النادي الطبي

Genetics

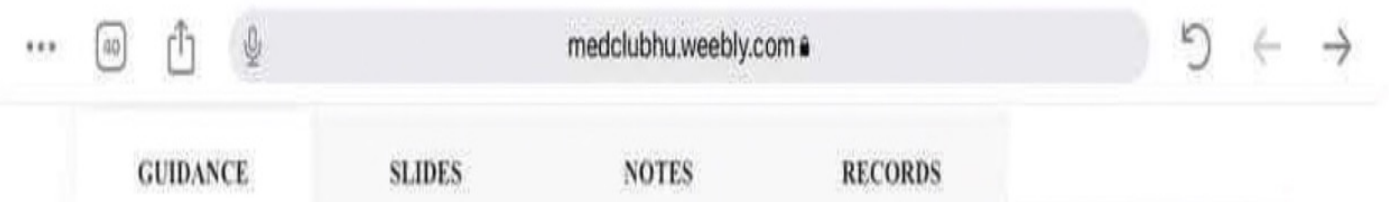
Subject : PCR part 2

Lec no : 29

Done By : Maria hood

Noor zamel   تدقيق :

وَقُل رَّبِّ زِدْنِي عِلْماً



تجدون في guidance مادة الجينتكس على موقع النادي :

للوصول الى guidance الجينيتكس و تفاريغ المادة كاملة :

شرح الدكتورة ولاء الجزار للمادة

كل اعمال الفريق العلمي تنشر على قناة التيليغرام

(Real time PCR)

كتير ادق من ال conventional PCR

Quantitative PCR (Q-PCR)

- Used to measure the quantity of a PCR product (commonly in real –time) QRT-PCR. It quantitatively measures starting amounts of DNA, cDNA or RNA.

- Quantitative real time PCR has a very high degree of precision.

- QRT-PCR methods use fluorescent dyes or DNA probes to measure the amount of amplified product in real time.

بدل ال primer

هس الي كنا نحكي عنه قبل شوي مشان ال RNA اسمه conventional و هو بس بيعطيني يا positive يا negative يعني يا في virus يا لأ ، و هو يستخدم للأبحاث
بس ساعات انا بكون بدي اعرف ال quantity بتاعت ال virus قد ايه ، يعني فيه بس كمن virus و لا في منه كمية كبيرة ، يعني بدي اطلع رقم فبستخدم ال Q-pcr او ال real time pcr
و فكرته زي الي قبل شوي بس ال product ما بمشيه على gel
و انا بعمل ال reaction بكون واضع في ال tube صبغات مشعة ، و بإستخدام كاميرات و اجهزة حديثة بحسب الانبعاثات من ال fluorescent dyes ، فبتبلش الأجهزة ترسم curve حسب الانبعاثات و بتطلع اول ما يصير فيه amplification و الكمبيوتر بيعمل analysis لل curve و بيعطيني رقم
هس كل ما زادت كمية الفيروس كل ما قدرت اعمل اله detection اسرع ، كمية الفيروس بقول عليها viral load ، كل ما زاد ال viral load كل ما اني اكتشفته في cycle أبكر مثلا في cycle رقم ٥ لو كان قليل لازم يتكاثر مشان يعمل الجهاز detection اله و ممكن هذا الاشي مثلا ما يبين الا بال cycle رقم ١٥ مثلا مثلا

استخدامات ال PCR

Clinical Applications of PCR

اي اشي فيه Genetic material

• 1. Diagnosis of bacterial and viral diseases:

In early phases of tuberculosis, the sputum may contain only very few tubercle bacilli, so that usual acid fast staining may be negative. But PCR could detect even one bacillus present in the specimen. Any other bacterial infection could also be detected similarly. The specific nucleotide sequences of the bacilli are amplified by PCR and then detected by Southern blot analysis.

- Reverse PCR is widely used in the diagnosis of viral infections like **Hepatitis C**, and **HIV**.

