MIRACLE
Academy

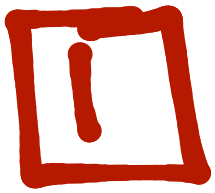
قال تعالى (يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ)

تفريغ البيوتكنو
زميلتكم حلا عبد الجابر

لجان الدُّفعات

🟢أهم المشاكل اللي تواجهنا هي مشكلة Mis-priming يعني ما بطلع بس الـ Band اللي بدي ياها و إنما بيطلع Bands ثانية مش نفس اللي بدي ياها لإنه الإرتباط تاع الإنزيم كان مش بمكان محدد.

🟢 عشان نحل هيالمشكلة في عدة حلول ممكنة :



Cheap fixes

- Physical separation –"DNA-in-the-cap"
- Set up reactions on ice

من أحد الاسباب لحدوث Mis priming هو وجود DNA مع Polymerase و قبل لنوصل الحرارة اللي يشتغل فيها Polymerase بشغله بكون صار عدة مصايب وبكون ربط واعطانا Bands بدناش ياها

🔴 فالحل الأول بنحط Physical separation بين الـ DNA و Polymerase فبفصل واحد منهم فبروح مثلا بحط الـ DNA على غطا علبة الـ Tube و الـ Polymerase بالـ Tube ، و طالما همه مش مع بعض ففش أي Mis priming، ومع الوقت بنزل الـ DNA على الـ Solution و ببلش الـ Complete reaction لإنه الحرارة ارتفعت للحد المطلوب و بتطلع الـ Band اللي بدي ياها .

🔴 أو الحل الثاني بروح بحضر الـ Mixture تاع الـ Reaction بـ Ice.

2

Hot-start PCR –holding one or more of the PCR components until the first heat denaturation

- Manually - delay adding polymerase
- Wax beads
- Polymerase antibodies

🔴 الحل الأول إنه نضيف الـ Polymerase بنص التفاعل يعني ببلش التفاعل و بالنص بنوقفه و بنضيف الـ Polymerase وهالشي بنسميه Delayed adding polymerase.

🔴 أو بنضيفها كـ Wax beads بحيث مرتبط عليها Polymerase و بصيرله Release شوي شوي مع الحرارة

🔴 أو بنركب الـ Polymerase مع الـ Antibody تاعه و مع الحرارة بفك شوي شوي.

3

PCR additives

- 0.5% Tween 20
- 5% polyethylene glycol 400 PEG
- betaine
- DMSO

🔴 بنقدر نضيف Additives على PCR مثل Tween أو PEG أو Betaine او DMSO.

4

Touch-down PCR – set stringency of initial annealing temperature high, incrementally lower with continued cycling

🔴 ممكن السبب يكون إنه الـ **Annealing temperature** عالية و بنقدرش ننزلها كثير لإنها هي الـ **Optimum temperature** عليها بربط الـ **Primer** مع الـ **DNA** و المشكلة هي الحرارة بتكون قريبة من الحرارة اللي بشتغل عليها الـ **Polymerase** فبروح ببلش الـ **Polymerase** شغل عالبدري، إذا الحل بررح ببلش الـ **6cycles** على حرارة عالية بعدين بنزلها شوي شوي فمثلا من **60** لـ **58** ثم لـ **56** وهكذا....

Solution for mis-priming

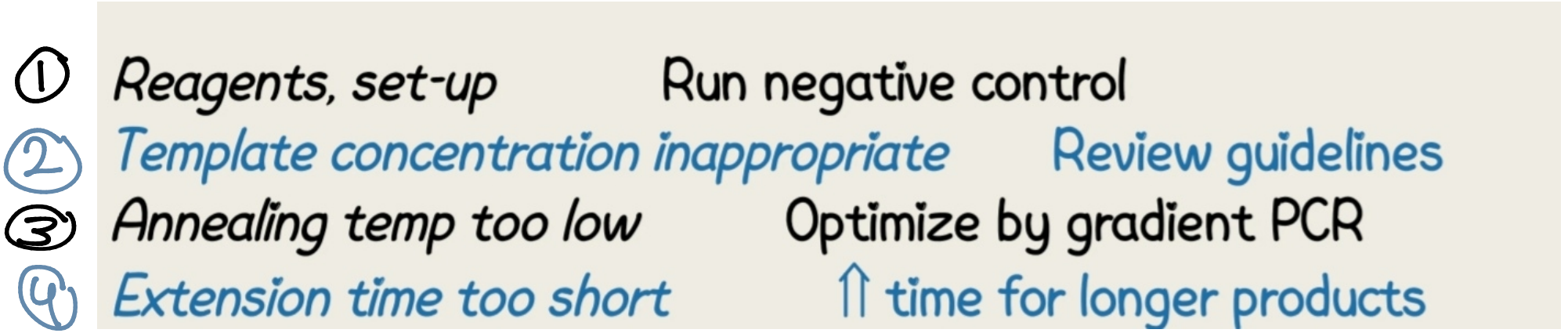
- **Cheap fixes**
  - Physical separation –"DNA-in-the-cap"
  - Set up reactions on ice

- **Hot-start PCR –holding one or more of the PCR components until the first heat denaturation**
  - Manually - delay adding polymerase
  - Wax beads
  - Polymerase antibodies

- **Touch-down PCR** – set stringency of initial annealing temperature high, incrementally lower with continued cycling

- **PCR additives**
  - 0.5% Tween 20
  - 5% polyethylene glycol 400
  - betaine
  - DMSO

🟢 من المشاكل الثانية إنه يطلع الـ Band اللي بدي ياها الأصلية و يطلع معها Bands بديش ياهم و إلها كثير اسباب و كل سبب إله حل :



1️⃣ ممكن يكون الـ Reagent نفسه فيه مشكلة مثلاً خالصة مدته فالحل نعمل negative control يعني بنستخدم الـ Reagent مع شي غير الـ DNA إذا طلعت وفي الـ Band معناها واضحة من الـ Reagent.

2️⃣ مشكلة بالـ Concentration تاع DNA الأصلي اللي بدنا نكثّره و هي بنرجع للـ Guideline نحل المشكلة وقتها حسبه يا بنخفف التركيز يا أما بنتأكد من نقاوة DNA .

