جامعة حماة
كلية الطب البشري

مقرر البيولوجيا الجزيئية
د. ظلال قطان

الفيروسات الحاوية على الحمض النووي RNA

دراسات قديمة أكدت أن المادة الوراثية المسؤولة عن نقل المعلومات الوراثية عبر الأجيال هي الـ DNA، و لكن بعد اكتشاف الفيروسات التي تحتوي الحمض النووي الريبي الـ RNA كمادة وراثية عوضا عن الـ DNA، عاد الجدل بين علماء البيولوجيا الجزيئية و علماء الوراثة الجزيئية حول الطبيعة الكيميائية للمادة الوراثية.

عادت النظرية القائلة : أن البروتينات هي المسؤولة عن حمل و نقل المعلومات الوراثية عبر الأجيال. لبرهان العكس، أجرى الباحثون تجارب عديدة للتأكد من صحة هذه النظرية أو رفضها.

من الأمثلة على الفيروسات التي تملك المادة الوراثية الـ RNA:

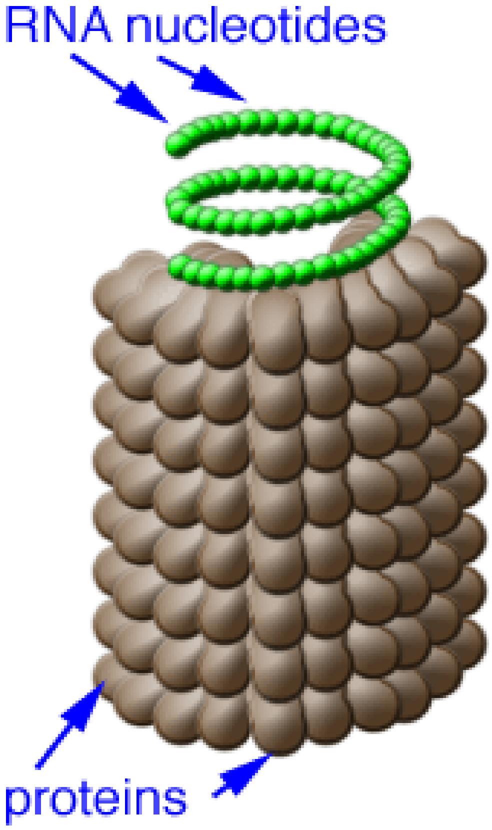
- فيروس فسيفساء التبغ (TMV)
- فيروس الأنفلونزا
- فيروس النكاف
- فيؤوسات شلل الأطفال
- فيروسات جرثومية مثل فيروسات Q /R17 /F2
- فيروسات اللوكيميا
- فيروس الإيدز AIDS

دراسة فيروس فسيفساء التبغ (TMV) :Tobacco Mosaic Virus

ينتمي إلى مجموعة فيروسات تبرقش الدخان، يتطفل على أوراق نبات التبغ.

يأخذ هذا الفيروس شكل أسطوانة صغيرة جوفاء، مؤلفة من غلاف بروتيني خارجي و من مادة وراثية تكون على شكل حمض نووي ريبي RNA. يكون هذا الأخير على شكل شريط حلقي أو حلزوني ملتف.

الغلاف البروتيني، لا يشبه الغلاف البروتيني للفيروسات التي تملك الـ DNA كمادة وراثية، فهو يتألف من نوع واحد فقط من الوحدات البروتينية، التي تتحد مع بعضها البعض لتشكل الغلاف البروتيني الخارجي للفيروس.



الشكل 33: فسيفساء التبغ Tobacco Mosaic Virus (TMV)

أجريت الكثير من الأبحاث للتأكد من طبيعة المادة الوراثية للفيروسات الحاوية على الـ RNA، من أهمها أبحاث فرانكل كورنات التي أجريت على فيروس فسيفساء التبغ TMV

- لاحظ العلماء أنه يمكن فصل بروتينات الغلاف عن الـ RNA وذلك بنقع الفيروسات في مزيج من الماء و الفينول.

يعمل الفينول على تفكيك الارتباط ما بين الوحدات البروتينية و المادة الوراثية للفيروس. و هذا التفكك عكوس لأنه يعاد بناء هذه الفيروسات، بضم الوحدات البروتينية و الـ RNA في أنبوب اختبار لا يحتوي على مزيج الفينول و الماء.

- أكدت الدراسات التي أجريت على فيروسات فسيفساء التبغ، أنه يوجد عدة سلالات من هذا الفيروس.

تختلف عن بعضها البعض:

1- في نوع و خصائص البروتينات المكونة للغلاف البروتيني للفيروس.
2- نوع البروتين المميز الموجود في الغلاف البروتيني لهذه الفيروسات، و عن طريق هذا البروتين المميز يتم التعارف ما بين الفيروس و عائله المضيف.

تجربة فرانكل كورنات Frankel corant et al. (1955) :

- استخدم الباحثون سلالتين من فيروس فسيفساء التبغ سلالة A و سلالة B.
- نقعوا كل سلالة على حدا في مزيج من الماء و الفينول.
- فصلوا البروتينات عن المادة الوراثية، عن طريق التثفيل السريع جدا Ultra-Centrifugation.
- بعد مرحلة التثفيل تترسب الجزيئات البروتينية الثقيلة في قاع أنبوب التثفيل أما المادة الوراثية الـ RNA تبقى في المحلول الطافي.
- أجرى الباحثون تجربة التصالب العكسي، فتم الحصول على نوعين من الفيروسات الهجينة.

1- ضم الحمض النووي RNA للسلالة الأولى من الفيروسات A مع بروتينات السلالة الثانية من الفيروسات B.

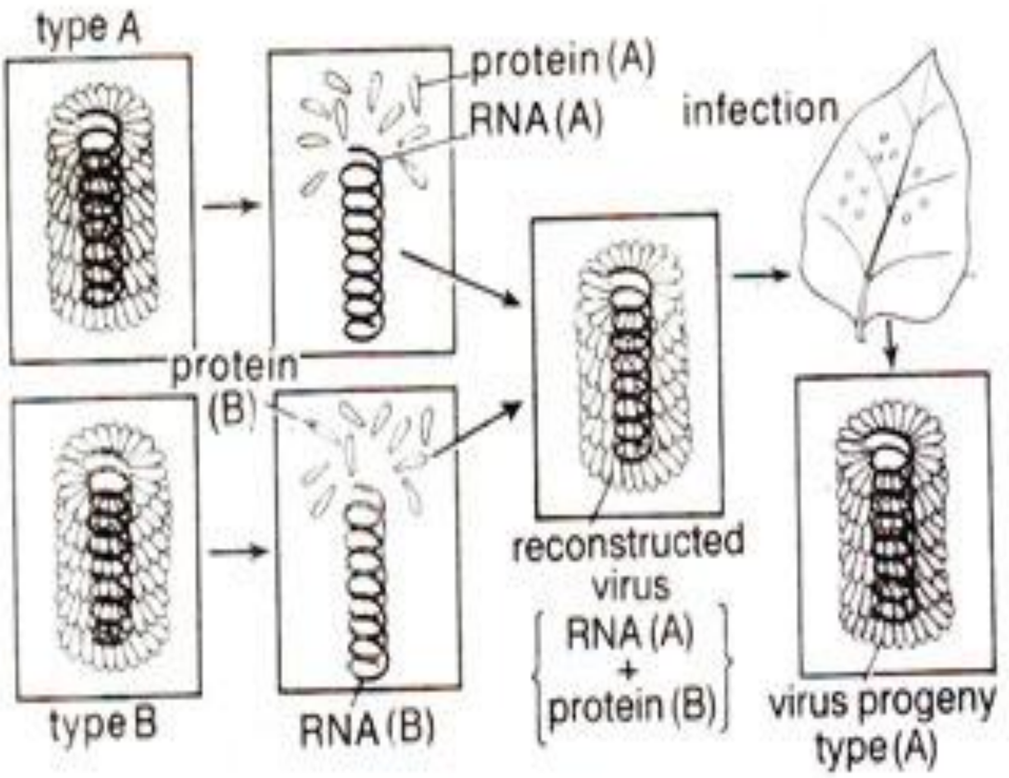
2- ضم الحمض النووي RNA للسلالة الثانية من الفيروسات B مع بروتينات السلالة الأولى من الفيروسات A.

