Polymerase Chain Reaction (اختصارًا PCR)

التفاعل التسلسلي للبوليميراز- تفاعل البوليمراز المتسلسل - التفاعل المتسلسل بإنزيم البلمرة – تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل

تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي عند انقسام الخلية بشكل تلقائي وبشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ. و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى 1000 قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي) وهي كما ذكرنا تحدث في الخلية في وقت التكاثر والانقسام فقط . ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي DNA بشكل أساسي، استدعى ذلك العلماء على أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي DNA بشكل كبير، خارج النظام الحيوي (الخلية). إذ ان أهم الأسباب التي تعيق تطبيق تقانات البيولوجيا الجزيئية هو ندرة الحموض النووية DNA و RNA في العينات المراد دراستها، وتقانة الـPCR مكنت الباحثين من الحصول على كميات ضخمة من الحموض النووية مقدرة بعشرات إلى مئات النانوغرامات. تُمكّن طريقة الـPCR من مضاعفة دورية للـ DNA في أنبوب الاختبار، للحصول على كميّات كبيرة من مقاطع مُحدّدة من الـ DNA. عمليًّا، تُستعمل الطريقة لاستنساخ مقاطع DNA، نرغب باستنساخها دون الحاجة إلى المكتبات أو إلى البكتيريا، حيث يتمّ ذلك خلال ساعات معدودة فقط، بدل من أن يستغرق أشهرًا طويلةً. بسبب الوقت القصير الذي تحتاجه هذه الطريقة وبفضل حساسيتها الكبيرة، لا يزال استعمالها واسع النطاق في هذه الفترة أيضًا، حتى بَعد مرور 40 سنة على تطويرها.

ما هو الـ PCR

هي طريقةٌ حيوية أو تقنية مخبرية مُستعملةٌ بشكلٍ واسعٍ في علم الأحياء الجزيئي، حيثُ تعمل على إنتاجٍ سريعٍ لمليارات النُسخ من عينةٍ خاصةٍ للحمض النووي الرايبوزي منقوص الأكسجين (DNA) خارج النظام الحيوي (أي أنها تجرى خارج الخلية وضمن المختبر in vitro في أنابيب اختبار)، مما يُمكن العلماء من أخذ عينةٍ محددة صغيرةٍ جدًا من DNA وتضخيمها ومضاعفة انتاجها إلى كميةٍ كبيرةٍ تكفي لدراستها بالتفصيل واجراء الاختبارات والفحوصات الاضافية عليها.

ابتكرت هذه التقنية من قبل العالم الامريكي Kary Mullis عام 1983 والذي حاز على جائزة نوبل بالكيمياء عام 1993

تهدف تقنية تفاعل الـ PCR لمكاثرة (مضاعفة، تضخيم، زيادة) قطعة معينة من جزيئة الـ DNA خارج الخلية لمرات عديدة حتى تصبح في نهاية التفاعل بأعداد كبيرة وتسمى Amplification في دوراتٍ من تغيرات درجة الحرارة بحيث أن كل جزيئة تتكون من هذه التفاعلات سوف تصبح هي ايضا قالبا لجزيئة اخرى يتم بنائها لاحقا.

الغاية من هذه العملية هو استخدام السلاسل الهجينة الناتجة في كل خطوة من خطوات الاصطناع كقالب من أجل الخطوة اللاحقة بدلاً من اعادة السلاسل الأساسية في كل مرة

يُعتبر تفاعل الـPCR، شائعًا حاليًا ولا غنًى عنه في كثيرٍ من الأحيان حيثُ يستخدم في المختبرات الطبية والبحوث المخبرية السريرية في مجموعةٍ واسعة من التطبيقات العملية والتي تتضمن البحوث الطبية الحيوية والطب الشرعي الجنائي. من أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية **على الانتشار** هو عدم اعتمادها على النظام الحيوي (أي الخلية) والتحكم بكمية الحمض النووي DNA وسرعة في الإنتاج. ولكن من **عيوب هذه التقنية** (محدودية تقانة الـPCR):

1- عدم وجود نظام إصلاح أخطاء الارتباط الخاطئ miss match إذ أن أنزيم Taq polymerase لا يصحح الأخطاء التي يرتكبها أثناء العمل وذلك يؤثر على التجربة المجراة في حال كانت عملية الـPCR تجرى لمعرفة تسلسل القطعة المدروسة وفي هذه الحالة نلجأ إلى استخدام أنزيم آخر يصحح الأخطاء ولا يتخرب بالحرارة. أما إذا كانت التجربة من أجل تحديد طول القطعة فقط فالأخطاء التي تحدث لا تؤثر تأثيراً كبيراً على النتائج.

2- يجب معرفة التسلسلات المجاورة للقطعة المرغوبة لعمل بوادئ مناسبة.

3- قابليتها للتلوث، من أجل هذا يجب إجراء شاهد سلبي لكل عملية PCR (وهو انبوب نضع فيه كل المكونات اللازمة ما عدا الـDNA المدروس) ويجب أن لا يظهر فيه أية قطعة متضاعفة بعد انتهاء العملية.

4- طول القطعة المضخمة عبر تقانة الـPCR محدود.

متـطـلبـــات الـ PCR تتطلب العديد من الاجراءات والتي تكون مشابهة لمتطلبات مضاعفة DNA في خلايا الكائن الحي.

يمكن اعتبار تقنية PCR محاكاة مبسطة لعملية انتساخ الحمض النووي DNA أثناء الانقسام الخلوي

تهدف تقنية PCR إلى تضخيم جزيئات قليلة من الحمض النووي DNA، بعد استخلاصه من خلايا أو سوائل الجسم وبالتالي الحصول على كميات كبيرة منه يمكن إجراء التحليل عليه. يمكن اعتبار تقنية PCR ترجمة مبسطة لعملية انتساخ الحمض النووي DNA أثناء الانقسام الخلوي. ولكي يتم هذا الانتساخ، لا بد من توفر مواد وادوات معينة تساعد على ذلك:

1- جهاز الدورة الحرارية Thermocycle للتحكم بدرجات حرارة التفاعل بشكل دقيق ومتتالي

و المدور الحراري Thermal cycler هو جهاز يستخدم في تقنية الـ PCR، ويقوم بعملية نسخ الـ DNA. حيث يقوم هذا الجهاز بتغيير درجة الحرارة بشكل سريع، ودقيق ومتتالي لان تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه

التقنية. إذ أن تغير درجة الحرارة مهم في عمليه التضاعف. حيث أن المراحل الثلاث في كل دورة من دورات الـPCR، تتم في درجات حرارة مختلفة وهذا يسمح بالتحكم بالنشاط الإنزيمي للإنزيمات المشاركة في هذه التفاعلات.
إذ يُعرض التدوير الحراري المواد المتفاعلة لدوراتٍ مُتكررة من التسخين والتبريد، مما يسمحُ بحدوث تفاعلاتٍ مختلفةٍ تعتمد على درجة الحرارة، خصوصًا انصهار الحمض النووي وتنسخ الـ DNA المُحرك بالإنزيم.
إن معظم طرق تفاعل الـPCR ،تستخدم التدوير الحراري بمعنى أنه يتم تسخين وتبريد عينة الـPCR، وذلك طبقا لسلسلة خطوات حرارية محددة، أي أنه لا يوجد شيء يدور بداخل هذا الجهاز وإنما اشتق هذا الاسم من عملية تنظيم حرارة الجهاز بحيث ترتفع إلى درجة عالية مثلا 98 درجة لفصل سلسلتي الـ DNA عن بعضهما البعض وبعد ذلك بمراحل يتم تقليل هذه الحرارة إلى 50 درجة ثم بعد ذلك إلى 72 درجة وبعد مراحل مختلفة تتكرر هذه العملية من جديد حتى نحصل على ملايين النسخ من قطعة DNA تحتوي على جين معين نريد دراسته. تكرار عملية رفع الحرارة وانخفاضها إلى درجات مختلفة هو ما نقصد به التدوير الحراري وهي الوظيفة التي يقوم بها جهاز المدوّر الحراري.

2- القالب template : قالب الحمض النووي وهو سلسلتي الـDNA الأساسي (عينة التفاعل DNA Sample).

يتمثل في شريط الـ DNA المراد تضخيمه وهو مضاعف السلسلة قد يشمل التضخيم الجينوم كله أو جزء منه يحتوي على الـ DNA المُستهدف المراد تضخيمه.
من الناحية العملية، نحتاج لعدة نسخ من الـ DNA الأساسي لكي نحصل على نتيجة جيدة. مع الأخذ بعين الاعتبار أنه في حال كانت نوعية أو كمية الـDNA الأساسي غير جيدة فإن ذلك قد يؤدي إلى تضخيم أجزاء غير نوعية من الـDNA أي الأجزاء التي لا نبحث عنها وليست هي الهدف المنشود. هذا التضخيم غير النوعي يمكن تفسيره بوجود تلوث او عدوى من العينات المستخدمة أو العناصر التفاعلية الأخرى المستخدمة في استخلاص الـDNA.

3- البادئات (السلاسل الأولية) Primers : اثنان من البادئات وهي نوعان : أمامي Forward و خلفي Reverse قطعة من الـ DNA احادية السلسلة، تدعى سلاسل البدء وجودها مهم ليتمكن الانزيم Taq DNA polymerase من بدء البناء والنسخ عليها عند النهاية '3، فهي تُعتبر نيكليوتيدات مكملة للنهاية 3' حيث تتعرف على مقطع نيوكليوتيدي مكمل لها على مجين الفرد (بمعنى انها سلاسل متممة لمنطقة الـ DNA المستهدفة)، مما يسمح بمكاثرة الـ DNA الموجود بين البادئتين والحصول على بلايين الجزيئات. وهي قطعة مصنعة ضرورية للشروع بتضاعف DNA يتراوح اطوالها بين 18 - 30، نيوكليوتيد، يختلف حسب نوع المؤشر المستخدم ويتطلب تحضير Primer معرفة بعض تتابعات القواعد النيتروجينية على طرفي الجزء المستهدف من القالب. تمتاز بأنها غنية بالسيتوزين والجوانين بمعدل 50 - 60 %
ملاحظة هامة: يمكن لبوليميراز الـ DNA فقط أن يرتبط بمنطقة ثنائية الشريط من الـ DNA ويتطاول منها، ودون البادئات لن تكون هناك منطقة ثنائية الشريط من الـ DNA ليرتبط بها البوليميراز)؛ تُختار البادئات المحددة المكملة للمنطقة الهدف من الـ DNA مسبقًا، وغالبًا ما تُصنع بشكل مخصص في المختبر أو تُشترى من موردي المواد الكيميائية الحيوية التجاريين. يجب ان لا تكون البادئات متممة لبعضها البعض وخاصة عند النهاية ' 3 .

4- نيوكليوتيدات حرة أو dNTPs

يتم تجهيزها على شكل نيوكليوسيدات منقوصة الأكسجين ثلاثية الفوسفات، deoxynucleosides triphosphate وبأنواعها الاربعة التي تدخل في بناء DNA،(أدنين Adenine، ثايمين Thymine، جوانين Guanine، سايتوسين Cytosine) وهي الدعائم الأساسية واحجار البناء التي يصنع منها Taq DNA polymerase السلسلة الجديدة من الـ DNA.

5- أنزيم التكثيف Taq DNA polymerase

يستخلص من بكتريا *Thermus aquaticus* التي تعيش في ينابيع المياه الحارة، يتحمل درجة الحرارة حتى 100 م، يقوم بتصنيع جزيئات جديدة من الـ DNA عن طريق تكثيف النيوكليوتيدات بالاتجاه من '5 الى '3 ، اعتماداً على جزيئة DNA القالب، ويستخدم في الـ PCR وجود إنزيم DNA بوليميراز مُقاوم للحرارة كان أحد العوامل الأساسيّة التي مكّنت من التشغيل الآلي لعمليّة الـPCR . بَعد مرور سنوات أُدخلت أنواع أخرى من DNA بوليميراز المُقاوم للحرارة مثل Supertherm , Pow وغيرها، قسم من هذه الإنزيمات ذات صفات مُشابهة لصفات الإنزيم Taq وقسم منهم ذا صفات مُحسّنة كالقدرة الافضل على تصحيح الاخطاء خلال المُضاعفة.