3️⃣ ممكن الـ Annealing temperature اللي بنستخدمها قليلة فبنروح نرفعها شوي شوي

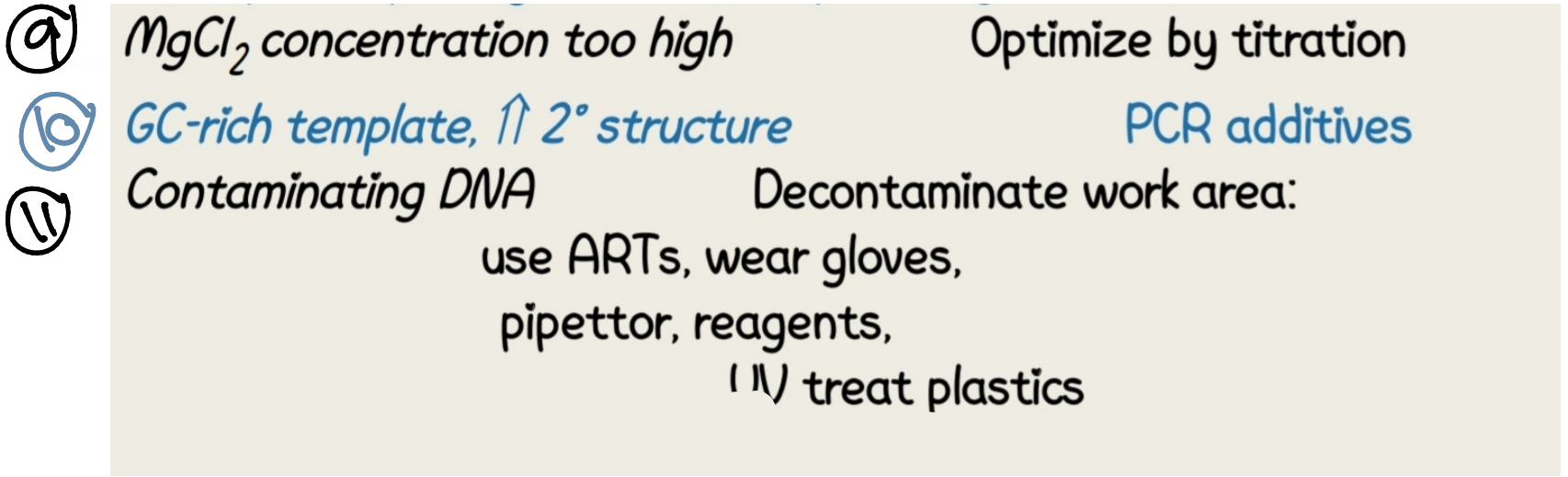
4️⃣ الـ Extension time كثير قليل يعني مثلا حكينا علي درجة حرارة 72 بنخليه لدقيقة ونص حسب الطول اللي عندي فالفكرة كل ما كان الـ Product اللي بده يطلع أطول معناها extension time أطول!

5 المشكلة احياناً بتكون بعدد الـ Cycles اللي بعملها فبالعادة بتكون من 25 إلى 40، لكن إذا كثير 40 بنروح بنعملها 30cycle.

6 مشكلة بالـ Primer فبرجع براجع الـ Sequences تاعه و كمان لازم اتأكد إنه آخره C أو G عشان يربط بشكل منيح مع النهاية .

7 ممكن الـ Primer تركيزه عالي فبنخففه.

8 مثل ما حكينا بكون بربط بأي مكان فممكن نبلش بحرارة عالية أو نزيد الـ Specificity.



9️⃣ ممكن السبب يكون تركيز الـ MgCl2 كثير عالي فبنروح نعمل إله Titration.

1️⃣0️⃣ وجود كمية كبيرة من GC بتأدي لظهور secondary structure فبنروح نضيف PCR acid اللي بتقلل من 2ry structure.

1️⃣1️⃣ المكان او المعدات مش نظيفة فبتلوث الـ DNA تاعي و بطلع Band مش صح فالحل استخدم ART بتمنع انتقال التلوث فلازم كلشي يكون Sterile و يكون DNA free و RNA free و حتى المي لازم تكون Sterile و تكون Free of DNA & RNA.

ART :Aerosol Resistant Tips

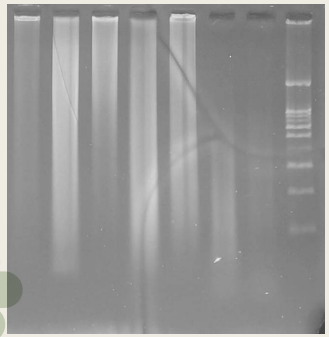
Troubleshooting PCR

Non-specific bands on your gel

Reagents, set-up	Run negative control
Template concentration inappropriate	Review guidelines
Annealing temp too low	Optimize by gradient PCR
Extension time too short	⇑ time for longer products
Cycle number too high	Review guidelines
Primer design not appropriate	⇑ specificity
Primer concentration too high	Optimize by titration
Non-specific priming	⇑ specificity, Hot Start
$MgCl_2$ concentration too high	Optimize by titration
GC-rich template, ⇑ 2° structure	PCR additives
Contaminating DNA	Decontaminate work area: use ARTs, wear gloves, pipettor, reagents, (UV) treat plastics

Troubleshooting PCR

Diffuse smearing on your gel



هي بكون في Band اصلية و في Smearبس نشوفها يعني تركيز MgCl2 كثير عالي لإنه لو قليل بطلعش PCR

الأسباب و حلولها في منهم شرحناه قبل و الزيادة ✅

Template concentration inappropriate	Review guidelines
Taq concentration too high	Optimize by titration
Extension time inappropriate	Review guidelines
Cycle number too high	Reduce, review guidelines
Primer design not appropriate	⇑ specificity
Primer concentration too high	Optimize by titration
Non-specific priming	use Hot Start
$MgCl_2$ concentration too high	Optimize by titration
GC-rich template, ⇑ 2° structure	PCR additives
Contaminating DNA	Decontaminate work area: use ARTs, wear gloves, pipettor, reagents, UV treat. plastics

الـ Guideline هو مثل ما حكينا كل 500bp تحتاج Extension time مدته دقيقة فيعني هي مرجعنا فكل ما زاد عدد الـ bp بنعمل نسبة وتناسب.

