الفصل الأول:

جولات مع التفاعل المتسلسل للبوليميريز PCR وتطبيقاته

الجولة الأولى:

جولة مع ... التفاعل المتسلسل للبوليميريز (PCR) واستخداماته:

تمهيد:

تفاعل الـ PCR هو تقنية بيولوجية للتكاثر الجزيئى لاستنساخ الچينات، وهو يعتمد على استغلال ظاهرة التكامل بين القواعد النيتروچينية على جديلتى الدنا الوراثى ويستفاد منها فى مجالات عديدة وبخاصة فى:

١ـ فى مجال البصمة الوراثية: وللتعرف على المجرمين وعلى الجثث المشوهة للقتلى فى الحوادث والحروب والزلازل. وسيكون لنا معها لقاء.

٢ـ فى مجال عمل اللقاحات والتطعيمات الچينية ضد الأمراض المعدية: وسنعرض أمثلة موضحة لذلك فيما بعد.

٣ـ فى مجالى الفحوص الوراثية والكشف عن الأمراض المعدية:

حيث ثبت نجاحه فى سنة ١٩٩٤م فى إختبارات للكشف عن العديد من الأمراض سواء وراثية... أو عن الأورام ـ بل وقطع باب الشك باليقين بها. وفى مجال الأمراض المعدية مثل استخدامه كتحليل ضرورى لاكتشاف الفيروسات ومعرفة نوع سلالة الفيروس مثل الفيروس {C}، وفيروس {الإيدز}... وذلك فى وقت مبكر.. وبالنسبة لفيروس الإيدز فإنه يستخدم هذا الاختبار للكشف عن الفيروس مباشرة من عينة مأخوذة من دماء الأشخاص الذين أصيبوا بالعدوى ولم تظهر عليهم الأعراض بعد (أو للتأكد من عدم حدوث عدوى لديهم). وبالتالى يفيد فى سرعة تقديم العلاج وتحسن حالة المرضى لحد كبير.

وفى مصر:

يُذكر أن هذا الاختبار يستعمل منذ فترة ليست بالقصيرة.. ومن بين مَنْ أبرزوا أهميته د. «ألفت جميل شاكر» [أستاذ مساعد الكيمياء الحيوية بطب قصر العينى] والتى نالت جائزة الدولة التشجيعية لتقدمها بأربعة أبحاث عن استخدام اختبار PCR فى مجال الأمراض المعدية مثل الالتهاب الكبدى الوبائى C، والدرن، والزوائد الورمية الموجودة فى رحم بعض السيدات، وأمكن استخدامه فى تشخيص بعض الأورام السرطانية ونقص بعض الجينات وثبت نجاحه ودقته.

وأكد الكثير من أطبائنا على ضرورة الكشف عن إنزيمات الكبد وعمل تحاليل PCR الكمى فى حالة الإصابة بمرض الفيروس الكبدى الوبائى - (بعدما ثبت نجاحه)؛ وهذا الفيروس يُعد من أخطر الفيروسات التى تصيب الكبد وينتج عنها تلف خلايا الكبد إذا أُهمل علاجه، وينتقل عن طريق الدم وأمواس الحلاقة وأدوات علاج الأسنان غير المعقمة جيداً أو أثناء العمليات الجراحية. وباستخدام اختبار PCR يتم ملاحظة الفيروس وتمييز وتشخيص نوع السلالة بدقة والكشف عن كم الفيروس فى الدم ومدى قدرته على التكاثر، وبذلك يمكن التحكم فيه ومتابعة حالة المريض منذ البداية وتحديد العلاج المناسب ... وتم فى المركز القومى للبحوث فى مصر العمل على تصميم وسائل تشخيصية صناعية لهذا الفيروس تصلح لعمليات المسح التشخيصى السريع فى بنوك الدم والمعسكرات وبذلك تقل نسبة حدوث العدوى عن طريق الدم.. وبالنسبة للفيروس "C" يُذكر أنه تم التوصل لمعرفة خمس سلالات وفى مصر نجد أشهرها Type 4 وعن طريق اختبار PCR يتم التمكن من معرفة أى سلالة فيروسية أو نمط من هذه السلالات الخمسة هو الذى أُصيب به المريض.