- و من ثم، ترتبط الوحدات البروتينية B مع بعضها البعض من جديد، و تشكل غلاف بروتيني حول المادة الوراثية للفيروس A، و ترتبط الوحدات البروتينية A مع بعضها البعض من جديد، و تشكل غلاف بروتيني حول المادة الوراثية للفيروس B.
- بعد الانتهاء من تشكيل الفيروسات الهجينة الجديدة، تحضن هذه الأخيرة مع أوراق نبات النبغ.
- تقوم الفيروسات الهجينة بدورة حياتها داخل خلايا أوراق التبغ، و بعد أن تكمل دورة حياتها. يقوم الباحثون بأخذ عينات من تلك الفيروسات الهجينة الجديدة و القيام بالتحاليل المطلوبة لمعرفة طبيعة لروتيناتها و حمضها النووي.

<u>النتيجة:</u>

تبين للباحثين أن طبيعة الغلاف البروتيني الذي يحيط بالأفراد الفيروسية الجديدة الناتجة من تجربة التصالب العكسي، يتبع نمط الفيروس الذي استخلص منه الحمض النووي RNA في بداية التجربة. أي المادة الوراثية من النمط A يحيط بها البروتينات من النمط A، و المادة الوراثية من النمط B يحيط بها البروتينات من النمط B.

و بذلك أثبتت هذه التجربة أن المادة الوراثية في هذه الفيروسات هو الحمض النووي RNA و ليس البروتينات.



الشكل 34: تجربة فرانكل كورنات

دورة حياة الفيروسات الحاوية على الحمض النووي RNA :

I- دورة حياة الفيروسات ذات السلسلة المفردة من الـ RNA:

تؤكد الدراسات المرجعية أن الفيروسات الحاوية على المادة الوراثية RNA تملك عد أقل و محدد من المورثات مقارنة مع الفيروسات الحاوية على المادة الوراثية DNA. لا يتجاوز عدد المورثات في الفيروسات RNA خمس مورثات.

مثال للدراسة، الفيروس آكل الجراثيم **R17** الذي يتطفل على البكتريا المعوية E.Coli، يمتلك هذا الفيروس ثلاث مورثات هي:

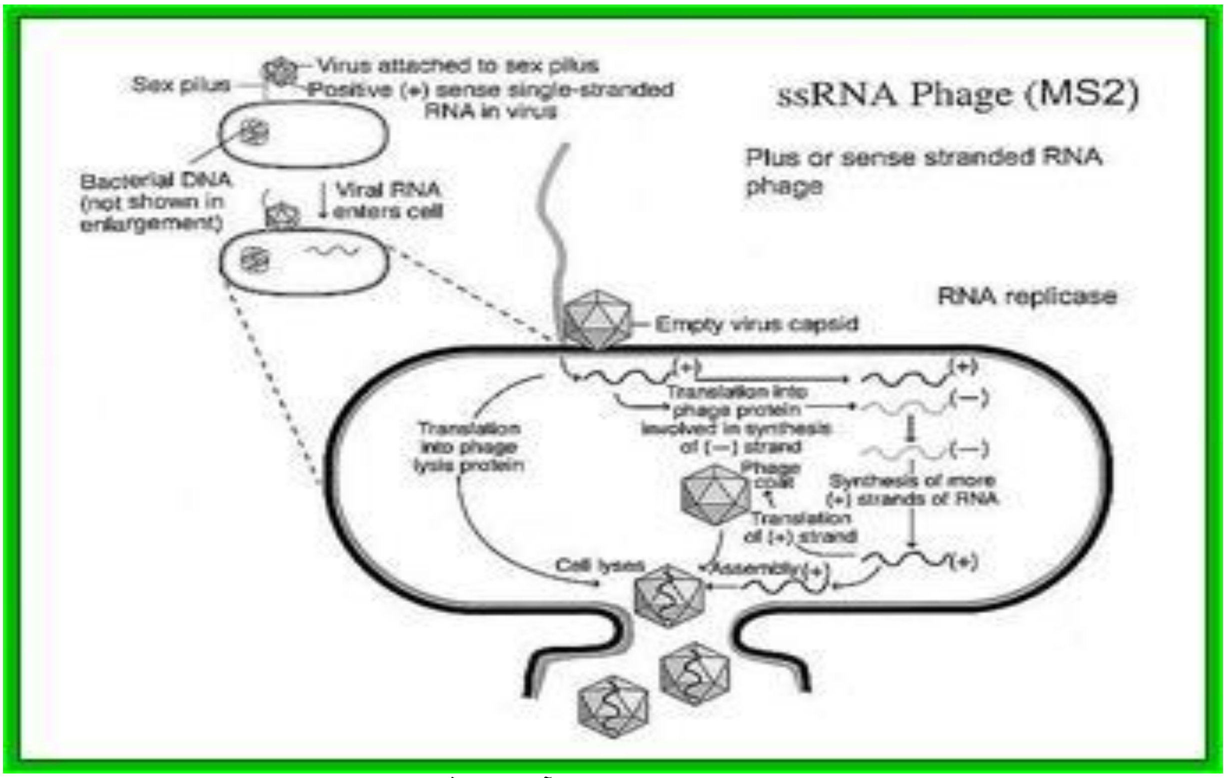
1- المورثة الأولى A: هذه المورثة مسؤولة عن تشفير البروتين A، و هذا الأخير يدعى البروتين المميز و هو بروتين وظيفي و عن طريق هذا البروتين يتعرف الفيروس على مضيفه.

2- المورثة الثانية CP: و هي المورثة المسؤولة عن تشفير البروتين الذي يدخل في تركيب الغلاف البروتيني للفيروس.

3- المورثة الثالثة SYN: التي تسيطر على تخليق أنزيم بلمرة الـ RNA الفيروسي الذي يدعى أيضا أنزيم نسخ الـ RNA الفيروسي RNA- Synthetase.

دورة حياة الفيروس آكل الجراثيم R17:

- يحمل الفيروس آكل الجراثيم **R17** سلسلة مفردة من الـ RNA يقوم بغزو خلية E.Coli و يحقن مادته الوراثية بداخلها.
- عند دخوله سيتوبلاسما الخلية المضيفة، يلتصق بجسيماتها الريبية و يستخدم أنزيماتها و حموضها الأمينية لتركيب بروتيناته الخاصة به، البروتين A و البروتين CP و أنزيم RNA-Synthetase.
- حالما يتشكل RNA-Synthetase الفيروسي، يتجه و يرتبط مع RNA الفيروسي المسمى السلسلة **(+).** و هي السلسلة القالب أي السلسلة الأصلية و هذه الأخيرة تنفصل مباشرة عن ارتباطها بالجسيمات الريبية التابعة للخلية الجرثومية.
- مباشرة يقوم أنزيم RNA-Synthetase بعمله و ذلك بنسخ السلسلة المتممة (القالب العكسي)، و تدعى السلسلة السالبة **(-).**
- بعد ذلك تنفصل السلسلة الموجبة **(+)** عن السلسلة السالبة **(-)** و تصبح هذه الأخيرة السالبة كقالب لنسخ العديد من السلاسل الموجبة **(+).**
- قسم من السلاسل الموجبة المنسوخة الجديدة **(+)** يدخل في عملية تشكيل الأغلفة البروتينية للفيروسات الجديدة، أما القسم الثاني لتلك السلاسل تستخدم كمادة وراثية.
- في نهاية مرحلة العدوى، تتجمع المادة الوراثية الفيروسية داخل الأغلفة البروتينية، هذا الأمر يترافق مع تشكيل العديد من الأفراد الفيروسية الجديدة القادرة على إحداث العدوى و الإصابة
- يتألف كل فرد فيروسي جديد من سلسلة مفردة من RNA وتدعى السلسلة الموجبة **(+)** و من غلاف بروتيني مماثل للأصل.
- عند وصول الخلية الجرثومية المصابة للانحلال بسبب تكاثر الفيروس فيها، تهاجم الأفراد الفيروسية الجديدة خلايا مضيفة أخرى و تعيد دورة حياتها من جديد.