6- محلول منظم PCR Buffer 10x وهذا المحلول يختلف بين تفاعل و أخر
يوفر بيئة كيميائية مناسبة لتحقيق النشاط والثبوتية الأمثلين لبوليميراز الـ DNA. هناك العديد من المحاليل المستخدمة في هذه التقنية مع Taq Polymerase منها المحلول المنظم، Tris – HCl (PH =8.5 - 9) وهو محلول موقي يساعد على استمرارية ثبات PH المحلول في الوسط التفاعلي وأيضاً تحفظ انزيمات التكثيف من الاضاءة. يحوي المحلول المنظم ماء مقطر وكاتيونات (شوارد) موجبة ثنائية التكافؤ، مثل أيونات المغنسيوم (Mg^{+2}) بالإضافة إلى كاتيونات أحادية التكافؤ

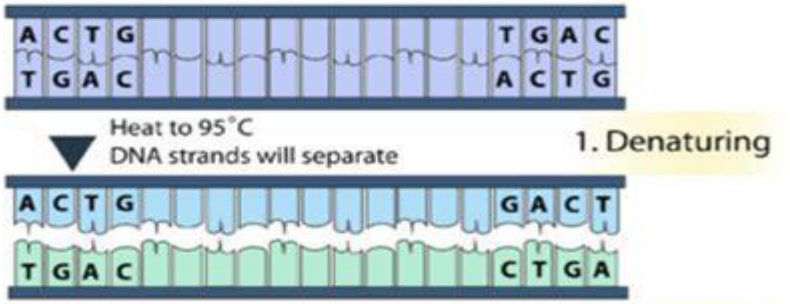
مثل أيونات البوتاسيوم (K^+)، و NH_4^+ وهي عوامل مساعدة لا غنى عنها في تفاعل الـPCR إلى جانب إنزيمات التكثيف مهمة هذه الكاتيونات تعديل الشحنة السالبة لمجموعات الفوسفات الموجودة في الـDNA وأيضاً تؤمن استقرار جزيئات الـDNA الهجينة.

7- وعاء ليتم فيه التفاعل PCR Tube

تعتمدُ مُعظم طُرق تفاعل الـPCR ،على التدوير الحراري من خلال تعريض العينات لعدد من الدورات يتراوح بين 30 - 50 دورة وتتألف الدورة الواحدة من 3 مراحل وتتم كل مرحلة بدرجة حرارة معينة ولفترة زمنية محددة نحصل بالنهاية على بلايين النسخ من جزيئة الـ DNA المختارة والمتماثلة.

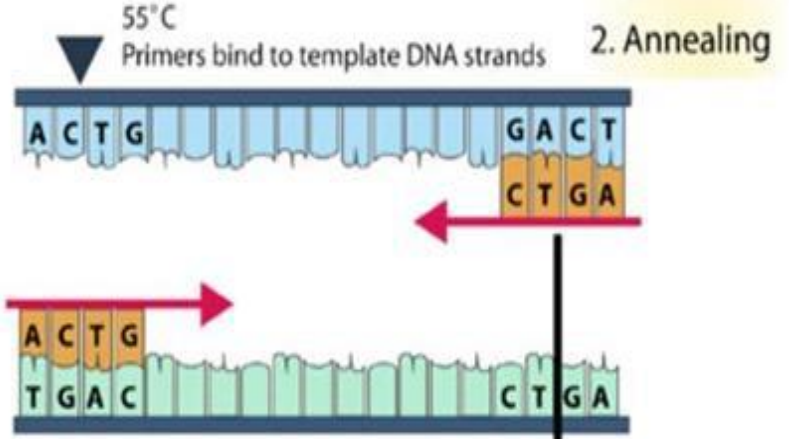
1- Denaturation التمسخ أو الفصل وهي مرحلة التفكيك والتحطيم لتحويل الـDNAمزدوج السلسلة إلى مفرد السلسلة

يحدث بهذه الخطوة تسخين حجرة التفاعل إلى 95 درجة مئوية لمدة 1 إلى 5 دقائق. تعتمد المدة اللازمة للفصل على مصدر الجينوم فعند طلائعيات النوى لا تحتاج لوقت طويل اما عند حقيقيات النوى ذات الجينوم الكبير والغنية بنكليوتيدات C و G تحتاج لزمن أطول لفك الحمض النووي DNA الأصل. مما يؤدي بالنتيجة إلى ذوبان قالب الـDNA ثنائي الشريط، أو إفساده، عن طريق كسر روابط الهيدروجين بين الأسس المكملة، ما يُنتج عنه جزيئَي DNA أحادي الشريط.



2- Hybridization (Annealing): مرحلة التهجين أو ارتباط البادئة بالـ DNA المكمل لها

في هذه المرحلة تنخفض درجة حرارة التفاعل إلى 50–65 درجة مئوية لمدة 20-45 ثانية، ما يسمح بالتصاق البادئات فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع متمماتها من قوالب الـDNA أحادي الشريط الأصل. يتضمن خليط التفاعل عادةً اثنين من البادئات: واحد لكل من المكملات أحادية الشريط التي تحتوي على المنطقة الهدف. البادئات هي تسلسلات أحادية الشريط بحد ذاتها ولكنها أقصر بكثير من المنطقة الهدف، تكمل بذلك تسلسلات قصيرة جدًا في النهاية 3' لكل شريط. وتعتمد درجة الحرارة اللازمة على تسلسل وطول البوادئ التي تضاف. يجب أن تكون درجة الحرارة هذه منخفضة بما يكفي لتسمح بتهجين البادئ إلى الشريط، وعالية بما يكفي ليكون هذا التهجين محددًا، أي يجب أن يرتبط البادئ بجزء محدد مكمل من الشريط لا في أي مكان آخر. إن لم تكن درجة الحرارة كافية، فإن البادئ سيرتبط بصورة شاذة. فإذا انخفضت درجة الحرارة فوق اللازم فسوف يلتصق البادئ بشكل عشوائي حتى انه يمكن ان يلتصق مع نكليوتيدات لا تتممه وإن كانت الحرارة مرتفعة جدًا، فقد لا يرتبط البادئ أساسًا مع متممه.. لا تتكوّن روابط الهيدروجين المستقرة بين الأسس المكملة إلا عندما يكون تسلسل البادئات متطابقًا مع تسلسل القالب. خلال هذه الخطوة، يرتبط البوليميراز بقالب البادئ الهجين ويبدأ تشكيل الـDNA.



3- Extension مرحلة الامتداد أو التمديد وتسمى أيضاً مرحلة الاستطالة Elongation أو مرحلة التصنيع وبناء الـ DNA (Synthesis): لتصنيع جزيئة الـ DNA الجديدة.

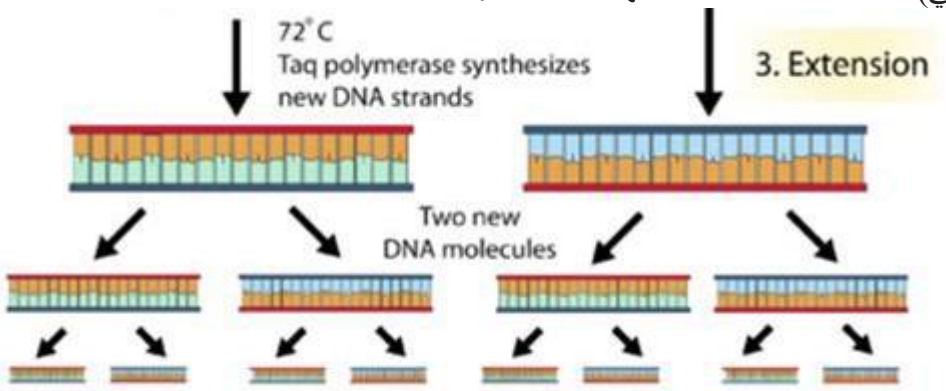
في هذه المرحلة يتم رفع درجة الحرارة إلى 72°م ليقوم انزيم البلمرة بعمله في بناء DNA الجديد في وجود dNTPs.

