

# Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης: διαγνωστικό εργαλείο

Η PCR (polymerase chain reaction) ή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στα ελληνικά, είναι μια *in vitro* μέθοδος απομόνωσης και πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας DNA μέσω ενζυμικής σύνθεσης.

Η μέθοδος λειτουργεί ως εξής: η αντίδραση χρησιμοποιεί δύο εκκινητές (έναν για κάθε αλυσίδα) οι οποίοι υβριδίζουν με την αντίστροφη αλληλουχία, ορίζοντας την περιοχή του DNA που θα συντεθεί. Η επιμήκυνση των εκκινητών καταλύεται από ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο όπως η Taq DNA πολυμεράση. Ο κύκλος των αντιδράσεων επαναλαμβάνεται περιλαμβάνοντας την αποδιάταξη του DNA, την επανασύνδεση των εκκινητών και την επιμήκυνση της νέας αλυσίδας. Τα προϊόντα του ενός κύκλου χρησιμεύουν ως μήτρα για τον επόμενο, με αποτέλεσμα σε κάθε κύκλο να έχουμε διπλασιασμό των αντιγράφων που δημιουργούνται. Οπότε στο 1ο κύκλο έχουμε 2 αντίγραφα, στον 2ο 4, στον 3ο 8 και το νούμερο ανεβαίνει εκθετικά πχ στον 10ο έχουμε 1,024, στον 20ο ξεπερνάμε το εκατομμύριο ενώ στον 30ο το δισεκατομμύριο.

Ξεκινώντας η διαδικασία πριν το 1ο κύκλο έχουμε την αρχική αποδιάταξη δηλ υποβάλλουμε το αρχικό δείγμα DNA σε θερμοκρασία 94°C για 1 ως 5 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη και η εξάλειψη των δευτερογενών δομών του DNA.

Μετά ξεκινάει η διαδικασία των κύκλων και κάθε κύκλος αποτελείται από τρία βήματα: αποδιάταξη, αναδιάταξη και επιμήκυνση.

Η αποδιάταξη γίνεται με θέρμανση στους 94°C για 0,5 ως 1 λεπτό με σκοπό να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου.

Στην αναδιάταξη η θερμοκρασία κυμαίνεται από 50°C ως 65°C και εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Σε αυτό το βήμα οι εκκινητές υβριδίζουν με το στόχο DNA. Ο χρόνος είναι πάλι από 05 ως 1 λεπτό.

Στην επιμήκυνση η πολυμεράση συνθέτει την συμπληρωματική αλυσίδα του στόχου DNA, με κατεύθυνση από το 5' άκρο προς το 3' άκρο. Η ταχύτητα επιμήκυνσης είναι 35-70 νουκλεοτίδια/δευτερόλεπτο και η θερμοκρασία είναι στους 72°C για 1 λεπτό.

Αυτά τα τρία βήματα επαναλαμβάνονται από 20 ως 40 φορές και μετά το τέλος των κύκλων έχουμε την τελική επιμήκυνση με θερμοκρασία 72°C για 5 ως 15 λεπτά για να ολοκληρωθεί η επιμήκυνση σε προϊόντα που η διαδικασία αντιγραφής έχει μείνει ημιτελής. Τέλος με την ολοκλήρωση του προγράμματος η θερμοκρασία

ρυθμίζεται στους 4 °C, ώστε να σταματήσει η αντίδραση και να διατηρηθούν τα δείγματα.

Στην διαδικασία αυτή χρησιμοποιούμε διάφορα αντιδραστήρια όπως: Μήτρα DNA (template) , εκκινητές, θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, dNTPs (δεοξυνουκλεοτίδια), κατάλληλο διάλυμα και κατιόντα μαγνησίου (ή πιο σπάνια μαγγανίου).

Οι εφαρμογές της μεθοδολογίας αυτής είναι πολλές και συνεχώς αυξάνονται. Ενδεικτικά αναφέρουμε τις εξής: μελέτη RNA αλληλουχιών, ανίχνευση γονιδίων, συμβολή στην τεχνική της μεταλλαξογένεσης, χαρτογράφηση του γονιδιώματος, κλινική διαγνωστική τεχνική, ανίχνευση νεοπλασιών, προγενετικός έλεγχος, εγκληματολογία, γενετική διάγνωση κληρονομικών ασθενειών και άλλες πολλές εφαρμογές.