وللعلم فإنه عند عدم معرفة السلالة الفيروسية وتحديدها بدقة وإعطاء العلاج المناسب؛ نجد أنه لا يصلح ولا يؤثر فى الفيروس أى علاج آخر وسيظل المريض يعانى من شدة الآلام وفتك الفيروس به لدرجة تصل لوفاة الكثيرين متأثرين بذلك لذا فبمعرفتنا والتشخيص الدقيق للسلالة المصاب بها المريض عن طريق اختبار PCR فإنه يؤدى لإعطاء علاج مناسب يقضى على المرض فوراً بإذن الله.

لم تنته بعد المجالات التى يستخدم فيها تفاعل (PCR). فهناك المزيد مثل استخدامه لمقارنة الدنا الوراثى للحيوانات وفى مجال التصنيف النباتى وغيرها...

مع كل ما سبق وعن قصة ابتكار تفاعل الـ PCR وفكرة عمله وعمل المجس المناسب وكيفية إجراء هذا التفاعل وتطبيقات متنوعة لاستخدام هذا التفاعل والبصمة الوراثية... مع كل ذلك سنقضى وقتنا فى هذه الجولة فمعنا ... عزيزنا القارئ

أولاً: المقصود باختبار الـ "PCR":

الـ PCR هى اختصار الجملة "Polymerase chain reaction" وهى تعنى: التفاعل المتسلسل للبوليميريز.. أو تفاعل البلمرة المتسلسل.. أو تفاعلات إنزيم البلمرة المتسلسل.

وتقنية (تفاعل) الـ PCR فى غاية الحساسية وتؤدى إلى إنتاج (تصنيع) الدنا معملياً، ويسمى بتفاعل البلمرة لاحتوائه أساساً على إنزيم بلمرة. ويتم فى هذه التقنية استغلال ظاهرة التكامل بين القواعد النيتروچينية على جديلتى الدنا الوراثى، ويُستفاد منها لتكبير وتطويل بادئ من جزء صغير من الدنا، ولإنتاج (أو لاستنساخ أو لإكثار) عدد هائل يبلغ الملايين ـ بل البلايين من نسخ تتابع دناوى أو چين «يهمنا، أو مطلوب» ـ خارج الجسم الحى ـ (أى دون اللجوء إلى الكلونة Clonning باستخدام خلية حية وذلك فى غضون ساعات قليلة لا تتجاوز ٣ ـ ٤ ساعات، حتى أن عشرين دورة من التسخين والتبريد أثناء التفاعل تنتج أكثر من مليون نسخة من الچين.

وفى حالة إكثار التتابع الدناوى (المطلوب) فإن تفاعل الـ PCR يمكنه ذلك من عينات غاية فى الضآلة من چينوم أى كائن حى.

ثانياً: قصة هذا الابتكار:

فى إبريل من عام ١٩٨٣م كان كارى ماليس "Kary Mallis" فى نزهة فى ليلة قمرية فى كاليفورنيا وتساءل : لماذا لا يتم تصنيع الحامض النووى DNA فى المعمل مثل باقى المركبات والجزيئات البيوكيميائية، وفى هذه الليلة تخيل تفاعل البلمرة

المتسلسل (PCR)، وفى اليوم التالى قام بتغيير منهج البيولوچيا الجزيئية الذى يقوم بتدريسه.

وفكرة تضاعف الـ DNA فى المعمل باستخدام PCR سهلة ولكنها متداخلة وغير عادية، وفى عام ١٩٨٥م [وهناك مراجع تذكر أنه عام ١٩٨٦م]، تم نشر أول بحث عن هذا التفاعل على يد كارى ماليس (أو ماليست) وآخرين "Malliset'al," [فى شركة تسيتوس بيركلى ـ كاليفورنيا]. ومن بعدها والبحوث فى زيادة مستمرة، وفى عام ١٩٨٩م اختارت مجلة ساينس "Science" تفاعل الـ PCR كأكبر حدث علمى واختارت «إنزيم Taq Polymerase" كجزىء العام، وفى عام ١٩٩٣م حصل {Karry} على جائزة نوبل فى الكيمياء تقديراً لأهمية هذا الاكتشاف فى خدمة البشرية. ومن خلال تعليق بعضهم على هذا الحدث.. فلقد ورد على لسانه:

"It is diffcult to think of life without it" وعموماً فإن تفاعل الـ PCR هو طريقة معملية لتكبير (تضاعف ـ إكثار) جزىء معين من الحامض النووى DNA دون اللجوء إلى استخدام البكتيريا كما فى إكثار الچين سابقاً.

