Genetics

Subject : PCR

Lec no : 28

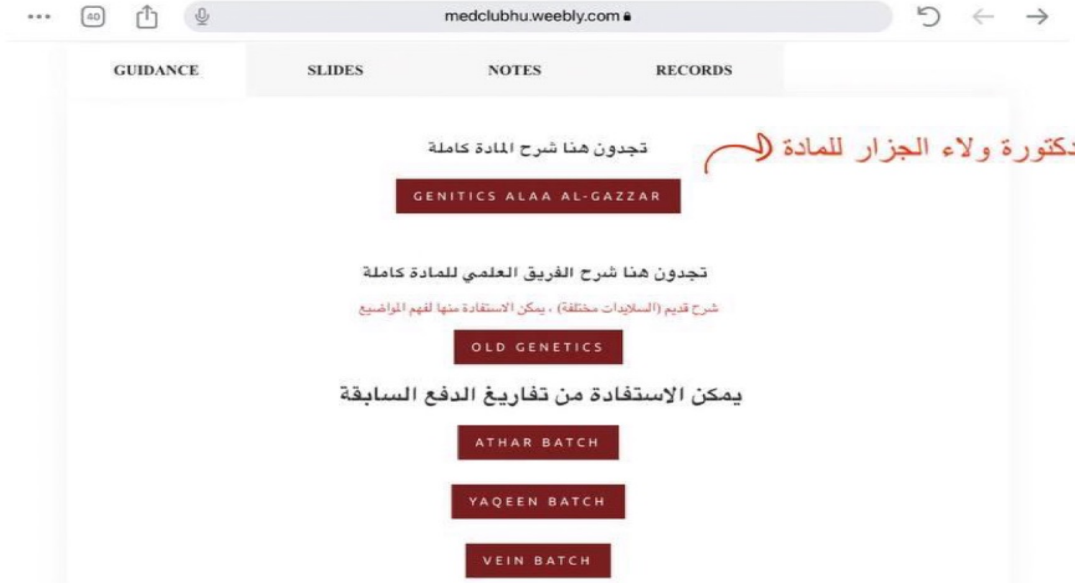
Done By : Maria hood

تدقيق : Esra'a khaled

وَقُل رَّبِّ زِدْنِي عِلْمًا

للوصول الى guidance الجينتكس و تفاريغ المادة كاملة :

تجدون في guidance مادة الجينتكس على موقع النادي :



شرح الدكتورة ولاء الجزار للمادة

كل اعمال الفريق العلمي تنشر على قناة التيليغرام

Polymerase chain reaction
PCR

By

Dr. Walaa Bayoumie El Gazzar

محاضرة اليوم رح تكون عن كيف نعمل محاكاة لعملية ال replication في جسمنا بس في اللاب و نعمل copies كثير لل DNA و ذلك عن طريق عملية اسمها ال PCR

PCR

- PCR is an **in vitro DNA amplification** *procedure in which* millions of copies of a particular sequence of DNA can be produced within a few hours.
- The flanking sequences of the gene of interest should be known.
-

* في البكتيريا بنعمل cloning

قبل ما ادخل بعملية ال PCR لازم اكون عارف ال flanking sequences of the gene ، و الي هي ال sequences الخاصة بأطراف الجين
قبل ما نبلش نتوغل بالموضوع ، شو مبدأ ال replication في جسمنا ؟ اول اشي بنفصل ال 2 Strands عن بعض بعديها بجيب primer مشان ال DNA polymerase يبلش يشتغل ، نفس الاشي رح اعمله باللاب

طيب ليش لازم نكون عارفين ال flanking sequence ؟
لأنه عملية ال PCR تقليد لعملية ال DNA replication بس باللاب

لما ابلش شغل بحتاج مجموعة أدوات:

Material required

1-Target DNA .

2- Two synthetic oligonucleotide primers:

These primers are complementary to the end of each strand of target DNA to be amplified. The selection of primer requires the knowledge of the flanking sequences of the gene of interest.

- **Two DNA primers** of about 20- 30 nucleotides with complementary sequence of the flanking region can be synthesized.(just at the edges of the region to be copied)

3- Heat stable DNA polymerase:

This enzyme is derived from bacteria Thermus acquaticus that can tolerate high temperatures. Therefore the enzyme is not denatured at high temperature. This polymerase is not denatured even at temperature around 95°C.

4- All four deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs).