Troubleshooting PCR

Poor or no amplification of bands

ما طلع معنا شي أصلاً او بتكون الـ Band رفيعة وبالأصل هي لازم تكون سميكة

هون بكون ما طلع PCRبنعيد الـ PCR مرة ثانية بنفس المواد و الـ Reagent الصح على نف الـ Thermocycler إذا طلعت نفس المشكلة معناها الغلط مش من المواد.

Problem with thermocycler, set-up, reagents	Run positive control
Enzyme concentration low	⇑ Concentration
Annealing temp too low	Optimize by gradient PCR
Extension time too short	⇑ Time for longer products
Cycle number too low	Review guidelines
Primer design not appropriate	⇑ Specificity
Primer concentration too high	Optimize by titration
Non-specific priming	⇑ Specificity, Hot Start
$MgCl_2$ concentration too low	Optimize by titration
GC-rich template, ⇑ 2° structure	PCR additives

يا بنزيدها شوي شوي او بنبلش عالي و ننزل الحرارة شوي شوي لحد ما نوصل للحرارة اللي بدنا ياها.

🟢 عنا الـ **Klenow fragments** هي عبارة عن **Large protein** بنتج لما الـ **Polymerase** اللي من الـ **Ecoli** يصيرله قص بإستخدام **Subtilisin**.

🟢 بعد ما نقصه رح نلاقيه بحتفظ بوظائف الإنزيم الأصلي و بفتقد وظائف ثانية:

الوظائف التي يحتفظ فيها	الوظائف التي يفتقدها (يعني ما رح يعملها مثل الإنزيم الأصلي **Polymerase**)
1) $5' \rightarrow 3'$ polymerase activity ● يعني يقدر يضيف **Nucleotide** (يبني الـ **DNA** الجديد باتجاه **5'** إلى **3'**). 2) $3' \rightarrow 5'$ exonuclease activity ● يعني عنده خاصية **proofreading** (التصحيح): يقدر يحذف النيوكليوتيدات الخاطئة أثناء النسخ.	$5' \rightarrow 3'$ exonuclease activity يعني ما يقدر يزيل **Nucleotide** من الطرف **5'** مثل ما كان بعمل الإنزيم الكامل.

🟢 هسا بضل جزء ثاني منه بتكون قطعة صغيرة بتنتج من الـ **Cleaving** هي تحتفظ فقط بـ:

$5' \rightarrow 3'$ exonuclease activity

لكنها تفتقد لباقي النشاطات (ما عندها لا **polymerase** ولا **proofreading**).

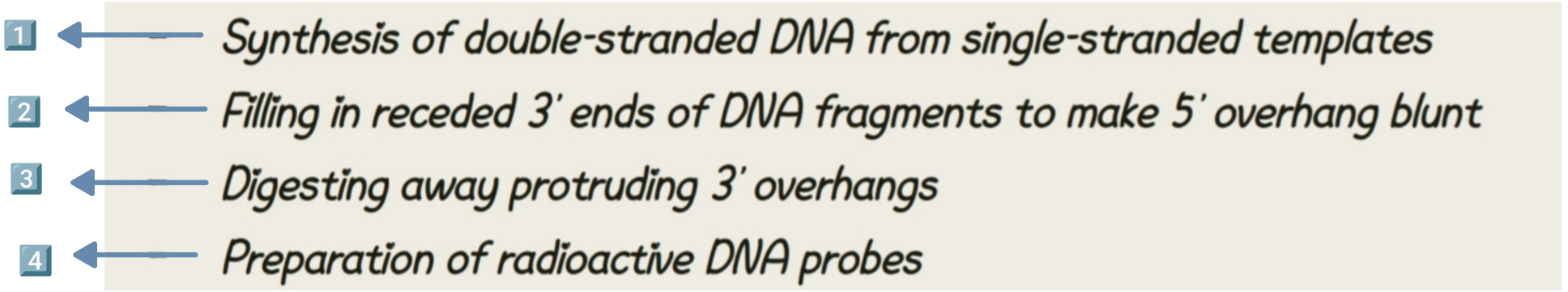
ملخص للي شرحنا و للي موجود بهالسلايد👇:

الجزء	النشاطات اللي يحتفظ فيها	النشاطات اللي يفقدها
Klenow fragment (الكبير)	5'→3' polymerase + 3'→5' exonuclease	يفقد exonuclease '3→'5
الجزء الصغير	فقط exonuclease '3→'5	يفقد الباقي

Klenow fragment

- It is a large protein fragment produced when DNA polymerase I from *E. coli* is enzymatically cleaved by the protease **subtilisin**.
- It retains the 5' → 3' polymerase activity and the 3' → 5' exonuclease activity for removal of precoding nucleotides and proofreading, but loses its 5' → 3' exonuclease activity.
- The other smaller fragment formed when DNA polymerase I from *E. coli* is cleaved by subtilisin retains the 5' → 3' exonuclease activity but does not have the other two activities exhibited by the Klenow fragment (i.e. 5' → 3' polymerase activity, and 3' → 5' exonuclease activity

🔴كيف بنقدر نستفيد من الـ Klenow fragments يعني لشو تستخدم ⁉️



1️⃣ بنقدر نصنع Double strand of DNA عن طريق إنه بروح بجيب mRNA و بحط إنزيم Reverse transcriptase فوقتها بطلها عندي Single strand of DNA فعشان يصيروا ثنتين بدي انسخ الـ Strand الأولى فبجيب الـ Klenow fragments و بتطلعلي نسخة عن الـ Strand.

2️⃣ إذا كان عنا الـ 5' أطول من 3' بروح بعبي الفراغات اللي فيها عشان تصير الأطراف متساوية يعني Blunt مش Overhang.