تعتمد درجة الحرارة في هذه الخطوة على بوليميراز الـDNA المستخدم؛ درجة حرارة النشاط المثلى لبوليميراز الـDNA المستقر حراريًا لبوليميراز المستحرة المائية هي 75-80 درجة مئوية، مع أن درجة الحرارة التي يشيع استخدامها مع هذا الإنزيم هي 72 درجة مئوية وتعد هذه الدرجة مثالية لعمل انزيم البلمرة والإنزيم يُمكنه أن يُحافظ على مستوى نشاط كبير أيضًا بعد البقاء فترة قصيرة وليست متواصلة في درجة حرارة 95 ºC.

تمتلك البوادئ قوة جذب ايوني عالي تجاه DNA القالب اذا ترتبط البوادئ بالمواقع الخاصة بها على القالب

في هذه الخطوة، يتعرف (الـ DNA بوليميراز) على الطرف 3' للبرايمر المرتبط بالـ DNA ويقوم بإطالته، بتصنيع وبناء شريط DNA جديد مكمل لقالب شريط الـ DNA القديم عن طريق إضافة (dNTPs نوكليوتيدات حرة) من خليط التفاعل الى البوادئ بحسب المعلومات الموجودة في كل واحدة من جدائل الـ DNA الهدف وذلك في الاتجاه من 5' إلى 3'، ما يكثف مجموعة 5'- فوسفات من dNTPs مع مجموعة 3'-هيدروكسيل الـ DNA الناتج (الممدد). يعتمد الوقت الدقيق المطلوب للتمديد على بوليميراز الـ DNA المستخدم وعلى طول منطقة الـ DNA الهدف المراد تضخيمها.

عادة تستغرق هذه المرحلة 5 دقائق... وكقاعدة عامة، عند درجة الحرارة المثلى، فإن معظم بوليميراز الـ DNA يبلمر ألف أساس نيوكليوتيدي بالدقيقة في ظل الظروف المثلى (على سبيل المثال، إذا لم تكن هناك قيود متعلقة بنقص الركائز أو الكواشف)، يتضاعف عدد تسلسلات الـDNA المستهدف في كل خطوة من التمديد/الإطالة. مع كل دورة ناجحة، تصبح أشرطة القالب الأصلية بالإضافة إلى جميع الأشرطة المنتجة حديثًا أشرطة قالب للدورة التالية من التمديد، ما يؤدي إلى تضخيم أسي (هندسي) لمنطقة الـ DNA المستهدف المحددة.



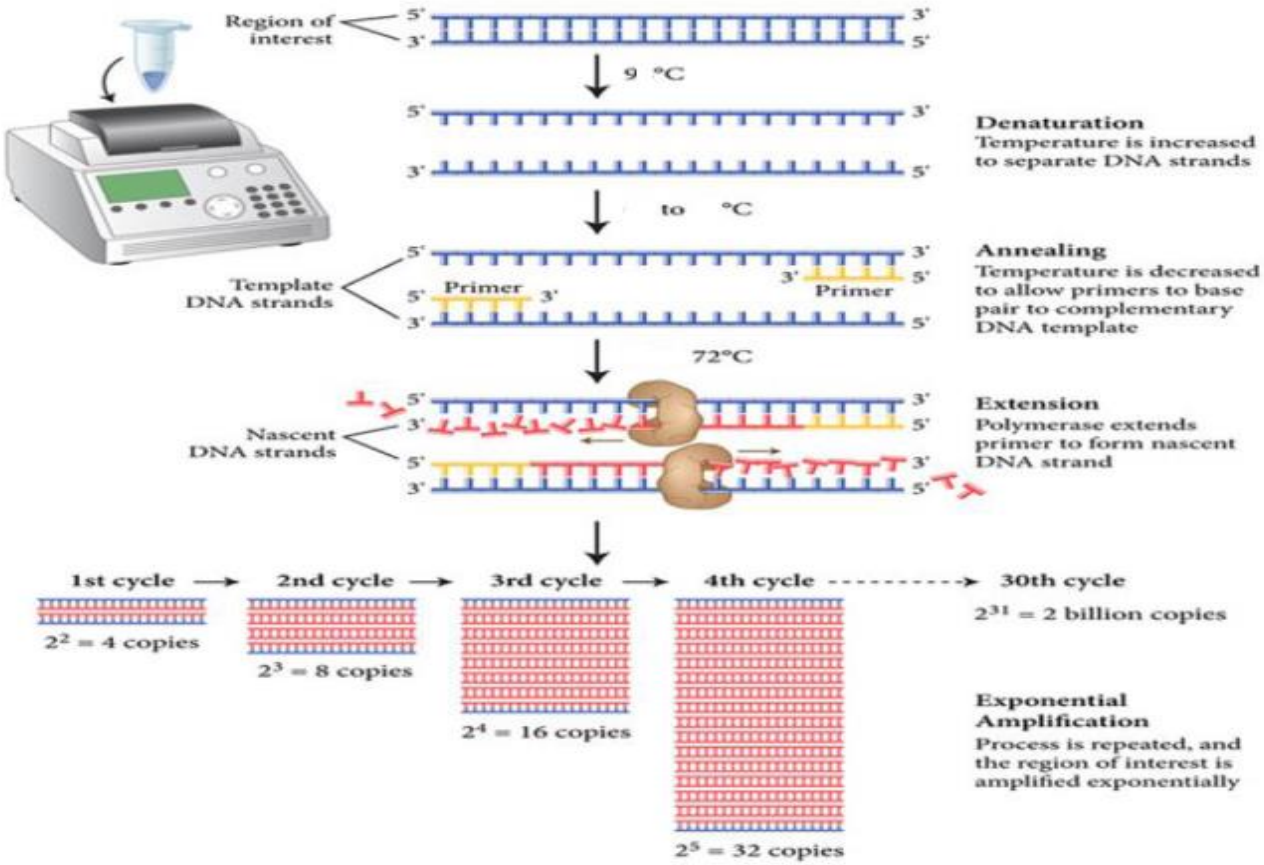
في نهاية مرحلة بناء الـDNA (DNA synthesis) تَنْتُج نُسخ إضافية من الـ DNA الذي نقوم بمُضاعفته.

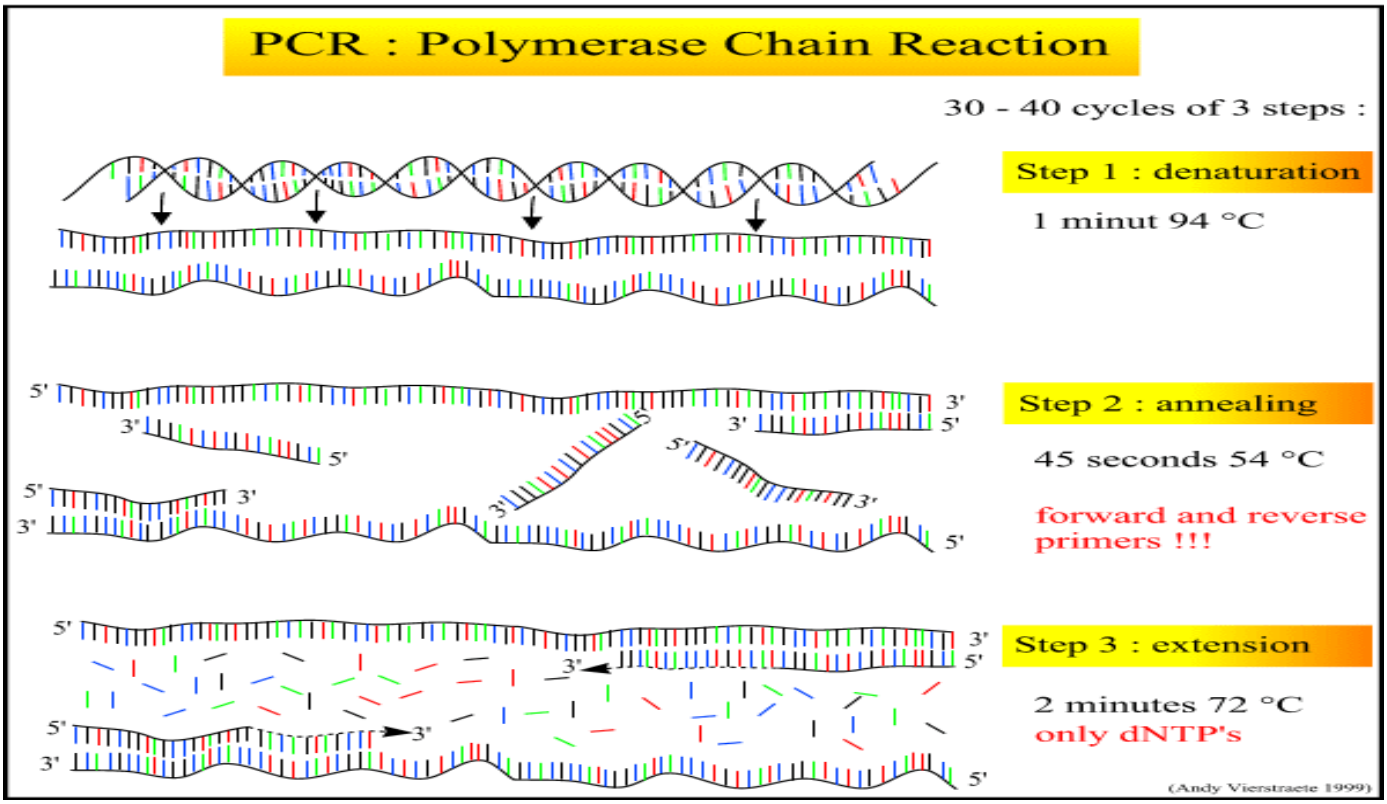
تعد المراحل الثلاث السابقة، دورة كاملة، وفيهًا يصبح الحمض النووي DNA الأصل قد تضاعف، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي DNA على عدد الدورات.

إن درجة الحرارة في مرحلة التفكيك ومرحلة الاستطالة تبقى ثابتة بينما **تتغير حرارة التهجين** ضمن المجال من 50–65 درجة مئوية تبعاً للسلاسل الأولية المستخدمة ومكوناتها من النكليوتيدات. وبالتالي كل ما زاد عدد القواعد النيتروجينية من نوع C،G تزداد درجة الحرارة

ومن أجل حساب درجة الحرارة اللازمة في مرحلة 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.


Region of interest
5'
3'
9 °C
Denaturation
Temperature is increased to separate DNA strands
to °C
Annealing
Temperature is decreased to allow primers to base pair to complementary DNA template
Template DNA strands
Primer
Primer
72°C
Extension
Polymerase extends primer to form nascent DNA strand
Nascent DNA strands
1st cycle
2nd cycle
3rd cycle
4th cycle
30th cycle
2^2 = 4 copies
2^3 = 8 copies
2^4 = 16 copies
2^5 = 32 copies
2^{31} = 2 billion copies
Exponential Amplification
Process is repeated, and the region of interest is amplified exponentially


PCR : Polymerase Chain Reaction
30 - 40 cycles of 3 steps :
Step 1 : denaturation
1 minut 94 °C
Step 2 : annealing
45 seconds 54 °C
forward and reverse primers !!!
Step 3 : extension
2 minutes 72 °C
only dNTP's
(Andy Vierstraete 1999)

طريقة عمل جهاز PCR

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

خطوات تقنية PCR: نضيفُ 23 مايكروليتر من المزيج الرئيسي على كل أنبوب من أنابيب PCR ثم نضيف 2 مايكروليتر من عينة الـ DNA، نضع جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي 3000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة لخلط جميع العينات وإزالة جميع الفقاعات.

	المكونات	الكميه بالمايكروليتر(١ x)
١	ماء مقطر(d.H2O)	١٧
٢	محلول منظم X١٠ (PCR buffer10x)	٢,٥
٣	خليط القواعد النيتروجينيه (dNTPs)	٢
٤	بادئ أمامي (forward primer)	٠,٦
٥	بادئ خلفي أو عكسي (reverse primer)	٠,٦
٦	أنزيم عديد البلمرة (Taq polymerase)	٠,٣
٧	عينه التفاعل (DNA sample)	٢
	المجموع الكلي بالمايكروليتر (µl)	٢٥

نظام التفاعل

	الوقت	درجه الحراره	الخطوات
تنشيط الأنزيم والتهيئة مرحله تفكك الحمض النووي DNA	١٥ دقيقه	٩٥ °م	١
مرحله التفكيك	١ دقيقه	٩٥ °م	٢
مرحله الالتصاق (درجه البادئ)	١ دقيقه	٦٠ - ٤٠ °م	٣
مرحله الامتداد	١ دقيقه	٧٢ °م	٤
إعادة الخطوة رقم ٢ إلى ٣٤ دورة			٥
ضمان اكتمال مرحله الامتداد واعادة التصاق الشريطين مع بعضهما واكمال عدد الدورات للنسخ	١٠ دقائق	٧٢ °م	٦
	∞	٤ °م	٧

الصيغة المستخدمة لحساب عدد نسخ الحمض النووي المتشكلة بعد عدد معين من الدورات هي 2^n، حيث **n** هو عدد الدورات. ومن ثم فإن التفاعل الذي يحصل على 30 دورة مُضاعفة بظروف مثاليّة ينتج عنه 2^{30}، أو 1073741824، نسخة من منطقة الـ DNA ثنائي الشريط المستهدف.