ثالثاً: فكرة عمله (فى حالة الشك بالإصابة بأمراض مُعدية):

نجد أن الباحث بعد تمكنه من أخذ عينة من المريض فى بداية المرض ـ [ويكفى أن تكون هذه العينة نقطة دم على سن إبرة أو مسحة لعاب]. وبدخول هذه العينة للجهاز الخاص باختبار PCR وبضغطة زر يتم الكشف عن أى كمية من الفيروس حتى إذا كانت كمية الميكروب غاية فى الضآلة. وللعلم فلم يكن بالإمكان من قبل مهما تم الاستعانة باختبارات سابقة أن يتم الكشف عن الفيروس أو البكتيريا الممرضة أو الطفيل المتسبب فى المرض ومن عينة ضئيلة للغاية ومن خلال الاختبار يتم مضاعفة المادة الوراثية للميكروب حتى يصل إلى ٣٠ جيل من المادة الوراثية خلال ٣ ساعات مما يسهل من عملية التعرف بسهولة، ويتم إجراء عملية تكبير ونسخ لهذا التسلسل للمادة الوراثية. ويتم تفريق شريطى الدنا الوراثى فى منطقة الچين ثم تعريضها للمسبار.

رابعاً۔ أهمية عمل المسبار أو المجس الوراثى المناسب [للكشف عن الميكروب فى تفاعل الـ PCR]:

يمكن للباحثين من خلال معرفتهم للتركيب الجينى للميكروب أن يصنعوا «مجسات» وهى تحتوى على جزيئات غير كاملة من الحمض النووى للميكروب المطلوب البحث عنه وتشخيصه سواء أكانت مادة الميكروب الوراثية من الرنا الوراثى أو الدنا الوراثى.. ثم يتم تعريض هذا المسبار (المجس) للدنا الوراثى الموجود بالعينة.. وإذا تلامس هذا المجس مع شريط الدنا المفرد الموجود بالعينة المراد فحصها [ولو كانت تحتوى على الميكروب مثل فيروس مُعْدٍ] ـ فإن الحامض النووى للفيروس الموجود بعينة المريض سوف يتكامل مع جزيئات [القواعد الآزوتية] للحامض النووى للمجس ـ [بعد أن تم تكبيره كما سنعرف عما قليل] ـ فإننا نجد أن طرفى الشريط الوراثى يتكاملان ويتعلق الشريط كالسوستة وهو دليل على وجود الميكروب المعنى، ويمكن وسمه بمادة مشعة أو مضيئة.

ويتم الكشف عن الترابط بين القواعد الآزوتية للمسبر والقواعد الآزوتية من خلال التصوير الإشعاعى والذى يُظهر هذه الترابطات فى صورة فقط غامقة. وبالتالى كان هذا دليلاً على أن الشخص مصاب بالميكروب.

خامساً: عمل مجسات وراثية للكشف عن الأمراض الوراثية:

تطور الأمر كثيراً بعد عمل مجس وراثى للكشف عن مرض هنتنجتون لتتزايد المجسات الدناوية للكشف عن أمراض وراثية أخرى بعد أن عرفت مواقع جيناتها على الكروموسومات، وعرفت تتابعاتها؛ من بينها مرض التليف الكيسى، ومتلازمة ليش نيهان، ومرض تاى ساكس، ومتلازمة س الهش. ونتوقع أن يستمر العمل لمعرفة وظيفة كل جين ، والجدير بالذكر أن عدد الجينات يبلغ حوالى ٢٢ ألف جين فقط يحمل جنس الإنسان منها ما يقرب من سبعة آلاف جين؛ أى ثلث جيناتنا يمكن أن يسبب أمراضًا وراثية!! أصبح من الممكن الآن للمرأة التى تشك فى احتمال أن يكون الجنين الذى تحمله مصاباً بهذا المرض الوراثى أو ذاك؛ فى أن تختبر دنا الجنين بالمجس الملائم فتعرف . والمجس الدناوى لا يتطلب إلا قدراً ضئيلاً للغاية من دنا

الجنين. وهناك الآن تقنية تؤخذ فيها خميلة واحدة من الخمائل المشيمية ـ بروز واحد من البروزات الإصبعية الشكل الناتئة من الأنسجة الجنينية التى تتخلل رحم الأم وتكون المشيمة ـ وذلك بعملية يمكن أن تتم فى عشر دقائق لا أكثر دون تخدير. والجنين عمره لا يتجاوز الأسبوع. توفر مثل هذه الخميلة من دنا الجنين ما يكفى لاستخدام المجسات الوراثية لكشف ما قد يوجد به من چينات معيبة. ومعنى هذا أنه قد أصبح فى مقدور المرأة أن تعرف فى المراحل الأولى من الحمل إن كان الجنين مصاباً بالمرض الوراثى الذى تخشاه أم لا.