3️⃣ إذا 3' زايدة بروح يقصها

4️⃣ ممكن نضيف Radioactive polymerase فبكون عليه Phosphate وهاد هو المشع وبقدر أعمل Detection للـ DNA في حال في سلالات مش طبيعية و طفرات

هو اول إنزيم استخدمناه بعملية الـ PCR قبل لنكتشف الإنزيمات الثانية اللي هي Thermostable أكثر مثل Taq & Pfu

Klenow fragment

النوع	الشكل	الوصف
Overhang (نهاية بارزة)	غير متساوية	أحد الشريطين أطول من الآخر، فيترك "ذيلًا" مفردًا
Blunt end (نهاية منبسطة)	متساوية	كلا الشريطين يتوقفان عند نفس النقطة، بدون أي بروز

- The Klenow fragment, which lacks activity, can be very useful in research. The Klenow fragment is extremely useful for research-based tasks such as:
  - *Synthesis of double-stranded DNA from single-stranded templates*
  - *Filling in receded 3' ends of DNA fragments to make 5' overhang blunt*
  - *Digesting away protruding 3' overhangs*
  - *Preparation of radioactive DNA probes*
- The Klenow fragment was also the original enzyme used for greatly amplifying segments of DNA in the polymerase chain reaction (PCR) process, before being replaced by thermostable enzymes such as Taq and Pfu polymerases

🟢 إنزيم DNA polymerase I عنده نشاطين:

1️⃣ 5'→3' exonuclease → (يزيل الـ Nucleotide من قدام الـ DNA)

2️⃣ 3'→5' exonuclease → (يصحح الأخطاء أثناء النسخ).

🟢لكن في بعض التطبيقات المخبرية، هي الأنشطة ممكن تكون مش مرغوبة لأنها ممكن تشيل أو تعدّل أجزاء من الـDNA اللي الباحث بده يشتغل عليها.

🟢فالحل كان إنهم يعملوا طفرة Mutation في الجين المسؤول عن إنتاج Klenow، بحيث بضل الإنزيم عنده نشاط 5'→3' Polymerase activity ، لكنه يفقد نشاط الـ exonuclease (سواء 5'→3' أو 3'→5').

وهذا الشكل المعدّل من الإنزيم بنسميه exo–Klenow fragment

الإستخدامات:

🟥 في تجارب fluorescent labeling مثل microarray.

🟥 في dA و dT tailing: وهي عملية إضافة nucleotidesفي نهاية الـDNA لتهيئته للربط مع قطع أخرى.

🟥 في ربط المحولات (adapters) إلى شظايا الـDNA، وهي خطوة مهمة في تحضير مكتبات الـDNA لتقنيات Next-generation sequencing (NGS).

Klenow fragment

الخاصية	Klenow fragment	exo-Klenow fragment
النشاط البوليميرازي	موجود	موجود
نشاط exonuclease '5→'3	موجود	غير موجود
نشاط exonuclease '3→'5	غير موجود	غير موجود
الاستخدام	تفاعلات نسخ أو ملء فراغات في DNA	تطبيقات دقيقة مثل labeling و tailing

- Just as the 5' → 3' exonuclease activity of DNA polymerase I from *E.coli* can be undesirable, the 3' → 5' exonuclease activity of Klenow fragment can also be undesirable for certain applications. This problem can be overcome by introducing mutations in the gene that encodes Klenow. This results in forms of the enzyme being expressed that retain 5' → 3' polymerase activity, but lack any exonuclease activity (5' → 3' or 3' → 5'). This form of the enzyme is called the **exo- Klenow fragment**.
- The exo-Klenow fragment is used in some (1) fluorescent labeling reactions for microarray, and also in (2) dA and dT tailing, an important step in the process of ligating DNA adapters to DNA fragments, frequently used in (3) preparing DNA libraries for Next-Gen sequencing

🟢 الإنسولين في Introns و Exons و من جين الإنسولين ما بدنا الـ Introns و بدنا الـ Exons همه بس اللي يصيرلهم Expression، فبنروح نعمل Reverse transcriptase لكل الجين ثم بنقصقص الـ Introns و بنرجع نربطهم و اللي بنتقل لمرحلة Translation هو Exons.

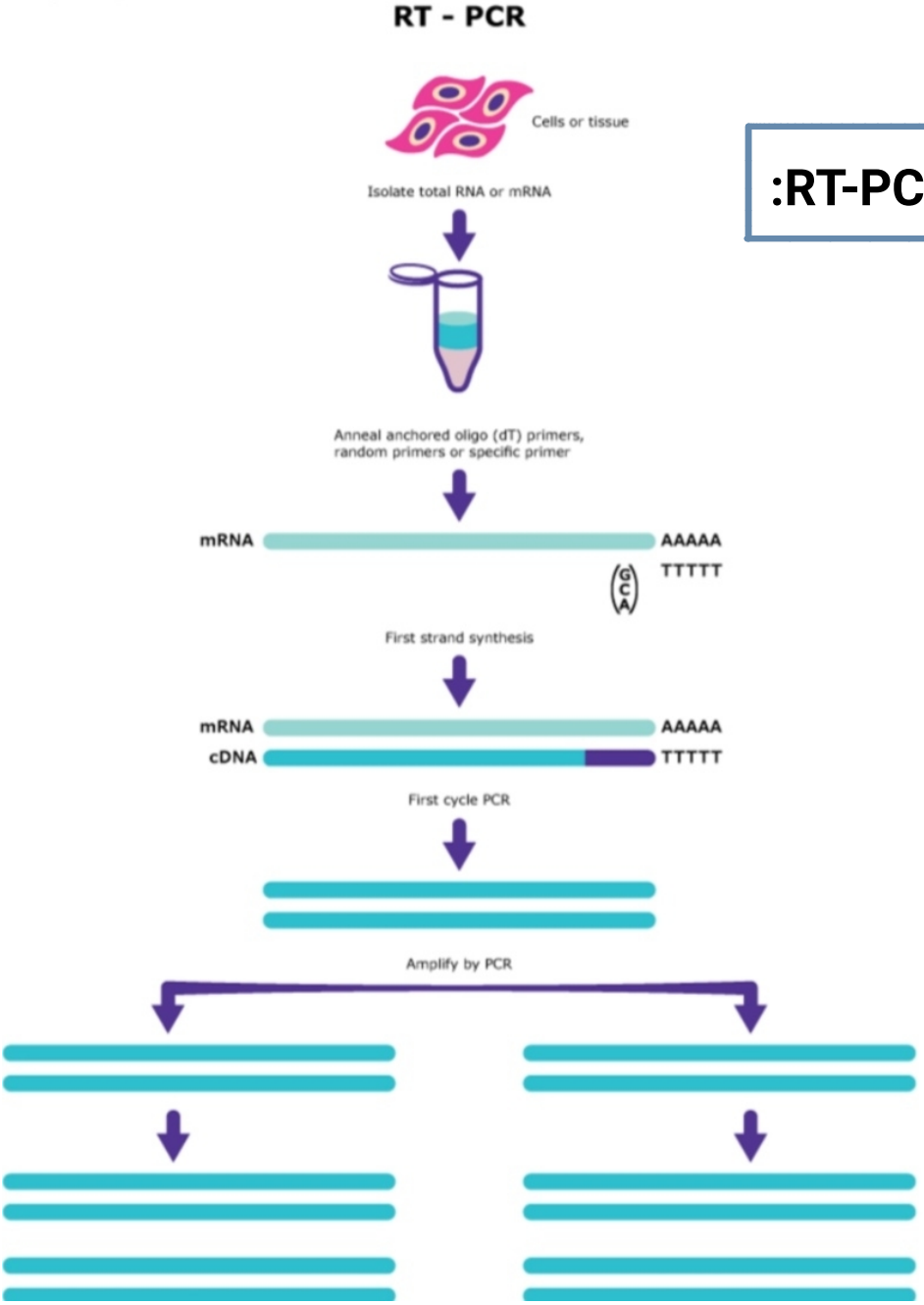
🟢جين الإنسولن طويل فاللي بصيرله Expression هو 51amino acid فمثل ما حكينا ملخص تحويل الجين الكبير لـ 51aa عن طريق نجيب mRNA ثم نعمل Transcription و نقصقص الـ Introns و ثم نعمل Translation للـ Exons و هيك حوّلناه لبروتين اصغر و أقصر بكثير.

