

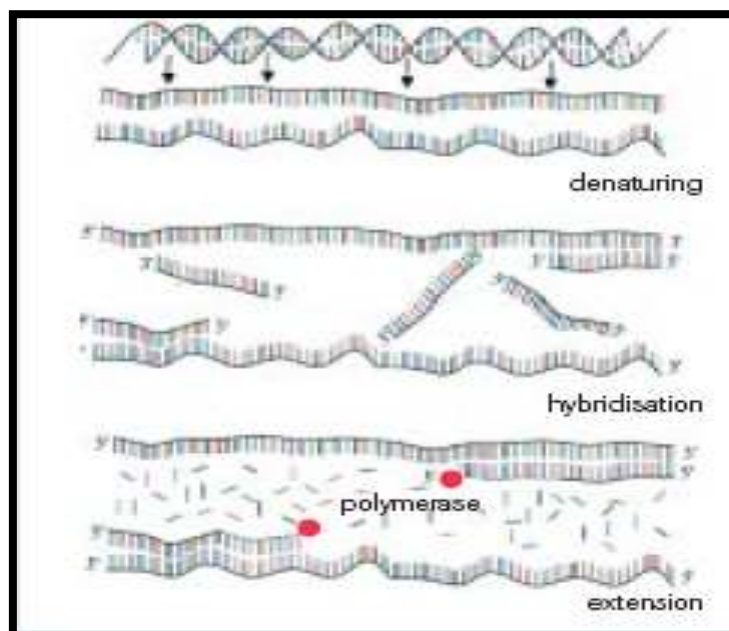
Εργαστηριακή Άσκηση:

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (**Polymerase Chain Reaction = PCR**) επιτρέπει σε μία ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων να αντιγραφεί σε μεγάλες ποσότητες γρήγορα και εκλεκτικά από οποιοδήποτε δείγμα DNA την περιέχει.

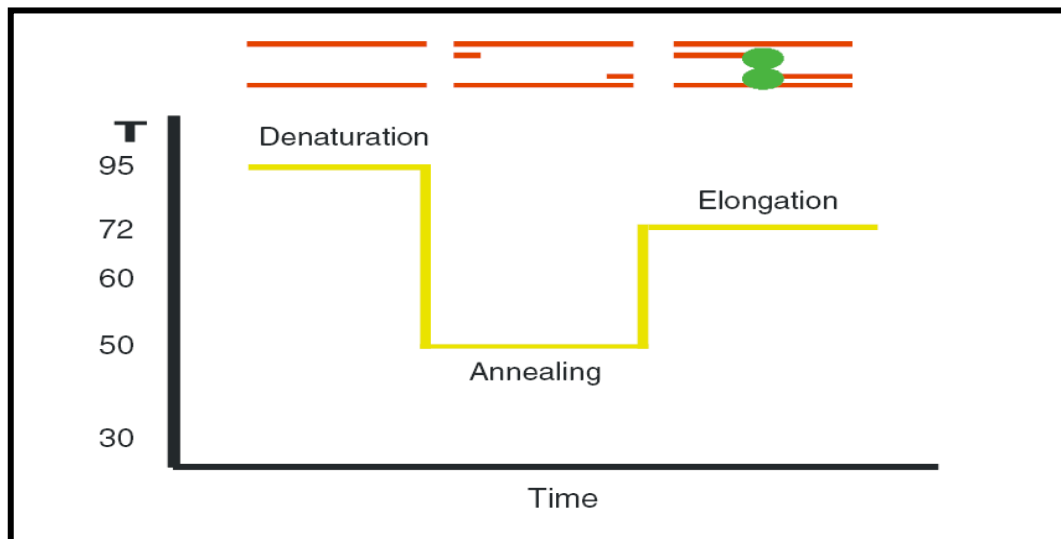
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτυγχάνεται με την επανάληψη τριών σταδίων:

1. **Αποδιάταξη** (Denaturation): Στο στάδιο αυτό το δίκλωνο μόριο του DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο έπειτα από θέρμανση στους 90 - 95°C.
2. **Υβριδισμός** (Annealing): Η θερμοκρασία του μείγματος ελαττώνεται (40 - 66°C) έτσι ώστε οι εκκινητές που βρίσκονται σε περίσσεια να μπορούν να ενωθούν με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δυο κλώνους του DNA.
3. **Σύνθεση** (Extension, Elongation): Σύνθεση των νέων αλυσίδων με επιμήκυνση των εκκινητών από το ένζυμο Taq πολυμεράση η οποία προσδένει τα ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) συμπληρωματικά ως προς την αρχική αλυσίδα σχηματίζοντας δύο νέα δίκλινα μόρια DNA. Η θερμοκρασία είναι στους 70 έως 75° C.



Τα τρία στάδια διαφέρουν μεταξύ τους σε θερμοκρασία και σε χρόνο και επαναλαμβάνονται διαδοχικά. Η ολοκλήρωση των τριών σταδίων αποκαλείται κύκλος και συνήθως μια αντίδραση περιλαμβάνει 20 – 40 κύκλους.

Ο κάθε κύκλος πολλαπλασιάζει την ποσότητα DNA που έχει συντεθεί στον προηγούμενο κύκλο. Δηλαδή, το αρχικό μόριο του DNA αντιγράφεται σε δύο θυγατρικά. Έπειτα από 30 κύκλους παράγονται περισσότερα από 1 δισεκατομμύριο αντίγραφα του αρχικού μορίου. Ο πολλαπλασιασμός είναι εκθετικός, 2^n όπου $n = 0$ αριθμός των κύκλων επανάληψης της αντίδρασης δηλ. $2^{30} = 1,073,741,764$.



Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης απαιτούνται:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer):** Ένα χημικό σύστημα που προλαμβάνει μεταβολές στη συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου. Ένα φυσικό ή φυσιολογικό σύστημα που τείνει να διατηρεί τη σταθερότητα.
- **Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs):** Χρησιμοποιούνται για την σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων.
- **Κατάλληλη συγκέντρωση $MgCl_2$:** Τα ιόντα του Mg^{+2} λειτουργούν ως συμπαραγοντας για την DNA πολυμεράση.
- **Εκκινητές (primers):** Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (15 – 30 βάσεις) συμπληρωματικών προς τα άκρα της αλληλουχίας-στόχου.

- **Ταq πολυμεράση:** Η πολυμεράση αυτή δεν μετουσιώνεται με τη θέρμανση αλλά η δράση της παραμένει σταθερή ως και τους 95° C ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας της είναι υψηλή. Απομονώνεται από ένα θερμόφιλο βακτήριο, *Thermus aquaticus*, το οποίο είναι σταθερό σε πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες από ότι οι ευκαρυωτικές πολυμεράσες.

Ενδονουκλεάσες Περιορισμού

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού (restriction endonucleases) είναι ένζυμα που κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Προέρχονται κυρίως από βακτήρια. Υπάρχουν τρεις τύποι ενζύμων περιορισμού: τύπου I, II, και III.

Μόνο τα ένζυμα τύπου II είναι τα κλασσικά πειραματικά εργαλεία. Έχουν πολύ ειδικές θέσεις αναγνώρισης και κοπής. Οι θέσεις αναγνώρισης είναι βραχείες (4-8 νουκλεοτίδια) και συνήθως παλίνδρομες επαναλήψεις.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Πρόκειται για μια μέθοδο που στηρίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μακρομόρια όπως το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος τους καθώς είναι ηλεκτρικά φορτισμένα. Επομένως, όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται από το λόγο του ηλεκτρικού πεδίου προς τη μάζα τους.

