تفاعل إنزيم البلمرة التسلسلي
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

fppt.com

تفاعل البوليمراز المتسلسل اختصاراً :(PCR) هو تقنية مستعملة بشكل واسع في علم الاحياء الجزيئي، حيث تعمل على انتاج سريع لمليارات النُسخ من عينة الحمض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) مما يُمكن العلماء من أخذ عينة صغيرة جدًا من الدنا وتضخيمها إلى كمية كبيرة. ويُعتبر هذا التفاعل أساسيا للعديد من الفحوصات الجينية، و هذه التقنية لايمكن الاستغناء عنها في كثيرٍ من الاحيان حيث تستخدم في المختبرات الطبية والزراعية البحوث المختبرية

fppt.com

مكتشف تقنية الـ PCR

كانت فكرة بواسطة عالم كيميائي تتضمن فصل الحمض النويو DNA و صنع نسخ كثيره منه .. وفعلا تحققت هذه الفكرة المبدعة..... من قبل العالم الكيميائي الامريكي كري موليس Kerry Mullis في عام 1983 (و قد حصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993) خطرت بباله فكرة أن يفصل الحمض النووي DNA ويصنع من نسخ كثيرة وقام بنشر اختراعه لتقنية البي سي ار PCR فكانت هذه التقنية بوابة لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التكنولوجيا الحيوية ، من أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية على الانتشار عدم اعتمادها على النظام الحيوي(أي الخلية) و التحكم بكمية الحمض النووي (DNA)

