



Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Δρ. Γκατζίδου Ελισάβετ

Μέλος Ε.ΔΙ.Π.

Εργαστήριο Βιολογίας

Τμήμα Ιατρικής ΔΠΘ

PCR

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

PCR

Τεχνική *in vitro*

“Molecular photocopying”

Ο δημιουργός

Kary B. Mullis



Επινόησε την μέθοδο της PCR το 1985

Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993

Ιστορική Αναδρομή

- 1983: **K. Mullis** – Ιδέα

- 1985: 1^η δημοσίευση στο Science

Saiki RK, Scharf S, Faldona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arhem N. 1985. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis and of Sickle Cell Anemia. Science 230: 1350-1354

- 1988: Θερμοσταθερή DNA polymerase

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491

- 1988 μέχρι σήμερα: Χιλιάδες άρθρα χρησιμοποιούν τη συγκεκριμένη τεχνική
- 1989: Το Science χαρακτηρίζει την PCR ως το μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα και την Taq DNA polymerase ως το μόριο της χρονιάς.
- 1993: Βραβείο Νόμπελ Χημείας στον **K. Mullis**

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

Ενα ζεύγος συνθετικών νουκλεοτιδίων συμπληρωματικών προς τα άκρα της αλληλουχίας

- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση
- $MgCl_2$, dNTPs, Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer)
- Ενα 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.

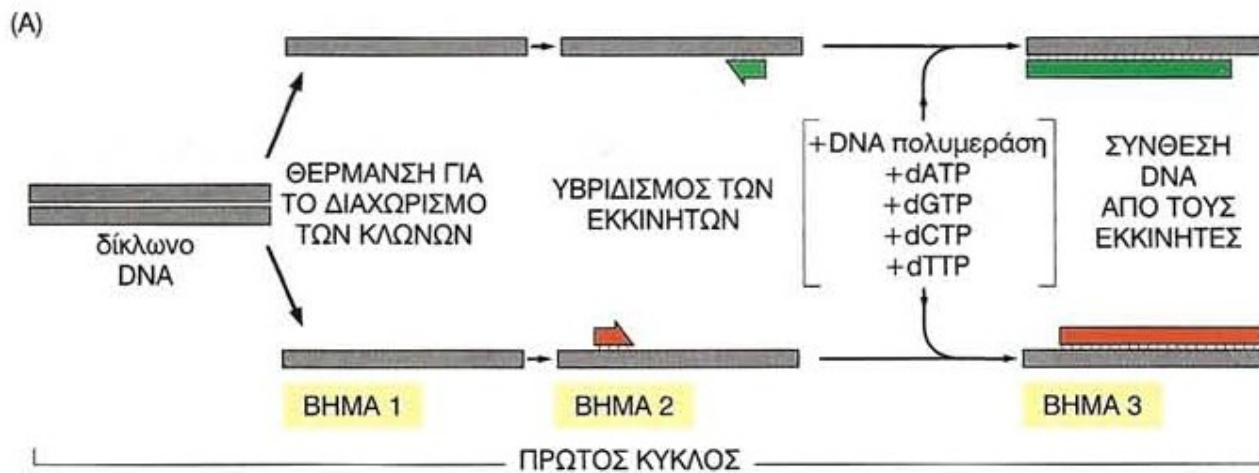
Στάδιο 2° -> Υβριδισμός (**Annealing**)

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 δίκλιωνα 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

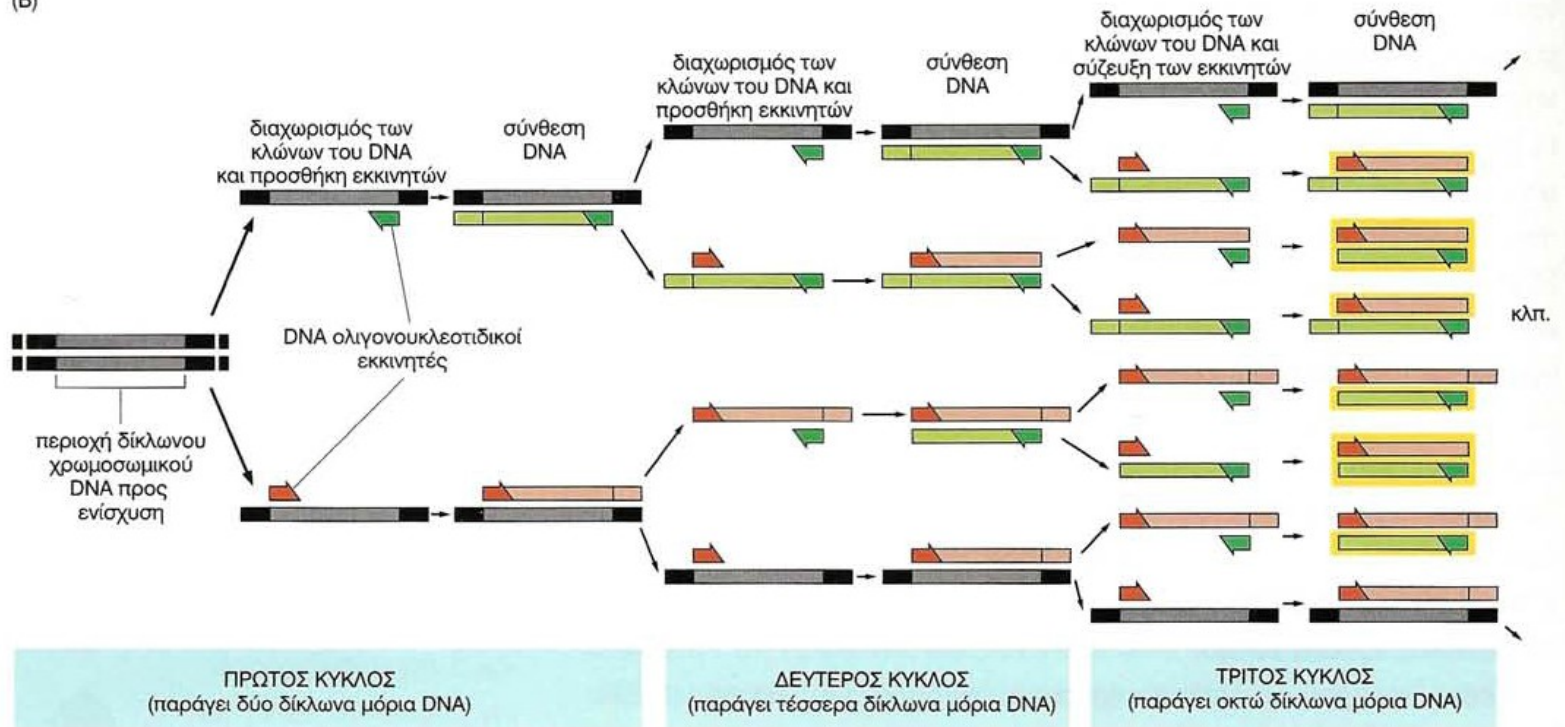
- Το αρχικό μόριο αντιγράφεται σε δύο θυγατρικά και στο τέλος παράγονται περισσότερα από 1 δις αντίγραφα του αρχικού μορίου.
- Ο πολλαπλασιασμός είναι εκθετικός 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης.

