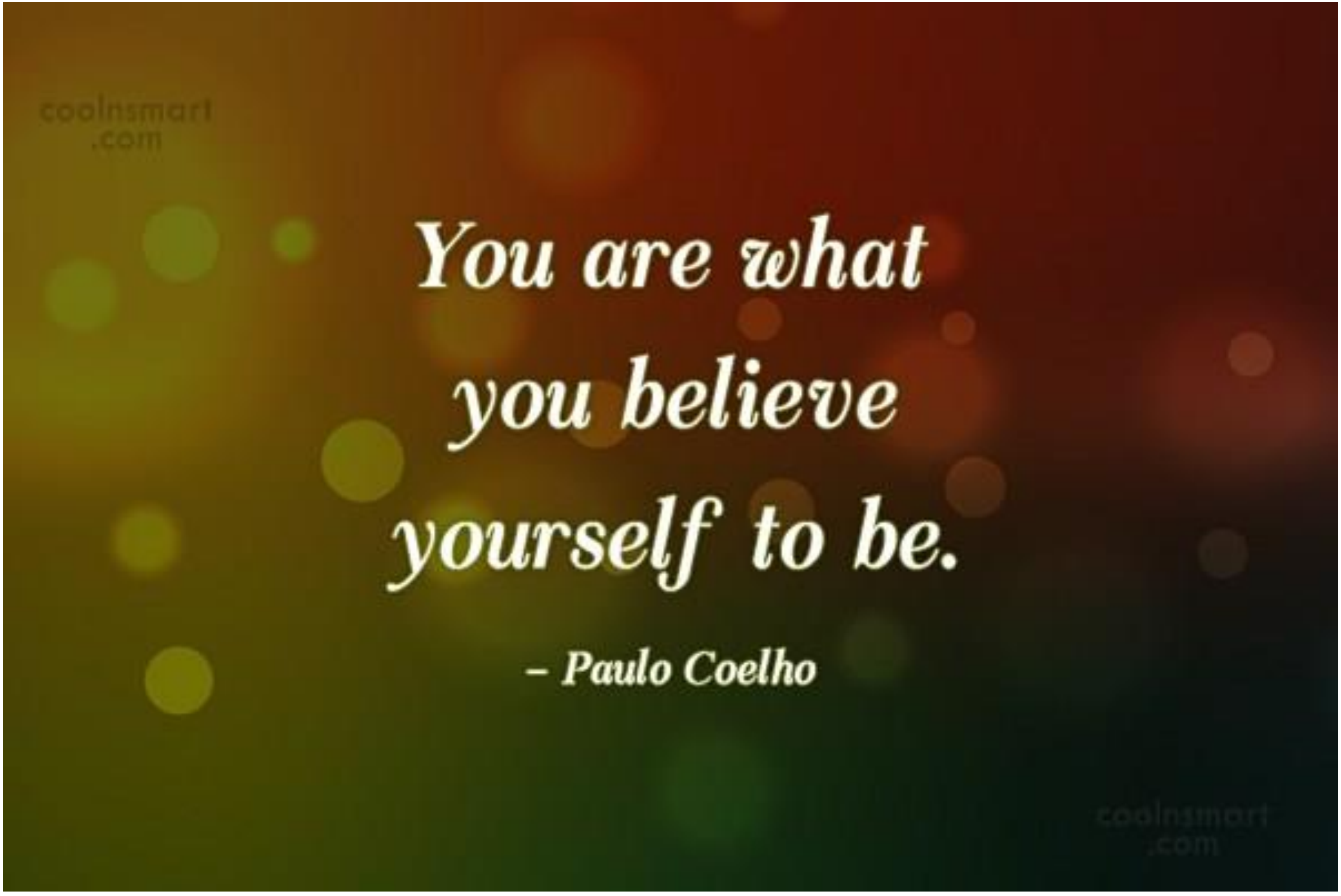

coolnsmart
.com
You are what
you believe
yourself to be.
– Paulo Coelho
coolnsmart
.com

Polymerase chain reaction (PCR)
تفاعل البلمرة التسلسلي

المحاضرة الثامنة
د. طلة المللي

جهاز نسخ قطع الشريط الوراثي PCR

أحدثت تقنية الـ PCR ثورة كبيرة في علم البيولوجيا الجزيئية حيث مكنت العلماء من الحصول على نسخ كبيرة من الـ DNA (مخبرياً) في وقت قصير وبكفاءة عالية جداً
يعتبر العالم كاري موليس (Kary Mullis) أول من استخدم تقنية الـ PCR في العام 1982 وتم نشرها للمرة الأولى في العام 1985 ، ومنذ ذلك الحين وحتى الآن لاتزال المجلات والدوريات العلمية تنشر الكثير من الطرق والتقنيات والتعديلات الجديدة والتي تعتمد في الأصل على التقنية الأم التي استخدمها كاري موليس لأول مرة وحاز بسببها على جائزة نوبل عام 1993
الـ PCR تقنية حساسة ويمكن أن تكون عالية التخصص في جزيء معين من الـ DNA

- **تفاعل البلمرة التسلسلي يعني التضخيم العددي لجزء محدد من الدنا**

- ***التضخم العددي=الحصول على عدد كبير من النسخ من قطعة محددة من الدنا***

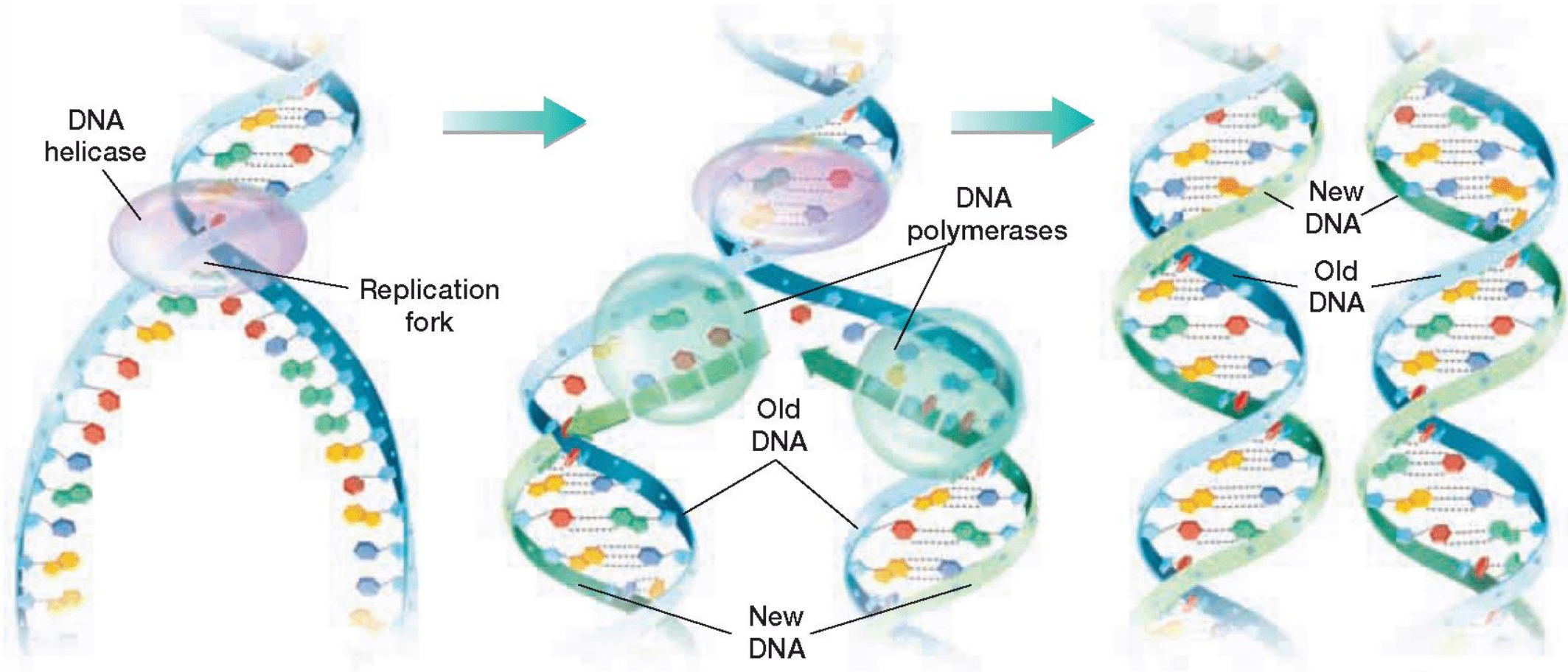
- **يمكن بواسطة التفاعل الحصول على بلايين النسخ من السلسلة المحددة في ساعات قليلة**

BIO graphic

DNA Replication

DNA replication results in two identical DNA strands.