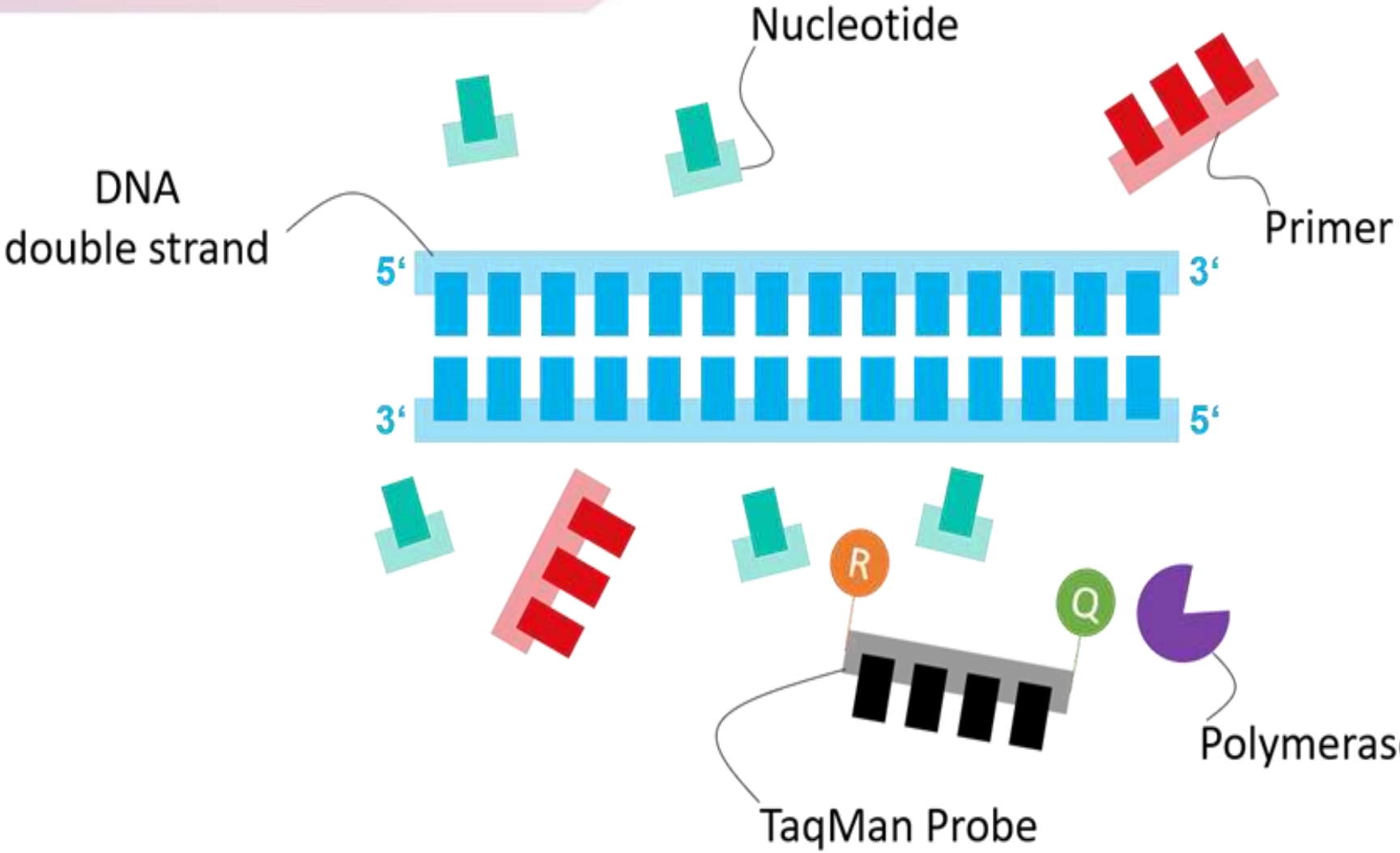
fppt.com

ما هو PCR

هو تقنية مخبريه تم اكتشافها عام 1983م تقريباً 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 لكي يتسنى إجرى عليه اختبارات و فحوصات إضافية.

fppt.com

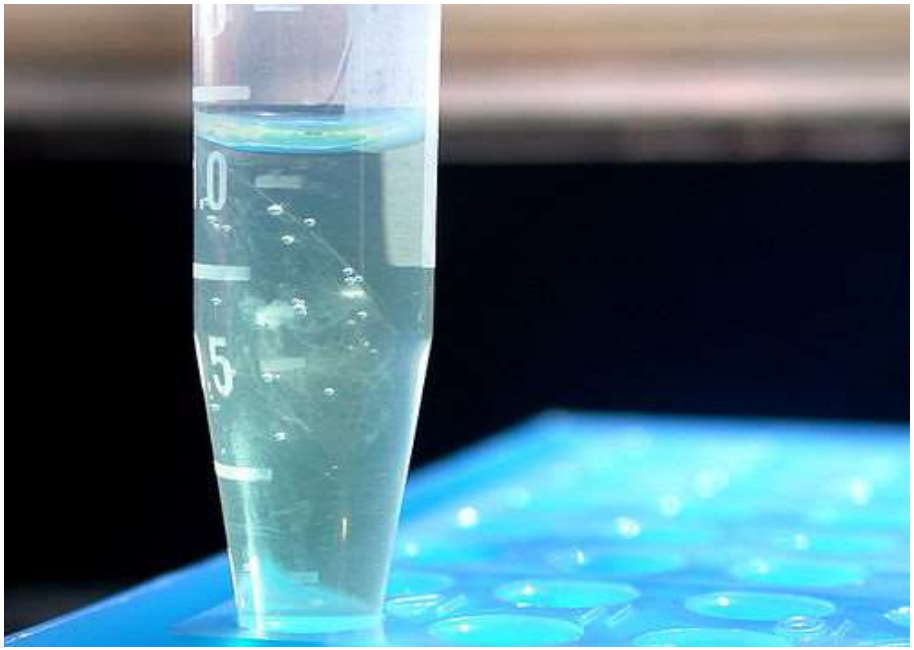
متطلبات تقنية PCR



fppt.com

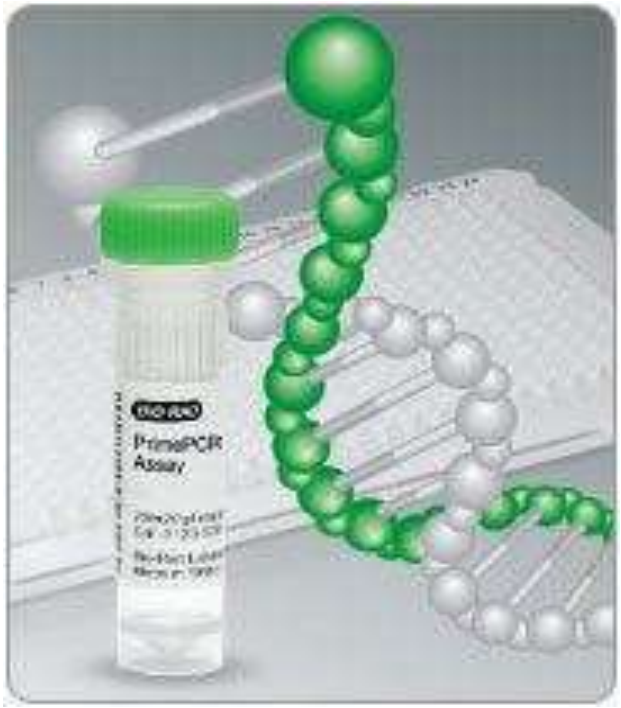
ما هي متطلبات PCR

1- التفاعل او يسمى قالب الحمض النويو (DNA Sample).