سادساً: فكرة تقنية الـ PCR [الطريقة التى تعمل بها]:

تعتمد على حقيقة أننا إذا سخّنّا محلولاً من الدنا، انفصلت جديلتا اللولب المزدوج إذ لا يربطهما سوى روابط هيدروچينية بين القواعد المكملة على السلسلتين، [إنما يمكننا من استغلال الجدائل المفردة التى تنتج عند تسخين الدنا المزدوج الجديلة كقوالب لتمثيل جدائل جديدة] وإذا ما بُرِّد المحلول شكل الدنا ثانية لوالب مزدوجة والتابعات المكملة تجد بعضها بطريقة غاية فى الدقة. مع العلم بأن كل ذلك يتم فى وجود إنزيم بوليميريز مناسب.

ويتطلب إجراء التفاعل أن يتم توفير ظروف مماثلة تماماً لعملية نسخ وتضاعف الـ DNA داخل الخلية فيجب إضافة مكونات التفاعل الأساسية وهى:

(أ) عينة من الدنا:

حيث يبدأ تفاعل البوليميريز المتسلسل بعينة من الدنا، من أى طول، نعرف أنها تحمل فى مكان ما الجزء الوراثى الهدف (المطلوب).

(ب) طليعتان Primers (المسبران):

لو كان الهدف من التفاعل هو لإكثار الچين فيتطلب الأمر تصنيع جديلتين قصيرتين من الدنا ويتراوح طول هذين التابعين القصيرين ما بين عشر وثلاثين نيوكليوتيدة، وكل واحدة من هاتين الطليعتين تكمل تتابعاً نعرف أنه موجود على إحدى السلسلتين، فى مكان ما على يسار المقطع الهدف، والأخرى تكمل تتابعاً على

السلسلة الأخرى إلى اليمين. (بمعنى أن الطليعتين يحدان الچين أو التتابع المطلوب تكثيره من الجانبين). ويوضع هذان المسبران (الطليعتان)، واللذان يُطلق على أى منهما اسم الطليعة Primer – فى محلول مناسب ومعهما عينة الدنا، ويجرى تحضير أعداد وفيرة منها .. (من الطليعتين) ـ بجهاز مخلق الدنا DNA synthesizer، أما فى حالة تكبير الدنا فيستخدم بادئ (شريط مفرد من الـ DNA) معروف تتابع قواعده ولا يزيد طوله عن ٢٠ نيوكليوتيدة بدلاً من الطليعتين.

٣ـ قدر وافر (كبير) من النيوكليوتيدات (DNTD).

٤ـ إنزيم بلمرة دنا (بوليميريز دنا DNA Polymerase):

حيث يقوم بتحفيز عملية نسخ الدنا، بأن يقوم بتجميع النيوتيدات على قالب template الدنا، ويلزم أن يكون مقاوماً للحرارة (يتحمل الحرارة)، لذا يُفضل استخدام إنزيم بوليميريزتاك "taq" Polymerase المأخوذ من بكتيريا ثرموس أكواتيكس Thermus aquaticus وهى بكتيريا مائية محبة للحرارة، وحتى يقوم هذا الإنزيم بدوره فى إضافة القواعد النيتروچينية وربطها معاً حتى يتكون الخيط المكمل، فإن هذه العملية تتم عند درجة حرارة ٧٢°م وهى الدرجة المثلى للحصول على أعلى كفاءة لإنزيم البوليميريز وتُعرف بدرجة حرارة التمديد "extension temperature" وهى لا خلاف عليها ولكن الاختلاف هو فى زمن فترة التمديد، حيث يستطيع هذا الإنزيم إضافة ٦٠ قاعدة فى الثانية عند درجة ٧٢° م وبالتالى فعند استخدام تفاعل PCR فى عملية تكبير أجزاء الدنا الوراثى يلزم معرفة أو توقع نواتج التكبير إذا كانت ذات حجم كبير (1.2kb) فإن الزمن المثالى هو ٤٠ ثانية، وإذا كانت أقل من (500bp) فإن ٢٠ ثانية هو وقت كاف.