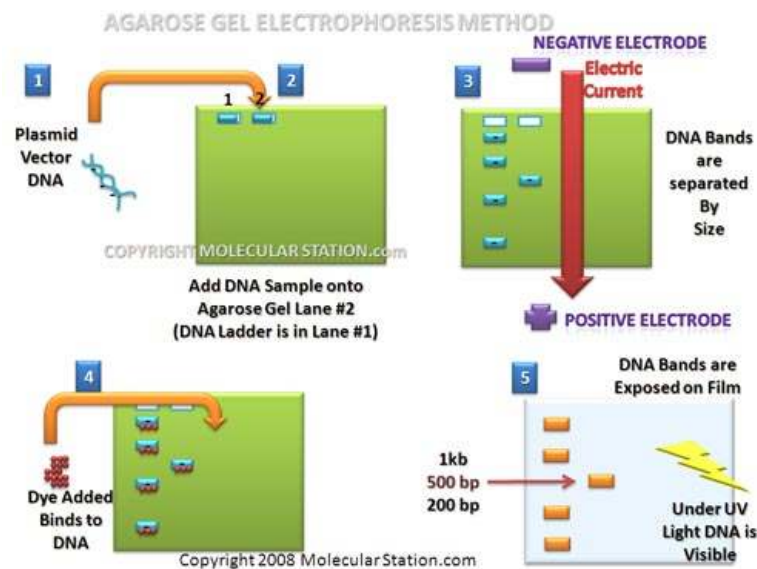
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης. Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης.

Η πηκτή φέρει στο εσωτερικό της πόρους των οποίων το μέγεθος εξαρτάται άμεσα από την συγκέντρωση της αγαρόζης. Όσο μικρότερη η περιεκτικότητα σε αγαρόζη τόσο μεγαλύτερο το μέγεθος των πόρων του σχηματιζόμενου πλέγματος.

Συγκεκριμένα, το προς ανάλυση δείγμα τοποθετείται στην πηκτή αγαρόζης μέσα σε ειδικά διαμορφωμένες οπές που αποκαλούνται κελιά ή πηγάδια ή κανάλια. Η πηκτή εμβαπτίζεται σε κατάλληλο διάλυμα και στα άκρα εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του

DNA μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο διασχίζοντας την πορώδη πηκτή. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται εξαρτάται από το μέγεθος τους, με τα μικρότερα τμήματα να μετακινούνται πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης τα διάφορα κλάσματα του DNA έχουν διανύσει διαφορετικές αποστάσεις μέσα στην πηκτή οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες με το μέγεθός τους. Προκειμένου να γίνει ορατό το DNA, κατά την κατασκευή της πηκτής προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), μία χρωστική η οποία συνδέεται στο δίκλωνο DNA. Όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία, το DNA στο οποίο έχει προσκολληθεί το βρωμιούχο αιθίδιο και εισχωρήσει ανάμεσα σε διαδοχικά νουκλεοτίδια, έχει την ιδιότητα να φθορίζει. Επομένως, οι ζώνες στις οποίες συγκεντρώνεται το DNA γίνονται ορατές όταν η πηκτή φωτιστεί με υπεριώδη ακτινοβολία.

Κατά την ηλεκτροφόρηση μαζί με τα προς μελέτη δείγματα συμπεριλαμβάνουμε και έναν μάρτυρα. Ο μάρτυρας αποτελείται από τμήματα DNA των οποίων γνωρίζουμε το μοριακό βάρος. Σύγκριση των ζωνών των προς μελέτη δειγμάτων με το μάρτυρα επιτρέπει τον υπολογισμό του μεγέθους των κλασμάτων του DNA καθώς όλα τα δείγματα του ίδιου μεγέθους μεταναστεύουν την ίδια απόσταση από την αφετηρία.



PCR για την μελέτη του πολυμορφισμού του γονιδίου Notch4 σε δείγματα ασθενών με Κοινή Ψωρίαση (Psoriasis vulgaris)

Πειραματική Διαδικασία

Θα χρησιμοποιήσουμε τη μέθοδο της PCR, πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για να ανιχνεύσουμε ένα γενετικό πολυμορφισμό στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Notch4. Πρόκειται για μία αντικατάσταση θυμίνης από κυτοσίνη (T/C) σε ρυθμιστική περιοχή κοντά στο 5' άκρο του γονιδίου Notch4 προκαλώντας τη δημιουργία θέσης αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση MspI. Το δείγμα μας προέρχεται από αίμα ασθενών με Κοινή Ψωρίαση (Psoriasis vulgaris).

