



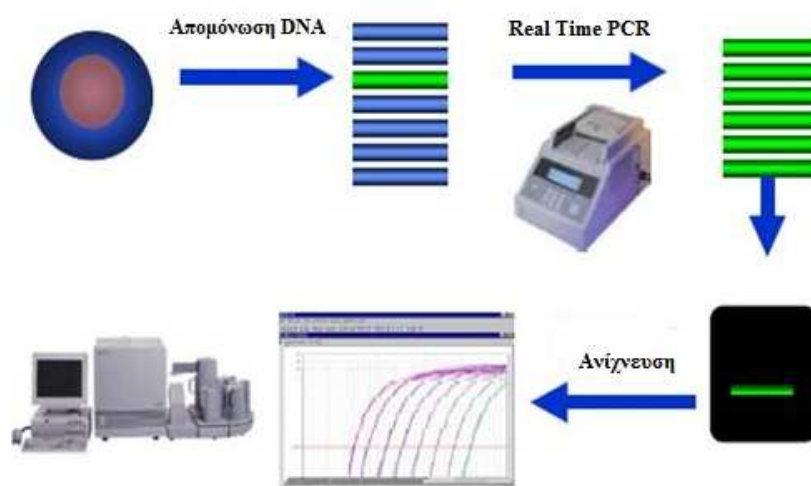
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ REAL TIME PCR (RT- PCR) ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ (*Escherichia coli*)»



ΛΑΖΑΝΑΚΗ ΒΙΡΓΙΝΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΒΕΡΒΕΡΙΔΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ, 2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής εργασίας μου, μου δίδεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Φίλιππο Βερβερίδη για την βοήθεια και την στήριξη από την αρχή μέχρι και την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μάνο Τραντά και την κ. Νίκη Παπαγεωργίου για τις πολύτιμες συμβουλές τους αλλά και την οικογενειά μου για την στήριξη και κατανόηση που έδειξαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
A.1. ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.....	9
A.1.1. Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης PCR.....	9
A.1.2. Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης Real Time PCR.....	16
A.1.3. Οι διαφορές μεταξύ συμβατικής PCR και Real Time PCR.....	23
A.1.4. QPCR και οι διάφορες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται.....	24
A.1.5. Εφαρμογές της Real Time PCR.....	30
A.2. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	31
A.2.1. Τι είναι οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί.....	31
A.2.2. Που χρησιμοποιούνται και γιατί πρέπει να ανιχνεύονται.....	32
A.2.3. Πως ανιχνεύονται.....	35
A.3. ΣΥΣΚΕΥΗ ΤΗΣ REAL TIME PCR.....	38
A.3.1. Περιγραφή οργάνου Real Time PCR.....	38
A.3.2. Τα μέρη του οργάνου.....	39
A.3.2.1. Πηγή φωτός.....	39
A.3.2.2. Είδη φίλτρων, αριθμός και ποιότητα φωτός.....	40
A.3.2.3. Ανίχνευση και συστήματα ανίχνευσης.....	40
A.3.2.4. Πηγάδια δειγμάτων.....	40
A.3.2.5. Λογισμικό.....	41
A.3.2.6. Είδη ανάλυσης.....	42
A.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	42
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	43
B.1. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
B.1.1. Αναλώσιμα Υλικά.....	44
B.1.2. Εργαστηριακά στελέχη <i>Eschericia coli</i>	45
a) Γενετικά τροποποιημένα στελέχη	
b) Μη γενετικά τροποποιημένα στελέχη	
B.1.3. Πειραματική διαδικασία-Μέθοδοι.....	45