1. The two original DNA strands separate.
2. DNA polymerases add complementary nucleotides to each strand.
3. Two DNA molecules form that are identical to the original DNA molecule.



عناصر التضاعف في تقانة الـ PCR

المكونات التالية يُحتاج اليها لتفاعل الإسترداد

DNA (your DNA of interest that contains the target sequence you wish to copy)

1- دنا (يحتوي على السلسلة المحددة)

A heat-stable DNA Polymerase (like Taq Polymerase)

2) بولي ميريز مستقر حرارياً مثل تاق بولي ميريز

All four nucleotide triphosphates

3- كل النيكليوتيدات ثلاثية الفوسفات

Buffers

4- بافر

Two short, single-stranded DNA molecules that serve as primers

5- جزيئات دنا أحادية السلسلة قصيرة لتعمل كبادئات

Thin walled tubes

6- أنابيب دقيقة

Thermal cycler (a device that can change temperatures dramatically in a very short period of time)

7- جهاز البلمرة (جهاز يمكنه تغيير الحرارة بشكل كبير في وقت قصير)

أولا: قالب الدنا DNA template

- تعتمد دقة نتائج الـ PCR إلى حد كبير جداً على مدى نقاوة وجودة وسلامة قالب الـ DNA المستخلص من العينات المدروسة فكلما كانت نقية وسليمة و كثيرة كانت النتائج أكثر دقة وجودة
- وهناك طرق مختلفة وكثيرة جداً لاستخلاص الحمض النووي تتبع لطبيعة العينة المدروسة (خلايا حيوانية – نسخ – بكتيريا – فيروسات – خلايا نباتية .... الخ).
- يمكن حفظ الـ DNA في محلول TEأو الماء على درجة حرارة 4 مئوية لمدة عام وعلى درجة -20 درجة مئوية أعوام متعددة دون أن تتأثر

قالب الـ DNA

يعتبر تقطيع الـ الشريط الوراثي الـ DNA من أهم العوامل التي تؤثر على جودة وسلامة قالب الـ DNA المستخلص، ومن أهم العوامل التي تؤدي إلى تقطيع الـ DNA:

- العامل الفيزيائي الناتج عن جهل المخبريين في طريقة الاستخلاص
- تجميد وإعادة حل الـ DNA مرات متعددة قد تؤدي إلى تقطيعه
- تلوث الـ DNA بالأنزيمات الهاضمة خاصة عند حفظه على درجات حرارة المختبر لفترات طويلة
- التعرض للأشعة فوق البنفسجية

مصدر الـ DNA

يمكن استخلاص الـ DNA من أية خلايا تتمتع أو كانت تتمتع بنشاط حيوي سواء كانت من أحاديات أو حقيقيات النوى. ومن الخلايا الشائعة الاستخدام لاستخلاص الـ DNA على سبيل المثال لا الحصر:

- **نسيج البشري**
- **الدم البشري**
- **الخمائر**
- **خلايا النباتات**
- **الباكتيربوفاج**

ثانيا: المحاليل المستخدمة في الـ PCR: (Buffers)

يؤمن المحلول الملحي وسط ذو قوة أيونية ثابتة أثناء عملية التضخيم

المحلول المثالي المستعمل في الـ PCR التقليدي هو (Tris -Hcl) حيث يستخدم بتركيز يتراوح بين (10 – 50 mM) وبدرجة (PH) تتراوح بين (8.3 -8.8) كما يضاف للوسط ملح (Kcl) بتركيز (50 mM) من أجل تسهيل عملية التحام البرايمرات بالقالب DNA

يمكن أن نستخدم أنواع أخرى من المحاليل الدارئة (Buffers) في حالات نوعية فمثلاً يمكن استخدام ملح (NaCl) من أجل تأمين فصل جيد للسلاسل المضاعفة والحاوية على كميات كبيرة من الـ G و C كما يمكن استخدام كبريتات الأمونيوم (Ammonium sulfate) من أجل الحد من الشوائب (artifacts) الناتجة عن النسخ غير الكامل (incomplete amplicons)

ثالثاً : الـ dNTPs

- عادة ما يتم تحضير الـ dNTP على شكل محاليل تركيزها 10 ميلي مول لكل نوع من النكليوتيدات (عند درجة pH=7)

- من المهم أن نستخدم الـ dNTPs بنسب متساوية بين جميع النكليوتيدات وذلك للإقلال من الأخطاء الناجمة عن سوء الادخال (Mis incorporation)

- تحوي على dATP, dCTP, dGTP, dTTP

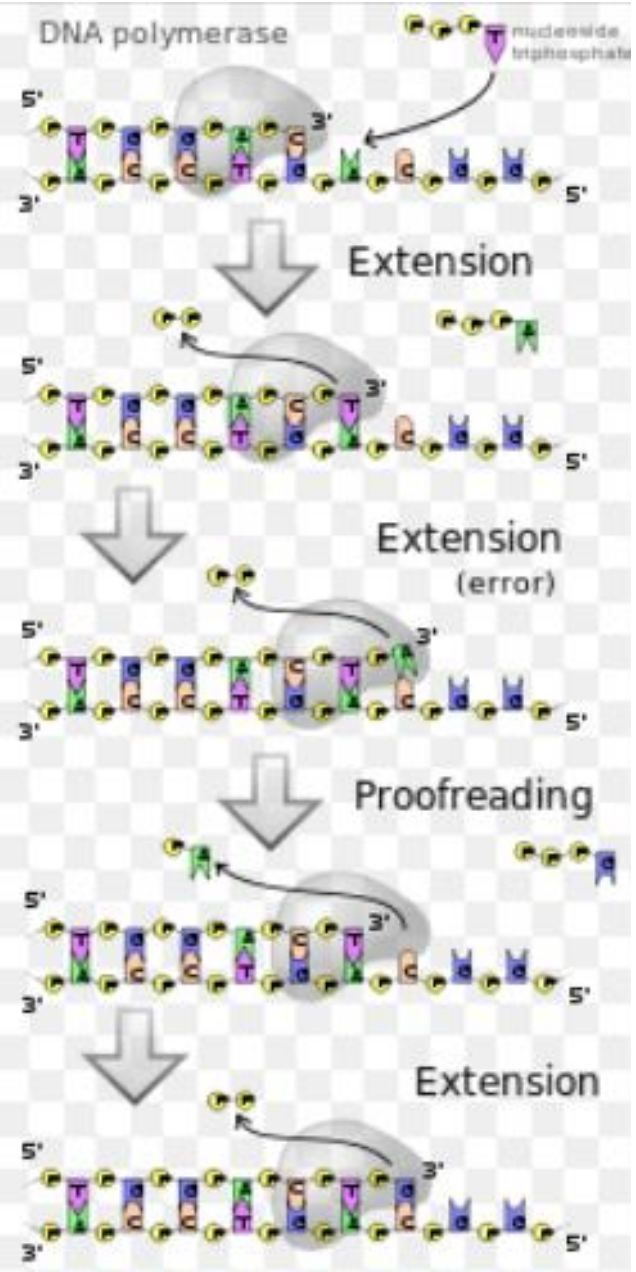
- النكليوتيد:

هو سكر خماسي ديوكسي ريبوز (بالنسبة للدنا)+ مجموعة فوسفاتية+ أساس آزوتي

تركيز شوارد المغنيزيوم

- يعمل المغنيزيوم كمساعد إنزيمي (co-factor) للأنزيم (DNA-polymerase) وله تأثير هام للغاية على نوعية القطع الناجمة عن الـ PCR
- تشكل شوارد المغنيزيوم معقدات ذوابة مع الـ dNTPs لكي يسهل التعرف عليها من قبل الانزيم (polymerase) ويعاملها كأساس في تصفيفها وفق ما يقابلها من نكليوتيدات مناسبة .

