

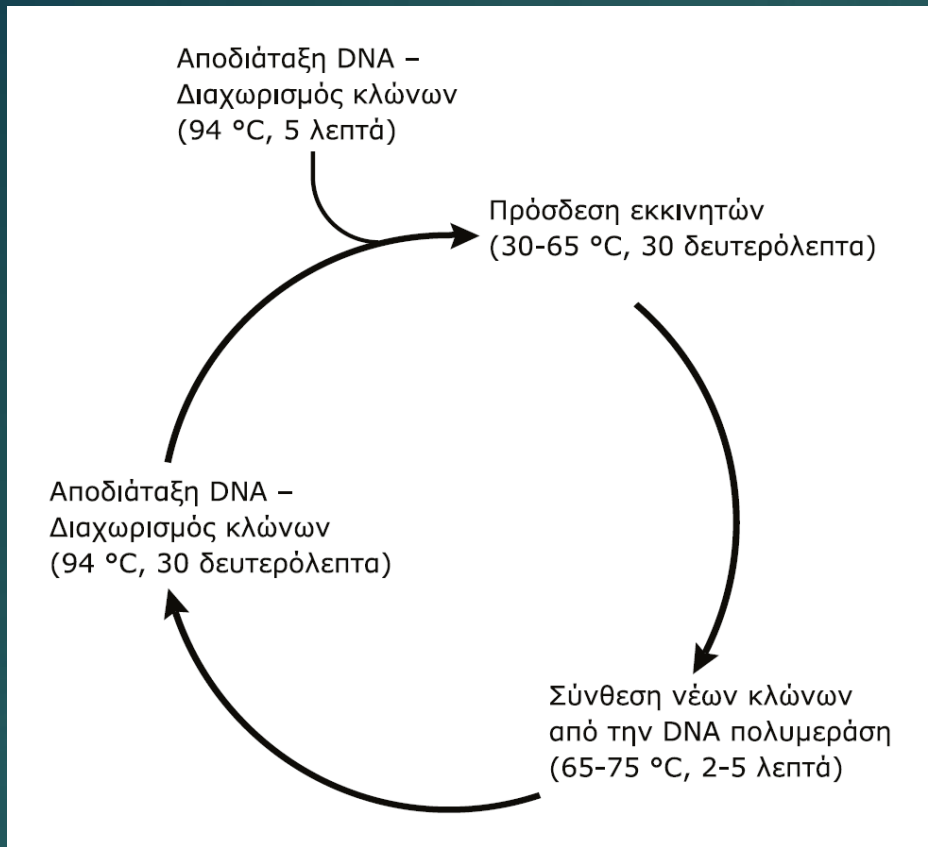
# Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πολλαπλασιάζει επιλεγμένες περιοχές ενός DNA-στόχου

## Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction) PCR

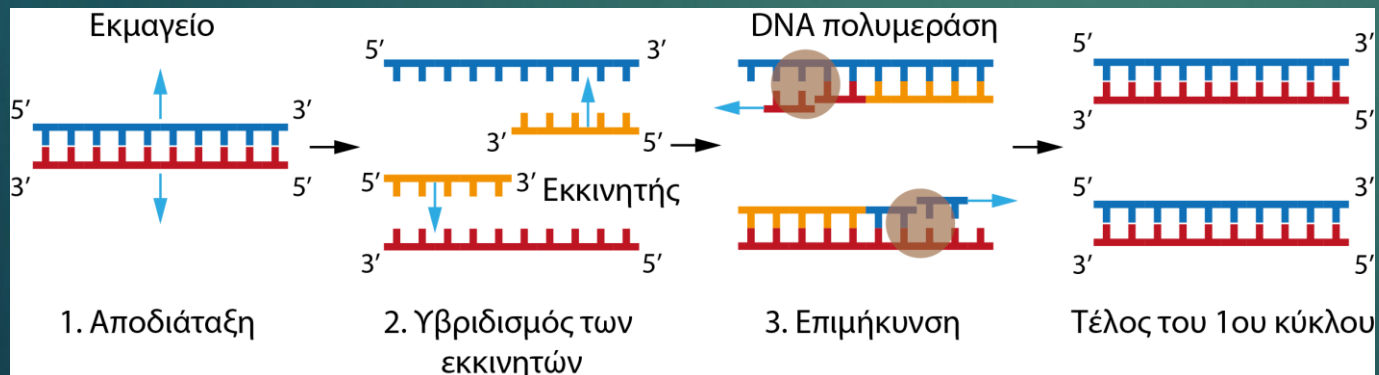
- in vitro μέθοδος για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA
- δίνει τη δυνατότητα απόκτησης μεγάλης ποσότητας DNA για ανάλυση
- in vitro μέθοδος κλωνοποίησης

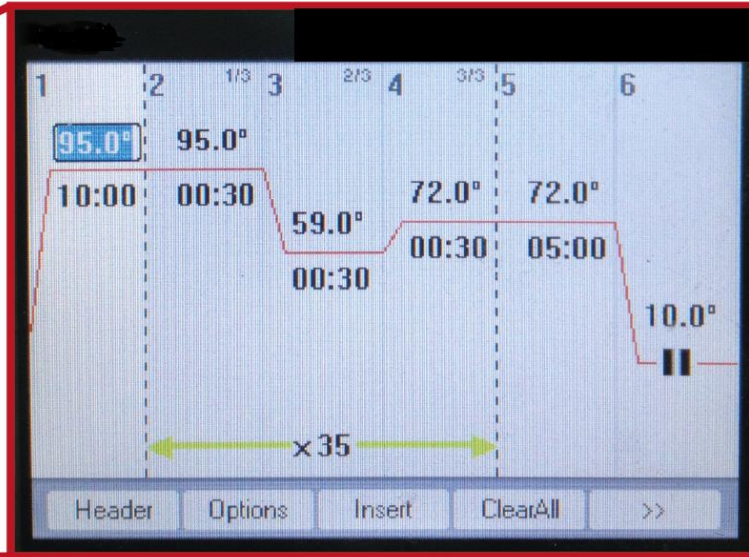
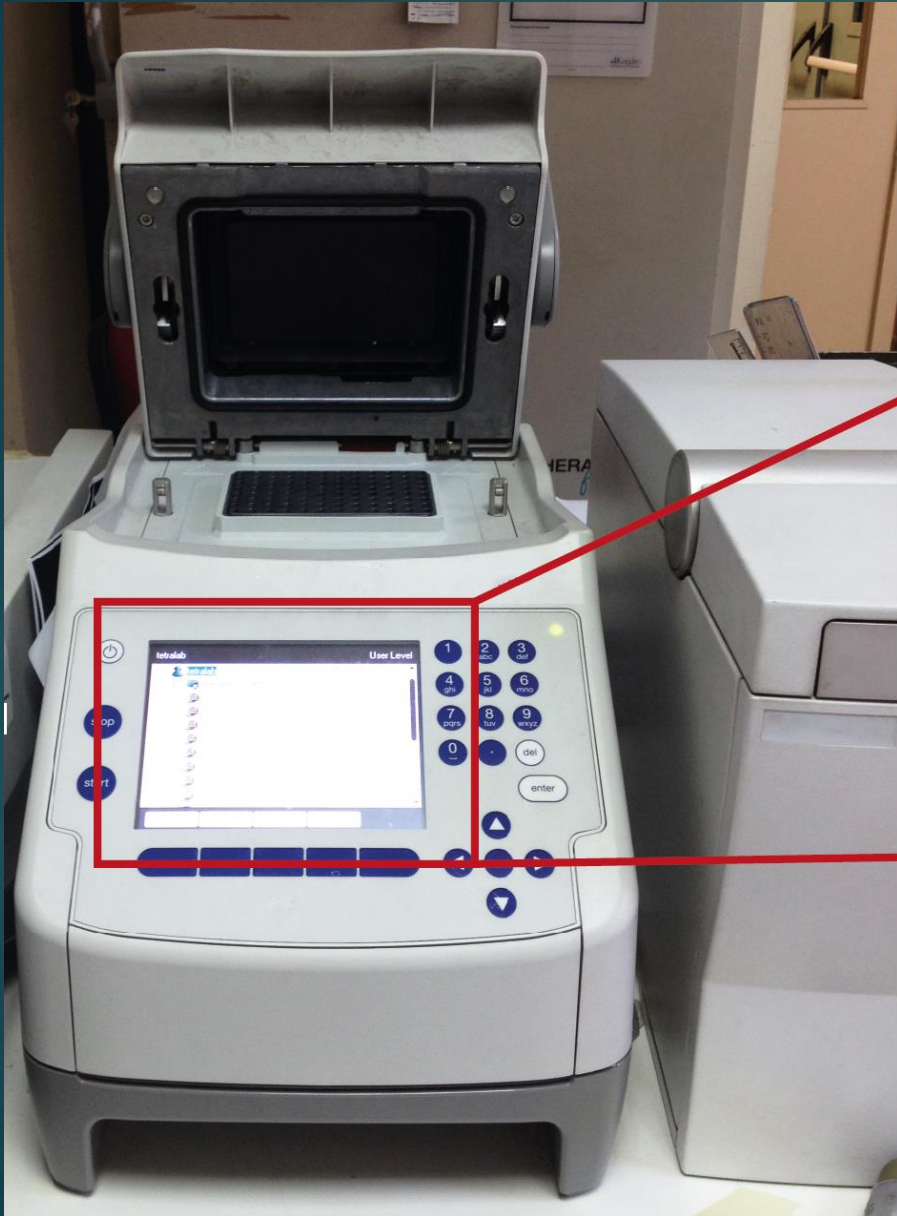
# Ιστορική αναδρομή

- 1983: σύλληψη της ιδέας, K. Mullis, Cetus Corporation
- 1985: πρώτη δημοσίευση, *Science* 1985, 230:1350-1354
- 1988: θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, *Science* 1988, 239:487-491
- 1988-σήμερα : Χιλιάδες άρθρα με εφαρμογές PCR
- 1989: το περιοδικό *Science* επέλεξε την PCR σαν το "μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα" και την Taq DNA πολυμεράση σαν το "μόριο της χρονιάς "
- 1993: βραβείο Nobel Χημείας στον K.Mullis