PCR

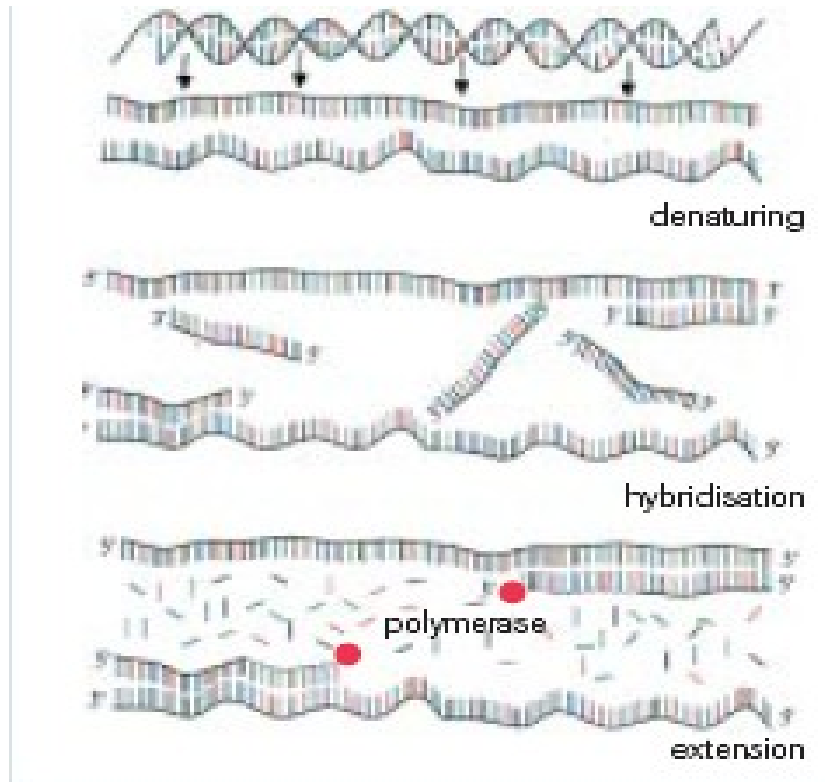
- Το αρχικό μόριο αντιγράφεται σε δύο θυγατρικά και στο τέλος παράγονται περισσότερα από 1 δις αντίγραφα του αρχικού μορίου.
- Ο πολλαπλασιασμός είναι εκθετικός 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης.

PCR

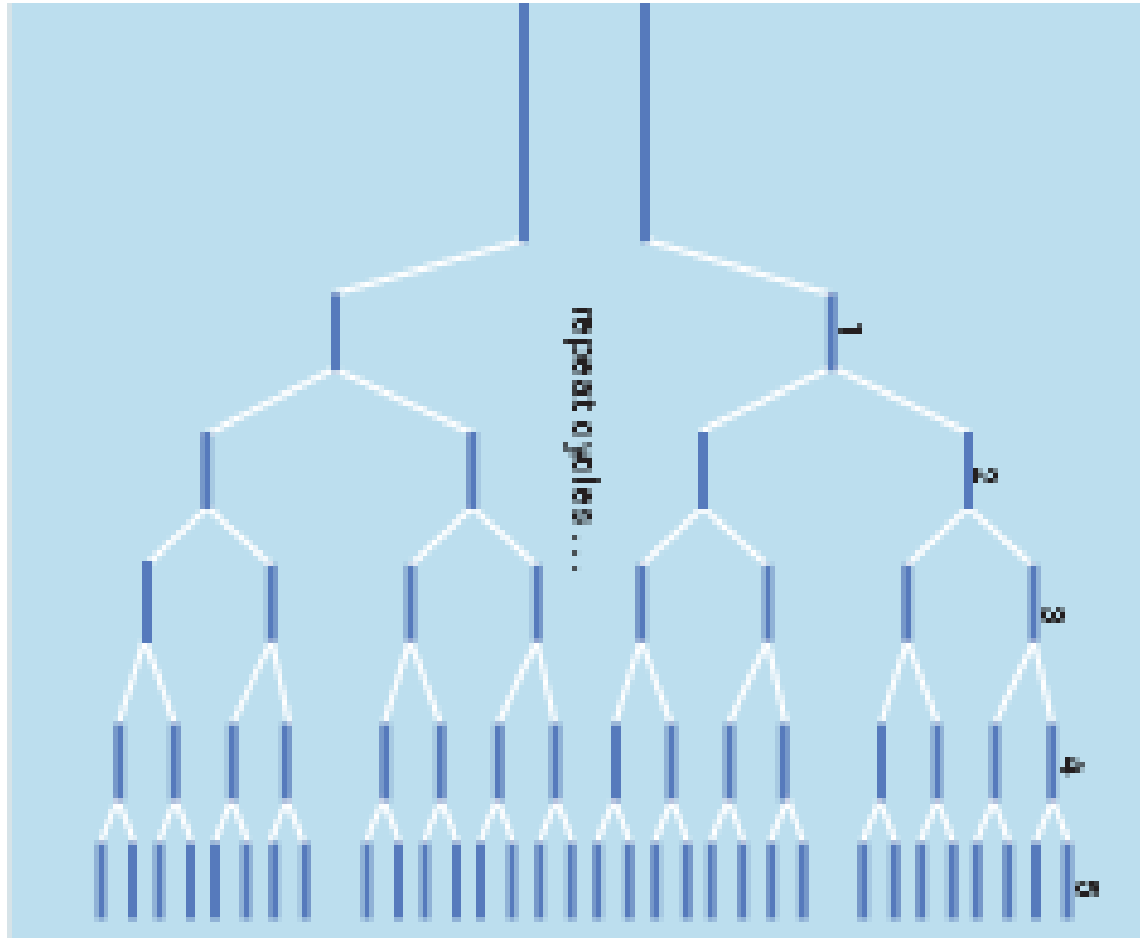
(B)



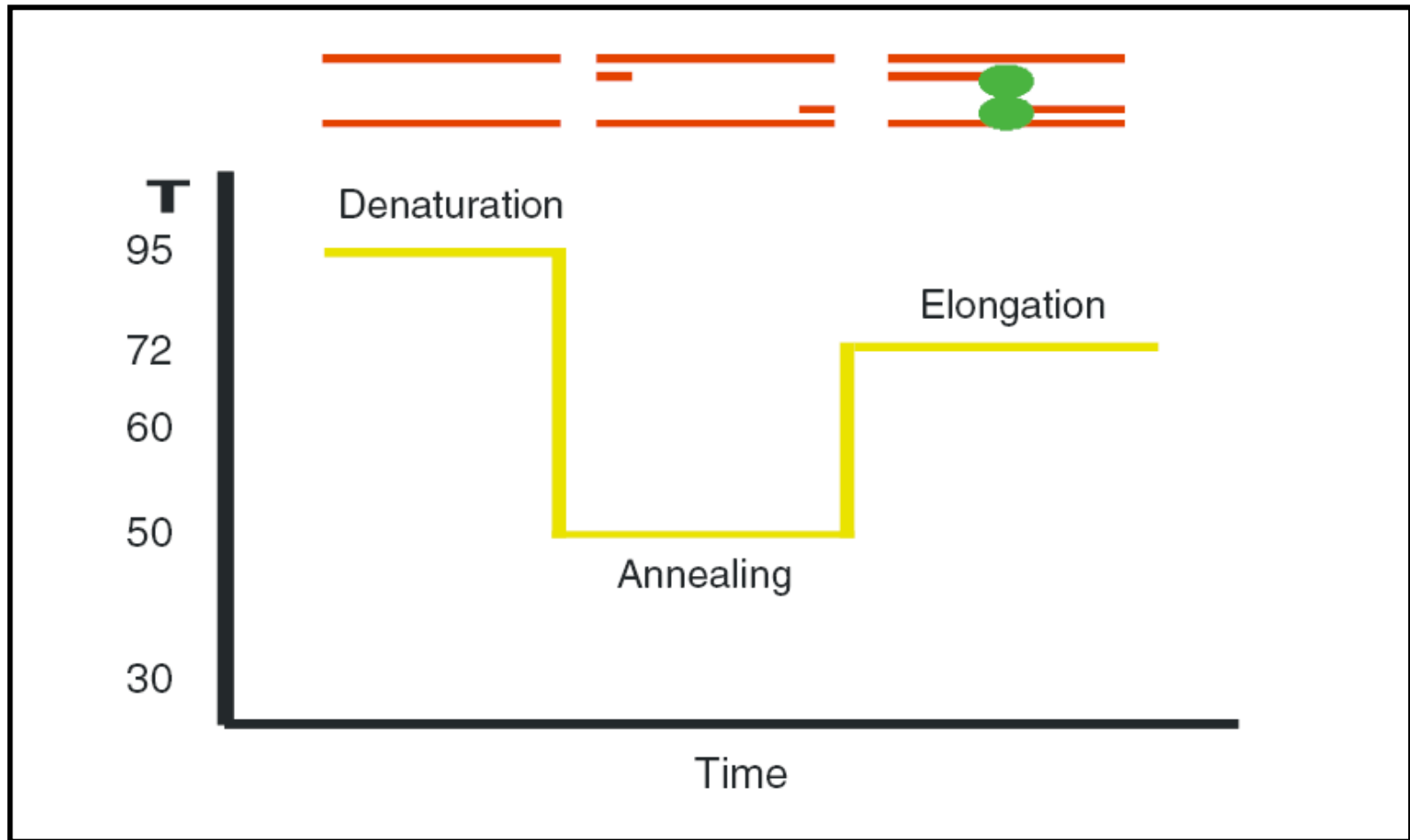
PCR



PCR



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



Μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα:

- H_2O
- Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer)
- $MgCl_2$
- Εκκινητές
- dNTPs
- Taq Polymerase
- DNA στόχος (δείγμα)

Το μείγμα μοιράζεται σε 3 σωληνάκια:

Δείγμα



Θετικός μάρτυρας
(positive control)



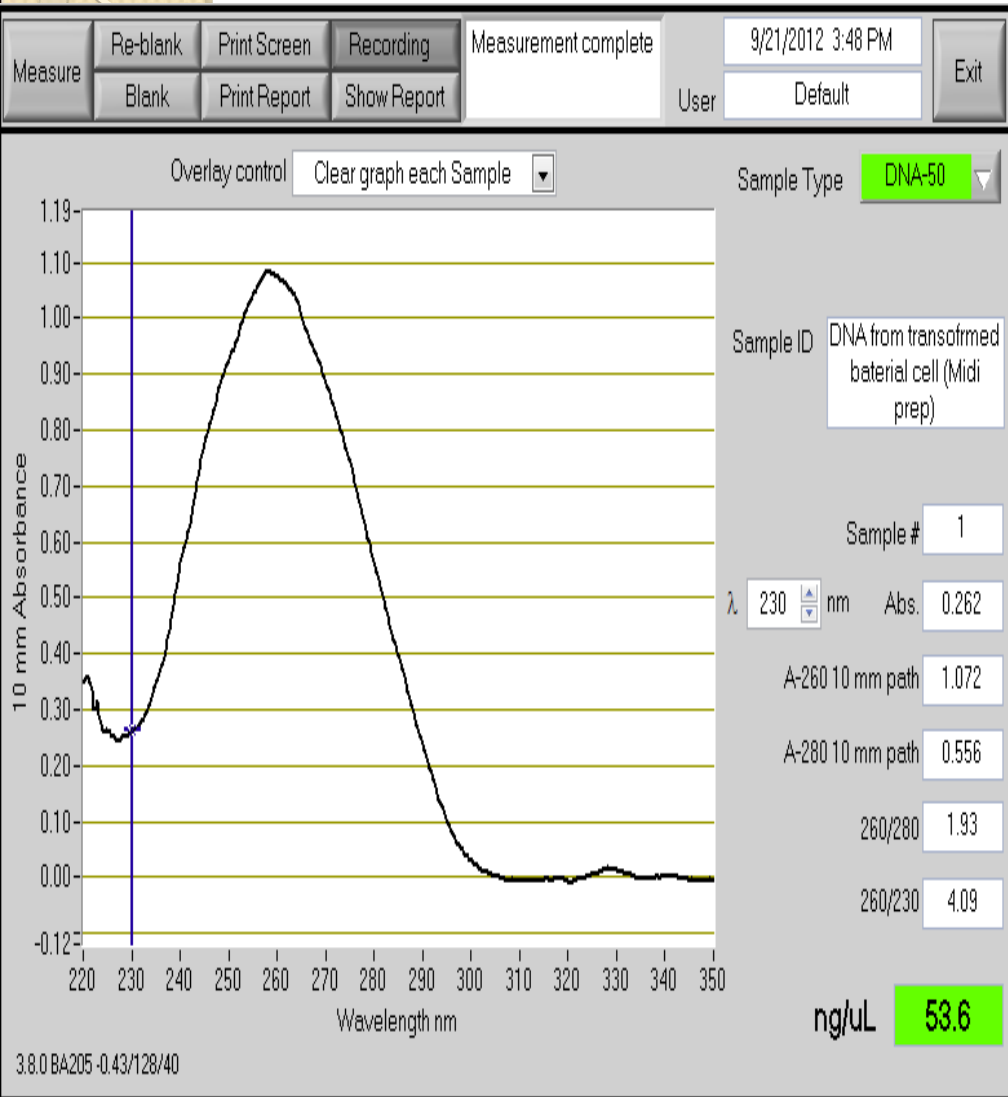
Αρνητικός μάρτυρας
(negative control)



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

Φασματοφωτόμετρο



- Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA
- Έλεγχος της καθαρότητάς του



Ηλεκτροφόρηση μετά την Απομόνωση DNA

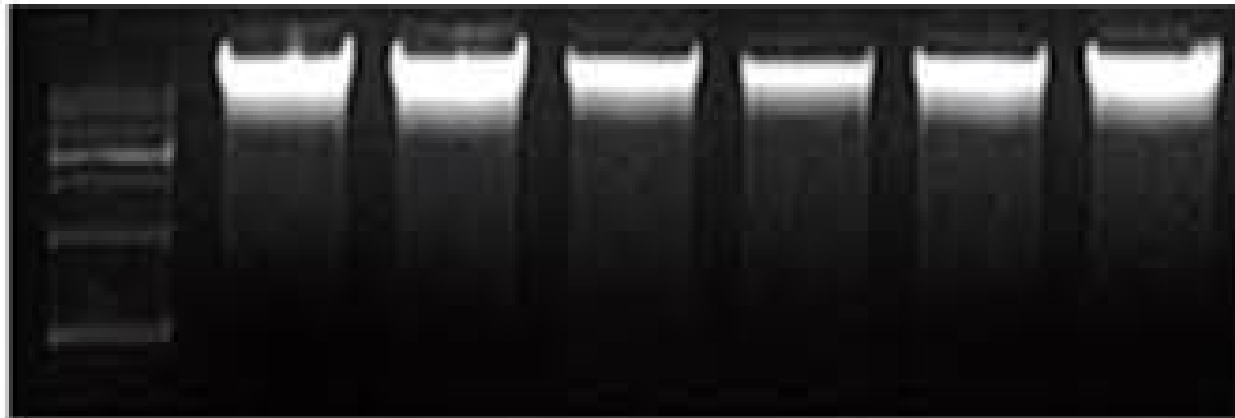


Fig 1. Genomic DNA was purified from 300 μ l of whole blood using the WizPrep™ DNA Extraction Kit (Blood). 7 μ l of the eluate (elution volume 100 μ l) were analyzed on a 1.5% agarose gel. Marker : 1kb DNA ladder.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

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

Κυριότερες παραλλαγές της PCR

- Τουλάχιστον 37 παραλλαγές τη PCR

1. Ασύμμετρη PCR
2. Nested PCR
3. Multiplex PCR
4. Reverse Transcription PCR (RT-PCR)
5. Real Time PCR

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)

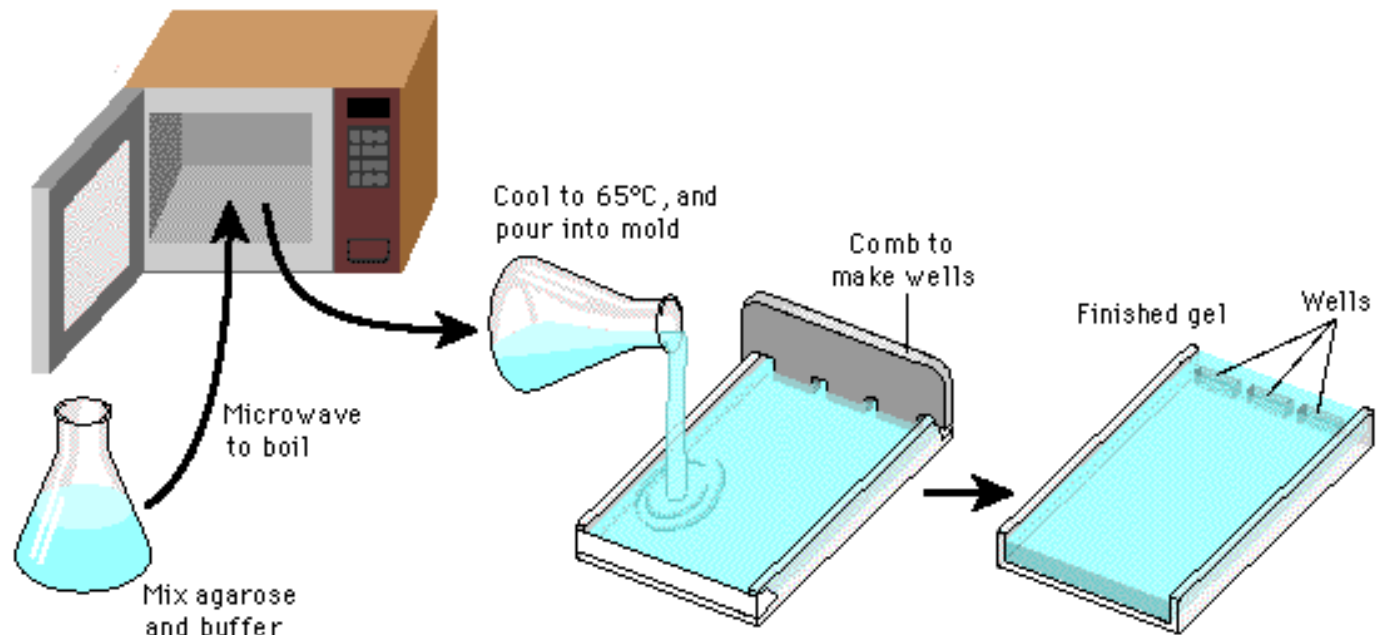
Ηλεκτροφόρηση

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

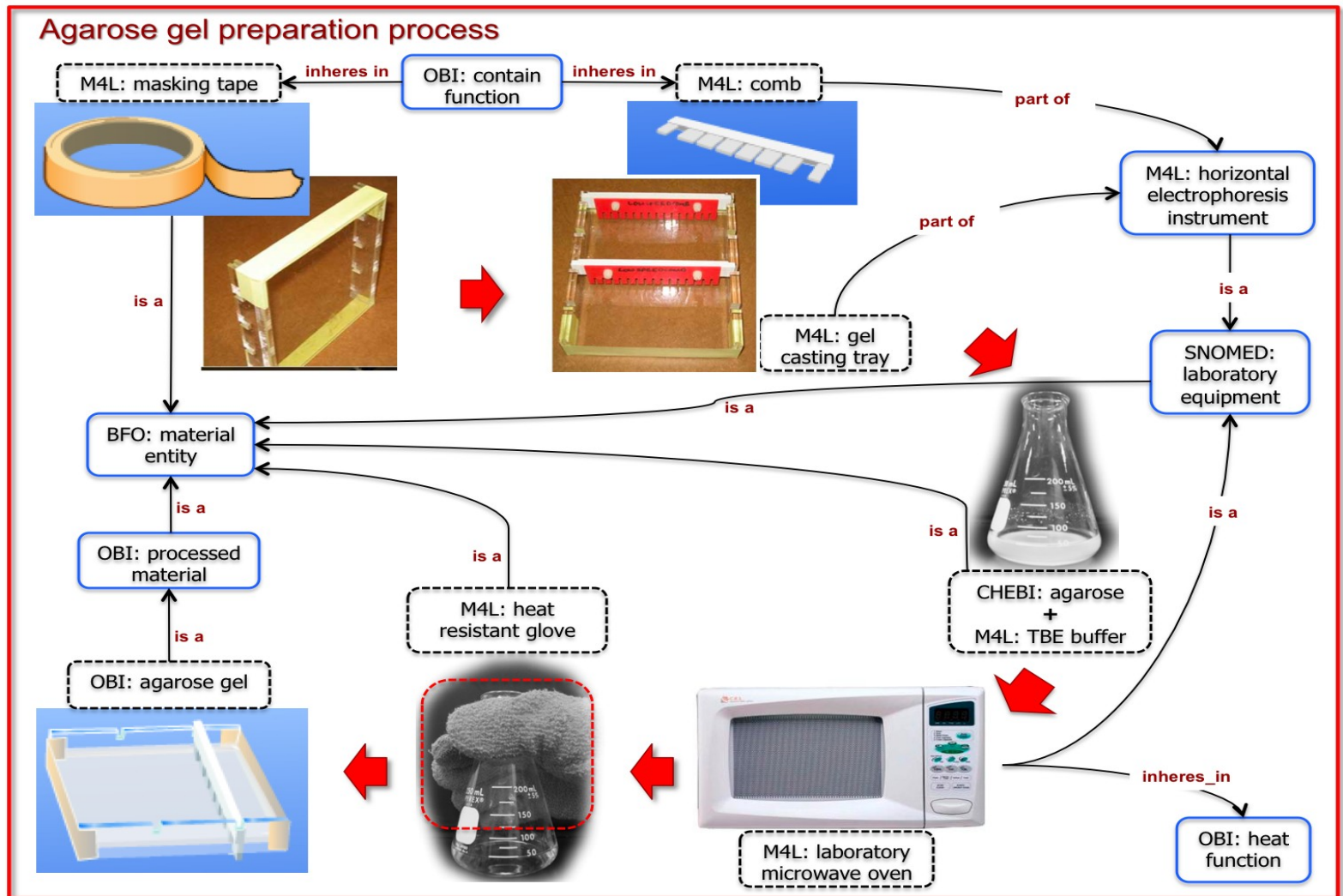
Εφαρμογές:

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

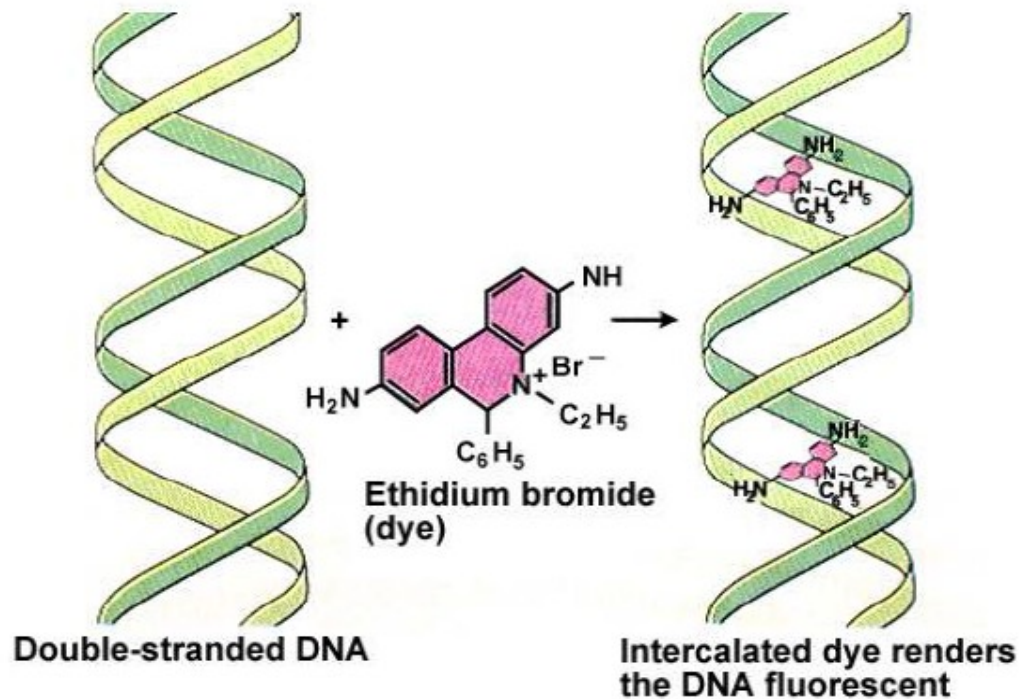
Πήκτωμα Αγαρόζης



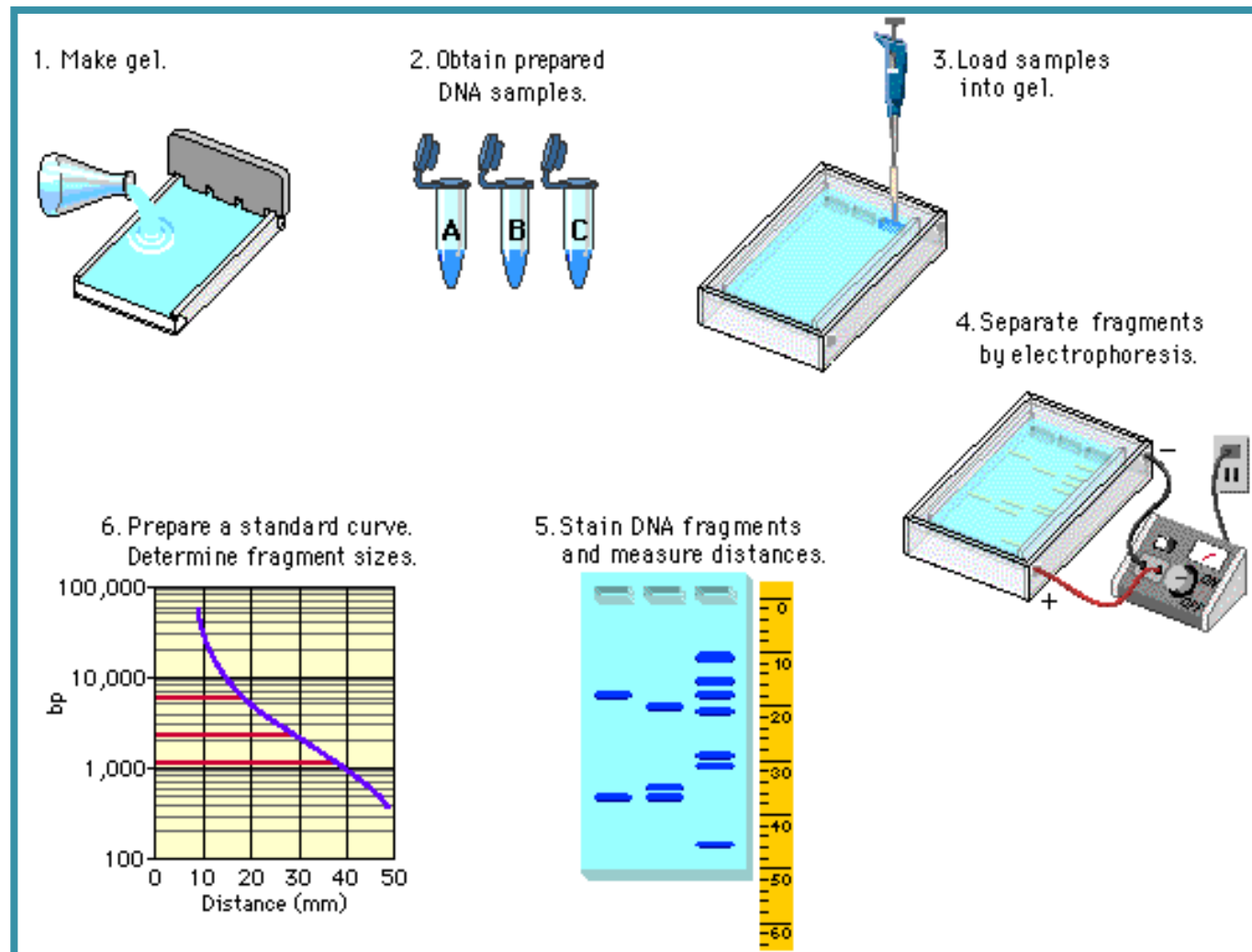
Electrophoresis = Ηλεκτροφόρηση



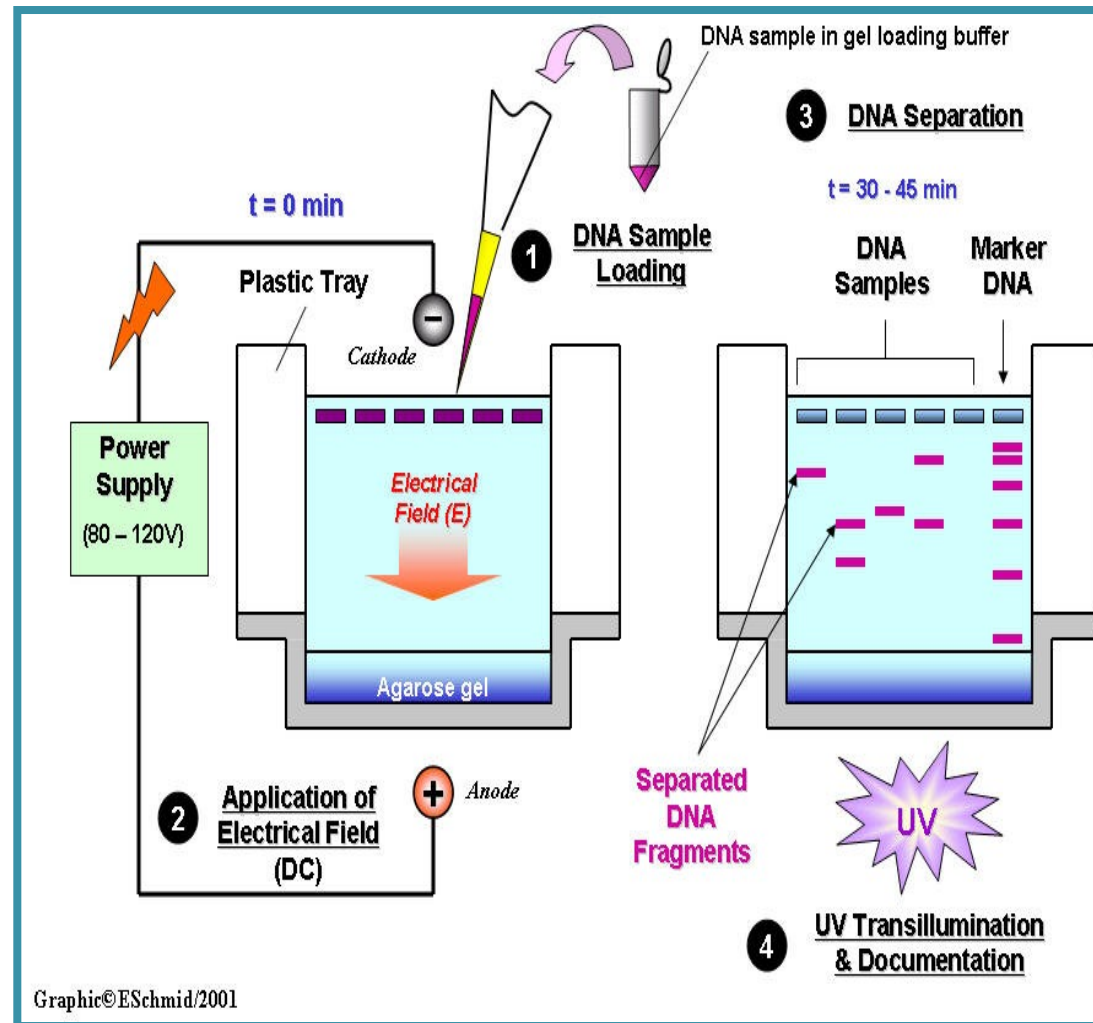
Βρωμιούχο Αιθίδιο [EtBr]



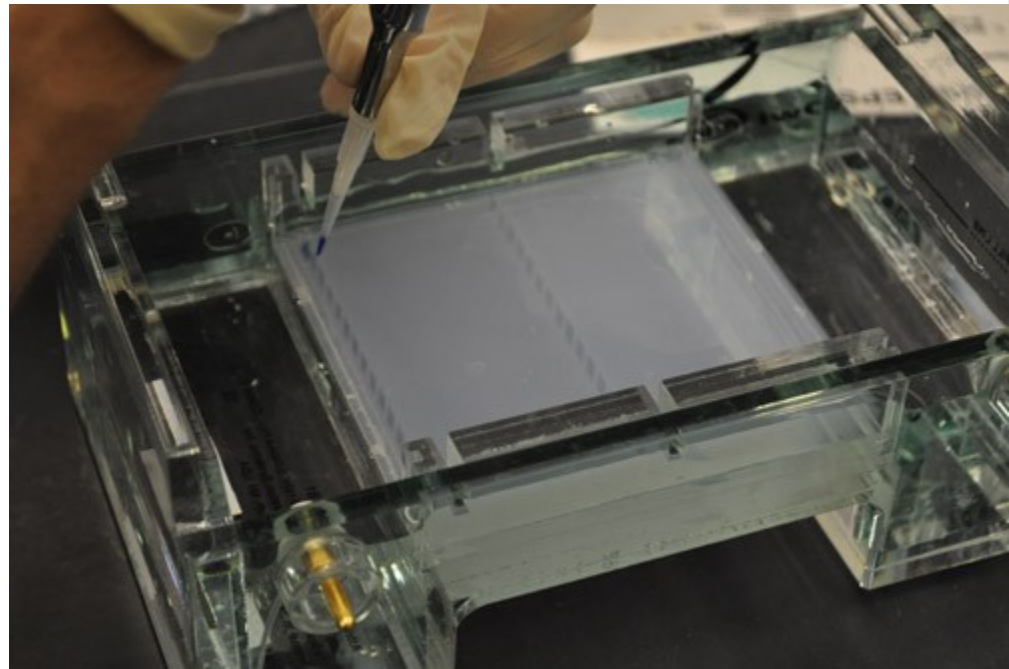
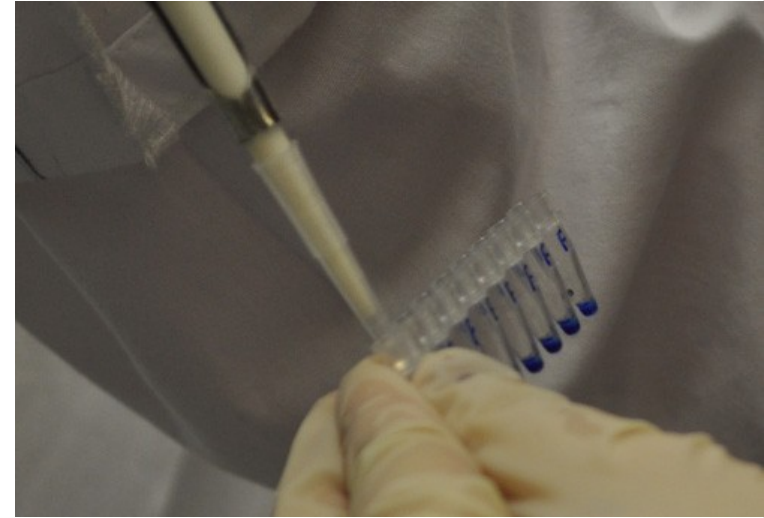
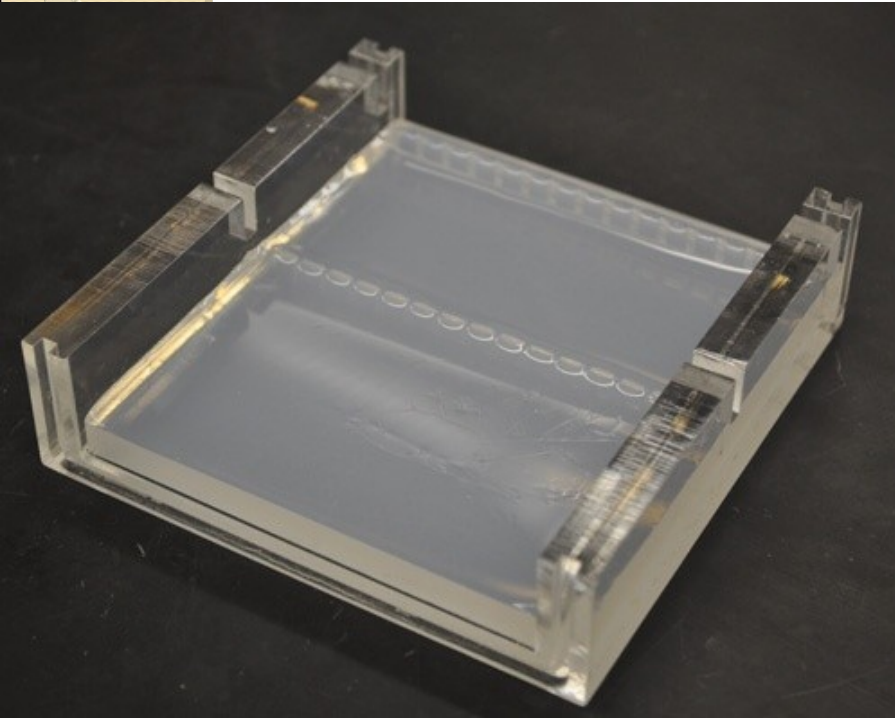
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης



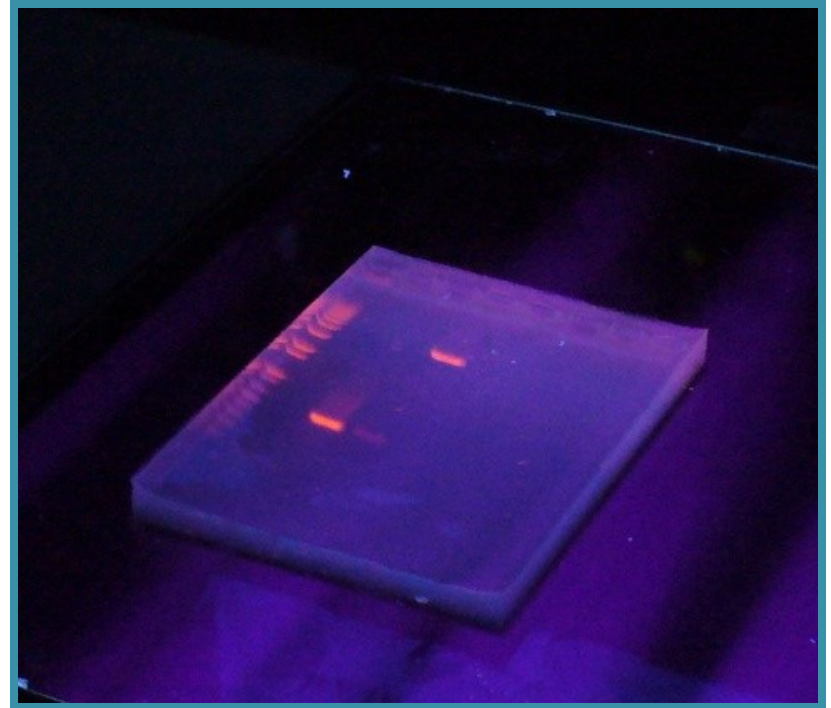
Ηλεκτροφόρηση



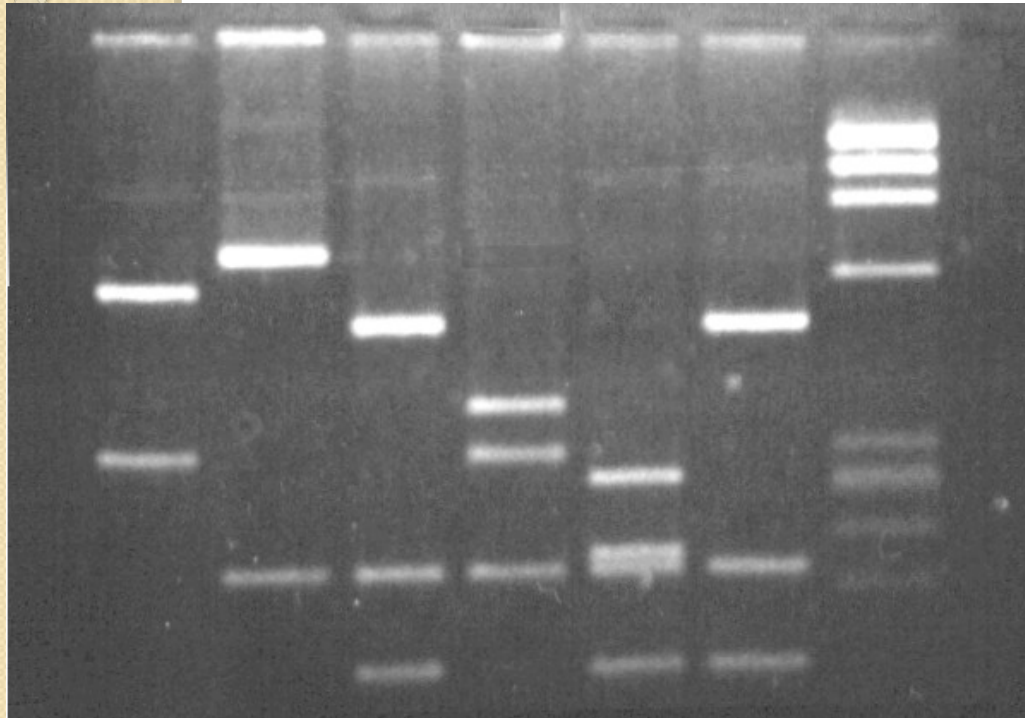
Ηλεκτροφόρηση



Χωρίς UV και με UV



Ηλεκτροφόρηση



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].

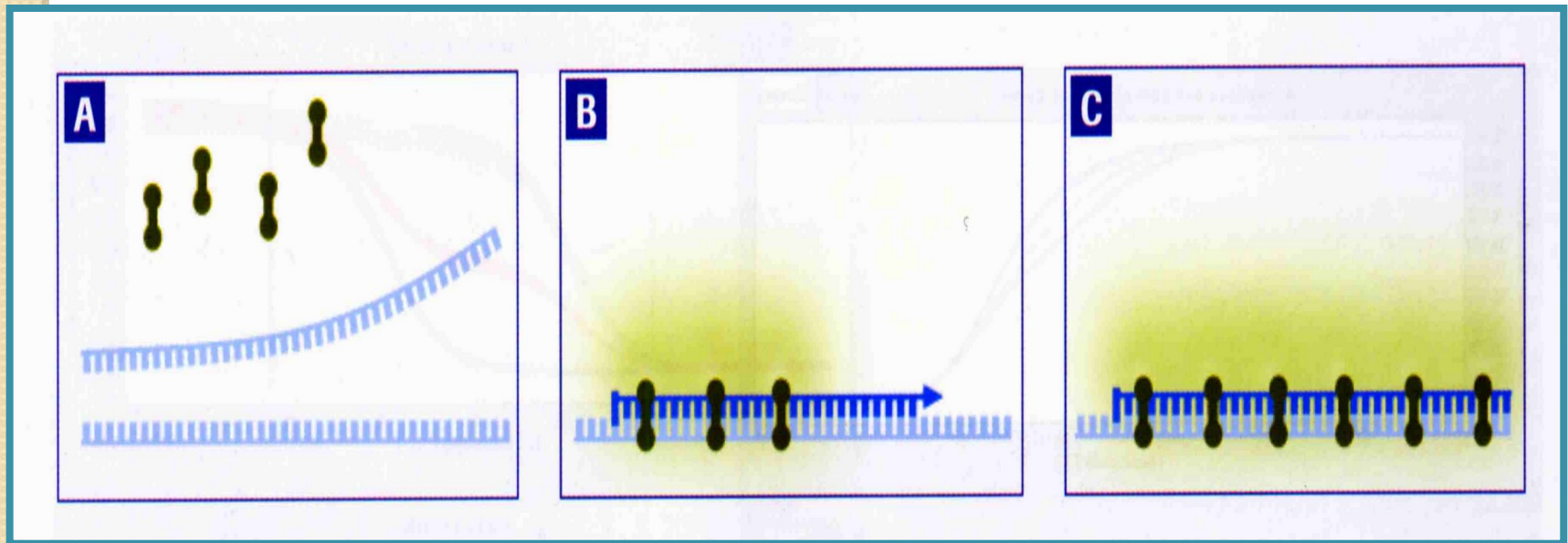
- Relative Quantification

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.

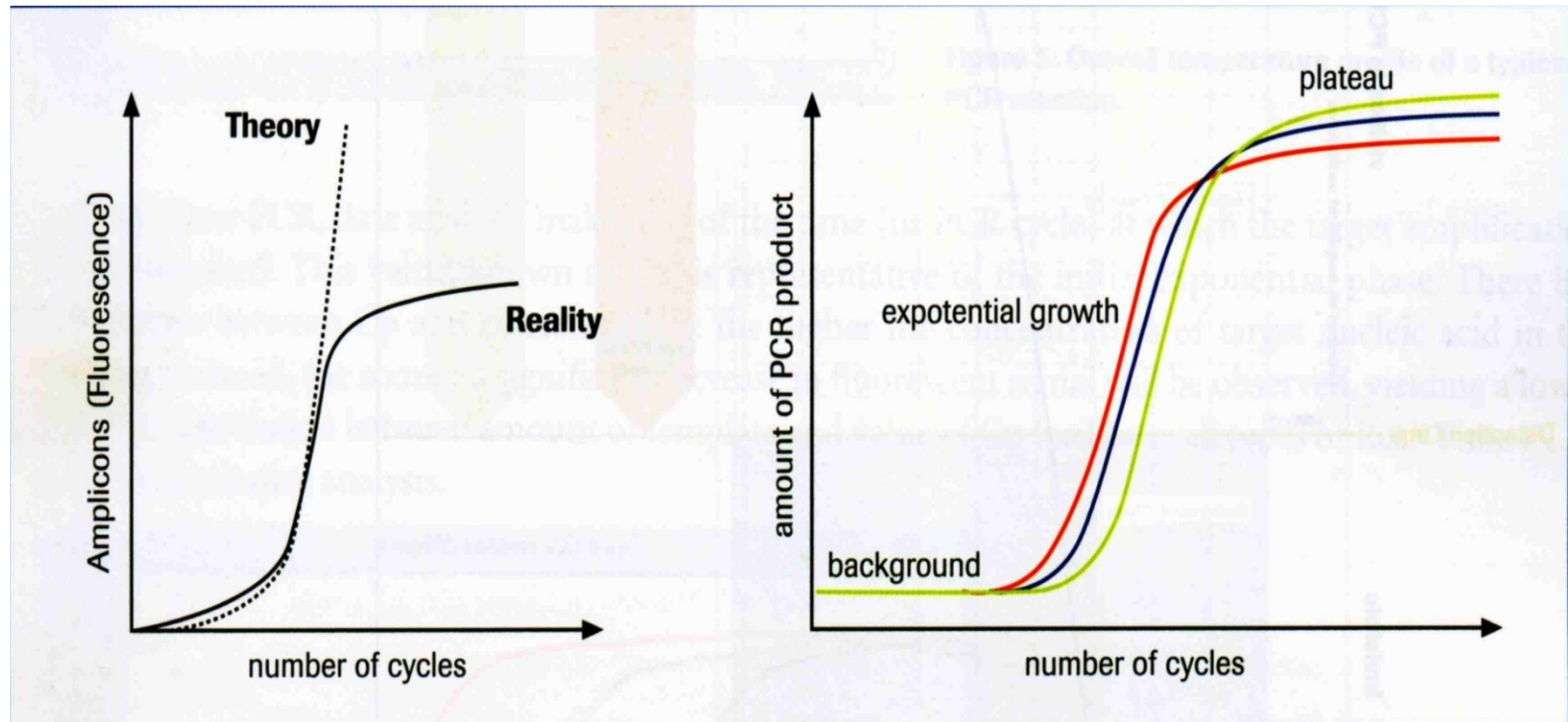
Συστήματα Ανίχνευσης στην Real Time PCR

- Ειδικές χρωστικές για dsDNA – SYBR Green
- Ζεύγος ανιχνευτών υβριδισμού – Dual Hybridization Probes
- Ανιχνευτές υδρόλυσης – Hydrolysis Probes
- Μοριακοί φάροι – Molecular beacons
- Ανιχνευτές τύπου «Σκορπιός» - Scorpions

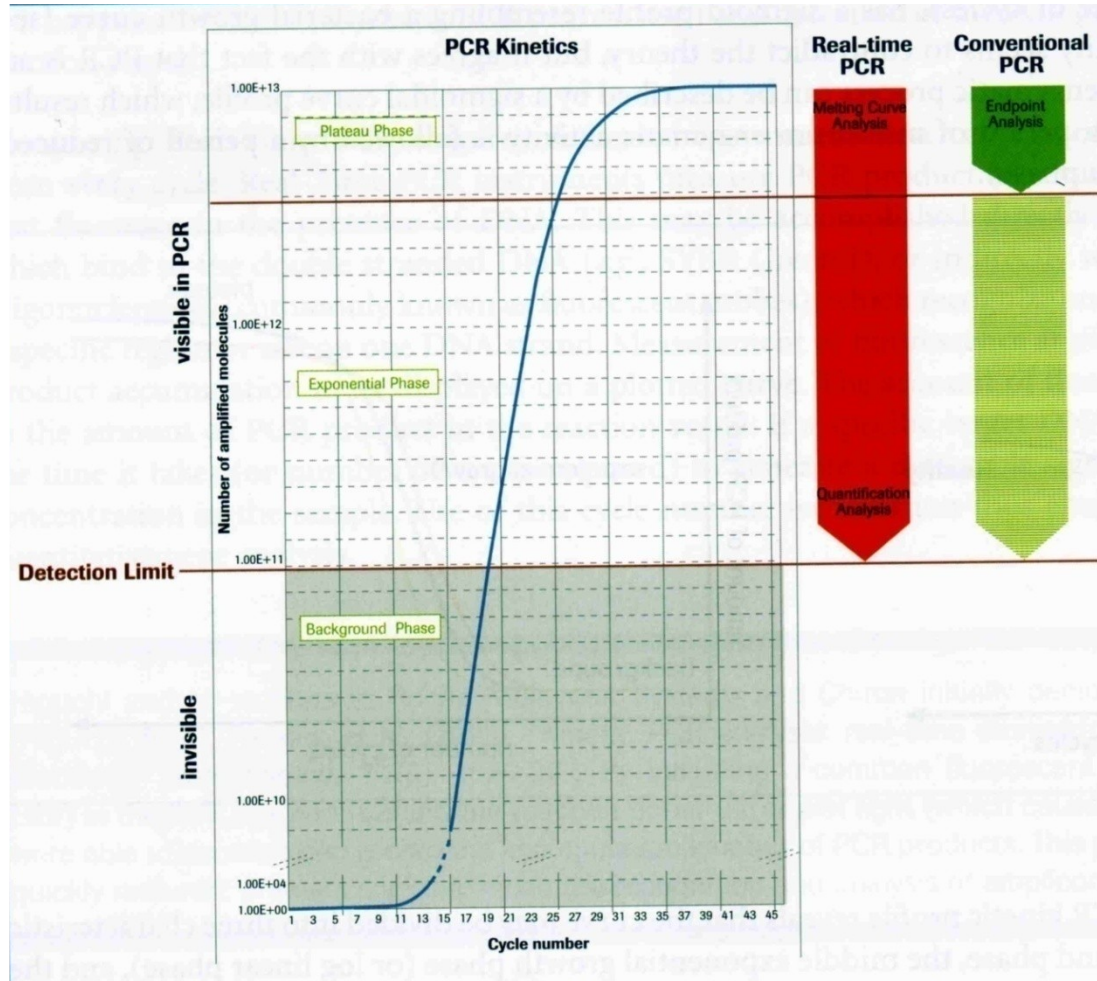
Real Time PCR: SYBR Green



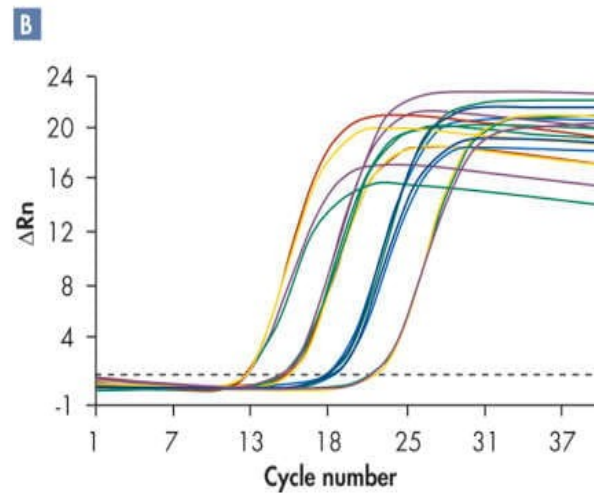
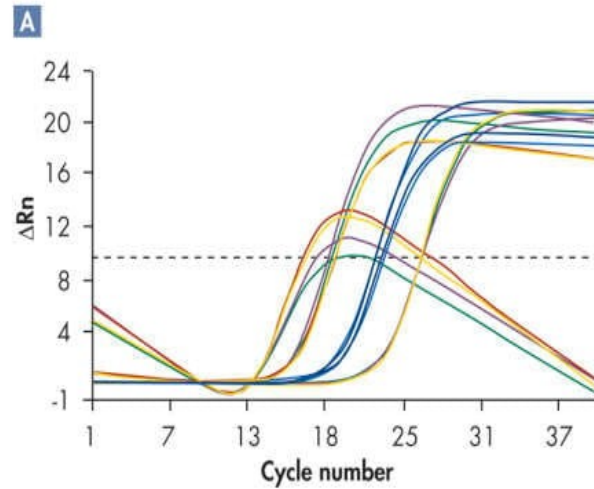
Real Time PCR



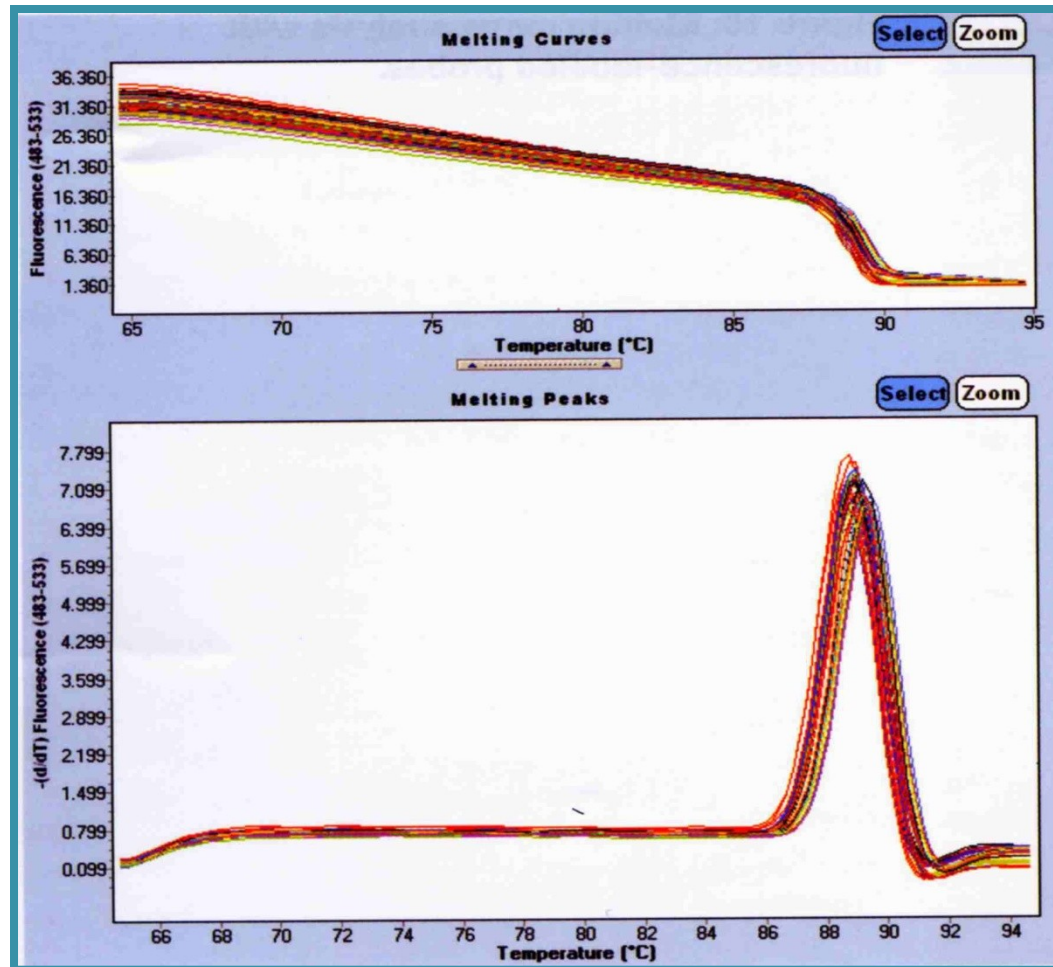
Real Time PCR



Real Time PCR



Real Time PCR: Melting Curve



Real Time PCR: Melting Curve

- Melting curve = καμπύλη τήξης
- Δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας από τους φθορισμούς που οφείλονται σε διμερή εκκινητών.
- Μετράται ο φθορισμός που εκπέμπεται, καθώς τα προϊόντα της αντίδρασης θερμαίνονται από θερμοκρασία χαμηλότερη του σημείου τήξης τους μέχρι θερμοκρασία μεγαλύτερη αυτού και αποδιατάσσονται.

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

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/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>



The end ... or begin ...

Ευχαριστώ

Καλή Εβδομάδα