الجلسة الرابعة

تضاعف الـ DNA باستخدام تقانة تفاعلات التسلسل البوليميري PCR

أهم الأسباب التي تعيق تطبيق تقانات البيولوجيا الجزيئية هو ندرة الحموض النووية DNA و RNA في العينات المراد دراستها. و تقانة الـ PCR مكنت الباحثين من الحصول على كميات ضخمة من الحموض النووية مقدرة بعشرات إلى مئات النانوغرامات.

ما هو PCR :

هو تقنية مخبريه تم اكتشافها عام 1983م، من قبل العالم كاري موليس Kary Mullis والذي حاز على جائزة نوبل عام 1993 .

تقوم على إكثار نسخ الحمض النووي (DNA) خارج النظام الحيوي. أي أنها طريقة لنسخ الحمض النووي في المختبر. و لذلك فهي تقنية حيوية لاستنساخ قطعة محددة من الحمض النووي و مضاعفة إنتاجها لإنتاج ملايين أو بلايين النسخ. لكي يتسنى إجراء عليه اختبارات و فحوصات إضافية.

إن المبدأ والشروط التجريبية التي تجري فيها هذه التفاعلات بسيطة والهدف هو حصول سلسلة من تفاعلات تضاعف الـDNA ثنائي السلسلة. وفي كل تفاعل يتم استخدام سلاسل أولية قليلة التعدد مؤلفة من عدد محدود من النكليوتيدات. الغاية من هذه العملية هو استخدام السلاسل الهجينة الناتجة في كل خطوة من خطوات الاصطناع كقالب من أجل الخطوة اللاحقة بدلا من إعادة السلاسل الأساسية في كل مرة.

كل دورة من تفاعلات التسلسل البوليميري مؤلفة من ثلاثة أطوار (مراحل) مختلفة تجري في درجات حرارة مختلفة أيضا"، هذه المراحل هي:

1- تفكيك جزيء الـ DNA (أو التمسخ). 2- التهجين. 3- الإطالة.

خلال كل دورة توجد ثلاث درجات حرارة مختلفة وتستمر لفترات مختلفة ومدة الدورة من رتبة الدقيقة، أي أن الدورة تستمر بين دقيقة إلى عشر دقائق حسب المطلوب.

متطلباتPCR :

لإنتاج الحمض النووي (DNA) بواسطة PCR يتطلب توفير :

1. جهاز للتحكم بدرجات حرارة التفاعل بشكل دقيق و متتالي (الدورة الحرارية Thermocycle) : ويقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع، لأن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقنية.

2.أنزيم Taq polymerase : وهو الإنزيم الذي يقوم ببناء وترتيب الأسس الآزوتية (وحدات الحمض النووي (DNA)) ، ويجب أن يكون هذا الإنزيم مقاوم للحرارة العالية ليتمكن من العمل. و قد اكتشف أنزيم مقاوم للحرارة و اسمه تاك Taq

3. مجموعة متفرقة من الأسس الآزوتية: (A- T- C- G) ليتمكن الإنزيم من ترتيبها في مواقعها أثناء عملية نسخ الحمض النووي (DNA).

4. بريمر (Primer) السلسلة الأولية أو السلسة البادئة: وهو قطعة صغيرة من الحمض النووي (DNA) ليتمكن الإنزيم من بداء البناء والنسخ عليها .

5. نسخة من الحمض النووي (DNA) المراد نسخه.

6. بالإضافة إلى محلول أو وسط ليتم به التفاعل : وهذا المحلول يختلف بين تفاعل و أخر.

بعد وضع الحمض النووي المراد نسخة مع البريمر و أنزيم البوليمراز و مجموعة مع الأحماض النووية في أنبوب داخل جهاز التحكم الحراري فان هناك 3 مراحل منفصلة تمر بها عملية النسخ لكل دورة:

1. **مرحلة التفكيك (التمسخ) Denaturation**:

في هذه المرحلة ترفع درجة الحرارة إلى 93 درجة، وهي الحرارة اللازمة لتفكيك جزيء الـ DNA ، فالروابط الهيدروجينية الضعيفة التي تؤمن ارتباط شريطي الـ DNA الحلزونيين تتحطم لتعطي السلاسل البسيطة المكونة لهذا الجزيء.