زمان الناس الي كان عندها TB كان مشان نعمل diagnosis كنا نجيب ال sputum بتاع ال patient و الي بكون فيه ال bacilli بتاعت ال TB فبناخذها و بنعمل الها فحوصات في اللاب .
فزمان كانوا مشان يقدروا يعملوا detection لازم المريض يكون عنده كميات كبيرة من ال bacilli في ال sputum
فالناس قديما ما كانت تقدر تعمل detection للمرض في مراحله الأولى الا اذا صار المرض اله فترة في الجسم و صار في كثير bacilli فكان يتأخر ال detection
اما الان و بإستخدام ال pcr بحتاج فقط bacilli واحدة مشان اقدر اعمل detection للمرض
ومتل ما حكينا المحاضرة الماضيه بساعدنا في تشخيص الفايروسات متل HIV و Hepatitis C

• 2. Medicolegal cases:

توضيح هاي النقطه بسلايد 5

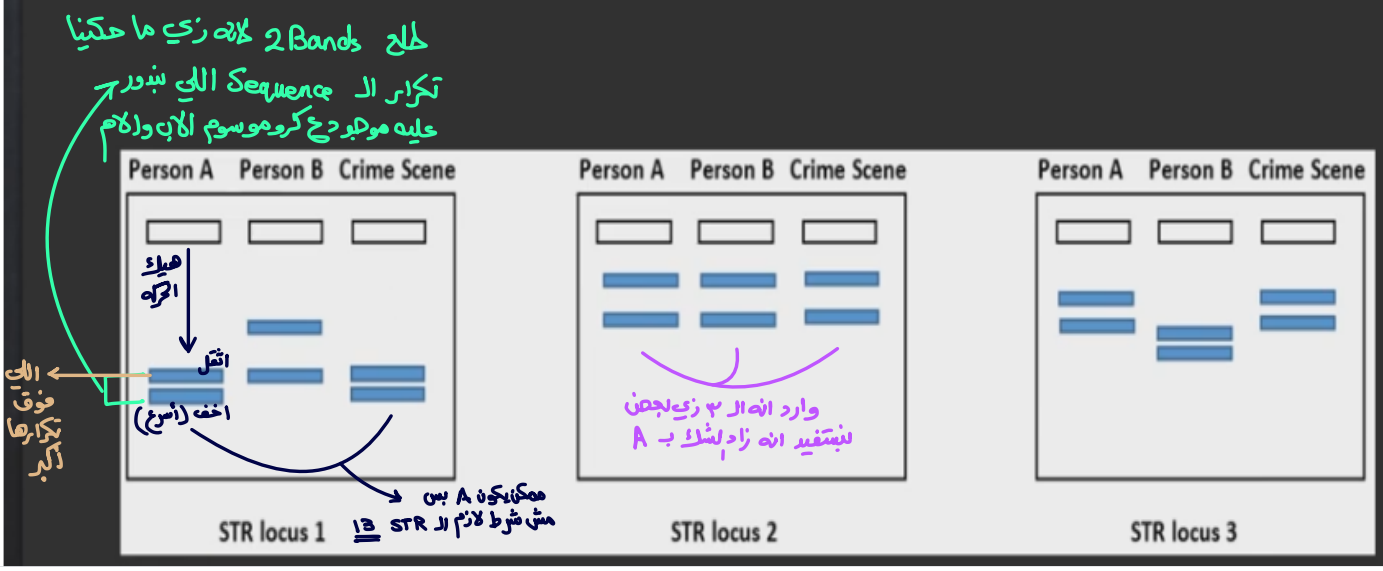
❖ DNA profiling (DNA Finger printing)

- Modern-day DNA profiling is also called **short tandem repeat (STR) analysis.** It uses the polymerase chain reaction (PCR)to produce many copies of specific STR sequences.
- In STR analysis the primers used in the PCR are designed to attach to either end of the STR sequence of interest.

- Short tandem repeats (STRs) are short tandemly repeated DNA sequences that involve a repetitive unit of 2-6 bp with the number of repeats varying among individuals, making STRs effective for human identification purposes.

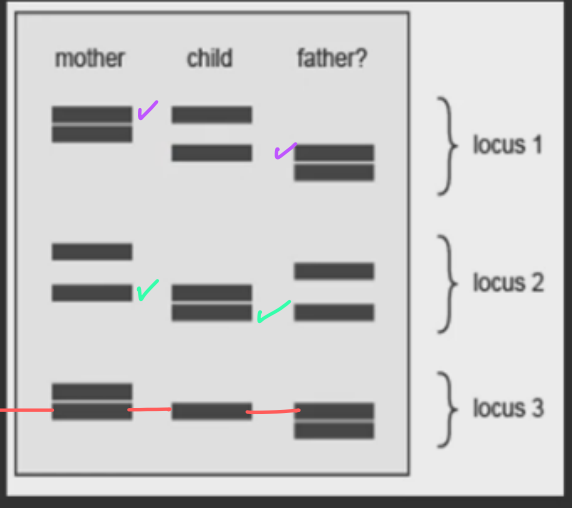
DNA Fingerprinting

You have performed STR analysis on your 3 DNA samples for 3 different loci (see below). **Do either of your suspects match the crime scene sample? How do you know?**



DNA Fingerprinting

A woman is suing her former lover for child support, but he claims that he is not the father of her child. An STR analysis was performed for the case and is shown below. **Whose claim does the analysis support? How do you know?**



لناس الي بيشتغلوا بالطب الشرعي دائما بيشتغلوا مع ال pcr ، احنا عنا حاجة اسمها DNA profiling ، احنا مشتركين بال DNA بتاعنا ب 99.9% و 0.01% هو الي بيكون الفرق بيناتنا بال DNA فهذا هو ال DNA profiling
بصمتك الوراثية بتعتمد على sequences كثير في ال 0.01% هذول ، وواحد من هذول ال sequences اسمها short tandem repeat و هو تقريبا عبارة من 2 إلى 6 necleotides و همي randomly repeated يعني عدد مرات تكرارهم بيختلف من شخص لآخر و همي متكررين ورا بعض زي عربات القطار ، الي بيختلف من شخص لآخر هو مقدار التكرار لهذا ال sequence يعني مثلا GC GC GC GC
بس الشخص عنده كروموسومين ، واحد من الاب وواحد من الام ، نحكي مثلا الكروموسوم من الام ممكن يكون فيه متكرر مرتين و الاب ٣ مرات ، و كان الي متكرر عندي مثلا GC فبكتبه بهاي الطريقة (GC 2 3) يعني متكرر بالكروموسوم الأول مرتين و بالثاني ٣ مرات
مش شرط بس GC يمكن يكون TG و غيره و ممكن يكون متكرر في regions مختلفة و هذا الاشي اله تطبيقات كثيرة
مثلا في مسرح الجريمة لقينا نقطة دم و في قتيل ، القتيل دا لقينا تحت ظوافره cells بترجع لواحد من المشتبه بهم و في نقطة دم بالمكان ، فأنا رحت درست ال short tandem repeat للعينات الي حصلت عليها (طبعا ال FBI بيدرسوا ١٣ STR للعينة الواحدة) بوخذ ال blood sample من المشتبه به و بقارن ال ١٣ عينة (لو وحدة ممكن تتكرر بس ١٣ مستحيل)
و نفس الشيء لمشاكل الابوة و البنوّة
متى تكون ال STR متشابهة و متطابقة ؟ لما يكونوا Identical twins (في قضية في ألمانيا واحد عمل جريمة و ما قدروا يحددوا مين الجاني لأنهم كانوا Identical twins و أخذوا براءة مع انهم عارفين انه واحد منهم هو الجاني)

3. Diagnosis of genetic disorders:

اي دراسه ع اي جينات لازم نعمل PCR

The PCR technology has been widely used to amplify the gene segments that contain known mutations for diagnosis of inherited diseases such as sickle cell anemia, beta thalassemia, cystic fibrosis, etc.

و بكون عن طريق اني استخدم primer مخصص لل mutagen

4. PCR is especially useful for prenatal diagnosis

of inherited diseases, where cells obtained from fetus by amniocentesis are very few.