عدد النُسخ الناتجة بظروف مثالية بَعد n دورات هو 2. يتمّ تحديد عدد دورات المُضاعفة n بحسب الكمية النهائية المطلوبة من المقطع الذي نقوم بمُضاعفته. عمليًا، عدد نُسخ مقطع الـ DNA المرغوب الناتجة في نهاية عملية المُضاعفة تتعلق بكمية الـ DNA المصدر التي وُجدت في الأنبوب في بداية العملية، وكذلك بعدد دورات المُضاعفة.

للتحقق مما إذا كان الـPCR ، قد نجح في إنشاء المنطقة المستهدفة المتوقعة من الـ DNA التي يُشار إليها أحيانًا باسم المنطقة المُضخمة أو أمبليكون، يمكن استخدام الرحلان الكهربائي باستخدام جيل الأغاروز لفصل نواتج الـPCR ، بناءً على حجمها. يُحدد حجم منتجات الـPCR، من خلال المقارنة على DNA مدرج Ladder ، مؤشر الوزن الجزيئي الذي يحتوي على شظايا الـ DNA معلومة الحجم تُقاس على جيل الأغاروز إلى جانب نواتج الـPCR

تطبيقات PCR لتقنية PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي DNA و الوراثة منها:

1. الكشف عن الطفرات الوراثية: وذلك عن طريقٌ وضع برايمر خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها. ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجينٌ الكروموسومات أو على احدهما. 2. تعيينٌ البصمة الوراثية.
3. معرفة طول الحمض النووي DNA 4. تحديد الجين المطلوب من خليطٌ من الجينات

5. الكشف عن الفيروسات: وهذه الطريقة الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
6. هو العنصر الأهم في عملية التجميعٌ الجيني (Recombinant الحمض النووي DNA) حيث نقوم بتكثير الجين المراد إدخاله على البلازميد أو الحمض النووي DNA المضيف .
7.استخدامه في تغير نهايٌات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع Restriction enzyme
8. هو العملية الأساس في تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي DNA (DNA Sequence)
9.في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ... الخ.)

Gel electrophoresis

الفصل الكهربائي الهلامي – والذي يعرف أيضا بالهجرة الكهربائية الهلامية أو الترحيل الكهربائي للهلام

هو واحد من أشهر التقنيات المستخدمة في فصل جزيئات الحمض النووي DNA أو RNA أو البرتينات

يُعرف مفهوم الفصل الكهربائي الهلامي على انه طريقة معملية تستخدم لفصل خليط من الحمض النووي DNAأو RNA أو البروتينات وفقًا للحجم الجزيئي والشحنة الكهربائية. في الرحلان الكهربائي الهلامي، يتم وضع أو دفع الجزيئات المراد فصلها بواسطة مجال كهربائي عبر مادة هلامية (جيل) تحتوي على مسام صغيرة. تنتقل الجزيئات عبر مسام الهلام بسرعة ترتبط عكسياً بأطوالها. هذا يعني أن جزيء DNA الصغير سوف ينتقل عبر الهلام أو الجيل مسافة أكبر من جزيء DNA الأكبر. يتضمن الرحلان او الفصل الكهربائي الهلامي مجال كهربائي، يتم تطبيق هذا المجال بحيث يكون لأحد طرفي الهلام شحنة موجبة والطرف الآخر له شحنة سالبة؛ فعلى سبيل المثال نظرًا لأن DNA و RNA جزيئات سالبة الشحنة، فسيتم سحبها نحو النهاية الموجبة الشحنة من الهلام. أما البروتينات فهي ليست سالبة الشحنة؛ لذلك عندما يراد فصل البروتينات باستخدام الفصل الكهربائي الهلامي، يجب أولاً خلط البروتينات بمنظف يسمى كبريتات دوديسيل الصوديوم sodium dodecyl sulfate. يجعل هذا العلاج البروتينات تتكشف وتظهر في شكل خطي وتغطيها بشحنة سالبة، مما يسمح لها بالانتقال نحو النهاية الموجبة للهلام أو للجيل ومن ثم الفصل. أخيرًا، بعد فصل جزيئات الحمض النووي DNA أو RNA أو البروتين باستخدام الفصل الكهربائي الهلامي، يمكن اكتشاف الحزم Bands التي تمثل جزيئات ذات أحجام مختلفة.

العوامل التي تتحكم بحركة جزيئات الحمض النووي DNA في الهلام أثناء الفصل الكهربائي الهلامي

- تمر الجزيئات عبر حقل كهربائي متنوع الجهد، وتهاجر الى الالكترود المناسب وتعتمد سرعة الهجرة على :
- شحنة الاحماض النووية - تركيز هلام الاغاروز (عادة 0.8٪). - المسافة بين الالكترودين
- تشكيل الحمض النووي (خطي / بلازميد / إلخ ..). - قوة التيار الكهربي المستخدم و الجهد المختلف بين القطبين
- حجم الثقوب (الثقوب الصغيرة مناسبة لفصل الجزيئات الصغيرة والثقوب الكبيرة مناسبة لفصل الجزيئات الكبيرة)
- الجحم الجزيئي لشريط الحمض النووي (الجزيئات ذات الحجم الجزيئي الأصغر تتحرك أسرع من الجزيئات ذات الحجم الجزيئي الأكبر) - صبغة بروميد الإيثيديوم: موجب الشحنة ؛ لذلك يقلل من معدل هجرة الحمض النووي بنسبة 15٪.

تشمل الصبغات الأخرى للحمض النووي في المواد الهلامية الاغاروز SYBR Gold و SYBR green و Crystal Violet و Methyl Blue.