fppt.com

ما هي متطلبات PCR



2- البادئات (Primers) :

نوعان :

- أمامي (Forward)
- خليف (Reverse)

وهي تسلسل من القواعد النيتروجينيه في شريط واحد قصير

(20-25 bp) مكمل لبداية الجزء المراد تضخيمه في الحمض النووي .

fppt.com

ما هي متطلبات PCR

3- انزيم التفاعل (Taq plymerase) :

- مستخرج من سلالة بكتيرية تسمى *Thermus aquaticus* التي تتواجد طبيعيا في اليانبيع الحارة.
- وهو الإنزيم الذي يقوم ببناء وترتيب القواعد النيتروجينية (وحدات الحمض النووي (DNA).
- لا يتأثر بدرجات الحرارة المرتفعة .
- درجة الحرارةالمثلى له 72 °م.

fppt.com

ما هي متطلبات PCR

4- القواعد النتروجينية (Nitrogen Base dNTPs):

- أدنين Adenine
- ثايمين Thymine
- جوانين Guanine
- سايتوسين Cytosine

fppt.com

ما هي متطلبات PCR

5- محلول منظم (PCR Buffer 10x)

محاليل مناسبه أهمها محلول كلوريد المغنسيوم MgCL2 التي يعتبر عامل متمم Cofactor لتنظيم البوليمراز.

6- ماء مقطر (DW)

fppt.com

ما هي متطلبات PCR

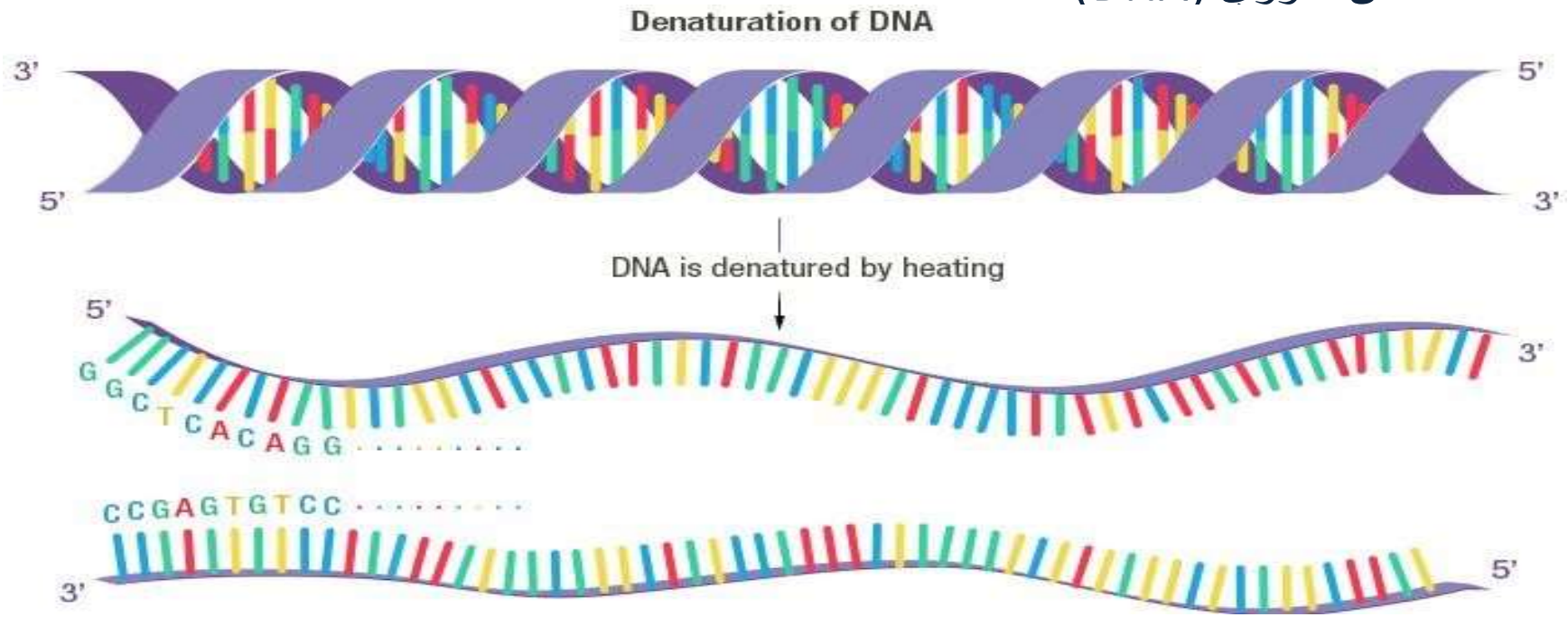
7- جهاز تفاعل البلمرة التسلسلي (Thermocycler PCR) :

يقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع ودقيق و متتالي لأن درجة الحرارة مهمة في عملية التضاعف .

fppt.com

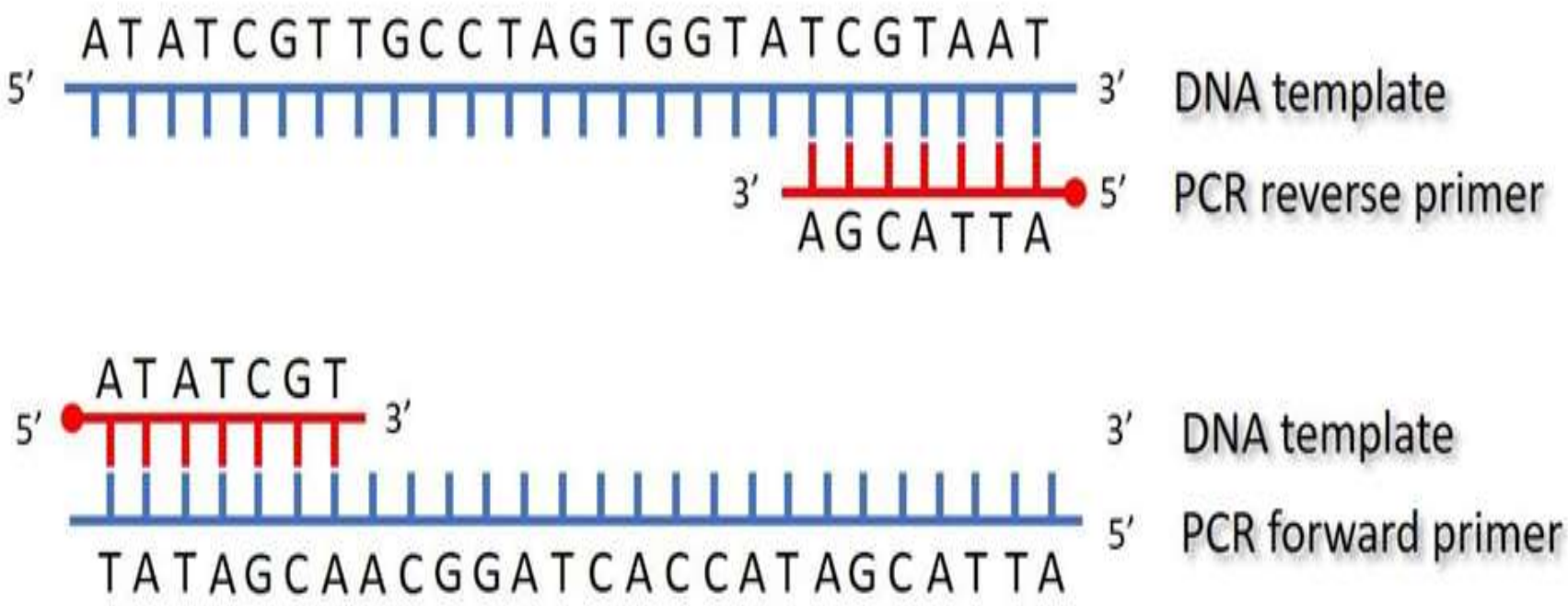
خطوات تقنية PCR
ثلاث مراحل في الدرورة الواحدة

1. **مرحلة التفكيك Denaturation :** هي الخطوة لاولى التي يتم صهر جزيئة DNAاي فصل الاشرطة المزدوجة وابعادها عن بعضها عن طريق رفع الحرارة إلى 94°م وذلك لفك الحمض النووى (DNA) الأصل .



