MIRACLE
Academy

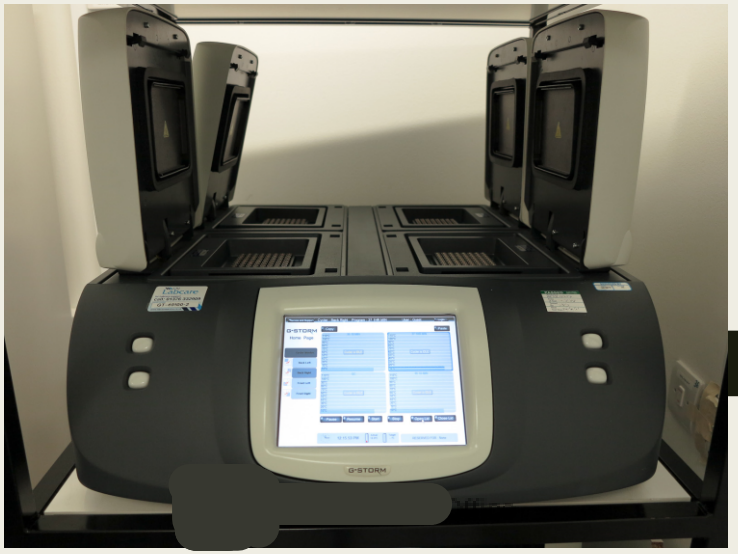
قال تعالى (يَرْفَعِ اللَّهَ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ)

تفريغ البيوتكنو
زميلتكم حلا عبد الجابر

لجان الدُّفعات

ربّ اشرح لى صدري، ويسّر لى أمري، واحلل عقدة من لسانى يفقه قولي، باسم الله الفتاح، اللهم لا سهل إلا ما جعلته سهلا، فإنك إن شئت تجعل الصعب سهلا يا أرحم الراحمين.

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)



PCR

🟩هو عبارة عن عملية Amplification of DNA ، وفعلياً الـ DNA موجود بخلايا الدم البيضاء فقط!

🟩يعني مثلاً لما ناخذ من مريض 1ml عينة دم فنتخيل كل RBCs و Platlets ما فيهم DNA غير شوية الـ WBC اللي بالعينة.

🟩معناها الـ WBC كميتها مش كبيرة يعني كمية الـ DNA قليلة كمان فلو لسا حنعمل عليه العمليات اللي حكيناها نقصه مثلا ففعلياً ما رح يعطيني شي هاد غير Restriction enzyme رح يقصه لـ Segment ليعطينا أحجام و جينات مختلفة.

🟩فالحل هو إنه إحنا ما بدنا كل الجين و إنما بس الـ Fingerprints تاعتنا فهو جين واحد بس فبنروح نعمل Purification لنحصل على DNA فقط و بنعمل إله Amplification عن طريق PCR لحتى نحصل على عدد كبير من الجين اللي بدي ياه و آخذ قد ما بدي منه

🟩 يعتبر الـ PCR إنه أهم Application للـ Molecular biology، و اول ما اكتشفوه كان ايام الثمانينات و كانت عملية بدائية جداً يعني عشان يعملوا PCR كان ينعمل عدة RXN و كان عندهم بس Waterbath و الواحد يزبط الحرارة فيضل يشيل الـ tube و يرجعه حسب الحرارة اللي بده ياها و يقضيها هيك و إذا بنشف الـ Tube من الحرارة بنرجع نجيب polymerase فيعني كانت عملية صعبة نوعا ما.

اللي عنا هسا أسرع كثير و بتعمل Heating ثم Cooling و بتحكم بالحرارة برفعها و بنزلها بدون ما اغير مكان العينة و ما بستخدم tube و إنما نستخدم Vials.

