تفاعل سلسلة متعدد البلمرة (PCR) وأنواعه

او يسمى تفاعل البوليميراز المتسلسل (Polymerase Chain Reaction - PCR) هو تقنية حيوية تُستخدم لتضخيم كميات صغيرة من الحمض النووي (DNA) إلى كميات كبيرة قابلة للتحليل. تم تطوير هذه التقنية في عام 1983 بواسطة كاري موليس، وأصبحت منذ ذلك الحين أداة أساسية في الأبحاث البيولوجية والطب الشرعي والتشخيص الجزيئي.

كل تفاعلات سلسلة متعدد البلمرة المتسلسل تستخدم انزيم بلمرة مستقر حرارياً مثل Taq polymerase وهو انزيم معزول من البكتريا المحبة للحرارة ، يعمل هذا الانزيم على تجميع سلسلة DNA جديدة من النيوكليوتيدات وذلك باستعمال سلسلة قصيرة مفردة كقالب (وتسمى ايضا البادئات) وهو مطلوبة لبدأ تصنيع الـ DNA .

معظم طرق تفاعل البلمرة تستخدم التدوير الحراري بمعنى انه يتم تسخين وتبريد عينة تفاعل البلمرة المتسلسل وذلك طبقا لسلسلة خطوات حرارية محددة.

آلية عمل تقنية الـ PCR:

تعتمد تقنية الـ PCR على تكرار دورات متتابعة من ثلاث خطوات رئيسية داخل جهاز المبلمر الحراري ويتم التحكم بدرجة الحرارة والوقت عن طريق برنامج خاص في الجهاز، وهذه الخطوات تشمل :

1. **المسخ او الفصل (Denaturation):** يتم بتسخين العينة إلى درجة حرارة عالية (92ºم - 98ºم درجة مئوية) لفصل شريطي الـDNA. ان احد اكثر اسباب فشل تفاعل الـ PCR هو عدم اكتمال عملية فصل سلسلتي الـ DNA ، ان الظروف المثالية لعملية المسخ (او الفصل) هي 95ºم لمدة 30 ثانية أو 97ºم لمدة 15 ثانية. وعموما فان درجة الحرارة العالية مناسبة خاصة مع تواجد كميات كبيرة من القواعد G-C (بسبب قوة الاصرة الثلاثية بينهما)، كما ان المسخ غير المكتمل يؤدي الى اعادة التحام الـDNA وهذا يؤدي الى قلة ناتج الـ PCR في حين يؤدي المسخ الطويل الى خسارة في فعالية انزيم Taq polymerase.
2. **التصميع او الارتباط (Annealing):** يتم تبريد العينة الى (55-75 درجة مئوية) لتمكين البادئات (Primers) من الارتباط بالتسلسل المستهدف على DNA. ان درجة حرارة وطول الوقت المطلوب لارتباط البادئ يعتمد على موقع الارتباط وطول البادئ.
3. **الإطالة (Extension):** يتم رفع درجة الحرارة إلى حوالي 72 درجة مئوية، حيث يقوم إنزيم Taq Polymerase بتمديد السلسلة الجديدة باستخدام النيوكليوتيدات المتاحة.

يتم تكرار هذه الخطوات لعدة دورات (عادة 25-40 دورة) مما يؤدي إلى تضاعف الحمض النووي المستهدف بشكل أُسِّي.

أنواع تقنية الـ PCR:

1- الـPCR التقليدي (Conventional PCR or Standard PCR):

- يستخدم لتضخيم تسلسل مفرد من الـ DNA بطول اقل من 5Kb.
- يستخدم للتحري عن الجينات و الطفرات.
- يتطلب إجراء تحليل لاحق مثل الترحيل الكهربائي للهلام.

2- الـ Long PCR

- يستخدم لتضخيم تسلسل مفرد بين (40 Kb -5 Kb)
- يستخدم للتحري عن الجينات الكبيرة (قطعة طويلة او جين كامل).

3- الـRAPD PCR

- يستخدم لتضخيم قطع عشوائية غير معروفة من الحمض النووي باستخدام بادئ عشوائي واحد قصير عادة (8-10) قاعدة نتروجينية
- يستخدم لغرض المقارنة بين الـDNA للعزلات المتشابهه.

4- الـ PCR اللحظي (Real-Time PCR or qPCR):

- يتيح حساب كمية الحامض المتوفر في النموذج
- يتيح تشخيص مثبطات الـPCR في خليط التفاعل
- يتيح الكشف عن تضخيم الحمض النووي بشكل فوري خلال التفاعل.
- يستخدم أصباغ فلورية .
- يُستخدم على نطاق واسع في تشخيص الأمراض الفيروسية والبكتيرية.

5- الـ PCR المتعدد (Multiplex PCR):

- يستخدم لتضخيم تسلسل متعدد وتكون طولها اقل من 5Kb. (تسلسل متعدد يعني عدة أهداف جينية في تفاعل واحد باستخدام أكثر من زوج من البادئات)
- يُستخدم في تشخيص الأمراض المعدية والاختبارات الجينية.

6- الـNested PCR

- يتكون من تفاعلين PCR متعاقبين، يستخدم التفاعل الثاني زوج من البادئات لتضخيم جين داخل ناتج التفاعل الأول.
- يستخدم في تضخيم القوالب الصعبة وقليلة التركيز.
- يستخدم عندما يكون التضخيم غير فعال بسبب وجود المثبطات ووجود بعض التراكيب الثانوية المعقدة.

7- الـ Reverse Transcription PCR (RT-PCR):

- يستخدم لتحليل الحمض النووي الريبي (RNA) عن طريق تحويله أولاً إلى DNA باستخدام إنزيم النسخ العكسي.
- يُستخدم في الكشف عن الفيروسات ذات الحمض النووي الريبي مثل فيروس كورونا.

8- الـ Digital PCR (dPCR):

- تقنية حديثة تُستخدم لتحليل كميات منخفضة جدًا من DNA أو RNA.
- توفر دقة عالية للكشف عن الطفرات النادرة وتحديد عدد النسخ الجينية.