🟢 في فكرة Real time PCR بعتمد على وجود Fluorescent فكل ما يتكون PCR بتزيد الـ Fluorescent و بنشوف الـ Dye detection على الكمبيوتر فهون الميزة بنستناش للأخير تخلّص الـ Cycle ونحطه على Gel و بعدييين نكتشف فش شي أما هون لأ من أولها بكون في رصد للصبغة أول بأول عالكمبيوتر فبكتشف عالبدري في حال مش زابط.

Reverse transcriptase- PCR

- RT-PCR is a PCR test that is designed to detect and measure RNA. Although initial PCR tests amplified DNA, many viruses and other biological components (for example, mitochondria) utilize RNA as their genetic material.
- RT-PCR differs from conventional PCR by first taking RNA and converting the RNA strand into a DNA strand.
- This is done by using an enzyme termed reverse transcriptase instead of the DNA polymerase which allows a single strand of RNA to be translated into a complementary strand of DNA.
- RT-PCR is used to detect and study many RNA viruses

النسخ العكسي بإستخدام mRNA مثل فكرة التجارة العكسية بالصين ،حد اخد براءة اختراع بشي بروحوا بشتروه بالمبلغ اللي بده ياه و بروحوا بفكفكوها و بصنعوا بلاوي منه بربع سعرها



ملخص مبسّط لعملية RT-PCR (Reverse Transcription PCR):

1 عزل الـRNA:
تُؤخذ الخلايا أو الأنسجة، ويتم استخراج الـRNA الكلي أو الـmRNA منها.

2 إضافة البادئات (Primers):
يتم إضافة بادئات (oligo dT أو random primers أو specific primers) لتتعرف على الـmRNA وتلتصق به.

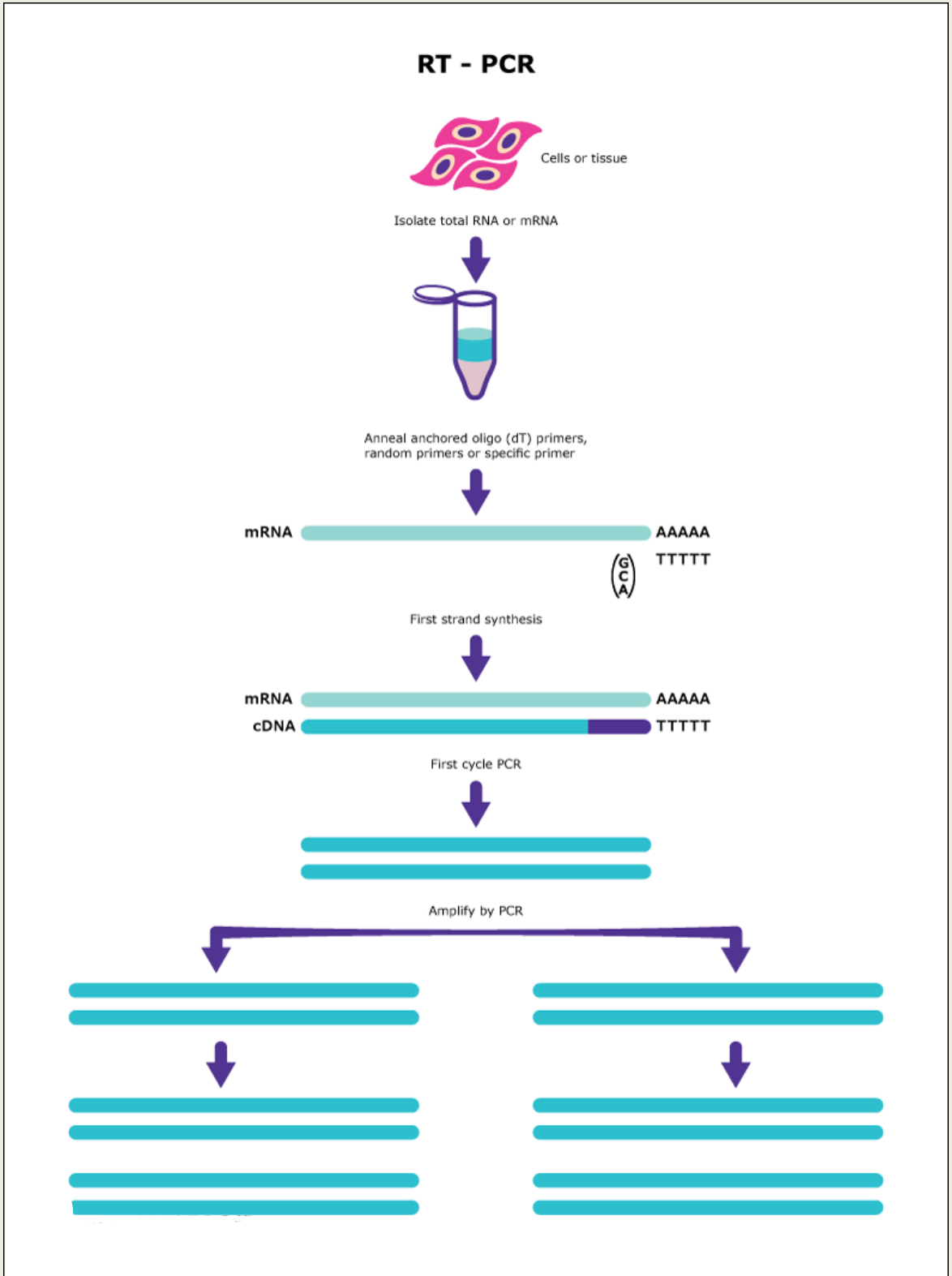
3 النسخ العكسي (Reverse Transcription):
باستخدام إنزيم Reverse Transcriptase يتم بناء شريط DNA مكمل (cDNA) من الـmRNA – أي تحويل الـRNA إلى cDNA.

4 تضخيم الـcDNA (PCR amplification):
يتم بعد ذلك استخدام تقنية PCR لتضخيم (زيادة عدد نسخ) هذا الـcDNA، باستخدام إنزيم Taq polymerase وبادئات خاصة بالتسلسل المطلوب.

5 النتيجة:
نحصل على كمية كبيرة من الـDNA المكمل، والذي يمثل نسخة من الـmRNA الأصلي، يمكن استخدامه لاحقًا في الكشف عن الجينات أو دراستها.

RT-PCR

✅

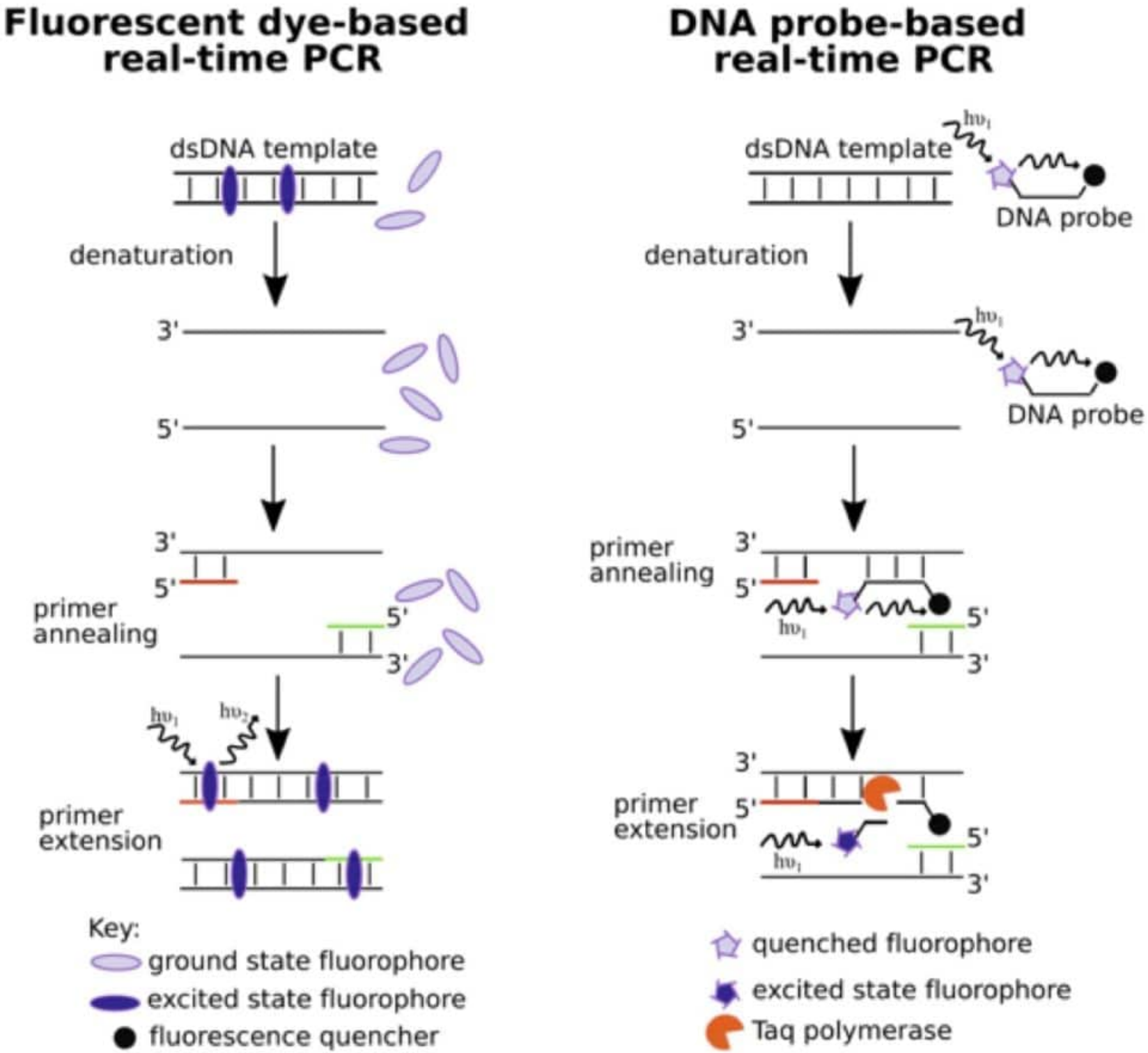

RT - PCR
Cells or tissue
Isolate total RNA or mRNA
Anneal anchored oligo (dT) primers,
random primers or specific primer
mRNA
AAAAA
TTTTT
G
C
A
First strand synthesis
mRNA
AAAAA
cDNA
TTTTT
First cycle PCR
Amplify by PCR

Real time-PCR

- Real-Time PCR is a variation of PCR that allows analysis of the amplified DNA during the usual 40 cycles of the procedure. Although the procedure is similar to conventional PCR with cycling, Real-Time PCR uses fluorescent dyes attached to some of the building blocks or small nucleotide strands.

- Fluorescence occurs when the amplified DNA strands are formed. The amount of fluorescence can be measured throughout the 40 cycles, and allows the investigators to measure specific products and their amounts during the amplification cycles (no need for gel electrophoresis, producing more rapid results)

شرحهم بالسلايد اللي تحت



DNA probe based real time PCR

🟢 هون بكون في قطعة قصيرة من الحمض النووي اسمها Probe مصممة لتتعرف على تسلسل معين داخل العينة

🟢الـ DNA probe بكون مرتبط معه Quenched fluorophore يعني ما بكون مشع و ضاوي

🟢أثناء تضاعف DNA بروح Taq polymerase بقطع الـ Probe ، مما يفصل Fluorophore عن Quencher ، فبنقدر نقيس الـ Excited fluorophore .

🟢الـ excited fluorophore ما بتبين إلا إذا كان التسلسل المستهدف موجود، هالشي معناه إنه الطريقة دقيقة جدًا في الكشف عنDNA sequence معينة.

Fluorescent dye real time PCR

1️⃣ بنجيب الحمض النووي الأصلي (dsDNA) المادة الوراثية التي بدنا نضاعفها.

2️⃣ بنعمل تسخين العينة لفصل السلسلتين فبصير Denaturation .

3️⃣ ثم خطوة Primer Annealing فبترتبط الـ Prmers مع DNA.

4️⃣ بتبلش خطوة Extension: يبدأ إنزيم Taq polymerase ببناء سلسلة جديدة.

5️⃣ آخر شي Fluorescence Detection ترتبط الصبغة بالـ DNA اللي من أول مرتبطة فيه وتُصدر ضوءًا بنسميه excited fluorophore يمكن قياسه.

خلاصة الـ Probe في حال في حد ما فهم طريقته:

1️⃣ الـ Probe هو قطعة قصيرة من DNA مصممة للتعرف على تسلسل معين داخل العينة.

2️⃣ يحتوي الـ Probe على fluorophore مشع ومربوط بمُطفئ اسمه quencher يمنع الإشارة الضوئية طالما أن المسبار سليم.

3️⃣ أثناء تضاعف DNA ، بيجي إنزيم Taq polymerase بقطع الـ Probe ، فبنفك الـ Fluorophore عن Quencher و بصير عنا Excited fluorophore بنقدر نقيس إشارته الضوئية.

كلما زادت الـ Excited fluorophore ، دلّ ذلك على وجود الـ DNA sequence اللي بدنا ياه ، وبالتالي بنقدر نحدّد تحديد كمية الـ DNA المطلوب بدقة.

Feature	Fluorescent Dye-Based PCR	DNA Probe-Based PCR
Detection Mechanism	Dye binds to double-stranded DNA	Probe emits fluorescence when cleaved
Specificity	Low – detects any dsDNA	High – detects specific DNA sequences
Fluorescence Trigger	Accumulation of dsDNA	Probe cleavage during extension
Cost	Lower	Higher
Complexity	Simple setup	Requires custom probe design
Applications	General quantification of DNA	Precise detection of target sequences
Risk of Non-Specific Signal	Higher – dye binds all dsDNA	Lower – probe ensures target specificity

جدول مقارنة بين الطريقتين

Other PCR variations

- In addition to Real-Time PCR and RT-PCR, there are many more variations (at least 25) that exist and are used to solve specific problems. They all have different names such as Assembly PCR, ① ② Hot-start PCR, ③ Multiplex PCR, ④ Solid-phase PCR and many others

PCR has become a very powerful tool in molecular biology

- One can start with a single sperm cell or strand of hair and amplify the DNA sufficiently to allow for DNA analysis and a distinctive band on an agarose gel.
- One can amplify fragments of interest in an organism's DNA by choosing the right primers.
- One can use the selectivity of the primers to identify the likelihood of an individual carrying a particular allele of a gene.

Applications of PCR

- **Selective DNA isolation** (as in cloning or fingerprinting of organism)
- **Amplification and quantification of DNA** (forensic medicine when trace amounts remains)
- **Medical applications:**
  - ***Genetic testing*** *looking for genetic disease mutations*
  - ***Tissue typing*** *important for organ transplantation*
  - ***In early detection of cancer*** *as leukemia and lymphoma*
- **Infectious disease application** as in HIV virus, Tuberculosis and spread of disease organism in animals
- **Forensic applications:** as genetic fingerprinting of DNA in crime scene and DNA Paternity testing

PCR and Disease

- Primers can be created that will only bind and amplify certain alleles of genes or mutations of genes
  - This is the basis of genetic counseling and PCR is used as part of the diagnostic tests for genetic diseases.
- Some diseases that can be diagnosed with the help of PCR:
  - Huntington's disease
  - cystic fibrosis
  - Human immunodeficiency virus

التطبيقات الفعلية للي بنحكيه كثيرة منها :

🟢مثلاً الـ Metabolite enzyme هي عند حد بتكون سريعة و حد مش سريعة فهالشي بنكتشفه لما نعطي Warfarin للمريض و فرضاً صار عنده Toxicity من الجرعة العادية معناها عنده Slow metabolizer وعالعكس تماماً لما يكون عنده Fast metabolizer ما بتكفيه الجرعة و نضطر نزيد الجرعة معناها لازم نروح نشيك عالـ Gene و نشوف هل في mutation و شو نوعها.

🟢 كمان بنشوف قابليته للمرض مثلا عنده قابلية لمرض الـ Leukemia هالشي ببين برضه بفحوصات الجينات.

🟢 أيام كورونا كانوا ياخدوا مسحة و يعملوا Reverse transcriptase ثم PCR و بحطوها بـ Tube فيه الـ Primer فلو طلعت النتيجة Positive معناها عنده الفيروس لإنه فعلياً إحنا بس حطينا الـ Primer والعينة كان من الشخص!