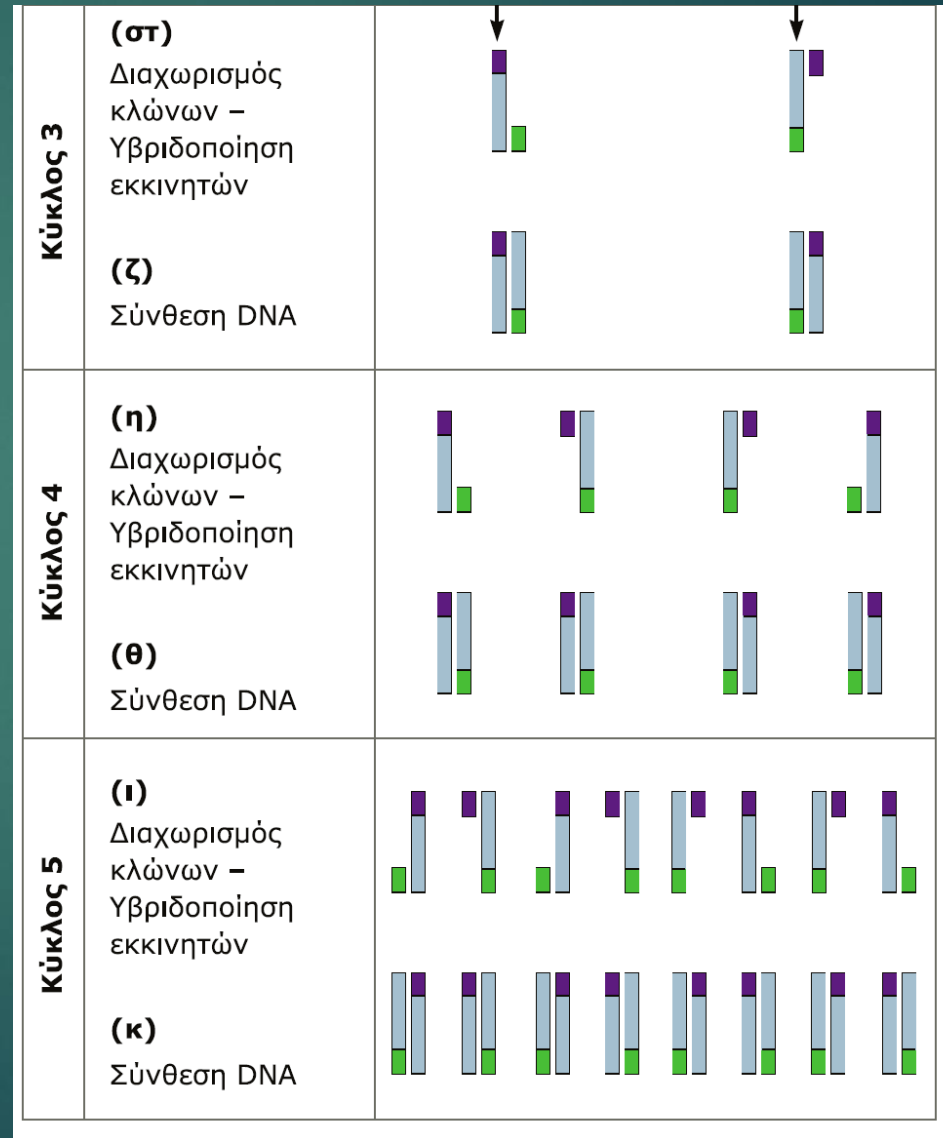
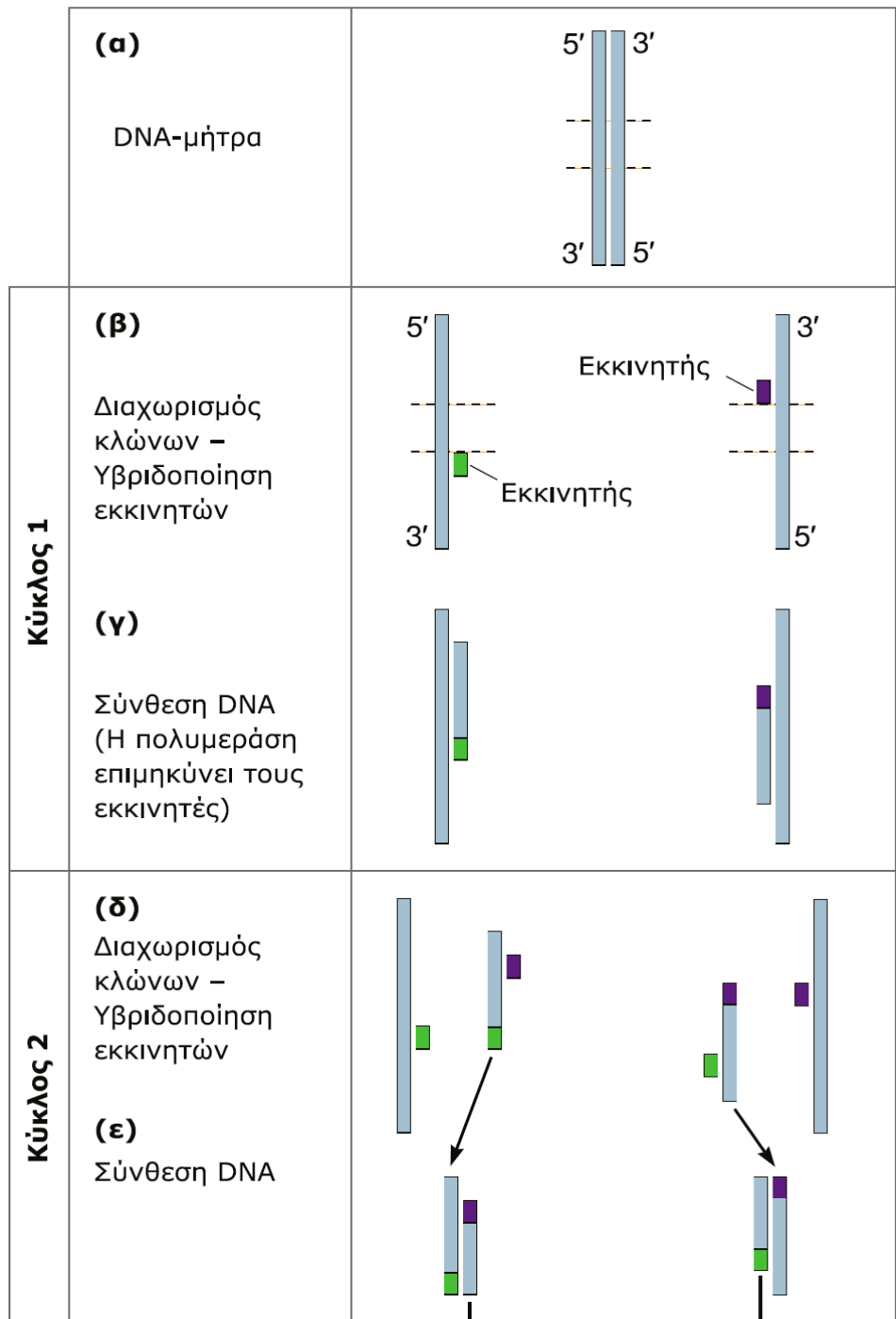


# Ο κύκλος της τεχνικής PCR.





# Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων DNA κατά την PCR.



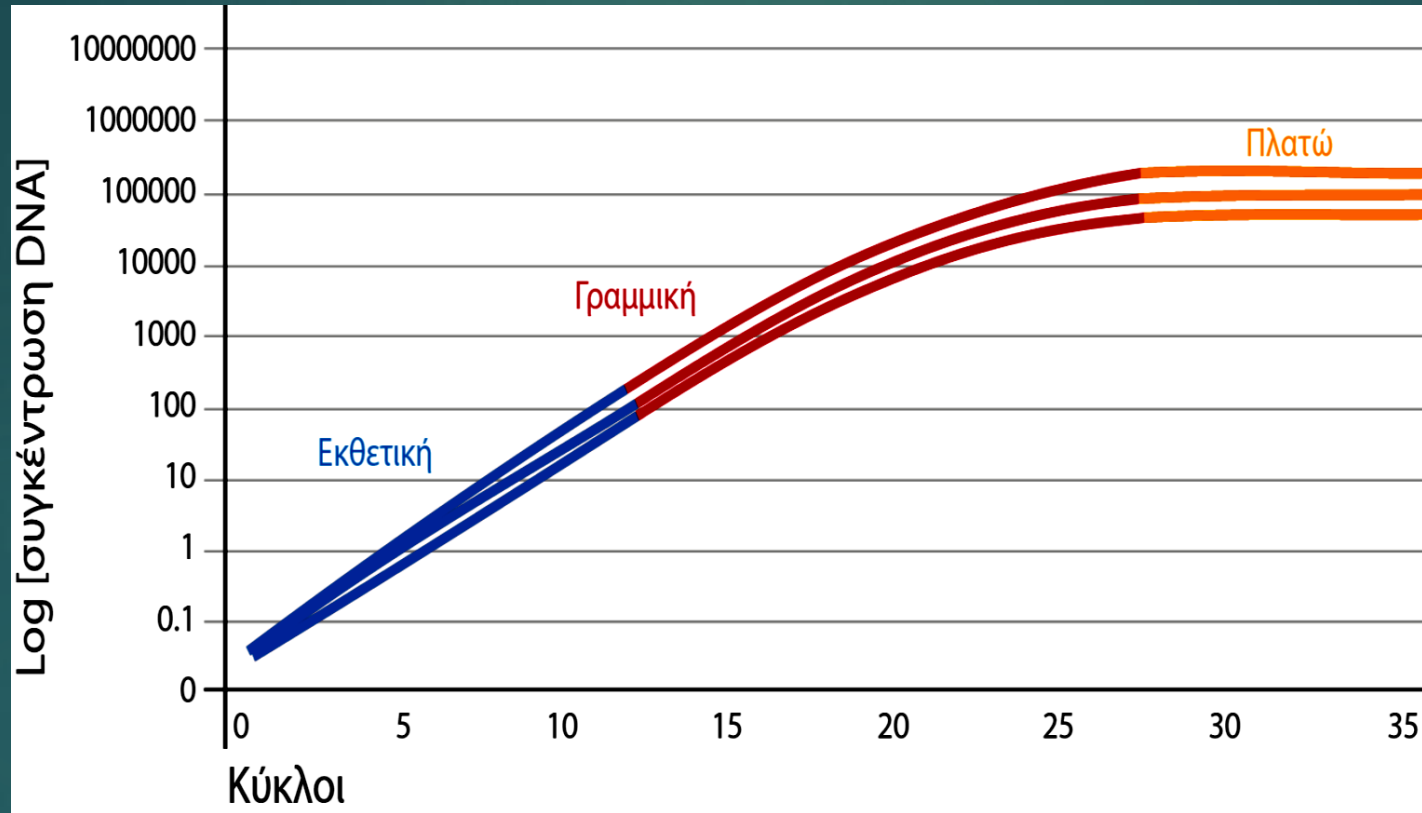
Αριθμός κύκλου	Αριθμός δίκλωνων μορίων-στόχων
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1.024
13	2.048
14	4.096
15	8.192
16	16.384
17	32.768
18	65.536
19	131.072
20	262.144
21	524.288
22	1.048.576
23	2.097.152
24	4.194.304
25	8.388.608
26	16.777.216
27	33.554.432
28	67.108.864
29	134.217.728
30	268.435.456
31	536.870.912
32	1.073.741.824

Πολλαπλασιασμός μορίων  
κατά την αλυσιδωτή  
αντίδραση πολυμεράσης.

$$N = N_0 2^n$$

Αριθμός μορίων DNA στόχου	Αριθμός κύκλων PCR
$3 \times 10^5$	25-30
$15 \times 10^4$	30-35
$1 \times 10^3$	35-40
50	40-45

## Οι φάσεις της αντίδρασης PCR



# Παράγοντες που επιδρούν στην PCR

- δείγμα DNA
- DNA πολυμεράση
- επιλογή εκκινητών
- συγκέντρωση ιόντων  $Mg^{2+}$
- συγκέντρωση dNTPs
- παρουσία ενισχυτών και αναστολέων
- αριθμός κύκλων



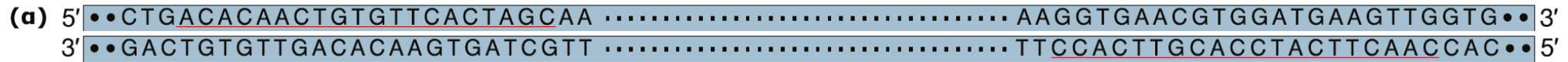
## Δείγμα DNA

- Το DNA είναι ένα πολύ σταθερό μόριο, εάν δεν εκτεθεί στη δράση ειδικών ενζύμων, των νουκλεασών
- επαρκές λιγότερο από ένα μικρογραμμάριο ολικού γενωμικού DNA
- ενίσχυση αλληλουχιών από ένα μόνο μόριο DNA
- Στο εμπόριο σήμερα κυκλοφορούν έτοιμα kit για την απλή, αποδοτική και γρήγορη εκχύλιση των νουκλειικών οξέων από βιολογικά δείγματα
- βιολογικά δείγματα (ιστοί, περιφερικό αίμα, κα)
- βιοψίες διατηρημένες σε παραφίνη ηλικίας άνω των 40 ετών
- Αιγυπτιακές μούμιες ηλικίας άνω των 4000 ετών!

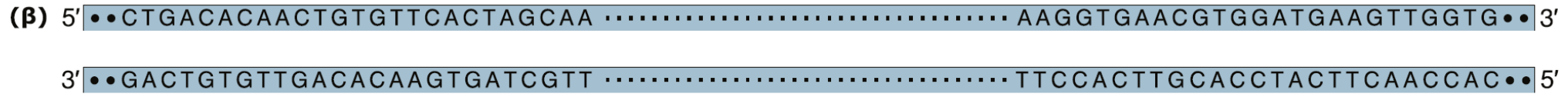
# Κριτήρια επιλογής εκκινητών

- Βέλτιστο μήκος 20-26 βάσεις (bp)
- περιεκτικότητα σε βάσεις G, C 40-60%
- αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών εντός του κλώνου των εκκινητών, ειδικά στο 3' άκρο
- αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών των εκκινητών με μη επιθυμητές αλληλουχίες DNA
- απόρριψη των εκκινητών που έχουν ομολογία με ανεπιθύμητες περιοχές άνω του 70%
- αποφυγή επανάληψης των G και C στο 3' άκρο των εκκινητών (πχ GCCCC, GGGG)

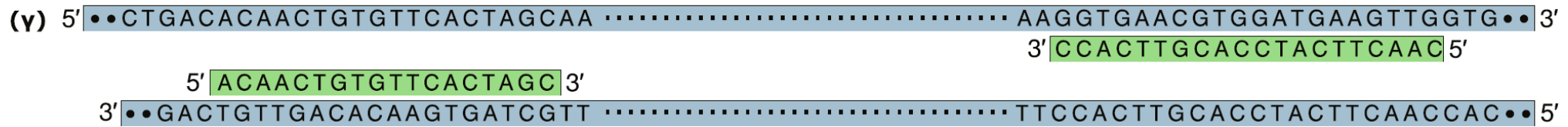
# Εκκινητές της DNA πολυμεράσης.



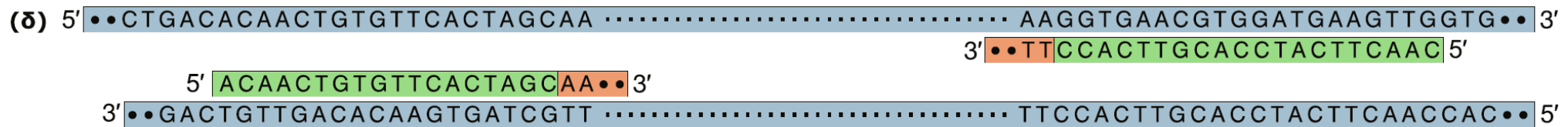
↓  
Θέρμανση



↓  
Προσθήκη εκκινητών



↓  
Προσθήκη dNTP και DNA πολυμεράσης



# Θερμοκρασία αποδιάταξης

$$T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C} \quad (< 20\text{bp})$$

Η θερμοκρασία αποδιάταξης, Melting temperature ( $T_m$ ), είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή

- Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature), εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις G και C
- Θερμοκρασία  $55^\circ\text{C}$  είναι καλή για ένα τυπικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή 20 βάσεων με περίπου 50% σύσταση σε GC
- μεγαλύτερες θερμοκρασίες μπορεί να είναι απαραίτητες προς αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή

# Οι θερμοσταθερές πολυμεράσες απλοποιούν και βελτιώνουν την PCR

## Η πιστότητα της σύνθεσης DNA εξαρτάται από την πολυμεράση

### Ταq πολυμεράση

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι 72° C

- μεγάλη εξειδίκευση
- καλύτερη απόδοση
- δυνατότητα αυτοματοποίησης
- 95°C, 20s/cycle, 65% activity, 50 κύκλοι



Το βακτήριο *Thermus aquaticus* ανακαλύφθηκε στις θερμές πηγές στην περιοχή Great Fountain του Lower Geyser Basin στο Εθνικό Πάρκο Yellowstone των ΗΠΑ.

# Συγκέντρωση ιόντων $Mg^{+2}$

- μεταλλικός συμπράγοντας Ταq DNA πολυμεράσης
- μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR
- Συνήθης βέλτιστη συγκέντρωση 1.5 mM (0.5-5 mM)
- περίσσεια  $Mg^{+2}$  θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος
- έλλειψη  $Mg^{+2}$  θα μειώσει την ποσότητα του προϊόντος

# Συγκέντρωση dNTPs

- τα dNTPs αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA
- οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200μM
- υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση
- τα dNTPs ενώνονται με τα  $Mg_{+2}$  και το ποσό των dNTPs προσδιορίζει το ελεύθερο ποσό διαθέσιμου  $Mg_{+2}$
- αν η συγκέντρωση των dNTPs αλλάξει σημαντικά, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και μια αλλαγή στη συγκέντρωση του ελεύθερου ποσού του διαθέσιμου  $Mg_{+2}$

# Εξειδίκευση PCR

οφείλεται:

- στη δυνατότητα επιλογής της προς ενίσχυση περιοχής DNA μέσω της επιλογής κατάλληλων εκκινητών

επιτυγχάνεται με:

- χαμηλή συγκέντρωση  $Mg^{2+}$ , dNTPs, Taq, εκκινητών
- χαμηλό αριθμό κύκλων
- αυξημένη θερμοκρασία υβριδισμού
- αυξημένο ρυθμό αυξομείωσης θερμοκρασίας





Μη ειδικό προϊόν PCR οφείλεται συνήθως σε :

- πιθανότητα λάθους της πολυμεράσης (1 στα  $10^9$  nt in vivo,  $2 \times 10^4$  nt in vitro)
- μη ειδική σύνδεση των εκκινητών
- επιμόλυνση από προηγούμενα προϊόντα PCR

# Η ιδιαίτερη ευαισθησία της PCR στις μολύνσεις μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα

- πολύ σημαντική ειδικά όταν ενισχύονται σπάνιες αλληλουχίες
- πολύ σημαντική ειδικά όταν χρησιμοποιείται για διαγνωστικό σκοπό (πχ HIV, HCV, HBV)

αποφεύγεται με :

- καλή εργαστηριακή πρακτική
- χρήση control (πχ H<sub>2</sub>O) σε κάθε PCR
- ακτινοβόληση του μίγματος της αντίδρασης με UV πριν την προσθήκη του δείγματος DNA
- χρήση διαφορετικών χώρων και πιπετών για προετοιμασία μίγματος και PCR

# Ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης PCR

- ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

## Ανίχνευση προϊόντων της αντίδρασης PCR

- βρωμιούχο αιθίδιο
- SYBR GREEN, SYBR GOLD (Molecular Probes) : πολύ υψηλή ευαισθησία
- χρώση αργύρου : πολύ υψηλή ευαισθησία
- αυτοραδιογραφία (autoradiography)
- αποτύπωση (blotting) (Southern Blot για DNA και Northern Blot για RNA)

# Κυριότερες παραλλαγές της αντίδρασης PCR

- PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)
- Ασύμμετρη PCR
- Διπλή PCR (Nested PCR)
- Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR)
- PCR-ELISA
- PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

# Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο Ποσοτική PCR (qPCR-Real time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται για τη γρήγορη και ακριβή ποσοτικοποίηση RNA και DNA

Η ποσοτική PCR δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης PCR κατά τη διάρκεια της εξέλιξής της

Πλεονεκτήματα:

- Αυτοματοποίηση
- Δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού
- Αποφυγή ηλεκτροφορήσεων
- Αποφυγή επιμολύνσεων
- Υψηλή ευαισθησία
- Κατάλληλη για μεγάλο αριθμό δειγμάτων