ال parental diagnosis بكون عن طريق انه و الشخص لسا في بطن أمه و عايز اعرفها عنده genetic disorder فبعمل حاجة اسمها amniocentesis ، بدخل الإبرة في بطن الام و بوخذ عينة من ال amniotic fluid الي حول الطفل ، لأنه لو اوخذ sample من الطفل مباشرة رح يتعرض للخطر و ممكن يصير اجهاض

5. Cancer detection:

PCR is widely used to monitor residual abnormal cells present in treated patients. Similarly identification of mutations in oncosuppressor genes such as p53, retinoblastoma gene, etc. can help to identify individuals at high risk of cancer

6. Fossil studies:

مش مهم كثير

دراسة الحفريات

DNA can be isolated and PCR amplified from fossils and is used to study evolution by comparing the sequences in the extinct and living organisms.

ال cancer detection: بعد ما الشخص يتعالج بدي اتأكد إذا في بقايا في جسده ، خلايا السرطان عندها expression pattern مختلفة و ممكن تعمل expression لجين اكثر من الباقي، فبروح بجيب ال mRNA و بحوله ل DNA و بعديها بحط primer للجين الي بيعمل protein product مختلف عن الباقي ، انا مش مهتم بال protein product قد ما انا مهتم اعرف ال cell بتعمل express للجين دا الي بدل على السرطان و لا لأ هس بعد ما اوخذ ال mRNA و احوله ل DNA، بحط primer للحاجات الي انا عايز اشوفها ، فلو عمل expression يعني لسا في cancer cells
طبعا احنا قبل ما نعمل ال pcr بنكون عارفين انه هذا ال cancer بطلع هذا النوع من ال protein، فبنحط primer بتاع ال mRNA الي بطلع البروتين دا
و يستخدم في ال cancer prediction يعني اتوقع اذا بصير في cancer او لأ اي جين انا عارفه لما يبقى mutated بيعمل نوع من انواع ال cancer ، و بكون عارف ال sequence بتاعه فبروح بجيب primer للجين الي انا عايزاها و بعمل amplification لو طلع الي نتيجة يعني mutated يعني مش سليم

هادولكي ما ناقشته الدكتورة

اذا بدي اعرف حالة ال expression للجين ، مثلا انا وياك عملنا pcr لنفس نوع الجين و انا طلع عندي النتيجة ١ مثلا و كان هذا ال normal ، بس الي معك عمل expression ضعفين الي فهذا صار over expression، و ممكن الجين الي بتاعك ما يكون شغال اصلا و بسمي هاي الحالة down regulation او under expression

زي المثال اللي حكينا المحاضرة الماضيه عن قياس ال expression تاع الانسولين من البنكرياس رحكينا انه بكون عن طريق reverse transcriptase PCR

7.Quantification of gene expression.

8.Tissue typing for transplanting, by PCR and detection of genetic variants.

- A very specific set of genes is examined when DNA testing is used for tissue typing. On chromosome 6 resides a large set of genes in the so called "Major Histocompability Complex," or MHC. These genes are very polymorphic (different) between individuals, and they code for the production of specific glycoprotein antigens located on the surface of many cells called the "human leukocyte antigens" or HLA.
- It is these antigens that allow our immune system to "recognise" our own organs and tissues from those of another individual. These antigens have the ability to provoke an immune system response that results in organ or tissue rejection if the tissue looks foreign.
- In tissue typing, the genes for a number of different HLA molecules are carefully compared between donor and recipient to ensure that they are as similar as possible to minimise the chance of a rejection.

بسلايد ٤

9.In sex determination of embryos, also useful to detect sex-linked disorders in fertilized embryos.