الشكل 35: دورة حياة آكل الجراثيم R17

II- دورة حياة الفيروسات ذات السلسلة المزدوجة من الـ RNA:

الفيروسات الحاوية على RNA على شكل سلسلة مزدوجة، واحدة منهما سلسلة موجبة **(+)** و الثانية سلسلة سالبة **(-)**. لهذا السبب لا يتم تشكل القالب العكسي. دورة حياتها تبدأ بالتضاعف فورا بعد غزو الخلايا المضيفة، مما يؤدي إلى تحلل هذه الخلايا و تحرر أفراد فيروسية جديدة قادرة على إصابة خلايا مضيفة جديدة.

III- دورة حياة الفيروسات الإرتجاعية أو القهقرية Retroviruses:

في السبعينات من القرن العشرين اكتشفت آلية تضاعف جديدة، و هذه الآلية خاصة بالفيروسات الإرتجاعية.

ميزات الفيروسات الارتجاعية:

1- التي تتطفل فقط على خلايا حقيقيات النوى.

2- صغيرة الحجم.

3- المادة الوراثية مكونة من سلسلتين مفردتين منفصلتين و متشابهتين من الحمض النووي RNA.

4- تحوي على أنزيمات بلمرة تسمى أنزيمات النسخ العكسي Reverse Transcription التي اكتشفت لأول مرة عام 1972 على يد العالمين Temin و Baltimore.

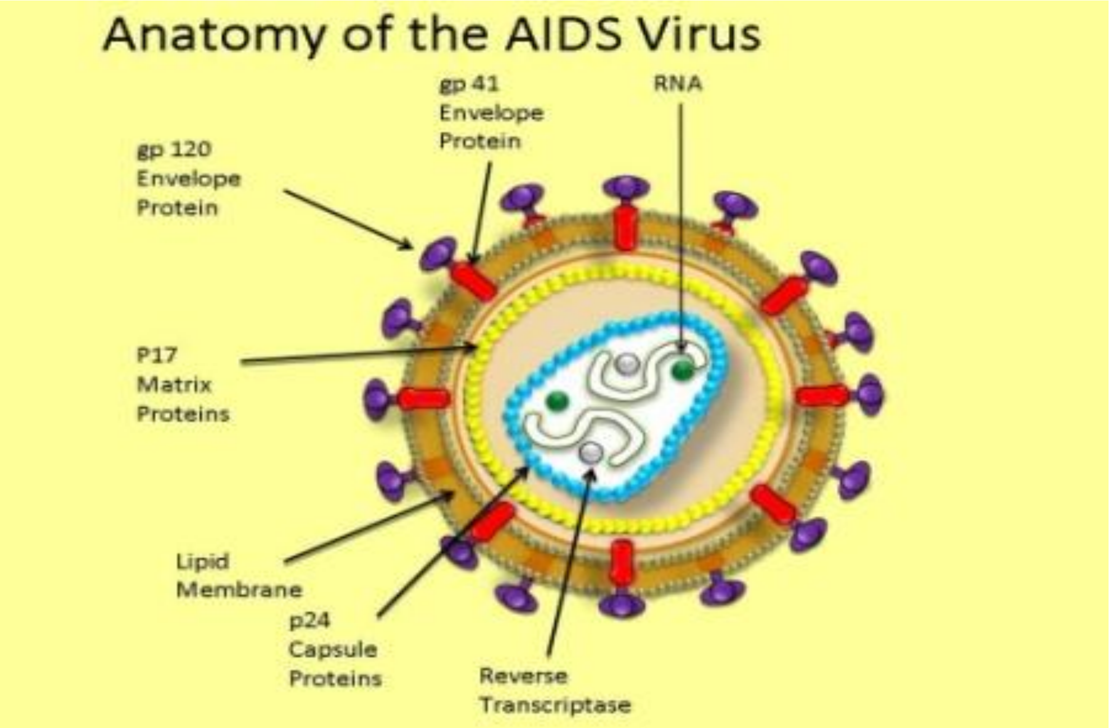
تم عزل أول فيروس قهقري عام 1910 من قبل العالم Rous، و يسبب هذا الفيروس ظهور أورام سرطانية عند الطيور.

تم عزل أول فيروس قهقري يتطفل على البشر عام 1978 و يدعى فيروس مرض الإيدز AIDA الذي يسبب عند المصابين نقص المناعة المكتسبة.

مثال للدراسة فيروس مرض الإيدز AIDS:

صفاته:

- يبلغ قطر الفيروس **0.1** ميكرومتر.
- مادته الوراثية مكونة من سلسلتين مفردتين متشابهتين و توجد في منطقة المركز التي تدعى النوكليوئيد Nucleod.
- يتكون النوكليوئيد من نوعين من البروتينات تدعى p24 وزنها الجزيئي **24000** دالتون و **p17** وزنها الجزيئي **17000** دالتون.
- يحاط النوكليوئيد بغلاف شحمي يضم بروتين سكري مكون من تحت وحدتين و هما على التوالي **p120** و **p41**.
- يحتوي على أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcription.



الشكل 36: الشكل العام لفيروس الإيدز

- تتكون سلسلة الـ RNA من **9749** نكليوتيد، و تضم ثلاث مورثات :

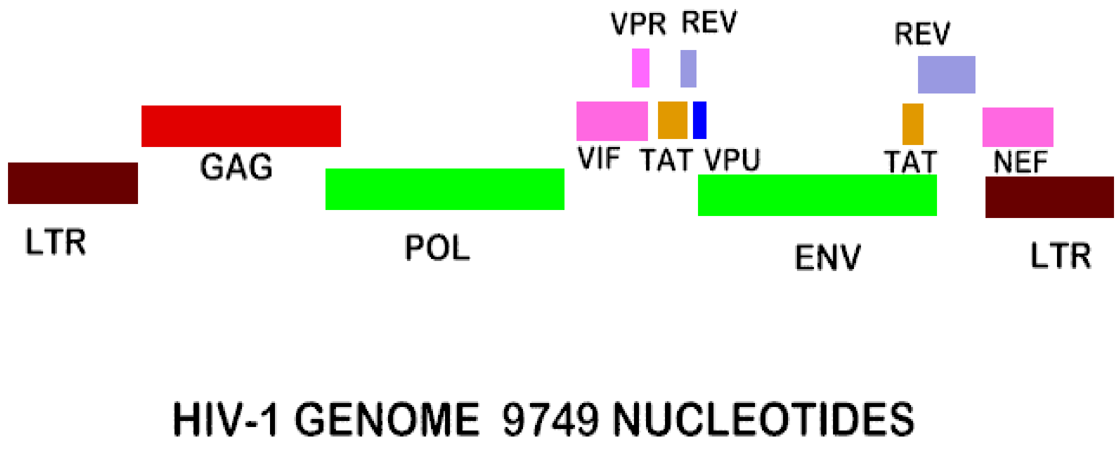
1. المورثة gag: المورثة المسؤولة عن تشفير بروتين أولي طويل الحجم، هذا الأخير ينقسم إلى بروتينين صغيرين بتحفيز من أنزيم البروتياز. و هما **p24** و **p17**.

ملاحظة، يشفر البروتياز من قبل إحدى مورثات الفيروس.

2. المورثة pol: المورثة المسؤولة عن تشفير أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcription.

3. المورثة env: المورثة المسؤولة عن تشفير البروتينات السكرية في الغلاف الشحمي للفيروس **p41** و **P120**.

يتألف الطرفين النهائيين **3`** و **5`** للـ RNA الفيروسي، من تسلسلات نكليوتيدية مكررة يطلق عليها **TRE5** و **TRE3** أي مكرر نهائي **3`** و **5`**.



الشكل 37: الذخيرة الوراثية لفيروس الإيدز

مرحلة (الإخماج)العدوى بفيروس الـ AIDS

I- طورالدخول:

- تبدأ مرحلة العدوى عند دخول الفيروسات داخل الكائن الحي بإحدى طرق العدوى أما عن طريق الدم أو الإفرازات المهبلية أو السائل المنوي أو حليب الأم.
- عندها يرتبط الفيروس بالخلية الهدف و هي الخلية اللمفاوية T4 التابعة للجهاز المناعي(من الخلايا ذات الأهمية الحيوية في الجهاز المناعي كونها المسؤولة عن إنتاج الأجسام المضادة) و التي تحمل على غشائها السيتوبلاسمي مستقبلات خاصة و هي البروتينات **CD4** و **CCR5**.
- بعد التعارف ما بين البروتين السكري P120 الموجود على الغلاف الشحمي للفيروس و المستقبلات **CD4** و **CCR5** الموجودة على غشاء الخلية اللمفاوية **T4**، يحصل اندماج مابين الغلاف الشحمي الفيروسي و الغلاف الشحمي للخلية اللمفاوية **T4**.
- و من ثم يدخل النكليوئيد الفيروسي سيتوبلاسما الخلية الهدف T4، و تبدأ مرحلة النسخ العكسي لجزيئات الـ RNA الفيروسية بوساطة أنزيم النسخ العكسي. و ذلك بتحويل المادة الوراثية المكونة من سلسلتين مفردتين من الـ RNA إلى سلسلة مزدوجة الـ DNA الذي يحمل المعلومات الوراثية التي كانت محمولة على RNA.

II- آلية النسخ العكسي في فيروس الـ AIDS:

يتكون أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcription، المستخلص من الخلايا التائية T4 للأشخاص المصابة بنقص المناعة المكتسبة الـ AIDS من وحدتين بروتينيتين، و يتميز باحتوائه على ثلاث فعاليات أنزيمية مختلفة، و هي على التوالي:

1. فعالية نسخ عكسي:

بعد دخول فيروس الإيدز الخلايا المضيفة T4، بفضل فعالية النسخ العكسي لأنزيم النسخ العكسي يتم نسخ الـ DNA المتمم cDNA انطلاقا من الـ RNA، حيث يقوم هذا الأنزيم أولا بنسخ السلسلة الأولى من الـ cDNA في الاتجاه **`3** إلى **`5** بالنسبة للـ RNA الفيروسي. ينشأ عن عملية النسخ هجين DNA- RNA.

2. فعالية محللة RNase H

بفضل الفعالية المحللة لأنزيم النسخ العكسي الفيروسي، تهضم الحمض النووي RNA الموجود في جزيئة الهجين DNA- RNA. تتم عملية الهضم في الاتجاهين **`3** إلى **`5** و **`5** إلى **`3**.

3. فعالية مبلمرة للـ DNA:

بفضل فعالية البلمرة لأنزيم النسخ العكسي، يتم نسخ خيط الـ DNA في الاتجاه **`5** إلى **`3**. عندها تتشكل جزيئة مزدوجة من الخيط و التي تمثل المادة الوراثية لفيروس الـ AIDS في الخلية المضيفة.

- آلية النسخ العكسي معقدة و من خلالها يتم:
- تحويل المعلومات الوراثية الموجودة على الشريط المفرد للـ RNA إلى شرسط مزدوج من الـ DNA.
- إحداث تسلسلات نكليوتيدية خاصة يطلق عليهاLTR(Long Terminal Repeats) على طرفي جزيئة الـ DNA. لهذه التسلسلات وظيفتين أساسيتين، من جهة تساهم في عملية اندماج الـ cDNA الفيروسي ضمن الذخيرة الوراثية للخلية المضيفة T4، و من جهة أخرى لها دور هام أثناء مرحلة نسخ cDNA من قبل أنزيمات الـ RNA بوليمراز الخاصة بالعائل المضيف.

للتذكرة:

تحتوي الفيروسات الرجعية عندما تكون خارج خلايا المضيف على مادة وراثية مؤلفة من سلسلتين مفردتين من الـ RNA، لكن بعد دخول تلك الفيروسات خلايا المضيف تتجول مباشرة إلى سلسلة مزدوجة من الـ DNA بفضل الفعاليات الثلاث المختلفة لأنزيم النسخ العكسي.

III-طور الكمون:

بعد مرحلة النسخ العكسي و تشكل الـ cDNA مزدوجة الخيط، تصبح هذه الأخيرة جاهزة للدخول إلى نواة الخلية المضيفة T4، لا يختصر فقط وجوده في نواة الخلية المضيفة بل تندمج جزيئة الـ cDNA داخل أحد صبغيات الخلية التائية المضيفة، عنده يصبح طفيليا ناجحا و الذي يحفز عملية الاندماج cDNA الفيروسي مع أحد صبغيات الخلية المضيفة هو أنزيم Integrase الفيروسي، و بالتالي يتشكل طليعة الفيروس الذي يصعب الكشف عنه و القضاء عليه.

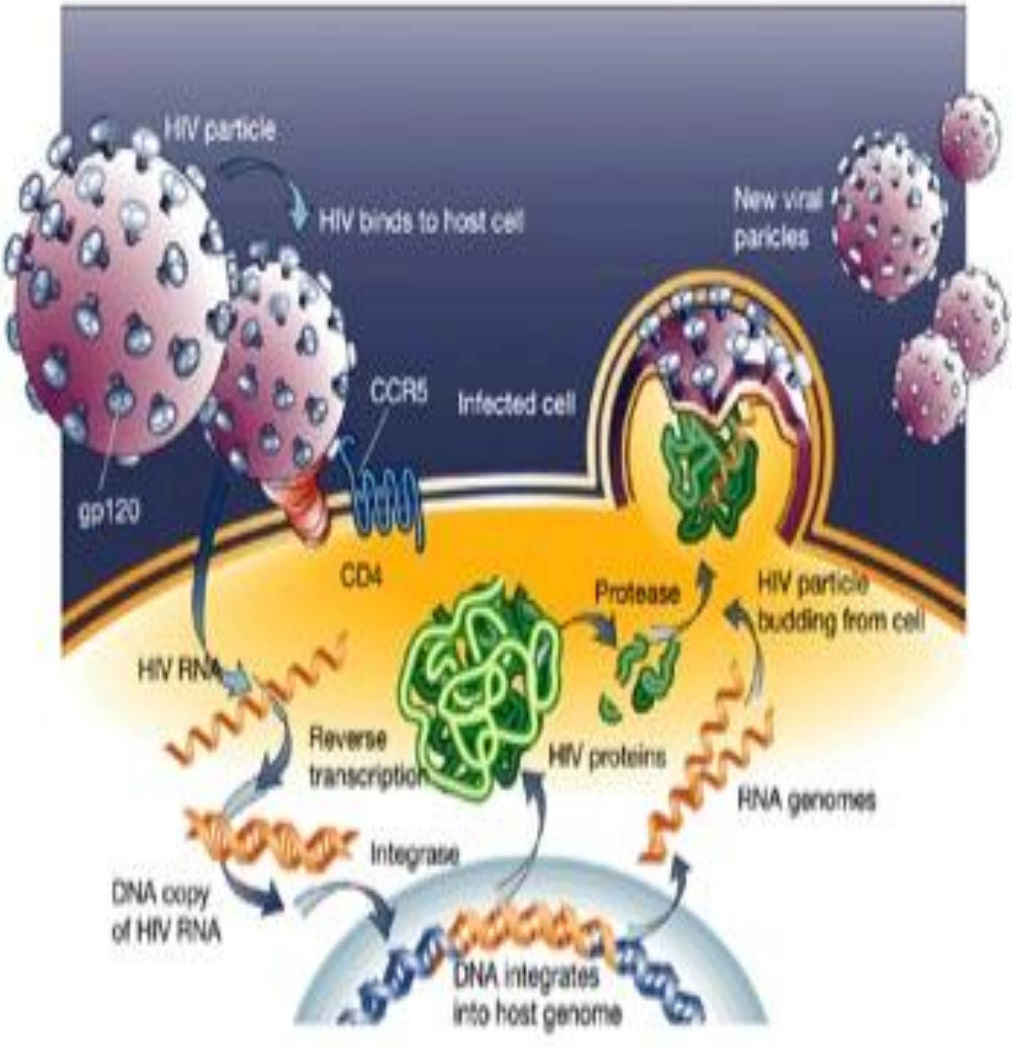
في هذه المرحلة لا تظهر على الشخص المصاب أعراضا مرضية، لكنه يستطيع أن ينقل خلايا مصابة بطليعة الفيروس إلى أشخاص أصحاء.

