

كلية الصيدلة

Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

المحاضرة العاشرة

2019-2020

د. شادي سكرية

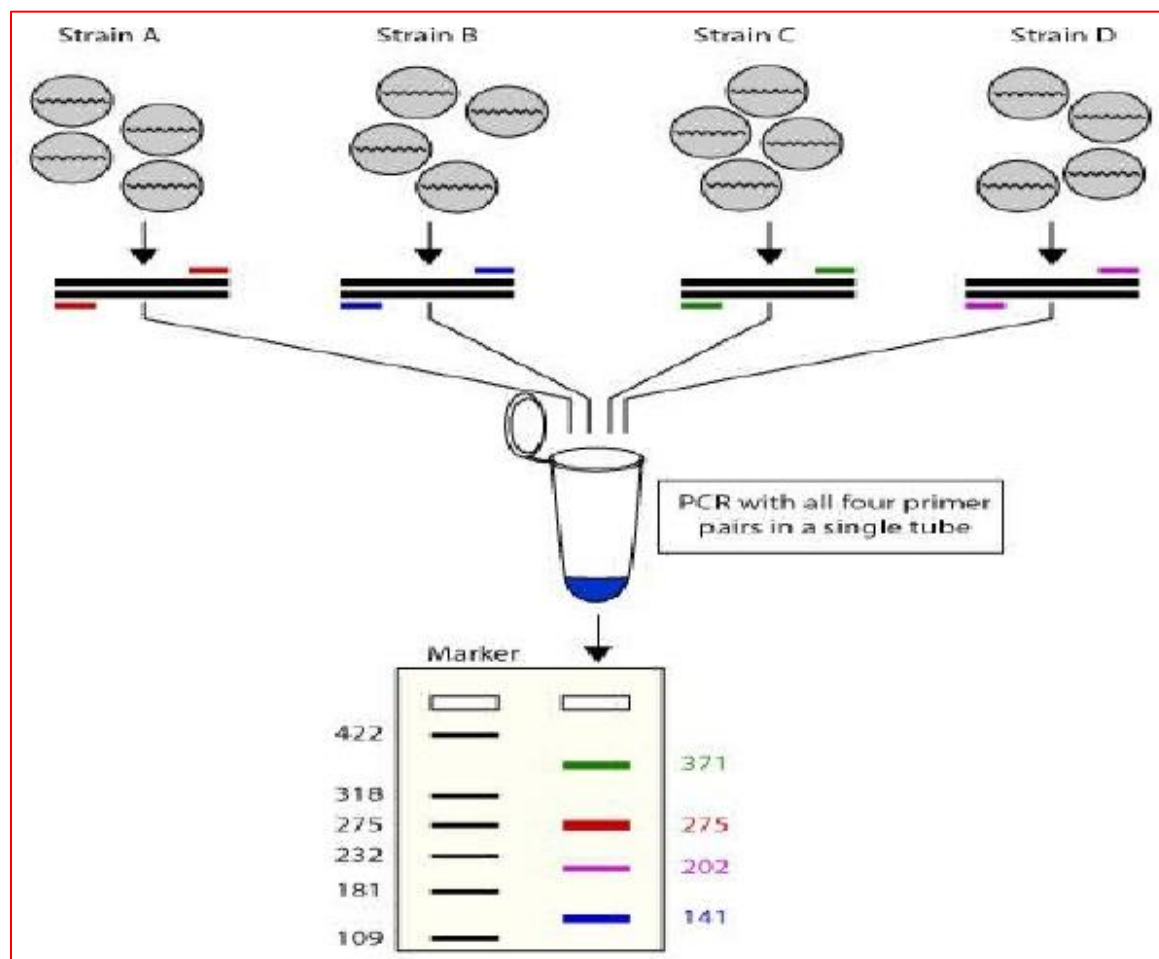
TYPES OF POLYMERASE CHAIN REACTION

• Multiplex PCR

- في PCR العادي يستعمل شفع واحد من البادئات لتضخيم تسلسل معين من DNA، في حين يستعمل عدة أشفاع of primers multiple pairs لتضخيم عدة تسلسلات بنفس الوقت simultaneously في Multiplex PCR.
- هذه التسلسلات قد تكون موجودة في DNA واحد أو في عدد من DNA.
- أهم شروط هذا التفاعل إعطاء شدف مضخمة مختلفة بطولها amplicon sizes كفاية حتى يمكن تمييزها كعصائب مختلفة على هلام الرحلان الكهربائي.
- من أهم تطبيقاتها: الكشف عن العديد من العوامل الممرضة Pathogens Identification، وتحليل الطفرات Mutation Analysis.