في شوية كلام عنهم بالصفحة الجاي

هس لما ابلش شغل بال pcr بتخلص ال DNA الي فيه الجين الي بدي اكثره ، بستخلص DNA الخلية كامل مش بس الحتة الي انا عايزاها ، بعد ما استخلصه بحطه في الcpr كله ، مش بس ال target gene ، و احط معه primer ، و هذا ال primer بكون بيتعرف على أطراف الحين الي همي ال flanking regions او بحكي عليهم ال ends لهيك لازم اكون عارفهم مشان اقدر اجيب primer مناسب الهم
ال primer بيتم تصنيعه في الشركات حسب الجين الي بدي اياه بعطيهم القياسات و ال sequence بتاع ال flanking regions و همي بصمموه و بكون complementary لل flanking regions و كمان بحط في الجهاز ال DNA POLYMERASE الي يبني و ال building blocks الي يستخدمها و الي هي ال necleotides

ال polymerase الي بستخدمه في حاجة مختلفة كدا ، مش هو enzyme ؟
اول ما احط ال material الي معي في ال tube بسخنهم على درجة حرارة 95° مشان اعمل separation لل Strands بتوع ال DNA ، هل في انزيم بيتحمل هاي الحرارة ؟ لأ ، بصير اله denaturation لانه protein بالأساس، بس في بعض البروتينات المستخلصة من احد انواع البكتيريا اسمها bacteria Thermus acquaticus بتقدر تستحمل هاي الحرارة

هس بعد ما احط المكونات هاي كلها في ال tube بروح بحطها في جهاز اسمه thermocycler من اسمه يعني بعمل الي cycles كثير كل cycle منهم 3 steps ، اول خطوة هي أن اسخن الجهاز مشان اعمل separation لل 2 Strands بتوع ال DNA

Technique steps

* اول خطوة نرفع درجة حرارة الجهاز ل 95° عشان نعمل separation لل DNA

Step 1: Separation (Denaturation):

DNA strands are separated (melted) by heating at 95°C for 15 seconds to 2 minutes.

ليش الفرق الكبير بين ال ١٥ ثانية و دقيقتين ، ليش مش ال range من دقيقة و نصف إلى دقيقتين ؟ لانه هذا بيعتمد على حجم ال DNA كل ما كبر كل ما احتجنا وقت أطول

* Depends on size of the gene

الخطوة الثانية اني اساعد ال primer يركب على الحتة الي هو لازم يركب فيها و في هاي الخطوة بخفض درجة الحرارة إلى حوالي من 50° إلى 65° ، لمدة تتراوح من دقيقة إلى ٣ دقائق لانه احنا وجدنا انه ال cooling دا بساعد ال primer انه يلزق بالحتة الي هو complementary الها

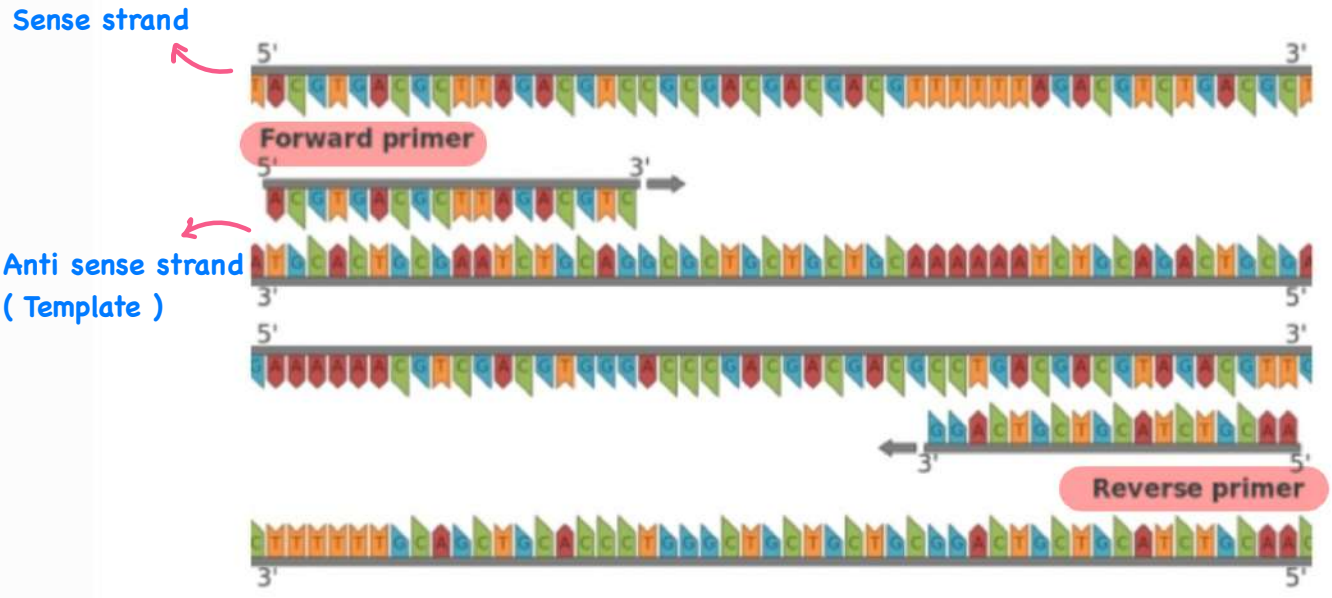
طيب ليش هالنزول الحاد لدرجة الحرارة ؟ لأنهم اكتشفوا انه افضل درجة حرارة لهاي الخطوة هي درجة او درجتين تحت ال melting temperature لل primer ، طيب من وين بعرفها ؟ من الشركة المصنعة

Step 2: Priming (Annealing):

The reaction mixture is cooled to about 50-65°C for about 1-3 minutes. The temperature chosen for cooling is usually about 2-3 below **Primer melting temperature (Tm).**

50% of primers are attached

- The melting temperature (T_m) of an oligonucleotide is the temperature at which 50% of the oligonucleotide is duplexed with its perfect complement and 50% is free in solution.
- The primer melting temperature (Tm) can be defined as the temperature at which half of the primers dissociate from the template DNA.



