مبدأ تقانة PCR

يقوم مبدأ هذه التقانة على تكرار عملية تضاعف DNA في الزجاج باستخدام مرئسات (بادئات) Primers نوعية.

المرئسات (البادئات) عبارة عن شفع من قليلات النكليوتيدات Oligonucleotides تصنع بشكل كيميائي في المختبر، ويتم اختيارها بشكلٍ نوعي بحيث **تتشافع مع أطراف التسلسل المراد تضخيمه في النهاية `3**.

تستخدم قليلات النكليوتيدات هذه كبادئة لاصطناع سلسلة جديدة من DNA اعتباراً من DNA أحادي السلسلة "القالب" (Matrix أو Template) الذي ينتج عن تسخين DNA الهدف ثنائي السلسلة.

يصنع DNA الجديد بوساطة تفاعل أنزيمي في الزجاج (تفاعل اصطناع أو بلمرة) ابتداءً من البادئات المتشافعة على DNA القالب وذلك باستخدام أنزيم DNA بوليميراز خاص.

1985

Invitro amplification achieved
--with *E.coli* DNA polymerase--

unstable with heat

فكرة رائعة لكن غير عملية.

إضافة الأنزيم باستمرار. !

لأنه يتخرب بالحرارة

1988

اكتشاف بوليميراز مقاومة للحرارة

Invitro amplification achieved
--with *Taq* DNA polymerase--

1989

Taq DNA polymerase cloned and expressed in *E.coli*

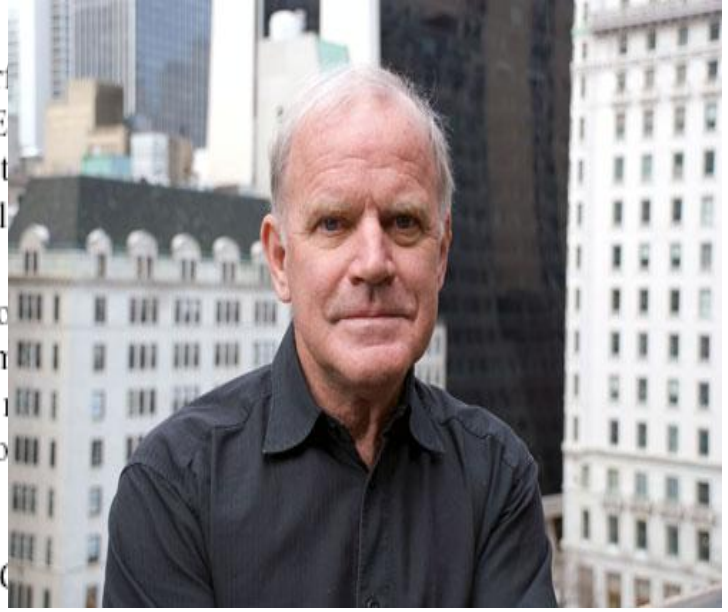
Saiki R, K.; Schar
A.; Arnheim N., E
sequences and rest
anemia, Science, 1

Mullis K. B; Faloo
A., Specific enzym
polymerase chain r
Quantitative Biolo

Scharf S. J; Horn (
ar
S

S
M
w
2

L
Gelfand D. H. Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from Thermus aquaticus. Journal of Biological Chemistry, 1989 Apr 15, 264(11):6427-37.



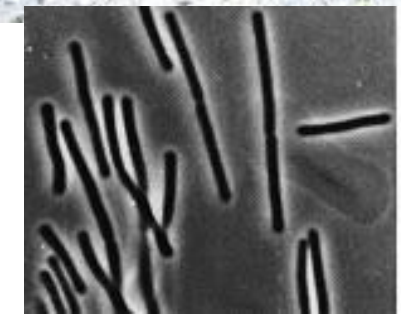
Kary Mullis, the inventor of PCR, was awarded the Nobel Prize in Chemistry

مخترع PCR وحامل جائزة نوبل في الكيمياء

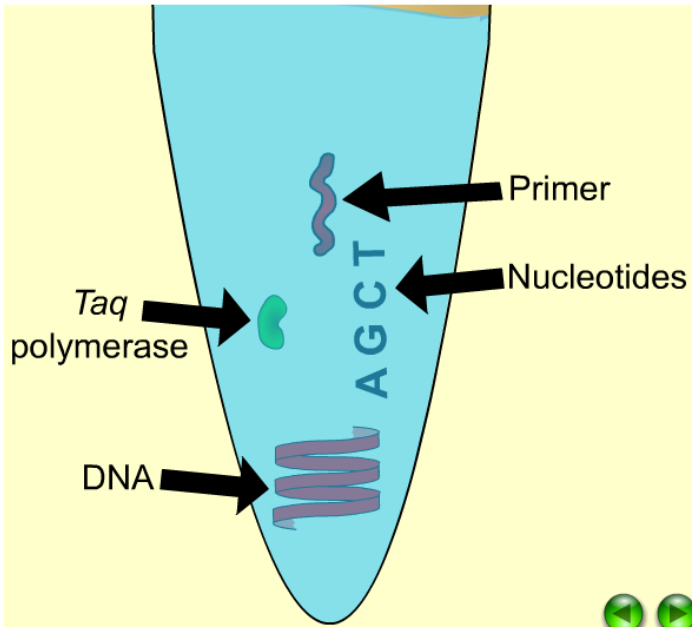
Developed automatic “thermocycler” programmable heat block

تطوير جهاز آلي يعرف بالمدور الحراري يحوي على قالب حراري قابل للبرمجة

عزل هذا الأنزيم ابتداءً من بكتيريا محبة للحرارة Thermopile، تعيش في الينابيع الحارة، حيث يبقى هذا الأنزيم فعالاً ولا يتخرب أثناء مرحلة التسخين الضرورية لفك تشافع الحلزون المزدوج لـDNA أي أنه يتحمل درجة حرارة تقارب 95م°.



Hot water bacteria: *Thermus aquaticus* *Taq* DNA polymerase



المواد اللازمة لتفاعل PCR:

-DNA القالب.

-شفع من المرئسات (البادئات).

-أنزيم DNA بوليمراز، من نمط Taq بوليميراز مع البفر المناسب.

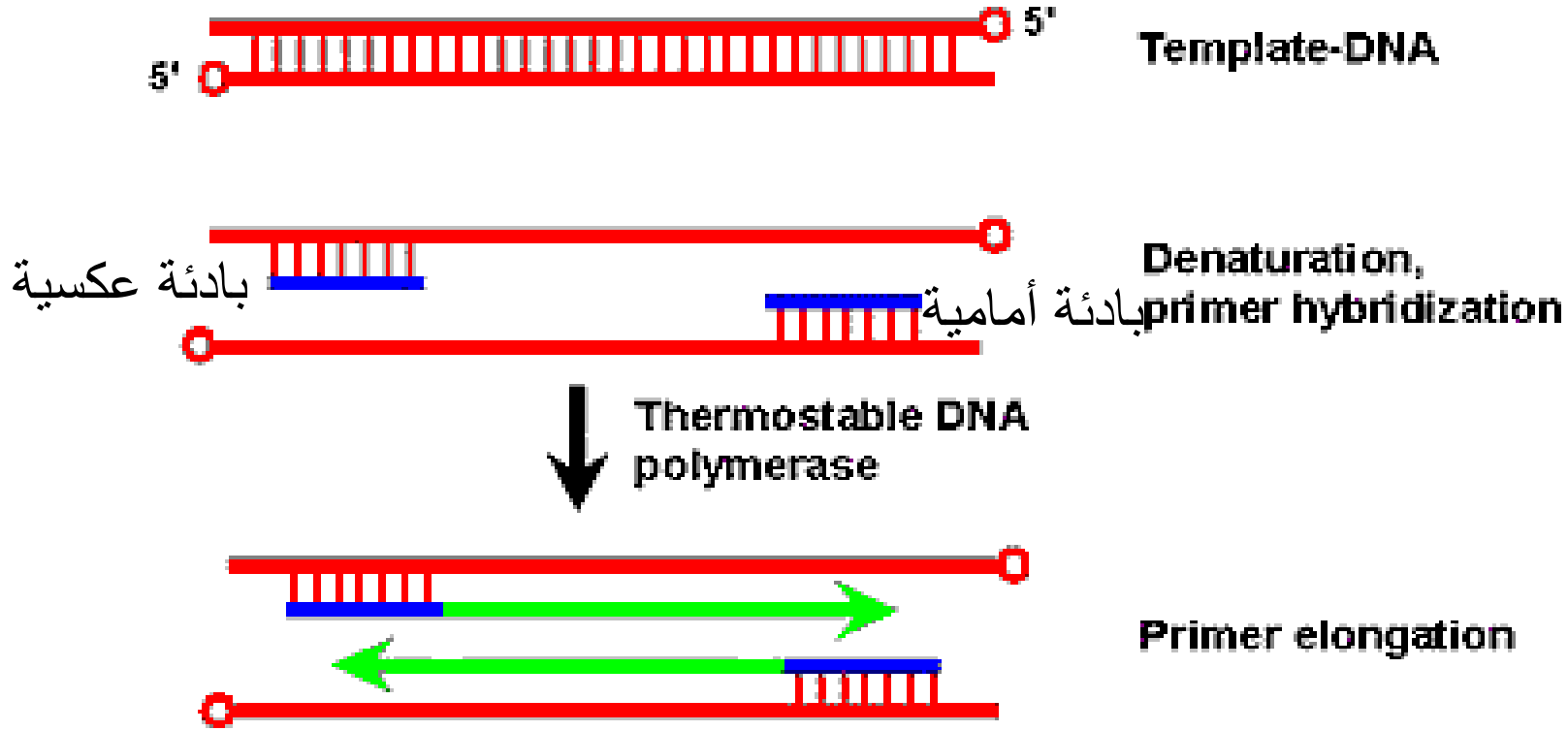
-نكليوتيدات حرة dNTPs.

المدور الحراري

يقوم تفاعل PCR على تتالي دورات من ثلاث مراحل:

- المرحلة الأولى فصل شريطتي DNA التمسخ Denaturation فك التشافع برفع درجة الحرارة (بدل استعمال الهليكاز).
- المرحلة الثانية تشافع البادئات Annealing مصنعة جاهزة (بدل استعمال البريماز).
- المرحلة الثالثة اصطناع DNA الجديد (Taq بوليميراز بدل البوليميراز III).

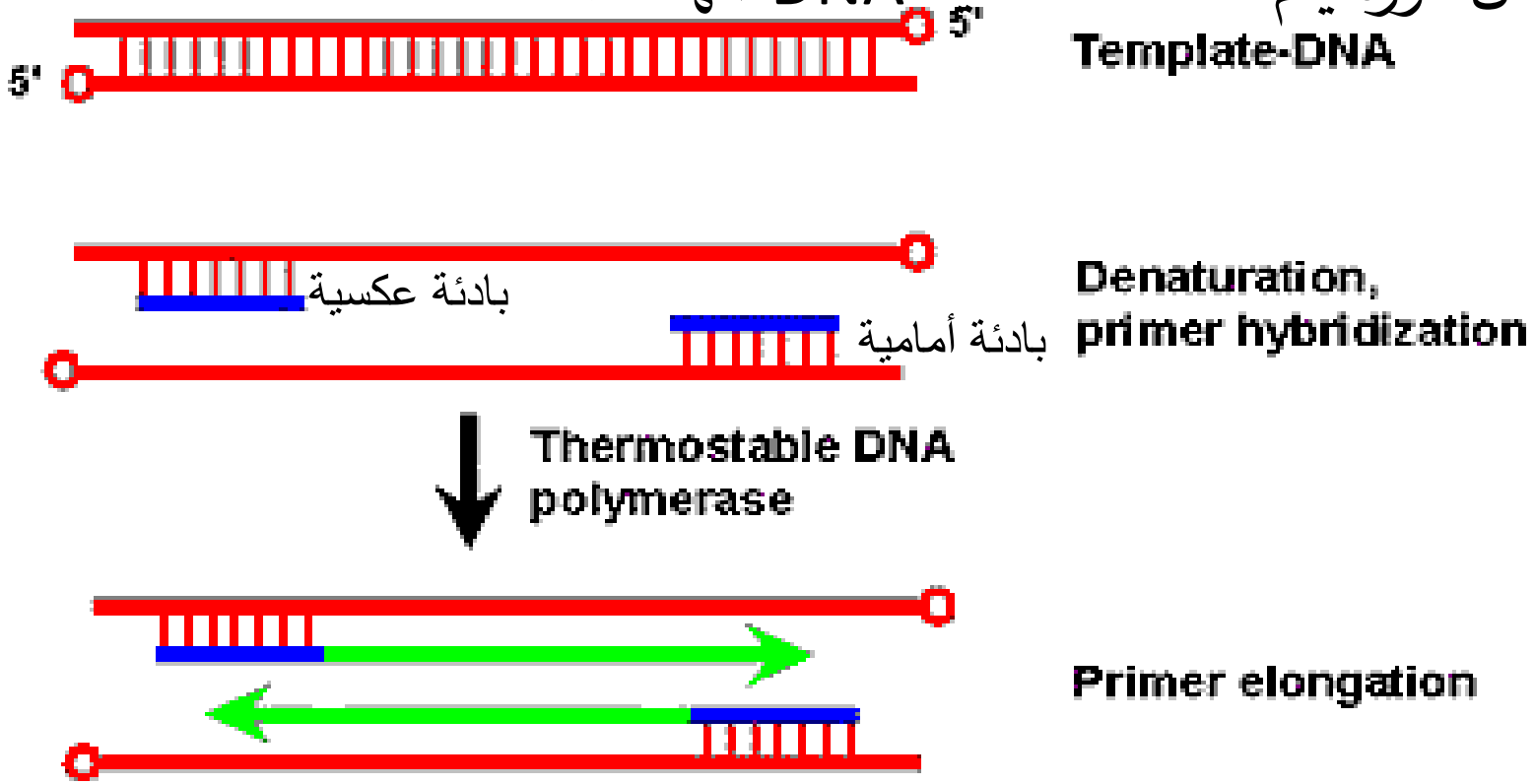
في نهاية كل دورة يتم مضاعفة كمية DNA الهدف.



