

Αλυσιδωτή Αντίδραση
Πολυμεράσης, Ενδονουκλεάσες
Περιορισμού και Ηλεκτροφόρηση
σε πηκτή αгарόζης

Lab No3

Ερευνητικός Στόχος

- Θα προσπαθήσουμε να ανιχνεύσουμε ένα γενετικό πολυμορφισμό στο γονίδιο Notch4 .
- Πρόκειται για μία αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου (T/C) σε ρυθμιστική περιοχή κοντά στο 5' άκρο του γονιδίου Notch4.

Notch4 και Psoriasis Vulgaris (Κοινή Ψωρίαση)

- Το γονίδιο Notch4 αποτελεί ένα από τα γονίδια που κρατούν ρόλους κλειδιά στην ανθρώπινη ανάπτυξη, συμμετέχοντας μεταξύ των άλλων, στη διαφοροποίηση, στην οργανογένεση και την ανάπτυξη των ιστών.
- Ψωρίαση είναι μία χρόνια, κληρονομική, υποτροπιάζουσα δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από διακριτές, ζωηρά ερυθρές κηλίδες ή πλάκες καλυπτόμενες από αργυρόχροα λέπια. Δεν είναι σπάνια η προσβολή των αρθρώσεων.

PCR

- PCR = **P**olymerase **C**hain **R**eaction
- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
- Τεχνική *in vitro*
- “Molecular photocopying”

PCR

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

Ο δημιουργός

Kary B. Mullis

Επινόησε την μέθοδο της PCR το 1985

Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993



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 θέρμανση στους 90 -95°C.

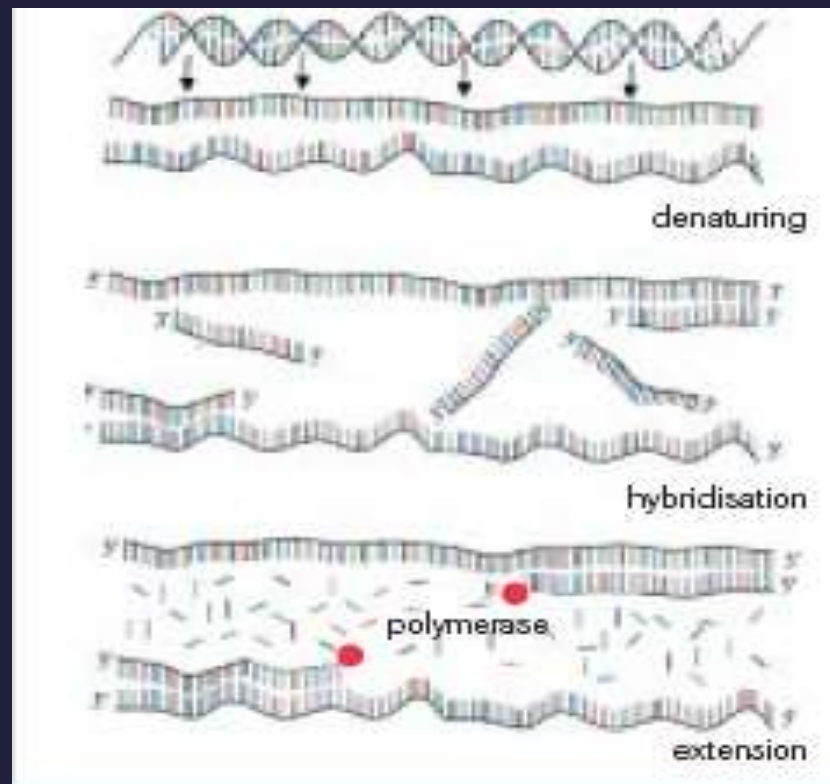
Στάδιο 2° -> Υβριδισμός (Annealing)

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.

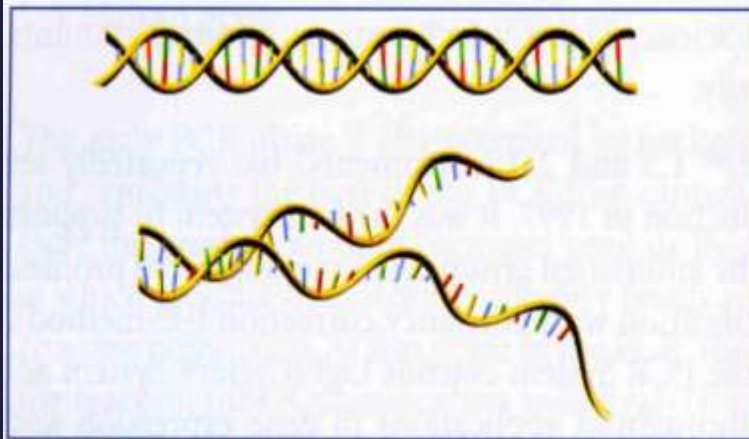
Στάδιο 3° -> Σύνθεση (Extension)

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.