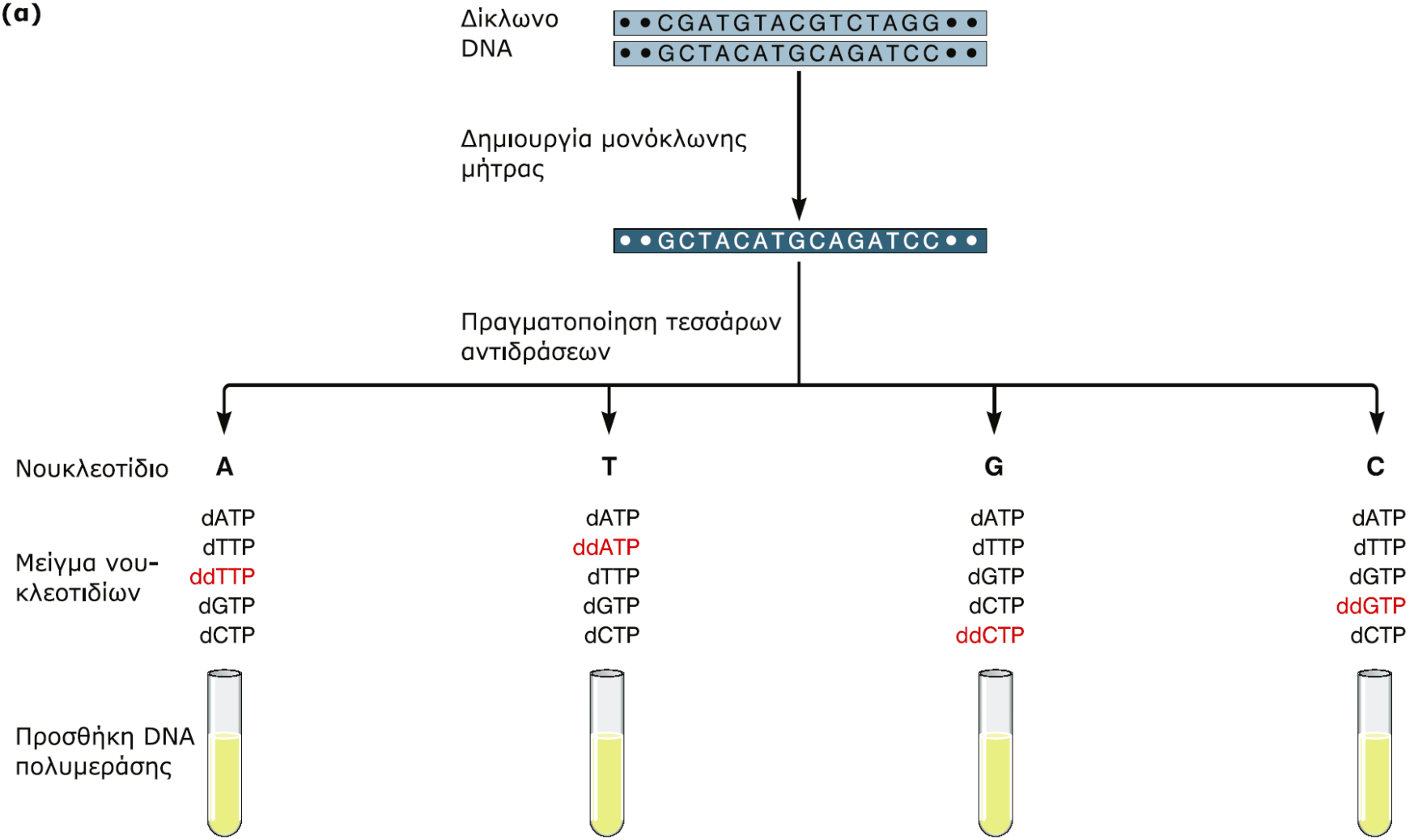
# ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΤΟΥ DNA

**1) Maxam-Gilbert (Βραβείο Nobel)** – η χημική μέθοδος  
chemical degradation method

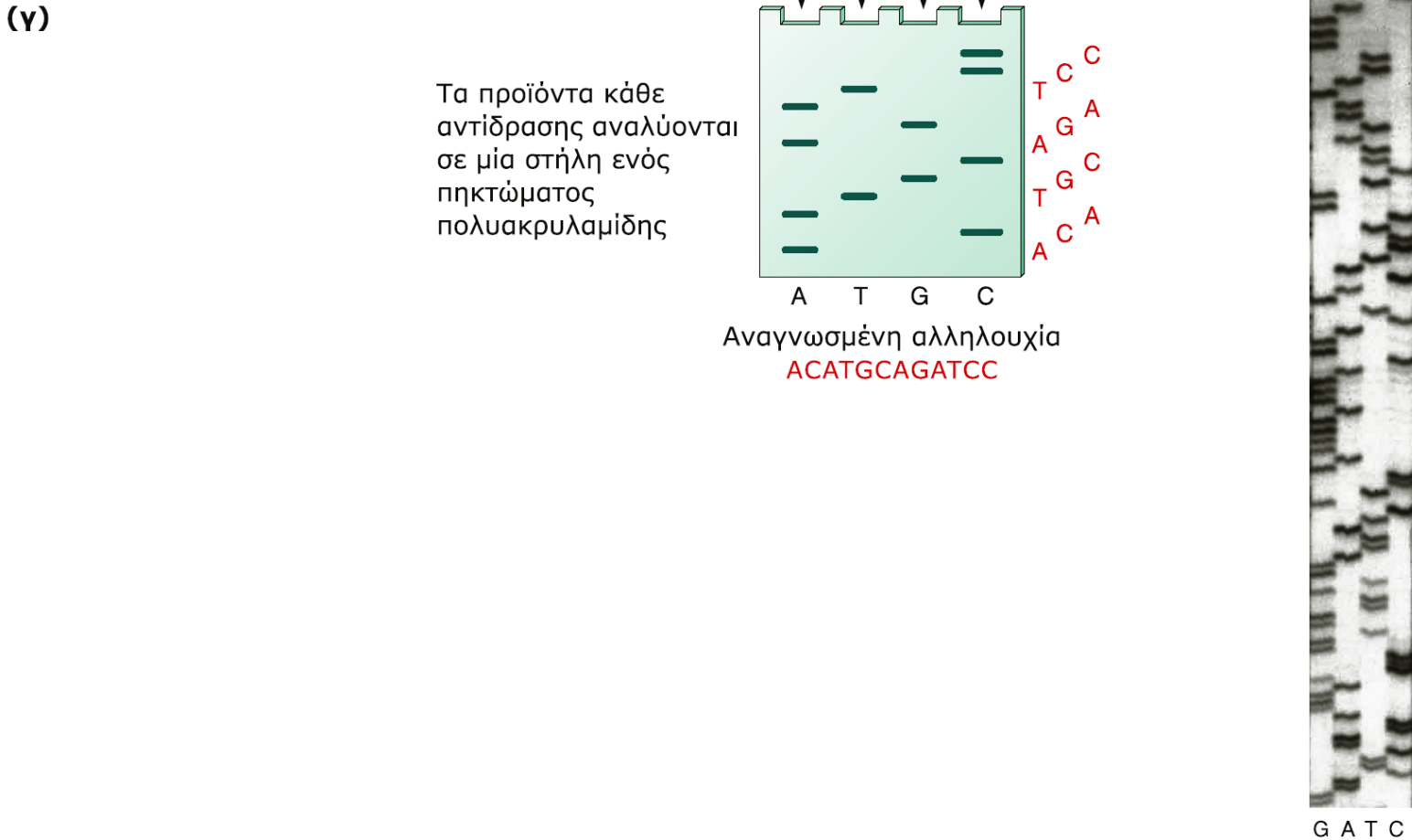
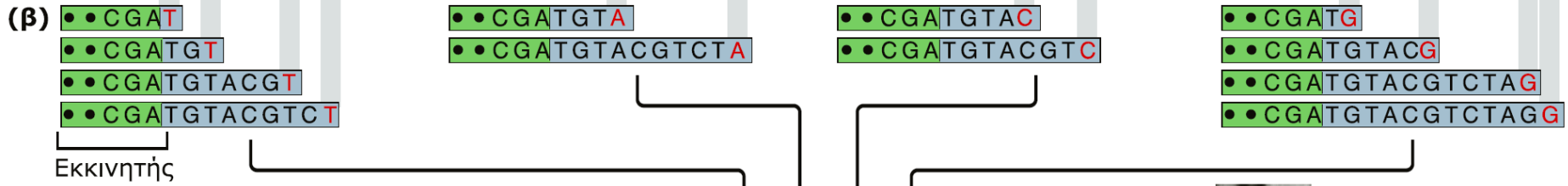
**2) Sanger (dideoxy-termination method) (Βραβείο Nobel),**  
η ενζυμική μέθοδος αλληλούχησης με «τερματισμό επιμήκυνσης  
της αλυσίδας» με τη βοήθεια τροποποιημένων  
δεοξυνουκλεοτιδίων,

# Η διαδικασία αλληλούχισης DNA με τη μέθοδο του Sanger που βασίζεται στη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων.

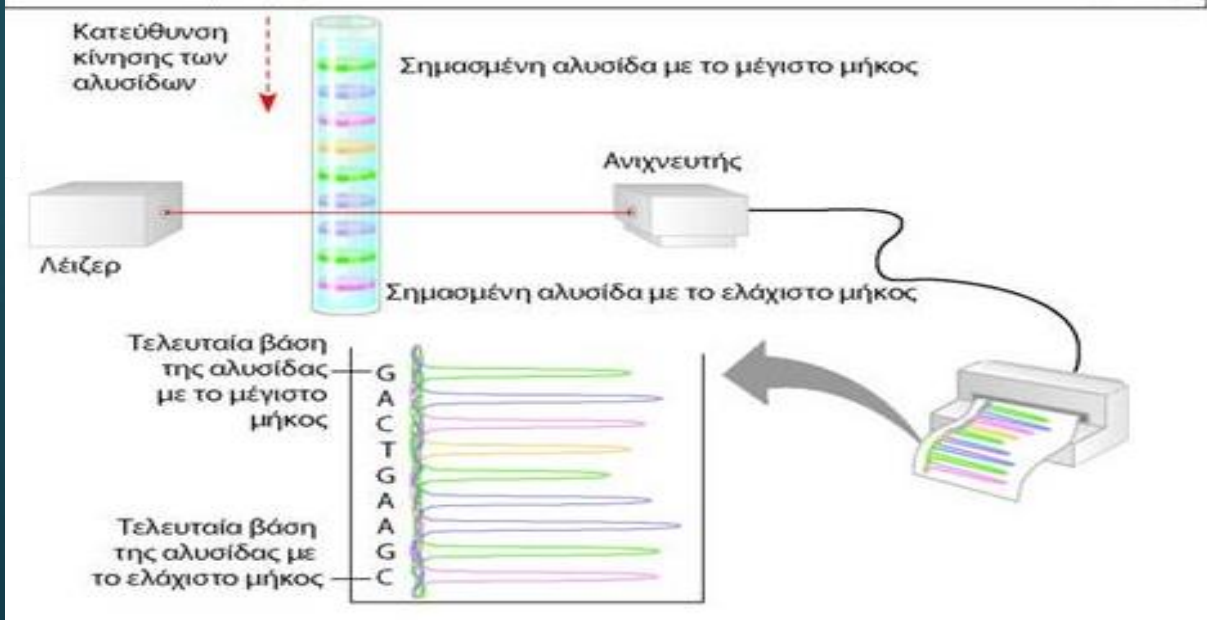
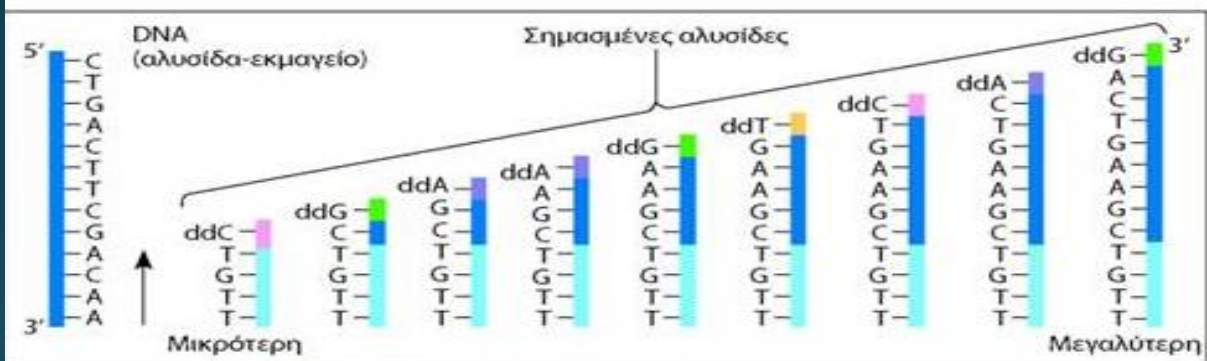
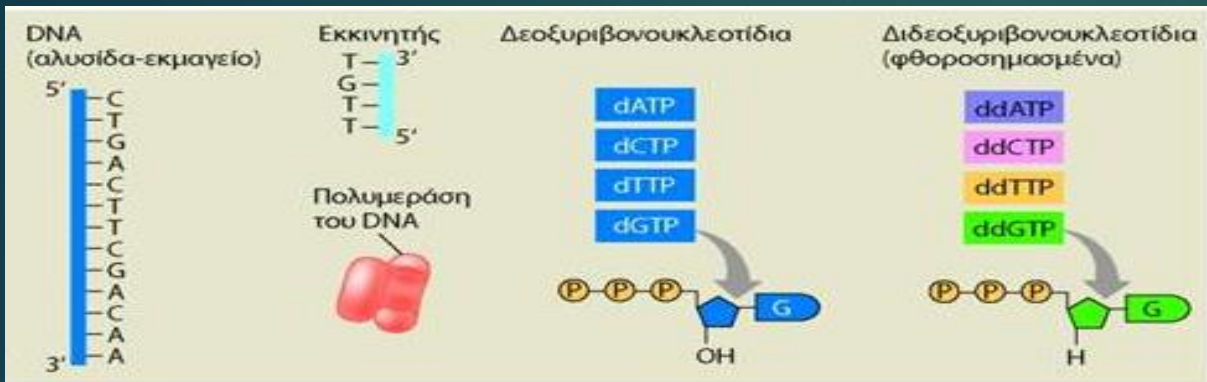
(a)



••GCTACATGCAGATCC•• ••GCTACATGCAGATCC•• ••GCTACATGCAGATCC•• ••GCTACATGCAGATCC••





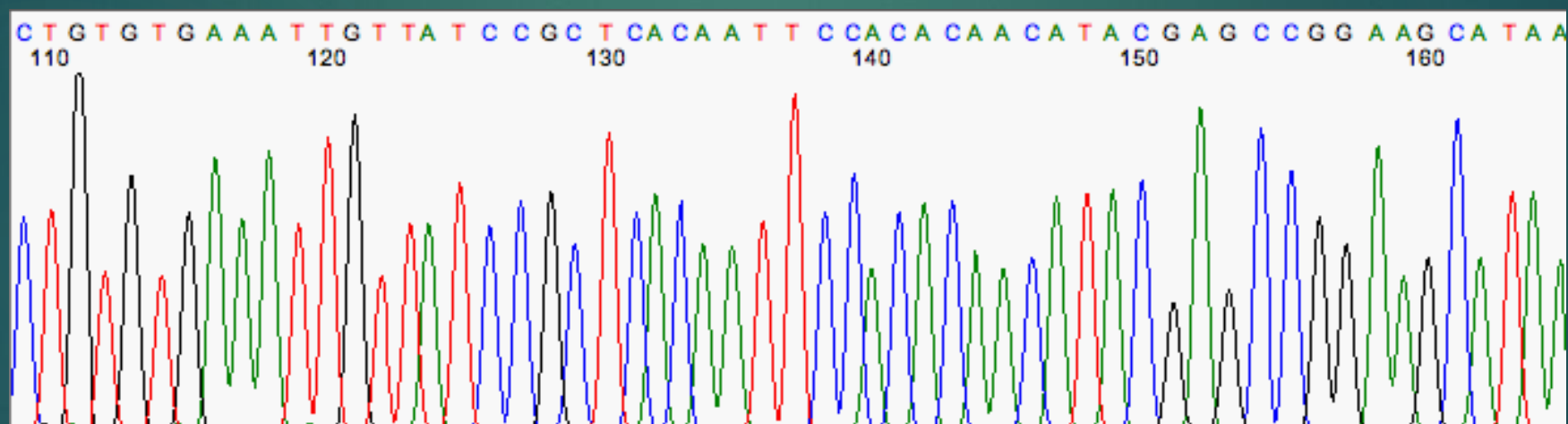
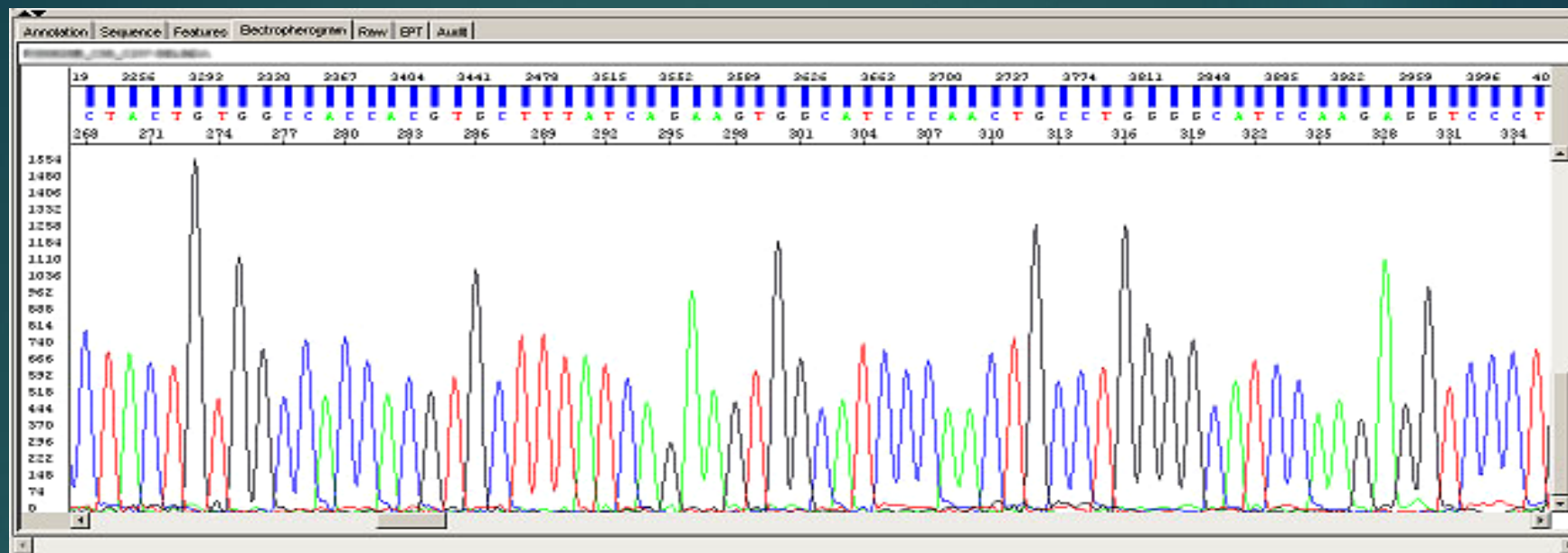


## DYE TERMINATOR SEQUENCING

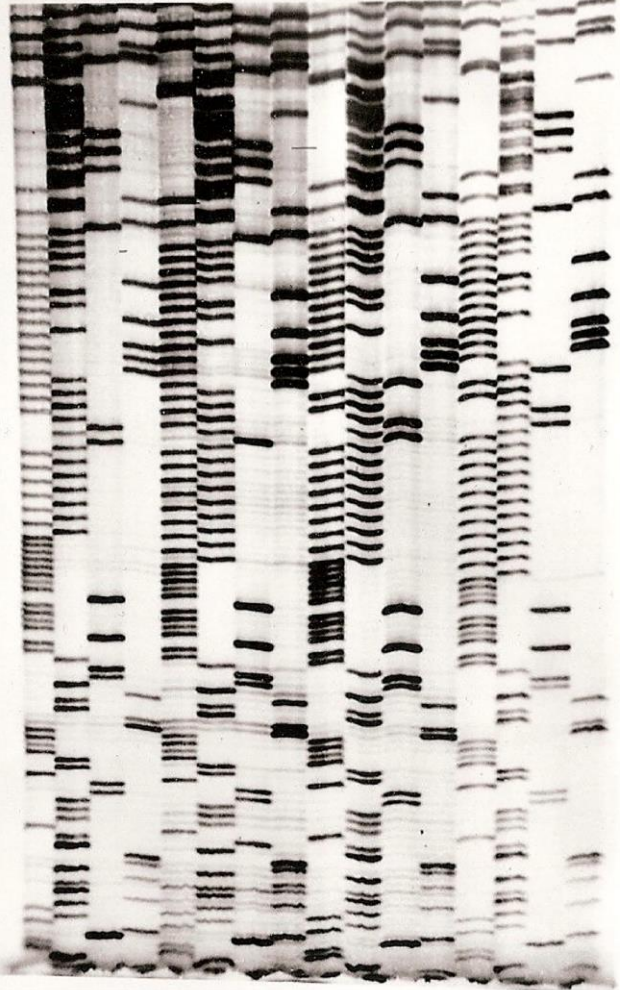
Το 1998 κυκλοφόρησε το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο αυτόματο σύστημα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων.

Οι δύο βασικές αλλαγές της μεθόδου ήταν:

- η χρήση φθορίζουσών χρωστικών ως μέσων σήμανσης των διδεοξυνουκλεοτιδίων
- και η χρήση τριχοειδών σωλήνων για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης.



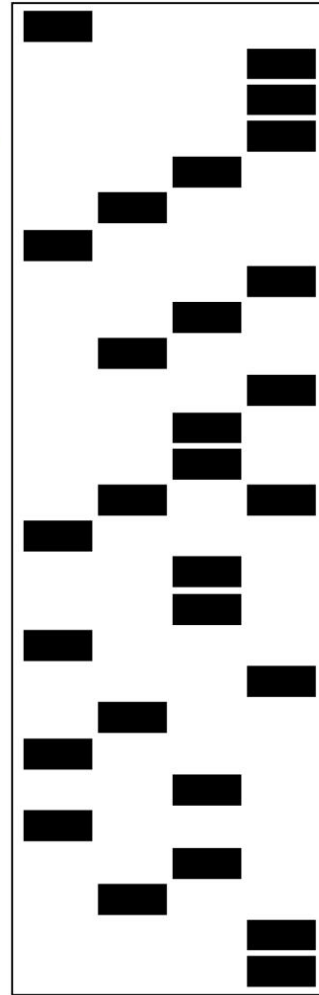
TACGTACGTACGTACG



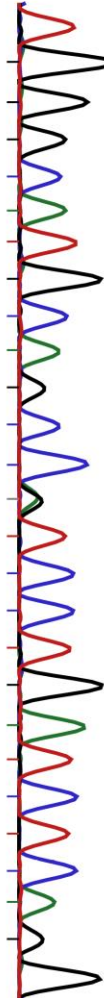
**α**

(α) με ραδιενεργή σήμανση

T A C G

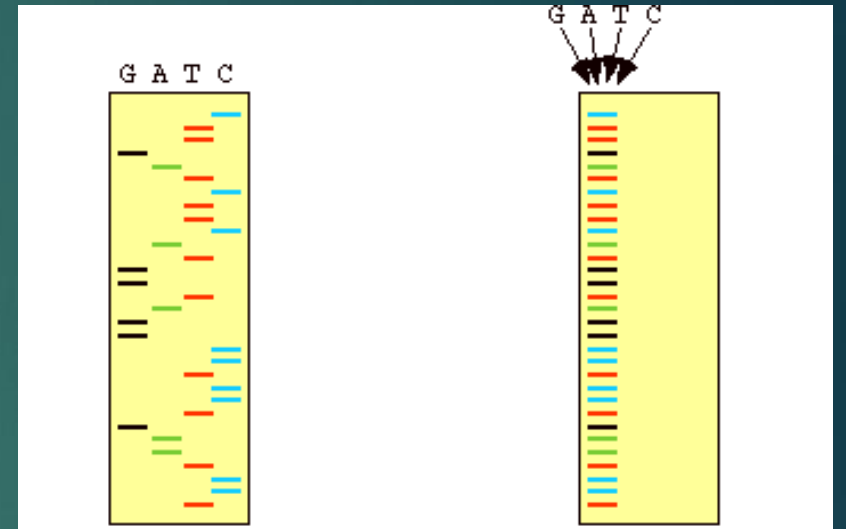


T G G G C A T G G C A G C C R T C C T G A T C T C A G G G



**β**

(β) με φθορίζουσες χρωστικές και ανάλυση της αλληλουχίας βάσεων από αυτόματο αναλυτή



# ABI 310 GENETIC ANALYZER



# Αλληλούχηση του DNA Επόμενης Γενιάς (NGS, Next Generation Sequencing),

επιτρέπουν τη μαζική παράλληλη αλληλούχηση πολλών γονιδίων στην ίδια εφαρμογή :

- το κόστος ανά γονίδιο μειώνεται σημαντικά
- παρέχονται ταχύτερα αξιόπιστα αποτελέσματα



NGS αναλυτής της Illumina

## ➤ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

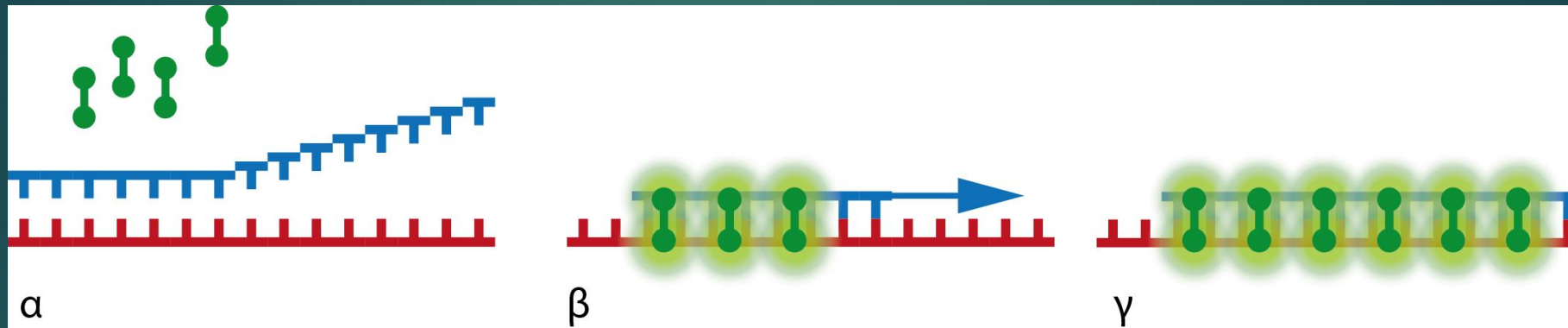
- 1) Με αυξανόμενη αλυσίδα σε στερεό υλικό
- 2) παρεμπόδιση της συμμετοχής σε χημικές αντιδράσεις του 5' ή 3' άκρου ενός νουκλεοτιδίου ( blocking groups)
- 3) Η χημική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων συγκεκριμένης αλληλουχίας (μέχρι 60 nt) είναι πλέον ρουτίνα και εκτελείται από αυτόματα μηχανήματα (DNA synthesizers).

## ➤ ΣΥΝΘΕΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

# Συστήματα Ανίχνευσης στην qPCR

- **Μη Ειδικές Χρωστικές για dsDNA** (SYBR<sup>®</sup> Green, LCGreen)
- Ζεύγος Ανιχνευτών Υβριδισμού (dual hybridization probes)
- Ανιχνευτές Υδρόλυσης (hydrolysis probes, TaqMan<sup>®</sup>)
- **Μοριακοί Φάροι** (molecular beacons)
- Ανιχνευτές τύπου «Σκορπιός» (scorpions)

## Μη ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ dsDNA SYBR Green



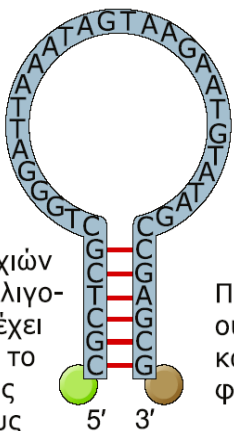
- Παρουσιάζουν ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερες στο διάλυμα (Α) και φθορίζουν όταν ενσωματώνονται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA (Β και Γ).
- Κατά την ποσοτική PCR πραγματοποιείται μέτρηση φθορισμού σε κάθε κύκλο μετά το τέλος της επιμήκυνσης των μορίων DNA.
- Όσο περισσότερα PCR προϊόντα παράγονται τόσο περισσότερο αυξάνει ο φθορισμός που καταγράφεται από το μηχάνημα



# Μοριακοί φάροι για την PCR πραγματικού χρόνου.

(α)

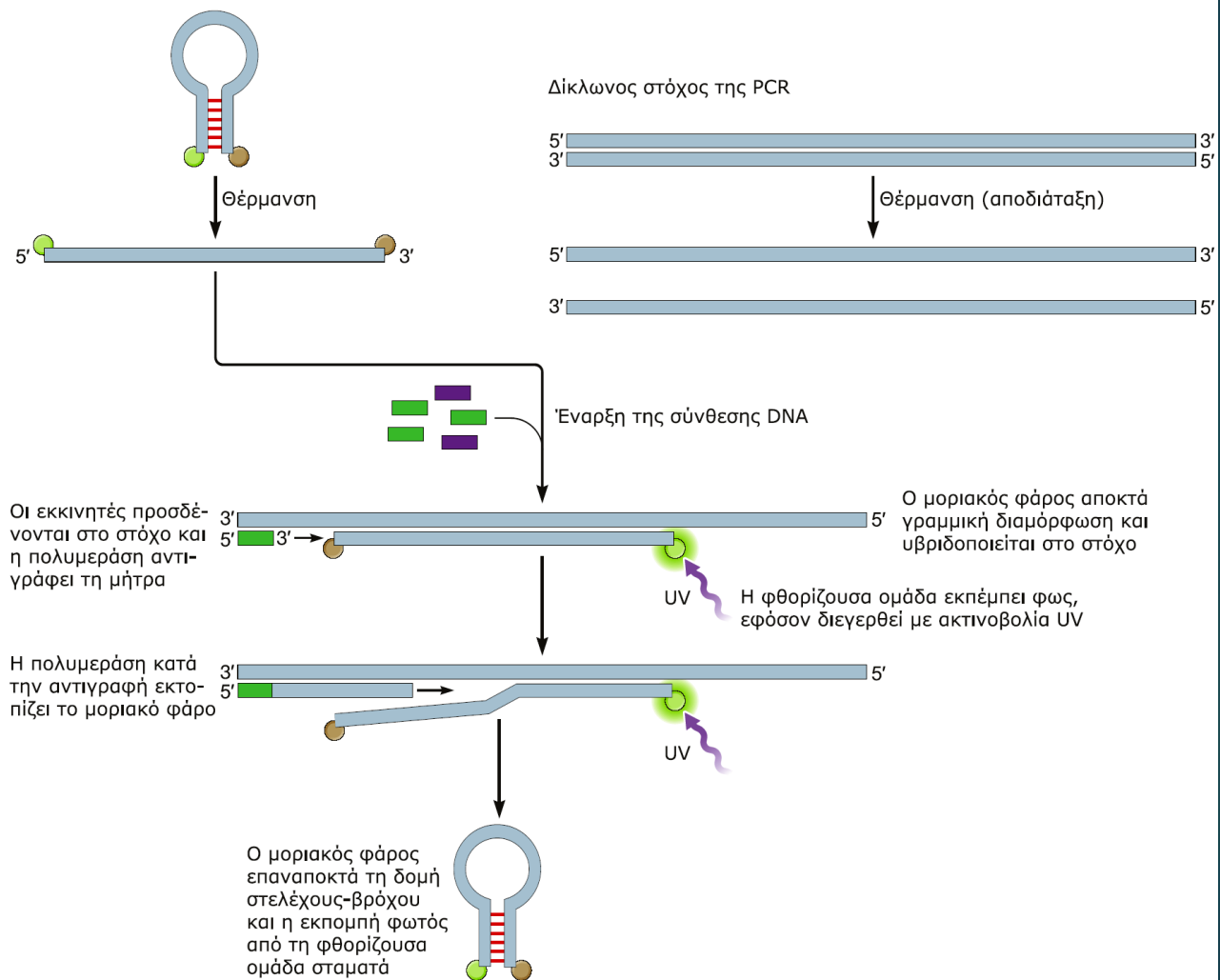
Η παρουσία συμπληρωματικών αλληλουχιών στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας δομής στελέχους-βρόχου



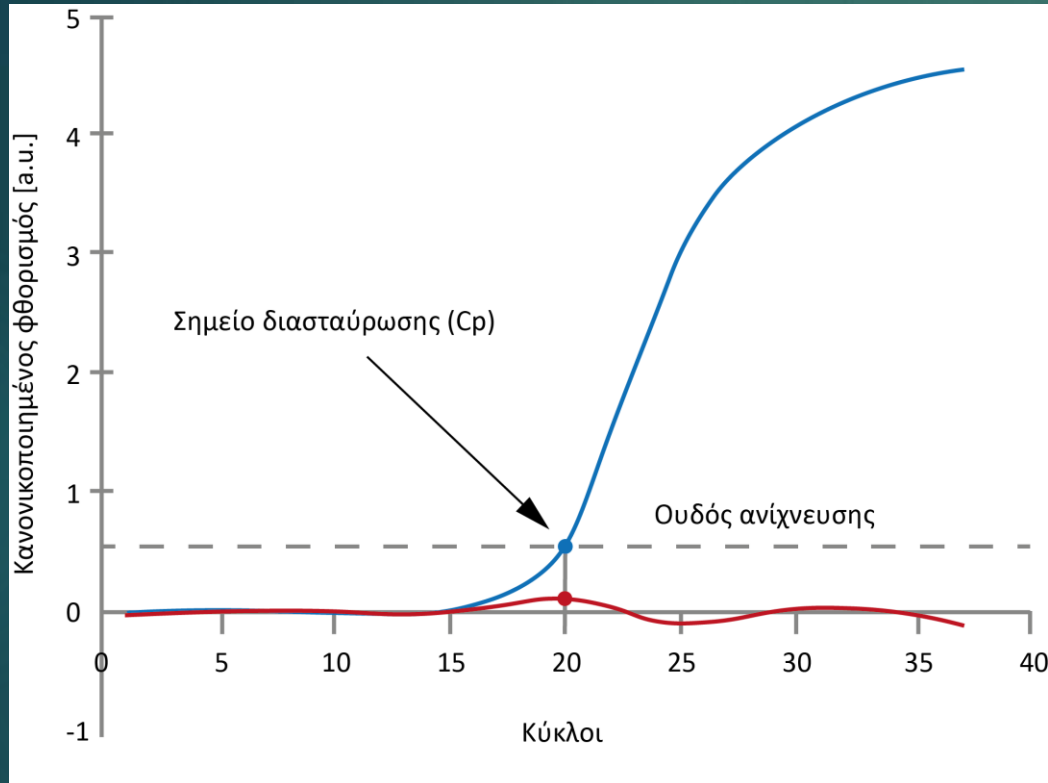
Οι αλληλουχίες του βρόχου είναι συμπληρωματικές με μία εσωτερική περιοχή του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος

Προσαρτάται μία φθορίζουσα ουσία στο 5' άκρο του ιχνηθέτη και μία ουσία απορρόφησης φθορισμού στο 3' άκρο του

(β)



Βασική διαφορά ανάμεσα στην ποσοτική και την κλασική PCR είναι η φάση της αντίδρασης, στην οποία συλλέγονται τα δεδομένα και εξάγονται τα αποτελέσματα.



Στην ποσοτική PCR τα δεδομένα συλλέγονται όταν η αντίδραση είναι ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης. Η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή  $C_p$ , που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνά το βασικό επίπεδο (baseline).

Το  $C_p$  υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα.

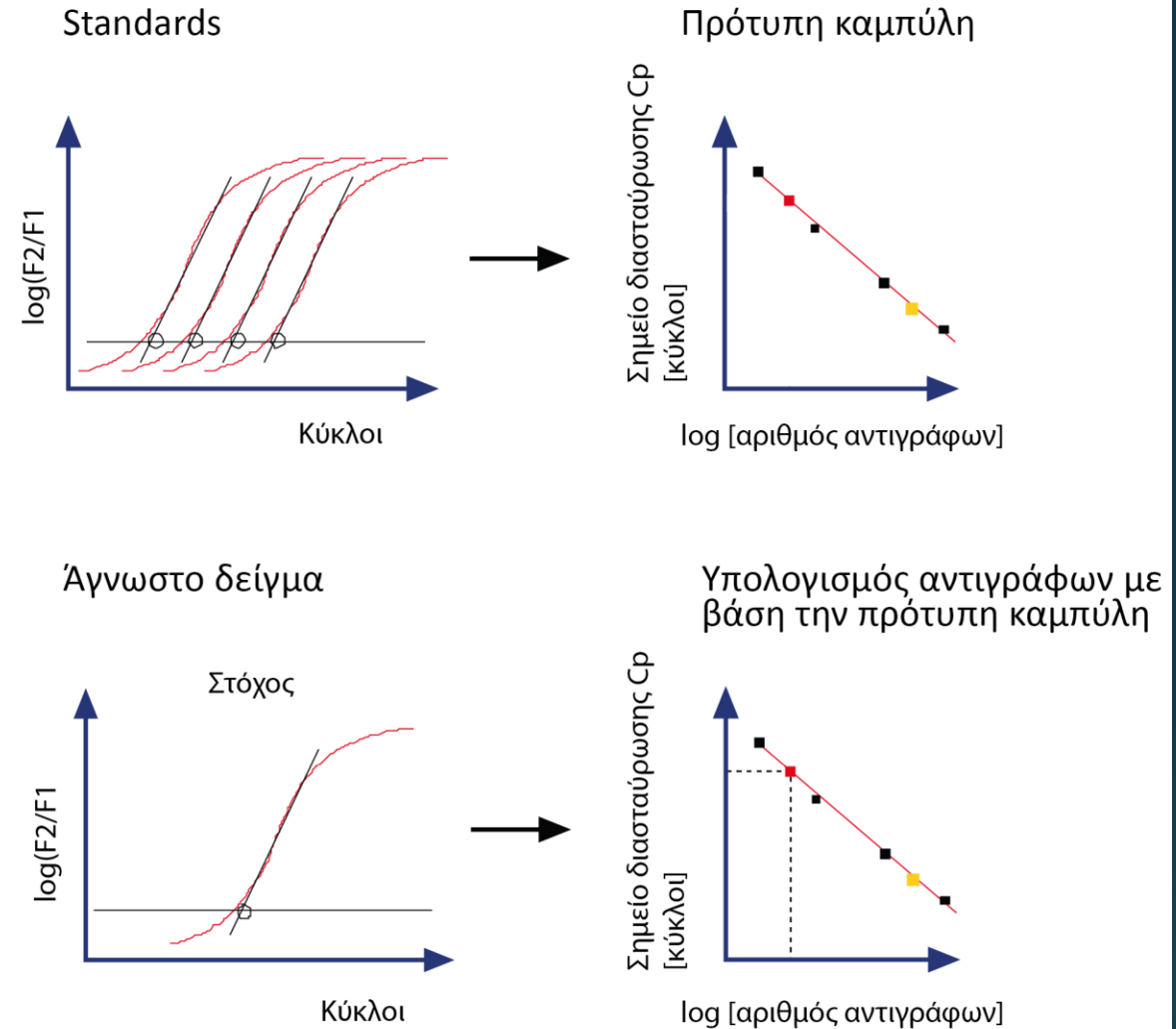
- Τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο  $C_p$  υπολογίζονται από την πρότυπη καμπύλη. Αντίστοιχα υπάρχουν και άλλοι μαθηματικοί τύποι υπολογισμού που περιλαμβάνουν διόρθωση για τη μείωση της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης που παρατηρείται με το πέρασμα των κύκλων πολλαπλασιασμού.
- Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται στο ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA ή cDNA στο αρχικό δείγμα τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης.
- Επομένως δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο  $C_p$  από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα. Επίσης είναι καλό να σημειωθεί ότι η παραγωγή του προϊόντος της PCR έχει γραμμική συσχέτιση με τον παραγόμενο φθορισμό.

## Απόλυτη ποσοτικοποίηση των αντιγράφων ενός γονιδίου με χρήση πρότυπης καμπύλης.

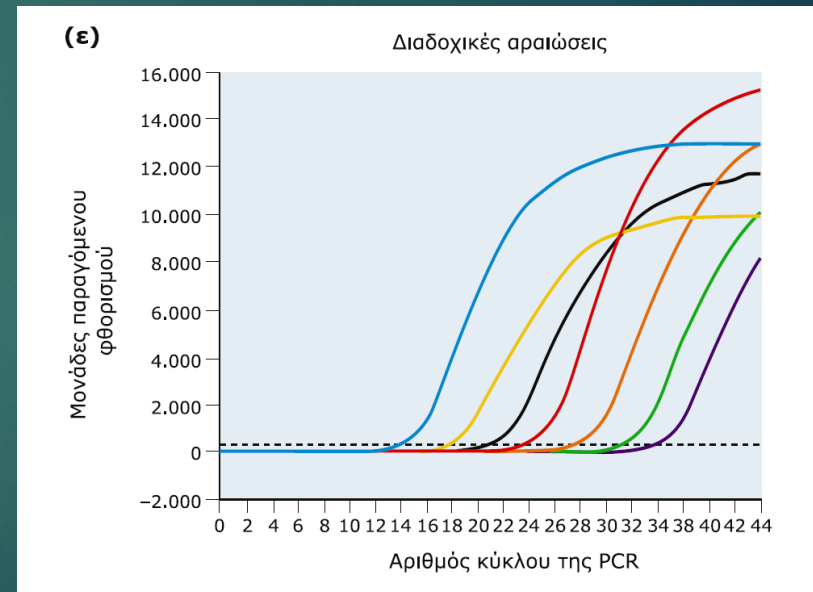
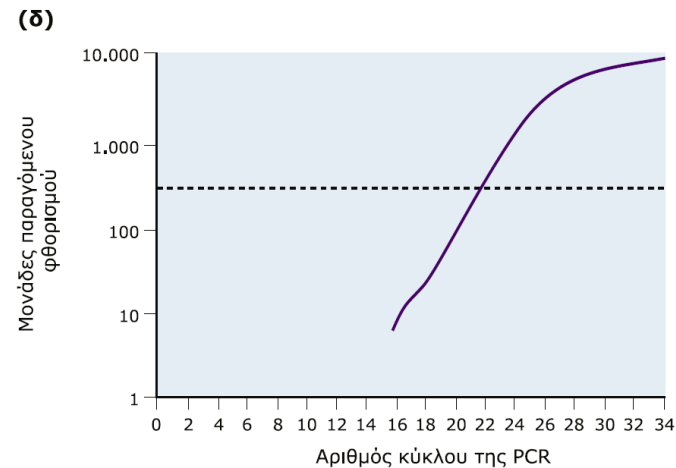
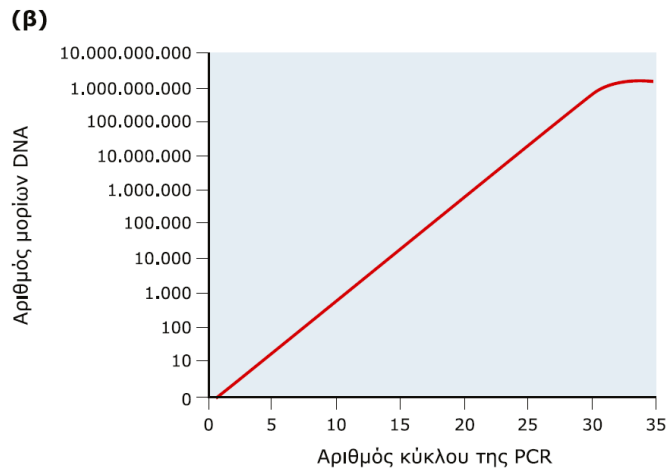
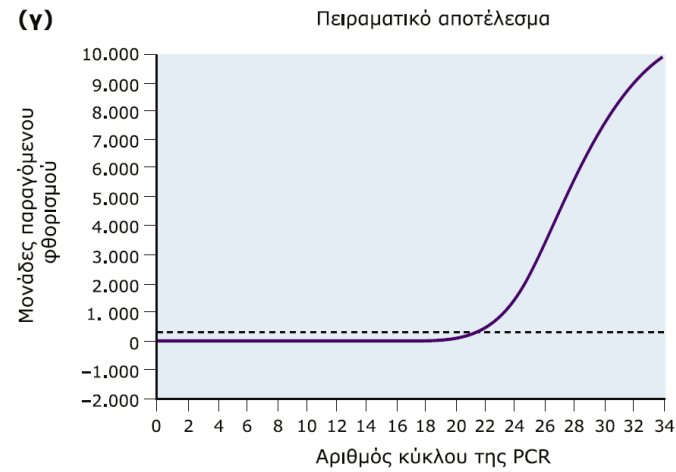
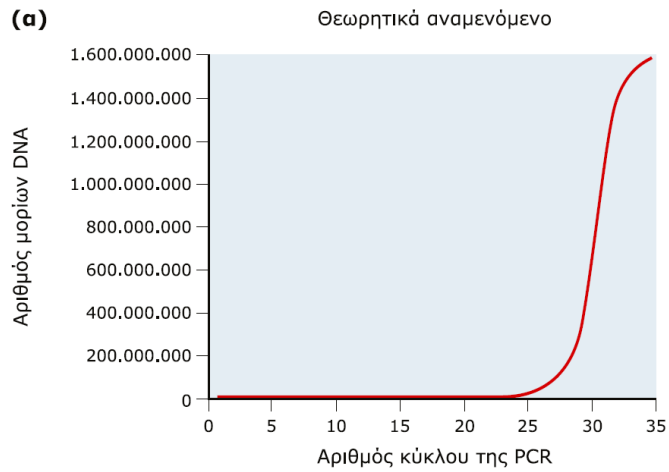
Η απόλυτη ποσοτικοποίηση στην ποσοτική PCR πραγματοποιείται βάσει μια πρότυπης καμπύλης, η οποία δημιουργείται από δείγματα με γνωστή συγκέντρωση ή καλύτερα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (standards).

Η συσχέτιση των σημείων διασταύρωσης ( $C_p$ ) των standards και του λογαρίθμου της συγκέντρωσής τους μας δίνει την πρότυπη καμπύλη.

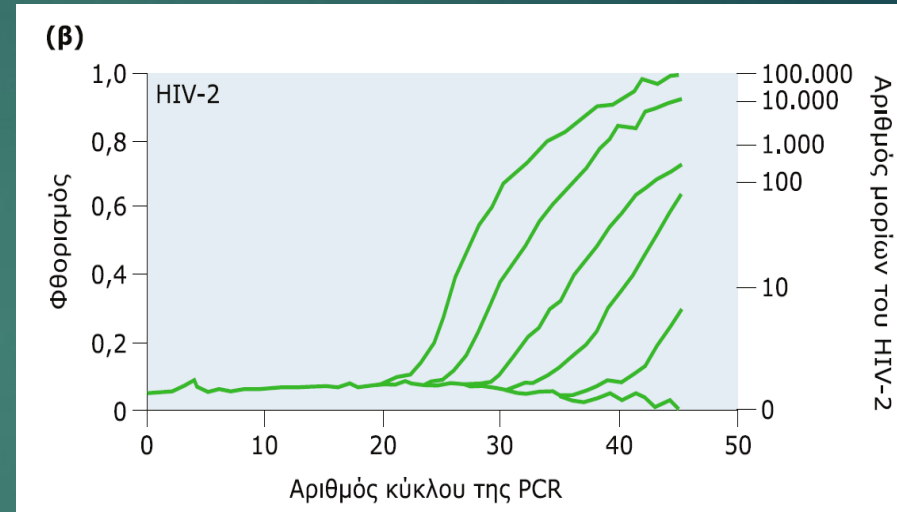
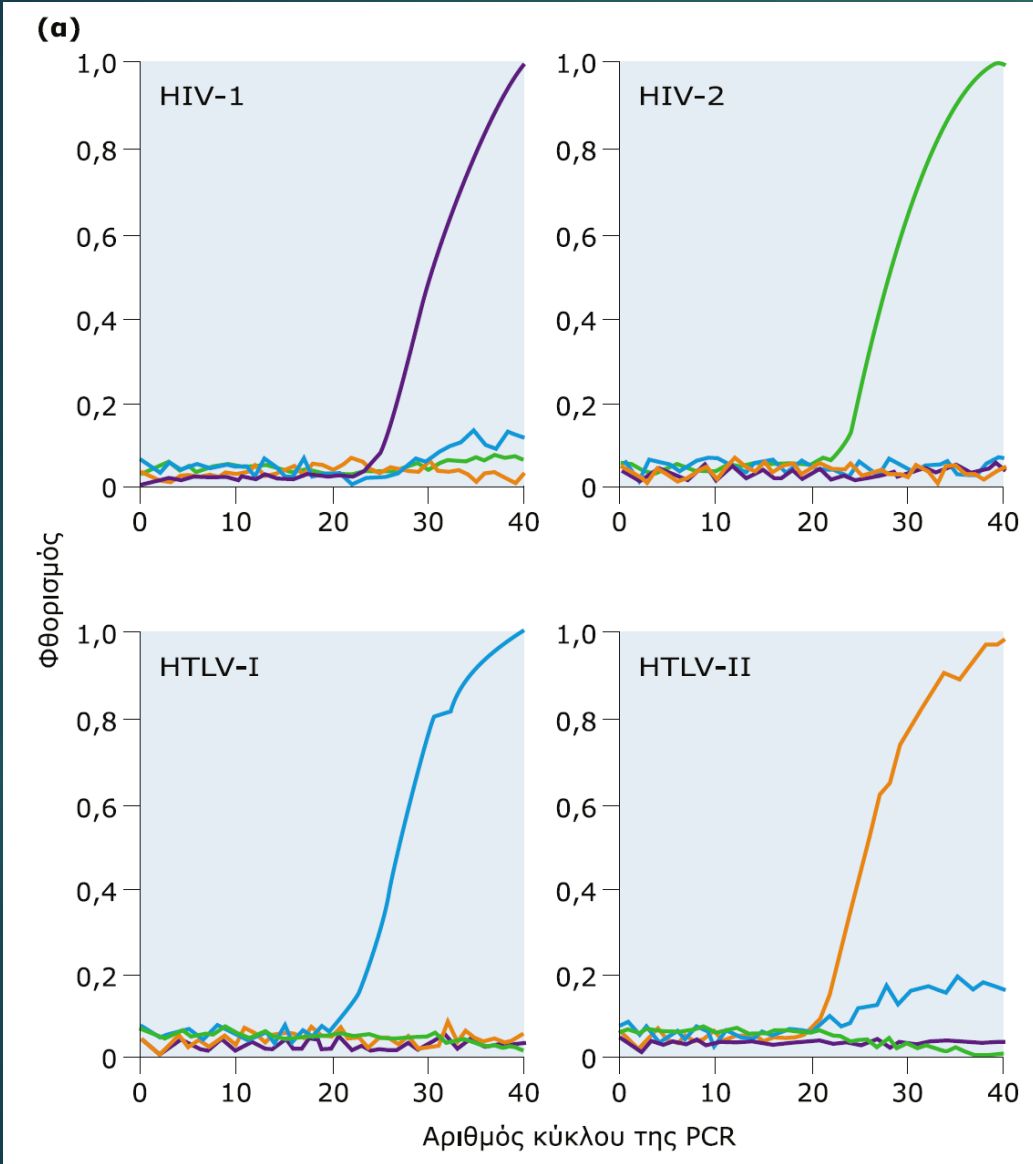
Στη συνέχεια, γνωρίζοντας μόνο το σημείο διασταύρωσης ( $C_p$ ) ενός άγνωστου δείγματος, μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των αντιγράφων του υπό μελέτη γονιδίου.



# Χρήση της PCR πραγματικού χρόνου για τη μέτρηση της ποσότητας των μορίων-στόχων που περιέχει ένα δείγμα.



# Ανίχνευση διαφορετικών ανθρώπινων ρετροϊών.



# Εφαρμογές της ποσοτικής (real time) PCR

- Ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης γονιδίων
- Μέθοδος αναφοράς για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με άλλες μεθόδους (πχ μικροσυστοιχίες)
- Ανάλυση GMOs (genetically modified organisms)
- Ανάλυση Single nucleotide polymorphisms
- Ανάλυση DNA mutations

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΠΗΓΕΣ**

Ανασυνδυασμένο DNA, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007

<https://www.openbook.gr/ergastiriakes-askiseis-genetikis-tou-anthrwpou/>