✳PCR gives millions of copy✳

Polymerase Chain Reaction (PCR)

- PCR is a means to amplify a particular piece of DNA
  - *Amplify= making numerous copies of a segment of DNA*
- PCR can make ***billions*** of copies of a target sequence of DNA in a few hours
- PCR was invented in the 1984 as a way to make numerous copies of DNA fragments in the laboratory
- Its applications are vast and PCR is now an integral part of Molecular Biology

DNA Replication vs. PCR

- PCR is a laboratory version of DNA Replication in cells
  - The laboratory version is commonly called *"in vitro"* since it occurs in a test tube while *"in vivo"* signifies occurring in a living cell.

✔️عملية الـ **PCR as in-vitro** معناها لما نعمله بالمختبر و أكيد بقابله شي **in-vivo** جوا الجسم و هو **in-vivo replocation of DNA** و هالشي بعمله جسمنا لما الخلية بدها تنقسم و تتجدد و طبعاً العملية بتاخد ساعات لننسخ كل الـ **DNA** بالمقابل بالمختبر بناخد ساعات لنعمل **Replication** لجين واحد بس ❗

🟩عملية نسخ الـ DNA تعتبر semi-conservative يعني Strand بعطينا نفس الـ Copy من الـ Strand الأصلية، طبعاً أكيد في نسبة خطأ مقدارها كل 1billion strand has 1 error يعني أكيد في خطأ وارد و لكن بجسمنا في Repairing system لتصحيح هاد الخطأ و إزالته.

🟩 الإنزيمات المسؤولة عن عملية نسخ DNA :

Polymerase :Adding nucleotide هاد أهم واحد

Helicase untwists the two parallel DNA strands

Topoisomerase relieves the stress of this twisting

Single-strand binding protein binds to and stabilizes the unpaired DNA strands
SSBs

Note:

3' (3 prime) it is an OH group side

5' (5 prime) it is a phosphate group side

DNA Replication in Cells (*in vivo*)

- DNA replication is the copying of DNA
- It typically takes a cell just a few hours to copy all of its DNA
- DNA replication is semi-conservative (i.e. one strand of the DNA is used as the template for the growth of a new DNA strand)
- This process occurs with very few errors (on average there is one error per 1 billion nucleotides copied)
- More than a dozen enzymes and proteins participate in DNA replication

الإنزيمات المهمة بالعملية:

- **Key enzymes involved in DNA Replication**
- DNA Polymerase
- DNA Ligase
- Primase
- Helicase
- Topoisomerase
- Single strand binding protein

عملية تضاعف الـDNA:

1️⃣ يقوم إنزيم Helicase بفتح الـ 2Strands of DNA وفصل السلسلتين عن بعض.

2️⃣ بعدين بيجي إنزيم Topoisomerase بمنع التواء الـ Strand.

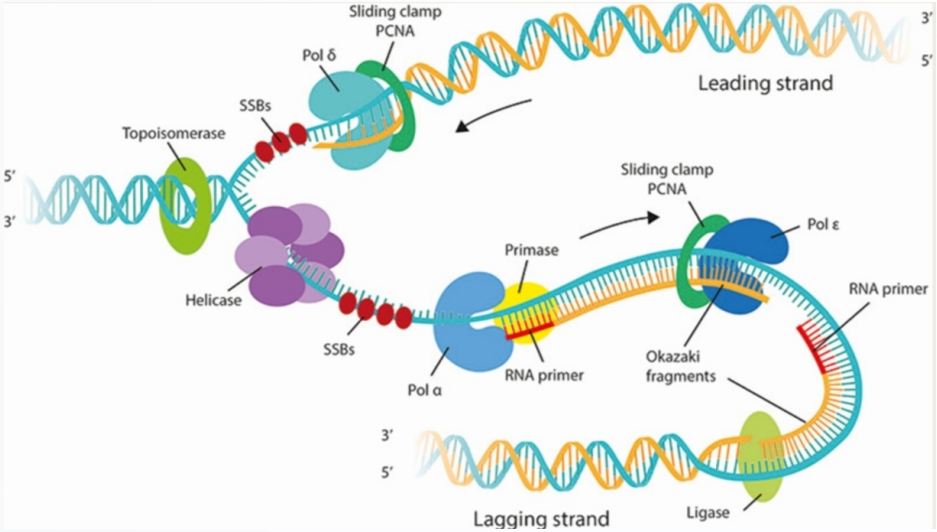
3️⃣ بعدين بتيجي بروتينات SSBs لتثبيت السلاسل المفكوكة و بتمنعها من إنهم يلزقوا ببعض يعني بضل فاصلهم عبين ليجي polymerase يبلش شغله.