يقوم تفاعل PCR على تتالي دورات من ثلاث مراحل:

- المرحلة الأولى فصل شريطتي DNA (فك التشافع أو التمسخ Denaturation).
- المرحلة الثانية تشافع البادئات Annealing .
- المرحلة الثالثة اصطناع DNA الجديد (استطالة).

في نهاية كل دورة يتم مضاعفة كمية DNA الهدف.



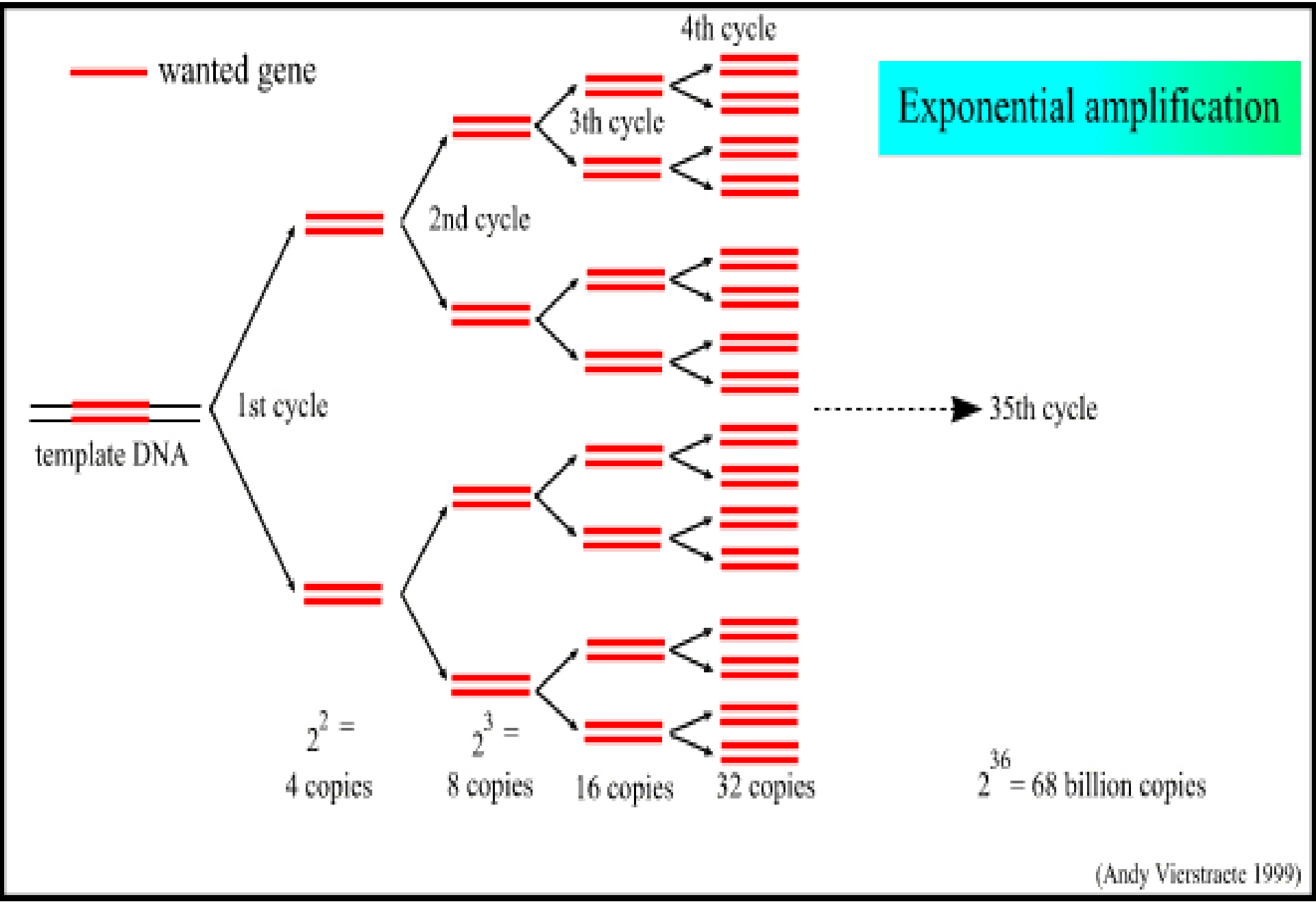
تُسخن شدفة DNA المراد تضخيمها أو تضخيم أجزاءٍ منها إلى نحو 94م° حيث تُحَطم الروابط الهيدروجينية بين الأسس المتشافعة للحلزون المزدوج لـDNA عند هذه الدرجة.

تسمى هذه العملية فك التشافع أو التمسخ Denaturation.

يتم بعدها تبريد الجملة إلى درجة حرارة تتراوح بين 55و70م° (درجة الحرارة هذه على علاقة وثيقة بطبيعة المرئسات وتدعى Tm المرئسة)، وعند درجة الحرارة هذه تتشافع المرئسات Annealing مع النهايات '3 من كل سلسلة أحادية الشريطة.

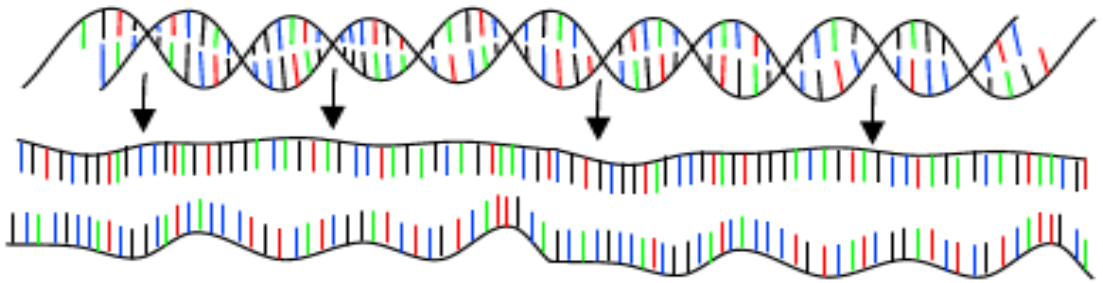
بعدها يتم رفع الحرارة إلى الدرجة 72م° حيث عند هذه الدرجة يعمل أنزيم DNA بوليميراز الخاص الذي تم إضافته إلى التفاعل على اصطناع شريطة جديدة من DNA.

- تستخدم الشدف المصنعة حديثاً في نهاية كل دورة كقالب في الدورة التالية وتتكرر تفاعلات الاصطناع دورة بعد دورة مضاعفةً عدد الشدف الناتجة بعد كل دورة.
- ومن هنا يأتي اسم التفاعل السلسلي للبوليميراز حيث يتم تكرار التفاعلات واحداً تلو الآخر بشكل سلسلة. وبصورة عملية يلزمنا تقريباً حوالي 30 دورة لتضخيم تسلسل ما من DNA بشكل فعال ويكون نظرياً عدد الشدف الناتجة هو 2^n حيث n هو عدد الدورات وبهذا الشكل يكون تزايد عدد شدف DNA المضخم وفقاً لمتوالية هندسية.
- لا تستغرق عادةً الدورة الواحدة أكثر من ٥ دقائق، فإذا كان من المفترض القيام بـ30 دورة فخلال حوالي ثلاث ساعات نكون قد ضخمنا التسلسل الهدف من DNA عدة ملاين من المرات.


wanted gene
Exponential amplification
4th cycle
3th cycle
2nd cycle
1st cycle
template DNA
35th cycle
2^2 =
4 copies
2^3 =
8 copies
16 copies
32 copies
2^{36} = 68 billion copies
(Andy Vierstraete 1999)

PCR : Polymerase Chain Reaction

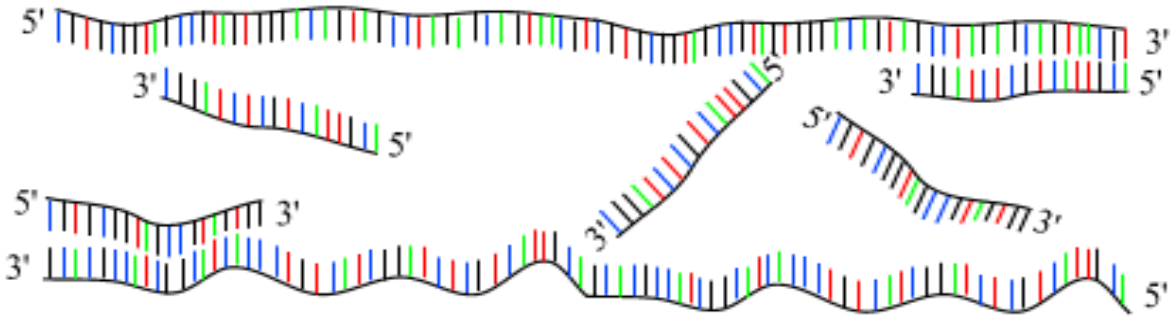
30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

فك التشافع أو التمسخ

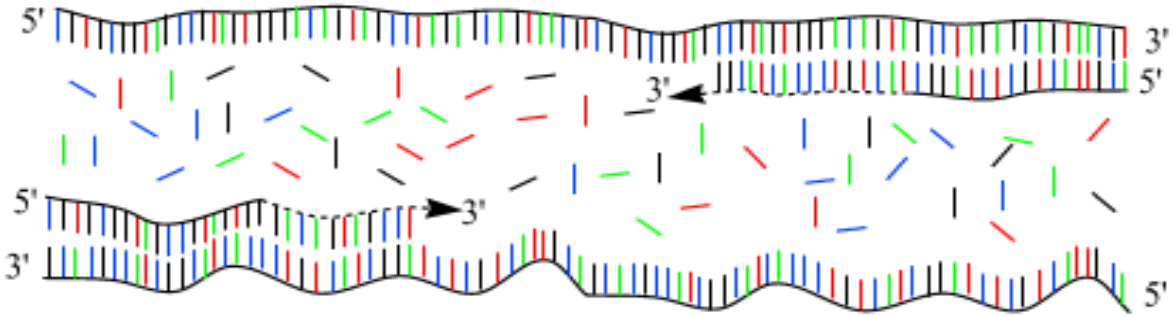


Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

تشافع المرئسات

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's

الاستطالة

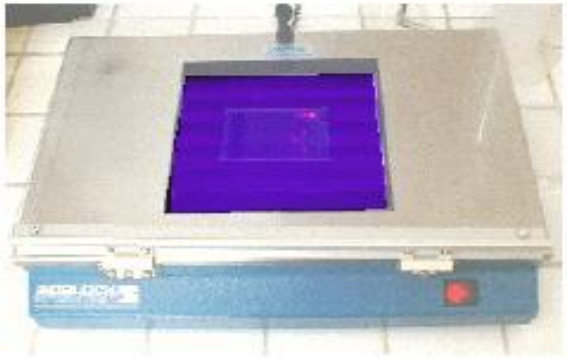
(Andy Vierstraete 1999)

كيفية قراءة النتائج: رحلان كهربائي تحليلي

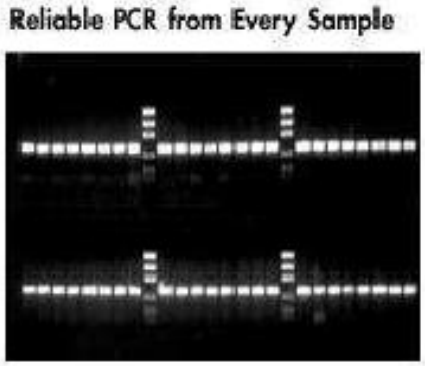
PCR

Agarose gel electrophoresis

3-4 hours



UV visualisation

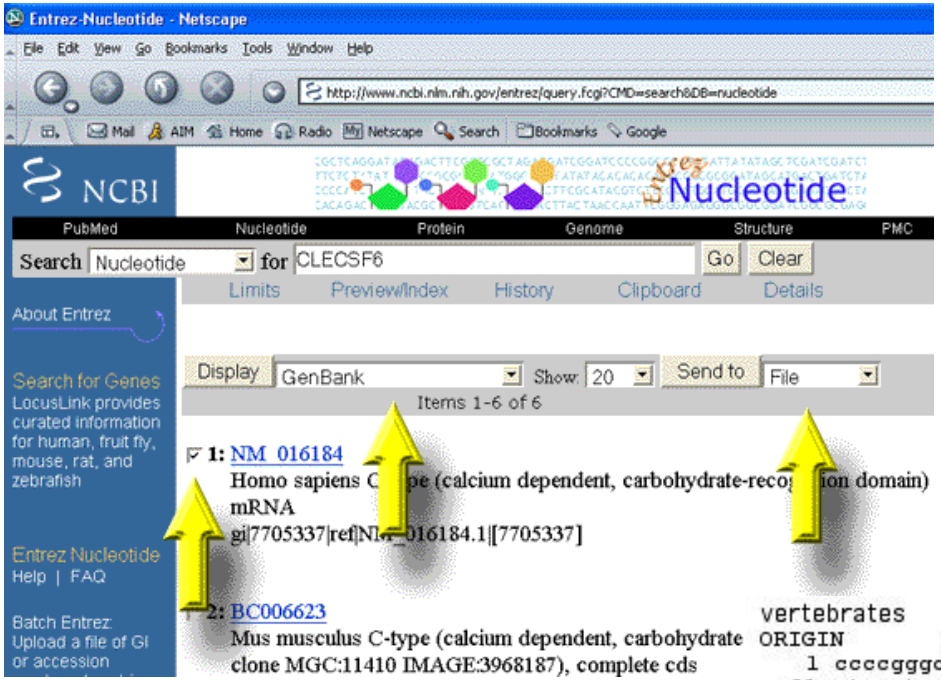


The final product

- يعد PCR تفاعلاً حساساً للغاية إذ يمكن نظرياً بواسطته الكشف عن جزيء واحد من DNA ضمن عينة ما، كما يمكن الكشف عن آثار من RNA وذلك بتحليلها بنفس الطريقة بعد نسخها إلى DNA باستخدام أحد أنزيمات النسخ العكسي.
- ولقد أصبح من غير الممكن الاستغناء أو الاستعاضة عن هذه التقانة في تشخيص الكثير من الأمراض الجينية قبل الولادة وبعدها كما وتستخدم بشكل دوري في مختبرات الأوبئة والطفيليات للكشف عن الأمراض الفيروسية والجرثومية والطفيلية المختلفة بحساسية عالية جداً، إذ تعد تقانة عالية الدقة في الكشف المبكر عن الإمراضية حتى قبل أن تستطيع الطرائق المناعية التقليدية المعتمدة على تفاعل ضد مستضد أن تكشفها.
- ويستخدم PCR حالياً بكثرة في الطب الشرعي وذلك لكشف هوية المجرمين عن طريق فحص بصماتهم الجينية، وفي فحوصات تحديد البنوة حيث تعطي نتيجة مضمونة 100%.

فكرة عن خطوات العمل

- الحصول على التسلسل المراد تضخيمه من البنوك الجينية.



vertebrates

ORIGIN 173 bp upstream of BglII site.

```
   1 ccccgggctg tattcccctc catcgtgggc cgctctaggc accaaggtgt gatggtggga
  61 atgggtcaga aggactccta tgtgggtgac gaggcccaga gcaagagagg tatcctgacc
 121 ctgaagtacc ccattgaaca tggcattgtt accaactggg acgacatgga gaagatctgg
 181 caccacacct tctacaatga gctgcgtgtg gcccctgagg agcaccctgt gctgctcacc
 241 gaggcccccc tgaaccctaa ggccaaccgt gaaaagatga cccagatcat gtttgagacc
 301 ttcaacaccc cagccatgta cgtagccatc caggctgtgc tgtccctgta tgcctctggt
 361 cgtaccacgg gcattgtgat ggactccggt gacgggggtca cccacactgt gcccatctac
 421 gagggctatg ctctccctca cgccatcctg cgtctggact tggctggccg ggacctgacg
 481 gactacctca tgaagatcct gaccgagcgt ggctacagct tcaccaccac agctgagagg
 541 gaaatcgtgc gtgacatcaa agagaagctg tgctatgttg ctctagactt cgagcaggag
 601 atggccactg ccgcatcctc ttcctccctg gagaagagct atgagctgcc tgacggccaa
 661 gtcatcacta ttggcaacga gcggttccga tgccctgagg ctcttttcca gccttccttc
 721 ttgggtatgg aatcctgtgg catccatgaa actacattca attccatcat gaagtgtgac
 781 gttgacatcc gtaaagacct ctatgccaac acagtgttgt ctggtggtac caccatgtac
 841 ccaggcattg ctgacaggat gcagaaggag attactgctc tggctcctag caccatgaag
 901 atcaagatca ttgctcctcc tgagcgcaag tactctgtgt ggatcggtgg ctccatcttg
 961 gcctcactgt ccaccttcca gcagatgtgg atcagcaagc aggagtacga tgagtccggc
1021 ccctccatcg tgcaccgcaa gtgcttctag gcggactgtt actgagctgc gttttacacc
1081 ctttctttga caaaacctaa cttgcgcag
```

- تصميم المرئسات إما يدوياً أو باستخدام أحد البرامج الحاسوبية

يجب أن يتوفر في شفع المرئسات المستخدمة مجموعة من الشروط:

١- أن تكون قيمة Tm لكلا المرئستين قريبة جداً من بعضها لكي يتم التشافع مع التسلسل الهدف في درجة حرارة واحدة. كما يجب أن تكون هذه القيمة مرتفعة، فكلما كانت مرتفعة كان التفاعل نوعياً، مع مراعاة أن تبقى هذه القيمة أقل بخمس درجات على الأقل من درجة الحرارة الفضلى لعمل أنزيم البوليميراز المستخدم.

عادة ما تعطي قيم Tm المتراوحة بين 55 و ٦٨ درجة أفضل النتائج.

٢- يجب أن لا يسمح لها تسلسل نكليوتيداتها بأن تنثني على نفسها لتشكل بنية ثانوية معيقة للتشافع مع قالب DNA، وأن لا يسمح لها بأن تتشافع بعضها مع بعض.

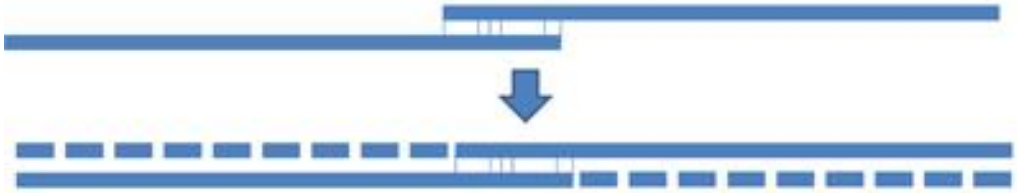
٣- من المفضل أن يكون محتواها من الأسس متوازناً وأن لا تتجاوز نسبة نكليوتيدي الستوزين والغوانين أي GC فيها 60%.

تتشافع مع ذاتها self-annealing فتنثني على نفسها لتشكل بنية ثانوية معيقة للتشافع مع قالب DNA.

(a)

hairpin loops
عروة الدبوس

(b)



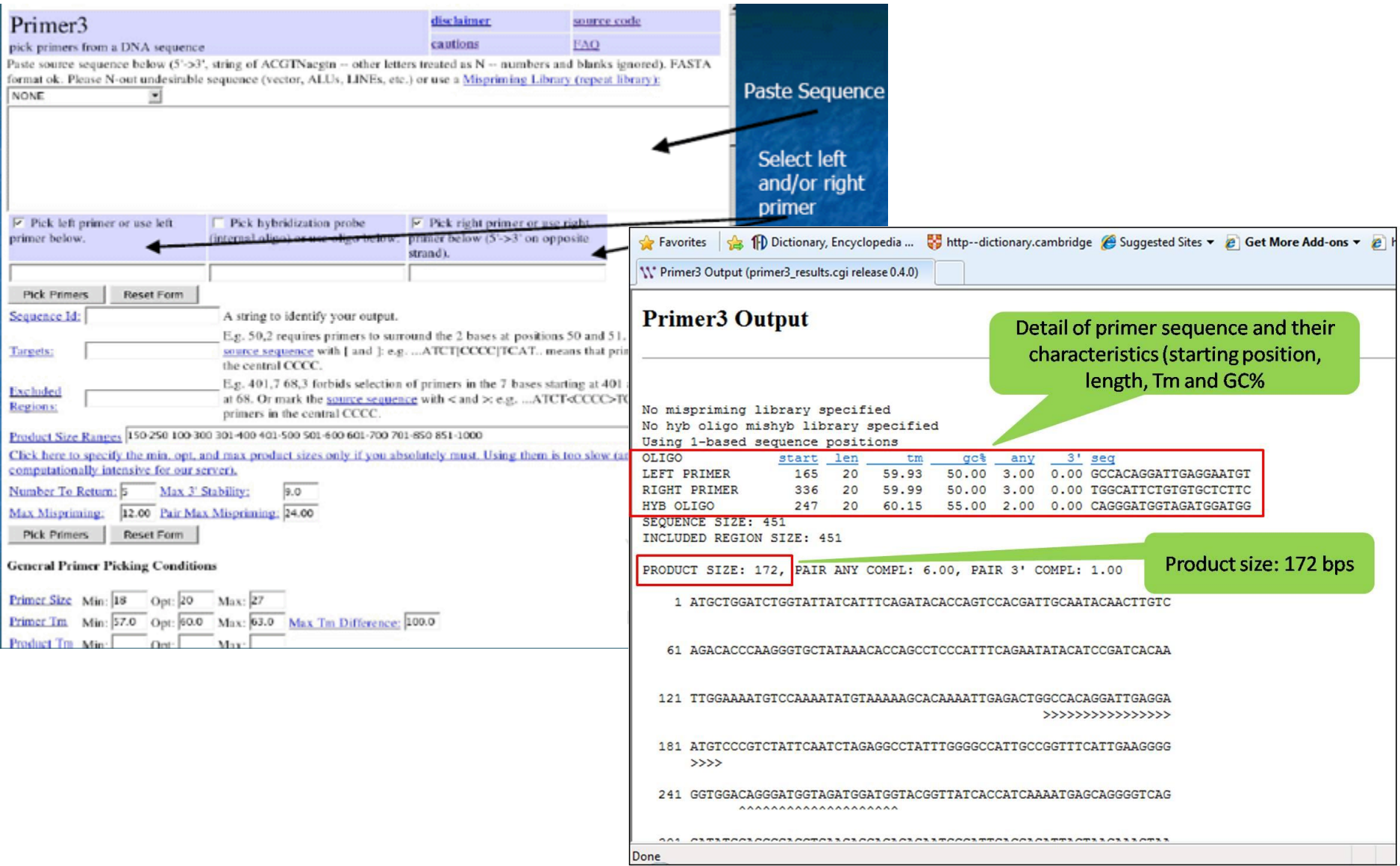
primer dimers

تتشافع مع بعضها، وتشكيل لثنائي قسيم primer dimers

حساب قيمة Tm المرئسة يدوياً:

$$T_m \approx 4(G\text{-}C) + 2(A\text{-}T)$$

يتوافر حالياً على الانترنت مجموعة من برامج المعلوماتية التي تستخدم بسهولة لتصميم المرئسات المثلى مثال Primer3