رابعاً: DNA Polymerase

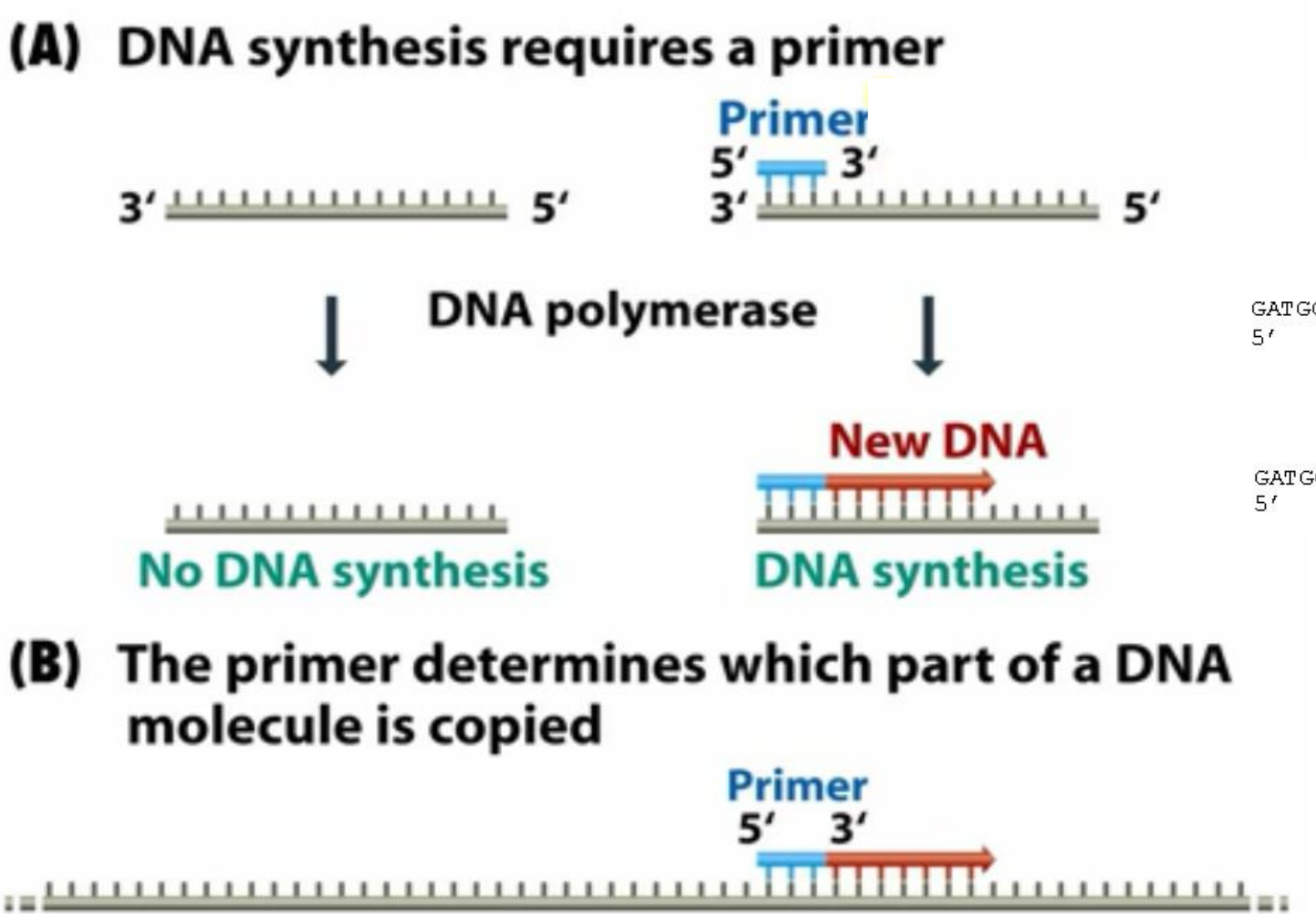


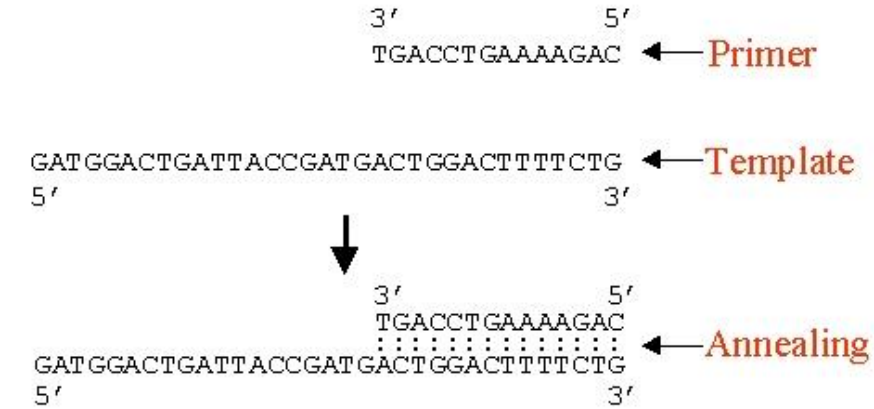
هنالك خصائص أخرى لإنزيمات البوليميرات إضافة إلى قدرتها على إضافة النكليوتيدات على سلاسل الـ DNA ومنها :

- Exonuclease activity : في الاتجاه من ' 3 > 5' تقترن هذه الوظيفة بعملية تصحيح القراءة والتثبيت منها

- من الناحية الأنزيمية : يعتبر هذا الأنزيم من مجموعة الـ holoenzyme نظراً لأنه يحتاج إلى عامل مساعد cofactor هو الـ Mg^{+2}
- عادة ما يكون هذا الأنزيم متوفراً بتركيز (5 وحدات / ميكروليتر)
- عادة ما يكفي (1 – 2.5) واحدة لكل 100 ميكرليتر حجم من مزيج تفاعل الـ PCR حيث تضمن هذه الكمية إطالة دقيقة وصحيحة للسلسلة الجديدة . وفي حال زادت كمية الأنزيم يمكن أن يؤدي إلى نواتج غير نوعية

خامساً: البادئات Primers



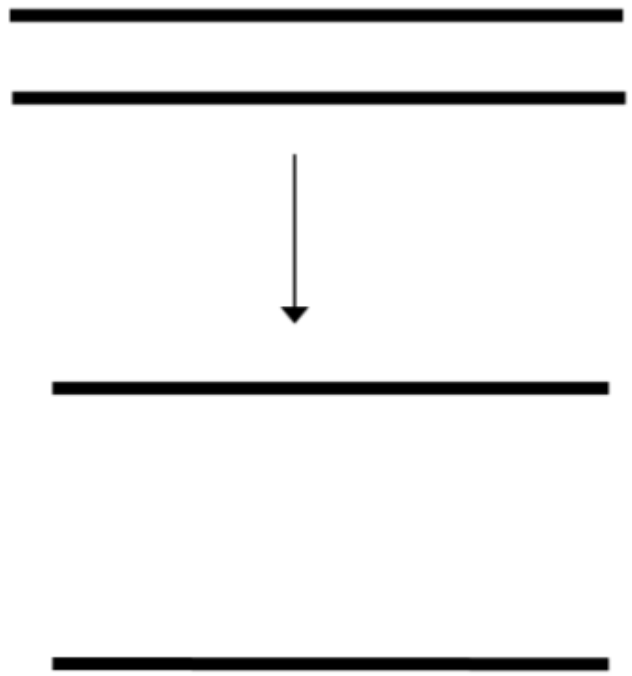


كيف يتم التفاعل؟

- تعتمد الطريقة على استخدام الأنزيم (DNA polymerase) وعلى خاصية انفكاك سلسلة الـ DNA المضاعفة لدى تعريضها لدرجة حرارة مرتفعة .
- تتألف مراحل الـ PCR من المراحل التالية :
- التمسخ (Denaturation) : وفيها يتم فصل السلاسل المضاعفة عن بعضها البعض ويتم عادة في الدرجة 94 C
- مرحلة الالتحام (Annealing) : وفيها يبرد المزيج إلى الدرجة 50 درجة تقريباً ليسمح للبادئات (Primers) النوعية بالالتحام بالسلاسل المفردة من الـ DNA القالب .
- مرحلة التطاول (elongation) : وفيها يتم رفع درجة الحرارة إلى 72 درجة مئوية تقريباً وبوجود الأنزيم (DNA polymerase) إضافة إلى الـ (Buffer) والـ ($Mgcl_2$) أي (Mg^{+2}) تبدأ عملية التضاعف ومع تكرار هذه العملية عدة مرات نحصل في كل مرة على عدد مضاعف من السلاسل .

