

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ



PCR



**REAL - TIME
PCR**



MICROARRAYS

Γιώργος Καπαρός

Λέκτωρ Μικροβιολογίας

ΕΡΩΤΗΜΑ

Μπορούν περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η διατροφή και η μητρική στοργή να προκαλέσουν επιγενετικές μεταβολές στο DNA και να αλλάξουν τη γονιδιακή έκφραση σε γενετικά δίδυμους οργανισμούς οδηγώντας τελικά σε διαφορετικό φαινότυπο;

Cell Division



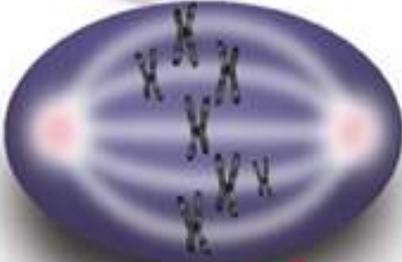
Parent Cell



Prophase

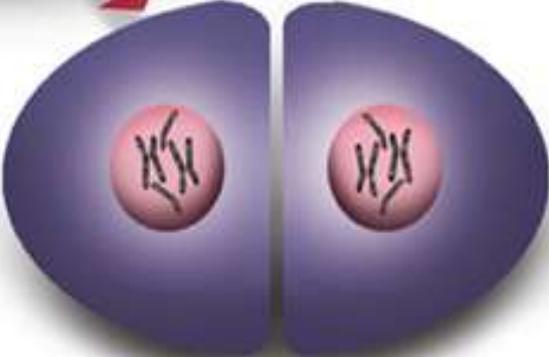


Chromosomes align at the equatorial (metaphase) plate



Metaphase (Centromeres divide)

Sister chromatids separate during anaphase, becoming chromosomes



Two Daughter Cells

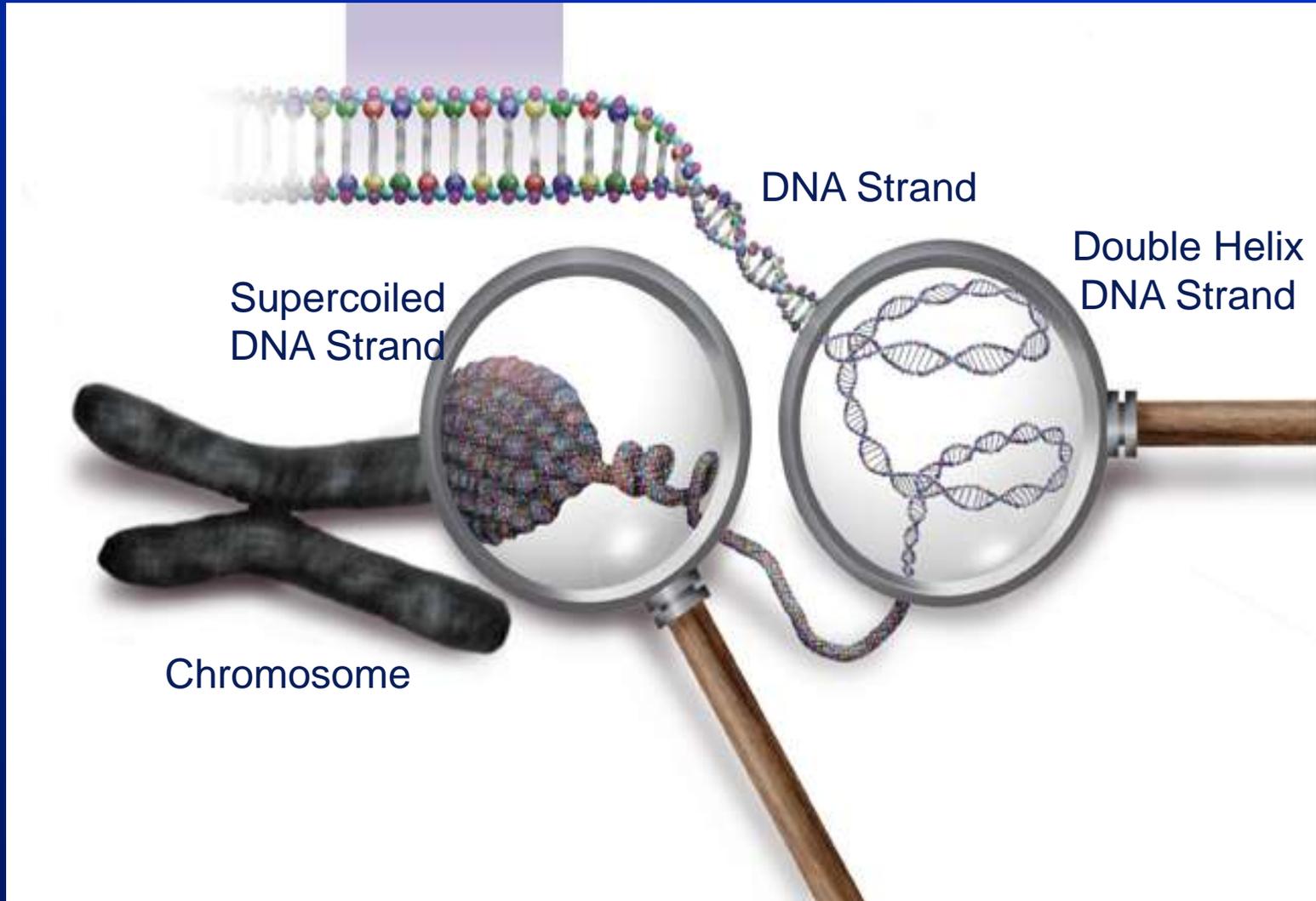
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

- 3.6×10^9 ΖΕΥΓΗ ΒΑΣΕΩΝ DNA ΑΠΟΤΕΛΟΥΝ ΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΜΗΚΟΥΣ 2m.
- 30.000 ΓΟΝΙΔΙΑ :ΩΣ ΓΟΝΙΔΙΟ ΟΡΙΖΕΤΑΙ ΤΟ ΜΗ ΔΙΑΚΛΑΔΙΖΟΜΕΝΟ ΧΗΜΙΚΟ ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ 4 ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΒΑΣΕΩΝ (A ,T,G,C) ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΠΟΛΥΤΙΜΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ ΕΝΩ ΣΥΓΧΡΟΝΩΣ ΔΥΝΑΤΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΝΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΑΓΕΙ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΤΟΥ ΤΟΣΟ IN VIVO ΟΣΟ ΚΑΙ IN VITRO.
- ΤΟ 10% ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ DNA ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ ΠΟΥ ΣΗΜΑΙΝΕΙ ΣΧΗΜΑΤΙΖΕΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ.

ΙΣΤΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΛΥΨΕΙΣ

- 1855: Ο MENDEL ΑΝΑΦΕΡΕΙ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΓΟΝΩΝ ΠΟΥ ΜΕΤΑΒΙΒΑΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΘΥΓΑΤΡΙΚΕΣ ΓΕΝΕΕΣ
- 1940: Ο BEADLE ΑΝΑΦΕΡΕΙ ΤΗΝ ONE GENE ONE ENZYME HYPOTHESIS. (NOBEL 1958)
- 1944: Ο AVERY ΑΠΟΔΕΙΚΝΥΕΙ ΌΤΙ ΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙΤΑΙ ΑΠΌ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΑΛΛΑ ΑΠΌ DNA.
- 1953: ΟΙ WATSON ΚΑΙ CRICK ΑΝΑΚΑΛΥΠΤΟΥΝ ΌΤΙ ΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΟΥ DNA ΑΠΟΤΕΛΕΙΤΑΙ ΑΠΌ ΔΙΠΛΗ ΕΛΙΚΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΕΡΙΓΡΑΦΟΥΝ .(NOBEL 1962)
- 1956: Ο KORNBERG ΑΝΑΚΑΛΥΠΤΕΙ ΤΗΝ DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA ΤΟΣΟ IN VIVO ΟΣΟ ΚΑΙ IN VITRO.(NOBEL 1959)
- 1975: Ο SANGER ΑΝΑΚΑΛΥΠΤΕΙ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΓΙΑ ΤΟ DNA SEQUENCING.(NOBEL 1980)
- 1985: Ο MULLIS ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΙ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ PCR .(NOBEL 1993)

Target Sequence

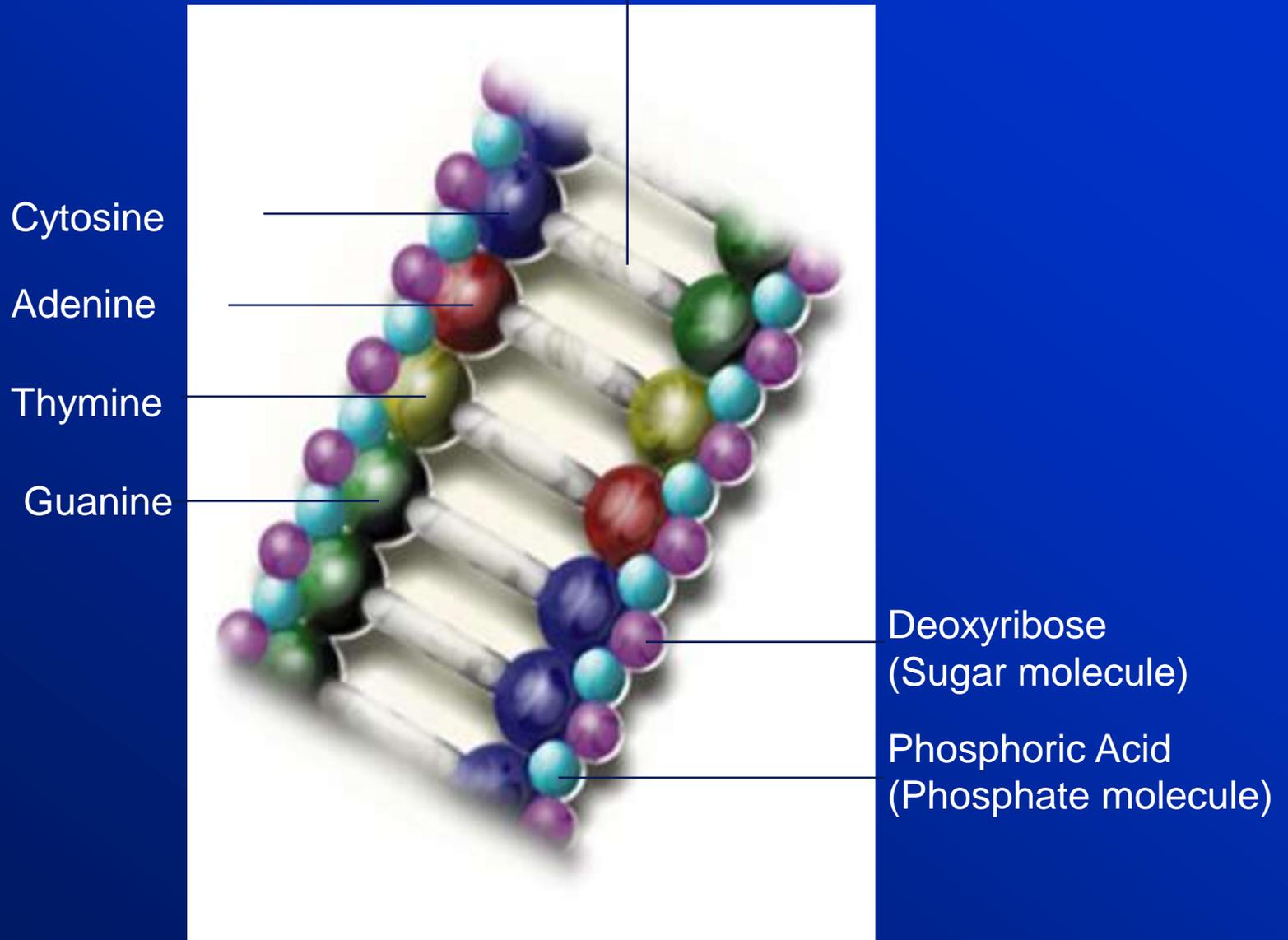


DNA Double Helix

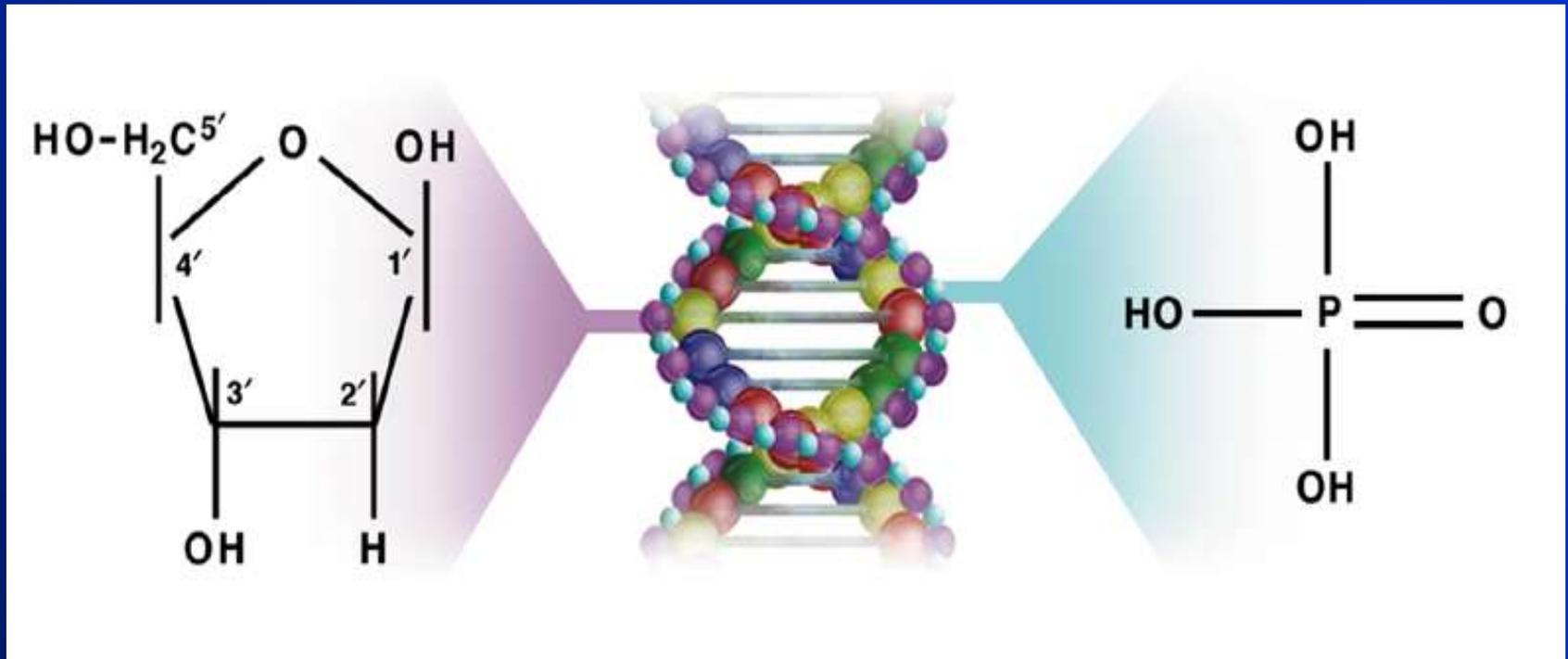


DNA Structure

Hydrogen Bonds



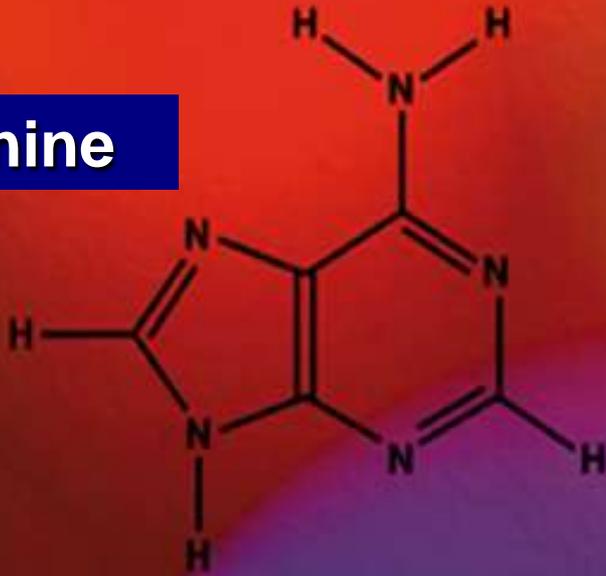
Deoxyribose and Phosphoric Acid



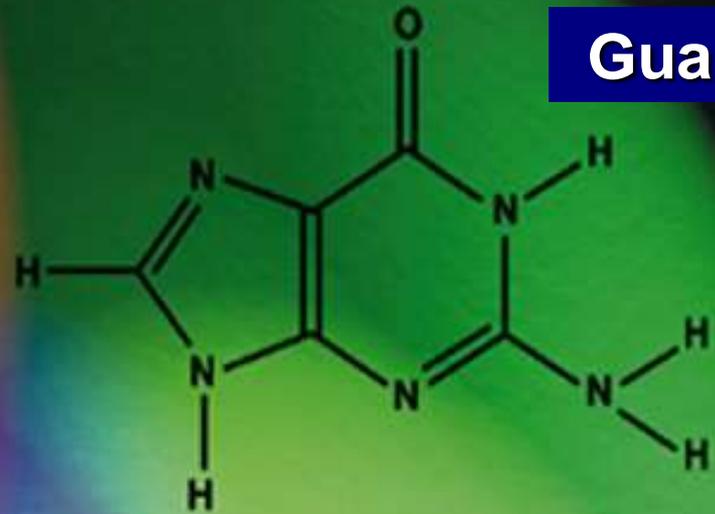
Deoxyribose

Phosphoric Acid

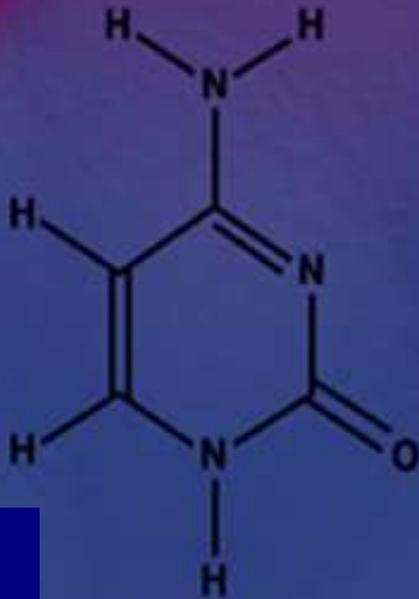
Adenine



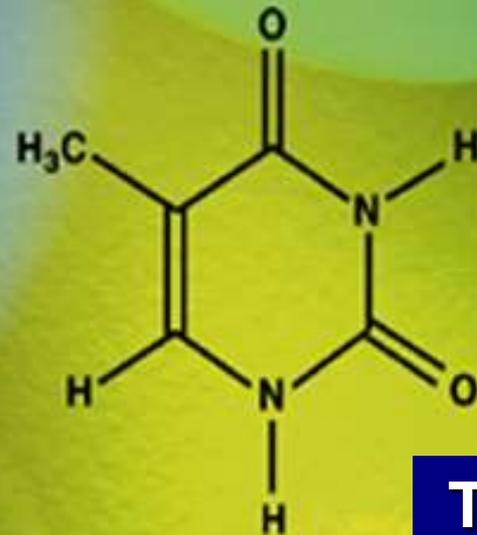
Guanine



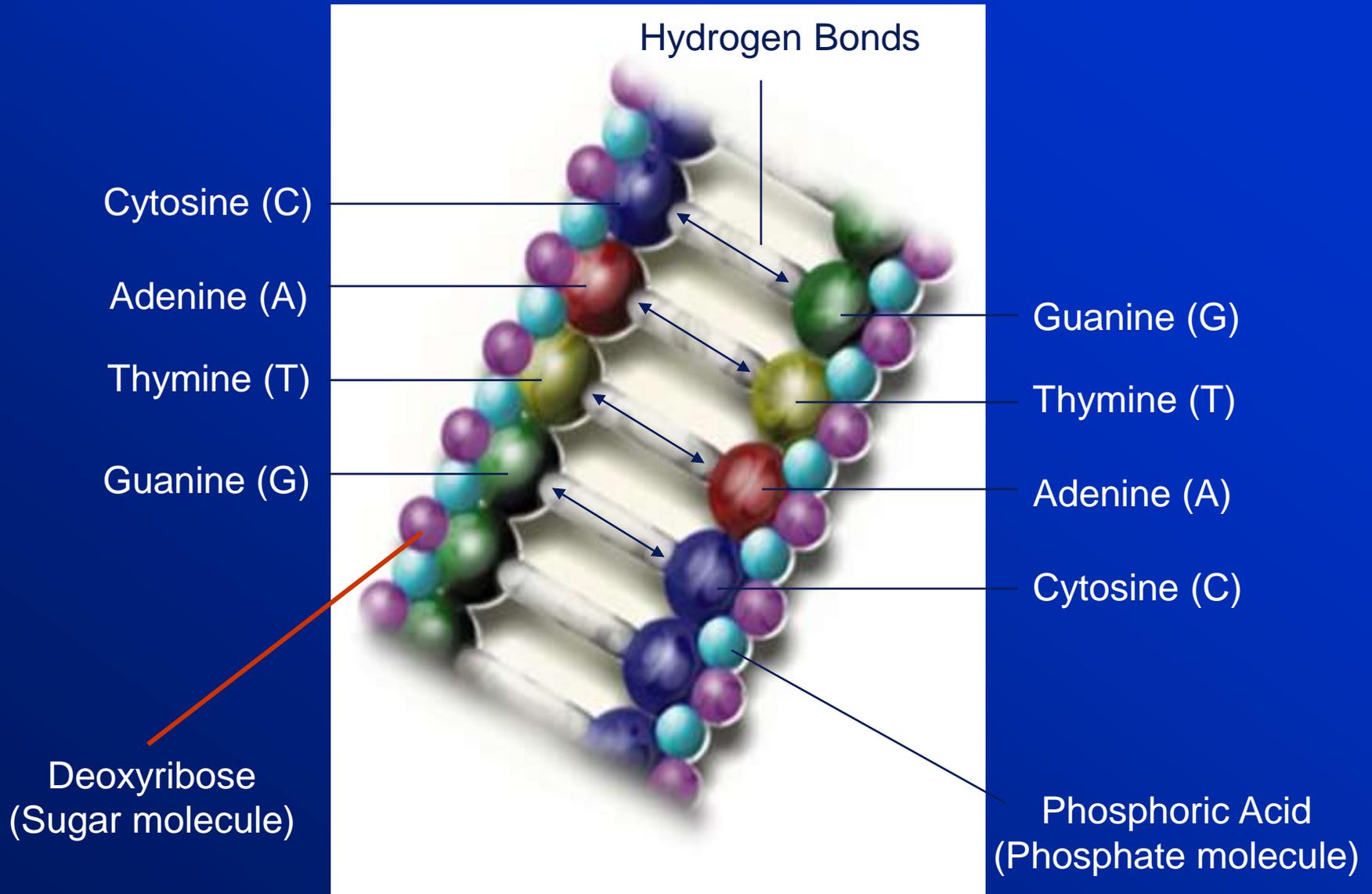
Cytosine



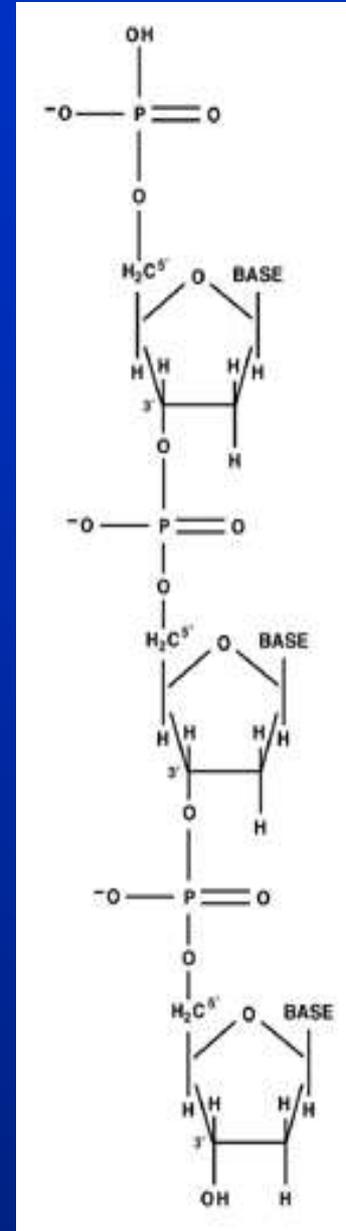
Thymine



The Nucleotide Sequence



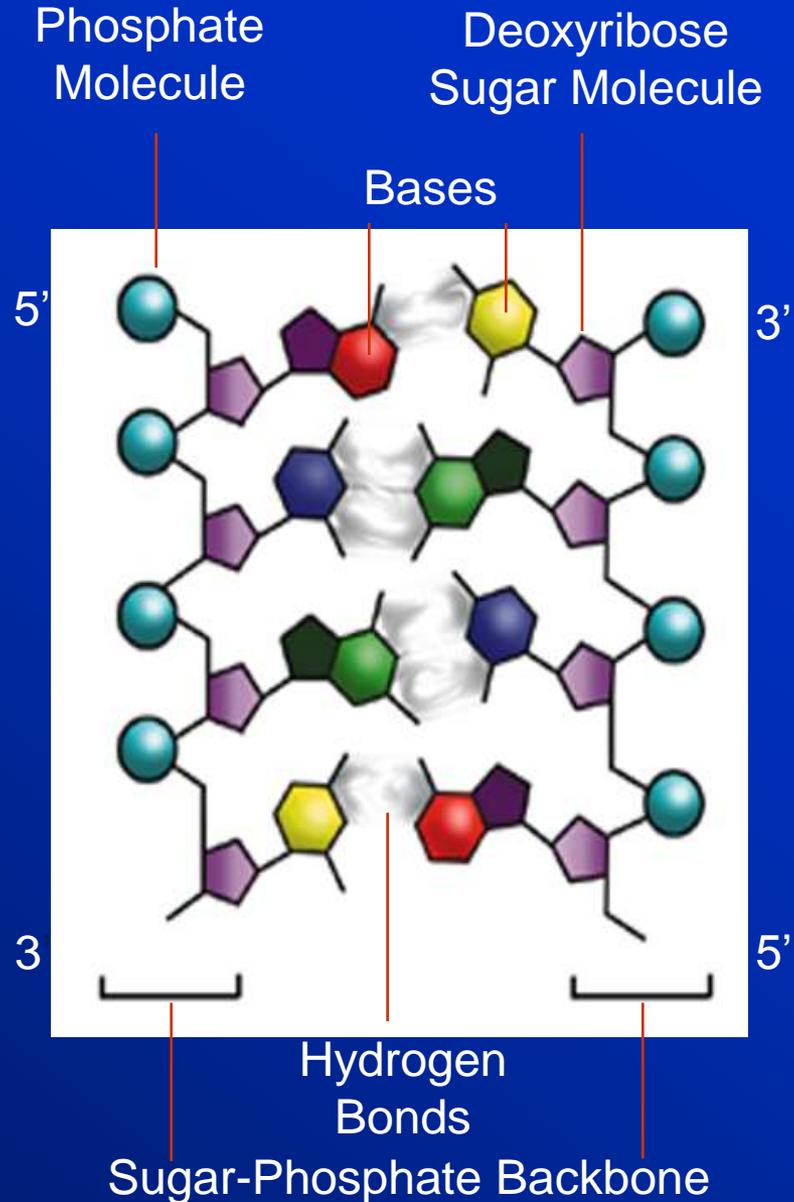
5' to 3' Orientation of the Sugar - Phosphate Backbone



5' end

3' end

Bonding of Base, Sugar and Phosphate Groups



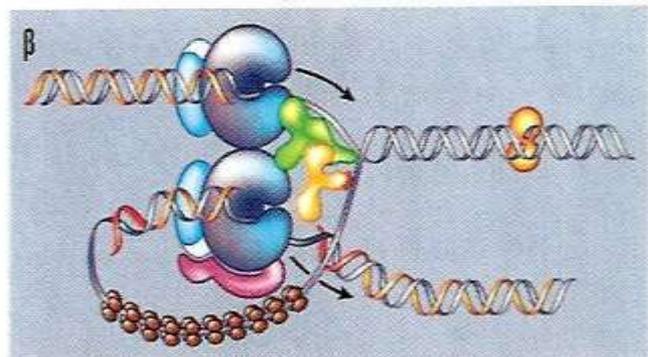
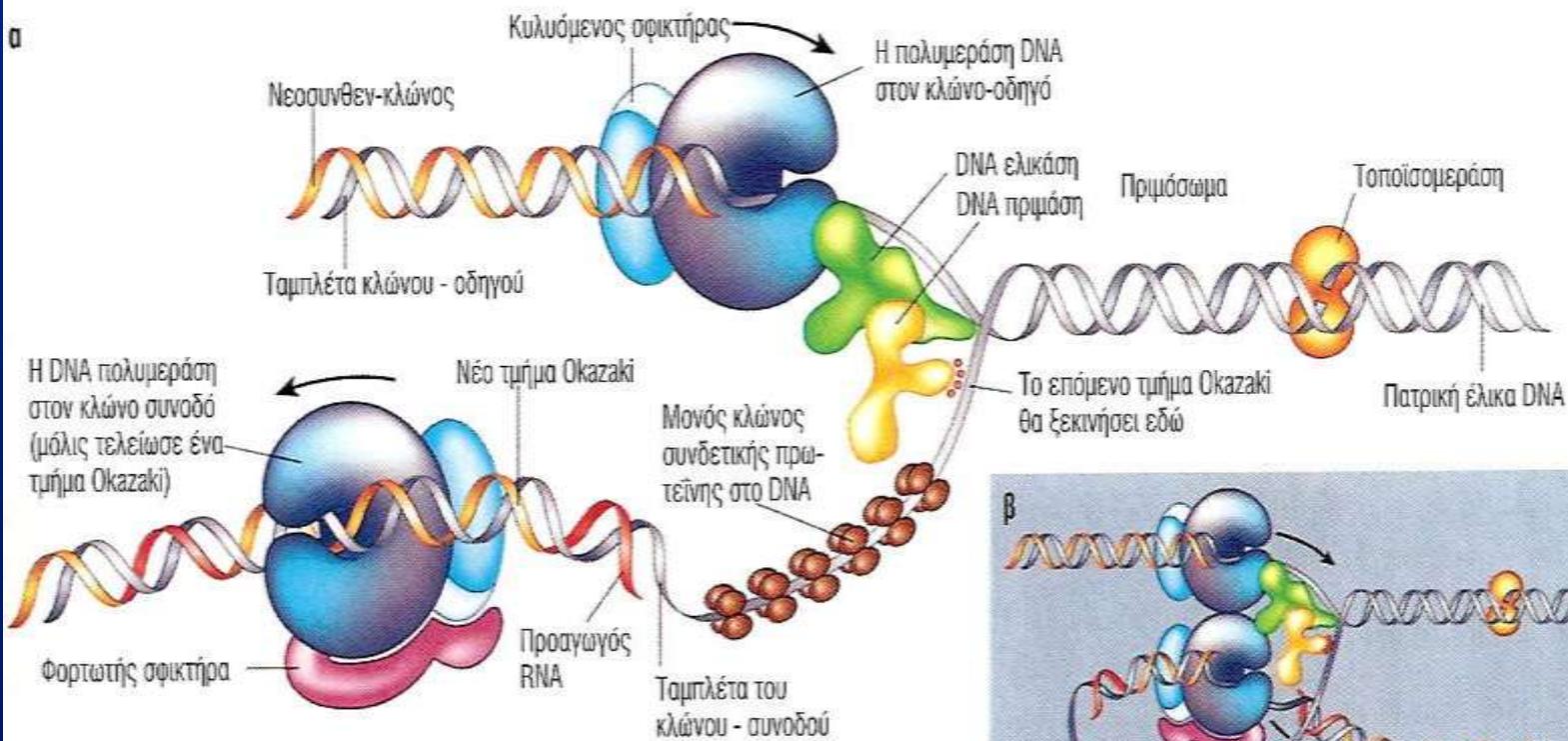


Αντιγραφή του DNA



© W. G. Klene

α



β

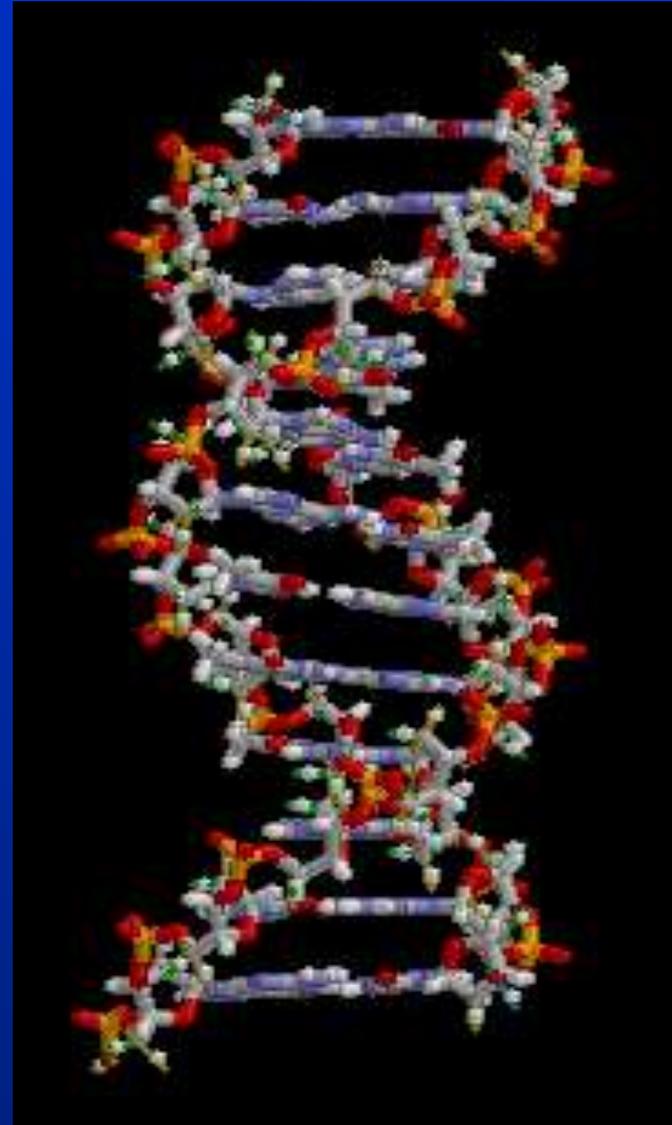


2000-:
Αποκρυπτογράφηση
ανθρώπινου γονιδιώματος

1990-2000:
Επανάσταση στη μεθοδολογία

1970-80:
Εμφάνιση των πρώτων
τεχνικών ανάλυσης του DNA

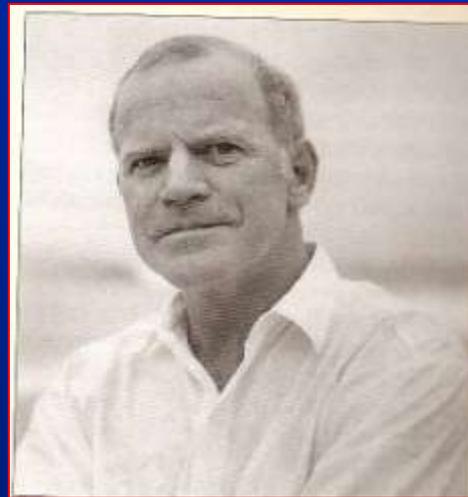
1950-60:
χαρακτηρισμός, απομόνωση
και χειρισμός
DNA, RNA και πρωτεΐνες





Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction -PCR)

1985



Kary Mullis

Nobel Χημείας
1993



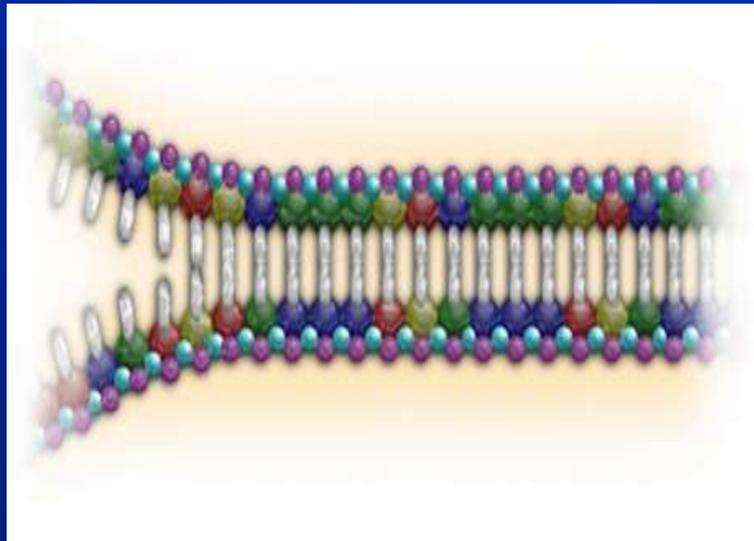
Όλα τα συστατικά της συνταγής ήταν γνωστά στην επιστημονική κοινότητα. Κανείς όμως μέχρι εκείνη τη στιγμή δεν τα είχε συνδυάσει όπως τα συνδύασε ο Mullis.

Για 4 μήνες κανείς στην εταιρεία δεν αξιολόγησε σοβαρά τη σκέψη του και μάλιστα το περιοδικό Science με ευθύνη του εκδότη του Dan Koshland απέρριψε το πρώτο paper με τη τεχνική PCR που έστειλε ο Mullis προς δημοσίευση.

Τρία χρόνια αργότερα όταν η PCR ανακηρύχτηκε «Molecule Of The Year» ο Dan Koshland εξακολουθούσε να είναι ο εκδότης του περιοδικού Science.

PCR 3 ΣΤΑΔΙΩΝ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

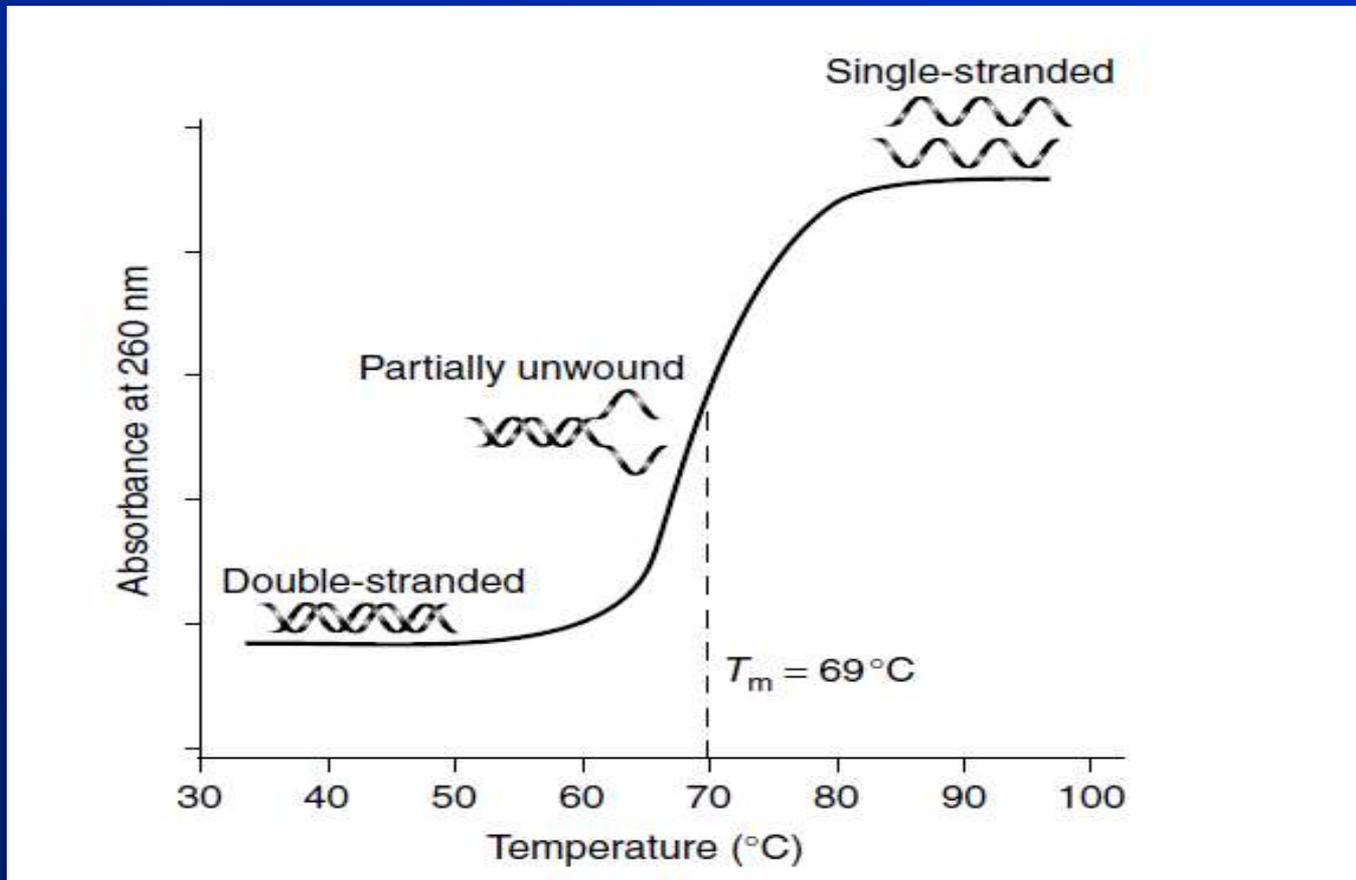
1. DNA DENATURATION (ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ) 94° C. 30 sec



- Όταν το DNA θερμαίνεται η διπλή έλικα αρχίζει να «χωρίζει» και το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως τήξη (melting). Από τη στιγμή που το ζεύγος A=T ενώνεται με δύο δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με το ζεύγος C≡G που ενώνεται με τρεις, περιοχές του DNA με μεγάλη συγκέντρωση A και T θα διαχωριστούν πρώτες.

PCR 3 ΣΤΑΔΙΩΝ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

- Η θερμοκρασία κατά την οποία το μισό DNA είναι πλέον μονόκλωνο ονομάζεται melting temperature (T_m).



PCR 3 ΣΤΑΔΙΩΝ

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

- Η T_m των μορίων DNA δεν είναι ίδια και εξαρτάται
 - 1) Από το μήκος της αλυσίδας DNA
 - 2) Από την αναλογία βάσεων A,T,C,G που περιέχει

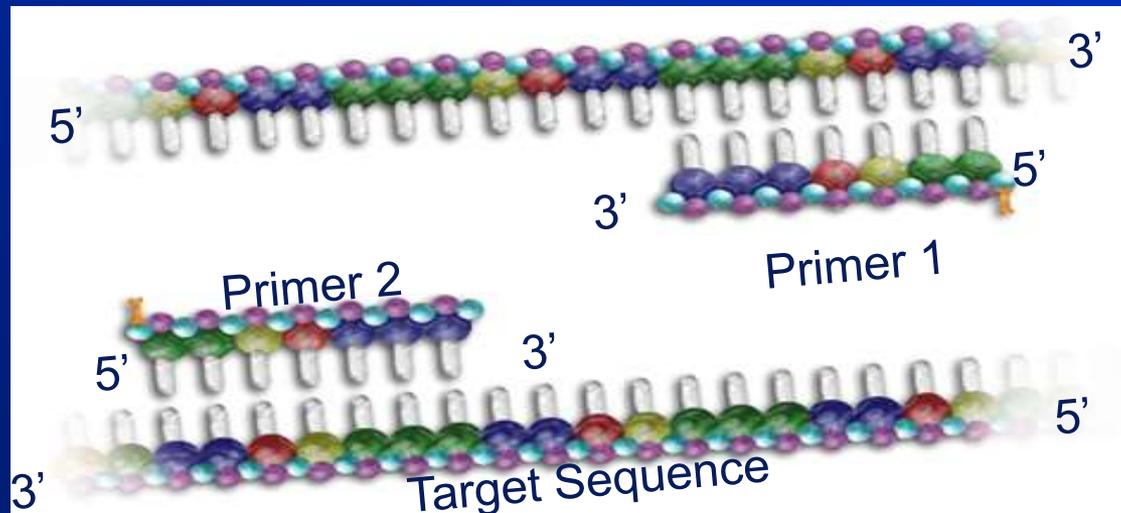
$$T_m = 16,5 (\log [Na^+]) + 0.41 (\%GC) + 81,5^\circ C$$

- Για μικρά μόρια DNA (15-30) βάσεων η
 $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$, Wallace rule
Έτσι μια μονόκλωνη αλυσίδα DNA 20 βάσεων με 5A, 6T, 3C και 6G θα έχει T_m :
 $T_m = 2(5^A + 6^T) + 4(3^C + 6^G) = 58^\circ C$.

PCR 3 ΣΤΑΔΙΩΝ

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

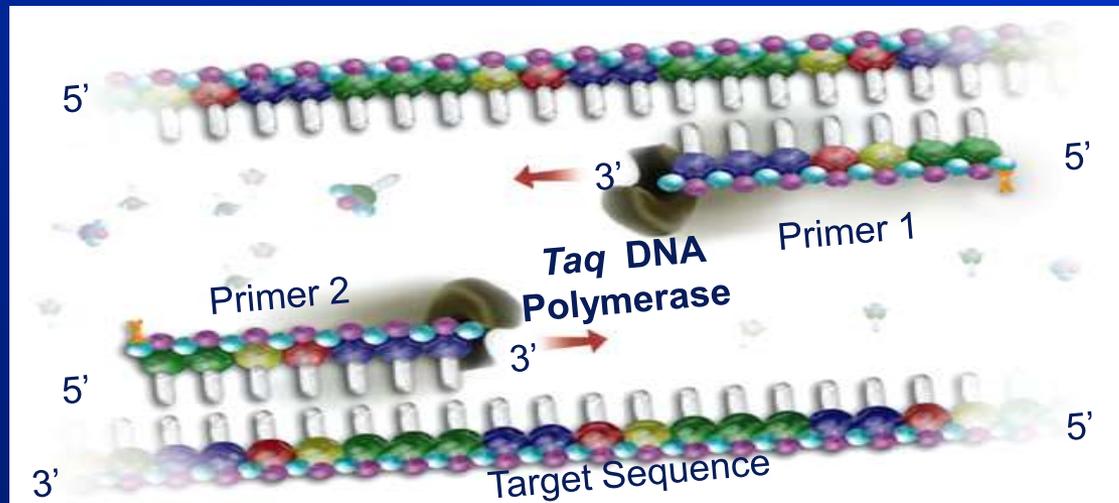
2. DNA ANNEALING (ΕΠΑΝΑΔΙΑΤΑΞΗ – ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΕΣ ΑΛΥΣΙΔΕΣ DNA) 45° - 60° C.



- Απαιτεί δύο εκκινητές (PRIMERS) μήκους 17-30 βάσεων που μαρκάρουν (FLANK) τον στόχο DNA που θέλουμε να αντιγραφεί και των οποίων τα 3' άκρα πρέπει να είναι αντικρυστά.

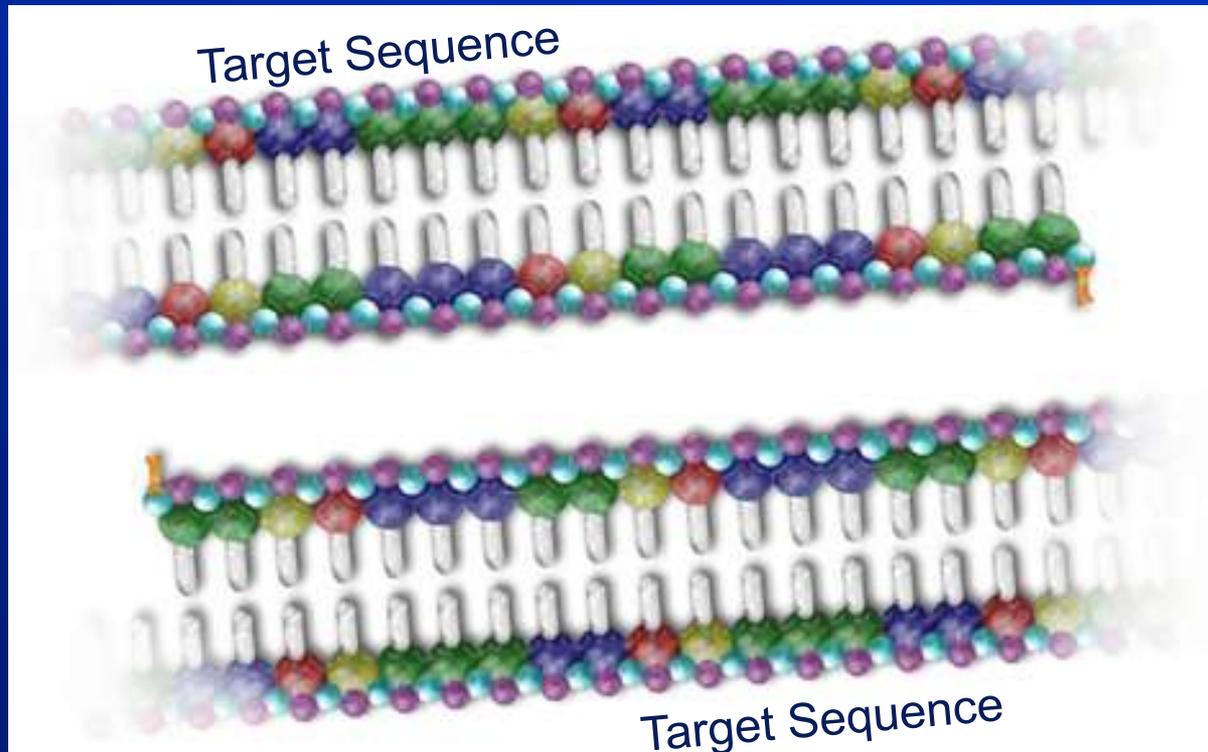
PCR 3 ΣΤΑΔΙΩΝ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

3. DNA EXTENSION (ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ) 72° C.



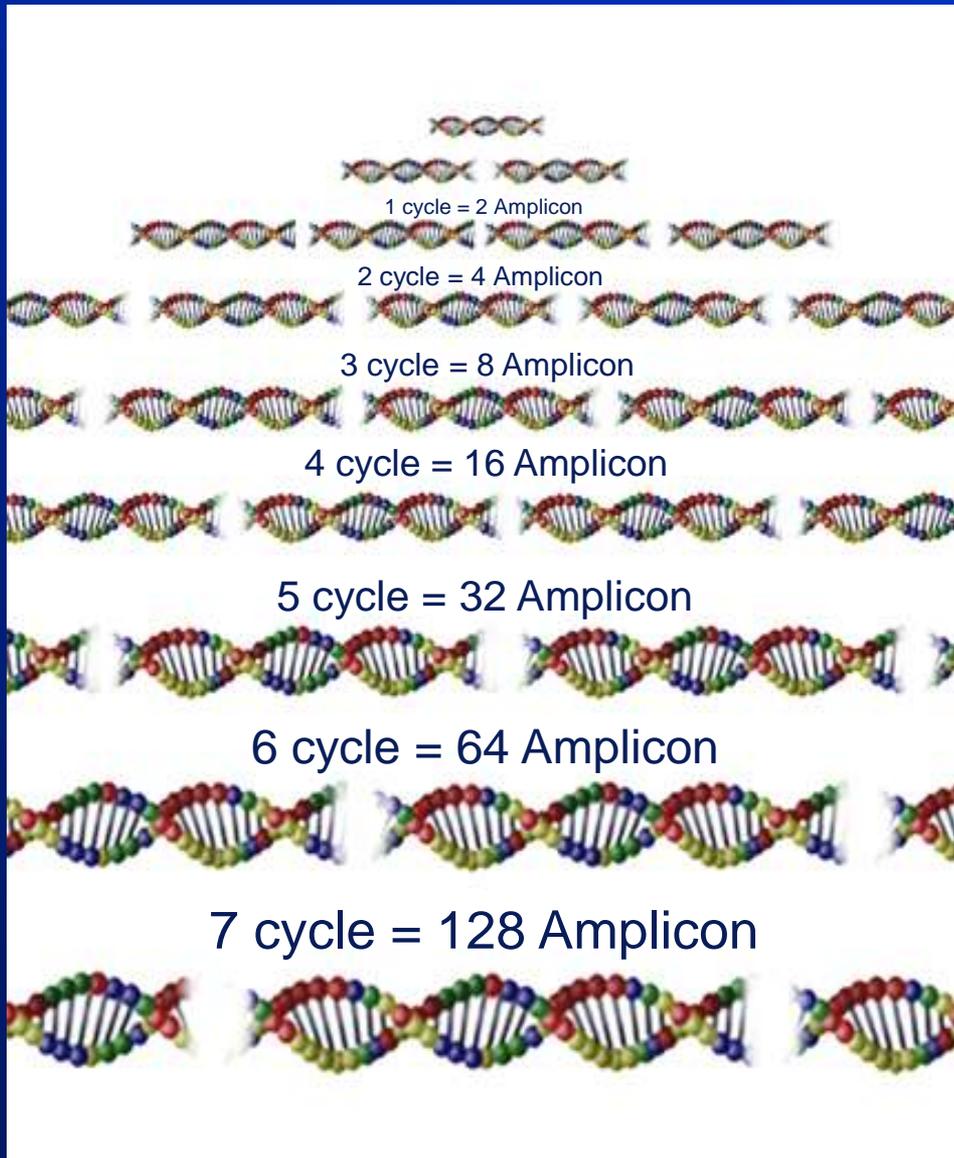
- Δράση της DNA πολυμεράσης σε περιβάλλον περίσσειας των τεσσάρων φωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων έχει σαν αποτέλεσμα την επιμήκυνση των εκκινητών με κατεύθυνση 5' → 3' και σύνθεση συμπληρωματικής ως προς τη μητρική, νέας αλυσίδας DNA με ταχύτητα αύξησης αλυσίδας 500 – 1000 ζεύγη βάσεων ανά λεπτό.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ 1^{ου} ΚΥΚΛΟΥ



2 ΔΙΚΛΩΝΑ ΜΟΡΙΑ DNA

ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ - ΣΤΟΧΟΥ



ΚΥΚΛΟΙ PCR	ΠΛΗΘΟΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΣΤΟΧΟΥ
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1.048.576
30	1.073.741.824

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR

Ένα τυπικό πείραμα PCR περιέχει τα ακόλουθα συστατικά:

- DNA (0,01 – 0,1 μg)
- PRIMER 1-FORWARD (20 μmol)
- PRIMER 2-REVERSE (20 μmol)
- Tris – HCL (20mM, pH 8)
- MgCl_2 (2 mM) 
- 50 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP.
- ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗ DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ (2 IU)
- dH_2O ΕΩΣ 50-100 μl ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΟΓΚΟΥ.

↓ Mg → ΕΛΛΑΤΩΜΕΝΗ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

↑ Mg → ΧΑΜΗΛΗ
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ
ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

ΟΡΓΑΝΟ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ : ΘΕΡΜΟΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗΣ (THERMOCYCLER)



PCR HIGHLIGHTS

DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ

- Στα πρώτα πειράματα PCR χρησιμοποιήθηκε DNA pol I (Klenow fragment) μη θερμοανθεκτική → ανάγκη προσθήκης νέου ενζύμου σε κάθε κύκλο PCR.

Με τη χρήση Taq DNA πολυμεράσης, προερχόμενη από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Lawyer et al 1989) η PCR αυτοματοποιείται αφού η Taq πολυμεράση αντέχει έως και 94°C ενώ παρουσιάζει βέλτιστη λειτουργικότητα στους 72°C.

Η υψηλή θερμοκρασία στην οποία γίνεται η αντίδραση της επιμήκυνσης των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων εξασφαλίζει ότι η ειδικότητα κατά τον υβριδισμό των primers δεν υπόκειται σε συμβιβασμό.

Η Taq πολυμεράση έχει βέλτιστη δράση στους 74° C και παραμένει λειτουργική έως και τους 95° C.

Το ένζυμο έχει δράση 5' → 3' πολυμεράσης

Το ένζυμο έχει δράση 5' → 3' εξωνουκλεάσης

ΣΤΕΡΕΙΤΑΙ δράσης 3' → 5' εξωνουκλεάσης

ΣΤΕΡΕΙΤΑΙ proofreading activity

PCR HIGHLIGHTS

Proofreading activity

Αν μια βάση εισαχθεί λάθος κατά την επιμήκυνση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας δεν μπορεί να απομακρυνθεί . Αυτό ευνοεί την εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων στο PCR προϊόν.

Η συχνότητα λάθους είναι 1 βάση κάθε $10^4 - 10^5$ βάσεις. Εάν ένα μόριο DNA μήκους 1 kb πολλαπλασιασθεί με PCR 25 κύκλων το 10% του προϊόντος περιέχει μεταλλάξεις. Εάν η PCR πραγματοποιείται για τον έλεγχο της παρουσίας ή απουσίας ενός τμήματος γονιδίου πρακτικά η επιτυχία της αντίδρασης δεν επηρεάζεται.

Η Taq πολυμεράση προσθέτει συνήθως ένα παραπάνω μόριο (συνήθως A) στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας (ελεύθερο κατάλοιπο). Χρήση άλλων πολυμερασών όπως η Pfu πολυμεράση με δραστηριότητα $3' \rightarrow 5'$ εξωνουκλεάσης θα περιορίσει το λανθασμένο προϊόν PCR για DNA 1kb σε 0,1% περίπου.

Η δραστηριότητα $5' \rightarrow 3'$ πολυμεράσης μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό primer dimer και πολλαπλασιασμό τους κατά την άνοδο της θερμοκρασίας στη φάση που οδηγεί στο Denaturation.

PCR HIGHLIGHTS

DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ

ΛΥΣΕΙΣ

1. Τοποθέτηση της πολυμεράσης στην αντίδραση όχι εξ αρχής αλλά στη θερμοκρασία των 94° C. (HotStart Polymerase).
2. Ένωση της πολυμεράσης με αντίσωμα που καθιστά το ένζυμο ανενεργό σε χαμηλές θερμοκρασίες. Σε υψηλή θερμοκρασία (94o C) το αντίσωμα καταστρέφεται η Taq απελευθερώνεται και καθίσταται ενεργή.
3. Κάλυψη των primers με πρωτεΐνη/ες που θα καταστραφεί/ούν στην υψηλή θερμοκρασία.

PCR HIGHLIGHTS

Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers)

Η επιτυχία ενός πειράματος PCR εξαρτάται κυρίως από τη σχεδίαση των εκκινητών.

PCR HIGHLIGHTS

Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers)

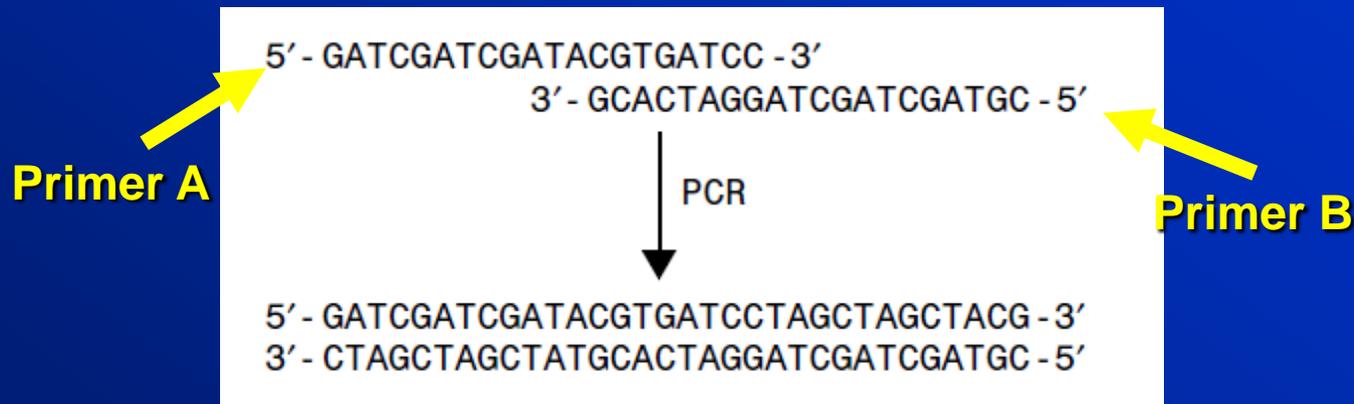
1. Μήκος 17-30 νουκλεοτίδια εξασφαλίζει μοναδικότητα υβριδισμού με μονή αλληλουχία DNA μέσα στο γένωμα ($4^{17} - 4^{30}$) συνδυασμοί βάσεων.
2. Περιεκτικότητα σε C,G κατα 50%.
3. Η θερμοκρασία υβριδισμού των 2 primers πρέπει να είναι παραπλήσια.
4. Αλληλουχίες επαναλαμβανόμενου νουκλεοτιδίου αποφεύγονται γιατί οδηγούν σε υβριδισμό μη ειδικό σε άλλες περιοχές του DNA.
5. Το κάθε primer δεν πρέπει να περιέχει αλληλουχίες συμπληρωματικές στα άκρα του διότι μπορεί να υβριδισθούν (hair pin structure) π.χ.



PCR HIGHLIGHTS

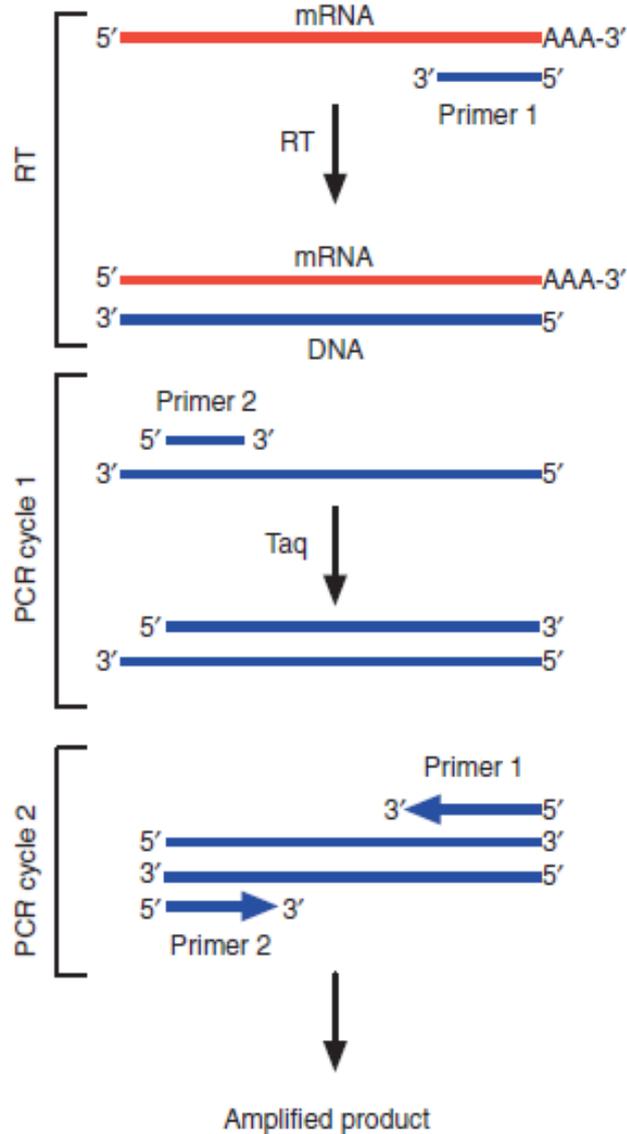
Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers)

6. Δεν πρέπει να υπάρχει συμπληρωματικότητα μεταξύ των 2 primers διότι οδηγούμαστε σε primer dimer που θα πολλαπλασιασθούν στους κύκλους της PCR.



Τα primers που χρησιμοποιούνται δεν χρειάζεται κατ'ανάγκη να είναι απόλυτα συμπληρωματικά με την αλυσίδα στόχο. Η μόνη βάση σε μια αλληλουχία βάσεων του primer που υποχρεωτικά πρέπει να είναι συμπληρωματικά με τη βάση της μητρικής αλυσίδας είναι αυτή στο 3' άκρο του primer. Εάν αυτό δεν επιτευχθεί η πολυμεράση δεν θα επιμηκύνει την αλυσίδα.

RT - PCR



RT – PCR

Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί ένα συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτίδιο για να ξεκινήσει την σύνθεση DNA από ένα μόριο RNA. Η μονόκλωνη αλυσίδα του DNA που παράγεται χρησιμοποιείται σαν «μητρική» για την σύνθεση και μιας δεύτερης αλυσίδας DNA και μετά για ενίσχυση χρησιμοποιώντας την PCR.

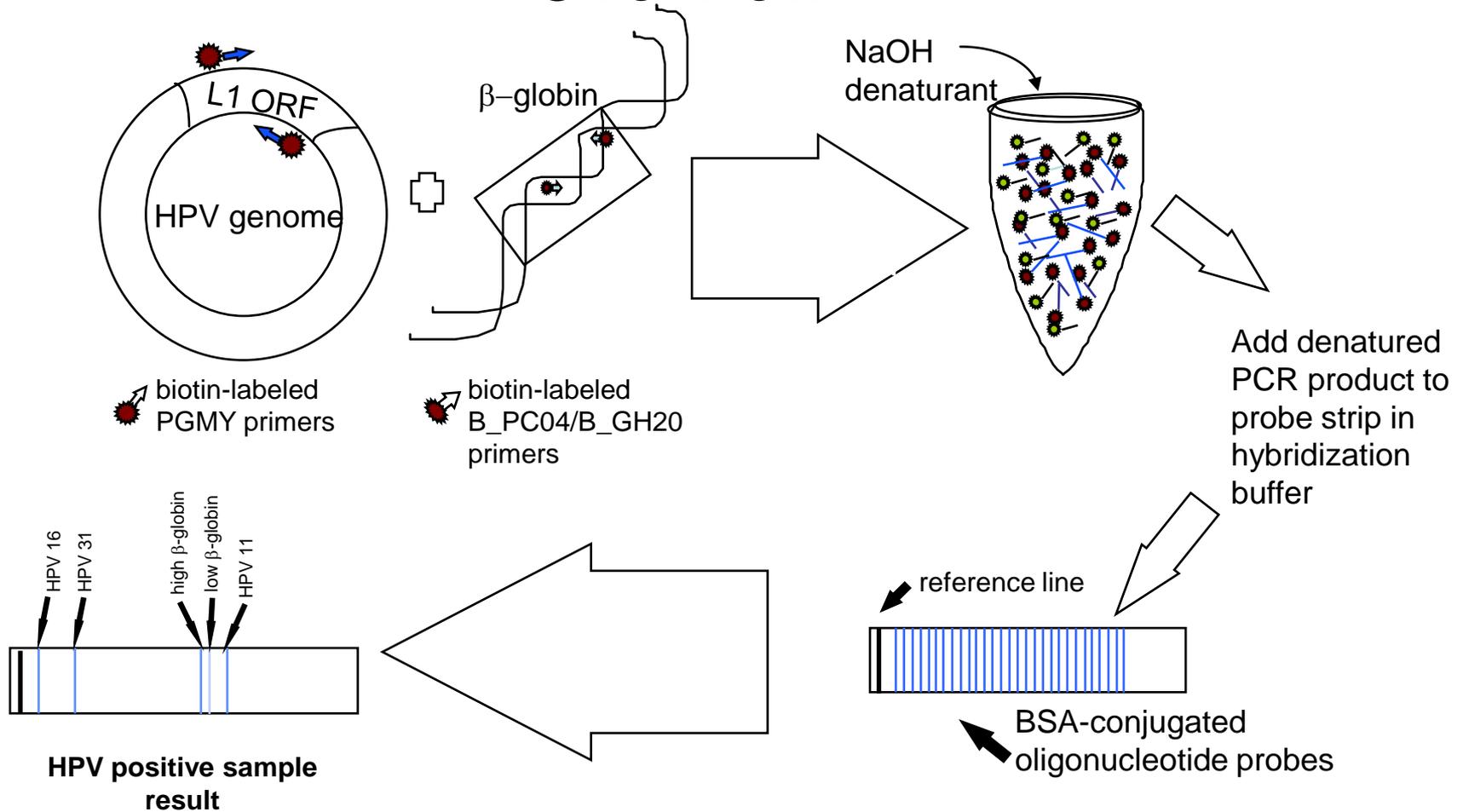
- Τα προϊόντα PCR αναλύονται σε μια ξεχωριστή διαδικασία που πραγματοποιείται μετά το τέλος της PCR.
- Ονομάζουμε αυτό το είδος της ανάλυσης «end-point analysis» (διότι συνήθως πραγματοποιείται μετά από 30-40 κύκλους PCR).
- Η end-point analysis χρησιμοποιείται συνήθως για ποιοτική ανάλυση και σπανίως για ημιποσοτική.
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (gel electrophoresis) χρησιμοποιείται συνήθως για να τεκμηριώσει την ύπαρξη ή την απουσία συγκεκριμένου προϊόντος, του μεγέθους του και της καθαρότητας του.
- Το αιθίδιο του βρωμίου (ethidium bromide) είναι η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιούμε συνήθως για την ανίχνευση του προϊόντος στο gel.
- Εάν έχουμε χρησιμοποιήσει στην PCR primers σημασμένους π.χ. με βιοτίνη τότε μπορούμε να υβριδίσουμε το προϊόν της PCR με καθηλωμένους συμπληρωματικά της DNA αλληλουχίας probes (ανιχνευτές) και με τη χρήση στρεπταβιδίνης να οπτικοποιήσουμε την παραγωγή ή όχι σήματος.

ΟΠΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ PCR ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ

Κλινική Μικροβιολογία : Ανίχνευση ιού HPV.

LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test

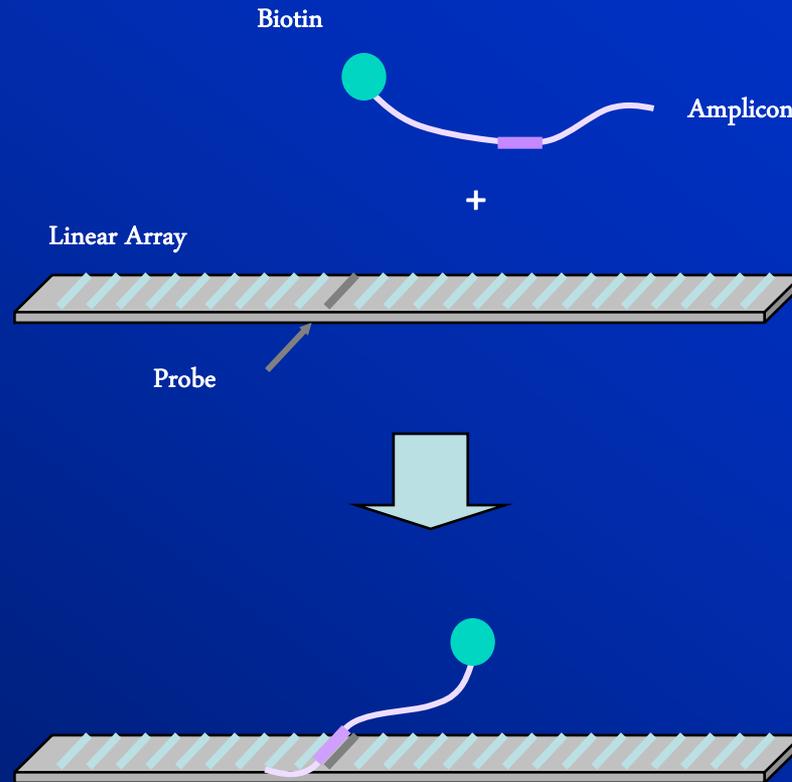
Overview



(Gravitt, et al. J. Clin. Micro. 36: 3020-3027)

LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test

ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

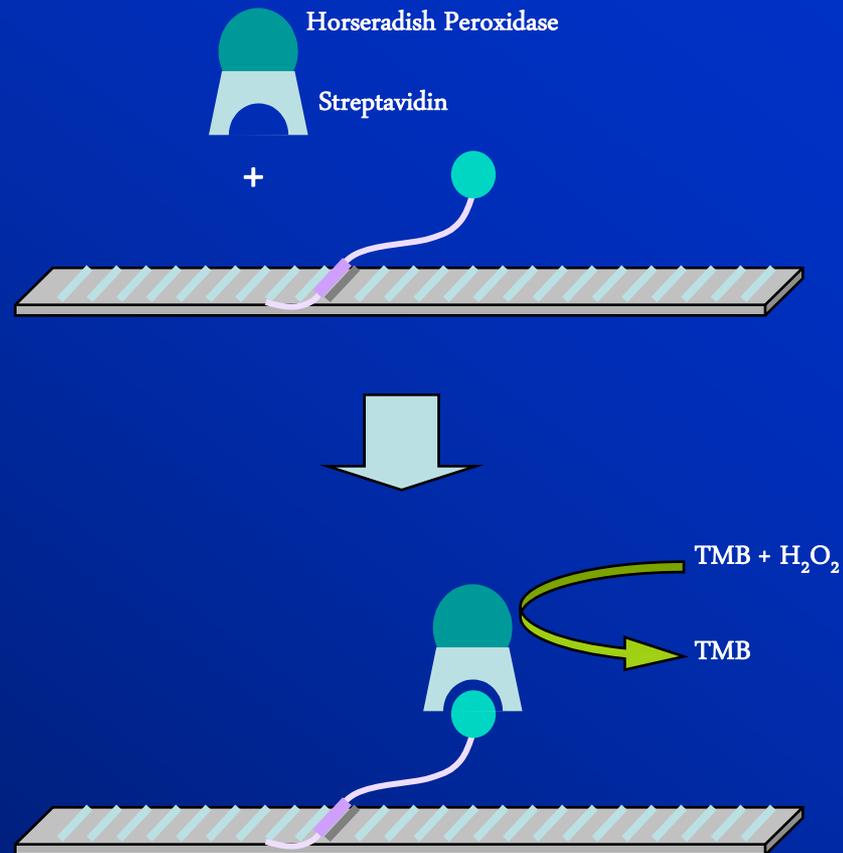


- Υβριδισμός του βιοτινυλιωμένου κωδικονίου (amplicon) με τα ακινητοποιημένα ειδικά ολιγονουκλεοτίδια (probes)

LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

- Προσθήκη Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate
- Χρωματισμός με καθίζηση TMB + Υπεροξείδιο
- Θετικό σήμα: μπλέ γραμμή



LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

HPV Strip Reference Guide

Reference Line →

Numerical order of genotypes

Low beta Globin Control →

High beta Globin Control →

REF	
1 - HPV GT6	2 - HPV GT11
3 - HPV GT16	4 - HPV GT18
5 - HPV GT26	6 - HPV GT31
7 - HPV GT33	8 - HPV GT35
9 - HPV GT39	10 - HPV GT40
11 - HPV GT42	12 - HPV GT45
13 - HPV GT51	14 - HPV GT52/33/35/58
15 - HPV GT53	16 - HPV GT54
17 - HPV GT55	18 - HPV GT56
19 - HPV GT58	20 - HPV GT59
21 - HPV GT61	22 - HPV GT62
23 - HPV GT64	24 - HPV GT66
25 - HPV GT67	26 - HPV GT68
27 - HPV GT69	28 - HPV GT70
29 - HPV GT71	30 - HPV GT72
31 - HPV GT73	32 - HPV GT81
33 - HPV GT82	34 - HPV GT83
35 - HPV GT84	36 - HPV GT83/9
37 - HPV GTCP61/88	38 - B-Globin low
39 - B-Globin high	

LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test

Reference Guide/ Referenzleitfaden/ Guide de références/ Guida di riferimento/ Guia de referencia/ Guia de Referencia/ Referenceguide/ Referensguide

Roche Molecular Systems, Inc.
Branchburg, NJ USA

04302/0401-01

Reference Line →

GT 16 →

GT 18 →

GT 31 →

GT 45 →

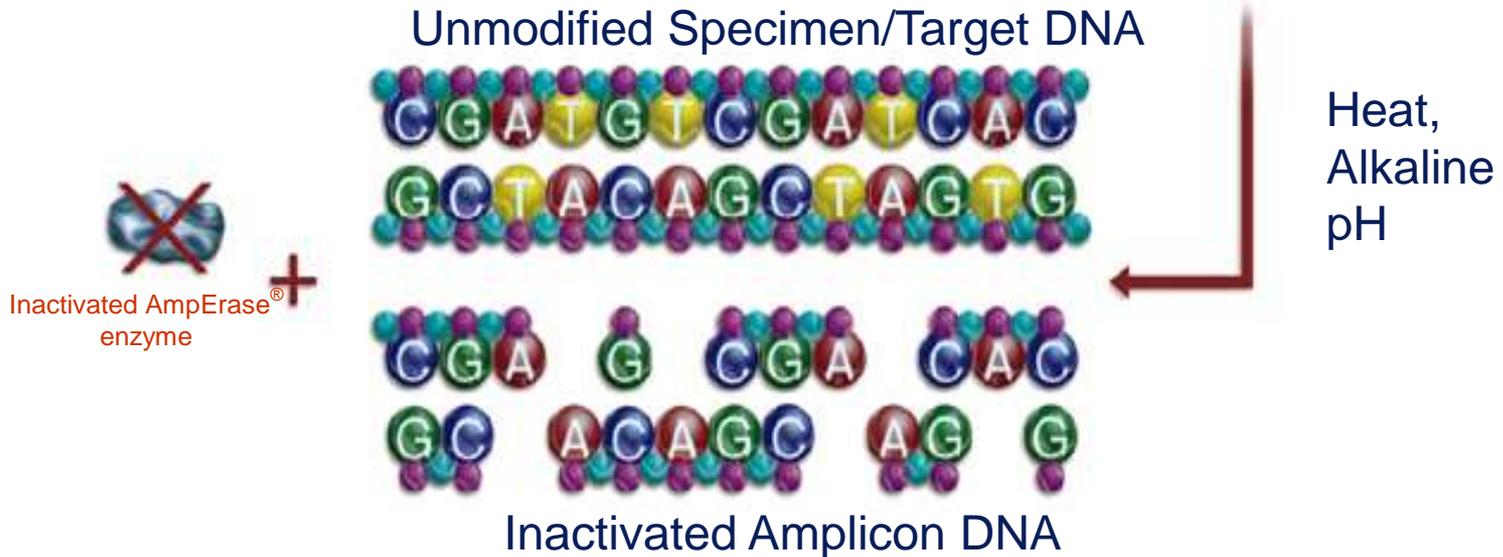
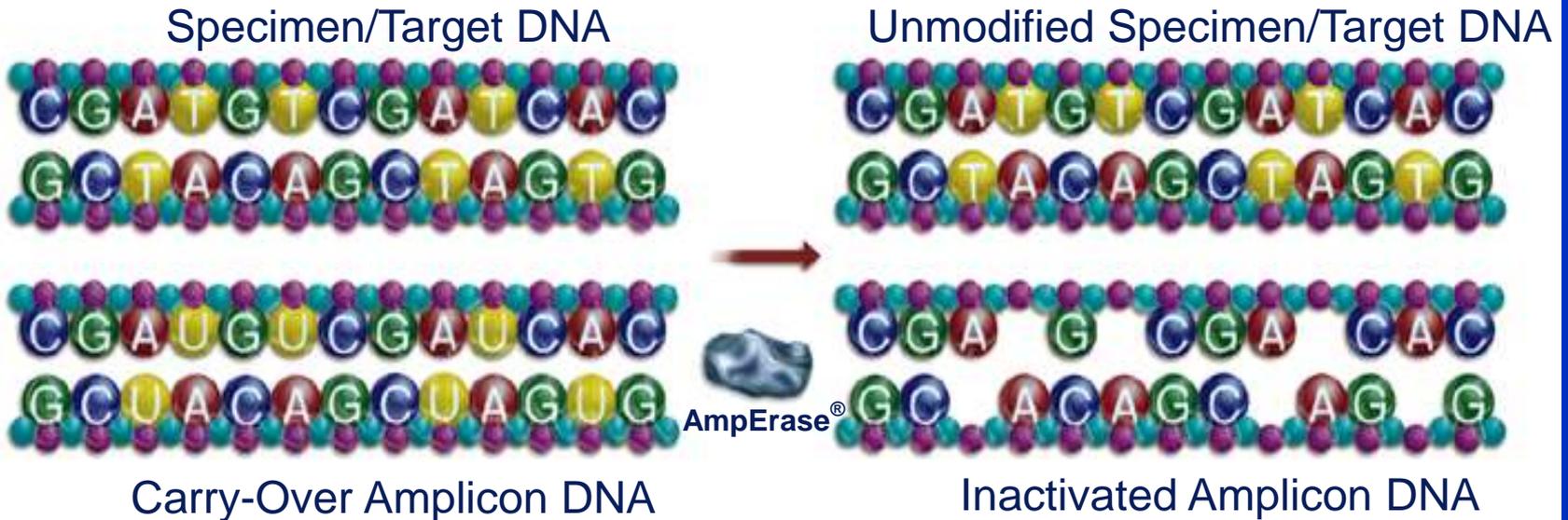
Low Globin Control →

High Globin Control →

D7RL1.1

D7RL1.2

Selective Amplification using AmpErase[®]



ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΜΛΑΞΗΣ ΛΟΓΩ DELETION ΣΥΝΔΡΟΜΟ WAARDENBURG

Primer 1

5' - CAG GGC CGC GTC AAC CAG CTC GGC - 3'

5' - GGC CAG GGC CGC GTC AAC CAG CTC GGC GGC GTT TTT ATC AAC GGC AGG CCG CTG
G Q G R V N Q L G G V F I N G R P L

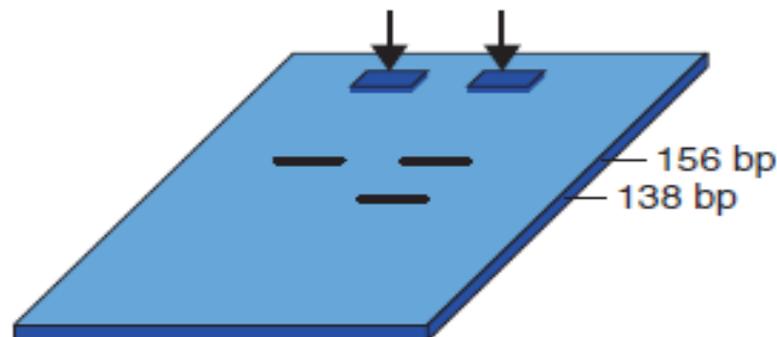
CCC AAC CAC ATC CGC CAC AAG ATC GTG GAG ATG GCC CAC CAC GGC ATC CGG CCC TGC
P N H I R H K I V E M A H H G I R P C

GTC ATC TCG CGC CAG CTG CGC GTG TCC CAC GGC TGC GTC TCC AAG ATC CTG - 3'
V I S R Q L R V S H G C V S K I L

3' - AGG GTG CCG ACG CAG AGG TTC TAG - 5'

Primer 2

Wild-type Mutant

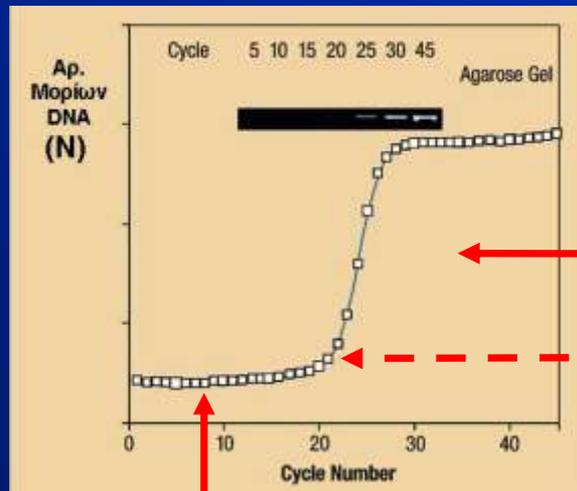


Real Time PCR

Η end-point αναλυση δεν προσφέρεται για ποσοτική PCR διότι παρέχει πληροφορία στην φάση «plateau» όπου πλέον η αντίδραση δεν μπορεί να περιγραφεί με μαθηματική φόρμουλα.

Δεν μπορούμε να συσχετίσουμε άμεσα το σήμα της end-point ανάλυσης με τη συνολική ποσότητα του DNA στόχου που είχαμε αρχικά στην αντίδραση.

Κινητική της αντίδρασης PCR



Τελική φάση της αντίδρασης (plateau)

Φάση της εκθετικής αύξησης (log phase)

Σημείο έναρξης της εκθετικής αύξησης

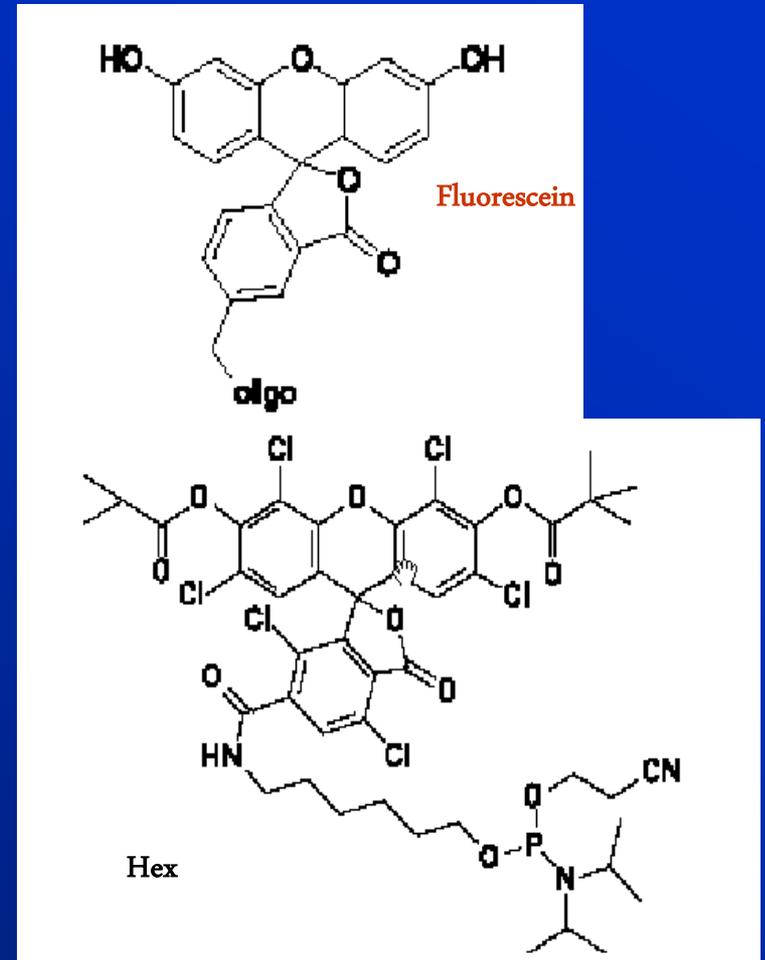
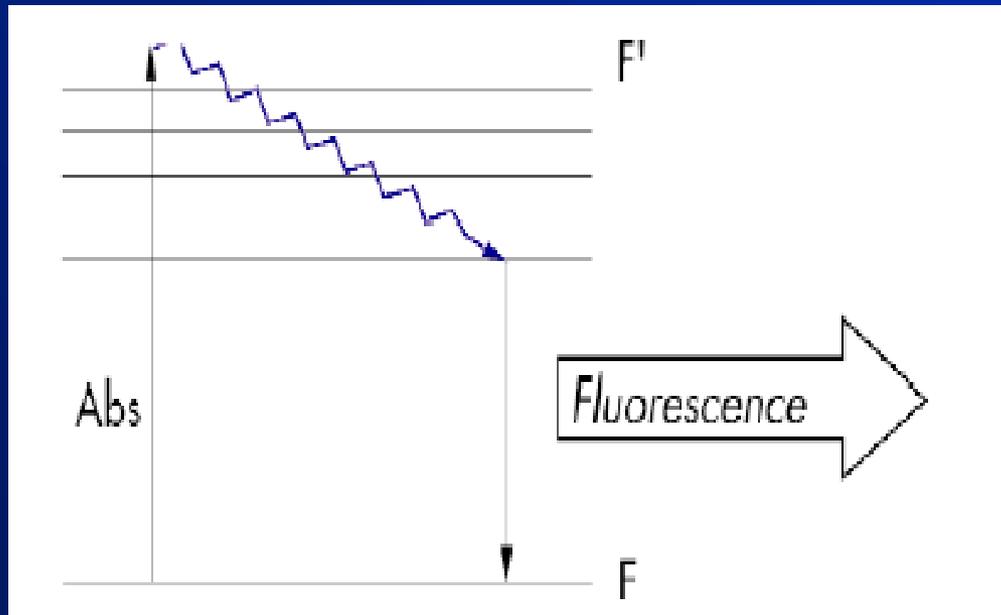
Αρχική φάση αύξησης (background)

Αρχή της Real-time PCR

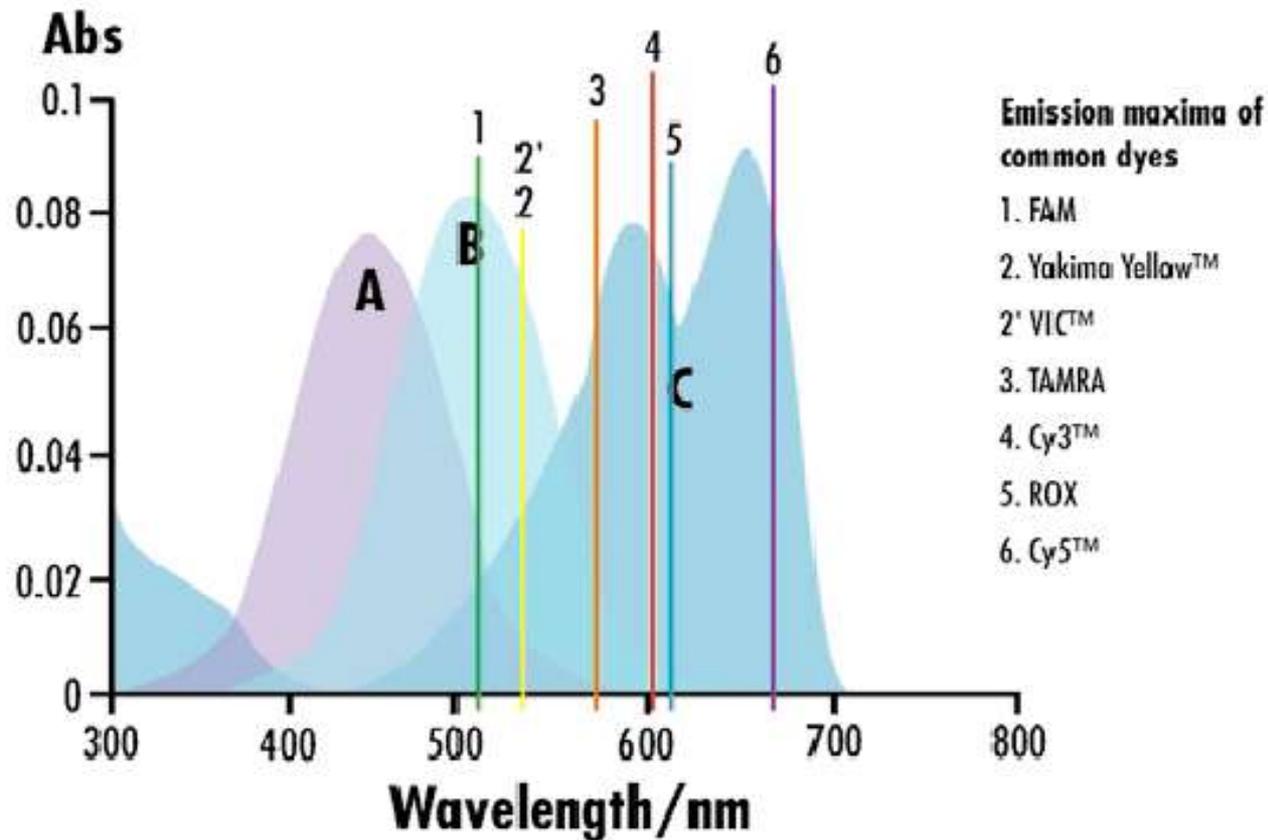
Είναι η διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Real-time PCR), μέσω της χρήσης ειδικών φθορίζοντων χρωστικών που ενσωματώνονται στην αλληλουχία που ενισχύεται.

ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

Ετεροκυκικοί ή
πολυαρωματικοί
υδρογονάνθρακες.



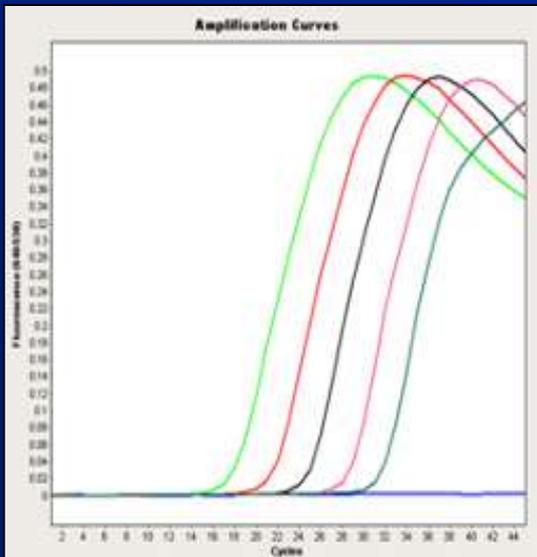
ΦΑΣΜΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ



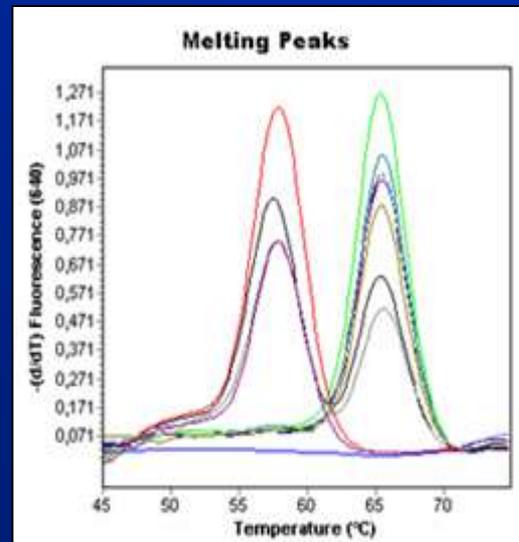
LightCycler, PCR πραγματικού χρόνου

Βασικές εφαρμογές

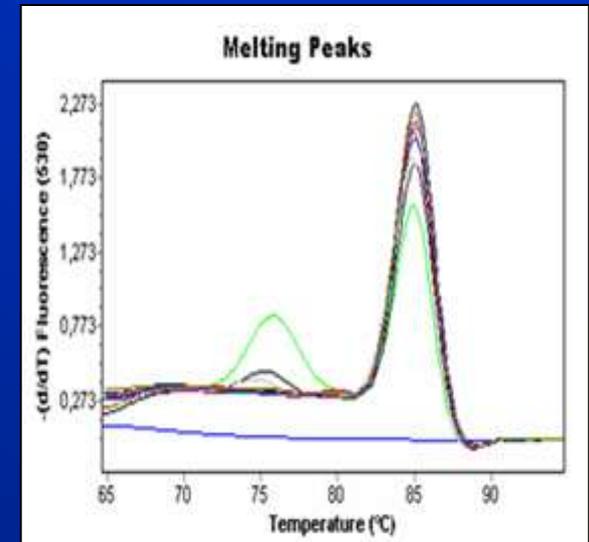
Ποσοτικοποίηση και ποιοτική
ανίχνευση



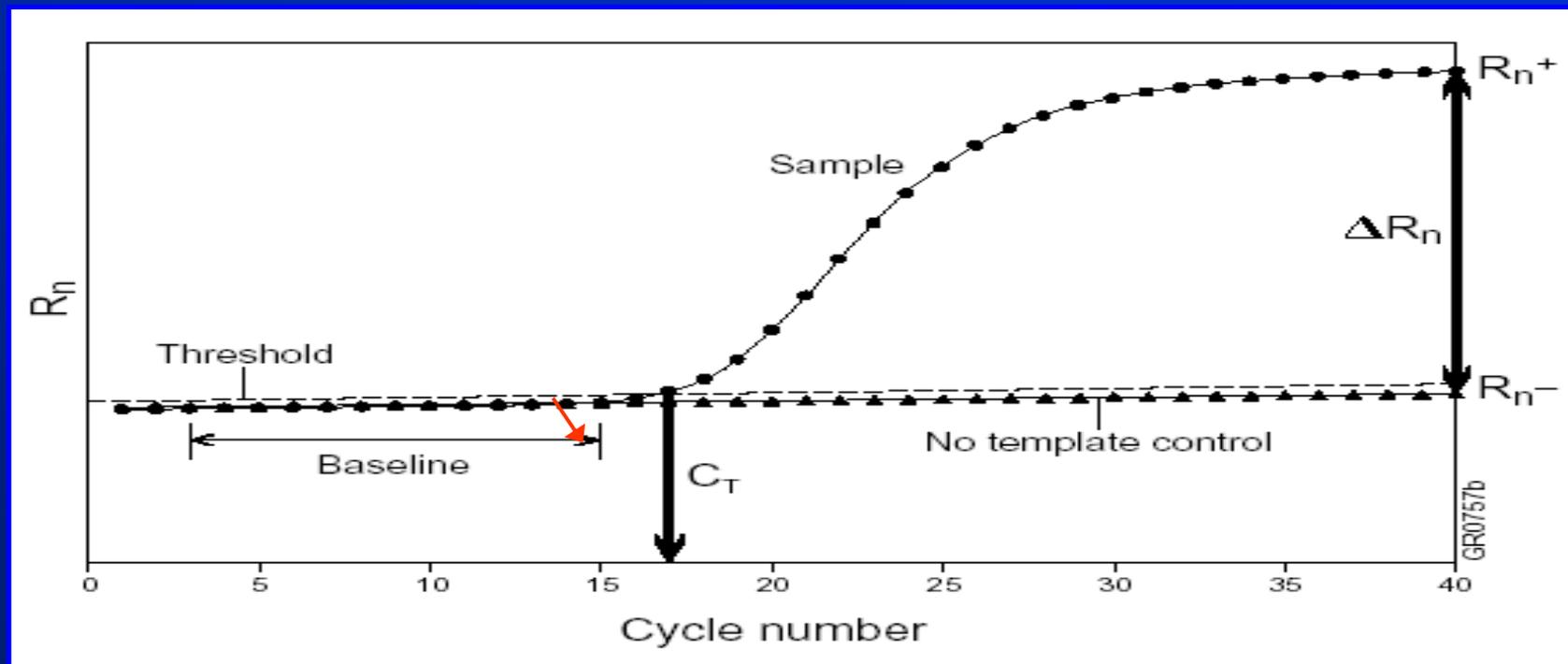
Ανίχνευση μεταλλάξεων



Χαρακτηρισμός προϊόντων



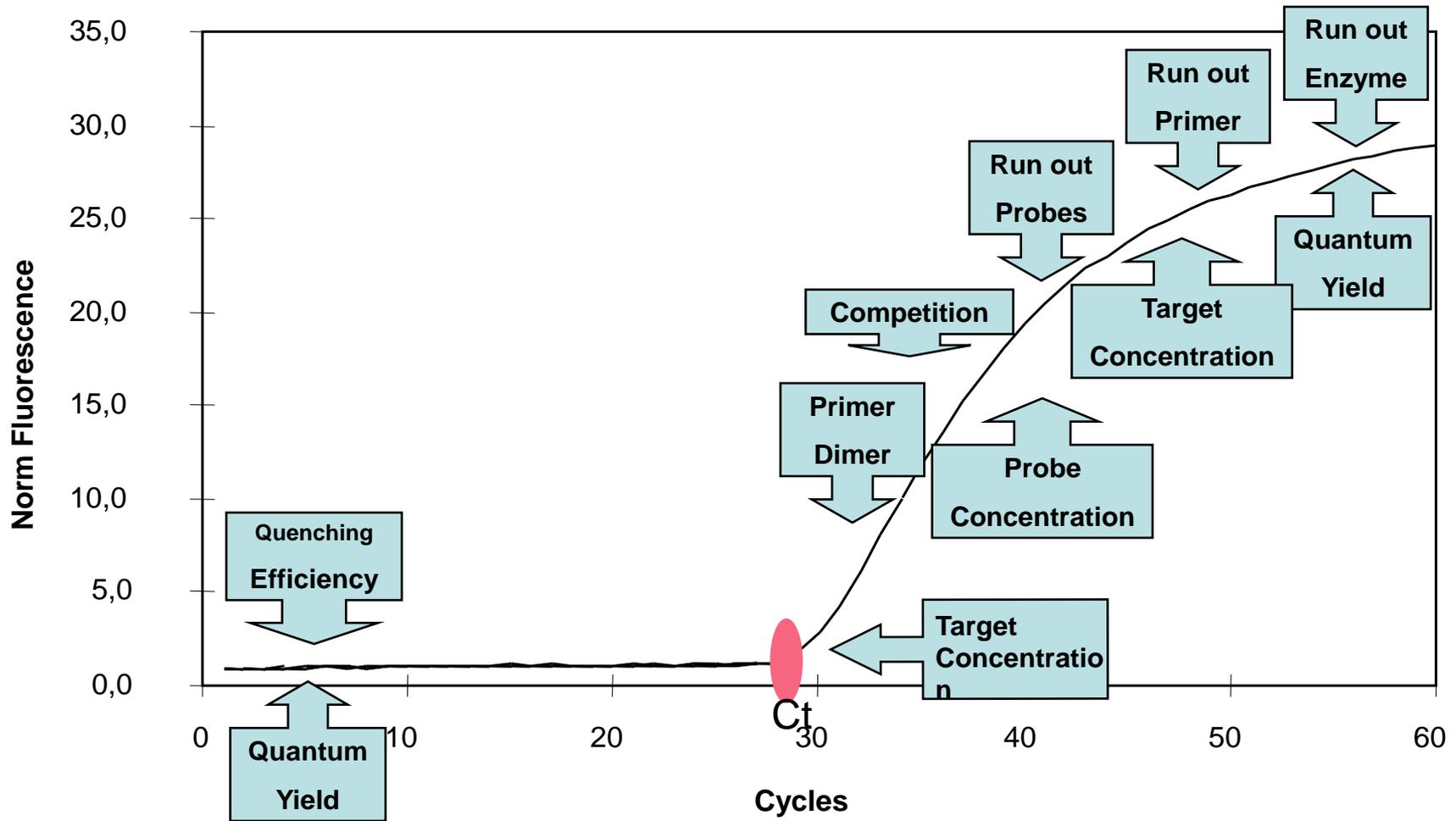
Real Time PCR



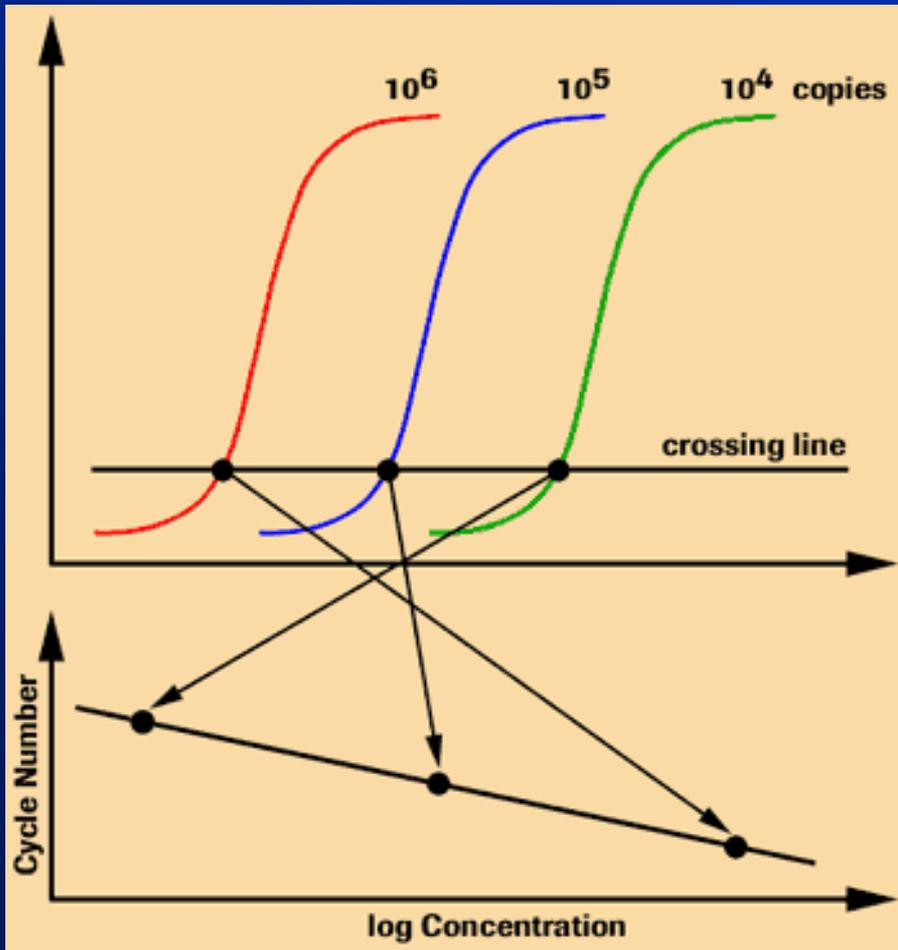
Ανίχνευση του σήματος φθορισμού

Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης, ορίζεται ως το «κατώφλι» μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (**Threshold Cycle ή C_T**), είναι στατιστικά σημαντική και ανιχνεύεται ως σήμα φθορισμού. Η μεταβολή αυτή της συγκέντρωσης γίνεται σε συγκεκριμένο κύκλο και εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του κάθε δείγματος.

Growth Curve Variation



Έννοια της καμπύλης αναφοράς με βάση την κινητική της αντίδρασης της PCR



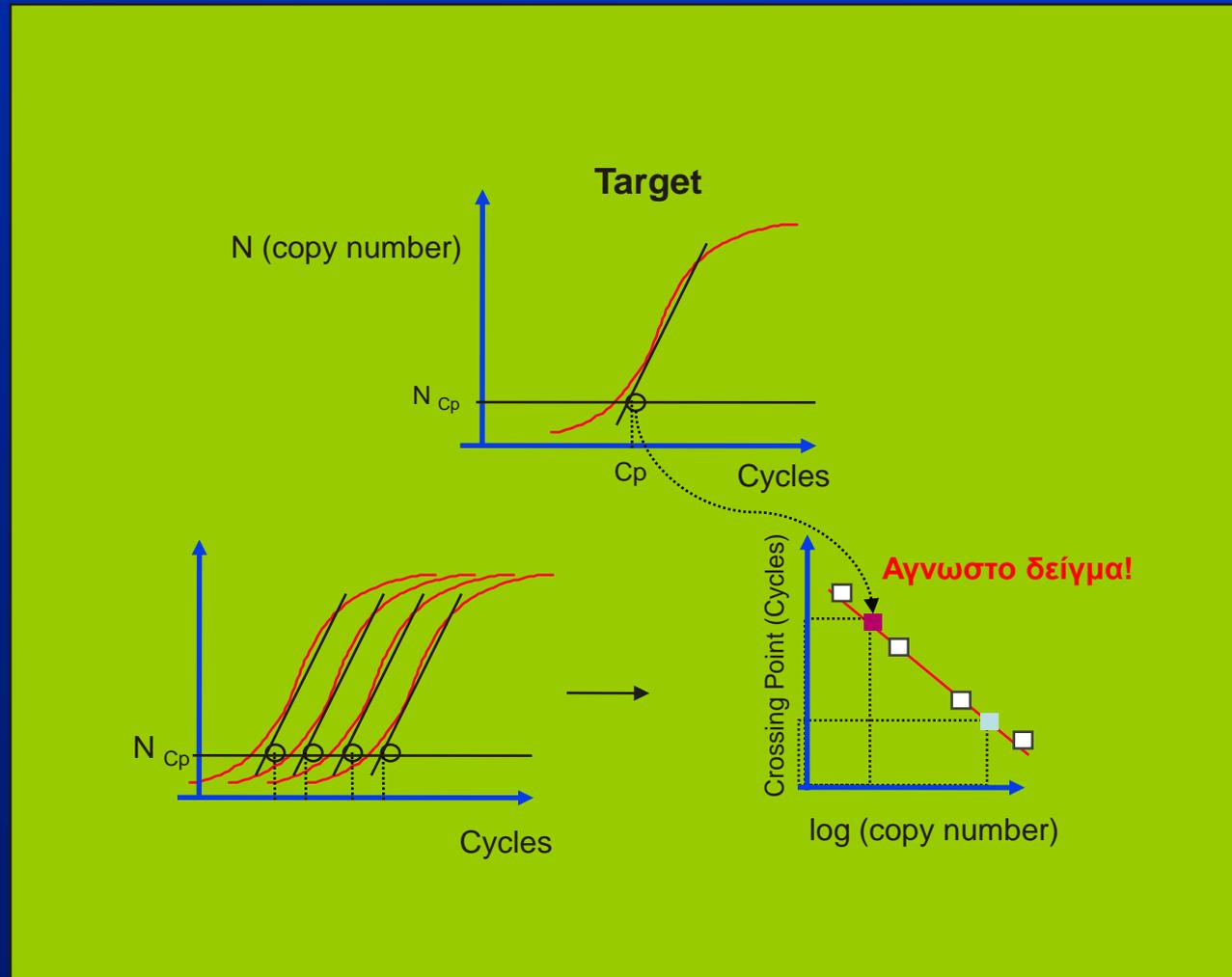
Παράδειγμα

Ενισχύουμε με την PCR τρία δείγματα συγκεντρώσεων, 10^6 , 10^5 και 10^4 αντιγράφων. Όπως αναμένεται, **όσο λιγότερα αντίγραφα περιέχονται στο δείγμα, τόσο περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για να εισέλθει η αντίδραση στην εκθετική της φάση και να ανιχνευθεί το παραγόμενο σήμα** που αντιστοιχεί στην μεταβολή του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Βασική Αρχή Ποσοτικοποίησης στο LightCycler

Άγνωστο
δείγμα

Καμπύλη
αναφοράς
(standard
curve)



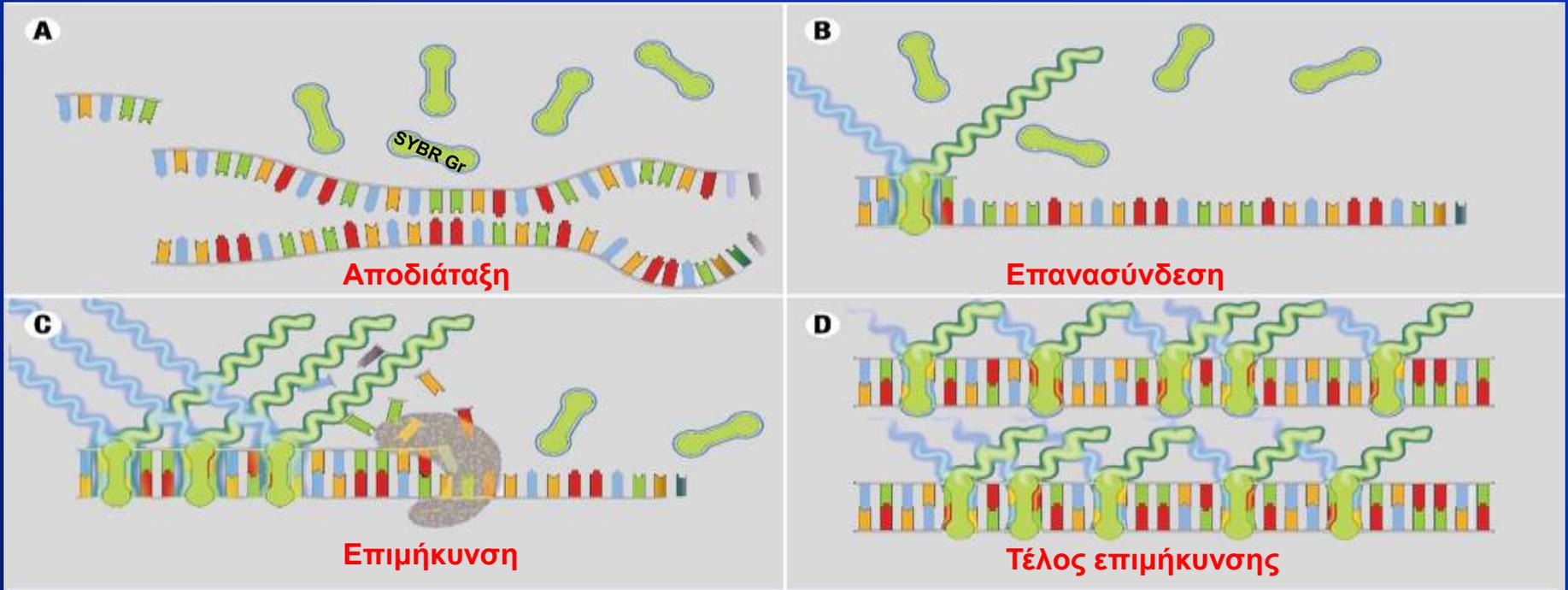
Real Time PCR

Όλα τα συστήματα real – time που ανιχνεύουν και αξιολογούν τα προϊόντα της PCR βασίζονται στην ανίχνευση φθοριζουσών χρωστικών και στη συσχέτιση της έντασης του παραγόμενου σήματος φθορισμού με την ποσότητα του προϊόντος της PCR στην αντίδραση.

Οι πλέον διαδεδομένες μέθοδοι real – time χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- 1) Sequence – independent detection assays
- 2) Sequence – specific probe binding assays

1. Sequence – independent detection assay (2 primers – 1 φθορίζουσα ελεύθερη ουσία)

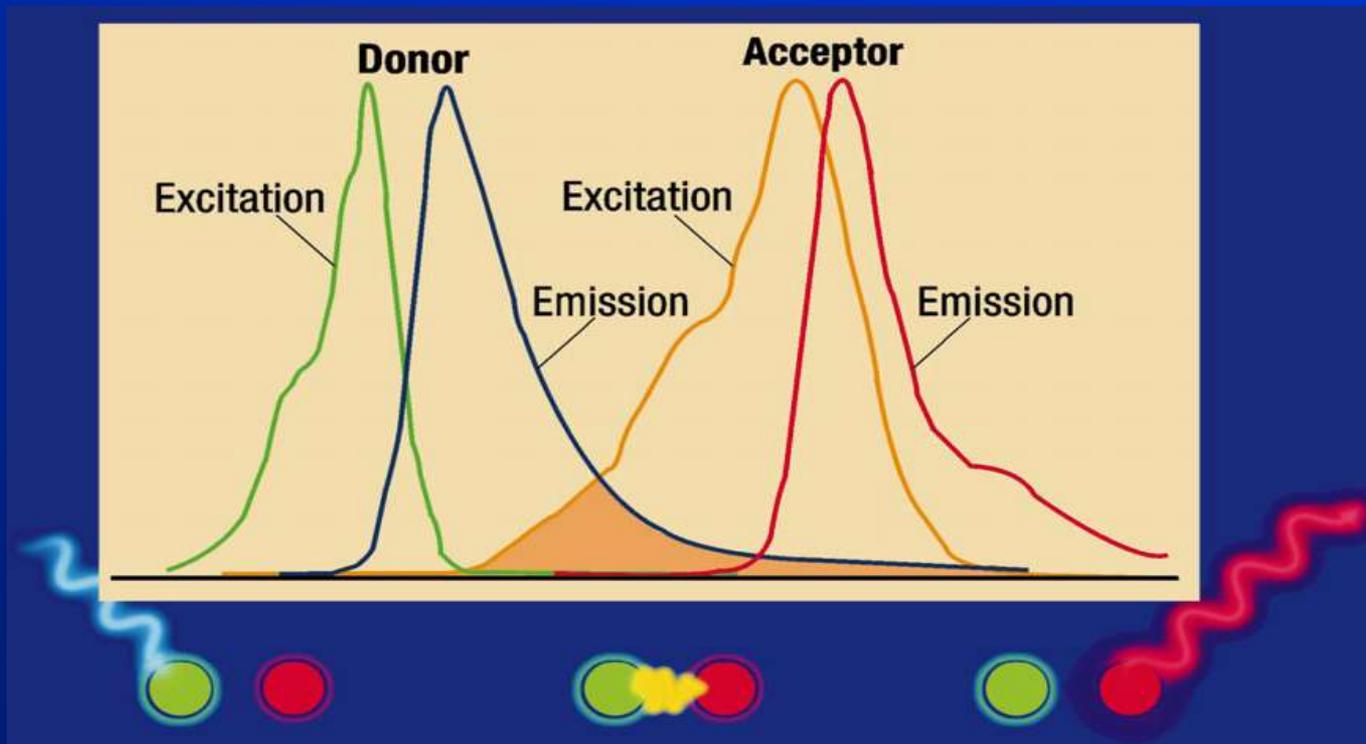


Βασίζεται στη χρήση μιας φθορίζουσας ουσίας (συνήθως SYBR Green I) που ενσωματώνεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA ανεξαρτήτων αλληλουχίας βάσεων. Η φθορίζουσα ουσία φθορίζει κατεξοχήν όταν ενσωματώνεται στο DNA ενώ πρακτικά δεν φθορίζει όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα της PCR.

2. Sequence – Specific Probe Binding Assays

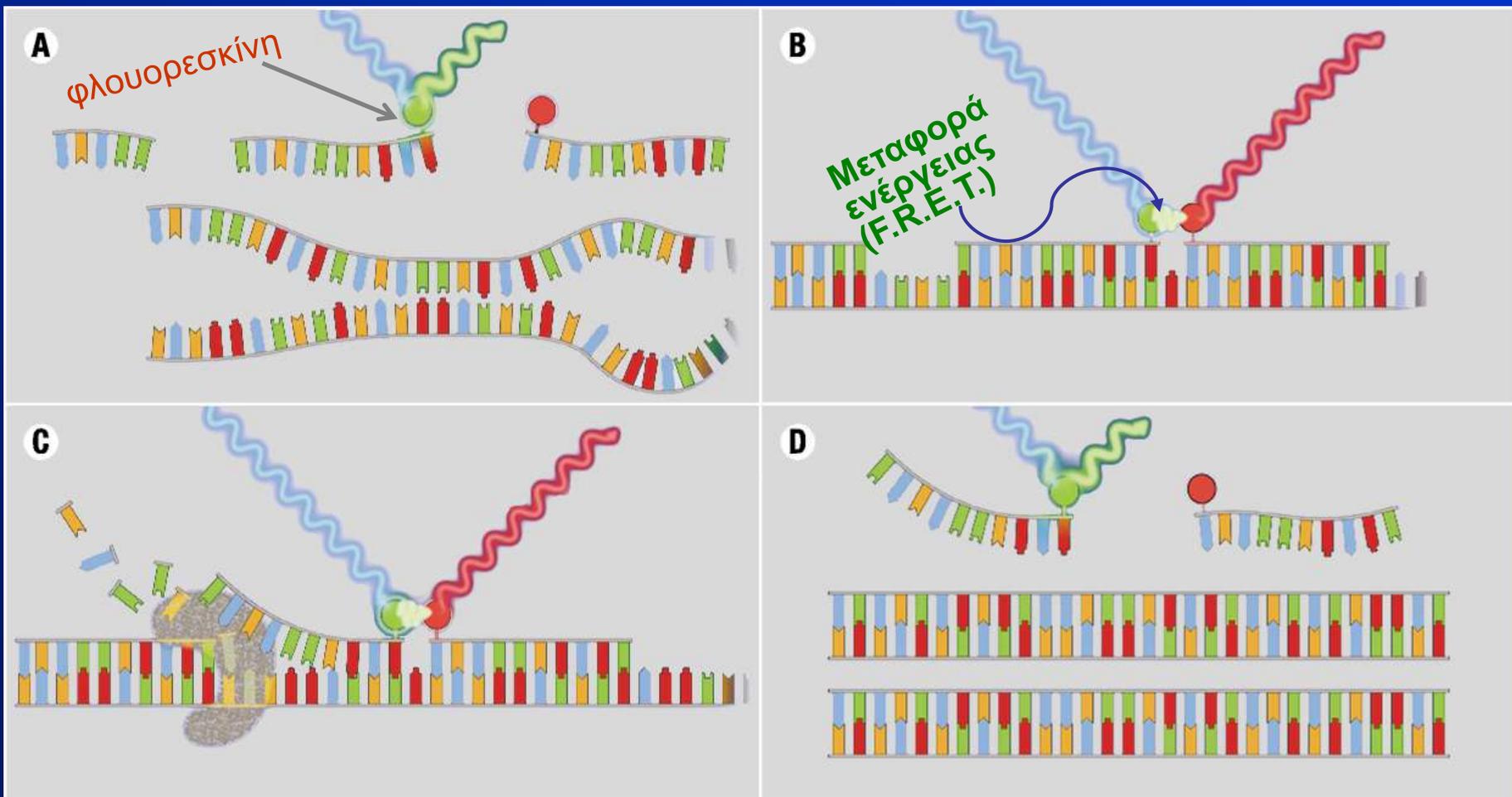
- Οι μεθοδολογίες βασίζονται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών που υβριδίζονται λόγω συμπληρωματικότητας των βάσεων τους με τον στόχο DNA, συνεπώς ανιχνεύουν μόνο το συγκεκριμένο προϊόν.
- Οι ανιχνευτές είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα που μας παρέχουν το σήμα της ανίχνευσης.
- Οι τεχνικές με χρήση σημασμένων ανιχνευτών υβριδισμού έχουν μεγάλη ειδικότητα
- Κύριοι αντιπρόσωποι
 - α) Hybridization probe assay (HybProbe probes)
 - β) Hydrolysis probe assay (TaqMan)

HYBRIDIZATION PROBE ASSAY



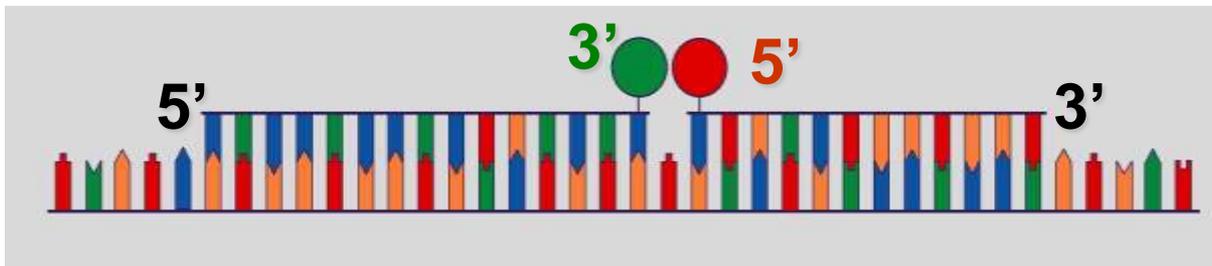
- Βασίζονται στην αρχή FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- Τα μόρια Donor και Acceptor πρέπει να είναι σε κοντινές θέσεις (απόσταση 1-5 βάσεις)
- Το φάσμα απορρόφησης του Acceptor πρέπει να επικαλύπτει το φάσμα εκπομπής του Donor

Η μεθοδολογία με Hybridization probes είναι κατάλληλη για ποσοτική και ποιοτική PCR καθώς και για ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων (SNP's).



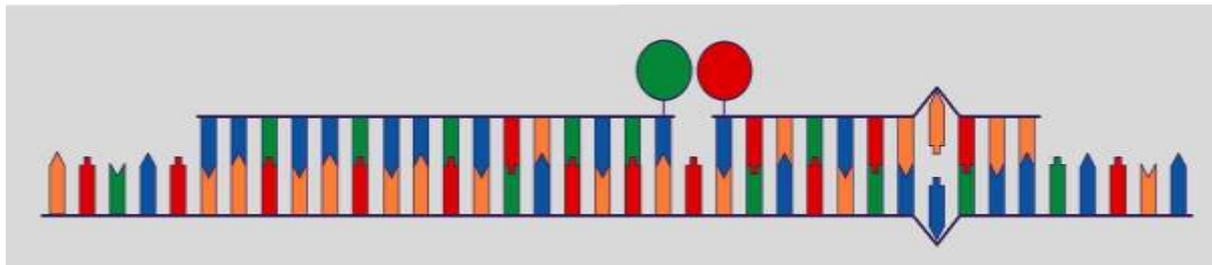
Ανίχνευση μεταλλάξεων, σχεδιασμός ανιχνευτών

Απόλυτη ομολογία (perfect match)



1) Το σημασμένο στο 5' άκρο probe πρέπει να είναι φωσφορυλιωμένο στο 3' άκρο για να μην γίνει επέκταση με την πολυμεράση.

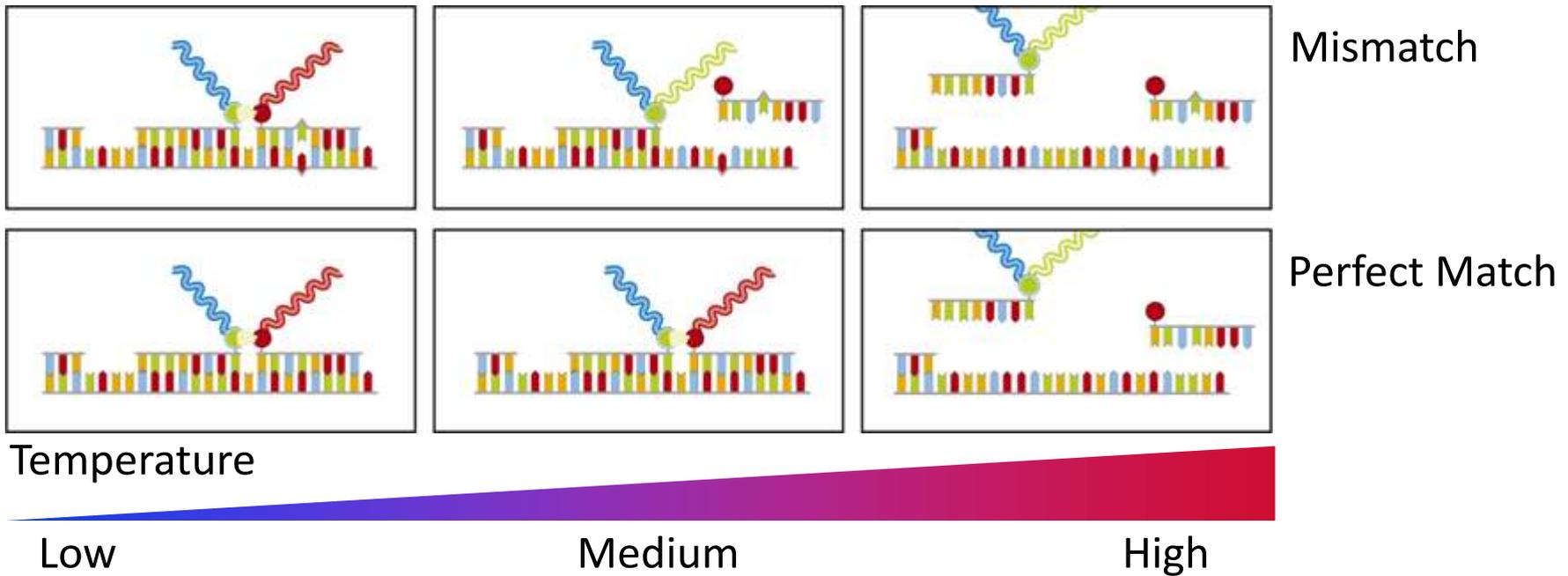
(mismatch)



Anchor Probe Mutation Probe

2) $T_m \text{ mut.probe} < T_m \text{ anchor probe}$

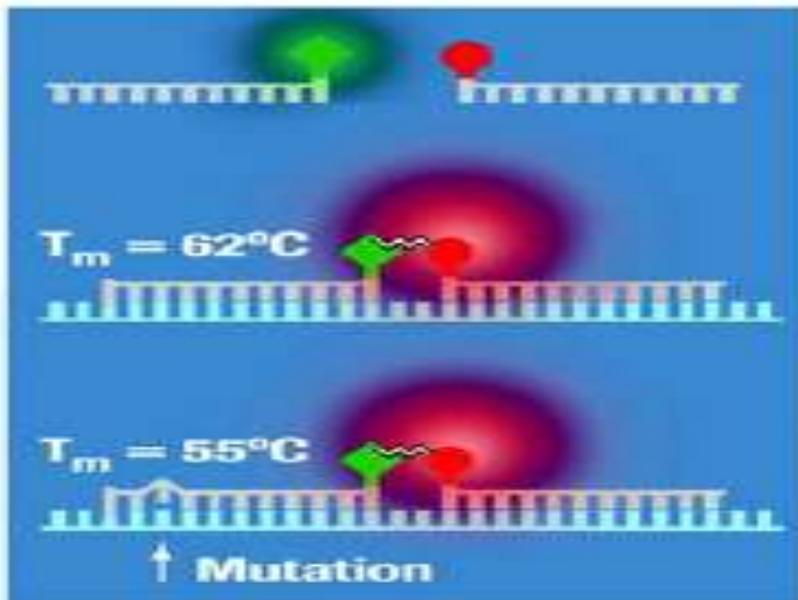
3) $T_m \text{ anchor probe} > T_m \text{ primers}$



- Υβριδισμός των ειδικών probe στον DNA στόχο.
- Ο φθορισμός ελαττώνεται όταν τα probe λόγω αύξησης της θερμοκρασίας απομακρύνονται από τη μήτρα DNA.
- Εάν υπάρχει αλλαγή σε μία βάση θα οδηγηθούμε σε θερμική αστάθεια του συμπλέγματος probe – target.
- Οι θερμοκρασίες αποδιάταξης των ανιχνευτών με τη μήτρα DNA θα είναι διαφορετικές εφόσον υπάρχει σημειακή μετάλλαξη.

Χαρακτηρισμός Βάσει T_m

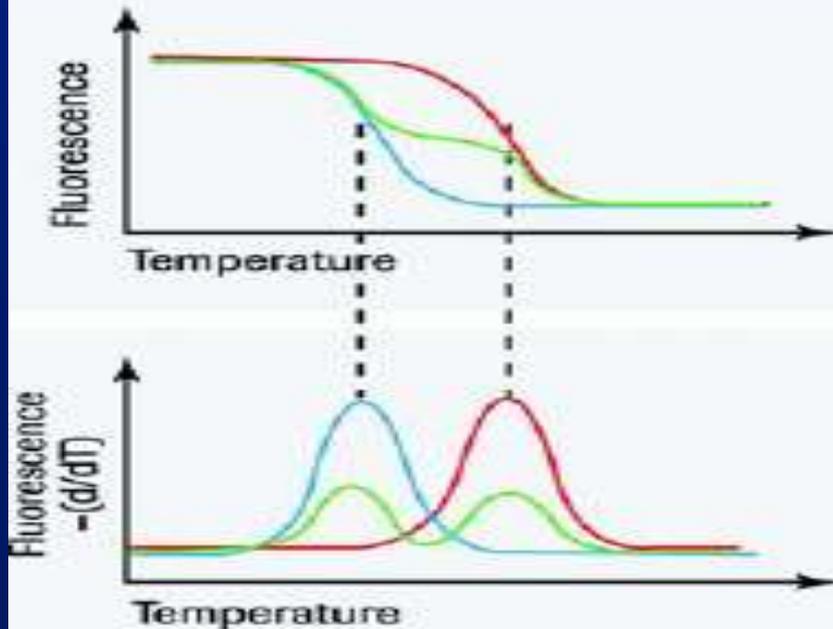
Wild Type – Mutant - Heterozygous



The melting temperature of each sample reveals its classification as a wild type, mutant, or heterozygote.

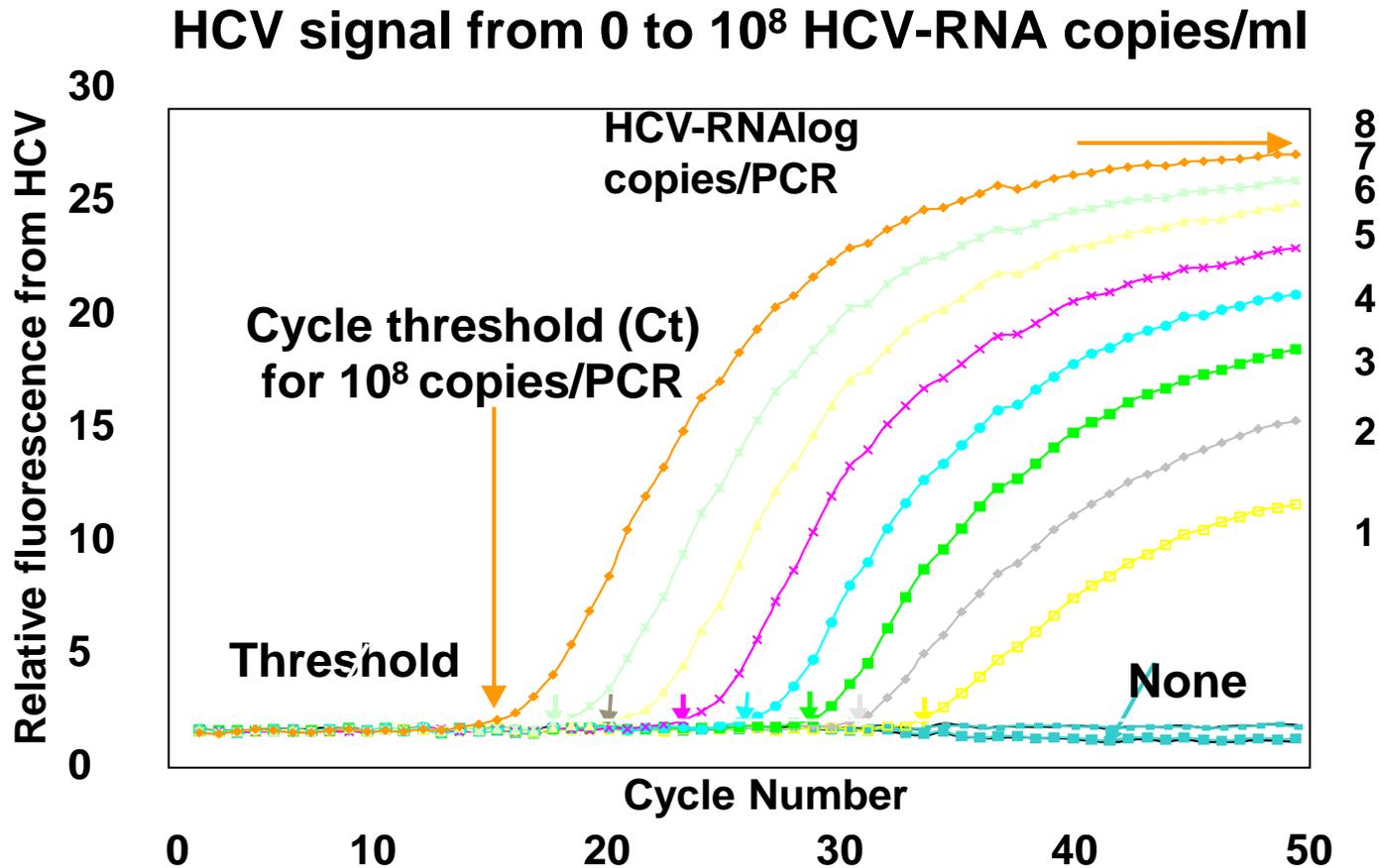
Sample profiles illustrate:

- ▶ a derivative peak at higher temperatures for the allele that is fully complementary to the sensor probe (e.g., a wild-type sequence)
- ▶ a peak at lower temperatures for mismatched alleles (e.g., mutant form), and
- ▶ both derivative peaks for a heterozygous sample



- homozygous wild-type sample
- homozygous mutant sample
- heterozygous sample

ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΗCV



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ PCR

- Ποσοτική μέτρηση RNA ή DNA
- Κλινική Μικροβιολογία
- Γενετική Διαγνωστική
- Ανάλυση Πληθυσμών
- Αρχαιολογία
- Ιατροδικαστική
- Κλωνοποίηση
- Χαρακτηρισμός αγνώστων μεταλλάξεων
- Πολλαπλασιασμός αγνώστων αλληλουχιών
- DNA sequencing
- Ανάλυση γενώματος

Μειονεκτήματα Μοριακών Τεχνικών

Πως η επιδημιολογία και το καλά οργανωμένο σύστημα υγείας δίνουν λύσεις σε κλινικά προβλήματα ?

ΣΟΥΗΔΙΑ

- Από το 1995 έως και το 2005 (10 έτη) οι στατιστικές ανά έτος εμφάνιζαν σταθερή αύξηση του ποσοστού χλαμυδιακών λοιμώξεων
 - Τα έτη 2005 – 2006 καταγράφεται αισθητή μείωση των χλαμυδιακών λοιμώξεων και μάλιστα στην πόλη Halland (290.000 κάτοικοι) η μείωση της συχνότητας έφτασε το 25%
 - Η πόλις Halland ήταν η πρώτη που υιοθέτησε μοριακές τεχνικές για ανίχνευση του *Chlamydia trachomatis* στο Νοσοκομείο της από το 1995 οι οποίες έως το 2006 συγκεκριμένη αλληλουχία DNA του κρυπτικού πλασμιδίου των Ct.
- (Abbott LCx – Roche Amplicor PCR – Abbott m200 real-time)

ΕΡΩΤΗΣΗ: ΓΙΑΤΙ ΕΠΕΛΕΞΑΝ ΤΟ ΚΡΥΠΤΙΚΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ ΩΣ ΣΤΟΧΟ ?

Η μείωση του επιπολασμού της
χλαμυδιακής λοίμωξης θα
μπορούσε να οφείλεται:

1. Πρόβλημα στην ποιότητα των
αντιδραστηρίων
2. Αλλαγή σεξουαλικών συνηθειών
3. Αλλαγή στον στόχο DNA του μικροβίου.

Η έρευνα αποκάλυψε μια απαλοιφή (deletion) 377bp στο κρυπτικό πλασμίδιο των χλαμυδίων με αποτέλεσμα θετικά δείγματα να χαρακτηρίζονται μέσω του μοριακού ελέγχου Αρνητικά (False negative)

Από το 2009 οι εταιρείες Roche – Abbott χρησιμοποιούν multiplex PCR (2 στόχων)

THE SWEDISH NEW VARIANT OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* (nvCT) REMAINS UNDETECTED BY MANY EUROPEAN LABORATORIES AS REVEALED IN THE RECENT PCR/NAT RING TRIAL ORGANISED BY INSTAND E.V., GERMANY

U Reischl (udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de)¹, E Straube², M Unemo³

1. Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University Hospital of Regensburg, Regensburg, Germany

2. Institute of Medical Microbiology, Friedrich-Schiller University, Jena, Germany

3. National Reference Laboratory for Pathogenic Neisseria, Department of Laboratory Medicine, Clinical Microbiology, Örebro University Hospital, Örebro, Sweden

In 2006, a new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) was identified in the Swedish county of Halland by Ripa and co-workers [1]. This mutant strain is characterised by a 377-bp deletion in ORF-1 of the multicopy cryptic plasmid, which includes the target region of both the Roche and Abbott *C. trachomatis* NAATs available at that time [2]. The currently available new redesigned dual-target assays, namely the Abbott RealTime CT/NG (CE mark-certified in January 2008) that targets another cryptic plasmid sequence in addition to the sequence affected by the nvCT deletion, and the Roche COBAS TaqMan CT v2.0 (CE mark-certified in June 2008) that detects the chromosomal *ompA* gene in addition to the sequence affected by the nvCT deletion, have replaced the former assays [3].

Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill.* 2006;11(45):pii=3076. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3076>

MICROARRAYS

Η χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος ($3,6 \times 10^9$ ζευγών βάσεων DNA) αποτελεί ένα τεράστιο επιστημονικό επίτευγμα.

Ο αριθμός των υπαρχόντων γονιδίων πριν την ολοκλήρωση του προγράμματος υπολογιζόταν σε 100.000 ενώ οι τελευταίες εκτιμήσεις κάνουν λόγο για 30.000 γονίδια.

- Το λεγόμενο «άχρηστο» DNA που έχει εξελικτικά συντηρηθεί πάρα πολύ καλά τι ρόλο διαδραματίζει; (ENCODE PROJECT)
- Από τα υπάρχοντα γονίδια ποια εκφράζονται σε κάθε κύτταρο, πότε θα εκφραστούν και κάτω από ποιες συνθήκες και προϋποθέσεις είναι ερωτήσεις προς απάντηση στο άμεσο μέλλον.
- Είναι γνωστό ότι ορισμένα γονίδια ενέχονται σε μια σειρά σοβαρών ασθενειών, όπως διάφοροι τύποι καρκίνου, διαβήτης, καρδιοπάθειες, σχιζοφρένεια. Ο τρόπος όμως έκφρασης και λειτουργίας αυτών με την έννοια της κατανόησης της βιολογίας και λειτουργίας των κυττάρων σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις παραμένει άγνωστος

MICROARRAYS

Η συνεργασία επιστημονικών κλάδων όπως της Ιατρικής – Χημείας – Βιοχημείας – Βιολογίας – Φυσικής και Βιοπληροφορικής ανοίγει νέες προοπτικές για τη:

Γενομική: (Genomics – κλάδος επιστήμης που μελετά το γονιδίωμα ως σύνολο) και την

Πρωτεομική: (Proteomics – κλάδος επιστήμης που μελετά το σύνολο των πρωτεϊνών).

Η σύζευξη γενετικής – γενομικής – πρωτεομικής θα βοηθήσει στη διαλεύκανση των βασικών μηχανισμών λειτουργίας του κυττάρου και των οργάνων, στη διερεύνηση της παθογένεσης των νόσων, κυρίως των πολυγονιδιακών, στην εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση τους αλλά και στη διαλεύκανση των μηχανισμών που οδηγούν στο γήρας.

Η χρήση των DNA microarrays που επιτρέπει την ταυτόχρονη άντληση πληροφοριών από εκατοντάδες έως χιλιάδες γονίδια σε ένα μόνο πείραμα είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την επίτευξη των ανωτέρω στόχων.

MICROARRAYS

Καθορισμένη συστοιχία νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών, μικρών μορίων, που επιτρέπει παράλληλη ανάλυση πολύπλοκων βιοχημικών δειγμάτων. (*Schena et. al., Science 270, 4670470; 1995*).

1. Laboratory Patrick Brown

Stanford University

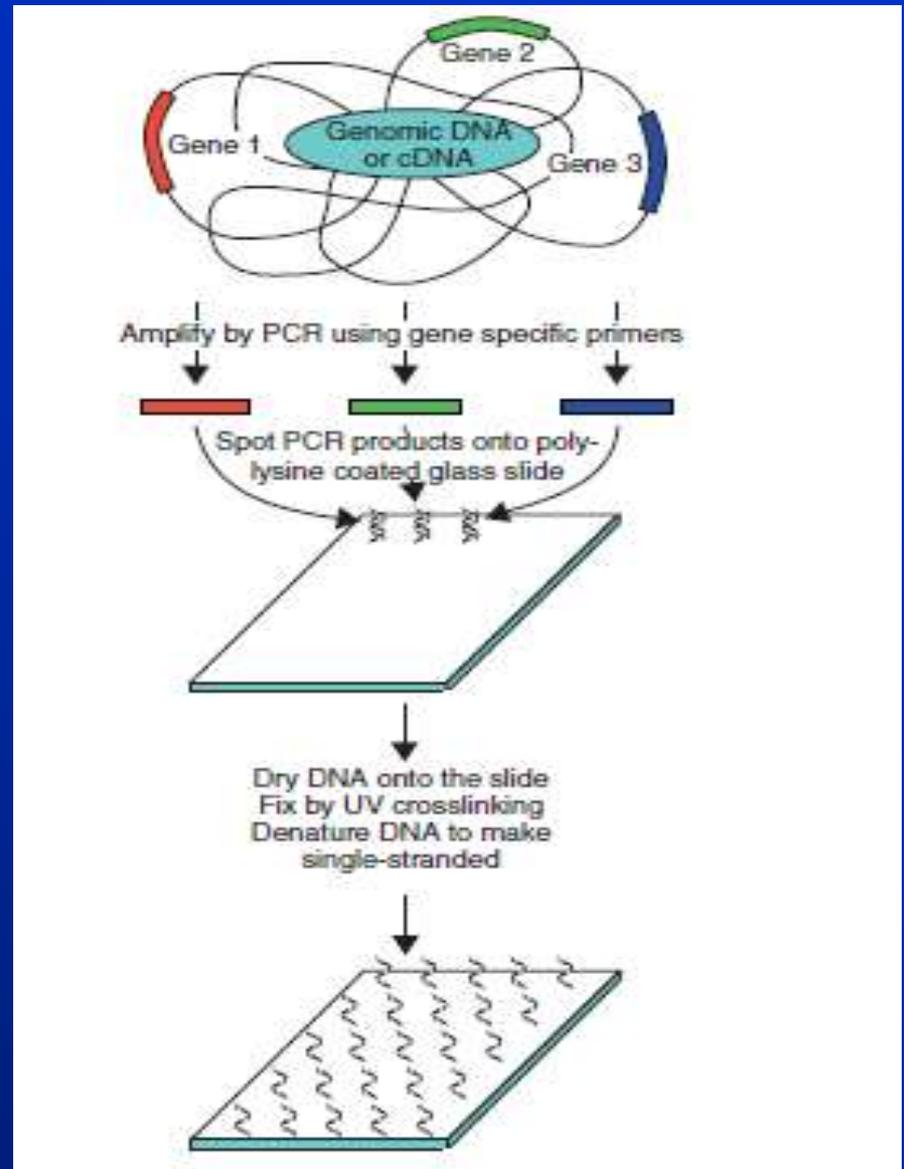
Yeast microchip

2. Μέθοδος Affymetrix

MICROARRAYS

1. Laboratory Patrick Brown Stanford University Yeast microchip

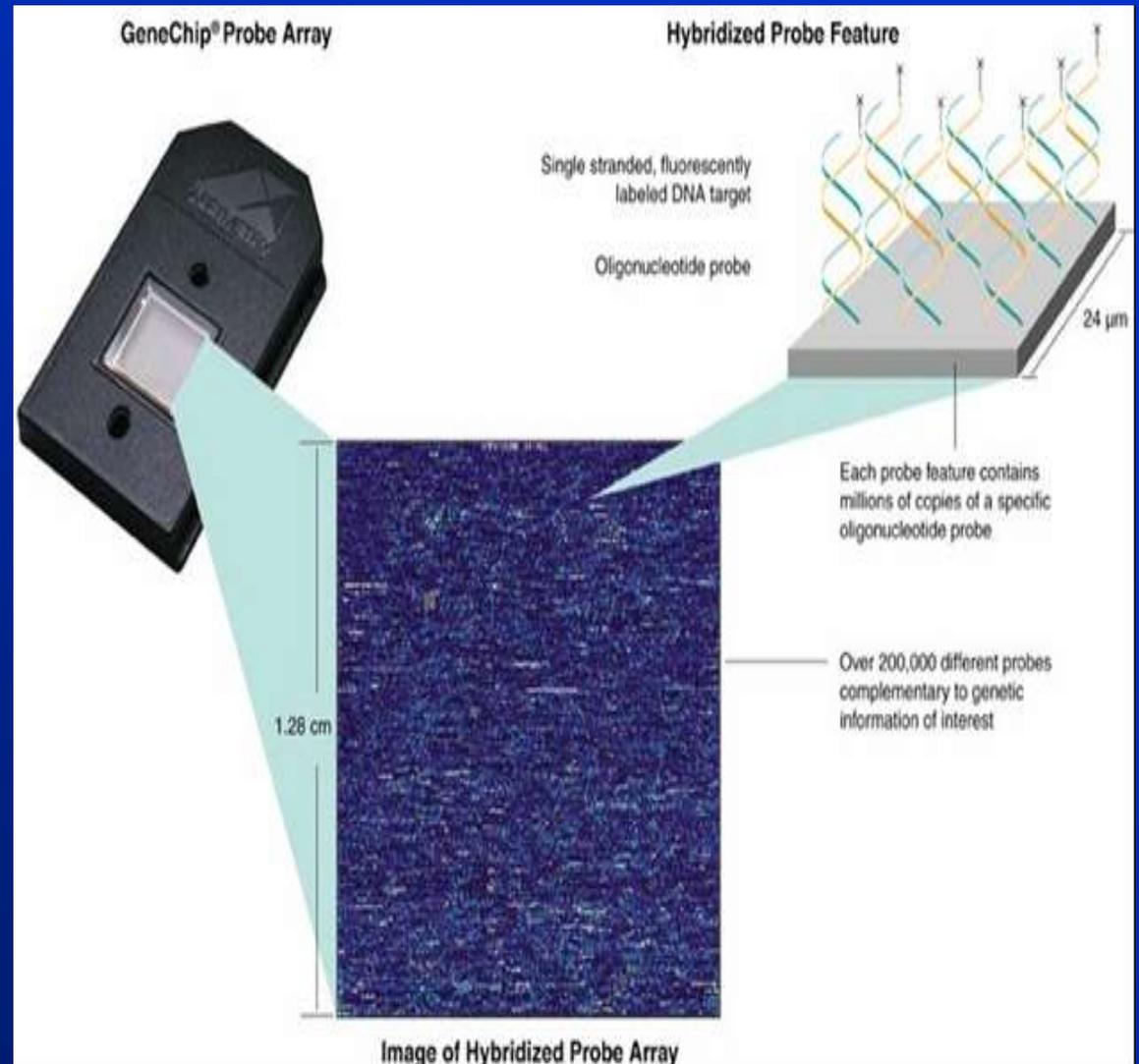
Πραγματοποίηση 6.116 PCR αντιδράσεων για πολλαπλασιασμό όλων των γονιδίων. Ρομποτική εγκατάσταση θραυσμάτων DNA, προϊόντων της PCR, χαρακτηριστικών κάθε γονιδίου σε υάλινη επιφάνεια 2cm^2 σε συγκεκριμένες θέσεις. Μήκος θραύσματος μονόκλωνου DNA 150-300 bp.



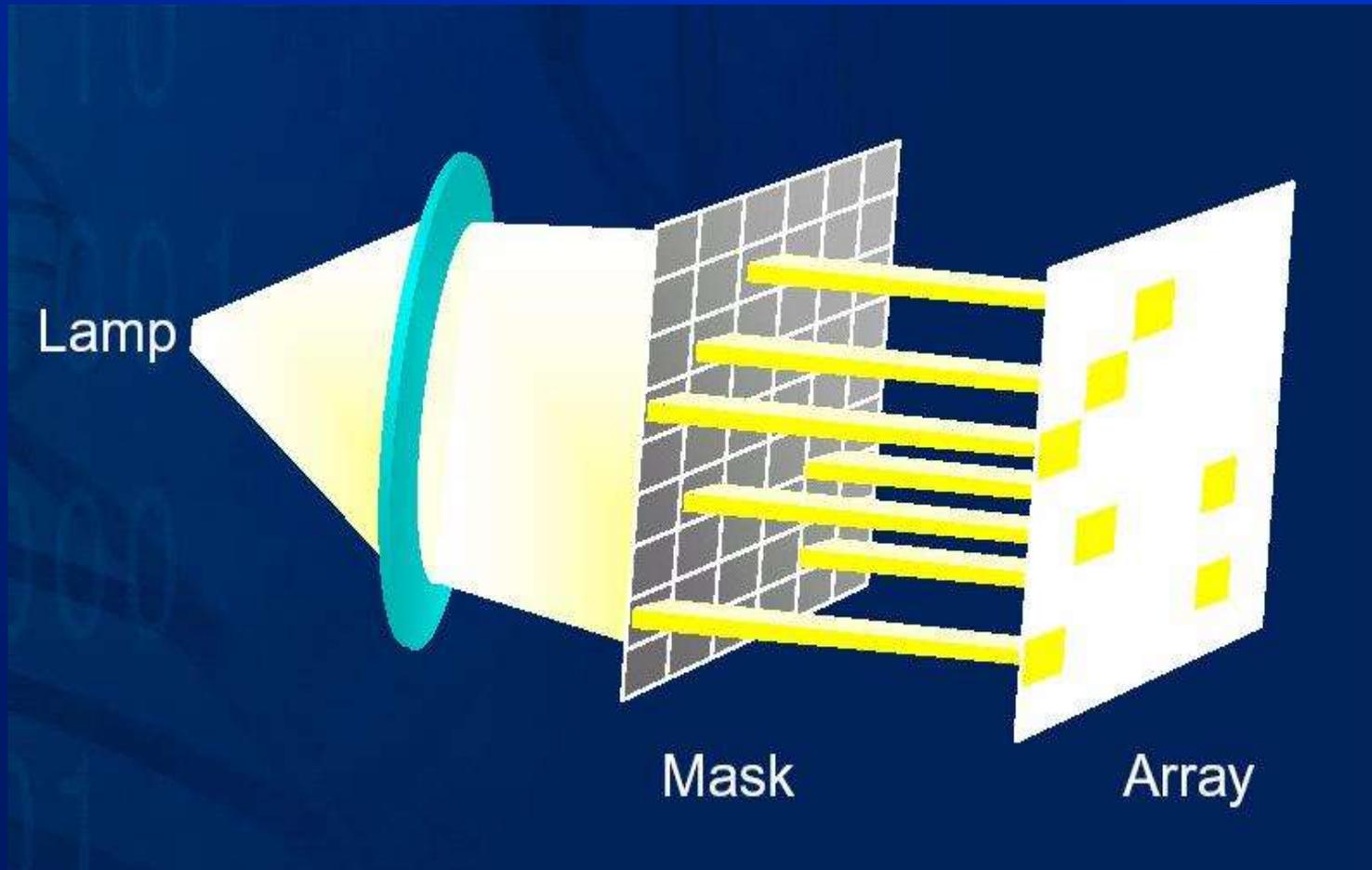
MICROARRAYS

2. Affymetrix

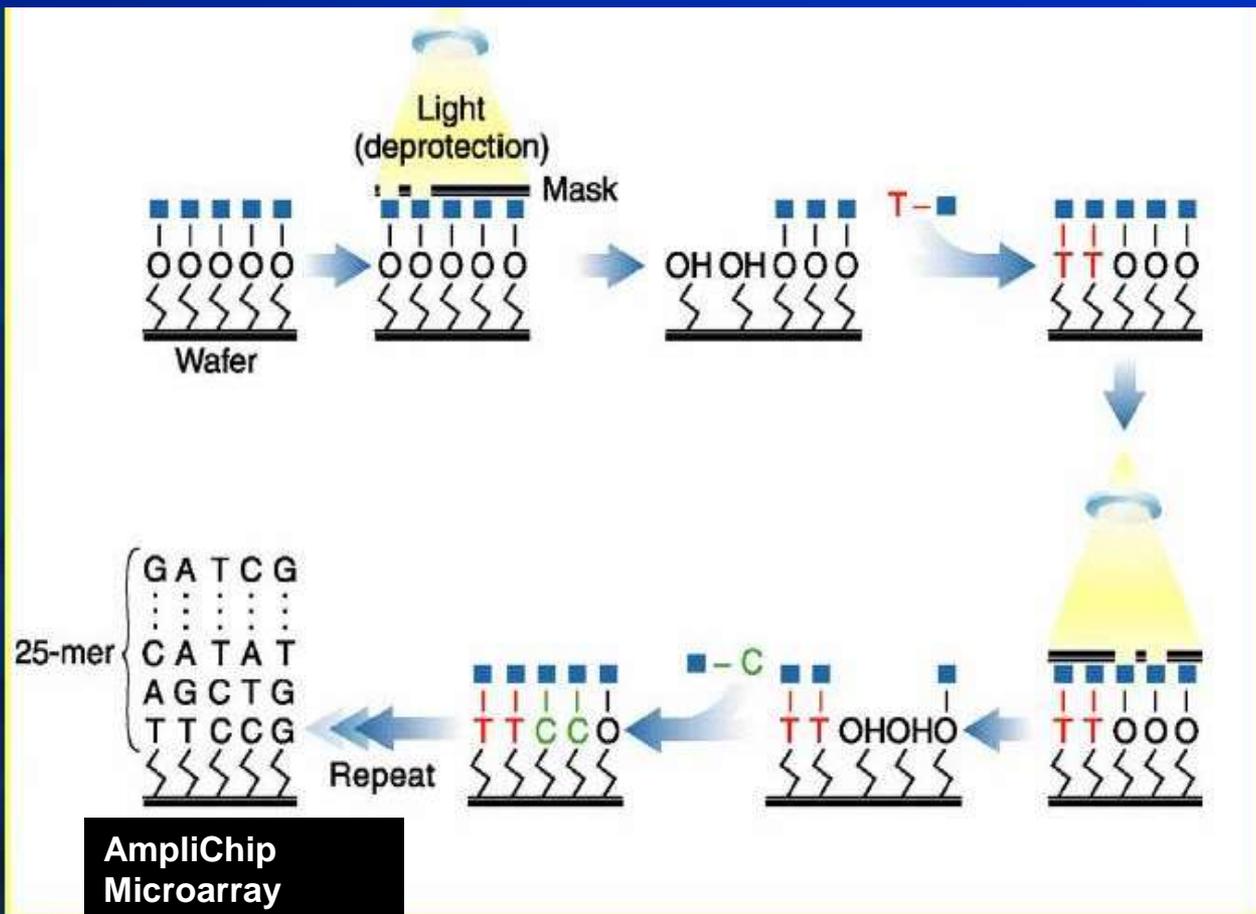
Προσκόλληση χημικά παρασκευασμένων ολιγονουκλεοτιδίων (25bp) με φωτολιθογραφική τεχνική σε συγκεκριμένες θέσεις σε chip σιλικόνης μεγέθους $1,28 \text{ cm}^2$



Κατασκευή microarrays με φωτολιθογραφική μέθοδο



Διαδικασία Κατασκευής: Ευαισθητοποίηση της περιοχής όπου μια νέα βάση προστίθεται



← Different masks are applied and a different base is added

DNA MICROARRAY

Chapter 3 The Experiment

We're going to use the power of genomics to answer a very important question:

"What's the difference between a healthy cell and a cancer cell?"



BACK

Select a New Chapter

NEXT

DNA MICROARRAY

The Experiment . . .



In this experiment, we will use a DNA microarray to compare the differences in gene expression levels between cancer cells and healthy cells.

The steps we'll follow are at the bottom of the screen. We'll highlight them as we go to track our progress.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY



Buffer Solution



Columns with Oligo-dT Beads



Solvent Solution



Green and Red Labeling Mix



Microarray Washing Solution

Microcentrifuge



Vortex



Scalpel



Sample Tubes



Pipettes, Pipetmen, and Tips



Microarray Scanner and Workstation



Now we can begin to answer our question:

"What's the difference between a healthy cell and a cancer cell?"

We'll answer this question by looking at gene expression, or which genes are "on" and "off" in cancer cells as compared to healthy cells. We will do this by measuring the types of mRNA found in both types of cells.

The first thing we need to do is find some cells!

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1. Collect Tissue

2. Isolate RNA

3. Isolate mRNA

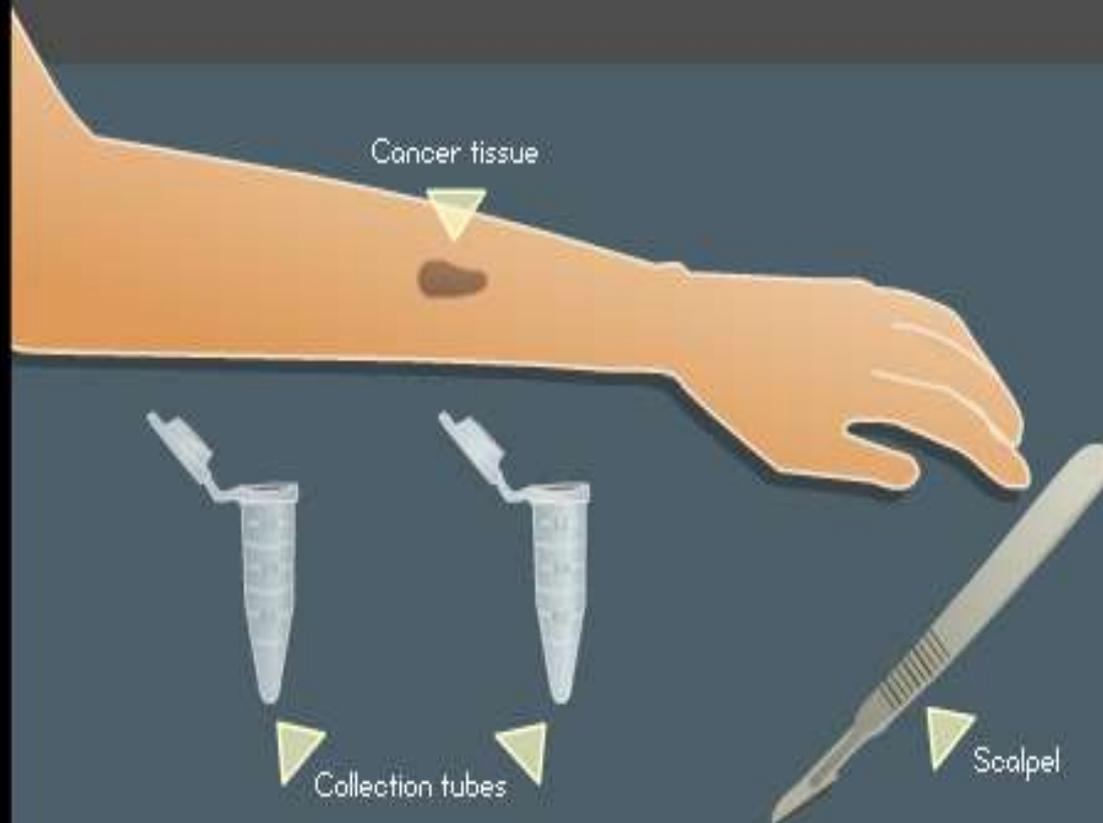
4. Make Labeled DNA Copy

5. Apply DNA

6. Scan Microarray

7. Analyze Data

DNA MICROARRAY



We will collect a healthy tissue sample and a cancer tissue sample from our patient. We will need a scalpel and two empty sample tubes.

Drag the scalpel over to the cancer tissue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

We can extract the RNA from both tissue samples by dissolving them in a mixture of various organic solvents. We can separate the DNA, proteins, and other cell components, leaving only RNA in solution.

Press NEXT to continue



Healthy



Cancer



BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

Next we will mix our tissue samples on the Vortex. As the vortex mixes the sample, the tissue will dissolve and the RNA will be released.

Place the tube containing the healthy tissue sample onto the vortex.



Healthy



Cancer



BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

Press the green button to turn the centrifuge on.



BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

6: Scan Microarray

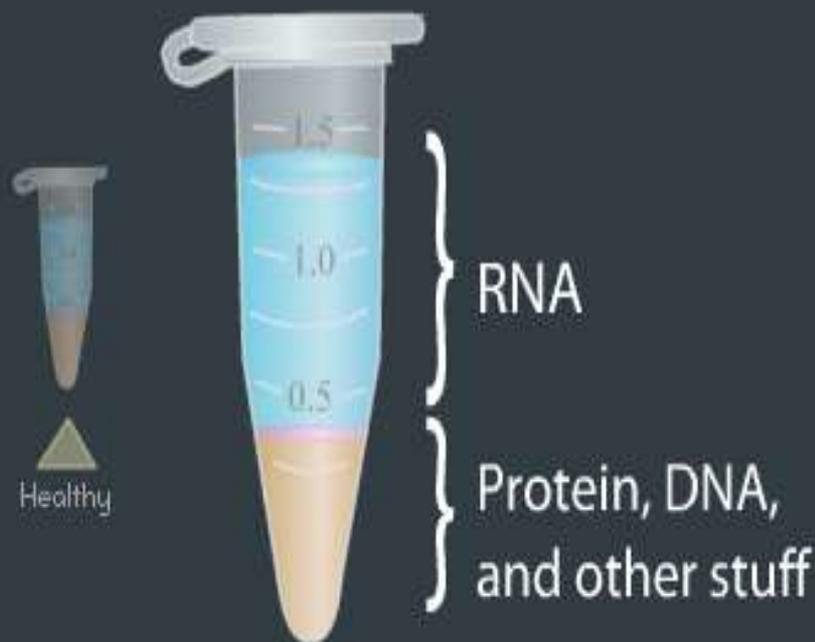
7: Analyze Data

DNA MICROARRAY



Why doesn't the DNA stay in solution?

Press NEXT to continue



BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

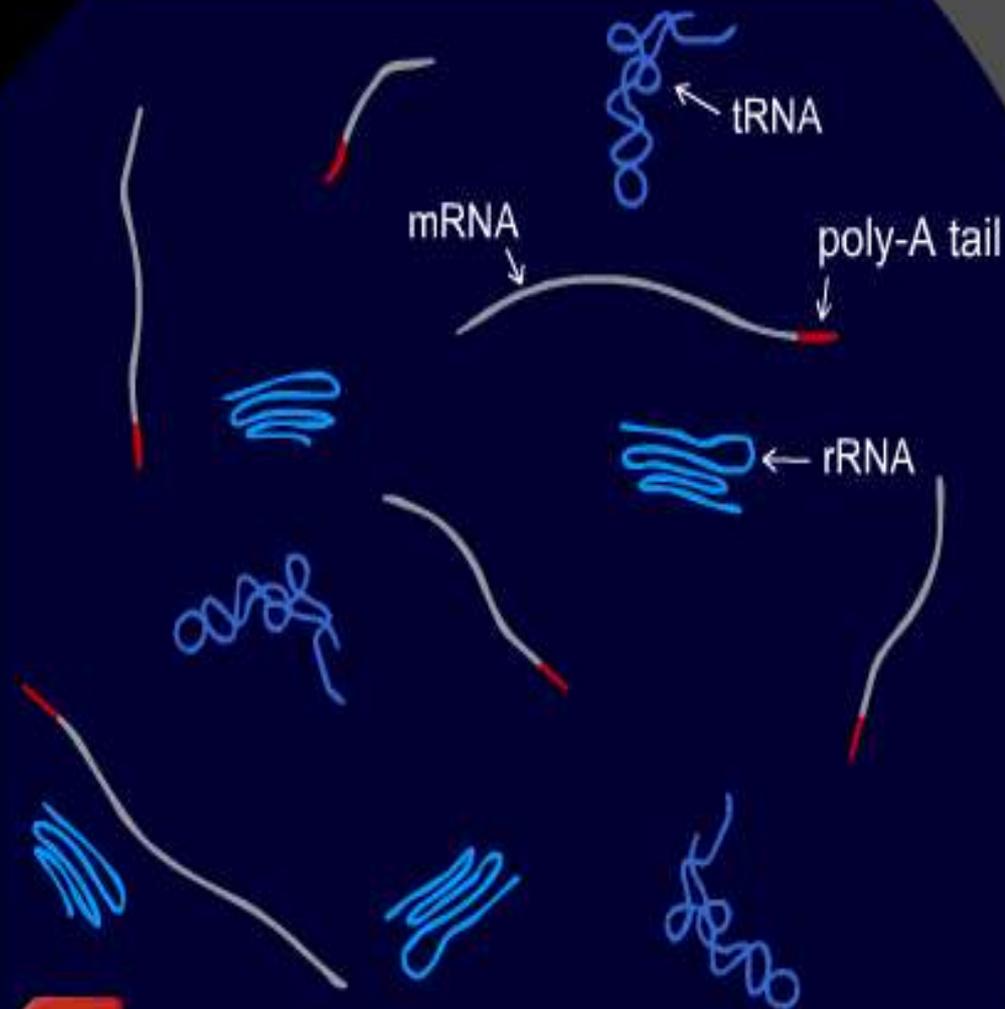
4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY



mRNA molecules, but not tRNA or rRNA, always end in a sequence of adenines, known as a "poly-A tail."

Only the mRNA reflects gene expression, so we'll save the mRNA and get rid of the others.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

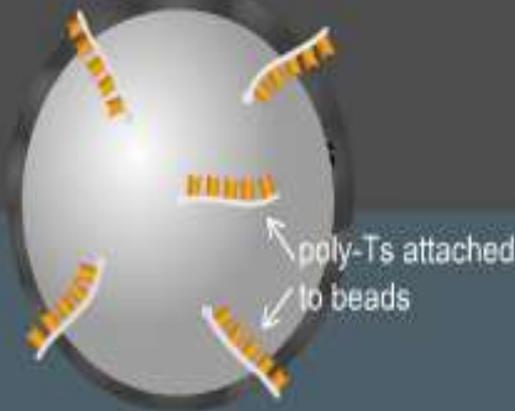
5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

Close-up of
a single bead



We will wash our RNA samples over columns filled with small beads that will only bind to RNA strands that have a poly-A tail. The other molecules will wash away.

Press NEXT to continue.



BACK

Select a New Chapter

NEXT

1. Collect Tissue

2. Isolate RNA

3. Isolate mRNA

4. Make Labeled DNA Copy

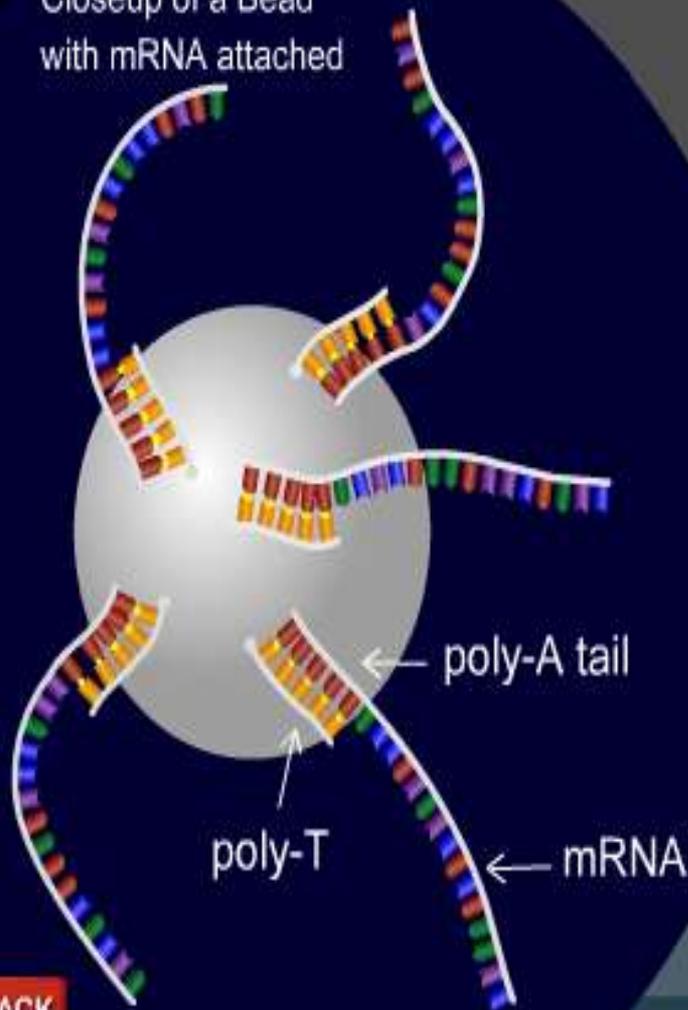
5. Apply DNA

6. Scan Microarray

7. Analyze Data

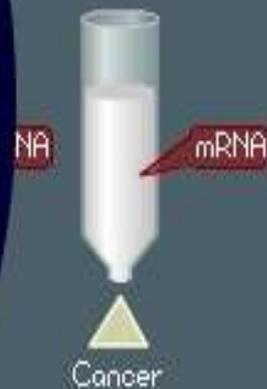
DNA MICROARRAY

Closeup of a Bead with mRNA attached



Our columns now contain strands of mRNA attached to the poly-T beads by their poly-A tails.

Press NEXT to continue.



BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

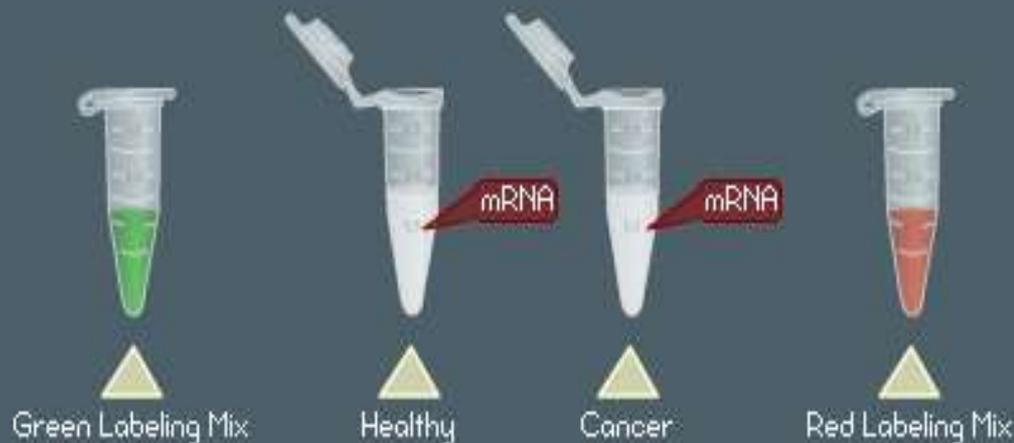
6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

Next we'll make a DNA copy of the RNA. As we do that, we'll give the DNA some color. We'll add some labeling mix to our two RNA samples. We'll use green labeling mix for the RNA from healthy cells. For the cancer cell RNA, we'll use a labeling mix containing a red fluorescent dye.

Press NEXT to continue.



BACK

Select a New Chapter

NEXT

1. Collect Tissue

2. Isolate RNA

3. Isolate mRNA

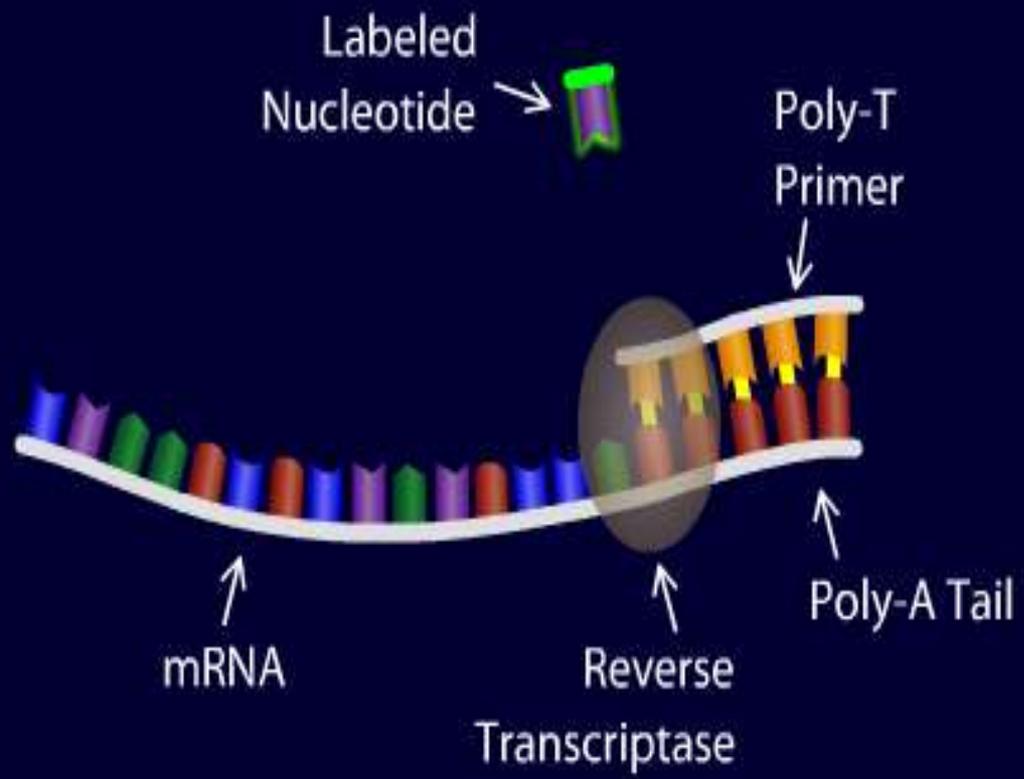
4. Make Labeled DNA Copy

5. Apply DNA

6. Scan Microarray

7. Analyze Data

DNA MICROARRAY



The labeling mix contains:

+ **Poly-T primers**, which bind to the poly-A tails on the mRNA (usually referred to by the scientific community as Oligo-dT primers)

+ **Reverse transcriptase**, an enzyme which will synthesize a strand of complementary DNA (cDNA)

+ **Labeled nucleotides**, which will be incorporated into the new cDNA molecule. The nucleotides in this tube have a green fluorescent molecule attached to them.

Press NEXT to continue.

BACK

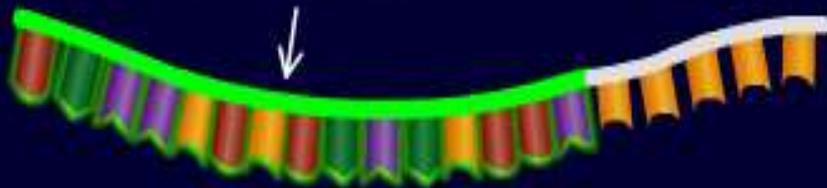
Select a New Chapter

NEXT

- 1: Collect Tissue
- 2: Isolate RNA
- 3: Isolate mRNA
- 4: Make Labeled DNA Copy
- 5: Apply DNA
- 6: Scan Microarray
- 7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

Labeled cDNA



Reverse transcriptase has assembled the labeled nucleotides into a cDNA molecule, and the mRNA molecule has been degraded.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1. Collect Tissue

2. Isolate RNA

3. Isolate mRNA

4. Make Labeled DNA Copy

5. Apply DNA

6. Scan Microarray

7. Analyze Data

DNA MICROARRAY



Healthy



Cancer

Good work! Our tubes no longer contain RNA, but now contain complementary DNA (cDNA). The healthy cell cDNA molecules are green, and the cancer cell cDNA molecules are red. This is what we will apply to our microarray.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1. Collect Tissue

2. Isolate RNA

3. Isolate mRNA

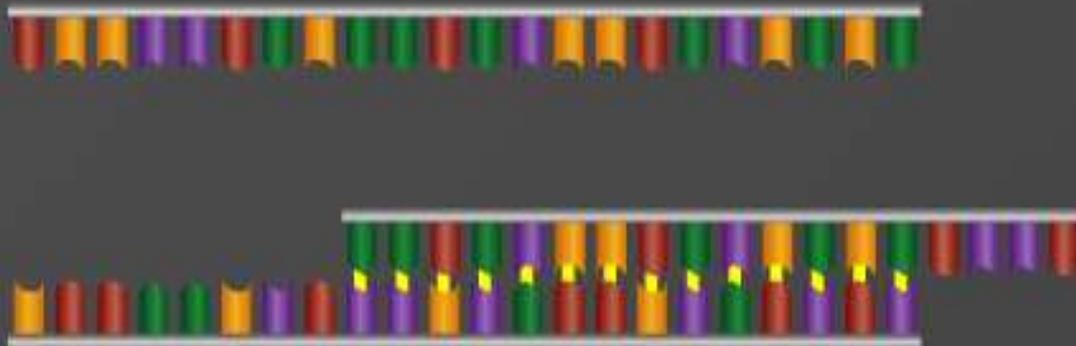
4. Make Labeled DNA Copy

5. Apply DNA

6. Scan Microarray

7. Analyze Data

DNA MICROARRAY



Two complementary DNA strands from different sources can pair with one another. This process is called HYBRIDIZATION.

For the next step in our experiment, we'll take advantage of a key property of DNA-- complementary base pairing. If two complementary DNA strands are mixed together, they will soon find and base pair with each other, reforming a double-stranded DNA molecule! It doesn't matter where they come from--they'll do that even if they were not originally paired. Scientists call this "hybridization", and it is the key to how DNA microarrays work.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1. Collect Tissue

2. Isolate RNA

3. Isolate mRNA

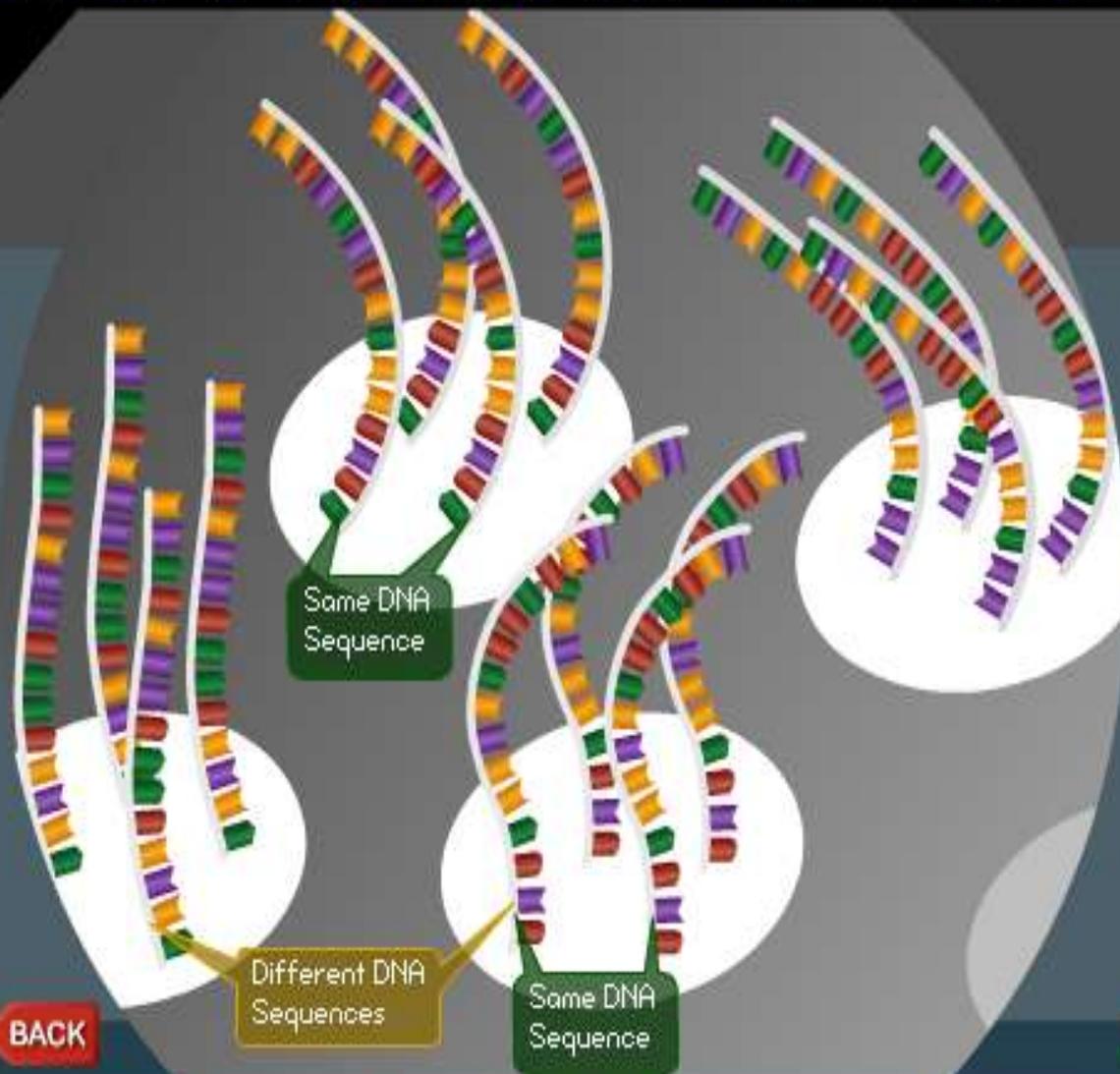
4. Make Labeled DNA Copy

5. Apply DNA

6. Scan Microarray

7. Analyze Data

DNA MICROARRAY



Stuck to our microarray are little piles of single-stranded DNA molecules. A single spot contains many identical copies of the same gene. And each spot on the microarray represents a different gene.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

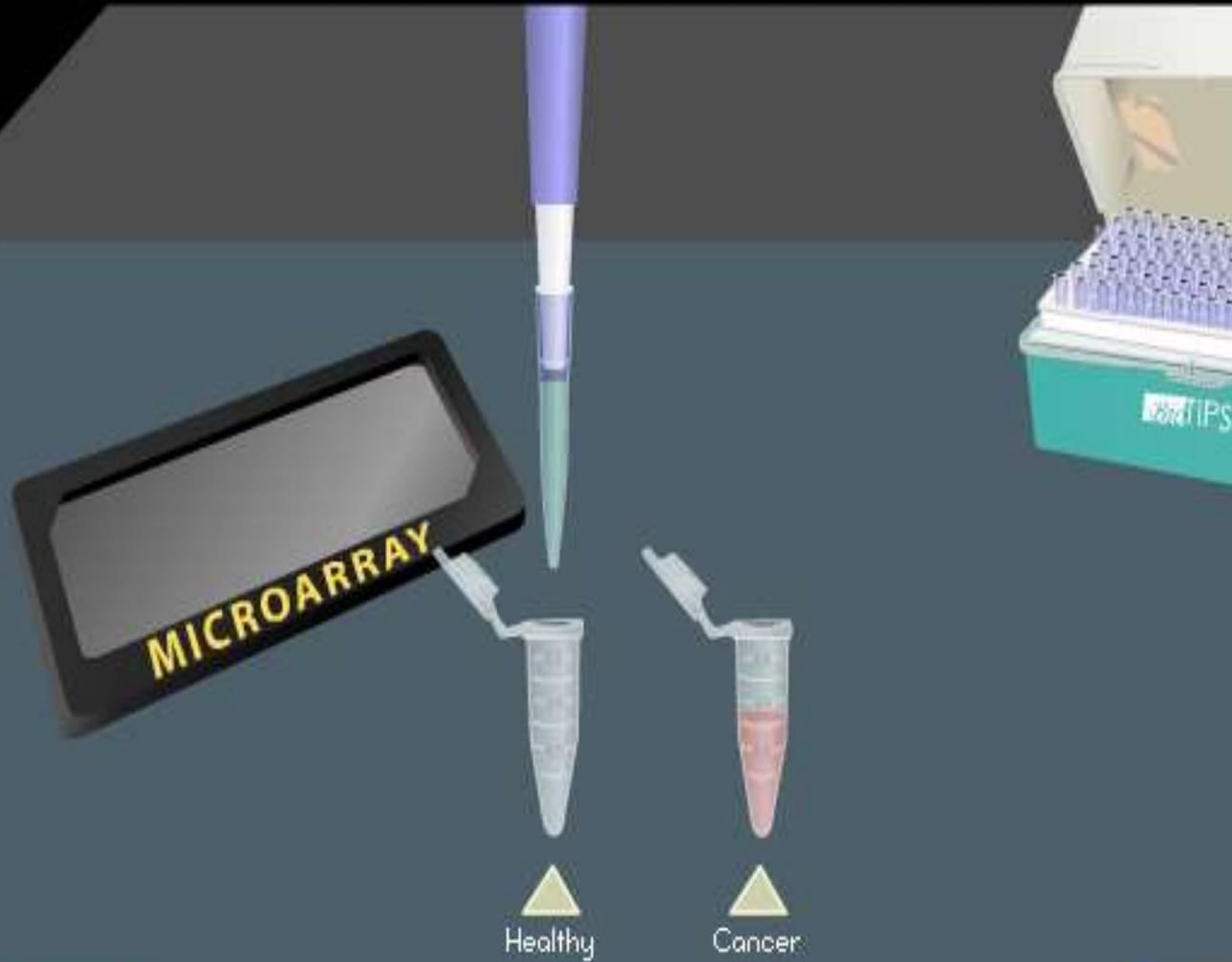
4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY



Now let's add the single-stranded cDNA we prepared from the healthy and cancer cells to our microarray. Remember that all the cDNA molecules in our tubes represent human genes, and for every molecule of cDNA there is a matching spot of single-stranded DNA on the microarray.

Pipette the Healthy cDNA sample onto the microarray.

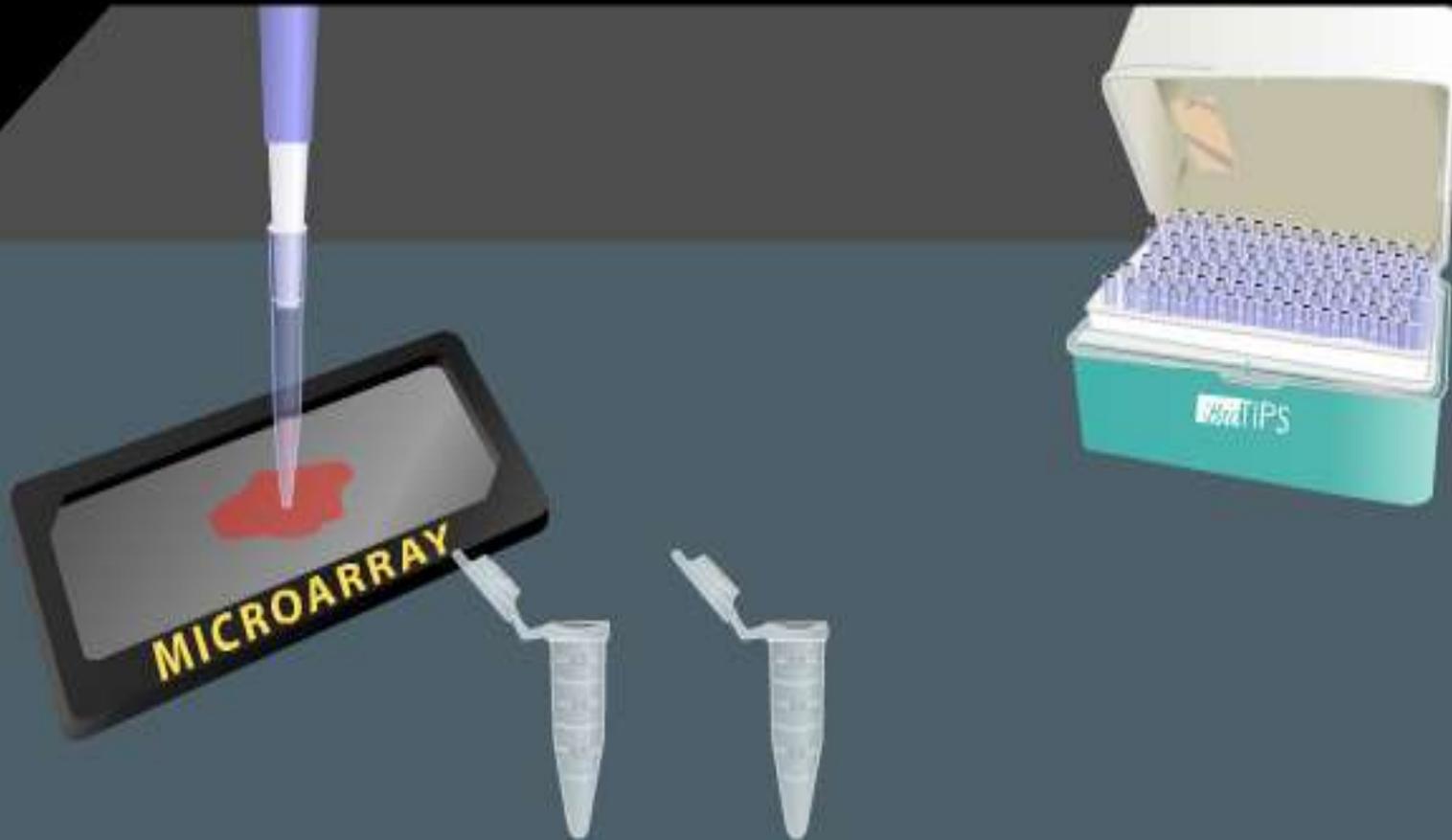
BACK

Select a New Chapter

NEXT

- 1: Collect Tissue
- 2: Isolate RNA
- 3: Isolate mRNA
- 4: Make Labeled DNA Copy
- 5: Apply DNA
- 6: Scan Microarray
- 7: Analyze Data

DNA MICROARRAY



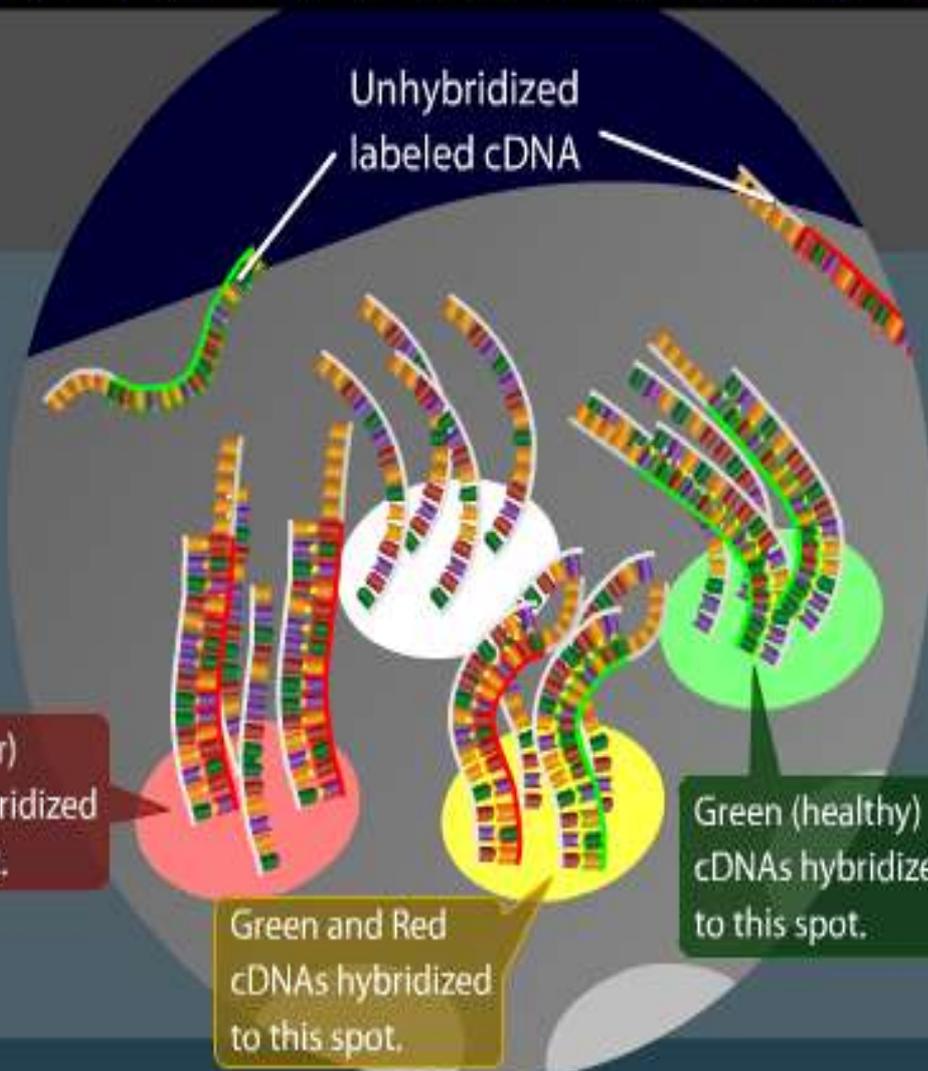
BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue 2: Isolate RNA 3: Isolate mRNA 4: Make Labeled DNA Copy 5: Apply DNA 6: Scan Microarray 7: Analyze Data

DNA MICROARRAY



Let's take a closer look at what's happening on the surface of the slide.

Most of the cDNA molecules have hybridized to their complementary DNA strands on the microarray. A few stray cDNA molecules did not hybridize.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

- 1: Collect Tissue
- 2: Isolate RNA
- 3: Isolate mRNA
- 4: Make Labeled DNA Copy
- 5: Apply DNA
- 6: Scan Microarray
- 7: Analyze Data

DNA MICROARRAY



BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY



BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY



Many of the spots are green! --
But not every spot. The dark spots
are genes that were not
transcribed in the healthy cells.
Remember, not every gene gets
expressed in every cell type.

Press NEXT to continue.

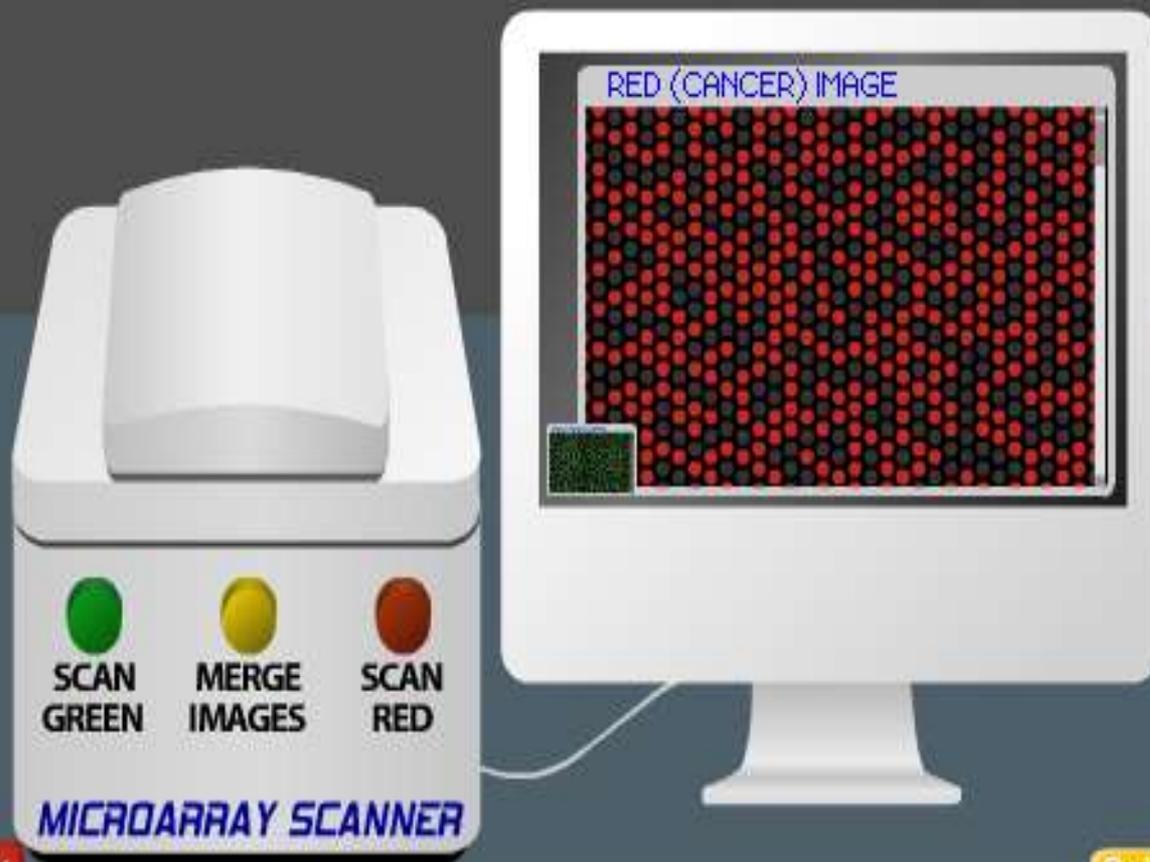
BACK

Select a New Chapter

NEXT

- 1: Collect Tissue
- 2: Isolate RNA
- 3: Isolate mRNA
- 4: Make Labeled DNA Copy
- 5: Apply DNA
- 6: Scan Microarray
- 7: Analyze Data

DNA MICROARRAY



Lots of spots again, just as for the green genes. But the red pattern looks different. It's clear that skin cancer cells and healthy skin cells have different gene expression patterns. But how can we sort through all this data to make sense of it?

The microarray scanner can merge the red image with the green image and display the composite picture.

Press the MERGE IMAGES button.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1. Collect Tissue

2. Isolate RNA

3. Isolate mRNA

4. Make Labeled DNA Copy

5. Apply DNA

6. Scan Microarray

7. Analyze Data

DNA MICROARRAY



How do colorblind people see microarray data?



Here are the red and green spots, merged together. Any spot that contains both red and green cDNA shows up as yellow. A yellow spot contains a gene that hybridized to both green and red cDNA, which means that that gene was expressed both in cancer cells and healthy cells.

Genes that show up as yellow spots probably aren't very interesting to us, since their activity doesn't change when the cell becomes cancerous.

But look at all the red spots and all the green spots!

Press NEXT to continue.

BACK

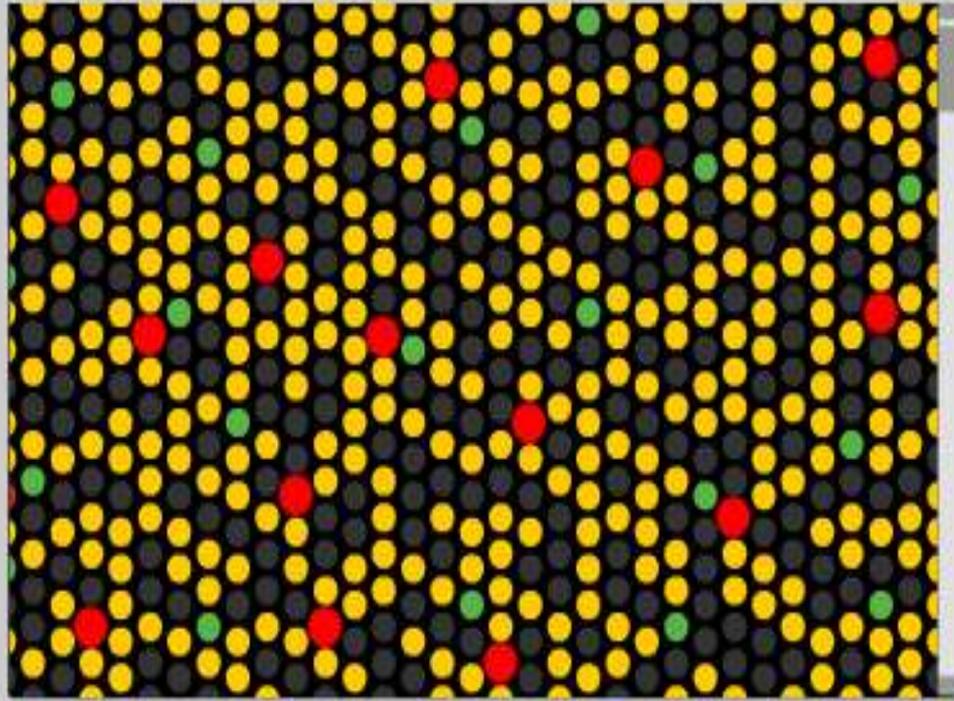
Select a New Chapter

NEXT

- 1: Collect Tissue
- 2: Isolate RNA
- 3: Isolate mRNA
- 4: Make Labeled DNA Copy
- 5: Apply DNA
- 6: Scan Microarray
- 7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

MERGED IMAGE



Red spots show genes that produce more mRNA in the cancer cells than in healthy cells -- they're "turned up" in cancer.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

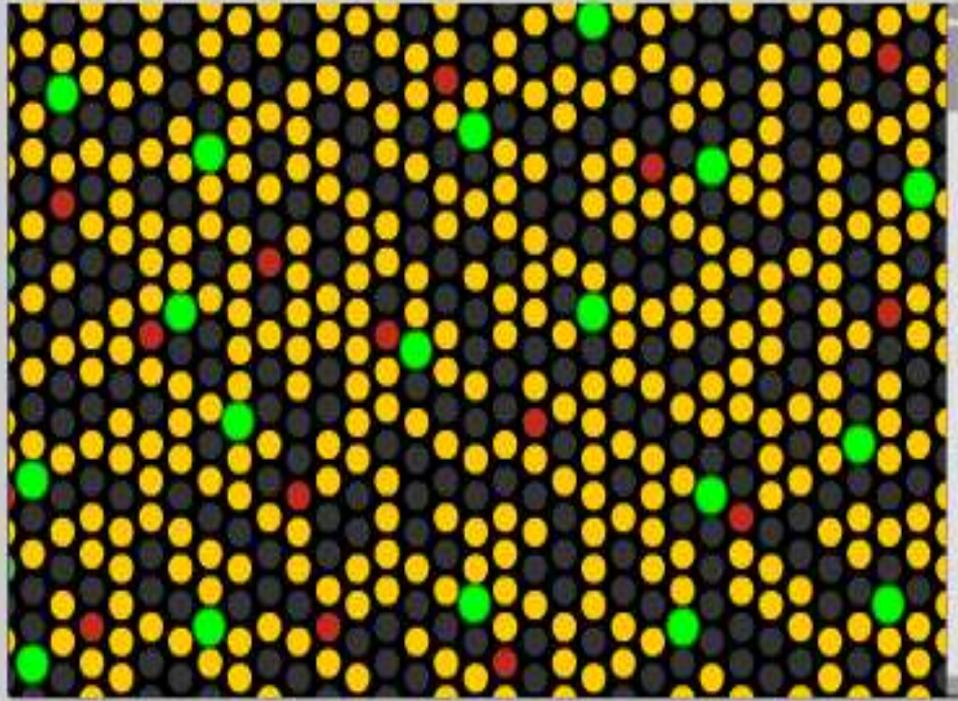
5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

MERGED IMAGE



Green spots show genes whose expression is "turned down" in cancer cells.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

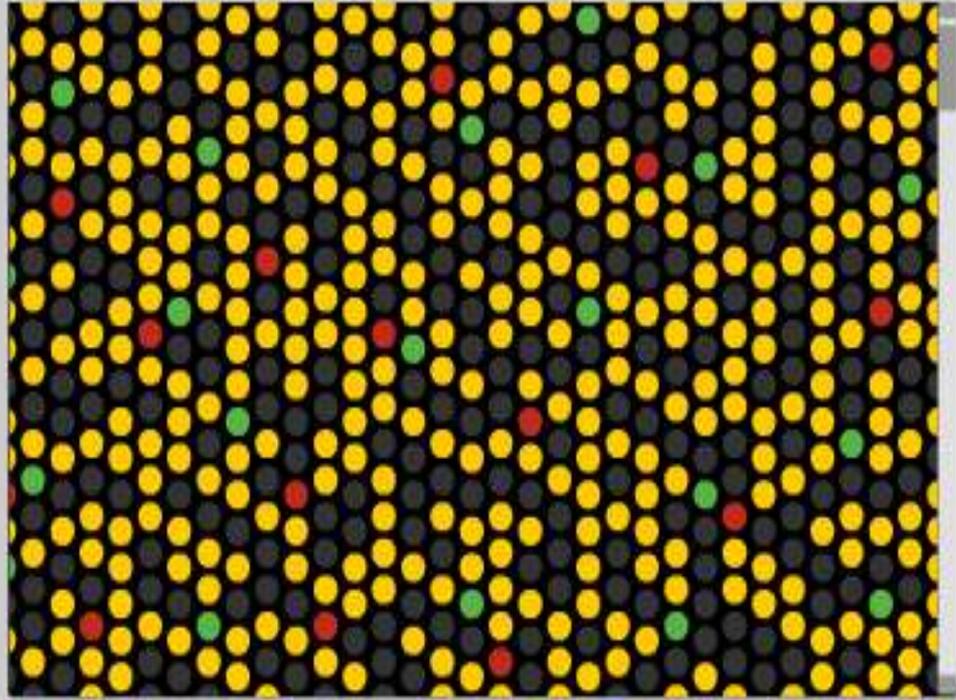
5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

MERGED IMAGE



You are a researcher interested in studying genes that have an increased level of activity in skin cancer cells. What color spots should you choose to study?



BACK

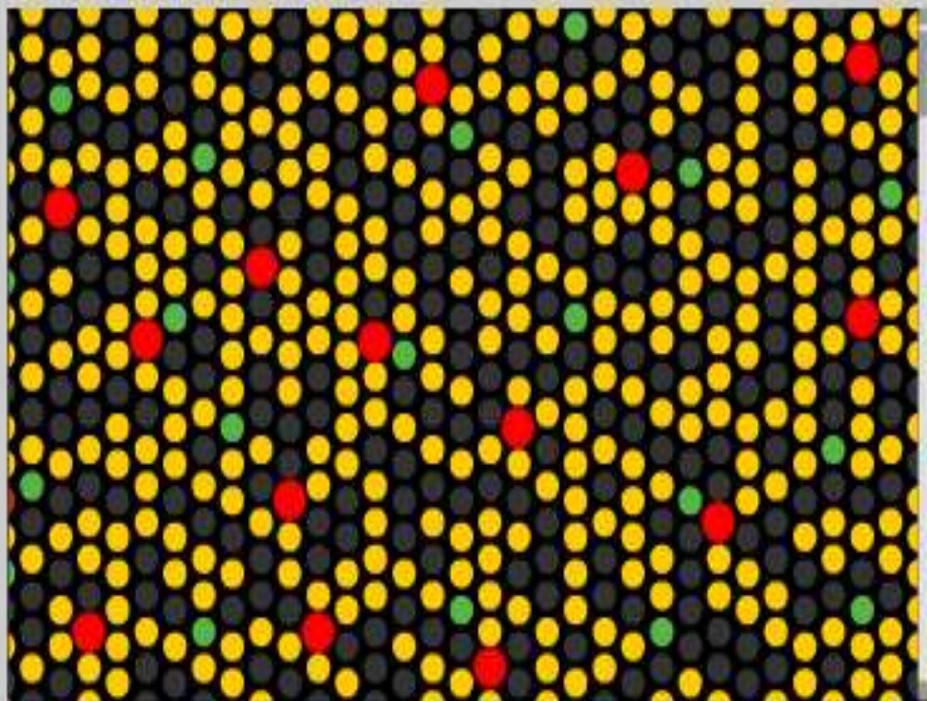
Select a New Chapter

NEXT

- 1: Collect Tissue
- 2: Isolate RNA
- 3: Isolate mRNA
- 4: Make Labeled DNA Copy
- 5: Apply DNA
- 6: Scan Microarray
- 7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

MERGED IMAGE



That's right!

Red spots represent genes that are turned up in cancer cells.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

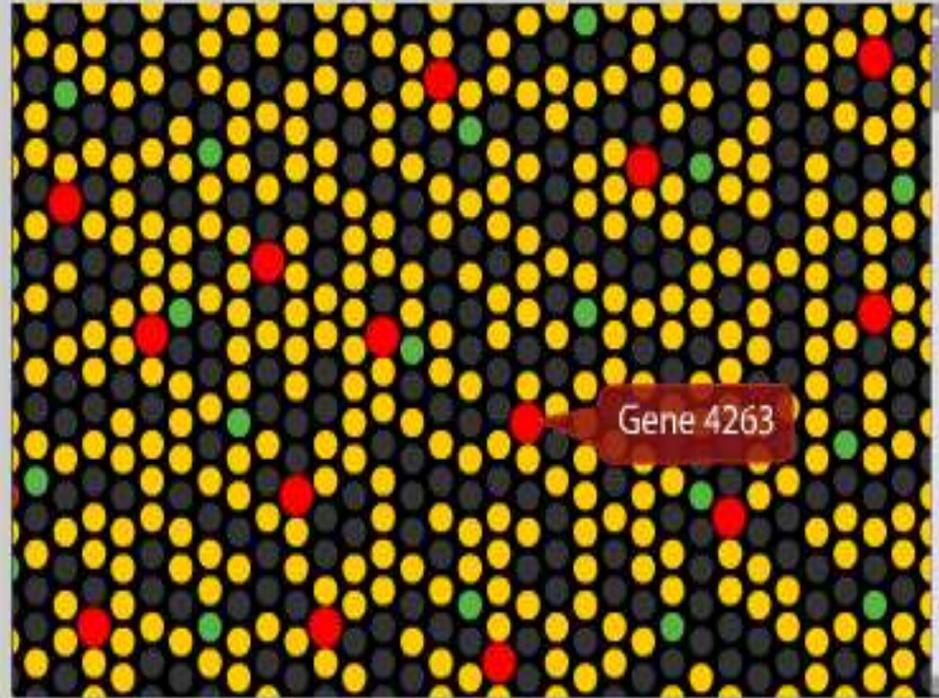
5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

MERGED IMAGE



Gene 4263 is one of the genes that are turned up in cancer cells. Gene 4263 produces a protein product whose role is to turn down the expression of several other genes. What color are the spots that are turned down by gene 4263?



BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

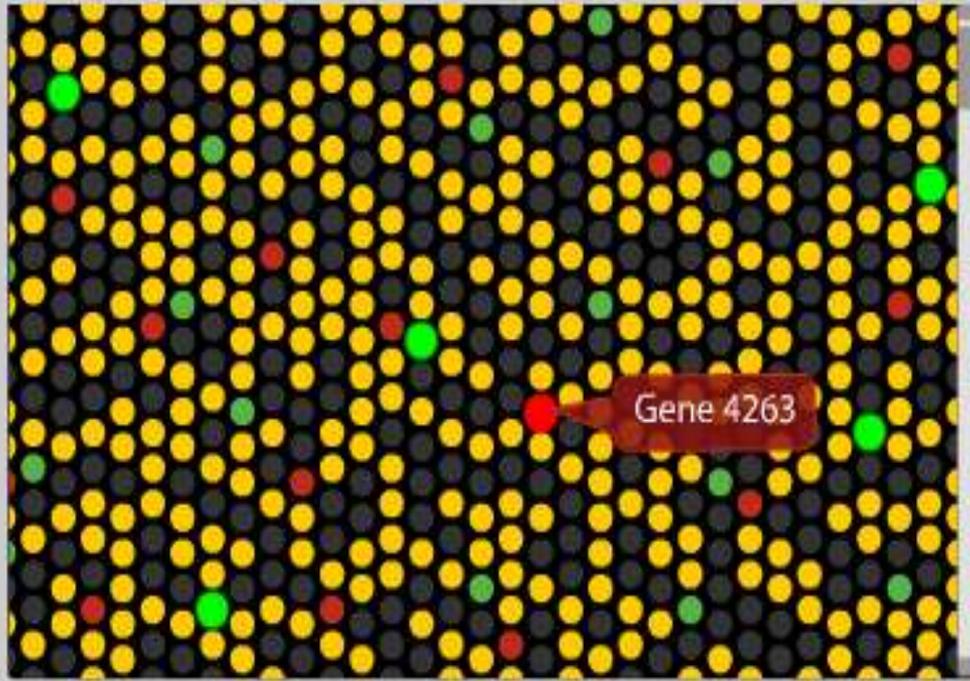
5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

MERGED IMAGE



Yes!

Gene 4263 turns down a set of genes which are represented by GREEN spots on our microarray.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

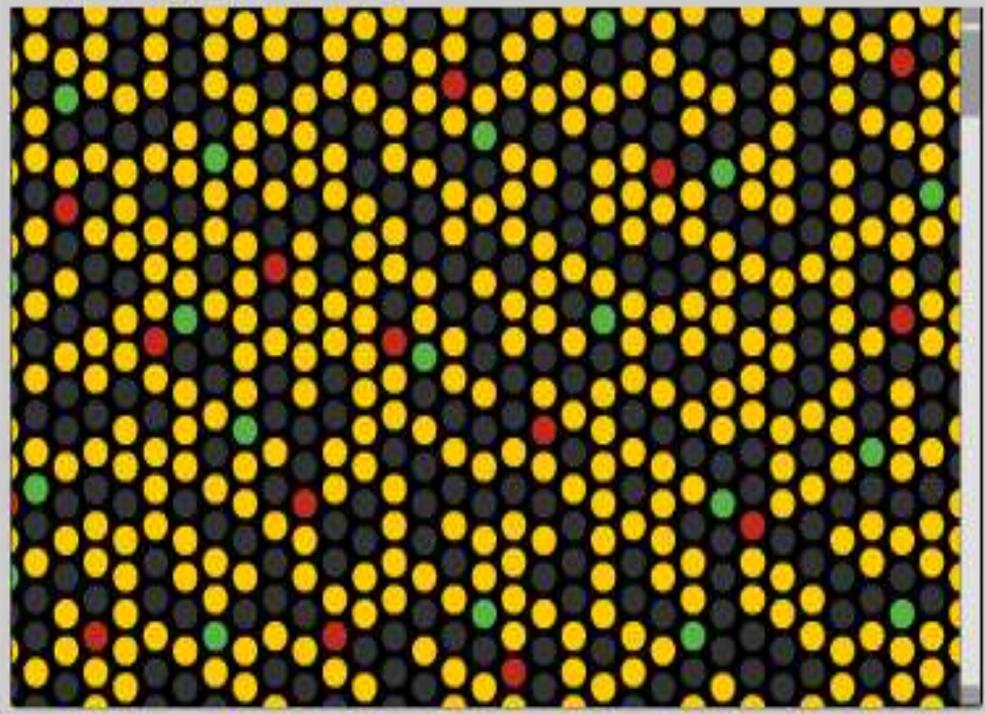
5: Apply DNA

6: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

MERGED IMAGE



Gene 6219 is normally turned on in skin cells. In our cancer sample, this gene is defective. While the gene still produces mRNA, the defect prevents the mRNA from being translated into protein. What color is gene 6219 on our microarray?



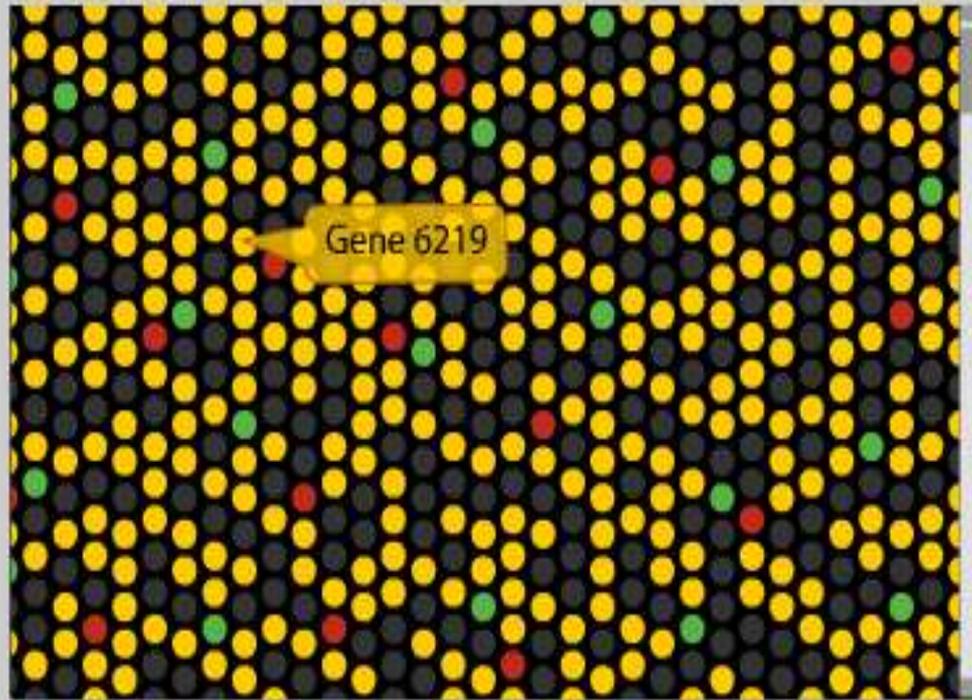
BACK

Select a New Chapter NEXT

- 1: Collect Tissue
- 2: Isolate RNA
- 3: Isolate mRNA
- 4: Make Labeled DNA Copy
- 5: Apply DNA
- 6: Scan Microarray
- 7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

MERGED IMAGE



Good job!

Gene 6219 is represented by a YELLOW spot on our microarray.

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

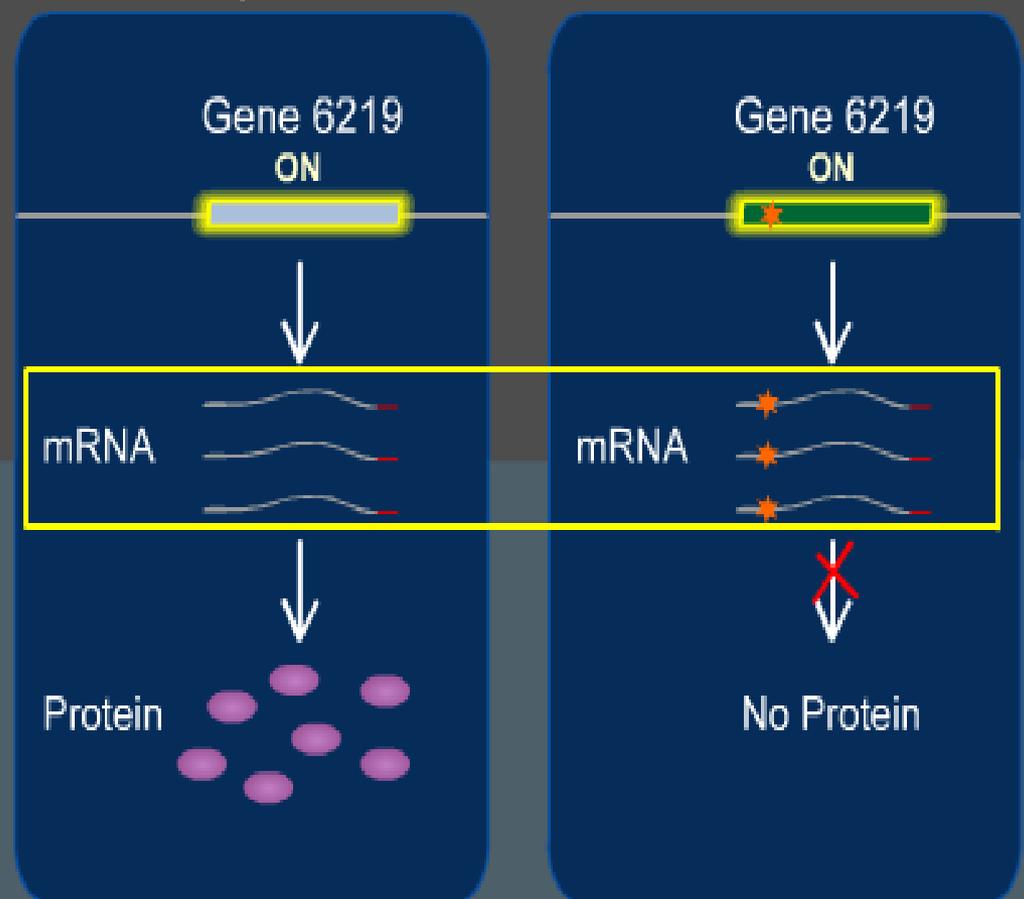
8: Scan Microarray

7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

Healthy Cells

Cancer Cells



While RNA expression USUALLY indicates protein activity, this is not always the case. In this example, gene 6219 mRNA is made in both healthy and cancer cells causing it to appear yellow on the microarray. However, in cancer cells a defect prevents the gene from being translated into protein. Because gene 6219 shows up as yellow, the defect cannot be detected using microarray analysis. This is a major limitation of the technology. So how can researchers know if a gene is producing protein?

Press NEXT to continue.

BACK

Select a New Chapter

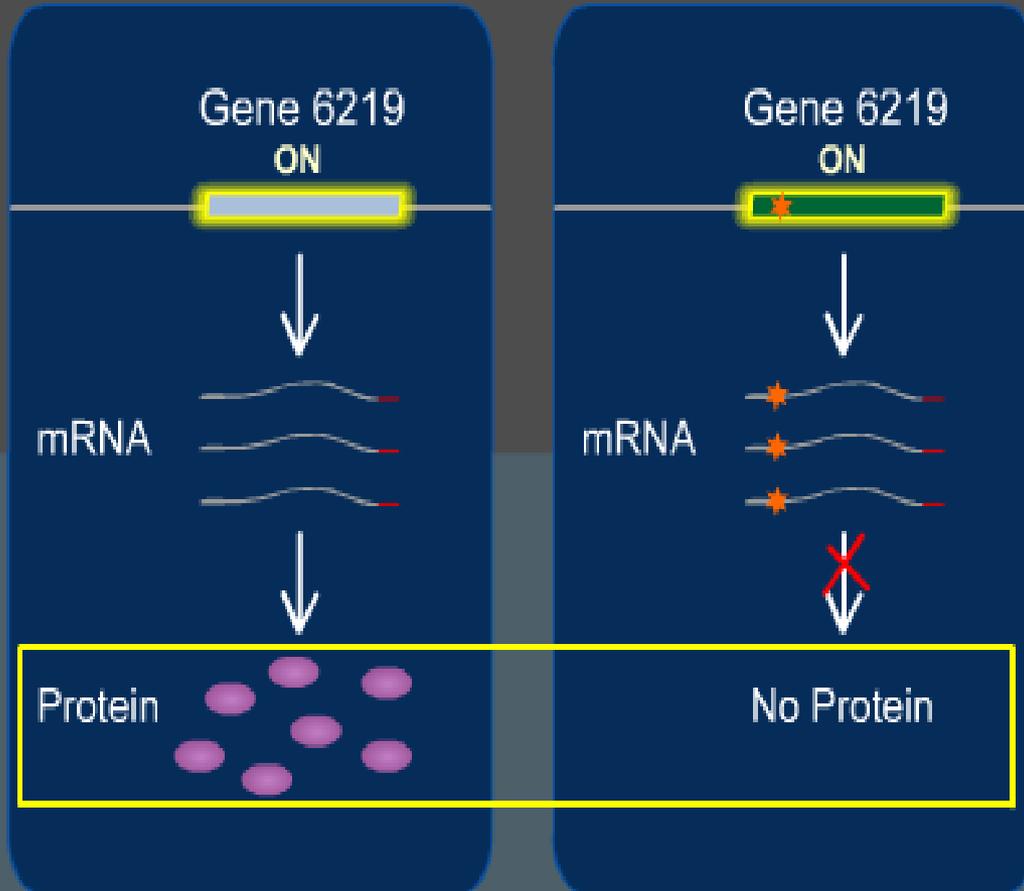
NEXT

- 1: Collect Tissue
- 2: Isolate RNA
- 3: Isolate mRNA
- 4: Make Labeled DNA Copy
- 5: Apply DNA
- 6: Scan Microarray
- 7: Analyze Data

DNA MICROARRAY

Healthy Cells

Cancer Cells



Scientists rely on a technique called protein expression analysis to tell them if the mRNA is being translated into protein

BACK

Select a New Chapter

NEXT

1: Collect Tissue

2: Isolate RNA

3: Isolate mRNA

4: Make Labeled DNA Copy

5: Apply DNA

6: Scan Microarray

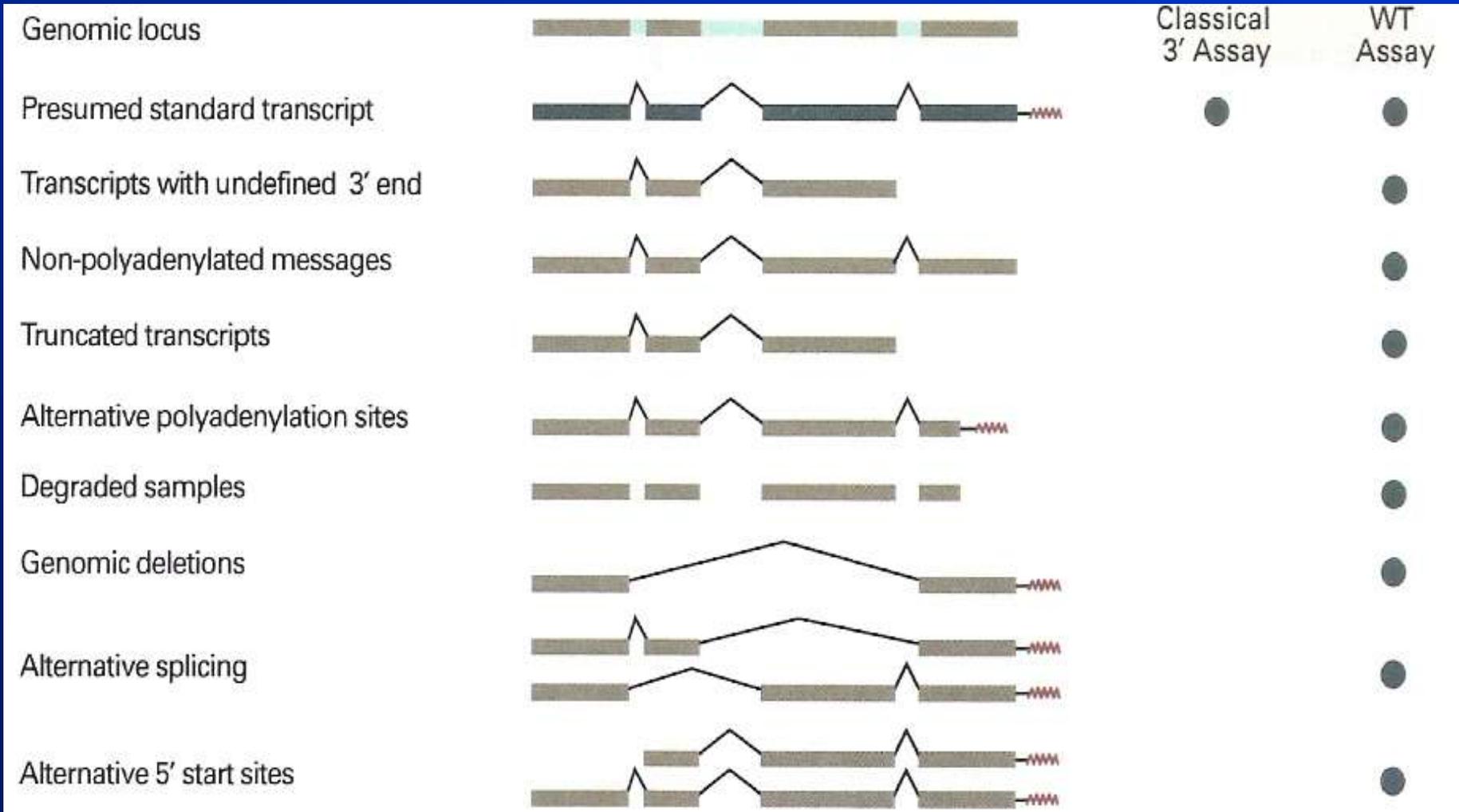
7: Analyze Data

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ DNA MICROARRAYS

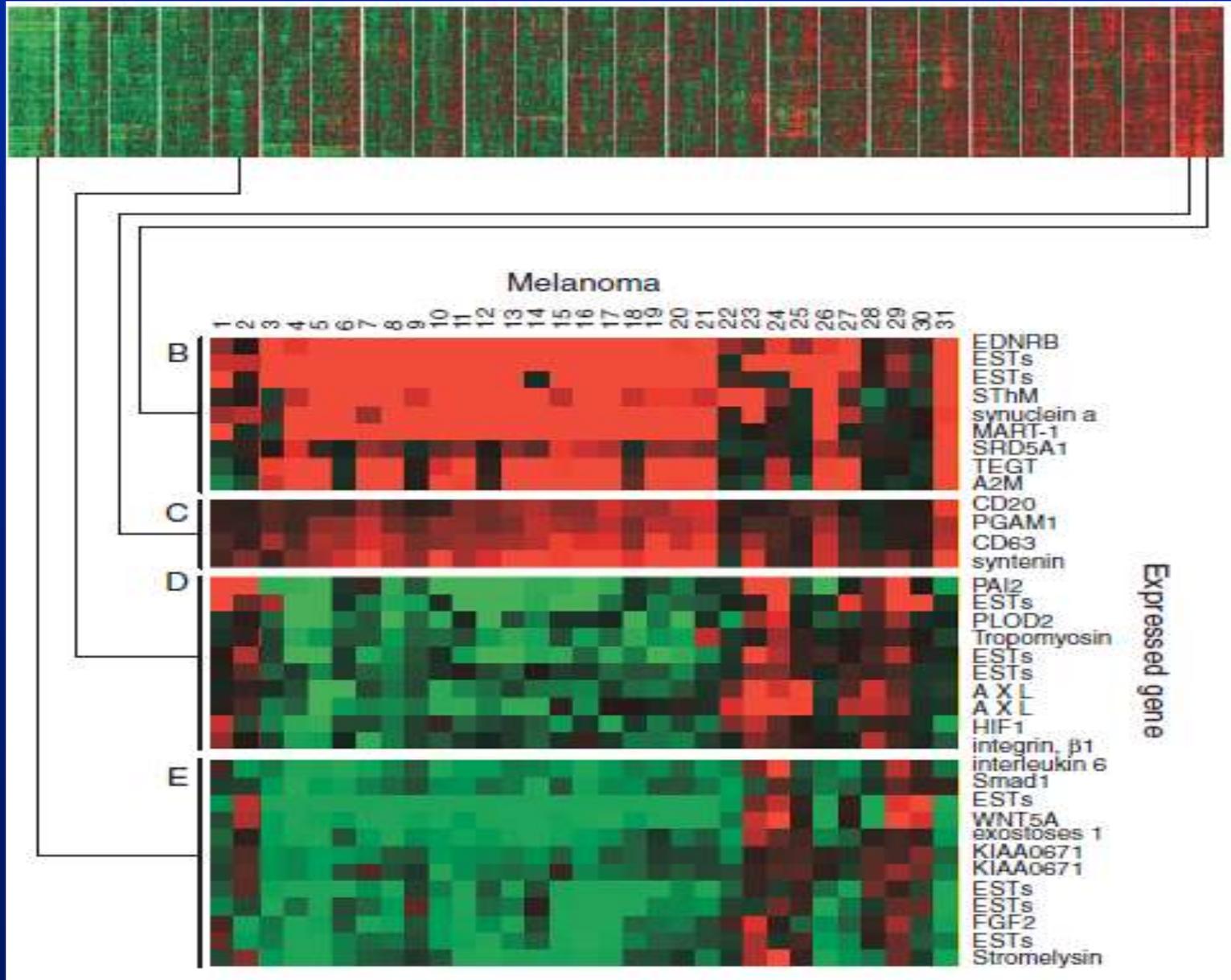
1. MICROARRAY EXPRESSION CHIP
2. MICROARRAY SNP CHIP

MICROARRAY EXPRESSION CHIP

25 – mer probes , 28.869 γονίδια, 764.885 probes.



MICROARRAY EXPRESSION CHIP



Απρίλιος 2010

Περιοδικό Cancer Research

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

- Οι όγκοι ανταποκρίνονται διαφορετικά στην ακτινοθεραπεία
- Η ακτινοθεραπεία συνεισφέρει σε ποσοστό 40% των περιπτώσεων όπου ο όγκος εξαλείφεται.



ZHTOYΜENO

Εύρεση στόχων που θα βελτιώσουν το αποτέλεσμα της ακτινοθεραπείας.

Απρίλιος 2010

Περιοδικό Cancer Research

ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΩΝ

1. Συγκριτική μελέτη έκφρασης 200 γονιδίων που ενέχονται στην επισκευή του DNA σε όγκους και υγιείς ιστούς.
2. Διαπίστωση ότι το γονίδιο POLQ εκφράζεται έντονα σε καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με υγιή.
3. Έλεγχος knockdown του γονιδίου με χρήση small interfering RNA (siRNA)* = **Επιτυχής.** ✓
4. α) Μελέτη της συμπεριφοράς καρκινικών κυτταρικών σειρών με αρχική αντίσταση στην ακτινοβολία και knockdown του γονιδίου POLQ.

ΕΥΡΗΜΑ

Τα καρκινικά κύτταρα αποδεικνύονται ευπαθή στην ακτινοβολία.

Απρίλιος 2010

Περιοδικό Cancer Research

4. β) Μελέτη υγιών κυττάρων που έχουν υποστεί knockdown του γονιδίου στην ανταπόκριση τους στην ακτινοβολία

ΕΥΡΗΜΑ

Δεν επηρεάζονται από την ακτινοβολία.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

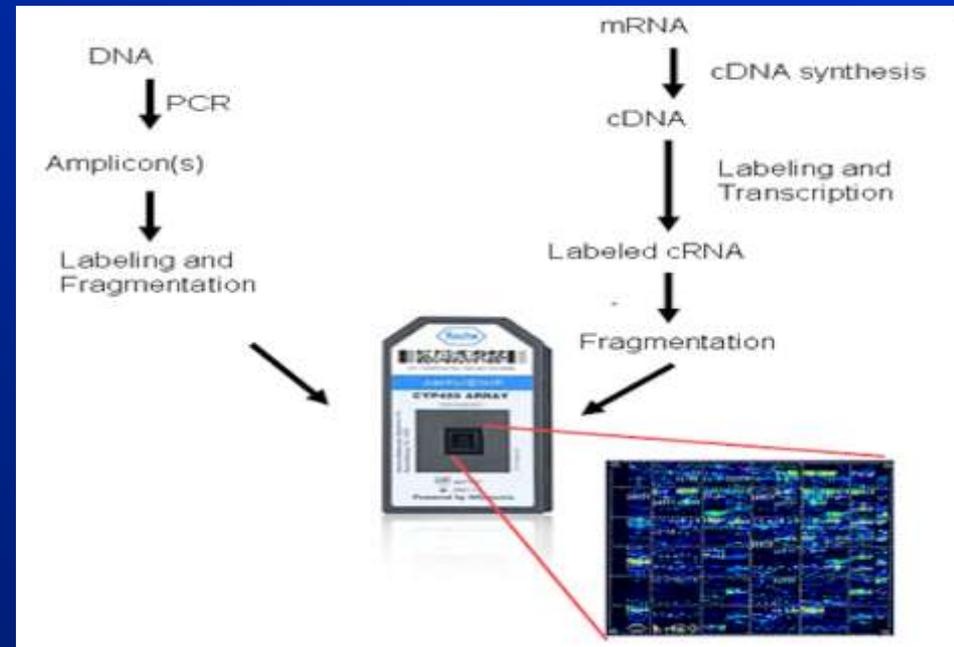
**Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
ROLQ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ ΚΛΙΝΙΚΑ
ΓΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΟΓΚΩΝ ΣΤΗΝ
ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ**

MICROARRAY SNP CHIP

Ανίχνευση 906.600 (SNPs) και 5.700 copy number variation (CNV) σε ένα πείραμα.

Εφαρμογή: Συσχέτιση SNPs προτύπου με συγκεκριμένες ασθένειες, Εξατομικευμένη φαρμακευτική προσέγγιση.

Π.χ. Roche Amplichip. Μεταβολισμός φαρμάκων CYP450



AmpliChip CYP450 Test

Intended Use

- Performs **genotyping** of two Cytochrome P450 genes:
2D6 and 2C19
 - Distinguishes 29 polymorphisms in the 2D6 gene, including gene duplication and deletion
 - Distinguishes 2 major polymorphisms in the 2C19 gene
- Provides **predictive phenotype** of the associated enzymatic activities

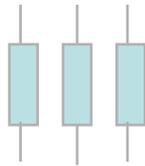
4 Types of Metabolizers (II)

Metabolizer Status

Genotype

Response to average daily dose

Ultrarapid

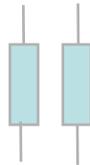


= Adverse Events
= Therapeutic Window
= Ineffective

Time

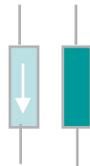
Extensive

normal activity



Intermediate

reduced activity



no activity



Poor



Examples: Dose recommendations for antidepressants

Drug	Usual Dose (mg)	Dose Adjustment (based on metabolizer type)			
		Poor	Intermediate	Extensive	Ultra-rapid
Tricyclics					
Amitriptyline	150 (50-150)	50 %	(90 %)	120 %	
Clomipramine	150 (100-200)	60 %	(90 %)	120 %	
Desipramine	150 (10-100)	30 %	30 %	130 %	260 %*
Fluvoxamine	100 (100)	90 %	(100 %)	110 %	
Imipramine	150 (25-100)	30 %	(80 %)	130 %	
Nortriptyline*	50 (25-150)	50 %	70 %	140 %	230 %
SSRI					
Fluoxetine*	20 (20-60)	70 %	(90 %)	110 %	
Paroxetine	20 (30)	70 %	(90 %)	110 %	
Mixed-Function					
Venlafaxine	150 (20-225)	20 %	(80 %)	130 %	

* single dose recommendations; recommendations in brackets are estimations and require clinical confirmation

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ MICROARRAYS ΣΕ ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

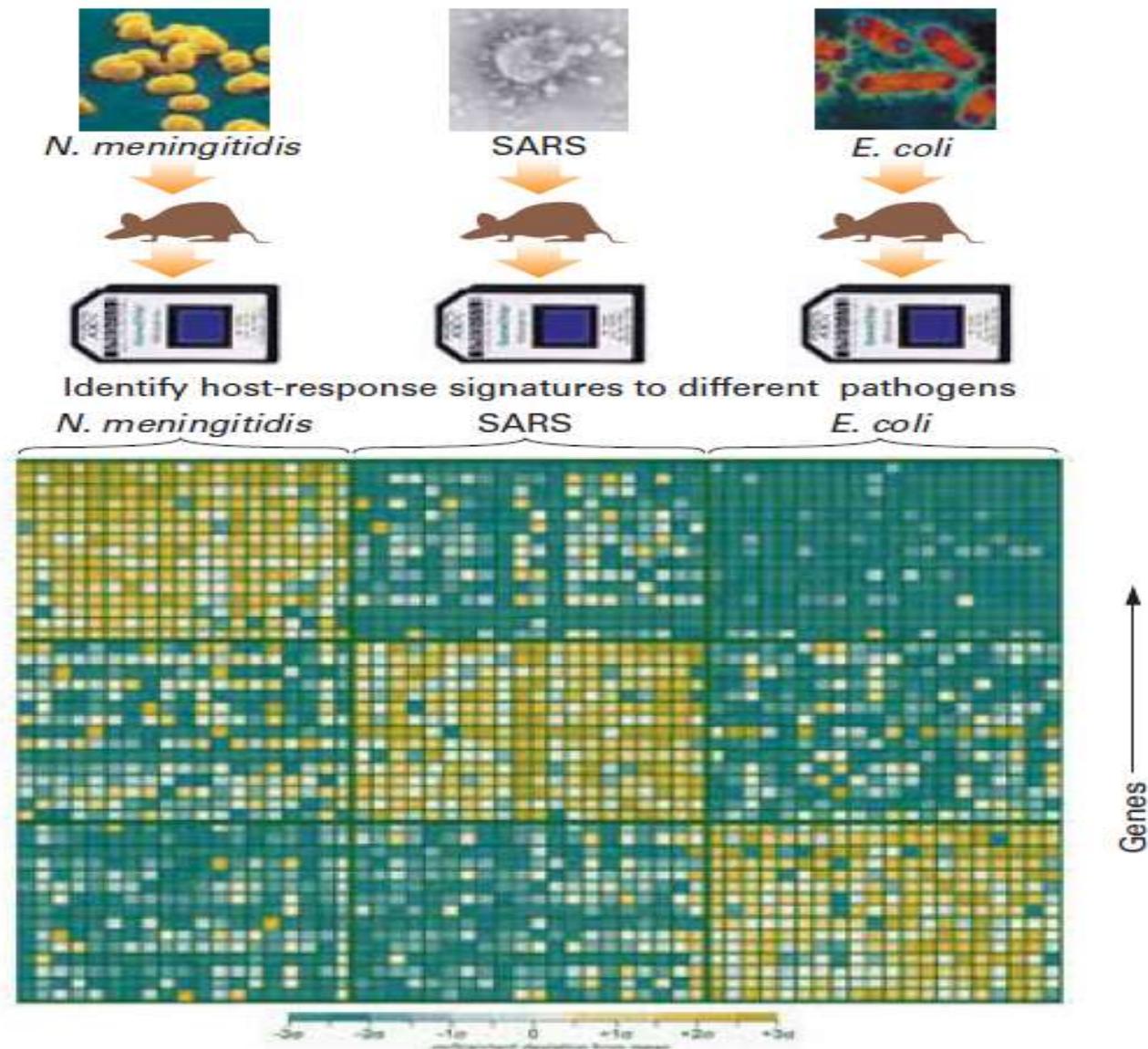
A) Αλληλεπίδραση Ξενιστή – Παθογόνου

1) Επίδραση ξενιστή στη έκφραση του παθογόνου

Pseudomonas aeruginosa Genome assay: Ανακάλυψη γονιδίων που απενεργοποιούνται και τα οποία επάγουν την βιοσύνθεση μαστιγίων στη Ψευδομονάδα. Τα μαστίγια προκαλούν ανοσολογική ανταπόκριση από τον ξενιστή → εξαφάνιση μαστιγίων = αποφυγή αμυντικού μηχανισμού ξενιστή.

2) Επίδραση παθογόνου στην έκφραση του ξενιστή

Figure 2: Host response signatures for pathogen identification. In this animal model, mice are infected with different pathogens and whole-genome expression is measured by microarray analysis, resulting in a specific host-response signature. This type of study can identify specific patterns for microarray diagnostic applications.



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ MICROARRAYS ΣΕ ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

B) Ανίχνευση παθογόνων

- Wilson et.al.: Multi-Pathogen Identification microarray (MPID), Ανίχνευση 18 παθογόνων προκαρυωτικών – ευκαρυωτικών - μυκήτων



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ MICROARRAYS ΣΕ ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

B) Ανίχνευση παθογόνων

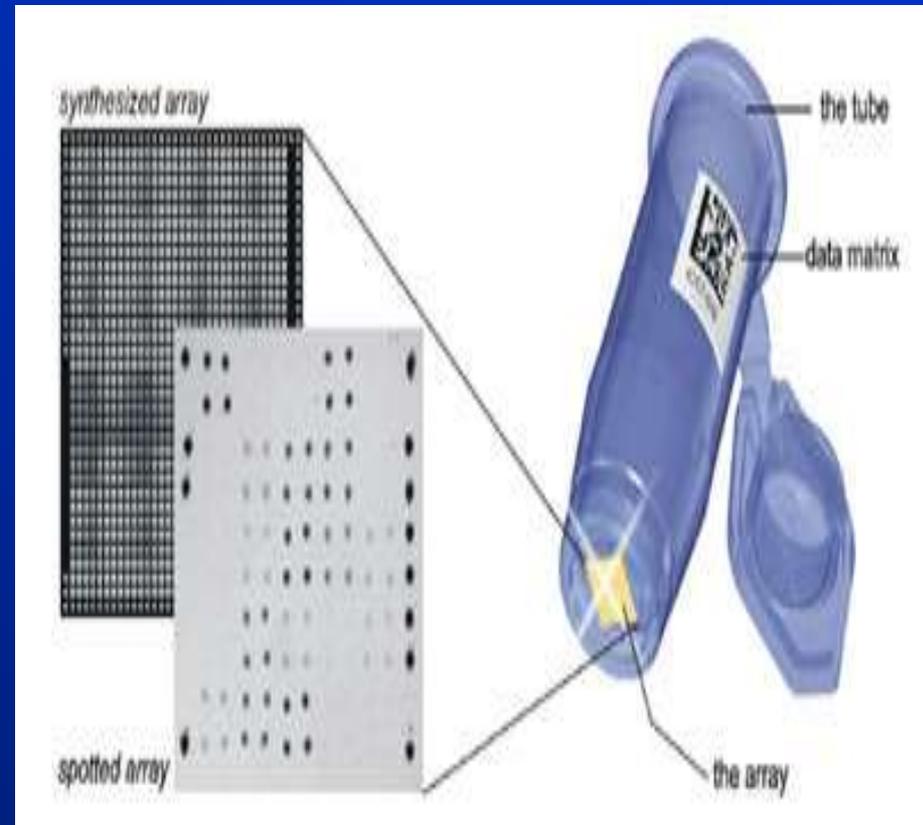
- Ανίχνευση και τυποποίηση 34 τύπων ιού HPV με microarrays (Genomedica)



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ MICROARRAYS ΣΕ ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

B) Ανίχνευση παθογόνων

- Τυποποίηση στελεχών: Microarray *Bacillus anthracis* για να διαχωρισθεί αν το στέλεχος είναι προϊόν γενετικής μηχανικής ή όχι



21^{ος} ΑΙΩΝΑΣ

Φθορίζοντα αντισώματα

ή

φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ MICROARRAYS ΣΕ ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Γ) Έλεγχος ευαισθησίας σε λοιμώξεις

Με τη χρήση microarray για SNPs ικανές για ταυτόχρονη μελέτη 1.000.000 πολυμορφισμών και άλλων τύπων microarray μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για ομάδες γονιδίων που συνδέονται με αντοχή ή ευπάθεια σε λοιμώξεις. π.χ

1) Μεταλλάξεις στο CKR5 human co-receptor για τον ιό HIV οδηγούν σε αυξημένη αντίσταση στη λοίμωξη.

2) Ομόζυγοι φορείς του γονιδίου που εκφράζει την ανενεργή caspase 12 (ωρίμανση κυτοκινών από μίτωση) κινδυνεύουν 8 φορές λιγότερο να εμφανίσουν βακτηριαιμία και 8 φορές λιγότερο να πεθάνουν από σηψαιμία, σε σχέση με τους ομόζυγους φορείς της ενεργούς μορφής.

ΣΙΩΠΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ = ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΟ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑ

Συχνότητα γονιδίου 28% στην Υποσαχάρια - Αφρική. Στις γυναίκες τα οιστρογόνα μπλοκάρουν την έκφραση του γονιδίου.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ MICROARRAYS ΣΕ ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Δ) Γενετική ποικιλομορφία Ξενοστή και θεραπευτική προσέγγιση

Μελετήθηκαν 143 ασθενείς με φλεγμονή από *Helicobacter pylori*

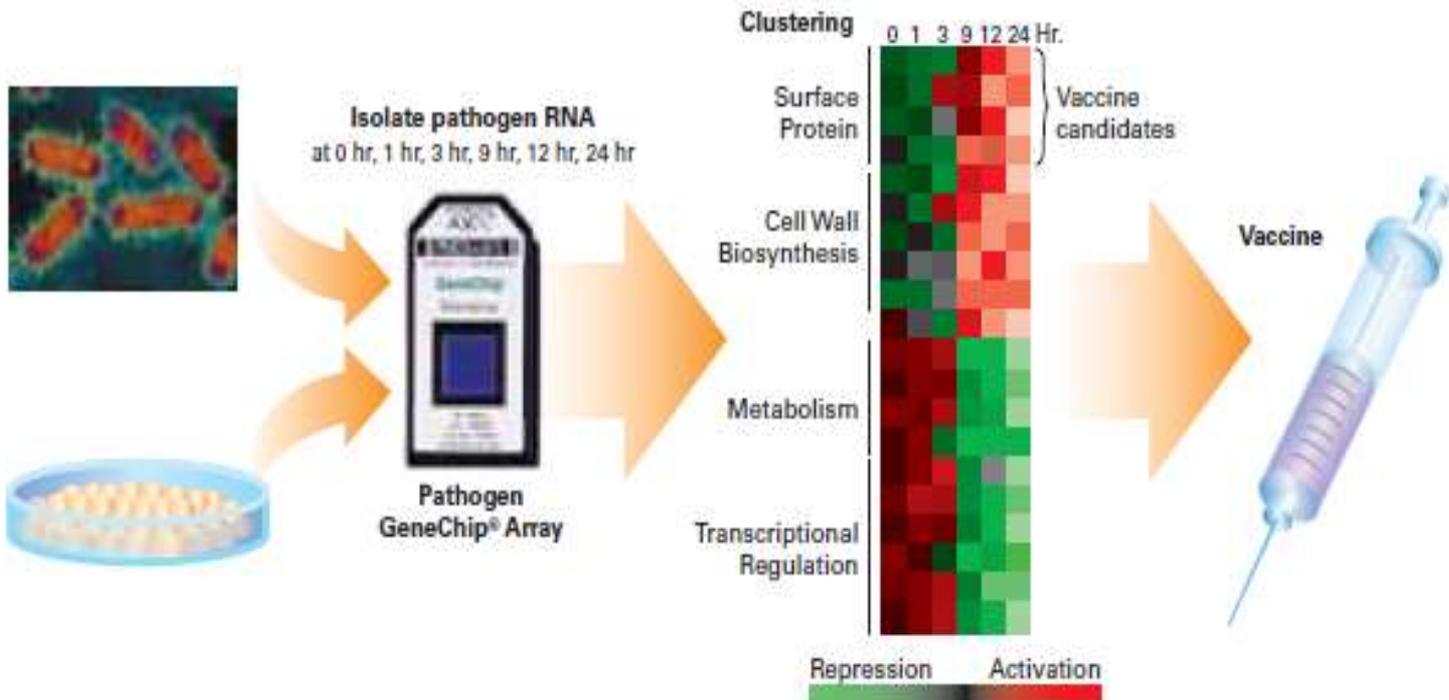
Όλοι έλαβαν τριπλό θεραπευτικό σχήμα 1 εβδομάδος.

Οι 50 που μετά τη θεραπεία συνέχιζαν να είναι θετικοί ήσαν ομόζυγοι ή ετερόζυγοι για τον γονότυπο CYP2C19 που χαρακτηρίζει τους ταχείς μεταβολιστές του φαρμάκου.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ MICROARRAYS ΣΕ ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Ε) Σχεδιασμός Εμβολίων

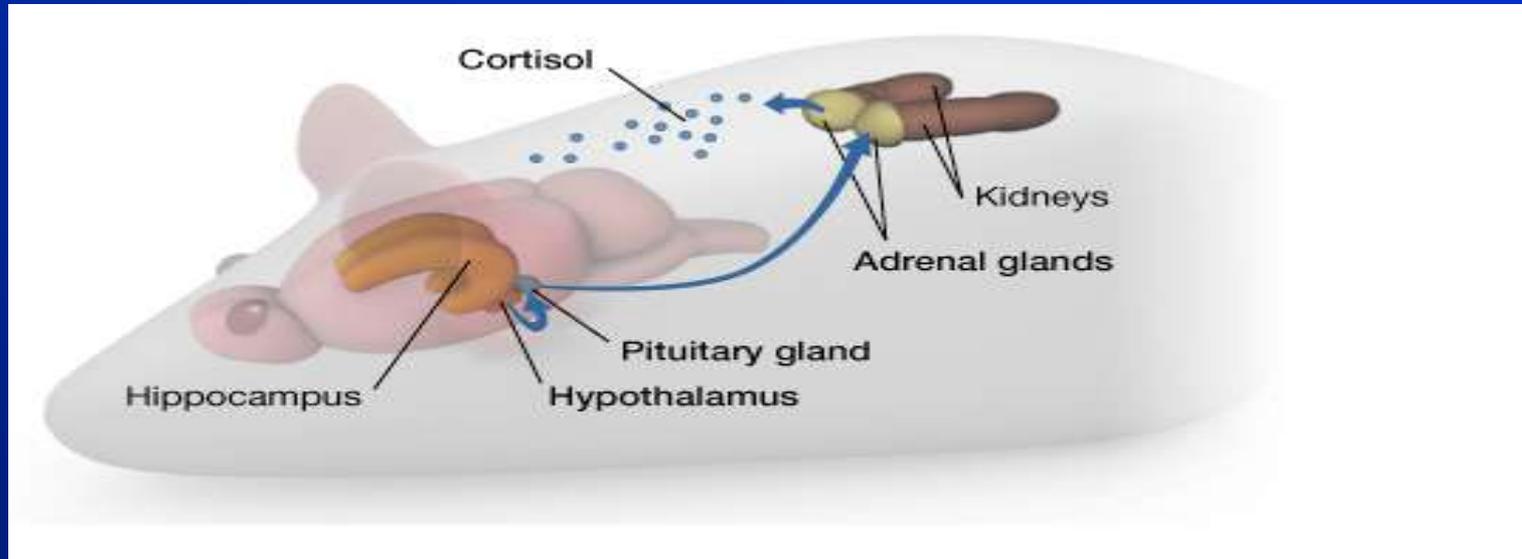
Figure 3: Whole-genome expression profiling allows researchers to identify antigenic candidates for rational vaccine design. By analyzing which genes are expressed by the pathogen over time, researchers identify genes crucial for infection. Ontology maps can be created and vaccine candidates identified.



ΕΡΩΤΗΜΑ

Μπορούν περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η διατροφή και η μητρική στοργή να προκαλέσουν επιγενετικές μεταβολές στο DNA και να αλλάξουν τη γονιδιακή έκφραση σε γενετικά δίδυμους οργανισμούς οδηγώντας τελικά σε διαφορετικό φαινότυπο;

Το κύκλωμα του stress – HPA Axis



Στρεσογόνα σήματα ακολουθούν την πορεία

Υποθάλαμος - Υπόφυση - Επινεφρίδια

κατευναστικό
σήμα για να
κλείσει το
κύκλωμα

Κορτιζόλη
(+ αδρεναλίνη)

Ιππόκαμπος

Cortisol + GR

ΦΡΟΝΤΙΔΑ & ΣΤΟΡΓΗ

Αμέσως μετά τη γέννηση, μεθυλομάδες προκαλούν σίγηση του γονιδίου GR receptor στα εγκεφαλικά κύτταρα όλων των αρουραίων

Κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδος η ανελλιπής μητρική φροντίδα προκαλεί απελευθέρωση χημικών ουσιών στον εγκέφαλο του νεογέννητου αρουραίου. Οι χημικές αυτές ουσίες ενεργοποιούν μονοπάτια μοριακής σηματοδότησης τα οποία αφαιρούν από το DNA τις μεθυλομάδες

Αποτέλεσμα: Ενεργοποίηση του γονιδίου GR receptor και παραγωγή της πρωτεΐνης GR (Glucocorticoid receptor)

**ΟΣΟ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΦΡΟΝΤΙΔΑ ΤΟΣΟ
ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GR**

ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Στην κοινωνία των μελισσών η βασίλισσα και οι εργάτριες μοιράζονται το ίδιο ακριβώς γενετικό υλικό ωστόσο ο φαινότυπος ως προς τη συμπεριφορά, το μέγεθος, τη φυσιολογία, την εμφάνιση και το χρόνο ζωής διαφέρουν δραματικά.

Η γονιδιακή ανάλυση αποκάλυψε ότι η διαφορά έγκειται στην μεθυλίωση πολλών γονιδίων στις εργάτριες με αποτέλεσμα την μη έκφρασή τους.

Σε επίπεδο λάρβας το φαινόμενο της μεθυλίωσης είναι αντιστρεπτό και εξαρτάται πλήρως από την τροφή.

Ο βασιλικός πολτός περιέχει ουσία που αναστέλλει το ένζυμο cytosine methyltransferase το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μεθυλίωση του DNA των μελισσών

ΛΑΡΒΑ



Εργάτρια μέλισσα



Νέκταρ



Βασιλικός
πολτός



Βασίλισσα μέλισσα

Χαρτογράφηση γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπινου εγκεφάλου **Allen Brain Atlas Project**

**62.000 gene probes – αναλυση όλων των
γνωστών γονιδίων**

1000 τομές / εγκέφαλο (500 τομές / ημισφαίριο)

55.000.000 \$ κόστος

Τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης αποδίδονται σε
συνδυασμό με ιστολογική μελέτη σε 3D απεικόνιση βασισμένη
σε MRI

Πόσο βέβαιοι μπορεί να είμαστε για τις
νέες θεωρίες που περιγράφουν
βιολογικά συστήματα;

**«Όσες αναφέρονται στην
πραγματικότητα δεν είναι βέβαιες και
όταν είναι βέβαιες δεν αναφέρονται
στην πραγματικότητα»**

Albert Einstein