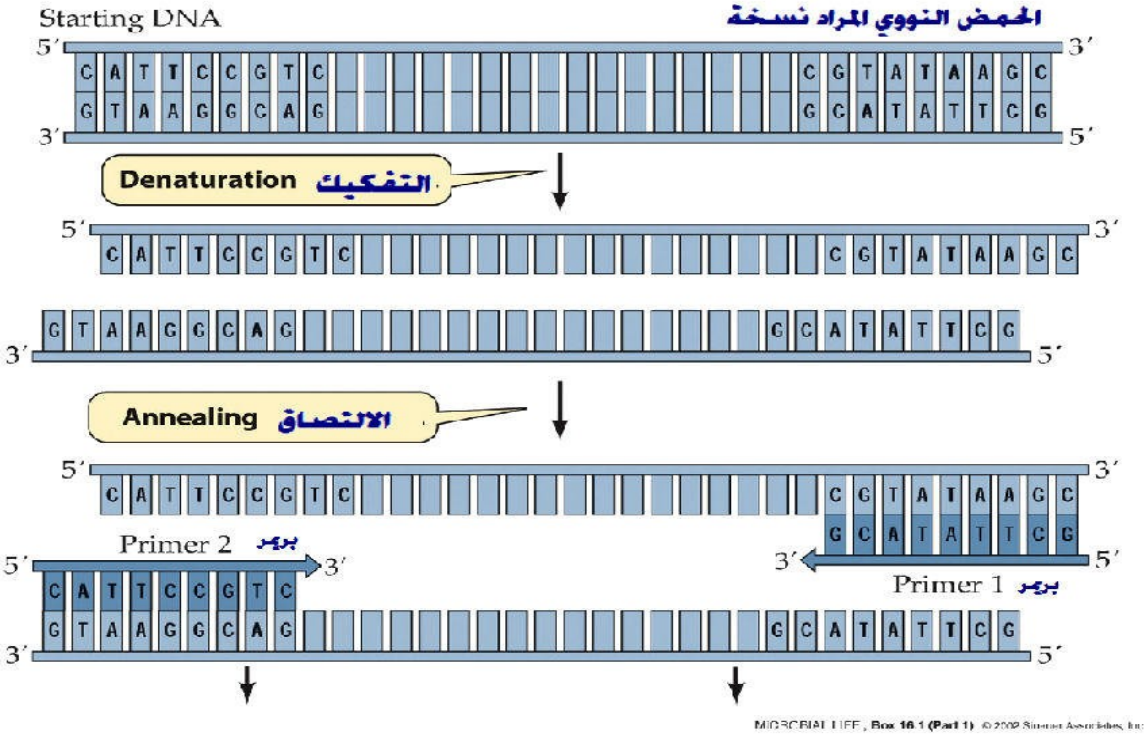
إذا قمنا بتخفيض درجة الحرارة وليكن إلى 20 درجة مئوية فإن شريطي الـ DNA سيعودان للارتباط من جديد ويأخذ شكله الحلزوني ثنائي السلسلة.

2. **مرحلة التهجين Hybridization**: إنزال الحرارة إلى حوالي 60، ليقوم البريمر السلسلة الأولية (البادئات) بالالتصاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع طرفي كل خيط من خيطي الـDNA المراد تضخيمه.

إن ارتباط السلسلة الأولية (البادئة) على قالب الـ DNA الأساسي المراد مضاعفته يقوم على مبدأ اقتران النكليوتيدات المتممة المقابلة لكل نكليوتيد في سلسلة الـ DNA الأساسية. إن درجة الحرارة المطبقة في هذه المرحلة مرتبطة بعدة معايير وتحسب بناء على طول السلسلة الأولية قليلة التعدد.

3. **مرحلة الإطالة أو التصنيع Synthesi** : بعد عملية التهجين بين سلاسل الـDNA المفردة للجين المراد تضخيمه و البادئات المرتبطة على طرفي الجين المستهدف، ترفع درجة الحرارة إلى 72 درجة مئوية ليقوم

أنزيم Taq polymerase بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد. تتم عملية البلمرة أو تكثيف الـ DNA بإضافة تسلسل معين من النكليوتيدات الموجودة في المزيج بكميات كبيرة. إن كل أساس مضاف يكون متمم للأساس الموجود مقابله على السلسلة الأساسية.



في نهاية عملية البلمرة، نحصل على نسختين من الجين المستهدف، أو أربعة خيوط من الـDNA بدلا من الخيطيين المتواجديين في بداية التفاعل، ومدة هذه المرحلة بين دقيقة واحدة و 3 دقائق حسب طول قطعة الـDNA المراد تضخيمها.

اختيار السلاسل الأولية (Primers)

إن اختيار السلاسل الأولية أو البادئات في تفاعلات التسلسل البوليميري يجب أن يكون دقيقا، هذه السلاسل تلعب دورا مضاعفا فهي تقوم عند تهجين سلسلة الـ DNA الأساسي (القالب) بتحديد الجزء المراد مضاعفته هذا من ناحية ومن ناحية أخرى فإنها تسمح ببدء بلمرة وتكثيف الـ DNA بواسطة النهاية الحرة لزمرة الهيدروكسيل على الموقع ´3.

إن السلاسل الأولية سيتم تهجينها عند نهايات سلاسل الـ DNA التي سيتم تضخيمها، لذلك فإنه من الضروري معرفة تسلسل النكليوتيدات عند نهايات هذه السلاسل.

من أجل تسهيل اختيار السلاسل الأولية، يوجد برامج تحليل السلاسل التي تسمح بالتأكد من النقاط التالية:

- مقارنة درجات الحرارة المستخدمة في التفاعلات حيث أن السلاسل الأولية يجب أن تكون قابلة للتهجين في نفس درجات الحرارة بالنسبة للسلاسل الأساسية (القالب).
- يجب أن لا تكون السلاسل الأولية متممة لبعضها البعض و خاصة عند النهاية ´3.
- أن لا تتضمن السلاسل الأولية سلاسل مكررة ومتعاكسة حتى لا يحدث وانطواء ضمن السلسلة نفسها.

درجات الحرارة المستخدمة في تفاعلات التسلسل البوليميري

إن المراحل الثلاثة من هذه التفاعلات التي تشكل حلقة الـ PCR تتم في درجات حرارة مختلفة وهذا يسمح بالتحكم بالنشاط الأنزيمي للأنزيمات المشاركة في هذه التفاعلات.

- المرحلة الأولى (تفكيك الـ DNA): تتم عادة في درجة حرارة 93 مئوية من أجل فصل سلسلتي الـ DNA.
- المرحلة الثانية (التهجين): يتم تحديد درجة الحرارة فيها حسب طبيعة السلسلة الأولية وهذه الحرارة تختلف بين 50 و 60 درجة مئوية و بالتالي تحدد مدى استقرار الجزيء الهجين الناتج عن ارتباط السلاسل الأولية والسلاسل الأساسية.
- المرحلة الثالثة (الإطالة أو تكثيف الـ DNA) : تتم في درجة حرارة 73 درجة مئوية وهي الدرجة المثلى لنشاط أنزيمات الربط وبالتالي بلمرة الـ DNA.

إن درجة حرارة التفكيك والتكثيف تبقى ثابتة بينما تتغير حرارة التهجين تبعا للسلاسل الأولية المستخدمة ومكوناتها من النكليوتيدات.

من أجل حساب درجة الحرارة اللازمة في عملية التهجين لسلسلة قليلة التعدد من النكليوتيدات (30 نكليوتيد) نستخدم العلاقة التالية :

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

حيث أن A، T، G، C هو عدد كل من هذه الأسس في السلسلة الأولية قليلة التعدد.

سلسلتي الـ DNA الأساسي أو القالب

من الناحية العملية، نحتاج إلى عدة نسخ من الـ DNA الأساسي لكي نحصل على نتيجة جيدة.

ملاحظة : إذا كانت نوعية أو كمية الـ DNA الأساسي غير جيدة فإن ذلك قد يؤدي إلى تضخيم أجزاء غير نوعية من الـ DNA أي الأجزاء التي لا نبحث عنها وليست هي الهدف المنشود.

هذا التضخيم غير النوعي يمكن تفسيره بوجود تلوث أو عدوى من العينات المستخدمة أو العناصر التفاعلية الأخرى المستخدمة في استخلاص الـ DNA.

أنزيم تكثيف الـ DNA (Taq -Polymérase)

تأتي هذه الأنزيمات من البكتيريا المقاومة لدرجات الحرارة المرتفعة و تدعى Taq (Thermus aquaticus Polymerase). هذه البكتيريا تعيش بشكل طبيعي في درجات حرارة مرتفعة تصل إلى أعلى من 90C° مثل الينابيع المائية الحارة في أعماق المحيطات، وبالتالي فان أنزيمات تكثيف الـ DNA لا تتحطم في درجات الحرارة المستخدمة لتحطيم و تخريب جزيئات الـ DNA و أكثر الأنزيمات المعروفة هو Taq Polymerase.

المحلول الموقي

المحلول الموقى المستخدم من أجل تفاعلات التسلسل البوليميري تساعد على استمرارية ثبات PH المحلول في الوسط التفاعلي و أيضا تحفظ أنزيمات التكثيف من الإضاءة (Tris-Hcl, PH = 8.5– 9).

هذا المحلول يحتوي على شوارد موجبة ثنائية التكافؤ وهي عوامل مساعدة لا غنى عنها في تفاعلات التسلسل البوليميري إلى جانب أنزيمات التكثيف. إن وجود شوارد موجبة ثنائية التكافؤ (Mg^{2+}) و أخرى أحادية التكافؤ (NH_4^+ ; k^+) يعدل من الشحنات السالبة لمجموعات الفوسفات الموجودة في الـ DNA و أيضا تؤمن استقرار جزيئات ال DNA الهجينة.

لتقنية PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي (DNA) و الوراثة ومنها :

1. الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بريمر خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجين من الكروموزومات أو على احدهما (allele).
2. تعين البصمة الوراثية.
3. الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
4. هو العملية الأساس في تحديد تتابع الأسس الآزوتية في الحمض النووي (DNA).
5. معرفة طول الحمض النووي (DNA).
6. تقنية الحمض النووي (DNA) المكمل.
7. تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات.
8. في مشروع الخارطة الجينية البشرية (human genome project).
9. تقنية ارتباط الحمض النووي (DNA) – بروتين (الحمض النووي (DNA) -Protein Interaction).
10. في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ... الخ) .

وغيرها من التطبيقات المخبرية والبحثية .