•Forward primers anneal to the antisense strand of the double-stranded DNA, which runs from 3' to 5' direction, whereas reverse primers anneal to the sense strand of the double-stranded DNA, which runs from 5' to 3' direction.

هس لما افصل ال Strands 2 عن بعض واحد رح يكون من 3prime إلى 5prime و الثاني من 5prime إلى 3prime، واحد اسمه sense strand او coding strand و الثاني اسمه antisense او template strand
لهيك بجيب primer ال 2 بيوقفوا عند ال 3prime لكل strand و بلشوا شغل و كل واحد complementary ل strand معين (لانه اتجاه التصنيع من 5prime ل 3prime) و كل واحد الهم اسم معين حسب الصورة

Step 3: Polymerization (extension) (elongation):

New DNA strands are synthesized by **Taq polymerase.** The polymerase reaction is allowed to take place at 72°C for 30 seconds in presence of dNTPs (all four deoxy ribonucleotide triphosphates).

مرات بتاخد اكتر من 30 ثانية حسب طول ال strand الي بنعمله elongation

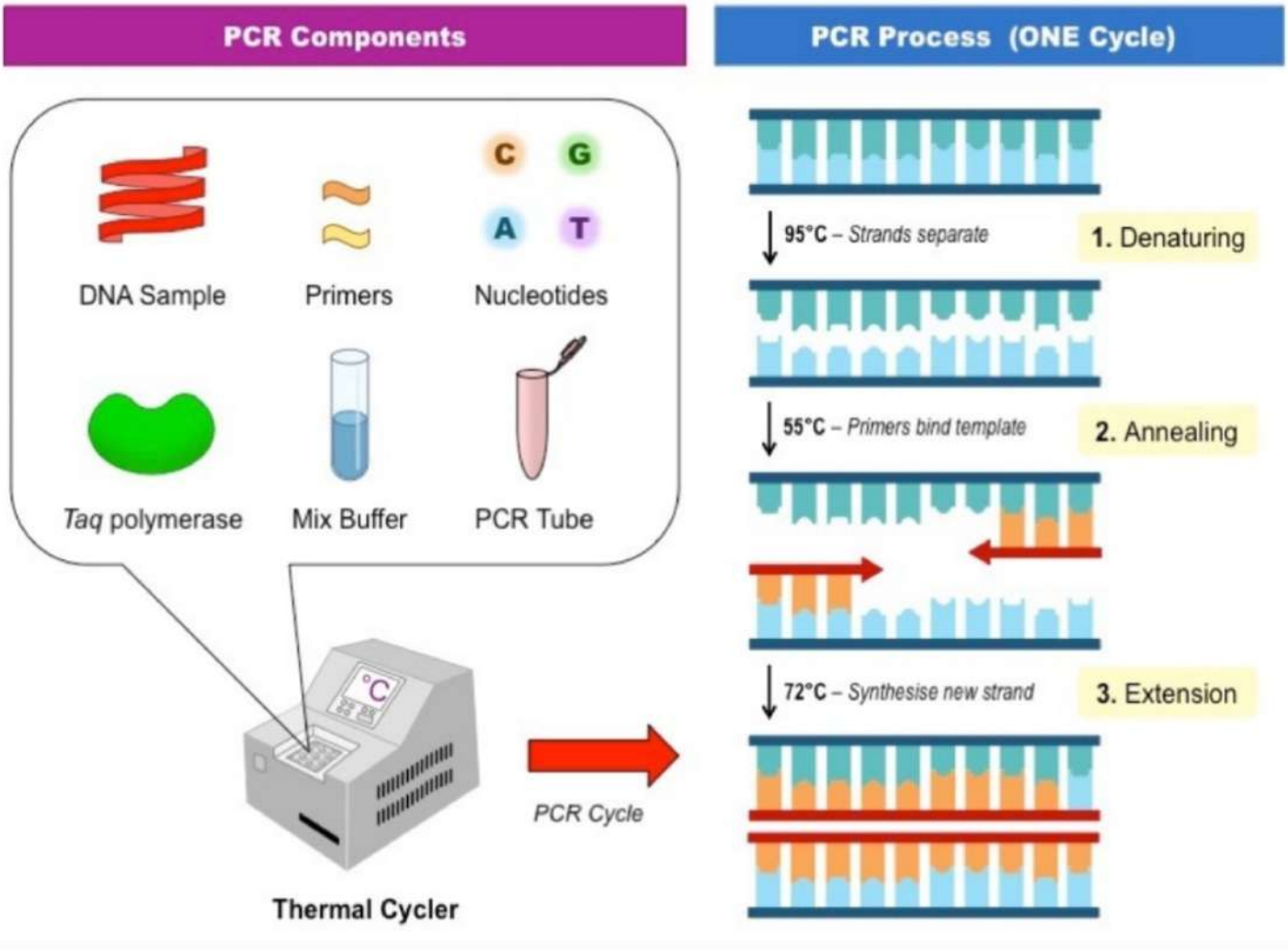
بعديها ارفع درجة الحرارة لدرجة الحرارة المناسبة لعمل ال polymerase بعد ما نخلص ال cycle نبلش ب cycle ثاني ل 30 دورة او اكثر حسب الحاجة

