



قسم النبات و الميكروبيولوجي  
كلية العلوم بأسسوط  
جامعة الأزهر

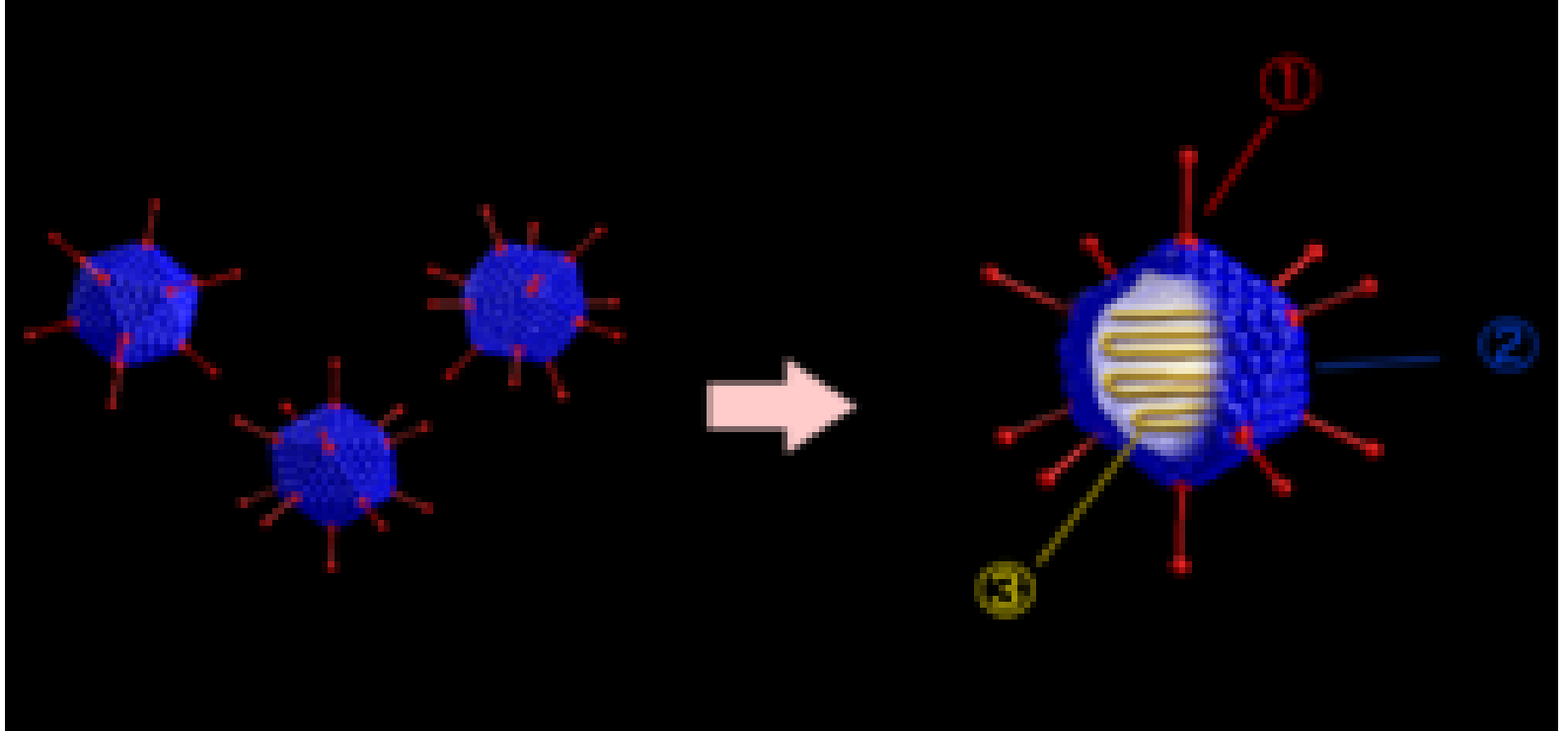
# مقدمة في علم الفيروسات

د. أحمد محمد العادلي

استاذ الفيروسات المساعد بقسم  
النبات و الميكروبيولوجي - كلية  
العلوم بأسسوط - جامعة الأزهر

ڦيرو س الاڊينو

# Adenovirus



تركيب الفيروس الادي نو . ١ = قاعدة البينتون ٢ = الهكسون  
كابسومير ، و ٣ = الجينوم الفيروسي (linear dsDNA)

## تركيب فيروس الادينو

- يتركب الادينوفيروس من ٢٤٠ كابسوميرة تأخذ الشكل السداسي (Hexamer) و ١٢ كابسوميرة خماسية الشكل (Pentamer) و ١٢ ليفة Fibers (شوكة Spike) تخرج من اركان Vertices الايكوزاهيرون
- توضع الخماسيات (خارجاً منها الالياف) على الاركان ، بينما تقع السداسيات على اوجه الايكوزاهيرون العشرين .
- توجد انواع مصلية مختلفة من الادينو فيروس
- يسبب اصابة الجهاز التنفسي والجهاز المعوي

# Viral Hepatitis

## التهاب الكبد الوبائي

# الكبد

- هو أكبر عضو في جسم الإنسان ، حيث يبلغ وزنها كيلو ونصف الكيلو وتقع الكبد في أعلى الجهة اليمنى من البطن ، ويحميها الجزء السفلي من القفص الصدري .
- وتقوم الكبد بما لا يقل عن خمسة آلاف وظيفة مهمة لاستمرار الحياة حيث تقوم بإنتاج اللبنة الأساسية اللازمة لبناء الجسم وكذلك تخلصه من المواد الكيميائية السامة الناتجة عن الاحتراق.
- تقوم الكبد بإنتاج العصارة الصفراوية ونقلها إلى الأمعاء عن طريق القنوات المرارية المنتشرة فيها.
- كما تنتج الكبد العديد من البروتينات ، و الهرمونات والأنزيمات التي تؤدي إلى انتظام عمل جسم الإنسان.
- وكذلك المواد الضرورية لتجلط الدم .

- بالإضافة إلى مسئوليتها عن تمثيل الكوليستيرول .
- وانتظام نسبة السكر في الدم.
- التعامل مع الغالبية العظمى من الأدوية التي يتناولها الإنسان و ذلك لتخلصيه من هذه المواد الكيميائية بعد الإستفادة منها
- وعند مرض الكبد فإنه ينتج عن ذلك مضاعفات خطيرة ،وتعد التهابات الكبد الفيروسية من أهم أمراض التي تصيب كبد الإنسان .
- و يصيب الفيروس الكبدي خلية الكبد عندها لا تستطيع القيام بوظائفها و عليه تقوم الخلايا السليمة المتبقية بعمل الجزء الأكبر من الوظائف المطلوبة ولذلك تتأثر سلباً جميع وظائف الجسم بعد حدوث هذا الالتهاب.

# ماذا نعني بالتهاب الكبد؟ (Hepatitis)

هناك عدة أسباب لالتهاب الكبد ،وهي ليست قاصرة على الفيروسات .فهناك الأدوية التي من الممكن أن تسبب التهابات في الكبد وكذلك الالتهابات المناعية . وتعتبر الالتهابات الفيروسية من أشهر هذه الأمراض. وعند استمرار الالتهاب إلى أكثر من ستة شهور فإننا نرمز إلى هذا النوع بأنه من الالتهابات المزمنة.Chronic Hepatitis

## ما هي أعراض التهابات الكبد ؟

الأعراض التي تنتج عن التهابات الكبد الفيروسية مختلفة ومتغيرة وهذا يعتمد على كون هذه الالتهابات الفيروسية إما حادة أو مزمنة.

إن العدد الأكبر من الالتهابات الحادة تكون عادة بسيطة لدرجة أن المريض لا يشعر بها ولا تظهر عليه علامات مميزة ،وفي بعض الحالات تكون الأعراض مشابهة تماماً لأمراض البرد والأنفلونزا و التي تستمر من عدة أيام إلى أسابيع.



# Hepatitis Viruses

- التهاب الكبد الوبائي A ، و يسببه الفيروس (HAV)
- التهاب الكبد الوبائي B ، و يسببه الفيروس (HBV)
- التهاب الكبد الوبائي C ، و يسببه الفيروس (HCV)
- التهاب الكبد الوبائي D ، و يسببه الفيروس (HDV)
- التهاب الكبد الوبائي E ، و يسببه الفيروس (HEV)
- التهاب الكبد الوبائي G ، و يسببه الفيروس (HGV)

# التهاب الكبد الوبائي أ Hepatitis A

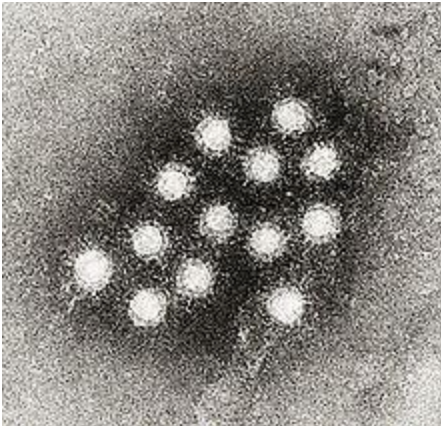
ويصيب هذا الفيروس الكبد ويسبب التهابا حاداً و لكن لا يتحول إلى التهاب مزمن مطلقاً.

لذلك فإن الأشخاص المصابين من الممكن أن يشعروا بأعراض التهاب الكبد الحادة لبضعة أيام أو أسابيع و لكن عند شفائهم فإن المريض يشفى تماماً ولا تبقى أية أعراض جانبية أو إصابة مزمنة في الكبد . علماً بأنه في حالات نادرة تتدهور حالة المريض أثناء شدة الالتهاب لدرجة أنها تؤدي إلى الوفاة (أو أن يكون المريض بحاجة إلى زراعة كبد على وجه السرعة).