Το γονίδιο Notch αποτελεί ένα από τα γονίδια που κρατούν ρόλους κλειδιά στην ανθρώπινη ανάπτυξη, συμμετέχοντας μεταξύ άλλων, στη διαφοροποίηση, στην οργανογένεση και την ανάπτυξη των ιστών. Η πρωτεΐνη που συντίθεται υπό τις οδηγίες του γονιδίου Notch συμμετέχει στην κυτταρική σηματοδότηση. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη Notch είναι διαμεμβρανική, διαπερνά δηλαδή τη μεμβράνη του κυττάρου και διαθέτει ένα μέρος της έξω από αυτό και ένα μέρος της στο εσωτερικό του κυττάρου. Όταν ένα μόριο – σήμα προσδένεται στο εξωκυττάριο τμήμα του Notch προκαλείται αλλαγή στη στερεοδιάταξη που έχει ως αποτέλεσμα την αποκοπή του εσωτερικού κομματιού της πρωτεΐνης, η οποία μεταφερόμενη στον πυρήνα δίνει εντολές για την έκφραση άλλων γονιδίων. Με άλλα λόγια, το γονίδιο Notch λειτουργεί ως ένας διακόπτης που «ανοιγοκλείνει» γονίδια σε συνάρτηση με τα ερεθίσματα που δέχεται. Στον άνθρωπο υπάρχουν 4 γονίδια και φυσικά οι 4 αντίστοιχες πρωτεΐνες που κωδικοποιούν αυτά.

Η ψωρίαση είναι μία χρόνια, κληρονομική, υποτροπιάζουσα δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από διακριτές, ζωηρά ερυθρές κηλίδες, βλατίδες ή πλάκες καλυπτόμενες από αργυρόχρωα λέπια. Στη χρόνια αυτή φλεγμονώδη νόσο σημαντικό ρόλο παίζουν περιβαλλοντικοί, γενετικοί και ανοσολογικοί παράγοντες.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

1. Ετοιμάζουμε ένα μείγμα για 3,5 δείγματα σε ένα σωληνάκι. (Ένα το προς εξέταση δείγμα, ένα για το αρνητικό control, ένα για το θετικό μάρτυρα και μισό παραπάνω) Όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να βρίσκονται συνέχεια μέσα στον πάγο.
2. Υπολογίζουμε τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που θα χρειαστεί να τοποθετήσουμε στο μείγμα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Ποσότητα για ένα δείγμα (μl)</u>	<u>Ποσότητες για 3.5 δείγματα (x3.5)(μl)</u>
H ₂ O	9,7	33,95
5X Buffer	5	15,5
DMSO	2,5	8,75
dNTPs	2,5	8,75
MgCl ₂	1,8	6,3
Primer Forward	1	3,5
Primer Reverse	1	3,5
Taq Polymerase	0,5	1,75
Τελικός όγκος μείγματος	24	84
Τελικός όγκος μείγματος ανά σωληνάκι		84:3,5 = 24 μl

3. Αναδεύουμε το δείγμα με τη βοήθεια της συσκευής ανατάραξης (vortex) και εν συνεχεία προχωρούμε σε μία σύντομη φυγοκέντρωση.
4. Σε τρία καθαρά σωληνάκια (ένα για κάθε δείγμα), τοποθετούμε 24 μ l μείγματος. Στο υπό εξέταση δείγμα καθώς και στο θετικό μάρτυρα τοποθετούμε από 1 μ l DNA. Στο σωληνάκι με τον αρνητικό μάρτυρα προσθέτουμε 1 μ l νερό.

5. Ανοίγουμε το θερμικό κυκλοποιητή και επιλέγουμε το επιθυμητό πρόγραμμα. Οι συνθήκες του προγράμματος αναγράφονται στο Πίνακα 2. Τοποθετούμε τα σωληνάκια στο μηχάνημα.