Step 1: Denaturation of DNA

الخطوة 1: مسخ الدنا (فصل الخيطين عن بعضهما)

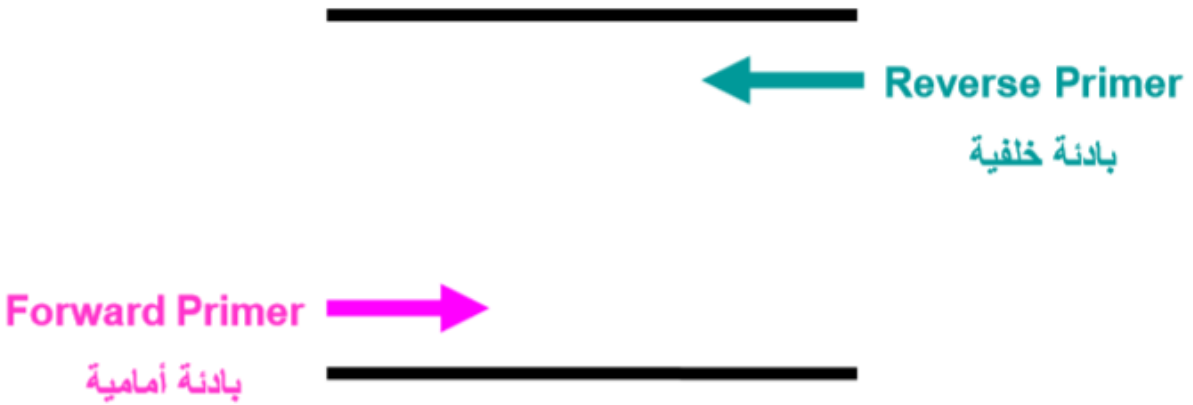


This occurs at 95 ºC mimicking the function of helicase in the cell

تحدث عملية مباعدة خيطي الدنا في درجة حرارة 95 ºC وبالتالي يشابه الوظيفة التي يقوم بها إنزيم الهليكيز في الخلايا

Step 2 Annealing or Primers Binding

الخطوة 2: الإرتباط أو إرتباط البادئات

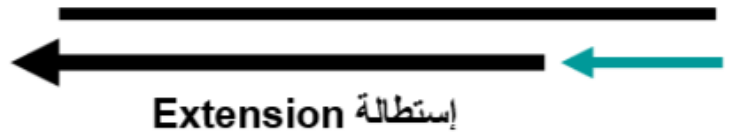


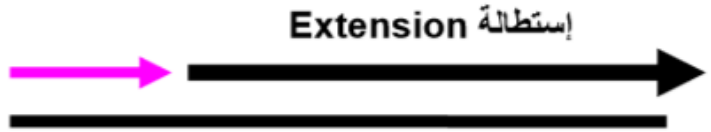
Primers bind to the complimentary sequence on the target DNA. Primers are chosen such that one is complimentary to the one strand at one end of the target sequence and that the *other* is complimentary to the *other* strand at the other end of the target sequence

ترتبط البادئات مع السلسة التكميلية للدنا المستهدف، يتم إختيار البادئات بحيث يكون أحدهما تكميلي لأحد خيوط الدنا فى إحدي النهايتين للدنا المستهدف والآخر تكميلي للخيط الآخر في النهاية الأخرى

Step 3 Extension or Primer Extension

الخطوة الثالثة: الإستطالة أو إستطالة البادئة

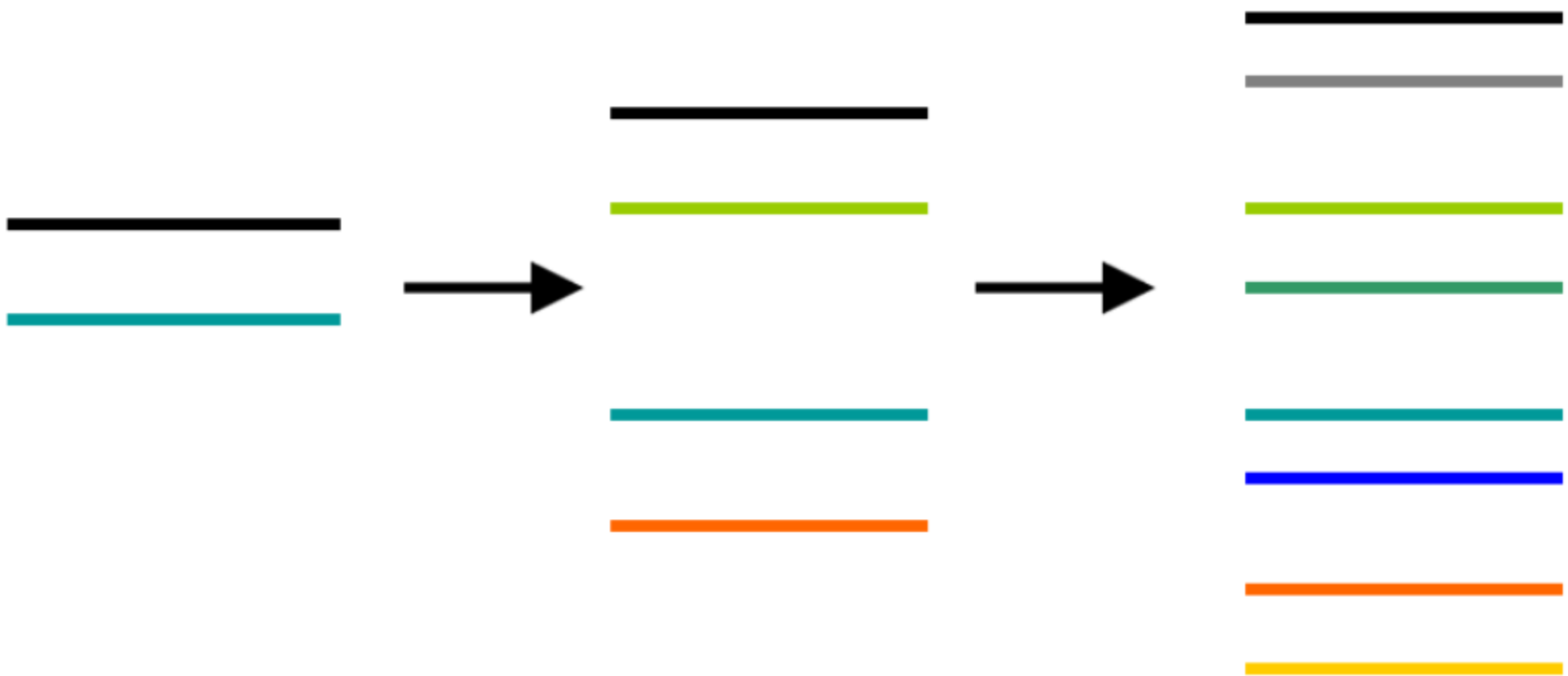




DNA polymerase catalyzes the extension of the strand in the 5-3 direction, starting at the primers, attaching the appropriate nucleotide (A-T, C-G)

يحفز الإنزيم إستطالة الخيط في الإتجاه 5-3، بدئاً من البادئة بإضافة النيكليوتيدات المناسبة (A-T, C-G)

- The next cycle will begin by denaturing the new DNA strands formed in the previous cycle
- الدورة التالية تبدأ بمسخ الدنا الجديد الذي تكون في الدورة السابقة وهكذا



The Size of the DNA Fragment Produced in PCR is Dependent on the Primers

حجم أجزاء الدنا المنتجة في تفاعل البلمرة تعتمد على البادئات

- The PCR reaction will amplify the DNA section between the two primers
  - يضخم تفاعل البلمرة جزء الدنا بين إثنين من البادئات
- If the DNA sequence is known, primers can be developed to amplify any piece of an organism's DNA
  - إذا كان تسلسل الدنا معروفاً، فيمكن تطوير البادئات لتضخيم أي جزء من دنا الكائن الحي

The DNA of interest is amplified by a power of 2 for each PCR cycle

الدنا المستهدف يضخم عددياً بمقدار 2 أُس كل دورة تفاعل بلمري

For example, if you subject your DNA of interest to 5 cycles of PCR, you will end up with 2^5 (or 64) copies of DNA

مثلاً، إذا أُخضع الدنا المستهدف لخمس دورات بلمرة ستكون النتيجة النهائية هي 2^5 (64) نسخة من الدنا

Similarly, if you subject your DNA of interest to 40 cycles of PCR, you will end up with 2^{40} copies of DNA

وكذلك عند تدوير التفاعل الى 40 دورة يكون الناتج 2^{40} نسخة من الدنا

94°C for 1 min

Step: 1 Denaturation

Lower temperature to 56°C for 1.5 min
Anneal with primers

Step: 2 Primer annealing

Increase temperature to 72°C for 1 min
Taq DNA polymerase + dNTPs

Step: 3 elongation by DNA pol

CYCLE NUMBER	DNA copy number
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824

eppendorf

Example:

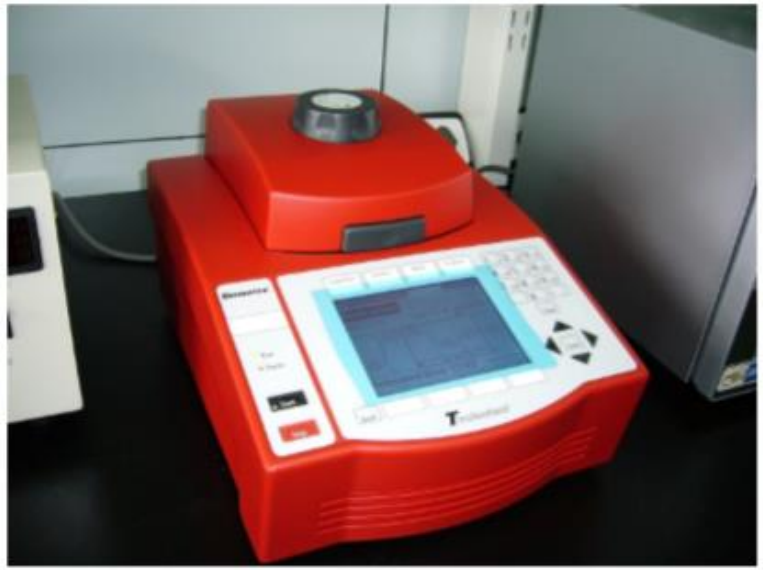
Program: Test (يمكن وضع أكثر من برنامج ضمن مجموعات وبأسامي مختلفة)

95 C for 5 min

Cycle for 35:
95 C for 15 sec.
60 C for 15 sec.,
72 C for 30 sec.

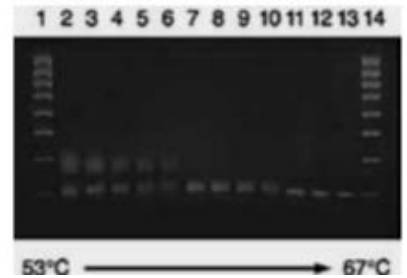
72 C for 7 min

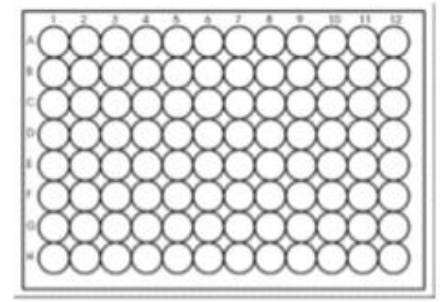
4 C hold

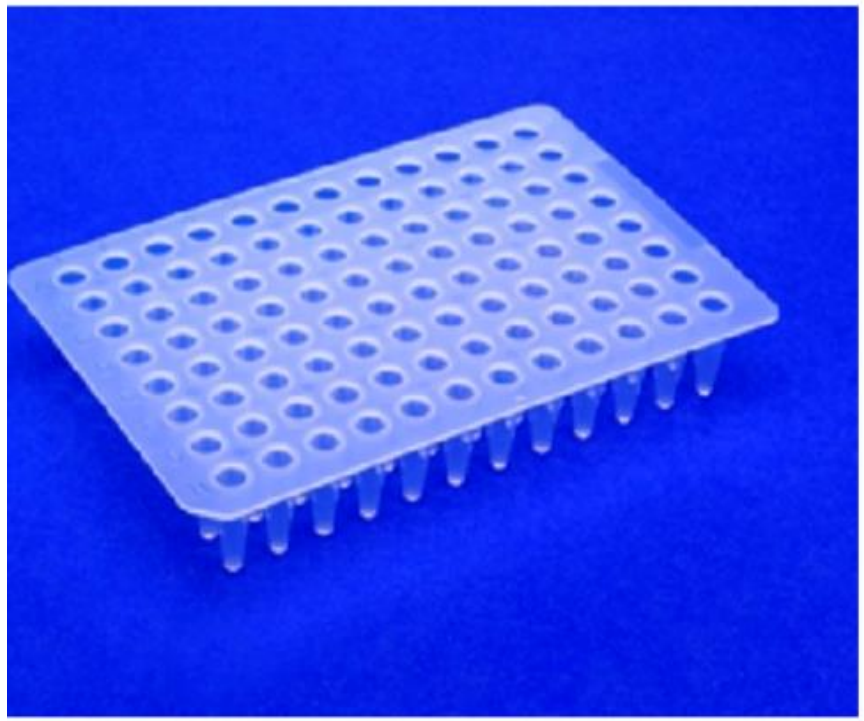


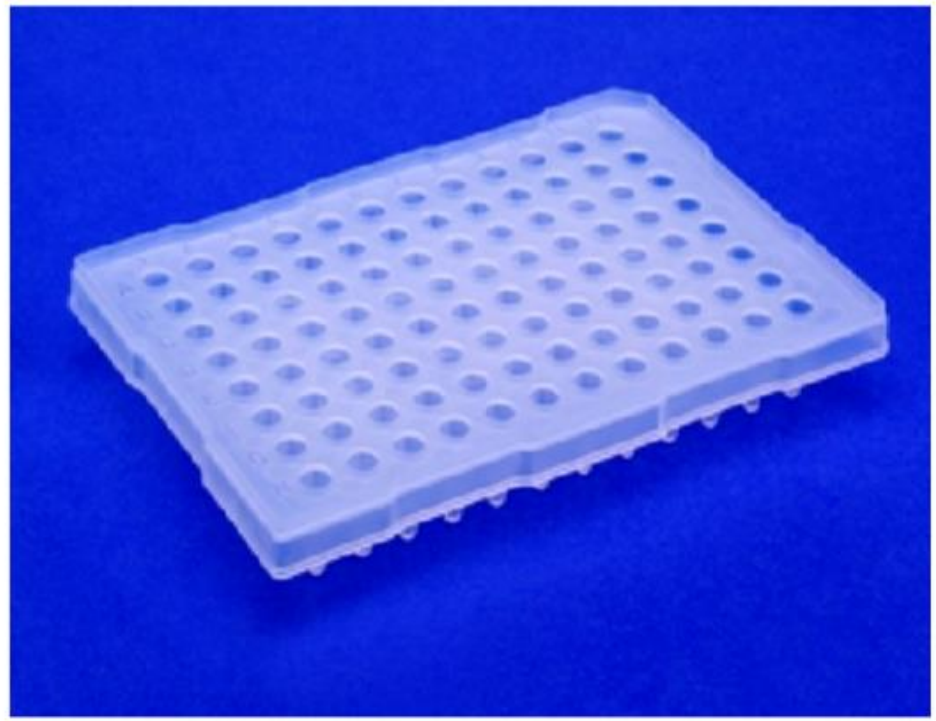
PCR gradient

هي آلية تمكن من التحكم بدرجة حرارة التحام البادئ لكل صف في نفس جهاز الـ PCR مما يمكننا من تحديد أية درجة حرارة هي المناسبة لاستنساخ قطع الـ DNA