B.1.3.1. Καλλιέργεια των στελεχών <i>E. coli</i>	45
B.1.3.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα δύο στελέχη του <i>E.coli</i>	46
B.1.3.2.1. Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με το πρωτόκολλο Απομόνωσης Βακτηριακού DNA με Αλκαλική λύση (μέθοδος miniprep).....	47
B.1.3.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το «NucleoSpin Plasmid Quick Pure».....	47
B.1.3.3. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από τα δύο στελέχη <i>E. coli</i>	48
B.1.3.3.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού βακτηριακού DNA με το πρωτόκολλο Απομόνωσης ολικού Βακτηριακού DNA.....	49
B.1.3.3.2 Απομόνωση Γενωμικού DNA με το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο «NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue» (Macherey-Nagel).....	50
B.1.3.4. Σήμανση και κωδικοποίηση δειγμάτων.....	51
B.1.3.5. Μέτρηση των συγκεντρώσεων προϊόντων των απομονώσεων DNA με Νανόμετρο (Nanodrop).....	52
B.1.3.6. Προετοιμασία καμπύλης αναφοράς (Standard curve).....	53
B.1.3.6.1. Απομάκρυνση ποσότητας DNA με το έτοιμο πρωτόκολλο «NucleoSpin ExtractII: PCR clean up, Gel extraction» της εταιρίας Macherey-Nagel.....	54
B.1.3.7. Μελέτη των δύο στελεχών με αντίδραση της Real Time PCR.....	54
B.1.3.8. Μελέτη των δύο στελεχών του <i>E. coli</i> με την μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).....	57
B.1.3.8.1. Τρέξιμο ποσότητας DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (0,8%).....	58
B.1.3.8.2. Προετοιμασία της αντίδρασης της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).....	58
B.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
B.2.1. Αποτελέσματα της μέτρησης με την συσκευή Nanodrop.....	59
B.2.2. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της καμπύλης αναφοράς (standard curve).....	61
B.2.3. Αποτελέσματα της αντίδρασης Real Time PCR.....	62
B.2.4. Αποτελέσματα της συμβατικής αντίδρασης PCR.....	67
B.2.4.1. Πήκτωμα αγαρόζης 0,8 %.....	67
B.2.4.2. Αποτελέσματα της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.....	68

Β.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	69
Β.4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μίας προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA ή RNA μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο σε τομείς όπως η ιατρική (π.χ. για διάγνωση ασθενειών), η μοριακή βιολογία, η ιατροδικαστική και η βιομηχανία τροφίμων (για ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών σε τρόφιμα).

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (συμβατική PCR) είναι μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση προεπιλεγμένων αλληλουχιών. Η μέθοδος αυτή είναι η πρώτη μέθοδος που αναπτύχθηκε για αυτό το σκοπό το 1984 από τον Kerry Mullis και βασίζεται στην συνεχή επανάληψη τριών σταδίων σε κάθε κύκλο. Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν και άλλες μέθοδοι που βασίστηκαν στην ιδέα της συμβατικής PCR και αποτέλεσαν παραλλαγές της αρχικής μεθόδου, όπως είναι η HotStart PCR, η Multiplex PCR και η Reverse transcriptase PCR (RT-PCR).

Η μέθοδος της Real Time PCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου, η οποία μπορεί να ενισχύσει, να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει μια αλληλουχία-στόχο με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου αποτέλεσε η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης σε οποιοδήποτε στάδιο της βρίσκεται η αντίδραση. Η λειτουργία της τεχνολογίας Real Time PCR βασίζεται στην χρήση μηχανισμών ανίχνευσης, με τη βοήθεια ειδικών χρωστικών που διεγείρονται και εκπέμπουν συγκεκριμένου μήκους κύματος φως, (λ), όπως η SybrGreen καθώς και ιχνηλατών (probes) αλλά και στις ειδικά διαμορφωμένες συσκευές Real Time PCR που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της. Οι συσκευές της Real Time PCR βασίζονται τόσο στο σύστημα ανίχνευσης που διαθέτουν, για την ανίχνευση του σήματος που εκπέμπει ο εκάστοτε μηχανισμός ανίχνευσης, όσο και στο ειδικό λογισμικό με το οποίο αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την διάρκεια της αντίδρασης.

Σκοπός της παρούσας πειραματικής εργασίας είναι η ανίχνευση ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους του βακτηρίου *Escherichia coli* με την χρήση της τεχνικής της Real Time PCR. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος του βακτηρίου *Escherichia coli* είναι το JM83, το οποίο τροποποιήθηκε γενετικά με την προσθήκη του πλασμιδίου pESC-HIS-4CL. Το βασικότερο μέρος του

πειράματος ήταν η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των στελεχών με την μέθοδο της Real Time PCR αλλά και με την συμβατική μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Η μέθοδος της συμβατικής PCR εφαρμόστηκε για σύγκριση της αποτελεσματικότητας των δύο μεθόδων. Τα αποτελέσματα που προήλθαν από την μέθοδο Real Time PCR έδειξαν πως ήταν δυνατή η ανίχνευση του γενετικά τροποποιημένου στελέχους καθώς και η ποσοτικοποίηση των αντιγράφων σε κάθε δείγμα, ενώ το στέλεχος που δεν περιείχε το πλασμίδιο δεν έδωσε αντίγραφα της προεπιλεγμένης αλληλουχίας. Με την συμβατική PCR τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ικανοποιητικά λόγω πιθανής επιμόλυνσης. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων έδειξαν πως η μέθοδος της Real Time PCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, ταχύτητα και λεπτομέρεια στην απόδοση των αποτελεσμάτων σε σχέση με την συμβατική PCR.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

A.1.1. Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης της PCR

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μια νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο Kerry Mullis, ο οποίος ανακοίνωσε την εφευρεσή του το 1984 και τιμήθηκε γι'αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993 (Βερβερίδης, 2003).

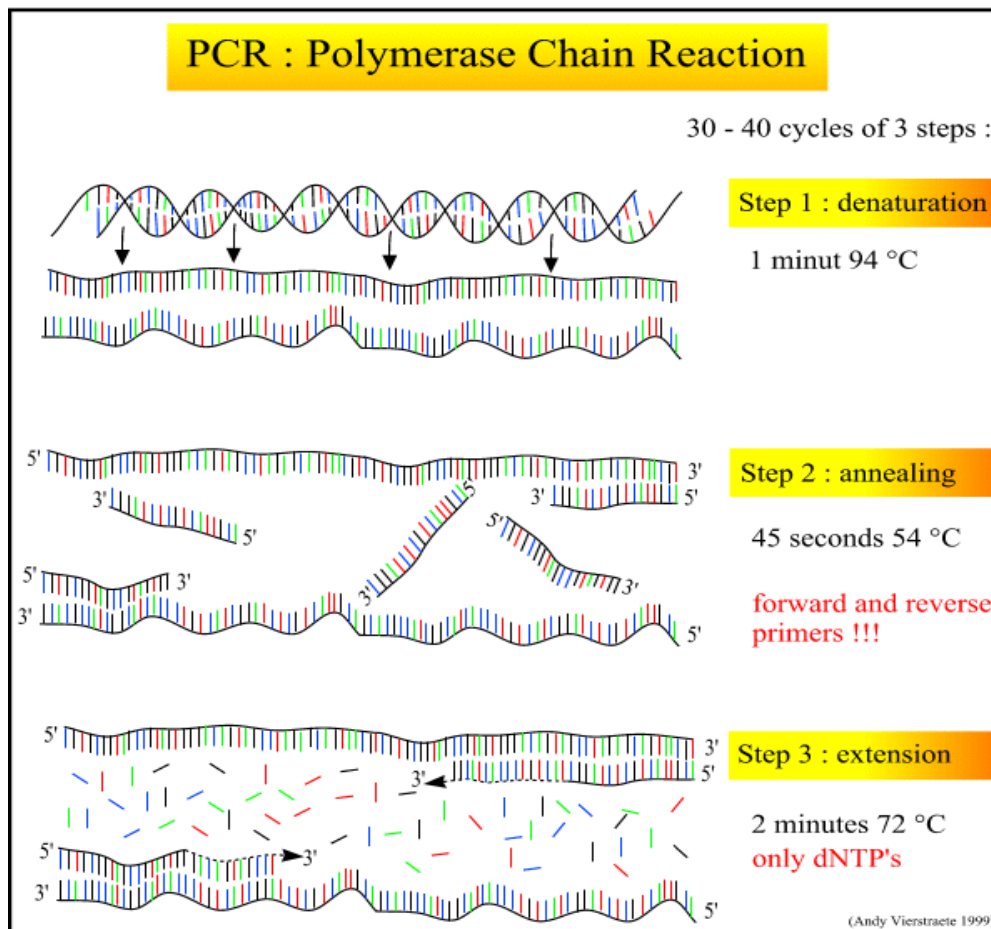
Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμάνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο (Βερβερίδης, 2003).

Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

1)Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation), 2)Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου, 3) Επιμήκυνση εκκινητών (extension).

Κατά την διάρκεια του **πρώτου σταδίου** το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation, Εικ.1).

Στο **δεύτερο στάδιο** η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing, Εικ. 1). Στο **τρίτο και τελευταίο στάδιο** η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3' (Εικ. 1).

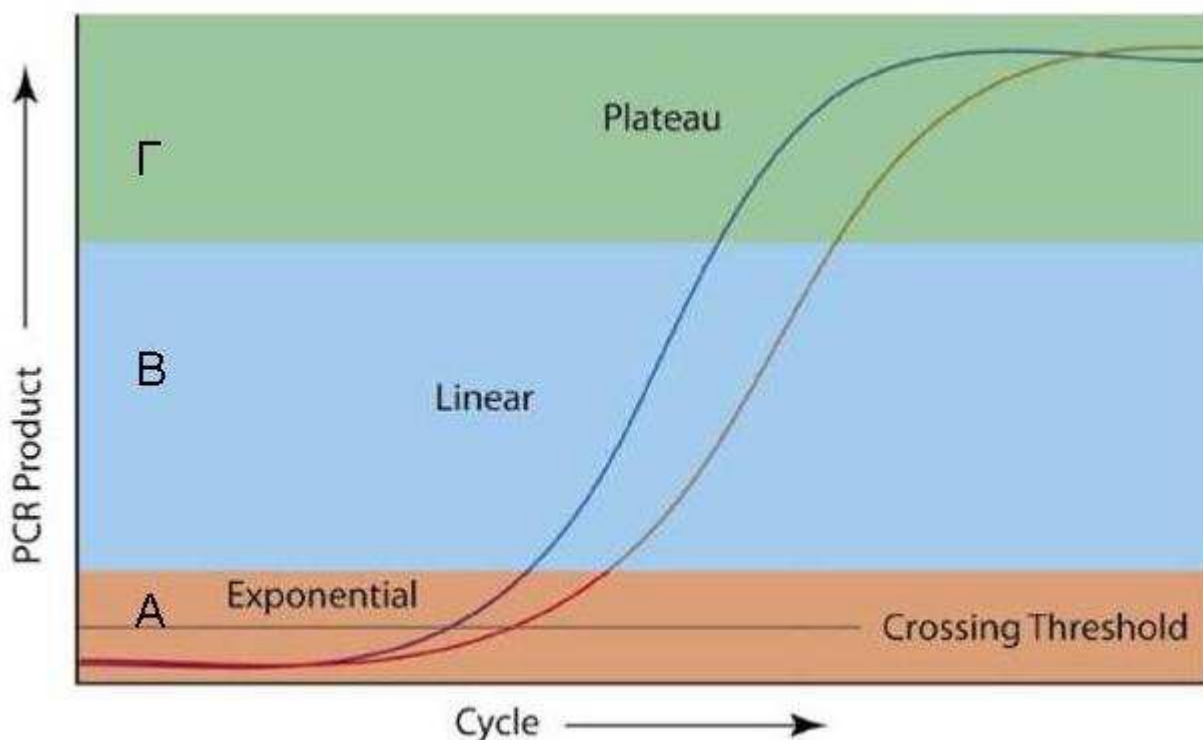


Εικόνα 1. Τα βασικά στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Στάδιο 1 (Step 1): Αποδιάταξη της διπλής αλυσίδας του τμήματος DNA (denaturation), Στάδιο 2 (Step 2): Ένωση των εκκνητών σε κάθε αλυσίδα (annealing), Στάδιο 3 (Step 3): Σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension) (Vierstraete, 1999).

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- **Εκθετική (exponential) φάση:** Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA (Εικ. 2Α).
- **Γραμμική (linear) φάση:** Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων (Εικ. 2Β).

- **Φάση Plateau:** Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Εικ. 2Γ) (Applied Biosystems, XX).



Εικόνα 2. Η καμπύλη παρουσιάζει τις τρεις φάσεις στις οποίες χωρίζεται η διαδικασία της PCR. Α) Εκθετική φάση (Exponential phase), Β) Γραμμική φάση (Linear phase) και Γ) Φάση Πλατώ (Plateau) (VanGuilder et al, 2008).