🟢كمان فكرة مرض الـ HIV نفس الشي فإذا موجود بدمه الـ RNA تاع الفيروس بتطلع العينة Positive، و طبعا هي مش بهدف الـ Screening و إنما بس لما حد يتبرع بالدم بنشيك إنه دمه ما في هالفيروس عشان بنتقل بين الأشخاص من خلال نقل الدم.

🟢 كمان في مرض Huntington disease وهو عبارة عن Genetic disease بصير عند المريض بكون عند مشاكل عقلية و مشاكل بالحركة سببها mutation بـ Huntington gene فبكون الجين عنده في مشكلة بالـ Sequences يعني بنلاقي الكودون هاد CAG مكرر أكثر من 36 مرة، ولكن بالوضع الطبيعي لازم يكون مكرر أقل من 30 مرة!

فبناخذ الـ Primer تاعت المرض و بنكثرها ثم نعمل PCR و نشوف Sequence ونعد CAG.

🟢 كمان مرض Cystic fibrosis فالمرضى هدول بكون عندهم مشكلة بالـ Secretions بالـ Respiratory system فوين ما عند المريض في Secretions بنلاقيها بتكون Viscous، فاللي بصير إنه كل ما دخل أو طلع Na بروح برافقه Cl و وقتها بروح بنط جزيء مي معهم فبنلاقي أي مكان بنفرز فيه Mucous بنلاقي فش مي لإنه طلعت فبالتالي بتكون الإفرازات هي Very Viscous و بكون حلقهم مسكر و هي بيئة مناسبة لنمو البكتيريا.

🟢هدول الأشخاص ممكن الأمعاء تسكر عندهم أو أي شي فيه هي الـ Bacterial Secretions و في Duct هناك معناها حنلاقي هي الـ Duct مسكرة.

🟢بنعمللهم Diagnostic test عن طريق PCR of CFTR ثم نشوف الـ Sequences ونشوف الـ Mutation اللي عنده.

it is a Pump

Huntington's Disease (HD)

- HD is a genetic disorder characterized by abnormal body movements and reduced mental abilities
- HD is caused by a mutation in the Huntingtin (*HD*) gene
- In individuals with HD, the *HD* gene is "expanded"
  - *In non-HD individuals, the HD gene has a pattern called **trinucleotide repeats** with "CAG" occurring in repetition less than 30 times.*
  - *IN HD individuals, the "CAG" trinucleotide repeat occurs more that 36 times in the HD gene*
- PCR can be performed on an individual's DNA to determine whether the individual has HD.
  - *The DNA is amplified via PCR and **sequenced** (a technique by which the exact nucleotide sequence is determined) and the number of trinucleotide repeats is then counted.*

Cystic Fibrosis (CF)

- CF is a genetic disease characterized by severe breathing difficulties and a predisposition to infections.
- CF is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene.
- In non-CF individuals, the *CFTR* gene codes for a protein that is a chloride ion channel and is involved in the production of sweat, digestive juices and mucus.
- In CF individuals, mutations in the *CFTR* gene lead to thick mucous secretions in the lungs and subsequent persistent bacterial infections.
- The presence of *CFTR* mutations in an individual can be detected by performing PCR and sequencing on that individual's DNA.

Human Immunodeficiency Virus (HIV)

- HIV is a retrovirus that attacks the immune system.
- HIV tests rely on PCR with primers that will only amplify a section of the viral DNA found in an infected individual's bodily fluids.
  - Therefore if there is a PCR product, the person is likely to be HIV positive. If there is no PCR product the person is likely to be HIV negative.
- Protein detection based tests are available as well but all US blood is tested by PCR.

PCR and Forensic Science

- Forensic science is the application of a broad spectrum of sciences to answer questions of interest to the legal system. This may be in relation to a crime or to a civil action.

- It is often of interest in forensic science to identify individuals genetically. In these cases, one is interested in looking at variable regions of the genome as opposed to highly-conserved genes.

- PCR can be used to amplify highly variable regions of the human genome. These regions contain runs of short, repeated sequences (known as variable number of tandem repeat (VNTR) sequences). The number of repeats can vary from 4-40 in different individuals.

- Primers are chosen that will amplify these repeated areas and the genomic fragments generated give us a unique "genetic fingerprint" that can be used to identify an individual.

PCR Applications to Forensic Science

أيام الحروب كانوا ياخدوا الأولال من أَهاتهم و يدفنوهم بمكان فبس لاقوهم صارت كل أم أو جدة تاخد الطفل وتعمل PCR لدمه و تتأكد هو ابنها أو لأ

- Paternity suits -Argentina's Mothers of the plaza and their search for abducted grandchildren

- Identifying badly decomposed bodies or when only body fragments are found - Bosnian , Iraq & Rwandan mass graves

العدوان لسا عم نشوفه للآن
بصير مع إخواننا بغزة و السودان
فلا تنسوهم من الدعاء🤲

شرحها بالسلايد اللي بعد هاي

- 5’-ACG TGT AAC CGT CGA GGT AAT ----------
  ----------ACT GCA ATT GCA TCA TAG AAC CGG-3’

- Sense: 5’-AAA GGA TCC ACG TGT AAC CGT CGA GGT

- Antisense; 5’-AAA GAA TTC CCG GTT CTA TGA TGC AAT TGC

🟢 حكينا عن Design الـ Primer الـ Forward و الـ Antisense primer ، هسا عشان نتجنب مشكلة القطع اللي بصير ما يقطع الـ DNA اللي بدي ياه فبروح بحط AAA عشان لو قطع يقطع شي بديش ياه أنا ضفته زيادة.

🟢كمان لما بكون بعمل clonning للـ DNA يعني بدي احضر Recombinant DNA فحطينا بالأول primer و بالآخر Primer و بدنا ننسخ ولكن لازم ندخله ع vector لذلك بدنا إنزيم عشان يدخله ع Vector لكن الانزيم بربطش على الـ DNA الاصلي اللي ببلش من ACG فببلش من ACG فعليا الـ Primer تاعي، اول نسخة ما حيربط معه ، الثانية ممكن يربط من النص لكن ما بعد ذلك بنسخ عنهم فمتى بدي ادخله على Vector بقصه بالإنزيم.