٥ـ محلول مناسب:

[وهو محلول منظم مناسب لعمل الإنزيم «lox buffer» ويبدأ فيه التفاعل ليحوى الدنا الذى يحمل الچين المراد تكثيره، وبه وفرة من الطليعتين ومن القواعد النيتروچينية الأربعة [أ، ث، س، ج]، وإنزيم Taq polymerase 1، وتتوفر به درجة الحامضية والقاعدية المناسبتان لعمل الإنزيم.

٦ـ توفير درجات الحرارة المناسبة وجهاز "PCR":

ويتم توفيرها من خلال تحضين أنابيب التفاعل فى جهاز "PCR". وهو جهاز يشبه إلى حد كبير الحمام المائى حيث يقوم برفع درجة الحرارة حتى ١٠٠ْم فى وقت قصير ثم يستطيع التبريد وخفض درجة الحرارة حتى صفر درجة مئوية وذلك حسب البرنامج المخزن مسبقاً فى الجهاز.

ويتأثر تفاعل البلمرة المتسلسل بعدة عوامل منها [نذكر منها خمسة عوامل] وهى:

١ـ نوع الجهاز {PCR}:

فالنوع الجيد من أجهزة الـ PCR يجب أن تتميز بسرعة الوصول إلى درجة الحرارة المطلوبة فى أقل وقت ممكن بمعنى عندما تكون درجة حرارة الجهاز ٩٢ْم "denaturing"، والخطوة التالية هى "annealing" {٣٥ْم} فإن هبوط درجة الحرارة من ٩٢ْم وحتى ٣٥ْم يجب أن يتم بأسرع ما يمكن والعكس وتعرف هذه الخاصة {ramp}، ويجب تزويد الجهاز بغطاء متصل بالحامل الذى تحضن فيها أنابيب التفاعل block أو بديل وهو نقطة من زيت معدنى "minearal oil".

٢ـ درجة حرارة التفكيك أو التكسير denaturing temperature:

فلأنه من المهم أن يتحول خيط الـ DNA المزدوج إلى خيوط مفردة وذلك بتكسير الروابط الهيدروچينية ويحدث ذلك عند درجة ٩٢ْم وهى التى تعرف بدرجة حرارة التفكيك denaturing temperature، وهناك من الباحثين من يفضل تحضين الـ DNA {Template DNA} على درجة ٩٥ْم لمدة عدة دقائق للتأكد من أن كل الخيوط قد تحولت إلى خيوط مفردة.

٣ـ تعرف البادئ على التتابع المكمل له على خيط الـ DNA المفرد {Primer annealing}:

فعند خفض درجة الحرارة إلى ٣٥ْم {annealing temperture} فإن البادئ يتعرف على التتابع المكمل لتتابع نيوكليوتيداته على أشرطة الـ DNA المفردة ويرتبط بها {تتكون الروابط الهيدروچينية مرة أخرى} وإذا خفضت درجة الحرارة أكثر من

٣٠ْم ففى هذه الحالة يحدث ارتبـاط بين البادئ وأى جزء من خيط الـ DNA المفـرد والذى ليس بالضرورة أن يكون مكملاً لتتـابع البادئ بنسبة ١٠٠٪. ومن المعـلوم أن اختيار درجة حرارة {annealing temp} يعتمد على نوع البادئ والغرض من تفاعل البلمرة.

٤ـ تطويل البادئ Primer extension:

وهى هامـة فى حالة اسـتخـدام التفـاعل فى تكبيـر أجزاء من الحـامض النوَوى (RAPD)، فبعد أن يرتبط البـادئ بالتتابع المكمل له على شريط الـ DNA المفـرد فإن هذه المنطقة تُعرف بمنشأ التضاعف "Origin of replication" ويبـرز هنا دور إنزيم البوليمـيريز الذى يقوم بإضافـة القواعد النيتـروجينية وربطها معاً حـتى يتكون الخيط المكمل ونكون فى النهاية قـد أتممنا تصنيع خيط مزدوج وتتم هذه العمـلية عند درجة حـرارة هى ٧٢ْم وهى الدرجة المثلـى للحصـول على أعلى كـفاءة للإنزيم. وتعـرف بدرجة حرارة التمديد "extension temperature".

