Polymerase Chain Reaction (PCR)

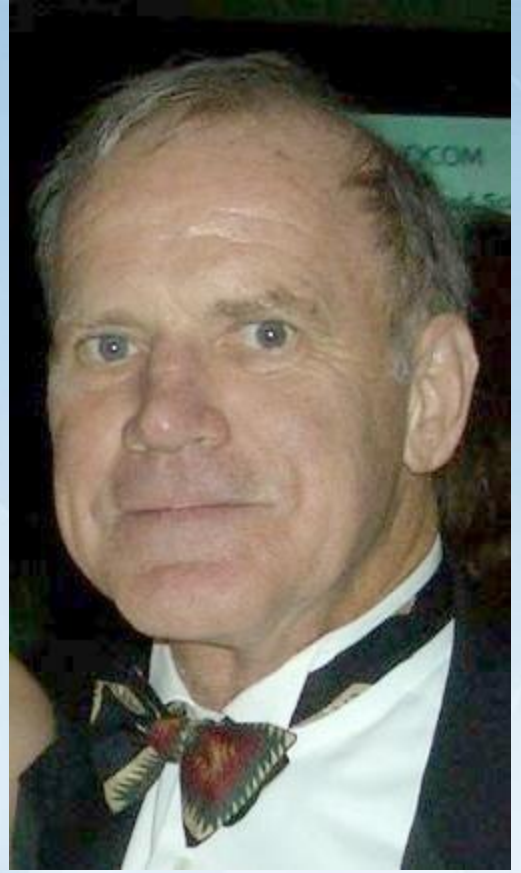
Principles & Applications

Ameer Effat M. Elfarash

Dept. of Genetics
Fac. of Agriculture, Assiut Univ.
aelfarash@aun.edu.eg

Introduction

- The technique was invented by Dr. Kary Mullis, 1986
- for which he received the Nobel Prize in Chemistry in 1993.



PCR Achieves Fame and Fortune

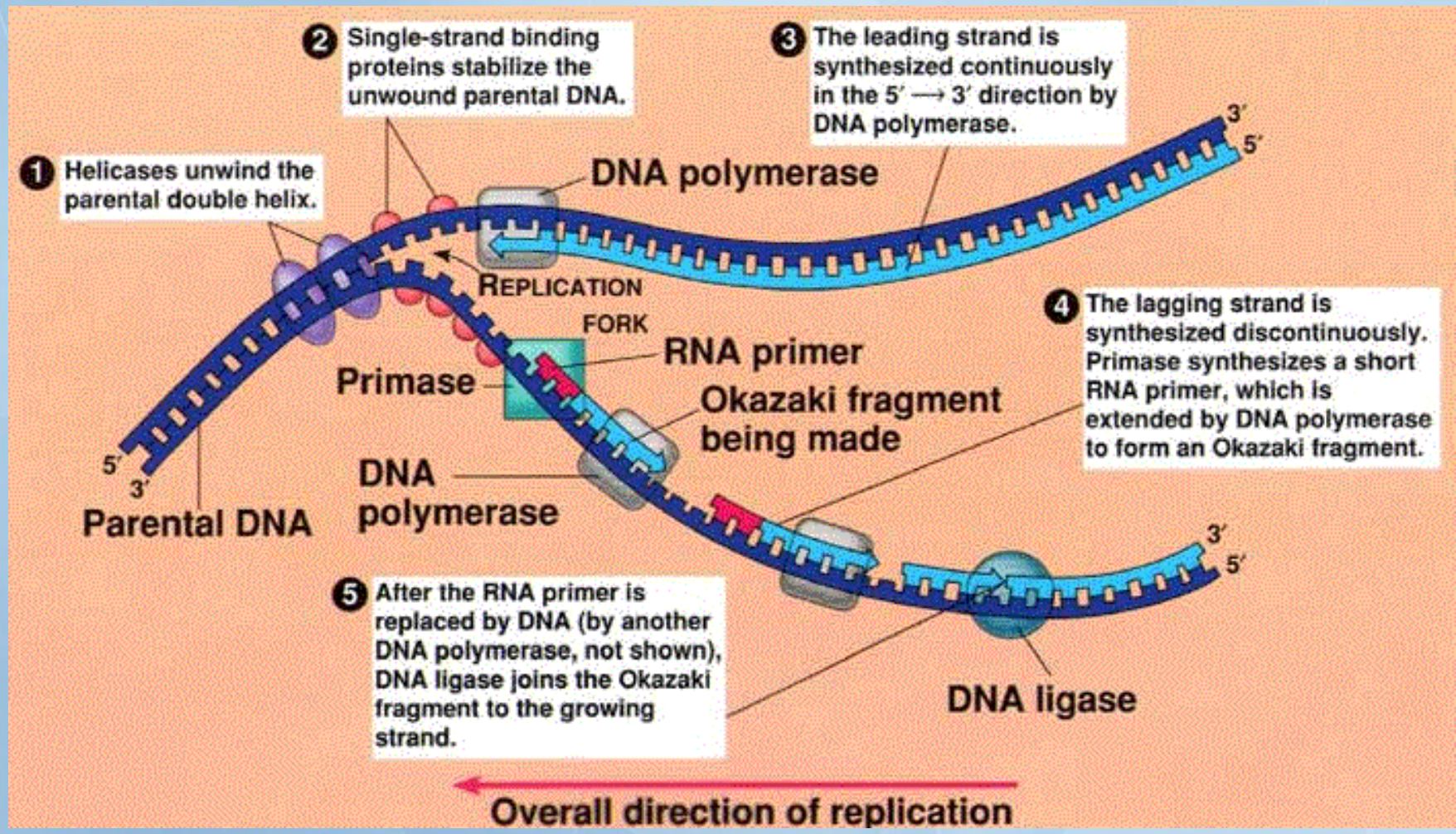
--becomes standard in molecular biology tool box--

The Molecule of the Year

Ruth Levy Guyer and Daniel E. Koshland, Jr.

Science has selected the polymerase chain reaction as the major scientific development of 1989 and has chosen for its first "Molecule of the Year" the DNA polymerase molecule that drives the reaction. The list from which the polymerase chain reaction (PCR) was chosen included an impressive array of accomplishments in many areas of science and technology; additional kudos are therefore conferred below to 17 of the other big "stories" that made 1989 an exciting year for scientists and for followers and beneficiaries of science. Although the PCR procedure was introduced several years ago, use of the technique truly burgeoned in 1989; in much the same way, the full potentials of many of the interesting "runner-up" scientific achievements of this year are likely to be realized sometime in the years to come.

DNA Replication



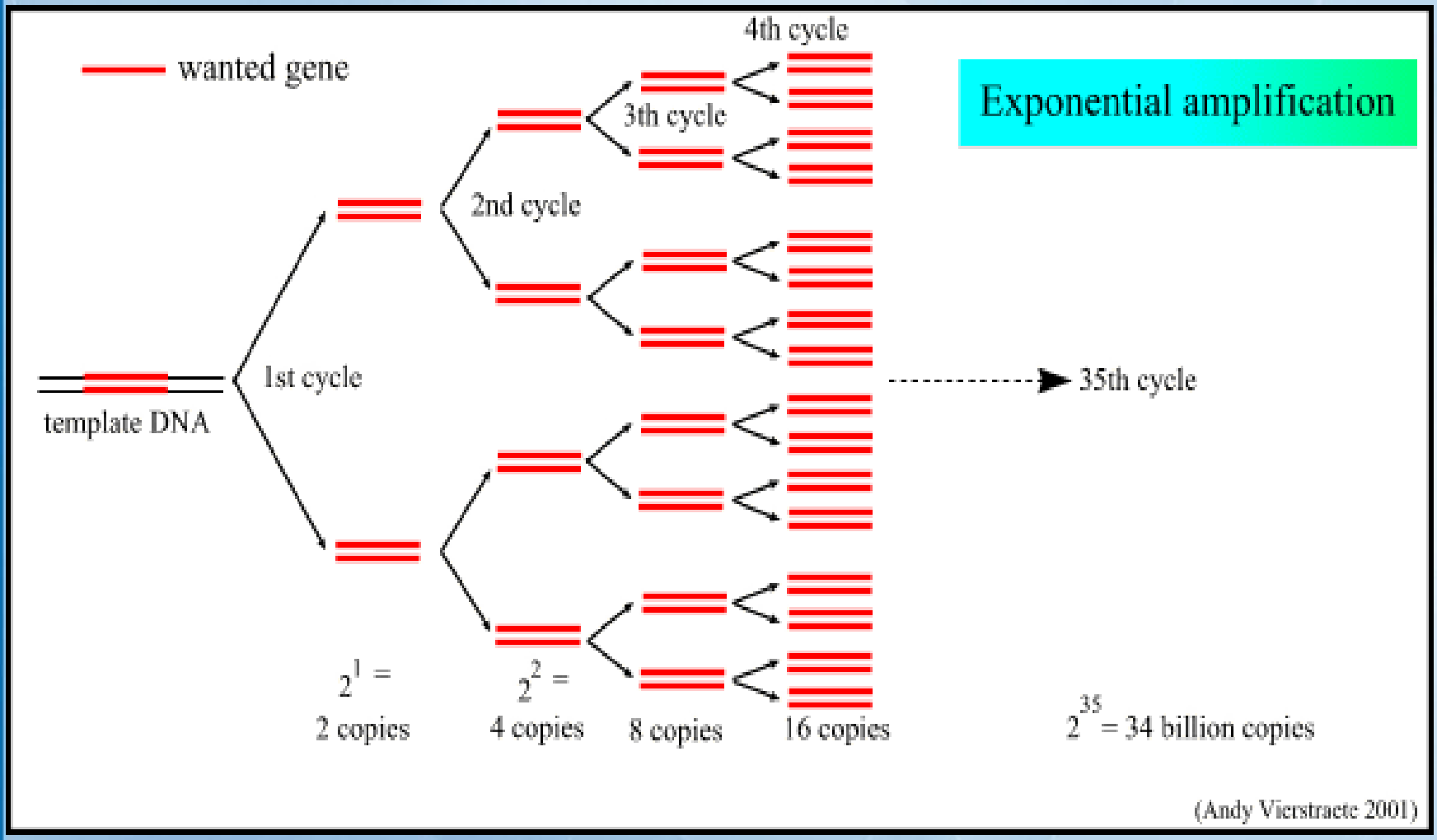
Polymerase Chain Reaction (PCR)

- PCR is a technique which is used to amplify the number of copies of a **specific region of DNA**, (usually fewer than 3000 base pairs) in order to produce enough DNA to be adequately tested.

- **Millions** of copies of a segment of DNA can be made within a few hours

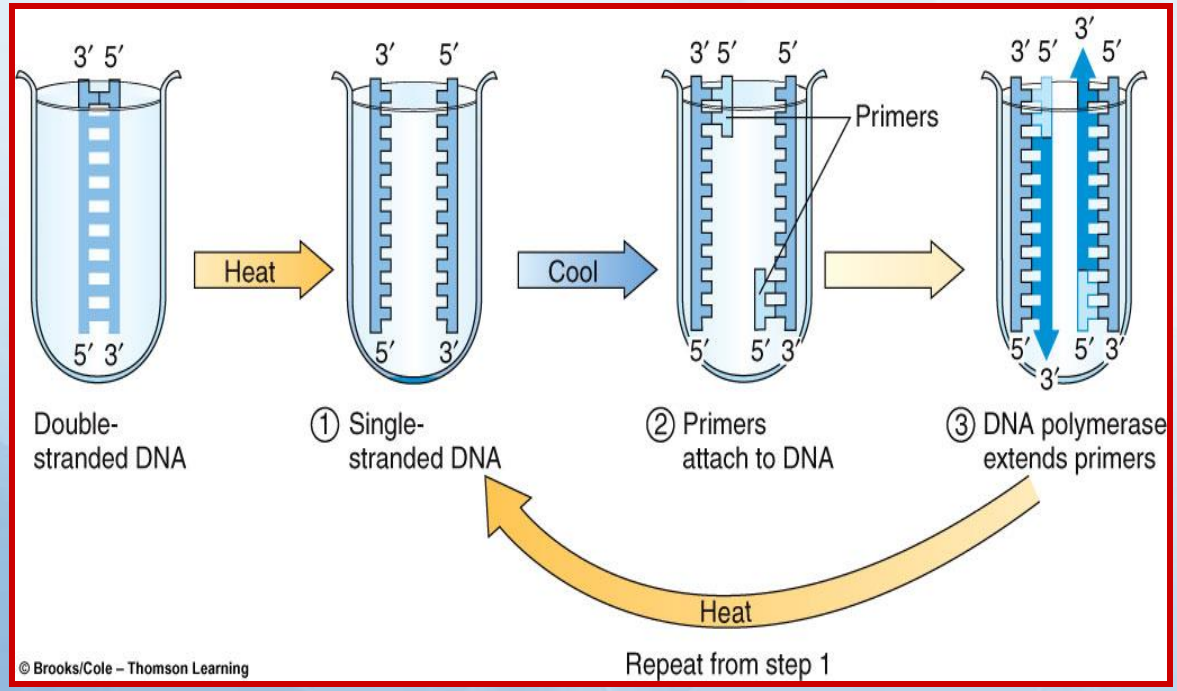
- As a result, it now becomes possible to analyze and characterize the DNA.

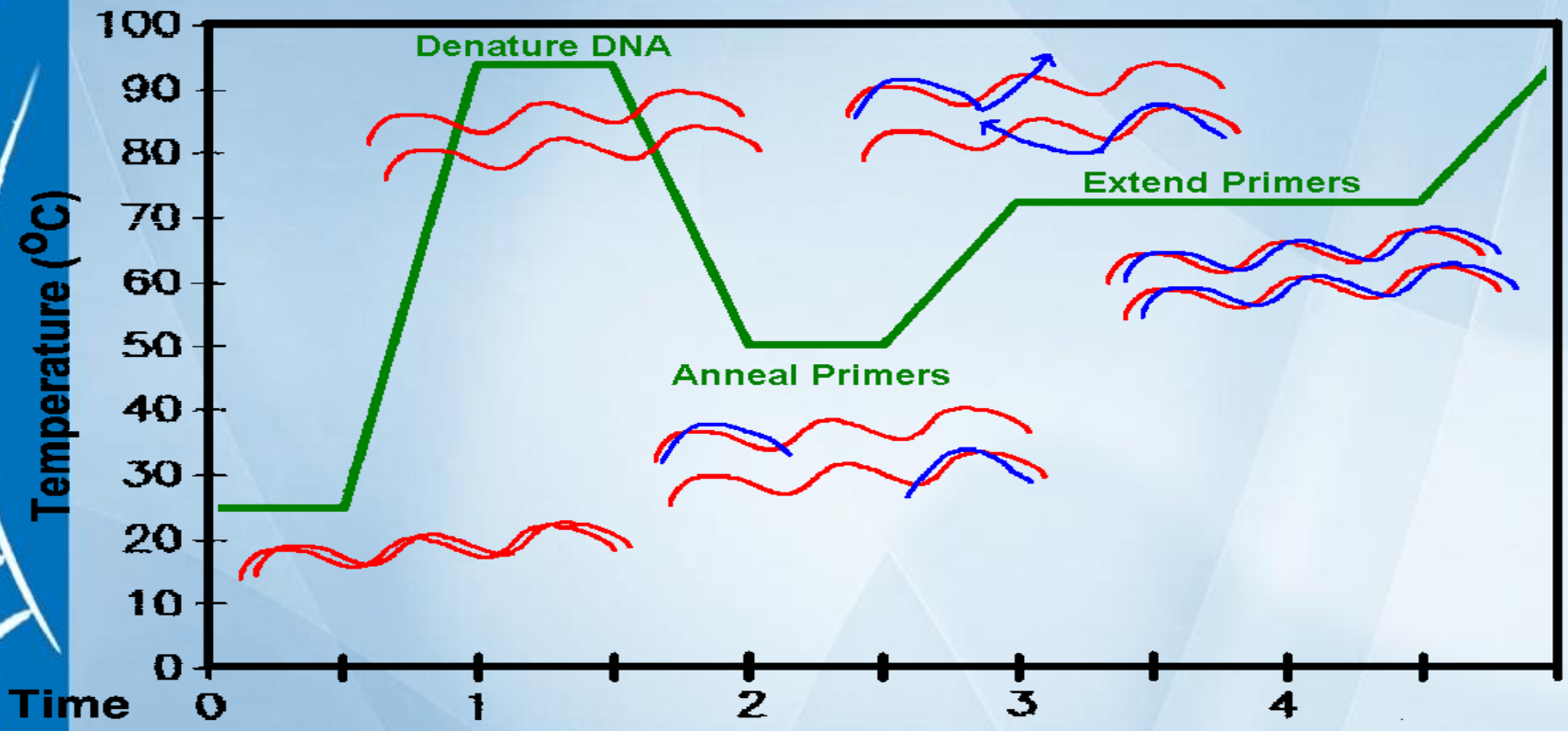
DNA amplification by PCR (overview)



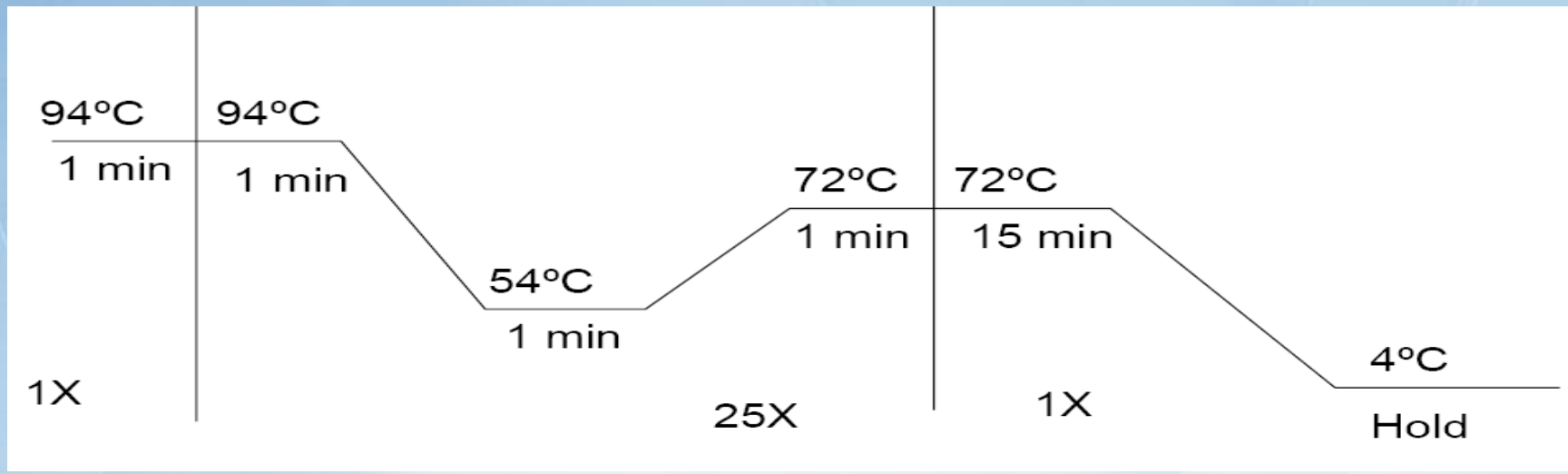
PCR Cycle

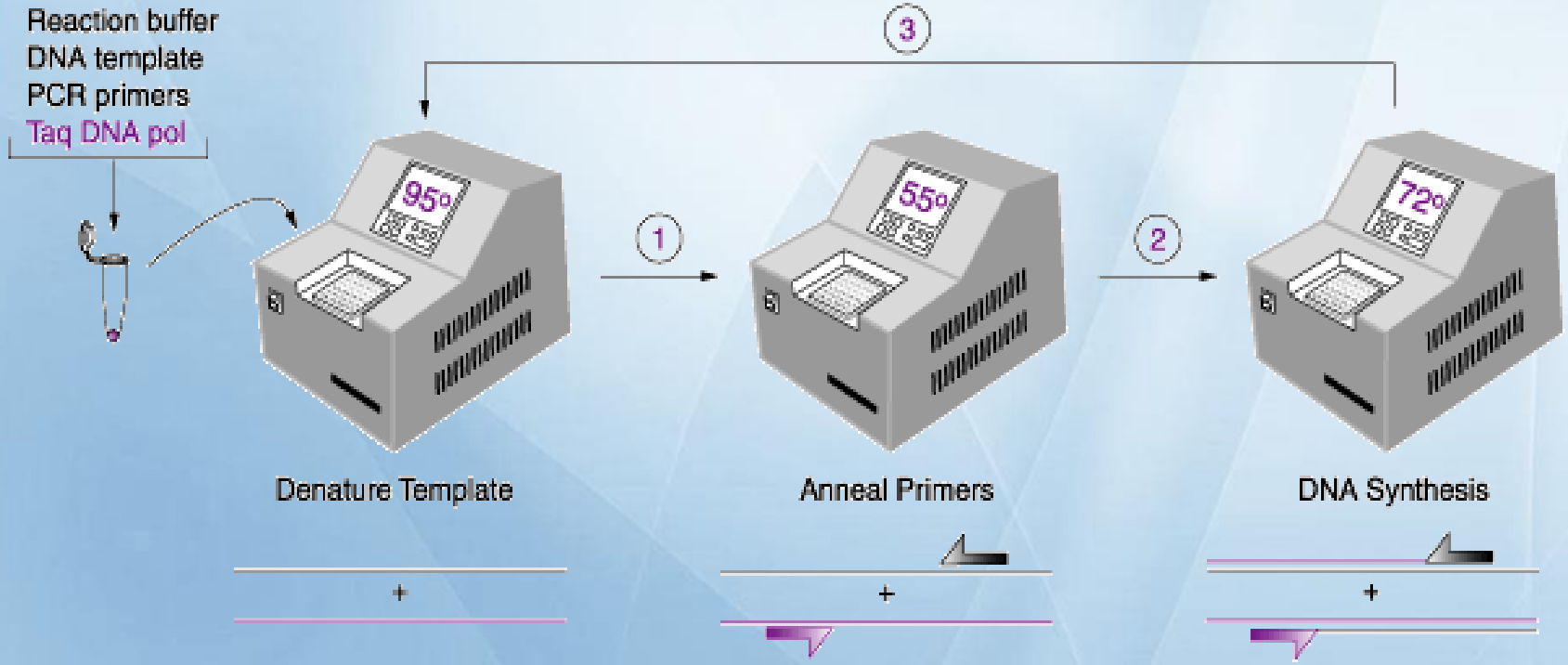
- **Each cycle (Round) of PCR contains 3 steps:**
  - **1- Denaturation**
  - **2- Primer annealing**
  - **3- Primer extension**
- **The cycle usually repeated for 25 – 40 times.**




Denature DNA
Anneal Primers
Extend Primers
Temperature (°C)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Time
0
1
2
3
4

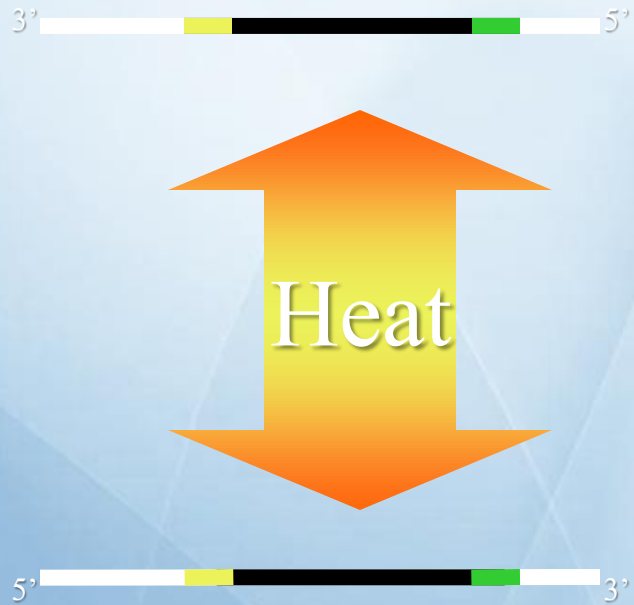
Programming the Thermocycler



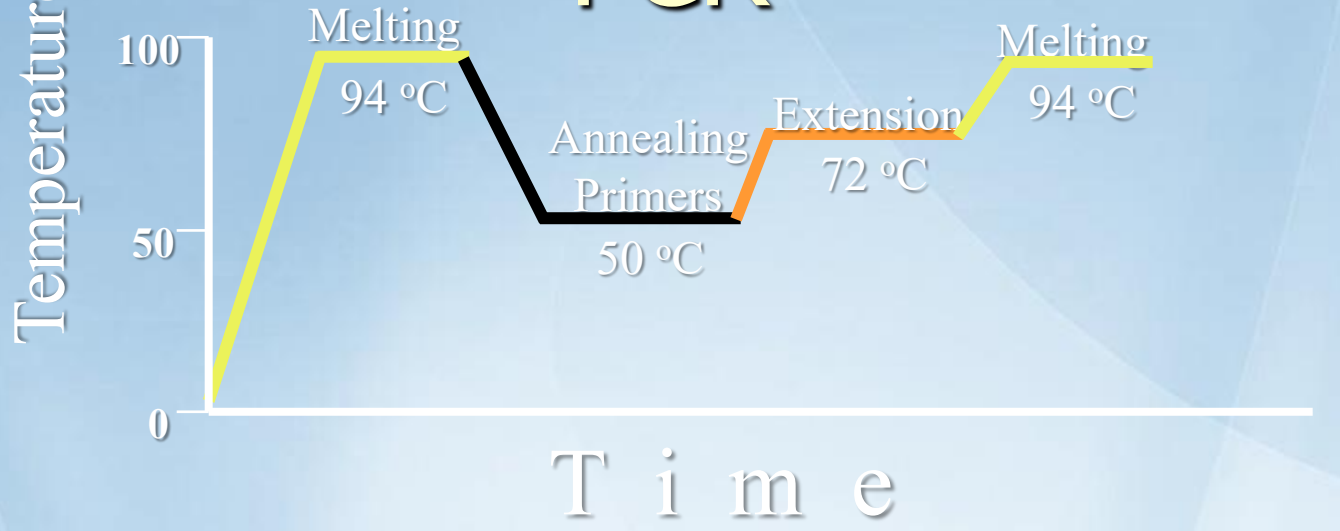


PCR

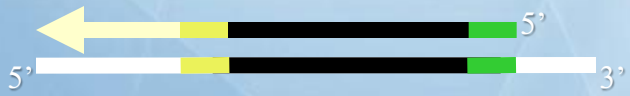
PCR

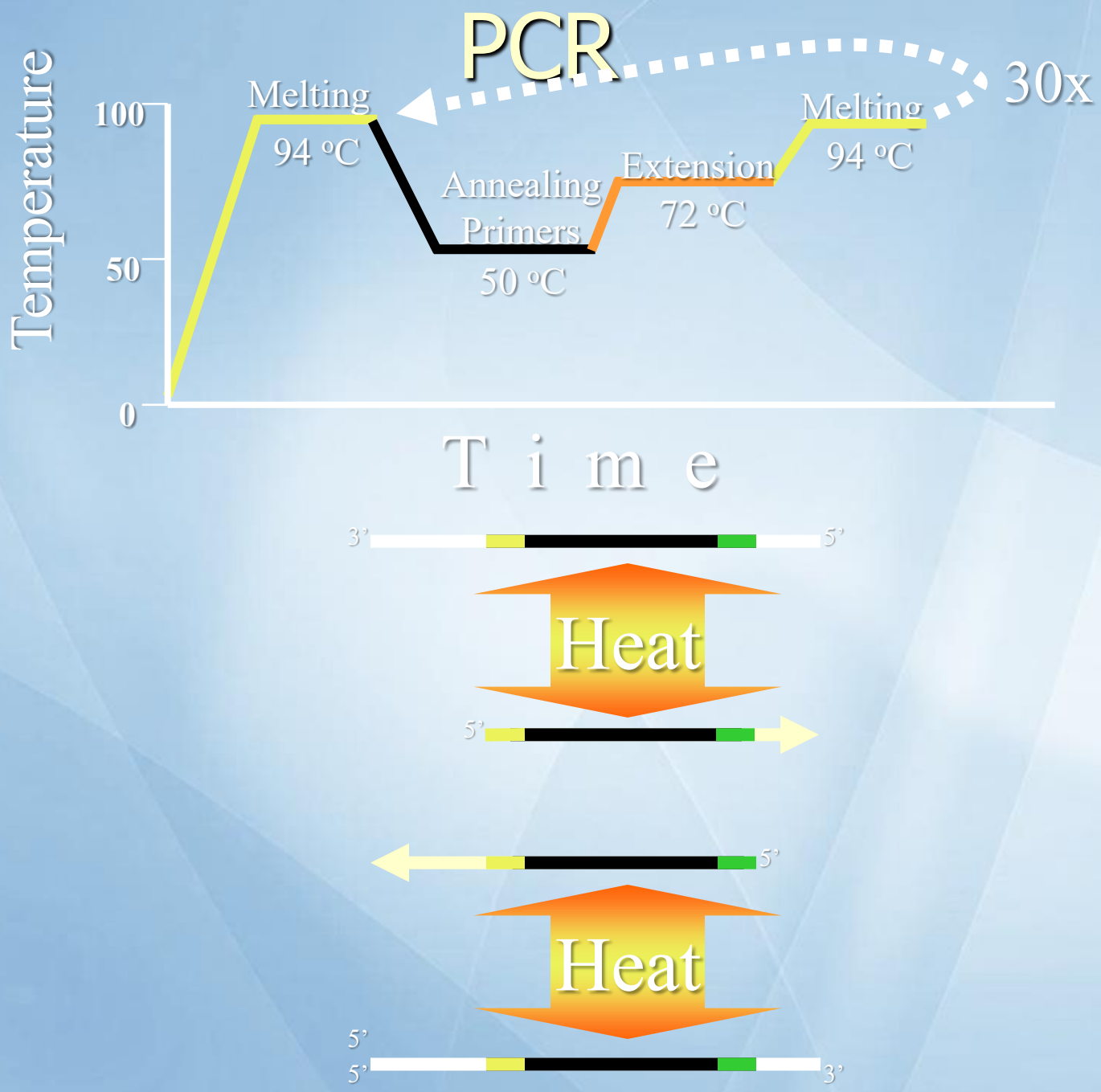


PCR


Temperature
100
50
0
Melting
94 °C
Annealing
Primers
50 °C
Extension
72 °C
Melting
94 °C
T i m e

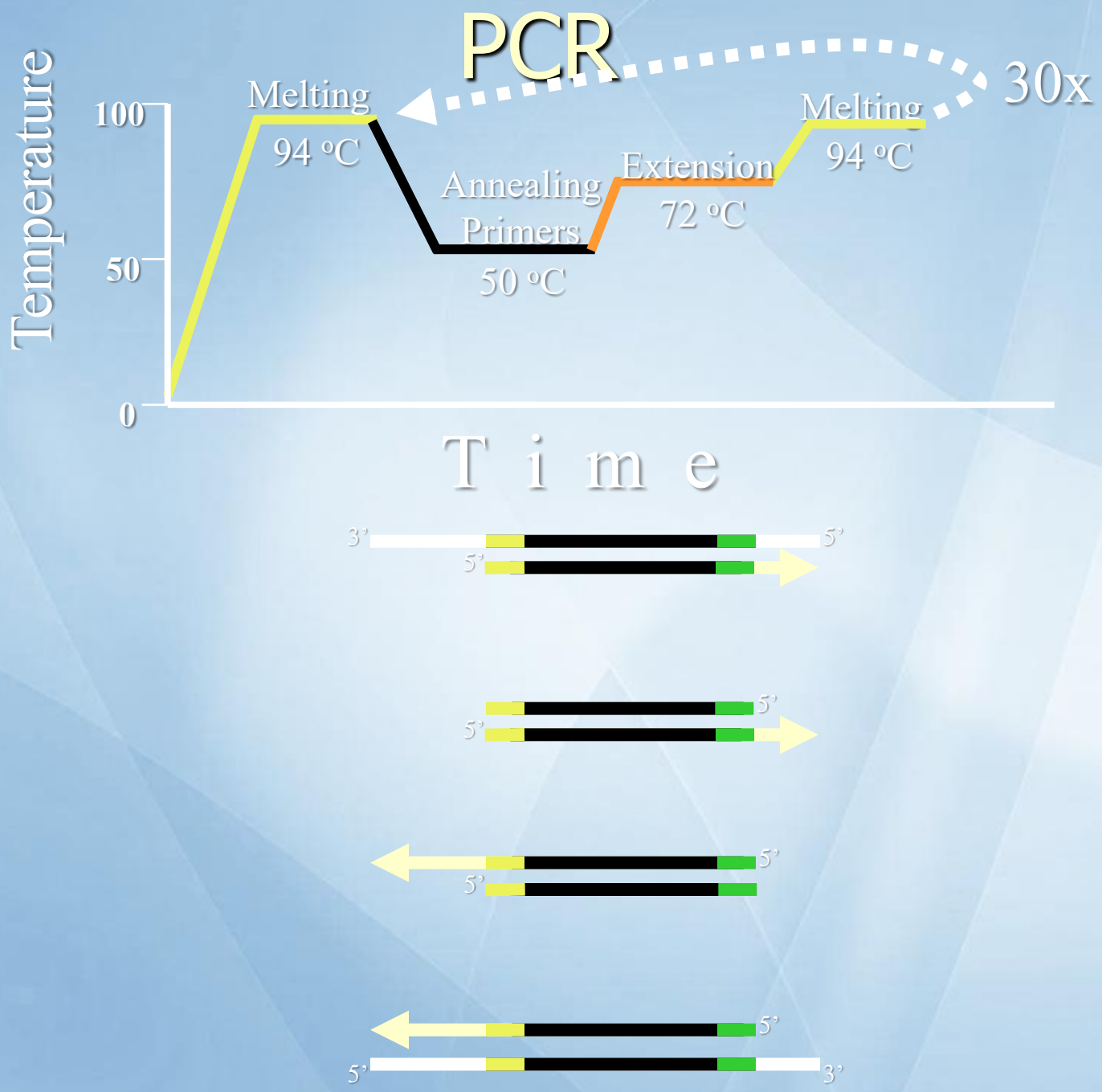
3'
5'
5'


5'
5'
3'



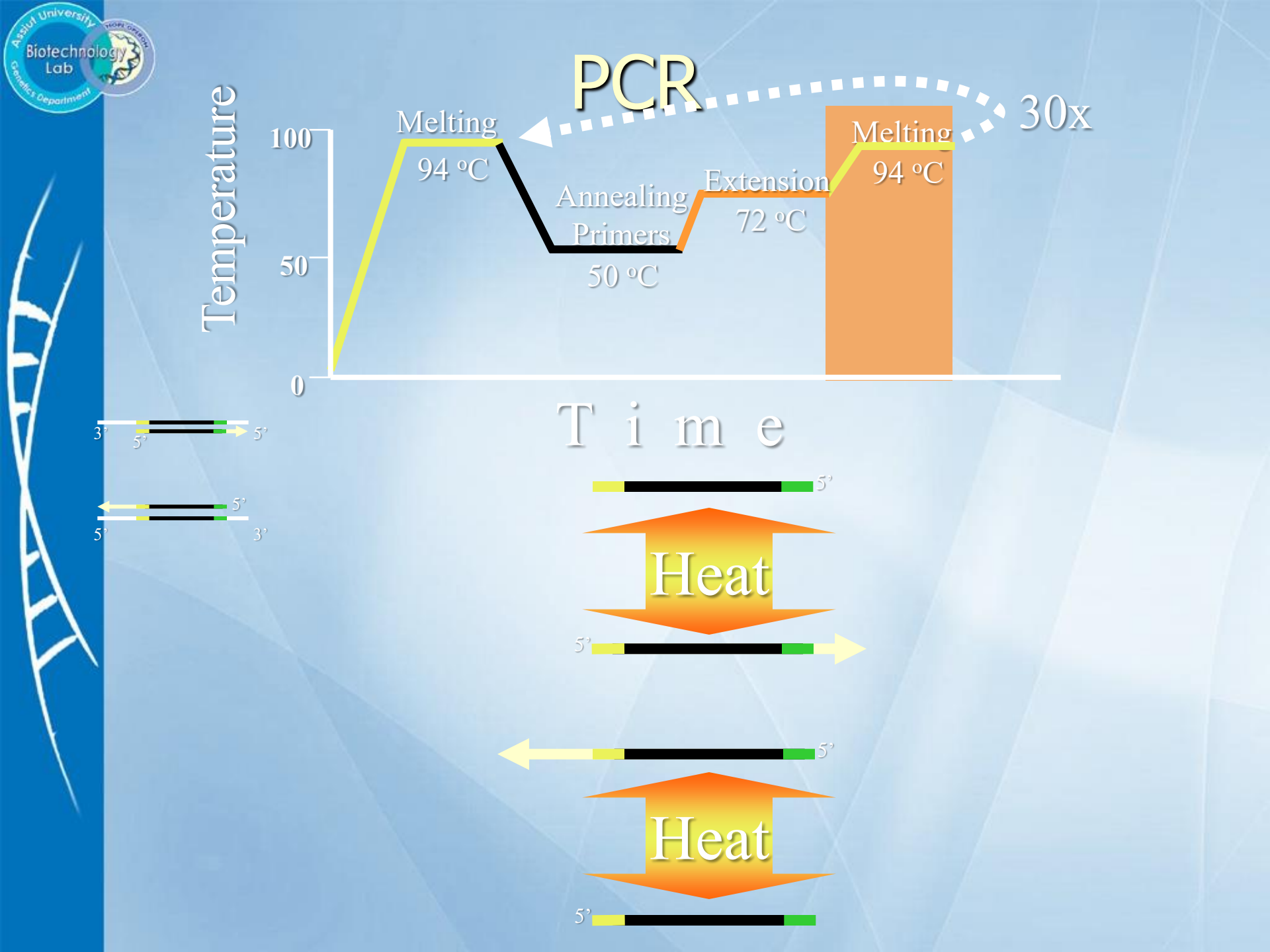
PCR

30x
Temperature
100
50
0
Melting
94 oC
Annealing
Primers
50 oC
Extension
72 oC
Melting
94 oC
T i m e
3'
5'
Heat
5'
5'
Heat
5'
5'
3'



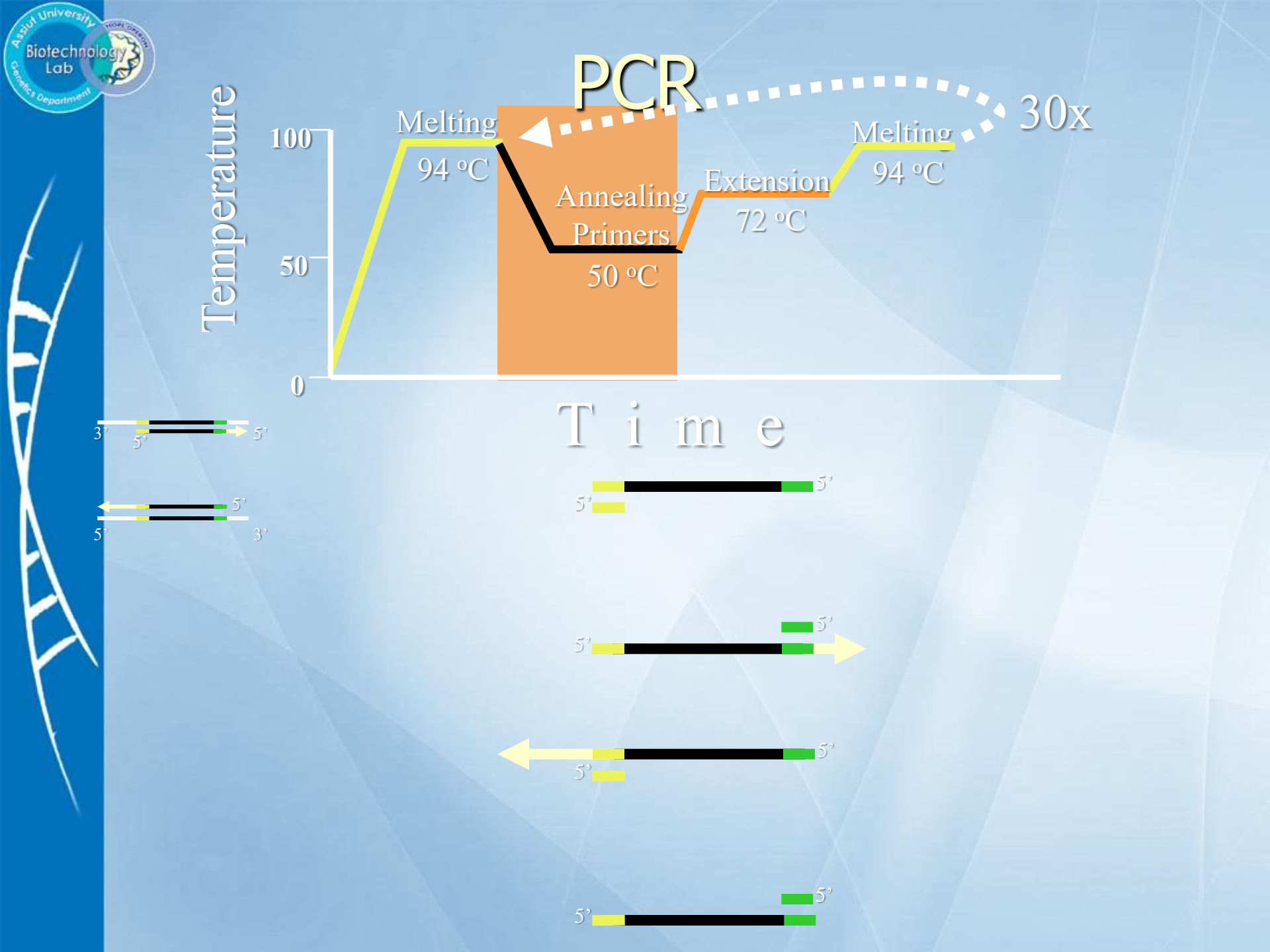
PCR

30x
Melting
94 °C
Annealing
Primers
50 °C
Extension
72 °C
Melting
94 °C
Temperature
100
50
0
Time
3'
5'
5'
5'
5'
5'
5'
5'
5'
3'

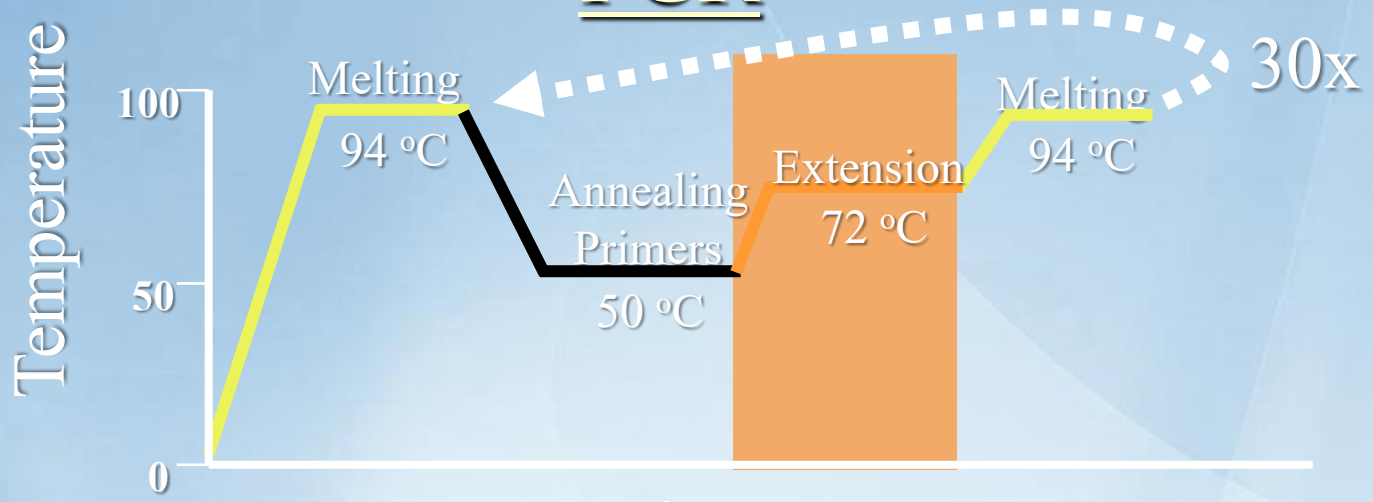


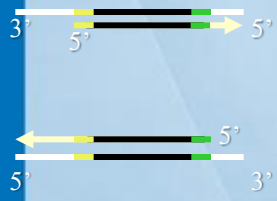
PCR

30x
Temperature
100
50
0
Melting
94 oC
Annealing
Primers
50 oC
Extension
72 oC
Melting
94 oC
T i m e
3'
5'
5'
5'
5'
3'
5'
Heat
5'
5'
Heat
5'

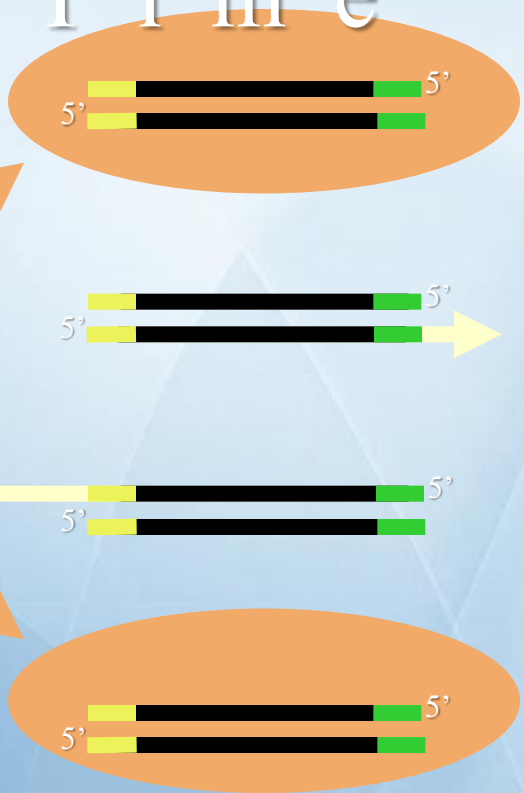

PCR
30x
Temperature
100
50
0
Melting
94 °C
Annealing
Primers
50 °C
Extension
72 °C
Melting
94 °C
T i m e
3'
5'
5'
5'
5'
3'
5'
5'
5'
5'
5'
5'
5'
5'
5'
5'

PCR





Fragments of defined length



What do we need for PCR?

PCR tube

THERMOCYCLER

متطلبات تقنيه تفاعل البلمره المتسلسل (PCR)

DNA Sample

Primers

نوعان :

- أمامي (Forward).
- خلفي (Reverse).

وهي تتابع من القواعد النيتروجينيه في شريط واحد قصير(20-25 b) مكمل لبداية الجزء المراد تضخيمه في الـ DNA.

CCGAATGGGATGC

GGCTTACCCTACG

Taq polymerase

- مستخرج من سلالة بكتيريه تسمى *Thermus aquaticus* التي تعيش في المياه الحارة.
- لا يتأثر بدرجات الحرارة المرتفعه.
- درجه الحراة المثلى له ٧٢ ºم.

First reports using DNA polymerase from *Thermus aquaticus* was at (1988)

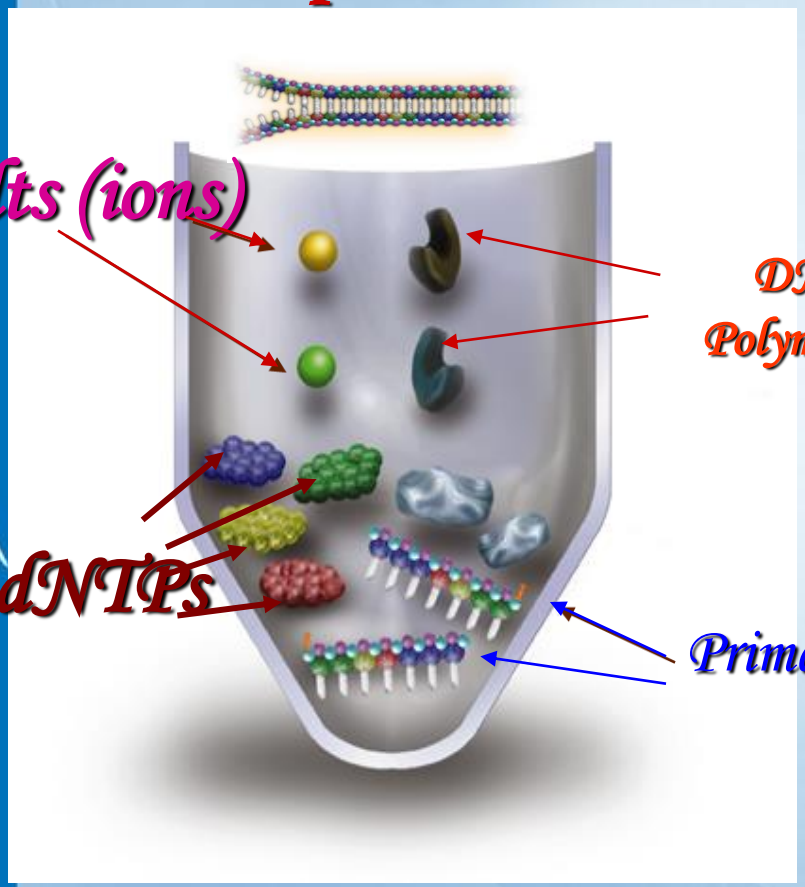
dNTPs

- **Adenine** أدنين
- **Thymine** ثايمين
- **Guanine** جوانين
- **Cytosine** سايتوسين

PCR Buffer 10x

Distilled Water

PCR Procedure



	المـــــكــــونـــــات	الكميه بالمايكروليتر(١ x)
١	ماء مقطر(d.H2O)	١٧
٢	محلول منظم ١٠X (PCR buffer10x)	٢,٥
٣	خليط القواعد النيتروجينيه (dNTPs)	٢
٤	بادئ أمامي (forward primer)	٠,٦
٥	بادئ خلفي أو عكسي (reverse primer)	٠,٦
٦	أنزيم عديد البلمرة (Taq polymerase)	٠,٣
٧	عينه التفاعل (DNA sample)	٢
	المجموع الكلي بالمايكروليتر (µl)	٢٥

THERMOCYCLER

نظام التفاعل

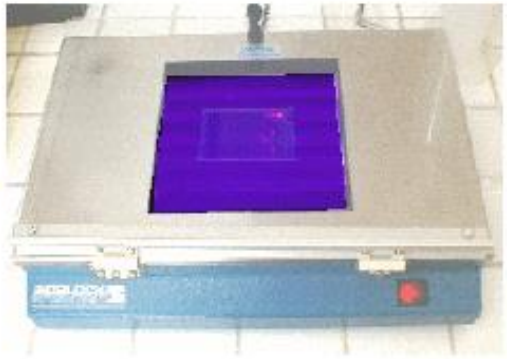
	الوقت	درجه الحراره	الخطوات
تنشيط الأنزيم والتهيئة مرحله تفكك الحمض النووي DNA	١٥ دقيقه	٩٥ م°	١
مرحله التفكيك	١ دقيقه	٩٥ م°	٢
مرحله الالتصاق (درجه البادئ)	١ دقيقه	٤٠ - ٦٠ م°	٣
مرحله الامتداد	١ دقيقه	٧٢ م°	٤
إعادة الخطوة رقم ٢ إلى ٣٤ دورة			٥
ضمان اكتمال مرحله الامتداد واعادة التصاق الشريطين مع بعضهما واكمال عدد الدورات للنسخ	١٠ دقائق	٧٢ م°	٦
	∞	٤ م°	٧

PROCEDURE .....

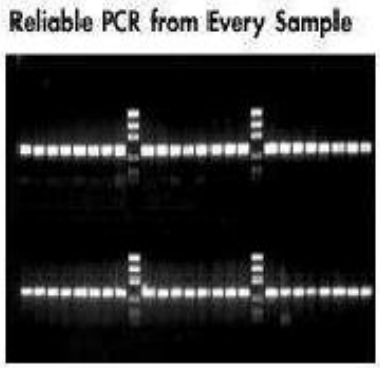
PCR

Agarose gel electrophoresis

3-4 hours



UV visualisation



The final product

الفرق بين تضاعف الـ DNA داخل الخلية وتخليقه داخل PCR

١.يتم تخليق نسخة واحدة من الـ DNA داخل الخلية بينما يتم تخليق ملايين ومليارات النسخ باستخدام PCR.

٢.تقوم الخلية بتخليق نسخة كاملة من DNAاي الجينوم كله يحدث له تضاعف بينما يعمل PCR على مقطع محدود فقط من الجينوم قد يكون جينا أو جزءً من جين.

٣.تَستخدم الخلية بادئا من RNA يتم ازالته فيما بعد بينما يستخدم PCR بادئا من DNA المخلق صناعيا.

٤.تستخدم الخلية مجموعة من البروتينات والإنزيمات لبناء DNA حيويا بينما يستخدم إنزيم واحد فقط (انزيم الـ Taq Polymerase) في PCR ويستعاض عن باقي الإنزيمات والبروتينات باستخدام الحرارة بدلا من ذلك.

تطبيقات تفاعل البلمره المتسلسل (PCR)

- تشخيص الأمراض الوراثيه.
- الاستنساخ
- الأبحاث الجنائيه
- عمل بصمة وراثية و إثبات الأبوه
- الأبحاث العلميه
- دراسة التطور
- اكتشاف الأمراض البكتيريه والفيروسيه
- معرفة تتابع القواعد النيتروجينية
- الطفرات