0.2 ml

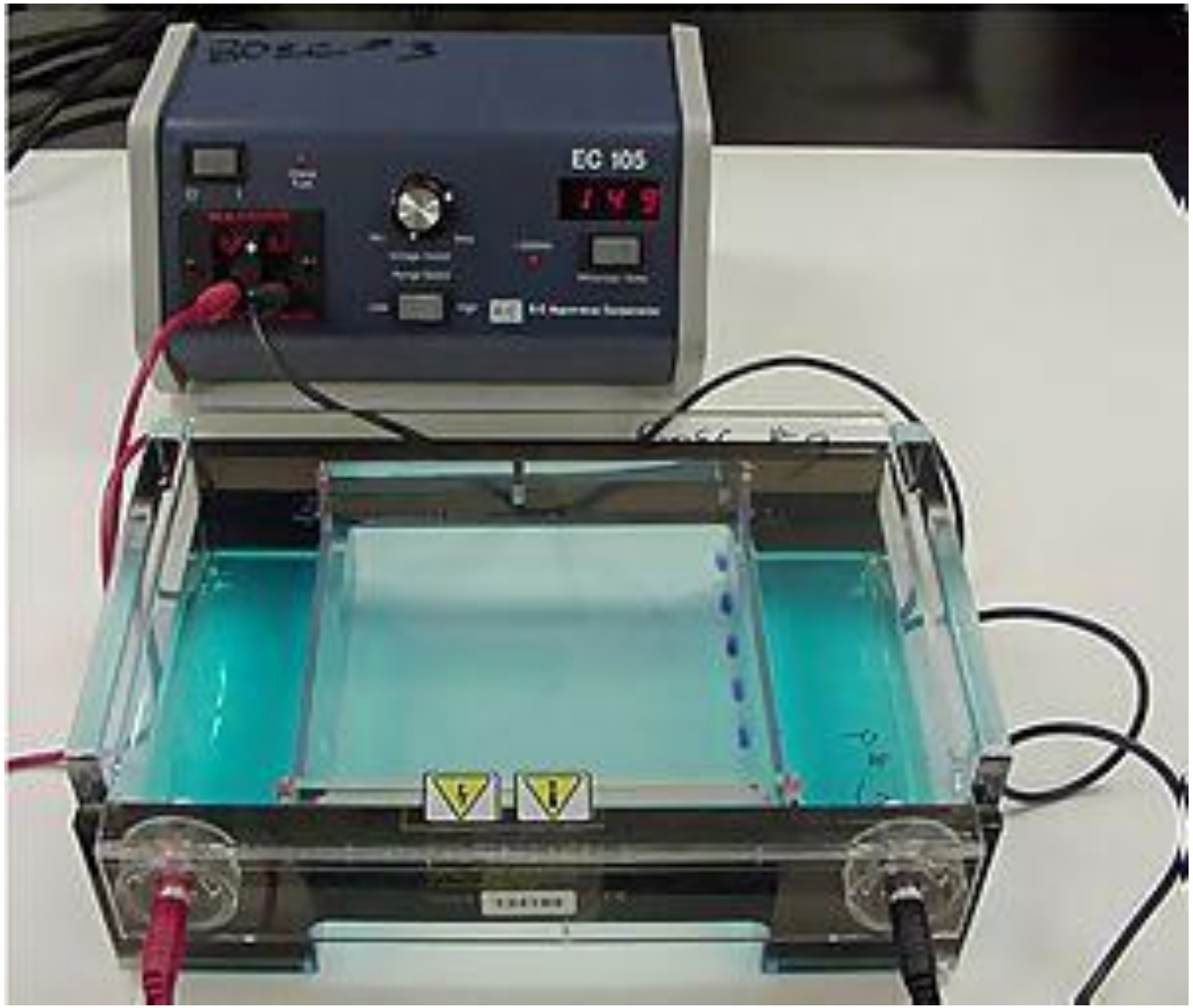
Gel electrophoresis

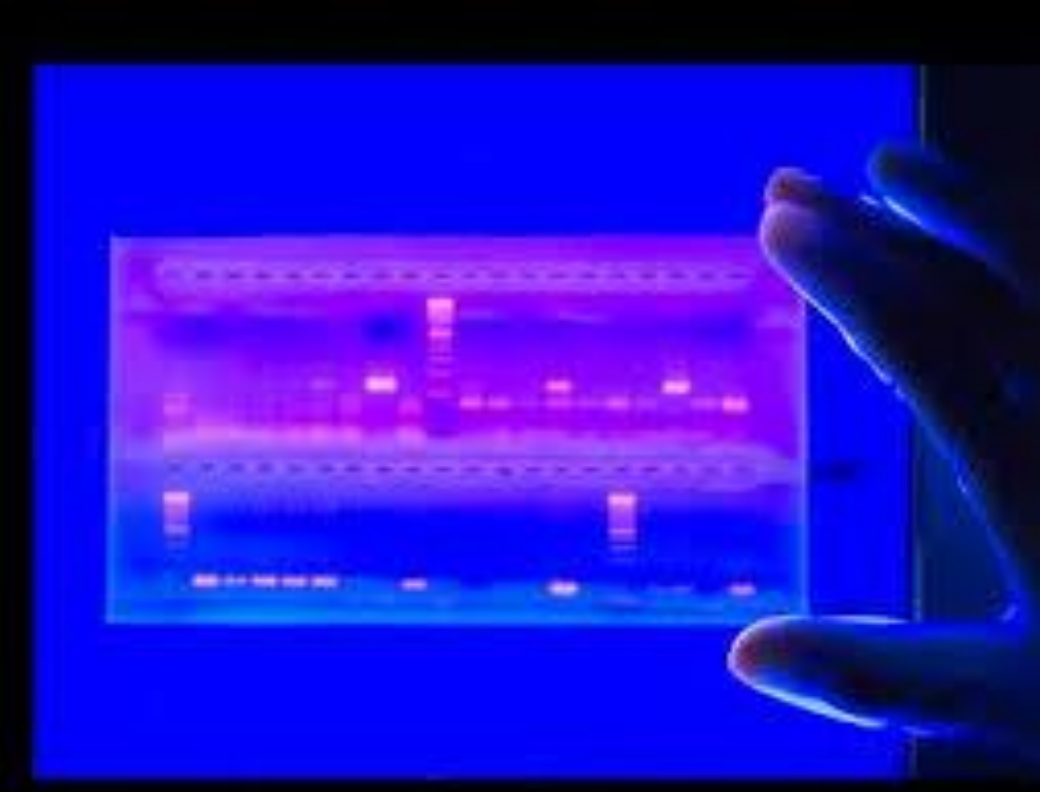
1. Preparation of the gel

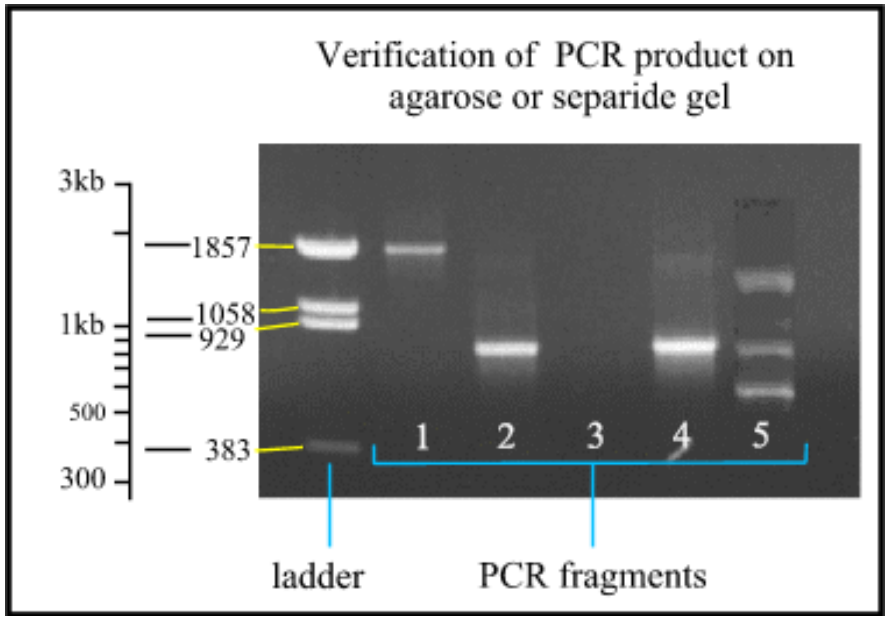
2. Loading the DNA

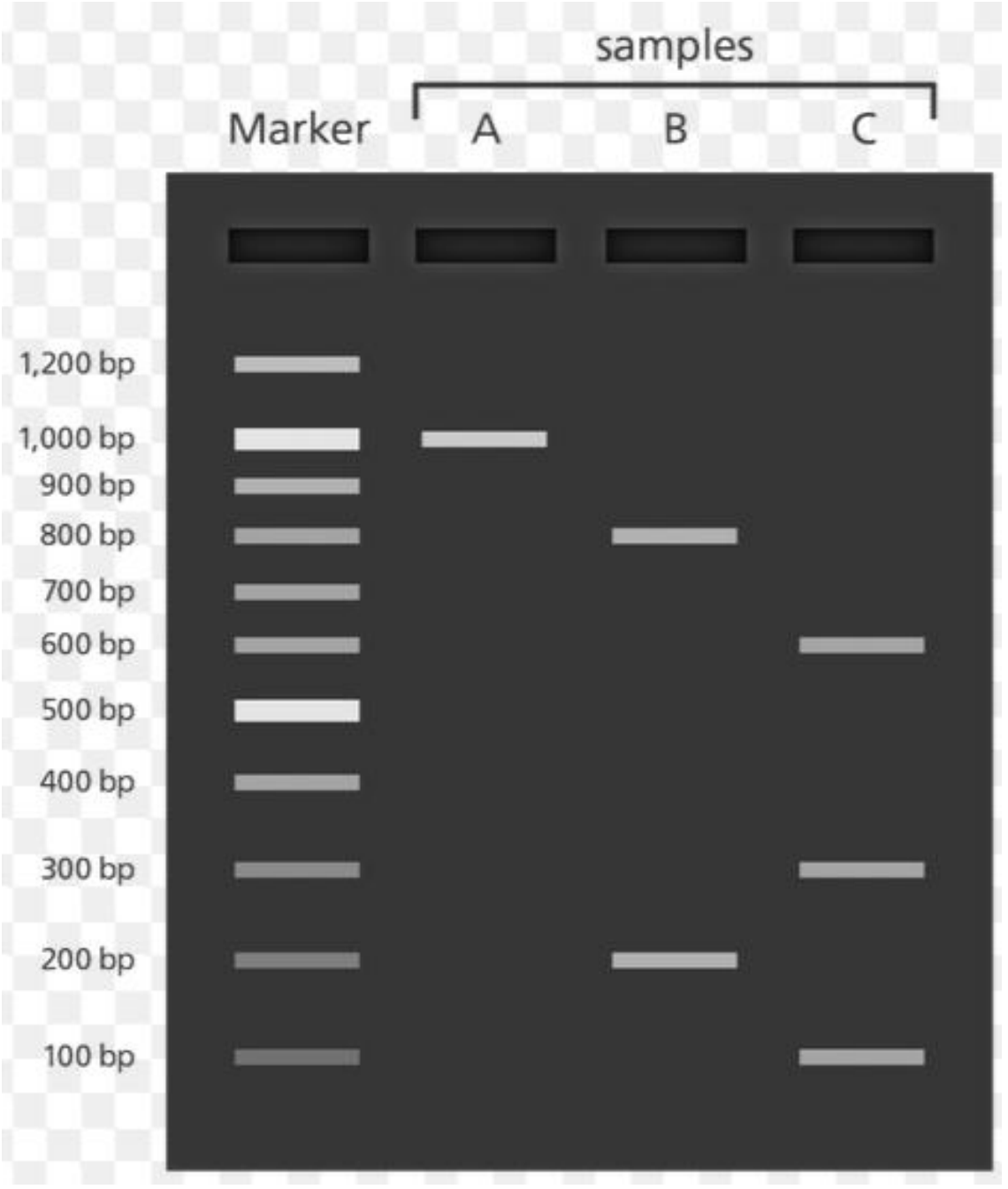
3. Separation

4. Staining






Verification of PCR product on
agarose or separide gel
3kb
1kb
500
300
1857
1058
929
383
1
2
3
4
5
ladder
PCR fragments


samples
Marker
A
B
C
1,200 bp
1,000 bp
900 bp
800 bp
700 bp
600 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

PCR

- Traditional PCR
- Reverse Transcripatse PCR
- Touchdown PCR
- Nested, Hemi-nested PCR
- Multiplex PCR
- Colony PCR
- Hot Start PCR
- In-Situ PCR
- Long PCR
- Quantitative PCR
- Competitive PCR
- Fluorometric Real Time PCR

كمية الـ DNA

تختلف كمية الـ DNA اللازمة لتفاعل الـ PCR وفق للتقانة المستخدمة. فعلى سبيل المثال لنسخ قطعة متخصصة من الشريط الوراثي كما هو في مؤشرات التتابع القواعد المتكررة البسيطة Simple sequence repeats واختصارا ندعوها بـ SSR يكفينا 10 نانو غرام من الـ DNA لإنجاز التفاعل بشكل ناجح، بينما نحتاج إلى كمية أكبر للبدء بتقانة الـ AFLP.

معظم الطرق المتبعة في استخلاص الـ DNA تأخذ بعين الاعتبار كمية النسيج المستخلص وبالتالي تقدر كمية الـ DNA النهائية بـ 10 – 100 ميكرو غرام

PCR and Diseases

تفاعل البلمرة والأمراض

- Primers can be created that will only bind and amplify certain alleles of genes or mutations of genes
- تستخدم البادئات بحيث أنها ترتبط مع وتضخم أليلات لجينات محددة أو طفرات لجينات محددة
- This is the basis of genetic counseling and PCR is used as part of the diagnostic tests for genetic diseases
- وهذا هو الأساس في الوراثة الإستشارية وتفاعل البلمرة لإستعماله كجزء من إختبارات التشخيص للأمراض الوراثية
- Some diseases that can be diagnosed with the help of PCR:
- بعض الأمراض التي يتم تشخيصها بمساعدة تفاعل البلمرة
- Huntington's disease
- مرض هنتغتون
- cystic fibrosis
- التليف الحوصلي
- Human immunodeficiency virus
- فيروس نقص المناعة في الإنسان (الإيدز)

Huntington's Disease (HD)