٥ـ تركيز إنزيم البوليميريز، والقواعد والبادئ وحامض الـ DNA الهدف:

ملخص طريقة العمل:

يتم تسخين المحلول أولاً إلى درجة ٩٥ْم ويبقى هكذا لمدة دقـيقتين ثم يتم تبريده إلى ٣٠ْم ويضاف إنزيم البلمرة. وبعد دقيقـتين تكرر دورة التسخين والتبريد. فى كل مـرة يُسَخَّن المحلول تـتفسخ اللوالب المـزدوجة (تنفـصل جديلتـا الدنا)، فإذا مـا برد بردت ـ عندئذ يلتصق مسبرا الدنا (الطليعتـان) بجدائلهما المكملة، يبدأ إنزيم البلمرة فى العمل (بعـد التبـريد) فيقـوم بنسخ منطقة الدنا بين المسـبرين (الطليـعتين) وفيـها المقطع الهدف، وتعمل كل من جديلتى الدنا حديثى التخليق بعد ذلك كقالب لجديلة أخرى، وعند التسخين والتبريد مـرة ثانية يتفسخ كل شىء مرة أخرى ـ لكن المحلول عند التبـريد هذه المرة سيـحـمل ضعـف عدد النـسخ من الدنا ذى المسـابر، وبذلك يتضـاعف عدد الجدائل مع كل دورة. وبعـد عشرين دورة مثلاً سيـكون مقطع الدنا الذى يحمل الهدف قد تضاعف مليون مرة.

ولقـد اعـتبـر تفـاعل PCR المتـسلسل هو أكـثر التـقنيـات الجـديدة ثورية فى

البيولوجيا الجزيئية فى عقد الثمانينات لما يتميز به كإجراء مباشر وسريع للكلونة دون خلايا.

ولقد قامت شركة سيتوس بتسجيل براءة العملية، ثم باعت البراءة فى صيف ١٩٩١م إلى شركة هوفمان ـ لاروس بمبلغ ٣٠٠ مليون دولار.

استخدامات متعددة للـ PCR

١ـ يستخدم فى الكشف عن وجود تتابع محدد فى عينة دنا.

٢ـ فى التكبير العشوائى للحامض النووى - Rondomly Amplified play morphic DNA (RAPD)؛

حيث يعتبر التكبير العشوائى لأجزاء من الحامض النووى DNA وهو يعرف بـ RAPD أحد أهم التطبيقات المباشرة لتفاعل البلمرة.

وعن كيفية حدوث عملية التكبير العشوائى فإننا نجد أن الباحث يتبع الآتى:

(أ) يتم مراعاة توفير ظروف مماثلة تقريباً لنفس ظروف عملية نسخ وتضاعف DNA والسابق عرضها منذ قليل من إنزيم بوليميريز، ووفرة من القواعد النيتروجينية، ... إلخ إلا أننا نضع مع هذه المكونات بادئ (شريط مفرد من الـ DNA معروف تتابع قواعده وقصير لا يزيد طوله عن ٢٠ نيوتيدة) «ولا نضع الطليعتين السابق الحديث عنهما فى تفاعل PCR ويراعى فى هذا الإجراء ما يلى:

من المهم جداً أن يتحول خيط الـ DNA المزدوج إلى خيوط مفردة وذلك بتكسير الروابط الهيدروجينية وهو يحدث عند ٩٢ْم وتعرف بدرجة حرارة التفكيك، والتحول غير الكامل لشريط الـ DNA إلى خيوط مفردة سوف يترتب عليه وجود عدد من الأشرطة غير المفردة وبالتالى لا يستطيع البادئ التعرف عليه والارتباط فى الخطوة التالية (annealing) وبالتالى فإن ناتج تفاعل البلمرة سيكون قليلاً وغير حقيقى ولذلك فإن معظم الباحثين يفضلون تحضين الـ DNA المراد تكبيره على درجة ٩٥ْم لمدة عدة دقائق للتأكد من أن كل الخيوط قد تحولت إلى خيوط مفردة.

(ب) تعرف البادئ على التتابع المكمل له على خيط الـ DNA المفرد:

فعنـد خفض درجة الحـرارة إلى ٣٥م (annealing temperature) فإن الـبادئ يتعرف على التتابع المكمل لتتابع النوتيدات على أشرطة الـ DNA المفردة ويرتبط بها (تتكون الروابط النيتروچينية مرة أخرى).