المادة الهلامية يوجد نوعان من الهلامات المستخدمة وهما الآغاروز Agarose ومتعدد الاكريلامايد polyacrylamide يتضمن الفصل الكهربائي للهلام مادة هلامية أو جيل هو عبارة عن لوح من مادة عادة ما يتم تصنيعها من الاغاروز (وهو مركب عديد السكاريد polysaccharides)، ويستخلص من الأعشاب البحرية Gelidium و Gracilaria ويكون على شكل رقائق جافة ومطحونة وعندما يتم تسخين الاجاروس في محلول ماء به بعض الأملاح ويترك ليبرد، فإنه يكون مادة هلامية صلبة لكن هشة قليلاً وتتكسر بسهولة بالتسخين. وتستخدم لفصل قطع DNA, RNA حسب الطول وتحديد نقاوة الحامض النووي، والمادة الهلامية عبارة عن مصفوفة من جزيئات الآغاروز التي ترتبط ببعضها البعض من خلال روابط هيدروجينية وتشكل مسامًا صغيرة في أحد طرفي اللوح يحتوي الجل او الهلام على فجوات أو فتحات تسمى الآبار، يتم وضع العينات فيها.

هلام الاكريلامايد يستخدم في عزل جزيئات صغيرة جدا من الاحماض النووية التي تختلف في الطول بقاعدة نايتروجينية واحدة فقط.

يمكن رؤية الحامض النووي المتواجد على الهلام بإضافة صبغة الاثيديوم بروماید ويستمر الترحيل الكهربائي حتى وصول الصبغة الى نهاية الهلام وتظهر قطع الـ DNA ذا وميض وهاج فيسهل تعينها وتصويرها بالأشعة فوق البنفسجية UV.

ماهي طريقة الفصل الكهربائي الهلامي....

هناك عدة خطوات أساسية لطريقة الفصل الكهربائي الهلامي، وهي:

1)- صب وتحضير الهلام: لتحضير هلام الأغاروز Agarose ، نقوم بغلي عينة عادة ما تكون بتركيز 1% Agarose، وبعد الغليان يُصب في قالب ويترك ليبرد. بعد أن يبرد، سوف يتجمد في شكل مصفوفة وعندما يصب الجل في القالب ، يتم وضع المشط داخل القالب في أحد طرفيه و لذلك الهلام يحتوي على عدة ثقوب أو آبار.

2)- تحضير العينات: يقصد بتحضير العينة أن تضيف صبغة تحميل إلى عينة الحمض النووي. الغرض من صبغة التحميل هو السماح بتصوير هجرة العينات خلال الهلام، فبالرغم من عدم قدرتنا على رؤية جزيئات الحمض النووي نفسها لكن يمكننا مراقبة التقدم من خلال مراقبة الى أي مدى الصبغة (ذات الشحن السالبة) قد انتقلت.

ملحوظة: الصبغة الأكثر شيوعًا هي البروموفينول الأزرق التي تنتقل من خلال الهلام بنفس معدل جزيء DNA الذي يبلغ 300 نيوكليوتيد في الطول.

3)- تحميل الهلام يقصد به إضافة العينات الى الهلام . في هذه الخطوة يتم نزع المشط حتى تكشف الثقوب. ومن ثم يتم نقل كل عينة في واحد من الثقوب أو الآبار بحيث يكون أساسا داخل الهلام نفسه. صبغة التحميل التي تم اضافتها مسبقا تحتوى هي ايضا على سكر مما يجعل المحلول كثيفًا الى حد ما؛ وهذا بدوره يجعل العملية سهلة.

4) - تشغيل الهلام (تعريضه لمجال كهربائي) عادةً ما يوضع جيل الاغاروز في حدود 20 إلى 100 فولت (أعلى من 100 فولت يمكن أن يتسبب في ذوبان الهلام نتيجة الحرارة المتولدة).

كلما زاد التيار زادت سرعة هجرة الجزيئات وبالتالي زادت سرعة تحليل النتائج. ومع ذلك ، فكلما كانت الهجرة أبطأ ، كان الحصول على نتائج واضحة أسهل.

عادة ما يتم تشغيل الهلام حتى تهاجر الصبغة الى منتصف الطريق تقريبًا من الثقوب أو الآبار حتى نهاية الجل

5) صبغ الجل او الهلام: يشير صبغ الهلام إلى صبغ جزيئات الحمض النووي حتى نتمكن من تحديد إلى أي مدى هاجروا من الأصل (الآبار). صبغة بروميد الاثيديوم هو الأكثر شيوعا في الاستخدام. سوف تلتصق الصبغة بالحمض النووي وستظهر الخطوط على الجل أينما يوجد DNA. بمجرد صبغها يمكن تحليل الجل.

ملحوظة: تختلف الصبغة هنا عن الصبغة في الخطوة رقم 2 التي لم تربط الحمض النووي، إنها موجودة عبر الهلام حتى نتمكن من مراقبة التقدم. بمجرد تشغيل الجل وصبغه، يمكن تحليله. يشمل التحليل تحديد الطول بالنيوكليوتيدات لجزيء (جزيئات) الحمض النووي في العينة. ويتم ذلك من خلال قياس المسافة التي انتقل خلالها كل جزيء عبر الهلام فهذه المسافة دالة على طول الجزيء؛ فكلما كانت الجزيئات أصغر (أقصر) سوف تهاجر أبعد من الجزيئات الأطول.

معدات تقنية الرحلان الكهربائي الهلامي (الهجرة الكهربائية)

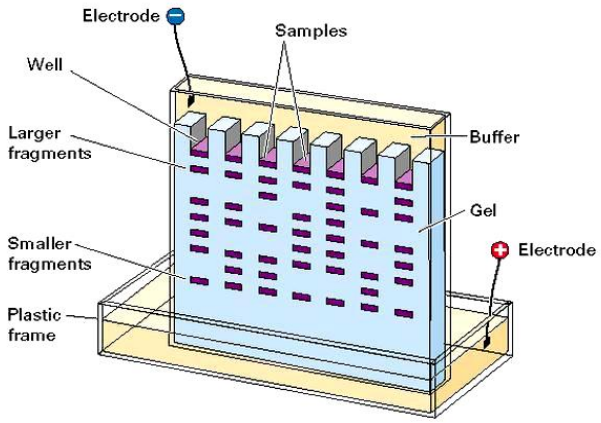
يتكون جهاز الرحلان الكهربي للهلام من مادة هلامية، والتي غالبًا ما تُصنع من أجار أو بولي أكريلاميد، وحجرة (عادةً صندوق أو خزان بلاستيكي صلب) مع كاثود (طرف سالب) في أحد طرفيه وأنود (طرف موجب) عند الطرف.