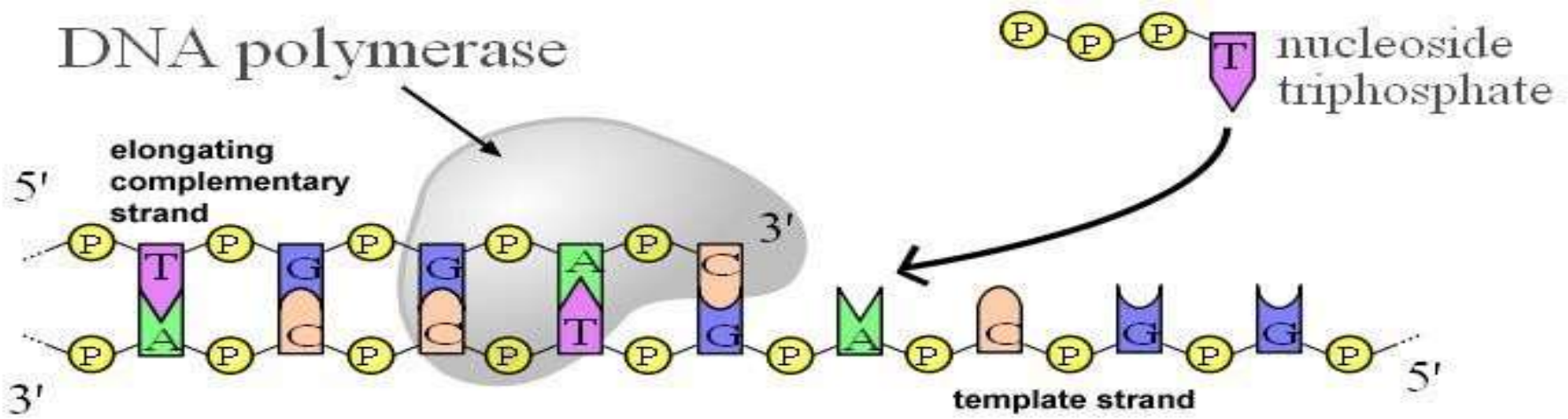
fppt.com

مرحلة الالتصاق **Annealing** : يتم تخفيض الحرارة من 50-60 م ليقوم الابرايمراو البادئ بالألتصاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) (الأصل .

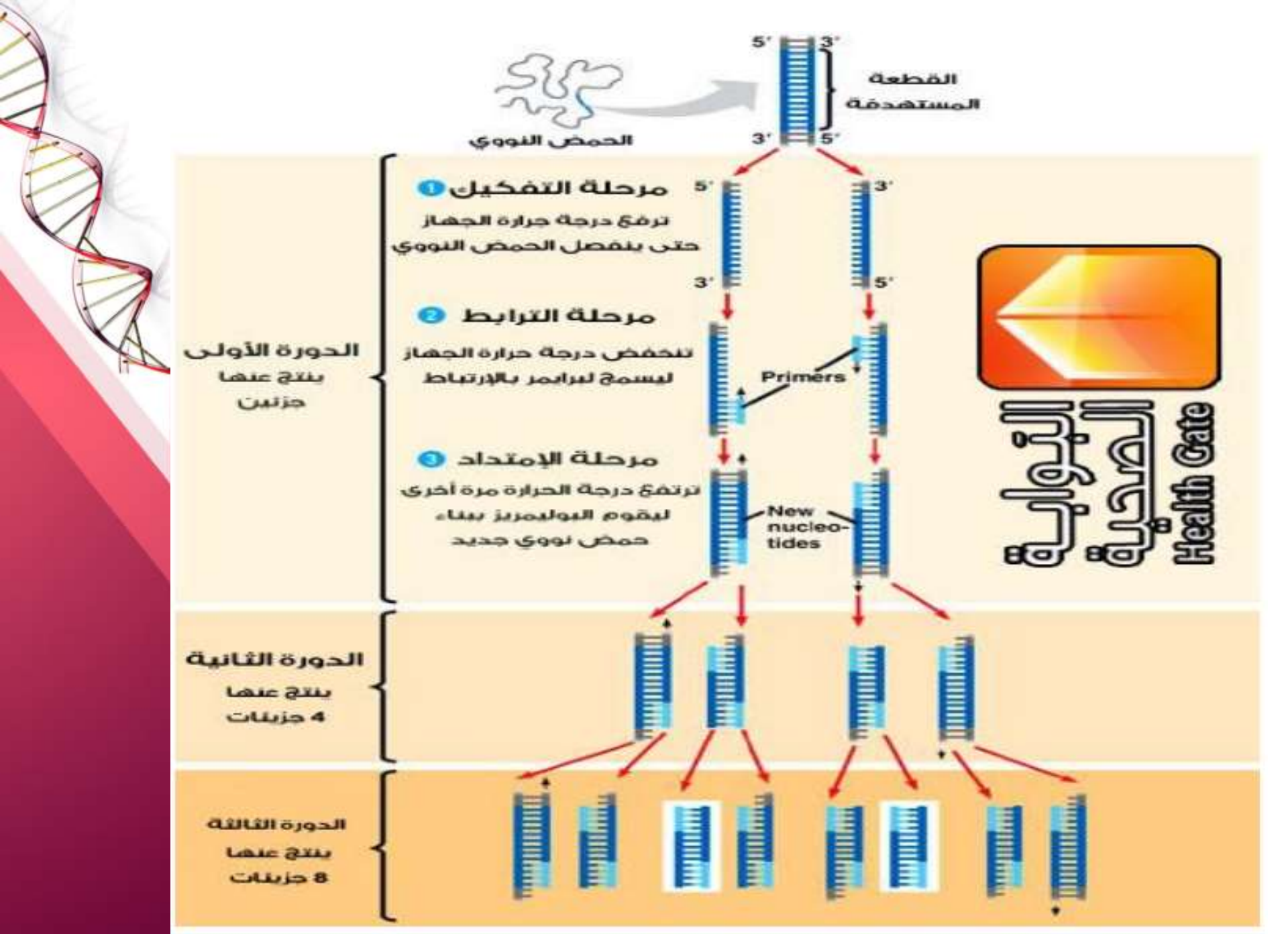


fppt.com

مرحلة الامتداد Extension :. تقوم برفع درجة حرارة الى72م وتعد هذه الدرجة مثالية لعمل انزيم البلمرة. تمتلك البوادئ قوة جذب ايوني عالي تجاه DNAالقالب اذا ترتبط البوادئ بالمواقع الخاصة بها على القالب ويباشر انزيم البلمرة ببناء شريط جديد مكمل للقالب بإضافة القواعد النيتروجينية الى البوادئ باتجاه 5 الى .3 وبانتهاء هذه المرحلة يتم الحصول عل اعداد كبيرة من DNA



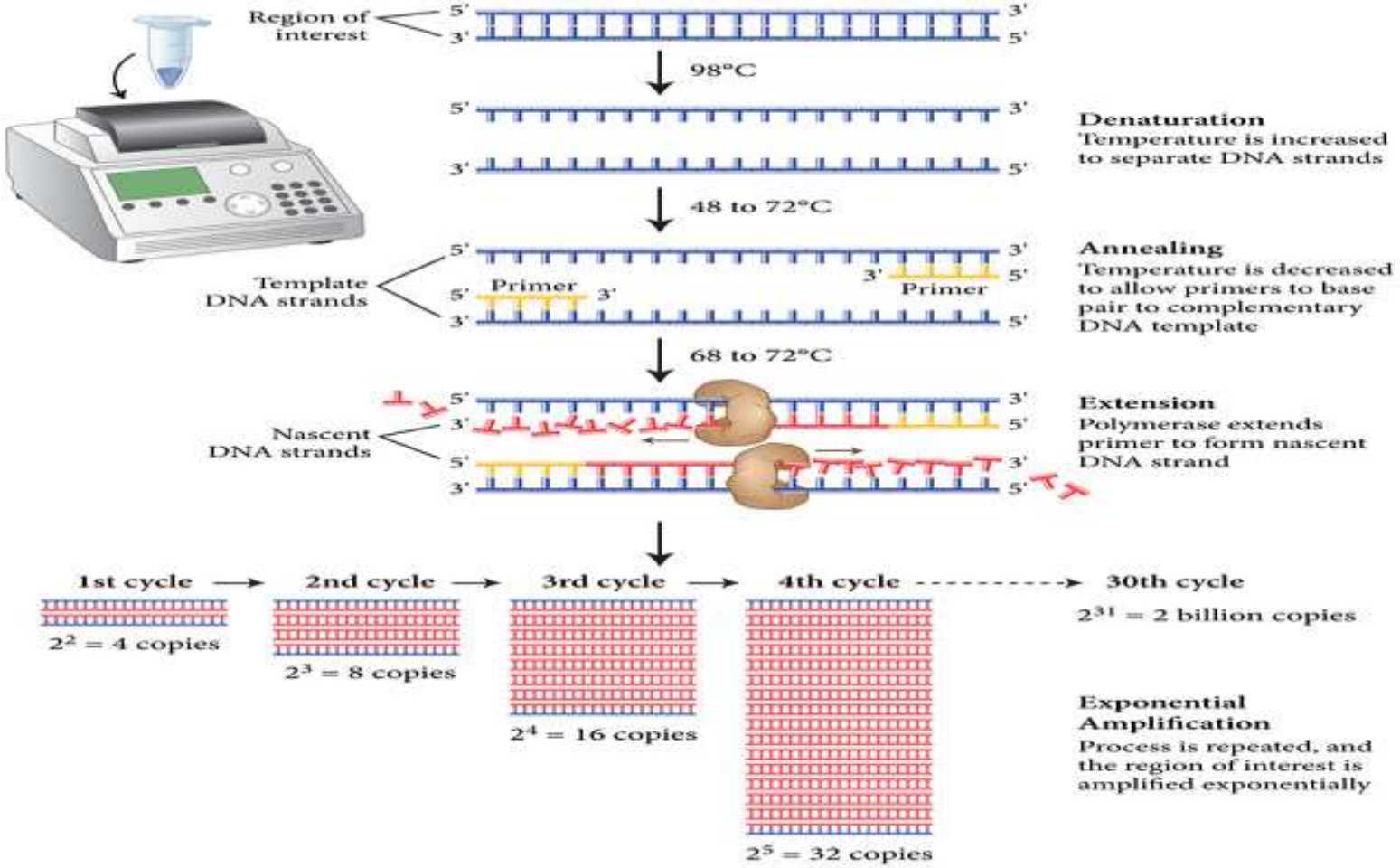
fppt.com



الحمض النووي
القطعة المستهدفة
5' 3'
3' 5'
مرحلة التفكيك 1
ترفع درجة حرارة الجهاز
حتى ينفصل الحمض النووي
مرحلة الترابط 2
تنخفض درجة حرارة الجهاز
ليسمح لبرايمر بالإرتباط
Primers
مرحلة الإمتداد 3
ترتفع درجة الحرارة مرة أخرى
ليقوم البوليمريز ببناء
حمض نووي جديد
New nucleo-tides
الدورة الأولى
ينتج عنها
جزئين
الدورة الثانية
ينتج عنها
4 جزيئات
الدورة الثالثة
ينتج عنها
8 جزيئات
البوابة الصحية
Health Gate

fppt.com

خطوات تقنية PCR
ثلاث مراحل في الدرورة الواحدة



fppt.com

طريقة عمل جهاز PCR

يجهز Master Mix من الشركات المختصة

الكمية بالمايكروليتر μl (X 1)	المكونات	
7.6	محلول منظم (PCR buffer 10x)	
4	خليط القواعد النتروجنبة (dNTPs)	
0.9	إنزيم عديد البلمرة (Taq polymerase)	
12.5	المجموع الكلي بالمايكروليتر μl	

fppt.com

طريقة عمل جهاز PCR

المكونات	الكمية مايكروليتر µl
Master Mix	12.5
بادئ امامي	1
بادئ خلفي	1
DNA	5
ماء مقطر	5.5

نضع جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي 3000 دورة في الدقيقه لمدة دقيقه واحدة لخلط جميع العينات وإزلة جميع الفقاعات ..

fppt.com

نظام التفاعل

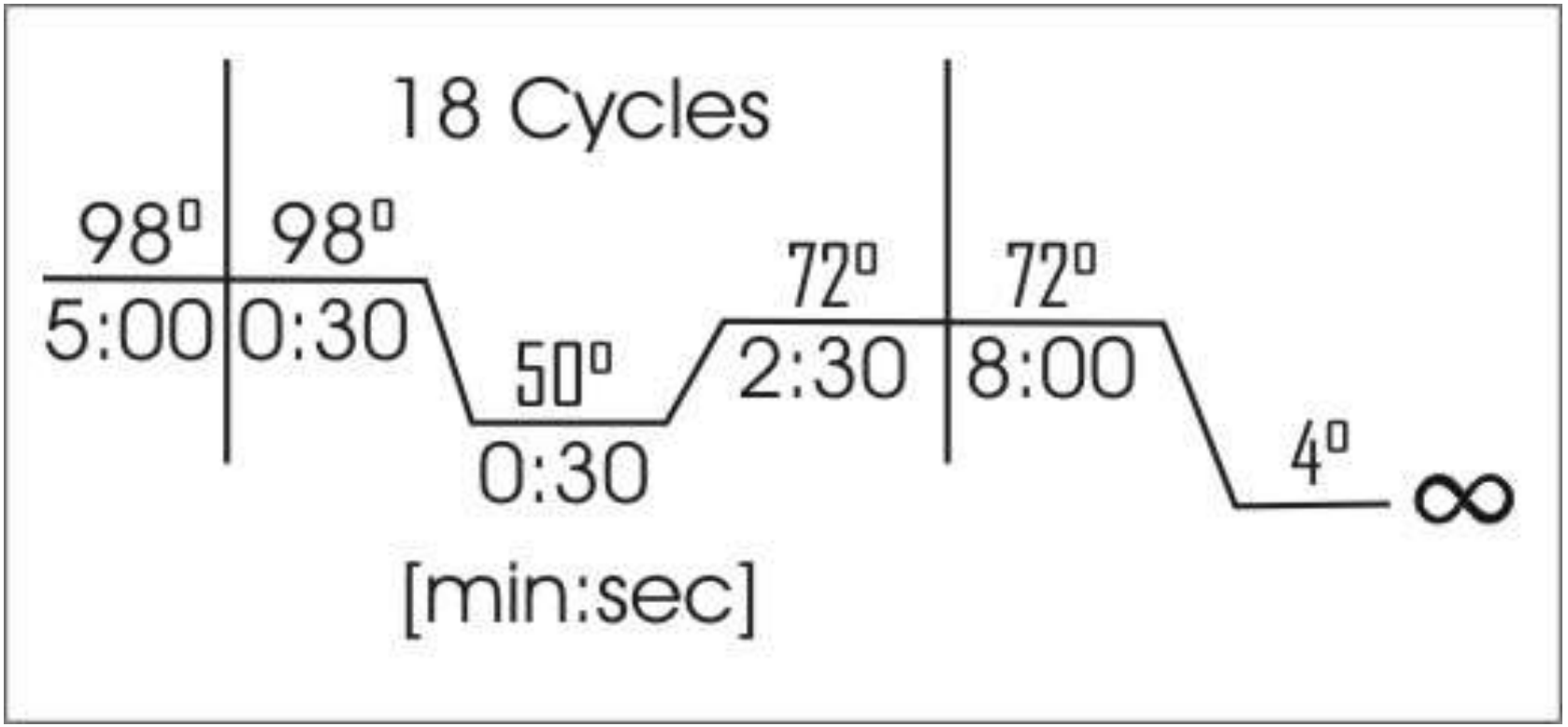
باستخدام لوحة المفاتيح وشاشة عرض الجهاز يتم ادخال الدورة المصممة لأي قطعة من الحمض النووي المفصول .

الخطوات	درجة الحرارة	الوقت	التفاعل
1	95˚c	5:00	تنشيط الأنزيم والتهيئة لمرحة تفكيك الحمض النووي DNA
2	95˚c	0:30	مرحلة التفكيك
3	62-50˚c	0:30	مرحلة الإلتصاق (درجة البادئ)
4	72 ˚c	2:30	مرحلة الإمتداد
5	إعادة الخطوة رقم 2 الى 4 لـ 30 دورة		
6	72˚c	7:00	ضمان اكتما مرحلة الإمتداد وإعادة التصاق الشريطين مع بعضهما واكمال عدد الدورات للنسخ
7	4˚c	∞	حفظ العينة

fppt.com

نظام التفاعل

نظام التفاعل



fppt.com

تطبيقات PCR

لتقنية PCRتطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي (DNAو الوراثة ومنها .

1- تشخيص مسببات الامراض النباتية (فطريات, بكتريا.....)والافات الحشرية
2-تشخيص النباتات
3-الكشف عن الطفرات الوراثية
4- تعين البصمة الوراثية .
5- الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
6- هو العملية الأساس في تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي DNA) Sequenc)
7معرفة طول الحمض النووي (. (DNA
8 في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، تحديد الهوية ... الخ) . وغيرها من التطبيقات المختبرية والبحثية

fppt.com