

**Αλυσιδωτή Αντίδραση
Πολυμεράσης, Ενδονουκλεάσες
Περιορισμού και Ηλεκτροφόρηση σε
Πηκτή Αγαρόζης**

Δρ. Γκατζίδου Ελισάβετ
Μέλος Ε.ΔΙ.Π.



The old and the new eras

PCR

- PCR = **P**olymerase **C**hain **R**eaction
- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

PCR



Τεχνική *in vitro*

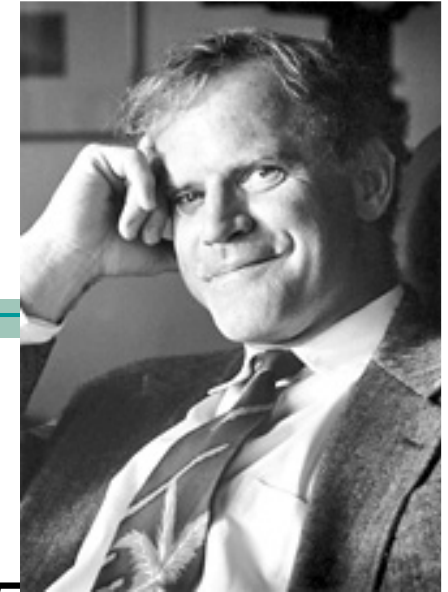
“Molecular photocopying”

Ο δημιουργός

Kary B. Mullis

Επιινόησε την μέθοδο της PCR το 1985

Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993



PCR

Μία ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να αντιγραφεί σε μεγάλες ποσότητες γρήγορα και εκλεκτικά από οποιαδήποτε δείγμα DNA την περιέχει.

Τι χρειάζεται:

- Δείγμα (γενωμικό DNA ή cDNA)
- Ειδικούς εκκινητές
Ένα ζεύγος συνθετικών νουκλεοτιδίων συμπληρωματικών προς τα άκρα της αλληλουχίας
- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση
- $MgCl_2$, dNTPs, Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer)
- Ένα θερμικό κυκλοποιητή

Θερμικοί Κυκλοποιητές

- Οι διαδοχικοί κύκλοι αυξομείωσης της θερμοκρασίας κατά την PCR διεξάγονται σε προγραμματισμένες ειδικές συσκευές, οι οποίες ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές.



Η αντίδραση αποτελείται από τρία στάδια:

Στάδιο 1° -> Αποδιάταξη (Denaturation)

Μετατροπή του δίκλωνου μορίου DNA σε μονόκλωνο έπειτα από βραδεία θέρμανση στους 90 - 95°C.

Στάδιο 2° -> Υβριδισμός (Annealing)

Η θερμοκρασία του μίγματος ελαττώνεται (40 - 65°C) έτσι ώστε οι εκκινητές που βρίσκονται σε περίσσεια μπορούν να ενωθούν με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δύο κλώνους του DNA.

Στάδιο 3° -> Σύνθεση (Extension)

Επιμήκυνση των νέων αλυσίδων με τη δράση του ενζύμου Taq πολυμεράση και των ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) τα οποία προσδένονται συμπληρωματικά ως προς την αρχική αλυσίδα σχηματίζοντας 2 νέα δίκλινα μόρια DNA. Η θερμοκρασία είναι στους 70 - 75°C.

PCR



PCR

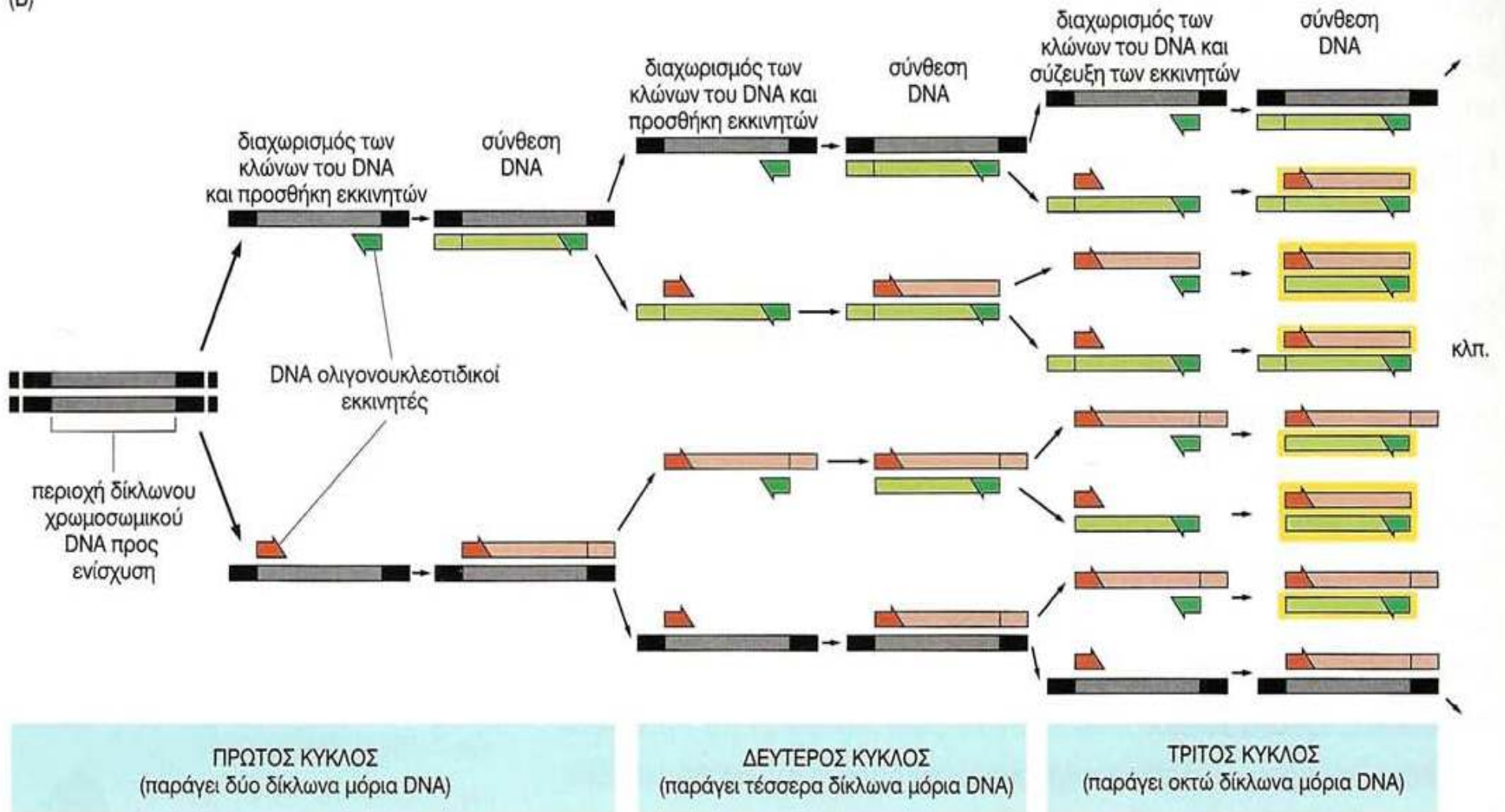
- Κάθε κύκλος αποτελείται από τα τρία στάδια
- Για να ολοκληρωθεί μία αντίδραση απαιτούνται 20 – 40 κύκλοι.
- Ο κάθε κύκλος πολλαπλασιάζει την ποσότητα του DNA που έχει συντεθεί στον προηγούμενο κύκλο.

PCR

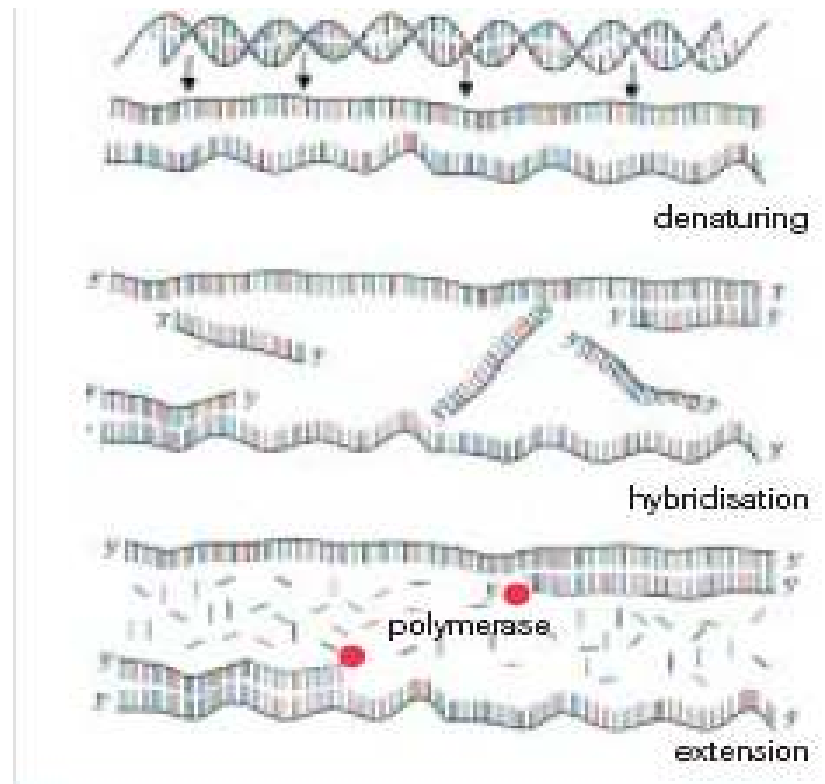
- Το αρχικό μόριο αντιγράφεται σε δύο θυγατρικά και στο τέλος παράγονται περισσότερα από 1 δις αντίγραφα του αρχικού μορίου.
- Ο πολλαπλασιασμός είναι εκθετικός 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης.

PCR

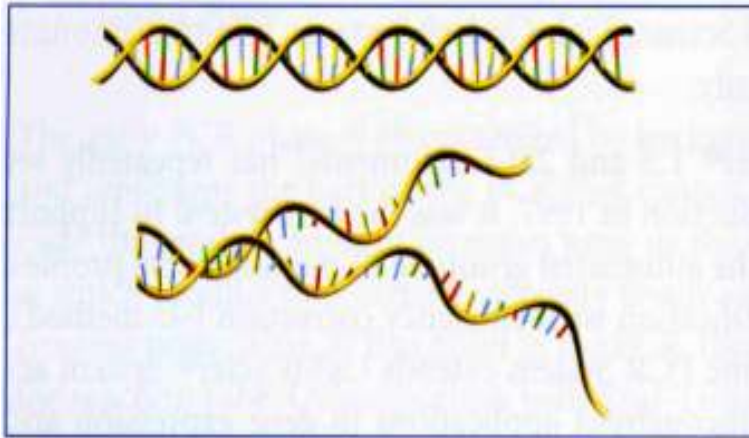
(B)



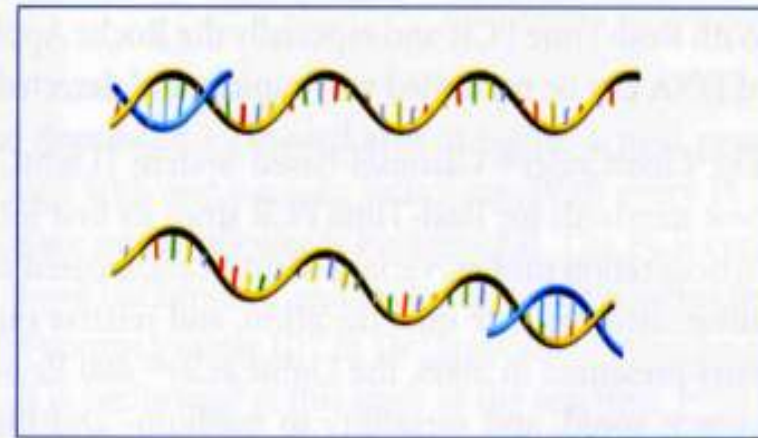
PCR



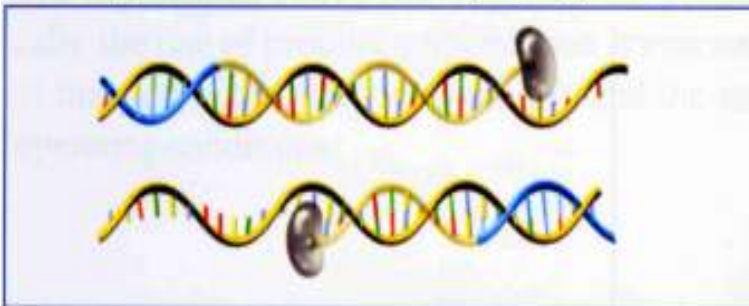
PCR



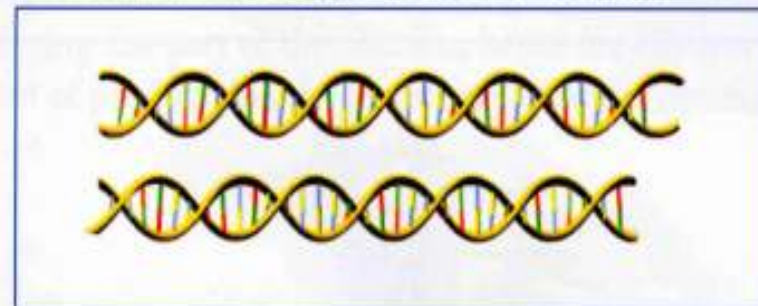
PCR Step 1: Denaturation of template by heat



PCR Step 2: Annealing of primers to template

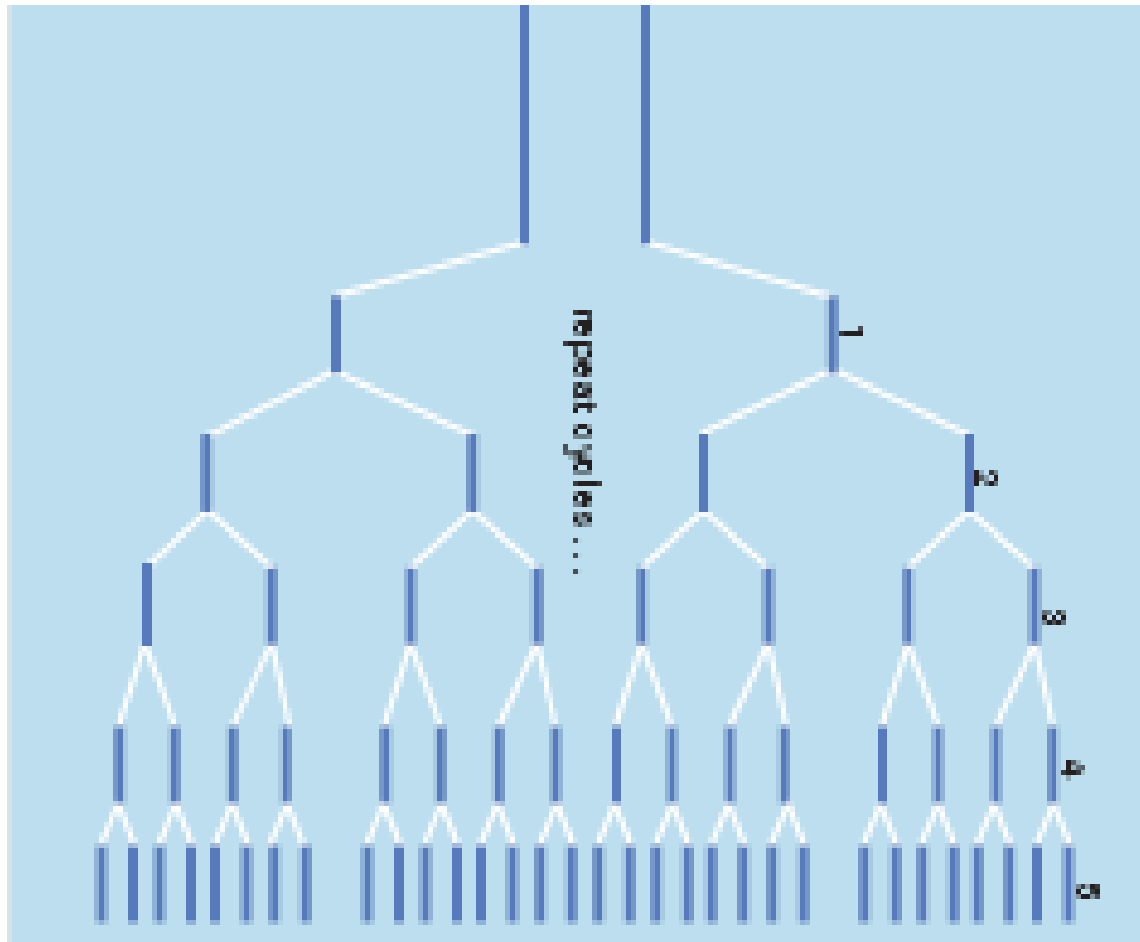


PCR Step 3: Extension of primers with thermostable polymerase



End of the first PCR cycle: Two copies of target sequence

PCR



PCR Video



Pcr2.exe

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

1. ΓΡΗΓΟΡΗ
2. ΦΘΗΝΟΤΕΡΗ
3. ΕΥΑΙΣΘΗΤΗ
4. ΕΙΔΙΚΗ
5. ΑΞΙΟΠΙΣΤΗ
6. ΑΠΛΗ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Εφαρμογή σε ΟΛΟΥΣ τους τομείς της βιολογίας.

Χρησιμοποιείται:

1. Σε διαγνωστικές δοκιμασίες για την ανίχνευση παθολογικών γονιδίων, ασθενειών, γενετικών ανωμαλιών.
2. Για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων μιας γενετικής αλληλουχίας από ένα μικρό δείγμα ανθρώπινου DNA.
3. Ανίχνευση λοιμώξεων σε πρώιμα στάδια.
4. Ιατροδικαστική

Αξιολόγηση των προϊόντων της PCR:

- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή ακρυλαμίδης

Τι χρειάζεται:

- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- DNA Ladder (μάρτυρας)
- Loading Buffer (διάλυμα φόρτωσης)
- Negative και positive control (Αρνητικός και θετικός μάρτυρας)

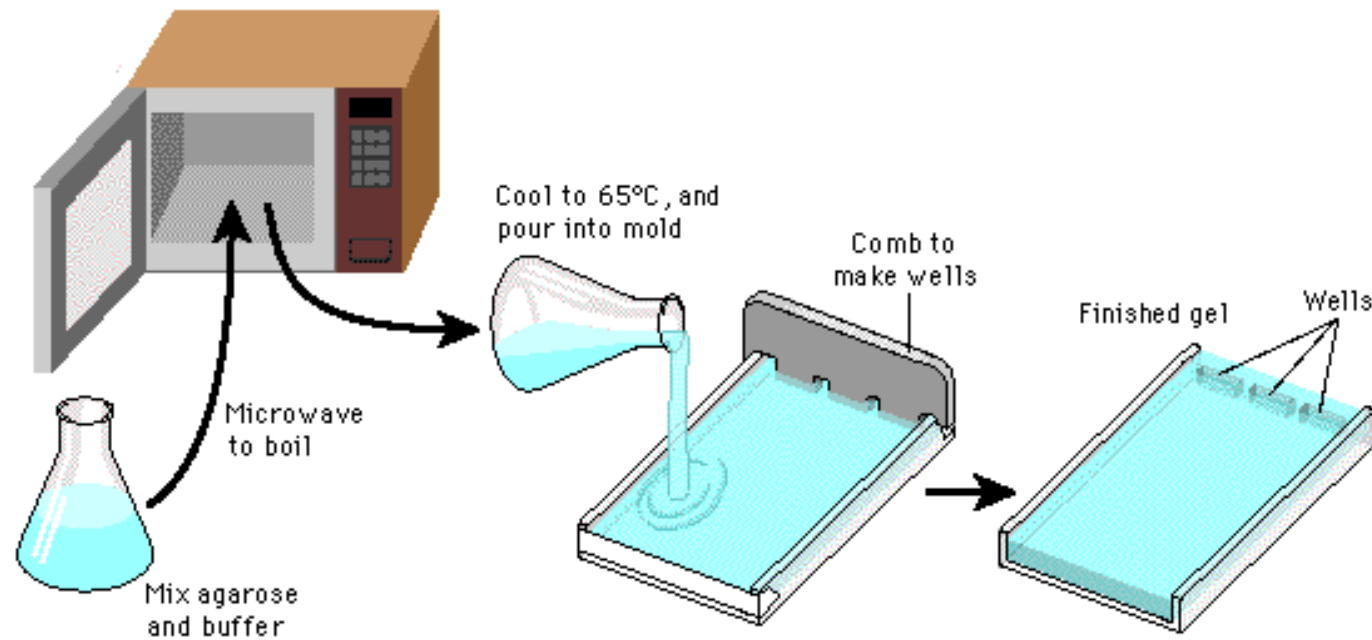
Ηλεκτροφόρηση

Βασίζεται στη μετακίνηση φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου και επιτρέπει το διαχωρισμό των μορίων ανάλογα με το μέγεθός τους.

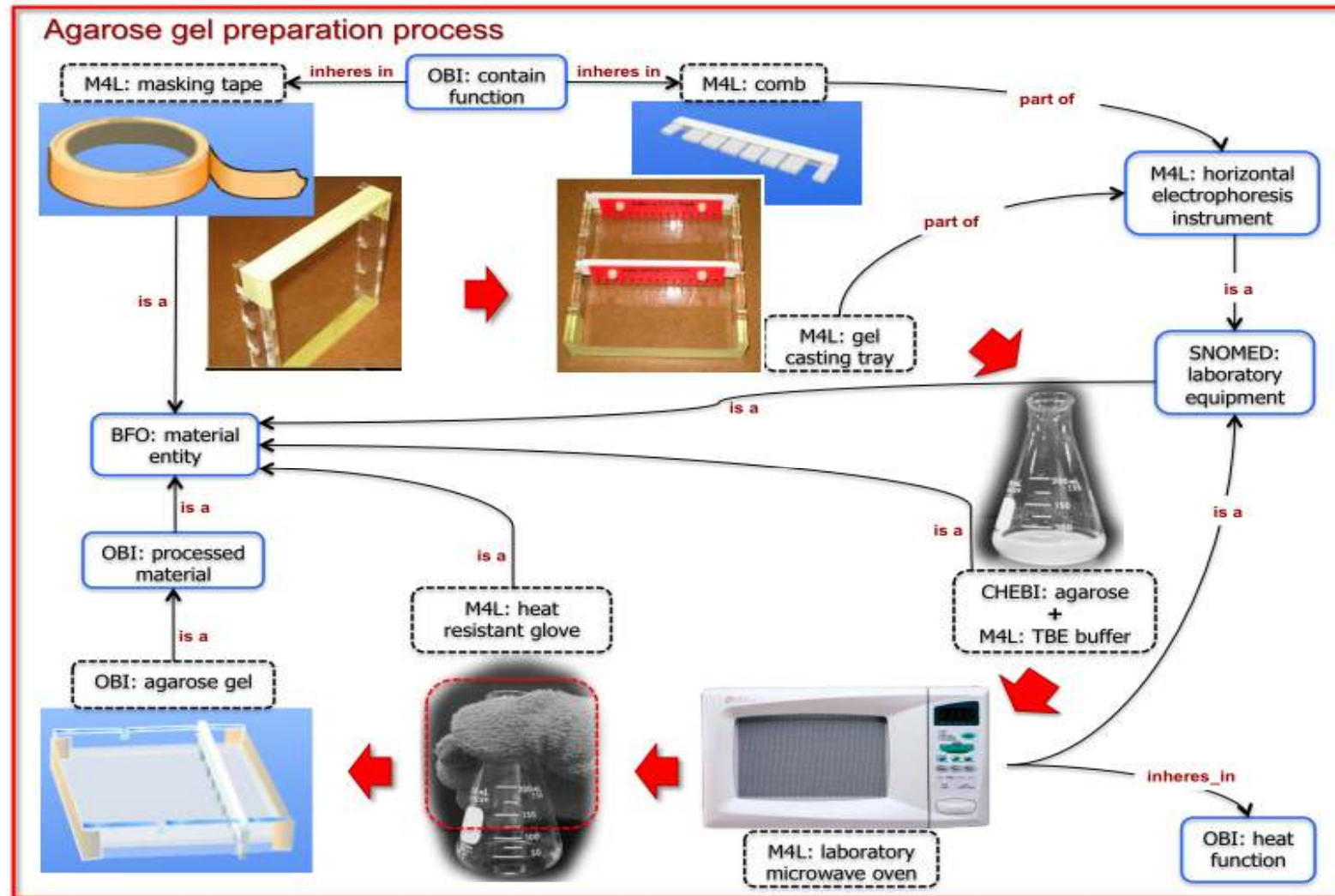
Εφαρμογές:

1. Διαχωρισμό μακρομορίων
2. Στον έλεγχο της καθαρότητας του δείγματος
3. Στον ποσοστικό και ποιοτικό έλεγχο
4. Στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους

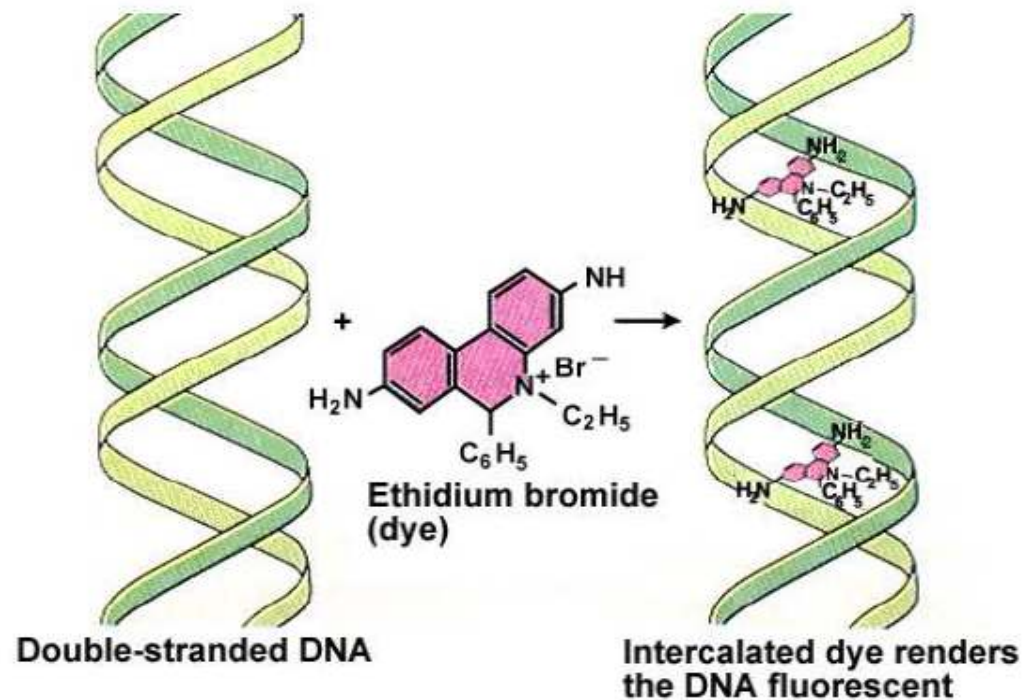
Πήκτωμα Αγαρόζης



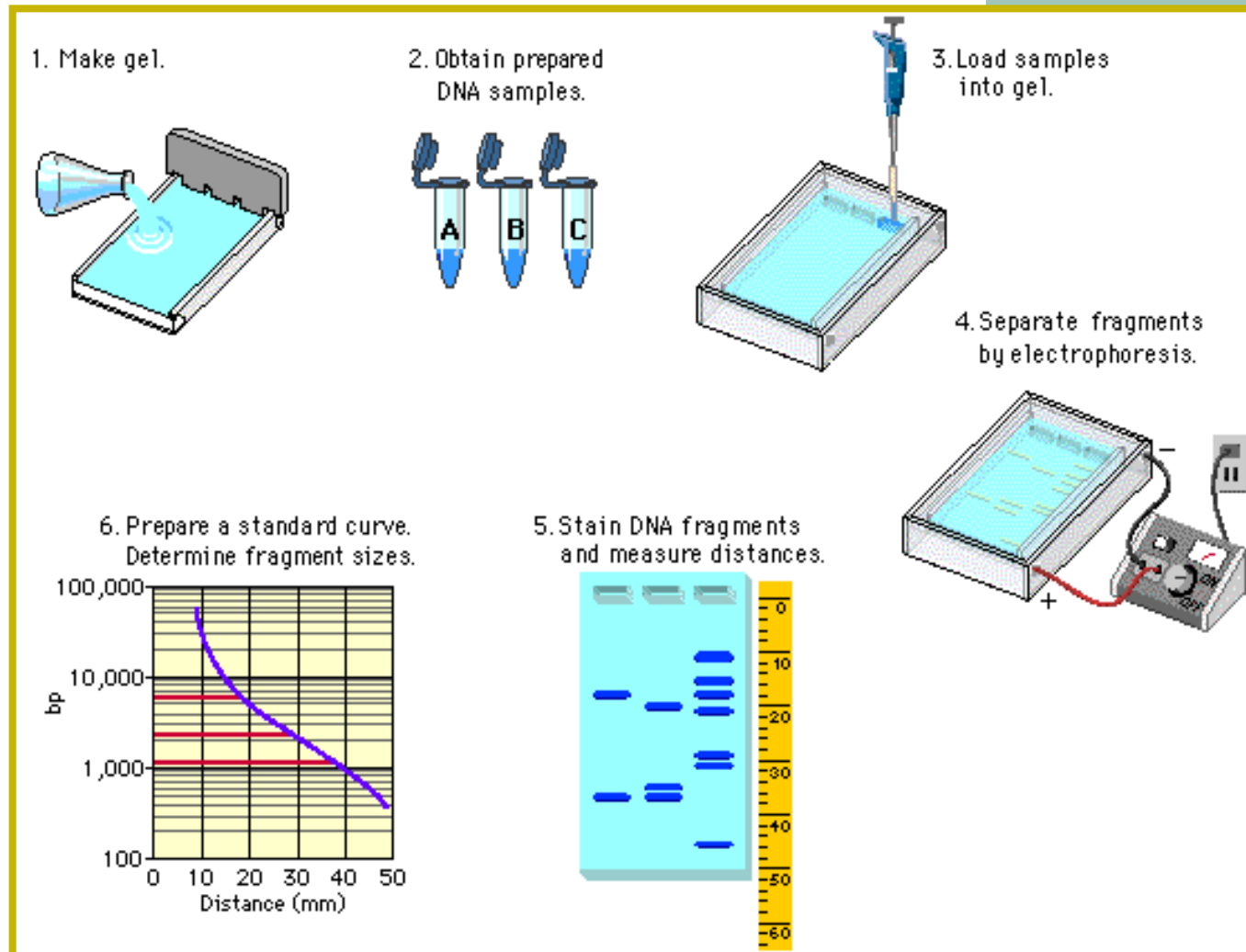
Electrophoresis = Ηλεκτροφόρηση



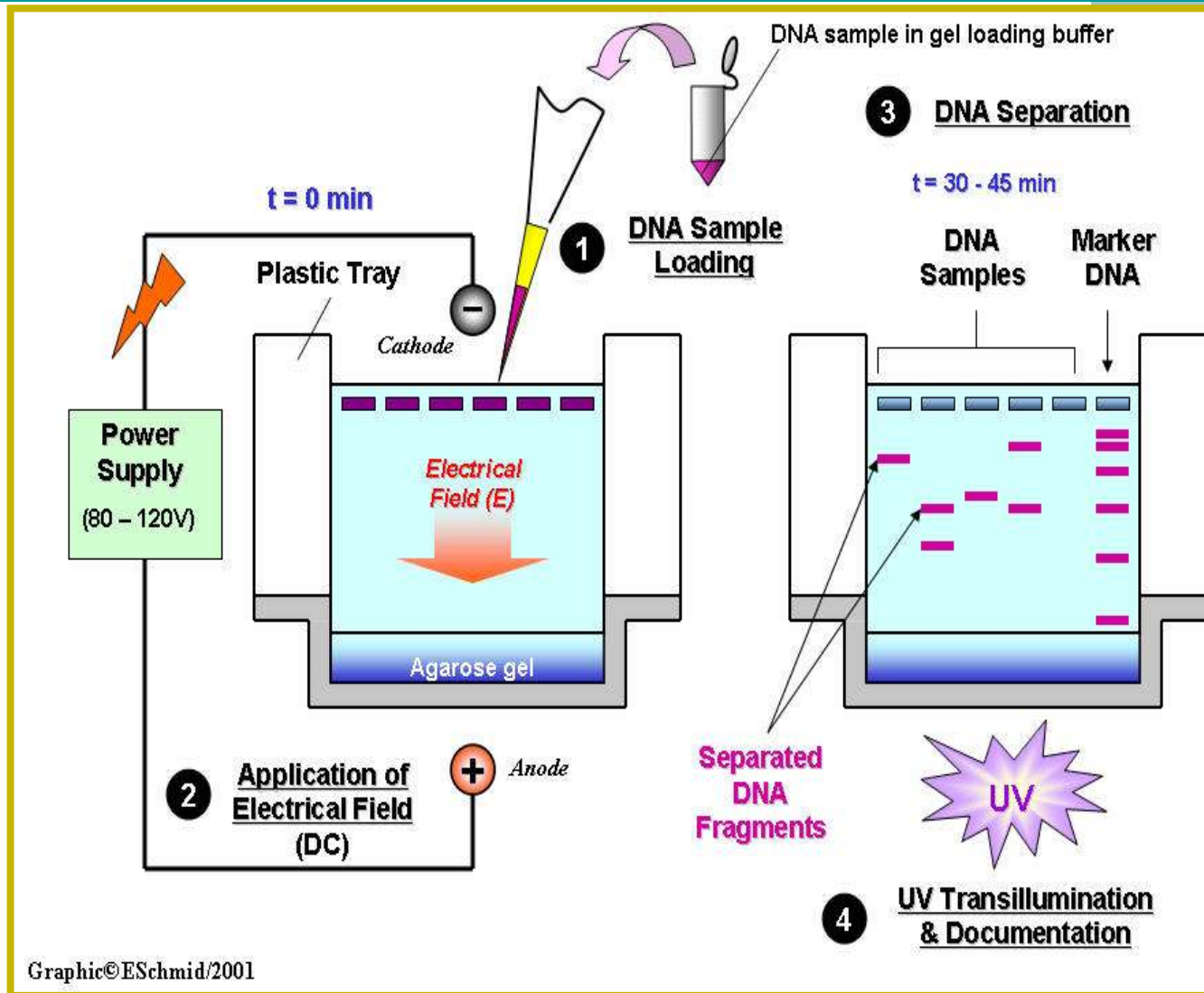
Βρωμιούχο Αιθίδιο [EtBr]



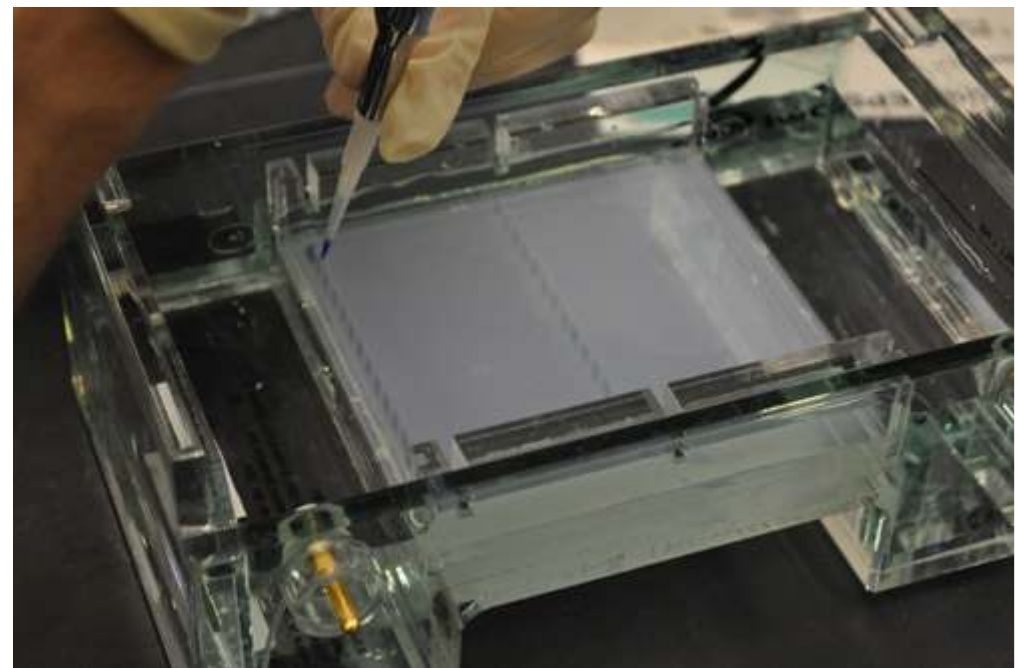
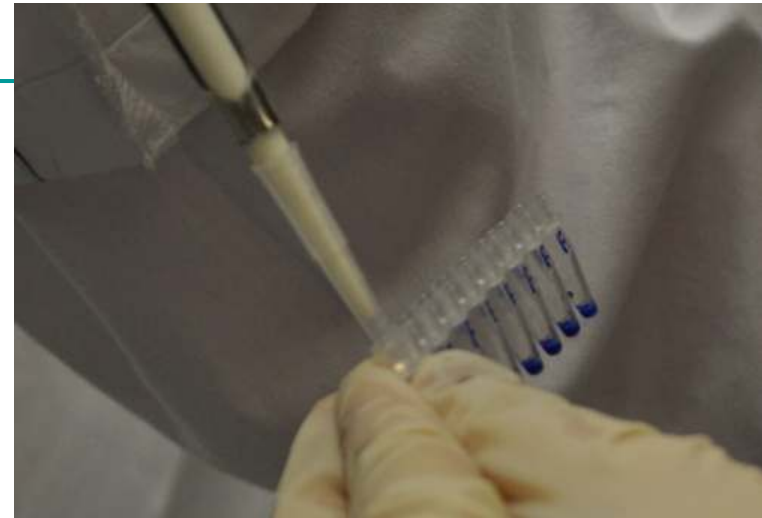
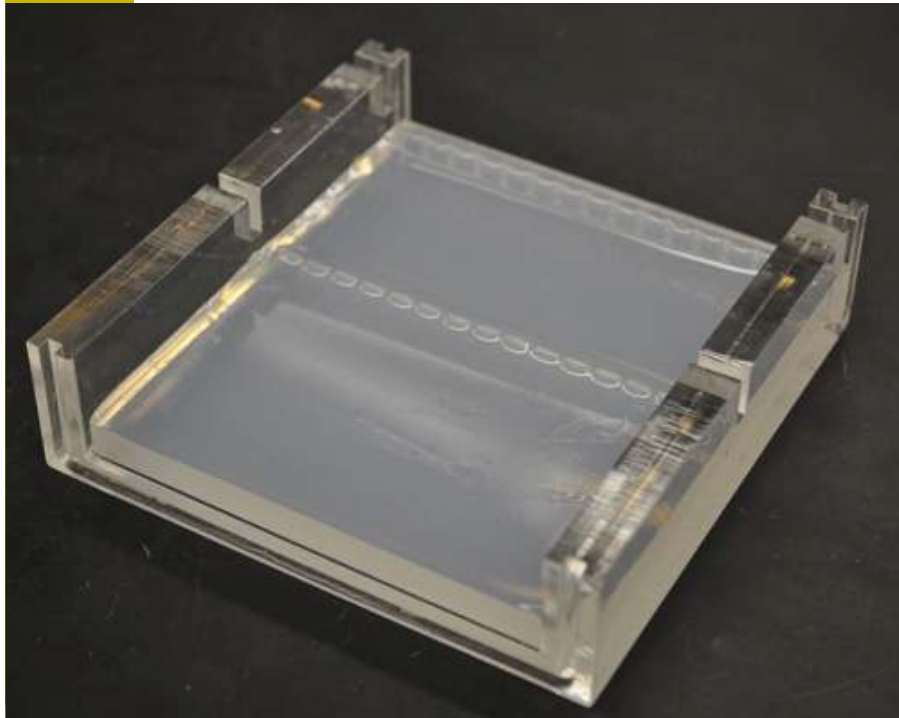
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης



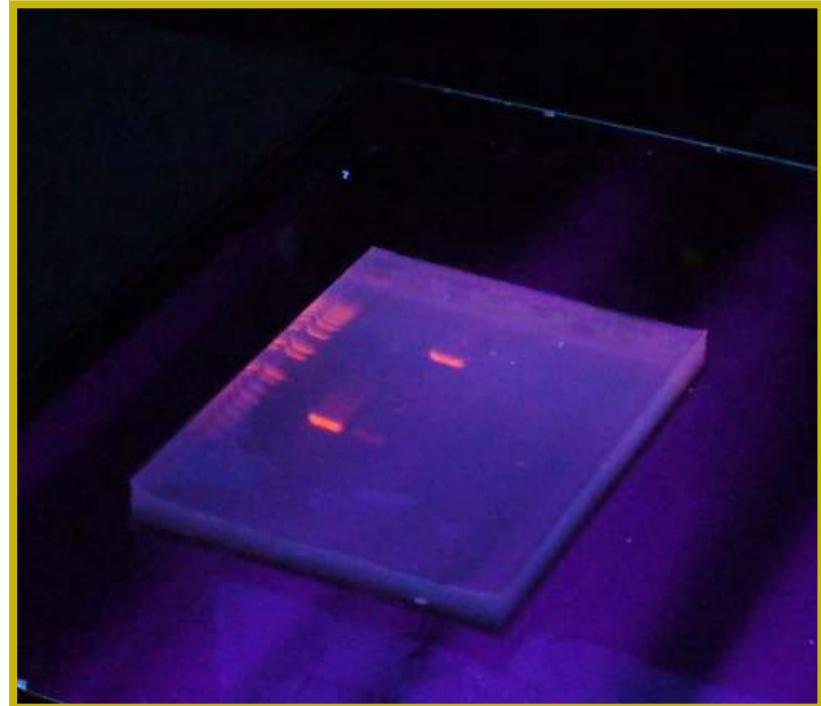
Ηλεκτροφόρηση



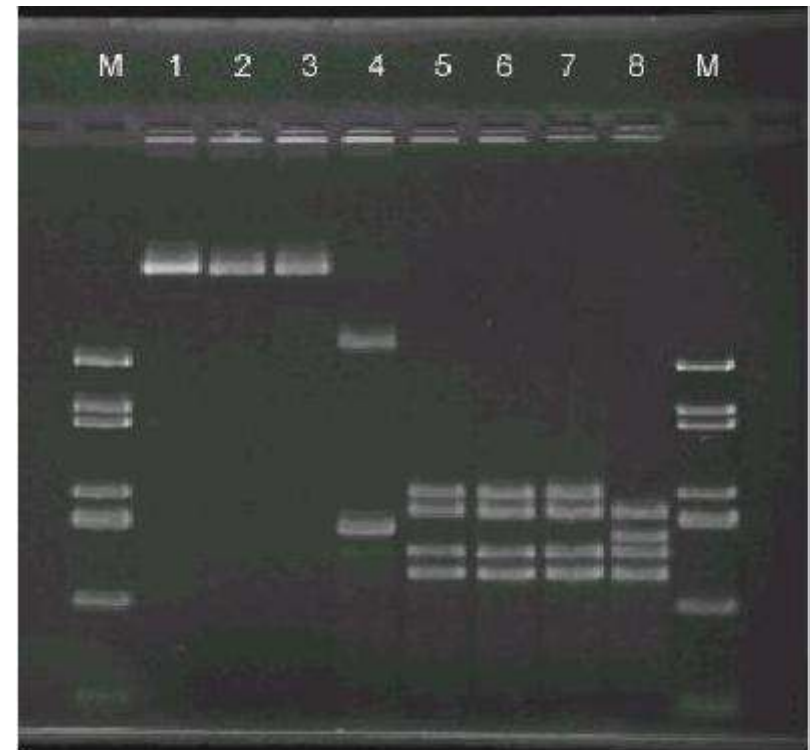
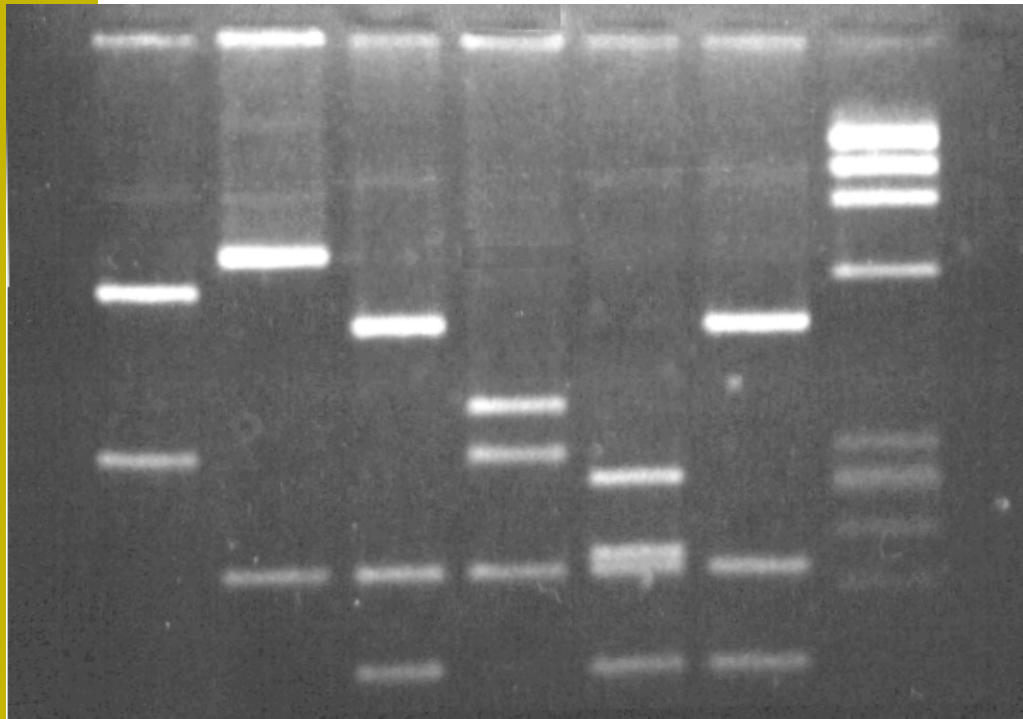
Ηλεκτροφόρηση



Χωρίς UV και με UV



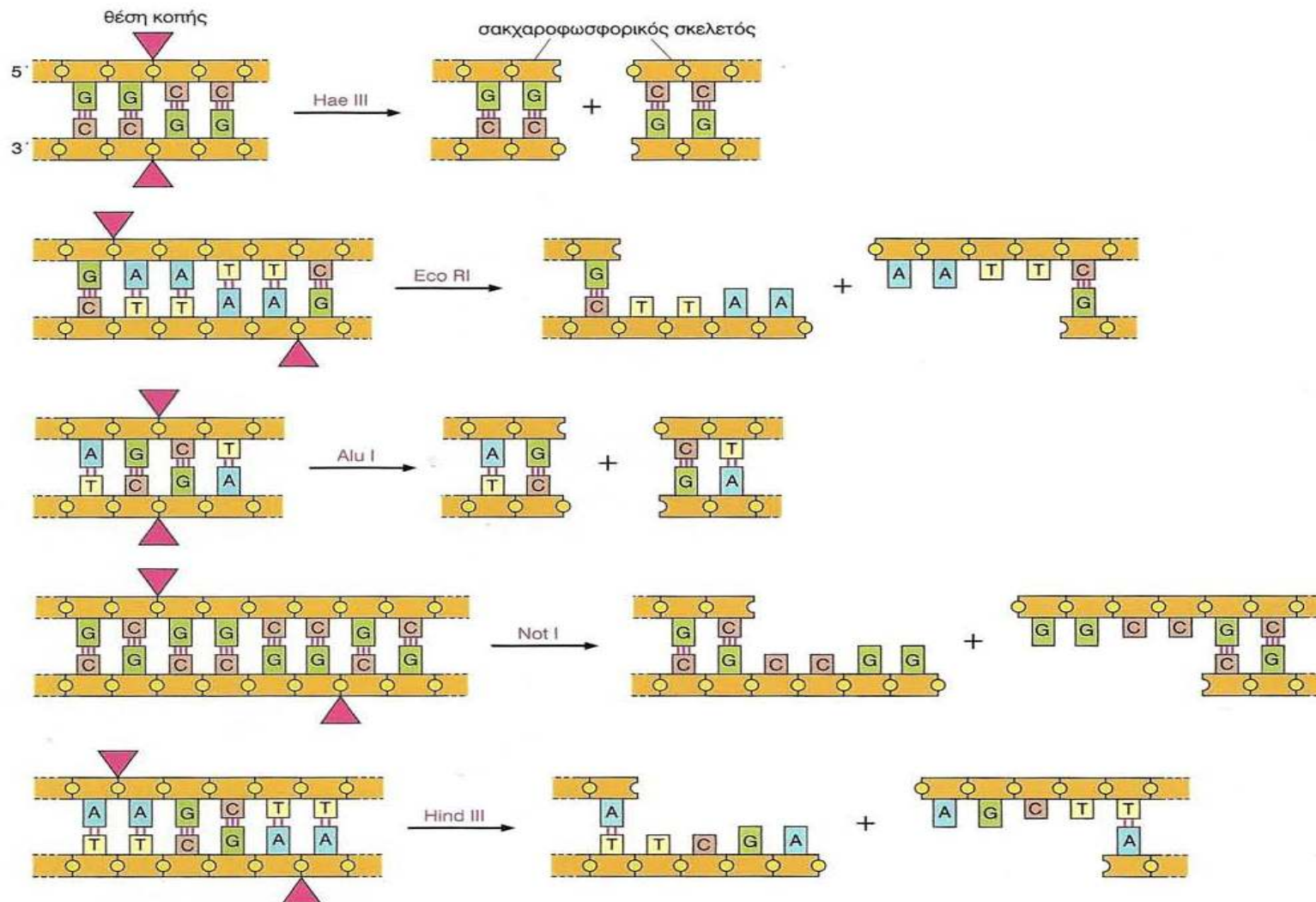
Ηλεκτροφόρηση



Ενδονουκλεάσες περιορισμού

- Ορισμένα ένζυμα που κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, αφήνοντας στα κομμάτια που προκύπτουν είτε λεία άκρα, είτε προεξέχοντα μονόκλωνα άκρα.
- Οι αλληλουχίες που στοχεύουν είναι βραχείες και έχουν μήκος 4-8 ζεύγη νουκλεοτιδίων.
- π.χ. Το ένζυμο Hae III κόβει σε μία αλληλουχία 4 ζευγών νουκλεοτιδίων. Η αλληλουχία αυτή αναμένεται να υπάρχει περίπου κάθε 256 ζεύγη νουκλεοτιδίων (1 στα 4^4).

Ενδονουκλεάσες περιορισμού



Το μέλλον της PCR: qRT - PCR

qRT-PCR = quantitative Real Time PCR



Real Time PCR: Μέθοδοι Ποσοτικοποίησης

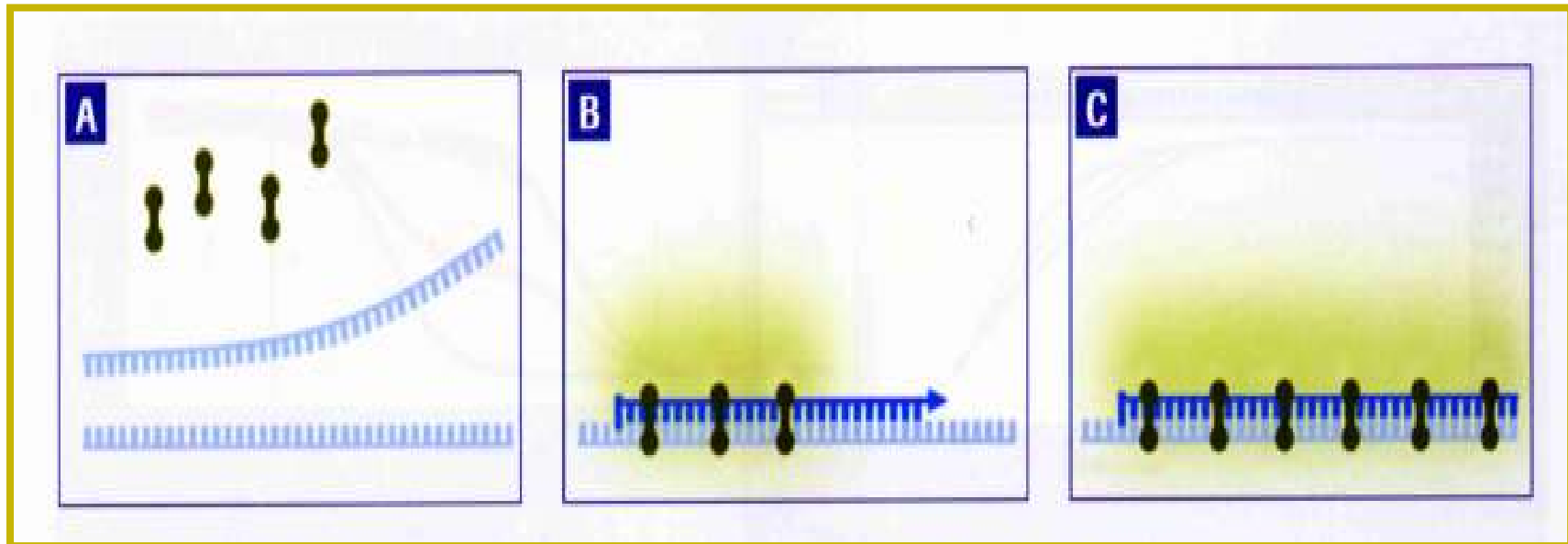
■ Absolute Quantification

Επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της αλληλουχίας στόχου και εκφράζοντας το τελικό αποτέλεσμα σε μία απόλυτη τιμή [copies / ml = αντίγραφα ανά ml].

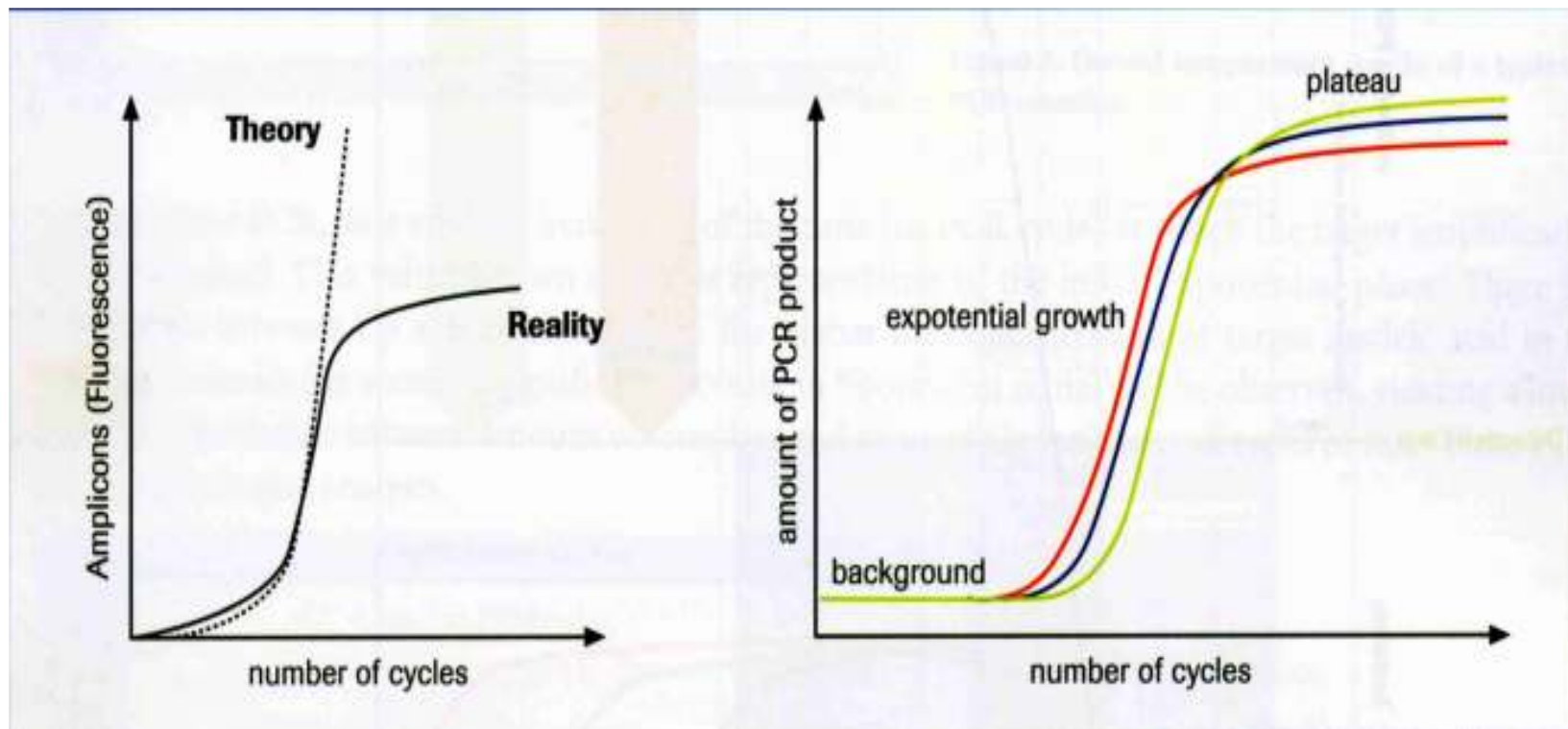
■ Relative Quantification

Συγκρίνει τα επίπεδα δύο διαφορετικών αλληλουχιών στόχων σε ένα μόνο δείγμα (π.χ. το / α προς εξέταση γονίδιο / α και το reference / housekeeping γονίδιο) δίνοντας ως τελικό αποτέλεσμα μία αναλογία αυτών των στόχων.

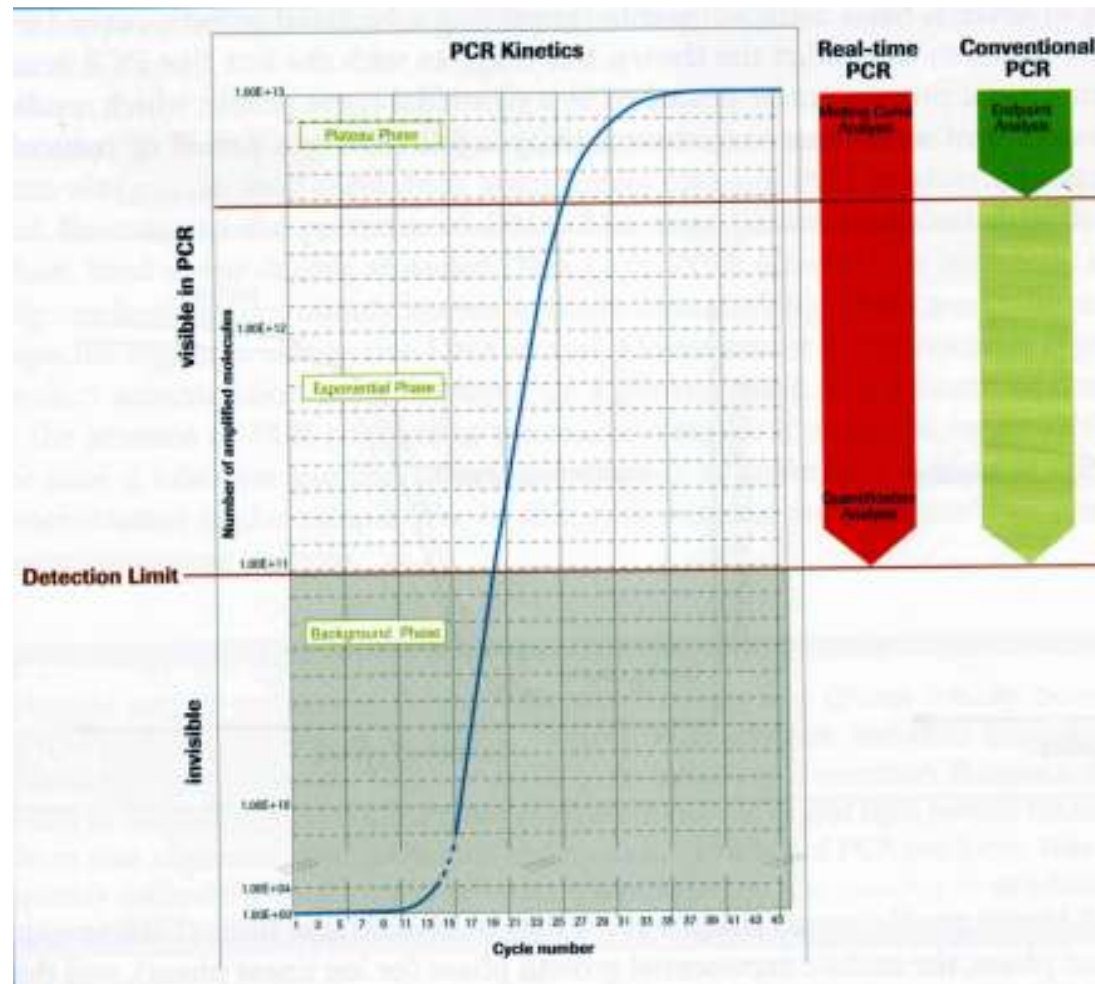
Real Time PCR: SYBR Green



Real Time PCR



Real Time PCR



Real Time PCR vs Standard PCR

- Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση
- Συλλογή πληροφοριών σε κάθε κύκλο της αντίδρασης PCR
- Εκτίμηση του αποτελέσματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης
- Μεγαλύτερη ακρίβεια
- Μεγαλύτερη ευαισθησία
- Μεγαλύτερη αξιοπιστία

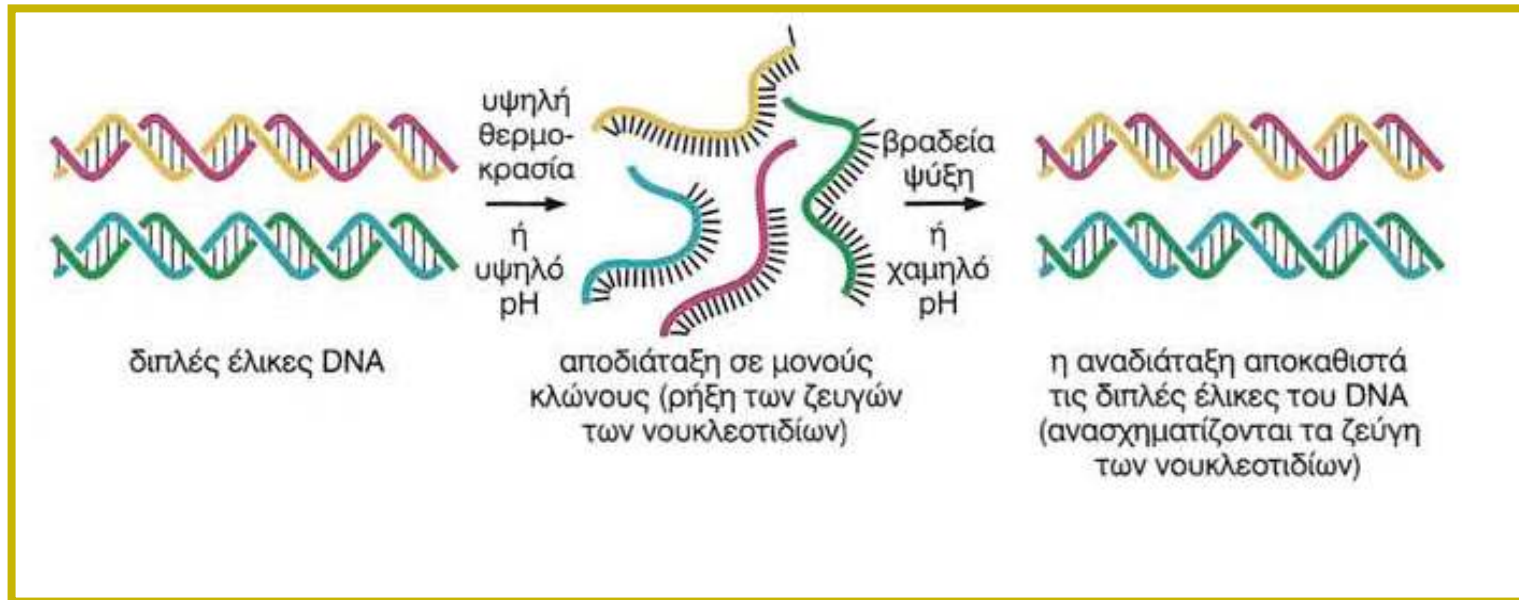
Εφαρμογές της Real Time PCR

- Ανίχνευση ειδικών DNA / RNA αλληλουχιών (Ογκολογία)
- Χαρακτηρισμός ενός συγκεκριμένου είδους όπως π.χ. Βακτήρια, ιοί (Ιολογία, Μικροβιολογία)
- Ανίχνευση παθογόνων π.χ. Anthrax, legionella
- Έλεγχος για την ποιότητα του νερού
- Καθορισμός των επιπέδων έκφρασης mRNA
- Ανίχνευση GMO

Hybridization = Υβριδισμός

- Τεχνική στην οποία μονόκλινα νουκλεϊνικά οξέα αφήνονται να αλληλεπιδράσουν ώστε να σχηματίσουν σύμπλοκα (υβρίδια) με μόρια παρόμοιας, συμπληρωματικής αλληλουχίας.
- Η προσφορά της τεχνικής του υβριδισμού:
 1. Μπορεί να εκτιμηθεί ο βαθμός ταυτότητας δύο αλληλουχιών
 2. Μπορούν να ανιχνευθούν δύο αλληλουχίες
 3. Microarrays

Υβριδισμός



Υβριδισμός

- Για την αναζήτηση μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων απαιτείται ένα ειδικό νουκλεϊνικό οξύ που ονομάζεται ανιχνευτής (probe) και κατέχει συμπληρωματική αλληλουχία.

Προκειται για ένα βραχύ μονόκλωνο μόριο DNA, ένα ολιγονουκλεοτίδιο, με μήκος που κυμαίνεται από 10 έως 1000 νουκλεοτίδια.

Οι ανιχνευτές είναι σημασμένοι είτε με ραδιενεργά ισότοπα είτε με φθορίζουσα χρωστική που ενσωματώνεται στον ανιχνευτή κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του.

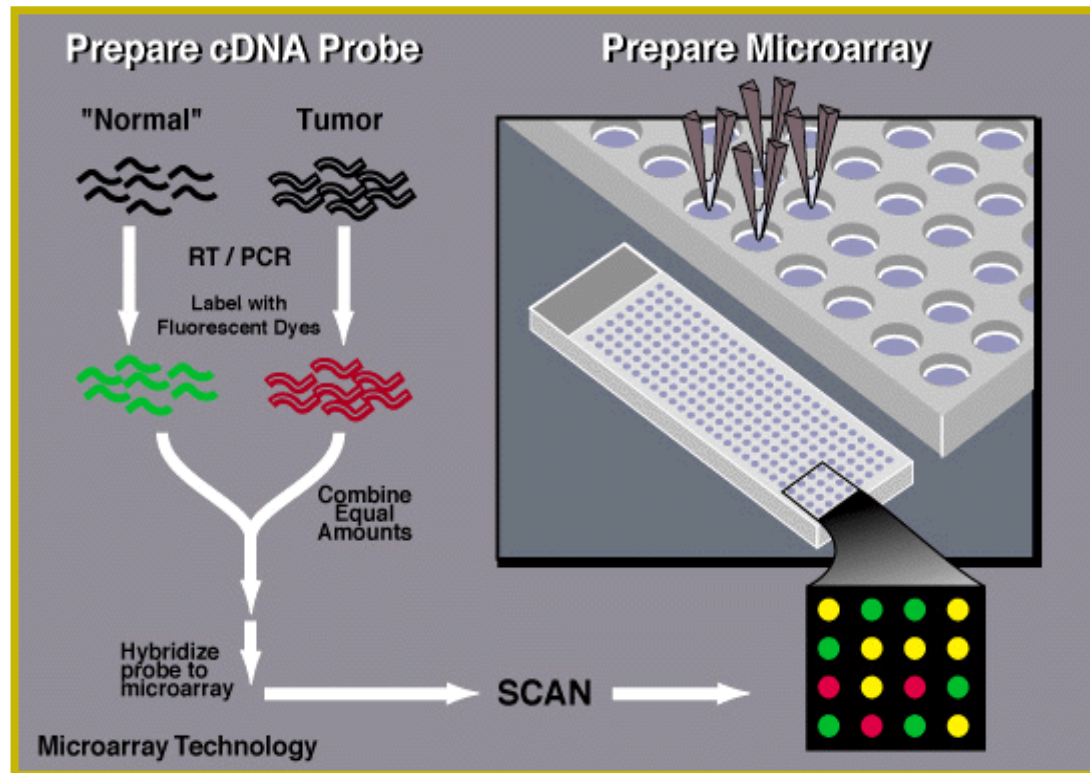
Υβριδισμός

- Ο υβριδισμός μπορεί να γίνει σε δ/μα ή με το ένα συστατικό ακινητοποιημένο σε πηκτή ή, συχνότερα, πάνω σε φύλλο νιτροκυτταρίνης.
- Τα υβρίδια μπορούν να ανιχνευθούν:
 1. Παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
 2. Ραδιενεργός σήμανση του ενός συστατικού και απομάκρυνση του ελεύθερου DNA
 3. Πλύσιμο ή πέψη με ένα ένζυμο που υδρολύει μονόκλιωνα νουκλεϊνικά οξέα και στη συνέχεια εκτίμηση της προσδεμένης ραδιενέργειας

Microarrays = Μικροσυστοιχίες

- DNA microarrays χρησιμοποιούνται για τη καταγραφή της έκφρασης εκατοντάδων ή χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα.
- Με τον τρόπο αυτό μπορούν να μελετηθούν τα περίπλοκα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης που κατευθύνουν τη φυσιολογία κάθε κυττάρου. Δηλαδή, μπορούμε να παρατηρήσουμε ποια γονίδια ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται καθώς τα κύτταρα αυξάνονται, διαιρούνται ή απαντούν σε ορμόνες, τοξίνες ή λοιμώξεις.

Μικροσυστοιχίες



Omics

Omics Technologies

Genomics /
Transcriptomics

Proteomics

Metabonomics

Bioinformatics

Microarrays
Gene Expression Profiling

- Toxicogenomics
- Pharmacogenomics
- Nutrigenomics
- **Athleticogenomics**

Βιβλιογραφία

- Σημειώσεις 2^{ου} Εργαστηρίου (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης)
- Alberts, Τόμος I, Κεφάλαιο. 10: Η τεχνολογία του DNA, σελ. 395 - 430

Videos

- PCR – Polymerase Chain Reaction animation with PowerPoint // Biology with Animation
<https://youtu.be/QwT-Tj89VLo>
- Polymerase Chain Reaction (PCR) // DNA Learning Centre
<https://youtu.be/2KoLnIwoZKU>
<https://youtu.be/JRAA4C2OPwg>
- PCR (Polymerase Chain Reaction) Tutorial – An Introduction // Applied Biological Materials – abm
<https://youtu.be/matsiHSuoOw>

Videos

- Introduction to PCR // Thermo Fisher Scientific
<https://youtu.be/NI6eLez3CNI>
- Principles of PCR // Thermo Fisher Scientific
<https://youtu.be/VD5qEVTsjTc>
- Basics of PCR // Thermo Fisher Scientific
https://youtu.be/mOKb0Pd_Rac
- PCR reaction types and applications // Thermo Fisher Scientific
<https://youtu.be/woYiV0KUUsk>



The end ... or begin ...

Ευχαριστώ

Καλό Σαββατοκύριακο