4-The steps of 1,2 and 3 are **repeated.**

In each cycle, the DNA strands are doubled. These cycles are generally repeated by automated instrument, called (**Tempcycler or thermalcycler).** 40 cycles

هس ال 2 copies الي بيطلعوا في ال cycle الي بعديها بصيروا ٤ و الي بعديها ٨ و الي بعديها ١٦ و الى ما ذلك و الزيادة سريعة جدا

ففي نهاية ال scycle رح الاقي million copies



هس بعد ما اطلع ال tube هل انا بعرف شو جواتها؟ لما اطلعها و اشوفها زي ما دخلت زي ما خرجت
يعني هل انا فعليا بعرف اذا الخطوات الي عملتها صح او لأ ؟

Identification of the PCR product

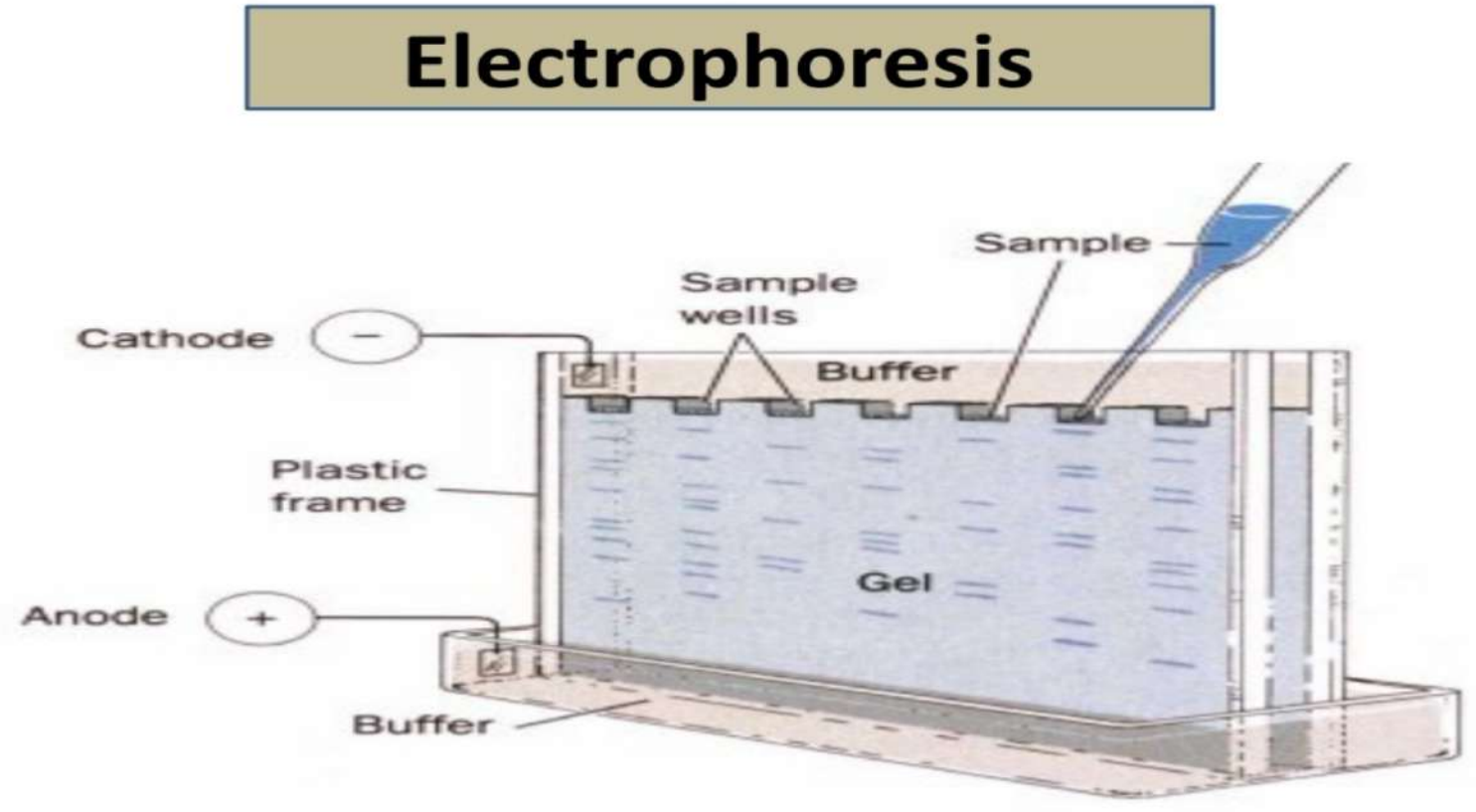
بنفصل ال molecules كهربائياً على حسب حجمها و شحنتها

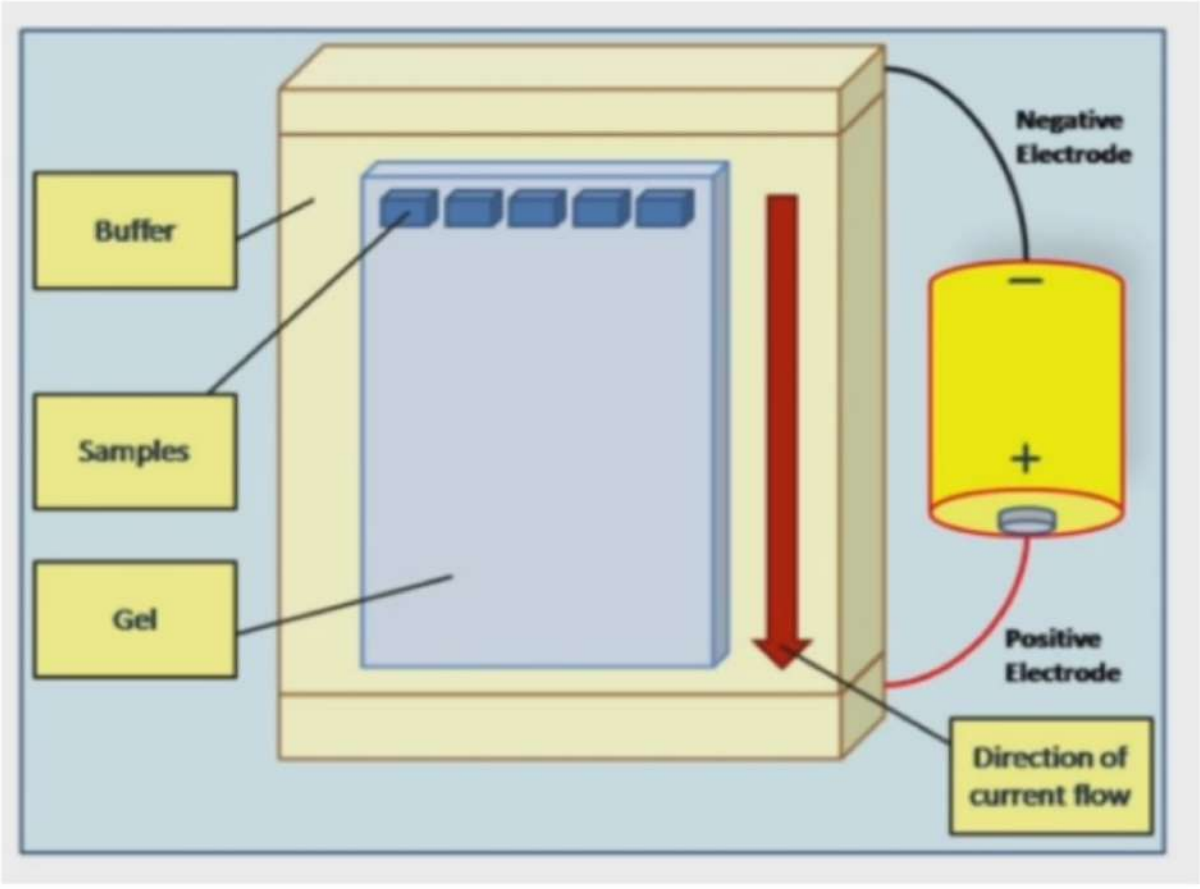
- Agarose gel electrophoresis is a basic and essential technique in molecular biology. It is routinely used for analysis of PCR products. It is the first step for analysis of specific DNA and RNA fragments by northern and Southern blots.
- Gel electrophoresis is used to separate mixtures of DNA, RNA, or proteins according to molecular size. In gel electrophoresis, the molecules to be separated are pushed by an electrical field through a gel that contains small pores.
- Small DNA molecule will travel a greater distance through the gel than will a larger DNA molecule.
- As previously mentioned, gel electrophoresis involves an electrical field; in particular, this field is applied such that one end of the gel has a positive charge and the other end has a negative charge. Because DNA and RNA are negatively charged molecules, they will be pulled toward the positively charged end of the gel.

استخلاص ال DNA بده خطوات كثير ممكن الواحد يغلط فيها فلهيك انا ممكن افكر اني عملت استخلاص لل DNA بس هو حاجة ثانية خالص
و ال primer اله تركيزات معينة ممكن الواحد يغلط فيها
و خطوات ال pcr معقدة برضو
فأنا لما اطلع ال tube لازم اعمل اله identification لل pcr product ، يعني في product طلع فعلا ؟ و هل الخطوات كلها حدثت و صحيحة كمان ؟
في احد الطرق اني اجيب ال product و امشيه على gel في عملية اسمها ال electrophoresis عملية صنع الجيل لل electrophoresis زي عملية صنع الجيلي في البيت نشتريه من ال supermarket و نسوحه في الماء و نقلب و نسيبه يبرد
بس انا هون بستخدم نوع معين اسمه agarose gel و هو white powder و عندي puffer باللاب بحطه عليه بتركيز معين

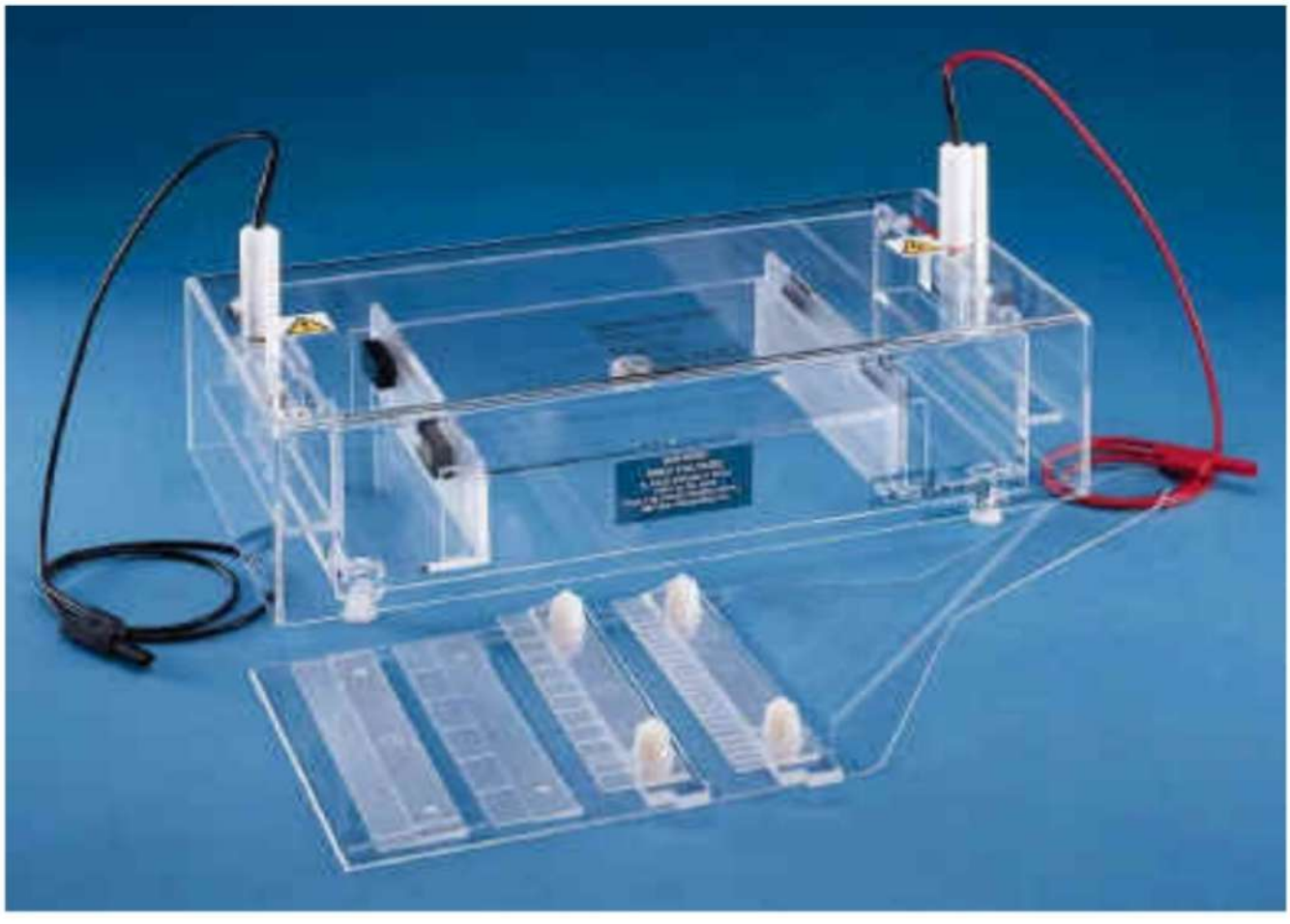
هس انا في البيت لو قدي اعمل جلي ، لو استخدم كوب واحد من الماء رح يصير hard و لو ثلاثة اكواب رح يصير سائل شوية
نفس الاشي في اللاب لازم انظم كمية ال puffer الي لازم استخدمها ، اذا عندي DNA حجمه صغير لازم اخلي الثقوب صغيرة و هذا بيكون عبر اني انظم ال buffer بطريقة مناسبة مشان ال DNA يمشي بسرعات مناسبة بس اوصل الجهاز بالكهرباء
هس الجهاز اله قطبين سالب و موجب و بما انه ال DNA سالب لهيك رح يجري لناحية الموجب
هس بسبب التباين في حجم قطع ال DNA منها الصغير و منها الكبير ، فالصغير رح يمشي مسافة أكبر على عكس الكبير و هيك بنفرق القطع الكبيرة عن الصغيرة

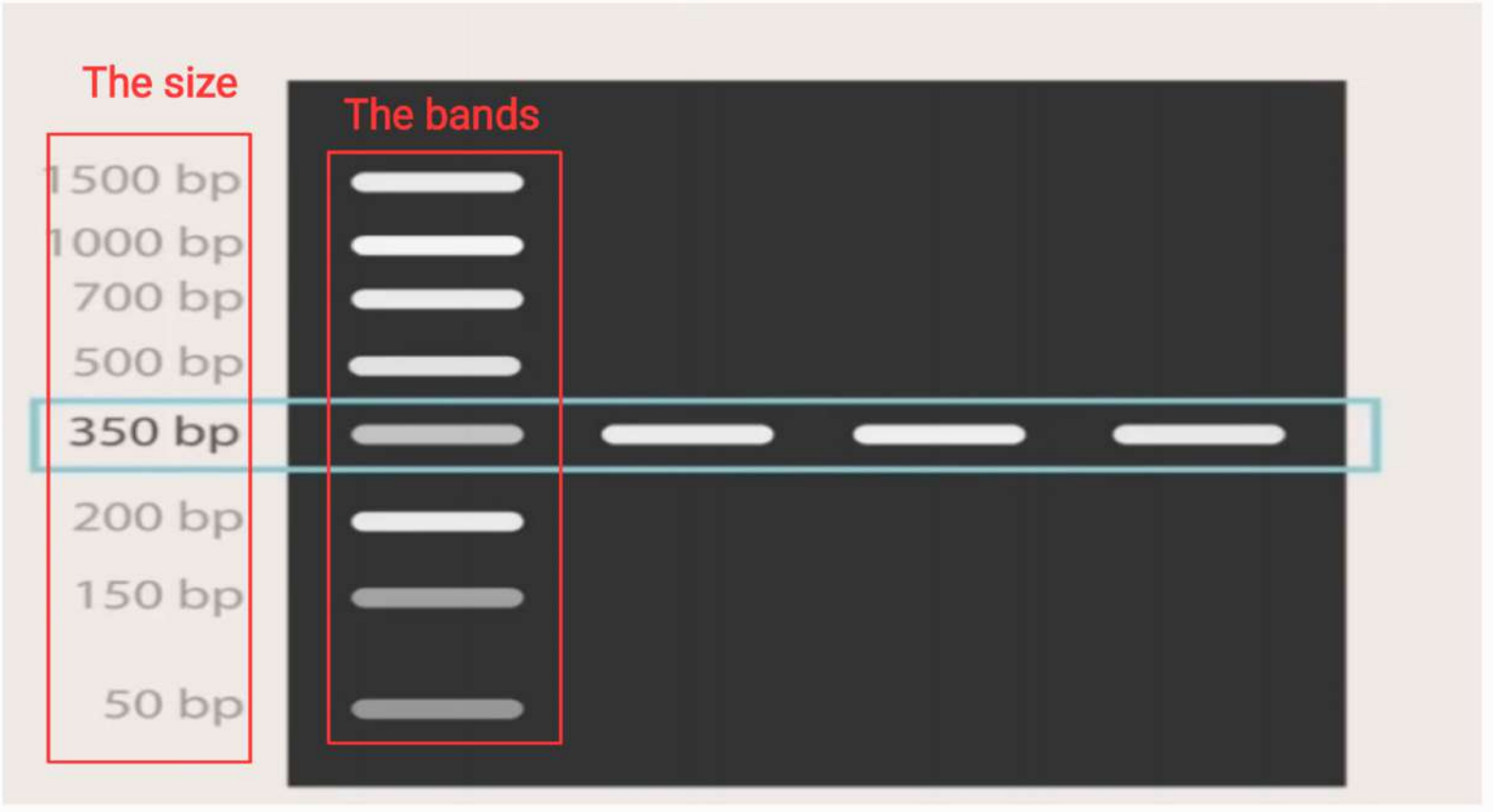
هس قبل ما يبرد الجيل لازم اعمل فيه ثقوب طولية مشان احط فيها عينات ال DNA و الثقوب هاي بسميها wells مثل الصورة الي تحت و انتبهوا كيف ال DNA بيمشي لل positive charge





Negative Electrode
Buffer
Samples
Gel
Positive Electrode
Direction of current flow





هس الشركات بتعطيني اشي اسمه DNA ladder بحقنه في وحدة من ال wells الي عملتها قبل شوي او الثقوب و بعد ما اشغل الجهاز بيعطيني bands كثيرة زي الصورة الي فوق ، كل band منها اله size معين مثلا 50 base pairs او 100 base pairs

ليه ؟ مشان يكوّنوا الي المسطرة الي حأقيس عليها ، يعني انا دلوقتي حطيت ال ladder و ال electrophoresis فصله الي إلى bands ، و همي molecules معلومين الحجم ، فلما اوصلها بالجهاز بتنفصل نسبة إلى الحجم بتاعها