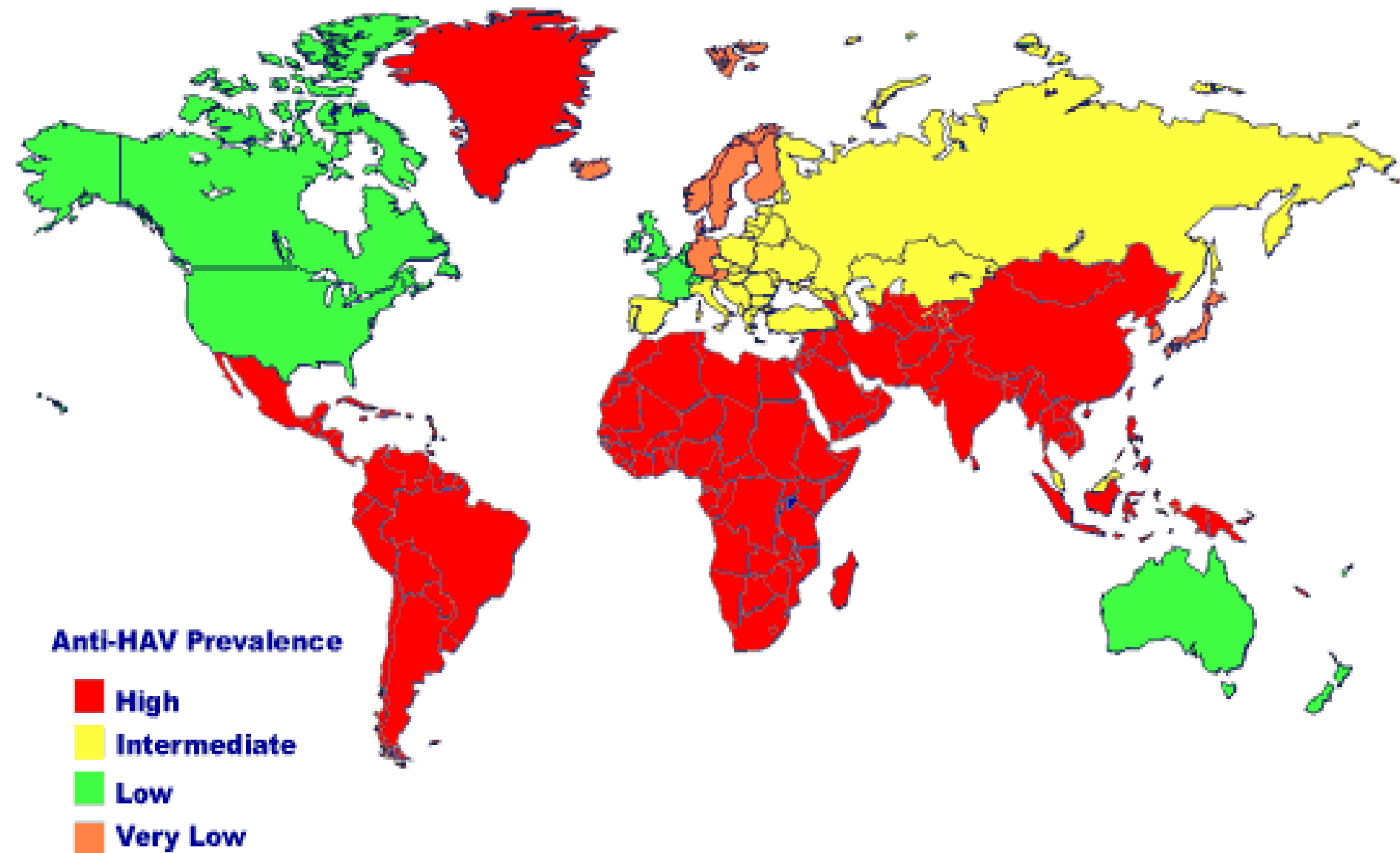
أنتج طعم خاص بهذا الفيروس في سنة ١٩٩٥ وينصح المسافرين إلى المناطق الموبوءة بهذا الفيروس باستخدامه كذلك من الممكن في المستقبل أن يصبح أحد التطعيمات الضرورية للأطفال.

# التهاب الكبد الوبائي أ Hepatitis A

- فيروس التهاب الكبد أ ينتمي لعائلة الفيروسات البيكورناوية أو (حمى بيكورنوية)؛ وليس لهذا الفيروس غلاف، ويحتوي الفيروس على سلسلة منفردة من المادة الجينية رنا (الحمض النووي الريبي) مغلفة بقشرة بروتينية تدعى القفيصة. هناك نمط مصلي واحد فقط لهذا الفيروس، ولكن له أنماط جينية متعددة.



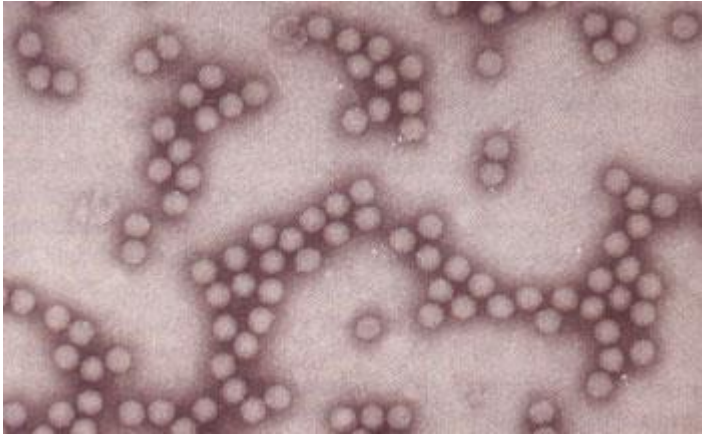
# Geographic Distribution of HAV Infection



# طرق انتشار التهاب الكبد الوبائي A :

التهاب الكبد A يعتبر هذا الفيروس من أمراض الطفولة و ينتقل من شخص إلى آخر .  
يتواجد الفيروس بصورة مكثفة في البراز لذلك عدم العناية بالنظافة بعد استعمال الحمام  
وعدم غسل الأيدي بصورة جيدة يسبب انتقال هذا الفيروس من شخص لآخر

كذلك تحضير الطعام عن طريق أشخاص مرضى يقوم بنقل الفيروس في الأطعمة المختلفة  
وعليه فمن الطبيعي انتشار هذا الوباء في حضانات الأطفال.



# التهاب الكبد الوبائي ب (Hepatitis B)

- يسبب التهاب الكبد B فيروس يطلق عليه اسم فيروس التهاب الكبد ب (HBV Virus) . وتتم العدوى بهذا الفيروس عن طريق الجنس غالباً والذي يعتبر أشيع طريق لانتشار الفيروس في أوروبا و أمريكا الشمالية ، ويصيب غالباً الأعمار ١٥ - ٢٤ سنة .
- يعد لقاح التهاب الكبد B آمناً و فعالاً ويقدم أفضل فرصة للوقاية وتخفيف احتمال الإصابة ، و يتم حالياً إعطاء هذا اللقاح بشكل روتيني في الطفولة في كثير من البلدان .

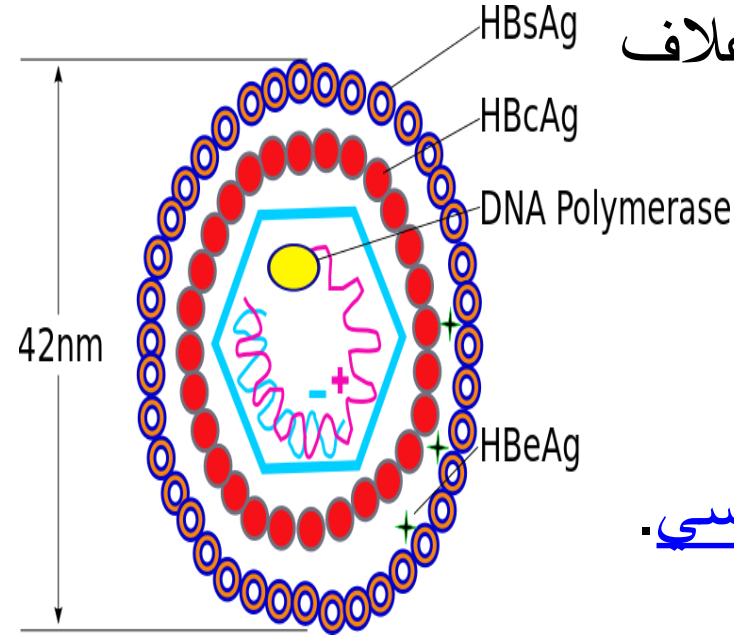
- في ٩٥% من المرضى يشفى المريض شفاءً تاماً وبدون أية مضاعفات جانبية . ويبقى الأقلية منهم ٥% حيث يستمر الالتهاب لفترة أطول من ستة أشهر ويصبح التهاباً مزمناً
- أما فيما يختص بالأطفال فإن الغالبية العظمى منهم يصبحون حاملين لهذا الفيروس بصورة مزمنة وعلى سبيل المثال فإن عند إصابة الأطفال في سنواتهم الأولى فإن ٩٠% منهم يصبحون حاملين للمرض بصورة مزمنة .
- وعلى المستوى العالمي فإن الأطفال هم الأكثر تعرضاً لهذا النوع من الالتهابات حيث أن الفيروس ينتقل عن طريق الأم.

# تركيب فيروس ب (Hepatitis B)

- يعد فيروس التهاب الكبد الوبائي عضواً في عائلة الفيروسات الكبدية. يتكون الفيروس من غلاف خارجي من الدهون وقفيفة داخلية عشرينية الوجوه تتكون من البروتين.

- ويتراوح قطره من ٣٠-٤٢ نانومتر. ويقع في داخل القفيفة، الحمض النووي (DNA) وانزيم بلمرة DNA الذي يتمتع بنشاط انزيم النسخ العكسي.

