النادي الطبي

Genetics

Subject : PCR part 3 + DNA sequencing

Lec no : 31

Done By : Maria hood

تدقيق: Noor zamel

وَقُل رَّبِّ زِدْنِي عِلْمًا

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

بهاي المحاضرة رح نكمل الجزئية الاخيرة اللي ضلت من محاضرة 29 عن ال PCR ورح نحكي عن ال DNA sequencing

HYBRIDIZATION AND BLOT TECHNIQUES

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).

عشان نميزهم

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

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.

اله اكتر من نوع رح نحكي عن ٣ أنواع

Blotting techniques

Southern Blot Technique:

- It is based on the specific base pairing properties of complementary nucleic acid strands. This technique is therefore based on * **DNA hybridization.** → Complementation بحقرع ال
- The blot technique was developed by EM Southern in 1975. This is used to *detect a **specific segment of DNA in the whole genome.***

هس في هاي التقنية اول اشي بيتم تقطيع ال DNA إلى قطع عبر ال restriction endonucleases بعديها بوخذ ال segments و بجريها على gel و بعديها electrophoresis فبتمشي حسب ال size
هس مش القطع الي بتجري دي مش double strand ؟ طب هس لو حطيت معاها ال probe الي probe حيرتبط ازاي ؟
فبدي اعمل خطوة ال denaturation و افصلهم عن بعض بس مش بال heating
انا هروح اوخذ ال gel بتاعي و احطه في alkaline medium و بيقوم بنفس عمل ال heating

- DNA is isolated from the tissue.
- It is then fragmented by **restriction endonucleases.**
- The cut pieces are **electrophoresed on agarose gel.** It is then treated with NaOH to denature the DNA, so that the pieces become single-stranded. (NaOH → alkaline media للفصل)
- This is then **blotted (adsorbed)** over to a nitrocellulose membrane. The single-stranded DNA is adsorbed in the nitrocellulose membrane.

بعدين بعمل blotting يعني لُطَعَة او لُطْخَة يعني بجيب nitrocelluloce membrane شفاف كدا و بروح حاطاه فوق الجيل فبتروح ال DNA fragments و بتلزق بال membrane الي حطيته فوق ال gel دا ، زي كأنه لطعتها او لطختها بال membrane كدا فبروح واخدة ال membrane الي لاطعاه و بحطه في plastic bag *و معاه ال probe الي بيكون complementary ل sequence الي انا عايزاه

و آخر اشي بحط x ray film فوق العينة اذا ال probe مسك بال fragment الي انا عايزاه بيطلق Radiation و بترك علامة على ال film

حكينا عنه إنه radioactively labeled

- The DNA is then fixed on the membrane by baking at 80°C. There will be many DNA fragments on the membrane, but only one or two pieces contain the target DNA.

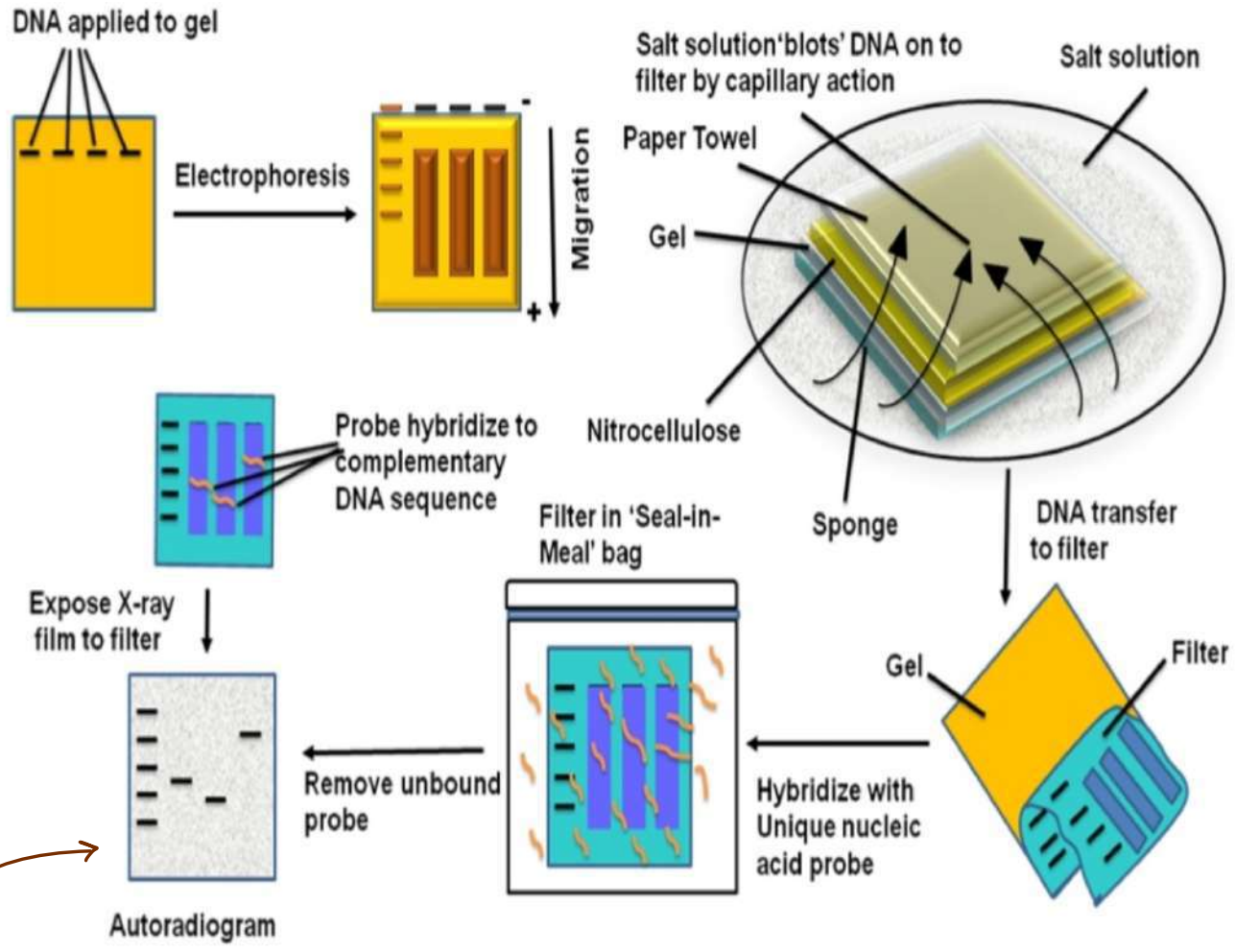
- The radio active *DNA probe is placed over the membrane.** If the target genes are present in the host DNA, the probe will detect the complementary nucleotide sequence in the host DNA. So the probe is hybridized to the particular pieces of host DNA.

- The membrane is then thoroughly **washed to remove excess probes.**

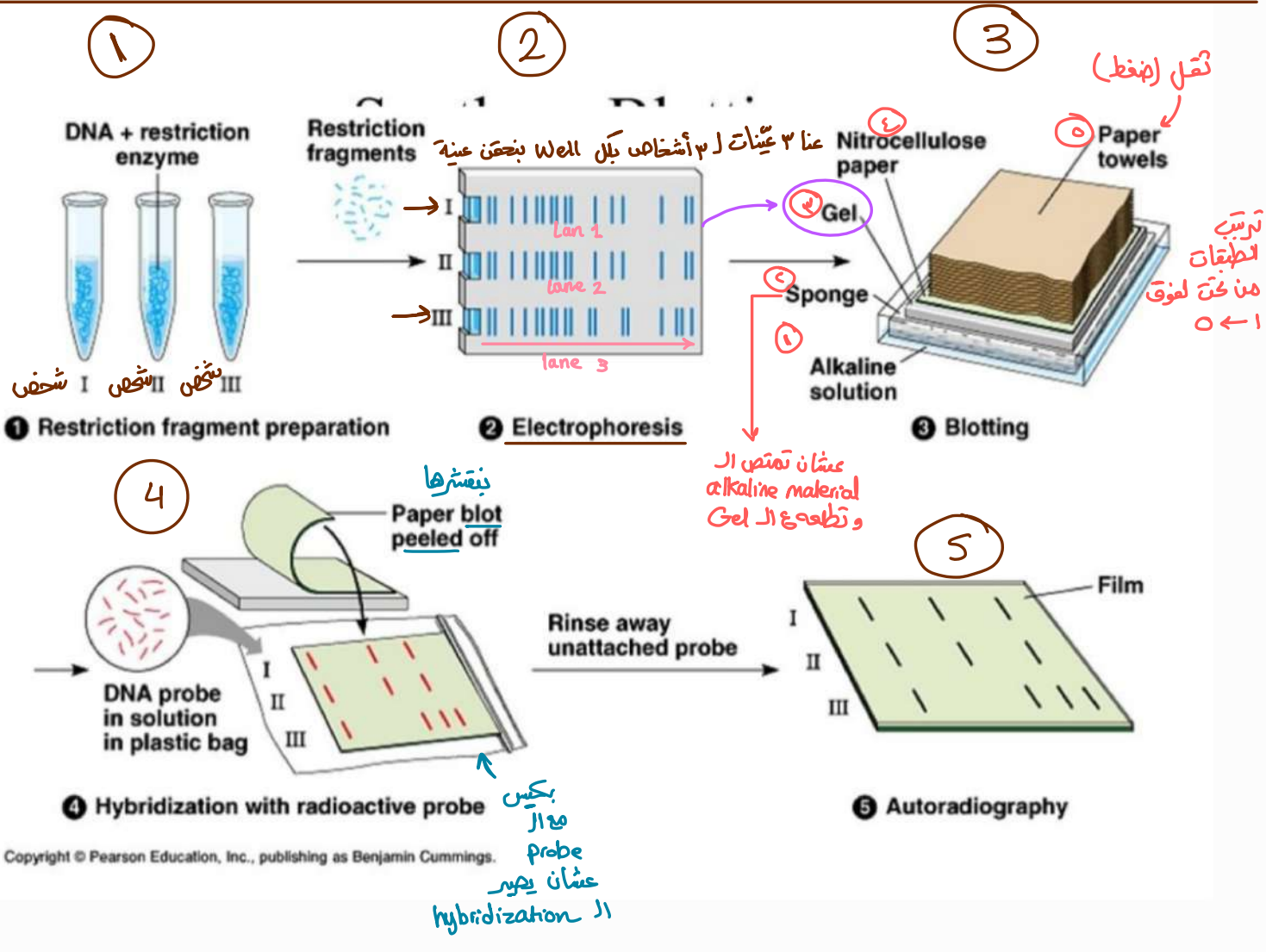
- **An** X-ray plate is placed over the membrane in the dark for a few days. The radiation from the fixed probe will produce its mark on the X-ray plate. This is called **autoradiography.**

هعطا سببين mutated genes فممكن تشخص يعمل probes لجين لمرض حتى تعمل Detection إله

- **Mutant genes** such as HbS, cystic fibrosis, DMD, PKU as well as presence of viral DNA (hepatitis virus B and C) can be identified by this method.



↓ هاي الرسمة أفضل بس هون أوضح جزء الـ X-ray



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

ال northern زي فكرة ال southern لكن لل RNA و نفس الخطوات بالزبط مشان اشوف ال gene expression

ال pcr اسهل و اسرع و كل حاجة لكن لا زال حتى الآن نستخدم ال blotting لأهداف بحثية

الفرق هون انه ال probe ممكن يكون DNA او RNA

ال DNA بكون في حالة صنعنا DNA من RNA وكنا نسميه cDNA ، فال probe برضو بنسميه cDNA probe

Northern Blotting for Identifying RNA:

- The Northern blot is used to demonstrate **specific RNA.** The total RNA is isolated from the cell, electrophoresed and then blotted on to a membrane. **This is then probed with radioactive cDNA (RNA-DNA hybridization) or RNA.**
- This is used to detect the gene expression in a tissue

فائدته

ال western مشان ال product النهائي الي هو البروتين (وليس nuclic acid) بس هون بستخدم antibodies (رح يربط معهم ال probe) ، و هذا النوع مهم كثير لانه ممكن يكون كل اشي صح بس ال protein بيطلعش لانه ممكن يكون في خلل بال translation و ما الا ذلك

ال pcr لا يغني عن ال western لانه ما بيعمل Detect لل protein

و في تقنية جديدة بتشبه ال western اسمها Elisa

Western Blot Analysis for Proteins

- In this technique, proteins (not nucleic acids) are identified.
- The proteins are isolated from the tissue and electrophoresis is done. The separated proteins are then transferred on to a nitrocellulose membrane.
- After fixation, it is probed with radioactive **antibody and autoradiographed.**
- This technique is very useful to identify the specific protein in a tissue, thereby showing the expression of a particular gene.

السمكة القوية هي التي تستطيع العوم ضد التيار، في حين يستطيع السمك الميت ان يعوم مع التيار!🐋

When you have a dream, you've got to grab it and never let go.🐅

المحاضرة سهلة نصيحة لا تضيعوا علاماتها ولا تنسوني من دعائكم 🙏

DNA sequencing

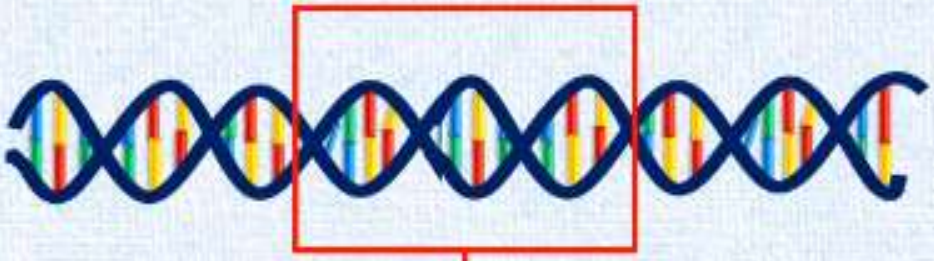
By

Dr. Walaa Bayoumie El-Gazzar

DNA sequencing

The technique by which the **precise order of nucleotides** in a DNA segment can be determined.

بطلعلي اياهم (سريعاً) مهمة الكلمة



5’ ATGCACTTGATC 3’

3’ TACGTGAACTAG 5’

وهاي شغلة متطورة جداً يعني اي detecting
لاي sequence سواء mutation or
genetic disease او غيره
اي اشي بدنا نعرفه عال genes بنعمله gene
sequencing على طول

سبحان الله والحمدلله والله اكبر

فكرة ال sequencing معقدة

Sanger:

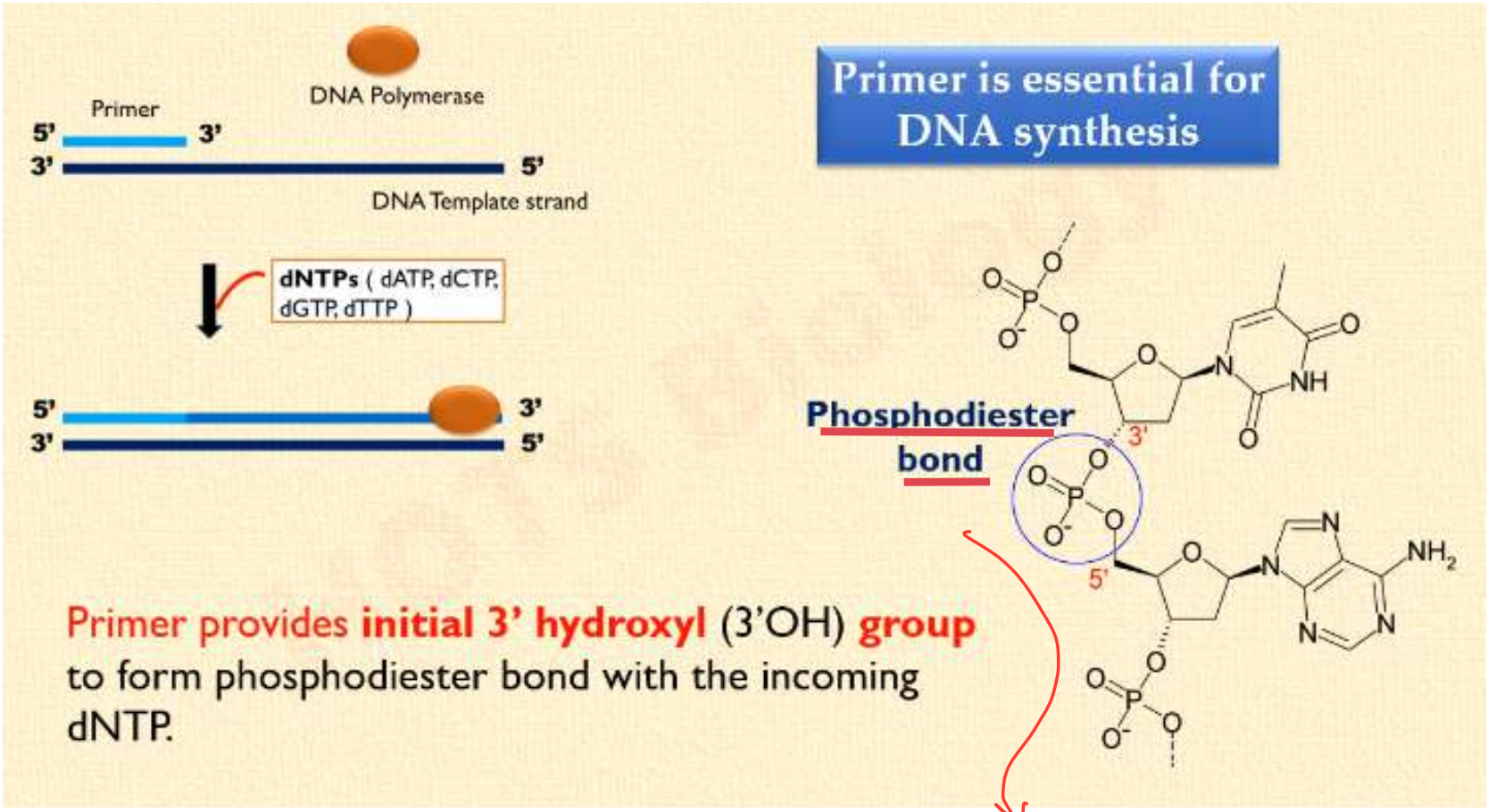
في ال 1977اكتشف كيف يقدر يشوف ال sequence تبع ال specific DNA segment والفكرة تبعته بناها على in vitro DNA synthesis يعني بناها على فكرة ال PCR (احنا عرفنا تفاصيل ال replication جوا الcell كيف بصير ومنها عرفنا نقلدها ونعمل برا الخلية يعني in vitro DNA synthesis) فهوه استغل الموضوع ليعرف ال sequence كيف ماشي

Sanger Sequencing

- Developed by **Frederick Sanger** and colleagues at University of Cambridge, 1977
- Involves *in vitro* DNA synthesis
- Based on the principle and biochemistry of DNA replication

استغفر الله العظيم وأتوب اليه

وانا ابني بالسلسة المكملة للnucleotide الtemplate رح يمسك بال primer من جهة ال 3'بالبداية



بين الكربونة رقم ٣ واللي فيها free OH عشان تيجي الnucleotide الجديدة بالفوسفات تبعها عند الكربونة رقم ٥ويمسك فيها

بالتالي هيه three prime five prime phoshphodiester linkage

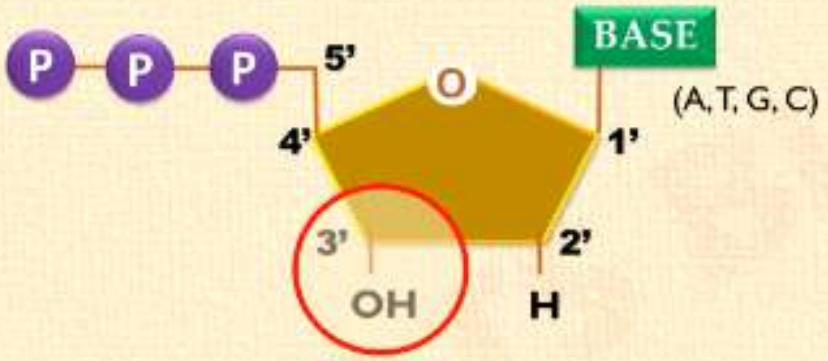
وهون sanger عمل modification للنيوكليوتيد اللي انا رح احطه اثناء عملية الpcr يعني حط اللي معدّل عليهم مع النيوكليوتيدات الطبيعيات في الtube في التجربة وقال هاي التجربة ممكن توقفلي الreaction والنيوكليوتيدات المعدلة هيه
Dideoxynucleotides triphosphate

طيب شو يعني هاد المصطلح ؟ يعني الكربونة رقم ٢ والكربونة رقم ٣ التنتين ما عليهم OH group

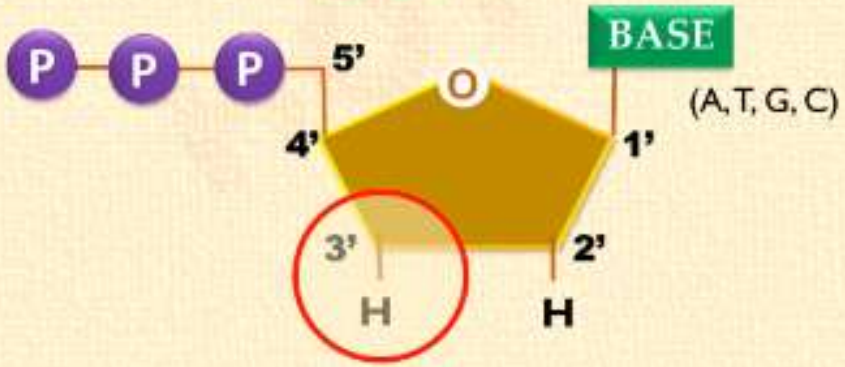
طيب النيوكليوتيدات العادية كانت عبارة عن شو ؟ كانت deoxy بس يعني الكربونة رقم ٢ هيه بس اللي ماكان فيها OH group

وفي حال حطيت الnormal and modified nucleotides in the tube التفاعل تبع الPCR رح يمشي عادي جداً بس أول ما تنحط الmodifiede nucleotide ال polymerase ما رح يعرف يكمل ليه ؟ لانه ال 3' end ما بزبط اي اشي يشبك فيها وانما لازم اجيب OH عشان النيوكليوتيد اللي بعدها تشبك فيها وهاي كانت فكرته انه اول ما تنحط الmodified التفاعل رح يوقف

Sanger DNA sequencing technique makes use of modified deoxynucleotides known as **DIDEOXY**NUCLEOTIDES.



Deoxynucleotide (dNTP)

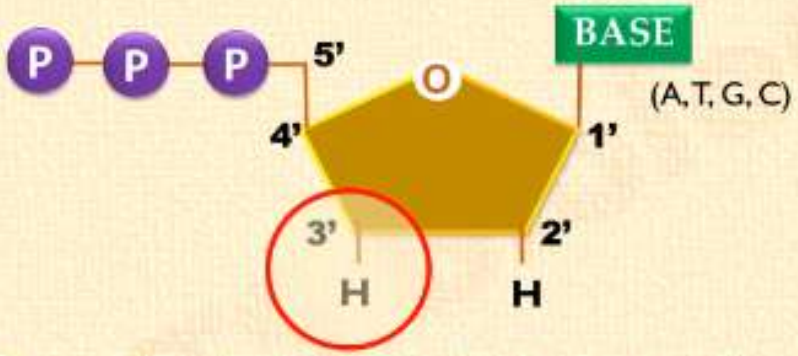


Dideoxynucleotide (ddNTP)

اللهم اعني على ذكرك وشكرك وحسن عبادتك

When a ddNTP is added in a DNA synthesis reaction…..

DNA synthesis will TERMINATE with the incorporation of ddNTP.



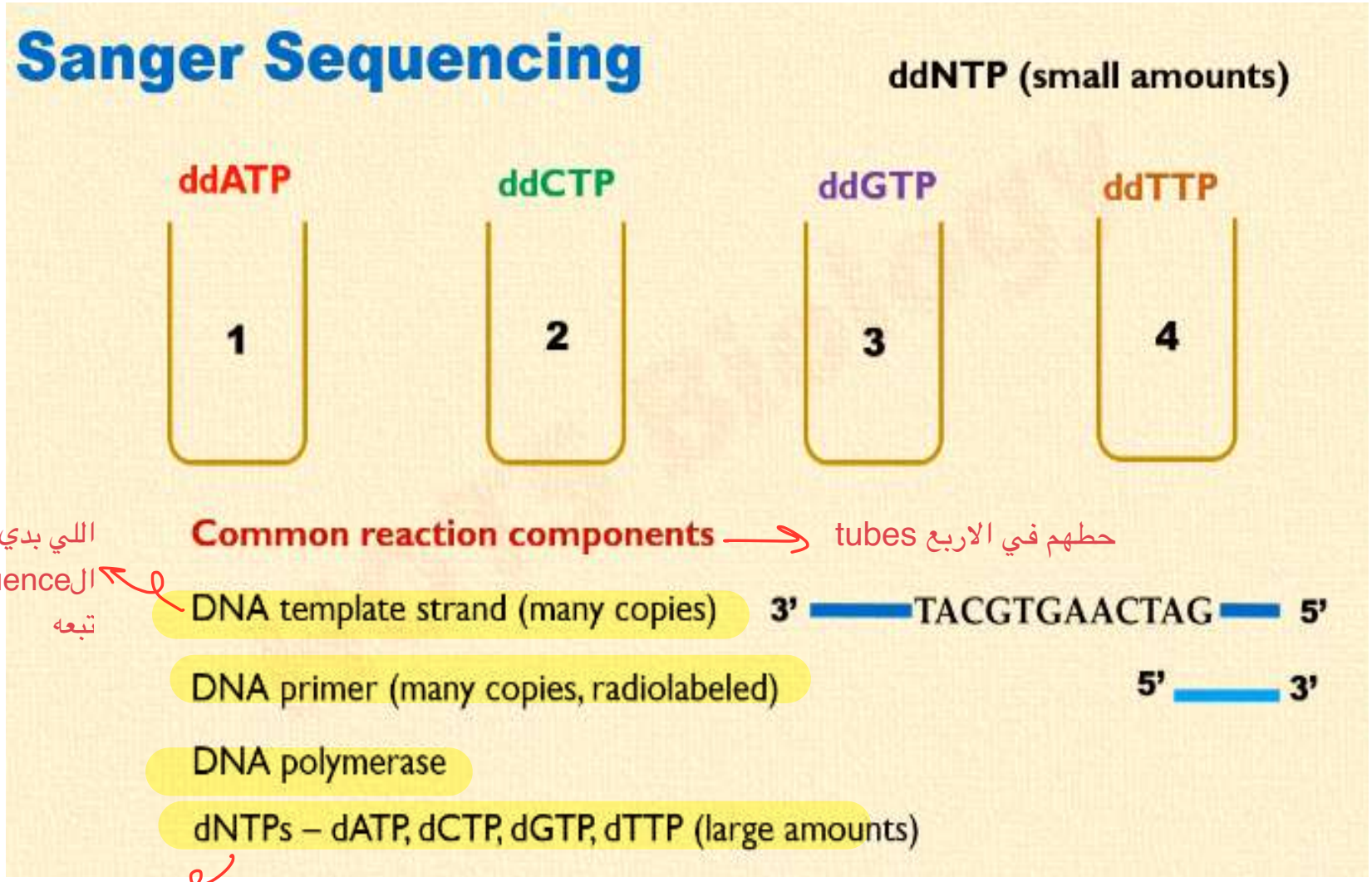
ddNTPs are also known as chain terminating nucleotides.

Sanger Sequencing is also known as chain termination method or dideoxy DNA sequencing.

لانه رح يوقف ال synthesis

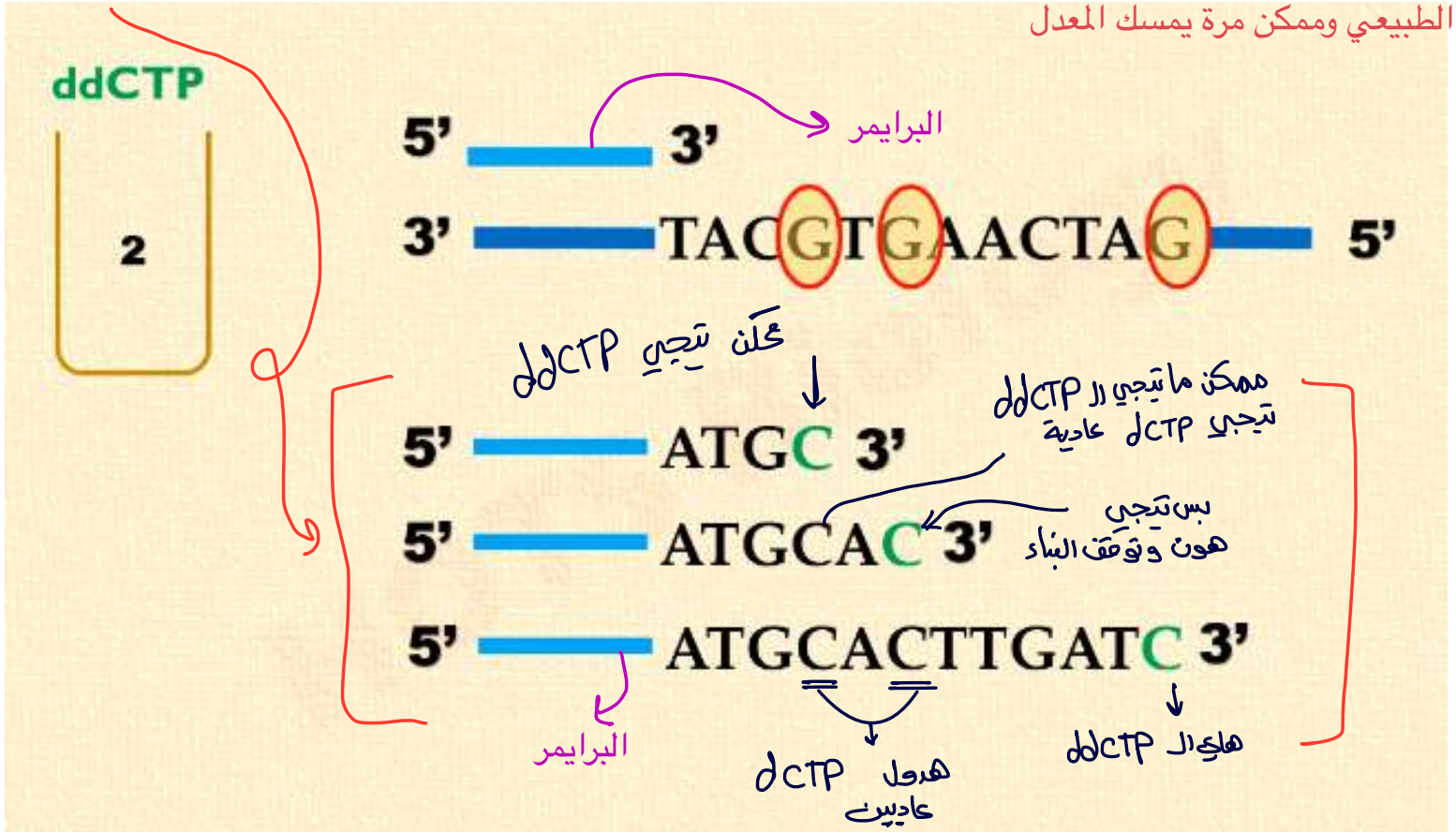
ورح نعمل هاد التفاعل اربع مرات يعني رح احتاج اربع tubes حتى بالاخر احدد الsequence of DNA segment

Sanger Sequencing



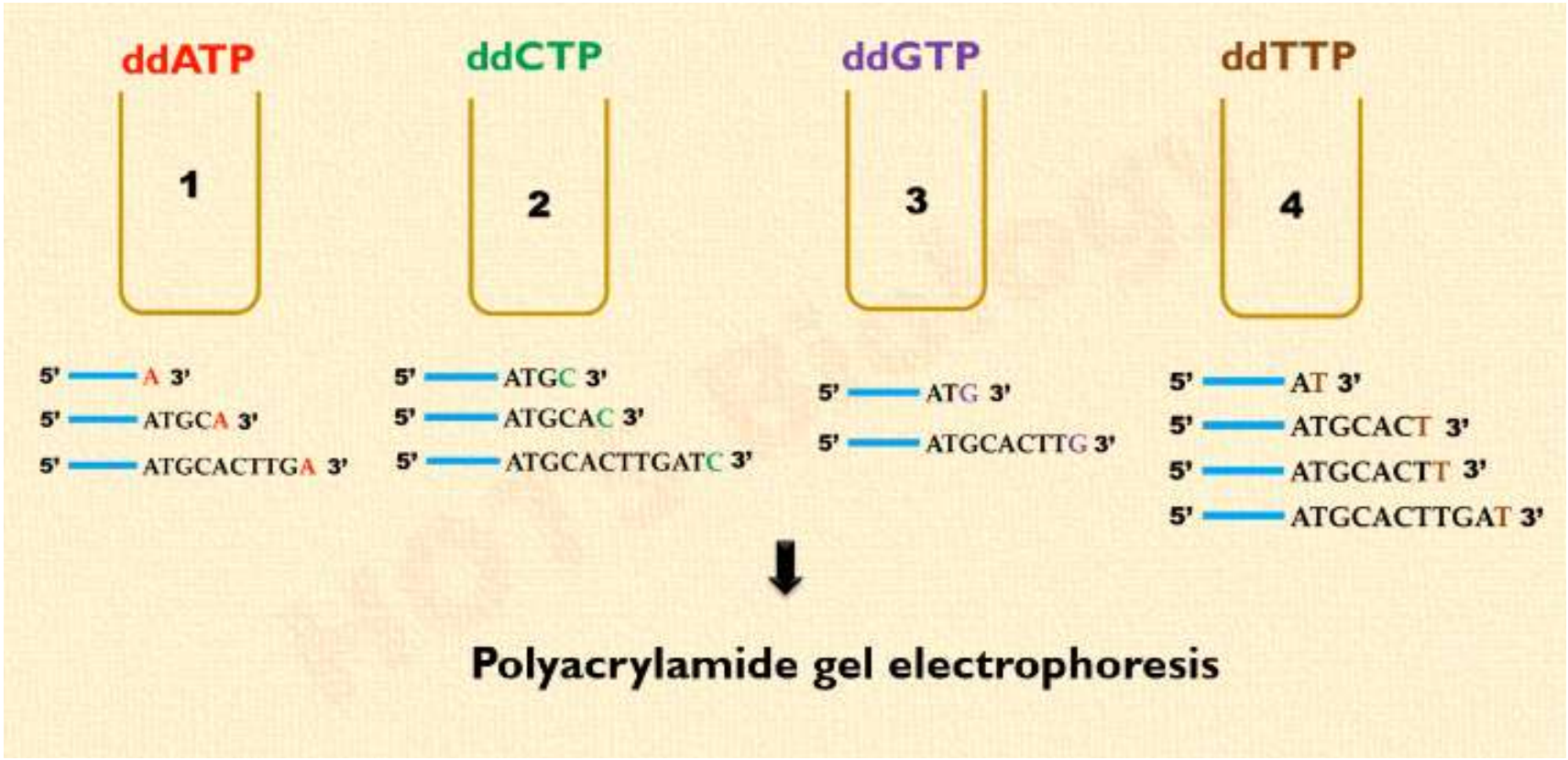
في كل مرة رح يكون عندي بالتسلسل الاصلي G ممكن يمسك فيها ddCTP ركزوا على كلمة ممكن لا ننسى انه عنا dCTP اللي هيه الطبيعية

لا ننسى انه عملية الPCR واحنا بنعملها بنعملها ملايين المرات لهيك بطلع عندي نواتج مختلفة زي ما احنا شايفين هون لانه ممكن مرة يمسك فيها الطبيعي وممكن مرة يمسك المعدل



بالاخر بعد ال PCR reaction الtube رح يكون جواتها many fragments that differ in their lengths يعني مختلفة الحجم و برجع بعيد ليه ؟ لانه في كل مرة بنعمل فيها amplification ال ddCTP بتمسك بمكان مختلف وما ببني بعده وبوقف بس الحلو انه كلهم الfragments اللي نتجوا نهايتهم cytosine احنا عن بنحكي عن السلسة الجديدة مو الtemplate انتبهوا.

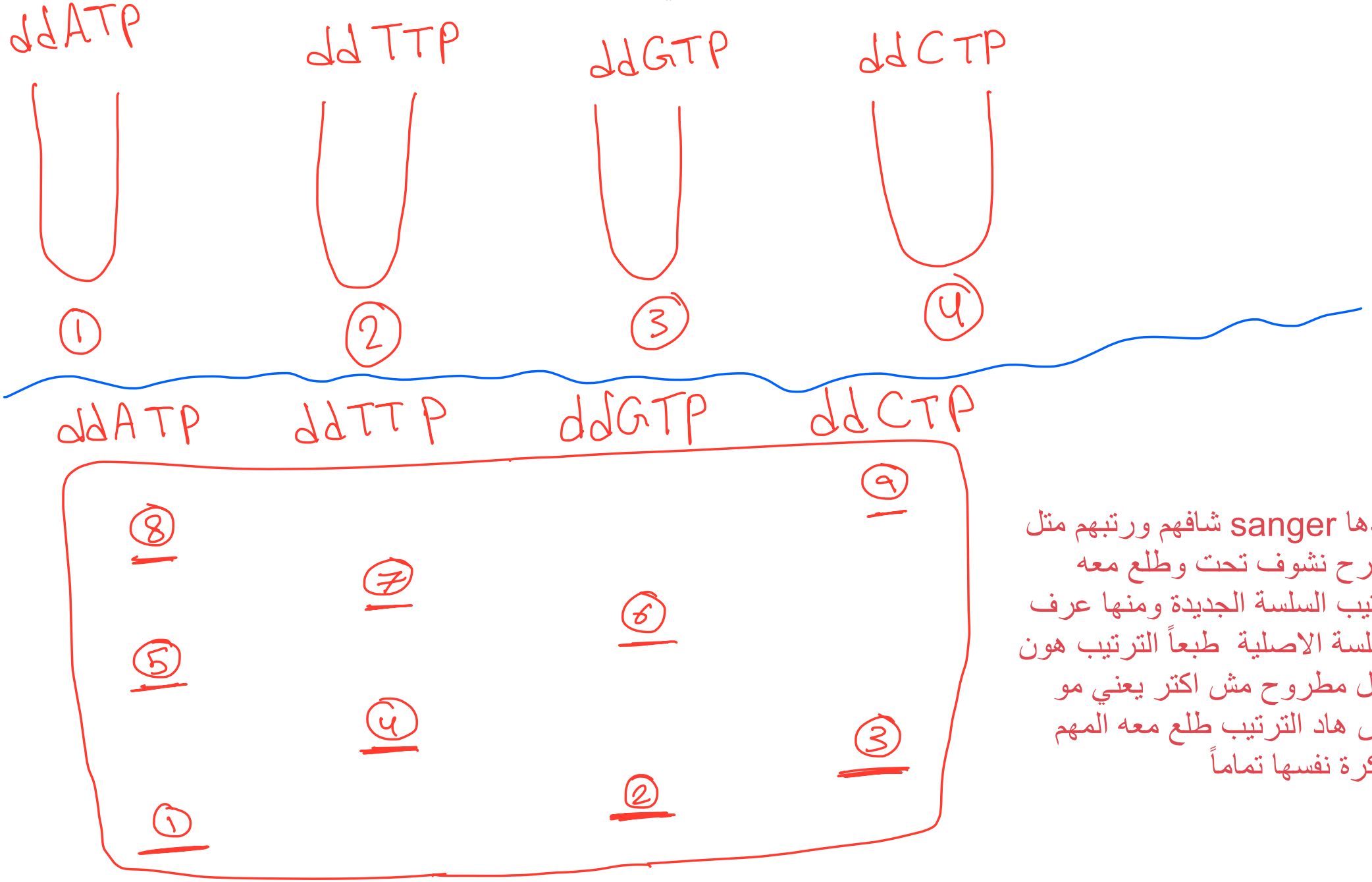
اما في الوضع الطبيعي بدون اضافة الmodified nucleotides كل ال fragments الناتجة بتكون نفس الطول .



بعد ما ينتج عندي الاربع tubes بمشيهم على جل اسمه polyacrylamide gel بالمرة الماضية حكينا عن ال agarose gel

خلونا نوضح كيف نعرف الترتيب هون

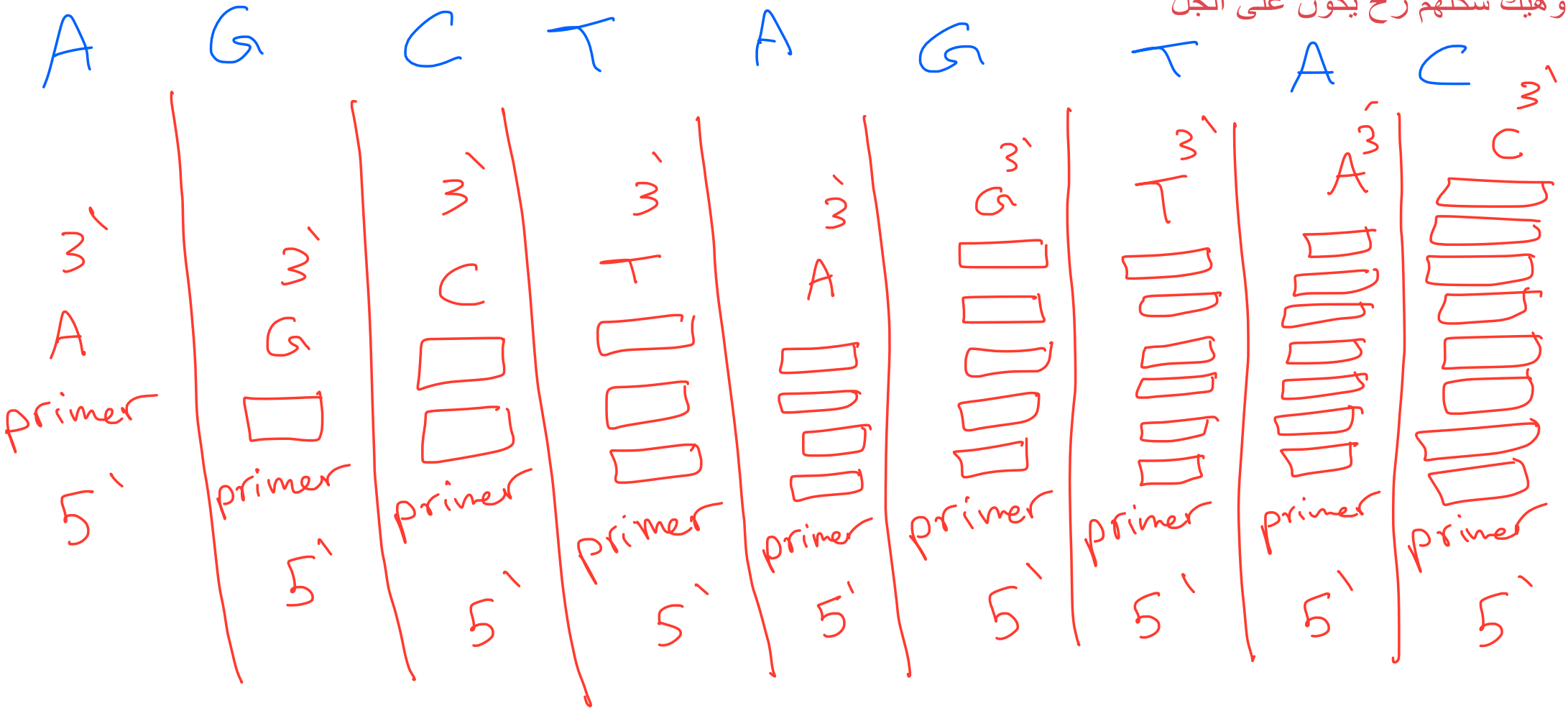
لنفرض انه ترتيب ال template strand كالتالي TCGATCATG 1 2 3 4 5 6 7 8 9 والـ comlemenraty AGCTAGTAC



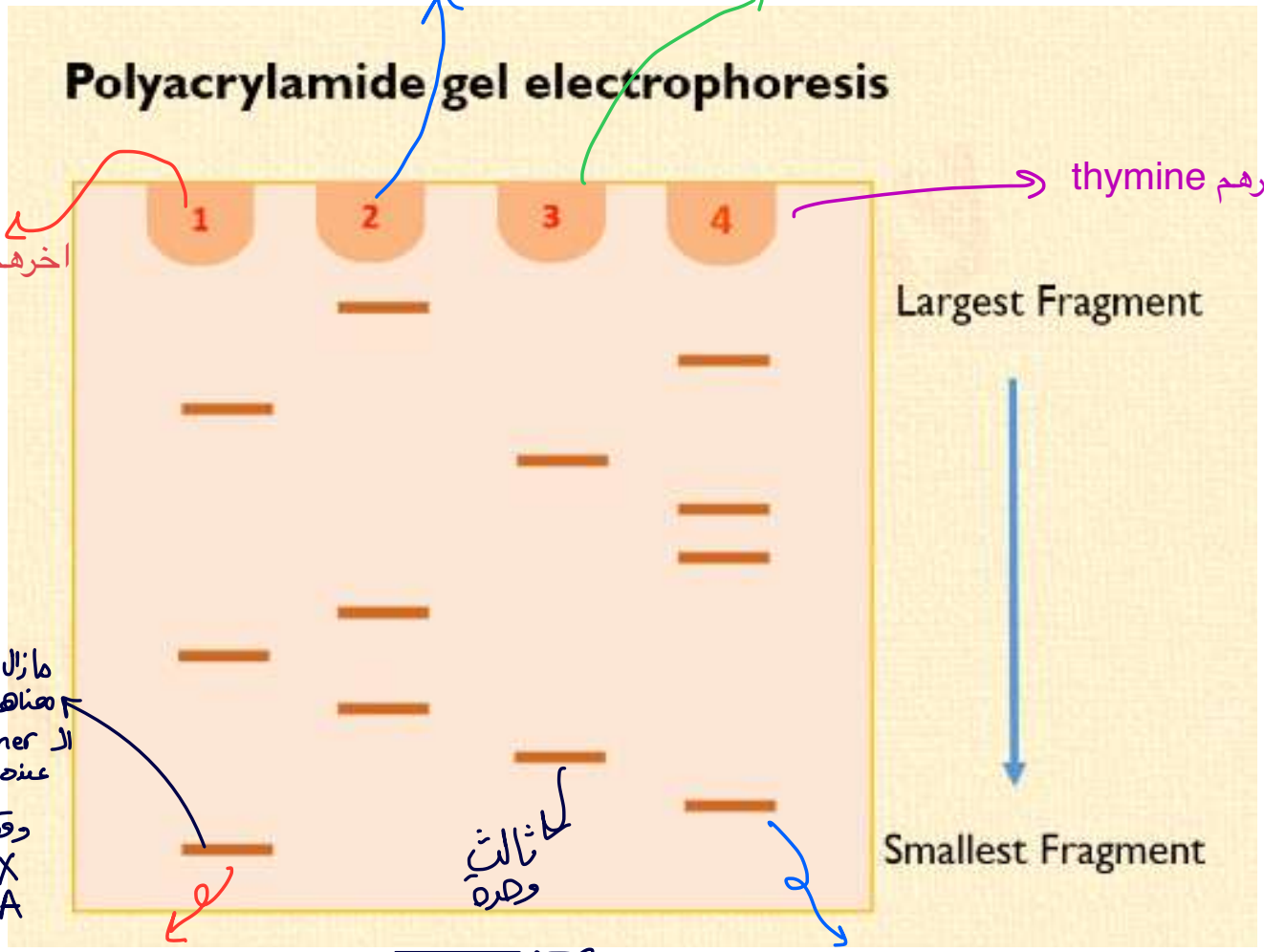
بعدها sanger شافهم ورتبهم متل ما رح نشوف تحت وطلع معه ترتيب السلسة الجديدة ومنها عرف السلسة الاصلية طبعاً الترتيب هون مثال مطروح مش اكتر يعني مو نفس هاد الترتيب طلع معه المهم الفكرة نفسها تماماً

حتى اعرف شو اول نيوكليوتيد بجيب اقصر fragment بشوف شو النيوكليوتيد اللي بعد البرايمر فيه هون لازم يكون A معناها اول نيوكليوتيد في السلسة الجديدة هوه A رح يقابله في السلسة الاصلية T وهكذا

وهيك شكلهم رح يكون على الجل



هون احنا طلعنا ال complementary strand وبنطلع منه الtemplate strand



cytosine اخرهم

guanine اخرهم

thymine اخرهم

adenine اخرهم

مازال هية اصغر Fragment معناها أول نيوكليوتيد بعد ال primer كان A ووقفنا عنده

وقفنا
primer X
A

ثالث وحدة

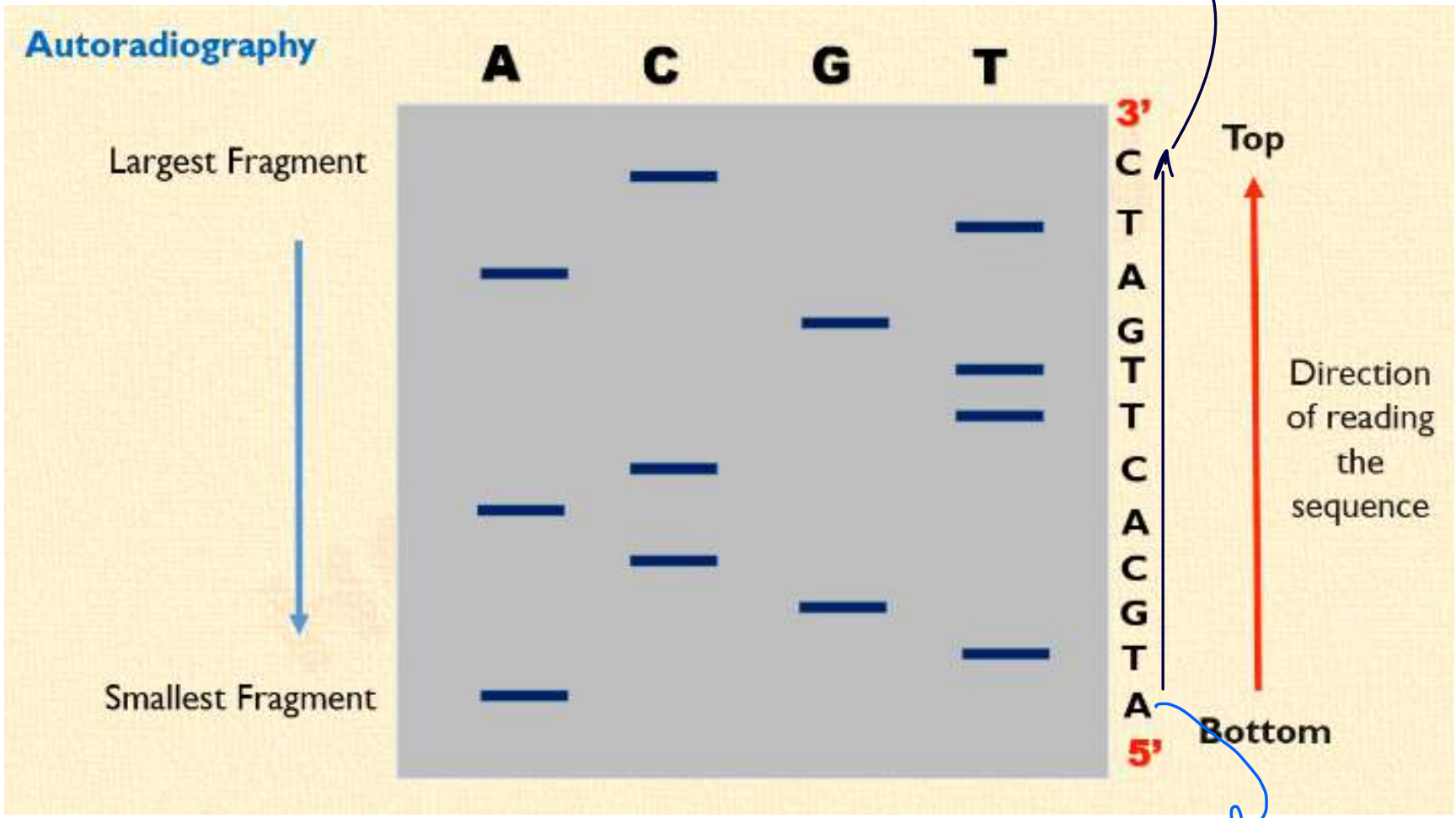
primer ATG

هاي اصغر fragment شو
يعني ؟ يعني مشينا البرايمر
ووقفنا يعني مشينا البرايمر
وحطينا ال ddATP ووقفنا

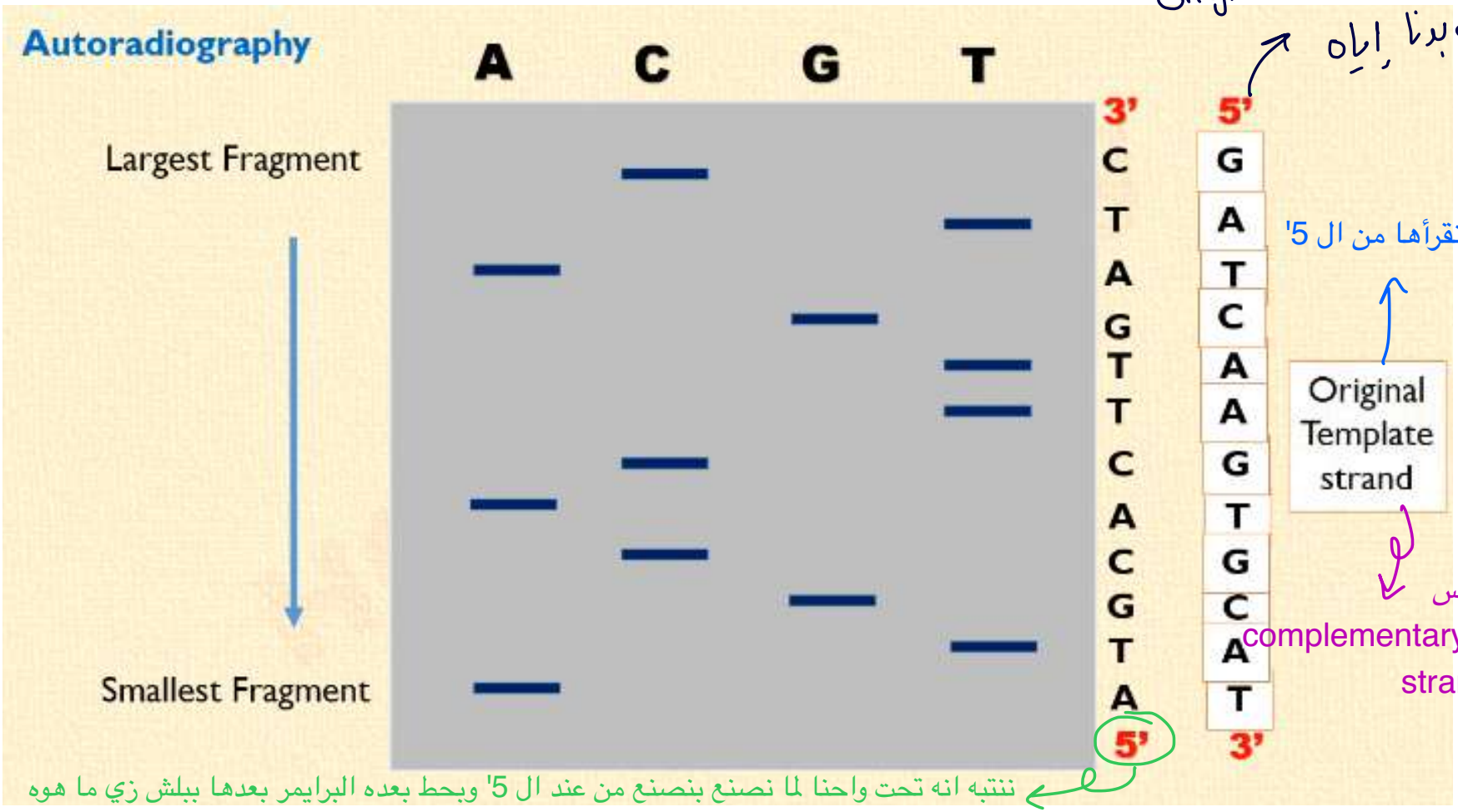
ثاني اصغر قطعة يعني مشينا برايمر وحطينا
ddATP و حطينا ddTTP ووقفنا

primer A T

اذا أهادا Sequence ما بعد الprimer الـ Complementary Strand



طبعاً قبل ال adenine هون في
برايمر لا ننسى



قسمنا ال smallest and largest fragments وما بينهم حسب ال molecular weight

لو بدنا ندرس sequence صغير ممكن نقدر عليه في لاباتنا

ال automated sequencers غالية جداً جداً ومو متوفرة كتير وبكون في اللابات الكبيرة وهوه نفس ال principal or base لكن بختلف بالاسلوب حيث بحتوي على laser beams بتعمل detect على طول لل nucleotide sequence بطلعلنا النتيجة بساعات لكن بال principal or base بحتاج كتير وقت

Chain termination method (sanger dideoxy method)

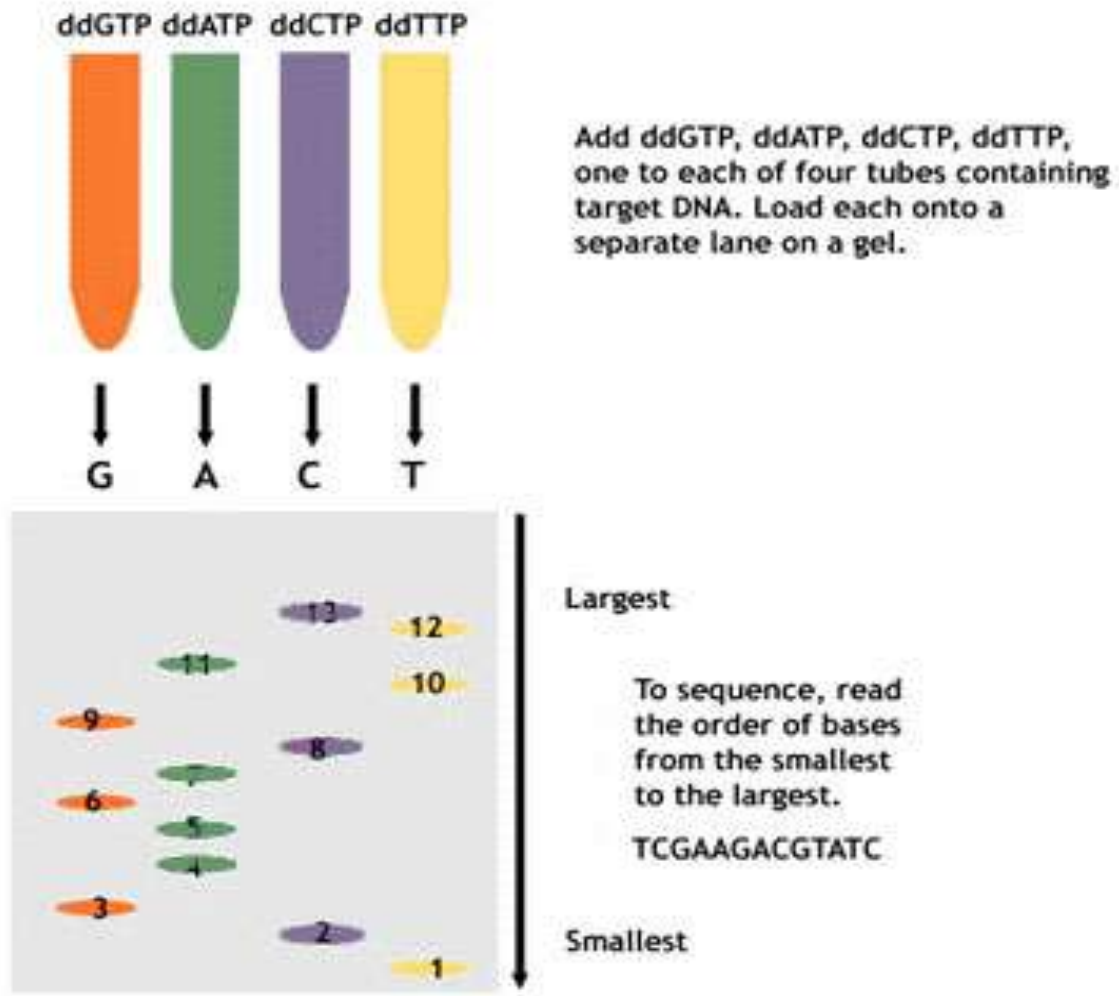
الحكي هون مكرر
ممكن نستبدله بالرسمات اللي فوق ↑

1- The DNA to be sequenced is prepared as single stranded molecule .

2- An incubation mixture is set up containing the following :

- The single stranded DNA template
- DNA polymerase
- **Radioactive primer** complementary to the 3`end of the target DNA.
- All four deoxynucleoside triphosphates (dATP-dGTP-dCTP-dTTP).

The sample is divided into four reaction tubes and a small amount of one of the four **dideoxyribonucleoside triphosphate (ddNTP)** is added to each tube.



3- During incubation, the DNA begins to copy the template molecule by extending the bound primer.

4- As a new DNA strand is synthesized, **every time when dGTP , for example, is incorporated there is a chance to incorporate ddGTP instead.** If this happens, no further chain elongation can occur because ddGTP lacks the 3̀-OH group needed to make the next phosphodiester bond. Thus this particular chain stops at this point.

مدمجة

يعني رح يكون عنا اربع انواع من ال segments كل نوع بنتهي بنيوكليوتيد معين

5-Four sets of chain-terminated fragments are formed corresponding to the positions of A,G,C and T in the sequence.

6-After incubation, all four reaction mixtures are electrophoresed in parallel lanes of a **polyacrylamide gel** and then subjected to autoradiography.

7-The DNA sequence is determined simply by reading the band pattern on the autoradiogram from the bottom of the gel toward the top. من smallest to largest

8-We know that each reaction mixture has the same primer therefore all the strands begin with the same sequence