4️⃣ ببلش إنزيم Primase بوضع RNA primer صغير على كل سلسلة، وهو نقطة البداية التي يحتاجها إنزيم النسخ ليبدأ عمله.

5️⃣ بيجي إنزيم Polymerase بنسخ السلسة في الاتجاه 5' إلى 3'، و بضيف قواعد جديدة وحدة ورا الثانية و بتكون عنا Leading strand .

6️⃣ أما في lagging strand ، بكون اتجاهها من 5' إلى 3'، بس بتكون مشقلبة و بيتم نسخها بشكل متقطع على شكل قطع صغيرة تُسمى Okazaki fragments.

7️⃣ هسا دور إنزيم Ligase لربط هي القطع ببعضها بكوّن سلسلة متكاملة.



✔️طوال العملية، يعمل إنزيم PCNA كحلقة تثبيت تحافظ على استقرار إنزيم النسخ وتمنعه من الانزلاق.

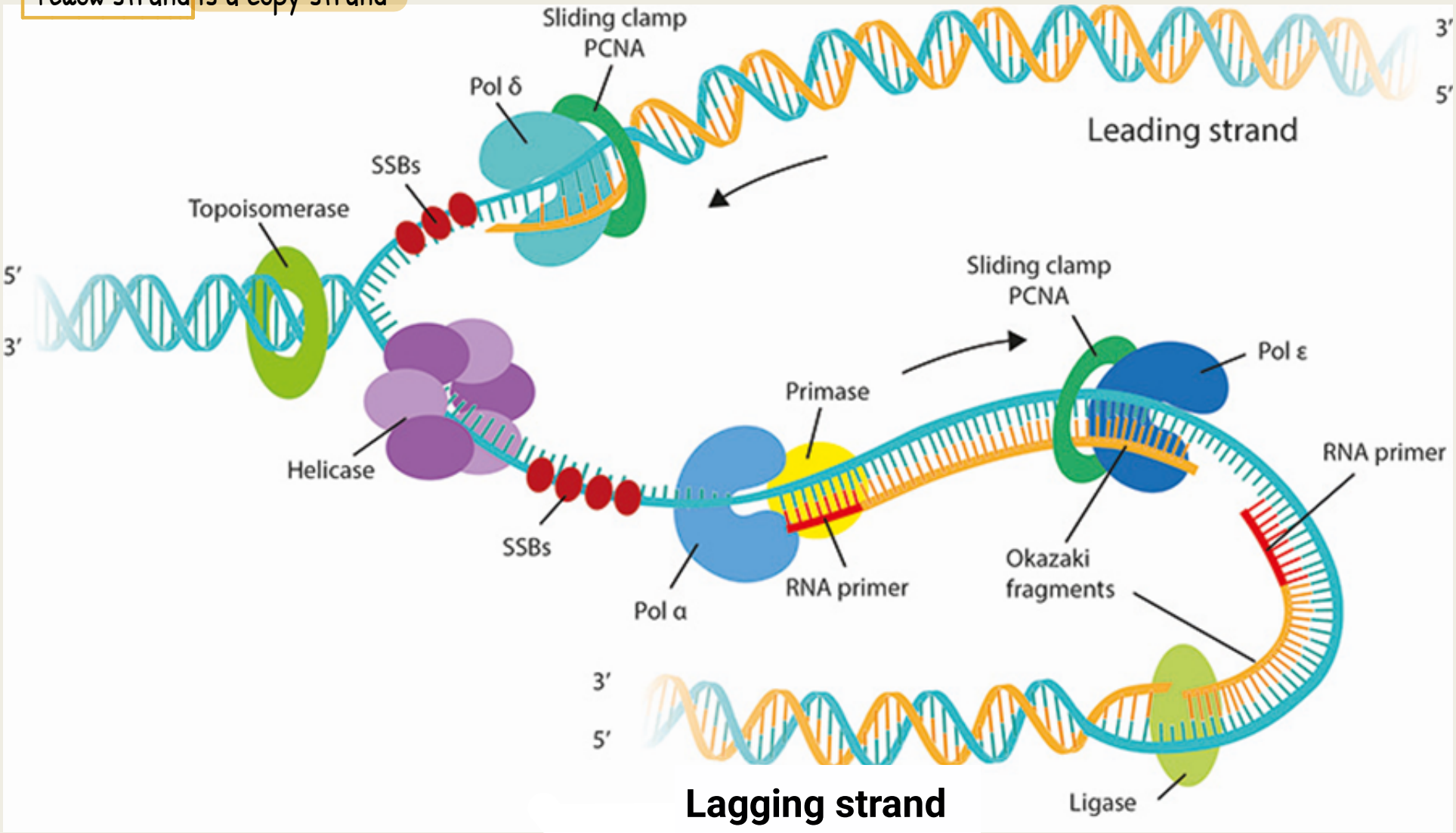
✔️ بيضل في إضافة للـ Primer عشان الـ polymerase بقدرش يحط primer و إنما بكمل عليه.