هنتغتون

- HD is a genetic disorder characterized by abnormal body movements and reduced mental abilities
  - مرض هنتنقتونس هو عبارة عن قصور وراثي يتصف بحركة غير طبيعية في الجسم وقصور في القدرات العقلية
- HD is caused by a mutation in the Huntingtin (*HD*) gene
  - يسببه طفرة في جين هنتغتون
- In individuals with HD, the *HD* gene is "expanded"
  - يتمدد الجين في الأشخاص المصابون
  - In non-HD individuals, the *HD* gene has a pattern called trinucleotide repeats with "CAG" occurring in repetition *less than* 30 times
  - في الأشخاص غير المصابون للجين نمط محدد يسمي بالنيكليوتيد الثلاثي بتكرار للقواعد (CAG) أقل من 30 مرة
  - IN HD individuals, the "CAG" trinucleotide repeat occurs more that 36 times in the *HD* gene
  - في الأشخاص المصابون تتكرر القواعد (CAG) في النيكليوتيدات أكثر من 36 مرة في جين هنتغتون

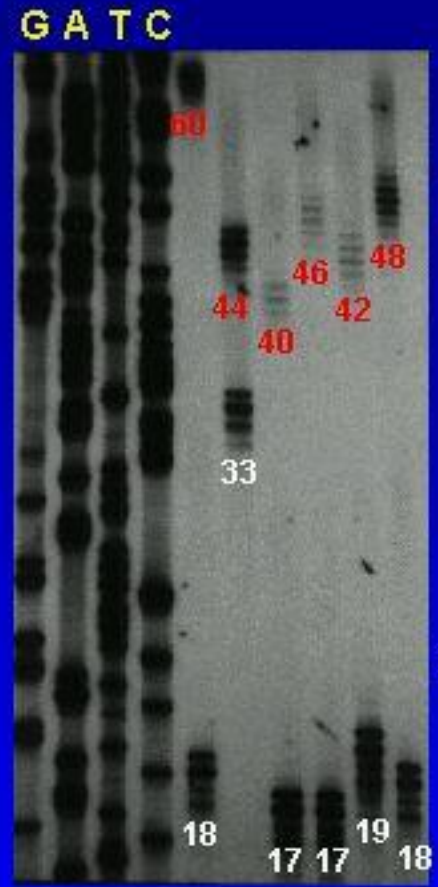
PCR can be performed on an individual's DNA to determine whether the individual has HD

يمكن أستخدام تفاعل البلمرة في دنا الأفراد لتحديد ما إذا كان الشخص مصاب بمرض هنتغتون

The DNA is amplified via PCR and *sequenced* (a technique by which the exact nucleotide sequence is determined) and the number of trinucleotide repeats is then counted

يضخم الدنا بتفاعل البلمرة وتحدد السلسلة ويتم حساب عدد تكرارالنيكليوتيدات الثلاثية

CAG REPEAT SIZING IN HUNTINGTON'S DISEASE



HD AFFECTED ALLELES ≥ 36 RPTS

HD NORMAL ALLELES 10 - 29 RPTS

(rare intermediate alleles of 30 - 35 rpts)

PCR Applications to Forensic Science

تطبيقات تفاعل البلمرة في العلوم الشرعية

- Paternity suits -Argentina's Mothers of the plaza and their search for abducted grandchildren
  - دعوات إثبات الأبوة (أو في حالة الأطفال المختطفين)

- Identifying badly decomposed bodies or when only body fragments are found, Bosnian and Rwandan mass graves
  - التعرف على الأفراد الذين توفوا وتحللت أجسادهم أو في حالة تبقي جزء من الجسم المتحلل مثل الوفيات الجماعية في المذابح كمذبحة البوسنة والهيرسك، رواندا