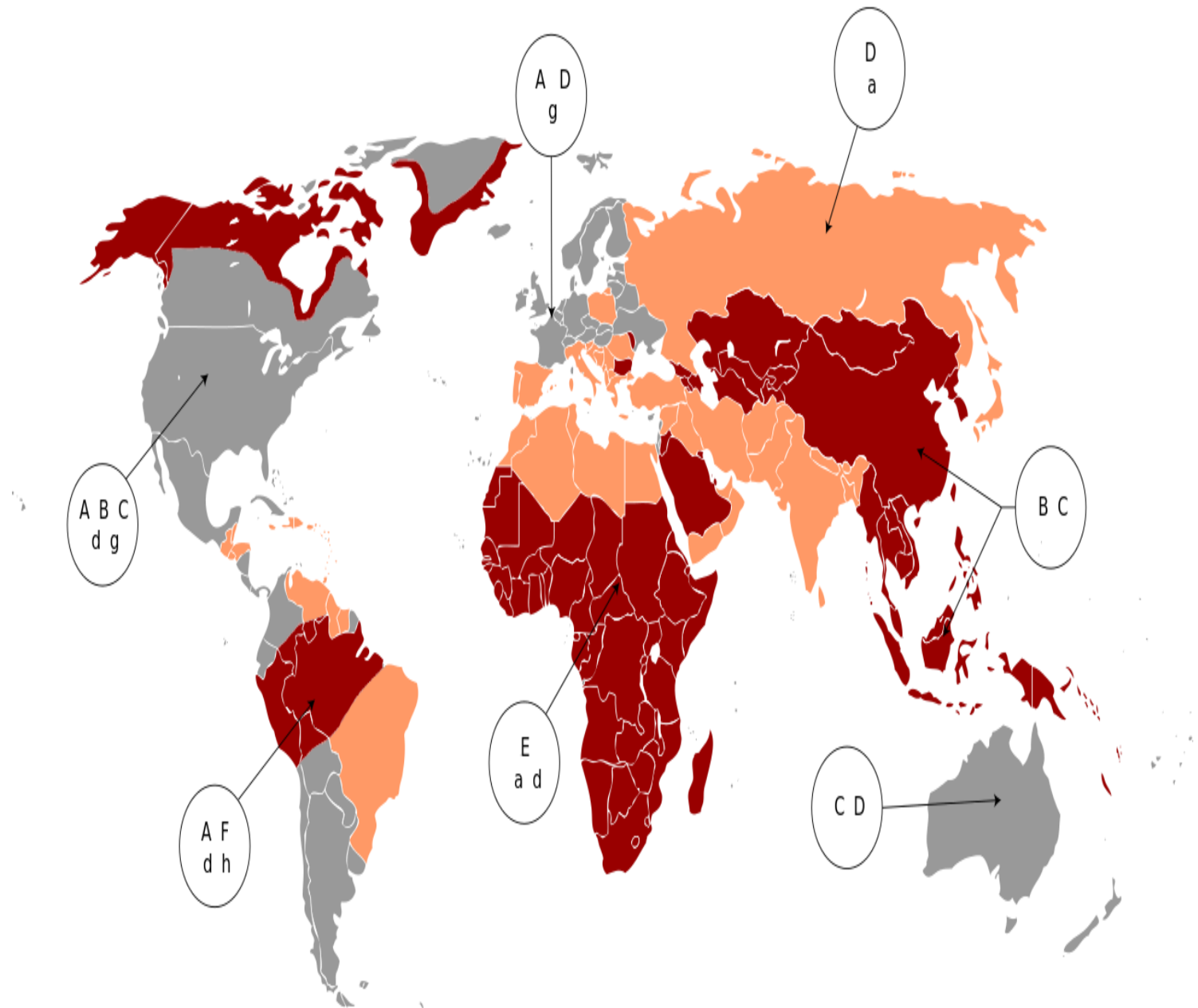
- يحتوي الغلاف الخارجي على بروتينات ممتدة بداخله والتي تساعد على ارتباط الفيروس ودخوله إلى الخلية.





# لأنماط المصلية والأنماط الجينية لفيروس بـ الوبائي

- نقسم الفيروس إلى أربعة أنواع من الأنماط المصلية استناداً إلى الجزء السطحي لمولدات ضد المرتبطة على بروتينات الغلاف.
- وإلى ثمانية طرز جينية وهي A, B, C, D, E, F, G, H. تُستخدم الطرز الجينية من أجل تتبع التطور والانتقال في هذا الفيروس. الاختلاف في الطرز الجينية يؤثر على حدة المرض، إحصائية حدوث مضاعفات، الاستجابة للعلاج وربما التطعيم.
- تختلف الطرز الجينية عن بعضها البعض بنسبة ٨% على الأقل في تسلسلها الجيني. وقد تم اكتشاف ستة منها عام ١٩٨٨، ولاحقاً تم اكتشاف النوعين الأخيرين ووصفهما. معظم الطرز الجينية حالياً تم تقسيمها إلى مجموعات أدق وأصغر بصفات محددة ومميزة.



# Hepatitis D or (د) التهاب الكبد الوبائي delta

❖ الفيروس (د) ويسمى أيضا بفيروس الدلتا Delta virus لا يستطيع استنساخ نفسه (التكاثر) إلا بوجود فيروس آخر

❖ فيروس التهاب الكبد الوبائي (د) يوجد دائماً مع التهاب الكبد الوبائي (ب) ب.Hepatitis B

❖ يوجد الفيروس (د) في المملكة العربية السعودية عند ٨% من المصابين بالتهاب الكبد الوبائي (ب) وعند أقل من ٢% من حاملي فيروس التهاب الكبد الوبائي (ب).

# طرق انتشار التهاب الكبد الوبائي د :

❖ ينتقل التهاب الكبد الوبائي (د) عن طريق نقل الدم أو منتجاته.

❖ أو بالاتصال الجنسي.

❖ العوامل المساعدة على انتقاله تشبه العوامل المساعدة على انتشار فيروس التهاب الكبد الوبائي (ب).

❖ والمدمنون على المخدرات عن طريق الحقن هم أكثر المصابين.



# التهاب الكبد الوبائي (هـ) Hepatitis E

❖ التهاب الكبد الوبائي (هـ) و يسببه الفيروس (HEV)

❖ يعتبر من الأمراض الوبائية المرتبطة بتلوث المياه.

❖ لقد تسبب الفيروس (هـ) في حدوث عدة كوارث وبائية في عدة بلدان كالهند والاتحاد السوفيتي ونيبال وبرما والجزائر) وساحل العاج ومخيمات اللاجئين في شرق السودان والصومال والمكسيك .

❖ بينت بعض الأبحاث أن هذا الفيروس تقريبا أصاب ١٠ % من سكان المملكة العربية السعودية و ٢٥ % من سكان جمهورية مصر العربية.

## طرق انتشار من التهاب الكبد الوبائي E:

❖ ينتقل هذا الفيروس إلى الإنسان عن طريق الفم بواسطة الأكل أو الشرب الملوّثين. ولأن الفيروس يخرج من جسم المصاب عن طريق البراز فعادة يكون سبب العدوى مياه الشرب الملوثة بمياه الصرف الصحي.

❖ تتراوح فترة حضانة الفيروس بين أسبوعين و ٩ أسابيع. ويعتبر الأشخاص بين ١٥-٤٠ سنة أكثر عرضة للإصابة به.

❖ النساء الحوامل أكثر المعرضين وبشكل خاص للإصابة بهذا الفيروس وتكون نسبة الوفاة لديهم أعلى بكثير، إذ ربما تصل إلى ٢٠% مقارنة بأقل من ١% عند الآخرين.

# طرق الوقاية من التهاب الكبد الوبائي E:

❖ منع تلوث مياه الشرب بمياه الصرف الصحي

❖ شرب الماء النظيف .

❖ تناول الأطعمة الغير ملوثة أو المطبوخة (الحرارة تقضي على الفيروس).

الاهتمام بالنظافة الشخصية خاصة لدى المصابين وذلك بغسل اليدين بالماء والصابون بعد استعمال الحمام.

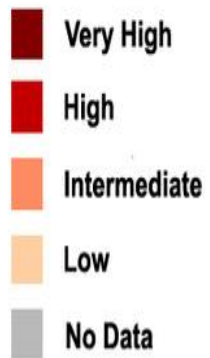
# التهاب الكبد الوبائي (ج) Hepatitis C

- التهاب الكبد الفيروسي ج (Hepatitis C) هو مرض معدٍ يؤثر بشكل رئيسي على الكبد. كثيراً ما لا يترافق الالتهاب الكبدي ج بأي أعراض، لكن العدوى المزمنة قد تؤدي إلى ظهور ندوب على الكبد، وبعد عدة سنوات قد تؤدي إلى التشمع.
- في بعض الحالات، يعاني مرضى التشمع أيضاً من الفشل الكبدي أو سرطان الكبد أو من أوردة شديدة التورم في المريء والمعدة، ما قد يؤدي إلى نزيف شديد يؤدي إلى الوفاة.

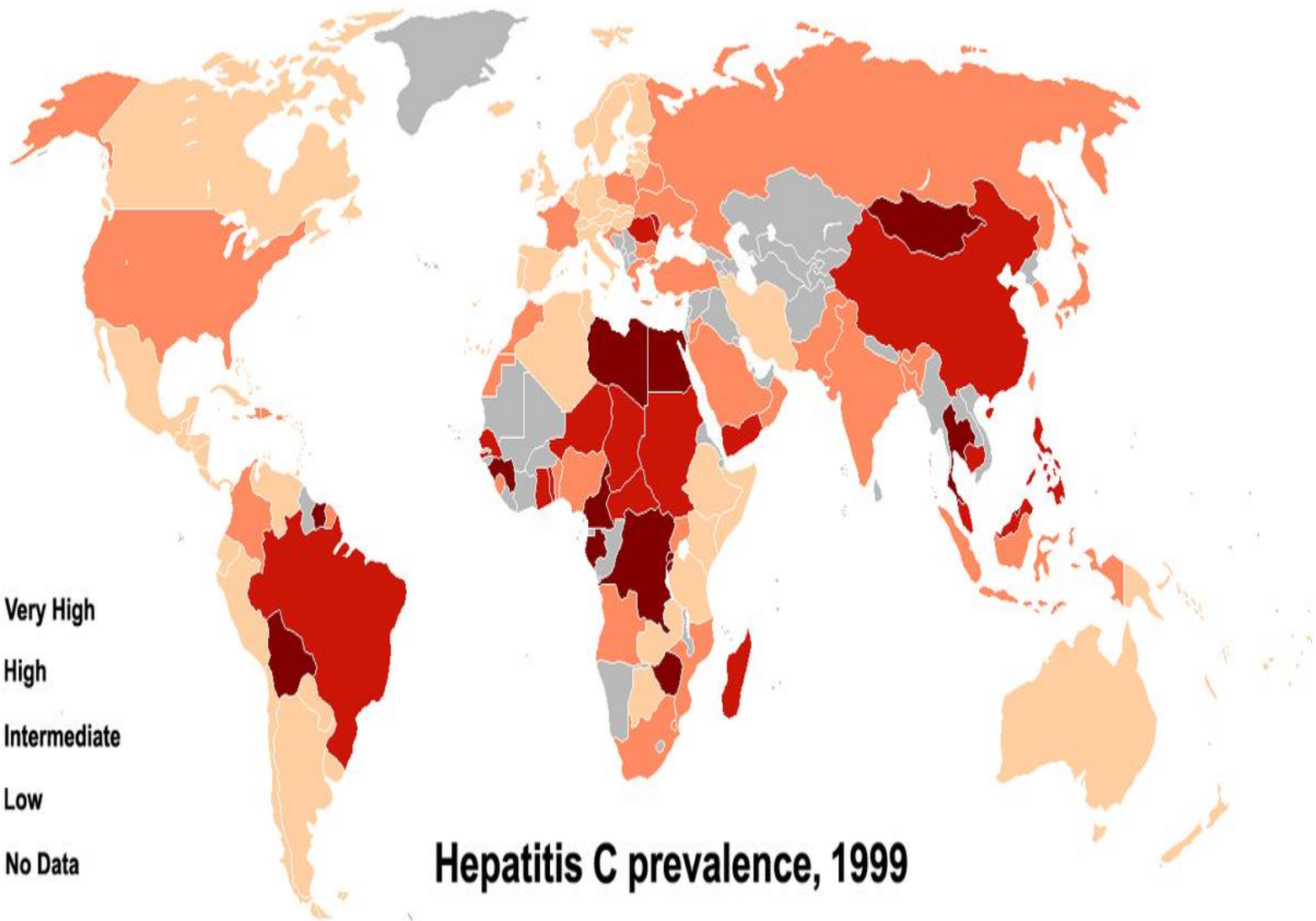


# التهاب الكبد الوبائي (ج) Hepatitis C

- فيروس التهاب الكبد ج عبارة عن فيروس RNA صغير مغلف أحادي النطاق إيجابي الاتجاه وهو ينتمي إلى جنس “hepacivirus” في عائلة “Flaviridae”.
- هناك سبعة أنماط جينية رئيسية من فيروس التهاب الكبد C في الولايات المتحدة الأمريكية، نجد أن النمط الجيني ١ هو المسؤول عن ٧٠% من الحالات، في حين أن النمط الجيني ٢ مسؤول عن ٢٠% منها؛ وكل من الأنماط الجينية الأخرى مسؤول عن ١% من الحالات.
- كما أن النمط الجيني ٤ هو الأكثر انتشاراً أيضاً في جمهورية مصر العربية



**Hepatitis C prevalence, 1999**



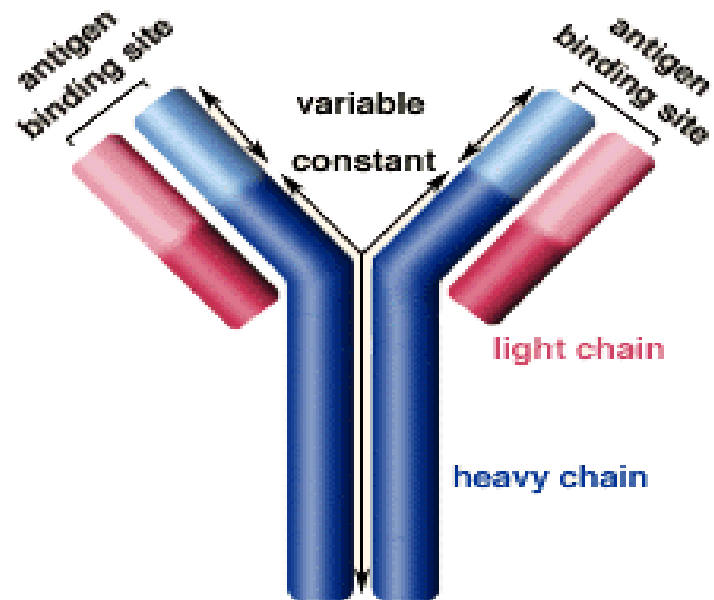
# Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

التحاليل المناعية المرتبطة

# تعريفات عامة

ما هي الأجسام المضادة Antibody

هي مركبات موجودة ضمن الجهاز المناعي للجسم  
وتصنع بشكل خاص عند تعرض الجسم لأجسام  
غريبة



## تعريفات عامة

- **Antigen** **الانتيجين**

هو جسم مسؤول عن اثاره الجهاز المناعي للجسم وبالتحديد  
اثارة الأجسام المضادة

- **التحاليل المناعية Immunoassay**

هي اختبارات بيوكيميائية لقياس مستوى مادة معينة في  
السائل الحيوي (سيرم، بول، لعاب، دموع) بواسطة ارتباط  
Antigen مع Antibody المخصص له

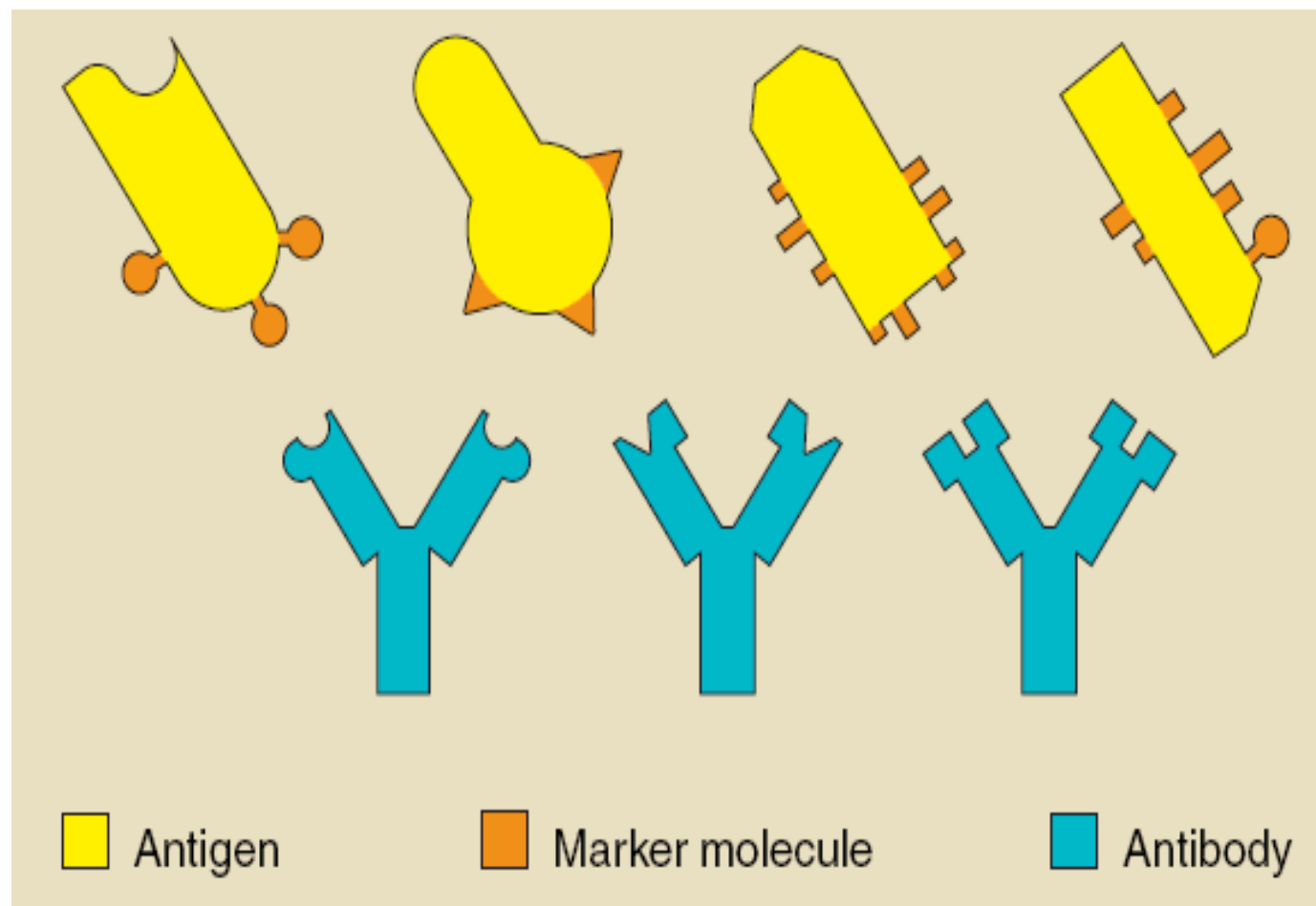
## تعريفات عامة

### • Analyte

هي المادة البيوكيميائية التي يتم قياسها وفي التحاليل المناعية يكون Analyte إما Antibody أو antigen

## التحاليل المناعية المرتبطة

- يتم تصنيع الأجسام المضادة Antibodies في حال التعرض لأجسام غريبة Antigens وتكون هذه الأجسام المضادة ذات تخصصية وألفة Specific Affinity للأجسام الغريبة التي أثارت تصنيعها مثل البروتينات والسكريات العديدة و الأحماض النووية

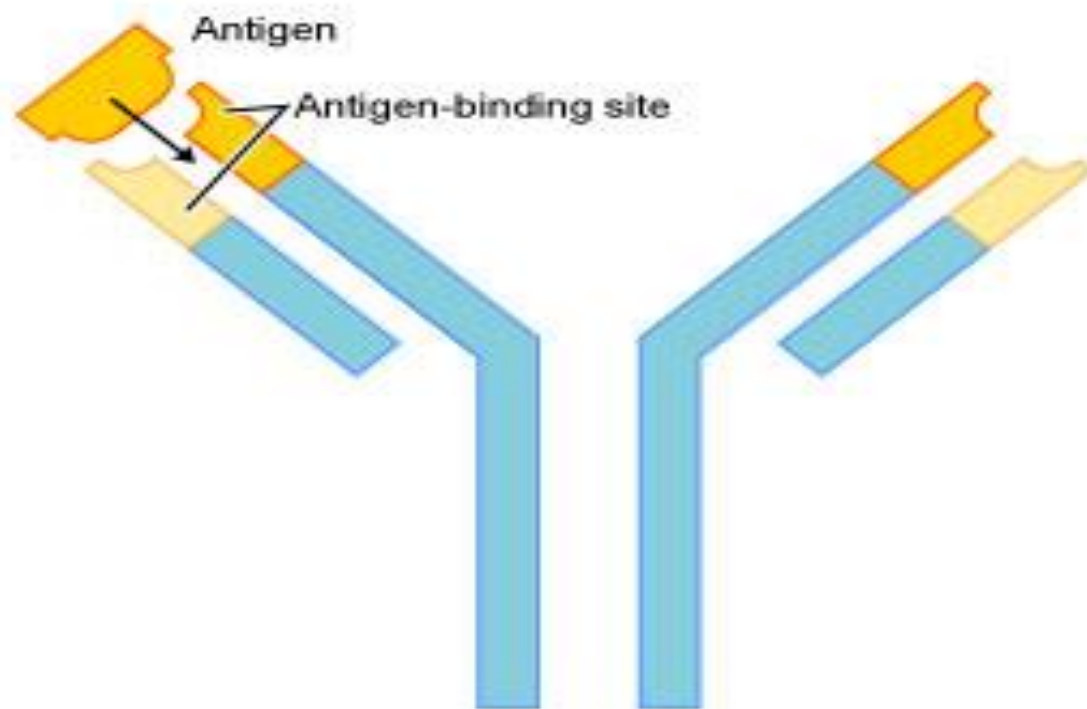




# التحاليل المناعية المرتبطة

- تتعرف الأجسام المضادة على الجزء antigenic determinant
- يحتوي الجسم على خلايا مصنعة للأجسام المضادة

## Antigens



## Antibody

## طرق تصنيع الأجسام المضادة الخاصة بالتحاليل المناعية

هناك أكثر من طريقة لتصنيع الأجسام المضادة و أحد أكثر هذه الطرق شيوعا لتصنيع Antibody مخصص لجسم ما (Antigen) هو حقن هذا الجسم مرتين متباعدة فترة ٣ أسابيع لأرنب وبعد عدة أسابيع من الحقن يتم سحب دم من الأرنب وعمل طرد مركزي للحصول على السيرم المحتوي على Antibody المطلوب

ولكن هذا Antibody يسمى polyclonal لأنه ناتج تصنيع عدة خلايا

## طرق تصنيع الأجسام المضادة الخاصة بالتحاليل المناعية

هناك طريقة لتصنيع أكثر Antibody تخصصاً  
monoclonal وهو ناتج تصنيع مجموعة خلايا  
متماثلة تماماً cell line ونحصل على هذه الخلايا  
بدمج خلية مصنعة للجسم المضاد مع خلية سرطانية  
لها القدرة على الانقسام الى ما لا نهاية

# ما هي تقنية ELISA

هذه التقنية تستخدم لقياس تركيز مادة جزيئية مثل الهرمونات والعقاقير في السائل الحيوي كالسیرم . هذه المادة الجزيئية تقاس عن طريق معرفة كمية الأجسام المضادة Antibody التي ارتبطت ب Antigen

# استخدامات تقنية ELISA

استخدامات  
ELISA

للكشف عن وجود  
الأنتيجينات

للكشف عن تركيز  
الأجسام المضادة

في الصناعات الغذائية

# تقنية ELISA

تنقسم إلى:

- ١ - قياسات مناعية تنافسية Competitive ELISA
- ٢ - قياسات مناعية غير تنافسية Sandwich ELISA

# Competitive ELISA

في هذه الحالة يتنافس Antigen المطلوب قياسه في العينة مع Labeled Antigen للارتباط بالجسم المضاد وفي هذه الحالة تكون العلاقة عكسية بين كمية Antigen المطلوب قياسه مع labeled Antigen



# Competitive ELISA

## Competitive Enzyme Immunoassay

Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y

Solid phase coated with antibody



Add free and labelled antigen



Free and labelled antigen are captured



TMB

+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

TMB ox

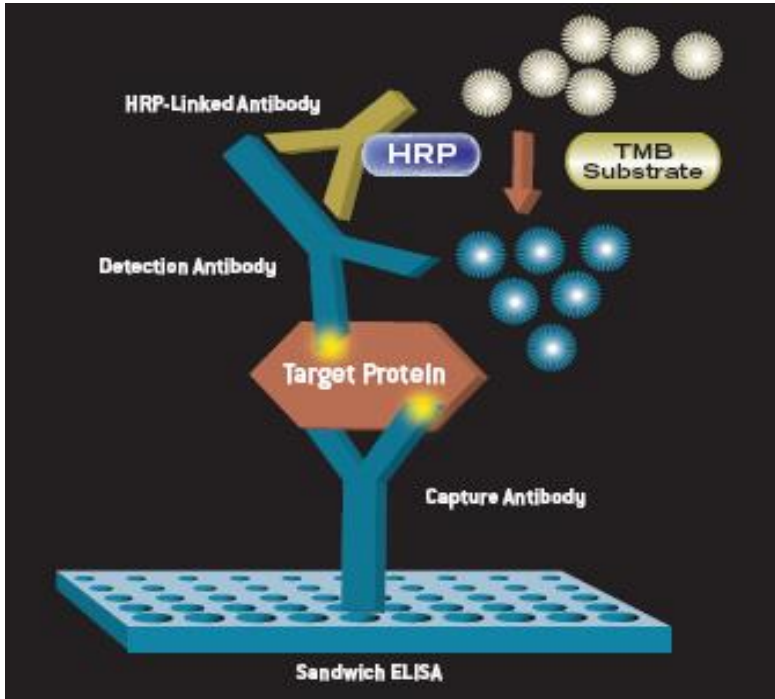


Color formation by oxidation of substrate into a colored compound

# Sandwich ELISA

هناك حالتين

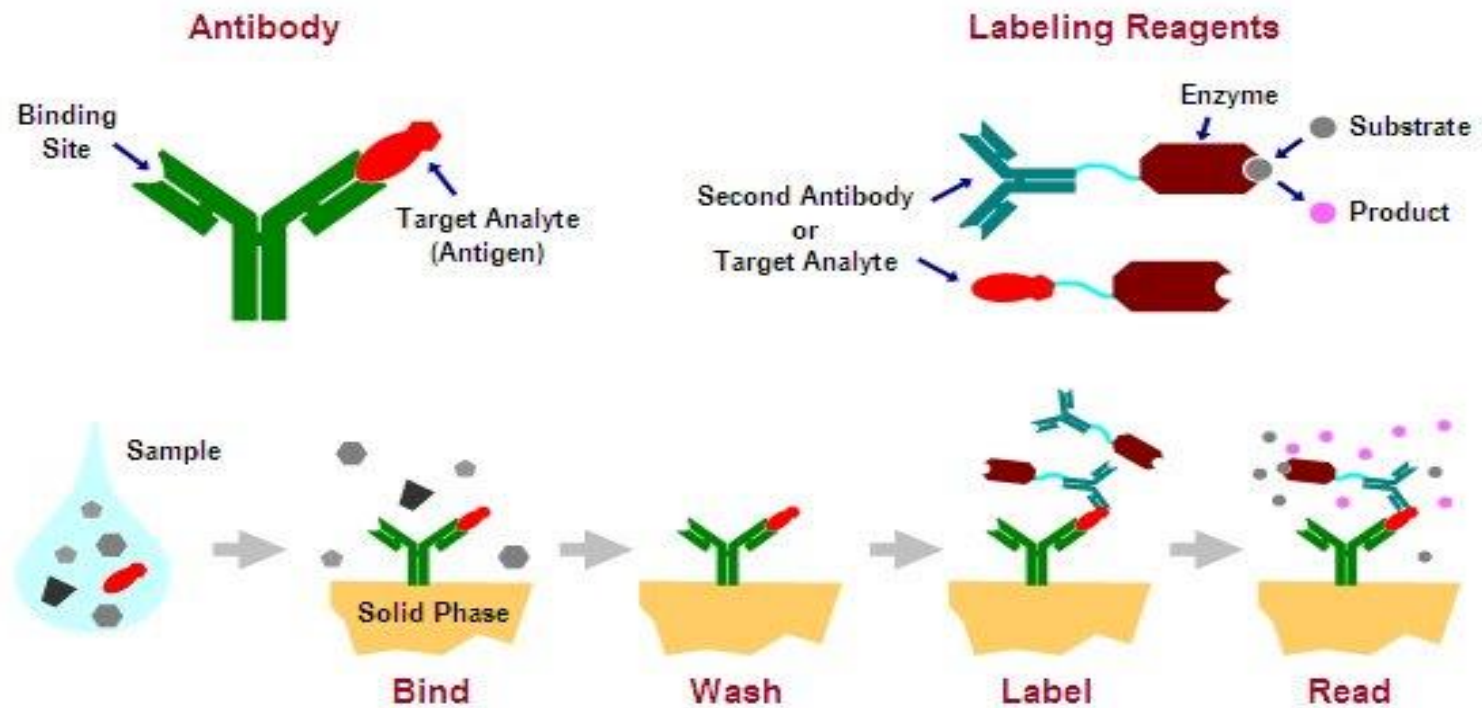
أ- إما أن يكون المطلوب الكشف عن Antigen وقياس تركيزه في العينة ففي هذه الحالة يكون طبق الاليزا مغطى بالجسم المضاد Antibody



# Sandwich ELISA

يرتبط Antigen في العينة مع الجسم المضاد وبعد ذلك يرتبط الجسم المضاد بجسم مضاد آخر ويكون الجسم المضاد الآخر مرتبط بإنزيم ثم تضاف المادة الأساس للإنزيم ويتم حساب كمية Antigen عن طريق قياس كمية ناتج التفاعل

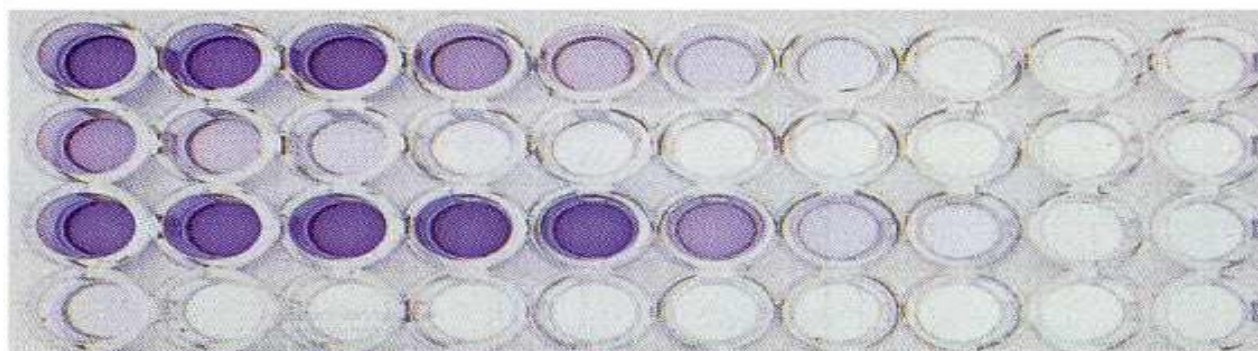
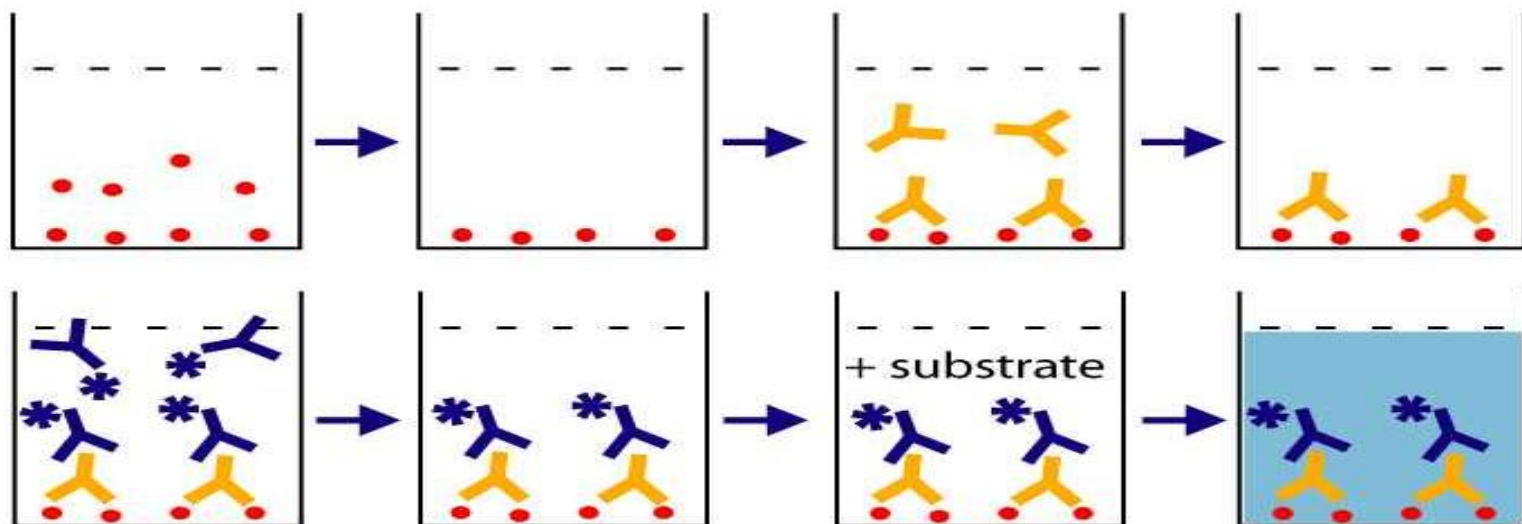
# ELISA



# Sandwich ELISA

**ب- الحالة الثانية** أن يكون المطلب الكشف عن Antibody وقياس تركيزه في العينة ففي هذه الحالة يكون طبق الاليزا مغطى ب Antigen

يرتبط Antibody في العينة مع Antigen الموجود في الطبق وبعد ذلك يرتبط الجسم المضاد بجسم مضاد آخر ويكون الجسم المضاد الآخر مرتبط بإنزيم ثم تضاف المادة الأساس للإنزيم ويتم حساب كمية Antibody عن طريق قياس كمية ناتج التفاعل



# طريقة عمل Sandwich ELISA

1- يتم ترقيم الطبق الخاص المكون من ٩٦ خانة ( wells ) بدقة وتستخدم الخانات wells الأولى لرسم المنحنى القياسي Standard curve



# طريقة عمل Sandwich ELISA

٢- ثم يتم وضع العينة المراد فحصها في الطبق ويفضل تكرار كل عينة مرتين أو ثلاث مرات Duplicate or Triplicate

وبعد ظهور النتائج يؤخذ المتوسط

٣- تستخدم عينة ضابطة Quality control sample وهذه العينة تأتي مع مجموعة المحاليل (Kit) وهي ذات تركيز محدد من قبل الشركة المصنعة وتعامل تماما مثل العينة المفحوصة



# طريقة عمل Sandwich ELISA

٤- تترك العينات لفترة زمنية محددة حتى يلتصق Analyte بالطبق بعد ذلك يغسل الطبق لإزالة ما تبقى من العينة

٥- تتم اضافة محلول يحتوي على أجسام مضادة للبروتين المطلوب الكشف عنه وهذه الأجسام تسمى الأجسام المضادة الأولية Primary Antibodies

# طريقة عمل Sandwich ELISA

٦- تتم اضافة أجسام مضادة ثانية Secondary Antibodies للأجسام المضادة الأولية Primary Antibodies وهذه يمكنها الارتباط بالطبق فقط في حال ارتباط الأجسام المضادة الأولية بالعينة (هذه الأجسام المضادة الثانية يرتبط بها انزيم) Sandwich ELISA

# طريقة عمل Sandwich ELISA

٧- يتم اضافة المادة الأساس للإنزيم المرتبط بالأجسام المضادة الثانية فيقوم الإنزيم بتحويل المادة الأساس الى ناتج ملون

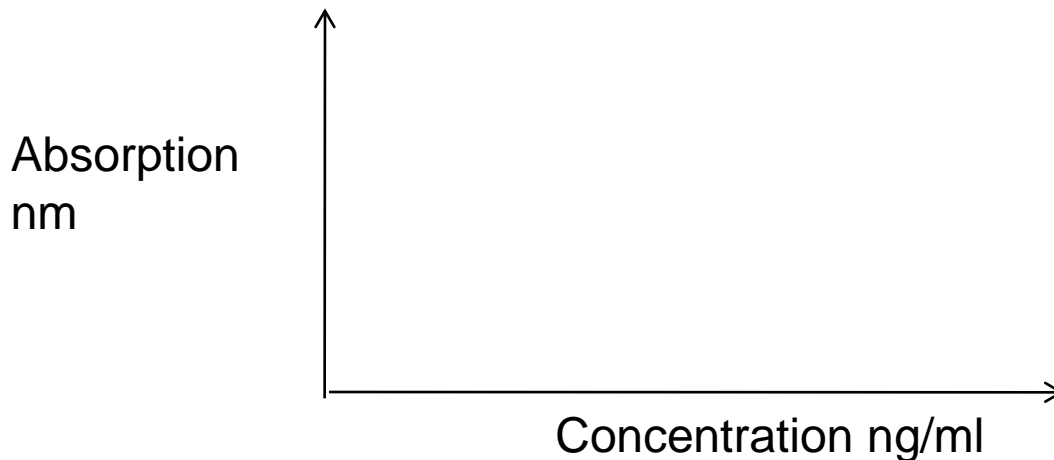
٨- تحسب كمية ناتج التفاعل ضوئيا باستخدام جهاز الحاسوب وتكون كمية

ناتج التفاعل متناسبة طرديا مع كمية Analyte في العينة



## النتائج

بعد قراءة نتائج الامتصاص في جهاز قارئ الاليزا نقوم  
برسم المنحنى القياسي على ورق الرسم البياني بحيث  
نستخدم المحور السيني x-axis للتركيز concentration  
والمحور الصادي y-axis للامتصاص Absorption

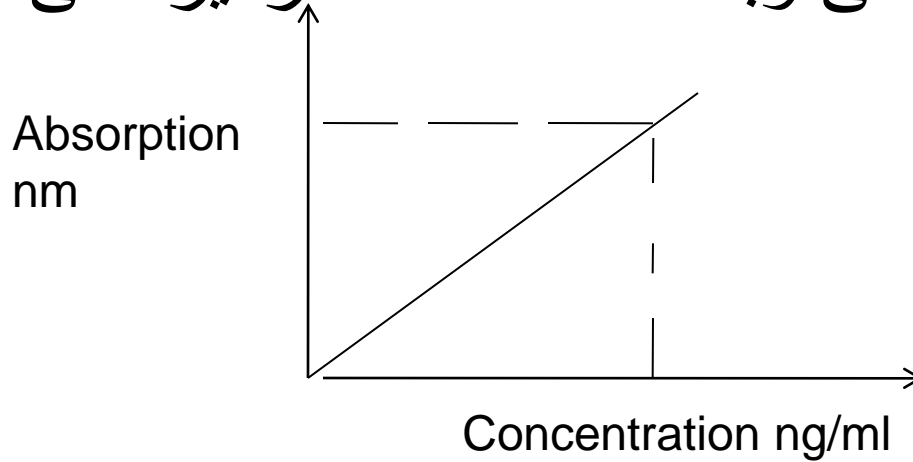


## النتائج

نقوم بتحديد تركيزات المحاليل القياسية standards على المنحنى السيني x-axis ثم نحدد قراءة كل محلول قياسي على المنحنى الصادي y-axis ونرسم المنحنى القياسي

## النتائج

يستخدم هذا المنحنى لقياس تركيز كل عينة بحيث تأتي عند قراءة الامتصاص على المحور الصادي ونحدد النقطة المقابلة لها على المنحنى وبعد ذلك نحدد التركيز على المنحنى السيني



## النتائج

نحسب تركيز العينة الضابطة من المنحنى وإذا كان في الحدود الطبيعية المحددة من الشركة المصنعة فهذا يعني أن التجربة ناجحة ويمكن اعتماد النتائج.