(جـ) تطويل البادئ Primer extension:

بعد أن يرتبط البـادئ بالتتابع المكـمل له على شريط الـ DNA المفـرد فـإن هذه المنطقـة تُعـرف بمنشأ الـتضـاعف Origin of replication، ويـأتـى دور إنـزيم taq polymerase الذى يقوم بإضافة القواعد النيتـروچينية وربطها معاً حتى يتكون الخيط المكمل وبذلك يكون قـد تم تخليق خيط مـزدوج وتتم هذه العمليـة عند درجة ٧٢م وتُعرف بدرجـة حرارة التمديد وهى لا خـلاف عليها ولكن الاختـلاف دائماً هو فى زمن فتـرة التمديد فمن المعـروف أن إنزيم البوليميـريز يستطيع إضافة ٦٠ قـاعدة فى الثانية عند درجة ٧٢م ، وبـالتالى فمن المهم معرفة أو توقع نواتج التكبـير فإذا كانت ذات حجم كبير (1.2kb) فإن الزمن المثالى هو ٤٠ ثانية وإذا كانت أقل من (500bp) فإن ٢٠ ثانية هو وقت كاف.

وفى حالة استبـدال البّوادئ المتخـصصة والمـكملة لتتابع مـعين (محـدد) ببادئ عشوائى (عـبارة عن عشرة أو عشـرين نيوكليوتيدة). سوف يرتبط البـادئ العشوائى بشريط الحامض النووى المفرد إذا تصادف وجود تتابع مكمل له على شريط الحامض النووى، وحـيث إن البادئ العـشوائى قـصـير وشـريط الحامض النووى طويل جـداً واحـتمالية تواجـد عشرة نيـوكليوتيـدات على شريط الحامض النووى المـفرد مكملة لتـابع نيوكليوتيدات الـبادئ عالية فـإن إمكانية ارتباط البـادئ العشوائى أيضاً عـالية وبالتالى إمكانية تكبـير مقاطع معـينة من الحامض النووى باستخدام بوادئ عـشوائية قائمة وهذا بالضبط ما يحدث فى تفاعل التكبير العشوائى "RAPD".

وفى عـام ١٩٩٥م تمكن «وليم وآخرون» من اسـتـخدام بادئ عـشوائى قـصيـر يحتوى علـى القواعد"G-C" بنسبـة ما بين ٥٠ ـ ٨٠٪ من تكبير مـقاطع من جزىء الحامض النووى DNA وذلك باستخدام درجة تمديد "annealing" منخفضـة نسبياً وبتـحليل نواتج التكبـير الـعشـوائى باسـتخـدام طريقـة التفـريد الكهـربى RAPD}

Profiles} لعينات حامض نووى من مصادر مختلفة، وجدوا أن هذا الأسلوب مفيد فى الكشف عن الاختلافات الوراثية.

٢ـ استخدام الـ PCR فى إكثار قطعة محددة من الچين:

مثال توضيحى يبين كيفية استخدام تفاعل الـ PCR فى إكثار (قطعة محددة لچين):

١ـ يراعى توفير كافة الظروف المناسبة لإجراء التفاعل والسابق عرضها مع العلم بأننا لا نستخدم بادئًا ولكن طليعتين يجرى تحضير أعداد وفيرة منهما بجهاز مخلق الدنا DNA synthesizer.

٢ـ سنفرض أن الچين الذى نود (إكثاره أو إنتاج كميات منه أو استنساخه) يحده على جانبيه (الطليعتان) الموضحتان كما سيلى، (وسنعتبر أن البادئ مكوَّن من ٣ قواعد فقط):

الجديلة (١)	٥َ.... ــــ	ث ث س ــــ	ج ج أ ــــ ... ٣َ
من اللولب المزدوج	بقية مقطع الدنا الذى نريد التخلص منها للحصول على الچين وحده	جديلتا الچين المطلوب تكثيره	بقية مقطع الدنا التى نريد التخلص منها للحصول على الچين وحده
الجديلة (٢)	٣َ .... ــــ	أ أ ج ــــ	س س ث ــــ ..... ٥َ

الطليعة (١) على الجديلة (١) من اللولب المزدوج هى ٥َ ـ ث ث س ـ ٣َ (وقد كتبت ببنط أسود) والطليعة (٢) على الجديلة (٢) هو ٣َ ـ س س ث ـ ٥َ.

٣ـ بتسخين المحلول لدرجة ٩٥ْم [كما سبق وذكرنا أو لدرجة ٩٤ْم كما ذكرت بعض المراجع الأخرى].

٤ـ يبرد المحلول بعد ٥ دقائق إلى ٣٠ ـ ٧٢ْم فتلتحم الطليعتان كل بالتتابع المكمل، وتشرع كلٌ بدءاً من تتابعها فى بناء جديلة مكملة للقديمة التى التصقت بها.

