إن التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي (DNA) بشكل أساسي، استدعى ذلك العلماء للبحث عن طريقة أو تقنية مماثلة تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي (DNA) بشكل كبير، فكان هناك عدة محاولات لتنشيط الخلية على الانقسام المستمر بإضافة عوامل النمو Growth factors، ولكن هذه الطريقة لم تكن ذات جدوى لأسباب كثيرة. إلى أن توصل العالم Kerry Mullis في عام 1985 بنشر اختراعه لتقانة PCR فكانت هذه التقانة بوابةً لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التكنولوجيا الحيوية. من أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقانة على الانتشار عدم اعتمادها على النظام الحيوي (أي الخلية) و التحكم بكمية الحمض النووي (DNA)، أي أنها طريقة لنسخ الحمض النووي في المختبر لذلك فهي تقانة حيوية لاستنساخ قطعة محددة من الحمض النووي بعد استخلاصها من خلايا أو سوائل الجسم و مضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجراء الاختبارات و الفحوصات الإضافية عليها.

تقانة (PCR) Polymerase Chain Reaction (تفاعل البلمرة المتسلسل)

تعد هذه التقانة سريعة، وسهلة، وحساسة وأوتوماتيكية و هي تحتاج إلى توافر مواد معينة لكي يحدث التفاعل:

1 -البادئات Primers وهي عبارة عن نيكليوتيدات قصيرة (18– 30 Oligonucleotides أساس آزوتي) قادرة على الارتباط مع الأسس الأزوتية للحمض النووي المراد تضخيمه و تكون البادئات غنية بالغوانين C و السيتوزينG (من 40–60%) و يجب حساب درجة الحرارة الملائمة للبادئات.

2– كميات وافرة من النيوكليوزيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين Deoxynuleoside (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) triphosphates (dNTPs)

3 – أنزيم التكثيف البوليميراز Polymerase وهو مقاوم للحرارة المرتفعة، وأهمهاTaq Polymerase المستخلص من بكتيريا تعيش في مياه الينابيع الحارة Thermus aquaticus في درجة حرارة أعلى من 110 °م (230 F). يعد هذا الإنزيم مسؤولاً عن تضاعف الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و هو جزء من اسم الطريقة Polymerase Chain Reaction.

4– محاليل واقيه Buffers.

5– شوارد مناسبة، أهمها شاردة المغنيزيوم Mg+2 التي تعد عامل متمم Co-factor لأنزيم البوليمراز.

يتم تضخيم قطعة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين باستخدام جهاز التدوير الحراري الآلي Thermocycle و ذلك للتحكم بدرجة حرارة التفاعل بشكل دقيق و متتالي ويقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع، لآن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقانة. يتم التضخيم بعدد من الدورات يتراوح بين 25–40 دورة و تتكون كل دورة PCR من ثلاث مراحل كالآتي:

I– Denaturation: مرحلة التحطيم أو التفكيك الحراري لجزيء الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين :

أي فصل السلسلة المزدوجة ds-DNA نتيجة تحطم الروابط الهيدروجينية. وتتم هذه المرحلة عند درجة حرارة 94 °م، حيث تتوقف جميع التفاعلات الأنزيمية.

II– Primers Annealing: مرحلة تشفع البادئات (ارتباط البادىء بقطعة الحمض النووي):

يتم ذلك بتخفيض درجة الحرارة إلى 35–65 °م، (و ذلك تبعاً لطول البادئ و تركيبه من الأسس الآزوتية). حيث يلتصق البادئ على الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين في المكان المناسب، ويقوم أنزيم البوليميراز بإكمال السلسلة المتممة ومضاعفة سلسلة الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين.