يمكن لطليعة الفيروس البقاء بشكل خامل لفترات زمنية طويلة.

IV- طور النشاط:

- لأسباب غير معروفة بعد، تتنشط المادة الوراثية لطليعة الفيروس، و هذا ما يحفز أنزيمات الـ RNA Polymerase الخاصة بالخلية اللمفاوية T4 بنسخ جزيئة cDNA مما يترافق مع ظهور كميات كبيرة من الـ RNA الرسول الفيروسي في سيتوبلازما هذه الخلايا.
- قسم من الـ RNA الرسول الفيروسي يترجم إلى بروتينات فيروسية وظيفية في سيتوبلازما الخلية المضيفة. أما القسم الآخر يستخدم كمادة وراثية.

- تتجمع الأفراد الفيروسية الجديدة الحاملة للـ RNA داخل الخلية المصابة T4.
- تغادر أعداد كبيرة من فيروسات الإيدز الجديدة الخلية المضيفة T4 بعد أن تأخذ معها قسما من مكونات الغشاء الخلوي للخلية اللمفاوية، تموت الخلية T4 نتيجة الإصابات المتكررة الناتجة عن فقدانها قسم من مكونات غشائها البلازمي.
- تتحرر الفيروسات الجديدة و تنتشر في كل العضوية، و تهاجم خلايا تائية جديدة. و يكمل فيروس الإيدز دورة حياته داخل هذه الخلايا، مما يؤدي إلى إبادتها.
- يتحطم الجهاز المناعي و يصبح غير قادر على حماية الكائن الحي من الأخ ماج الخارجية، بسبب انخفاض كمية الخلايا T4 في الدم.
- بعض الأشخاص المصابين بمرض الإيدز تتطور عندهم أحد أنواع السرطانات مثل سرطان Kaposi الذي يصيب الأنسجة الضامة.



الشكل 38: دورة حياة فيروس الإيدز AIDS

السؤال الهام: لماذا يجد الجهاز المناعي صعوبة بالغة للتغلب على فيروس AIDS؟

الجواب: أن فيروس الإيدز يمتلك آليات تشويش للجهاز المناعي، مما يصعب التعرف عليها و القضاء عليه.

أهم هذه الآليات :

- تغيير تركيب الغشاء البروتيني للفيروس، فعند خروج الفيروس من الخلية التائية المصابة، يحاط بغشاء بروتيني مشابه للغشاء الشحمي لهذه الخلية. و هذا ما يجعل جهاز المناعة غير قادر على التعرف على الفيروس و الصعوبة في القضاء عليه.

- حدوث طفرات مستمرة على جينات الفيروس، هذا ما يجعل التغيير المستمر في بروتينات الغبلف الخارجي للفيروس، فيخدع الفيروس جهاز المناعة باستمرار.

أخيرا: من الدراسات في مخابر الأبحاث العلمية لمحاربة فيروس الإيدز، بإجراء دراسات دقيقة عن الجينات المسؤولة عن تشفير أنزيمات الفيروس التي تلعب دور حيوي إصابة الخلايا التائية و تدميرها و منها:

أنزيم البروتياز، و أنزيم النسخ العكسي، و أنزيم Integrase.

تقنية الـ PCR

تفاعل التسلسل البوليميري

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.

1. ما هو الـ 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 إجراء اختبارات و فحوصات إضافية عليها.

وضعت هذه التقنية من قبل العالم كاري موليس Kary Mullis في عام 1983م والذي حاز على جائزة نوبل عام 1993 .

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.

2. 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.

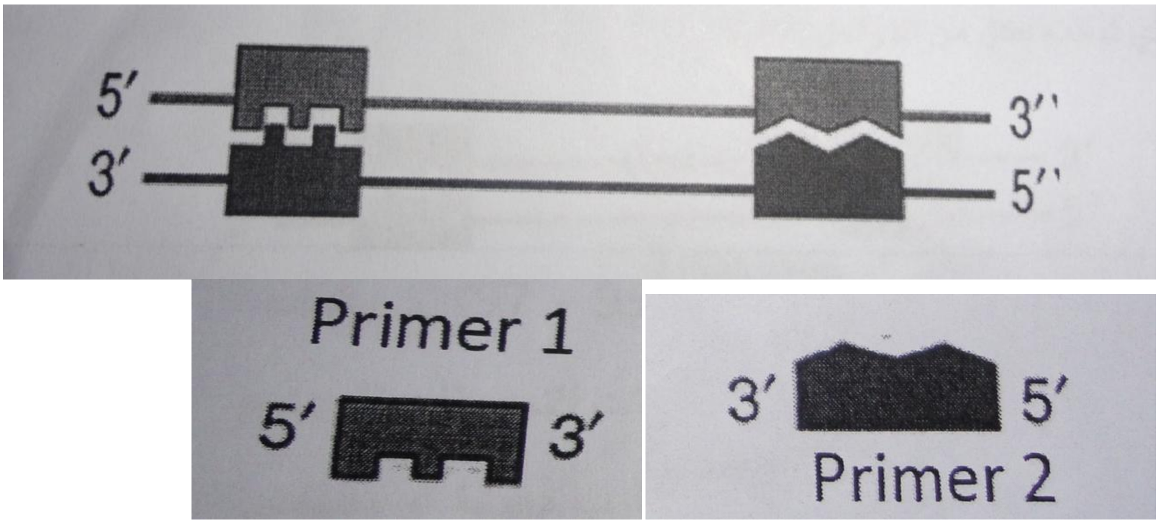
2- القالب template: شريط من الـ DNA مضاعف السلسلة قد يكون الجينوم كله أو جزء منه.

3- أنزيم Taq polymerase

4- السلاسل البادئة primers: وهو قطعة صغيرة من الحمض النووي (DNA) ليتمكن الإنزيم من بدء البناء و النسخ عليها عند النهاية ´3.

5- نكليوتيدات حرة dNTPs.

6- وقاء ليتم فيه التفاعل ويحوي شوارد المغنيزيوم.

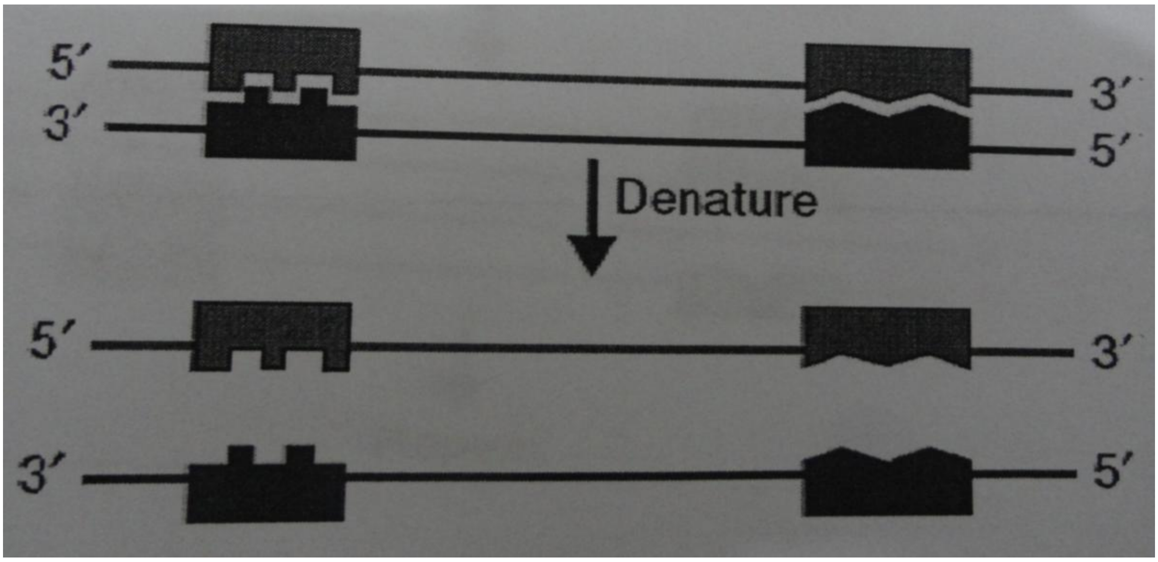


الشكل 39: البرايمر و قطعة الـ DNA

تقوم عملية الـ PCR على عدة دورات (30-24) دورة تقريبا، وتتألف الدورة الواحدة من ثلاث مراحل:

I. التمسخ أو الفصل (Denaturation):

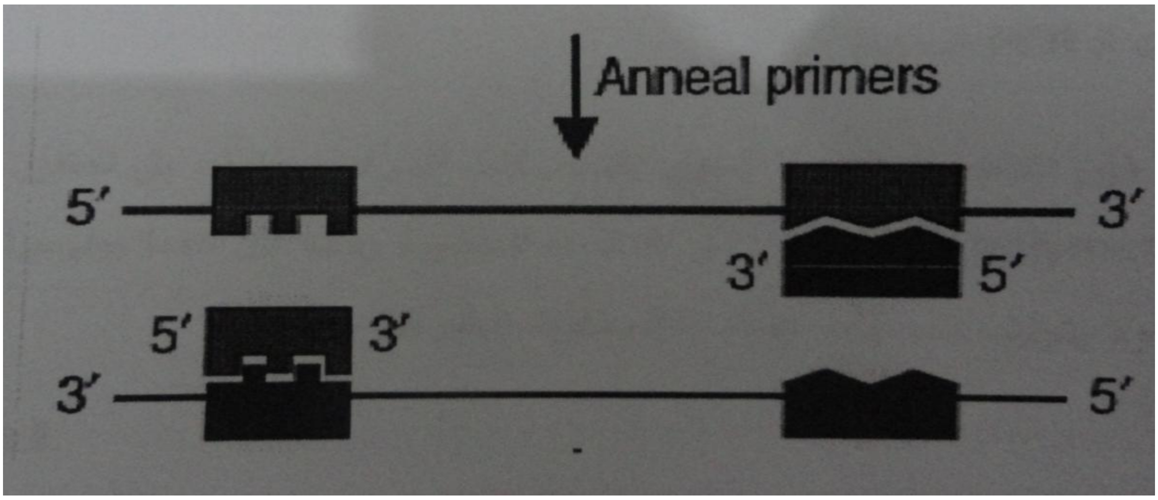
يتم الفصل بين الـ DNA المتتامين للقالب بالحرارة التي تقارب (93-95) ^{o} م. تعتمد المدة اللازمة للفصل على مصدر الجينوم (عند طلائعيات النوى لا تحتاج لزمن طويل أما حقيقيات النوى ذات الجينوم الكبير والغنية بنكليوتيدات الـ C والـ G تحتاج لزمن أطول). تستمر هذه المرحلة ما يقارب دقيقة أو دقيقتين (وهو تقريبا الزمن الذي تأخذه كل من المراحل التالية).



الشكل 40: مرحلة التمسخ

II. مرحلة التهجين Hybridization:

في هذه المرحلة تنخفض درجة الحرارة إلى ما يقارب (50 - 65) ° م لتلتصق البوادئ مع متمماتها على الجينوم. وتعتمد درجة الحرارة اللازمة على تسلسل وطول البوادئ التي تضاف، فلكل بادئ درجة حرارة مناسبة لالتصاقه (فإذا انخفضت درجة الحرارة فوق اللازم سيلتصق البادئ بشكل عشوائي حتى أنه يمكن أن يلتصق مع نكليوتيدات لا تتممه، أما إذا ارتفعت درجة الحرارة كثيرا فلن يلتصق البادئ مع متممه).

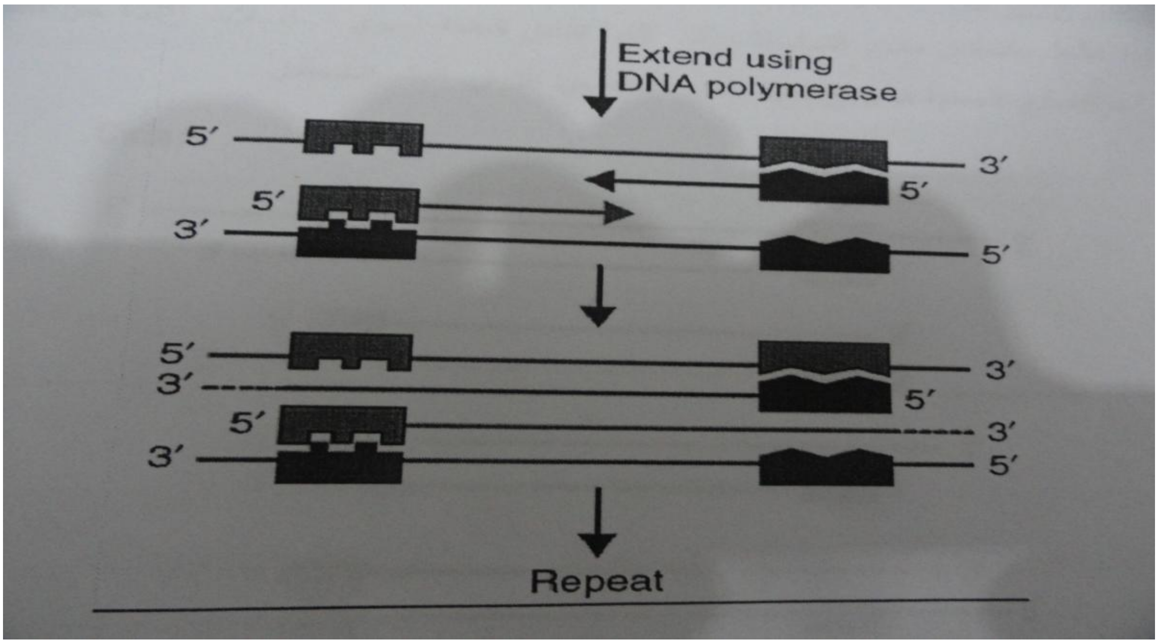


الشكل 41: مرحلة التهجين

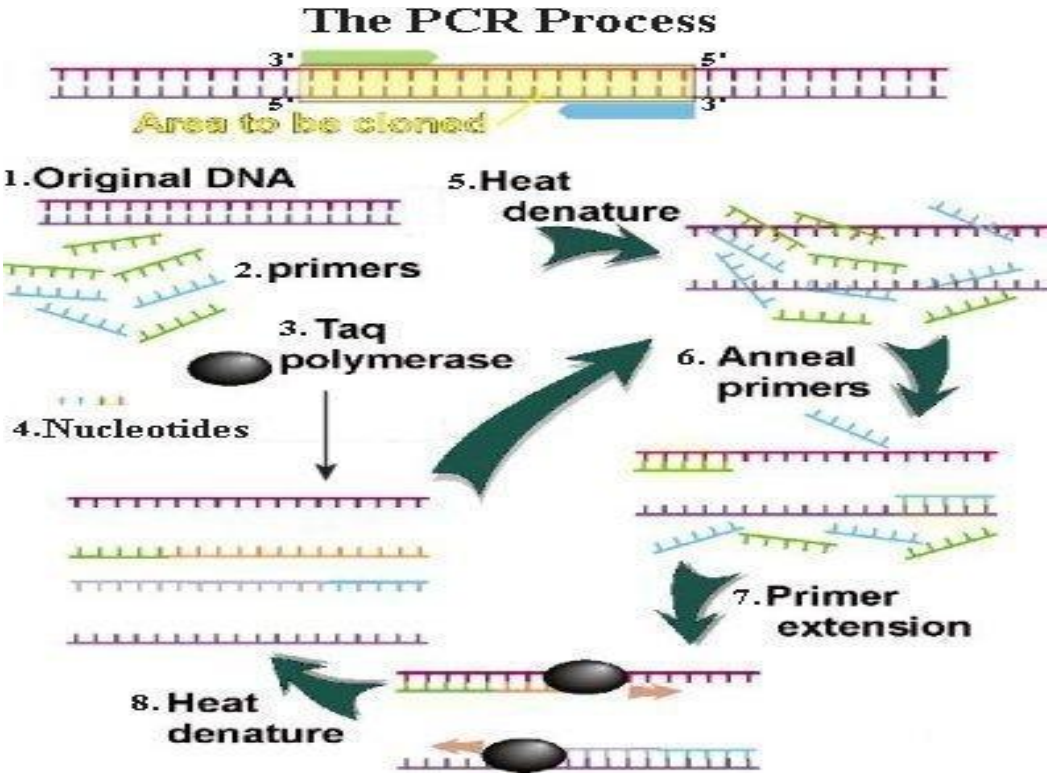
II. مرحلة الإطالة أو التصنيع Synthesis :

بعد أن يرتبط البادئ مع متتمه على القالب يأتي أنزيم الـ Taq polymerase ويتمم التسلسل على كل خيط فينتج عن كل خيط في النهاية خيط مضاعف من الـ DNA.