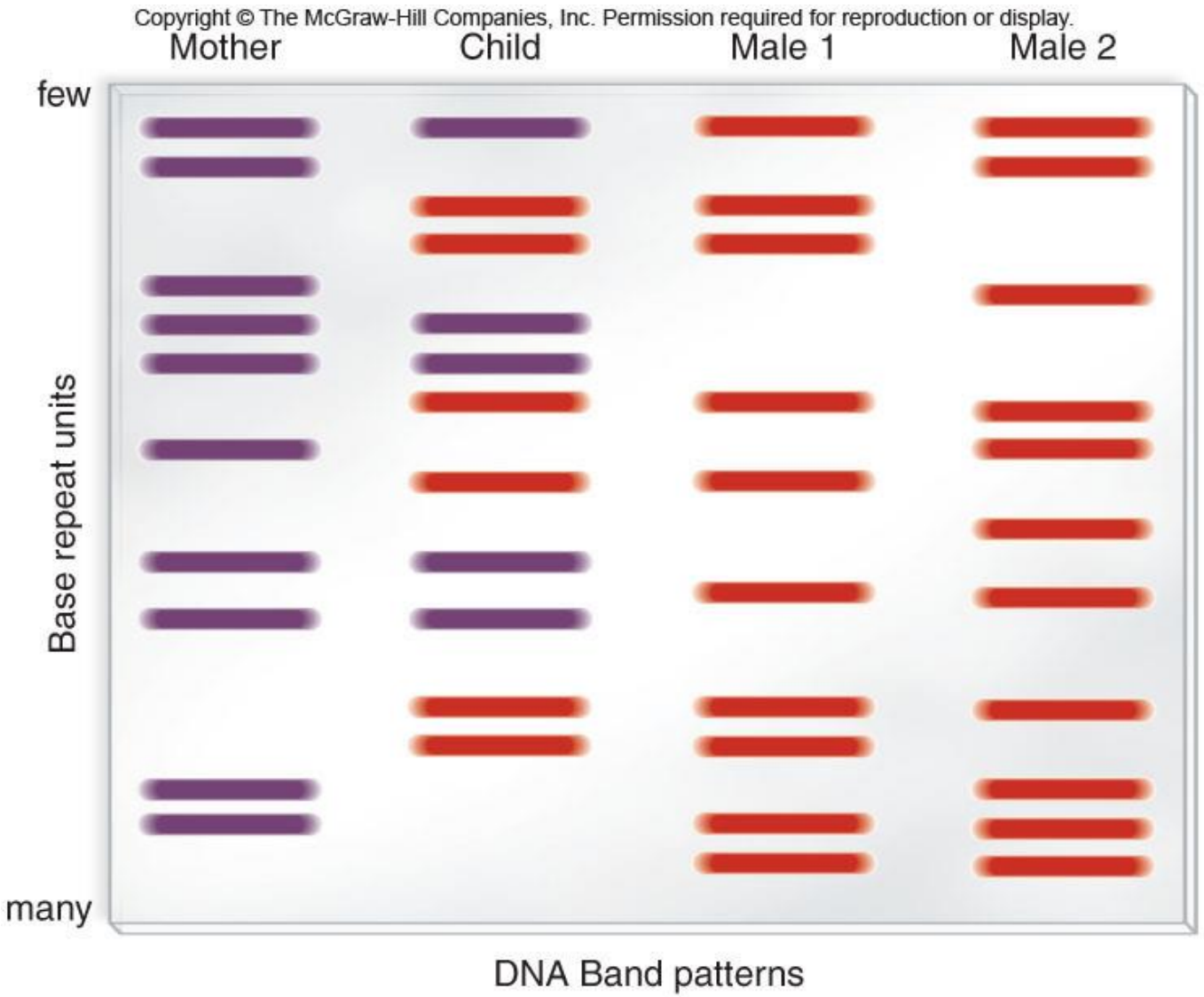
PCR can be used to amplify highly variable regions of the human genome. These regions contain runs of short, repeated sequences (known as variable number of tandem repeat (VNTR) sequences) . The number of repeats can vary from 4-40 in different individuals

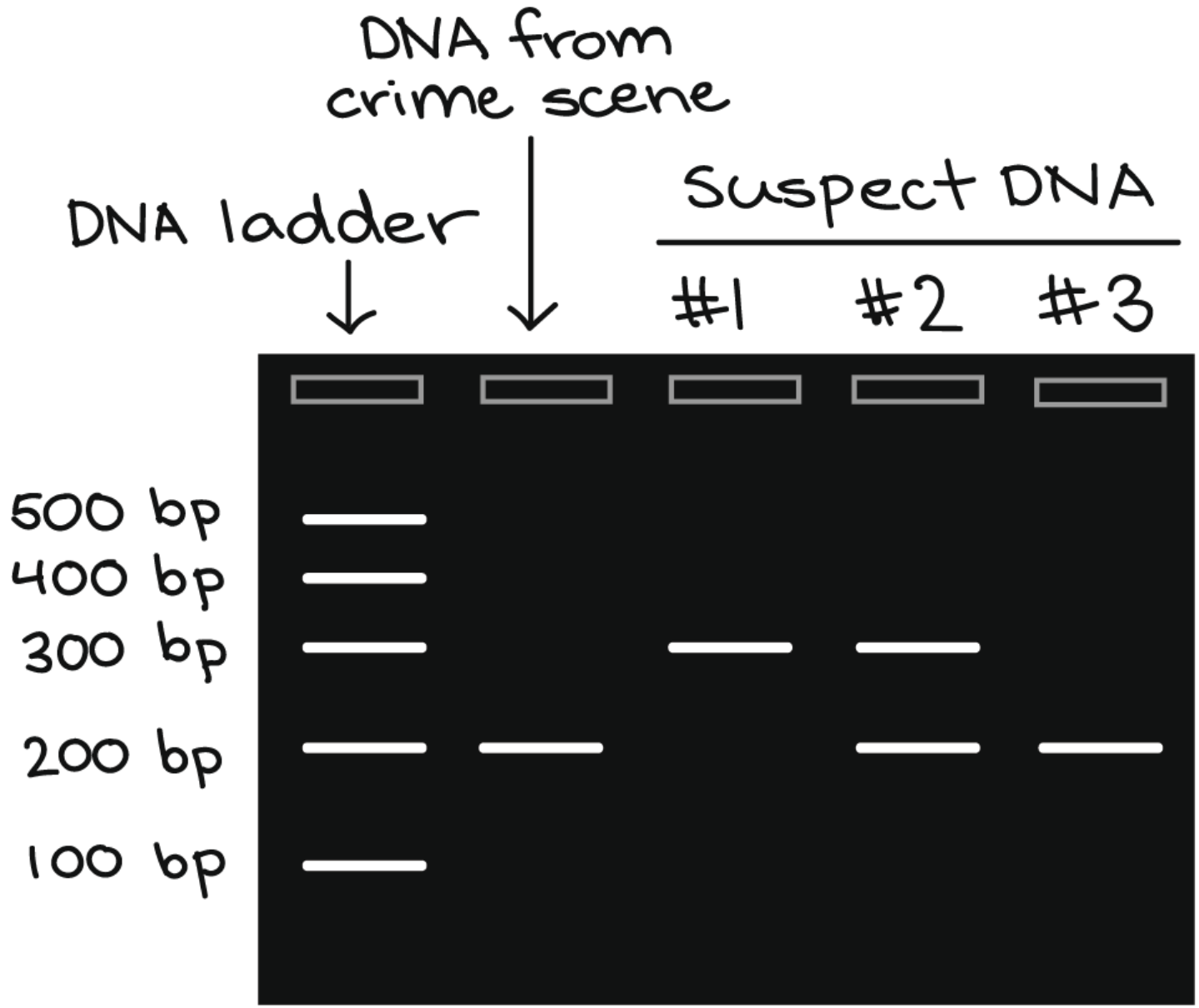
في تفاعل البلمرة يتم تضخيم المناطق عالية التباين في الإنسان، هذه المناطق تحتوي على سلاسل قصيرة متكررة تعرف بالعدد المتباين لسلسة التكرار المزدوج (VNTR) ، عدد المتكررات يترواح بين 4-40 في مختلف الأشخاص

Primers are chosen that will amplify these repeated areas and the genomic fragments generated give us a unique "genetic fingerprint" that can be used to identify an individual

يتم إختيار البادئات التي تمكن من تضخيم مناطق هذه المتكررات والأجزاء الجينومية التي يتم الحصول عليها تعطي بصمة وراثية متفردة والتي يمكن بها التعرف على الأفراد

DNA fingerprinting البصمة الوراثية




DNA from
crime scene
DNA ladder
Suspect DNA
#1
#2
#3
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp