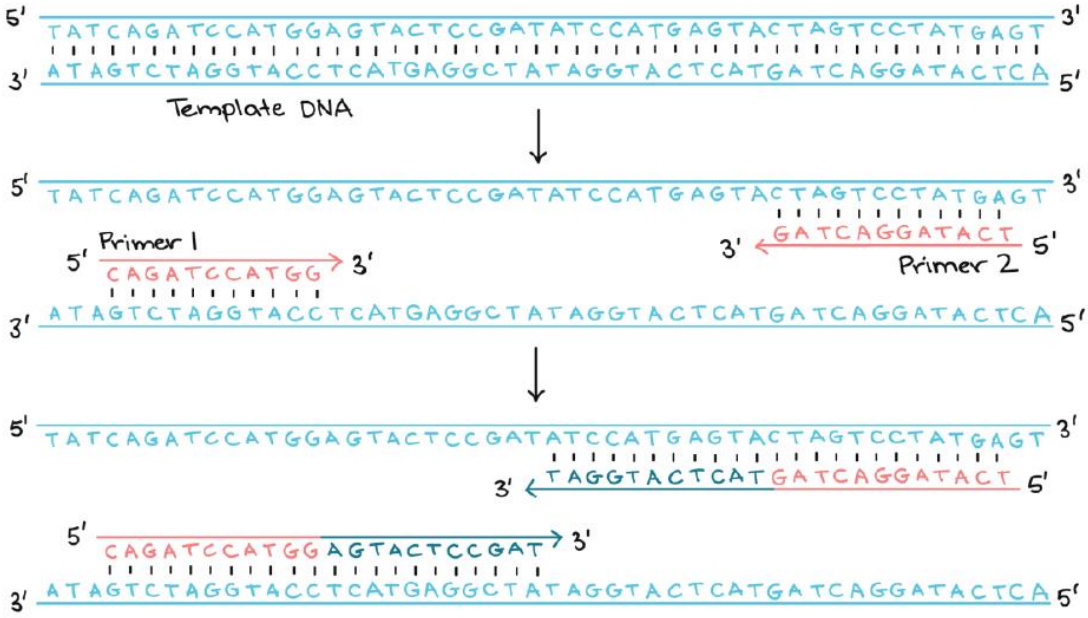
**البادئات (Primers):**

قطع صغيرة من الـ DNA أحادي الطاق، متممة لتتاليات موجودة على طرفي تتالي الـ DNA الهدف (Target) المراد تضخيمه في تفاعل الـ PCR.




**درجة الالتحام Melting Temperature (TM):** درجة الحرارة التي تحول نصف السلاسل المزدوجة إلى سلاسل أحادية مما يمكن البادئات من الالتحام بمناطق تحتوي على التسلسل المكمل والمتمم لها Complementary strand.

**من القواعد الأساسية الواجب اتباعها أثناء تصميم primer:**

1. **يجب أن يكون طول البادئ بين 16 – 28 أساس.**
2. **يجب أن يحوي في تركيبه على الأسس G وC بنسبة تتراوح بين 50 – 60 %.**

إن سبب التركيز على نسبة الأسس C / G هو أنها ترتبط بثلاث روابط هيدروجينية بينما تكون الروابط ثنائية بين الأسس A/T وبناء على ذلك تحسب درجة الالتحام وفق المعادلة:

$$Tm = (A+T) * 2 + (G+C) * 4$$

$(A+T)$: مجموع عدد أسس الثيامين والأدنين

$(G+C)$: مجموع عدد قواعد الغوانين والسيتوزين

أن طول البادئ يؤثر على درجة الالتحام وفق المعادلة السابقة فإن زيادة عدد النكليوتيدات في البادئ سيؤدي إلى ارتفاع درجة حرارة الالتحام، كما أن زيادة نسبة CG في البادئ ستؤدي إلى درجة الالتحام.

مثلاً: عند تصميم بادئ في منطقة من الـ DNA غنية ب T/A يتطلب أن نجعل البادئ طويل، بينما تصميم بادئ في منطقة غنية ب G/C يتطلب أن نجعل البادئ أقصر.

مثلاً:

CGGTCGTCGACCG
Tm= 3 X 2 + 10 X 4 = 46

GTCGACGCTCGGGA
4 X 2 + 10 X 4 = 48

TACTATTTAAACGTT
12 X 2 + 3 X 4 = 36

ينبغي عند اختيار البادئ البحث عن منطقة من الـ DNA تكون فيها نسبة النكليوتيدات (G+C) حوالي 50 – 60%.

فإذا كانت نسبة (G+C) أقل من 50% سوف يضعف من الالتحام ويخفض درجة حرارته Tm مما يعيق إعادة التحام طاقي DNA معاً، وبالتالي ينبغي زيادة عدد النكليوتيدات في بنية البادئ لتلافي هذه المشكلة.