هس لما تيجي تزرع كلية او كبد رح تواجهك مشاكل ، المشاكل هاي ما بتكون في ال procedures بتاعت الزراعة ، المشكلة انه بصير فيه rejection (رفض) بعد عملية الزراعة ، يعني ال immune cells بتبلش تهاجم ال organ الجديد الي دخلته على ال patient

هس الجين ما بهاجم ال organs بتاعته لانه في على سطحها بروتينات اسمها human leakocytes antigens بتخلي الجسم يتعرف عليها انها خاصة فيه

لما يلاقي الجسم antigens مختلفة بعتبرها foreign و يهاجمها، و هذا هو السبب في فشل اغلب عمليات ال implantation

على الكروموسوم رقم 6 في complex من الجينات اسمه major histocompability و هذا ال MHC complex اله خاصية انه very polymorphic يعني مختلفين من الواحد للثاني بيطلعوا نفس نوع ال protein بس ال sequence بتاع ال DNA مختلف شوية من واحد للثاني

هذه الجينات بتطلع بروتينات نوعها glycoproteins يعني بروتين معه حتة carbohydrates و بتكون غالبا ال surface بتاعت ال cell و اسمها هو "human leukocyte antigens" or HLA بتشتغل ك antigens على ال surface بتاعت ال cell ، الجسم بيتعرف على ال cell بتاعتي عن طريقها

لو دخل tissue اله HLA مختلف لو بشكل بسيط بيصير اله rejection
هس لما اعمل tissue typing قبل ما المريض اعمل اله transplant بروح بجيب متبرع donor،
فأنا بخليهم يجيبوا donor من اقارب الدرجة الأولى، فبروح بجيب أقاربه و بندرس جيناتهم و
نجيب المتبرع الي جيناته شبيهة بجينات المتلقي على قدر الإمكان(بس ما رح تكون 100%)
بحيث حتى لو صار rejection يكون ضعيف و بقدر بمثبطات المناعة الي بيوخذوها الناس في
الفترة دي اني اهدي ال immune reaction لحد ما الجسم يتقبلها
و آخر نقطة من ال applications هي تحديد جنس المولود حتى و هو لسا empryo ، ليش مهم
اعمل تحديد لجنس المولود ؟ لانه في أمراض genetic diseases related to sex
و بعمل هذا الاشي عن طريق اني اعمل amplification لبعض ال genes الموجودة على ال Y
chromosome لو لقيتها الجنين ولد ، لو ما لقيتها بنت

توضيح نقطة ٩
ال PCR بساعد في معرفة جنس المولود في حالة الابوين كانو بدهم يعرفوا جنسه قبل الشهر الرابع
لاسباب معينه احدها امراض وراثيه بالعائلة بتصيب جنس معين مثلًا

HYBRIDIZATION AND BLOT TECHNIQUES

فكرته انه بدنا ناخد segment معين من ال DNA عن طريق اشي بنسميه probe
بيشبه ال primer بنعمله مكمل لل segment اللي بدنا نستخرجه

من اسمها بستخدم حاجة hyperdized شبيهة لل primer اسمها probe ، ال sequence بتاعها
complementary لل sequence بتاع ال DNA و ال RNA الي انا بدور عليها

PROBES

- **How can the DNA sequence of interest be picked out of a mixture of thousands or even millions of irrelevant DNA fragments?**

- The answer lies in the use of a probe (a single-stranded sequence of DNA or RNA of variable length used to search for its complementary sequence and can be radioactively or fluorescently labeled to allows its binding to be visualized).

لو انت عندك sequence من ال DNA موجود وسط آلاف ال sequences من ال DNA فكيف اعمل pick up اله ؟
بروح بصنعله probe و يفضل يكون مشع كدا (radioactive) بحيث اول ما يمسك كدا يعطيني signal و انا بقدر to detect ال sequence بتاعي
من الاشعاع اللي حيطلع

Hybridization of a probe to DNA fragments

قبل ما نحط ال probe لازم نفصل ال strands عن طريق اني احطه ب alkaline media

- The utility of probes hinges on the phenomenon of hybridization (or annealing) in which a probe containing a complementary sequence binds a single-stranded sequence of a target DNA.
- ssDNA, produced by alkaline denaturation of dsDNA, is first bound to a solid support, such as a nitrocellulose membrane. The immobilized DNA strands are prevented from self-annealing, but are available for hybridization to an exogenous, radiolabeled, ssDNA probe.