✔️ بالأخير بس تجهز عنا نسخة DNA بيجي الـ Ligase بشيل كل الـ RNA primers

DNA Replication in Cells (*in vivo*)

Blue strand is an original strand

Yellow strand is a copy strand



🟩 الـ Polymerase بعمل Elongation of new strand عشان دايماً بنحتاج Primase يحط primer حسب الـ Sequence اللي رح نكملها.

🟩لما نيجي نركّب New nucleotide بنضيف أول DNTB على 3'

عبارة عن 1sugar & 1base & 3 phosphate

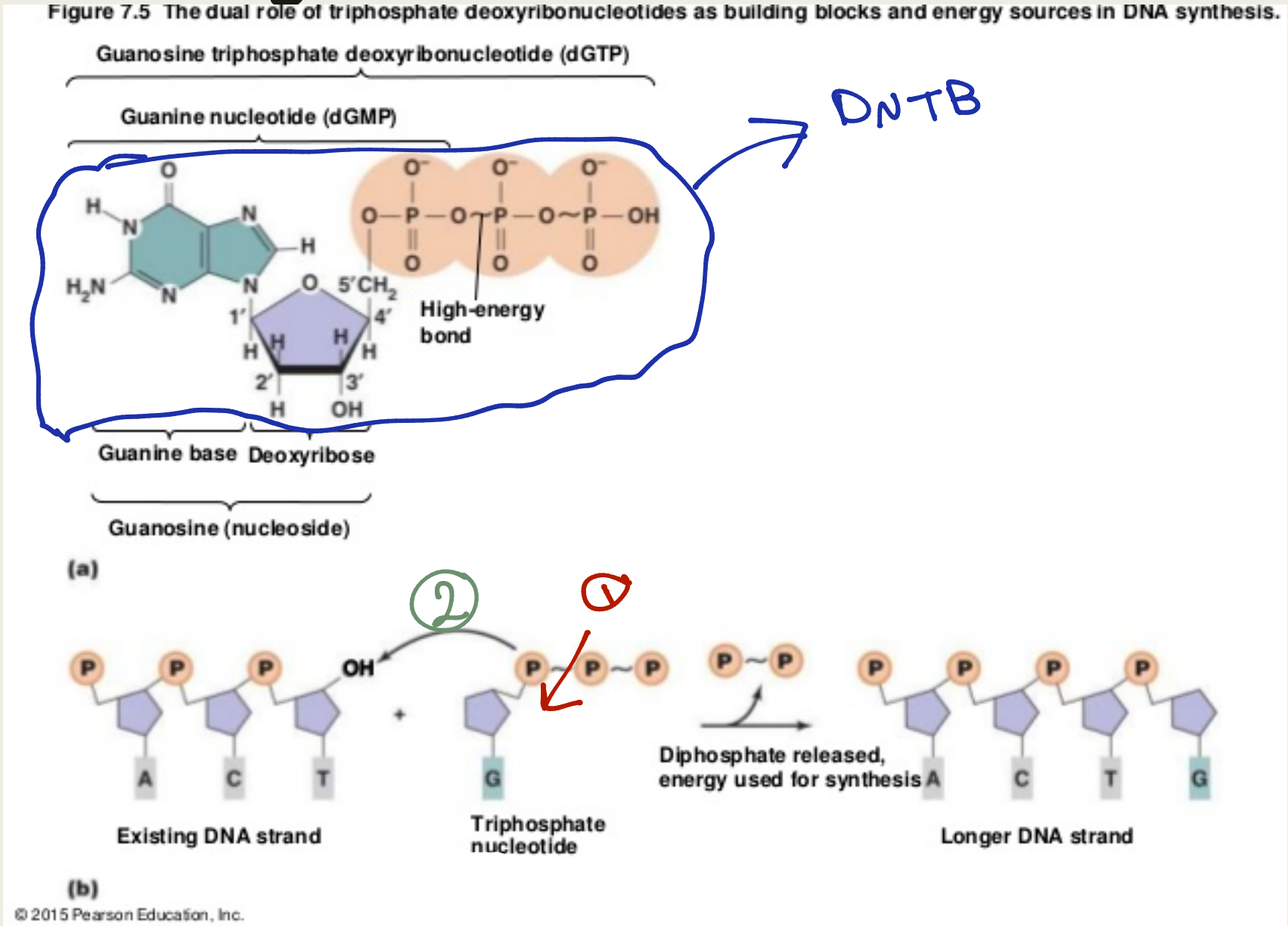
🟩عشان نضيف Nucleotide جديد بنروح بنكسر 2phosphate من DNTB و بنركب الـ 1phosphate اللي ضلت عالـ Strand الجديدة من جهة 3' يعني بنشبكها مع OH

DNA Replication enzymes: DNA Polymerase

- catalyzes the elongation of DNA by adding deoxynucleoside triphosphates to the 3' end of the growing strand
  - A deoxynucleotide triphosphate is a 1 sugar + 1 base + 3 phosphates
  - When a deoxynucleoside triphosphate joins the DNA strand, two phosphates are removed.
- DNA polymerase can *only* add nucleotides to 3' end of growing strand

DNA replication
DNA Polymerase

نفس ما شرحنا و هيها واضحة أول شي عنا DNTB
كيف شكله الكيميائي بعدين بنكسر 2phosphate من
DNTB ثم نربطها على Strand



🟩 عملية الـ Replication تعتمد على base pairing يعني T ترتبط مع A ،و G مع C و بالتالي بيتكون عنا Double Helix جديد و يكون اتجاه النسخ من '5 إلى' 3.

🟩 اللي بمشي مع عملية فتح DNA هو Leading strand أما اللي ماشي بالعكس و بنلاقي عنده Okazaki fragments هو الـ Lagging strands.

Lagging strand	Leading stand
🔵تُنسخ بشكل متقطع على شكل قطع صغيرة اسمها قطع أوكازاكي (Okazaki Fragments). 🔵 لأن اتجاهها الأصلي هو 5' إلى 3'، عكس ما يحتاجه الإنزيم، فيضطر يشتغل عليها من الخلف إلى الأمام. 🔵 كل قطعة تبدأ ببرايمر RNA، ثم تُنسخ باتجاه 5' إلى 3'. 🔵يتم ربط القطع لاحقًا بواسطة إنزيم Ligase. 🔵يستخدم إنزيم DNA Polymerase α في النسخ.	🔵تُنسخ بشكل مستمر بدون توقف. 🔵اتجاهها الأصلي هو 3' إلى 5'، وهذا يسمح للإنزيم يشتغل عليها بسهولة باتجاه 5' إلى 3'. 🔵يبدأ النسخ من نقطة واحدة ويتقدم بسلاسة مع فتح الشريط. 🔵يستخدم إنزيم DNA Polymerase في النسخ.

Complementary Base-Pairing in DNA

- DNA is a double helix, made up of nucleotides, with a sugar-phosphate backbone on the outside of the helix.
- The two strands of DNA are held together by pairs of nitrogenous bases that are attached to each other via hydrogen bonds.
    - Adenine will only pair with thymine (2 H-bonds)
    - Guanine will only pair with cytosine (3 H-bonds)
- During replication, once the DNA strands are separated, DNA polymerase uses each strand as a template to synthesize new strands of DNA with the precise, complementary order of nucleotides.

DNA Replication enzymes: DNA Ligase

- The two strands of DNA in a double helix are **antiparallel** (i.e. they are oriented in opposite directions with one strand oriented from 5' to 3' and the other strand oriented from 3' to 5'
  - *5' and 3' refer to the numbers assigned to the carbons in the 5 carbon sugar*
- Given the antiparallel nature of DNA and the fact that DNA ploymerases can only add nucleotides to the 3' end, one strand (referred to as the **leading strand**) of DNA is synthesized continuously and the other strand (referred to as the **lagging strand**) in synthesized in fragments (called **Okazaki fragments**) that are joined together by **DNA ligase.**

🟩حكينا نحتاج لـ Primer للعملية و بجسمنا أصلاً في إنزيم Primase و ببدأ هو العملية عشان يعمل Okazaki Fragments.

🟩و حكينا بيج Topoisomerase ببعدهم عن بعض و اللي بيحافظ ع انهم يضلهم بعاد هو SSBs.

🟩لكن in-vitro بالأصل كله غشيناه من in-vivo ،فبالجسم الإنزيمات اللي حكيناها كلها مساعدة لكن العملية هي بالمختبر بنتحكم فيها مش عن طريق هي الزنزيمات و إنما بنلعب بالحرارة بطريقة معينة و بالـ Polymerase و وضافته وهكذا...

🟩هسا بالنسبة لإنزيم الـ Polymerase لما بلشوا يستخرجوه أول مرة جابوه من Ecoli و مثل ما بنعرف بتعيش بالأمعاء يعني بتتحمل لحد درجة حرارة 37 ففعليا لما نستخدمه بالتجربة رح نحتاج نرفع الحرارة لـ 95 و نرجع ننزلها لـ 72 فوجدنا إنه بتحملهاش إلا لحد 2cycle و بخرب بعدها!

🟩فراحوا لقوا Microorganism بعيش بالينابيع الحارة فأكيد الـOptimum temp الها بين درجة 75 و 80

DNA Replication enzymes: Primase

- DNA Polymerase *cannot* initiate the synthesis of DNA
  - Remember that DNA polymerase can *only* add nucleotides to 3' end of an already existing strand of DNA
- **In humans, primase** is the enzyme that can start an RNA chain from scratch and it creates a **primer (a short stretch RNA with an available 3' end)** that DNA polymerase can add nucleotides to the strand during replication
- *RNA primer is subsequently replaced with DNA*

DNA Replication enzymes:

Helicase, Topoisomerase and Single-strand binding protein

- **Helicase** untwists the two parallel DNA strands
- **Topoisomerase** relieves the stress of this twisting
- **Single-strand binding protein** binds to and stabilizes the unpaired DNA strands

🟩اول شي بدنا Template ننسخ عنه اللي هو Original strand.

🟩بعدين بدنا polymerase بس لازم يكون بتحمل حرارة.

🟩بدنا DNTP

بدنا Buffer عشان نحافظ على الـ Optimum pH و بكون معه كمان Cofactor مهم للإنزيمات.

🟩بدنا Primer.

🟩 بدنا Tube يكون زله Thin wall عشان تتوزع الحرارة بشكل ممتاز.

🟩بدنا Thermal cycler اللي هو PCR instrument.

PCR: the *in vitro* version of DNA Replication

The following components are needed to perform PCR in the laboratory:

1) DNA of interest that contains the target sequence we want to copy
2) A heat-stable DNA Polymerase (like Taq Polymerase)
3) All four deoxynucleotide triphosphates (dNTP)
4) Buffers
5) Two short, single-stranded DNA molecules that serve as primers
6) Thin walled tubes
7) Thermal cycler (a device that can change temperatures dramatically in a very short period of time)

New method

🟢 بكون Tube اله Thin wall.

🟢 الـ Volume اللي بنحتاجه اقل.

🟢 التكلفة أقل.

🟢 الـ Evaporation أقل.

🟢 فيه 4blocks كل Block في عدد من الـ Thin tubes و بنقدر نبرمج كل Block على حرارة معينة فبنقدر نبرمج كل Block على حرارة معينة.

Old method

🔴 القديم كان عبارة Tubes معناها كنا نحتاج Volumes كبيرة

🔴 و بكون مع الـ Tube في Holder

🔴 تكلفته عالية

🔴 بيصير Evaporation عالي

🔴 و Heat transfer كمان عالي ❗

Old versus New method

Standard tube, ↑volume,
↑cost
evaporation & heat transfer
concerns

Thin walled tube, ↓ volume, ↓ cost
↓ evaporation & heat transfer
concerns

PCR

The DNA, DNA polymerase, buffer, deoxynucleoside triphosphates, and primers are placed in a thin-walled tube and then these tubes are placed in the PCR thermal cycler

PCR Thermocycler

عنا 3main steps بعملية PCR و هم :

1️⃣ بنعمل Isolation للـ DNA يعني بنفكه و بنفصله وهالشي بيتم على حرارة 95.

2️⃣ نضع Primer مع هاد الـ DNA template فهاد بده حرارة محدد حسب الـ Primer اللي عندي، فالـ Annealing temp بتكون ما بين 40 و 65.

إذا حسبت الـ Annealing temp للـ Primer و كانت فوق الـ 65 بحطها على 65 لإنه ممنوع نطلع عن هي الحرارة، لإنه الـ Polymer بشتغل على حرارة 72 فلو كانت الحرارة تاعت الـ Primer اعلى من 65 و حطيتها فوق 65 معناها ما بلحق اربطهم إلا هالـ Polymerase بلّش شغل فما بطلع الـ PCR بالحجم الصحيح

3️⃣ هسا دور الـ DNA polymerase ببلش شغل و بعمل DNA extension على حرارة 72.

4️⃣ بعدين بتيجي خطوة اتأكد من حجمه ففي كثير طرق يا بمشيهم على جل او بنعمل Purification أو بنقصه بـ Restriction enzyme و أكون حصلت الـ Recombinant DNA و ممكن إذا محصلة الـ Fingerprints بقصها بـ Restriction enzyme و بشوف الـ Patternity تاعتها

✳ بتضل تتكرر هي الـ Cycle من 25 لـ 35 مرة ✳

The three main steps of PCR

- The basis of PCR is temperature changes and the effect that these temperature changes have on the DNA.
- In a PCR reaction, the following series of steps is repeated 20-40 times

(note: 25 cycles usually takes about 2 hours and amplifies the DNA fragment of interest 100,000 fold)

Step 1: **Denature** DNA

At 95°C, the DNA is denatured (i.e. the two strands are separated)

Step 2: Primers **Anneal**

At 40°C- 65°C, the primers anneal (or bind to) their complementary sequences on the single strands of DNA

Step 3: DNA polymerase **Extends** the DNA chain

At 72°C, DNA Polymerase extends the DNA chain by adding deoxynucleotides to the 3' ends of the primers.

🟩 اول ما بلشوا يعملوا PCR كانوا يعملوه من Klenow part of Ecoli و كانت مشكلتها إنه ما بتتحمل حرارة عالية و بصيرلها Denaturation.

🟩لكن راحوا قدروا يستخلصوا هاد الـ polymerase من بكتيريا اسمها Thermus aquaticus تعيش بالينابيع الحارّة اسمها Taq

التسمية بتكون إنه أول حرف بكون Capital و من الـ Genus و بعدين بنجيب أول حرفين من الـ Species و بكونوا Small و إذا في أرقام للـ Stains بنحطها.

🟩 هسا Taq اله نسبة Error اعلى و هو بتحمل حرارة من 75 لـ 80 يعوي لو بستخدمه على حرارة 92.5 بضل لـ 130 دقيقة ، و فعليا بأول خطوة حكينا بدنا حرارة 95 فهو بقدر يتحملها معناته و اصلا احنا ما بنخلي الـ 40 دقيقة متواصل و إنما بنضل نرفع و نزل بالحرارة الخلاصة إنه بتحمل بس في Error.

🟩بعدين اكتشفوا واحد احسن من بكتيريا Pyrococcus furiosus يعني اسمه Pfu هاد بعيش في الحمم البركانية فهاد بتحمل حرارة كثير كثير عالية فهو أحسن من الـ Taq، فميزاته Thermostable بعمل proof reading حيث إنه عنده Dexonuclease activity يعني برجع بقرأ اللي تم نسخه و بشيك عليه و بصححه لذلك الـ error قليل يعني مثلا T لقى قبالها C بروح ببدلها يعني بعمل Exonuclease و بعدها بحط A فيه و سعره أكيــد أغلى.

بس مشكلته اللي بتخلينا ما نشتغل فيه إنه مرات ما بعطينا ولا شي بالنتيجة مع انه بكون الشخص مستخدم كلشي صح و Primer صح فهو يا بعطيك شغلك صح يا ما بعطي ولا شي.

Heat-stable DNA Polymerase

- Given that PCR involves very high temperatures, it is imperative that a heat-stable DNA polymerase be used in the reaction.
  - Most DNA polymerases would denature (and thus not function properly) at the high temperatures of PCR.
  - Initially PCR used the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase - inactivated by high temperatures
- Taq DNA polymerase was purified from the hot springs bacterium *Thermus aquaticus* in 1976

DNA polymerase

- Taq has maximal enzymatic activity at 75 °C to 80 °C, and substantially reduced activities at lower temperatures.

- K_{cat} = 150 nucleotides/sec/enzyme (at T_{opt})

$Taq_{1/2}$ =

92.5 °C	→	130 min
95.0 °C	→	40 min
97.5 °C	→	5 min

Pfu DNA polymerase

- ***Pfu* DNA polymerase** is an enzyme found in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*
- Characterized by having superior thermostability and proofreading properties compared to *Taq* DNA polymerase.
- Unlike *Taq* DNA polymerase, *Pfu* DNA polymerase possesses 3' to 5' exonuclease proofreading activity, meaning that as the DNA is assembled from the 5' end to 3' end, the exonuclease activity immediately removes nucleotides misincorporated at the 3' end of the growing DNA strand.
- Consequently, *Pfu* DNA polymerase-generated PCR fragments will have fewer errors than *Taq*-generated PCR inserts