



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
& ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΖΩΪΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ PCR ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ



ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΚΑΡΑΤΣΙΝΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΑΖΑΡΑΚΗ ΚΥΡΙΑΚΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, στο τμήμα Ζωϊκής Παραγωγής. Σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι μελέτη της αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης ή αλλιώς PCR, η αναφορά κυρίως στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται και στην εφαρμογή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Μαζαράκη Κυριακή για τη βοήθεια της καθώς και την κα. Πάλλα Ελισάβετ για τη σωστή καθοδήγηση και βοήθεια καθώς επίσης το επιπλέον υλικό που μου χορήγησε, τις συμβουλές και τον απαιτούμενο χρόνο που ανάλωσε για την υλοποίηση της παρούσας εργασίας.

Τέλος ευχαριστώ την μητέρα μου για τη βοήθεια και την στήριξη που μου πρόσφερε για την υλοποίηση αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ PCR

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

1.1 Αρχή της μεθόδου PCR σελ 7

1.2 Βήματα της PCR σελ 8

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:

2.1 Συστατικά για την επιτέλεση μιας αντίδρασης PCR σελ 11

2.2 Χώροι και εξοπλισμός για την επιτέλεση της αντίδρασης.....σελ 20

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

3.1 Ευαισθησία και επιμόλυνση..... σελ 23

3.2 Σχεδιασμός εκκινητώνσελ 28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

4.1 Γενική επισκόπηση της αντίδρασης – πρωτόκολλα..... σελ 33

4.2 Βελτιστοποίηση της PCRσελ 36

4.3 Μέθοδοι βελτιστοποίησης της PCR σελ 40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:

5.1 Ποσοτική PCR..... σελ 43

5.2 Real time PCR..... σελ 43

5.3 Multiplex PCR..... σελ 49

5.4 DOP PCR..... σελ 52

5.5 In Situ PCR σελ 53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:

6.1 Ανίχνευση μεταλλάξεων.....	σελ 59
6.2 PCR και νεοπλασία	σελ 60
6.3 PCR στη μικροβιολογία.....	σελ 60
6.4 Γενετική αποτύπωση με τη χρήση της PCR	σελ 62
6.5 Έλεγχος πατρότητας.....	σελ 66
6.6 Προγεννητικός έλεγχος με τη χρήση της PCR	σελ 67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ 72

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εστιάζει στην μελέτη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, η οποία είναι μια μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας η οποία χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA. Γίνεται αναφορά των υλικών και των μηχανημάτων με τα οποία πρέπει να είναι ένα εργαστήριο εξοπλισμένο. Επίσης αναλύονται τα στάδια της αντίδρασης και οι προδιαγραφές που πρέπει να τηρούνται για την διεξαγωγή της έτσι ώστε να έχουμε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Γίνεται γενική επισκόπηση της αντίδρασης και αναφέρονται κάποια πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον περιγράφονται μέθοδοι με τις οποίες μπορεί να βελτιωθεί η PCR. Αναφέρονται επίσης ποιες τεχνικές PCR χρησιμοποιούνται και ποια είναι τα οφέλη τους, όπως επίσης που χρησιμοποιούνται οι τεχνικές αυτές και γενικά γιατί είναι τόσο σημαντική η PCR στη σύγχρονη μοριακή βιολογία.

SUMMARY

The concept of this paper is to provide an introductory text that is useful to understand and use PCR for experimentation. It provides information on the fundamental principles of the reactions occurring in a PCR tube. It explains the steps that should be followed to perform PCR and analyze the PCR products. Also there are mentioned the equipment a laboratory needs and the rules that should be followed to get positive results. It analyzes the PCR techniques that exist today and in which areas they are used.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ PCR

Η τεχνική της PCR περιγράφηκε αρχικά από τον Kary Mullis το 1983. Από τότε έχει υποστεί πολλές τροποποιήσεις και έχει γίνει μία από τις πιο σημαντικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας. Η PCR επιτρέπει στους ερευνητές να επιλέξουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία- στόχο του DNA η οποία βρίσκεται σε μικρή ποσότητα και να παραγάγουν δεκάδες εκατομμύρια αντίγραφα της. Ας υποθέσουμε για παράδειγμα, πως ένας ερευνητής μελετάει το γονίδιο ενός συγκεκριμένου ανθρώπινου χαρακτηριστικού που έχει μέγεθος 1000 ζεύγη βάσεων (bp, base pairs). Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από περίπου 3,2 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων. Επομένως, αν απομονώσουμε DNA από κύτταρα, το γονίδιο αυτό θα συνιστά μόνο το 0.00003% της συνολικής ποσότητας DNA που θα απομονωθεί. Η PCR μας επιτρέπει να παράγουμε επιλεκτικά εκατομμύρια αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Ας υποθέσουμε επίσης πως ένας επιστήμονας πραγματοποιεί αναλύσεις σε DNA που απομονώθηκε από το σάλιο που βρέθηκε σε ένα γραμματόσημο. Πάνω στο γραμματόσημο υπάρχει μια πολύ μικρή ποσότητα DNA. Αν επιθυμούμε να αναλύσουμε κάποια περιοχή του DNA αυτού, πρέπει προηγουμένως να την πολλαπλασιάσουμε εκατομμύρια φορές. Το εργαλείο που χρειαζόμαστε για να πετύχουμε κάτι τέτοιο είναι η PCR.

Η PCR είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην έρευνα. Η εισαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου διευκόλυνε ιδιαίτερα την κλωνοποίηση τμημάτων για τη δημιουργία κατασκευών, την μεταλλαξογένεση, την αλληλούχιση κ.α. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή της στις φυλογενετικές μελέτες με δείγματα τα οποία απομονώνονται από αρχαίους ιστούς οι οποίοι δεν θα ήταν δυνατόν να μελετηθούν. Επιπλέον η αναπτύξη της PCR αλλά και των παραλλαγών της (π.χ. ποσοτική PCR) έχει βοηθήσει στην ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων. Πολυάριθμες όμως είναι και οι εφαρμογές της PCR σε πολλούς τομείς όπως της Υγείας, της Γεωργίας, του Περιβάλλοντος, των Τροφίμων, της Ιατροδικαστικής κ.α. Ενδεικτικά στον τομέα της Υγείας η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση φορέων μεταλλάξεων στις οποίες οφείλονται κληρονομικές ασθένειες όπως η Μεσογειακή αναιμία ή η κυστική ίνωση, στον προγεννητικό ή προεμφυτευτικό έλεγχο, στην μικροβιολογία για την ταυτοποίηση στελεχών, για την τυποποίηση των ιστών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR), είναι μια *in vitro* ενζυματική σύνθεση 500.000 και πλέον αντίγραφων ενός τμήματος DNA γνωστής αλληλουχίας βάσεων. Η PCR αντιγράφει το DNA μέσα στον δοκιμαστικό σωλήνα και χρησιμοποιεί τα βασικά στοιχεία της διαδικασίας σύνθεσης και αντιγραφής του DNA. Δηλαδή μιμείται την φυσική ικανότητα ενός κυττάρου να αντιγράφει το DNA του χρησιμοποιώντας ένζυμα τα οποία ονομάζονται DNA πολυμεράσες. Σε ένα ζωντανό κύτταρο χρειάζεται ένα πολύ περίπλοκο σύστημα πρωτεϊνών για να γίνει αντιγραφή όλου του γονιδιώματος. Με λίγα λόγια, το DNA ξεδιπλώνεται και κάθε έλικα λειτουργεί ως καλούπι για να δημιουργηθεί μια νέα συμπληρωματική έλικα. Αυτή η αντιγραφή στηρίζεται στην ικανότητα των νουκλεοτιδίων να σχηματίζουν ζεύγη βάση των κανόνων Watson και Crick. Η έλικα που λειτουργεί ως καλούπι καθορίζει την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της νέας συμπληρωματικής έλικας. Ένας μεγάλος αριθμός από πρωτεΐνες και άλλα μόρια, όπως RNA εκκινητές απαιτούνται έτσι ώστε να βεβαιωθεί ότι η διαδικασία αντιγραφής του DNA ήταν επιτυχής και διεξάγει με υψηλή ακρίβεια δηλαδή με τα λιγότερα λάθη. Για να παραχθεί DNA από μια DNA πολυμεράση θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε μια μικρή αλληλουχία ως εκκινητή, η οποία αλληλουχία θα είναι συμπληρωματική στην έλικα που λειτουργεί ως καλούπι. Οι εκκινητές παράγονται τεχνητά και είναι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που παράγονται από συνδιασμό 20 νουκλεοτιδίων.

Η αντίδραση στηρίζεται στην επέκταση δύο ολιγονουκλεοτιδίων- εκκινητών (primers) τα οποία υβριδίζονται με αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής "στόχου" του DNA. Αναλυτικότερα, η δίκλωνη έλικα του DNA υφίσταται θερμική αποδιάταξη (94°C- 95°C) και ακολουθεί υβριδισμός των ολιγονουκλεοτιδίων στις αντίστοιχες περιοχές κάθε αλυσού (37°C- 65°C) με τις οποίες παρουσιάζουν ομολογία. Στη συνέχεια μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση συνθέτει την θυγατρική αλυσού, προσθέτοντας στο 3' υδροξυ-άκρο των εκκινητών δεοξυριβονουκλεοτίδια συμπληρωματικά αυτών της μητρικής 'αλυσού (72°C). Τα τρία αυτά στάδια (αποδιάταξη-υβριδισμός εκκινητών-σύνθεση DNA) αποτελούν ένα κύκλο της PCR.

1.2 ΒΗΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR

1. Πρώτο βήμα: Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA.

Το δείγμα DNA στο οποίο περιέχεται η αλληλουχία-στόχος που μας ενδιαφέρει, η **μήτρα DNA** (template DNA) αρχικά εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες, συνήθως μεταξύ 92 και 94° C ώστε να αποδιαταχθεί, δηλαδή να διαχωριστούν οι δύο αλυσίδες του μορίου.

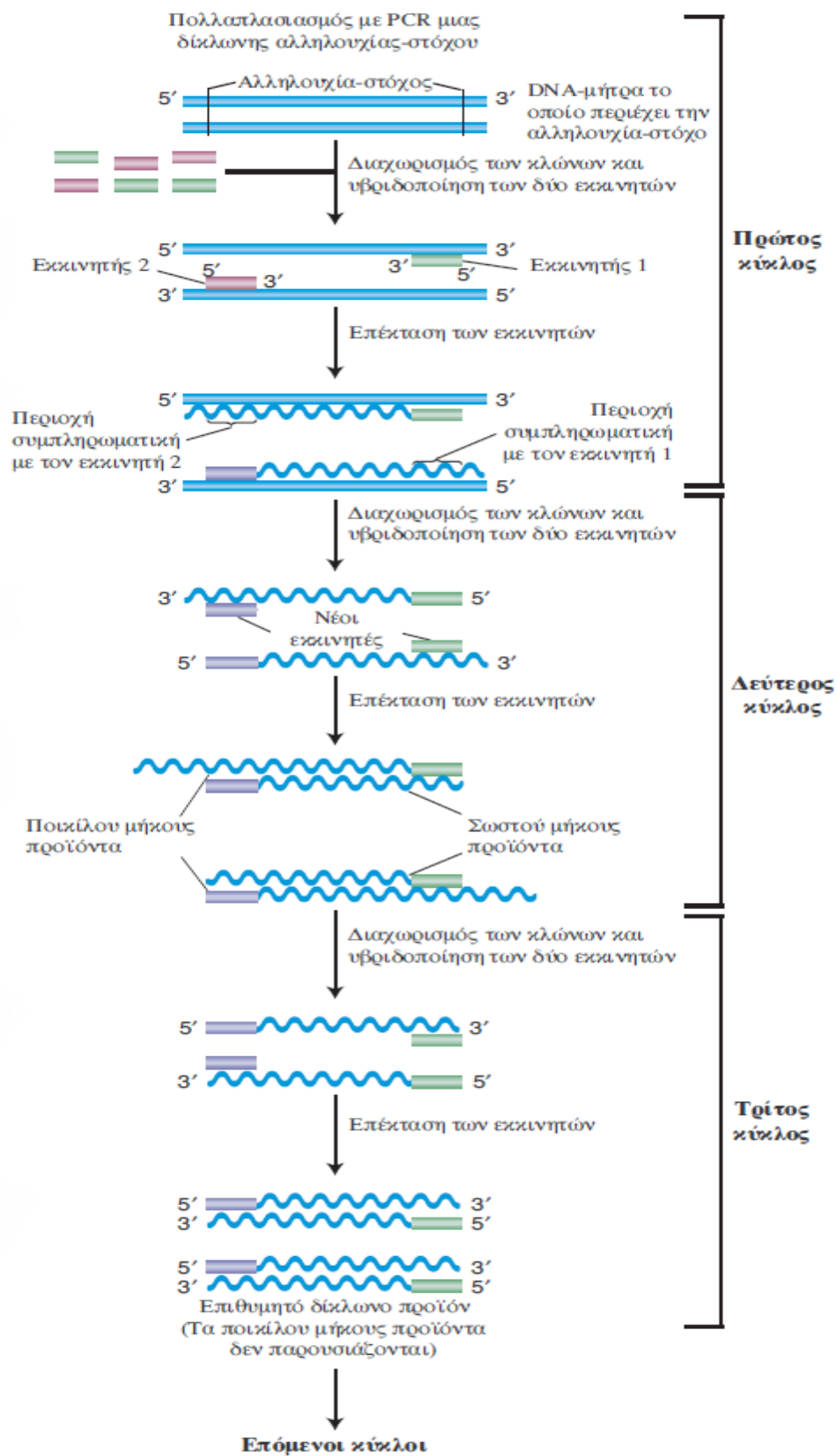
2. Δεύτερο βήμα: Προσαρμογή των εκκινητών.

Στη συνέχεια, η θερμοκρασία μειώνεται σε μια κατάλληλη τιμή, συνήθως 47-72° C. Τότε ειδικά σχεδιασμένοι **ολιγονουκλεοτιδικόι εκκινητές** (oligonucleotide primers) υβριδοποιούνται (δηλαδή προσδένονται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων) στη μήτρα DNA. Σε μια PCR χρησιμοποιούνται δυο εκκινητές. Ο ένας είναι συμπληρωματικός με την περιοχή που βρίσκεται ακριβώς ανοδικά της αλληλουχίας-στόχου στον ένα κλώνο του DNA και συχνά αναφέρεται ως ανοδικός (upstream) ή εμπρόσθιος (forward) εκκινητής. Ο άλλος είναι συμπληρωματικός με την περιοχή που βρίσκεται ακριβώς καθοδικά της αλληλουχίας στόχου στον άλλον κλώνο του DNA και συχνά αναφέρεται ως καθοδικός (downstream) ή ανάστροφος (reverse) εκκινητής. Οι εκκινητές προσδένονται στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου και οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.

3. Τρίτο βήμα: Επιμήκυνση των εκκινητών.

Στο τελευταίο στάδιο της αντίδρασης, το οποίο συνήθως πραγματοποιείται στους 72° C, η Taq, μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, αντιγράφει τους δύο κλώνους ξεκινώντας από τους εκκινητές. Για να επιτευχθεί αυτό, στο μείγμα της αντίδρασης συμπεριλαμβάνονται και τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (A,T,G και C), τα οποία αναφέρονται ως dNTP (deoxyribonucleotide Triphosphate).

Αυτά τα τρία βήματα αποτελούν έναν κύκλο της PCR, στο τέλος του οποίου ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο έχει διπλασιαστεί. Κατόπιν, η διαδικασία επαναλαμβάνεται, με αποτέλεσμα ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο να τετραπλασιάζεται, στη συνέχεια να οκταπλασιάζεται και ούτω καθεξής. Συνήθως η διαδικασία πραγματοποιείται για 25-40 κύκλους, οπότε δημιουργούνται εκατομμύρια αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου.



Εικόνα 1: Πολλαπλασιασμός με PCR μιας δίκλωνης αλληλουχίας- στόχου.

Στην PCR, ο αριθμός των αντίγραφων της αλληλουχίας-στόχου θεωρητικά διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Επομένως η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου είναι εκθετική, όπως η αύξηση του αριθμού των βακτηρίων στις καλλιέργειες, όταν αυτά διπλασιάζονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Θεωρώντας πως η απόδοση της PCR είναι 100%, μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου μετά από έναν συγκεκριμένο αριθμό κύκλων χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$N=2^t(N_0)$$

Όπου: N είναι ο τελικός αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου

t είναι ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης και

N₀ είναι ο αρχικός αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου.

Στην πραγματικότητα, η απόδοση της PCR δεν είναι 100% και ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο δε διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Στους τελευταίους κύκλους, η αντίδραση φτάνει σε πλατό εξαιτίας μιας σειράς παραγόντων, όπως και η εξάντληση των αντιδρώντων.

Η PCR δύναται να ενισχύσει συγκεκριμένες αλληλουχίες οι οποίες βρίσκονται σε εξαιρετικά μικρές αναλογίες σε ένα μίγμα νουκλεϊνικών οξέων. Η μεγάλη εξιδίκευση της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι, υπό ιδανικές συνθήκες, οι εκκινητές προσδένονται μόνο στις περιοχές με τις οποίες παρουσιάζουν νουκλεοτιδική ομολογία, με αποτέλεσμα να ενισχύεται μόνον η περιοχή που καθορίζεται από αυτούς. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση της PCR σε συνδυασμό με την ταχύτητα της, καθιστά την τεχνική πολύτιμη στην καθημερινή πρακτική της Μοριακής Βιολογίας και των εφαρμογών της. (διαδίκτυο₁, ελ.βιβ.₁)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΕΛΕΣΗ ΜΙΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR:

✓ Το DNA-μήτρα:

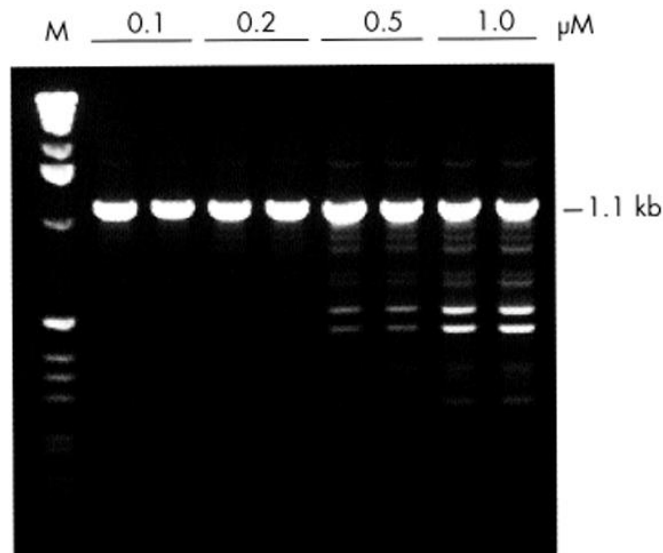
Η μήτρα της PCR ποικίλει. Μπορεί να είναι πλασμιδιακό, ιικό ή γονιδιωματικό DNA. Εναλλακτικά μπορεί να είναι cDNA παρασκευασμένο από RNA. Άλλοτε υπάρχει σε σημαντικές ποσότητες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, για παράδειγμα σε ιατροδικαστικά δείγματα και σε αναλύσεις αρχαίων δειγμάτων, η διαθέσιμη ποσότητα είναι πολύ περιορισμένη. Επίσης η αλληλουχία-στόχος μπορεί να συνιστά μεγάλο τμήμα της μήτρας DNA ή αντίθετα ενδέχεται να αποτελεί ένα αναλογικά πολύ μικρό τμήμα αυτής. Για παράδειγμα, το DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα μπορεί να είναι ένα πλασμίδιο μεγέθους 4Kb και η αλληλουχία-στόχος να έχει μέγεθος 1 Kb. Στην περίπτωση αυτή, η αλληλουχία-στόχος αναλογεί στο 25% της μήτρας DNA. Ωστόσο, μια αλληλουχία-στόχος μεγέθους 1 Kb μέσα στο ανθρώπινο γονιδίωμα $3,2 \times 10^9$ bp αντιπροσωπεύει μόνο περίπου το 0,00003% της μήτρας DNA. Επομένως, είναι εύκολο να πετύχουμε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της αλληλουχίας-στόχου όταν χρησιμοποιούμε πλασμίδια, όχι όμως και όταν χρησιμοποιούμε γονιδιωματικό DNA. Να σημειωθεί πως, όταν χρησιμοποιείται πολύ μεγάλη ποσότητα DNA σε μια αντίδραση αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης παραπροϊόντων. Από την άλλη πλευρά, αν η συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου είναι χαμηλή, αυξάνεται η πιθανότητα η τελική ποσότητα του προϊόντος να είναι μικρότερη του επιθυμητού.

Το DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα ποικίλλει. Γι' αυτόν τον λόγο δεν υπάρχει ένα συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων εντός του οποίου πρέπει να περιλαμβάνεται το DNA στην αντίδραση. Θα πρέπει όμως να τηρούνται οι ακόλουθες γενικές οδηγίες:

- *Ο όγκος της μήτρας δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/101 του συνολικού όγκου της αντίδρασης (π.χ. όχι περισσότερα από 5μL σε μια αντίδραση όγκου 50μL.)*
- *Συνήθως σε μια αντίδραση δεν προστίθενται περισσότερα από 500ng ανθρώπινου γονιδιωματικού DNA.*
- *Η τυπική ποσότητα για βακτηριακό γονιδιωματικό DNA είναι 1-10ng.*
- *Η τυπική ποσότητα για πλασμιδιακό DNA είναι 0,1-1ng.*
- *Στις ιατροδικαστικές μελέτες μπορεί να χρησιμοποιηθούν μόλις 0,5-10ng ανθρώπινου γονιδιωματικού DNA. Υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά kit και ειδικά πρωτόκολλα προκειμένου να βελτιστοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός μιας αλληλουχίας-στόχου όταν ξεκινάει κάποιος από τόσο μικρές ποσότητες DNA.*

✓ Ένα ζευγάρι εκκινητών:

Οι εκκινητές αποτελούν ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά της αντίδρασης, γιατί αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτιδικά άκρα του DNA στόχου και είναι απαραίτητοι προκειμένου να προστεθούν τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας. Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια, το μήκος των οποίων κυμαίνεται ανάλογα με την χρήση τους (για να απομονώσουμε και να πολλαπλασιάσουμε μία μοναδική αλληλουχία στόχο DNA, οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν μέγεθος από 18 έως 30 βάσεις). Η συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση πρέπει να είναι 0,1-0,5 μM . Όταν η συγκέντρωση είναι πολύ υψηλή αυξάνεται η πιθανότητα να δημιουργηθούν μη ομόλογοι (τυχαίοι) υβριδισμοί μεταξύ εκκινητή και DNA, με αποτέλεσμα την δημιουργία DNA τμημάτων που δεν αντιστοιχούν στα αναμενόμενα προϊόντα (εικόνα 2)



Εικόνα 2: Πολλαπλασιασμός μίας αλληλουχίας μεγέθους 1,1 kb, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών.

Για την κατασκευή των δύο εκκινητών μιας αντίδρασης πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη τα παρακάτω:

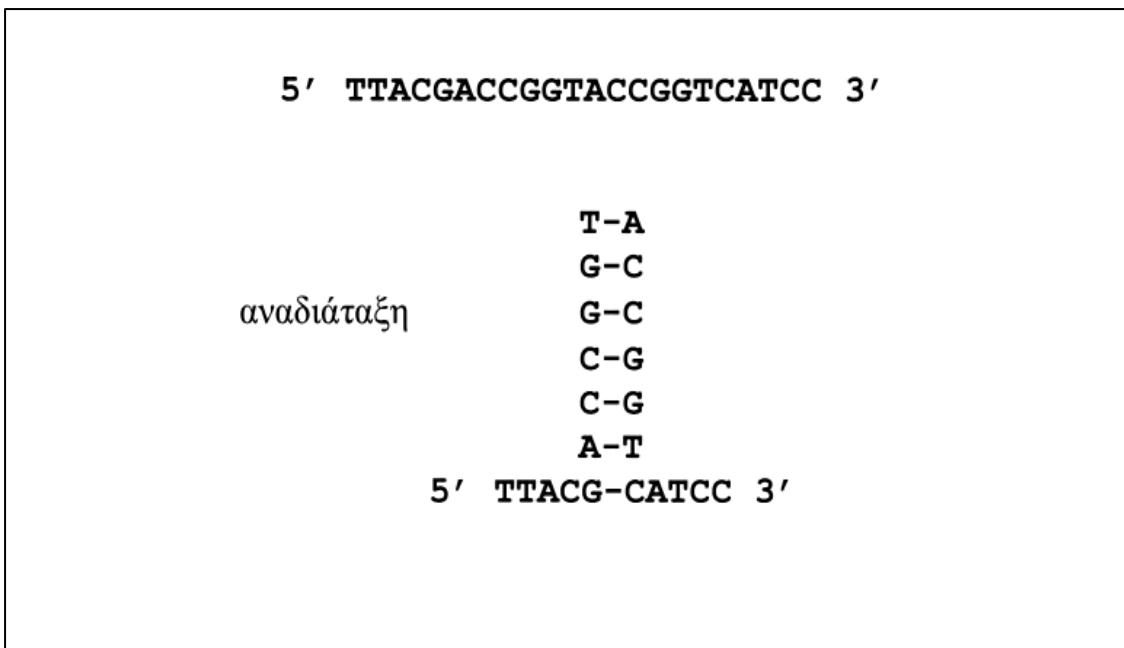
α. οι αλληλουχίες τους δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ειδικά στο 3' άκρο (εικόνα 3)



Εικόνα 3: Δύο εκκινητές μεγέθους 18 νουκλεοτιδίων που παρουσιάζουν υψηλή νουκλεοτιδική ομολογία.

β. οι αλληλουχίες τους πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G και C νουκλεοτίδια, ώστε οι Tm θερμοκρασίες τους (melting temperature) να μην διαφέρουν σημαντικά,

γ. η αλληλουχία του κάθε εκκινητή δεν πρέπει να περιλαμβάνει περιοχές συμπληρωματικές, γιατί κατά την διάρκεια της αναδιάταξης δημιουργούνται φουρκέτες (hair-pins) (εικόνα 4)



Εικόνα 4: Εκκινητής που περιλαμβάνει περιοχές με συμπληρωματικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

δ. κατά τον σχεδιασμό τους θα πρέπει η κατανομή των νουκλεοτιδίων να είναι τυχαία και να αποφεύγονται περιοχές με πολυπυρίνες ή πολυπυριμιδίνες. Επίσης θα πρέπει να αποφεύγονται επαναλήψεις νουκλεοτιδίων (πχ. 5'AGCATCTCTCTCAGG 3').

Προκειμένου να πολλαπλασιαστεί επιλεκτικά μόνο ο επιθυμητός στόχος DNA οι εκκινητές πρέπει να έχουν υψηλή εξειδίκευση και αποδοτικότητα, συνεπώς ο επιτυχής σχεδιασμός τους είναι πολύ σημαντικός. Για την κατασκευή και καλύτερη επιλογή εκκινητών υπάρχουν ειδικά προγράμματα τα οποία είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο.

✓ Μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση:

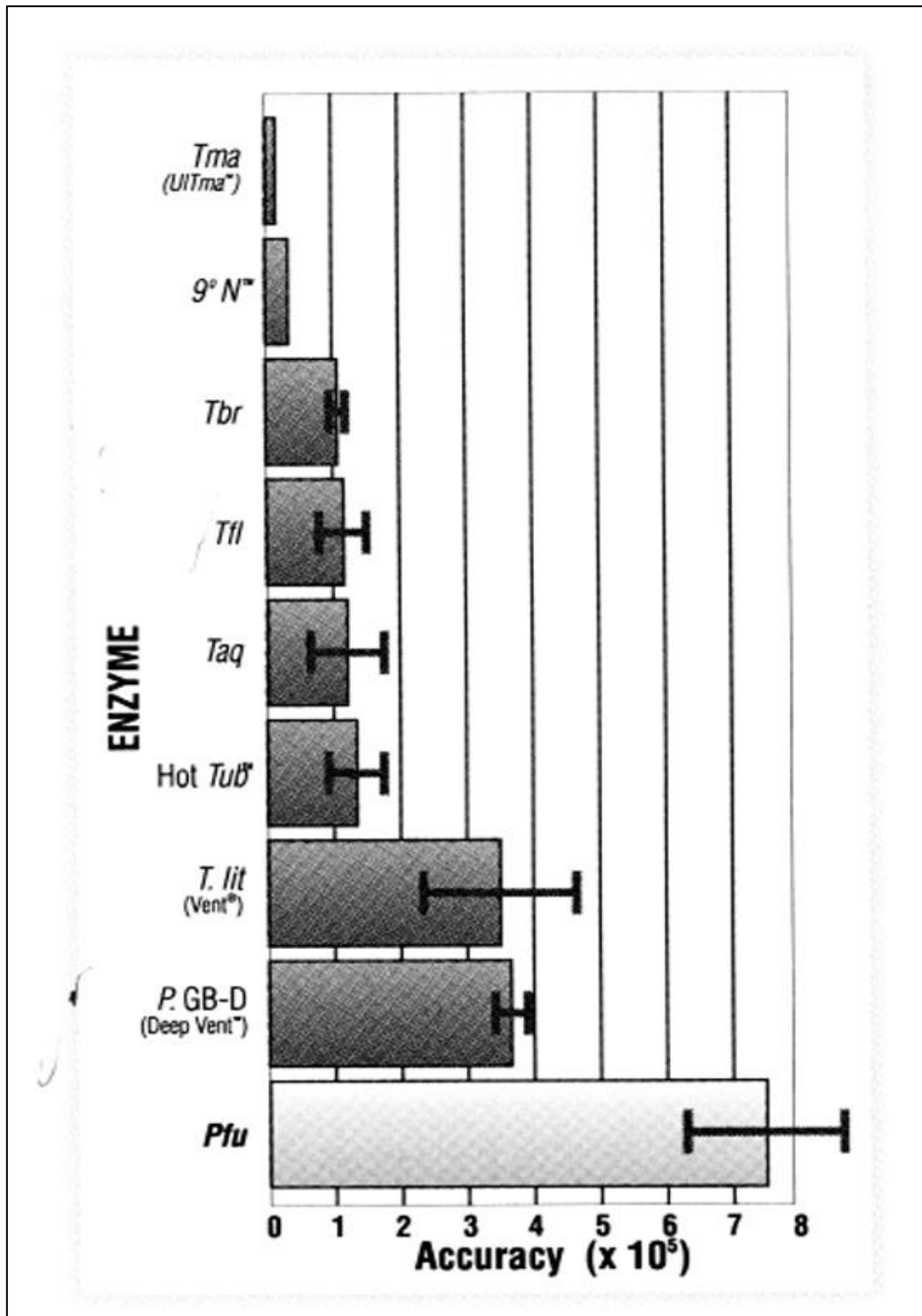
Η πολυμεράση είναι το ένζυμο με το οποίο επιτυγχάνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του στόχου DNA μετά από κάθε αποδιάταξη και υβριδισμό των εκκινητών. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Klenow. Η Klenow είναι DNA πολυμεράση τύπου I, που της έχει αφαιρεθεί η 5'-3' εξωνουκλεϊκή δράση ενώ παραμένει η 3'-5' εξωνουκλεϊκή δράση. Τα μειονεκτήματα της Klenow είναι ότι:

α. καταστρέφεται στις υψηλές θερμοκρασίες αποδιάταξης (90-95°C), συνεπώς είναι αναγκαία η προσθήκη ενζύμου μετά από κάθε κύκλο, με αποτέλεσμα να επιβαρύνεται ο χρόνος (πρόσθεση ενζύμου μετά από κάθε κύκλο) και το κόστος (οι πολυμεράσες είναι ακριβά ένζυμα) της διαδικασίας, και

β. η θερμοκρασία στην οποία πολυμερίζει είναι οι 37°C, η οποία ενδέχεται να είναι μικρότερη της T_m των εκκινητών, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει απόλυτη νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ των εκκινητών και του στόχου DNA.

Τα παραπάνω προβλήματα λύθηκαν με την χρησιμοποίηση της πολυμεράσης *Taq*. Η πολυμεράση *Taq* έχει απομονωθεί από βακτήρια (***Thermus aquaticus***) που ζουν σε περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία (θερμοπίδακες) και είναι πολυμεράση τύπου I με 5'-3' εξωνουκλεϊκή δράση. Η ιδανική θερμοκρασία για την δράση της είναι 55-75°C (pH 8,2-9,0) και ο χρόνος ημιζωής της είναι 50 κύκλοι στους 95°C. Η πολυμεράση *Taq* είναι διαθέσιμη από πολλές εταιρίες βιολογικών προϊόντων. Εκτός της *Taq* πολυμεράσης, έχουν απομονωθεί πολυμεράσες και από άλλα θερμοφιλα βακτήρια, όπως τα ***Thermus thermophilus***, ***Thermotoga maritima***, και το ***Bacillus stercophilus***. Η πολυμεράση *AmpliTaq-stoffel* fragment είναι πιο θερμοσταθερή (97,5°C) και έχει καλύτερη δραστηριότητα σε πιο ευρύ φάσμα συγκέντρωσης ιόντων Mg^{++} (2-10mM) σε σύγκριση με την *Taq*. Άλλες πολυμεράσες είναι η *UITma* και η *Vent* (*Thermococcus litoralis*) που παράγουν τυφλά άκρα, η *rTth* που έχει δράση πολυμεράσης και ανάστροφης μεταγραφάσης, και η *rTth XL* (extra long) που έχει 5'-3' και 3'-5' εξωνουκλεϊκή δράση και δυνατότητα πολλαπλασιασμού στόχου DNA μεγέθους από 5 έως 40 kb.

Οι πολυμεράσες έχουν πιθανότητα λάθους κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Η ακρίβεια αντιγραφής εξαρτάται από την πολυμεράση (εικόνα 5) αλλά και από τις συνθήκες της αντίδρασης (συγκέντρωση dNTPs ή αλλιώς τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και ιόντων μαγνησίου, pH, θερμοκρασία).



Εικόνα 5: Πιστότητα αντιγραφής θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών

✓ Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs):

Τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυουκλεοτίδια: dATP(τριφωσφορική δεοξαδενοσίνη), dTTP (τριφωσφορική θυμιδίνη), dCTP (τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη) και dGTP (τριφωσφορική δεοξυγουανοσίνη). Είναι σημαντικό τα δεοξυουκλεοτίδια να βρίσκονται σε ίση συγκέντρωση μεταξύ τους για να μην γίνονται λάθη κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Η συγκέντρωσή των δεοξυουκλεοτιδίων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20 και 200 μM . Τυπικά χρησιμοποιείται κάθε dNTP σε συγκέντρωση 200-250 μM . Η ποσότητα αυτή είναι υπεραρκετή καθώς αν αξιοποιηθεί όλη θα συντεθούν 6-6,5 μg DNA. Ειδικά όταν λοιπόν το προϊόν της αντίδρασης είναι σχετικά μικρό (της τάξης των μερικών εκατοντάδων ζευγών βάσεων) είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί χαμηλότερη συγκέντρωση dNTPs (100 μM ή και μικρότερη).

✓ Δισθενή κατιόντα:

Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου, που συνήθως προέρχονται από την προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου, επηρεάζει τον υβριδισμό του εκκινήτη, τη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και των PCR προϊόντων, τη δημιουργία διμερών από τους εκκινήτες, την εξειδίκευση των προϊόντων και τη δραστικότητα και πιστότητα της πολυμεράσης. Προϊόντα που δεν αντιστοιχούν στην αλληλουχία του στόχου DNA μπορούν να παραχθούν όταν η συγκέντρωση Mg^{++} είναι υψηλή. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν γιατί το Mg^{++} μπορεί να σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA, με αποτέλεσμα να έχουμε τυχαίες προσκολλήσεις εκκινήτων σε μη ομόλογα τμήματα του DNA. Αντίθετα, η χαμηλή συγκέντρωση μειώνει την απόδοση του PCR, γιατί το Mg^{++} , ως συνένζυμο της πολυμεράσης, είναι απαραίτητο για την λειτουργία της. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου πρέπει να είναι 0.5-2.5 mM. Η παρουσία EDTA ή άλλων χηλικών παραγόντων που δεσμεύουν Mg^{++} στο διάλυμα των εκκινήτων ή στο DNA μπορεί να διαταράξει την συγκέντρωση του μαγνησίου.

Όλες οι θερμοσταθερές DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στην PCR χρειάζονται δισθενή κατιόντα Mg^{2+} προκειμένου να λειτουργήσουν. Η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 1-5 mM ανάλογα με την αντίδραση. Έχει διαπιστωθεί πως σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Mg^{2+} μεταβάλλεται η κινητική της πρόσδεσης των εκκινήτων, στη συμπληρωματική προς αυτούς αλληλουχία την οποία αναγνωρίζουν. Σχετικά υψηλή συγκέντρωση Mg^{2+} σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αναφερθεί πως μειώνει την ειδικότητα πρόσδεσης, ενώ σε άλλες περιπτώσεις έχει αναφερθεί πως την αυξάνει. Στην πράξη η ιδανική συγκέντρωση Mg^{2+} για κάθε δεδομένη αντίδραση PCR προσδιορίζεται εμπειρικά.

✓ Ρυθμιστικό διάλυμα:

Το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR διατηρεί σταθερό το pH του μείγματος της αντίδρασης. Επίσης συχνά περιέχει μαγνήσιο, το οποίο δρα ως συμπαράγοντας της πολυμεράσης. Άλλες φορές το μαγνήσιο προστίθενται ξεχωριστά. Το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR συνήθως παρασκευάζεται και αποθηκεύεται σε συγκέντρωση 10x(δηλαδή συγκεντρωμένο κατά δέκα φορές). Στη συνέχεια, αραιώνεται και χρησιμοποιείται στο μείγμα της αντίδρασης.

Το διάλυμα θα πρέπει να δημιουργεί ένα ιοντικό περιβάλλον για να διευκολύνεται η αναδιάταξη (annealing) του εκκινητή με το στόχο DNA, το οποίο παρέχεται από την παρουσία NaCl ή KCl. Εάν η συγκέντρωση των δύο αλάτων υπερβαίνει τα 50 mM, αναστέλλεται η δράση της *Taq* πολυμεράσης. Στο διάλυμα επίσης υπάρχει Tris-HCl σε συγκέντρωση 10-50mM με pH 8,3 (στους 20°C). Κατά την διάρκεια της αντίδρασης, όπου οι θερμοκρασίες φθάνουν έως τους 94°C, το pH κυμαίνεται μεταξύ 6,8 και 7,8. Τέλος στο διάλυμα υπάρχουν και σταθεροποιητές ενζύμου όπως ζελατίνη ή ορολευκωματίνη (bovine serum albumin-BSA) και μη ιοντικά απορρυπαντικά (Tween 20 και Triton X-100).

Συνήθως ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται Tris-Cl τυπικά σε συγκέντρωση ~10 mM, προκειμένου το pH να διατηρείται μεταξύ 8,3 και 8,5 σε θερμοκρασία δωματίου. Στην θερμοκρασία των 72 °C στην οποία επιτελείται ο πολυμερισμός, το pH πέφτει κατά μια περίπου μονάδα φτάνοντας στο ~7,2 που είναι η κατάλληλη τιμή για την δράση των περισσότερων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών.

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΗΣ PCR 10x	ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΗΣ PCR 1x
Tris 100mM, pH 8,3 στους 25°C KCl 500 mM MgCl ₂ 15-20 mM*	Tris 10 mM, pH 8,3 στους 25°C KCl 50 mM MgCl ₂ 1,5-2,0 mM*

Πίνακας 1: Τα κύρια συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος της PCR στις συγκεντρώσεις 10x και 1x.

* Η ιδανική συγκέντρωση του MgCl₂ ποικίλλει, καθώς εξαρτάται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της εκάστοτε αντίδρασης, και συνήθως καθορίζεται εμπειρικά. Γενικά πολύ χαμηλή συγκέντρωση Mg²⁺ οδηγεί σε χαμηλές αποδόσεις, ενώ πολύ υψηλή συγκέντρωση Mg²⁺ προκαλεί την εμφάνιση παραπροϊόντων (δηλαδή τον πολλαπλασιασμό άλλων αλληλουχιών πέραν της αλληλουχίας-στόχου). Το MgCl₂ συχνά προστίθεται ξεχωριστά από το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR, κυρίως σε πειράματα τα οποία έχουν ως στόχο τη βελτιστοποίηση της αντίδρασης, ώστε να μπορεί κανείς να δοκιμάσει διαφορετικές συγκεντρώσεις του.

Δεν υπάρχει συγκεκριμένη σειρά με την οποία αναμειγνύονται τα αντιδραστήρια. Το χλωριούχο μαγνήσιο, τα dNTPs, το ισοτονικό διάλυμα και όσο νερό (δυσ αποσταγμένο και αποστειρωμένο) χρειάζεται για να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης μπορούν να αναμειχθούν και να μοιραστούν στα φιαλίδια ή να προστεθούν ξεχωριστά σε κάθε φιαλίδιο. Στο στάδιο αυτό μπορούν να εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV 254nm) για την καταστροφή εξωγενούς DNA. Μετά προστίθενται οι εκκινητές (αν έχουν μικρό μήκος -έως 10 βάσεις- μπορούν να προστεθούν πριν την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία), το DNA και τέλος η πολυμεράση.(διαδίκτυο ^{2,3,6,7} ξεν.βιβ.^{4,5})

ΤΑ ΚΥΡΙΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΜΙΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΚΟΠΟΣ	ΣΥΝΗΘΗΣ ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ Ή ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΜΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ
<i>Ρυθμιστικό διάλυμα</i>	Ρυθμίζει το pH	1x
<i>MgCl₂ (ορισμένες φορές περιλαμβάνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα)</i>	Απαραίτητος συμπαραγόντας της πολυμεράσης	1,5-2,5 mM
Μήτρα DNA	Το μόριο DNA που περιέχει την αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.	0,0001-1,0 μg(σε ιατροδικαστικές αναλύσεις τυπικά χρησιμοποιούνται 0,5-10 ng DNA)
<i>Εμπρόσθιος εκκινητής</i>	Μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό με την περιοχή που βρίσκεται ακριβώς ανοδικά της αλληλουχίας-στόχου. Από το 3' υδροξύλιο του ξεκινάει η αντιγραφή της μιας αλυσίδας της αλληλουχίας-στόχου.	0,05-2,0 μM
<i>Ανάστροφος εκκινητής</i>	Μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό με την περιοχή που βρίσκεται ακριβώς καθοδικά της αλληλουχίας στόχου. Από το 3' υδροξύλιο του ξεκινάει η αντιγραφή της άλλης αλυσίδας της αλληλουχίας-στόχου.	0,05-2,0 μM
<i>dNTP (dATP,dGTP, dCTP,dTTP)</i>	Υπομονάδες του DNA που απαιτούνται για την αντιγραφή του.	200μM το καθένα
<i>Θερμοσταθερή DNA πολυμεράση</i>	Ένζυμο που συνθέτει DNA.	0.01-0.05 μονάδες/μL (U/μL)

Πίνακας 2: Τα κύρια συστατικά μιας αντίδρασης PCR

2.2 ΧΩΡΟΙ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ:

Για να εκτελεστεί με επιτυχία η αντίδραση της PCR και να έχουμε εξαγωγή ποιοτικών πειραματικών αποτελεσμάτων θα πρέπει οι εργασίες που γίνονται από το ειδικευμένο προσωπικό να γίνονται χώρους με κατάλληλες υποδομές και με ειδικό εξοπλισμό. Το εργαστήριο θα πρέπει να είναι σχεδιασμένο κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να ελαχιστοποιείται η επαφή μεταξύ των προ-PCR και μετά-PCR χώρων(περιοχή απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων, δωμάτιο παρασκευής διαλυμάτων αντιδράσεων-master mix, πάγκος προσθήκης νουκλεϊκών οξέων στα διαλύματα των αντιδράσεων και δωμάτιο PCR). Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται σε κάθε περιοχή εργασίας δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ή να μεταφέρεται έστω και για σύντομο χρονικό διάστημα σε άλλες περιοχές. Οι συσκευές θα πρέπει να φέρουν ειδική σήμανση (π.χ διαφορετικό χρώμα) για τον εύκολο εντοπισμό της ύπαρξης εξοπλισμού σε λάθος χώρο.

ΚΑΘΑΡΟ ΔΩΜΑΤΙΟ:

- Ο χώρος αυτός θα πρέπει να περιορίζεται αυστηρά και μόνο στην παρασκευή διαλυμάτων και του κύριου μίγματος της PCR.
- Είναι από τους πιο ευαίσθητους χώρους (απομονωμένη περιοχή, χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας-UV, αποφυγή μεταφοράς υλικών από άλλους χώρους -tubes, tips, πάγκος, τετράδιο εργαστηρίου)
- Ο εξοπλισμός του χώρου θα πρέπει να χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τις ανάγκες του δωματίου και δεν θα πρέπει να μεταφέρεται εκτός δωματίου ή να χρησιμοποιείται για άλλο λόγο (υπεριώδης ακτινοβολία, απολύμανση, μικροφυγόκεντρος, ψυγείο, καταψύκτης, δοχείο πάγου, vortex (κυκλομίκτης), γυαλιά ασφαλείας, σέτ μικροπιπεττών, tips).
- Διαφορετικές εργαστηριακές ρόμπες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο σε αυτό το δωμάτιο και όχι σε άλλους χώρους.
- Καινούργια, καθαρά γάντια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και θα πρέπει να αντικαθίστανται όταν αφήνουμε το δωμάτιο και επιστρέφουμε ξανά.
- Η κατάλληλη φύλαξη πολύ ευαίσθητων αντιδραστηρίων είναι αναγκαία προϋπόθεση για τη σωστή λειτουργία τους.

ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ:

- Η περιοχή αυτή είναι αφιερωμένη στο χειρισμό των δειγμάτων και στην απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων.

- Σε μερικές περιπτώσεις απαιτούνται επιπρόσθετα μέτρα βιοασφάλειας.
- Οι ακριβείς διαδικασίες που θα πρέπει να ακολουθηθούν εξαρτώνται από τη φύση του υλικού και του μολυσματικού παράγοντα.
- Όπως και με το καθαρό δωμάτιο, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ξεχωριστές εργαστηριακές ρόμπες για την εργασία στην περιοχή αυτή, καθώς και καινούργια, καθαρά γάντια.
- Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να λαμβάνεται για την αποφυγή της επιμόλυνσης του χώρου και των συσκευών.

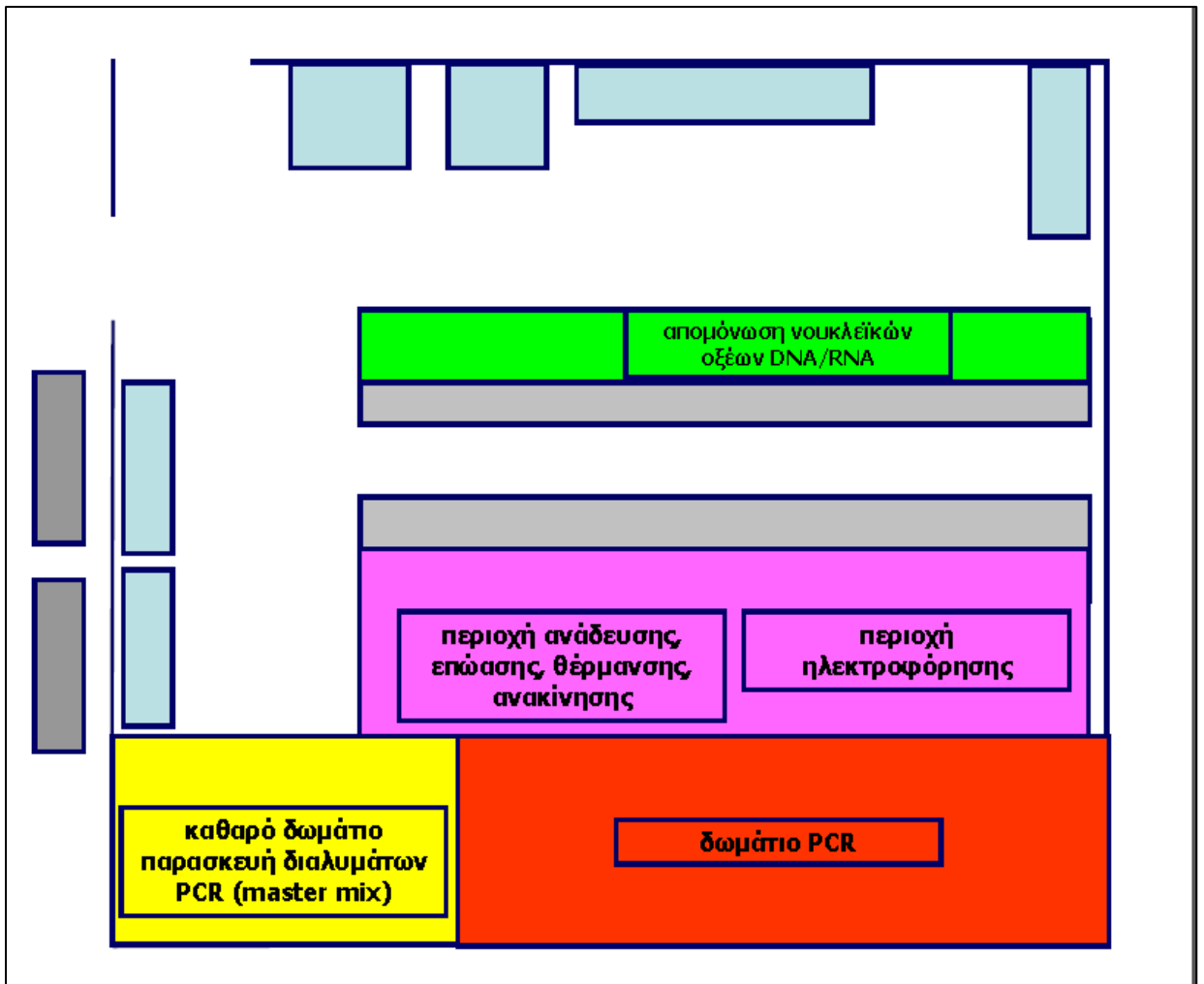
ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΕΛΙΚΗΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ:

- Η περιοχή αυτή είναι αφιερωμένη στην παρασκευή των αντιδράσεων PCR με την ανάμειξη των νουκλεϊκών οξέων και του κύριου μίγματος.
- Αρκετές συσκευές και υλικά συνιστάται να βρίσκονται ειδικά στο χώρο αυτό. (συσκευή PCR, υπεριώδης ακτινοβολία, ψυγείο, καταψύκτης, vortex, χρονόμετρα, εργαστηριακές ρόμπες, γάντια, γυαλιά ασφαλείας, ένα σετ μικροπιπεττών, αντίστοιχα tips)

ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ:

- Στην περιοχή αυτή όλα τα τελικά προϊόντα των αντιδράσεων, μπορούν να αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου.
- Μετά από την ηλεκτροφόρηση, τα προϊόντα των αντιδράσεων παρατηρούνται υπό υπεριώδη ακτινοβολία (χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο). (σκοτεινό δωμάτιο, πλάκα υπεριώδους, camera).

Είναι πολύ σημαντικό να γίνεται διαχωρισμός των συσκευών που χρησιμοποιούνται πριν και μετά από την PCR. (σέτ πιπεττών το οποίο θα πρέπει να είναι αποκλειστικά αφιερωμένο για χρήση με τα προϊόντα της PCR, συσκευές για την παρασκευή πηκτωμάτων αγαρόζης και ακρυλαμιδίου, μικροφυγόκεντροι, πεχάμετρο, ζυγαριά, ψυγείο, καταψύκτης, θερμόμενη πλάκα, stirrer, φούρνος μικροκυμάτων...)(Διαδύκτιο 10,19,22,28)



Εικόνα 6: Οργάνωση εργαστηρίου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ-ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ

Η PCR είναι μια πολύ ευαίσθητη και ειδική μέθοδος. Με τον κατάλληλο σχεδιασμό και των έλεγχου των παραμέτρων μπορεί να αποδώσει και στο 100% της ευαισθησίας του. Τα πιο κοινά προβλήματα προέρχονται από την παράβλεψη βασικών αρχών σχεδιασμού και βελτιστοποίησης.

Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία της PCR. Δύο από τους πιο βασικούς είναι η σωστή διεξαγωγή της διαδικασίας και δεύτερον τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στην διαδικασία να είναι κατάλληλα. Γι' αυτό το προσωπικό πρέπει να είναι εξειδικευμένο έτσι ώστε να διεξαχθεί σωστά η τεχνική της PCR αλλά και να υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου πιθανού λάθους λόγω λανθασμένων βημάτων και χρήση χημικών κατά την διάρκεια της διαδικασίας.

Η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται από:

- ✓ την επιλογή κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης
- ✓ την χρήση κατάλληλου προγράμματος σχεδιασμού των εκκινήτων
- ✓ την εκτίμηση ποιότητας των δειγμάτων και έλεγχος αναστολέων
- ✓ τον έλεγχο για τυχόν επιμόλυνση
- ✓ την βελτιστοποίηση ποιότητας και συγκέντρωσης αντιδραστηρίων
- ✓ τη ρύθμιση των παραμέτρων του προγράμματος

Η υψηλή ευαισθησία της μεθόδου είναι δυνατόν να αποτελέσει σημαντικό πρόβλημα καθώς ακόμα και ελάχιστες επιμολύνσεις στη μήτρα είναι δυνατόν να δώσουν ψευδή αποτελέσματα.

Παρ' όλα αυτά η ευαισθησία της PCR δεν έχει μόνο αρνητικά. Η ικανότητα να πολλαπλασιάζει ότι βρίσκεται μέσα σε ένα δείγμα σημαίνει ότι μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την PCR για να ανιχνεύσουμε DNA το οποίο βρίσκεται σε απειροελάχιστη ποσότητα στο δείγμα μας. Για παράδειγμα, αν κάποιος νοσεί χρόνια με τον ιό HIV μπορεί να έχει πολύ χαμηλό ιικό φορτίο, γεγονός το οποίο καθιστά δύσκολο να εντοπισθούν εύκολα αντίγραφα του ιού στο αίμα του ασθενούς. Χάρης λοιπόν την ευαισθησία της PCR, ακόμα και πολύ μικρά ιικά φορτία είναι δυνατόν να εντοπισθούν, γιατί ακόμα και αν υπάρχει μόνο ένα αντίγραφο του ιού στο δείγμα αυτό θα πολλαπλασιαστεί με την διαδικασία της PCR.

Στην ιατροδικαστική PCR, η ευαισθησία της PCR είναι πολύ σημαντική διότι επιτρέπει στον ειδικό να αναγνωρίσει ξένο DNA σε ένα δείγμα το οποίο μπορεί να του παρέχει κάποιο στοιχείο για κάποιο έγκλημα. Επίσης λόγω της ευαισθησίας είναι πιο εύκολο να γίνει και η ανάλυση DNA από αρχαιολογικά ευρήματα. Η δυνατότητα να μπορείς να πολλαπλασιάσεις ένα μικροσκοπικό δείγμα DNA είναι πολύ σημαντική

σε αυτό τον κλάδο διότι ένας ανθρωπολόγος έχει πολλές φορές μόνο ένα δόντι για να μπορέσει να αναγνωρίσει κάποιον.

Υπάρχουν τέσσερις βασικές πηγές επιμόλυνσης:

- τα προϊόντα από προηγούμενες PCR αντιδράσεις
- το DNA που “κυκλοφορεί” πριν στο εργαστήριο
- η επιμόλυνση από δείγμα σε δείγμα
- το DNA που υπάρχει συνέχεια στον περιβάλλοντα χώρο του εργαστηρίου από τα άτομα ή τα αντιδραστήρια για απομόνωση DNA ή PCR

Μέθοδοι ανίχνευσης πιθανής επιμόλυνσης:

- δείγματα αρνητικοί μάρτυρες σε κάθε στάδιο της αντίδρασης
- αλληλούχιση των προϊόντων της PCR

Ωστόσο το πιο σημαντικό είναι η λήψη μέτρων που περιορίζουν την πιθανότητα επιμόλυνσης.

Οι διαδικασίες για την αποφυγή επιμόλυνσης μπορούν να διαιρεθούν σε χημικές και φυσικές. Οι χημικές διαδικασίες περιλαμβάνουν τη χρήση του ενζύμου Uracil DNA glycosylase (UNG) μετά την ενσωμάτωση των dTTP ως δομικών λίθων κατά τη διάρκεια της PCR ή τη χρήση του Psoralen, το οποίο αλληλεπιδρά ομοιοπολικά υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας με τα προϊόντα διπλής έλικας της PCR για την αποφυγή της αποδιάταξης των προϊόντων σε επακόλουθες αντιδράσεις PCR. Ο φυσικός έλεγχος της επιμόλυνσης απαιτεί ότι όλοι οι χώροι θα πρέπει να είναι φυσικά διαχωρισμένοι

Πρόληψη πιθανής επιμόλυνσης:

- ✓ Διαχωρισμός χώρων πραγματοποίησης PCR
- ✓ Καλή εργαστηριακή πρακτική
- ✓ Διαφορετικές συσκευές, αυτόματες πιπέτες, μικροφυγόκεντροι, tubes, γάντια θα πρέπει να διατηρούνται σε κάθε περιοχή.
- ✓ Φυσικές μέθοδοι διαχωρισμού
- ✓ Παρασκευή DNA/RNA σε BSC ή hood ή PCR-workstation
- ✓ Φίλτρα στα tips
- ✓ Υπεριώδης ακτινοβολία
- ✓ Αντιδραστήρια PCR σε μικρές ποσότητες
- ✓ Επιλογή του αριθμού και του είδους των αντιδράσεων ελέγχου. Σε κάθε ομάδα αντιδράσεων θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και αντιδράσεις ελέγχου (θετικά δείγματα ελέγχου, αρνητικά δείγματα ελέγχου, δείγματα ελέγχου αναστολέων).
- ✓ Αδρανοποίηση προϊόντων πολλαπλασιασμού με χημικές/βιοχημικές μεθόδους.



Εικόνα 9: Φυγόκεντρος



Εικόνα 10: Σωληνάρια (tubes)



Εικόνα 11: Πεχάμετρο



Εικόνα 12: Ζυγαριά



Εικόνα 13: Αναδευτήρας (stirrer)



Εικόνα 14: Vortex-mixer



Εικόνα 15: Προστατευτικά γυαλιά



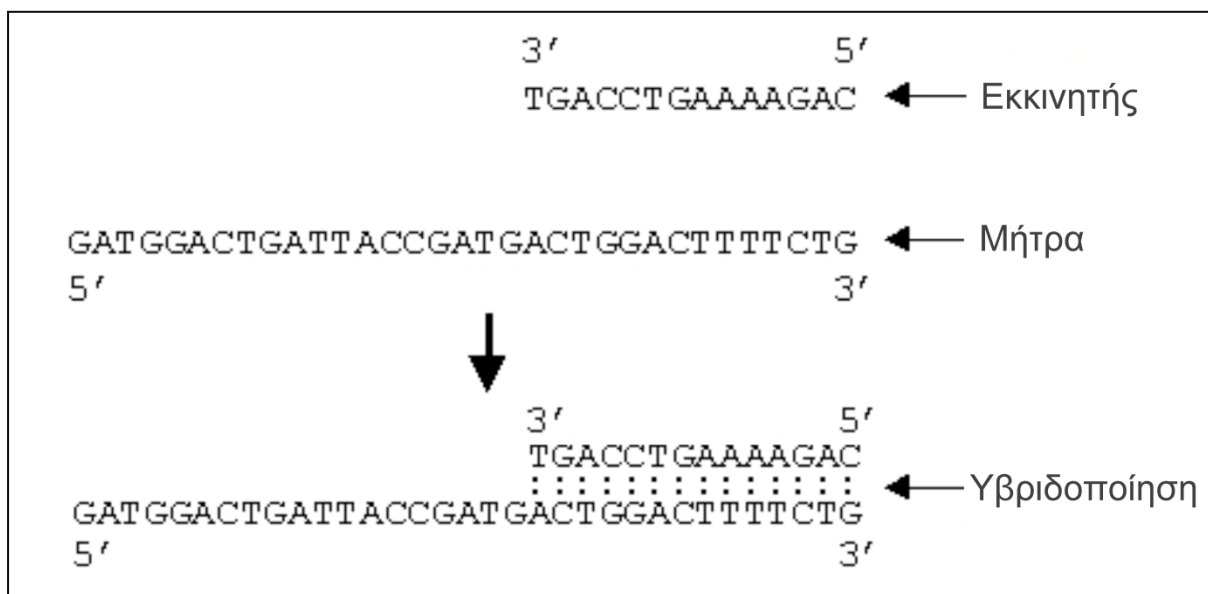
Εικόνα 16: Εργαστηριακή ρόμπα



Εικόνα 17: Εργαστηριακά γάντια

3.2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Η διαδικασία επιλογής της αλληλουχίας των εκκινήτων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιτυχία της PCR. Χωρίς κατάλληλους, λειτουργικούς εκκινήτες δεν θα υπάρξει προϊόν της PCR. Οι εκκινήτες είναι μικρές συνθετικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που σχεδιάζονται βάσει της αλληλουχίας της περιοχής που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Στη περίπτωση των αντιδράσεων της PCR είναι ζευγάρι , ένας εμπρόσθιος και ένας ανάστροφος εκκινήτης. Στη δε περίπτωση της αλληλούχισης μπορεί να είναι μόνο ο εμπρόσθιος ή ο ανάστροφος εκκινήτης. Μετά το βήμα της αποδιάταξης του DNA και την μείωση της θερμοκρασίας οι εκκινήτες προσδένονται στις δυο αλυσίδες του DNA. Οι εκκινήτες ορίζουν τη περιοχή της μήτρας που θα ενισχυθεί (αλληλουχία συμπληρωματική με τις ακραίες περιοχές της περιοχής που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί). Επίσης αποτελούν το σημείο έναρξης για τη λειτουργία της πολυμεράσης.



Εικόνα 18: Υβριδοποίηση του εκκινήτη στη συμπληρωματική του αλληλουχία πάνω στη μήτρα.

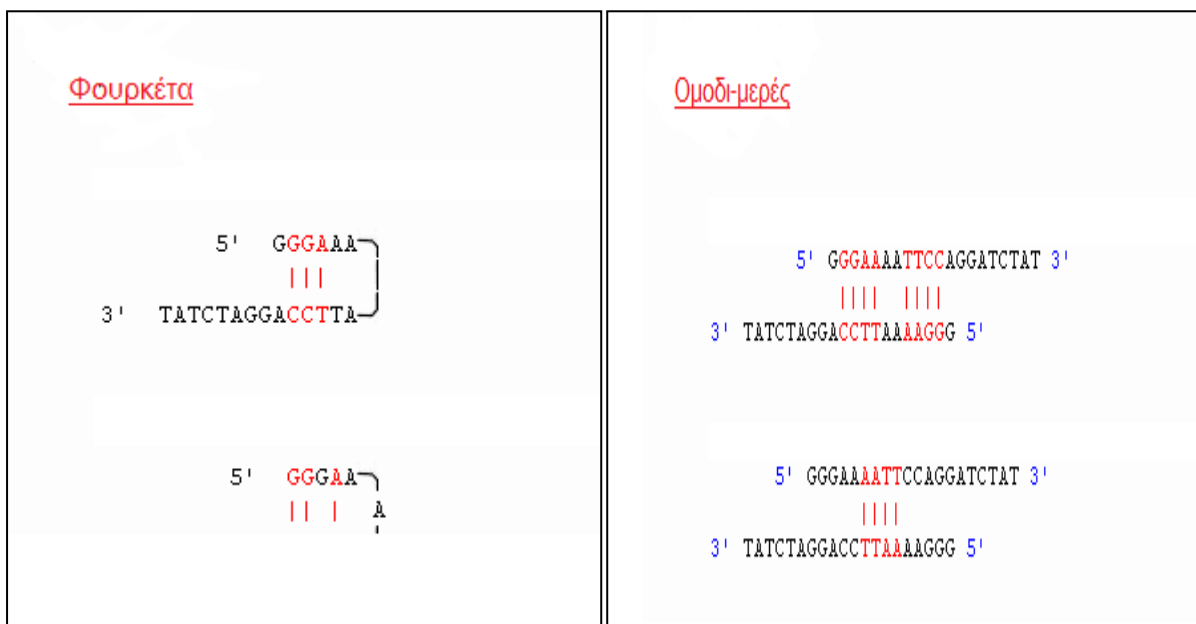
Σημαντικοί παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη:

- 1) Μοναδικότητα
- 2) Μήκος
- 3) Σταθερότητα στο 3° & 5° άκρο
- 4) Σύσταση βάσεων
- 5) Θερμοκρασία τήξης
- 6) Θερμοκρασία υβριδοποίησης
- 7) Εσωτερική δομή
- 8) Συμπληρωματικότητα

- ✓ Μοναδικότητα: Για κάθε ζεύγος εκκινητών πρέπει να υπάρχει αποκλειστικά ένας στόχος στη μήτρα του DNA. Επίσης δεν πρέπει να υπάρχει στόχος για τους εκκινητές πάνω σε μόρια πιθανής επιμόλυνσης από άλλες πηγές όπως DNA ανθρώπου, αρουραίου κ.λ.π.
- ✓ Μήκος: Το μήκος των εκκινητών επιδρά τόσο στην μοναδικότητα τους όσο και στην θερμοκρασία τήξης/υβριδοποίησης τους.
 - Όσο αυξάνεται το μήκος του εκκινητή τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να υβριδοποιεί μόνο με τον στόχο, ενώ επίσης αυξάνονται οι θερμοκρασίες τήξης/υβριδοποίησης.
 - Συνήθως οι εκκινητές έχουν μήκος 17 με 35 ζεύγη βάσεων.
- ✓ Σταθερότητα: Η επιμήκυνση από την Taq πολυμεράση ξεκινά όταν η αλληλουχία στο 3^ο άκρο του εκκινητή υβριδοποιηθεί σταθερά στην μήτρα DNA.
 - Αν στο 3^ο άκρο του εκκινητή εντοπίζονται τρεις ή παραπάνω βάσεις C/G μπορεί να προσδεθεί σταθερά σχεδόν σε όλες τις περιοχές της μήτρας με τρεις συμπληρωματικές βάσεις G/C.
 - Για την αποφυγή υβριδοποίησης σε πολλαπλά ή σε λανθασμένα σημεία λόγω πρόσδεσης του 3^ο άκρου του εκκινητή, συνήθως στον σχεδιασμό προτιμώνται πολύ σταθερά 5' άκρα και λιγότερα σταθερά 3' άκρα.
 - Προτιμώνται 5' άκρα με μία ή δύο βάσεις G/C, και 3' άκρα με μία ή και καμία βάση G/C.
- ✓ Σύσταση βάσεων: Επηρεάζει την υβριδοποίηση, τη θερμοκρασία τήξης/πρόσδεσης και τη σταθερότητα.
 - Προτιμώνται οι αλληλουχίες τυχαίας σύστασης
 - Αποφεύγονται οι περιοχές πλούσιες σε A+T είτε σε G+C
 - Προτιμάται μέση περιεκτικότητα σε G+C, περίπου 50-60% απαιτούνται ιδανικές θερμοκρασίες τήξης/πρόσδεσης και υβριδοποίησης
- ✓ Θερμοκρασία τήξης (T_m): Είναι η θερμοκρασία κατά την οποία το 50% των μορίων DNA είναι δίκλινα μόρια.
 - Εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση της αλληλουχίας του DNA. Υψηλότερη περιεκτικότητα σε G+C έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό περισσότερων δεσμών H₂ άρα υψηλότερο T_m.
 - Απλή μέθοδος υπολογισμού T_m για ≤ ολιγονουκλεοτίδια 20 βάσεις:

$$T_m = (A + T) \times 2 + (G + C) \times 4$$

- Υπάρχουν και άλλες πιο ακριβείς μέθοδοι υπολογισμού
- ✓ Θερμοκρασία υβριδοποίησης T_a : Είναι η θερμοκρασία κατά την οποία οι εκκινητές προσδένονται στη μήτρα του DNA. Μπορεί να υπολογισθεί από το T_m .
- $T_a = T_{m_{\text{εκκινητή}}} - 4^\circ\text{C}$
- $$T_a = 0.3 \times T_{m_{\text{εκκινητή}}} + 0.7 \times T_{m_{\text{προϊόντος}}} - 14,9$$
- Για την υβριδοποίηση των εκκινητών στη μήτρα του DNA πριν την αναδιάταξη των δυο αλυσίδων της μήτρας πρέπει:
- $T_{m_{\text{προϊόντος}}} - T_{\text{υβριδοποίησης}} > \text{των } 30^\circ\text{C}$
- ✓ Εσωτερικές δομές: η απόδοση της αντίδρασης PCR μειώνεται δραματικά στις περιπτώσεις που οι εκκινητές υβριδοποιούνται μεταξύ τους και σχηματίζουν δομές φουρκέτας ή ομοδιμερίζονται.




Εικόνα 19: Δευτεροταγείς δομές που πρέπει να αποφεύγονται.

✓ Συμπληρωματικότητα: Ο εμπρόσθιος και ανάστροφος εκκινητής πρέπει να είναι κατάλληλα σχεδιασμένοι ώστε να λειτουργούν στις ίδιες συνθήκες:

- Τα ζεύγη των εκκινητών πρέπει να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης και οι Tm των δυο εκκινητών δεν πρέπει να διαφέρουν παραπάνω από 3-5 °C.
- Εκκινητής με Tm υψηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδοποίησης της αντίδρασης μπορεί να προσδεθεί μη ειδικά και να ενισχύσει λάθος περιοχή της αλληλουχίας του DNA.
- Εκκινητής με Tm χαμηλότερη από την θερμοκρασία υβριδοποίησης της αντίδρασης μπορεί να μην προσδεθεί καθόλου και να μην αποδώσει προϊόν PCR.

Ο σχεδιασμός και η επιλογή της αλληλουχίας των εκκινητών είναι αρκετά πολύπλοκος και ως εκ τούτου πραγματοποιείται σχεδόν πάντα μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων. Όλες οι παραπάνω παράμετροι είναι καθορισμένες και κωδικοποιημένες τόσο σε εντολές προγραμμάτων online όσο και σε λογισμικά υπολογιστών.

Μπορούμε όμως αντί να σχεδιάσουμε τους εκκινητές να τους προμηθευτούμε από μια εμπορική εταιρεία. Οι εκκινητές που θα προμηθευτούμε θα φέρουν ειδικό πιστοποιητικό ανάλυσης το οποίο θα μας παρέχει τις απαραίτητες πληροφορίες. Επίσης είναι πιθανόν να παραλάβουμε λυοφιλιώμενους (αφυδατωμένους) εκκινητές, αυτοί πρέπει να ενυδατωθούν, κατόπιν να κατανεμηθούν σε ξεχωριστά σωληνάρια και να αποθηκευτούν στην κατάψυξη.



CLEAN GENE PRIMER CERTIFICATE

Oligo Name	Oligo #	Length	MW	Tm	µg/OD	OD	µg	nmol	Sequence
forward	23290	19	5716.7	61.2	31.8	12.9	410	72.0	GCTOCTA CAAATGCC ATCA
reverse	23291	20	6227.9	63.5	31.0	11.0	341	54.9	GATAGTG GGATTGT GCGTCA

Εικόνα 20: Ειδικό πιστοποιητικό ανάλυσης εκκινητών

- Στις δύο πρώτες στήλες αναφέρονται τα ονόματα των εκκινητών και ένας αριθμός που τους αποδίδεται.
- Κατόπιν αναφέρεται το μήκος τους (σε νουκλεοτίδια) και το μοριακό τους βάρος. Το μοριακό τους βάρος μπορούμε να το υπολογίσουμε και εμείς με βάση την αλληλουχία τους
- Στη συνέχεια αναφέρεται η θερμοκρασία τήξης τους. Η θερμοκρασία διασπά τους δεσμούς υδρογόνου που συγκρατούν τις αλυσίδες των δίκλωνων νουκλεϊκών οξέων. Ως θερμοκρασία τήξης (T_m) ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία τα μισά μόρια του εκκινητή ζευγαρώνουν με τη μήτρα DNA, ενώ τα άλλα μισά σταθεροποιούνται πάνω σε αυτήν και παραμένουν ελεύθερα. Σε μια PCR είναι σημαντικό να γνωρίζουμε το T_m των εκκινητών. Αν η θερμοκρασία στο στάδιο υβριδοποίησης υπερβαίνει σημαντικά το T_m οι εκκινητές δεν θα προσδεθούν αποτελεσματικά στη μήτρα DNA. Αντίθετα, αν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή, οι εκκινητές τείνουν να προσδεθούν μη ειδικά και σε άλλες, τυχαίες αλληλουχίες του DNA με τις οποίες εμφανίζουν μικρή συμπληρωματικότητα. Κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει στο πολλαπλασιασμό παραπροϊόντων.
- Ακολουθούν τρεις στήλες όπου αναφέρονται σχετικά με την ποσότητα του εκκινητή που περιέχεται σε κάθε φιαλίδιο, η οποία προσδιορίζεται φασματομετρικά. Η οπτική πυκνότητα (OD, Optical Density) είναι το ίδιο μέγεθος με την απορρόφηση. Όπως είχαμε πει, OD (στα 260 nm) ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ολιγονουκλεοτιδίου περίπου 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Οι ελαφρώς διαφορετικές τιμές που αναφέρονται εδώ (31,8 και 31,0 $\mu\text{g}/\text{OD}$) είναι πιο ακριβείς, καθώς βασίζονται στην αλληλουχία των συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδίων. Η OD στην επόμενη στήλη είναι η τιμή που προσδιόρισε με ένα φασματοφωτόμετρο ο κατασκευαστής των εκκινητών κατά τον έλεγχο τους. Αν πολλαπλασιάσουμε τα $\mu\text{g}/\text{OD}$ με την OD, θα βρούμε πόσα μg εκκινητή περιέχονται στο αντίστοιχο φιαλίδιο. Η πληροφορία αυτή αναγράφεται στην επόμενη στήλη.
- Η στήλη «nmol» υποδεικνύει την ποσότητα κάθε εκκινητή σε nmol.
- Τέλος στην δεξιά στήλη αναφέρονται οι αλληλουχίες των εκκινητών.

Πριν την προετοιμασία των πυκνών διαλυμάτων των εκκινητών καλό είναι να μελετήσουμε το πρωτόκολλο που πρόκειται να ακολουθήσουμε. (Ξεν.βιβ_{7,8,11,12})

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 ΓΕΝΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ- ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ:

Βήμα 1: Προσδιορίζουμε τα συστατικά του κεντρικού μίγματος (master mix).

Αφού αποφασίσουμε ποιο πρωτόκολλο θα ακολουθήσουμε και πόσα δείγματα θα αναλύσουμε, μπορούμε να σχεδιάσουμε έναν πίνακα όπως ο πίνακας 3 παρακάτω. Στον πίνακα αυτό περιλαμβάνονται τα συστατικά που θα πρέπει να περιέχει κάθε αντίδραση, καθώς και η συγκέντρωση και ο όγκος όλων των αντιδραστηρίων. Η τελευταία στήλη συμπληρώνεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να περιληφθούν στο πείραμα.

Ας υποθέσουμε ότι έχουμε εννέα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων και των δειγμάτων ελέγχου (controls), και επομένως σχεδιάζουμε να πραγματοποιήσουμε εννέα αντιδράσεις. Αυτό σημαίνει πως θα έχουμε εννέα σωληνάρια, ένα για κάθε δείγμα, και για κάθε σωληνάριο θα περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την PCR (μήτρα, dNTP κτλ). Μια καλή πρακτική θα ήταν να παρασκευάσουμε λίγο περισσότερο κεντρικό μείγμα(συνήθως για ένα επιπλέον δείγμα από αυτό που θεωρητικά θα χρειαστούμε, προκειμένου να είμαστε σίγουροι πως θα μας φτάσει. Στον πίνακα 4 παρουσιάζεται η τελευταία στήλη συμπληρωμένη για 10(9+1) δείγματα. Για παράδειγμα, για κάθε αντίδραση απαιτούνται 8 μL dNTP, οπότε για να παρασκευάσουμε αρκετό κεντρικό μείγμα για δέκα αντιδράσεις, θα χρειαστούμε 80 μL dNTP. Να σημειωθεί η μήτρα DNA δεν περιλαμβάνεται στο κεντρικό μείγμα, επειδή συνήθως διαφέρει από δείγμα σε δείγμα.

Βήμα 2: Ετοιμάζουμε το κεντρικό μίγμα.

Ετοιμάζουμε το κεντρικό μίγμα με τα συστατικά που αναφέρονται στον πίνακα 2, εκτός από το ένζυμο και τη μήτρα DNA: αναμειγνύουμε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος, 80 μL από το μείγμα των dNTP, 10 μL από κάθε εκκινητή και 695 μL νερού.

Βήμα 3: Προσθέτουμε την μήτρα DNA.

Προσθέτουμε την μήτρα DNA (10 μL) σε καθένα από τα 9 σωληνάρια. Η μήτρα DNA δεν περιλαμβάνεται στο κεντρικό μείγμα, καθώς στο παράδειγμα αυτό διαφέρει από δείγμα σε δείγμα.

Βήμα 4: Προσθέτουμε το ένζυμο στο κεντρικό μίγμα.

Προσθέτουμε το ένζυμο, στην προκειμένη περίπτωση 5μL, στο κεντρικό μίγμα, αναμειγνύουμε και φυγοκεντρίζουμε σύντομα, προκειμένου να συλλέξουμε όλο το υγρό στο κάτω μέρος του σωληνάριου.

Βήμα 5: Αναμειγνύουμε το κεντρικό μίγμα με τη μήτρα DNA σε κάθε σωληνάριο.

Κατανέμουμε σε καθένα από τα 9 σωληνάρια 90 μL από το κεντρικό μίγμα, αναμειγνύουμε και φυγοκεντρίζουμε σύντομα. (Χρησιμοποιούμε διαφορετικό ακρορύγχιο για κάθε δείγμα, προκειμένου να αποφύγουμε την πιθανότητα επιμόλυνσης του ενός δείγματος με το άλλο.)

Βήμα 6: Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή.

Τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή εκτίθεται σε ελεγχόμενες αλλαγές της θερμοκρασίας για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Ως προς τις συνθήκες θερμοκρασίας και τον χρόνο, ο θερμοκυκλοποιητής προγραμματίζεται ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες του συγκεκριμένου πειράματος. (Ξεν.βιβ.4,9,13 Διαδ. 6,7,8,9)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ PCR1- ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΜΙΓΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ**

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΥΚΝΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΜΕΙΓΜΑ
<i>Ρυθμιστικό διάλυμα με MgCl₂</i>	10x	10 μL	
<i>dNTP</i>	2,5 mM από το καθένα	8μL	
<i>Εμπρόσθιος εκκινητής</i>	50 pmol/μL	1μL	
<i>Ανάστροφος εκκινητής</i>	50 pmol/μL	1μL	
<i>DNA πολυμεράση Taq</i>	5 U/μL	0,5μL	
<i>Νερό</i>		Όσο απαιτείται ο τελικός όγκος της αντίδρασης (με τη μήτρα DNA) να είναι 100μL.	
<i>Μήτρα DNA</i>	10 ⁵ -10 ⁶ αντίγραφα σε 10μL	10μL	

Πίνακας 3 : Πρωτόκολλο για PCR(1) –κεντρικό μίγμα

ΠΙΝΑΚΑΣ 4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ PCR1- ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΜΙΓΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ			
ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΥΚΝΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΜΕΙΓΜΑ ΣΤΟ
Ρυθμιστικό διάλυμα με MgCl ₂	10X	10μL	100μL
dNTP	2,5 mM από το καθένα	8μL	80μL
Εμπρόσθιος εκκινητής	50 pmol/μL	1μL	10μL
Ανάστροφος εκκινητής	50 pmol/μL	1μL	10μL
DNA πολυμεράση Taq	5 U/μL	0.5μL	5μL
Νερό		Όσο απαιτείται ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης (με τη μήτρα DNA) να είναι 100μL	695μL
Μήτρα DNA	10 ⁵ -10 ⁶ αντίγραφα σε 10 μL	10 μL	

Πίνακας 4: Πρωτόκολλο για PCR (2) – κεντρικό μίγμα

4.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ PCR

Παρότι η τεχνική της PCR είναι μια απλή διαδικασία, στην πράξη πολλές εργαστηριακές δοκιμές αποτυχαίνουν και δεν προσφέρουν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Τα ποια συχνά είναι προβλήματα που με εμφανίζονται είναι οι δοκιμές στις οποίες δεν παράγεται το επιθυμητό προϊόν(ή παράγεται σε ελάχιστη ποσότητα) και εκείνες στις οποίες παράλληλα με το επιθυμητό προϊόν παράγονται και άλλα παρά- προϊόντα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, για να διαπιστώσουμε αν λειτουργούν σωστά οι εκκινητές και ο θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιήσαμε εκτελούμε τις λεγόμενες «τεχνικές ελέγχου» , στις οποίες χρησιμοποιούμε άλλους εκκινητές και διαφορετική πηγή DNA. Αν οι δοκιμές ελέγχου παραγάγουν το επιθυμητό προϊόν αλλά η δοκιμή που μας ενδιαφέρει παραγάγει ελάχιστη η καθόλου ποσότητα προϊόντος τότε πρέπει να γίνουν αλλαγές στις συνθήκες με τις οποίες διεξάγουμε την δοκιμή μας.

Πολλές φορές η ανάγκη για παραγωγή μεγάλης ποσότητας προϊόντος έχει ως αποτέλεσμα να μην δίνεται η απαραίτητη προσοχή σε κάθε μια ξεχωριστά PCR δοκιμή. Εν τούτοις, στις περισσότερες περιπτώσεις για να βελτιωθούν οι συνθήκες διεξαγωγής μιας δοκιμής PCR απαιτείται πολύς χρόνος. Οι διάφορες μέθοδοι βελτίωσης διαφέρουν ευρέως ανάλογα με το είδος των εκκινητών και του DNA που χρησιμοποιείται. Αυτές οι διαφορές προκύπτουν, εν μέρει επειδή το περιεχόμενο σε G και C και πιθανόν δευτερευόντων δομών διαφέρει για κάθε αλληλουχία-στόχο και επιπλέον η ικανότητα των εκκινητών να αλληλεπιδρούν με πολλαπλές αλληλουχίες αλλά και μεταξύ τους διαφέρει για κάθε ζευγάρι εκκινητών. Η βελτίωση μιας δοκιμής PCR είναι περίπλοκη διότι ταυτόχρονα με τις αλλαγές των συνθηκών μπορεί να αλλάξει η ικανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ των εκκινητών και της αλληλουχίας, η θερμοκρασία μετουσίωσης της αλληλουχίας και του προϊόντος και η δράση και πιστότητα της πολυμεράσης.

→ Επιλογή νέων εκκινητών :

Σε πολλές περιπτώσεις, εναλλακτικοί εκκινητές μπορούν να πολλαπλασιάσουν με την ίδια επιτυχία τις επιθυμητές αλληλουχίες. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται μπορούν να διαφέρουν στο μήκος από 21 νουκλεοτίδια μέχρι 24 και άνω, δίνοντας μεγάλη ποικιλία στην επιλογή εκκινητών. Αν η επιλογή των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά έγινε μέσω υπολογιστή τότε μπορούμε να επιλέξουμε νέους εκκινητές αλλάζοντας απλώς κάποιες παραμέτρους (π.χ αλλάζοντας το μήκος τους) με αυτό τον τρόπο μπορούμε να έχουμε μια πιο βελτιωμένη δοκιμή. Για να ενισχύσουμε τις πιθανότητες μιας σωστής PCR επιλέγουμε πολλαπλούς εμπρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές και τους δοκιμάζουμε σε διάφορους συνδυασμούς. Επειδή στους περισσότερους εκκινητές το 3 άκρο είναι πολύ σημαντικό, αν χρησιμοποιήσουμε εκκινητές οι οποίοι είναι λίγα νουκλεοτίδια

μακρύτεροι ή κοντύτεροι από τους κανονικούς εκκινητές μπορούμε να δημιουργήσουμε ισχυρότερο (ή πιο αδύναμο) πολλαπλασιασμό. Ομοίως, η πιθανότητα σχηματισμού ενός διμερούς εκκινητή, ο οποίος δημιουργείται όταν ένα ζεύγος εκκινητών περιλαμβάνει τμήματα από αλληλουχία που αλληλεπιδρά μεταξύ τους μπορεί να μειωθεί αν επιλέξουμε νέους εκκινητές που επικαλύπτουν τους αρχικούς αλλά αποφεύγουν την ομολογία. Αν δεν μπορεί να γίνει η επιλογή νέων εκκινητών, τότε οι συνθήκες της αντίδρασης πρέπει να αλλάξουν ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση.

→ Τροποποίηση συνθηκών των θερμικών κύκλων:

Ο πολλαπλασιασμός DNA με την χρήση της PCR αποτυγχάνει όταν το δείγμα ή το προϊόν δεν έχει μετουσιωθεί επαρκώς. Αυτό μπορεί να συμβεί αν το δείγμα στο σωληνάριο δεν φτάσει στην προγραμματισμένη θερμοκρασία μετουσίωσης ή αν το δείγμα ή το προϊόν απαιτεί υψηλότερη θερμοκρασία για την πλήρη μετουσίωση και διαχωρισμό των ελίκων. Μια αύξηση στην διάρκεια ή στην θερμοκρασία της μετουσίωσης μπορεί να βελτιώσει την απόδοση της PCR. Οι θερμοκρασίες μεταξύ 92-94⁰ C είναι συνήθως επαρκής για να μετουσιωθεί το DNA (μια διαδικασία η οποία τυπικά απαιτεί μερικά δευτερόλεπτα σε αυτές τις θερμοκρασίες), αλλά αυξάνοντας την διάρκεια του χρόνου σε αυτές τις θερμοκρασίες μπορεί να βελτιώσει την PCR. Εναλλακτικά, αυξάνοντας την θερμοκρασία μετουσίωσης (π.χ 97⁰C) ενώ παράλληλα γίνεται μείωση της διάρκειας (πχ από 30 δευτερόλεπτα σε 15 δευτερόλεπτα) μπορεί επίσης να βελτιώσει την PCR.

Οι αλλαγές στην θερμοκρασία ανόπτησης τυπικά έχουν σημαντική επίδραση στην εκτέλεση της PCR. Η παραγωγή λάθος προϊόντων με την χρήση PCR μπορεί να ελαττωθεί σημαντικά αν αυξήσουμε την θερμοκρασία της ανόπτησης έστω κατά 2⁰C. Όταν προσπαθούμε να βελτιώσουμε τις συνθήκες PCR, είναι συχνά χρήσιμο να προγραμματίσουμε μια σειρά δοκιμαστικών αντιδράσεων στις οποίες η θερμοκρασία ανόπτησης διαφέρει κατά 2⁰C έτσι ώστε η θερμοκρασία να αποδώσει την επιθυμητή αναλογία σωστών και λάθος προϊόντων. Όσο η θερμοκρασία της ανόπτησης αυξάνεται και πλησιάζει την T_m των εκκινητών , η απόδοση του επιθυμητού προϊόντος πέφτει. Η T_m των εκκινητών έχουν μήκος μικρότερο των 20 νουκλεοτιδίων μπορούν να υπολογιστούν από τον παρακάτω τύπο (Suggs et al.1981):

$$T_m = 4(G+C) = 2(A+T)$$

Ο υπολογισμός της T_m των εκκινητών για νουκλεοτίδια με μεγαλύτερο μήκος είναι πολύ περίπλοκος, παρόλα αυτά μπορεί να γίνει πιο εύκολος χρησιμοποιώντας το κατάλληλο λογισμικό. Το ποσό του προϊόντος που παράγεται με την PCR μπορεί να αυξηθεί μειώνοντας την θερμοκρασία ανόπτησης μερικούς βαθμούς.

Ο αριθμός των κύκλων που θα χρειαστεί για να εντοπίσουμε σε μεγάλη ποσότητα το επιθυμητό προϊόν είναι ανάλογος της αρχικής ποσότητας DNA στην αρχή της διαδικασίας. Εκτός από τις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις προϊόντος (<100

μόρια/αντίδραση), 30-35 κύκλοι πρέπει να είναι επαρκής. Η ανάγκη για παραπάνω από 40 κύκλους υποδεικνύει την χρήση εναλλακτικών συνθηκών ή υψηλά ασυνήθιστων συνθηκών για την διεξαγωγή της αντίδρασης. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των κύκλων αυξάνεται η παραγωγή λανθασμένου προϊόντος.

Οι αλλαγές στις συνθήκες εκτέλεσης των κύκλων από τους πρώτους σημαντικούς κύκλους της PCR μπορεί να μειώσει τον πολλαπλασιασμό ανεπιθύμητων προϊόντων. Εφόσον οι θερμοκυκλοποιητές αλλάζουν θερμοκρασίες σε διαφορετικούς ρυθμούς, μπορεί να γίνει σύνθεση DNA σε μερικά από τα μηχανήματα πριν την αρχική μετουσίωση, πράγμα το οποίο οδηγεί σε μεγάλη ποσότητα άσχετων προϊόντων. Η hot start μέθοδος μπορεί να ελαττώσει το φαινόμενο αυτό. Αντισώματα κατά της πολυμεράσης (π.χ Clontech Laboratories) μπορούν να αναστείλουν την δράση των ενζύμων μέχρι το αντίσωμα να χάσει την δράση του στην αρχή της μετουσίωσης. Εναλλακτικά, η Amplitaq Gold (Perkin-Elmer), είναι ένα είδος πολυμεράσης στο οποίο η πολυμεράση είναι συνδεδεμένη με λιποσώματα τα οποία διασπώνται όταν το δείγμα φτάσει στην θερμοκρασία μετουσίωσης και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί.

→ Αλλαγή στην συγκέντρωση Mg^{++} :

Η PCR είναι πολύ ευαίσθητη σε ότι αφορά την συγκέντρωση του Mg^{++} . Όταν η συγκέντρωση του Mg^{++} βγαίνει εκτός των ορίων, οι ευαίσθητες δοκιμές της PCR επηρεάζονται σημαντικά. Έτσι αν τροποποιήσουμε το ποσοστό αυτού του ιόντος μπορεί να βοηθήσει στο να ορίσουμε άριστες συνθήκες για την αντίδραση. Το Mg^{++} είναι συνδεδεμένο με το αρχικό DNA, με τα προϊόντα του DNA, με τους εκκινητές και τα dNTP. Ως εκ τούτου οι διακυμάνσεις στα ποσοστά ενός από αυτά τα στοιχεία μπορεί να αλλάξει την συγκέντρωση του διαθέσιμου Mg^{++} . Επίσης, EDTA τα οποία υπάρχουν στο αρχικό δείγμα μειώνουν το ποσοστό διαθέσιμου Mg^{++} . Ενώ οι συγκεντρώσεις του Mg^{++} των 1,5 mM είναι κοινές στην PCR, η άριστη συγκέντρωση Mg^{++} για συγκεκριμένο ζεύγος αρχικού DNA-εκκινητή μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 4 mM με προσαυξήσεις 0,5 για τις περισσότερες αντιδράσεις.

→ Αλλαγή του pH:

Η άριστη τιμή pH για την εκτέλεση της PCR διαφέρει από αντίδραση με αντίδραση. Ενώ η τιμή pH 8,3 είναι συνήθης για την PCR, είναι μεγάλης σημασίας να επιλεγεί η άριστη τιμή pH για μια δοκιμή κάνοντας πρώτα μια σειρά δοκιμαστικών αντιδράσεων στις οποίες οι τιμές του pH κυμαίνονται μεταξύ 8.0 με 10.0 με προσαυξήσεις των 0,5.

→ Αλλαγή άλλων συστατικών της αντίδρασης:

Εικονικά όλα τα συστατικά της αντίδρασης επηρεάζουν την απόδοση που θα έχει ο πολλαπλασιασμός του αρχικού DNA και το τελικό προϊόν. Αν οι παραπάνω

τροποποιήσεις δεν δώσουν το επιθυμητό αποτέλεσμα που περιμένουμε από την αντίδραση, τότε οι συγκεντρώσεις των dNTP, των εκκινητών και της πολυμεράσης μπορούν να αλλάξουν. Η προσθήκη οργανικών διαλυτών (πάνω του 10% DMSO ή φορμαμίδια) μπορεί επίσης να αυξήσουν την απόδοση της PCR (Pomp and Madrano 1991). Τέτοιοι διαλύτες μειώνουν την T_m για την ανόπτωση των εκκινητών και έτσι προάγουν την μετουσίωση, η οποία μπορεί να είναι μερικώς ωφέλιμη με δείγματα που περιέχουν υψηλό ποσοστό σε G+C. Παρόλα αυτά αυτοί οι διαλύτες αναστέλλουν την δράση της πολυμεράσης, έχοντας ως αποτέλεσμα την μείωση του ποσού του επιθυμητού προϊόντος.

Η πηγή DNA που θα χρησιμοποιηθεί αν δεν μπορεί να υποστηρίξει τον πολλαπλασιασμό ενός προϊόντος μπορεί να περιέχει αναστολείς της DNA πολυμεράσης. Για να εντοπίσουμε αυτό το λάθος πρέπει να χρησιμοποιήσουμε τους ίδιους εκκινητές και άλλα τμήματα (αλληλουχίες) για να πολλαπλασιάσουμε διαφορετικά δείγματα. Η κάθαρση του αρχικού δείγματος χρησιμοποιώντας εναλλακτικά πρωτόκολλα μπορεί να μας δώσει DNA που υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό. Εναλλακτικές μέθοδοι όπως η εκχύλιση του DNA με οργανικούς διαλύτες μπορεί να βοηθήσει παρόλα αυτά αμα δεν γίνει σωστή αφαίρεση αυτών των διαλυτών τότε αυτοί οι διαλύτες μπορούν επίσης να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό.

→ Επίλυση προβλημάτων:

Για να αντιμετωπίσουμε μια αποτυχημένη PCR, είναι σημαντικό να κρατάμε σε αρχείο ποια τμήματα DNA χρησιμοποιήθηκαν και υπό ποιες συνθήκες ώστε να μπορέσουμε να αποφύγουμε μελλοντικές αποτυχίες χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές DNA. Δεν θα γίνεται καταγραφή μόνο λάθος τμημάτων αλλά και επιπλέον θα γίνεται καταγραφή και των συστατικών που παρεμποδίζουν την δράση της πολυμεράσης. Ένα μη αναμενόμενο λάθος κατά την διάρκεια της διεξαγωγής της PCR μπορεί να εντοπισθεί γρήγορα χρησιμοποιώντας θετικούς ελέγχους (πχ τμήμα DNA που γνωρίζουμε ότι περιέχει τις αρχικές αλληλουχίες). Ωστόσο είναι κοινός γνωστό ότι το ποσοστό πολλαπλασιασμού με την χρήση PCR αλλάζει δεν είναι πάντα σταθερό, ανάλογα πάντα με την υποβάθμιση κάποιου συστατικού της αντίδρασης. Επομένως ο καλύτερος τρόπος για την αντιμετώπιση μελλοντικών αποτυχιών είναι να κρατάμε καλά αρχεία.

Γενικά η αποτυχία να πολλαπλασιάσεις ένα προϊόν και ο άφθονος πολλαπλασιασμός ενός ανεπιθύμητου προϊόντος είναι περιπτώσεις που πρέπει να αντιμετωπισθούν με αντίθετες προσεγγίσεις. Δηλαδή συνθήκες που αυξάνουν την απόδοση της PCR τείνουν να μειώσουν την απόδοση όλων των προϊόντων, ενώ συνθήκες που μειώνουν την δράση των προϊόντων συχνά αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό ανεπιθύμητων προϊόντων. (Ξεν.βιβ.14,15 Διαδ.6,7,30)

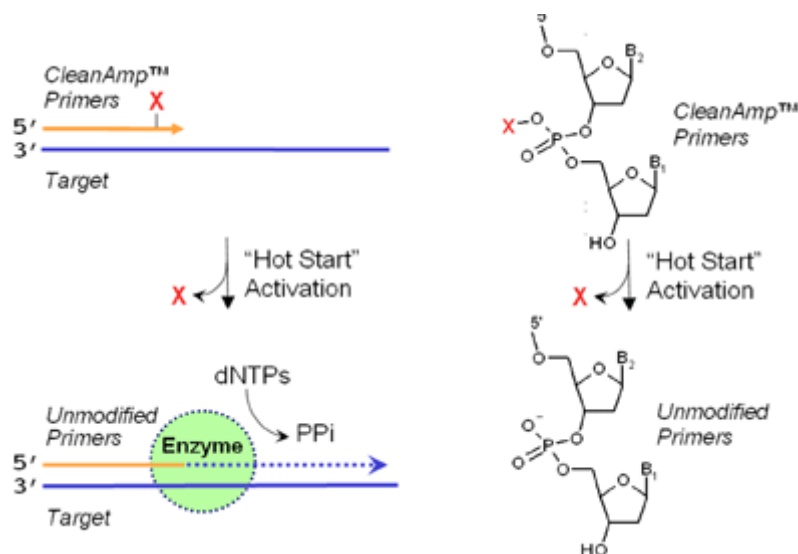
4.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ PCR

Έχουν περιγραφεί πολλές καινοτομίες για να βελτιωθεί η εκτέλεση μιας δοκιμής PCR. Όλες αυτές οι καινοτομίες είναι χρήσιμες και αξίζουν τον επιπλέον κόπο και χρόνο που χρειάζεται για να λυθεί είτε ο ανεπιτυχής πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA, είτε ένα πρόβλημα λόγω χαμηλής ποσότητας αρχικού DNA ή επειδή η επιθυμητή απόδοση του πολλαπλασιασμού είναι δύσκολο να επιτευχθεί. Γενικά, όταν ένας πολλαπλασιασμός παράγει συστηματικά ανεπιθύμητα προϊόντα και οι αλλαγές που εφαρμόζονται στις συνθήκες ανόπτησης δεν βοηθούν στην λύση του προβλήματος, κάποιες από τις παρακάτω εναλλακτικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Παρόλα αυτά αυτές οι μέθοδοι βελτιστοποίησης της PCR μόνο εφόσον έχουν γίνει όλες οι δυνατές αλλαγές στην θερμοκρασία και διάρκεια της ανόπτησης.

→ Hot start PCR:

Η hot start PCR διαφέρει στο ότι το μείγμα θερμαίνεται σε μια θερμοκρασία μεγαλύτερη από αυτή που προβλέπεται για την ανόπτηση των ολιγονουκλεοτιδίων και έπειτα την έναρξη του πολυμερισμού. Αυτή η τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα να αποφευχθεί ο πολυμερισμός του νέου DNA κατά την διάρκεια της αρχικής φάσης της αντίδρασης όπου υπάρχει η δυνατότητα μη ειδικής πρόσδεσης μεταξύ εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων και άλλων τμημάτων DNA στο μείγμα. Επιπλέον ελατώνει τον πολλαπλασιασμό ανεπιθύμητων προϊόντων.

Στην κλασική PCR, όλα τα αντιδραστήρια είναι παρόντα και η επιμήκυνση ξεκινά κατά την διάρκεια της αλλαγής θερμοκρασίας από αυτή του χώρου σε αυτή των 94°C. Δεν θα υπάρξει επιμήκυνση αν κατά την διάρκεια αλλαγής θερμοκρασίας λείπει κάποιο από τα συστατικά.



Εικόνα 21: Hot Start PCR

Μια μέθοδος hot start, μπορεί να επιτευχθεί μειώνοντας τα αρχικά dNTP, Mg⁺⁺, ή την ενζυμική συγκέντρωση ή χωρίζοντας τα συστατικά της αντίδρασης με ένα κέρινο 'φράγμα' το οποίο λιώνει καθώς το μείγμα θερμαίνεται ελευθερώνοντας έτσι ένα συστατικό στο υπόλοιπο μείγμα της αντίδρασης. Σε πρόσφατη χρήση αντισωμάτων για την Taq DNA πολυμεράση σε μια αντίδραση hot start, τα αντισώματα προσδένονται στο ένζυμο και προκάλούν αναστολή της δράσης του. Η ενζυμική δράση αποκαθίσταται όταν τα αντισώματα απελευθερωθούν και μετουσιωθούν σε υψηλή θερμοκρασία. Μια παρόμοια ενζυμική αναστολή μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση ενός τροποποιημένου ενζύμου(γνωστό ως Amplitaq Gold), το οποίο θεωρείται ότι δρά πλήρως μόνο μετά τον πρώτο κύκλο της μετουσίωσης. Μια απλή και μη ακριβή εναλλακτική μπορεί τις περισσότερες φορές να παρέχει την επιθυμητή απόδοση της hot start. Σε αυτή την περίπτωση όλα τα συστατικά της αντίδρασης προστίθενται στους δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι διατηρούνται μέσα σε πάγο για να μειωθεί η απόπτωση ή η δράση της πολυμεράσης. Μόλις το αντιδραστήριο μείγμα είναι έτοιμο, τα σωληνάρια τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή όταν η θερμοκρασία έχει φτάσει τους 85°C. (Ξεν.Βιβ. 5,6)

→ Touch-down PCR:

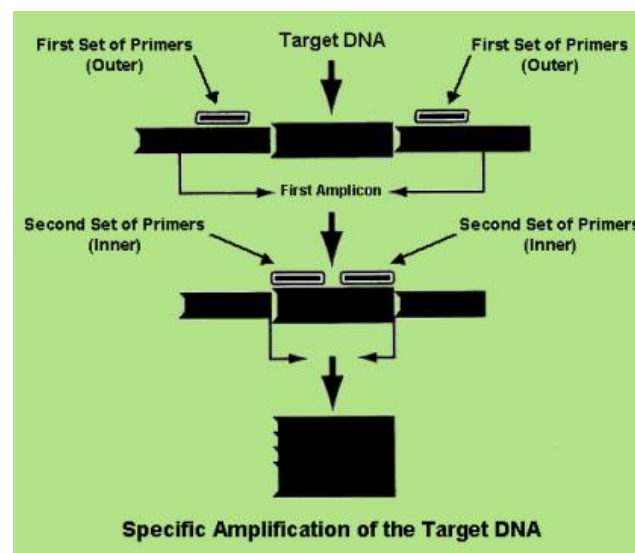
Η Touch-down PCR είναι μια παραλλαγή της Hot start PCR στην οποία μερικοί κύκλοι πολλαπλασιασμού γίνονται σε σχετικά υψηλή αυστηρότητα και οι ακόλουθοι κύκλοι σε σταδιακή μείωση αυστηρότητας. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της αποτυχίας στο να πολλαπλασιασθεί χαμηλής συγκέντρωσης υλικού λόγω μολυσματικών παραγόντων.

→ Boosted PCR:

Η Boosted PCR είναι μια μέθοδος στην οποία χρησιμοποιούνται σε χαμηλή συγκέντρωση οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές στους αρχικούς κύκλους του πολλαπλασιασμού και έπειτα αυξάνονται στην κανονική συγκέντρωση κατά την διάρκεια της δεύτερης φάσης των κύκλων. Ο στόχος της Booster PCR είναι να μειώσει τη δυσεκκίνηση μειώνοντας την αρχική αφθονία του εκκινητή, έτσι περιορίζεται ο πολλαπλασιασμός του αρχικούς κύκλους σε πολύ συγκεκριμένες αλληλουχίες που μας ενδιαφέρουν. Η χαμηλότερη συγκέντρωση εκκινητών μπορεί να μειώσει την αποδοτικότητα του πολλαπλασιασμού στους αρχικούς κύκλους, αλλά η γενική απόδοση της PCR αυξάνεται. (Ξεν.Βιβ 5)

→ Nested PCR:

Η Nested PCR είναι μια συχνή εναλλακτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την βελτιστοποίηση της ακρίβειας και της ευαισθησίας της αντίδρασης . Η διαδικασία γίνεται με την εκτέλεση δύο κύκλων. Μετά τον αρχικό κύκλο της PCR, ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών το οποίο βρίσκεται στο τμήμα που έχει πολλαπλασιαστεί χρησιμοποιείται για την σύνθεση ενός νέου , μικρότερου προϊόντος. Σε αυτόν τον δεύτερο κύκλο της PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο νέοι εκκινητές ή μόνο ένας νέος εκκινητής σε συνδυασμό με έναν από τους αρχικούς εκκινητές (seminested PCR; Zhang and Erlich 1194). Η χρήση ενός νέου εκκινητή ή ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών επιτρέπει την επιλογή πιο 'αυστηρών' θέσεων εκκίνησης και μια δεύτερη ευκαιρία να παράγουμε ένα συγκεκριμένο προϊόν. Τα μειονεκτήματα της Nested PCR είναι το επιπλέον κόστος του δεύτερου ζεύγους εκκινητών, η ανάγκη για επιπλέον χειρισμούς και η πιθανότητα επιμόλυνσης όταν το δείγμα μας μεταφέρεται από την μια φάση της διαδικασίας στην άλλη. (Ξεβ.Βιβ 5,16).



Εικόνα 20: Nested PCR

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1 ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR:

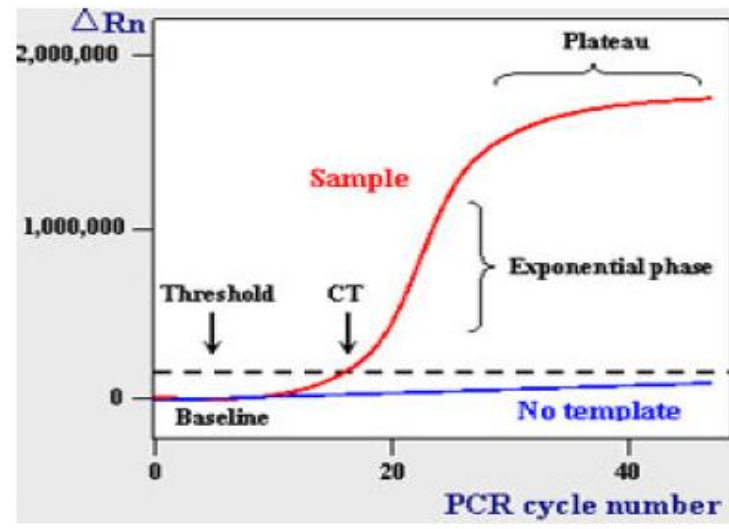
Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, QPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR: η τελικού σημείου (end-point) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR. Στην end-point PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσχεραίνει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Αντίθετα, στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας.

5.2 REAL TIME PCR:

Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού 34 φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης.

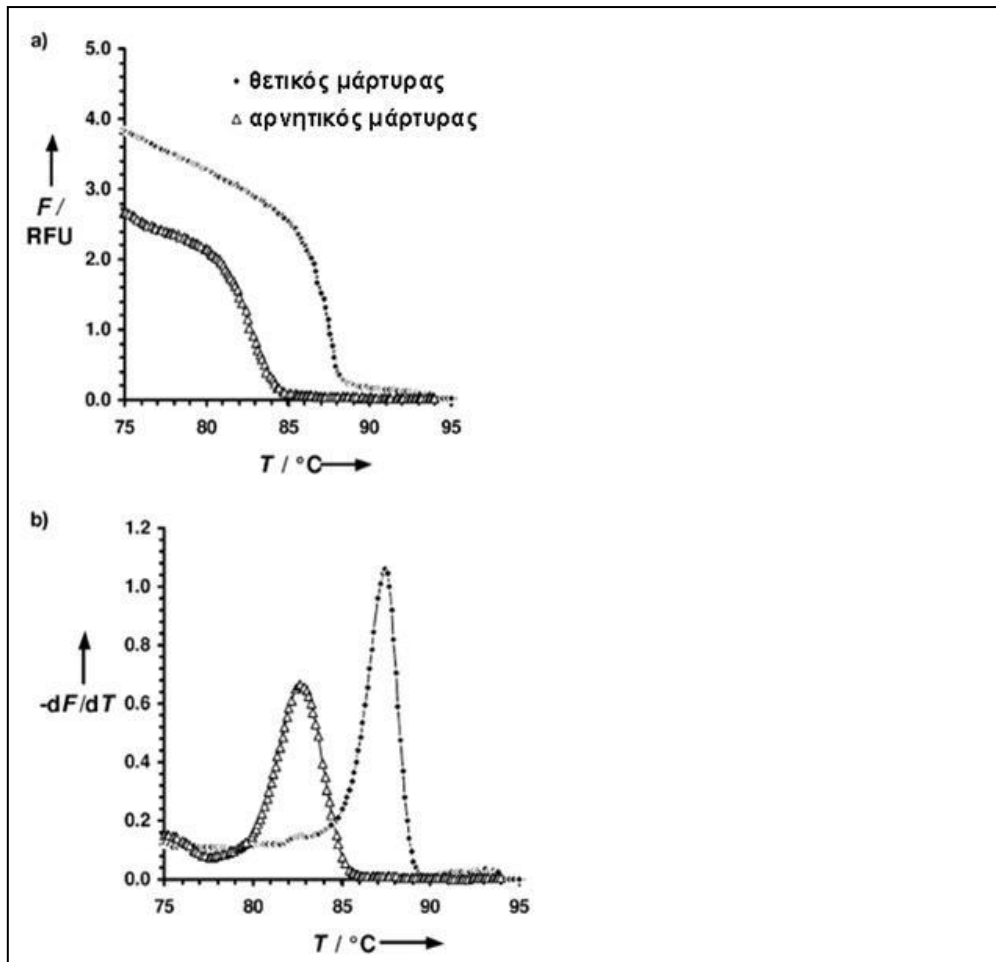
Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η

συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος .



Εικόνα 21: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής Ct, ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο 'θορύβου' (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

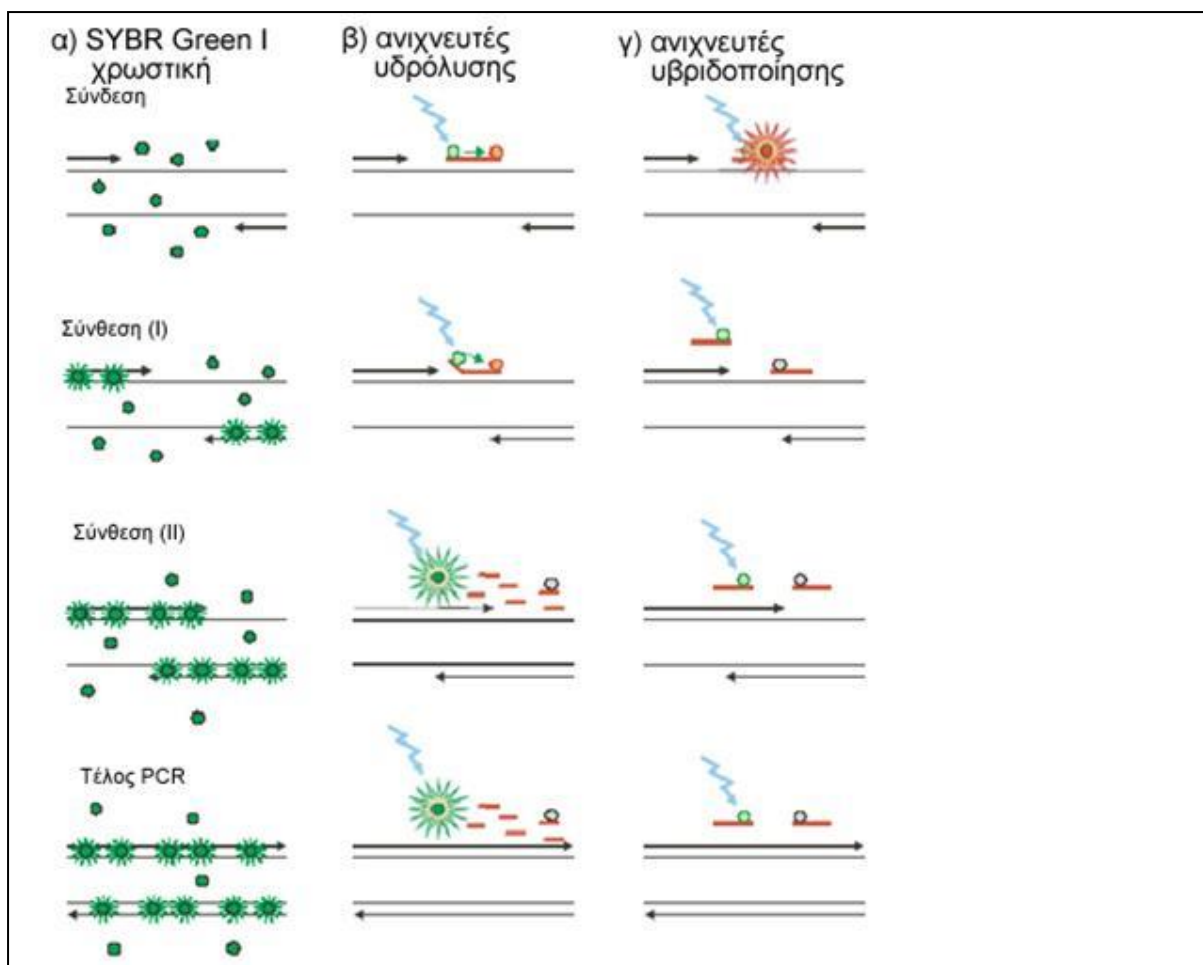
Με την real-time PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), κατά την οποία οι μεγεθυμένες αλληλουχίες μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση το σημείο τήξης τους (T_m), το οποίο είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος. Το σημείο τήξης είναι μοναδικό για κάθε αλληλουχία και χαρακτηριστικό γι' αυτήν.



Εικόνα 22: Αποτελέσματα ανάλυσης της καμπύλης τήξης ενός θετικού και ενός αρνητικού μάρτυρα.

Ο θετικός μάρτυρας περιέχει το ειδικό PCR προϊόν με $T_m=87.5$ οC, ενώ ο αρνητικός περιέχει αφετηρίες και διμερή αφετηριών (primers dimmers) χαμηλότερο $T_m=83$ οC. a) Δεδομένα της καμπύλης τήξης. Η αρχική μικρή πτώση οφείλεται στη θερμοκρασία την εξαρτώμενη από τη χρωμογόνο , ενώ η επόμενη απότομη πτώση αναπαριστά την διαδικασία τήξης του προϊόντος. b) Αναπαράσταση της κορυφής τήξης από τα δεδομένα της καμπύλης της (a).

Η ικανότητα ελέγχου της προόδου του πολλαπλασιασμού του DNA σε πραγματικό χρόνο, η οποία επιτυγχάνεται κατά την μεθοδολογία της real time PCR, πραγματοποιείται με την βοήθεια ειδικών χημικών αντιδράσεων και ανιχνευτών (probes). Σε γενικές γραμμές χρησιμοποιούνται σημασμένοι ανιχνευτές διάφορων τύπων, όπου ο καθένας έχει μοναδικά χαρακτηριστικά, αλλά η στρατηγική είναι απλή για όλους, δηλαδή πρέπει να προκαλέσουν μια αλλαγή κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA. Σήμερα οι πιο κοινές μέθοδοι χημείας που χρησιμοποιούνται στη real-time PCR είναι: α) η SYBR green I χρωστική, β) οι ανιχνευτές υδρόλυσης (Hydrolysis probes) και γ) οι ανιχνευτές υβριδοποίησης (Hybridization probes)



Εικόνα 23: Μέθοδοι real-time PCR α) SYBR green I χρωστική, β) ανιχνευτές υδρόλυσης και γ) ανιχνευτές υβριδοποίησης. (van der Velden VH, et al. Leukemia. 2002;17(6):1013-34)

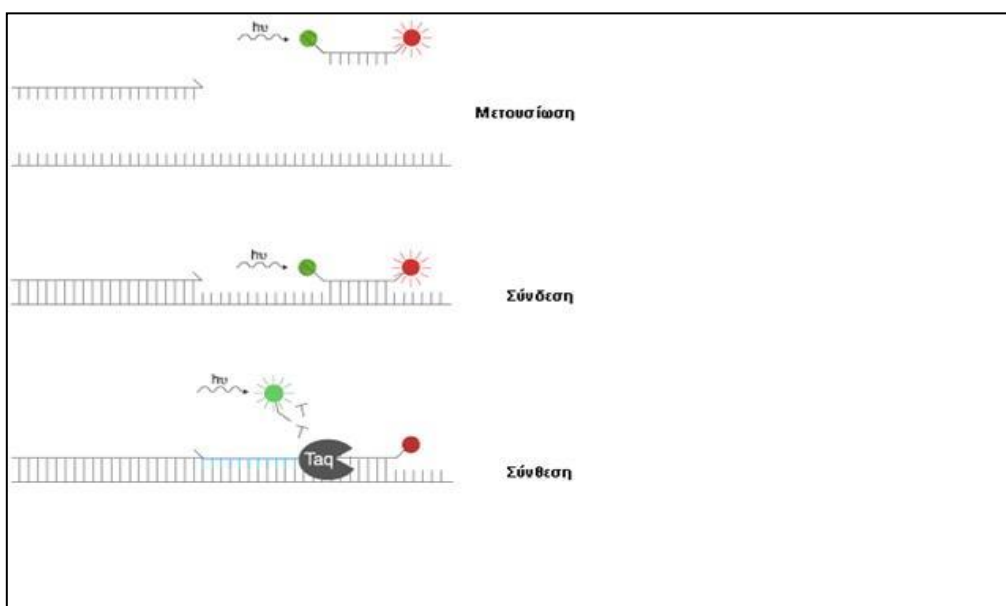
Η απλούστερη μέθοδος είναι αυτή στην οποία το προϊόν PCR ανιχνεύεται με φθορίζουσες χρωστικές που συνδέονται στο δίκλωνο DNA. Το SYBR green I είναι μια τέτοια χρωστική η οποία παράγει σήμα φθορισμού. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη του ποσοστού του DNA που υπάρχει στην αντίδραση. Επομένως η ένταση του σήματος σε κάθε βήμα της αντίδρασης PCR αυξάνει καθώς αυξάνει και η συγκέντρωση του προϊόντος. Το γεγονός αυτό παρέχει μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο ελέγχου της real-time PCR. Ακόμη ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η χρήση μη τροποποιημένων αφετηριών, η οποία διευκολύνει τον σχεδιασμό και την σύνθεση των αφετηριών με χαμηλό κόστος σε σχέση με τις άλλες μεθόδους real time PCR. Επιπλέον η SYBR green I επιτρέπει και ποιοτική ανάλυση, με βάση την μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος, δεδομένου ότι κάθε προϊόν ανάλογα με το μέγεθος του έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης (T_m). Η θερμοκρασία τήξης (T_m) μπορεί να χρησιμοποιηθεί επομένως ως διαγνωστικό στοιχείο, εφόσον η αναπαραγωγή του πειράματος γίνεται κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες, αφού οι τιμές της θερμοκρασίας τήξης (T_m) επηρεάζονται από:

- Τη συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου
- Του DMSO
- Του δείγματος του DNA
- Της SYBR green I και
- Το ρυθμό διακύμανσης της θερμοκρασίας κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης.

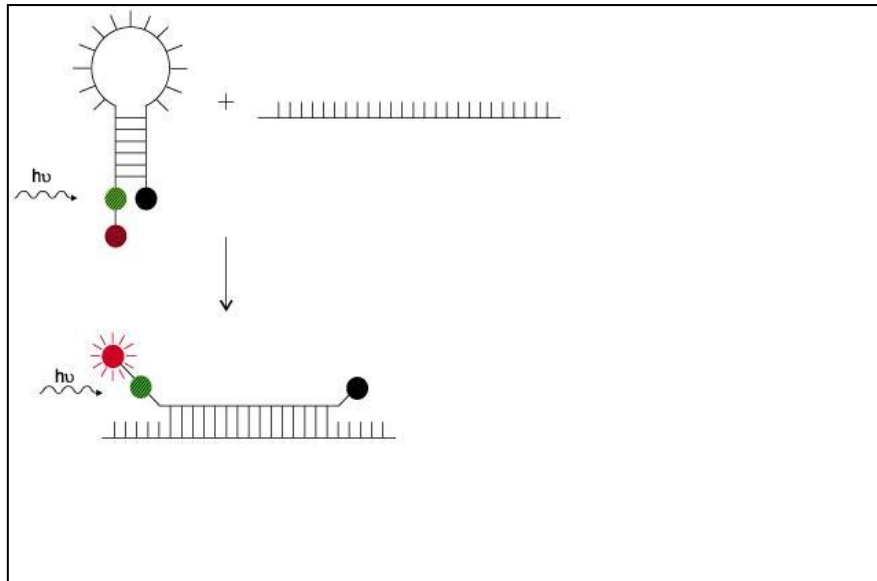
Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green I είναι ότι συνδέεται και στα μη ειδικά προϊόντα, οπότε πρέπει να γίνεται σαφής διαφοροποίηση μεταξύ ειδικών και μη ειδικών προϊόντων, όταν χρησιμοποιούμε ανάλυση της καμπύλης τήξης. Μεγαλύτερη ειδικότητα στη real time PCR επιτυγχάνεται με την χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών (oligoprobes), οι οποίοι είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, ένα μόριο δότη και ένα μόριο απόσβεσης (quencher), και υβριδίζονται στο πρότυπο DNA. Μέθοδοι ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών είναι:

- Οι Taqman probes
- Molecular beacons
- Scorpion primers

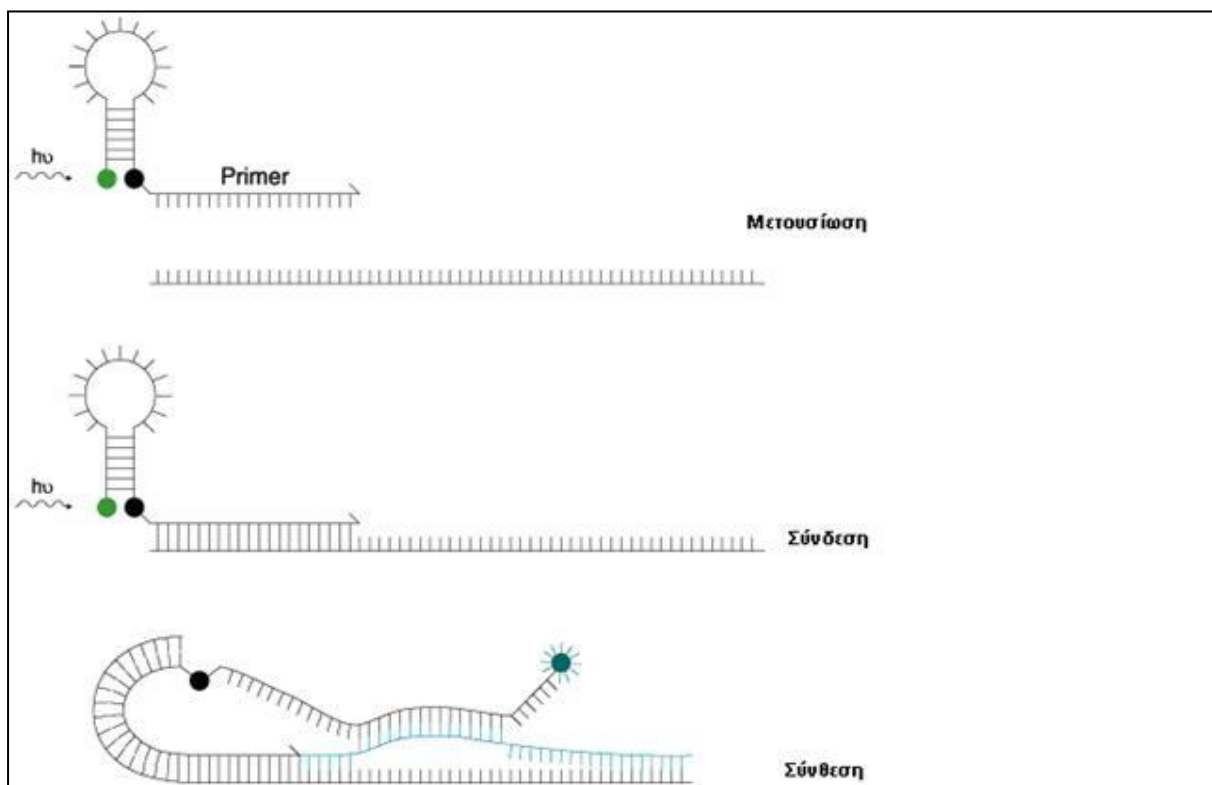
Από τις συνηθέστερες που χρησιμοποιούνται είναι οι Taqman ανιχνευτές. Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιεί την 5'-3' εξωνουκλεοτιδική δράση της Taq DNA πολυμεράση η οποία προσκολλάται στον δίπλα-μαρκαρισμένο ανιχνευτή και του αποσπά το 5' άκρο του. Ο Taqman ανιχνευτής σχεδιάζεται για να υβριδίζεται στο πρότυπο DNA μεταξύ των αφετηριών και όταν είναι υβριδισμένος δεν φθορίζει, διότι τα δύο μόρια στα άκρα του, δότης στο 5^ο άκρο και μόριο απόσβεσης στο 3' άκρο, βρίσκονται κοντά. Αντίθετα, όταν το μόριο δότης απομακρυνθεί κατά την διάρκεια της αντίδρασης PCR από το μόριο της απόσβεσης, φθορίζει έντονα. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη του προϊόντος της PCR που παράγεται.



Εικόνα 24: Σχηματική παράσταση real time PCR με Taqman αφετηρίες .



Εικόνα 25 Σχηματική παράσταση real time PCR με molecular beacons



Εικόνα 26: Σχηματική παράσταση real time PCR με Scorpions αφητηρίες

Η εφαρμογή της real time PCR απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή

- Στην ποιότητα του δείγματος
- Στο χειρισμό του οργάνου

- Στην επιλογή της μεθόδου(χημείας)
- Στα αντιδραστήρια (Taq πολυμεράση) και
- Στην αντικειμενικότητα ανάλυσης των αποτελεσμάτων.

Τα πλεονεκτήματα της real time PCR, έναντι της απλής PCR, αλλά και άλλων μοριακών μεθόδων, είναι πολλά. Το πιο σημαντικό ίσως αναφέρεται στην ικανότητα υπολογισμού νουκλεϊκών οξέων με απίστευτο πλατύ δυναμικό εύρος (το λιγότερο 5 λογαριθμικές μονάδες). Η ικανότητα αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία που έχει η μέθοδος, η οποία οφείλεται η ανίχνευση αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών λιγότερων από πέντε (ίσως και μόνο ενός σε μερικές περιπτώσεις). Επιπλέον πλεονεκτήματα είναι ο μικρότερος χρόνος που απαιτείται για την αντίδραση με παράλληλη αντίδραση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης, η αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε ένα κλειστό υψηλής τεχνολογίας σύστημα ώστε να μην απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR για την ανάλυση του προϊόντος και να ελαχιστοποιούνται έτσι οι επιμολύνσεις στο εργαστήριο και τέλος η δυνατότητα ποσοτικοποίησης.(Ξεν Βιβ_{5,10,16})

Η real time PCR μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε παραδοσιακές όσο και σε νέες εφαρμογές με πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την απλή PCR. Το γεγονός ότι η μέθοδος συλλέγει στοιχεία κατά την εκθετική φάση πολλαπλασιασμού του DNA, ανοίγει νέες προοπτικές για νέες εφαρμογές:

- Ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών (π.χ ιοί)
- Μέτρηση της έκφρασης κάποιων γονιδίων
- Επαλήθευση πολλαπλασιασμού κάποιων γονιδίων (gene amplification)
- Αποτελεσματικότητα θεραπευτικής αγωγής (π.χ νέα φάρμακα για τον καρκίνο)
- Ποσοτικό προσδιορισμό βλάβης στο DNA
- Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών
- Προσδιορισμό γονότυπου (genotyping).

5.3 Multiplex PCR:

Η multiplex PCR χρησιμοποιείται για τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό πολλαπλών προϊόντων με την χρήση παραπάνω του ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σε μια μόνο δοκιμή PCR. Στην multiplex PCR ένα ζεύγος εκκινητών μπορεί να πολλαπλασιάσει μια μοναδική αλληλουχία ενώ σε άλλες δοκιμές ένα ή περισσότερα ζεύγη εκκινητών μπορούν να πολλαπλασιάσουν πολλές αλληλουχίες (eg.,AP PCR or inter- *Alu* PCR). Είναι χρήσιμη:

- στην ανίχνευση διαγραφής
- στην ανάλυση σύνδεσης
- στην εγκληματολογική ανάλυση

- στην παθολογική ανάλυση
- στις ποσοτικές μελέτες και σε άλλες εφαρμογές(Edwards and Gibbs 1994)

Πάνω από 15 διαφορετικά σύνολα εκκινητών έχουν χρησιμοποιηθεί στην Multiplex PCR (Shuber et al. 1995), και είναι πολύ πιθανό να δημιουργηθούν συνθήκες ώστε να μπορούν να πολλαπλασιάζονται περισσότερες αλληλουχίες ταυτόχρονα.

Η πρώτη εφαρμογή της Multiplex PCR έγινε για τον εντοπισμό διαγραφής DNA σε DMD (μυϊκή δυστροφία Duchenne) . Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, το καθένα από διαφορετικά εξώνια στο DMD γονίδιο. Η ύπαρξη των διαγραφών εμπόδισε τον πολλαπλασιασμό των προϊόντων τα οποία προέρχονταν από κάθε διαγραμμένη περιοχή (αλληλουχία). Η ανάλυση με την χρήση της Multiplex PCR αποδείχτηκε αποτελεσματική και αξιόπιστη. Εφόσον κάθε δείγμα ασθενή με DMD περιείχε μόνο μια διαγραφή DNA, μόνο τότε ο πολλαπλασιασμός των συνεχόμενων εξωνίων αποτύγχανε λόγω της διαγραφής. Σε κάθε περίπτωση, κάποια κομμάτια αναμενόταν να πολλαπλασιαστούν, περιπτώσεις στις οποίες δεν παράχθηκαν προϊόντα αντανακλούν γενικά προβλήματα της τεχνικής. Η ικανότητα να συμπεριλαμβάνουμε προϊόντα πολλαπλασιασμού τα οποία λειτουργούν ως εσωτερικός έλεγχος στις συνθήκες πολλαπλασιασμού, είναι ένας ισχυρός τρόπος για να εξαλείψουμε τα αρνητικά αποτελέσματα.

Η Multiplex PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην ποσοτική PCR με διαφορετικούς τρόπους. Δύο τέτοιες εφαρμογές στην γονιδιωματική έρευνα είναι η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του mRNA και η δόση του γονιδίου. Στην εξέταση της δόσης γονιδίου, οι δοκιμές PCR επιτρέπουν γρήγορη ανίχνευση ετεροζυγωτών και διπλασιασμό γονιδίου σε διπλοειδής οργανισμούς. Η ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων προϊόντων PCR μπορεί να γίνει με την χρήση λογισμικού ανάλυσης εικόνας και εικόνες από αιθιούχο-βρωμιούχο-χρωματιστό πήκτωμα αγαρόζης .

Σε τέτοια πειράματα, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται εκκινητές της PCR οι οποίοι θα λειτουργούν ως 'ελεγκτές'. Σε πολλές δοκιμές η χρήση φθορίζοντων εκκινητών και ενός συστήματος αυτόματου εντοπισμού φθορισμού είναι η πιο αποτελεσματική. Αυτή η προσέγγιση μας επιτρέπει να εντοπίζουμε μικρότερες ποσότητες ενός προϊόντος και συνεπώς απαιτούνται λιγότεροι κύκλοι. Μειώνοντας τον αριθμό κύκλων που χρησιμοποιούμε αυξάνεται η πιθανότητα ότι το ποσό του παραχθέντος προϊόντος θα υποδεικνύει το ποσό του αρχικού υλικού.

Το να καθορίσεις κατάλληλες συνθήκες για την Multiplex PCR μπορεί να είναι πολύ χρονοβόρο. Είναι επιθυμητό να διαλέξουμε τμήματα με παρόμοιο περιεχόμενο σε G+C όπως επίσης και μια κατάλληλη κατανομή των προϊόντων έτσι ώστε να βελτιωθεί η ηλεκτροφορετική ανάλυση. Ένα ποσοστό 40-60% σε G+C και μήκος 23-28 νουκλεοτιδίων γενικά προτείνεται ως οδηγός για τον σχεδιασμό των εκκινητών. Γενικά , καλώ είναι τουλάχιστον κάποια από τα ζεύγη εκκινητών να προσαρμοστούν βάση δοκιμής ή λάθους μέχρι να γίνει επιλογή των κατάλληλων συνθηκών. Ρυθμίζοντας 'σχετικά' την συγκέντρωση των ζευγών εκκινητών θα βοηθήσει στο να

παράγουμε κατάλληλα πρότυπα για την βελτιστοποίηση των παραγόμενων προϊόντων της PCR. Η χρήση DMSO σε ποσοστό 10% στις αντιδράσεις εξασφάλισε ομαλό(κανονικό) πολλαπλασιασμό των επιθυμητών προϊόντων. Επίσης μπορεί να αυξηθούν και οι συγκεντρώσεις του Mg^{++} , των dNTPs και των ενζύμων μπορεί επίσης ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό. Σε κάθε περίπτωση, οι συνθήκες που επικρατούν σε κάθε θερμικό κύκλο πρέπει να ρυθμίζονται έτσι ώστε να λαμβάνουμε τα καλύτερα αποτελέσματα. Γενικά, συνιστάται να αυξάνονται οι περίοδοι επιμήκυνσης έτσι ώστε να συσχετίζονται με τον αριθμό των τμημάτων DNA που πολλαπλασιάζονται.

Ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα της multiplex PCR είναι ότι μεταγενέστερες αναλύσεις μπορούν επίσης να ξανά γίνουν με την multiplex ανάλυση. Το οποίο διευκολύνει κατά πολύ την εντόπιση μετάλλαξης και μας καθιστά ικανούς να εξετάζουμε ταυτόχρονα πολλούς γενετικούς τόπους. Η αλληλούχιση του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των προϊόντων που προκύπτουν από την εκτέλεση της multiplex PCR, είτε αμέσως από το παραγόμενο προϊόν είτε μετά από μερικό καθαρισμό. Ο υβριδισμός ή ο χειρισμός με ανασταλτικά ένζυμα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν , κάθε μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση προϊόντων PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την ανάλυση προϊόντων της multiplex PCR.

Η πλειοψηφία των δοκιμών της multiplex PCR χρησιμοποιήθηκαν για την εντόπιση μεταλλάξεων που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο, όμως η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τον εντοπισμό πολυμορφικών δεικτών. Μικρού μήκους επαναλαμβανόμενοι δείκτες μπορούν να αναλυθούν με την multiplex PCR αν τα προϊόντα μπορούν να διακριθούν βάση μεγέθους και χρώματος. Η χρήση μοναδικών πολλαπλών δεικτών σε μια αντίδραση παρέχει μια πιο κατάλληλη μορφή γενετικών δοκιμών. Συνολικά. Τα πλεονεκτήματα της multiplex PCR μπορούν να κάνουν την τεχνική πολύ χρήσιμη με πολλούς τρόπους. Ωστόσο, τα πλεονεκτήματα πρέπει να εξισορροπούνται με την δυσκολία να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες για την δοκιμή.

5.4 DOP PCR (Πολλαπλασιασμός με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ως εκκινητές)

Οι εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται στην PCR δεν χρειάζεται να ταιριάζουν ακριβώς με το πρότυπο DNA. Σε μερικές περιπτώσεις, το γεγονός αυτό μπορούμε να το εκμεταλλευτούμε και να σχεδιάσουμε εκκινητές χωρίς να κατέχουμε πλήρη γνώση της αλληλουχίας- στόχου. Ένα καλό παράδειγμα εκκινητών που δεν ταιριάζουν είναι ο πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων cDNAs χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδια τα οποία σχεδιάστηκαν από την αντίστροφη μετάφραση της αλληλουχίας των αμινοξέων. Για παράδειγμα, 20-30 υπολείμματα αμινοξέων μπορούν να αποκτηθούν έπειτα από την απομόνωση ενός πεπτιδικού θραύσματος. Κάθε πιθανό κωδικόνιο στο πεπτίδιο μειώνεται, και οι λιγότερο πλεονάζουσες περιοχές χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό εκκινητών. Η πρώτη επιτυχής επίδειξη αυτής της μεθόδου πολλαπλασιασμού ήταν όταν έγινε η κλωνοποίηση μιας ουρικής οξυδάσης cDNA από χοίρο .

Τα ανάμεικτα (ή εκφυλισμένα) ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται σε αυτή την διαδικασία παράγονται σε μια απλή σύνθεση, χρησιμοποιώντας είτε τις αυτόματες συνθήκες μίξης του μηχανήματος είτε μια μέθοδο στην οποία οι πρόδρομοι βάσης αναμειγνύονται πριν γίνουν ζεύγη βάσεων. Γενικά, οι αυτόματες μέθοδοι παράγουν τα επιθυμητά προϊόντα. Επειδή η σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων ξεκινά από το '3 άκρο χρησιμοποιείται μια ανάλογη βάση η οποία συνδέεται σε ένα στερεό υπόστρωμα , τα αναμειγμένα κατάλοιπα του '3 άκρου δεν είναι πάντα διαθέσιμα έτοιμα. Αν χρειάζεται μια μεικτή βάση για το '3 άκρο στο τέλος του εκκινητή, πρέπει είτε να προετοιμαστεί μια ειδική στήλη αντίδρασης μαζί με το μείγμα είτε να συντεθούν ξεχωριστά διαφορετικοί εκκινητές και έπειτα να αναμειχθούν.

Μπορεί να απαιτούνται υψηλά πλεονάζοντα μείγματα ολιγονουκλεοτιδίων να ταιριάζουν με πεπτιδικές αλληλουχίες που συμπεριλαμβάνουν αμινοξέα (π.χ σερίνη) τα οποία έχουν πολλά πιθανά κωδικόνια. Όταν είναι εφικτό, η πλήρωση θέσεων πρέπει να επιλέγεται σε περιοχές που παρουσιάζουν ελάχιστο πλεονασμό, παρόλο που η χρήση χιλιάδων διαφορετικών αλληλουχιών για την σύνθεση κάθε μικτού εκκινητή είναι πολύ κοινή.

Επίσης νουκλεϊκές βάσεις (base analogs δηλ βάσεις που χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα για τις κανονικές) χρησιμοποιήθηκαν και αυτές για να μειωθεί η περιπλοκότητα της σχεδίασης εκκινητών σε αυτές τις δοκιμές. Συγκεκριμένα, η αντικατάσταση των κατάλοιπων αδερίνης/ γουανίνης με ινοσίνη έχει ευνοηθεί.

Ιδανικά, ο επιτυχής πολλαπλασιασμός ενός στόχου cDNA χρησιμοποιώντας αναμειγμένα ολιγονουκλεοτίδια μπορεί να φανεί από την εμφάνιση ενός δεσμού που παρουσιάζει το κατάλληλο μέγεθος έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης. Εάν η ηλεκτοφόρηση των προϊόντων της PCR δεν εμφανίσει τον δεσμό συγκεκριμένου μεγέθους, είναι συχνά απαραίτητο να καθορίσουμε αν ο πολλαπλασιασμός ήταν επιτυχής με τον υβριδισμό των προϊόντων της PCR

χρησιμοποιώντας ανιχνευτή ολιγονουκλεοτιδίων ο οποίος να προέρχεται από την περιοχή που βρίσκεται μεταξύ των εκκινητών της PCR. Ο απόλυτος δείκτης επιτυχίας είναι η αλληλούχιση του DNA των πολλαπλασιασμένων τμημάτων, αφού η προβλεπόμενη μετάφραση της αλληλουχίας μεταξύ των εκκινητών πρέπει να εμφανίζει την σωστή αλληλουχία αμινοξέων. Η αλληλούχιση του παραγόμενου προϊόντος μπορεί να γίνει άμεσα με την δοκιμή της PCR παράγοντας ένα ομοιογενές προϊόν, αλλιώς θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της κλωνοποίησης. Μετά τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος με την χρήση αναμειγμένων εκκινητών, ένας ολόκληρου μήκους cDNA κλώνου μπορεί να απομονωθεί από μια βιβλιοθήκη με συμβατικές μεθόδους. Σε μερικές περιπτώσεις, μπορεί να είναι πιθανό να χρησιμοποιηθούν προϊόντα της PCR τα οποία ήδη προέρχονται από το πείραμα MOPAC.

Εκτός από την κλωνοποίηση των cDNA που βασίζεται πάνω στις αλληλουχίες αμινοξέων, οι αναμειγμένοι εκκινητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές για την απομόνωση σχετικών οικογενειών γονιδίων και την ανάλυση δειγμάτων από κάθε είδος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι εκκινητές προέρχονται από διατηρημένες περιοχές μέσα στην οικογένεια των γονιδίων ή ενός ομολόγου. Τα προϊόντα πολλαπλασιασμού γονιδίων που σχετίζονται μπορούν να κλωνοποιηθούν και να αναλυθούν έτσι ώστε να προσδιοριστεί η πολυπλοκότητα και η ταυτότητα της οικογένειας γονιδίων.

Τα πρωτόκολλα πολλαπλασιασμού που χρησιμοποιούν αναμειγμένα ολιγονουκλεοτίδια μοιάζουν αρκετά με τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται και στην κλασική PCR. Για τον πολλαπλασιασμό των cDNAs, πρέπει να προσαρμοστεί ένα πρωτόκολλο για την αντίστροφη αντιγραφή (Chelly and Khan 1994). Δεν είναι απαραίτητο να παραχθούν και η δύο έλικες του cDNA πριν την PCR, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν διπλές έλικες ως πρότυπο. (Ξεν.βιβ.4,7)

5.5 In situ PCR:

Ο in situ υβριδισμός ο οποίος εφαρμόσθηκε πρώτη φορά το 1969, αποτελεί πολύτιμη μέθοδο της μοριακής βιολογίας για τον παθολόγο ανατόμο, επειδή επιτρέπει τη μορφολογική εντόπιση της γενετικής πληροφορίας. Ενώ οι κλασικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας, όπως η Southern blot και η αλυσιδωτή πολυμεράσης, πιστοποιούν απλώς την παρουσία μιας αλληλουχίας DNA ή RNA, ο in situ υβριδισμός προσδιορίζει επιπλέον σε ποια και πόσα κύτταρα υπάρχει η αλληλουχία αυτή και σε ποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα (κυτταρόπλασμα, πυρήνας) εντοπίζεται. Επιπρόσθετα, μας πληροφορεί εάν η παρουσία της αλληλουχίας αυτής σχετίζεται με συγκεκριμένες ανωμαλίες σε κυτταρικό και ιστικό επίπεδο. Η τεχνική του in situ υβριδισμού βασίζεται στη θεμελιώδη ιδιότητα των πυρηνικών οξέων και σχηματίζουν σύμφωνα με το νόμο της συμπληρωματικότητας των βάσεων σταθερά διμερή που ονομάζονται υβρίδια. Τα τελευταία μπορεί να αποτελούνται από δύο

αλυσίδες DNA ή συνδυασμό αλυσίδων RNA-DNA και RNA-RNA. Ο *in situ* υβριδισμός μπορεί να εφαρμοσθεί σε όλα τα είδη υλικού, όπως τα κυτταρικά επιχρίσματα και οι τομές παραφίνης και κρουστάτη.

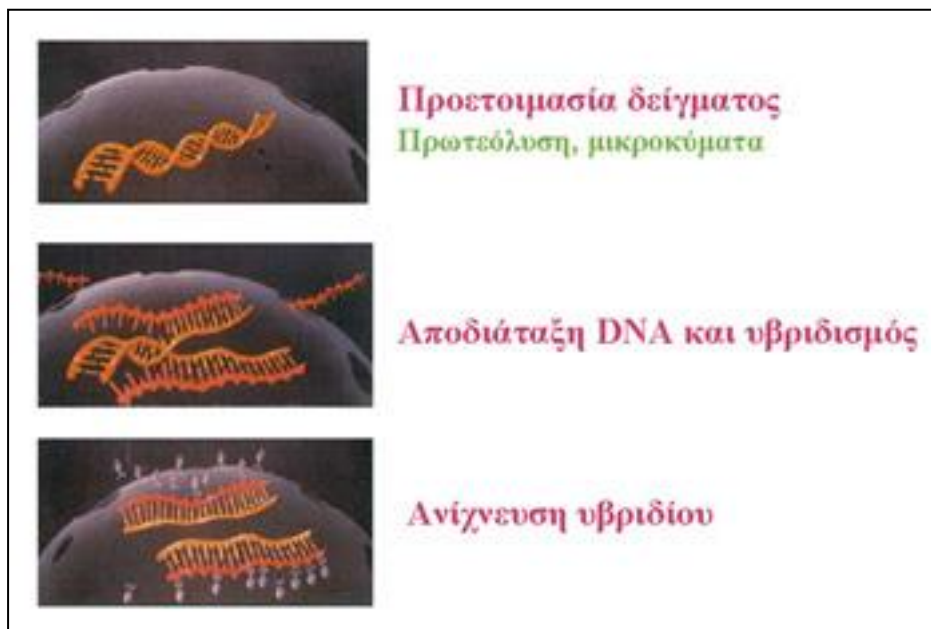
→ Δείκτες DNA/RNA: τα βασικά εργαλεία της τεχνικής ονομάζονται δείκτες (probes) και αποτελούν κατάλληλα σημασμένες δίκλωνες (DNA probes) ή μονόκλωνες (RNA probes) αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, οι οποίες μπορούν να συνδεθούν σύμφωνα με την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων και επομένως, να ανιχνεύσουν την αναζητούμενη αλληλουχία. Η επιλογή του κατάλληλου δείκτη εξαρτάται από το είδος της εφαρμογής. Αν αυτή αφορά την αναζήτηση DNA (όπως *in situ* DNA, αλληλουχίες γονιδίων ή χρωμοσωμάτων) προτιμάται η χρήση δίκλωνων δεικτών DNA. Αν η εφαρμογή αφορά την ανίχνευση RNA τότε προτιμάται η χρήση δεικτών RNA (riboprobes), δεδομένου ότι προκύπτουν υβρίδια RNA-RNA είναι πιο σταθερά από τα υβρίδια DNA-RNA. Εναλλακτικά, για την ανίχνευση RNA σε αφθονία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ολιγονουκλεοτίδια, μονήρη ή μίγμα περισσότερων του ενός.

Οι δείκτες δίκλωνου DNA έχουν μήκος 100-400 βάσεις συνήθως, παράγονται με κλωνοποίηση σε πλασμίδια βακτηριδίων και σημαίνονται με την τεχνική nick translation. Για την παραγωγή και σήμανση των δεικτών RNA χρησιμοποιείται κυρίως η τεχνική *in vitro* transcription με την βοήθεια κατάλληλων σημασμένων νουκλεοτιδίων. Τέλος τα ολιγονουκλεοτίδια έχουν μήκος 18-30 βάσεις συντίθεται χημικά σε ειδική συσκευή και σημαίνονται στο 3^ο άκρο με τη βοήθεια του ενζύμου τελική τρανσφεράση. Η σήμανση των δεικτών γινόταν αρχικά με ραδιοϊσότοπα (κυρίως ³⁵S), αλλά η χρήση αυτών έχει πλέον περιορισθεί και χρησιμοποιούνται μόνο σε ανίχνευση RNA, εφ' όσον δεν είναι επιτυχής η χρήση μη-ισοτοπικών δεικτών. Στα κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά οι μη-ισοτοπικοί δείκτες, λόγω των κινδύνων και της κακής ποιότητας του σήματος των ραδιενεργών δεικτών. Η σήμανση των μη-ισοτοπικών δεικτών γίνεται συνήθως με βιοτίνη, διγοξυγενίνη ή φθορίζουσες χρωστικές. Η παρουσία φθορίζουσας χρωστικής, είτε απευθείας στο δείκτη είτε σε κάποιο αντιδραστήριο από τα επακόλουθα στάδια ανίχνευσης της αντίδρασης υβριδισμού, επιτρέπει την εφαρμογή της φθορίζουσας παραλλαγής της τεχνικής του *in situ* υβριδισμού, διεθνώς γνωστή ως Fluorescent *in situ* Hybridization- FISH.

→ Βασικά στάδια *in situ* υβριδισμού:

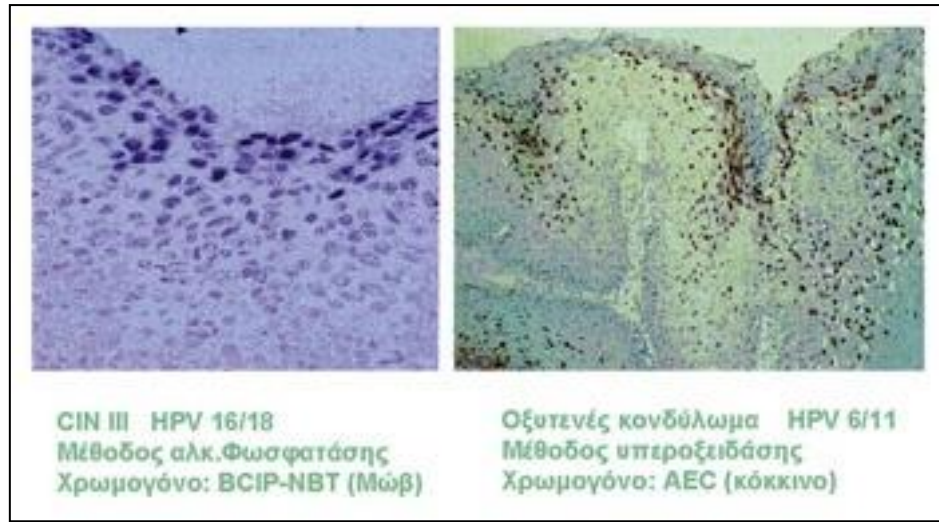
→ Προετοιμασία του δείγματος: Αυτή περιλαμβάνει την επεξεργασία των κυττάρων του δείγματος με πρωτεολυτικά ένζυμα (πεψίνη ή πρωτεϊνάση κ) ή μικροκύματα, ώστε να επιτευχθεί η διαπερατότητα κυτταροπλάσματος και πυρήνα στον δείκτη και η αλληλεπίδραση του με τις αναζητούμενες αλληλουχίες DNA ή RNA. Η πρωτεόλυση είναι απολύτως απαραίτητη,

όταν η μονιμοποίηση του δείγματος έχει γίνει σε ουδέτερη μορφή, ενώ δεν απαιτείται σε μονιμοποίηση με αλκοολούχα μονιμοποιητικά.



Εικόνα 27: Βασικά στάδια in situ υβριδισμού.

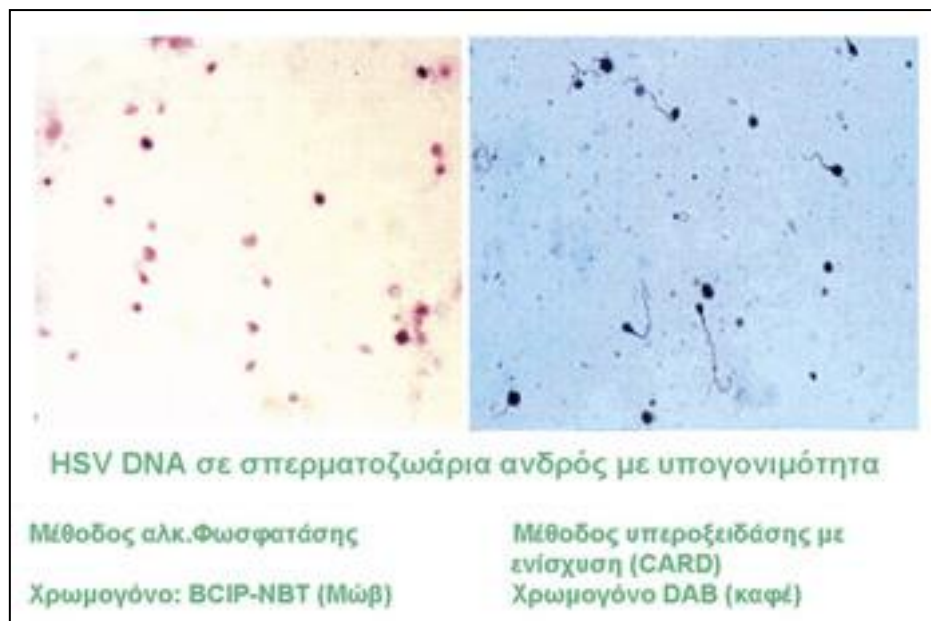
- Αποδιάταξη και υβριδισμός: Στο στάδιο αυτό επιτελείται απομάκρυνση των δύο αλυσίδων DNA του δείκτη και του κυττάρου, ώστε να επιτευχθεί ακολούθως η σύνδεση τους στο κατάλληλο χημικό και θερμικό περιβάλλον.
- Ανίχνευση αντίδρασης υβριδισμού: Μετά από την μεθυβριδική έκπλυση των δειγμάτων ακολουθεί η ανίχνευση των σχηματισθέντων υβριδίων που γίνεται, ανάλογα με τη σήμανση του δείκτη, με αυτοραδιογραφία, ιστοχημικό- ανοσοενζυματικό μηχανισμό ή φθορισμό.



Εικόνα 28: Ταυτοποίηση HPV σε αλλοιώσεις τραχήλου μήτρας.

- Μέθοδοι ενίσχυσης ευαισθησίας in situ υβριδισμού: Η ενίσχυση της ευαισθησίας του in situ υβριδισμού μπορεί να γίνει σε επίπεδο αναζητούμενης αλληλουχίας προ του υβριδισμού ή σε επίπεδο ανίχνευσης της μετά τον υβριδισμό. Η πρώτη στρατηγική επιτυγχάνεται με την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων DNA ή RNA με τη βοήθεια ενδοκυττάριας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (in situ PCR) και ακολούθως υβριδισμό των πολλαπλασιασθέντων αλληλουχιών με δείκτη. Η δεύτερη στρατηγική επιτυγχάνεται με μεθόδους ενίσχυσης του σήματος μετά την αντίδραση υβριδισμού, η σπουδαιότερη από τις οποίες είναι αυτή που βασίζεται στην ενζυματική εναπόθεση τυραμιδίου (μεγέθους CARD). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την βελτίωση της ευαισθησίας της αντίδρασης 5-10 φορές, με αποτέλεσμα να καθιστά δυνατή την ανίχνευση ακόμη και ενός αντιγράφου νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.
- Εφαρμογές του in situ υβριδισμού: Ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι εφαρμογές του in situ υβριδισμού στο κλινικό εργαστήριο και αφορούν την ανίχνευση ιών, τις μεταβολές των γονιδίων σε επίπεδο πυρηνικού DNA (απώλειες, ενισχύσεις) αλλά και έκφρασης αυτών σε επίπεδο κυτταροπλασματικού mRNA και τον προσδιορισμό δοκιμών και αριθμητικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Ακολούθως, περιγράφονται μερικές από τις εφαρμογές του in situ υβριδισμού με ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον.
- Ιοί ανθρώπινου θηλώματος
Οι περισσότεροι ιοί δεν ανιχνεύονται αξιόπιστα με ορολογικές μεθόδους ή χρονοβόρες καλλιέργειες. Η ανοσοϊστοχημική πιστοποίηση των αντιγόνων τους θεωρείται επίσης ανεπαρκής για διάφορους λόγους ,όπως η πλημμελής διατήρηση ή απουσία του αντιγόνου, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις λανθάνουσας ιογενούς λοίμωξης. Οι τεχνικές του υβριδισμού των πυρηνικών οξέων, οι οποίες ανιχνεύουν άμεσα το γονιδίωμα των ιών, θεωρούνται σήμερα οι πιο

ευαίσθητες και αξιόπιστες για την διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων στο κλινικό εργαστήριο. Επιπρόσθετα ο *in situ* υβριδισμός μπορεί να εκμεταλλευτεί τις διαφορές στο γονιδίωμα διάφορων τύπων ενός ιού και να ταυτοποιήσει το συγκεκριμένο τύπο που σχετίζεται με ορισμένες αλλοιώσεις σε ιστολογικό αλλά και κλινικό επίπεδο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας εφαρμογής αποτελούν οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) όπου η παρουσία ορισμένων τύπων όπως 16,18 και 31,33,35,51 στα επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, σχετίζεται με υψηλό ή ενδιάμεσο κίνδυνο ανάπτυξης ενδοεπιθηλιακού ή διηθητικού καρκινώματος αντίστοιχα. Αντίθετα η παρουσία των χαμηλού κινδύνου HPV όπως οι 6,11 σχετίζεται με καλοήθεις επεξεργασίες όπως τα κονδυλώματα.



Εικόνα 29: HSV σε ανθρώπινο σπέρμα.

- Προσδιορισμός χρωματοσωμικών διαταραχών (FISH)

Οι χρωματοσωμικές ανωμαλίες θεωρήθηκαν από την αρχή του 20^{ου} αιώνα ως βασικό συστατικό των νεοπλασμάτων και και μελετήθηκαν αρχικά με την κλασική κυτταρογενετική, κυρίως σε αιματολογικά νεοπλάσματα. Η κλασική κυτταρογενετική όμως, λόγω των προβλημάτων επιλογής, δειγματοληψίας και καλλιέργειας των νεοπλασματικών κυττάρων, δεν καθιερώθηκε ως μέθοδος ρουτίνας στους συμπαγείς όγκους. Εναλλακτικά αναπτύχθηκε αργότερα η κυτταρογενετική της μεσόφασης, η οποία βασίζεται στον *in situ* υβριδισμό αλληλουχιών χρωμοσωμάτων με τη χρήση δεικτών DNA σε άκεραια κύτταρα, χωρίς δηλαδή καλλιέργεια κυττάρων και λήψη μεταφάσεων. Επειδή οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ήταν σημασμένοι με φθορίζουσες χρωστικές και η ανίχνευση της αντίδρασης υβριδισμού γινόταν με μικροσκόπια φθορισμού, η τεχνική ονομάστηκε φθορίζον *in situ* υβριδισμός (Fluorescent *in situ* hybridization FISH). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σήμερα η ίδια τεχνική μπορεί να εφαρμοσθεί

με ανίχνευση ενζυματικού τύπου και χρωμογόνα υποστρώματα και ονομάζεται Chromogenic in situ hybridization (CISH). Τα επιχρίσματα και εντυπώματα ακέραιων κυττάρων αποτελούν άριστο υλικό για την μελέτη των χρωματοσωμικών διαταραχών, αν και ορισμένες από τις εφαρμογές μπορούν αξιόπιστα να γίνουν και σε τομές ιστών μονιμοποιημένες σε φορμόλη και εμπεδωμένες σε παραφίνη. Το μεγάλο πρόβλημα στις τελευταίες αποτελεί η διαφόρου βαθμού απώλεια χρωματοσωμικού υλικού, λόγω της τυχαίας τομής του πυρήνα κατά την μικροτόμηση.

Σημαντική εφαρμογή της τεχνικής FISH είναι ο προσδιορισμός των αριθμητικών διαταραχών που αφορούν είτε σε απώλεια είτε σε αύξηση του αριθμού αντιγράφων ενός χρωμοσώματος. Ορισμένες αριθμητικές ανωμαλίες φαίνεται ότι σχετίζονται σταθερά με συγκεκριμένους τύπους νεοπλασμάτων και αποτελούν βασικό συστατικό της προκαλούμενης ανευπλοειδίας του DNA, η οποία μπορεί να έχει σημαντική προγνωστική αξία 12-14. Αριθμητικές ανωμαλίες στα χρωμοσώματα 13,18 και 21, συνήθως με την μορφή της τρισωμίας, χαρακτηρίζουν τα σύνδρομα Patau, Edward και Down αντίστοιχα και αποτελούν σημαντικές εφαρμογές προγεννητικού ελέγχου που μπορούν να απαντηθούν ταχύτατα με τη μέθοδο FISH μεσοφασικών κυττάρων. (Ξεν. Βιβ. 8,11)

Το δεύτερο είδος εφαρμογής της τεχνικής FISH είναι οι δοκιμές χρωμοσωματικές διαταραχές, οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρήση δεικτών έναντι μιας ή περισσοτέρων ειδικών χρωματοσωμικών αλληλουχιών. Σημαντικές δοκιμές διαταραχές είναι η διαμετάθεση *bcr-abl* γνωστή και ως χρωματόσωμα της Φιλαδέλφειας που αποτελεί διαγνωστικό και προγνωστικό δείκτη της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας και η διαμετάθεση *t(11;22) (q24;12)* η οποία είναι χαρακτηριστική του σαρκώματος Ewing και των αρχέγονων νευροεξωδερματικών όγκων (PNETs)



Εικόνα 30: Fish και αριθμητικές χρωματοσωμικές διαταραχές σε καρκίνωμα μαστού.

ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ PCR

6.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Οι μεταλλάξεις εντοπίζονται σε καρκίνους και σε κληρονομικές διαταραχές. Για να γίνει πιο σωστή και γρήγορη διάγνωση είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η φύση της μετάλλαξης. Η μέθοδος της PCR σε αυτή την περίπτωση είναι ανεκτίμητη γιατί χρησιμεύει ως εργαλείο για την μελέτη συγκεκριμένων γονιδίων που φέρουν μετάλλαξη.

Το 1989 έγινε απονομή του βραβείου Νόμπελ στον Harold Varmus και J. Michael Bishop διότι ανακάλυψαν ότι τα ογκογονίδια που μεταφέρονται από τους RNA ογκογόνους ιούς είναι φυσιολογικό κομμάτι του γεννητικού υλικού του κυττάρου. Οι καρκίνοι προκύπτουν όταν αυτά τα φυσιολογικά κύτταρα μεταλλαχθούν. Αυτό το σημαντικό πλεονέκτημα της μελέτης για τον καρκίνο αναπτύχθηκε ακόμα περισσότερο όταν ανακαλύφθηκε ότι συγκεκριμένες μορφές καρκίνου δημιουργούνται από συγκεκριμένες και αναπαραγώγιμες μεταλλάξεις. Για παράδειγμα, έχουν παρατηρηθεί σε πολλές μορφές καρκίνου μεταλλάξεις στο *ras* ογκογονίδιο, και η PCR χρησιμοποιήθηκε για να αναλυθεί το πρότυπο και η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης στα ανθρώπινα *ras* γονίδια. Ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων από ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο μελετήθηκε με την μέθοδο της PCR και οι μελέτες έδειξαν ότι διαφορετικές μορφές λεμφικών κακοηθειών προέρχονται από διαφορετικές μεταλλάξεις των *ras* γονιδίων.

Η γενετική ανάλυση παρέχει σημαντικά συμπεράσματα για το ρετινοβλάστωμα. Είναι μια μορφή καρκίνου του ματιού που εμφανίζεται σε παιδιά και βρέφη. Υπάρχει η κληρονομική μορφή ρετινοβλαστώματος στην οποία παρατηρείται βλαστική μετάλλαξη σε ένα από τα δυο αλληλόμορφα γονίδια του ρετινοβλαστώματος. Όλα τα κύτταρα αυτών των ασθενών περιέχουν ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο και ένα που έχει υποστεί μετάλλαξη, απαιτείται μόνο μια μετάλλαξη σε ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο για να δημιουργηθεί καρκίνος. Το ρετινοβλάστωμα μπορεί επίσης να εμφανιστεί και χωρίς να υπάρχει κληρονομική προδιάθεση. Παρόλα αυτά σε οικογένειες που νοσεί μόνο ένα μέλος είναι δύσκολο να προσδιοριστεί αν η ασθένεια οφείλεται σε κληρονομική προδιάθεση. Το πρόβλημα αυτό λύνεται με την χρήση της PCR και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των γονιδίων μπορεί να γίνει ανάλυση της μετάλλαξης σε ιστό του όγκου και φυσιολογικό ιστό από άτομα που νοσούν. Σε μερικούς ασθενείς οι μεταλλάξεις εντοπίζονται μόνο σε ιστό όγκου, αυτό δηλώνει ότι αυτές είναι αυθόρμητες μεταλλάξεις οι οποίες δεν οφείλονται σε κληρονομικούς παράγοντες και τα παιδιά αυτών των ασθενών δεν θα έχουν προδιάθεση για εμφάνιση ρετινοβλαστώματος. Σε άλλες περιπτώσεις η μετάλλαξη εντοπίζεται σε φυσιολογικό ιστό όπως και στα κύτταρα του όγκου, αυτό δηλώνει ότι αυτοί οι ασθενείς γεννήθηκαν με μια μετάλλαξη σε όλα τους τα κύτταρα. Τα παιδιά αυτών των ασθενών θα έχουν υψηλές πιθανότητες εμφάνισης ρετινοβλαστώματος γιατί είναι πολύ πιθανό να κληρονομήσουν ένα αντίγραφο από το γονίδιο που προκαλεί το ρετινοβλάστωμα. Αυτά τα ευρήματα είναι πολύ σημαντικά για γενετικό έλεγχο.

6.2 PCR ΚΑΙ ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ

Η τεχνική της PCR είναι η μοναδική τεχνική με την οποία μπορούν να καθοριστούν διάφορες μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη του καρκίνου ακόμη και σε μικροποσότητες καρκινικού δείγματος. Δεδομένου ότι η PCR μπορεί να ανιχνεύσει γονιδιακές διαταραχές ακόμη και σε ένα νεοπλασματικό κύτταρο είναι φανερό ότι η πρώιμη διάγνωση των καρκίνων μπορεί να γίνει πιο εύκολα, επιφέροντας σημαντικά κοινωνικό-οικονομικά οφέλη.

Η PCR χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση ιών που σχετίζονται με κακοήθεις όγκους όπως ο HPV, ορισμένοι τύποι του οποίου (HPV-16, HPV-18) σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος του τραχήλου και της μήτρας, ο ανθρώπινος T-λεμφοτρόπος ιός (human T-leukocyte virus, HTLV-1) ο οποίος εμπλέκεται στην ανάπτυξη οξείας λευχαιμίας και ο ιός EBV ο οποίος έχει παθογενετική σημασία στην ανάπτυξη καρκινώματος του ρινοφάρυγγος και νόσου Hodgkin.

Επιπλέον, η PCR χρησιμοποιείται παράλληλα και στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Μερικά από τα πιο διαδεδομένα παραδείγματα είναι τα εξής:

α) Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια BRCA-1 και BRCA-2 (breast-associated cancer genes) ευθύνονται για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών θεωρούνται υπεύθυνες για την κληρονομική προδιάθεση ανάπτυξης καρκινώματος μαστού και ωοθηκών.

β) Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, μεταλλάξεις του οποίου είναι πολύ συχνές σε πολλούς τύπους όγκων.

γ) Τα ογκογονίδια Ras και myc τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα.

6.3 PCR ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

✓ Λοιμώδεις νόσοι

Η χρήση της PCR στις λοιμώδεις νόσους επικεντρώθηκε αρχικά στη διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων. Η εφαρμογή αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη δεδομένου ότι οι καλλιέργειες ιών είναι χρονοβόρες και πολλές φορές ανεπιτυχείς. Η τεχνική της PCR είναι ταχύτερη σε αντίθεση με τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης μετά από καλλιέργεια, ενώ η ευαισθησία ανίχνευσης της PCR είναι μεγαλύτερη ακόμη και από αυτή των ανοσοενζυμικών μεθόδων (ELISA). Επειδή η τεχνική της PCR δεν στηρίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων στο αίμα κατά των παθογόνων αιτίων, αλλά στην άμεση ανίχνευση του γενετικού υλικού του μικροοργανισμού στο υπό εξέταση δείγμα, αφενός δεν παρουσιάζεται λανθάνοντας χρόνος ανίχνευσης του μικροοργανισμού, αφετέρου το αποτέλεσμα δεν επηρεάζεται από την ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς. Χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους PCR έχουν ανιχνευθεί ιοί όπως ο Epstein-Bar (EBV), ο ιός θηλωμάτων ανθρώπου (Human

papilloma virus, HPV), ο ιός ανοσοανεπάρκειας ανθρώπου (Human Immunodeficiency Virus, HIV), ο κυτταρομεγαλοϊός (Cytomegalovirus, CMV), ο ιός απλού έρπητος (Herpes Simplex virus, HSV), οι ιοί της ηπατίτιδας B και C καθώς και άλλοι.

Η τεχνική της PCR έχει χρησιμοποιηθεί συχνά στην ανίχνευση ογκογόνων ιών όπως του EBV, ο οποίος σχετίζεται με το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα. Η ανίχνευση του ιού αυτού μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως διαγνωστικός καρκινικός δείκτης σε πρωτοπαθές ή και μεταστατικό καρκίνωμα.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή της PCR στη διάγνωση της φυματίωσης (Mycobacterium tuberculosis). Η συνήθης μικρή ποσότητα του μυκοβακτηριδίου στα παθολογικά δείγματα δυσχεραίνει την ανίχνευση του με κλασικές μεθόδους. Η PCR επιτρέπει την ταχύτερη και ευκολότερη ανίχνευση του μικροοργανισμού, μία και η ευαισθησία ανίχνευσης φτάνει τους 10 βακίλους σε 10^6 ευκαρυωτικά κύτταρα. Χρησιμοποιείται επίσης όταν η ανάπτυξη του μικροβίου στην καλλιέργεια είναι βραδεία, ανέφικτη ή έχουμε μικρό αριθμό αποικιών στην καλλιέργεια.

Υπερτερεί των άλλων βιοχημικών δοκιμών γιατί αναγνωρίζει γενετικό υλικό και όχι φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Σήμερα εφαρμόζεται για την ανίχνευση ανίχνευση ιών, βακτηριδίων, μυκητών, παρασίτων και λοιπών μικροοργανισμών σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών υλικών. Οι μικροοργανισμοί είναι οι ακόλουθοι:

- Ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων - APTIMA HPV RNA τεστ
- Ιός Influenza A - H1N1 (νέος ιός γρίπης)
- Ιός της Ηπατίτιδας B (HBV)
- Ιός της Ηπατίτιδας C (HCV)
- Ιός της Ερυθράς (Rubella)
- Ιός του Απλού Έρπητα HSV-1
- Ιός του Απλού Έρπητα HSV-2
- Ιός της Ανεμοβλογιάς / Έρπητα Ζωστήρα (VZV/HHV-3)
- Ιός της Λοιμώδους Μονοπυρήνωσης / Epstein-Barr (EBV)
- Ιός του Ανθρώπινου Κυτταρομεγαλοϊού (HCMV)
- Ερπητοϊός 6 (HSV-6)
- Ερπητοϊός 7 (HSV-7)
- Ερπητοϊός 8 (HSV-8)
- Ιός HIV I & II
- Αδενοϊοί
- Εντεροϊοί Enterovirus (Polio-Echo-Coxsaki)
- Ιός Influenza A, B
- Chlamydia Trachomatis (C. trachomatis)
- Mycoplasma Hominis (M. hominis)
- Ureoplasma Urealyticum (U. urealyticum)
- Γονόκκοκος - Neisseria gonorrhoea
- Τοξοπλάσμα - Toxoplasma Gondii
- Χλαμύδιο της πνευμονίας (C. pneumoniae)
- Βακτήριο της Λεγιονέλλας (L. pneumophila)
- Μυκοπλάσμα της πνευμονίας (M. pneumoniae)
- Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (M. tuberculosis complex)

- Άτυπα Μυκοβακτηρίδια
- Παρβοϊοί
- Ιοί Πολυόμα
- Λιστέρια
- Βρουκέλλα
- Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού - *Helicobacter pylori*
- Πρωτόζωα της Λείσμανίασης

✓ Γενετικές παθήσεις

Στον τομέα των γενετικών ασθενειών, η PCR είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων και πολυμορφισμών. Σε γενετικές ανωμαλίες μάλιστα, όπου τα προϊόντα μεταλλαγμένων γονιδίων είναι πολύ δύσκολο να ανιχνευθούν, μόνο η ανάλυση του DNA μπορεί να φανεί χρήσιμη. Με την τεχνική της PCR η μεταβολή ακόμη και μια μονάχα βάσης σε ένα γονίδιο μπορεί να ανιχνευθεί καθώς και να εξακριβωθεί αν πρόκειται για ομόζυγη ή ετερόζυγη μεταβολή. Μία από τις πιο σημαντικές εφαρμογές της PCR είναι στον προγεννητικό έλεγχο δείγματος αμνιακού υγρού ή χοριακών λάχνων για την ύπαρξη γενετικών ανωμαλιών, όπως μεταξύ άλλων αιμοσφαιρινοπάθειες, μεσογειακή αναιμία, κυστική ίνωση και θρομβοφιλική προδιάθεση. (Διαδ. 23,24,25,26)

6.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ PCR

Η PCR μαζί με την ανακάλυψη στα τέλη της δεκαετίας του 1980 των σύντομων διαδοχικών επαναλήψεων (STRs – short tandem repeats) – 2-9 ζεύγη βάσεων (bp) επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, που ονομάζονται επίσης μικροδορυφόρων, άνοιξαν τον δρόμο για της υψηλής ταχύτητας τεχνολογία γενετικής αποτύπωσης, που χρησιμοποιούν σήμερα οι ιατροδικαστές. Η PCR επιτρέπει σε έναν τόπο DNA που μας ενδιαφέρει (π.χ . οι 4 βάσεων (bp) STR, γνωστή ως D18S51, (AGAA)_n) να ενισχυθεί εκθετικά, δημιουργώντας σε λίγες μόνο ώρες ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα από ένα μόριο DNA.

Για τους ιατροδικαστές, αυτό έχει το πλεονέκτημα πως είναι δυνατή η ανάλυση ακόμη και των πολύ μικροσκοπικών δειγμάτων- τόσο λίγο όσο 30 κύτταρα για μια σύγκριση του σχετικού με RFLP γενετικό αποτύπωμα.

Για την ανάλυση PCR χρειαζόμαστε STR's που πλευρίζονται από αλληλουχίες που είναι ταυτόσημες σε όλα τα ανθρώπινα όντα (αυτές τις αλληλουχίες τις λέμε συντηρημένες). Στη συνέχεια χρησιμοποιούμε εκκινητές, μικρά μόρια που είναι συμπληρωματικά προς τις συντηρημένες πλευρικές αλληλουχίες για την κίνηση της PCR. Μόλις το DNA έχει ενισχυθεί, μπορούμε να το διαχωρίσουμε είτε με πήκτωμα ηλεκτροφόρησης η στην σύγχρονη ιατροδικαστική επιστήμη με ηλεκτροφορητική αυτοματοποιημένη αλληλούχιση και απεικονισή της ως ένα γενετικό αποτύπωμα.

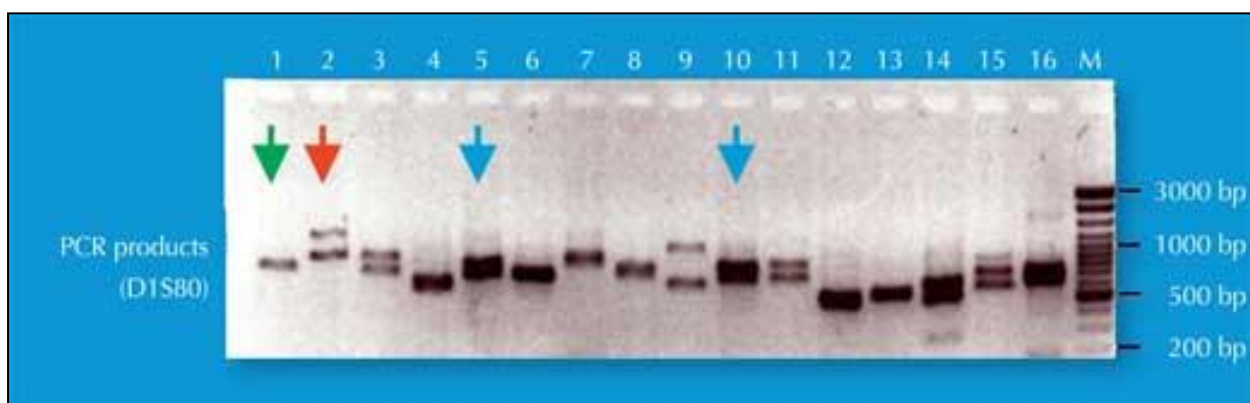
	RFLP	PCR
Ποσότητα αρχικού DNA	30–50 µg	Τουλάχιστον 200pg (περίπου 30 κύτταρα) για ένα πλήρες πρότυπο STR
Ευσαιθησία	+	+++
Ποιότητα DNA που απαιτείται για την ανάλυση	Ολόκληρο το γονιδίωμα	Δεν είναι αναγκαίο το πλήρες γονιδίωμα. Προϊόντα αποικοδόμησης είναι επίσης επαρκή, λόγω των μικρών αλληλουχιών που εμπλέκονται (συνολικό μήκος αλληλουχίας ενός STR, συμπεριλαμβανομένων των πολλαπλών επαναλήψεων και των πλευρικών αλληλουχιών, περίπου το 50 - 500 bp)
Χρόνος	Ημέρες έως εβδομάδες	Ώρες
Ισχύς διάκρισης ανά τόπο	+++ (Περισσότερα αλληλόμορφα και περισσότερη ετεροζυγωτία ανά τόπο)	+ (Λιγότερα αλληλόμορφα και λιγότερη ετεροζυγωτία ανά τόπο) <i>Ωστόσο, η πολλαπλή PCR ενίσχυσης (PCR με περισσότερα από ένα ζεύγος εκκινήτων) και πολυχρωματική επισήμανση επιτρέπουν σε περισσότερους από 16 τόπους να εξεταστούν ταυτόχρονα, πράγμα που παρέχει μια εξαιρετική ισχύς διάκρισης</i>
Επαναλήψη μονάδας	10 bp έως 100 bp	2 bp έως 9 bp (στην ρουτίνα των εγκληματολογικών περιπτώσεων, βασικά 4 bp-ζεύγη βάσεων-)
Αυτοματοποιημένη ανίχνευση	Δεν είναι δυνατόν	Είναι δυνατή υψηλής απόδοσης επεξεργασία του δείγματος
Αριθμός επικυρωμένων τόπων (σημαντικό, αν πρόκειται για συγγενείς)	Περιορισμένος αριθμός	Μεγάλος αριθμός
Κίνδυνος επιμόλυνσης	+	+++
Απαιτούνται πρόσθετα μέτρα ασφαλείας;	Ναι (λόγω του ραδιενεργού ιχνηθέτη)	Όχι (όχι ραδιενεργός ιχνηθέτης)

Εικόνα 31: Σύγκριση της αποτύπωσης DNA που βασίζεται στα RFLP και στη PCR.

Έτσι έχουμε δύο αντίγραφα από κάθε χρωμόσωμα και επίσης δύο αντίγραφα για κάθε STR. Εάν, για κάθε ένα αντίγραφο της STR, κάποιος έχει τον ίδιο αριθμό επαναλήψεων (δηλαδή το ίδιο αλληλόμορφο), η ανάλυση PCR αποκαλύπτει μόνο ένα μέγεθος του θραύσματος DNA: το άτομο είναι ομόζυγο για το αλληλόμορφο STR (πράσινο βέλος στην εικόνα 33, που αντιστοιχεί στο άτομο 2 στην εικόνα 32). Εάν τα δύο χρωμοσώματα φέρουν μη-ταυτόσημα αλληλόμορφα για την συγκεκριμένη STR, βλέπουμε δύο μεγέθη του θραύσματος και λέμε πως το άτομο είναι ετερόζυγο (κόκκινο βέλος στην εικόνα 33, που αντιστοιχεί στο άτομο 1 από την εικόνα 32).

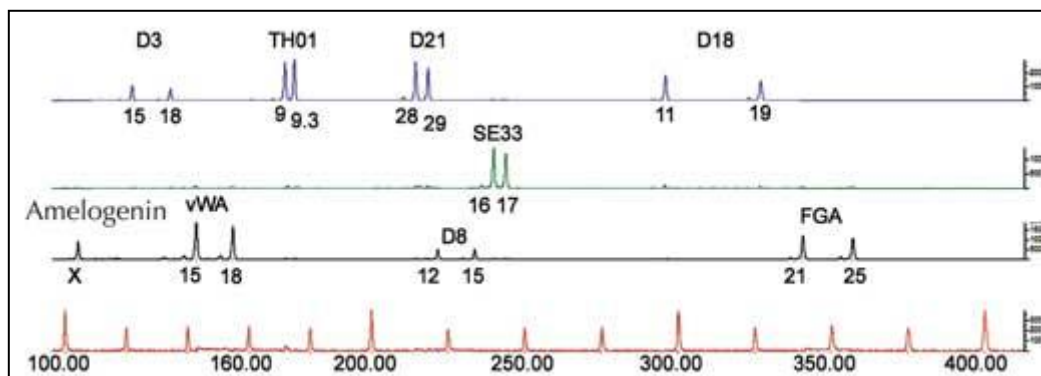


Εικόνα 32: Σχηματική παρουσίαση του STR D1S80 (η ονοματολογία «D1S80» μας λέει ότι ο STR βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1, στην περιοχή 80) από δύο άτομα. Τα μαύρα βέλη αντιπροσωπεύουν τους εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουν το συγκεκριμένο STR.



Εικόνα 33 : Γενετικό αποτύπωμα του τόπου D1S80 που παράγεται από μαθητές (αριθμοί καναλιών 1-16) με το δικό τους DNA. Η γραμμή στην άκρη δεξιά, που επισημαίνεται ως M, περιέχει θραύσματα DNA γνωστών μεγεθών, που χρησιμοποιούνται ως δείκτες. Το άτομο που υποδεικνύεται με το πράσινο βέλος είναι ομόζυγο για τον τόπο D1S80 (μόνον μία ζώνη είναι ορατή). Το άτομο που επισημαίνεται με το κόκκινο βέλος είναι ετερόζυγο (δύο ζώνες). Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν δύο μαθητές που είναι ετερόζυγοι και έχουν τον ίδιο αριθμό επαναλήψεων για κάθε αλληλόμορφο στον τόπο D1S80. Αυτό σημαίνει ότι δεν μπορούν να διακριθούν με το αποτύπωμα. Μπορεί να είναι δίδυμα, αλλά είναι επίσης πιθανό ότι δύο άσχετα άτομα θα έχουν τον ίδιο αριθμό των επαναλήψεων αν αναλύεται μόνο ένα STR

Αν αναλύσουμε μόνο ένα STR, η πιθανότητα δύο άσχετα άτομα να έχουν το ίδιο γενετικό αποτύπωμα που βασίζεται σε PCR, είναι υψηλή - μεταξύ 1:2 και 1:100 (μπλε βέλη στην εικόνα 33). Αυτό συμβαίνει επειδή τα STRs έχουν λιγότερα αλληλόμορφα και χαμηλότερη ετεροζυγωτία σε σχέση με τα VNTRs που χρησιμοποιούνται στην γενετική αποτύπωση βάση των RFLP. Για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα, αναλύουμε πολλά STRs ταυτόχρονα: με 16 STRs, όπως συνηθίζεται στις ιατροδικαστικές υποθέσεις στη Γερμανία, μπορούμε να επιτύχουμε μια ισχύς της διάκρισης των 1:10 δισεκατομμυρίων (που ισοδυναμεί με ένα άτομο στον πληθυσμό του πλανήτη, εικόνα 34).



Εικόνα 34: Ηλεκτροφερόγραμμα μιας γυναίκας, που δημιουργήθηκε από πολλαπλή PCR και μετέπειτα ηλεκτροφορητική αυτοματοποιημένη αλληλούχιση. Οκτώ STRs (D3, TH01, D21, D18, SE33, vWA, D8 και FGA) και αμελογενίνη (που δείχνει το φύλο) αναλύθηκαν. Οι μπλε, πράσινες και μαύρες καμπύλες αντιπροσωπεύουν ενισχυμένα STRs (με αριθμούς επανάληψης κάτω από τις κορυφές). Η κόκκινη καμπύλη είναι ο δείκτης (το μέγεθος του θραύσματος DNA επισημαίνεται σε bp-ζεύγη βάσεων).

Η γενετική αποτύπωση που βασίζεται στο PCR εφαρμόζεται ευρέως στις ιατροδικαστικές έρευνες: αυτό επιτρέπει στην αστυνομία να αποκλείσει ή να ταυτοποιήσει υπόπτους στη βάση του γενετικού υλικού, όπως θύλακες των τριχών, δέρμα, σπέρμα, σάλιο ή αίμα. Ένα γενετικό αποτύπωμα και μόνο, όμως, δεν είναι επαρκές αποδεικτικό στοιχείο για την καταδίκη, καθώς στενοί συγγενείς μπορεί να έχουν πολύ παρόμοια αποτυπώματα (και μονοζυγωτικά δίδυμα θα έχουν κανονικά τα ίδια). (Διαδ.12,13,14)

6.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΤΡΟΤΗΤΑΣ

Από τις αρχές του 1990 και ως σήμερα, στις υποθέσεις πατρότητας χρησιμοποιείται η μέθοδος της PCR (Polymerase Chain Reaction), η οποία απαιτεί πολύ μικρή ποσότητα γενετικού υλικού και στην οποία χρησιμοποιούνται τμήματα του DNA τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία στα άτομα του πληθυσμού. Σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα που εφαρμόζονται στα πιστοποιημένα εργαστήρια σε όλο τον κόσμο, ένα έγκυρο και αξιόπιστο DNA Τεστ Πατρότητας, οφείλει να περιλαμβάνει την ανάλυση 16 τουλάχιστον διεθνώς αναγνωρισμένων δεικτών STR και να πιστοποιεί την πατρότητα με πιθανότητα μεγαλύτερη από 99.99%.