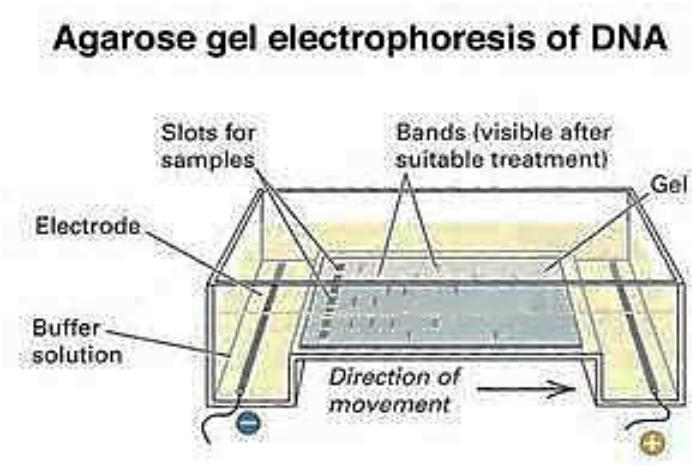
في النهاية المقابلة. يتم وضع الجل أوالهلام ، الذي يحتوي على مجموعة من الفتحات او الآبار في نهاية الطرف السالب، داخل الحجرة ومغطى بمحلول للعزل. بعد ذلك يتم وضع العينات في الفتحات باستخدام الماصة.

الحجرة متصلة بمصدر طاقة، عند تشغيله، يطبق مجالًا كهربائيًا على الحجرة. يتسبب المجال الكهربائي في انتقال الجزيئات سالبة الشحنة عبر الهلام نحو القطب الموجب. (الحمض النووي DNA والحمض النووي الريبي RNA مشحونان بشحنة سالبة بعد المعالجة) كما تتأثر الجزيئات وحركتها بمصفوفة الهلام المسامية بحيث تتحرك الجزيئات الأثقل والأكبر بشكل بطيئ نسبيًا ، بينما تتحرك الجزيئات الأخف وزنًا والأصغر حجما بسرعة أكبر.

تؤثر نوع المادة المستخدمة في تصنيع الهلام و كثافة المسام على معدل حركة الجزيئات. غالبًا ما يتم تشغيل "سلم" مصبوغ، أو علامة متعددة الجزيئات لها أوزان جزيئية متغيرة ومعروفة مع عينات تجريبية لتكون مثل مرجع للحجم.

دور الصبغة هنا هو اتاحة تصوير العلامة أثناء تحركها خلال الهلام؛ عادة ما تكون العينات مصبوغة أيضًا للتصوير. تُستخدم صبغة معروفة باسم بروميد إيثيديوم ، والتي تلمع تحت الضوء فوق البنفسجي ،لتصوير واضح لعينات الحمض النووي.





تطبيقات الفصل الكهربائي الهلامي

تكمن اهمية تقنية الهجرة الكهربائية في امكانية استخدامها في مجالات الطب الشرعي والبيولوجيا الجزيئية وعلم الوراثة والميكروبيولوجي والكيمياء الحيوية.

أشهر تطبيقات الفصل الكهربائي الهلامي هي عملية فصل الحمض النووي DNA بهدف:

التحقق من التضخيم بواسطة الـ PCR، أو تفاعلات التسلسل.

تصور مجموعات من العلامات الجزيئية لتحديد التركيب الوراثي للنباتات .

التحقق من جودة وكمية الحمض النووي الجيني بعد استخلاص الحمض النووي. تحليل الجينات المرتبطة بمرض معين.

الحصول على قطع منفصلة من الحمض النووي لاستنساخ قطع معينة. في اختبار الأبوة باستخدام بصمة الحمض النووي.

فصل قطع من الحمض النووي لأخذ البصمات للتحقيق في مسرح الجريمة.

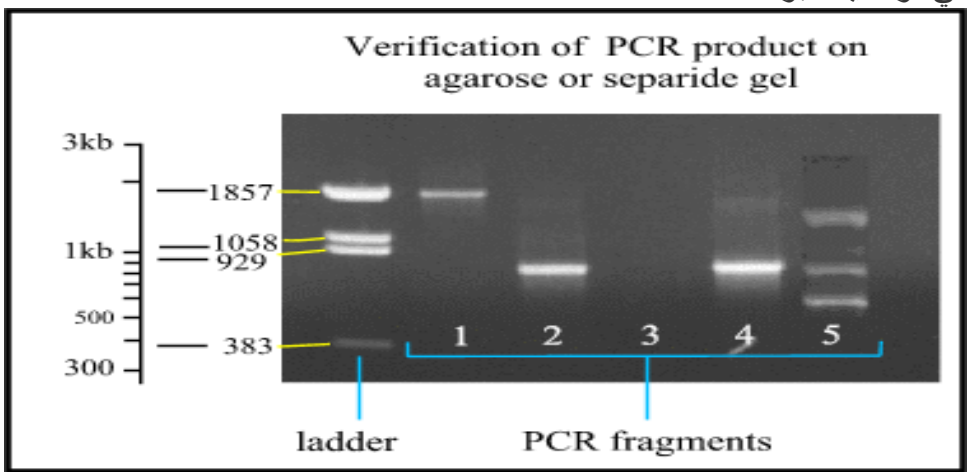
في تحديد سمات الحمض النووي لدراسات التصنيف للتمييز بين الأنواع المختلفة.

في دراسة بنية ووظيفة البروتينات. في تحليل مقاومة المضادات الحيوية.

في دراسة العلاقات التطورية من خلال تحليل التشابه الجيني بين السكان أو الأنواع.

تُستخدم تقنية الهجرة الكهربائية الهلامية أيضًا في الصناعات مثل علوم الأغذية؛ فمعظم الطعام يمكن فحص مكوناته بهذه التقنية (خاصة البروتينات والأيونات والأحماض العضوية والسكريات) وتحليلها بهدف الحفاظ على جودة المنتجات الغذائية.

من تطبيقات الفصل الكهربي الهلامي الطبية أنه يمكن استخدامه للكشف عن الشوائب وتركيز المضادات الحيوية واللقاحات وكذلك تحديد جرعة المضادات الحيوية بدقة أكبر. ففي اللقاح، يتم استخدامه لاختبار نقاوة وتركيز اللقاحات بمستويات مختلفة وأنواع الأجسام المضادة لإيجاد نسخة من اللقاح أفضل ما يمكن. كما أنها تستخدم للكشف عن وجود بروتين غير طبيعي كميا أو نوعا. كما يستخدم في تشخيص اعتلال الهيموغلوبين، وتحديد المصل والتنميط الجيني للبروتين لتحليل ApoE لمرض الزهايمر (البروتين متعدد الأشكال)، مراقبة الجزيئات الصغيرة (الأدوية، المنشطات)، تحليل السائل النخاعي، وتحليل البول.



انتهت المحاضرة .....