المعادلة التي تحسب درجة الحرارة اللازمة لارتباط البادئ بقطعة الحمض النووي:

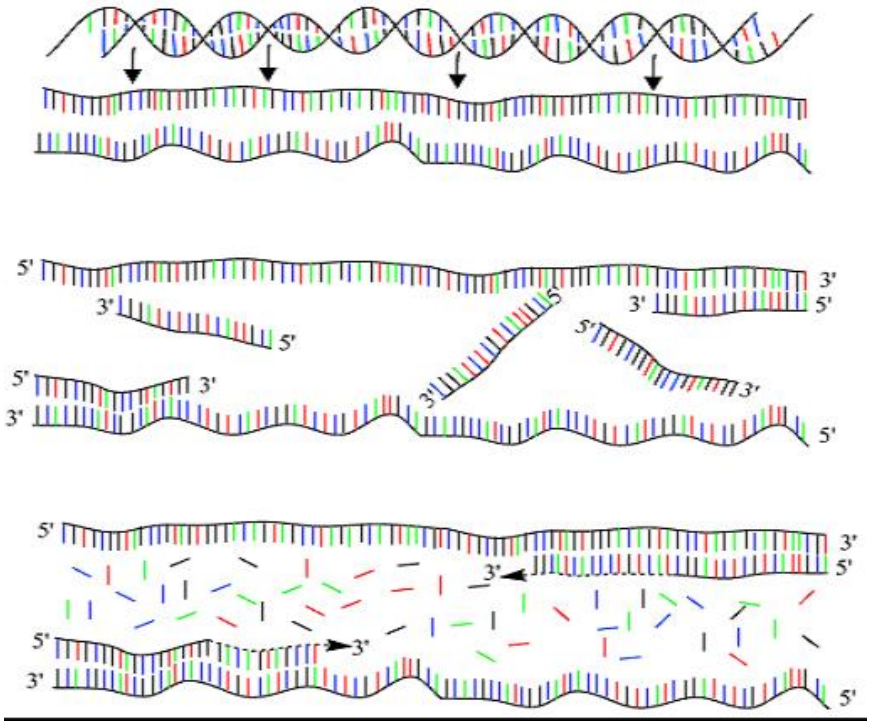
$$\underline{(A+T)\times 2+(C+G)\times 4}$$

III- Extension: مرحلة إعادة تركيب السلسلة الجديدة المكملة لقطعة الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الأصلية:
و ذلك باستخدام نيكليوتيدات مفردة ثلاثية الفوسفات ATP، CTP ، GTP، TTP وبمساعدة أنزيم البوليميراز، من خلال رفع درجة الحرارة إلى 70-75 م°.

تسمح هذه التقانة بالحصول على ملايين من النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين والتي تتضاعف أسياً exponentially، من خلال استخدام دورات حرارية متعددة.

إن الحساسية العالية التي تبديها هذه التقنية تجعلها عرضة لإعطاء نتائج إيجابية كاذبة بسبب أي تلوث خارجي المنشأ ومن أهم مصادر هذا التلوث: منتجات تضخيم سابقة أو التلوث من عينة أخرى. لذا يعد التلوث العقبة الوحيدة المهمة التي تواجه استخدام هذه التقنية لغايات تشخيصية و يمكن تجنب التلوث بالانتباه الجيد لتفاصيل العمل المخبري.

تفاعل البلمرة المتسلسل PCR



المراحل المختلفة لتفاعل البمرة المتسلسل PCR.

قطع الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين التي ضخمت لتفاعل البمرة المتسلسل PCR في هلامة الأغاروز و موضحة من خلال صبغة بروموفينول الزرقاء.

تطبيقات تقانة تفاعل البمرة المتسلسل PCR:

لتقانة **تفاعل البمرة المتسلسل** PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي (DNA) خاصةً و الوراثة عامةً ومنها:

– الكشف عن الطفرات الوراثية: وذلك عن طريق وضع بادىء خاص للطفرة لتضخيم المورث الخاص بها ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجي الصبغيات أو على إحداهما (allele).

– تحديد البصمة الوراثية: و هو العنصر الأهم في عملية الاتحادات الجديدة للحمض النووي (Recombinant الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين) حيث يقوم PCR بتضخيم المورث المراد إدخاله على البلاسميد أو الحمض النووي (DNA) المضيف.

– تحديد تتابع النيكليوتيدات في الحمض النووي (Sequencer DNA).

– معرفة طول الحمض النووي (DNA).

– الحصول على الحمض النووي المكمل (cDNA).

– تحديد المورث المطلوب من خليط من المورثات.

– دور فعال في مشروع الخارطة الوراثية البشرية (Human genome project) .

– و في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة، حالات الاغتصاب، تحديد الهوية ... الخ). وغيرها من التطبيقات المخبرية والبحثية.