TYPES OF POLYMERASE CHAIN REACTION

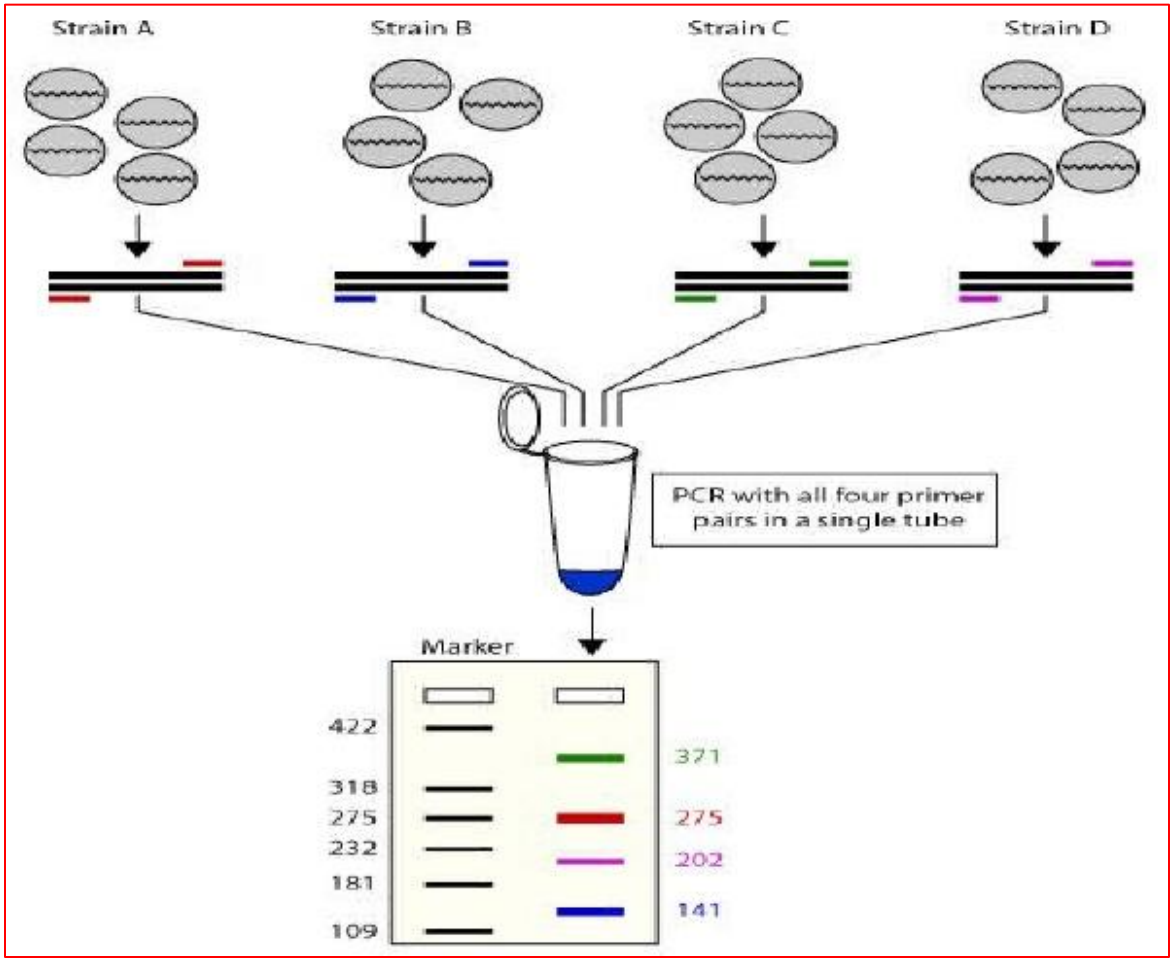
- **Multiplex PCR**

- في PCR العادي يستعمل شفع واحد من البادئات لتضخيم تسلسل معين من DNA، في حين يستعمل عدة أشفاع of primers multiple pairs لتضخيم عدة تسلسلات بنفس الوقت simultaneously في Multiplex PCR.
- هذه التسلسلات قد تكون موجودة في DNA واحد أو في عدد من DNA.
- أهم شروط هذا التفاعل إعطاء شدف مضخمة مختلفة بطولها amplicon sizes كفاية حتى يمكن تميزها كعصائب مختلفة على هلامة الرحلان الكهربائي.
- من أهم تطبيقاتها: الكشف عن العديد من العوامل الممرضة Pathogens Identification، وتحليل الطفرات Mutation Analysis.

Pathogen Identification

تحديد هوية العديد من العوامل الممرضة بتفاعل واحد

توفير الوقت والجهد



Mutation Analysis

الكشف عن العديد من الطفرات في تفاعل واحد

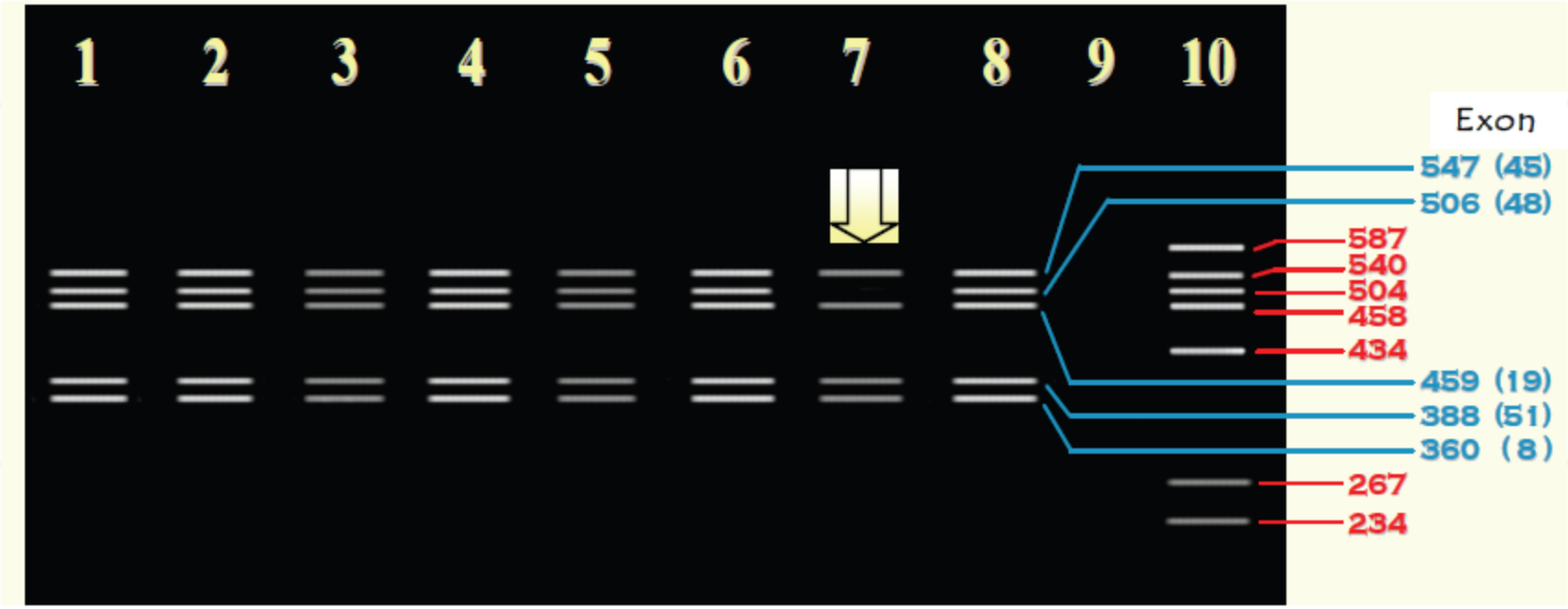


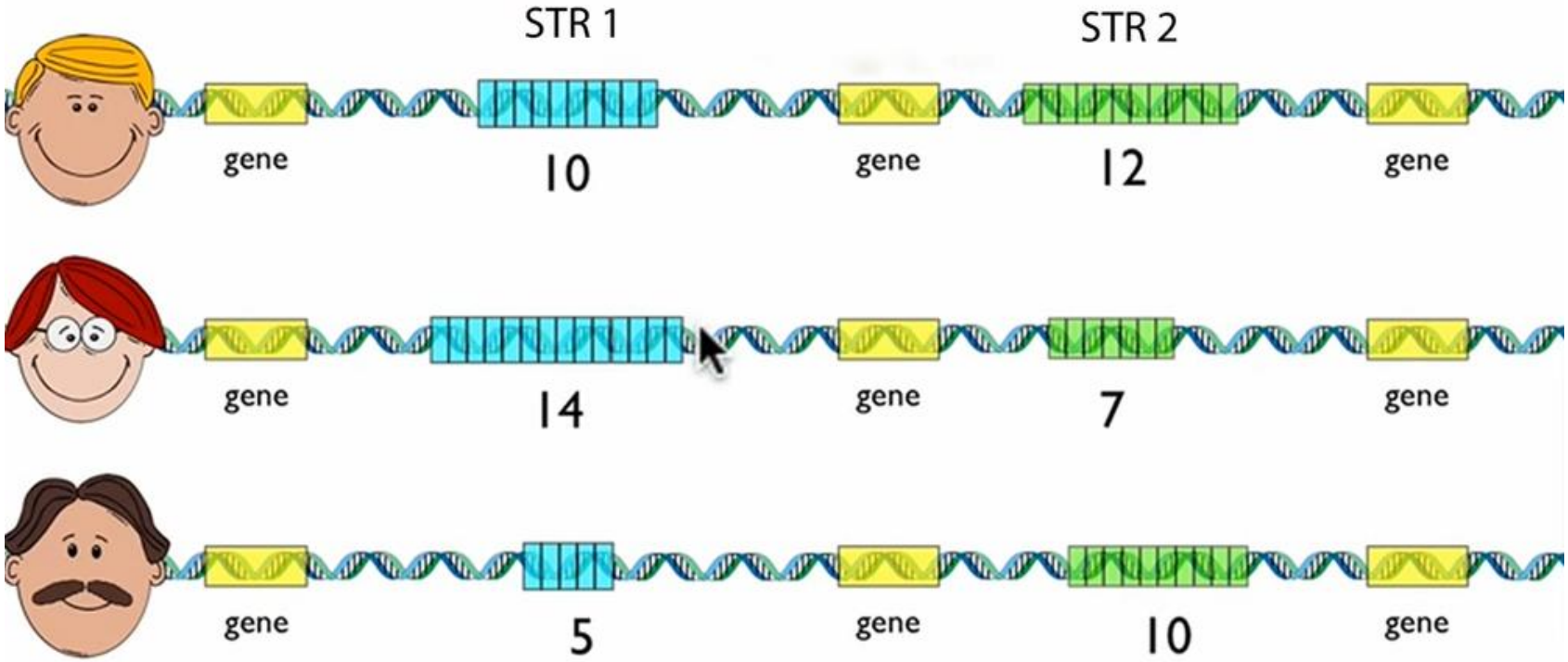
Fig. 2. Results of a multiplex PCR in a patient with Duchenne Muscular Dystrophy. Dystrophy gene has different mutations in exons; this is the cause of disease. In lane 7 is shown the absence of a band corresponding to exon 48 (506 bp) of the dystrophy gene (Hernández-Rodríguez et al., 2000; Hernández-Rodríguez & Restrepo, 2002).

الكشف عن الهوية الجينية وتحديد البنوة

- يعتمد هذا الاختبار على تضخيم مواقع محددة من الجينوم البشري تعرف هذه المواقع بالسواتل الصغيرة Microsatellite أو ما يعرف أيضاً STR, Short tandem repeat وهي عبارة على تسلسلات تكرارية ترادفية.

5′–CACACACACACACAC–3′
3′–GTGTGTGTGTGTGTG–5′

- يوجد الآلاف من هذه التسلسلات التكرارية في الجينوم البشري، يتألف كل منها من وحدة تكرارية مؤلفة من ١-١٠ نكليوتيدات متكررة ترادفياً (خلف بعضها البعض) عدد من المرات يصل إلى ٢٠ مرة.
- يختلف طول التسلسل التكراري بحسب عدد التكرارات.
- يختلف عدد التكرارات في الموقع الواحد بشدة بين أفراد النوع البشري.
- يمكن بوساطة تفاعل PCR وباستعمال بادئة تتشافع على أطراف التسلسل المدروس (تحصر التسلسل) من الكشف عن طول التسلسل.



A – 8 repeats

Forward primer

...GCTCCAGGCTTAGACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCGCACTTTAACGATACGG...
...CGAGGTCCGAATCTGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGCGTGAAATTGCTATGCC...

Reverse primer

B – 7 repeats

Forward primer

...GCTCCAGGCTTAGACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCGCACTTTAACGATACGG...
...CGAGGTCCGAATCTGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGCGTGAAATTGCTATGCC...

Reverse primer

C – 9 repeats

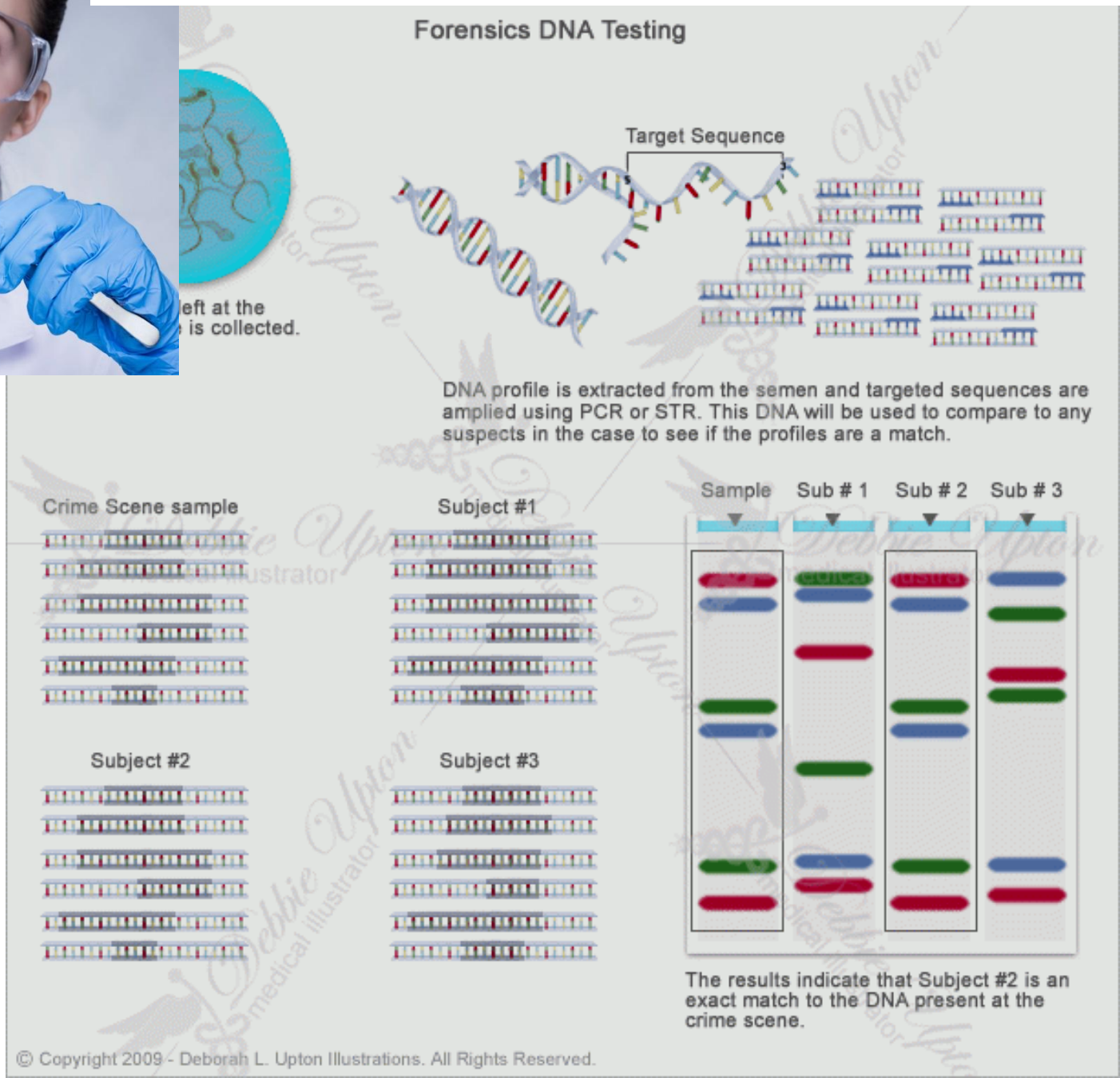
Forward primer

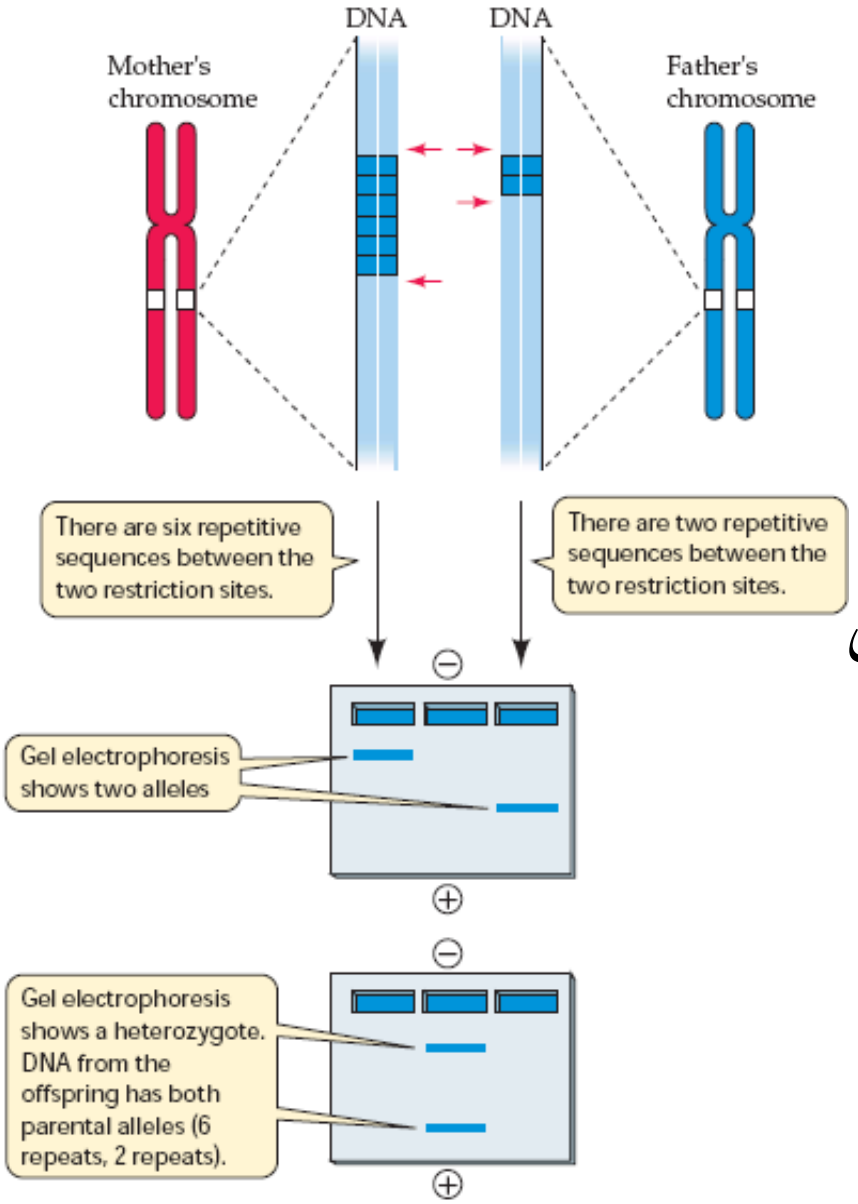
...GCTCCAGGCTTAGACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCGCACTTTAACGATACGG...
...CGAGGTCCGAATCTGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGCGTGAAATTGCTATGCC...

Reverse primer

- عالمياً تم تحديد ١٦ موقعاً من بين الآلاف المتوفرة لتحديد الهوية الجينية أو البصمة الوراثية لأفراد النوع البشري.
- لا يوجد شخصين يملكان نفس أطوال المواقع ١٦ على سطح الكرة الأرضية إلا التوائم الحقيقية.
- هذا الاختبار، يعد حالياً أهم اختبارات الطب الشرعي التي يعتمد عليها لتحديد هوية المجرمين، من بقايا الأثار البيولوجية التي يتركونها في مكان الجريمة.
- يستخلص DNA منها وتضخم المواقع ١٦ بوساطة PCR وترسم بصمة جينية للمشتبه به بعد عملية الرحلان الكهربائي.

الاستعمالات في الطب الشرعي: تحديد الهوية الجينية للمجرم



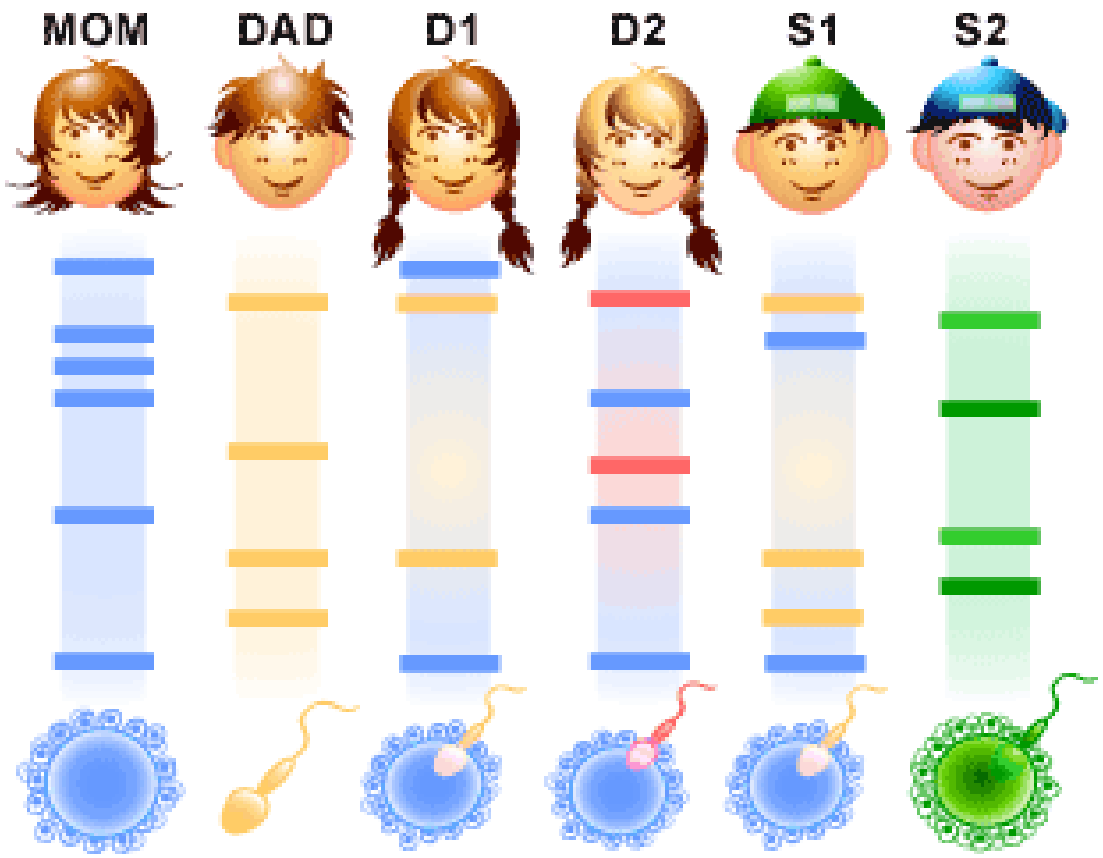


16.17 DNA Fingerprinting The number of VNTRs inherited by an individual can be used to make a DNA fingerprint.

يملك كل شخص أليلين (صنوين) من كل موقع، هذين الموقعين سينتقلان ذريته بحسب قوانين الوراثة المندلية، وبالتالي أي فرد سيملك لموقع معين إما الأليل الأبوي أو الأمومي.

وعليه يمكن تحديد البنوة باختبار البصة الوراثية.

DNA fingerprinting can be used to identify a child's parents.

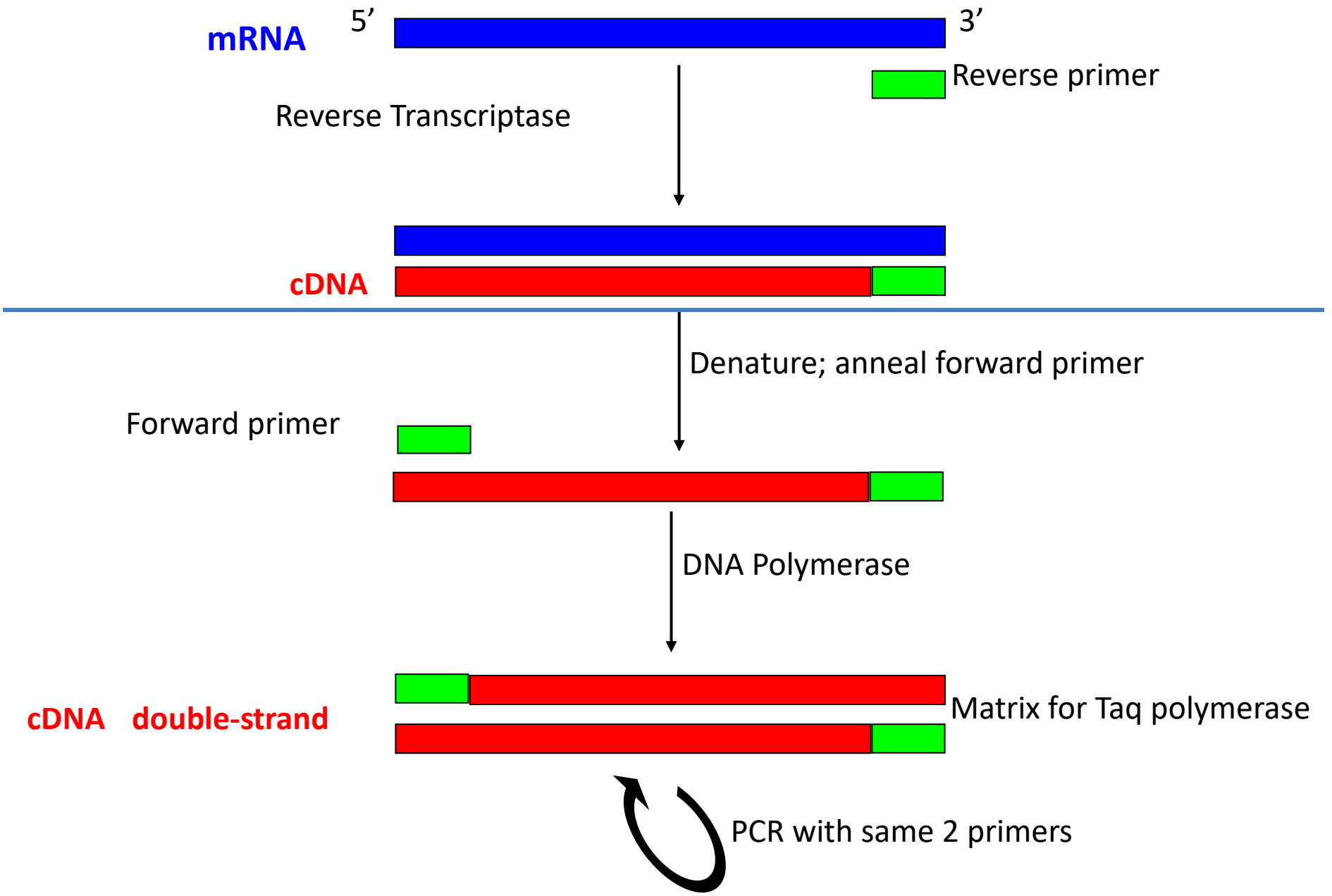


a family consists of a mom and dad, two daughters and two sons. The parents have one daughter and one son together, one daughter is from the mother's previous marriage, and one son is adopted

Reverse Transcriptase PCR RT-PCR

- تستعمل لتضخيم mRNA معروف التسلسل (أو على الأقل جزء من التسلسل).
- البدء مع mRNA بدل DNA ثنائي الشريطة.
- الخطوة الأولى: تحويل mRNA إلى cDNA أحادي الشريطة
- RNA →cDNA with reverse Transcriptase and reverse primer.
- الخطوة الثانية: استعمال البادئة الأمامية لتحويل الشريطة المفردة cDNA إلى شريطة مضاعفة.
- الناتج يستخدم كـ قالب في تفاعل PCR تقليدي.

Reverse Transcriptase PCR RT-PCR



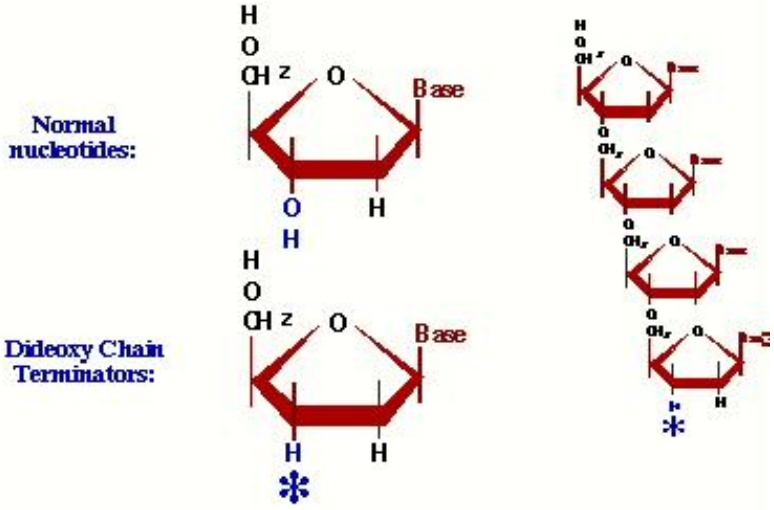
DNA Sequencing سلسلة DNA

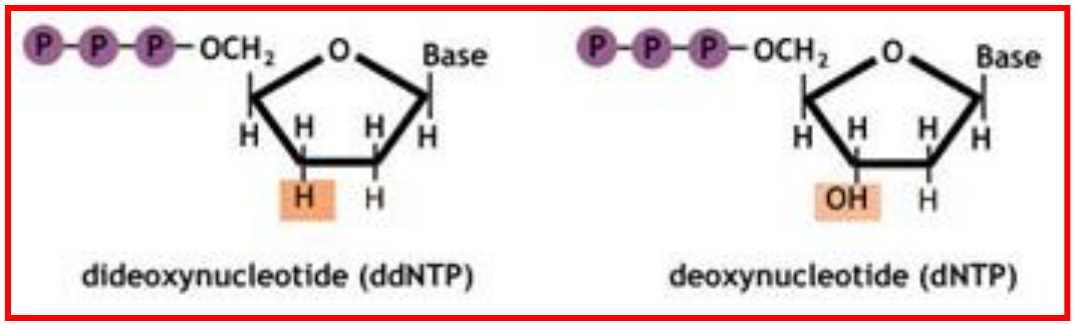
هي معرفة تتالي الأسس الآزوتية التي تكون تسلسل معين من DNA

تستخدم عادة طريقة سنجر للسلسلة Sanger sequencing method

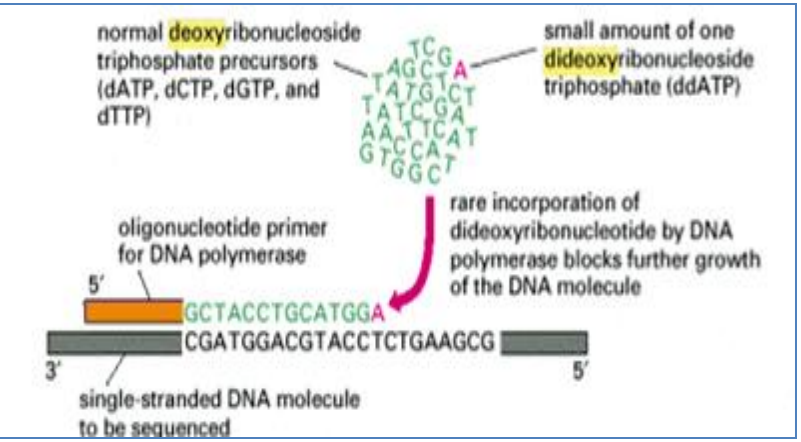
يتعمد مبدأ السلسلة على استخدام نكليوتيدات ثنائية منزوعة الأوكسجين منهية للسلسلة chain-terminating dideoxynucleotides يضيفها أنزيم DNA بوليميراز أثناء تضاعف DNA في الزجاج *in vitro* DNA replication إلى السلسلة النامية بشكل عشوائي.

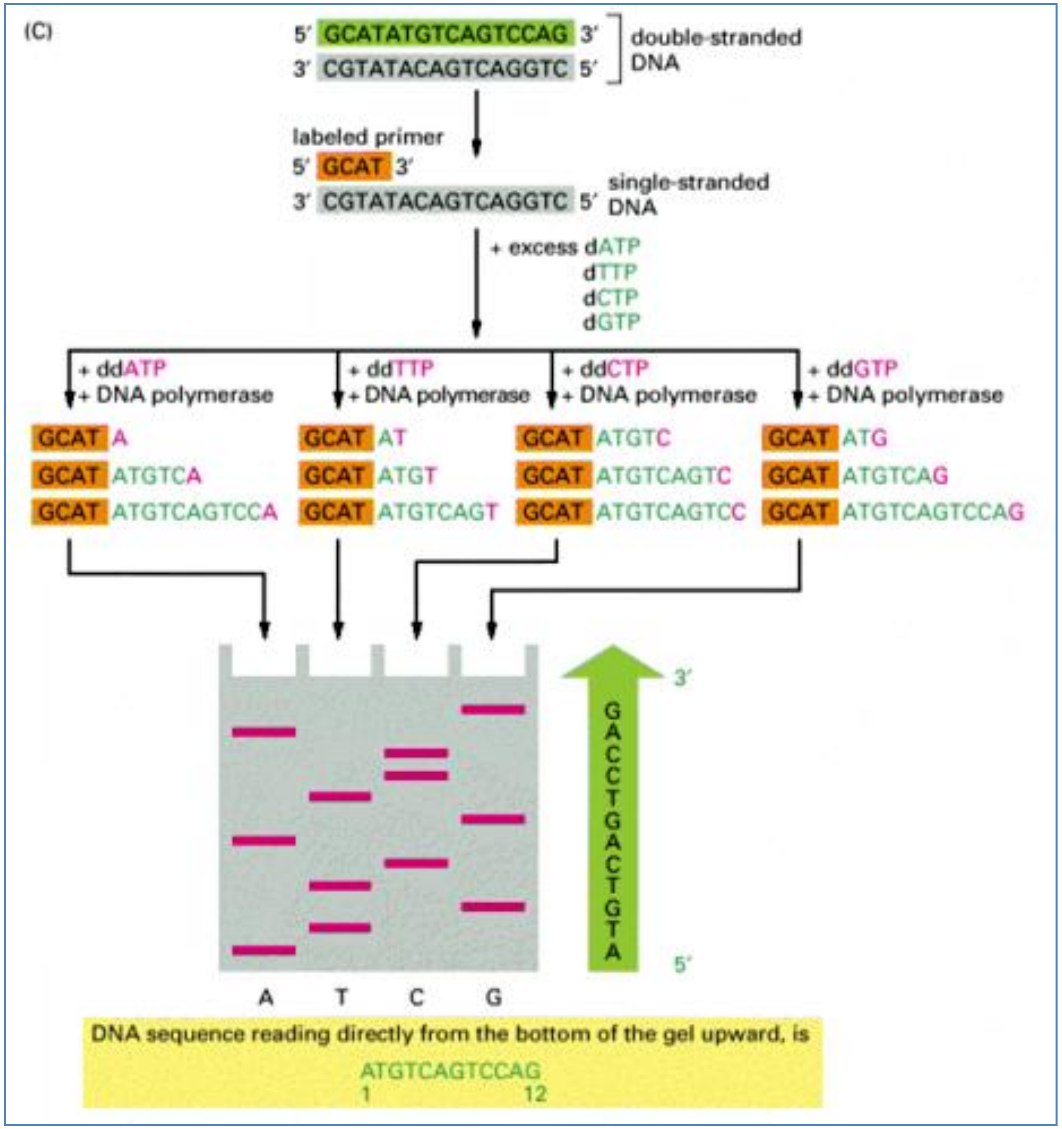
عندما يتم إضافة نكليوتيد منهي ddNTP يتوقف نمو (اصطناع) السلسلة.





The dideoxy method for sequencing DNA :

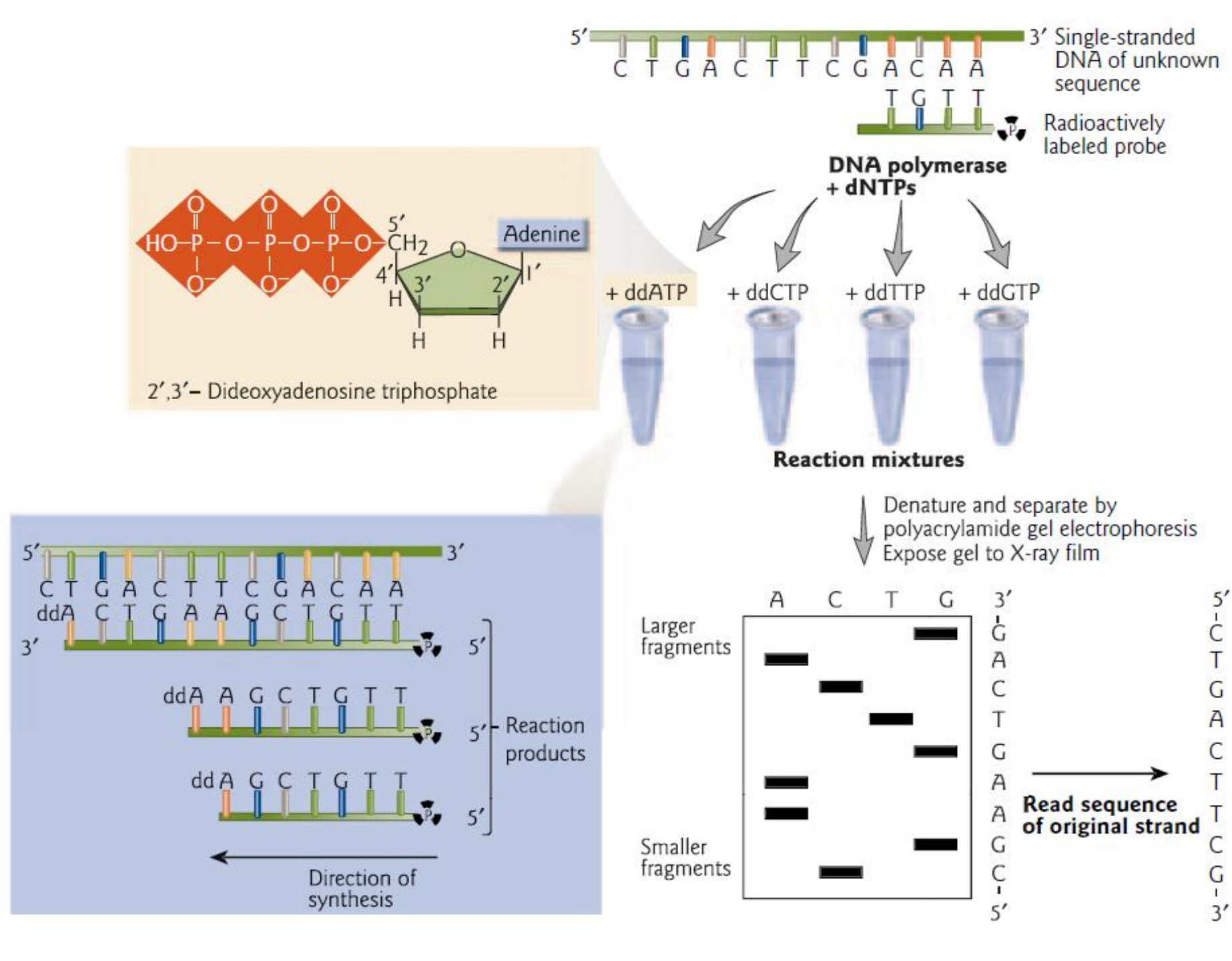


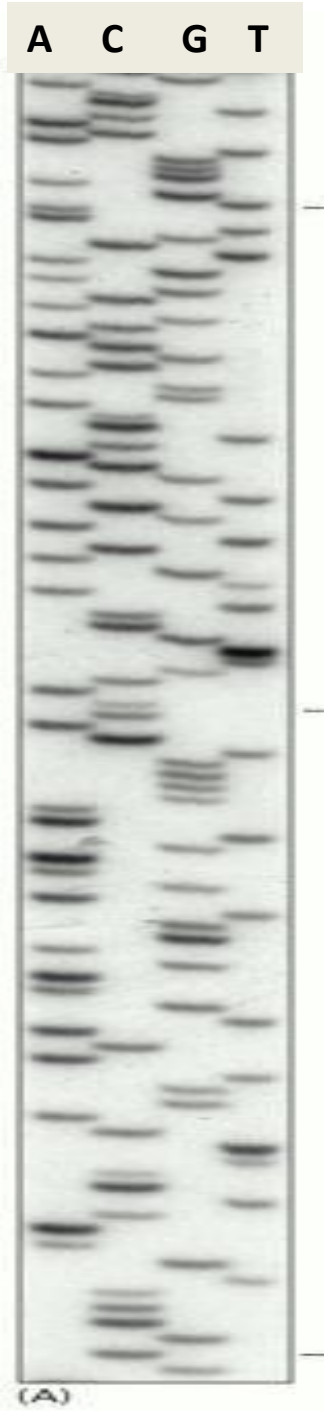


يعمد إلى إجراء أربع تفاعلات اصطناع DNA في الزجاج بشكل منفصل، يوضع في كل تفاعل النكليوتيدات الأربع منزوعة الأوكسجين وكمية معينة مدروسة بدقة من نكليوتيد ثنائي منزوع الأوكسجين.

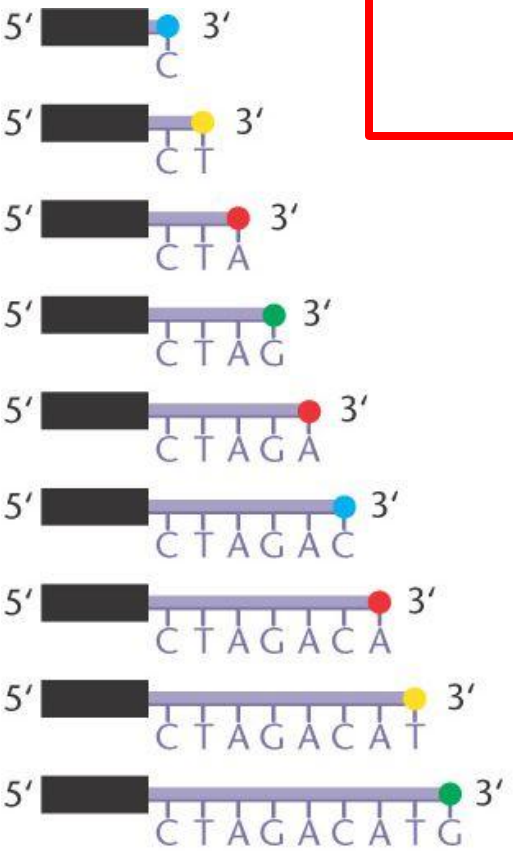
يتوقف اصطناع السلسلة عند ضمه عشوائياً.

بعد الرحلان الكهربائي سنحصل في كل تفاعل على شدفة منتهية بالنكليوتيد ثنائي منزوع الأكسجين في كل مواقعه.

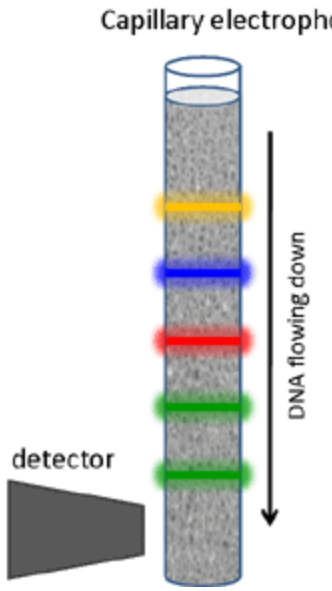

5′ C T G A C T T C G A C A A 3′ Single-stranded DNA of unknown sequence
T G T T
Radioactively labeled probe
DNA polymerase + dNTPs
+ ddATP
+ ddCTP
+ ddTTP
+ ddGTP
Reaction mixtures
Denature and separate by polyacrylamide gel electrophoresis
Expose gel to X-ray film
Adenine
2′,3′– Dideoxyadenosine triphosphate
5′ C T G A C T T C G A C A A 3′
ddA C T G A A G C T G T T
3′
ddA A G C T G T T
ddA G C T G T T
Reaction products
Direction of synthesis
A C T G
Larger fragments
Smaller fragments
3′ G A C T G A A G C 5′
Read sequence of original strand
5′ C T G A C T T C G 3′


A C G T
(A)

السلسلة الآلية



4. Electrophoresis, imaging, data analysis



= AATCG

Automatic sequencing machine

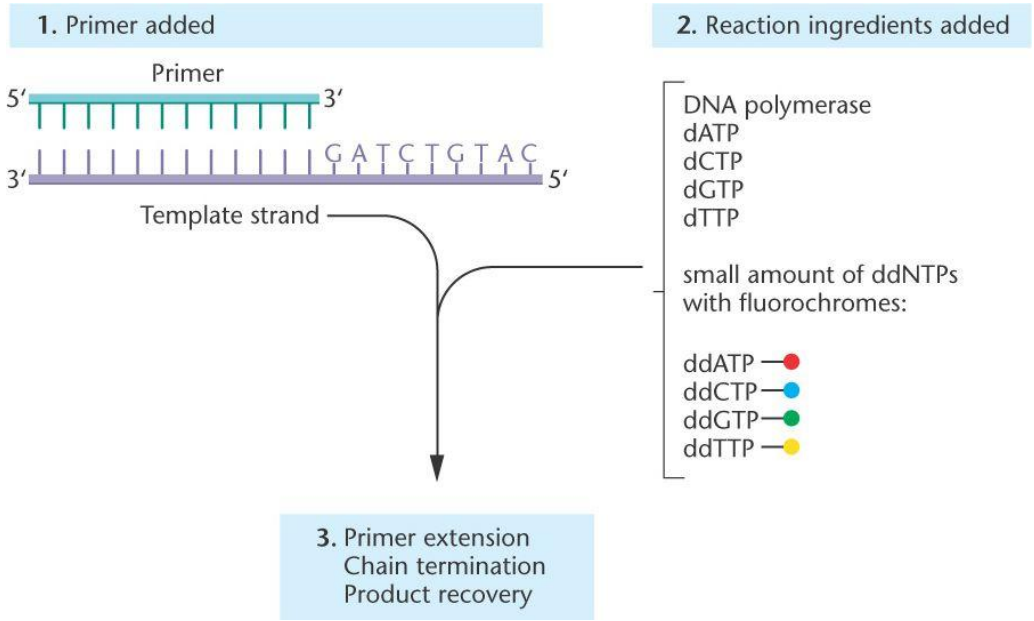
DNA sequencer : Genome Analyzer

السلسلة الآلية

- نحتاج لإنجاز تفاعل السلسلة الآلية إلى:

DNA، أنزيم بوليميراز، بادئة، نكليوتيدات حرة dNTPs، نكليوتيدات منهية ddNTPs موسومة بصباغ فلورة (fluorescent dyes) كل نكليوتيد بصباغ فلورة معين.

تضاف هذه النكليوتيدات المنهية بتراكيز محسوبة بدقة بحيث يتم إضافتها بشكل عشوائي أثناء تفاعل البناء. يتوقف نمو السلسلة بعد إضافتها.

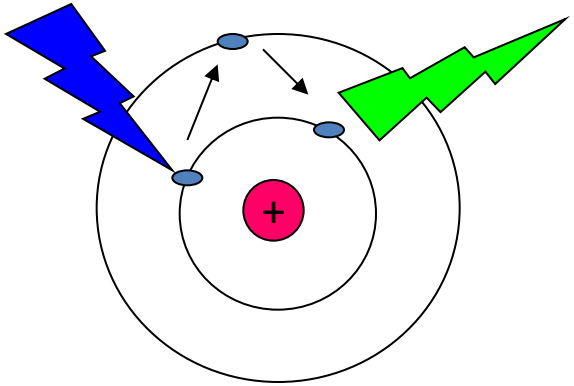


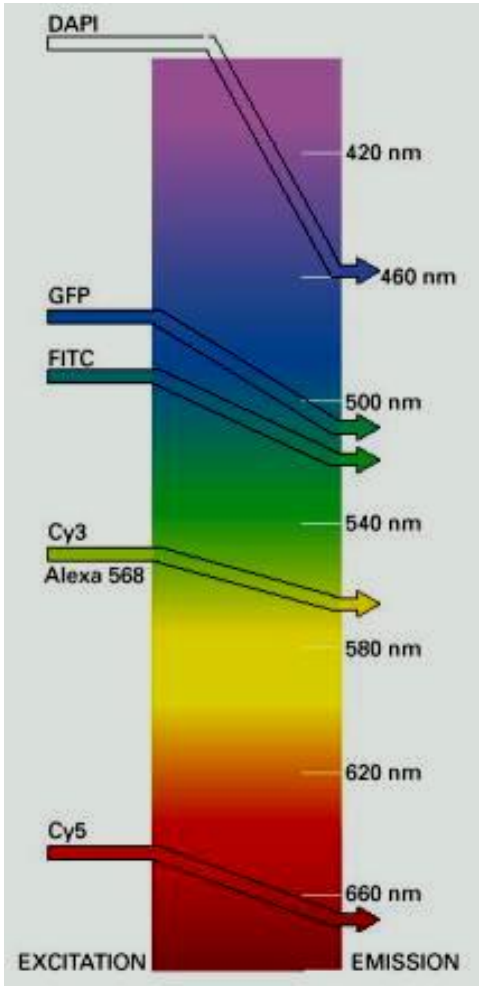
FLUOROPHORES

الفلورسين / الرودامين

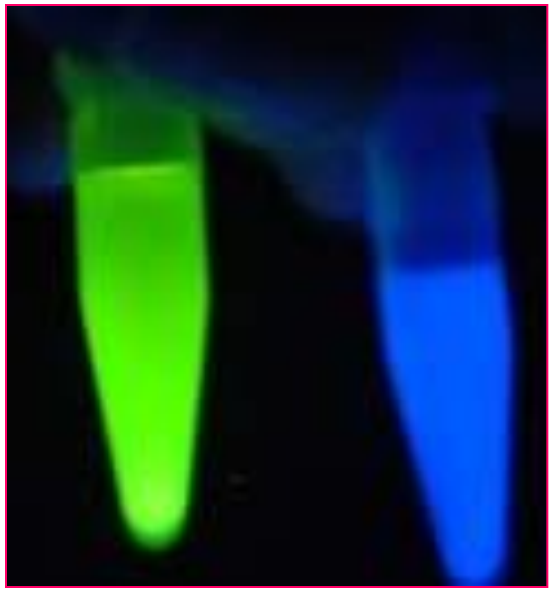
CY3 / CY5

Alexa 488/ 568/ 645





ترى هذه الجزيئات مضيئة إذا تمت استثارتها بشعاع ضوئي طول موجته تعادل طول موجة الامتصاص (التهيج، استثارة) الخاصة بها.
اللون الذي تتألق به هو لون طول موجة الإصدار.



