ثانياً :- مؤشرات الدنا المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR)

تعمل هذه التقانة على مضاعفة قطعة معينة من الدنا المنتجة من الجينوم الكلي انزيمياً وخارج الجسم الحي Invitro بوجود البادئات Primers والتي ترتبط بالتتابع المكمل لها على شريط الدنا القالب DNA Template . ويعد PCR اليوم التقنية الاكثر رواجاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع انحاء العالم والاساس الذي تعتمد عليه الكثير من الدراسات على مستوى الدنا إذ يمكن استخدام قطرة دم او شعرة او حتى خلية واحدة لاجراء عمليات الـ PCR عليها.

مراحل التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا :-

حددت مراحل تفاعل (**PCR**) بثلاث خطوات أساسية تتكرر في كل دورة من دورات التفاعل بمدة زمنية معينة **وتقسم هذه المراحل الى** :-

1. **مرحلة المسخ أو الإنفكاك Denaturation stage**:-

هي مرحلة فك حلزنة شريطي **DNA (double helix)** برفع درجة حرارة التفاعل لتصل الى **92 - 94 م°** ولوقت يتراوح بين **(3-5)** دقائق إذ تؤدي الحرارة المرتفعة الى كسر الأزدواج بين القواعد النتروجينية عن طريق كسر الأواصر الهيدروجينية وينتج منها شريطين مفردين من الدنا **(Single strand DNA)** الذي يعمل كقالب **(templeate)** في الدورة التالية من تضاعف الدنا وتعتمد عملية المسخ على عدد من العوامل كنوعية ومصدر الدنا القالب ونوع الانزيم المستخدم .

2 . مرحلة آرتباط البادئ Annealing stage :-

هي مرحلة ارتباط البادئات مع التتابعات المكملة لها من القواعد النتروجينية في الشريط المفرد من الدنا القالب وذلك ببناء الاواصر الهيدروجينية بينهما.

3 . مرحلة الإستطالة Extension stage :-

هي مرحلة آستطالة السلسلة الجديدة بإضافة النيوكليوسيدات منقوصة الاوكسجين ثلاثية الفسفور **Deoxynucleoside Triphosphate (dNTPs)** ، بمساعدة أنزيم (***Taq* DNA polymerase**) عند درجة حرارة **70- 75 م°** التي تضاف الى النهاية **(OH - 3)** بدءاً من نقطة آرتباط البادئ بالقالب لتكوين شريط دنا مكمل لذلك القالب

من قبل انزيم البلمرة والمدة الزمنية اللازمة لذلك تختلف حسب نوع المؤشرات المستخدمة .

اما للكشف عن نواتج الـ PCR فتتم بعدة طرائق اكثرها شيوعاً هي الهجرة الكهربائية بأستعمال هلام الاكاروز او هلام البولي اكرل أمايد والتصبيغ بأستخدام بروميد الاثيديوم والكشف بأستخدام الاشعة فوق البنفسجية والتصبيغ بأستخدام نترات الفضة مع الكشف المباشر بالعين المجردة.

مؤشرات الدنا المعتمدة على PCR :-

تقسم الى قسمين :-

أ - **مؤشرات تستهدف مواقع متعددة من الجينوم :-**

PCR – Based Multilocus Profiling Techniques

وتشمل :-

1. مؤشرات تستخدم بادئات عشوائية تماماً كمؤشرات نسق النواتج المتضاعفة المتعددة العشوائية

Multiple Arbitrary Amplicon Profiling (MAAP)

وهذه المؤشرات تقسم الى :-

- ❖ مؤشرات التفاعل العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

- ❖ مؤشرات التفاعل العشوائي لسلسلة الدنا

Arbitrary Primed PCR(AP-PCR)

- ❖ بصمة الدنا المتضاعفة

DNA Amplification Finger Printing (DAF)

2. مؤشرات تستخدم فيها بادئات شبه عشوائية Semiarbitrary Primers كمؤشرات تباين اطوال قطع الدنا المتضاعفة

Amplified Fragment Length Polymorphism(AFLP)

3. مؤشرات تستخدم فيها بادئات متخصصة كمواقع محددة متوزعة على الجينوم كمؤشرات التتابعات القصيرة المتكررة

Simple Sequence Repeat (SSR)

ب - **مؤشرات تستهدف موقع محدد معروف التسلسل**

Sequence Targeted and Single Locus PCR Markers

ان هذه المؤشرات تحتاج الى معرفة تسلسل موقع الدنا المطلوب الذي ليس بالضرورة ان يكون في النواة بل قد يكون في المايتوكوندريا او الكلوروبلاست سواء في الخلايا النباتية او الحيوانية ومن الامثلة على هذه المؤشرات :

Ribosomal Gene Analysis و Alpha –Amylase Gene Analysis

استخدامات تقانة الـ PCR :-

1. آستخدام التقانه في برامج التربية والتحسين وإنتاج الهجن للمحاصيل الاقتصادية والماشية.

2. آستخدام التقانة في تقدير ودراسة كميات قليلة جداً من الدنا خاصةً في مجالات الطب العدلي والتحقيق الجنائي وتحديد الأبوة الشرعية .

3. آستخدمت في تحليل العينات المتحللة والمتعفنة التي يصعب إجراء الإختبارات عليها بالطرائق العادية إذ تم تحليل الدنا لـ ماموث بعمر **(40)** الف سنة وتحليل أمهات الحضارة المصرية و قيصر روسيا .

4. آستخدمت في تقدم علم الحفريات النباتية والحيوانية وعلم الآثار وإيجاد أصول عدد من النباتات والحيوانات عن طريق دراسة بقايا النباتات والحيوانات المدفونة في العنبر (الكهرمان) عبر العصور الجيولوجية المختلفة عن طريق تحليل الدنا .

5. أستخدمت في تشخيص بعض الأمراض الوراثية عن طريق تشخيص المورث أو الجين المسوؤل عن ظهور المرض وفي تشخيص الطفرات والأمراض الطفيلية والفايروسية للانسان مثل (التهاب الكبد الفايروسي ، الانفلاونزا ، الحصبة ، الايدز HIV ، انفلاونزا الطيور H_5N_1 ، والامراض السرطانية) والوبائية إذ إنَّ التشخيص المبكر قبل أيام أو أسابيع أو شهور يسهل من علاجها قبل أستفحالها .

6. تستخدم عند إجراء المقارنة بين تركيبين وراثيين يعودان للنوع نفسه أو لنوعين مختلفين يمكن المقارنة بينهما عن طريق آستخدام بادئات عشوائية .

7. التمييز بين العلاقات الوراثية من حيث القرابة والبعد أسهل بعد آكتشاف تقانه **(PCR)** مما أدى الى ظهور تقنيات حديثة مثل(**RAPD وAFLPو SSR)** .

متطلبات تقانة الـ PCR :-

1. انزيم بلمرة الدنا DNA Polymerase .
2. البادئات Primers .
3. النيوكليوسيدات المنقوصة الاوكسجين الثلاثية الفسفور dNTPs .
4. المحلول المنظم (الدارئ) PCR Buffer الحاوي على ايونات Mg^{+2} إذ يقوم هذا المحلول بالحفاظ على الـ PH من التغيير كما يقوم بتنظيم عمل انزيم البلمرة والمحافظة على نشاطه .
5. جهاز المبلمر (التدوير) الحراري Thermocycler.