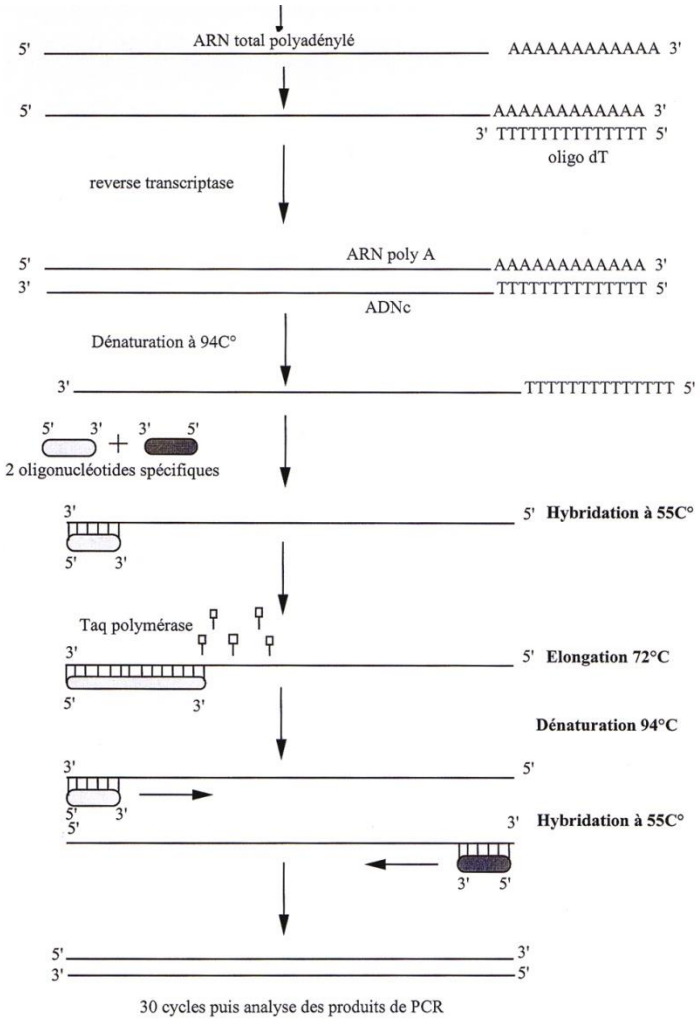
النسخ العكسي المترافق مع التضخيم بواسطة Tag polymerase (تقانة RT-PCR):

تمكن هذه التقانة من التحديد الدقيق للكميات القليلة من RNA و تحليليها في المجالات المهمة لمعظم الدراسات البيولوجية الجزيئية. يعطي التكيف مع طرق PCR الخاصة بـ RNA الباحث السرعة في العمل و النوعية و الدقة في النتائج. و بما أن RNAلا يصلح أن يكون قالباً في PCR فان ذلك يستدعي إلى تحويله إلى الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين المتمم و الذي يكون ملائماً لتفاعلات PCR .

و تعد تقانة RT-PCR ذات أهمية في تحديد التعبير المورثي و تشخيص عوامل العدوى و تشخيص الأمراض الوراثية. و لا بد من توافر مواد معينة لكي يحدث التفاعل:

أنزيمات النسخ العكسي (Reverse transcriptase): و تمثل RNA-dependent polymerases و التي تساهم في بناء الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين المتمم cDNA .

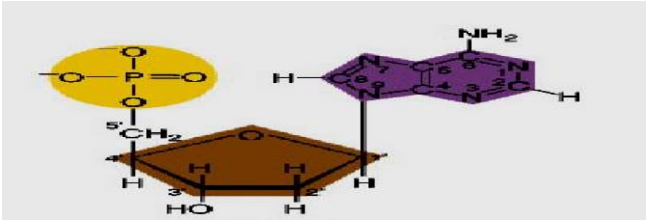
البادئات: يستخدم البادئ Oligo-dT (متعدد 12–18 أساس أزوتي) في النسخ العكسي الذي يقتضي تركيب السلسلة الجديدة cDNA ابتداءً من mRNA ذو ذيل متعدد الأدنيل A (Poly A).



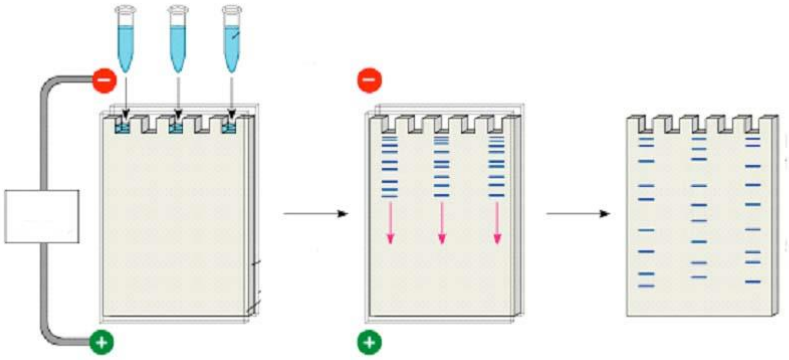
مراحل RT-PCR

الرحلان الكهربائي الهلامي Gel electrophoresis

تعد تقنية الرحلان الكهربائي من المقومات الأساسية للهندسة الوراثية، و التي بواسطتها يتم تصور قطع الحمض النووي مباشرة، تعتمد هذه الطريقة على طبيعة الحموض النووية التي تمثل مركبات متعددة الشحنة السالبة Polyanionic في درجة pH متعادلة، تحمل الأحماض النووية شحنات سالبة متعددة من خلال المجموعات الفوسفاتية ثنائية الاستر لسلاسل الحمض النووي. و يعني ذلك هجرة الجزيئات نحو القطب الموجب عند وضعها في مجال كهربائي. يوجد نوعان من الهلامات gel تستعملان بشكل واسع و هما: الأغاروز Agarose و متعدد الأكريلامايد Polyacrylamide.



الشحنة السالبة الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين لوجود زمرة الفوسفات.

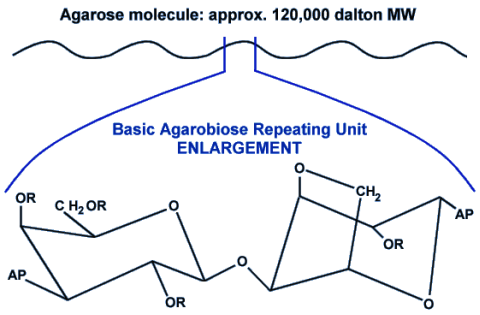


الرحلان الكهربائي الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين نحو القطب الموجب.

تمر الجزئيات عبر حقل كهربائي متنوع الجهد و تهاجر إلى الالكترود المناسب، و تعتمد سرعة الهجرة على: الجهد المختلف بين القطبين، شحنة الحموض النووية، المسافة بين الالكترودين، و لزوجة المحاليل (تركيز الهلامة و حجم الثقوب). فبذلك تهاجر القطع الصغيرة (ذات الوزن الجزيئي المنخفض) بسرعة أكبر من هجرة القطع الكبيرة (ذات الوزن الجزيئي المرتفع).

جزيء الأغاروز :

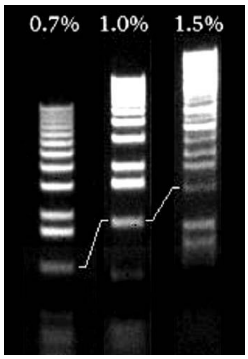
جزيء الأغاروز عبارة عن متعدد السكاريد الخطي (وزنه الجزيئي حوالي 12000 KDa) و مركب من تكرار وحدة Agarobiose أغاربيوز الذي بدوره يتكون من تسلسل للسكر البسيط الغالاكتوز و مستخلص من الطحلب البحري Seaweed. كما يتميز الأغاروز أيضاً بأنه مادة هشة ضعيفة و تتكسر بسهولة بالتسخين (طورت في عام 1970).



بنية جزيئية الأغاروز.

يترواح تركيز هلامة الأغاروز بين0,7 و 2%. تكون المسامات في الهلامة كبيرة في حال التركيز 0,7% و تستخدم لفصل القطع الكبيرة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (5–10 Kb)، في حين تكون المسامات صغيرة في حال التركيز 2% و تستخدم لفصل القطع الصغيرة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (1-0.2 Kb). يمكن في بعض الحالات استخدام تراكيز أعلى من ذلك.