Πίνακας 2

<u>Βήματα</u>	<u>Θερμοκρασία</u>	<u>Ωρα</u>	<u>Κύκλος</u>
Αποδιάταξη	95°C	2 min	1
Αποδιάταξη	94°C	1 min	40
Υβριδισμός	55°C	30sec	
Επέκταση	68°C	1 min	
Επέκταση	72°C	10 min	1

Έλεγχος των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

1. Ζυγίζουμε την απαραίτητη ποσότητα αγαρόζης. Η περιεκτικότητα της συγκεκριμένης πηκτής πρέπει να είναι 1%. Επομένως, για 50 ml πηκτής χρειάζεται 0,5 gr αγαρόζης.
2. Σε μία κωνική φιάλη προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα 50 ml 1 x TBE και 0,5 gr αγαρόζης.
3. Βράζουμε το εναιώρημα αγαρόζης προσεκτικά μέχρι να διαλυθεί. Το διάλυμα γίνεται διαυγές.
4. Αφήνουμε το διάλυμα να επανέλθει στους 45° C ανακατεύοντας.
5. Προσθέτουμε 2ml βρωμιούχο αιθίδιο και ανακατεύουμε ελαφρά.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξιγόνο και χρειάζεται μεγάλη προσοχή τόσο κατά την παρασκευή του όσο και κατά τη χρησιμοποίησή του. Πάντα φοράμε γάντια και μετά το πείραμα πλένουμε καλά όλα τα σκεύη με νερό.

6. Ετοιμάζουμε το πιάτο της συσκευής. Τοποθετούμε τις χτένες και προσέχουμε να μην ακουμπούν στην κάτω επιφάνεια του πιάτου.
7. Αδειάζουμε το διάλυμα της αγαρόζης στο πιάτο της συσκευής.
8. Περιμένουμε μέχρι να πήξει η αγαρόζη.

9. Αφαιρούμε τα χτένια και τοποθετούμε την πηκτή στη συσκευή.
10. Γεμίζουμε με διάλυμα 1 x TBE μέχρι να καλυφθεί τελείως η πηκτή.
11. Φορτώνουμε τα δείγματα στην πηκτή. Για κάθε δείγμα: βάζω 5 μl από το αντίστοιχο προϊόν PCR, 1,5 μl 10x διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer) που περιέχει χρωστικές που μας βοηθούν να παρακολουθούμε την πορεία της ηλεκτροφόρησης.
12. Φορτώνω 2 μl από έναν δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (Ladder) που δίνει ζώνες γνωστού μεγέθους για να μας βοηθήσει να υπολογίσουμε το μοριακό βάρος των νουκλεϊκών οξέων που μελετάμε.
13. Συνδέουμε τα ηλεκτρόδια στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, ρυθμίζουμε την τάση στα 90 – 100 volts.
14. Παρατηρούμε την πηκτή στη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και ελέγχουμε την ποιότητα του DNA.

Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση MspI

1. Ετοιμάζω ένα μείγμα για τα προς εξέταση δείγματα σε ένα σωληνάκι (Στην προκείμενη περίπτωση για 3,5 δείγματα). Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να βρίσκονται στον πάγκο.
2. Υπολογίζουμε τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιήσουμε στο μείγμα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Ποσότητα για ένα δείγμα (μl)</u>	<u>Ποσότητα για 3,5 δείγματα (x3,5)(μl)</u>
10 X Buffer	2,5	8,75
MspI	1	3,5
ddH ₂ O	1,5	5,25
Τελικός όγκος μείγματος	5	17,5
Τελικός όγκος μείγματος ανά σωληνάκι		17,5 : 3,5 = 5 μl

3. Εκτελούμε μία γρήγορη φυγοκέντρωση.
4. Τοποθετούμε τα δείγματα στο υδατόλουτρο στους 37°C για τουλάχιστον 3 ώρες.

**Έλεγχος του αποτελέσματος της αντίδρασης με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή
αγαρόζης 2%.**

1. Ετοιμάζουμε πηκτή αγαρόζης 2%.
2. Σε κάθε δείγμα θα προσθέσουμε 3 μl 10x διάλυμα φόρτωσης.
3. Φορτώνουμε το δείγμα στα πηγαδάκια της πηκτής.
4. Ηλεκτροφόρηση στα 90 – 100 volt.
5. Αξιολόγηση της πηκτής και συνεπώς του αποτελέσματος της πέψης έπειτα από παρατήρηση της πηκτής στη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας.