



# DNA replication

## DNA Polymerase

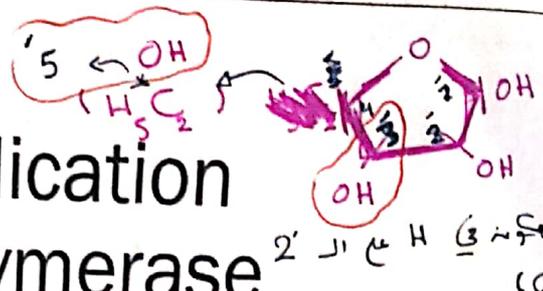
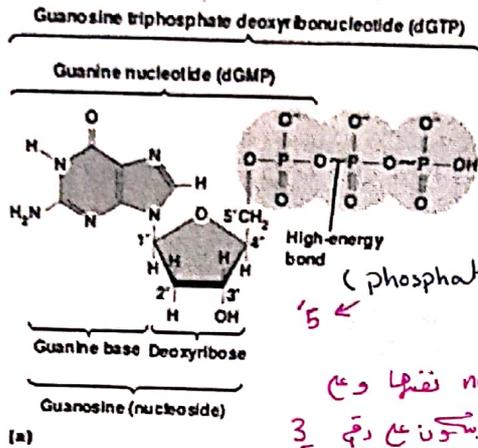
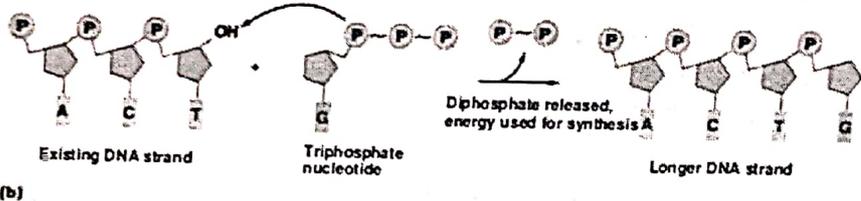


Figure 7.5 The dual role of triphosphate deoxyribonucleotides as building blocks and energy sources in DNA synthesis.



\* عننا deoxy مع الـ two Primes  
 عندي Guanine & triphosphate  
 حكيما شغل الـ Polymerase من 5' لـ 3'  
 بتسكر عندي تنتين Phosphate، وبتربط وحدة (phosphate)  
 مع الـ OH (3)  
 \* الـ direction من جهة الـ sugar مع رقم 1 الـ nucleotide فيها مع  
 5 عندي الـ Phosphate بتكون مرتبطة بالـ OH الـي بتكون مع رقم 3  
 الـ Base تاتبع ..



© 2015 Pearson Education, Inc.

⑤ مراجعت سريعة عـ  
 حكيما بالـ (leading) الـ Poly-merase بداية بدم Primase. هشان يضيف ويباش شغل الـ DNA ما بقدر يباش من الـ الصفر -  
 Nucleotides Strand

## Complementary Base-Pairing in DNA

\* حكيما دالنا هو جود dNTP (tri-Phosphate) بتتبنط بطلعو وحدة بتربط مع الـ 3' الـ nucleotide الـي جنبها، طبعاً بتاربط 5' مع 3' ..

- DNA is a double helix, made up of nucleotides, with a sugar-phosphate backbone on the outside of the helix. (لما بتكون عندي الـ double helix)
- The two strands of DNA are held together by pairs of nitrogenous bases that are attached to each other via hydrogen bonds. (كله (nucleotide) بقابلها وحدة)
  - Adenine will only pair with thymine (2 H-bonds) ⇒ A = T (رابطتين)
  - 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. (حكيما الـ PCR هو تقليد أو شئ بتسابق الـي موجود عندي بالـ Replication of the DNA)

(in vitro) شرح الـ *in vitro*

١١. شواحيات حتى نعمل (Replication) ؟!

- ١ شي اهاي انقل عنه
  - ٢ polymerase enzyme
  - ٣ Primers
- بالتالي لازم اطلبه

## DNA Replication enzymes:

Helicase, Topoisomerase and Single-strand binding protein

\* بالسي يكون متوفر عندي pH, Buffer, temp.   
 نيا برا الجيب انا اللي بوفر هادي له (Conditions) ..

■ Helicase untwists the two parallel DNA strands   
 \* طبعا الحرارة لازم تكون موزعة بالتساوي مع كبر tube موجودة

لعي بالتالي بنستخدم (Thin walled) شو خاص لسفد الـ PCR ..   
 tubes بالوضاحت

■ Topoisomerase relieves the stress of this twisting   
 لـ (Thermal cycler) عبارة عن heating, كبر (block) blocks   
 بقدر اعملها programming, يعني اطلبك في لازم ارفع الحرارة و في لازم ينزلها, وشو الـ temp. و

■ Single-strand binding protein binds to and stabilizes the unpaired DNA strands   
 الوقت كبر temp.   
 كمان الـ (bed) اللي

بعضي فيه العيانت تاعتب عبارة عن (Heated beds), يعني الحرارة موزعة بكر الاتجاهات   
 بالتالي ما في evaporation :: العيانت ح تظلمها موجودة \*

## 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)

الأجهزة القديمة كان ال volume له tube المستعمل محدود 5 او 4 مقارنة  
 بال volume المستعمل بالأجهزة الحديثة حالياً محدود 10 mL

# Old versus New method

بالأجهزة القديمة كان عندي  
 (Limitations)

نتيجة الحجم الكبير يتطلب اتي اخط الزيادة كثيرة وها هو يزيد ال (cost) وغير هيك نتيجة الاختلاف  
 بالحرارة كان يصير عندي evaporation

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

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

عكس

الأجهزة الحديثة

صارت اوفر

ال ( tubes ) المستعملت

باتالي ال

efficiency

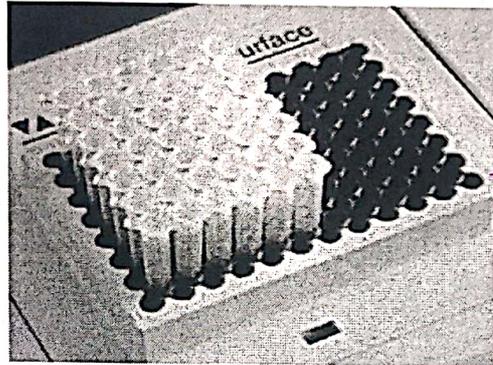
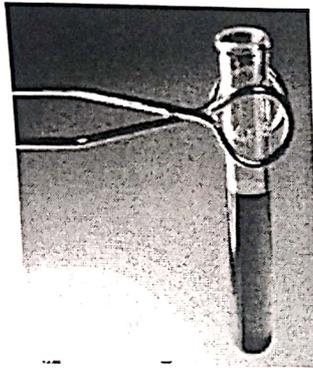
أحسن وماي

عندي evaporation

نتيجة التوزيع

المتساوي

للحرارة ..



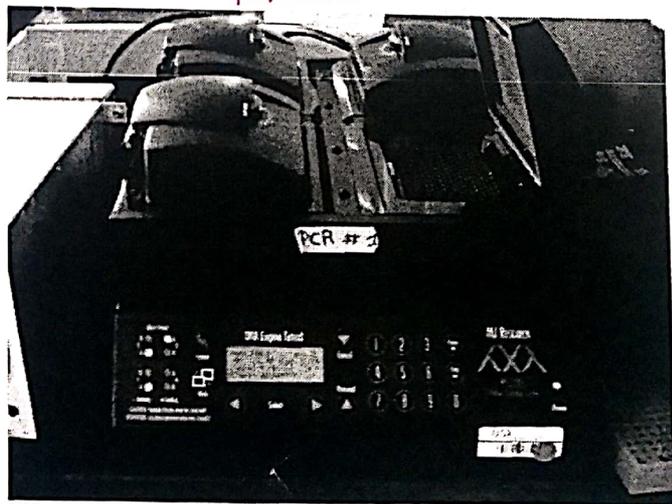
هون بس يعني (programming) له Block التي بدنا اياها (هون عندي 4 blocks)  
 و ال Heated بتوزع الحرارة بالتساوي بينهم ، احنا بس منظم ال (mix) تاغنا  
 leds

## PCR

اللي يتكون من ( Primers , DNA , Buffer , template )  
 Polymerase

10:00

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

\* في عندي three steps PCR  
mainly

Denaturat. ← منظر ← Denaturat. لـ DNA

# The three main steps of PCR

أنا عندي بالجميع كان عندي Helicase & Topoisomerase & SSB لفك الـ "DNA"  
يسر هون يو الـ الجسج بايما للحرارة

- 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)

يعني بقدر أعبر Denaturat. لـ "DNA" من دون ما أخربها ، بيجود إنه انصقت مع 95° ← بالتالي الـ Strands

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

الـ Primers ما يربط مع 95° ، بدهم درجة حرارة مناسبه وهما ينفصلو  
بتبقي فيها حسب الـ Primer الـ عندي (جسجه) وشونوع الـ nucleotide  
عادة الـ temp. الـ complementary الـ primer الـ ما يربط الـ 45-65° ..

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.

يعني الـ polymerase بتدخل على الـ الوقت الـ بيدي ، ياه حتى  
يفضل يشتغل بتبقي فيه عن طريق الـ Construct الـ بيدي أجبني ..

\* حكيما منحنى الـ DNA مع 95° لمدة 5 دقائق حتى انصقت . denaturat. (فصل عن بعضه) وبعد ما فصل كبر شي هونج لدرجة حرارة 72° لمدة 10 دقائق بديينه منظر الـ end لـ rxn ناعنا عن طريقه  
تفويض الحرارة ..

## Heat-stable DNA Polymerase

\* البدايات لـ PCR ، الـ polymerase بالبريات كانت عبارة عن Klenow من الـ DNA لـ E. coli  
water ، الـ polymerase بالبريات كانت عبارة عن Klenow من الـ DNA لـ E. coli  
الـ water ، الـ polymerase بالبريات كانت عبارة عن Klenow من الـ DNA لـ E. coli

- 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

كان زمان يستعملوا وقت كثير وثمان الـ كاست عاليه ..  
كيف هتو الفسكج ؟! ← وهدوا في انواع من البكتيريا هوجودة بالينابيع الحارة مثلا

الـ enzyme حسب الطريقة الـ ذكرنا قبله (Taq)



\* حجبنا الـ  $Mg^{2+}$  هو الـ Cofactor لـ Polymerase enzyme

ليس صق لها آجبر اشتغل بر الجسم يكون في عذري  
Optimum Conc. for  $Mg^{2+}$  .. different conc. حاولوا بكمبوا



## Magnesium Chloride

( $MgCl_2$  - usually 0.5-5.0mM)

Magnesium ions have a variety of effects

$Mg^{2+}$  acts as cofactor for Taq polymerase

Required for Taq to function

\* زيادة الـ  $Mg^{2+}$  Conc. of  $Mg^{2+}$   
[ interaction between primer & the template ] يعني بيطلع الـ Strand الـ DNA يربط الـ  
بصير يربط اي مكان ( يعني ماي specificity بمعني الربط )  
Complementary الـ system..  $Mg^{2+}$  binds DNA - affects primer/template interactions

$Mg^{2+}$  influences the ability of Taq pol to interact with primer/template sequences

More magnesium leads to less stringency in binding

Manganese ( $Mn^{2+}$ ) can be used for PCR-mediated DNA mutagenesis, as a higher  $Mn^{2+}$  concentration increases the error rate during DNA synthesis

\* الـ Manganese بزيد من نسبة الـ error ، يعني اذا بدي اعلم mutation بالـ DNA مثك بدي اعلم knock out ← خط منخيز  
لاني بزيد نسبة الـ error ..

⊕ وين بدي انبش عسج البناء لـ "DNA" تاي ، كط الـ primer الـ الـ هو يكون

Complementary لـ DNA ←

## Primers

23,41

- PCR primers are short, single stranded DNA molecules (15-40 bp)
- They are manufactured commercially and can be ordered to match any DNA sequence
- Primers are sequence specific, they will bind to a particular sequence in a genome
- As you design primers with a longer length (15 → 40 bp), the primers become more selective.
- DNA polymerase requires primers to initiate replication

# « PCR Process »

- أول خطوة لل PCR ( Denaturation ) ، بعد ذلك يرتبط ال Primer  
ويبدأ سطر ال ( Polymerase )

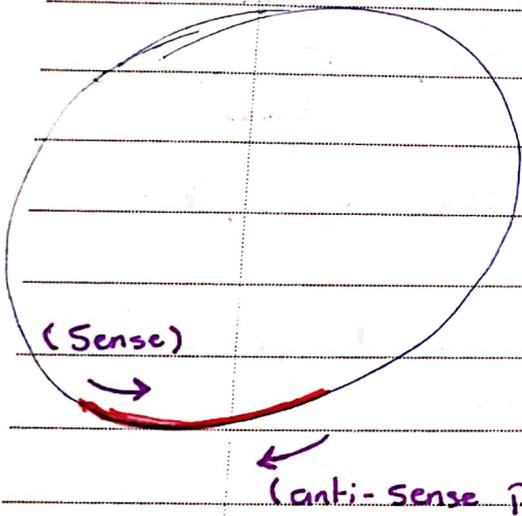
\* حساس جدا لتغيير ال DNA ما يكون دائما موجود وطوره ، أيضا يكون  
رابط هو ال Plasmid أو ضمن ال DNA تابع ال Human

\* ال PCR لل PCR يطبخ نجم الجين الذي يري اياه بالزبط ..

⑤ بعدنا ننفق ال Design تابع ال primers 2 -

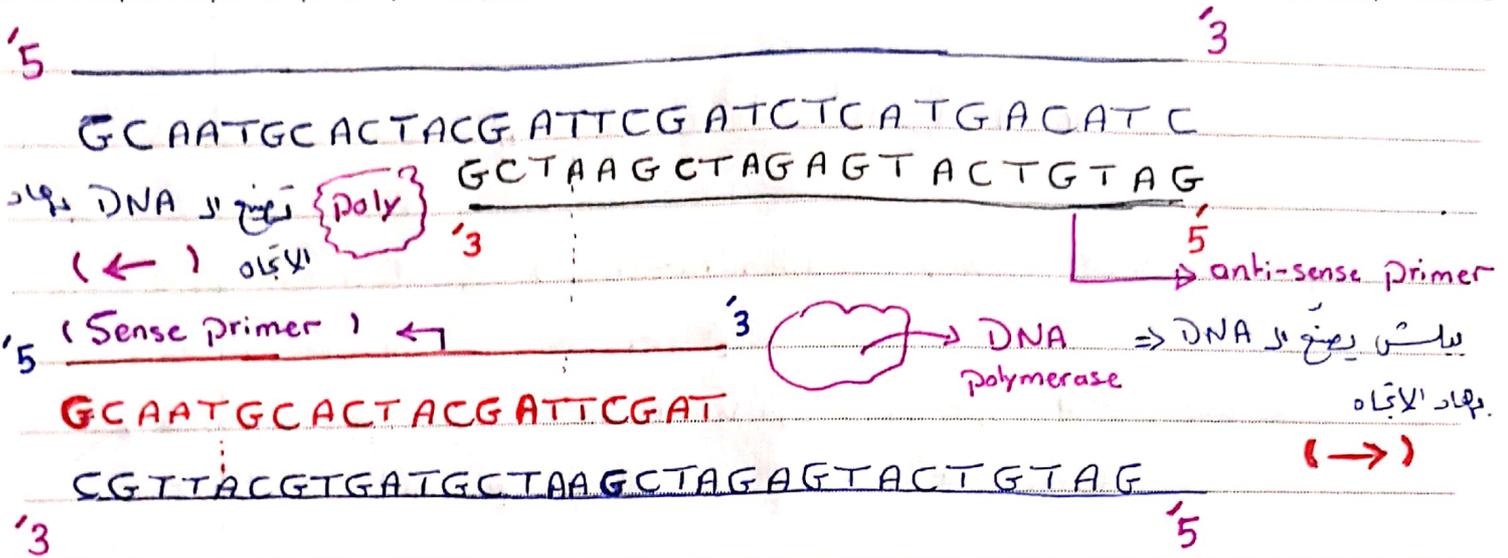
we need to  
design two  
primers

← to isolate this  
region of the DNA



\* احنا صغرفا ال DNA  
double  
Stranded





\* حتى اذني ال primer ← more وقل احتمال اني الاتي نفس specific

ال Sequence اليين تابع ال Human ← بتاني اقل size ال primer .  
 15 bases ، احنا بالعادة مناخذ 18 واكثر ..

- Size ال primer ال ( 15 - 40 )

\* فرضا هون اخذنا 20 ( Size of primer ) base

Note: سفر ال primer من 5' ← 3'

\* كل Base احتمال اني الاتيها 0.25

احتمال الاتي AA =  $0.25 * 0.25$

احتمال الاتي AAA =  $(0.25)^3$

- عملية التصنيع لا Primers عبارة عن Single Strand ، بتصنّفوا بتركيبات

موجّهة عن ال Sequence التي يردّ إياها

Anti-sense

primer

GATGTCATGAGATCGAATCG

5'

3'

بودي هاد ال Sequence للشركة وتصنّفوا إياها ..  
of anti-sense

\* علينا ال Requirements التي أنا بضيفها ال PCR Tube :

← nucleotide ( dNTP ) ، primers ، DNA sample "التي بدي أنتج عنه"

، Taq polymerase ، ال mixed buffer التي كتوي مع  $Mg^{+2}$  وال pH المناسب ..

1) تولد شي  $95^{\circ}$  ← Denaturation لفصل ال two strands

2) يربطوا ال primers ← ال temp. لتخليق الربط ( Annealing )

متغيرة وفي طريقة كما بها

← ( Annealing ) ربط ال primer ال ال Strand of the DNA

3) Extension بغير ال temp. ال Optimum التي بتناسب ال Taq polymerase

polymerase

صنّفوا يشغل ويبتدئ يصنع ال New strand of the DNA

\* هاي العملية كلها تتكرر "35" مرة

← Cycle بطول عندي two strands

عدد ال Strands الناتجة =  $2^{35}$   
من ( One molecule of )  
the DNA

⊗ هلا على سبيل المثال عندي segment عملتها enzymes digestion  
← طول موجي ( 4 Bands ) ، هاد ال Pattern للمثبتة فيه ..

وعنت للضخمة نفس الشيء ← PCR لقطعة من ال DNA  
← طول موجي ( 3 Bands )

(مش لازم)

← ال برنا نوصله الى هون ما يحتاج اني اخط ال  
Primer restriction enzymes  
لدي بس بردي اشفوف pattern و اتمارن فقط ..

\* بفنا ← لو الهرف تايي اعز Cloning هان اصبغ مشد ( insulin )  
قد ما بردي ، ازا انا صبغ ال PCR هاد و طول موجي كيتة موبشة و انوري تمام  
وال Sequence طول موجي ، بظن عندي مسكينة

← ( كيف بردي اذخره بال Plasmid  
تايي ) ؟!

نه هون يحتاج اضيف Restriction enzymes مع ال Sequence الي عندي ..

حسينا سينس  
two Primers  
Sense  
anti-sense

بالنسبة لـ Sense ، عندئذٍ سنجد Segment يدي اعلمها

PCR ← لذي أخذ اول شي Complementary منها ..

بالـ "Cloning" -

يروج بدونه الـ vector الـ يدي اعلمها (ويجدي ادخله) كان

بدي اعلمها الـ enzymes الموجودة بالـ multiple cloning region

والترميزات الموجودة بالـ construct (زي ما حسينا قبله ياخذ enzyme

مكرر) ، ويعرف الـ Restriction انهار الانزيم وبقيته - Sequence

لـ لتفرض كان هاد الـ Sequence ← (GGATTC) يروج بدونه

قبل الـ primer ..

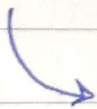
حلال عييت الـ PCR مع تقطر لـ "klenow" مان نكمل التواقص

- هاي التواقص كيف بتنتج ؟!

حلال عييت الـ PCR ، الـ polymerase ممكن يقص من الاطراف

تاعة الـ DNA يعني "ممكن يقص" ، مع اني بدي اياها ضمن الـ Sequence

هاي  
مشكلة



حالا - ع 4 ط AAA لاول

AAA

Primer



يحيى شئى بدي ادخله جسم الانسان as injection معناه بدي  
البروتين كالكه. ولذلك نشير الاحياء النباتية

غير هيبات ← انما ما تجلب الـ Histidine والاحياء النباتية

هين يكون اجسام غريبه دخلت جسم الانسان ، ممكن تحلل ( Allergy )

Stop codone

\* عملية الترجمة ← و تضيقها فاشية كد ما يكون عندي

عندي تضيق الـ Sequence ناي ..

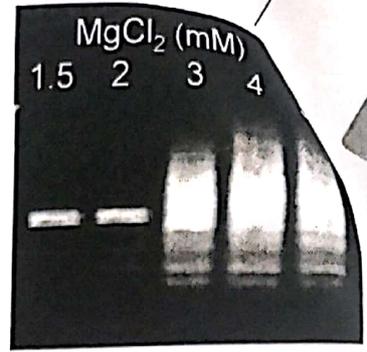
~~Stop codone~~

حکینا ال  $Mg^{+2}$  هو ال Cofactor ال polymerase enzyme

بیس حد لہا تہی اشتغلہ برا الہم بکون فی عندی  
 ہاولا بکوبوا .. different conc. ال

## Magnesium Chloride

( $MgCl_2$  - usually 0.5-5.0mM)



Magnesium ions have a variety of effects

$Mg^{2+}$  acts as cofactor for *Taq* polymerase

Required for *Taq* to function

Conc. of  $Mg^{2+}$  ال زیادہ ال  
 interaction between primer & the template  
 ال باؤرے ال [ interaction between primer & the template ]  
 ال یعنی بیٹھ ال Strand ال DNA ال ربط ال

$Mg^{2+}$  binds DNA - affects primer/template interactions

Complementary ال بصیر ربط ای مکن ( یعنی مای specificity بمعنی الربط ) ..

$Mg^{2+}$  influences the ability of *Taq* pol to interact with primer/template sequences

More magnesium leads to less stringency in binding

Manganese ( $Mn^{2+}$ ) can be used for PCR-mediated DNA mutagenesis, as a higher  $Mn^{2+}$  concentration increases the error rate during DNA synthesis

\* ال Manganese بزیڈ من نسبتہ  
 ال error ، ال از بیدی اغلر mutation بال DNA مٹ بیدی اغلر knock out ال خط منخیز  
 لہی بزیڈ نسبتہ ال error ..

⊗ وینہ بیدی ابلتس عسبے البناء ال DNA تایی ، خط ال primer الی ہو بکون

## ⊗ Primers

23,41

Complementary ال DNA

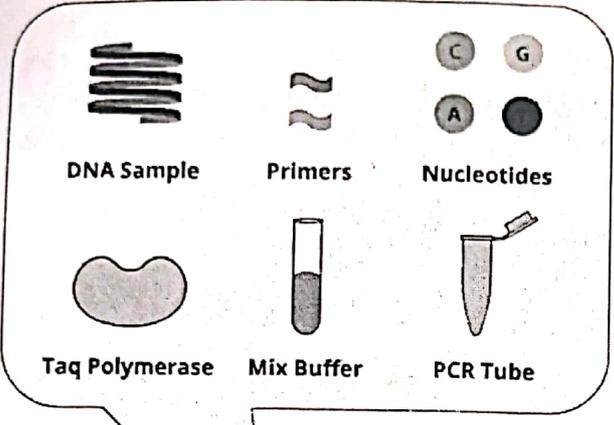
⊗ ال primer کتر مہم بال ال PCR process  
 ال primer design

- PCR primers are short, single stranded DNA molecules (15-40 bp) Sequence ال خط ال من 15 ال 40 ال یعنی عندی
- They are manufactured commercially and can be ordered to match any DNA sequence شرکت متفصیل بتسبیح
- Primers are sequence specific, they will bind to a particular sequence in a genome ال Primers
- As you design primers with a longer length (15 → 40 bp), the primers become more selective.
- DNA polymerase requires primers to initiate replication

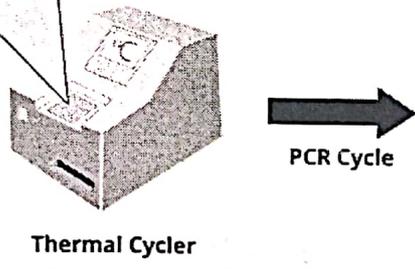
\* فكينا في 3 steps لـ PCR

Denaturation ① "For 1 minute" ← 95° مع  
 \* فكينا بالجب في عنا نكومن انزيم متمايز الـ two strands باليدافه الـ SSB of DNA

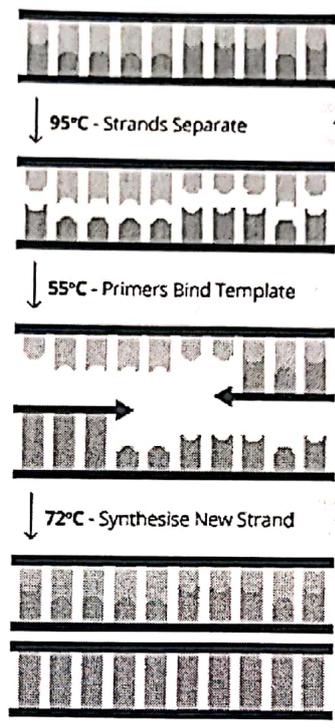
**PCR Components**



SSB: They working as aid for separation of two strands of the DNA for replication process.



**PCR Process (One Cycle)**



Out - side  
 in vitro ←  
 الـ denaturat. عن طريق Heating (تسخين)  
 \* الـ DNA بقصم الحرارة  
 ← Annealing (ربط الـ Primers بالـ Strands)  
 ايقام الـ primer و polymerase  
 دلتنا من 5' ← 3'  
 ← كبر الـ primer الـ annealing  
 temp. فاصحة في الـ 3. Extension  
 بعد هيك بيش شغل الـ Taq polymerase

Temp. "كبر ما قلنا الـ rate of polymerase action (تحت لباء الـ nucleotide) بقدر  
 مع الوقت في عند الـ protocol عدد : ما بقدر الـ temp. عن 72° حتى الـ polymerase

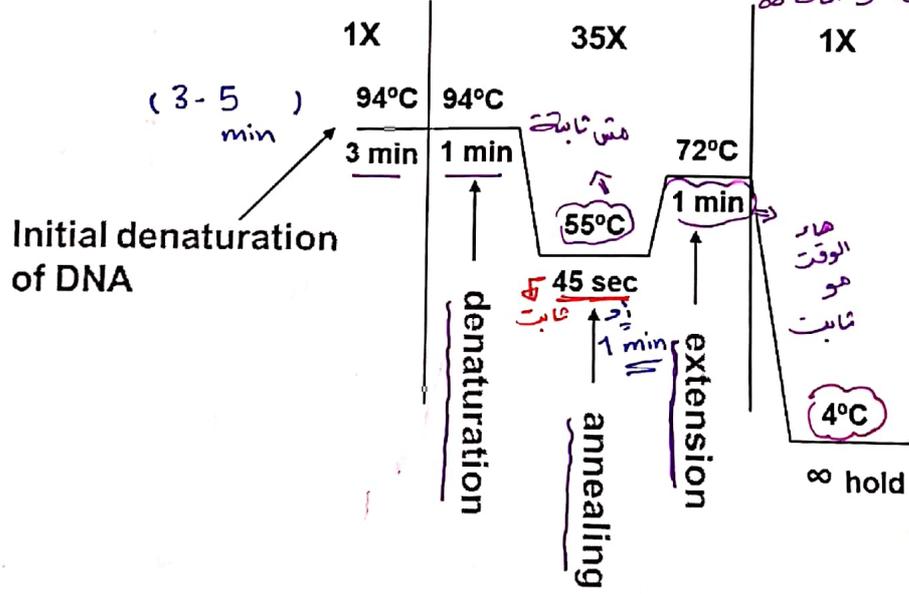
95° → 1 min  
 Temp → 1 min. 35 times.

**PCR Protocol**

72° → ?? max 3 min.

Annealing Temp  
 Extension Time

\* عند متغيرات قتيبة  
 آخر شي منتهي درجة الحرارة 4° مشان نوقف  
 الـ rxn , يومنظ (EDTA) ← هيك مشون وقفنا الـ (PCR)  
 \* اذا انقضت حرارة الـ Taq ← هكنا بغير عنا (mis-priming) ← بالشي بطع عند الـ streake  
 ما بكونه في Band وافوضه



## PCR Problems

Taq is active at low temperatures

At low temperatures mis-priming is likely

SO The design of the primer is important

Temp	Extension Rate
55° C	24 nt/sec
37° C	1.5 nt/sec
22° C	0.25 nt/sec → 150 nucleotides in 10 min

5) بال primer design ← بدی اموله بقدر الامكان يكونوا GC همه آخر Nucleotides ، وانما ما كان عندی غیر A&T. بزیده شوی ..

6) حکینا فی عنا (Soft-wares) ممکن زشتغل عیدم ..

\* ال Annealing بقعد علی ال (GC) به کله ماکانه عنا GC اکثر ← بختاج حواره اکر ..  
temp. content

- از اسیخه ال GC 50% اوبتای 50% به باخدها مثل ماهی (زی ما یتطوع مای)

## Primer Design

(بس لوکانته اقله لتفرض انه عنا (20 BP) ، وعندی ال GC عدد 9 ، معناه ال AT = 11

\* بهای کالته ما باخذ ال Annealing مثل ماهی ، لذرا اطرع منها (5) یعنی (5° - Annealing Temp.)

1. Typically 20 to 30 bases in length (sense and antisense)   
 و متسب له sense primer & anti-sense primer ← یعنی two ← بعدینه باخذ للاقله ..
2. Annealing temperature dependent upon primer sequence (~ 50% GC content)   
 \* از اکانته ال annealing کتر عالیته ← بوسر عندی mis-priming
3. Avoid secondary structure, particularly 3'   
 \* ال primer هونفسر ← های الفسکله رو تفله ال PCR Product
4. Avoid primer complementarity (primer dimer)   
 ال RNA ← عباره عنا
5. The last 3 nucleotides at the 3' end is the substrate for DNA polymerase - G or C   
 ال primer یلق علی مالک Single strand ، فسخ مکنه
6. Many good freeware programs available   
 (برتبط مع نفسه) و بعض

بدنا خاوله اینه ال sense & anti-sense ← ما یکنوا .. (Secondary) Primer dimerizat. structure

Complementary عندی Complementary to each other ← حتی ما يرتبطوا بعض (Primer dimer)

more & more ← Specificity ← Primer length → كبر ما زاد عندي ال

← يعني بزيادة ال Specificity عن طريقه زيادة ال Bases ال Primer

## Selectivity of Primers

- Primers bind to their complementary sequence on the target DNA
  - A primer composed of only 3 letter, ACC, for example, would be very likely to encounter its complement in a genome.
  - As the size of the primer is increased, the likelihood of, for example, a primer sequence of 35 base letters repeatedly encountering a perfect complementary section on the target DNA become remote.

## A Review of Probability

احتمالنا على ال Probability

### A COIN THROW

The probability of a heads (H) or a tails (T) is always 0.5 for every throw. What is the probability of getting this combination of tails in a row?

Event	Probability
Tails	0.5 = 0.5
T,T	0.5 x 0.5 = 0.25
T,T,T	0.5 x 0.5 x 0.5 = 0.125
T,T,T,T	(0.5) <sup>5</sup> = 0.03125
T,T,T,T,T,T,T,T	(0.5) <sup>11</sup> = 0.0004883
T,T,T,T,T,T,T,T,T,T,T,T	(0.5) <sup>16</sup> = 0.00001526

So it become increasing unlikely that one will get 16 tails in a row (1 chance in 65536 throws). In this same way, as the primer increases in size the chances of a match other than the one intended for is highly unlikely.

# Probability in Genetics

- There are 4 bases in the DNA molecule A,C,G,T
- The probability of encountering any of these bases in the code is 0.25 (1/4)
- So let us look at the probability of encountering a particular sequence of bases

Event	Probability
A	0.25 = 0.25
A,T	$0.25 \times 0.25 = 0.0625$
A,T,A	$0.25 \times 0.25 \times 0.25 = 0.015625$
A,T,A,G,G	$(0.25)^5 = 0.0009765$
A,T,A,G,G,T,T,T,A,A,C	$(0.25)^{11} = 0.000002384$
A,T,A,G,G,T,T,T,A,A,C,C,T,G,G,T	$(0.25)^{16} = 0.0000000002384$

So it become increasing unlikely that one will get 16 bases in this particular sequence (1 chance in 4.3 billion). In this same way, one can see that as the primer increases in size, the chances of a match other than the one intended for is highly unlikely.

\* ازا کاغذے ال GC Content باضد ال temp. قس ما هیں ..

بطح عندي two باضد الاقله temp

الفرقه بس! في ما بطرح 5 بهاي

الكلية ..

## Primer Design Software

Many free programs available online

OLIGO

PRIMER

PrimerQuest

DNA Star

\* شرح ال Extension ..

time

1 min ← 500 base pair

90' sec ← 700

2 min ← 1000

3 min ← 1500

3 min ← maximum عندي , لو ال (X) 4 min ← 2000

.. restriction enzyme بالاتي بقتهم لقطعين ( 2 PCR ) بعدين كطرح مع بعض , بضمها عن طريق enzyme products

# Primer Dimers

- Pair of Primers

5'-ACGGATACGTTACGCTGAT-3'  
5'-TCCAGATGTACCTTATCAG-3'

وحدة من المسألة  
التي يمكن تمييزها  
إذا كان في جزء بال primer  
Other Complementary  
Primer

- Complementarity of primer 3' ends

5'-ACGGATACGTTACGCTGAT-3'  
3'-GACTATTCCATGTAGACCT-5'

- Results in PCR product

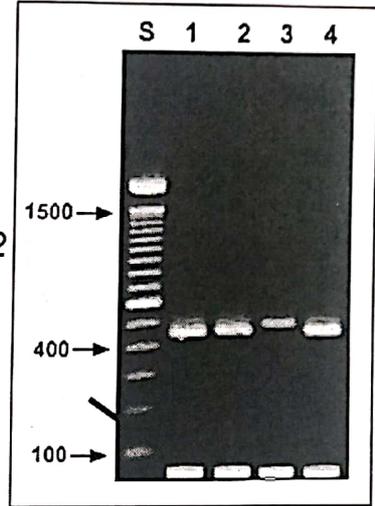
Primer 1

5'-ACGGATACGTTACGCTGATAAGGTACATCTGGA-3'  
3'-TGCCTATGCAATGCGACTATTCCATGTAGACCT-5'

Primer 2  
\* يمكن أن يكون ال PCR يكون ناقص عندي . لهيئة [3A]

AAA GGATCC His  
restrict. enzyme  
Sequence Sequence  
التي هي انقطع

\* يمكن أن يكون از ابي بروتين (growth, insulin) hormone  
نصف sequence ل protease enzymes



بقصرا بانماكن معينة مثان يطبخ البروتين كاله ..

\* لنفرض ال primer يتكون من 19 base  
GC ← 9 ← مضروب بـ 4 ، مشهور 3  
AT ← 10 ← مضروب بـ 2

## Rules of thumb for PCR conditions

$10 \times 2 = 20$   
Annealing temp. ← 56

- Add an extra 3-5 minute (longer for Hot-start Taq) to your cycle profile to ensure everything is denatured prior to starting the PCR reaction

56-5 = 51

- Approximate melting temperature (Tm) =  $[(2 \times (A+T)) + (4 \times (G+C))]^{\circ}\text{C}$

Other primer  
كمان عندي 19 base

- If GC content is < 50% start 5°C beneath Tm for annealing temperature

(8 \* 4) 8 ← GC  
11 ← AT

- If GC content ≥ 50% start at Tm for annealing temperature

length of my PCR ← Extension \* time (11 \* 2)

- Extension at 72°C: rule of thumb is ~500 nucleotide per minute. Use 3 minutes as an upper limit without special enzymes

32 + 22 = 54  
- 5 = 49

49 ← annealing temp. \* باخذ الاقل

\* كل الادوات التي يشتغل فيها لازم تكون (Sterile) حتى ان dials  
 و قنجان تكون DNA يوجب ما يري ال DNA تاني يدخل لاداه ما اليه دخل  
 Free

## Common PCR additives

BSA: في اساسي بال Restrict. enzyme  
 BSA (usually at 0.1 to 0.8 µg/µL final concentration)

Stabilize Taq polymerase & overcome PCR inhibitors يعني لازم نضيفه لاداه

Boman Serum Albumin (Stabilization) بقول

DMSO (usually at 2-5% v/v, inhibitory at ≤ 10% v/v) Stabilization

Denaturant - good at keeping GC rich template/primer strands from forming secondary structures. \* بفتح ال primer مرة تايك , يعني

يساطة بسهل ارتباط ال primer

(Viscous)

Glycerol (usually at 5-10% v/v)

Increases apparent concentration of primer/template mix, and often

increases PCR efficiency at high temperatures. ال viscosity ال glycerol

ال primer & template يقربوا من بعض اكون

Stringency enhancers (Formamide, Betaine, TMAC) يحافظ على انه ال solution الموجود

Concentrations used vary by type

ال PCR تكون ال viscosity بلك العقولة

Enhances yield and reduces non-specific priming بالاتي بعض ال primer مرتبط مع ال template

non-specific priming حتى اقول ال

Non-ionic detergents (Triton X, Tween 20 or Nonidet P-40) (0.1-1%) efficiency ال PCR احسن ..

NOT SDS (0.01% SDS cuts Taq activity to ~10% of normal)

Stabilize Taq polymerase & suppress formation of 2° structure

\* ما بضيف ionic detergent ← ح - كربولي كن شي -

ان ال non-ionic لقلوا ال Secondary Structure و يزيدوا ال Stability of Taq polymerase

## Typical PCR Temps/Times

⊗ Initial denaturation 90° - 95° C 1 - 3 min  
 وبصير (5 min)

\* ازا كانت ال annealing temp.

قلباته كثير ← ما رح يطالع عندي

PCR (Bands)

ولو عاليه كثير ← ممكن بصير

⇒ Denature 90° - 95° C 0.5 - 1 min

Primer annealing 45° - 65° C 0.5 - 1 min

Primer extension 70° - 75° C 0.5 - 2 min

max time ← 72 ← عادة مناخذ

3 min

Final extension 70° - 75° C 5 - 10 min

72°

Stop reaction 4° C @ 10 mM EDTA hold

( قبل ارتباط ال primer بشكل جيد )

to avoid mis priming

\* ما قطع ال polymerase يبتدئ من الاوله بحله

Physical Separat.   
 Polymerase بفعال ال   
 بغيره بضيفه

# Solution for mis-priming

## Cheap fixes

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

او يبتدئ ال rxn ب ice بالاتي ال polymerase   
 مانع يكون شغاله

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

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

Hot start :- يعنى يبتدئ بحله ال denaturat. قبل   
 اضافه ال polymerase يعنى Heating ل 10 min بغيره   
 بضيف ال polymerase

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

wax beads : عباره عن قطع بربط عليها ال polymerase ، بغيره مع الحماض العاليه والتعدين بيفضل ال "polymerase" ويبتدئ بضيف   
 صيدك بكونه غلظه ( isolation )

## PCR additives

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

\* Polymerase anti-body : بكونه مرتبط مع ال polymerase بغيره ارتفاع الحماض   
 anti-body شغاله عن بعضه

Touch Down PCR

:- بغير من ال annealing temp. ، مشك ال annealing temp.

باوله cycle تكونه عاليه شويه ، بغيره بفضله شوي مشك اقله   
 من مشك ( mis-priming )

37: 31

\* PCR additives   
 Buffer of polymerase ( انكز لطريقت مستخدمه )   
 reagent ( انكز ال reagent )   
 check contaminated

## Troubleshooting PCR

### 1) Non-specific bands on your gel

Secondary structure and mis-priming   
 خلوا مشك ال

### 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<sub>2</sub> concentration too high

Optimize by titration

GC-rich template, ↑ 2° structure

PCR additives

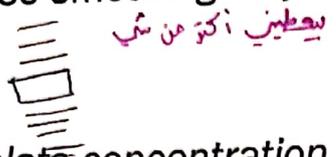
Contaminating DNA

Decontaminate work area:

- use ARTs, wear gloves,
- pipettor, reagents,
- UV treat plastics

non-specific bands   
 streaks

③ Troubleshooting PCR  
Diffuse smearing on your gel (Smear) ⇒ <sup>سيها ال</sup> mis-priming



- |  |                           |
|--|---------------------------|
| 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 <sub>2</sub> concentration too high | Optimize by titration     |
| GC-rich template, ↑ 2° structure         | PCR additives             |
| Contaminating DNA                        | Decontaminate work area:  |

لذا كره شي يكون (Sterile) DNA Free & RNA Free  
use ARTs, wear gloves, pipettor, reagents, UV treat plastics

\*\* اي شي زيادة زو نقصان => يرجع لـ Guidelines وبتأكد ، انزا نا صالحة كره شي بفسد

③ Troubleshooting PCR  
Poor or no amplification of bands

enzyme (عمادة كره شي قليل) مس enzyme Conc., Annealing temp.

يعني في عندي "template" & primers وكره شي..  
Run positive control

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

التوكيز => برجع بغير (Titration) ..

# 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)

enzymes

3 advantages

# Klenow fragment

\* عنده القدرة ان يصح وراحاله (Proofreading)

- 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

ن ان "Klenow" عبارة عن

Polymerase 5' to 3'  
exonuclease 3' to 5'

← هـ الـ قـ صـ هـ

5 → 3 ← يمكن استخدامها في بعض الحالات - لكنها غير موصية  
exonuclease

# Klenow fragment .. "polymerase"

⑤ بقدر استخدامها انزيمي ( Phosphate ) مع الـ "DNA"   
 group

- 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 fluorescent labeling reactions for microarray, and also in dA and dT tailing, an important step in the process of ligating DNA adapters to DNA fragments, frequently used in preparing DNA libraries for Next-Gen sequencing

\* بالوضع العادي يمكن أخذ بس الـ polymerase و أنسيل كل الـ exonucleases  
← مع بسين المثال ما عندي ( Subtilisin ) ~~يتسبب~~ الـ ~~بعض~~ enzyme

قطعة الـ exonuclease ، شو بروج بعقل ؟!

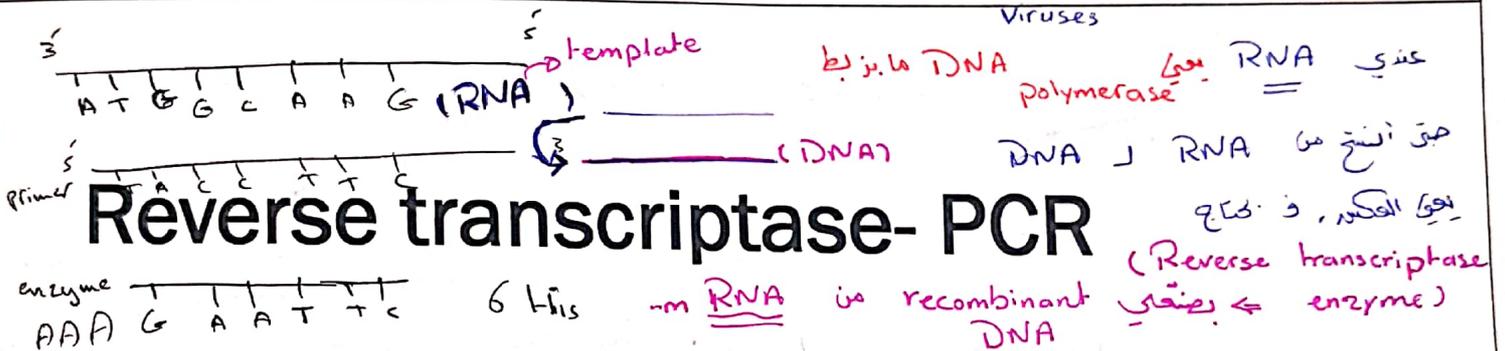
← بروج كروب الـ DNA و كروب بس الـ ( Polymerase )

⑥ exonuclease activity و ما في polymerase activity only  
exo-klenow Fragment بالفرقة ..

هـ الـ "exo-klenow" بقدر استخدامها بعضات الـ labeling & Sequencing  
الـ DNA

adapters to DNA fragments, frequently used in preparing DNA libraries for Next-Gen sequencing

\* في عددي اشياء فيها مسكنة ابي ابيح الـ DNA ناعلا اير اكثره -  
 د ازيكاد في عددي RNA ← كيتي كيتي ابيح (detection)



- 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

# « Reverse transcriptase-PCR Applications »

① أول فكرة ... (First application)

عندي خلايا سرطان ، وهاي الخلايا بغير فيها Over-expression لبروتين معين

يحيي مثان هاي الخلايا تنمو وتهاجم ال (Normal cells) ، لانه تزويد من الـ Blood supply ، Oxygenation الـ

الـ Kinases ← بتنقل بتدخل بعيارات الـ metabolism بكثرة ، ممكن يصير لها (Over-expression)

\* كيميائي اعرف (enzyme) معين مهاره Over-expression او كذا ؟  
 وهو ممكن استنسخه as drug target

- في ادوية مثل بدي اتموفا و ناتو عماد الـ انزيم و كذا ...

Untreated cell

اذا استنسخت ادوية ← ممكن يقدر الـ "expression"

RNA ← مع يطوع  
 كميات كبيرة و هو يصير عينا

Synthesis للبروتين كميات

كثرة لانه الانزيم شغال

- كذا عندي RNA ← مع اعرف من جيم الـ (Band)

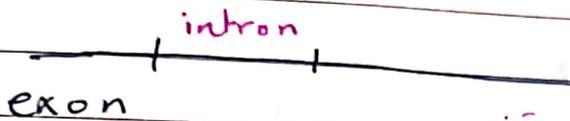
① 100%

② 30%

∴ مقارنة تقص الـ expression

(هون ما تكفي عن activity ، تكفي عن "Quantity")

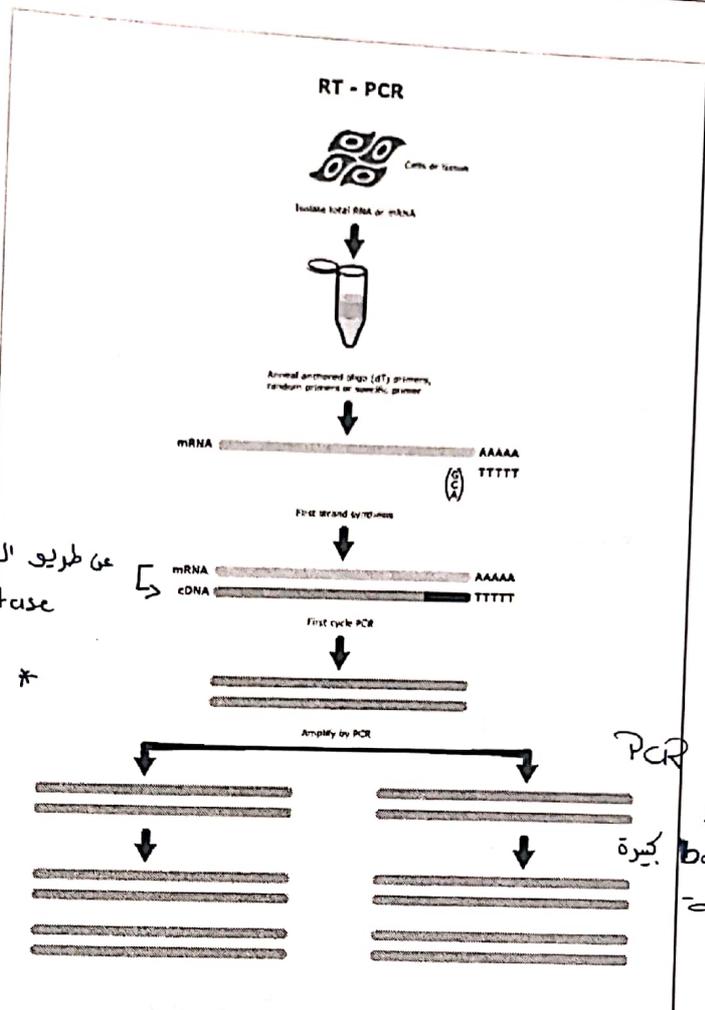
exons & intron :: كيف عرفوا انه الجين تابع بتقسيمه  
 3-sub unit of Hemoglobin



لا ال intron موجود، بس ما بقوله لبروتين  
 بالتالي بقوله بعد تصنيع ال mRNA و يربط ال exons مع بعض  
 و يطلع على ال cytosol و يدير له expression بال "Ribosome"  
 كيف بدى تعرف هال ال Sequence  
 ال عن طريق ال mRNA بدير له expression و يطلع منه ال cDNA  
 و هال ال DNA بدير منها قطعة تالفة

RNA viruses :: ازا بي Virus جديد اكتبوه و عامل انواع  
 بوهوا ال RNA تابع و بدرسوه

# RT-PCR



Reverse transcriptase  
عن طريق الـ

\* بقدر اقل من الـ mRNA  
لنهاد البروتين داخل الخلية ، واز  
بدرسه ادوية بقدر اقل كيف  
تأثيرها على الخلايا ٥٥

PCR  
بند  
على الخلية  
الـ Band  
& واضحة

16:33 ✖

1 RNA (Real time) بقدر استعمال  
&

2 Real time PCR  
PCR product من الاوله وقت لـ  
بطلع تـ ( Radiolabel ) بقدر انظر

## Real time-PCR (detection)

3 Polymerase

الـ بطلع هو اني بضيف مادة  
( Fluorescent )

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.

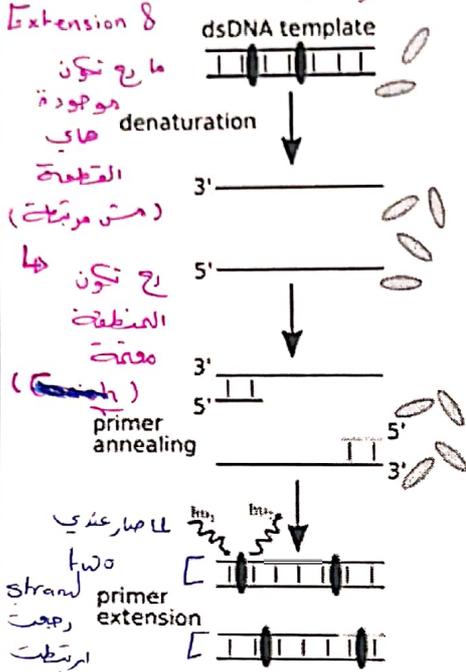
عند  
طريقته

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)

Strand of the DNA  
 Fluorescent material  
 ما يرتبط بال DNA

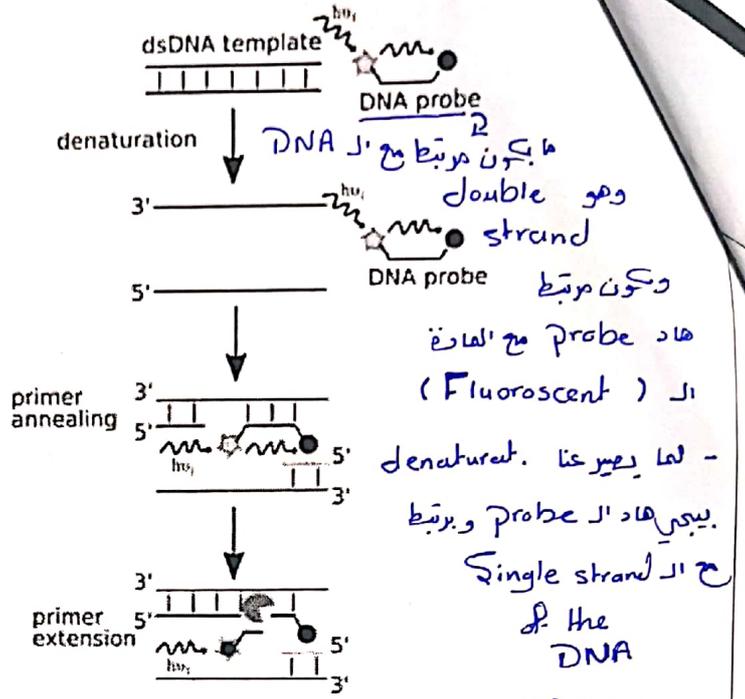
### ① Fluorescent dye-based real-time PCR

anneal. & Denat. مناسبات از اوقات ال



Key:  
 ○ ground state fluorophore  
 ● excited state fluorophore  
 ● fluorescence quencher

### DNA probe-based real-time PCR



☆ quenched fluorophore  
 ● excited state fluorophore  
 ● Taq polymerase

20:00

← يعني كل ما انكسرت وحدة ← مع تسع ..  
 \* كل ما تكون عندي double strand اكثر ← كل ما انكسر اكثر ← و بتعطيل! شعاع اكثر ..  
 ال DNA

## 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, Hot-start PCR, Multiplex PCR, Solid-phase PCR and many others

طوره تاييد ال PCR غير

PCR ال Reverse & Real time PCR  
 ال العادي (نول واحد)  
 ال transcriptase