Pathogen Identification

تحديد هوية العديد من العوامل الممرضة بتفاعل واحد
توفير الوقت والجهد



Mutation Analysis

الكشف عن العديد من الطفرات في تفاعل واحد

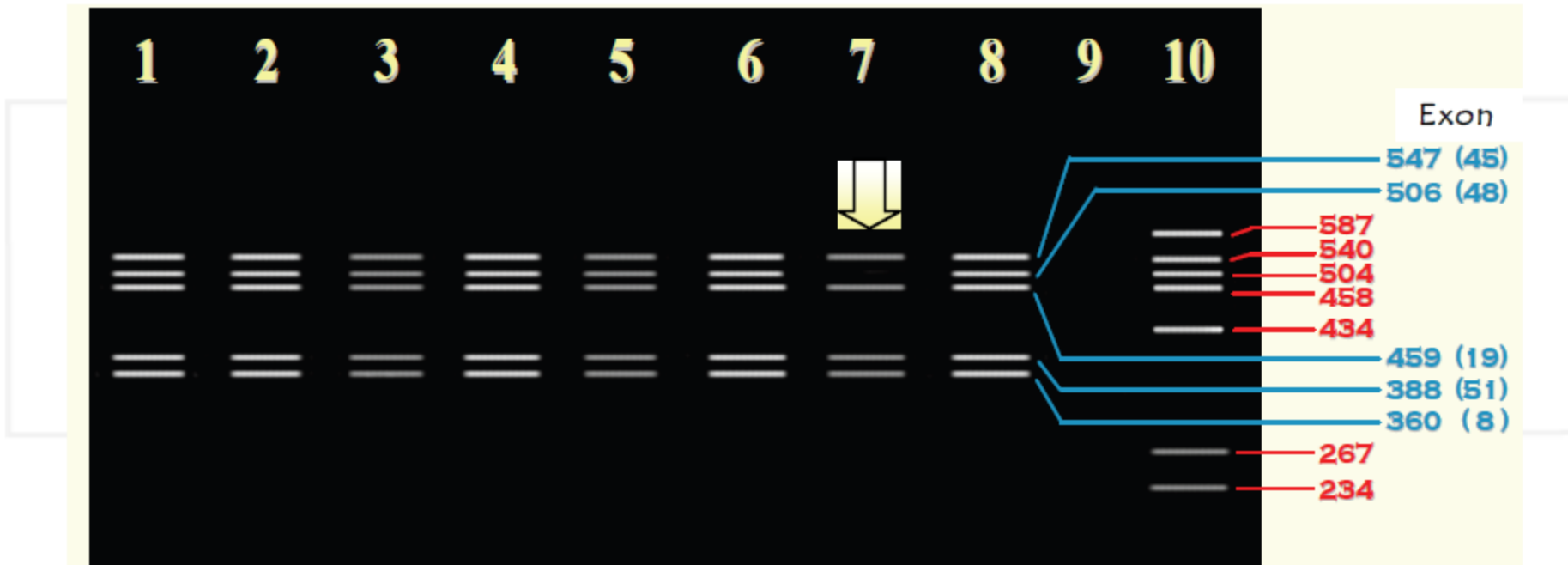


Fig. 2. Results of a multiplex PCR in a patient with Duchenne Muscular Dystrophy. Dystrophy gene has different mutations in exons; this is the cause of disease. In lane 7 is shown the absence of a band corresponding to exon 48 (506 bp) of the dystrophy gene (Hernández-Rodríguez et al., 2000; Hernández-Rodríguez & Restrepo, 2002).

الكشف عن الهوية الجينية وتحديد البنوة

• يعتمد هذا الاختبار على تضخيم مواقع محددة من الجينوم البشري تعرف هذه المواقع بالسواتل الصغيرة Microsatellite أو ما يعرف أيضاً STR, Short tandem repeat وهي عبارة على تسلسلات تكرارية ترادفية.



- يوجد الآلاف من هذه التسلسلات التكرارية في الجينوم البشري، يتألف كل منها من وحدة تكرارية مؤلفة من 1-10 نكليوتيدات متكررة ترادفياً (خلف بعضها البعض) عدد من المرات يصل إلى 20 مرة.
- يختلف طول التسلسل التكراري بحسب عدد التكرارات.
- يختلف عدد التكرارات في الموقع الواحد بشدة بين أفراد النوع البشري.
- يمكن بوساطة تفاعل PCR وباستعمال بادئة تتشافع على أطراف التسلسل المدروس (تحصر التسلسل) من الكشف عن طول التسلسل.

- عالمياً تم تحديد ١٦ موقعاً من بين الآلاف المتوفرة لتحديد الهوية الجينية أو البصمة الوراثية لأفراد النوع البشري.
- لا يوجد شخصين يملكان نفس أطوال المواقع ١٦ على سطح الكرة الأرضية إلا التوائم الحقيقية.
- هذا الاختبار، يعد حالياً أهم اختبارات الطب الشرعي التي يعتمد عليها لتحديد هوية المجرمين، من بقايا الآثار البيولوجية التي يتركونها في مكان الجريمة.
- يستخلص DNA منها وتضخم المواقع ١٦ بواسطة PCR وترسم بصمة جينية للمشتبه به بعد عملية الرحلان الكهربائي.

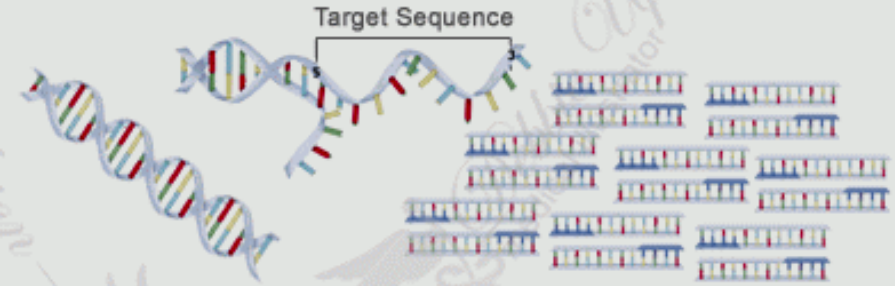


الاستعمالات في الطب الشرعي: تحديد الهوية الجينية للمجرم



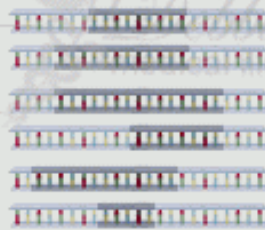
Left at the cigarette is collected.

Forensics DNA Testing

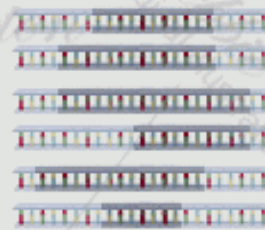


DNA profile is extracted from the semen and targeted sequences are applied using PCR or STR. This DNA will be used to compare to any suspects in the case to see if the profiles are a match.

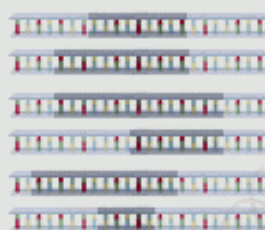
Crime Scene sample



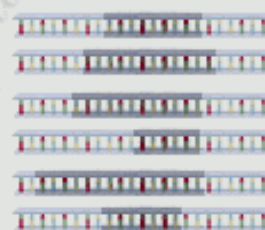
Subject #1



Subject #2



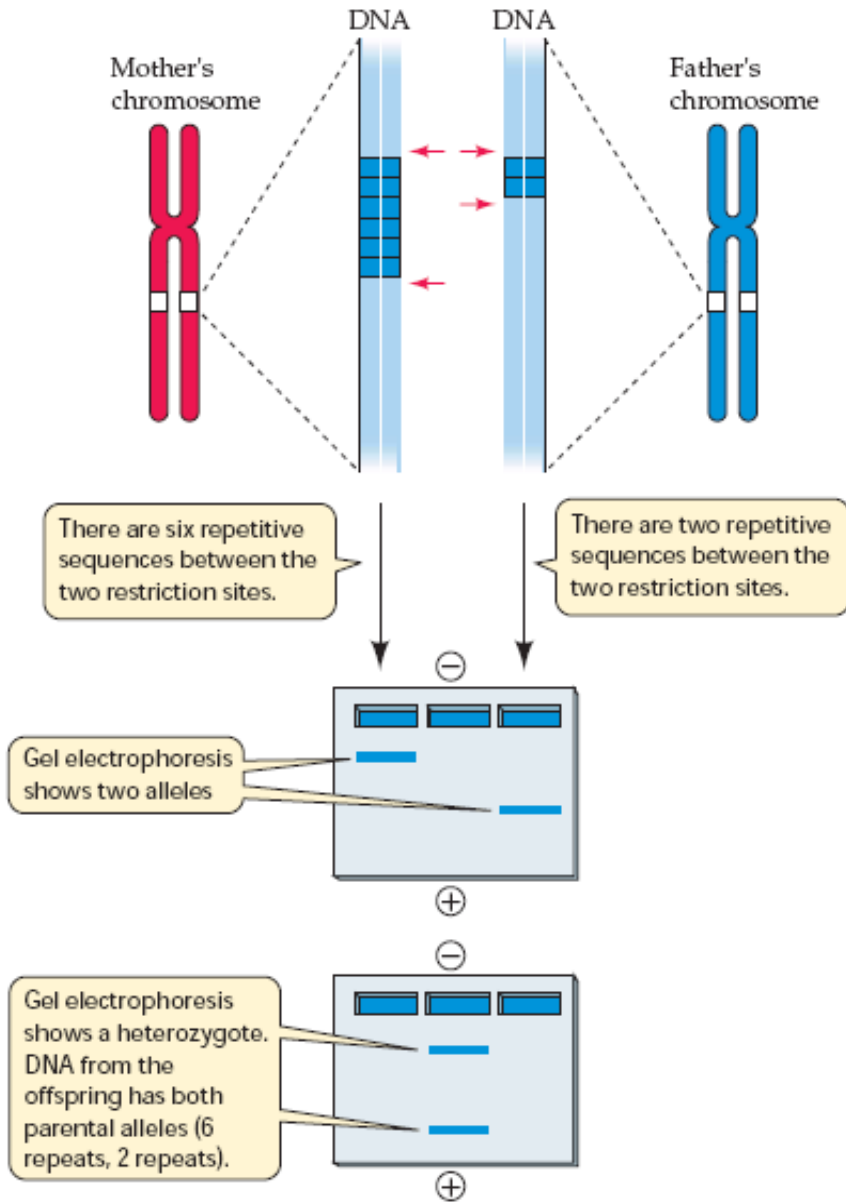
Subject #3



Sample Sub # 1 Sub # 2 Sub # 3

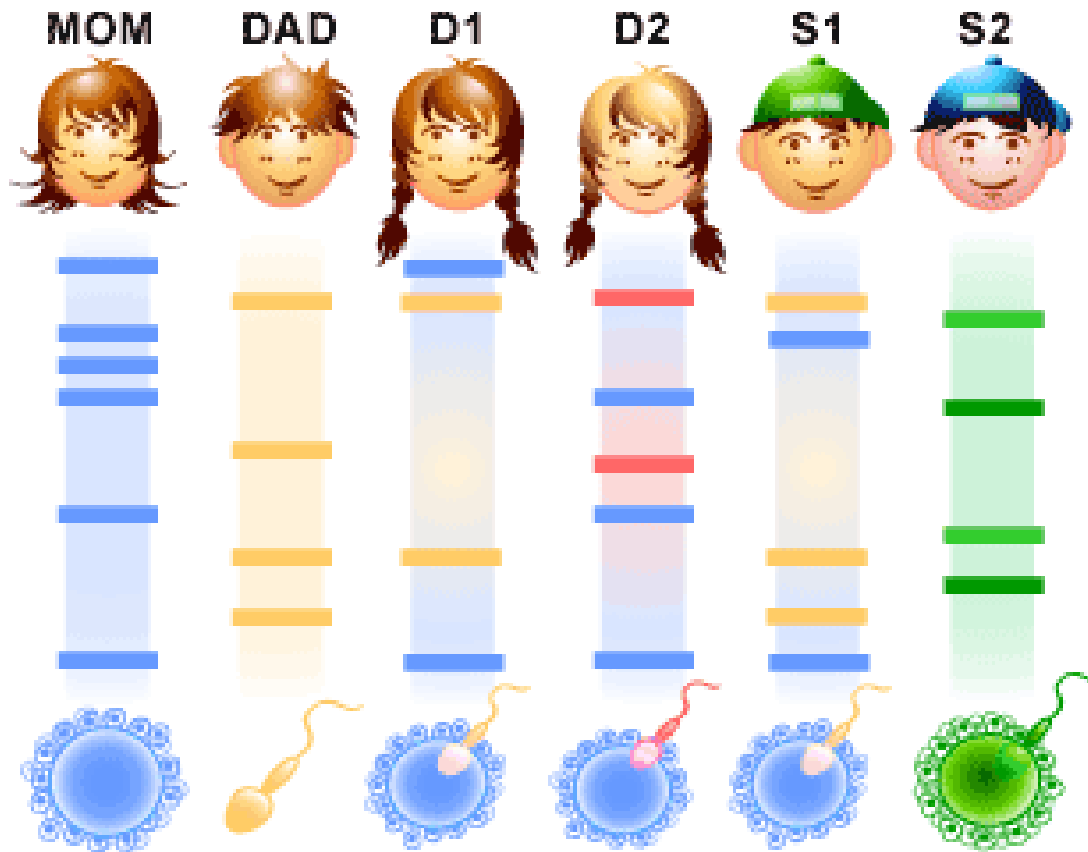


The results indicate that Subject #2 is an exact match to the DNA present at the crime scene.



يملك كل شخص أليلين (صنويين) من كل موقع، هذين الموقعين سينتقلان ذريته بحسب قوانين الوراثة المندلية، وبالتالي أي فرد سيملك لموقع معين إما الأليل الأبوي أو الأمومي. وعليه يمكن تحديد البنية باختبار البصمة الوراثية.

DNA fingerprinting can be used to identify a child's parents.

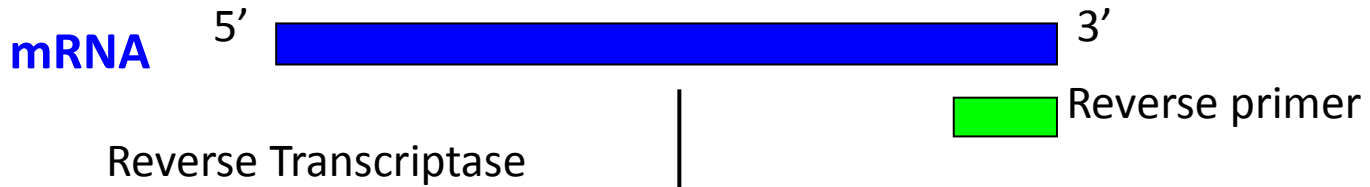


a family consists of a mom and dad, two daughters and two sons. The parents have one daughter and one son together, one daughter is from the mother's previous marriage, and one son is adopted

Reverse Transcriptase PCR RT-PCR

- تستعمل لتضخيم mRNA معروف التسلسل (أو على الأقل جزء من التسلسل).
- البدء مع mRNA بدل DNA ثنائي الشريطة.
- الخطوة الأولى: تحويل mRNA إلى cDNA أحادي الشريطة
- RNA → cDNA with reverse Transcriptase and reverse primer.
- الخطوة الثانية: استعمال البادئة الأمامية لتحويل الشريطة المفردة cDNA إلى شريطة مضاعفة.
- الناتج يستخدم ك قالب في تفاعل PCR تقليدي.

Reverse Transcriptase PCR RT-PCR

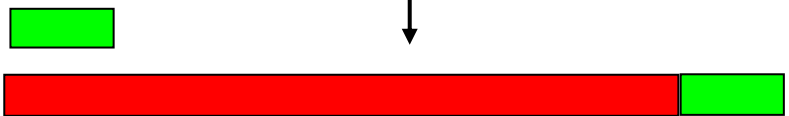


cDNA



Denature; anneal forward primer

Forward primer

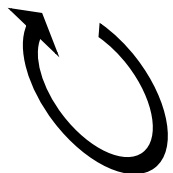


DNA Polymerase

cDNA double-strand



Matrix for Taq polymerase



PCR with same 2 primers