تفاعل إنزيم البلمرة التسلسلي

Polymerase Chain Reaction

➤ تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت انقسام الخلية بشكل تلقائي و بشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ. و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى ١٠٠٠ قاعدة نيتروجينية بالثانية ( داخل النظام الحيوي ) و هي 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).

# تاريخ اكتشاف PCR

- كانت فكرة بواسطة عالم كيميائي
- تتضمن فصل الحمض النووي DNA وصنع نسخ كثيرة منه ..
- وفعلاً تحققت هذه الفكرة المبدعة ..
- بواسطة د. كاري مولس Kary Mullis
- خطرت بباله فكرة أن يفصل الحمض النووي DNA
- ويصنع منه نسخ كثيرة ..
- ليقلد في عام ١٩٩٣ م جائزة نوبل في الكيمياء.



# ما هو PCR ؟

- هو تقنية مخبرية تقوم على أساس تصنيع نسخ عديدة من قطع الحمض النووي DNA في المختبر (in vitro).
- بحيث يقوم الجهاز برفع درجة الحرارة إلى ٩٥ درجة مئوية
- فينفصل الحمض النووي إلى جزئين ..
- وبإضافة إنزيمات لكل جزء تساعد على إنتاج مئات النسخ من النسخة الأصلية
- الهدف : تسهيل إجراء الاختبارات و الأبحاث وفحوصات إضافية.
- وهذه صور توضح خطوات عمل الجهاز :



### 1 مرحلة التفكيك

ترفع درجة حرارة الجهاز حتى يفصل الحمض النووي

### 2 مرحلة الترابط

تنخفض درجة حرارة الجهاز ليسمح لبرايمر بالإرتباط

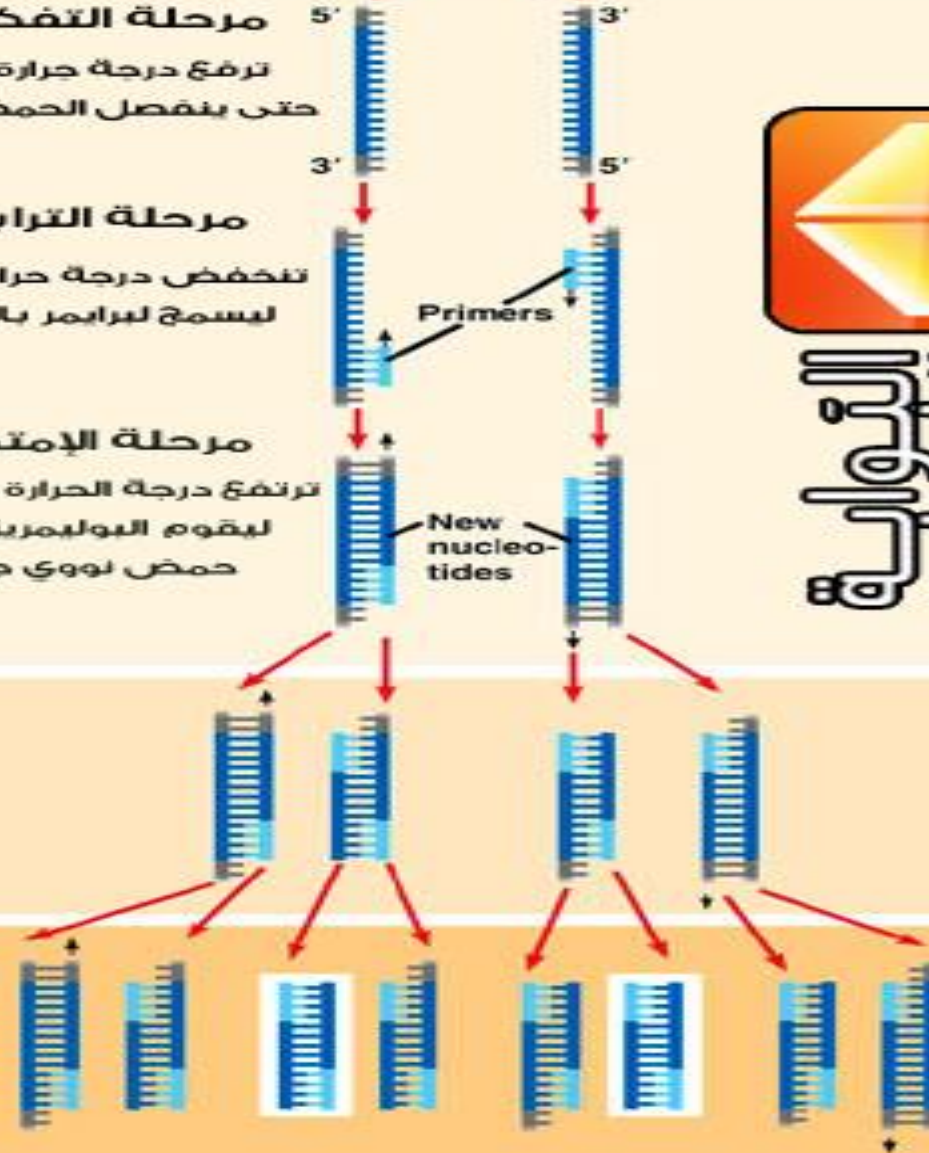
### 3 مرحلة الإمتداد

ترفع درجة الحرارة مرة أخرى ليقوم البوليمريز ببناء حمض نووي جديد

الدورة الأولى  
ينتج عنها  
جزئين

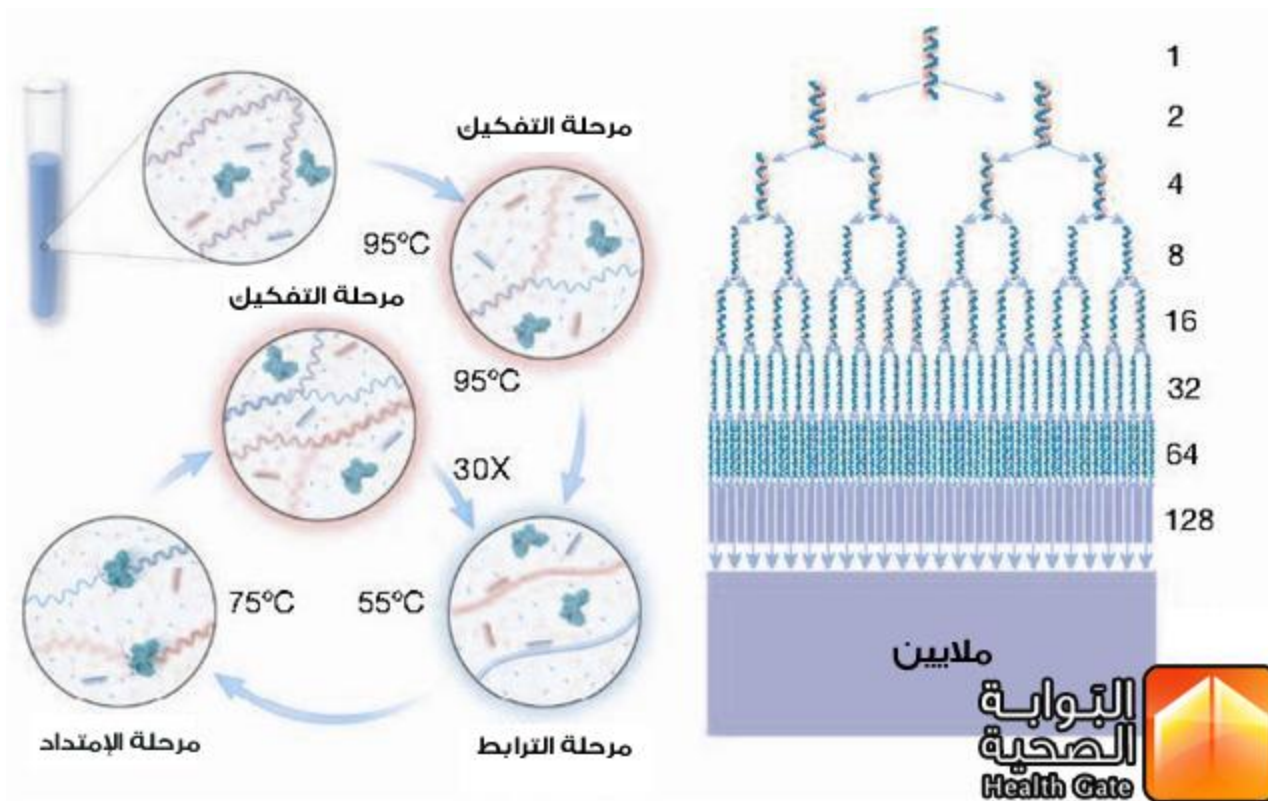
الدورة الثانية  
ينتج عنها  
4 جزئيات

الدورة الثالثة  
ينتج عنها  
8 جزئيات



الصحة  
البوابة  
Health Gate

# مراحل PCR



# تطبيقات تفاعل انزيم البلمرة التسلسلي

- الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بريمير خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها . ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجين الكروموسومات أو على احدهما.
- الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته
- يساعد في تشخيص بعض الأمراض والتي تسببها بكتيريا أو فيروسات .
- يستخدم في الإستنساخ وإنتاج خلايا أكثر
- هو العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني ( Recombinant ) الحمض النووي : ( DNA ) حيث نقوم بتكثير الجين المراد إدخاله على البلازميد أو الحمض النووي ( DNA ) المضيف.
- هو العملية الأساس في تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي ( DNA ) الحمض النووي ( DNA ) Sequencer .

## مبدأ عمل الجهاز

- يمكن اعتبار تقنية PCR ترجمة 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 معينة تساعد على ذلك:



# متطلبات تقنية PCR

١- عينة التفاعل او يسمى قالب الحمض النووي (DNA Sample).





## • ٢- البادئات (Primers):-

نوعان :

- أمامي (Forward).
- خلفي (Reverse).

• وهي تسلسل من القواعد النيتروجينية في شريط واحد قصير (20-25 bp) مكمل لبداية الجزء المراد تضخيمه في الحمض النووي.

- ٣-انزيم التفاعل ( Hot Star Taq polymerase )  
أو ( Taq polymerase ):

- مستخرج من سلالة بكتيرية تسمى *Thermus aquaticus* التي تتواجد طبيعياً في الينابيع حارة.



- لا يتأثر بدرجات الحرارة المرتفعة.
- درجة الحرارة المثلى له ٧٢ ٥م.

## • ٤- القواعد النيتروجينية ( Nitrogen Base dNTPs ):-



**Adenine**

**Thymine**

**Guanine**

**Cytosine**

■ أدنين

■ ثايمين

■ جوانين

■ سايتوسين

dNTPs :Deoxynucleoside triphosphates

## ٥- محلول منظم ( PCR Buffer 10x ).

- شوارد مناسبة، أهمها شاردة المغنيزيوم  $Mg^{+2}$  التي تعتبر عامل متمم Cofactor لأنزيم البوليمراز



## ٦- ماء مقطر (DDW).





## ٧-جهاز تفاعل البلمرة التسلسلي (Thermocycler):-

يقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع و دقيق و متتالي لأن تغير درجة الحرارة مهم في عملية التضاعف.



# خطوات تقنية PCR ثلاث مراحل في الدورة الواحدة

## ١- مرحلة التفكيك Denaturation الحراري:

يتم رفع درجة الحرارة إلى  $94^{\circ}\text{C}$  وذلك لفك الشكل المزدوج للحمض النووي (DNA) الأصل.

d.s. DNA الى s.s.DNA

## ٢- مرحلة التصاق البادئات Primers annealing:

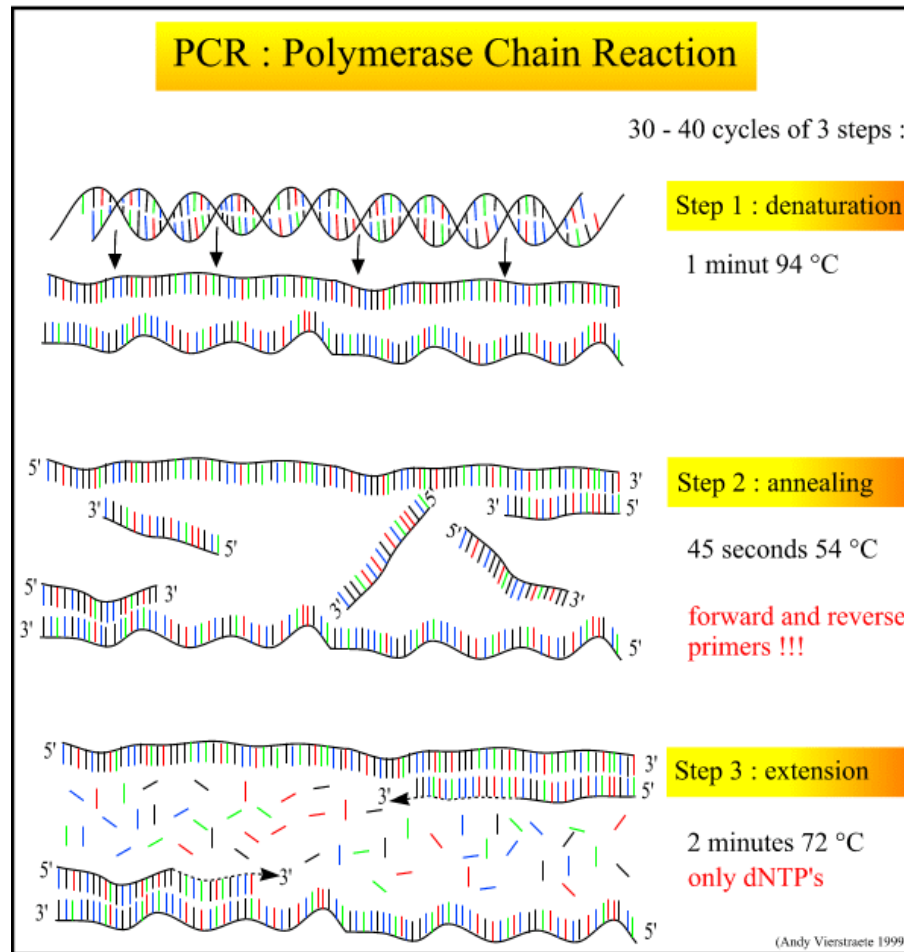
يجب خفض درجة الحرارة إلى ما بين  $55-60^{\circ}\text{C}$  ليقيم البادئات بالالتصاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصل.

## ٣- مرحلة الامتداد Extension:

يقوم برفع درجة الحرارة إلى  $72-75^{\circ}\text{C}$  ليقيم انزيم البلمرة بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد. في وجود dNTPs

وهذه المراحل الثلاث تمثل دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي (DNA) الأصل قد تضاعف ، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي (DNA) (على عدد الدورات بشكل أسي .

# The different steps in PCR.





# طريقة عمل جهاز PCR

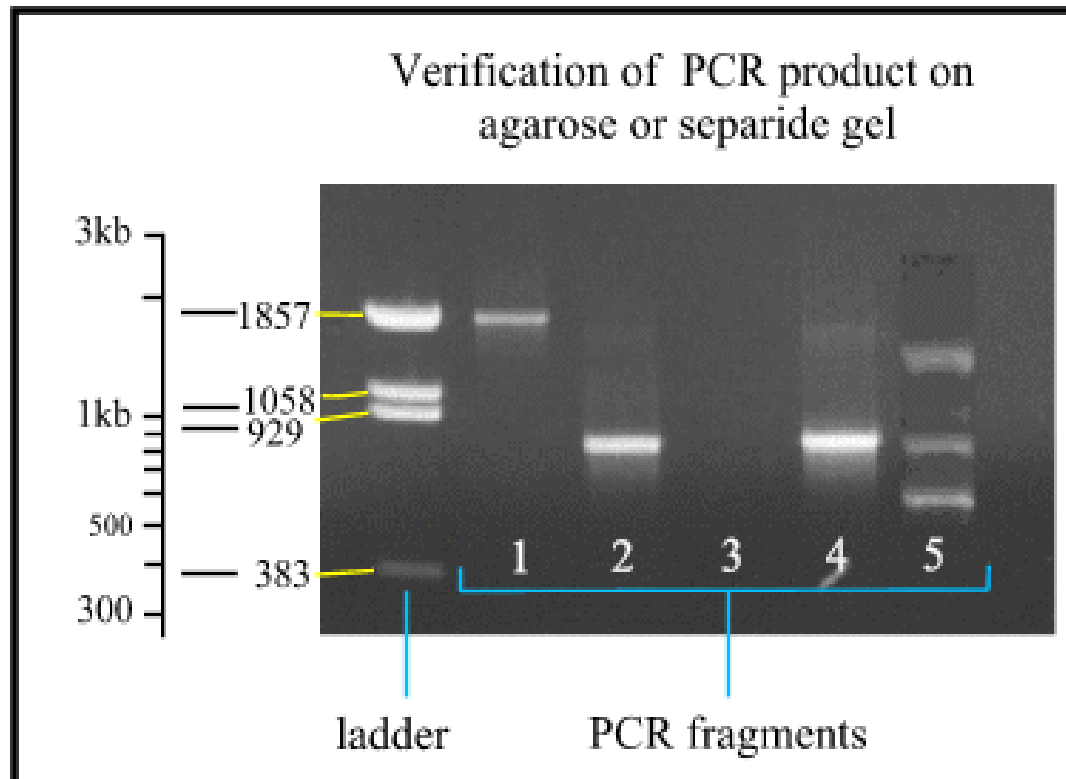
- باستخدام لوحة المفاتيح وشاشة عرض الجهاز ، يتم ادخال الدورة المصممة لأي قطعه من الحمض النووي المفصول.

المكونات		الكمية بالمايكروليتر (x ١)
١	ماء مقطر (d.H2O)	١٧
٢	محلول منظم ١٠ X ( PCR buffer 10x )	٢,٥
٣	خليط القواعد النيتروجينية ( 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

■ نضيف ٢٣ مايكروليتر من المزيج الرئيسي Master Mix على كل أنبوب من أنابيب PCR ثم نضيف ٢ مايكروليتر من عينه الدنا (DNA) .

■ نضع جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي ٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة لخلط جميع العينات وإزاله جميع الفقاعات.

# Verification of the PCR product on gel



# أنواع تقنية الـ PCR

**PCR العادي** : وهو ما تم شرحه والتطرق اليه في الخطوات السابقة.

**Real Time PCR** : وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن خلاف الوحيد يكون مرتبط الجهاز بكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدا التفاعل ومن ثم الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي ( DNA ) ويعتمد ذلك على وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك . مما يسهل على الباحثين الوقت لتحديد وجود الجين المطلوب أو لا ، وكمية الجين بدون الوصول إلى نهاية الدورات الحرارية المحددة .

# A thermal cycler for PCRs