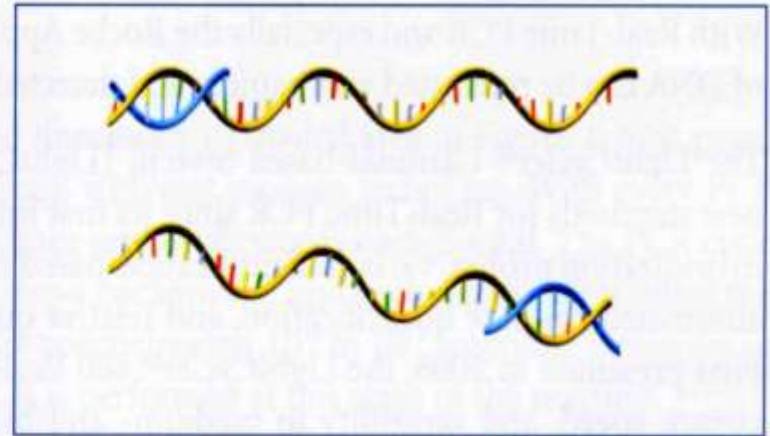
PCR



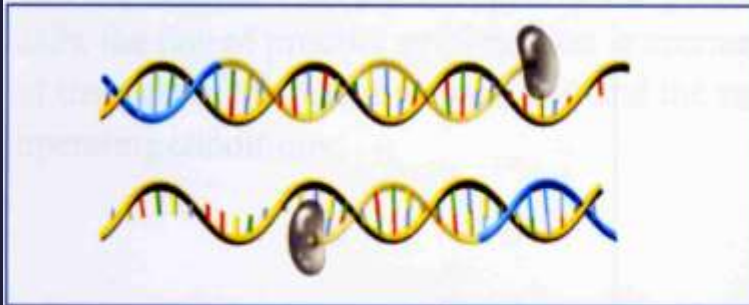
PCR



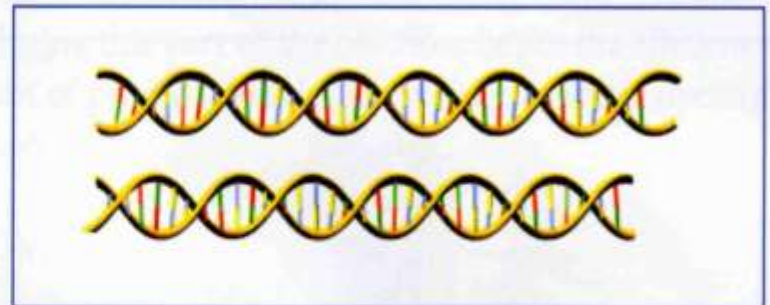
PCR Step 1: Denaturation of template by heat



PCR Step 2: Annealing of primers to template

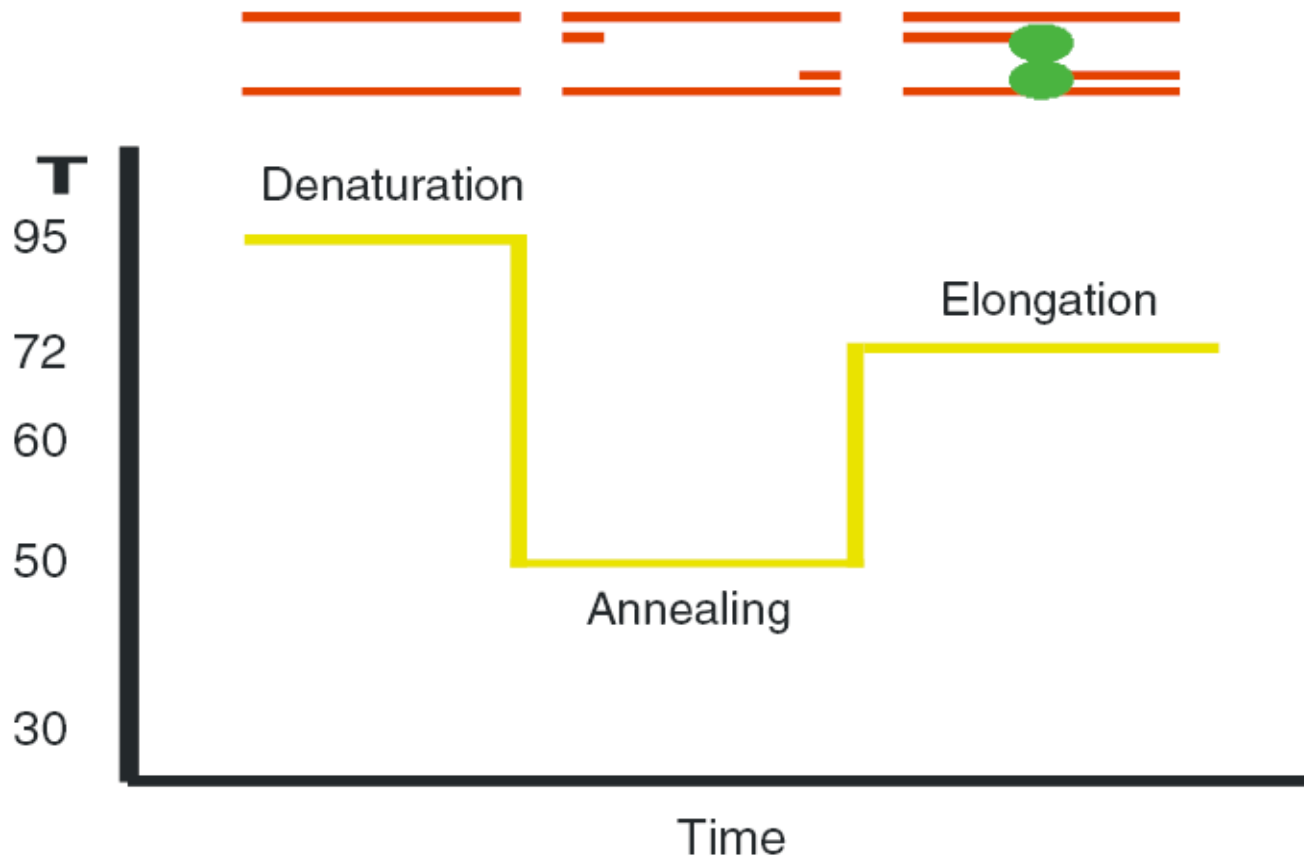


PCR Step 3: Extension of primers with thermostable polymerase



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

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. 2006. The real – time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95-125



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.

Μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα:

- H₂O
- Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer)
- MgCl₂
- Εκκινητές
- dNTPs
- Taq Polymerase
- DNA στόχος (δείγμα)

Το μείγμα μοιράζεται σε 3 σωληνάκια:

Δείγμα



Θετικός μάρτυρας
(positive control)



Αρνητικός μάρτυρας
(negative control)



Μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες για ένα δείγμα (μl)	Ποσότητες για 3.5 δείγματα (x3.5) (μl)
H ₂ O	12.2	42.7
5x Buffer	5	17.5
dNTPs	2.5	8.75
MgCl ₂	1.8	6.3
Primer F	1	3.5
Primer R	1	3.5
Taq Πολυμεράση	0.5	1.75
Τελικός όγκος μείγματος	24	84
Τελικός όγκος ανά σωληνάκι		84:3.5=24

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

Το μέλλον της PCR: qRT - PCR

qRT-PCR = quantitative Real Time PCR



Real Time PCR: Μέθοδοι Ποσοτικοποίησης

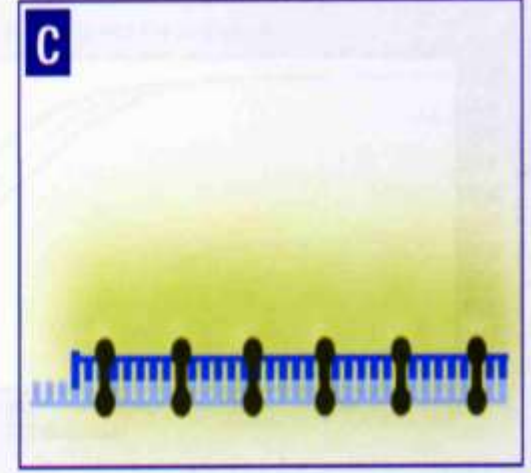
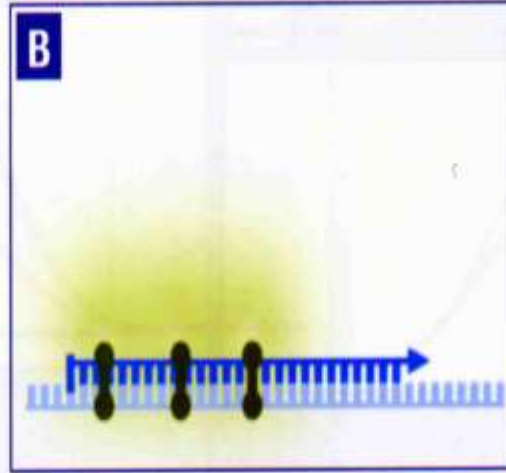
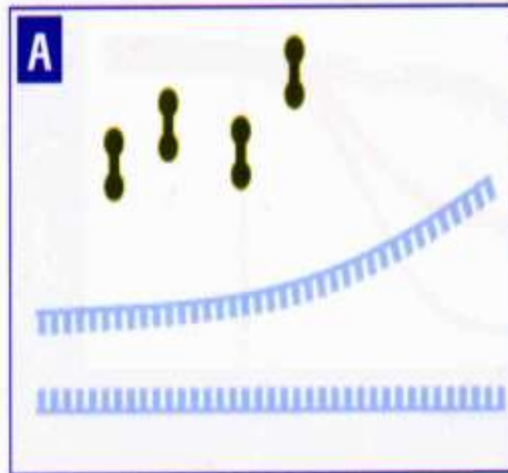
■ Absolute Quantification

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

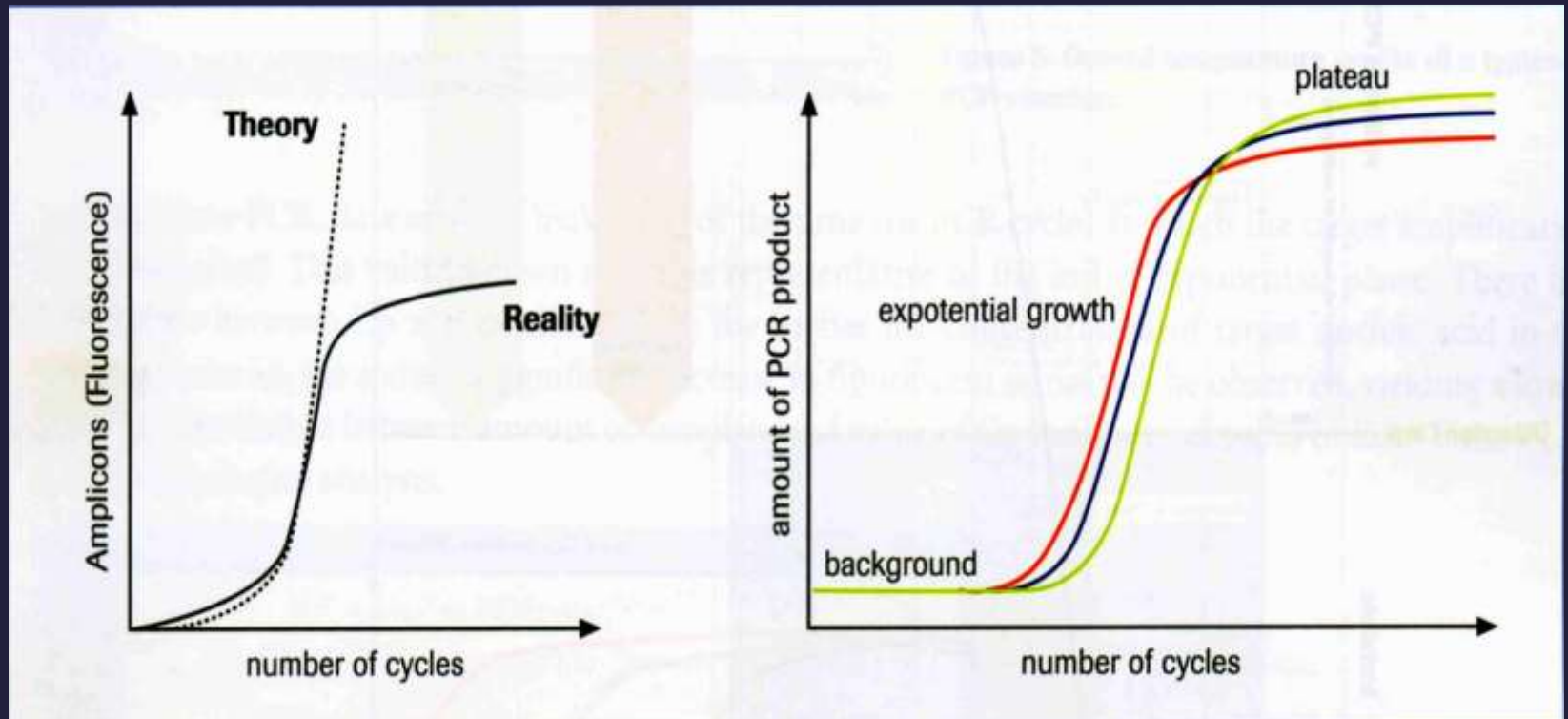
■ Relative Quantification

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.

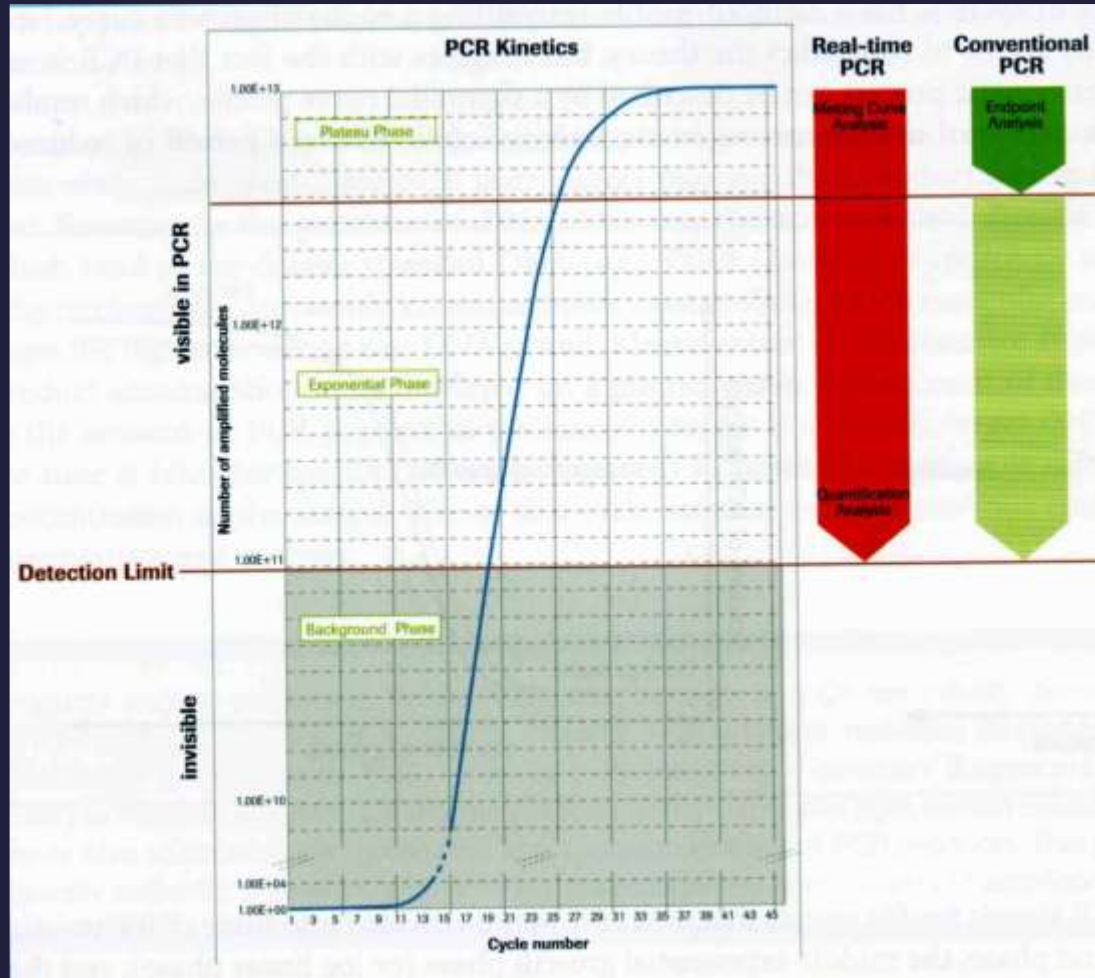
Real Time PCR: SYBR Green



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

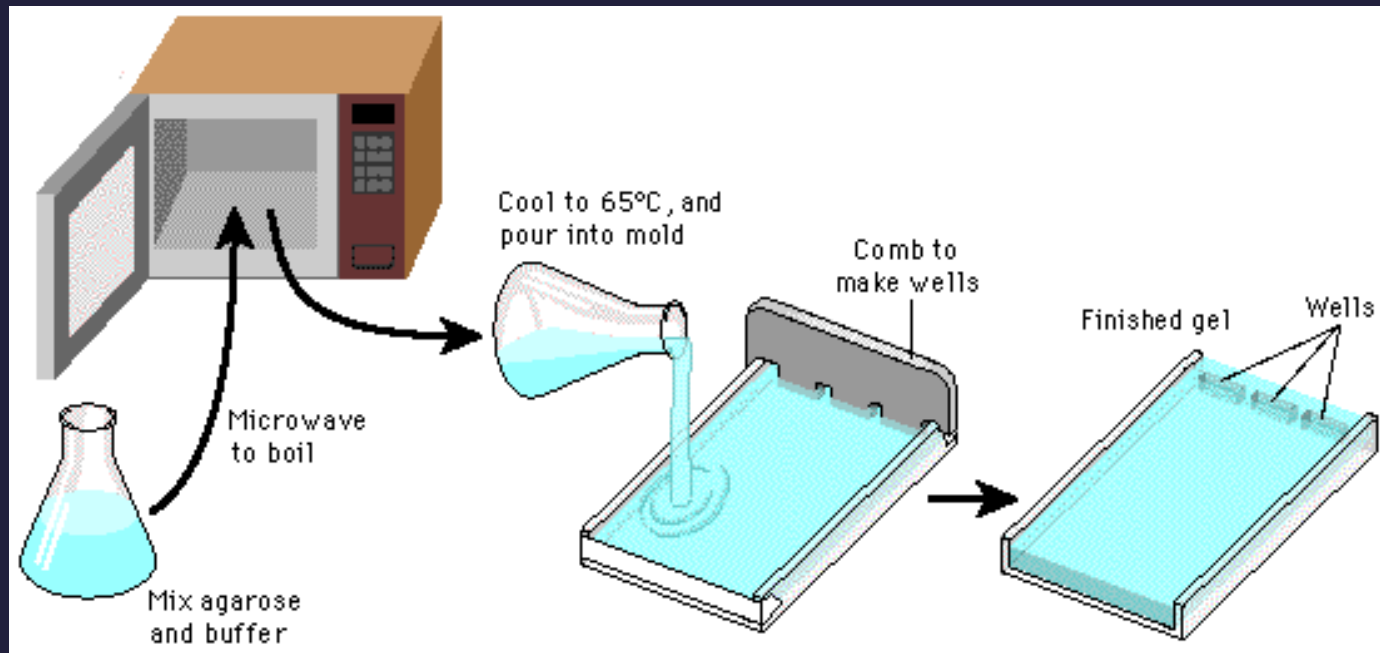
Αξιολόγηση των προϊόντων της PCR:

- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή **αγαρόζης** ή ακρυλαμίδης

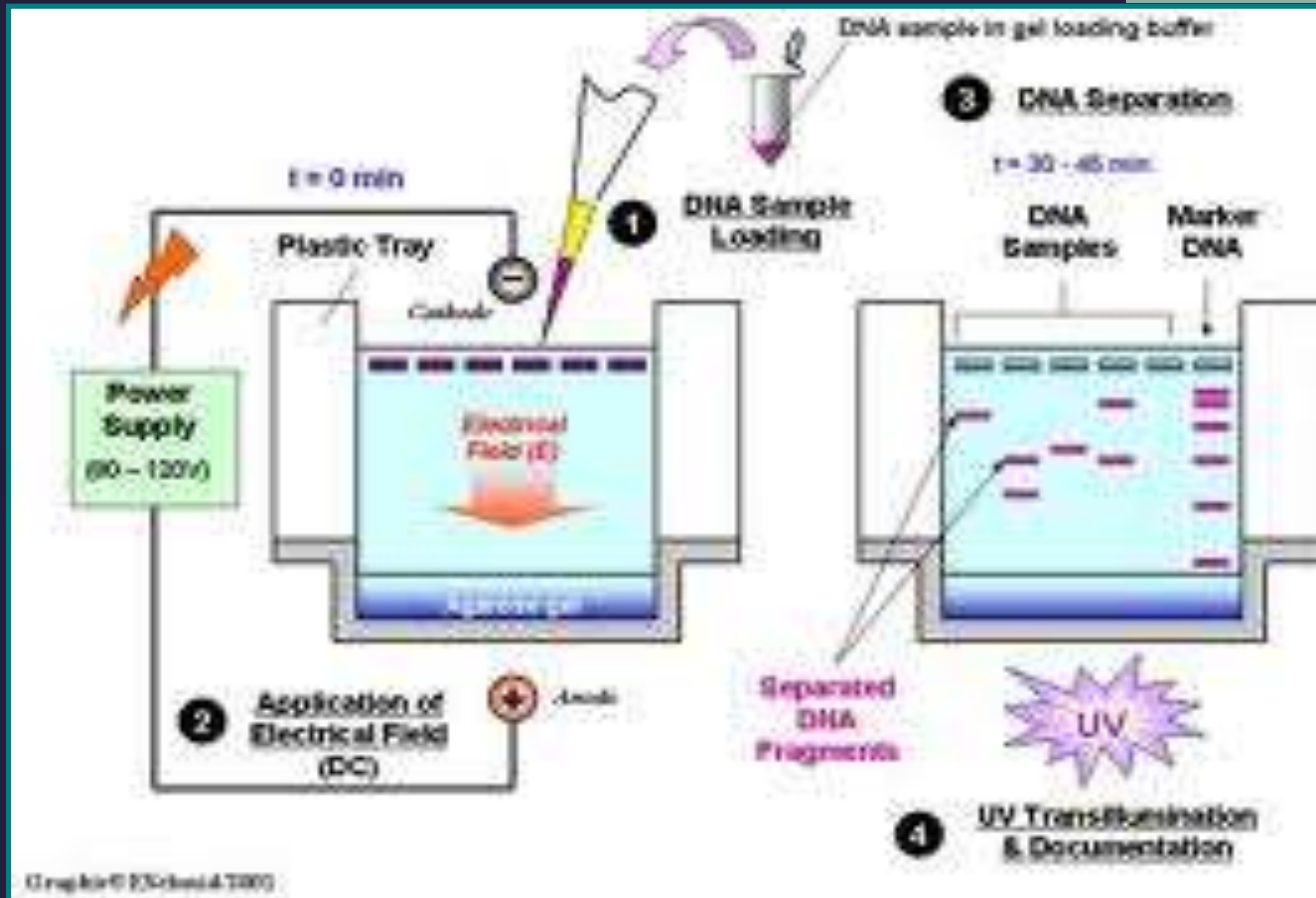
Τι χρειάζεται:

- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- DNA Ladder (Δείκτης Μοριακών Βαρών)
- Αρνητικός και θετικός μάρτυρας
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer)

Πήκτωμα Αγαρόζης

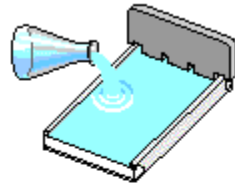


Ηλεκτροφόρηση

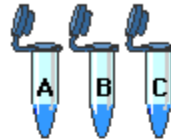


Ηλεκτροφόρηση

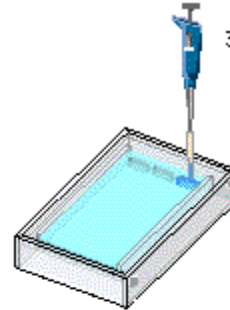
1. Make gel.



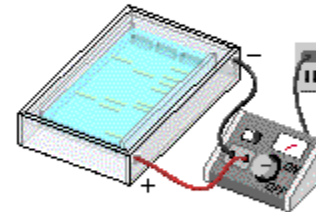
2. Obtain prepared DNA samples.



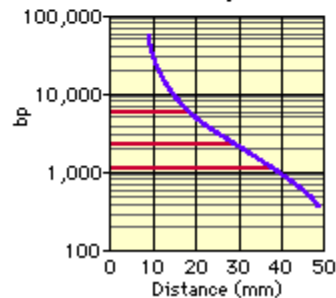
3. Load samples into gel.



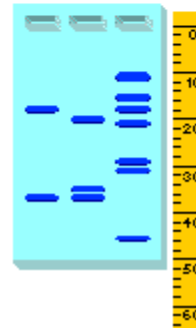
4. Separate fragments by electrophoresis.



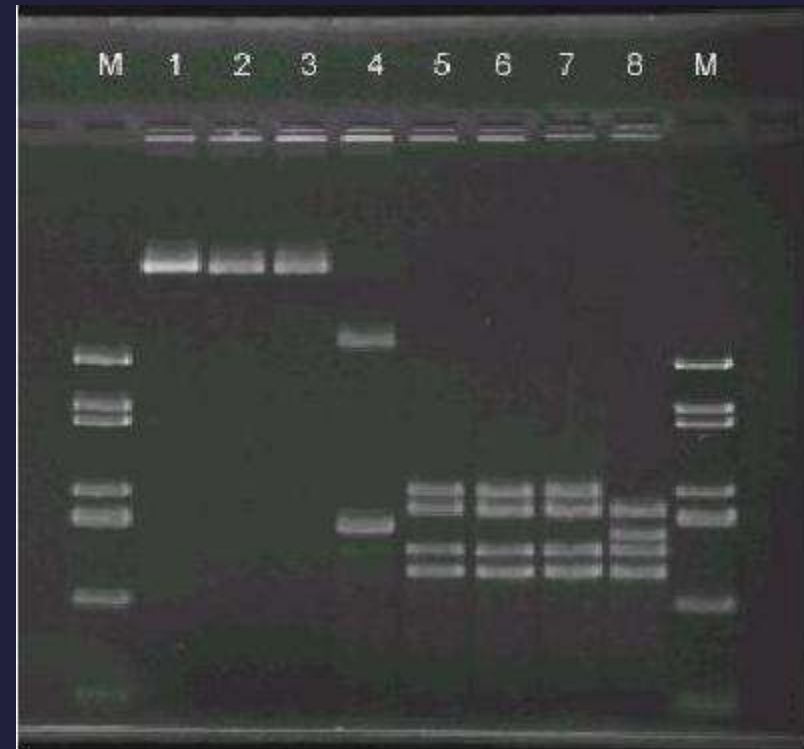
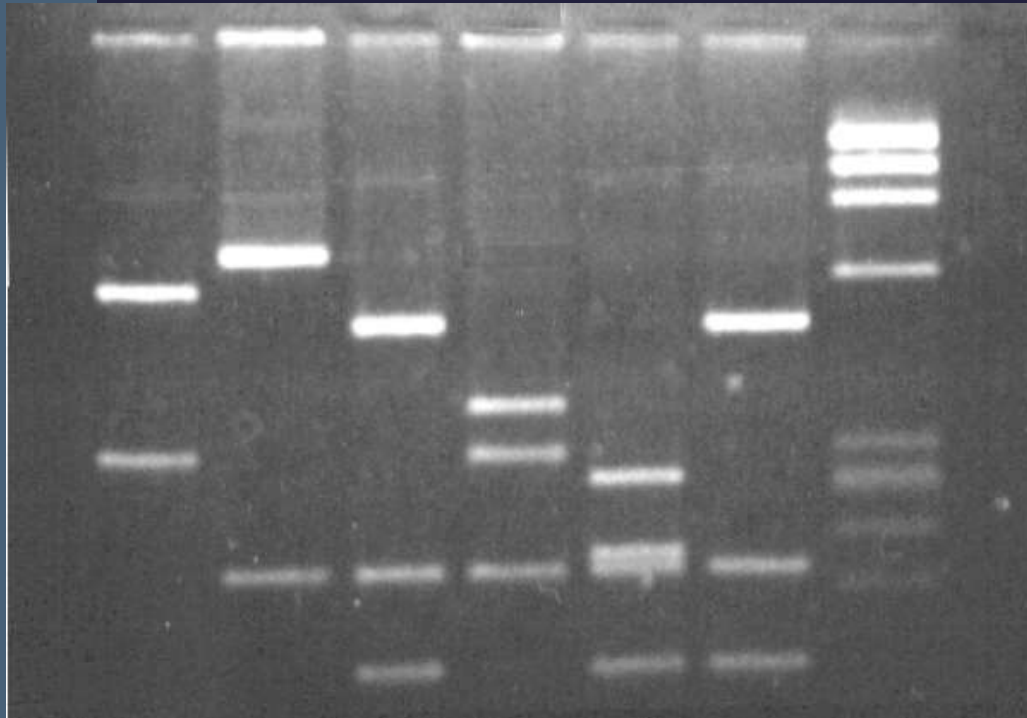
6. Prepare a standard curve.
Determine fragment sizes.



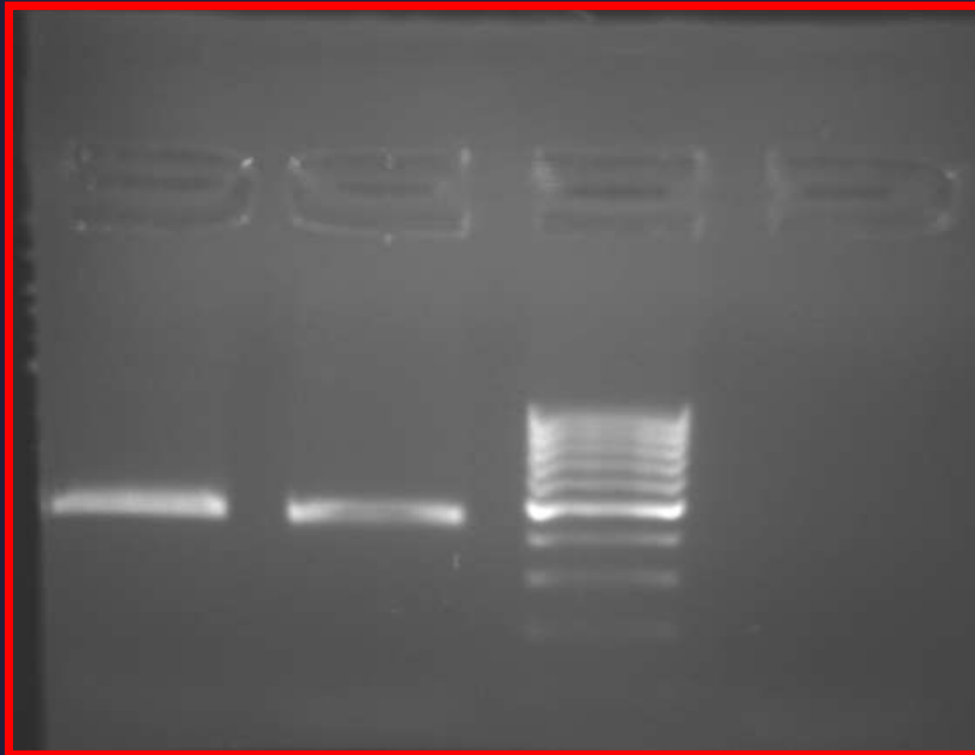
5. Stain DNA fragments and measure distances.

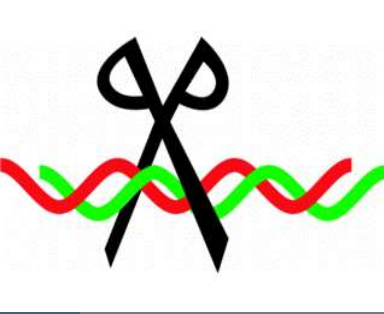


Ηλεκτροφόρηση



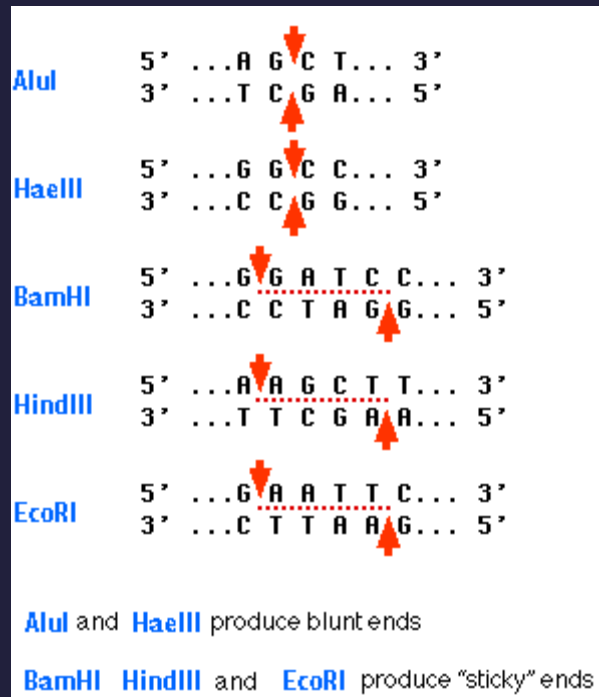
Notch4





Ενδονουκλεάσες Περιορισμού

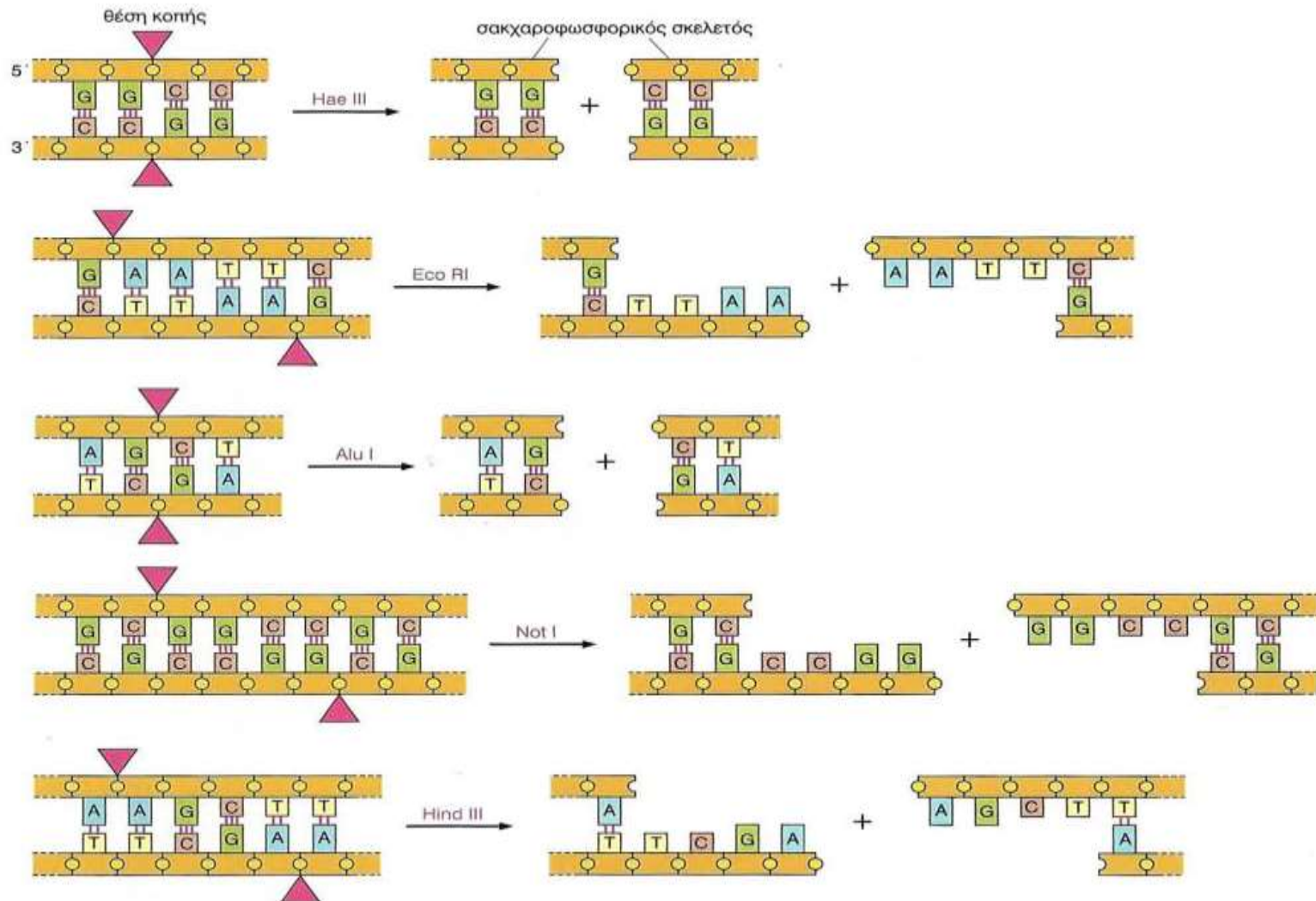
Restriction Endonucleases



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 (4^4).

Ενδονουκλεάσες περιορισμού



Ενδονουκλεάσες Περιορισμού

Restriction Endonucleases

- Χρησιμοποιείται το ένζυμο MspI.

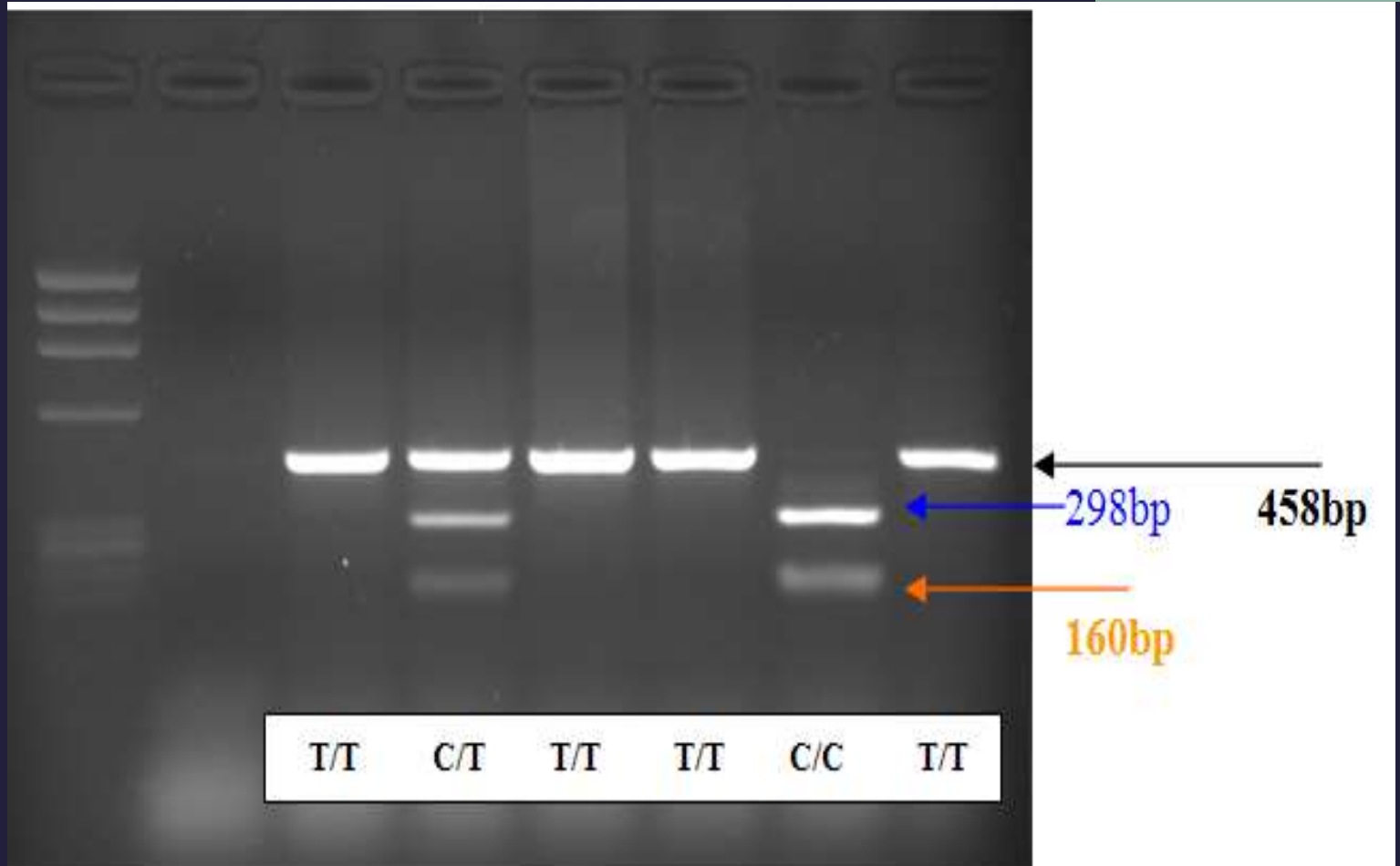


- Κόβει στο C σε δύο κομμάτια
- Επομένως, T/T => 458 bp
 - C/T => 458 bp, 298 bp, 160 bp
 - C/C => 160 bp, 298 bp

Μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα για ένα δείγμα (μl)	Ποσότητες για 3.5 δείγματα (x3.5) (μl)
5x Buffer	2.5	8.75
MspI	1	3.5
ddH ₂ O	1.5	5.25
Τελικός όγκος μείγματος	5	17.5
Τελικός όγκος ανά σωληνάκι		17.5:3.5=5

Notch4



Βιβλιογραφία

- Σημειώσεις 3^{ου} Εργαστηρίου (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης)
- Alberts, Τόμος Ι, 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/2KoLnlwoZKU>
<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/Nl6eLez3CNI>
- 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>