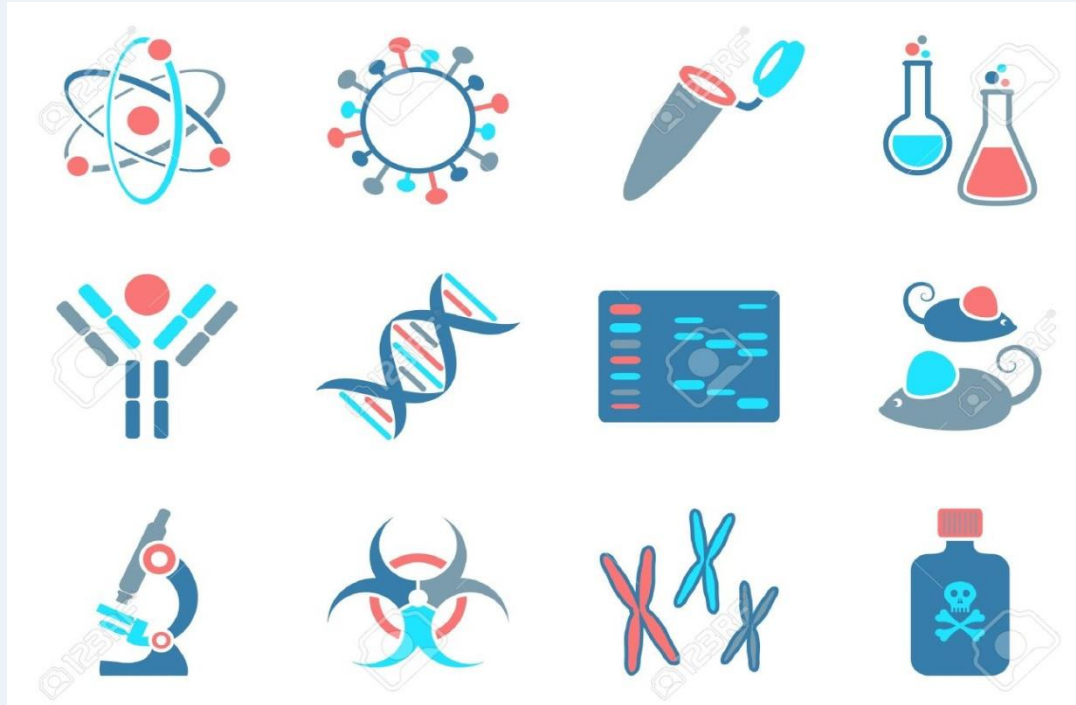


ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΓΕΝΕΤΙΚΗ – Ι



ΚΥΡΙΑΚΗ ΠΑΥΛΟΥ
ΜΕΛΟΣ ΕΔΙΠ

ΑΘΗΝΑ 2023

Μοριακή Βιολογία- Γενετική

Μοριακή Βιολογία

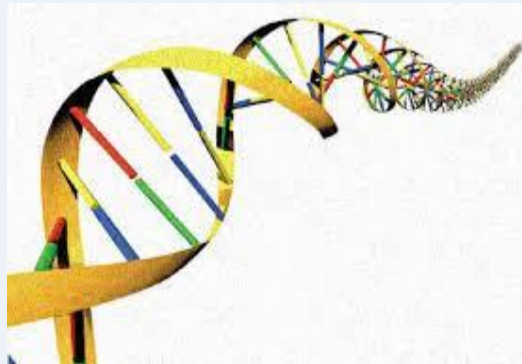
- Μελέτη της δομής, σύνθεσης, τροποποίησης, αποικοδόμησης, λειτουργίας και αλληλεπίδρασης των βιολογικά σημαντικών μακρομορίων (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες)
- Τους μοριακούς μηχανισμούς της λειτουργίας των κυττάρων και των οργανισμών

Γενετική

Μελέτη των γονιδίων, της γενετικής ποικιλομορφίας και της κληρονομικότητας σε σχέση με το πως δρουν, αποτυπώνονται και εκφράζονται σε έναν οργανισμό

Μοριακή Βιολογία

Στη δεκαετία του **1930** άρχισαν να διαφαίνονται οι πρώτες εκδηλώσεις του επιστημονικού πεδίου που πραγματεύεται σήμερα η Μοριακή Βιολογία, περισσότερο σαν γενικές ιδέες.



Ο Warren Weaver, τότε Διευθυντής του τμήματος Φυσικών επιστημών του ιδρύματος Rockefeller, εισήγαγε τον όρο «**Μοριακή Βιολογία**» σε μια έκθεσή του προς το ίδρυμα το 1938.

**ΠΑΛΑΙΟΝΤΟ
ΛΟΓΙΑ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ
ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΑ

ΚΑΡΚΙΝΟΣ

**ΜΟΡΙΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΙΑ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗ

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

**ΛΟΙΜΩΔΗ
ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

❖ Κατανόηση ασθενειών

(π.χ. Γενετικές Διαταραχές, Λοιμώξεις)

❖ Ταυτοποίηση διαγνωστικών δεικτών

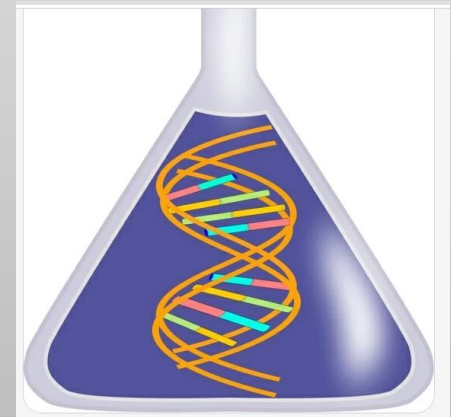
❖ Εύρεση θεραπευτικών στόχων

Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

Κατανόηση της λειτουργίας του κυττάρου και του οργανισμού

Μελέτη

- ❖ δομή του DNA
- ❖ λειτουργία των γονιδίων
- ❖ έκφραση των γονιδίων
- ❖ έκφραση των πρωτεϊνών



Εξεταζόμενο Υλικό: DNA-RNA

DNA

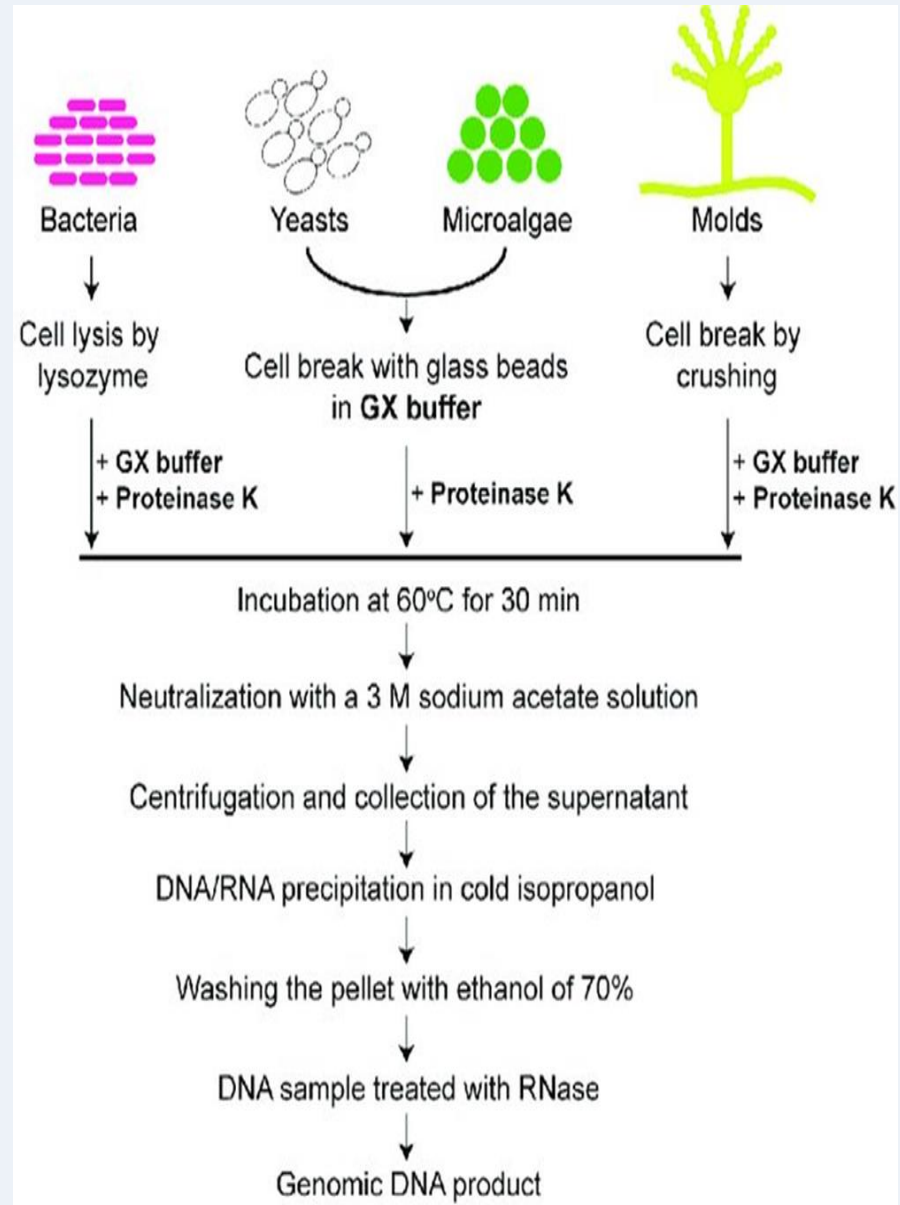
- Δίκλωνο
- Θυμίνη + 2' δεοξυριβόζη
- **Όχι Ιστοειδικότητα**
- Ανθεκτικό μόριο
- Απομονώνεται από βιολογικό υλικό π.χ αίμα, πτύελα, τρίχες
- Απλή διαδικασία απομόνωσης

RNA

- Συνήθως μονόκλωνο
- Ριβόζη + Ουρακίλη
- **Ιστοειδικότητα**
- Ευαίσθητο μόριο
- Συνήθως απομονώνεται από τον εξεταζόμενο ιστό
- Περισσότερο απαιτητική διαδικασία απομόνωσης

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

- ΥΠΕΡ-ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΟΚ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΑΝΙΟΝΙΚΩΝ ΑΠΟΡΡΥΠΑΝΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΣΠΑΣΙΜΟ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
- ΜΕ ΧΕΙΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ π.χ EDTA ΠΕΡΙΟΡΙΖΕΤΑΙ Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ
- ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ Κ ΚΑΙ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΜΕ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ
- ΛΗΨΗ ΤΗΣ ΥΔΑΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΤΑ ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΞΙΚΟΥ ΑΛΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΓΙΑ ΝΑ ΠΑΡΟΥΜΕ ΤΑ ΝΟΥΚΛΕΙΚΑ ΟΞΕΑ
- ΓΙΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ΚΑΘΑΡΟΥ DNA, ΚΑΤΑΣΤΡΕΦΟΥΜΕ ΤΟ RNA ΜΕ RNάση



ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

1. ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ –ΙΣΤΩΝ, ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ

BREAKING CELLS AND TISSUES

The first step in the purification of most proteins is to disrupt tissues and cells in a controlled fashion.

Using gentle mechanical procedures, called **homogenization**, the plasma membranes of cells can be ruptured so that the cell contents are released. Four commonly used procedures are shown here.

The resulting thick soup (called a **homogenate** or an **extract**) contains large and small molecules from the cytosol, such as enzymes, ribosomes, and metabolites, as well as all of the membrane-enclosed organelles.



1 Break cells with high-frequency sound.



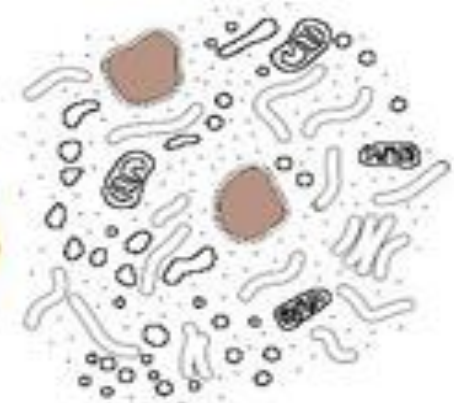
2 Use a mild detergent to make holes in the plasma membrane.



3 Force cells through a small hole using high pressure.



4 Shear cells between a close-fitting rotating plunger and the thick walls of a glass vessel.



When carefully conducted, homogenization leaves most of the membrane-enclosed organelles intact.

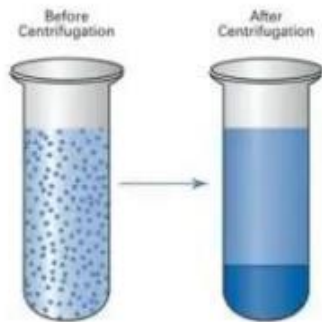
ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

2. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

Φυγοκέντρηση - centrifugation

1. Η φυγοκέντρηση είναι μέθοδος ευρείας χρήσης για τον **διαχωρισμό κυττάρων** ακόμα και υποκυτταρικών οργανιδίων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων.
2. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και για την **ανάλυση των φυσικών ιδιοτήτων** των μακρομορίων

Το δείγμα προς ανάλυση υποβάλλεται σε συνθήκες άσκησης φυγόκεντρος δύναμης



Υπερκείμενο - Supernatant: Το υγρό που μένει πάνω από το ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση

Pellet: το ίζημα που σχηματίζεται στον πυθμένα του σωλήνα μετά τη φυγοκέντρηση



- Τα σωματίδια που είναι διασκορπισμένα σε ένα υγρό μείγμα καθιζάνουν λόγω βαρύτητας ($1 \times g$) αν η πυκνότητά τους είναι μεγαλύτερη από αυτήν του μείγματος. **Χρονοβόρα διαδικασία για ένα εργαστήριο!**
- Ένα σωματίδιο θα μετακινηθεί μέσα σε ένα υγρό αν βρεθεί σε πεδίο φυγόκεντρης δύναμης. Η δύναμη που αναπτύσσεται στα σωματίδια είναι πολύ μεγαλύτερη από τη δύναμη της βαρύτητας

$$\text{Φυγόκεντρος δύναμη } F = m \omega^2 r$$

2. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

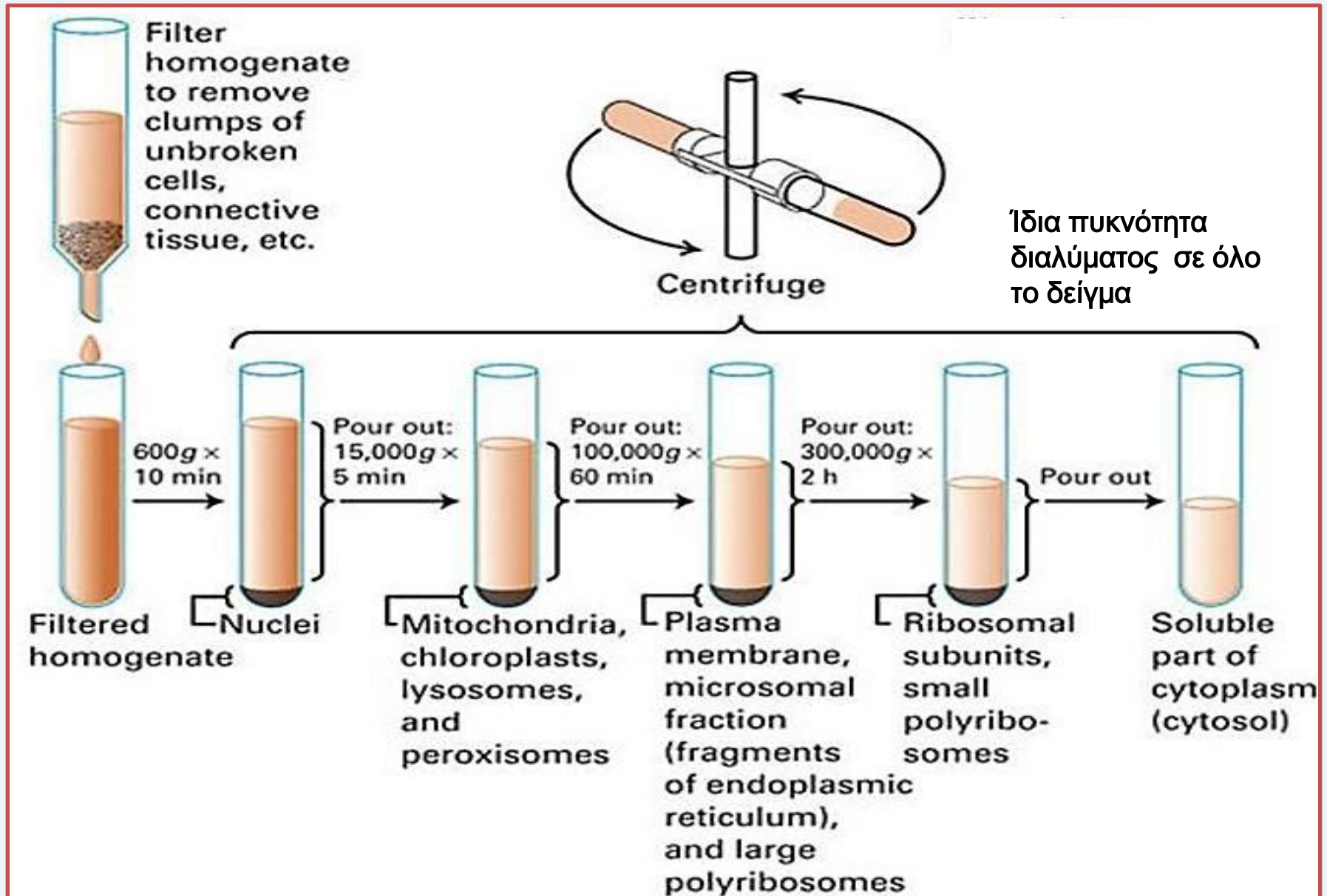
- **ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ:**

Διαδοχικές φυγοκεντρήσεις κάθε φορά με μεγαλύτερη ταχύτητα. Κάθε φορά συλλέγουμε το υπερκείμενο και ξαναφυγοκεντρούμε σε μεγαλύτερες στροφές.

- **ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΠΥΚΝΩΤΗΤΑΣ:**

Χρησιμοποιούμε συνεχή ή ασυνεχή βαθμίδωση πυκνότητας (συνήθως υδατικό διάλυμα σουκρόζης 15%-40%). Μετά τη φυγοκέντρηση τα διαφορετικής πυκνότητας συστατικά του δείγματος θα ισορροπούν σε διαφορετική θέση στο μήκος του σωλήνα ανάλογα με την πυκνότητά τους.

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ



ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

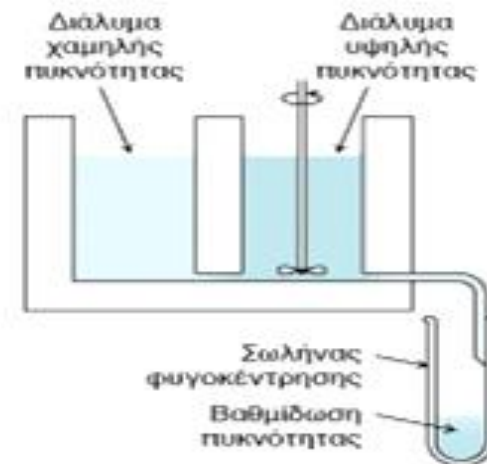
- Ο ρυθμός καθίζησης των συστατικών εξαρτάται από το μέγεθος του κάθε σωματιδίου και την πυκνότητά του.
- Αν έχουμε σωματίδια της ίδιας πυκνότητας θα καθιζάνουν πιο γρήγορα τα μεγαλύτερα σε μέγεθος
- Αν έχουμε σωματίδια ίδιου μεγέθους θα καθιζάνουν πιο γρήγορα τα πυκνότερα

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

3. Φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας (Density gradient centrifugation)

- Η δημιουργία μιας βαθμίδωσης πυκνότητας σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα επιτρέπει τον διαχωρισμό σωματιδίων με διαφορετικούς S .
- Η δημιουργία βαθμίδωσης συγκέντρωσης επιτυγχάνεται με υλικά όπως η σακχαρόζη, γλυκερόλη ή το ficoll που είναι ένας ουδέτερος πολυσακχαρίτης, μεγάλου μοριακού βάρους, με πολλές διακλαδώσεις, υδρόφιλος, υδατοδιαλυτός.

1. Αναμειγνύοντας ίσες ποσότητες ενός διαλύματος χαμηλής πυκνότητας (όπως 5% σακχαρόζη) και ενός διαλύματος υψηλής πυκνότητας (όπως 20% σακχαρόζη) επιτυγχάνουμε τη δημιουργία μιας γραμμικής βαθμίδωσης σακχαρόζης από 20% στον πυθμένα έως 5% στην κορυφή του σωλήνα



(A)

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

Βαθμίδωση διαλύματος σακχαρόζης 5-20%

Πυκνότητα₁ < πυκνότητα₂ < πυκνότητα₃ < πυκνότητα₄ < πυκνότητα₅ < πυκνότητα₆

Το δείγμα τοποθετείται στην κορυφή του φυγοκεντρικού σωλήνα ως λεπτή στοιβάδα

Στο τέλος της φυγοκέντρωσης τα σωματίδια έχουν διαχωριστεί ανάλογα με το μέγεθος και τη μάζα τους



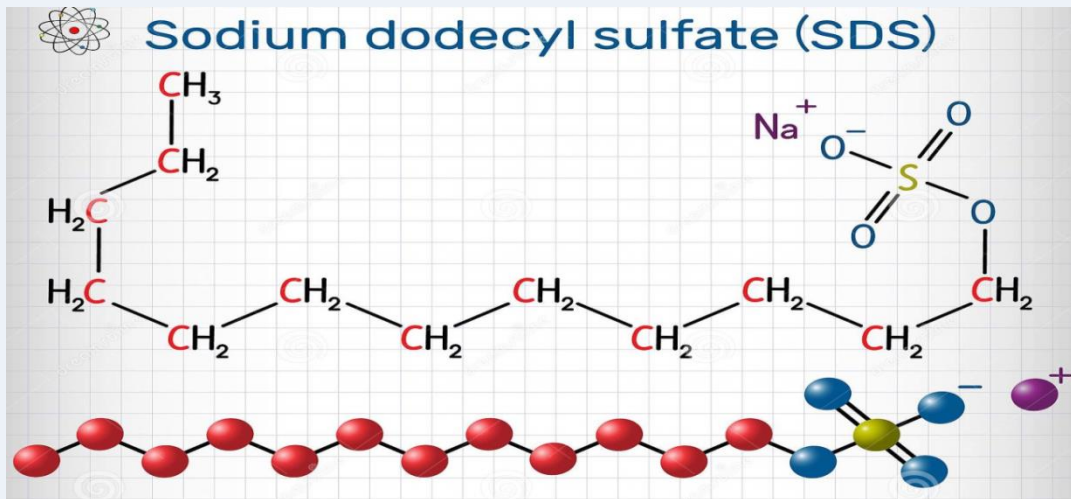
Τα σωματίδια μπορούν να συλλεχθούν στο τέλος της φυγοκέντρωσης ανοίγοντας μια οπή στον πυθμένα του σωλήνα

Η προτιμώμενη μέθοδος διαχωρισμού υποκυτταρικών σωματιδίων και μακρομορίων

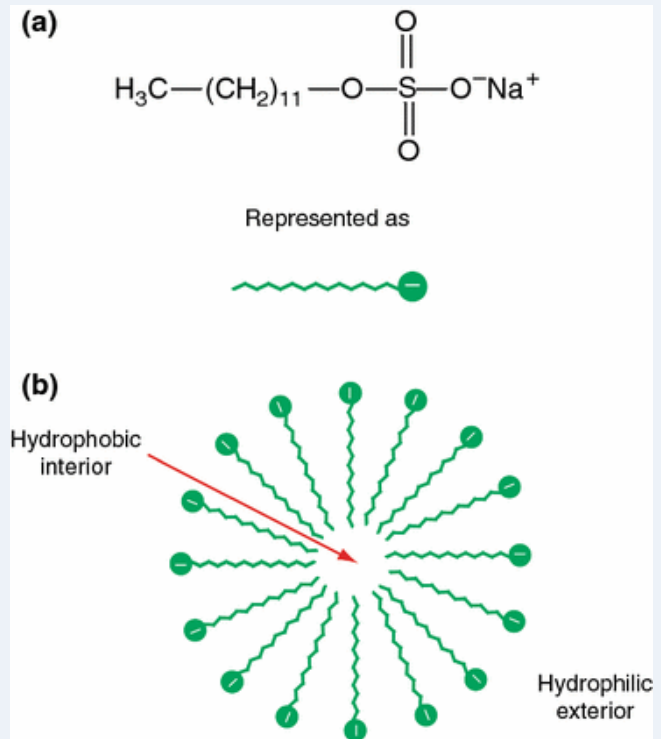
ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

3. ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΓΙΑ ΝΑ ΕΛΕΥΘΕΡΩΘΕΙ ΤΟ DNA ΣΤΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

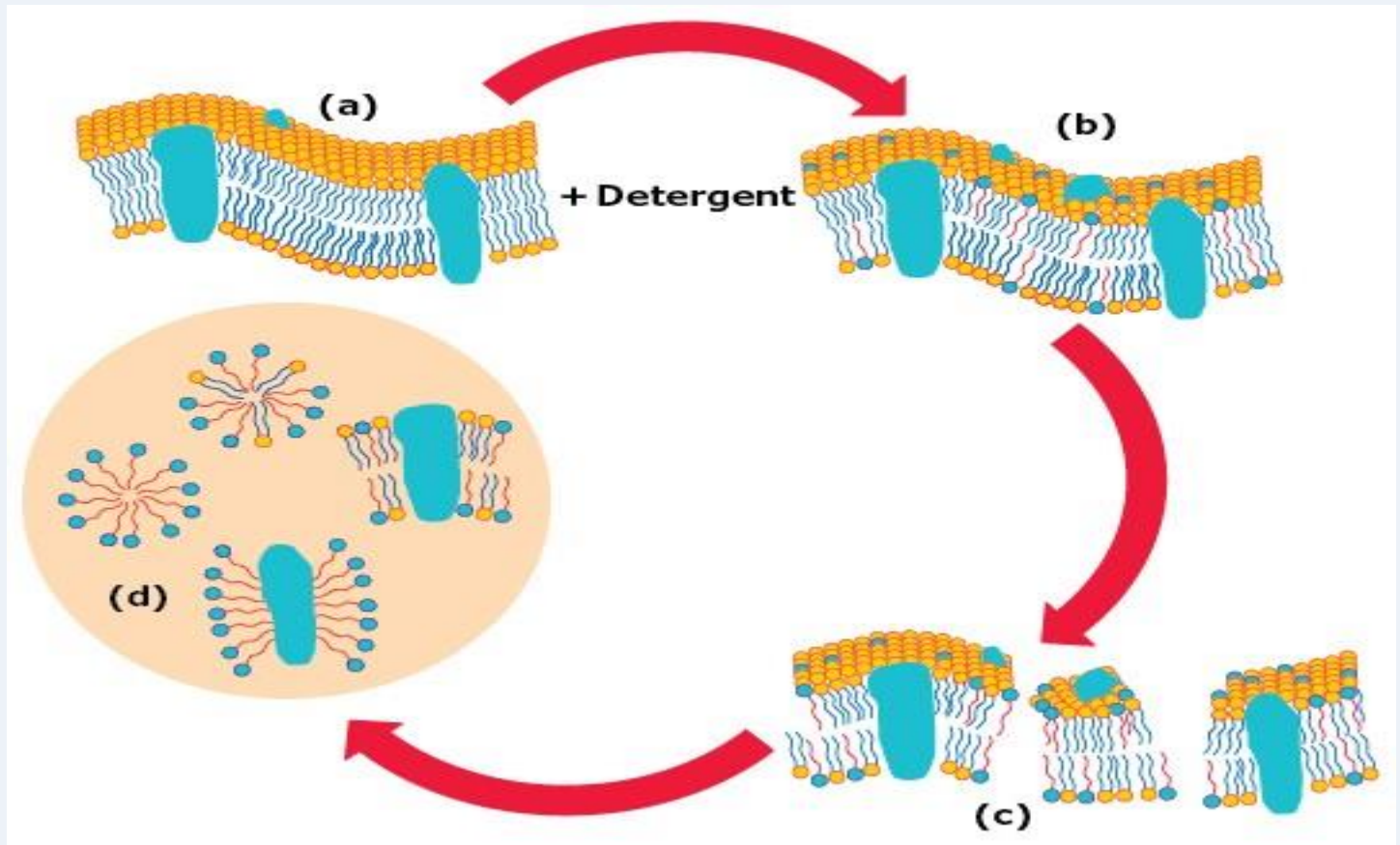
Διαλύματα που περιέχουν απορρυπαντικά, όπως το δωδεκυλοθειικό νάτριο Sodium Dodecyl Sulphate (SDS).



Αμφιπαθές μόριο, αποτελείται από μια υδρόφοβη ουρά και μια υδρόφιλη κεφαλή



SDS



- Διασπά τη συνοχή των φωσφολιπιδίων και δημιουργεί σύμπλοκα με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες καθιστώντας τες υδατοδιαλυτές
- Δεσμεύει και τις μη μεμβρανικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες
- Διαταράσσει τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών
- **Απομακρύνει τις ιστόνες από τα μόρια DNA**

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

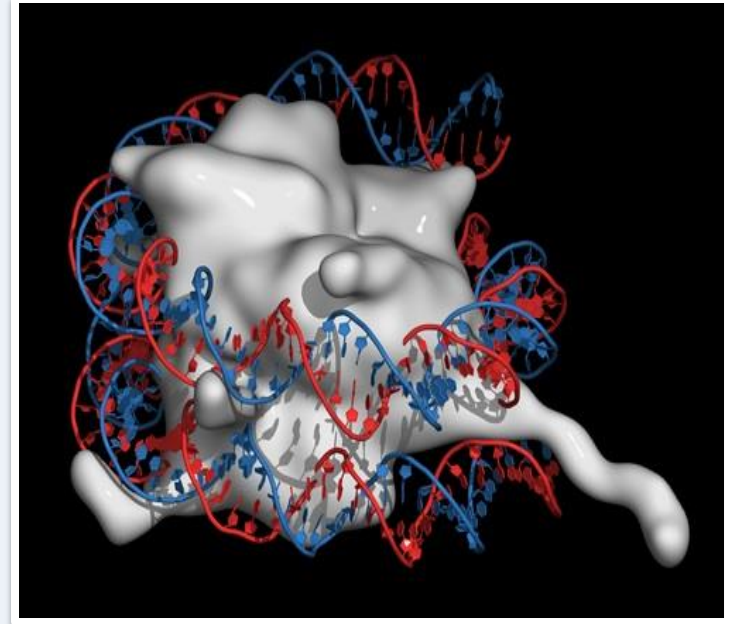
4. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

Το ένζυμο πρωτεΐνάση Κ

- Δρα έναντι ευρέος φάσματος ενδογενών πρωτεϊνών του κυττάρου και πήρε το όνομά της από την ιδιότητά της να διασπά την κερατίνη.
- Είναι μια πρωτεάση σερίνης, που αναγνωρίζει και διασπά τον πεπτιδικό δεσμό αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων.
- Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης από 50° C έως 70° C.
- Μετά την προσθήκη της στο διάλυμα, απενεργοποιεί αμέσως τις ενδογενείς νουκλεάσες (**DNAσες**) του κυττάρου, που μπορεί να κατακερματίσουν το DNA κατά τη διαδικασία απομόνωσης.
- Παραμένει δραστική ακόμη και παρουσία **SDS** και χηλικών παραγόντων όπως το Ethylenediaminetetraacetic acid (**EDTA**)

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

5. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ



Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται

- Με την προσθήκη διαλυμάτων αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης (100%) αιθανόλης
- Με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης - χλωροφορμίου
- Με πρόσδεση σε μεμβράνη ιοντοανταλλαγής
- Με πρόσδεση σε μαγνητικά/φορτισμένα σφαιρίδια

5. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

ΑΛΑΤΑ

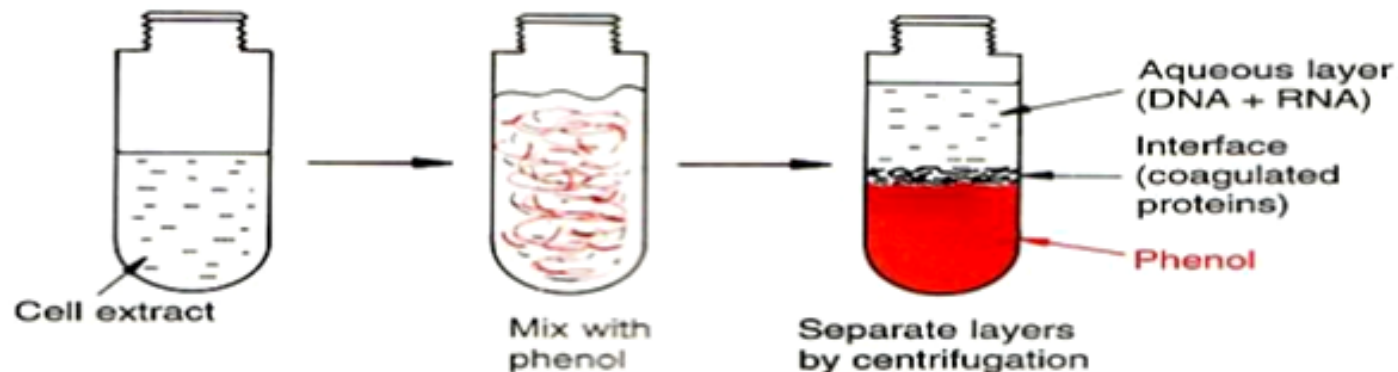
Sodium chloride, potassium acetate, ammonium acetate

- ❖ Οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων διασπούν τους δεσμούς του DNA με τα μόρια του νερού και το κάνουν λιγότερο υδρόφιλο – άρα και υδατοδιαλυτό
- ❖ Οι πρωτεΐνες αναδιατάσσονται και κατακρημνίζονται
- ❖ Φυγοκέντρωση
- ❖ Οι πρωτεΐνες καθιζάνουν με τη μορφή συσσωματωμάτων (πελέτας)
- ❖ Το υπερκείμενο περιέχει το DNA

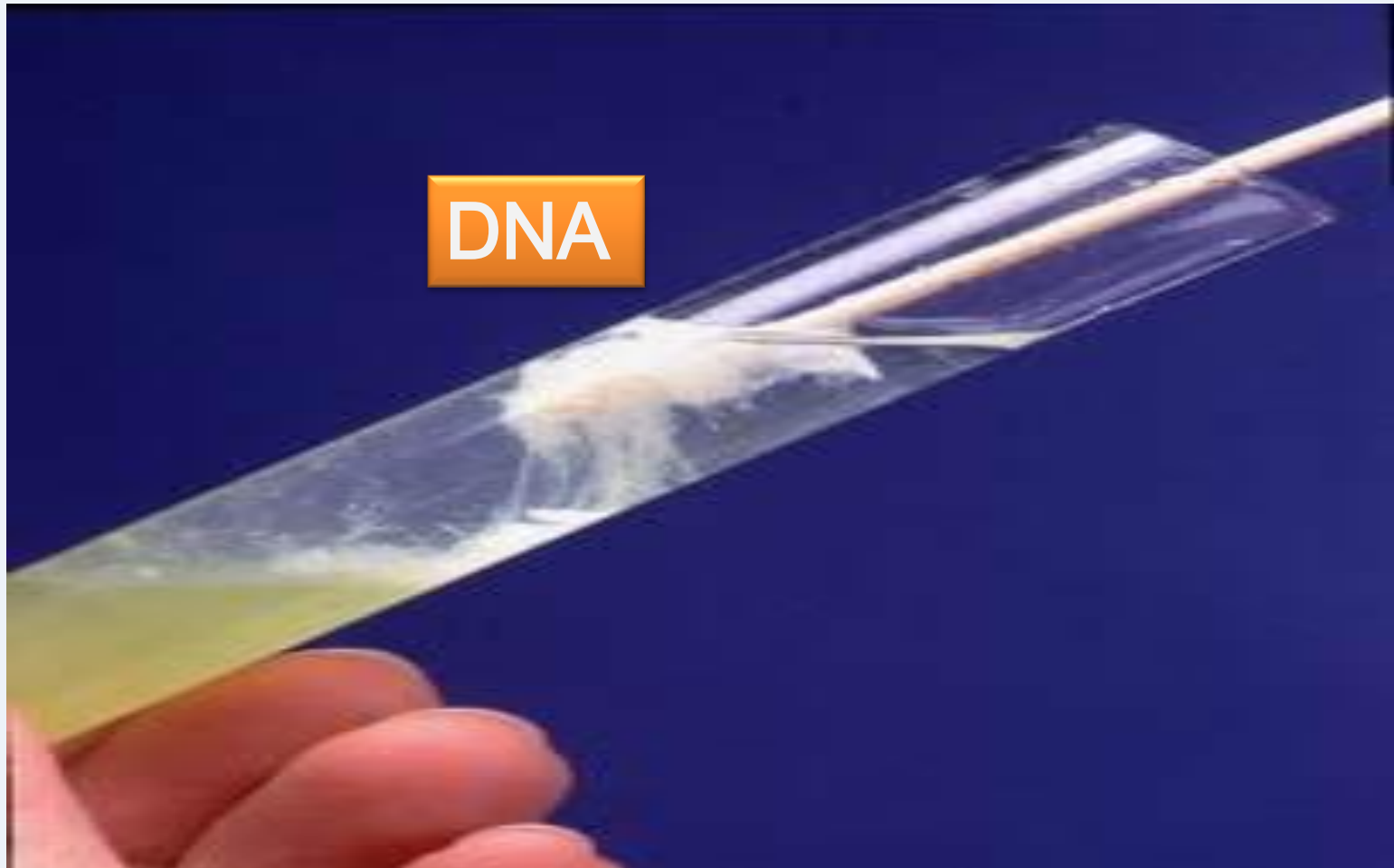
5. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Φαινόλη: Χλωροφόρμιο

- § Φαινόλη: Αποδιατάσει τις πρωτεΐνες και τις διαλυτοποιεί
- § Αποτέλεσμα: Δημιουργία δύο φάσεων στο διάλυμα
 - § Υδατική Φάση (άνω): DNA
 - § Οργανική Φάση (κάτω): πρωτεΐνες



5. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ



6. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ DNA

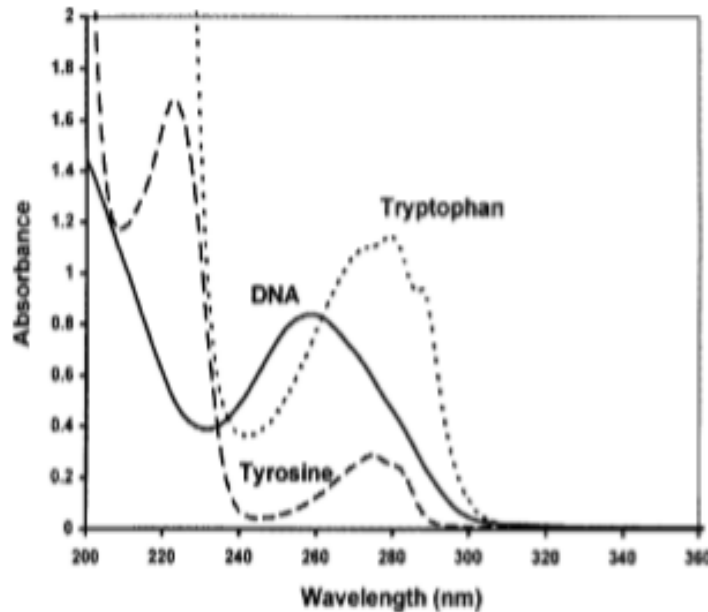
- ❖ Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 70%

Η προσθήκη της αιθανόλης παρουσία αλάτων προκαλεί δομικές αλλαγές στο μόριο του DNA, με αποτέλεσμα να κατακρημνίζεται εκτός διαλύματος και όταν η ποσότητά του είναι μεγάλη να γίνεται ορατό σαν μια λευκή κλωστή.

- ❖ Ανασύσταση του DNA σε διάλυμα TE /υπερκάθαρο νερό

Το διάλυμα Tris-EDTA (TE) είναι ένα ελαφρά αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8-9), που περιέχει EDTA. Το EDTA προστατεύει το DNA, δεσμεύοντας δισθενή ιόντα, όπως Mg^{2+} ή Ca^{2+} , που είναι απαραίτητα για τη δράση ενζύμων όπως οι νουκλεάσες (που διασπούν το DNA) και οι πρωτεάσες.

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ DNA



Αρωματικά αμινοξέα → $A_{\max} = 280 \text{ nm}$
DNA → $A_{\max} = 260 \text{ nm}$

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών βασίζεται στην ιδιότητα των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξικών καταλοίπων (τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη) να παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280nm. Αυτό συμβαίνει γιατί τα ηλεκτρόνια του αρωματικού δακτυλίου είναι απεντοπισμένα (είναι ελεύθερα να κινηθούν σε ολόκληρο το συζυγές σύστημα).

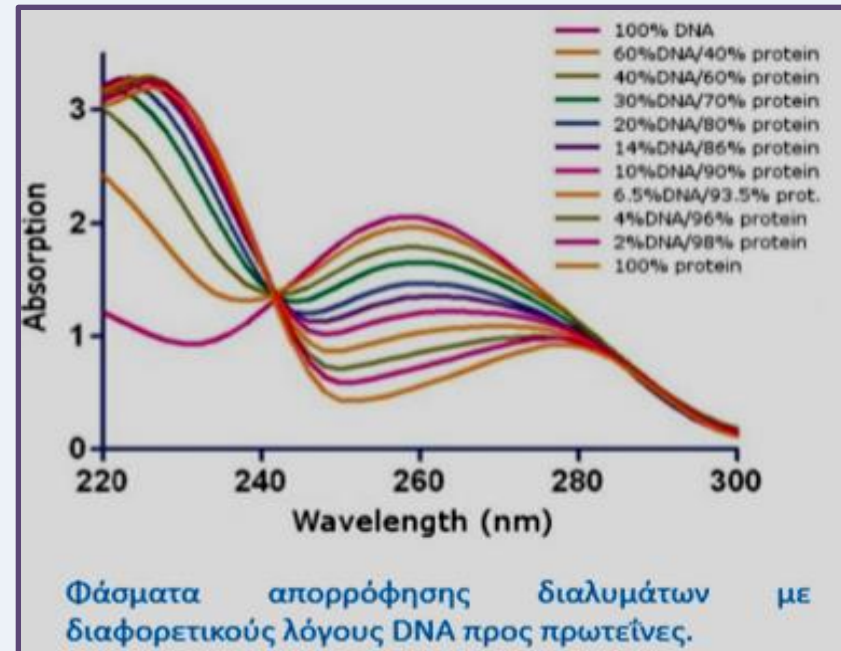
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ DNA

ΕΝΑ ΠΟΣΟΣΤΟ
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΑΝΤΑ ΘΑ
ΥΠΑΡΧΕΙ ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ

ΠΟΣΟ ΟΜΩΣ?

Η αναλογία DNA / πρωτεΐνης είναι ο δείκτης καθαρότητας του DNA και μπορεί να εκτιμηθεί από την μέτρηση απορρόφησης του δείγματος στα 260 και 280 nm

Σε καθαρό διάλυμα DNA
 $A_{260} / A_{280} = 1,8$



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

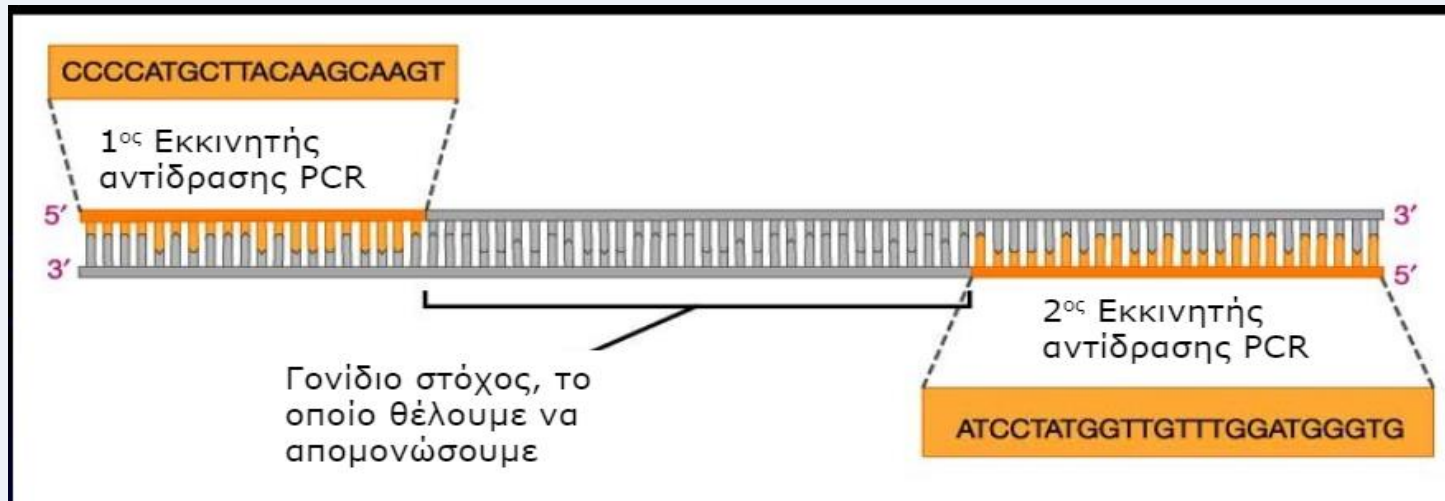
- in vitro μέθοδος για τον πολλαπλασιασμό **συγκεκριμένης** αλληλουχίας DNA (200-1000bp)
- in vitro μέθοδος κλωνοποίησης
- Δυνατότητα απόκτησης μεγάλης ποσότητας DNA για ανάλυση



Επαναλαμβανόμενες επώσεις σε διαφορετικές συνθήκες

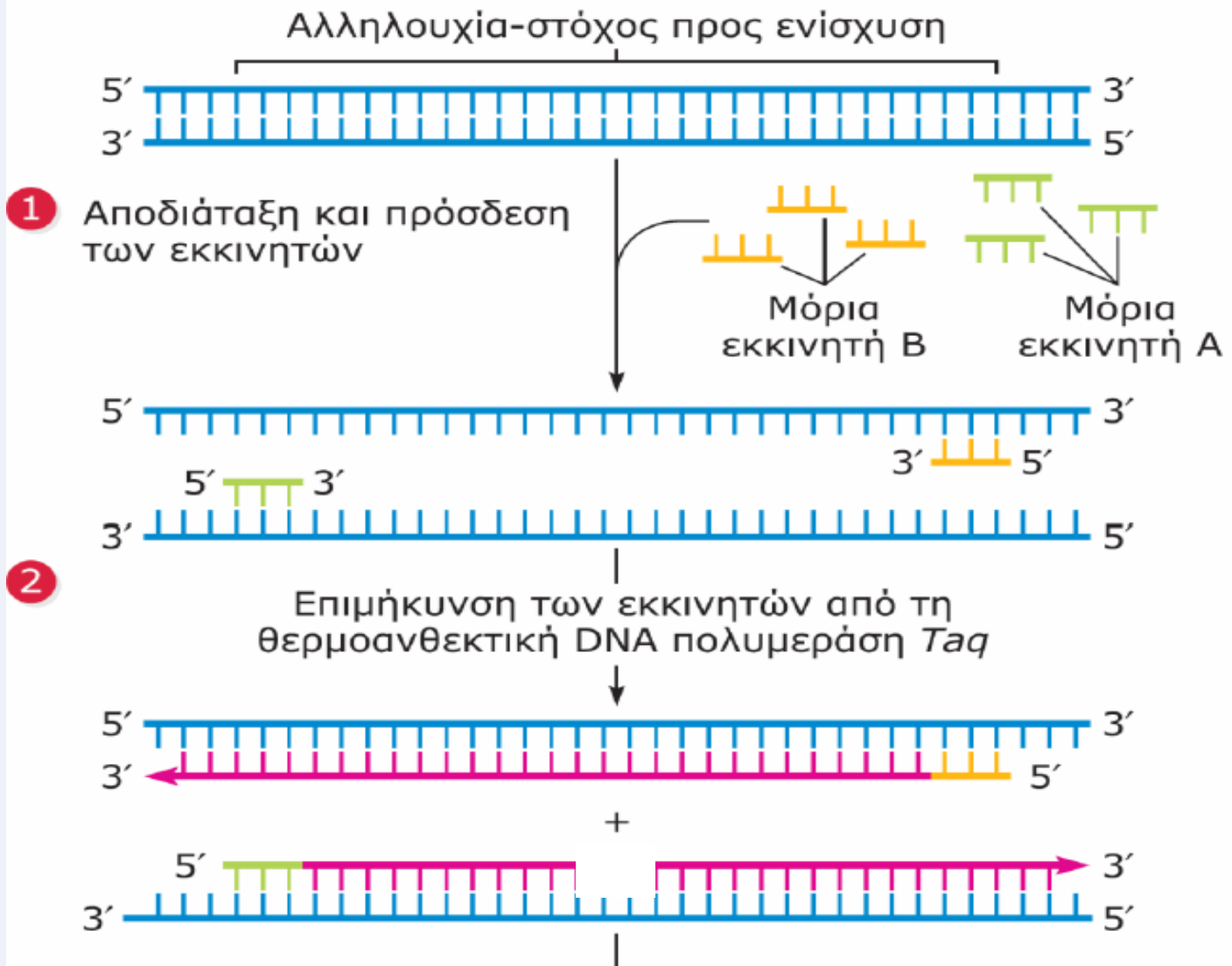
- Χρόνου
- Θερμοκρασίας

Απομόνωση της αλληλουχίας στόχου με χρήση συμπληρωματικών εκκινητών

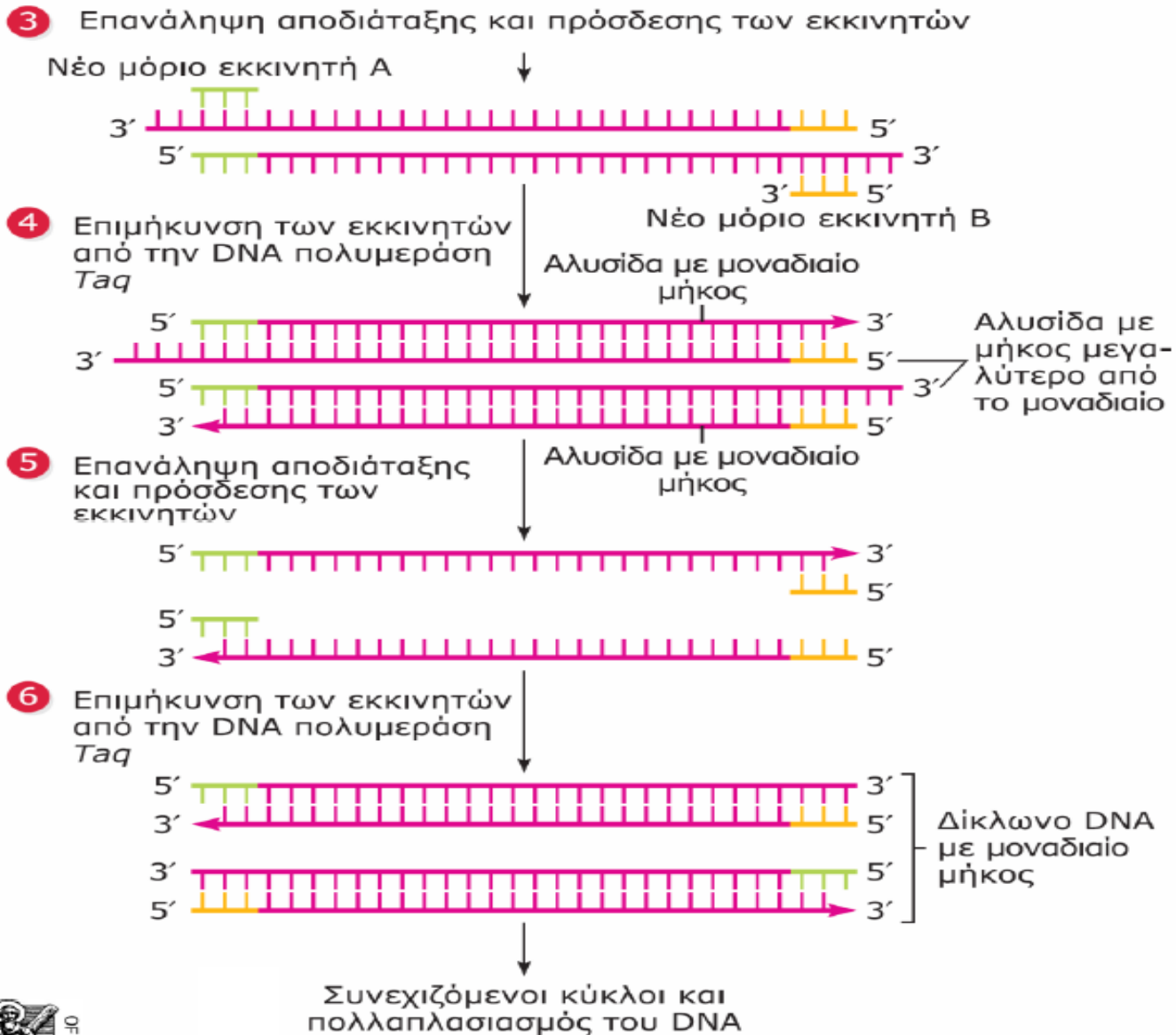


Στάδια της PCR

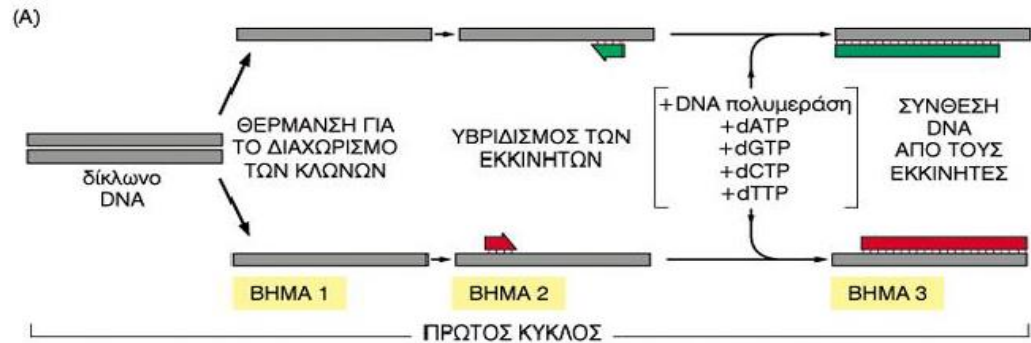
Αρχικό δίκλωνο DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο



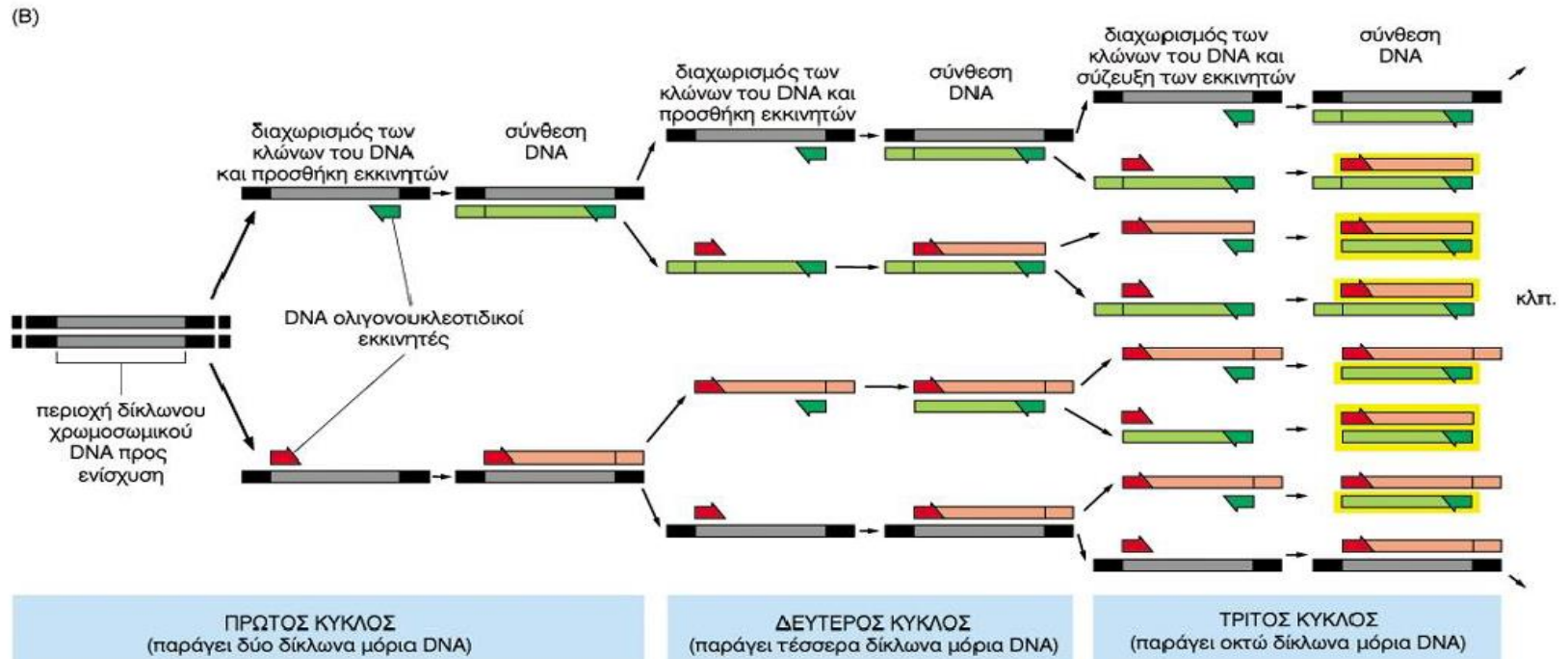
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

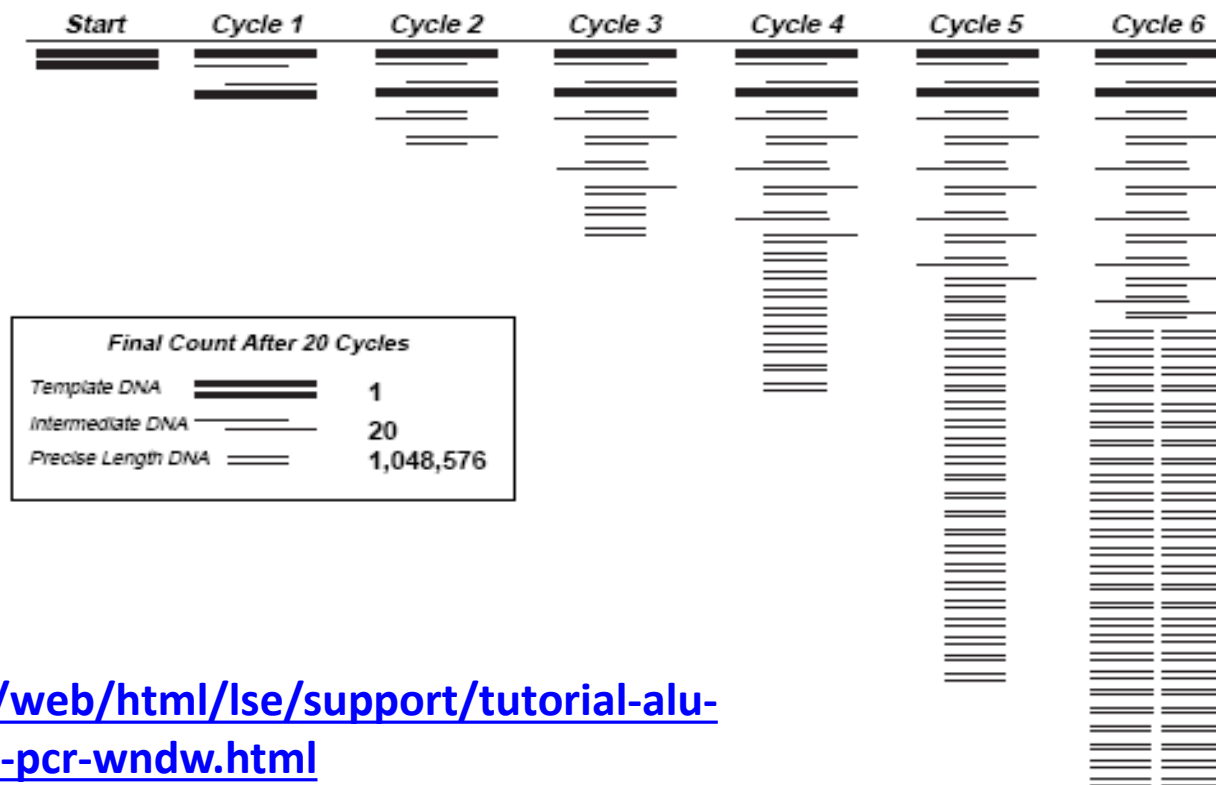


R



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

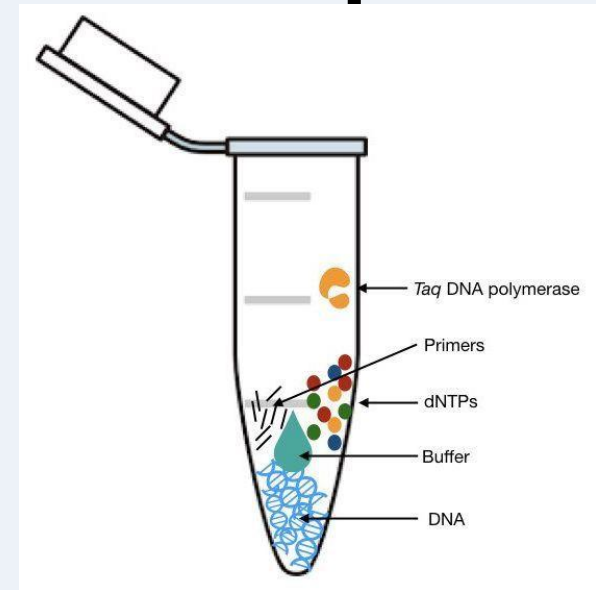
<https://www.bio-rad.com/webroot/web/movies/lse/global/english/what-is-polymerase-chain-reaction/tutorial.html>



<https://www.bio-rad.com/webroot/web/html/lse/support/tutorial-alu-pv92-detection-by-pcr-wndw.html>

Παράγοντες που επιδρούν στην PCR

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

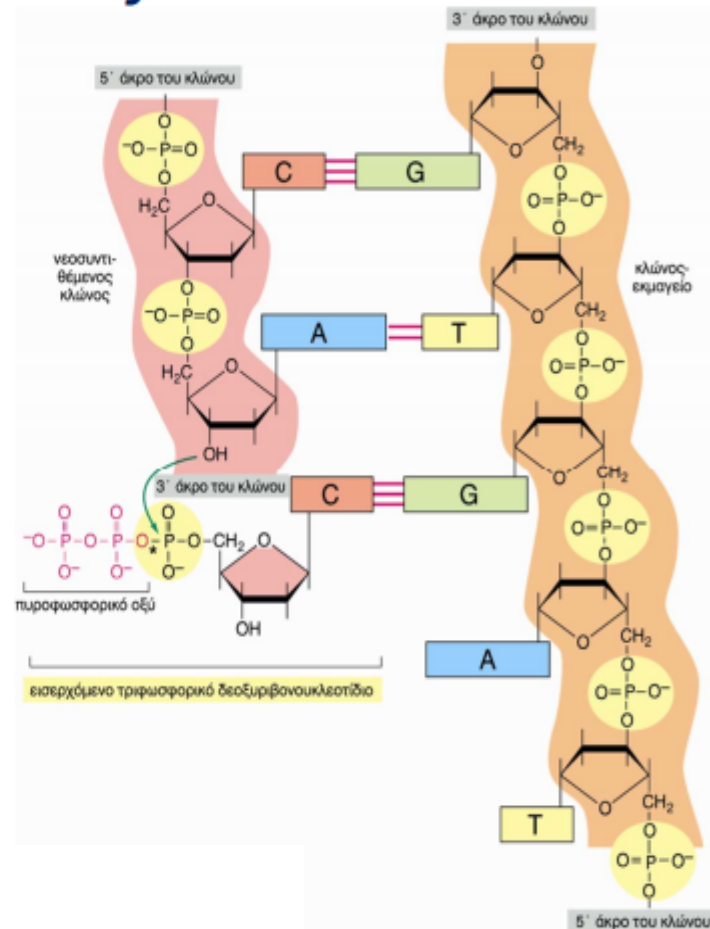


Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)



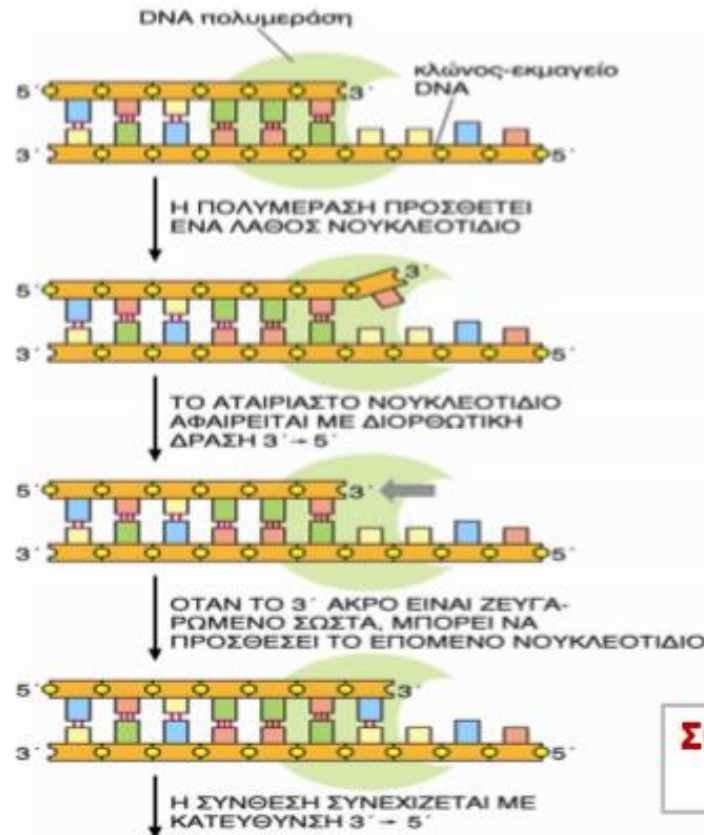
DNA-Πολυμεράσες

- Συνθέτουν ένα νέο κλώνο DNA ομόλογο μίας υπάρχουσας μήτρας DNA.
- Εκκινητής (primer): έναρξη πολυμερισμού.
- Βασική δράση: σύνθεση 5'→3'
- Διορθωτική δράση: 3'→5' (εξωνουκλεάση Proofreading)



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η DNA πολυμεράση ελέγχει την πιστότητα της αντιγραφής

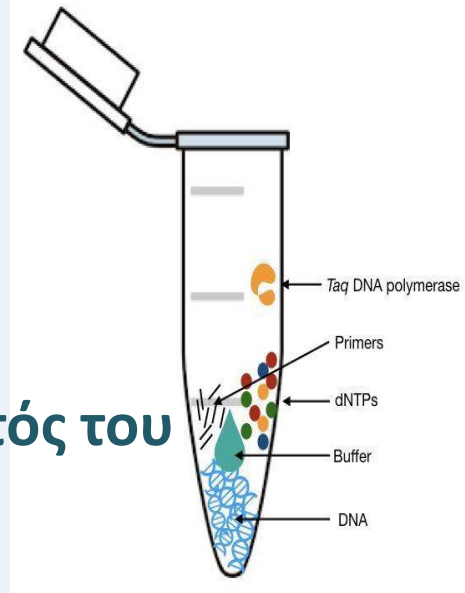


Proofreading
«διόρθωση
δοκιμίων»

**Συχνότητα λαθών:
1:10⁷ βάσεις**

Κριτήρια επιλογής εκκινητών

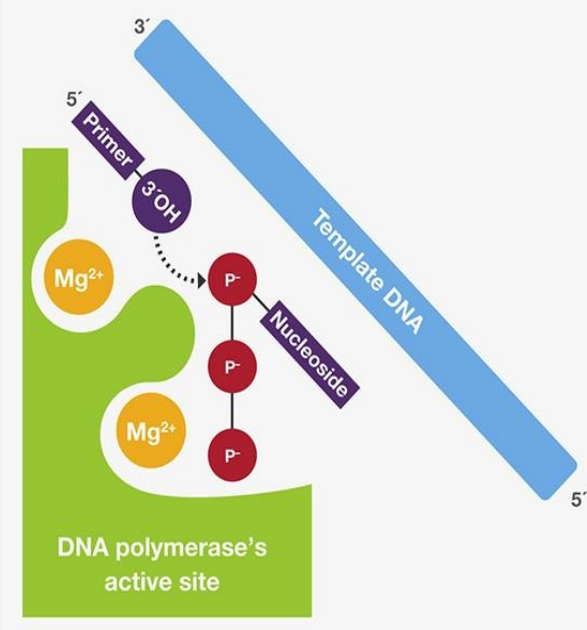
- Βέλτιστο μήκος 20-26 βάσεις (bp)
- περιεκτικότητα σε βάσεις G, C 40-60%
- αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών εντός του κλώνου των εκκινητών, ειδικά στο 3' άκρο
- αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών των εκκινητών με μη επιθυμητές αλληλουχίες DNA
- απόρριψη των εκκινητών που έχουν ομολογία με ανεπιθύμητες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



Θερμοκρασία υβριδισμού

- $T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$ (< 20bp)
- Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature), εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις G και C
- Θερμοκρασία 55°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

Συγκέντρωση ιόντων Mg^{+2}



- Συμπαράγοντας 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

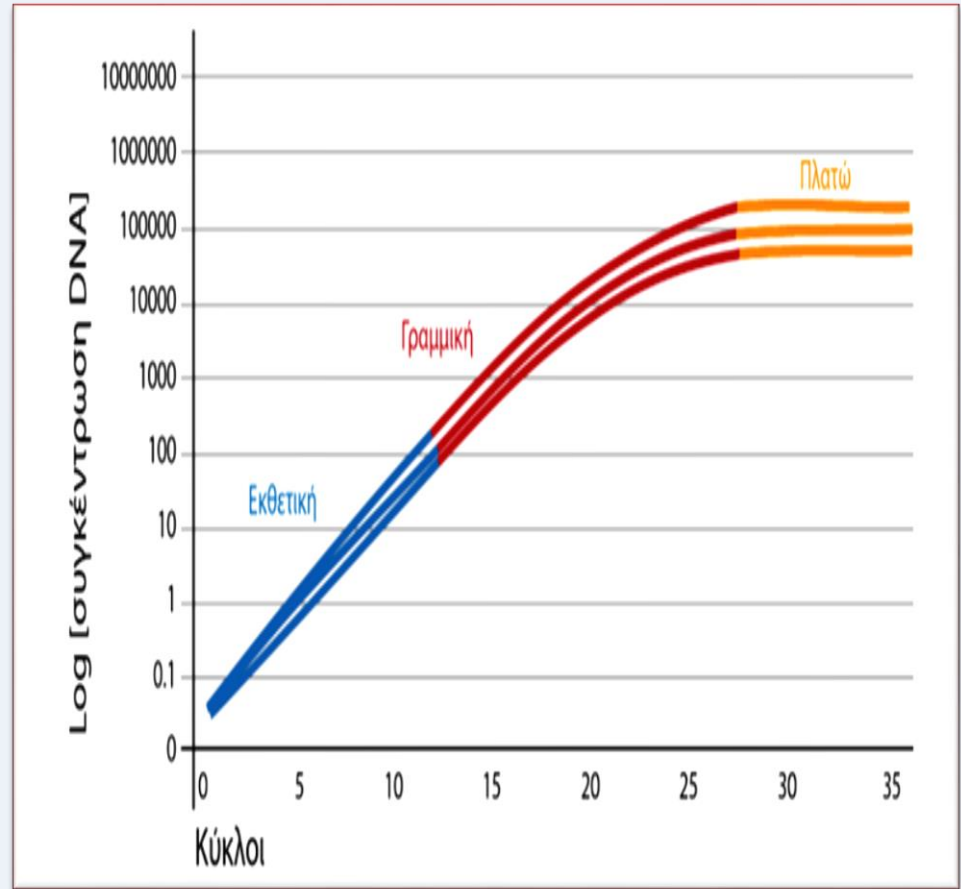


- Τα dNTPs αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA
- Οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200μM
- **Υψηλότερες συγκεντρώσεις** μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση
- Τα dNTPs ενώνονται με τα Mg^{+2} και το ποσό των dNTPs προσδιορίζει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

Φάσεις της αντίδρασης PCR

Η αντίδραση χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- στην αρχική **εκθετική φάση** τα προϊόντα της PCR σχηματίζονται με εκθετικό ρυθμό
- στην **γραμμική φάση** ο ρυθμός σύνθεσης επιβραδύνεται
- στη **φάση πλατώ** δεν συντίθενται πλέον νέα προϊόντα PCR



Φάση κορεσμού: πως προκύπτει

- Έλλειψη αρκετής ποσότητας αρχικού DNA εκμαγείου
- Ατελής σύνθεση νέων κλώνων
- Εξάντληση των εκκινητών και dNTPs
- Καταστροφή ή απενεργοποίηση των συστατικών της αντίδρασης σε υψηλές θερμοκρασίες
- Παρεμπόδιση της αντίδρασης από τα προϊόντα (πυροφωσφορικά και δίκλωνο DNA)
- Ανταγωνισμός των αντιδρώντων με μη ειδικά προϊόντα ή διμερή των εκκινητών (primer dimers)
- Επανασύνδεση του προϊόντος της PCR σε υψηλές συγκεντρώσεις ($>10^{-9}$ M) προ του υβριδισμού των εκκινητών
- Κορεσμός του ενζύμου σε συνδυασμό με μειωμένη ενεργότητα έπειτα από πολλούς κύκλους

Αναστολείς και ενισχυτές της αντίδρασης PCR

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

- φύση των βιολογικών δειγμάτων
- μέθοδος απομόνωσης του DNA
- χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του DNA
- ιοντικά επιφανειοδραστικά (SDS ισχυρός αναστολέας της Taq πολυμεράσης)

ΕΝΙΣΧΥΤΕΣ

φορμαμίδιο (5%), DMSO (<10%), PEG (5-15%), Tween-20 (0.1-2.5%), T4gene32 protein, γλυκερόλη (10-15%)

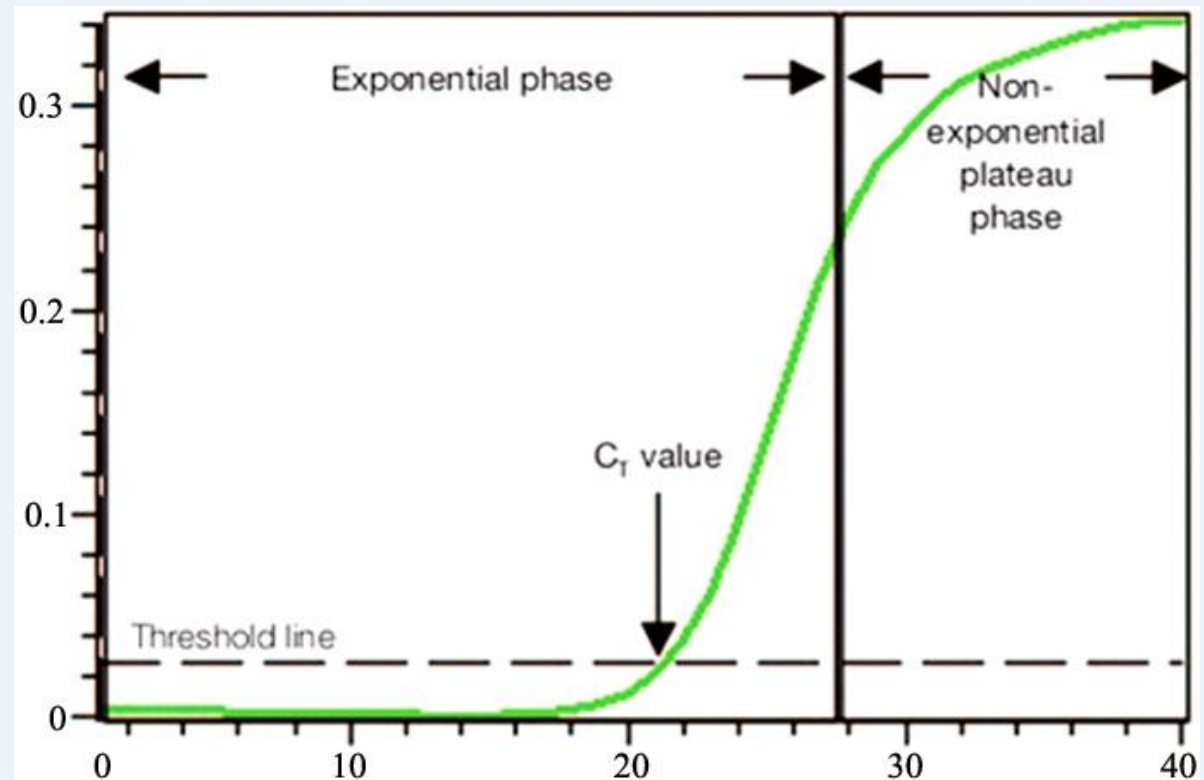
Τύποι PCR

- **RT-PCR (Reverse Transcription PCR):** Χρησιμοποιείται για την παραγωγή αντιγράφων cDNA από mRNA
- **Multiplex PCR:** Ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών στόχων
- **Nested PCR:** Δύο κύκλοι αντιδράσεων. Στον δεύτερο κύκλο ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται το προϊόν του πρώτου κύκλου.
- **Real Time PCR:**
 - ✓ ποσοτική εκτίμηση των αντιγράφων mRNA
 - ✓ ποσοτικοποίηση της έκφρασης του mRNA

Real Time PCR

Διαδικασία ενίσχυσης μιας αλληλουχίας DNA / cDNA με τη μέθοδο της PCR με ταυτόχρονη ποσοτική ανίχνευση του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης

- Ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με **φθορίζουσα ουσία**
- Μέτρηση της εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού

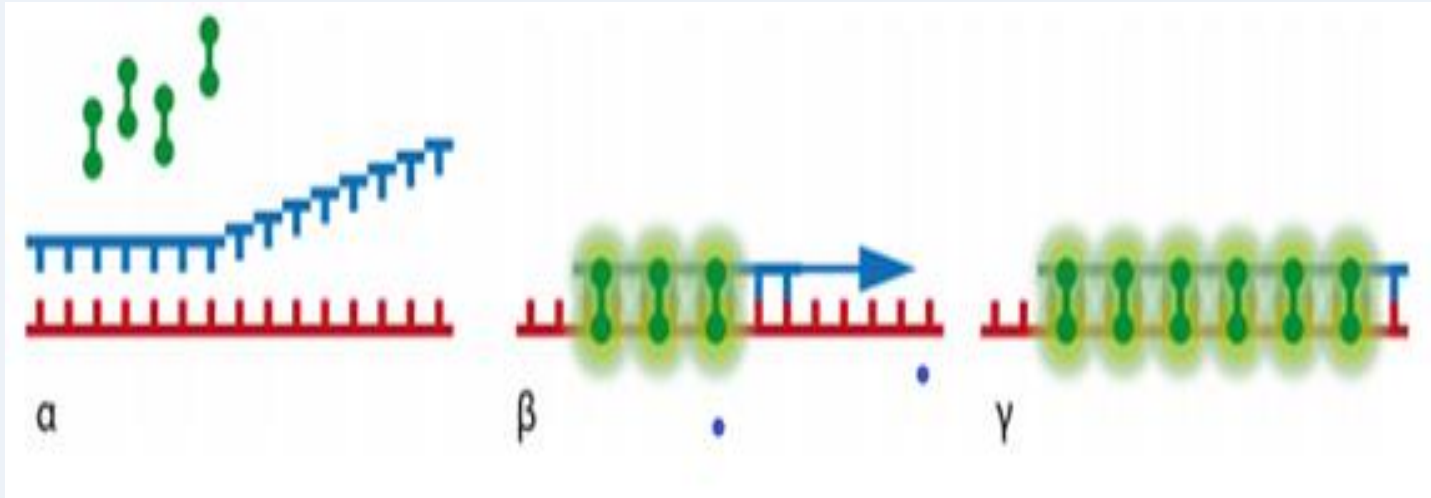


Real Time PCR

Οι ειδικές χρωστικές ενσωματώνονται στο προϊόν της αντίδρασης και εκπέμπουν φθορίζων σήμα που ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης

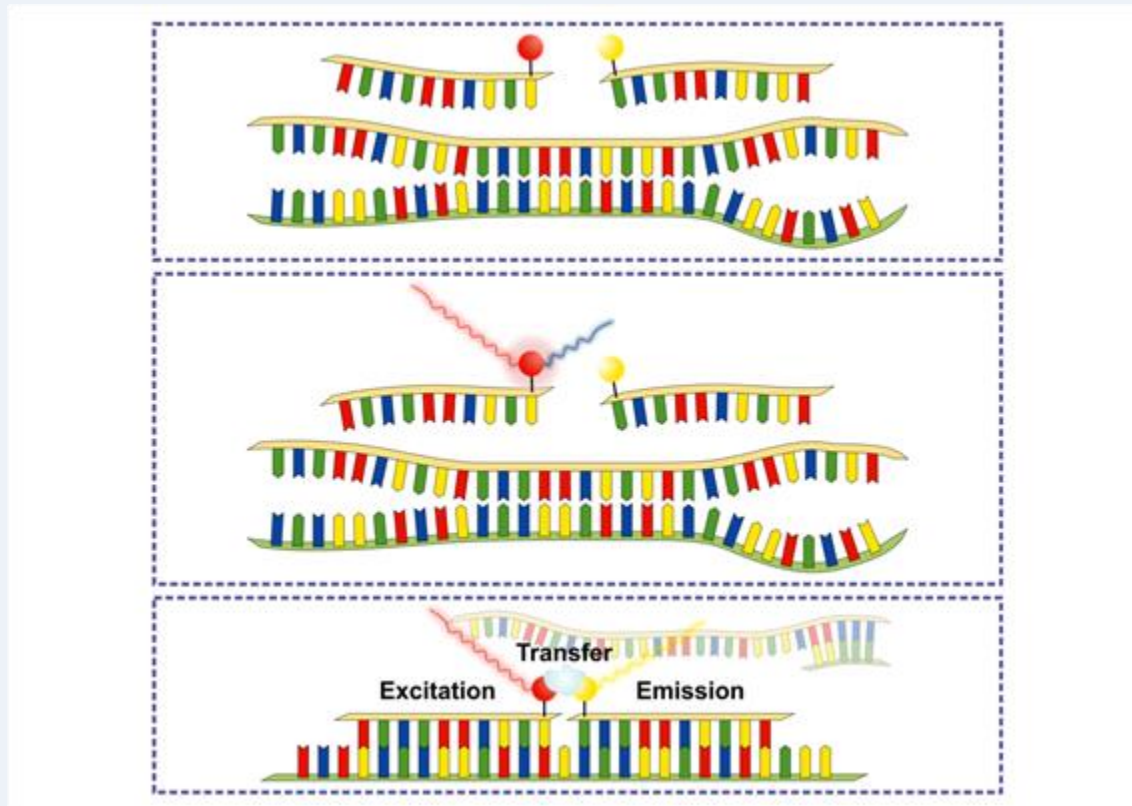
- ❖ Μη ειδικές χρωστικές (π.χ **Syber Green**)
- ❖ Ειδικές χρωστικές
 - i. Φθορίζοντες ανιχνευτές
 - ii. Υδρολυόμενοι φθορίζοντες ανιχνευτές (**Taq man probes**)

Χρωστική Syber Green



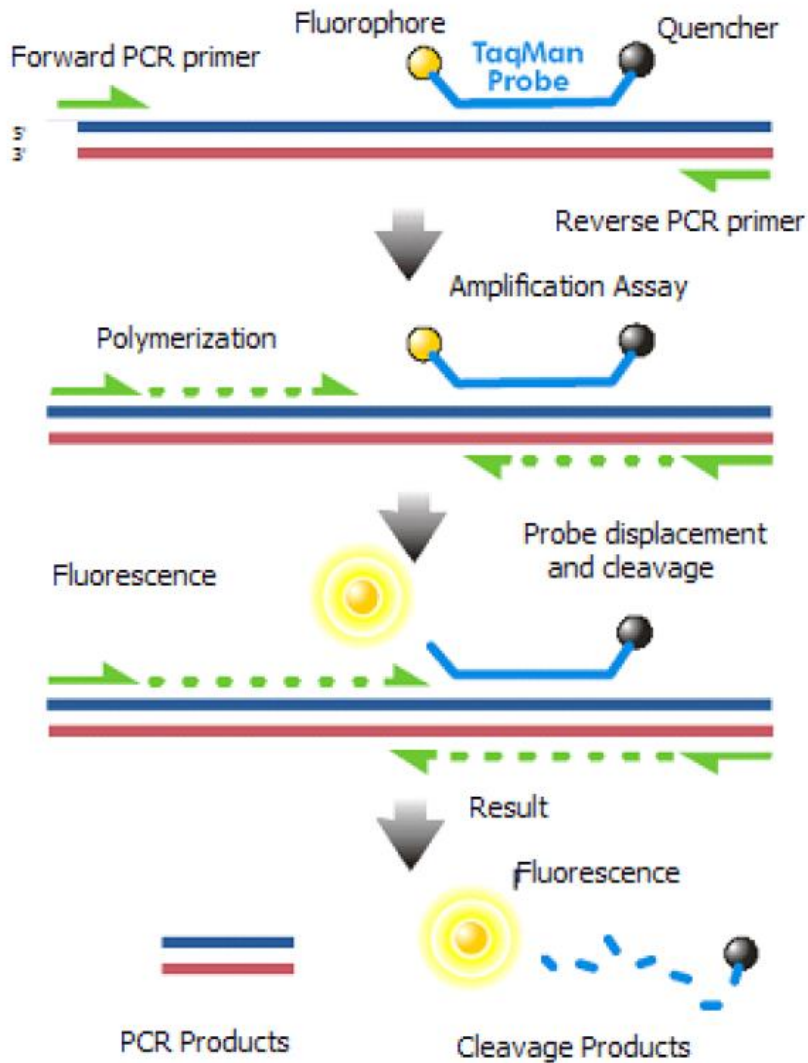
- ✓ Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός
- ✓ Ενσωματώνεται στο δίκλωνο μόριο dsDNA καθώς αυτό συντίθεται και φθορίζει μόνο όταν είναι συνδεδεμένη
- ✓ Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος

Φθορίζοντες ανιχνευτές



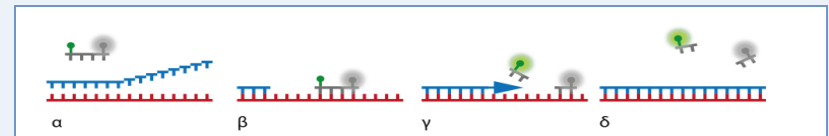
- Ειδικά σημασμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές υβριδοποιούνται σε γειτονικές περιοχές
- Όταν οι ανιχνευτές που είναι σε κοντινή απόσταση υβριδοποιούνται, τότε εκπέμπεται σήμα λόγω μεταφοράς ενέργειας μεταξύ των φωτοευαίσθητων μορίων

Υδρολύομενοι φθορίζοντες ανιχνευτές



■ Οι ανιχνευτές φέρουν στο 5' άκρο ένα φθορίζον μόριο και στο 3' άκρο ένα μόριο παρεμπόδισης φθορισμού. Το δεύτερο μόριο χρωστικής εξουδετερώνει το σήμα από το πρώτο.

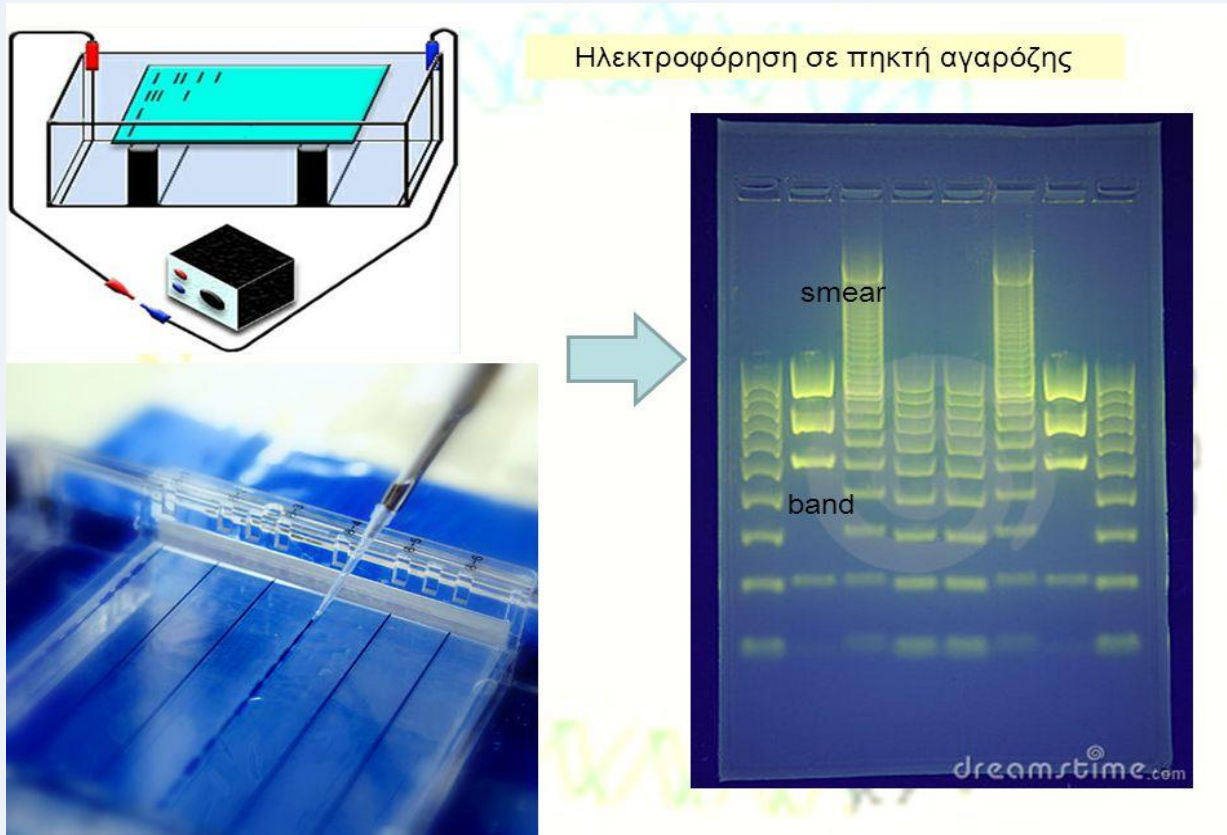
■ Ο πολυμερισμός κατά την αντίδραση ενίσχυσης, οδηγεί στην αποκοπή του άκρου του ανιχνευτή, από την 5'→3' εξωνουκλεολυτική δράση της πολυμεράσης και στη διακοπή της εξουδετέρωσης του σήματος, με αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού



Εφαρμογές της ποσοτικής Real Time PCR

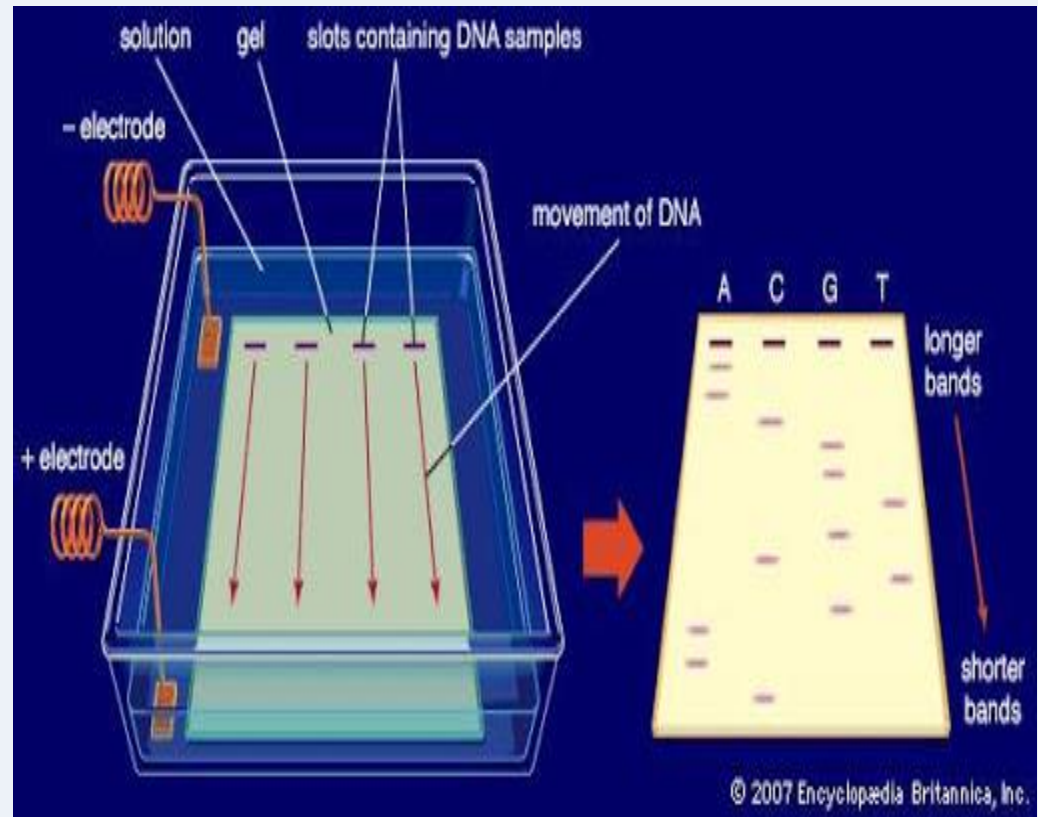
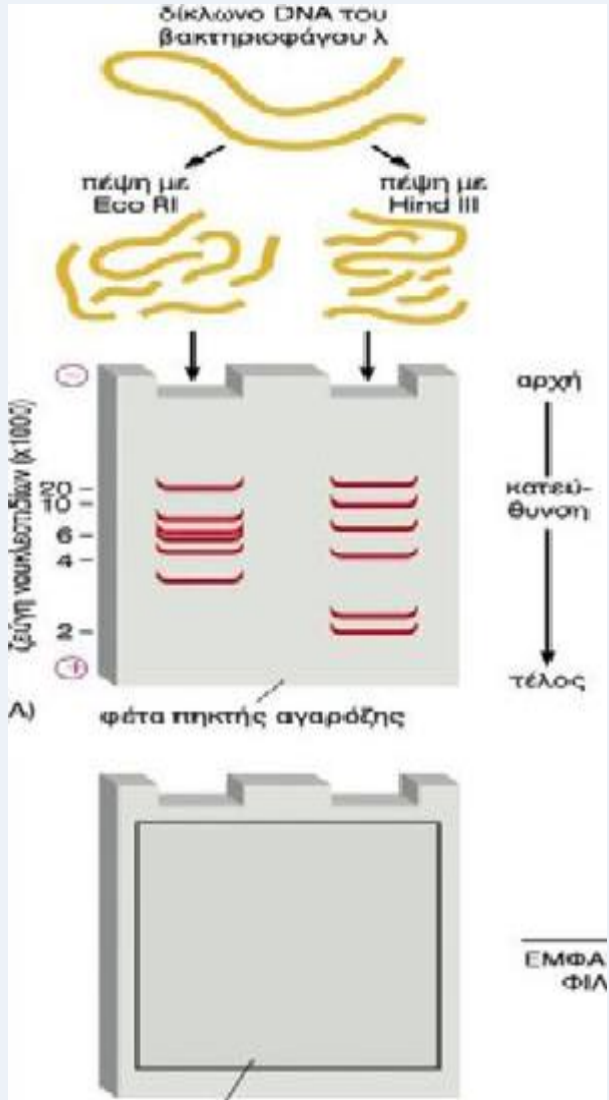
- ✓ Ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης γονιδίων
- ✓ Ανάλυση DNA μεταλλάξεων
- ✓ Μέθοδος αναφοράς για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με άλλες μεθόδους (π.χ. μικροσυστοιχίες)
- ✓ Ανάλυση GMOs (genetically modified organisms)
- ✓ Ανάλυση Single nucleotide polymorphisms

Ηλεκτροφόρηση DNA



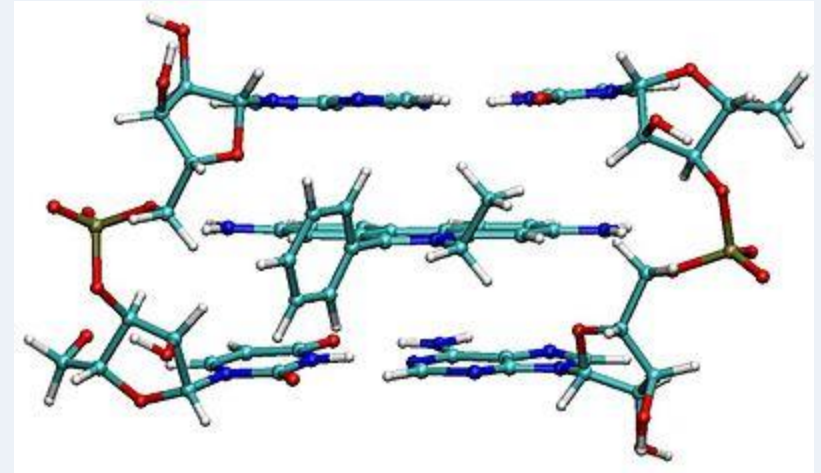
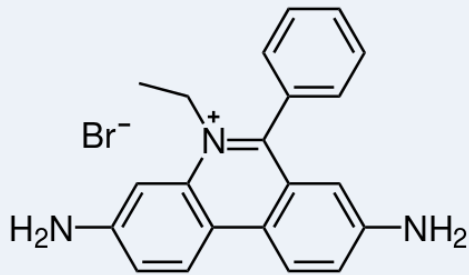
- Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο
- Με την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου το DNA θα μετακινηθεί προς τον θετικό πόλο
- Διαχωρισμός με βάση το Μοριακό Βάρος
- Το DNA γίνεται ορατό με φθορίζουσες χρώσεις (Ethidium Bromide)

Διαχωρισμός DNA με ηλεκτροφόρηση



Ανάγνωση του αποτελέσματος

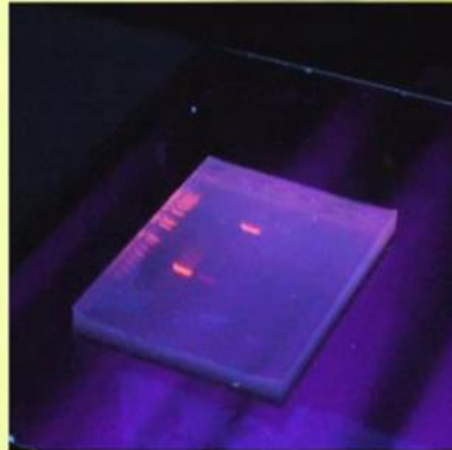
EtBr (βρωμιούχο αιθίδιο)



Χωρίς UV



Με UV



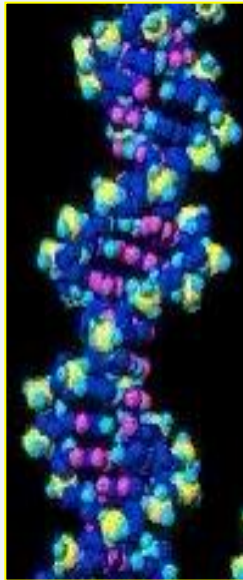
Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ δύο ζευγών βάσεων αδενίνης-θυμίνης

Ως αποτέλεσμα της διέγερσης με υπεριώδες φως, το EtBr εκπέμπει πορτοκαλί φως με μήκος κύματος 605 nm μετά τη δέσμευση στο DNA

Τζελ Πολυακρυλαμιδίου

VS

τζελ αγαρόζης



Τζελ Πολυακρυλαμιδίου

- Έχει σφικτό σταθερό ικρίωμα
- Ιδανικό για διαχωρισμό πρωτεϊνών
- Μικρότερο μέγεθος πόρου σε σχέση με την αγαρόζη
- Οι πρωτεΐνες είναι αρκετά μικρότερες από το DNA
 - Μέσο βάρος αμινοξέως = 110 daltons
 - Μέσο βάρος ζεύγους νουκλεοτιδίου = 649 daltons
 - 1 kilobase of DNA = 650 kD
 - 1 kilobase of DNA encodes 333 amino acids = 36 kD

Το τζελ αγαρόζης χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό DNA εάν και κάποιες φορές χρειάζεται η χρήση του τζελ Πολυακρυλαμιδίου για μεγαλύτερη ακρίβεια

VIDEO

https://www.biorad.com/webroot/web/html/Is_e/support/tutorial-alu-pv92-detection-by-pcr-wndw.html

[**https://www.youtube.com/watch?v=tcPgdR9_t64&ab_channel=TheJacksonLaboratory**](https://www.youtube.com/watch?v=tcPgdR9_t64&ab_channel=TheJacksonLaboratory)

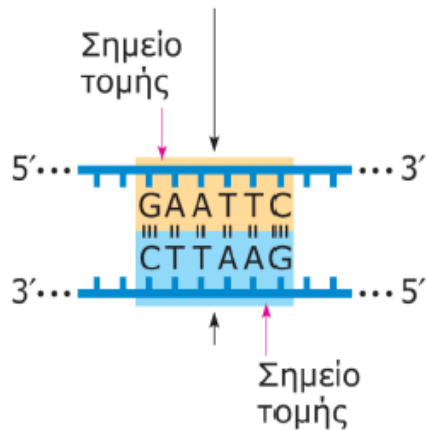
Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- Λέγονται "ενδονουκλεάσες" γιατί κόβουν το [DNA](#) στο εσωτερικό του μορίου και "περιοριστικές" γιατί η δραστηρότητά τους περιορίζεται στο "ξένο" DNA, συμμετέχοντας στο μηχανισμό άμυνας των ξενιστών έναντι των "εισβολέων".
- Είναι ένζυμα που **παράγονται από βακτήρια** για την προστασία τους από παθογόνους οργανισμούς, κυρίως βακτηριοφάγους.
- Διασπών το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, αφού αναγνωρίσουν μικρού μεγέθους χαρακτηριστικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων **«Βιολογικά ψαλίδια»**
- **Στόχευση κυρίως παλίνδρομων αλληλουχιών**
- Η ανακάλυψή τους επέτρεψε την ανάπτυξη πολλών εφαρμογών in vitro χειρισμού του DNA μεταξύ των οποίων η κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε φορείς και η δημιουργία βιβλιοθηκών.
- Μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι η **EcoRI** που απομονώνεται από το βακτήριο **Escherichia coli**
- Ονομασία βάση του μικροοργανισμού π.χ. EcoRI = Escherichia (E) coli (co) στέλεχος R(R). Το I αναφέρεται στο 1ο ένζυμο που απομονώθηκε από τον μικροοργανισμό



Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η αλληλουχία είναι συμμετρική



Πέψη με
EcoRI

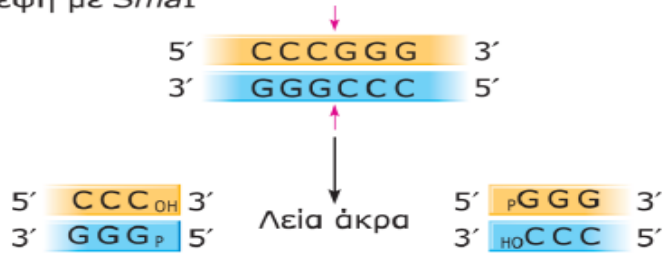


Θέση περιορισμού συμμετρική ως προς τον άξονα που περνά από το μέσο της. Στην εικόνα φαίνεται η θέση αναγνώρισης της *EcoRI*. Η αλληλουχία είναι παλίνδρομη: είναι ίδια και στις δύο αλυσίδες του DNA όταν διαβάζεται στην ίδια κατεύθυνση (στο παράδειγμα αυτό είναι 5' GAATTC 3').

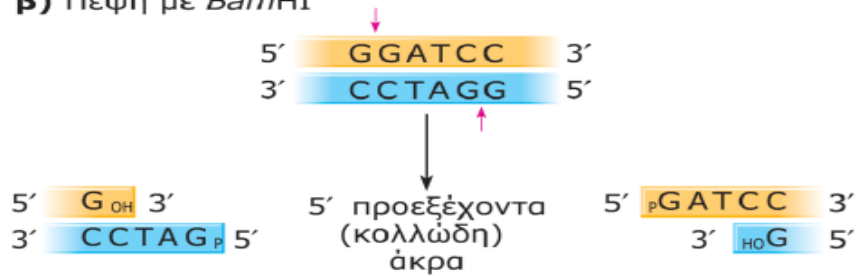
W. Arber, D. Nathans, H. Smith...Nobel Prize 1978.

Τα ένζυμα περιορισμού δημιουργούν δίκλωνα ή μονόκλωνα άκρα

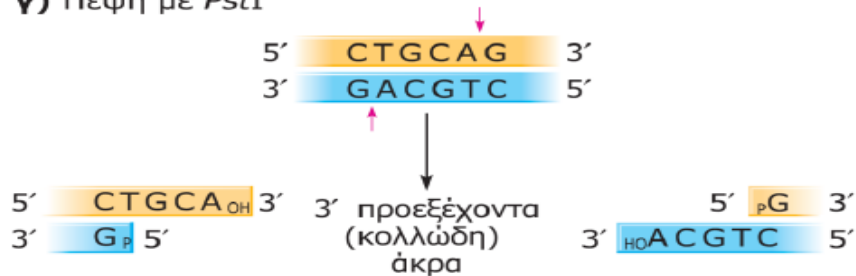
α) Πέψη με *Sma*I



β) Πέψη με *Bam*HI



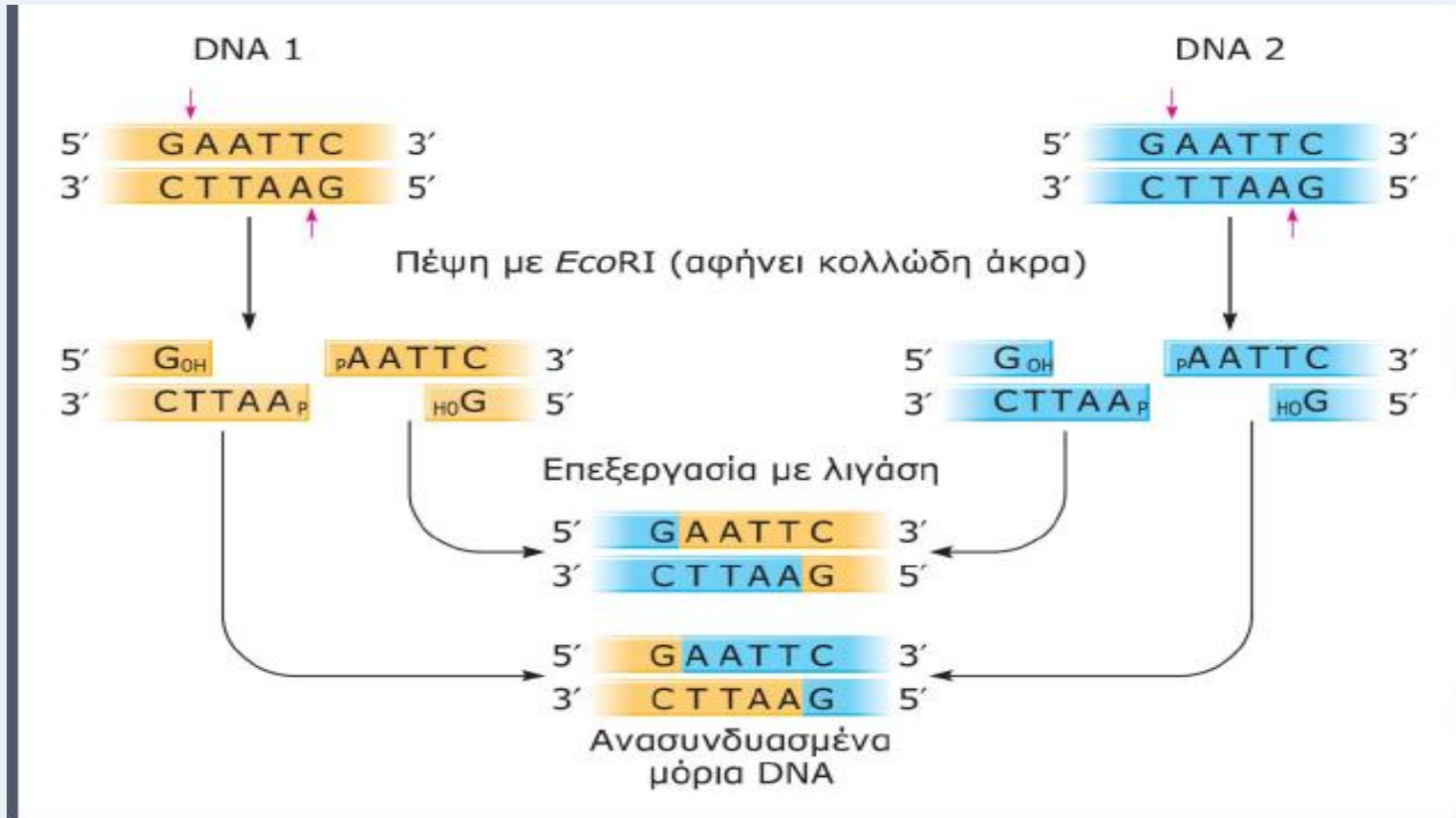
γ) Πέψη με *Pst*I



Παραδείγματα του τρόπου με τον οποίο τα ένζυμα περιορισμού κόβουν το DNA.

(α) Η *Sma*I δημιουργεί λεία άκρα. (β) Η *Bam*HI δημιουργεί προεξέχοντα 5' μονόκλωνα (κολλώδη) άκρα. (γ) Η *Pst*I δημιουργεί προεξέχοντα 3' μονόκλωνα (κολλώδη) άκρα.

Κατασκευή συνεκτικών άκρων σε δυο μόρια DNA και σύνδεση μεταξύ τους



Η δυνατότητα αυτή χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε φορείς

Εφαρμογές Περιοριστικών ενδονουκλεασών

- Η κλωνοποίηση DNA
- Η κατασκευή βιβλιοθηκών DNA
- Η ανίχνευση πολυμορφισμών
- Το αποτύπωμα DNA (DNA fingerprint)
- Η δημιουργία χαρτών του DNA
- Η μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων
- Η επεξεργασία του DNA

Βάση δεδομένων **REBASE** <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

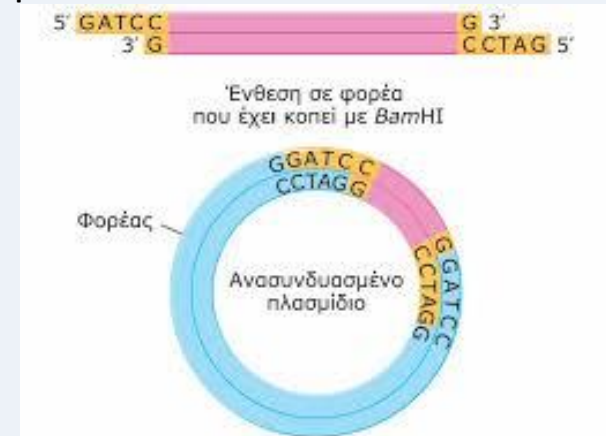


Είναι μια πλήρης και καλά σχολιασμένη βάση που περιέχει πληροφορίες για τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των μεθυλοτρανσφερασών, την εμπορική διαθεσιμότητα των ενζύμων, τις αλληλουχίες τους κ.α. Οι πληροφορίες ενημερώνονται σε μηνιαία βάση και η πρόσβαση σε αυτά είναι ελεύθερη.

Κλωνοποίηση

- Παραγωγή πολλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA για μελέτη ή τροποποίηση
- Εισαγωγή της αλληλουχίας σε ένα μόριο DNA που ονομάζεται **φορέας** και έχει την ικανότητα να αντιγράφεται αυτόνομα σε ένα κύτταρο ξενιστή απ' όπου μπορεί στην συνέχεια να απομονωθεί.

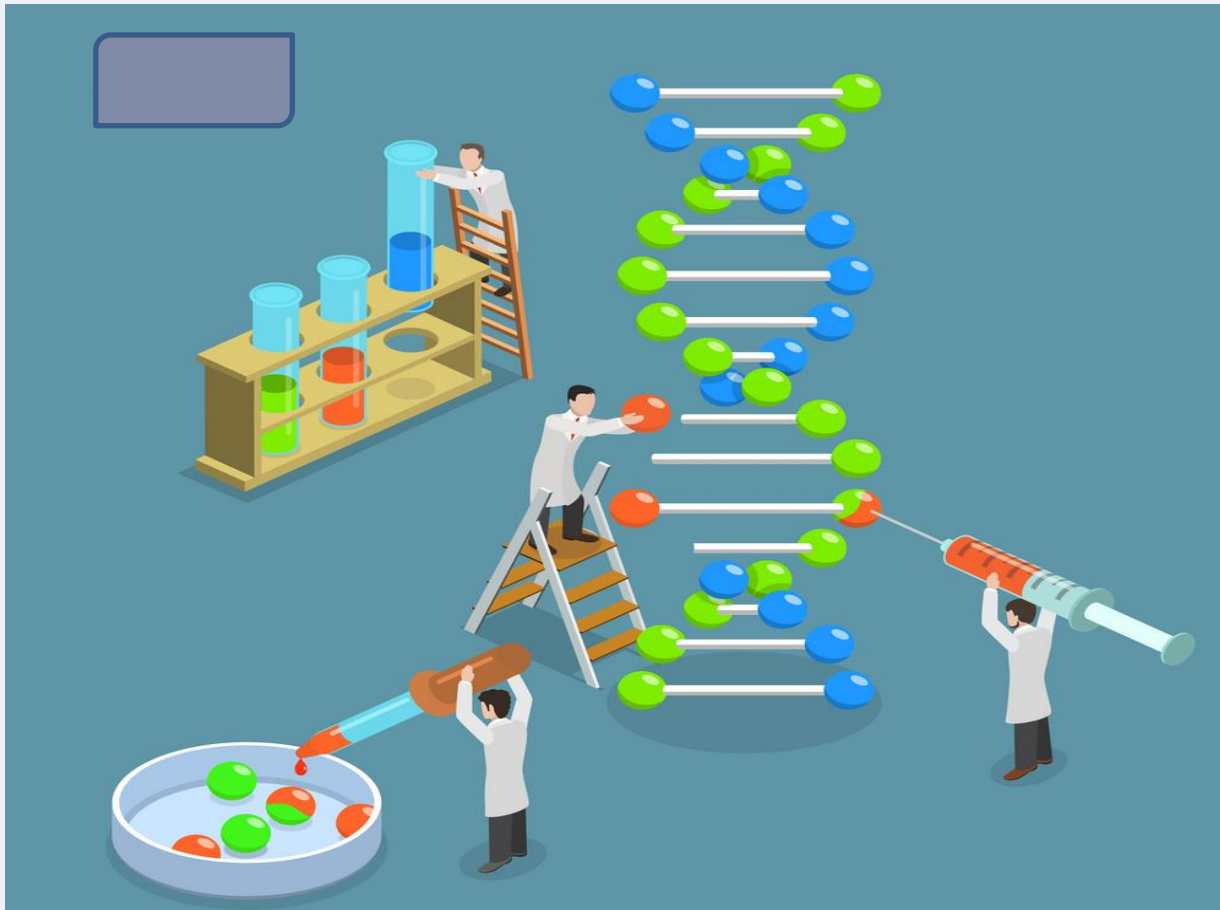
Ανασυνδυασμένα πλασμίδια



Χαρακτηριστικά πλασμιδίου ως ικανός φορέας κλωνοποίησης

- Να έχει ικανότητα αυτόνομης αντιγραφής μέσα στο κύτταρο ξενιστή
- Να διαθέτει γονίδιο (ή γονίδια) ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά
- Να περιέχει την ακολουθία που αναγνωρίζει η ενδονουκλεάση, που θα χρησιμοποιηθεί μια μόνο φορά

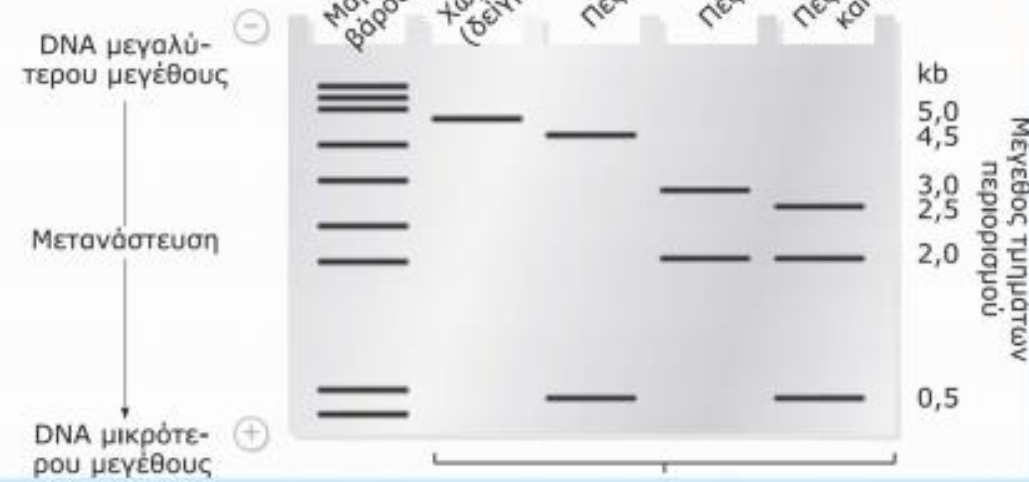
Μοριακή ανάλυση κλωνοποιημένου DNA



Χαρτογράφηση με ένζυμο περιορισμού

1 Πολλαπλά αντίγραφα ενός κλωνοποιημένου γραμμικού τμήματος DNA, μεγέθους 5,0 kb.

2 Πέψη με ένζυμο περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.



Χαρτογράφηση περιορισμού.

Δημιουργία χάρτη μετά από πέψη με ένζυμο περιορισμού

3 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Στον κάθετο άξονα της γραφικής παράστασης αναφέρεται ο δεκαδικός λογάριθμος του μοριακού βάρους σε kb των τμημάτων του μάρτυρα, ενώ στον οριζόντιο άξονα αναφέρεται η απόσταση σε mm που διήνυσαν.



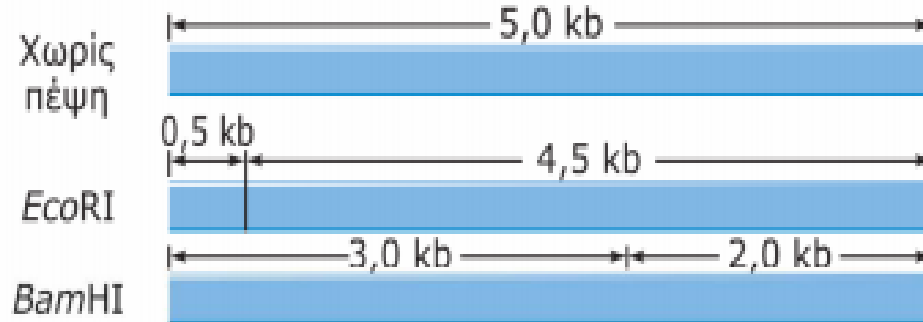
Απόσταση μετανάστευσης (mm)

Χαρτογράφηση με ένζυμα περιορισμού

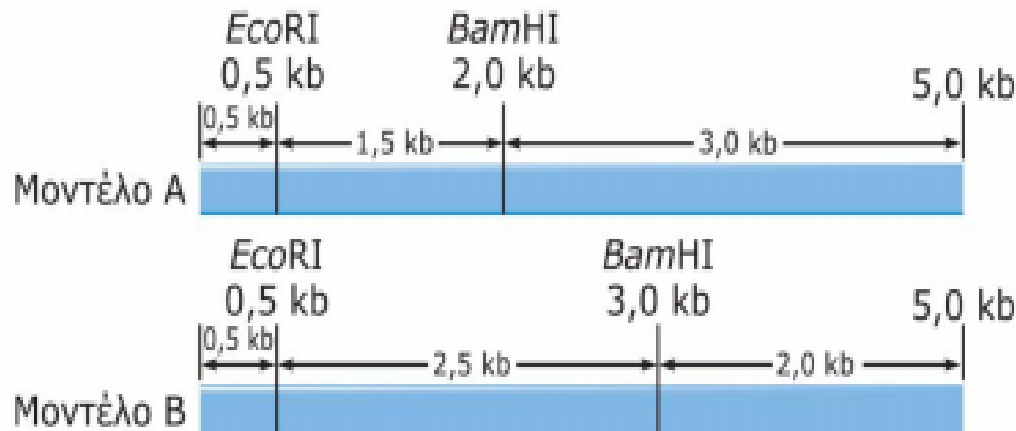
5 Αποτελέσματα

Χωρίς πέψη	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>
5,0 kb	4,5 kb 0,5 kb	3,0 kb 2,0 kb	2,5 kb 2,0 kb 0,5 kb

6 Ερμηνεία



7 Κατασκευή μοντέλων



Προβλεπόμενα μεγέθη τμημάτων μετά από διπλή πέψη με *EcoRI* και *BamHI*.

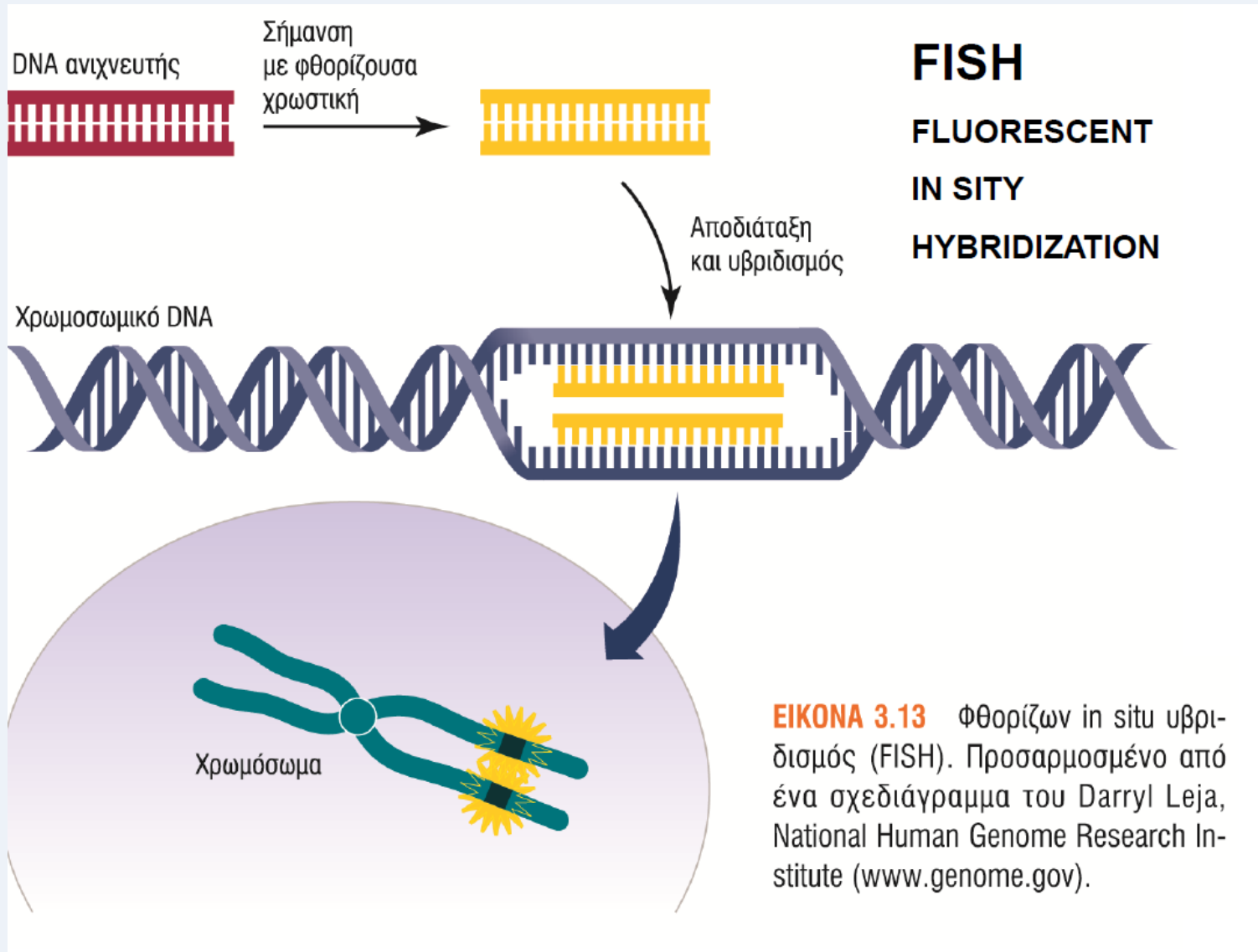
3,0, 1,5 και 0,5 kb

2,5, 2,0 και 0,5 kb

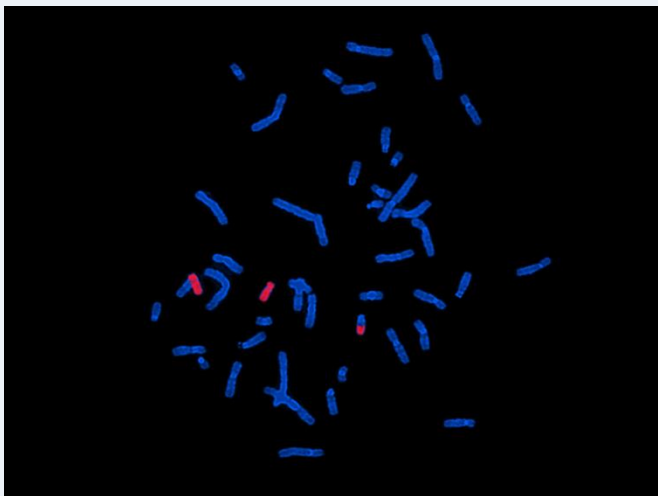
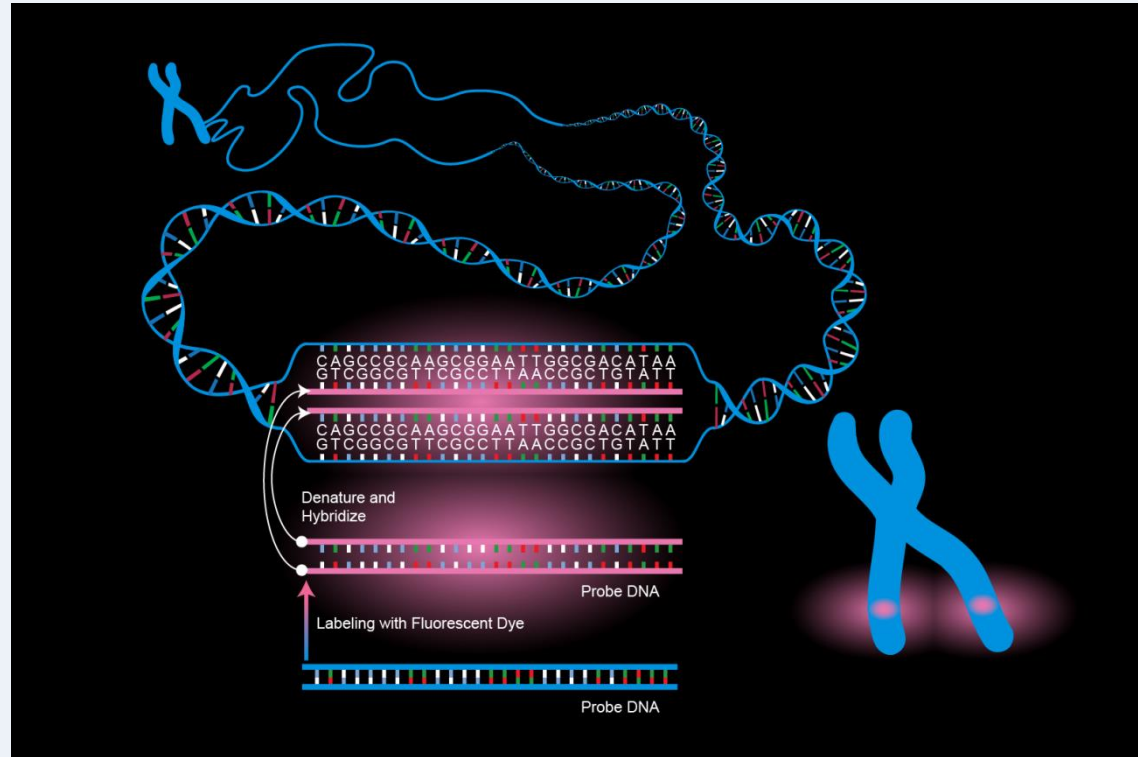
8 Συμπέρασμα

Τα πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι σωστό είναι το μοντέλο Β.

Fluorescent In situ Hybridisation (FISH)



Fluorescent In situ Hybridisation (FISH)



Ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών
π.χ. διερεύνηση γενετικών συνδρόμων που προκαλούνται από μικροελλείψεις γενετικού υλικού (σύνδρομα DiGeorge, Williams, Miler Dieker, κ.α.)

RFLP ανάλυση (Restriction fragment length polymorphism)

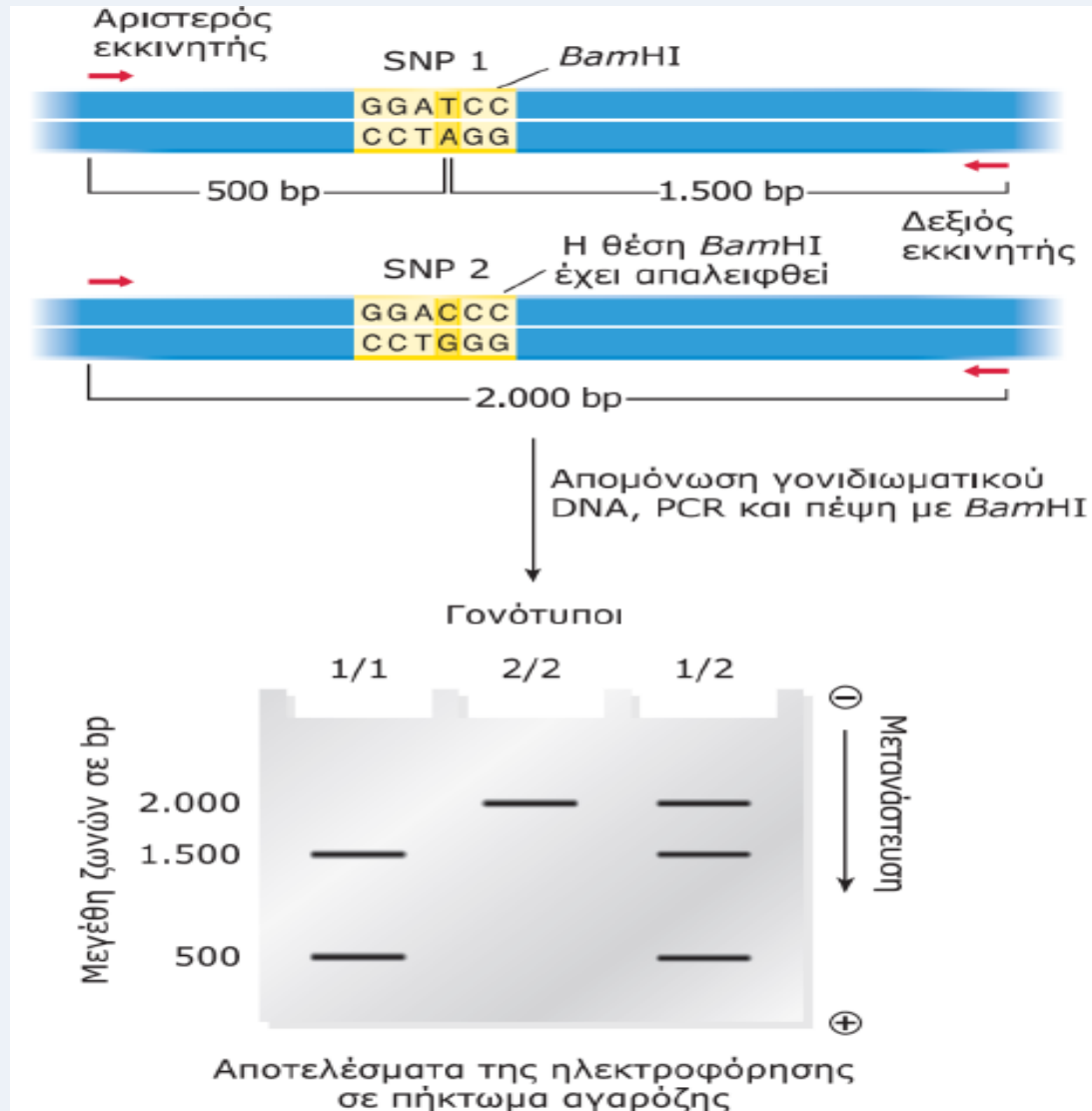
- Ανίχνευση πολυμορφισμών με βάση το πρότυπο ηλεκτροφόρησης θραυσμάτων μετά από πέψη
- Ανιχνεύουν μεταλλαγές ή άλλες αλλοιώσεις (διπλασιασμό τμημάτων)
- Τα θραύσματα διαφέρουν συχνά ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα

<https://www.youtube.com/watch?v=sRChlozVu4c>

<https://www.youtube.com/watch?v=wUEgQYoKUqw>

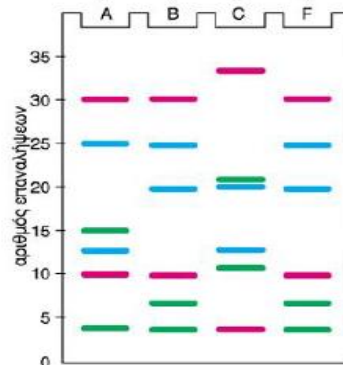
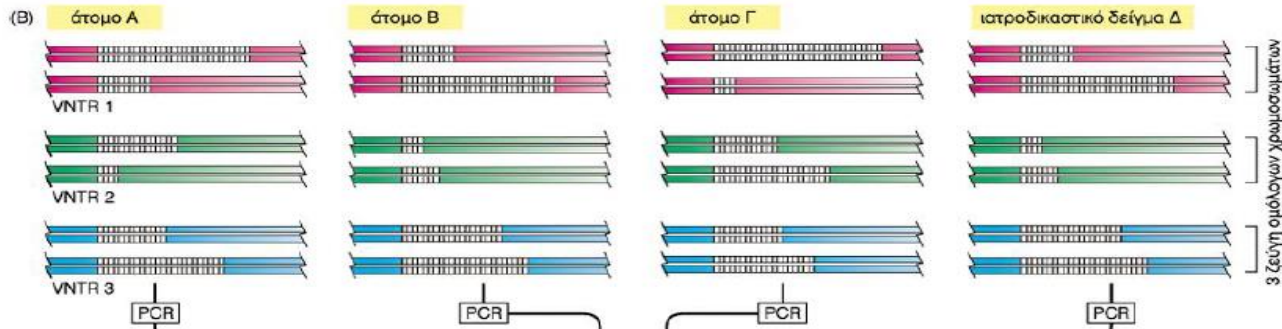
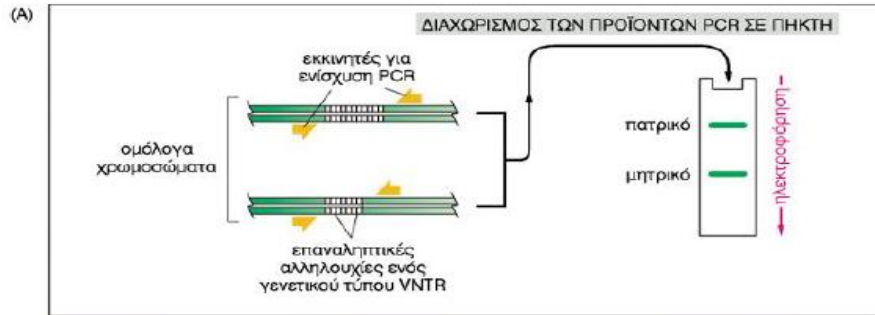
PCR - ανίχνευση πολυμορφισμών

Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP)



PCR -ανίχνευση πολυμορφισμών

Ποικίλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις
Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs)

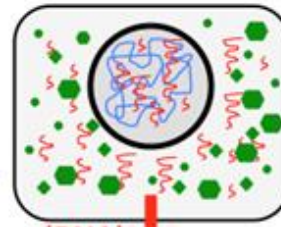


Εφαρμογές
Ιατροδικαστική
Έλεγχος πατρότητας

Short Tandem Repeats (STRs)

Variable Number Tandem Repeats (VNTRs)

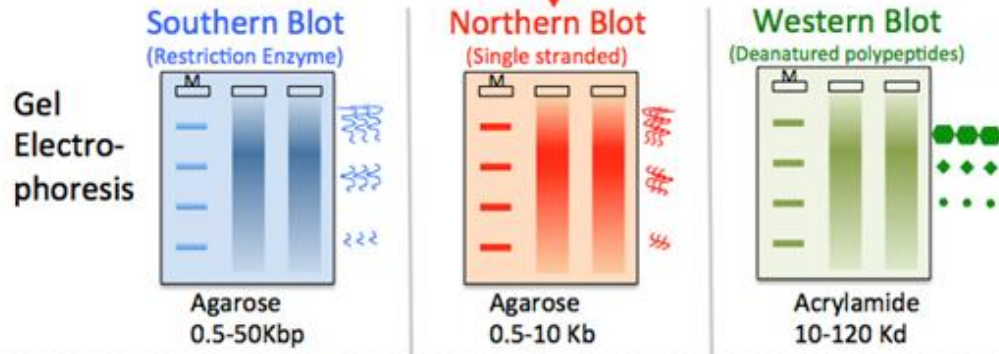
Cell with DNA,
RNA, & Protein



(DNA)

(RNA)

(Protein)



ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗ

- **Διαφάνειες στο e-class MED 850**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