الجديلة (١) القديمة ٥َ ... ــــ ث ث س ــــ ج ج أ ــــ ... ٣َ

الجديلة (١ ـ أ) ٣َ... ــــ أ أ ج ــــ س س ث ٥َ لولب مزدوج ناشئ عن الجديلة(١)

الجديلة (٢) القديمة ٣َ ... ـــ أ أ ج ـــ س س ث ـــ ... ٥َ

الجـديلة (٢ـ أ) الجـديدة ... ٥َ ث ث س ـــ ج ج أ ـــ ... ٣ لولب مـزدوج ناشئ عن الجديلة.

ملحوظة:

من خلال تتبعك عزيزى القارئ للخطـوة السابقة ستجد أن الجديلة الجديدة (١ـ أ) تبـدأ بالطليعـة [٣َ س س ث ـ ٥] وأنهـا لا تحمل كل مـا كـان من قواعـد بالجهـة اليسرى (وهو يحـدث بشكل طبيعى دون تدخُّل من الباحث أى أن النيـوكليوتيدات التى بهـا القواعـد النيتـروچينية جـهة اليسار لـم تتكون). وبنفس الشكل مع الـفرق حدث مع الجديلـة (٢ ـ أ) فالجديلة الجديدة (٢ ـ أ) تبدأ بالـطليعة ٥َ ـ ث ث س ـ ٣َ (ولا شىء إلى يمينهـا) وتمتـد حـتى نهـاية المقطـع المكمل إلى اليسـار، عند تسـخين المحلول مرة ثانية لدرجـة الحرارة المثلى ينفصل اللولبان المزدوجان كلٌ إلى جـديلتيه، وسنهـتم هنا فقـط بالجديلة (١ ـ أ)، الجـديلة (٢ ـ أ)، وعندمـا يبرد المحلول تلتـحم الطليعتان كلٌ بالتتابع المكمل:

الجـــديلة (١ ـ أ) ٣َ .. ـــــ أ أ ج ـــ س س ث ٥َ لولـب مـزدوج نـاشئ من الجديلة (١ ـ أ)

الجديلة (١ـ ب) ٥َ ث ث س ـــ ج ج أ ٣َ

الجديلة (٢ ـ أ) ٥َ ث ث س ـــ ج ج أ ٣َ

الجديلة (٢ ـ ب) ٣َ أ أ ح ـــ س س ث ٥َ لولـب مـزدوج ناشئ عن الجديلة (٢ ـ ث)

ولعلك تلاحظ عزيزى القارئ أن الجديلة (١ ـ ب) لا تحمل من الجديلة الأصلية (١) إلا منطقة الچين ومعها الطليعة (١) والقواعد المكملة للطليعة (٢)، وأن الجديلة (٢ ـ ب) لا تحـمل أيضاً من الجـديلة (٢) الأصليـة إلا منطقـة الچين والطليعـة (٢) والقواعـد المكملة للطليعة (١) بتكرار التسخين والتبريد يتضاعف تكرار (١ـ ب)، (٢ ـ ب) أُسيـا exponentially عشرين دورة كهذه لتنتج أكـثر من مليون نسخة من الچين فى المحلول [اللولب المزدوج المكون من الجديلتين (١ ـ ب) و (٢ ـ ب) هو الچين].

وتلاحظ عزيزى القارئ أن هذه التقنية وكأنها تبحث عن منطقة الچين أو التتابع المطلوب بنفسها؛ ثم تنتج منه الأعداد الكثيرة التى ذكرناها، ولا يحتاج الأمر من الباحث سوى أن يفصله عن بقية الچينوم فى آخر التفاعل، بمعنى أننا نستطيع أن نستخدم الچينوم الكامل للكائن الحى، ثم نترك للتقنية أمر اقتناص الچين ونَسْخه ملايين المرات دون تدخُّل منا!!. يكفى فقط أن تعرف ترتيب القواعد فى الطليعتين اللتين يحدان الچين المطلوب.

التنقية:

يتبقى فى المزيج (المحلول) بجانب الچينات التى تم إنتاجها، كمية من القواعد النيتروچينية ونُسخ من الطليعتين والبوليميريز وأطوال أخرى من الدنا غير مطلوبة، ولذا نستخلص الچينات المطلوبة فقط ويتم ذلك عن طريق (التفريد الكهربى بالچيل) الذى يفصل الچين عن كل الشوائب، حيث يتخذ موقعاً معيناً فى صورة شريط على الچيل، يمكن أن يُقطع، وقد يكرر التفريد مرة أخرى لضمان النقاء.