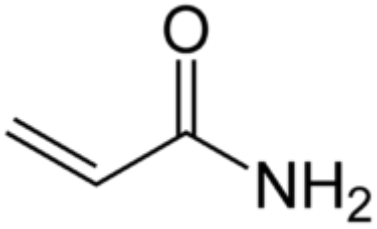
تستخدم هلامة الأغاروز لإظهار قطع الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الناتجة عن استخدام أنزيمات القطع، تحديد نقاوة الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين، فصل قطع الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين أو RNA و تحديد أطوالها.



تركيز هلامة الأغاروز

هلامة الأكريلامايد Polyacrylamide:

وصفت هلامة متعدد الأكريلامايد من قبل Raymond and Weintuab عام 1959 و تستخدم هذه الهلامة في فصل جزيئات صغيرة من الحمض النووي الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و يكون ذلك مهماً في عزل القطع التي تختلف في الطول بأساس أزوتي واحد فقط، و ذلك لان حجم مساماتها أصغر و هي أكثر مرونة و تحدد بوضوح الحزم مقارنة بهلامة الأغاروز.



بنية الأكريلامايد.

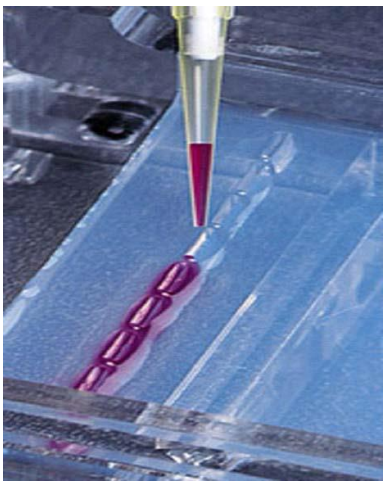
يترواح تركيز هلامة متعدد الأكريلامايد بين 3-30%، و هي تسمح بفصل جزيئات البروتين التي تتراوح أوزانها الجزيئية من 5 إلى 2000 KDa و تكون الهلامة رقيقة جداً (5 مم أو أقل) كما يمكن حفظ هذه الهلامة في الكحول مدة طويلة. كما تستخدم هلامة متعدد الأكريلامايد لفصل جزيئات البروتين و متعدد الببتيد و لتحديد تتابع الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين .

الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة الأكريلامايد.

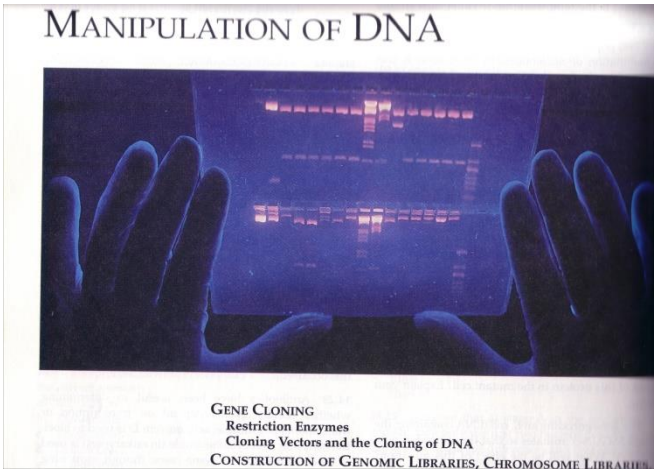
يستمر الرحلان الكهربائي حتى وصول الصبغة المرئية المستخدمة (صبغة بروموفينول) إلى نهاية الهلامة (دليل نهاية الرحلان الكهربائي).

كما يمكن في بعض الأحيان استخدام صبغة Xylene cyanol.

يمكن رؤية الحامض النووي المتوضع على الهلامة بإضافة صبغة الأثيديوم بروماید ، التي تتخلل بين الأسس الأزوتية لـ الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و تتفاعل معها فيظهر الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين عندئذ ذو وميض وهاج فيسهل تعينها وتصويرها بالأشعة فوق البنفسجية (UV)، و لا بد من إضافة مؤشر يعبر عن الطول الجزيئي(*1 kb ladder*) ، و هو عبارة عن محلول تجاري يتألف من قطع *الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين* ذات أطوال معروفة و يستخدم هذا المؤشر للمقارنة.



استخدام صبغة بروموفينول الزرقاء



صبغة الأثيديوم بروماید

انتهت الجلسة