هس بعد ما احقنهم بحقن الجين الي بتاعي في well ثاني غير الي حقنت في ال ladder و انا كنت حاسب انه الجين الي معي 50 base pairs

فالمفروض يوقف عند 50 ، لو وقف عند 50 يعني كل الخطوات الي عملتها صح ، لو وقف بمكان ثاني في خلل

العينات بحقنها بصبغة ال acetyl promide مشان تبين و هذه المادة mutagen و خطيرة، لهيك لازم البس عدة وقاية مثل القفازات و القناع
هس كل well بحط فيها عينة ، و كل عينة بكون عاملة الها amplification ل segment واحد أو اثنين ، لو اني عاملة ل segment واحد رح يظهر الي band واحد فقط ، لو ل ٢ رح يظهر الي 2 bands
لو حطيت عينة انا عاملة فيها amplification ل segment وحدة و ظهر الي 2 bands معناها في خلل في وحدة من الخطوات
بس هس لو حطيت primer بيطلع الي segment ل 50 base pairs و طلع عندي 150bp مثلا ، معناته في خلل في تصميم ال primer فقطع في مكان غير الي انا بدي اقطع عنده

هس انا بقدر اعمل pcr لفايروس كورونا ؟ فايروس كورونا هو RNA virus و ال pcr لل DNA فهل بقدر اعمل اله ؟ الجواب نعم عن طريق اني اولا بعمل reverse transcription و الي بحوله ل DNA عبر انزيم اسمه reverse transcriptase و ال pcr هون بصير اله اسم ثاني و هو Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)
و هو يستخدم للفحص اذا الشخص مصاب او لأ ، هس لو طلع product معناته انا في عندي virus لو ما طلع معناته ال reverse transcriptase ما لقى اشي يحوله
يعني ال RT-PCR يستخدم في فحص ال viral infection

Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

- Refers to utilization of mRNA for the formation of target DNA using **reverse transcriptase enzyme**.
- Essentially normal PCR is preceded by reverse transcription (to convert the RNA to cDNA). This is widely used in expression mapping, determining when and where certain genes are expressed.
- **Presence of HIV RNA in blood can be detected as early as 4 weeks after infection.**

ال cDNA يعتبر DNA جاي من ال RNA

في كمان بستخدم ال RT-PCR في ال expression mapping ، يعني ايه ؟
يعني انا عايز اعرف الجين بيحصل اله expression او لأ ، يعني بطلع mRNA او لأ ، فبدل ما اعمل DNA extraction بعمل RNA extraction لكل ال RNA الي في الخلية و اعمل اله RT-PCR
لو النتيجة طلع انه في product يعني النتيجة positive يعني فيه mRNA يعني فيه expression
لو ما طلع فيه product اعكس الي فوق
ال RT-PCR بيساعدني اني اعمل detection لكثير RNA virus زي Corona virus و HIV virus بسرعة و بدقة accurately and rapidly

- There are three types of HIV tests: **antibody tests, antigen/antibody tests**, and **nucleic acid tests (NAT)**.
- An **antibody test** looks for antibodies to HIV in your blood or oral fluid.

هس الشخص لو عنده chronic HIV فهذا يعني انه جسمه كوّن antibodies لل HIV فأنا بفحصها ، و هذا الاختبار ما بقدر اعمله الا لما يكون المرض اله فترة صاب الشخص و كوّن antibodies بكمية انا اقدر اعمل الها detect و يمكن الموضوع يوخذ ل 3 اشهر او اكثر

- An **antigen/antibody test** looks for both HIV antibodies and antigens.
- A **NAT** looks for the actual virus in the blood.

الادق و الأحسن هو ال NAT لانه بيعمل Detect لل RNA بتاع ال virus شخصيا مش دلالات المرض و هو سريع مش زي تاع ال antibodies الي بيقعد تقريبا ٣ اشهر او اكثر

- **Can an HIV test detect the virus immediately after exposure?**
- No HIV test can detect HIV immediately after infection. That's because of the window period—the time between HIV exposure and when a test can detect HIV in your body. The window period depends on the type of HIV test. A nucleic acid test can usually detect HIV the soonest (about 10 to 33 days after exposure).

نفس الاشي لل hepatitis C لو بدي استنى ال antibodies تظهر الموضوع رح يتطلب ٣ اسابيع او اكثر ، اما من خلال ال RNA مباشرة بدك اسبوع لأسبوعين ان طارت

- If you've been exposed to hepatitis C, it takes about 1-2 weeks for viral particles (called HCV RNA) to be found. Hepatitis C antibodies appear after RNA is detectable and can take 3-12 weeks to appear.

في ناس بصير عندهم hepatitis C و ال immunity عنده بسبب جينات معينة بتقدر تتغلب على هاد المرض و تكوّن ضده antibodies كإنه ماخد vaccine ضد ال hepatitis C (طبعاً لحد هلأ ما في مطعوم لل hepatitis C) المهم هدول الناس إذا راحو يعملو test لل hepatitis C بطلع positive فبفكر انه مصاب بس هو فعلياً لا ، فلازم يعمل PCR عشان يتأكد