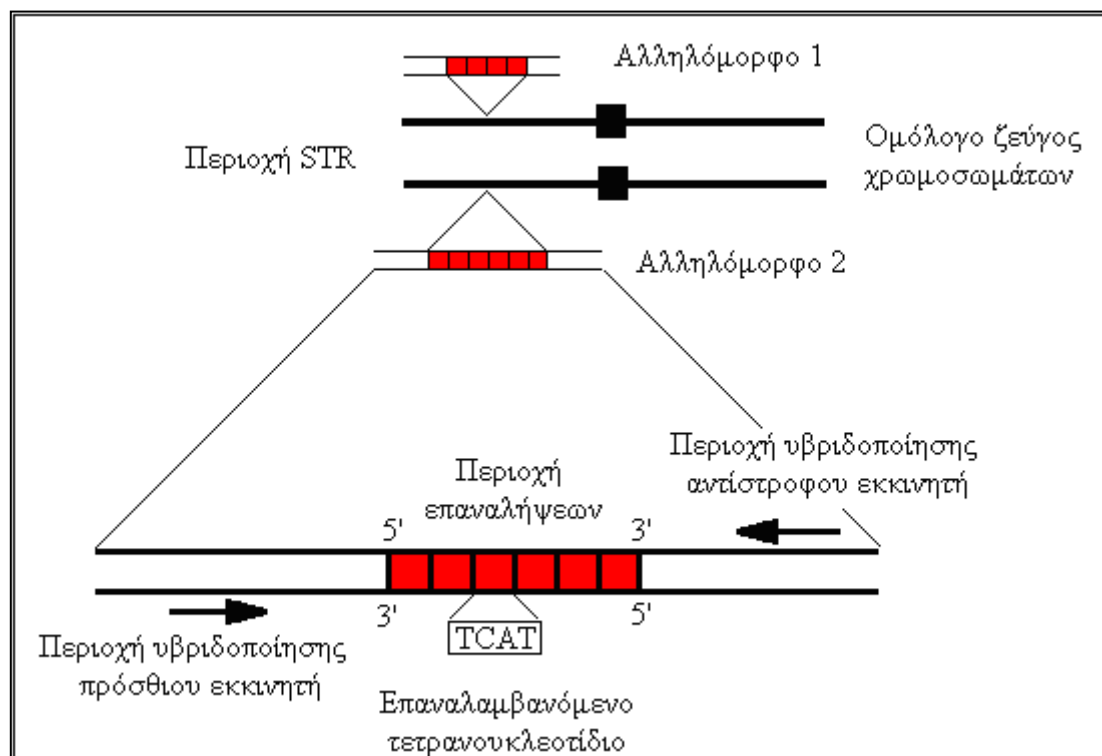
Ο συνδυασμός των 16 αυτών γενετικών δεικτών παρέχει ένα μοναδικό γενετικό προφίλ για κάθε άτομο το οποίο μπορεί να συγκριθεί άμεσα με το γενετικό προφίλ των γονέων ταυτοποιώντας ή αποκλείοντας την πατρότητα. Κύτταρα από τα μάγουλα, τα ούλα συλλέγονται μέσα από το στόμα με μια ειδική μπατονέτα. Στο εργαστήριο τα κύτταρα αυτά αφαιρούνται από τη μπατονέτα. Το DNA των κυττάρων στη συνέχεια απομονώνεται για ανάλυση με την τεχνική της PCR. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης PCR, παράγονται δισεκατομμύρια αντιγράφων των δεικτών (επιλεγμένων περιοχών) που βρίσκονται στο DNA του παιδιού και του φερόμενου πατέρα. Αυτό επιτρέπει στους επιστήμονες να αναλύσουν το DNA από μια πολύ μικρή ποσότητα δείγματος.

Οι δείκτες αυτοί στη συνέχεια αναλύονται σε γενετικό αναλυτή. Ο γενετικός αναλυτής προσδιορίζει το μέγεθος των δεικτών αυτών σε κάθε δείγμα. Σαν αποτέλεσμα της διαδικασίας, αποτυπώνεται το γενετικό προφίλ του κάθε ατόμου που ελέγχεται. Το προφίλ του DNA κάθε παιδιού είναι μοναδικό. Το ήμισυ των δεικτών ταιριάζουν με αυτούς της μητέρας και το άλλο ήμισυ με του πατέρα. Αν αποκαλυφθεί ότι οι δείκτες DNA του φερόμενου πατέρα δεν ταιριάζουν με του παιδιού τότε το πρόσωπο αυτό αποκλείεται ως πιθανός του πατέρα. Εάν οι δείκτες ταιριάζουν, τότε η πιθανότητα να είναι ο πατέρας αρχίζει να αυξάνεται. (Διαδ.31,32,33)

6.6 ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ PCR

✓ Χρήση της ποσοτικής φθορίζουσας PCR

Η τεχνική της ποσοτικής φθορίζουσας PCR (Quantitative Fluorescent PCR, QF-PCR) είναι μια μέθοδος που τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται για την προγεννητική διάγνωση ανευπλοειδιών του εμβρύου σε συνδυασμό με την συμβατική κυτταρογενετική ανάλυση. Η πρώτη περιγραφή της τεχνικής έγινε το 1993 (Mansfield, 1993) και βασίζεται στην ενίσχυση συγκεκριμένων πολυμορφικών αλληλουχιών ειδικών για κάθε χρωμόσωμα. Αυτές οι αλληλουχίες είναι γνωστές ως μικροδορυφόροι ή μικρού μήκους διαδοχικές επαναλήψεις (Short Tandem Repeats, STRs) (Εικόνα 4)



Εικόνα 35: Σχηματική αναπαράσταση περιοχής STR σε ομόλογο ζεύγος χρωμοσωμάτων.

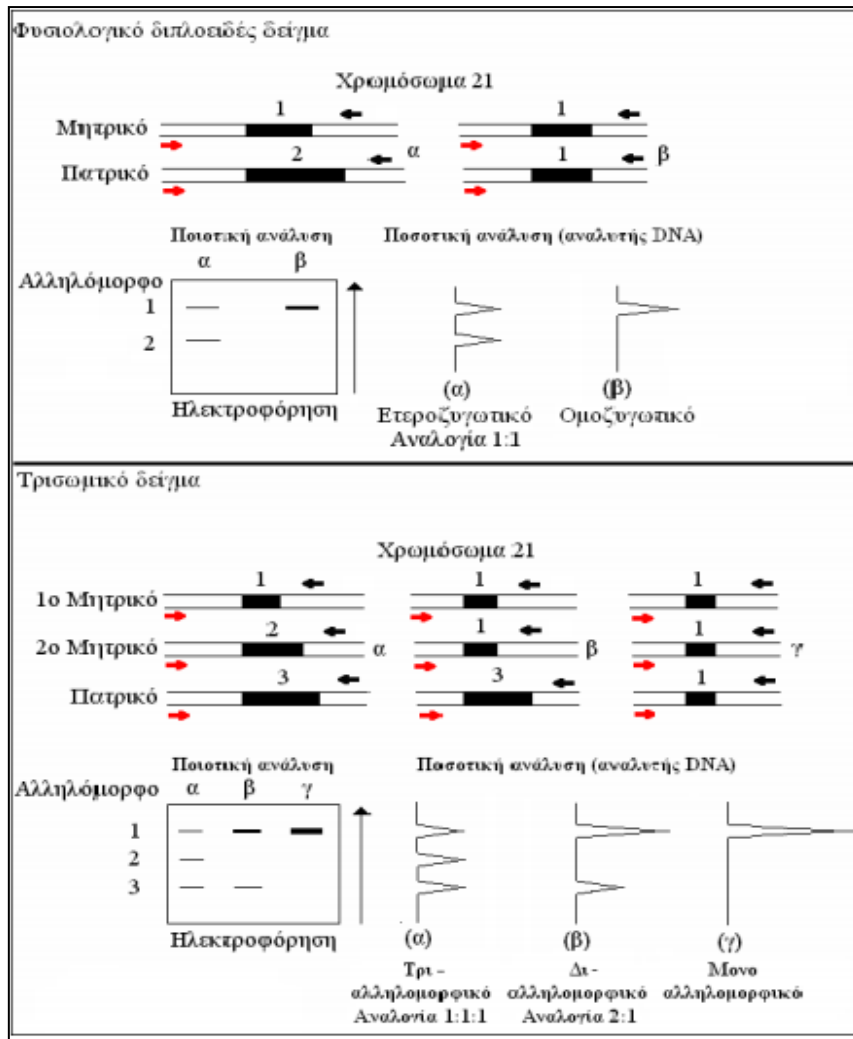
Οι STRs είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που αποτελούνται από δύο έως έξι νουκλεοτίδια. Οι αλληλουχίες αυτές είναι διάσπαρτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα, με συχνότητα εμφάνισης ενός STR κάθε 104 νουκλεοτίδια (Strachan and Read 1996). Οι χρωμοσωμικοί δείκτες STR παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας και ακολουθούν τον απλό μενδελικό τρόπο κληρονομικότητας. Η

πολυμορφικότητα ενός χρωμοσωμικού δείκτη STR καθορίζεται από το μέγεθος και τον αριθμό των αλληλομόρφων του.

Ο συνήθης αριθμός των επαναλήψεων είναι 15 – 30 και το συνολικό μήκος των αλληλομόρφων τους κυμαίνεται μεταξύ 100 και 400 νουκλεοτίδια. Βρίσκονται κυρίως σε περιοχές που παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων ή σε ενδογονιδιακά τμήματα, όμως έχει αναφερθεί η παρουσία τους και σε μεταγραφόμενα εξωγονιδιακά τμήματα. Γενικά παρουσιάζουν μια ομοιογενή κατανομή στο γονιδίωμα, αν και τείνουν να υποεκπροσωπούνται σε τελομερικές περιοχές (Koreth et al, 1996).

Ο πιο σημαντικός παράγοντας για την αποτελεσματική διάγνωση μιας ανευπλοειδίας με QF-PCR είναι η επιλογή των ειδικών χρωμοσωμικών δεικτών STR. Για τον σχεδιασμό αναλύσεων και πειραμάτων με QF-PCR θεωρείται προτιμότερη η χρήση τετρα- και πεντανουκλεοτιδικών STRs (επαναλήψεις τετρα- και πεντανουκλεοτιδικών αλληλουχιών), διότι έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα κατά τη διαδικασία της ενίσχυσης με PCR, σε σχέση με τους δι- και τρινουκλεοτιδικούς STRs (Adinolfi et al, 1997). Η ενίσχυση ενός δείγματος DNA γονιδιώματος με QF-PCR γίνεται με τη χρήση εκκινητών σημασμένων με φθοριόχρωμα για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση των προϊόντων. Τα προϊόντα της QF-PCR διαχωρίζονται και ποσοτικοποιούνται σε αυτόματο αναλυτή DNA με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται με τη μορφή ηλεκτροφορητικού διαγράμματος (Εικόνα 5). Κάθε 24 κορυφή στο διάγραμμα αντιστοιχεί σε κάθε αλληλόμορφο STR συγκεκριμένου μεγέθους και ποσότητας στο αρχικό δείγμα.

Η τεχνολογία της QF-PCR βασίζεται στην υπάρχουσα γνώση ότι κατά την πρώτη εκθετική φάση της PCR, το ποσόν του συγκεκριμένου DNA που παράγεται είναι ανάλογο με την ποσότητα της αρχικής εξεταζόμενης αλληλουχίας. Η εισαγωγή φθοριοχρώματος στα προϊόντα της QF-PCR μέσω του πρόσθιου εκκινητή επιτρέπει 25 την ανάλυσή τους με laser σε κατάλληλο αναλυτή DNA και παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης των προϊόντων της PCR. Έτσι, η ανάλυση των φθοριζόντων προϊόντων μιας QF-PCR σε δείγματα από ετεροζυγωτικά άτομα, αναμένεται να αποκαλύψει δύο δείκτες STR διαφορετικού μεγέθους με ποσοτική αναλογία 1:1. Εάν το δείγμα DNA ανήκει σε ομοζυγωτικό άτομο, ο πολλαπλασιασμός με QF-PCR και η ανάλυση των φθοριζόντων προϊόντων θα αποκαλύψει μόνο ένα προϊόν.



Εικόνα 36: Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης φυσιολογικών και τρισωμικών δειγμάτων με QF-PCR και χρήση STRs (Adinolfi et al, 1995).

Δείγματα από ασθενείς με τρισωμία ενδέχεται να αποκαλύψουν είτε τρία προϊόντα με ποσοτική αναλογία 1:1:1 (τρिसωμικά τριαλληλομορφικά), είτε δύο προϊόντα με ποσοτική αναλογία 2:1 (τρισωμικά διαλληλομορφικά) ή ένα προϊόν (τρισωμικά μονοαλληλομορφικά). Δεδομένου του υψηλού πολυμορφισμού που παρουσιάζουν οι δείκτες STR, ελάχιστα τρισωμικά δείγματα παρουσιάζουν μονοαλληλομορφικό γονότυπο. Υπάρχουν όμως ορισμένες περιπτώσεις όπου οι STRs που χρησιμοποιούνται δεν είναι πληροφοριακοί. Οι πολυμορφικοί STRs παρουσιάζουν διαφορετικές συχνότητες σε διαφορετικούς πληθυσμούς με αποτέλεσμα αυτοί που είναι πληροφοριακοί σε έναν πληθυσμό να μην είναι σε έναν άλλο (Slater et al, 2003). Για αυτό το λόγο θεωρείται απαραίτητη η χρήση 2 ή περισσότερων πολυμορφικών STR σε κάθε χρωμόσωμα για την προγεννητική διάγνωση ανευπλοειδιών με QF-PCR καθώς έτσι μειώνονται οι πιθανότητες να γίνει λάθος διάγνωση. Επίσης, η χρήση πολλών πληροφοριακών STRs και η παράλληλη ανάλυση του μητρικού και πατρικού γονοτύπου επιτρέπει τον προσδιορισμό της

γονεϊκής προέλευσης της ανευπλοειδίας του εμβρύου και αν αυτή είναι αποτέλεσμα μη διαχωρισμού στην πρώτη ή στη δεύτερη μειωτική διαίρεση.

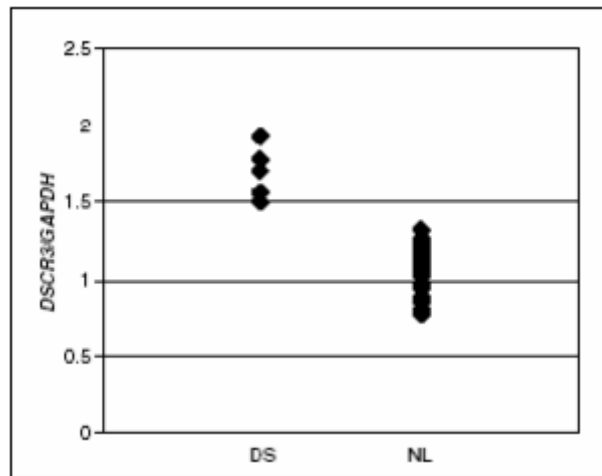
Με τη χρήση πολυμορφικών δεικτών STR των οποίων τα αλληλόμορφα διαφέρουν σημαντικά στο μέγεθος καθώς και με τη χρήση διαφορετικών φθοριοχρωμάτων για κάθε δείκτη STR, είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανάλυση πολλών χρωμοσωμάτων σε μια μόνο αντίδραση (πολλαπλή, multiplex QF-PCR). Διάφορες μελέτες αναφέρουν την εφαρμογή της QF-PCR στη διάγνωση των σημαντικότερων ανευπλοειδιών (τρισωμίες 21, 18, 13) με ελάχιστα ψευδώς αρνητικά ή θετικά αποτελέσματα (Pertl et al, 1999; Cirigliano et al, 2004; Nikolini et al, 2004; Ogilvie et al, 2005). Το βασικό μειονέκτημα της QF-PCR εντοπίζεται στους ελέγχους για ανευπλοειδία στα φυλετικά χρωμοσώματα. Συγκεκριμένα, τα δείγματα από φυσιολογικά XX θήλεα άτομα που είναι ομοζυγωτικά για συγκεκριμένους STRs στο χρωμόσωμα X, παρουσιάζουν μονοαλληλομορφικό γονότυπο (μια κορυφή) ο οποίος είναι πανομοιότυπος με αυτόν που παρουσιάζουν τα δείγματα από άτομα με σύνδρομο Turner (X0). Η λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα μπορεί να δοθεί είτε με τη χρήση περισσότερων από έναν δεικτών STR για το χρωμόσωμα X είτε με τη χρήση ενός αυτοσωμικού εσωτερικού μάρτυρα βάσει του οποίου θα υπολογισθεί η ποσότητα του χρωμοσώματος X στο δείγμα σε σχέση με κάποιο άλλο γνωστό φυσιολογικό δείγμα.

Άλλα προβλήματα που παρουσιάζει η ανάλυση δεικτών STR με την τεχνική της QF-PCR είναι: α) η παραγωγή υποπροϊόντων (stutters), η οποία οφείλεται στην εσφαλμένη «ανάγνωση» της αλληλουχίας των αλληλομόρφων από την DNA πολυμεράση που έχει σαν αποτέλεσμα την παρουσία επιπλέον κορυφών μικρότερου μεγέθους και έντασης από αυτές των κανονικών προϊόντων, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη διάγνωση, β) η παραγωγή διαφορετικά αδενυλιωμένων προϊόντων της PCR για το ίδιο αλληλόμορφο, εξαιτίας της προσθήκης ή μη-προσθήκης τελικής αδενίνης από την DNA πολυμεράση και έχει σαν αποτέλεσμα την παρουσία διευρυμένης ή διπλής κορυφής για το αλληλόμορφο (ανάλογα με την διακριτική ικανότητα του συστήματος διαχωρισμού που χρησιμοποιείται), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη εκτίμηση του αποτελέσματος, και γ) η επιμόλυνση του δείγματος με μητρικά κύτταρα, που οδηγεί σε παρουσία επιπλέονκορυφών ή αλλοίωση των αναλογιών των κορυφών γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην εσφαλμένη εντύπωση ότι το δείγμα είναι πολυπλοειδικό ή μωσαϊκό.

✓ Χρήση της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο

Η χρήση της qPCR στην προγεννητική διάγνωση των ανευπλοειδιών είναι υπό διερεύνηση. Η διάγνωση του συνδρόμου Down με qPCR πραγματοποιείται συγκρίνοντας την ποσότητα ενός γονιδίου στόχου που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 (π.χ. το γονίδιο DSCR3 που βρίσκεται στην κρίσιμη περιοχή του χρωμοσώματος 21 για το σύνδρομο Down), με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς το οποίο βρίσκεται σε κάποιο άλλο αυτοσωμικό χρωμόσωμα (π.χ. το γονίδιο GAPDH που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12). Στη συγκεκριμένη εφαρμογή της τεχνικής της qPCR γίνεται χρήση δύο ανιχνευτών (ένας για την κάθε περιοχή που ενισχύεται) και ο κάθε

ανιχνευτής είναι σημασμένος με διαφορετικό φθοριόχρωμα. Εάν η αναλογία μεταξύ των δύο γονιδίων είναι 1:1, τότε το έμβρυο είναι φυσιολογικό. Εάν η αναλογία είναι 3:2, τότε το έμβρυο είναι τρισωμικό .



Εικόνα 37: Οι αναλογίες για τα δείγματα DNA από τρισωμία 21 (DS) και τα φυσιολογικά δείγματα (NL) έπεται από ανάλυση με qPCR (Hu et al, 2004)

Τα προβλήματα που παρουσιάζει η ανάλυση με qPCR για τον προγεννητικό έλεγχο των ανευπλοειδιών είναι αρκετά. Η σωστή ανάλυση απαιτεί: (α) το σχεδιασμό κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών για την ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών σε κάθε χρωμόσωμα που ενδιαφέρει, (β) το σχεδιασμό κατάλληλων ανιχνευτών για την αναγνώριση αυτών των αλληλουχιών, και (γ) τη χρήση γνωστών ανευπλοειδικών και φυσιολογικών δειγμάτων σε κάθε ανάλυση. Σε σχέση με την QF-PCR, η τεχνική της qPCR υστερεί στο ότι α) είναι λιγότερο ευαίσθητη στην διάγνωση τρισωμικών μωσαϊκών δειγμάτων και β) δίνει μόνο μια ποσοτική αναλογία φθορισμού 3:2 για τα τρισωμικά δείγματα, ενώ η QF-PCR δίνει είτε μια πιο ξεκάθαρη ποσοτική διαλληλομορφική αναλογία 2:1 είτε ένα τριαλληλομορφικό αποτέλεσμα. Περιπτώσεις τριπλοειδίας και μόλυνσης του δείγματος από μητρικά κύτταρα είναι δύσκολο να ανιχνευθούν με αυτές τις τεχνικές. (Ξεν.Βιβ. 16)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΟΓΛΩΣΣΗ:

1. Αστέριος Χατζηπαναγιώτου,(1997). « Γονιδιακή τεχνολογία- Διαγονιδιακά ζώα». Εκδόσεις Πήγασος 2000, Θεσσαλονίκη.
2. Lewin, Genes VIII, Ελληνική έκδοση.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ:

1. Stein U, Walther W, Wendt J, Schild TA (1997) *In situ* RT-PCR using fluorescence labeled primers. *Biotechniques* 23: 194-195
2. Franz O, Bruchhaus I, Roeder T (1999) Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic acids res* 27: e3.
3. Siebert PD, Kellong DE (1995) PCR MIMICSs : competitive DNA fragments for use in quantitative PCR. In McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR (eds) *PCR 2Q A Practical Approach*, pp. 135-148. Oxford University Press, Oxford. UK.
4. Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257Q 967-971.
5. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of shortsynthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J.Mol. Biol.*, 1971, 56: 341-361.
6. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230: 1350-1354.
7. Mullis, K. B. & Faloona F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 1987, 155:335-350.
8. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. and Erlich H. A Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239:487-491.
9. Mitsuhashi M. Technical report : Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. *J. Clin. Lab. Anal.*, 1996, 10:285-93.
10. Riedel K. H., Wingfield B. D., and Britz T. J. Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers. *F.E.M.S. Microbiol. Let.*, 1992, 71:69-72.

11. Harris S. & Jones D. B. Optimisation of the polymerase chain reaction. Br. J. Biomed. Sci., 1997, 54:166-173.
12. Li H, Cui X and Arnheim N. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1990,87:4580-4584.
13. Vosberg, H-P. The polymerase chain reaction : an improved method for the analysis of nucleic acids. Hum. Gen., 83: 1-15 (1989).
14. Arnheim, N., White, and W. E. Rainey. The application of PCR: organismal and population biology. Bioscience, 40: 174-182 (1990).
15. Eisenstein , N.I . The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N. E. F. Med., 322:178 -183 (1990).
- 16: Innis, M. A., D. H Gelfand, j.J Sninsky, and T.J. White, eds. PCR Protocols : A guide to methods and applications. Academic, N.Y., 1990.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

1. <http://www.scienceinschool.org/2012/issue22/fingerprinting/greek#table1>
2. <http://www.ethemis.gr/methodi-exakrivosis-patrotitas-omades-ematos-antigona-hla-rflp-str-2/>
3. http://www.ddc-greece.com/paternity_exp.php
4. http://www.testpap.com/moriakes_eksetaseis/894/
5. <http://iatrikionline.gr/biotexnologia/3.htm>
6. <http://d1mqv16b9gntp7.cloudfront.net/images/GR-pridesign-pres.pdf>
7. http://www.academicbooks.gr/sites/default/files/basic_laboratory_calculations_for_biotechnology_sample_ch24.pdf
8. <http://d1mqv16b9gntp7.cloudfront.net/images/PCR-gr.pdf>
9. http://biotech.aua.gr/EPEAEK/site_Biotech/gewp_biot/Gen_Mechan/course_material/pcr1_1.htm
10. <http://www.wisegeek.com/what-is-pcr-sensitivity.htm>

11. <http://www.hms.org.gr/updocuments/%CE%A0%CF%81%CE%BF%CF%8B%CF%80%CE%BF%CE%B8%CE%AD%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20PCR%20fianl.pdf>
12. http://d1mqv16b9gxt7.cloudfront.net/images/22_INTRO-PCR-GR_re.pdf
13. http://en.wikipedia.org/wiki/Real-time_polymerase_chain_reaction
14. <http://www.science.gr/main/arhra/epistimes/40-epistimes-ygeias/104-real-time-pcr>
15. <http://www.ekmed.gr/ekmed09/data/pdf/pres4.pdf>
16. http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/2209/1/master_Symeonidou.pdf
17. <http://www.dna-analysis.gr/index.php?q=node/8>
18. <http://www.highveld.com/pcr/>
19. <http://molecularstation.com/pcr/history-of-pcr>
20. <http://www.labome.com/method/Current-PCR-Methods.html>
21. http://www.biosmart.ch/content/bilder/pcr_e.pdf
22. <http://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/the-polymerase-chain-reaction.pdf>
23. http://www.accessexcellence.com/RC/CT/polymerase_chain_reaction.php
24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1523369/pdf/1747-5333-1-7.pdf>
25. <http://196.29.172.66:8080/jspui/bitstream/123456789/2134/1/PCR.pdf>
26. <http://www.aimodiagnosi.gr/images/uploaded/PCR.pdf>
27. http://www.ivf.gr/developments_9.html
28. http://www.biology.uoc.gr/courses/BIO254_GeneticsII/notes%203.pdf
29. <http://www.bmlabs-mag.gr/?p=808>
30. <http://www.watermicro.gr/wp-content/uploads/mandilara2.pdf>
31. http://openwetware.org/wiki/PCR_techniques
32. <http://m-biotech.biol.uoa.gr/MATHIMATAPMS/M1/WORKSHOP/MasterW1a.pdf>
33. http://www.alysos.com/default.aspx?page_id=38

34. <http://www.qiagen.com/products/catalog/assay-technologies/end-point-pcr-and-rt-pcr-reagents/qiagen-multiplex-pcr-kit>
35. <http://www.bio-rad.com/ru-ru/category/pcr-amplification-kits>
36. <http://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/3554#page/136/mode/2up>
37. <http://d1mqv16b9gxt7.cloudfront.net/images/GR-PCR-pres.pdf>
38. <http://nefeli.lib.teicrete.gr/browse/steg/fp/2010/LazanakiVirginia/document-1288163120-529002-25286.tkl>
39. <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>
40. Για τον σχεδιασμό εκκινητών:

A. Εργαλεία προγραμμάτων:

- Primer3: www primer tool
http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi
- GeneFisher- Interactive PCR primer Design
<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/>
- Primer3Plus
<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
- OligoCalc
<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>
- NCBI Primer Blast
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

B. Υπάρχουν επίσης και εμπορικά διαθέσιμα λογισμικά υπολογιστών για το σχεδιασμό εκκινητών.

- Oligo.net
<http://www.oligo.net/>
- Beacon Designer™
http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/index.html
- ORFprimer
<http://www.proteinstrukturfabrik.de/ORFprimer/>

EIKONEΣ

1. <http://www.glenresearch.com/glenreports/gr21-11.html>
2. <https://laikaspoetnik.wordpress.com/tag/virus/>
3. <http://www.vortex-mixer.com/>

4. <http://www.dreamstime.com/stock-photos-blue-liquid-test-tubes-image23365403>
5. <http://medicallatexgloves.blogspot.gr/>
6. <http://www.peqlab.us/wcms/us/products/index.php?do=getArticlesByGroup&which=PEQSTAR>
7. <http://www.northbaybusinessjournal.com/36982/eurofins-scientific-adds-dna-sequencing-to-petaluma-lab/>
8. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
9. <http://agctsequencing.wordpress.com/>
10. http://diagnostics.finnzymes.fi/pathoproof/pathoproof_mastitis_starter_pack.html
11. <http://medicalab.blogspot.gr/2012/07/polymerase-chain-reaction.html>
12. <http://www.virology.ws/2009/05/10/the-error-prone-ways-of-rna-synthesis/>
13. http://www.redorbit.com/education/reference_library/science_1/fields_of_science/1112863226/brief-introduction-to-dna-probes/
14. http://www.pocdscientific.com.au/eppendorf_centrifuge_5702r.php