وزيادة النسبة عن 60 % سيزيد من صعوبة الالتحام نظراً لاحتياجه لدرجات حرارة مرتفعة.

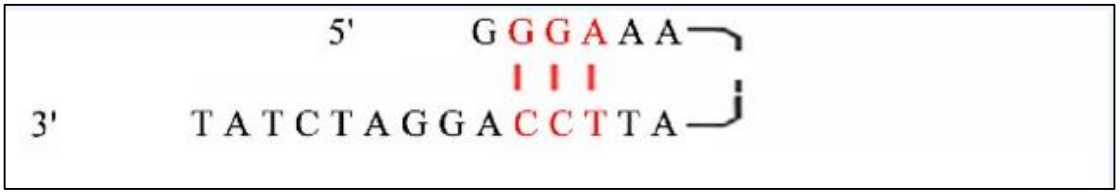
ولذلك ينبغي الابتعاد عن تلك المناطق في حال وجود مناطق مناسبة أكثر.

**3. يجب أن تكون النهاية (3') تحوي C أو G أو CG:**

النهاية 3' هي المكان الذي سيتوجه إليه إنزيم الـ DNA البوليميراز ليتابع تركيب السلسلة المكملة، لذلك فإن وجود C أو G أو CG في النهاية `3 سيزيد كفاءة وثبات الارتباط في هذه المنطقة مما يمكن إنزيم الـ DNA البوليميراز من القيام بعمله.

**4. تجنب ظاهرة Hairpin:**

تحدث هذه الظاهرة عندما يكون في البادئ نفسه أسس متجاورة متممة لمناطق أخرى في نفس البادئ، هذه الظاهرة تؤثر سلبا على تفاعل PCR وتقلل من كمية القطع المستنسخة، ويكون الضرر أكبر عندما تحدث هذه الظاهرة على النهاية 3'.




**5. تجنب ظاهرة Primer-dimer:**

تحدث هذه الظاهرة عندما يكون جزء من بادئ متمماً لجزء من البادئ الآخر، وينتج عن ذلك التحام بين البادئين (بدلاً من التحام البوادئ مع قطعة الـ DNA المراد تضخيمها) وتتشكل قطعة صغيرة من الـ DNA، مما يؤدي إلى انشغال الـ DNA البوليميراز بهذه القطع الصغيرة مما يؤثر سلباً على تفاعل الـ PCR وتقل كفاءته.

مثال:

ليكن لدينا التتالي الآتي:

5` CGATATCAGCCACTCGCCAGGTT NN..ATG…TGTGCGATCGTTAAGCT 3`
3`GCTATAGTCGGTGAGCGGTCCAA NN..TAC...ACACGCTAGCAATTCGA 5`

لدينا سلسلتين إحداهما هي Coding والأخرى Template، نريد تصنيع برايمرات لهذه القطعة من DNA، فنتبع الخطوات التالية:

في السلسلة العلوية المرمزة (Coding) ذات الاتجاه `3 ⇨ `5، نختار تتالي سابق للقطعة المراد مضاعفتها يحقق الشروط السابقة، وليكن مثلاً: `5CGATATCAGCCACTCGCC 3`، فنحصل على ما يسمى Forward Primer له اتجاه `3 ⇨ `5، ومتمم للسلسلة المقابلة (Template).

في السلسلة السفلية القالب (Template) ذات الاتجاه `5 ⇨ `3، نختار تتالي يقع بعد القطعة المراد مضاعفتها ويحقق الشروط السابقة، وليكن مثلاً: `5 CACGCTAGCAATTCG`3، ولكن بما أن اتجاه البادئ دائما من `3 ⇨ `5، فعلينا عكس هذا التتالي للحصول على Reverse Primer، متمم للسلسلة المقابلة (Coding).

فيكون تتالي البادئين:

Forward Primer : 5´- CGATATCAGCCACTCGCC-3`
Reverse Primer : 5´-AGCTTAACGATCGCAC-3`

نكتب البادئين بالاتجاه `3 ⇨ `5، لأن عملية التصنيع الكيميائي دائما تبدأ من `5، يجب ترقيم اتجاه البادئ قبل إرساله إلى المعمل ليتم تصنيعه وذلك ليتعرّف الأخصائي على اتجاه التصنيع.

في تفاعل PCR:

Coding strand

5` CGATATCAGCCACTCGCCAGGTT NN..ATG…TGTGCGATCGTTAAGCT 3`

3` CACGCTAGCAATTCGA 5`

Reverse Primer

Forward Primer

5` CGATATCAGCCACTCGCC 3`

3` GCTATAGTCGGTGAGCGGTCCAA NN..TAC...ACACGCTAGCAATTCGA 5`

Template strand