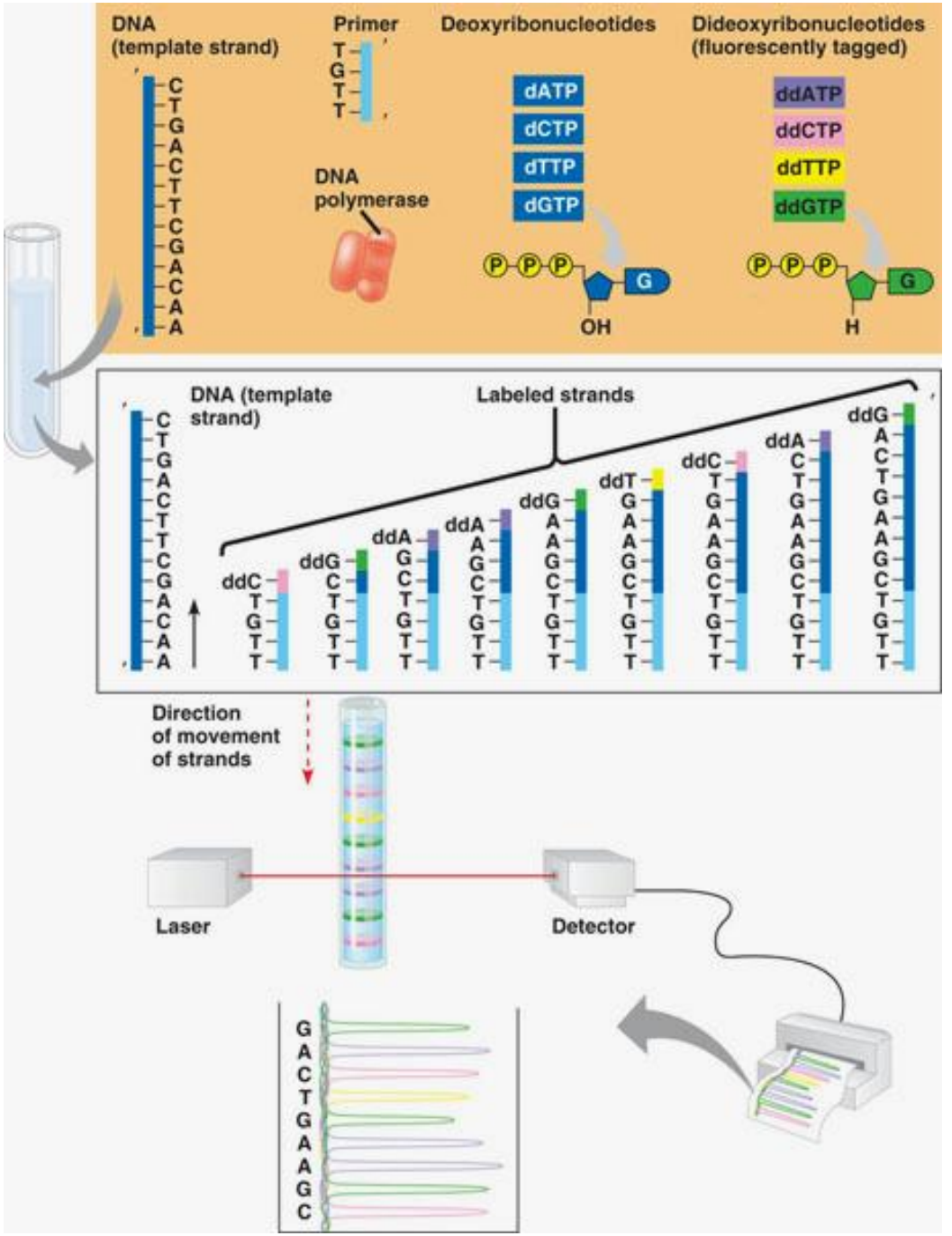
•بما أن النكليوتيدات الأربعة ثنائية منزوعة الأوكسجين موسومة بألوان مختلفة يمكن انجاز تفاعلات الإصطناع الأربعة ضمن نفس الأنبوب.

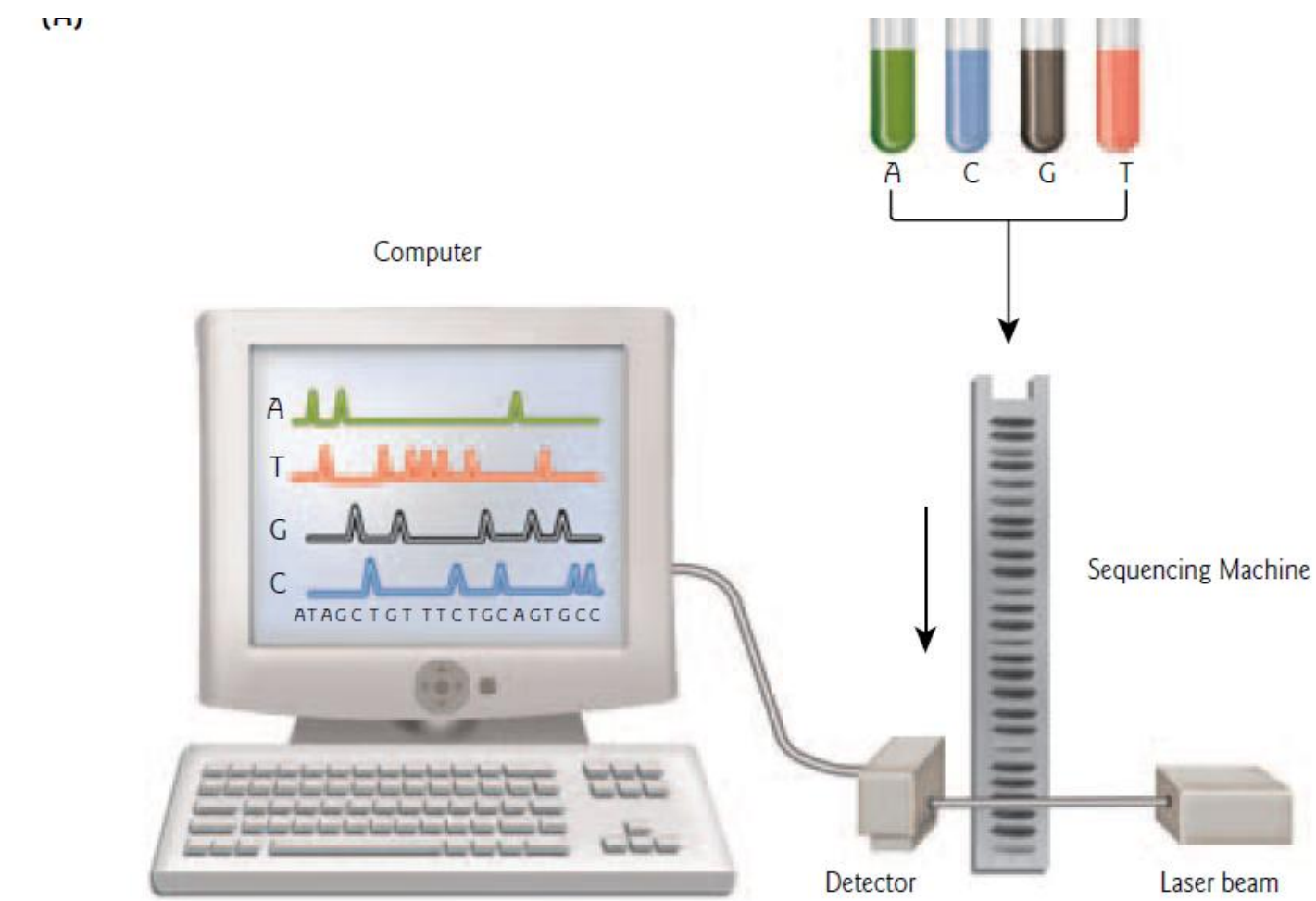
•يمكن فصل المنتجات في خط واحد (بئر واحدة) من الهلامة.

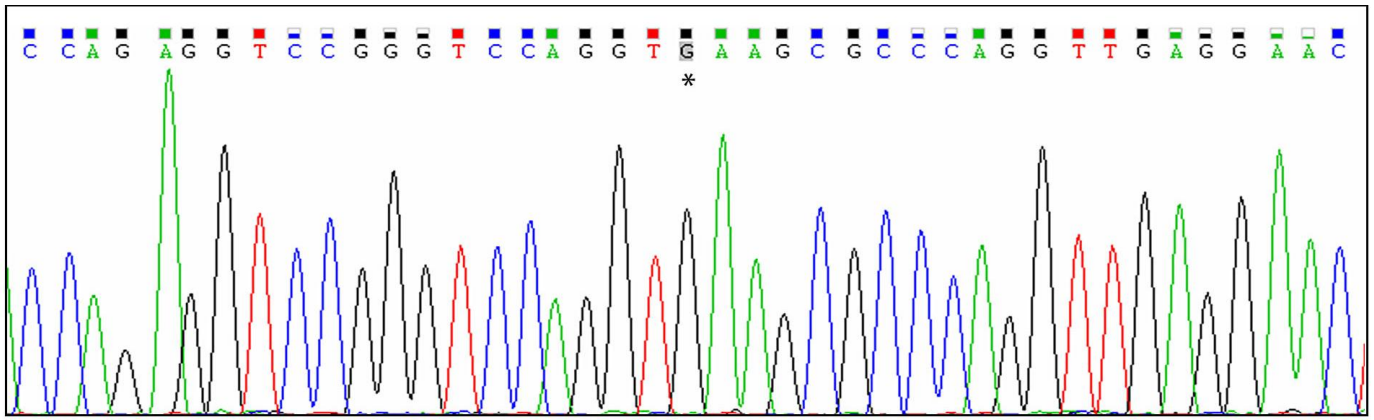
•يستعمل عمود رحلان شعري.

•في أسفل العمود ليزر لاستثارة الصباغ المفلور في كل عصابة وكاشف Detector (حساس) للون الفلورة.

• كومبيوتر مبرمج لقراءة اللون وتحول إلى النكليوتيد الموافق

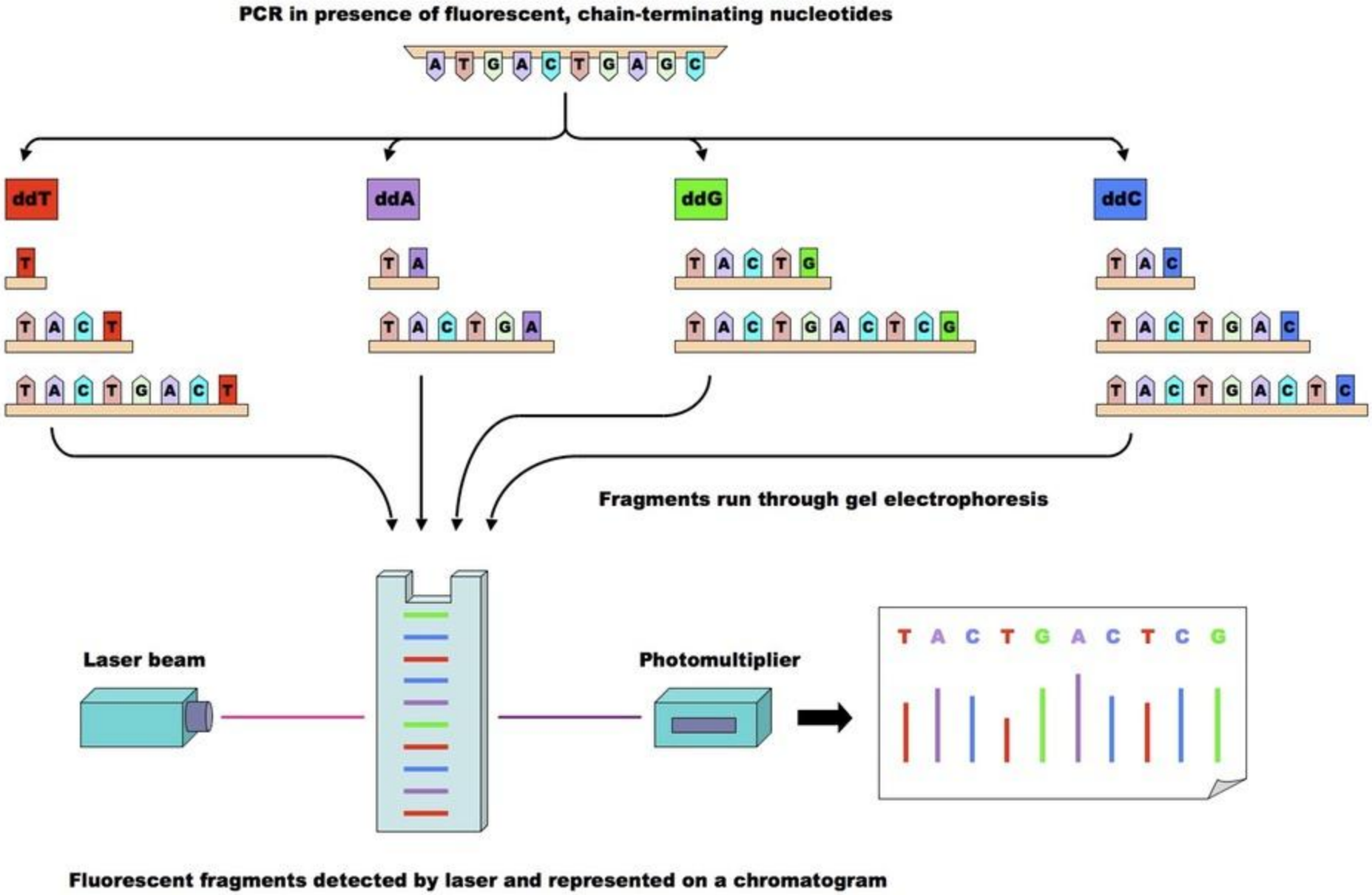






Electrophoretogram

Electropherogram


PCR in presence of fluorescent, chain-terminating nucleotides
A T G A C T G A G C
ddT
ddA
ddG
ddC
T
T A
T A C
T A C T
T A C T G
T A C T G A
T A C T G A C
T A C T G A C T
T A C T G A C T C
T A C T G A C T C G
Fragments run through gel electrophoresis
Laser beam
Photomultiplier
T A C T G A C T C G
Fluorescent fragments detected by laser and represented on a chromatogram