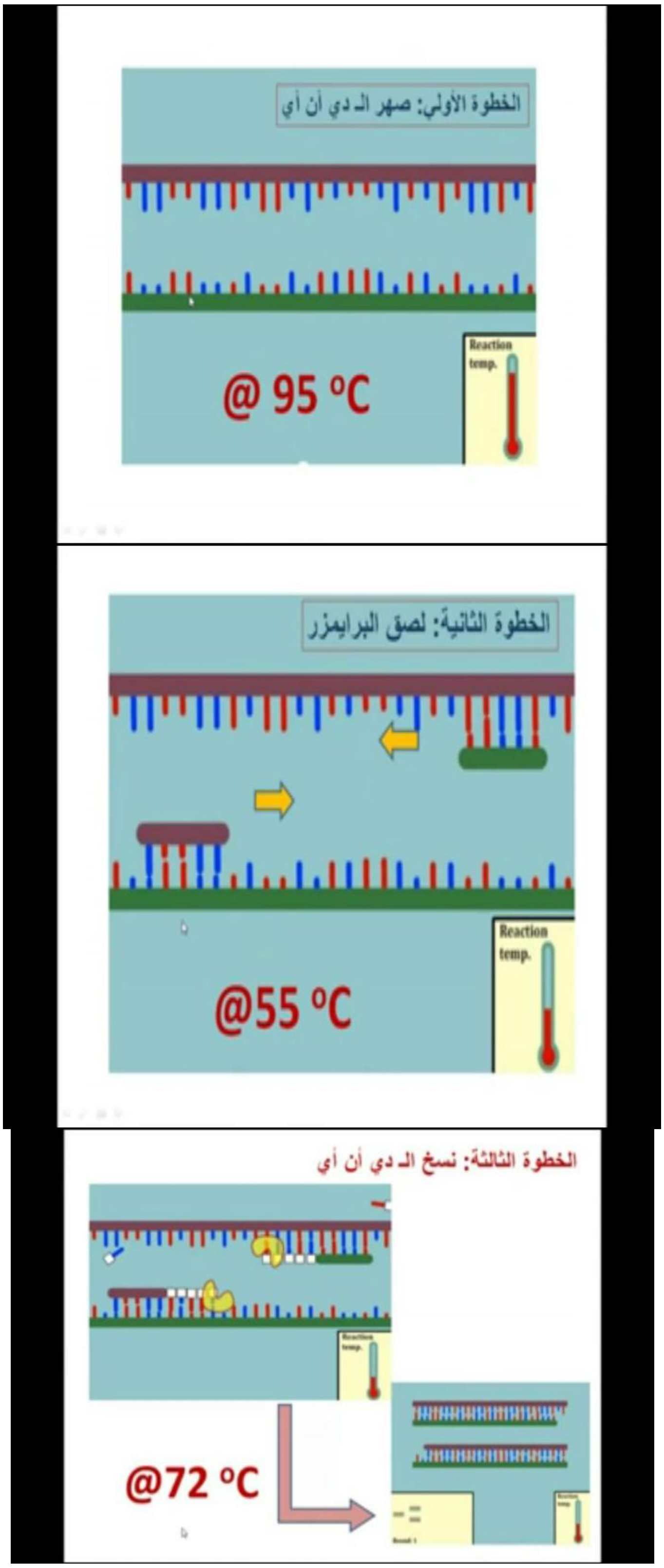
تكون درجة الحرارة في هذه المرحلة (72-75) ° م، أما الزمن يتفاوت حسب طول القطعة المراد دراستها.



الشكل 42: مرحلة الإطالة



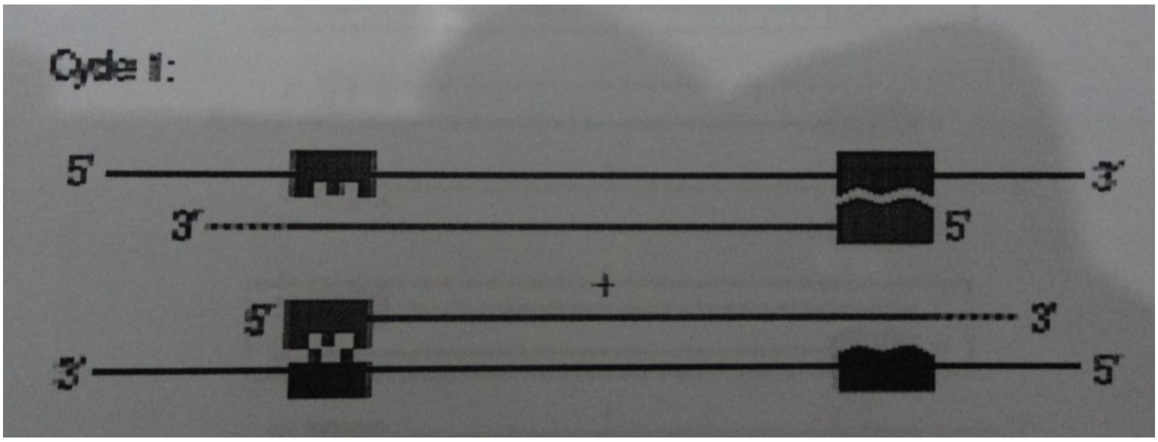
الشكل43: مراحل الـ PCR



الشكل 44: الدورة الواحدة للـPCR المكونة من ثلاث مراحل

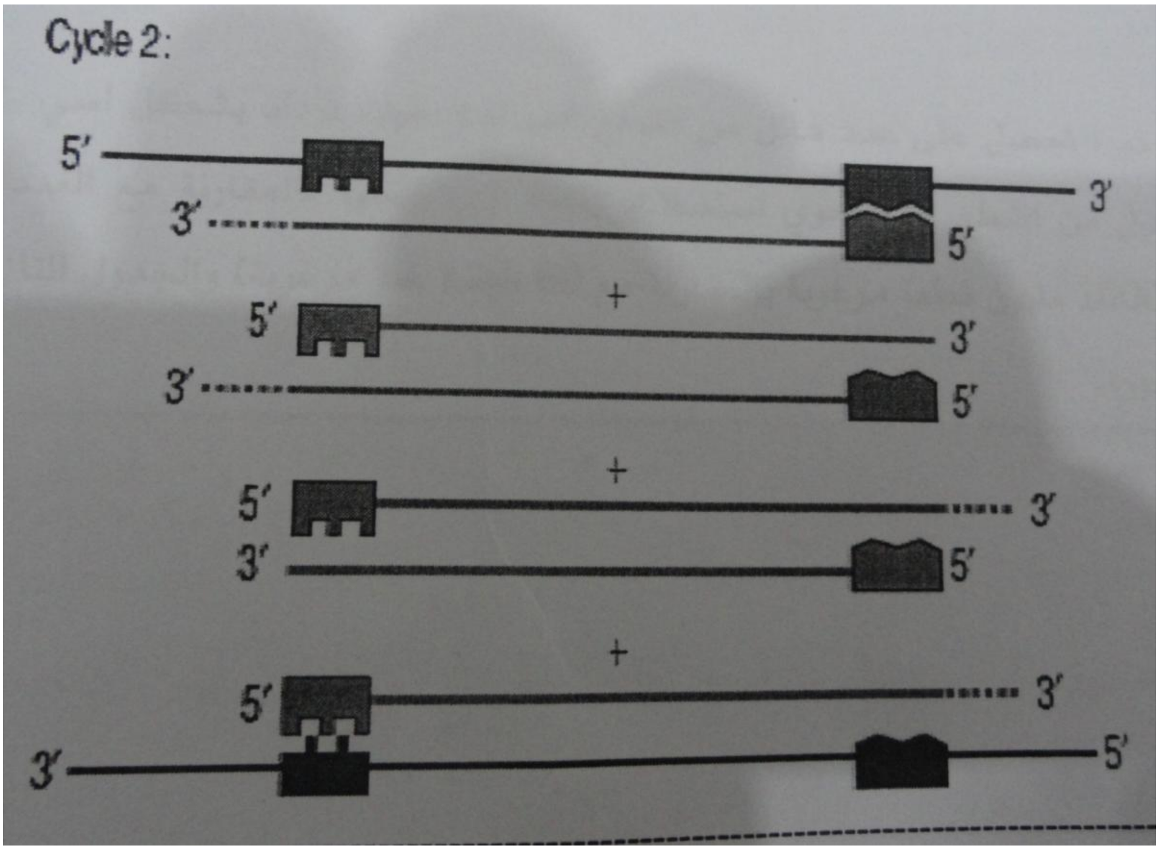
ماذا يحدث خلال دورات الـ PCR المتتابعة:

بعد الدورة الأولى: إن القطع الناتجة لا تحوي التسلسلات المرغوبة فقط، بل تكون التسلسلات التي يصطنعها الأنزيم أطول من السلسلة المطلوبة و ذلك لأن الأنزيم يتابع عمله على كل خيط من الخيطين ولا يتوقف عند نهاية السلسلة المطلوبة.



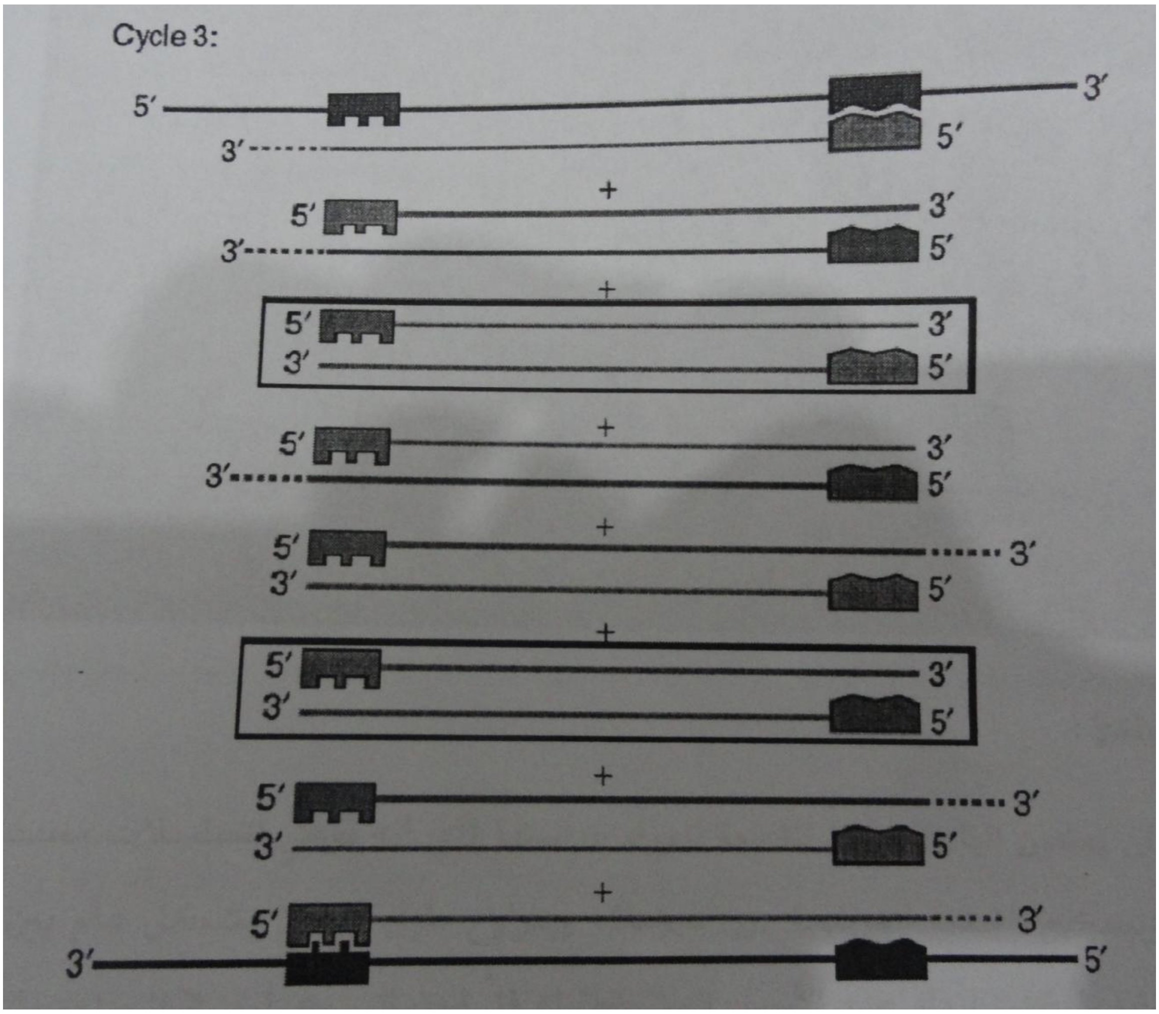
الشكل45: بعد الدورة الأولى

بعد الدورة الثانية: بعد فصل الخيطين المتتامين فإن الخيط المتشكل من الدورة الأولى سينتج عنه القطعة المرغوبة فقط وبشكل مفرد السلسلة و ذلك لأنها تقابل قطعة تحوي تسلسلات زائدة عن التسلسلات المرغوب بها، أما القطع الأصلية ينتج عنها ما ينتج في الدورة الأولى.



الشكل 46: بعد الدورة الثانية

<u>بعد الدورة الثالثة:</u> ينتج أول سلسلتين مضاعفتين ومحدودتين تماما بالشكل الذي نرغب به (وهي التي وضعت ضمن إطار في الشكل 46).



الشكل 47: الحصول على أول سلسلتين مضاعفتين بعد الدورة الثالثة

وبعد حوالي 30 دورة نحصل على عدد هائل من القطع المرغوبة حيث تزداد بشكل أسي في كل دورة. بالمقارنة مع عدد قليل من القطع التي تحوي تسلسلات زائدة التي نهملها بالمقارنة مع العدد الهائل للقطع المرغوبة (ما يقارب 1000 مليون قطعة مرغوبة بالمقارنة مع 60 قطعة غير مرغوبة).

3. 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.

4. 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 (93-95) 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 65) 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 (72-75) 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.

5. 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.

6. أنزيم تكثيف الـ DNA (Taq -Polymérase)

تأتي هذه الأنزيمات من البكتيريا المقاومة لدرجات الحرارة المرتفعة و تدعى Thermus aquaticus (Taq 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.

7. المحلول الموقى

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.

8. تقنية 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 .

<u>9.محدودية عملية الـ PCR :</u>

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

2- قابليتها للتلوث، من أجل هذا يجب إجراء شاهد سلبي لكل عملية PCR (وهو أنبوب نضع فيه كل المكونات اللازمة باستثناء الـ DNA المدروس) ويجب أن لا يظهر فيه أية قطعة متضاعفة بعد انتهاء العملية.

3- أنزيم الـ Taq polymerase لا يصحح الأخطاء التي يرتكبها أثناء العمل، وذلك يؤثر على التجربة المجراة في حال كانت عملية الـ PCR تجرى لمعرفة تسلسل القطعة المدروسة، في 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 تأثيرا كبيرا على النتائج.

4- طول القطعة المضخمة عبر الـ PCR محدود.