Μεγάλη σημασία στην επιτυχία της PCR έχουν οι εκκινητές και η DNA πολυμεράση. Οι **εκκινητές (primers)** είναι ολιγονουκλεοτίδια και έχουν συνήθως μήκος 15-20 νουκλεοτιδίων ο καθένας. Πρέπει να είναι συμπληρωματικοί στις αλυσίδες του DNA, αφορούν τις περιοχές από όπου αρχίζει το ένζυμο DNA πολυμεράσης την σύνθεση της διπλής αλυσίδας του επιθυμητού DNA προϊόντος και έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m).

Η **DNA πολυμεράση (Taq polymerase)** είναι ένζυμο που βοηθάει στην σύνθεση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας που θα είναι συμπληρωματική της

προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων. Τα νουκλεοτίδια σχηματίζουν ζευγάρια βάσεων με τα νουκλεοτίδια από την αρχική αλληλουχία DNA και η DNA πολυμεράση δημιουργεί τους δεσμούς που τα ενώνει μεταξύ τους. Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων γίνεται από το 3' άκρο του εκκινητή (Berg et al, 2002). Η DNA πολυμεράση απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες 72-80°C, διατηρώντας επαρκή ενζυματική δραστηριότητα στις συνθήκες της αντίδρασης. Σήμερα με την βοήθεια μεθοδολογιών της Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί διάφορα παράγωγα της Taq πολυμεράσης με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Αυτές οι πολυμεράσες δεν επιτρέπουν την λάθος τοποθέτηση βάσεων κατά την σύνθεση του DNA, εξαιτίας της 3' προς 5' επιδιορθωτικής ικανότητας (proofreading activity) που έχουν. Η Taq πολυμεράση δεν παρουσιάζει τέτοια ικανότητα και γι' αυτό υπάρχει πιθανότητα να έχουμε παραγωγή προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες αλυσίδες DNA (με μικρή συχνότητα) (Berg et al, 2002).

Ορισμένα από τα παράγωγα της Taq πολυμεράσης είναι:

- **Klenow fragment:** προέρχεται από την αρχική DNA πολυμεράση I από το βακτήριο *E. coli* και είναι το πρώτο ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην PCR. Σταματούσε όμως η δράση της κατά το στάδιο της αποδιάταξης του DNA και χρειαζόταν να συμπληρώνεται σε κάθε κύκλο (Wikipedia, 2004).
- **Stoffel fragment:** έχει παραχθεί από γονίδιο της Taq πολυμεράσης που εκφράζεται στο βακτήριο *E. coli* και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αντιγραφή μεγαλύτερων τμημάτων DNA (Wikipedia, 2008).
- **Faststart polymerase:** είναι μια χημικώς τροποποιημένη μορφή της Taq πολυμεράσης με θερμοανθεκτική ιδιότητα, που έχει παρασκευαστεί από την εταιρεία Roche ειδικά για χρήση στο τυποποιημένο εμπορικό πρωτόκολλο Hotstart PCR της εταιρείας (Promega, 2009) (βλ. σελ 15). Η Faststart polymerase ενεργοποιείται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 75°C, αποφεύγοντας την σύνθεση προϊόντων σε μικρότερες θερμοκρασίες, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί γρήγορα με επώαση στους 95 °C για 2 με 4 λεπτά. Με την Faststart polymerase στην Hotstart PCR παρουσιάζεται μεγαλύτερη

αποδοτικότητα και δεν χρειάζεται παραπάνω χειρισμούς π.χ. επώαση για μεγάλο χρονικό διάστημα (Biochemica, 2001).

- **Pfu DNA polymerase:** είναι μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που έχει απομονωθεί από τον οργανισμό *Pyrococcus furiosus* και έχει την 3' προς 5' επιδιορθωτική ικανότητα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της για τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA μέχρι 5kb ή να αναμιχθεί με DNA πολυμεράσες που δεν έχουν την επιδιορθωτική ικανότητα και να χρησιμοποιηθούν για τον πολλαπλασιασμό μεγαλύτερων τμημάτων DNA (Promega, 2009).

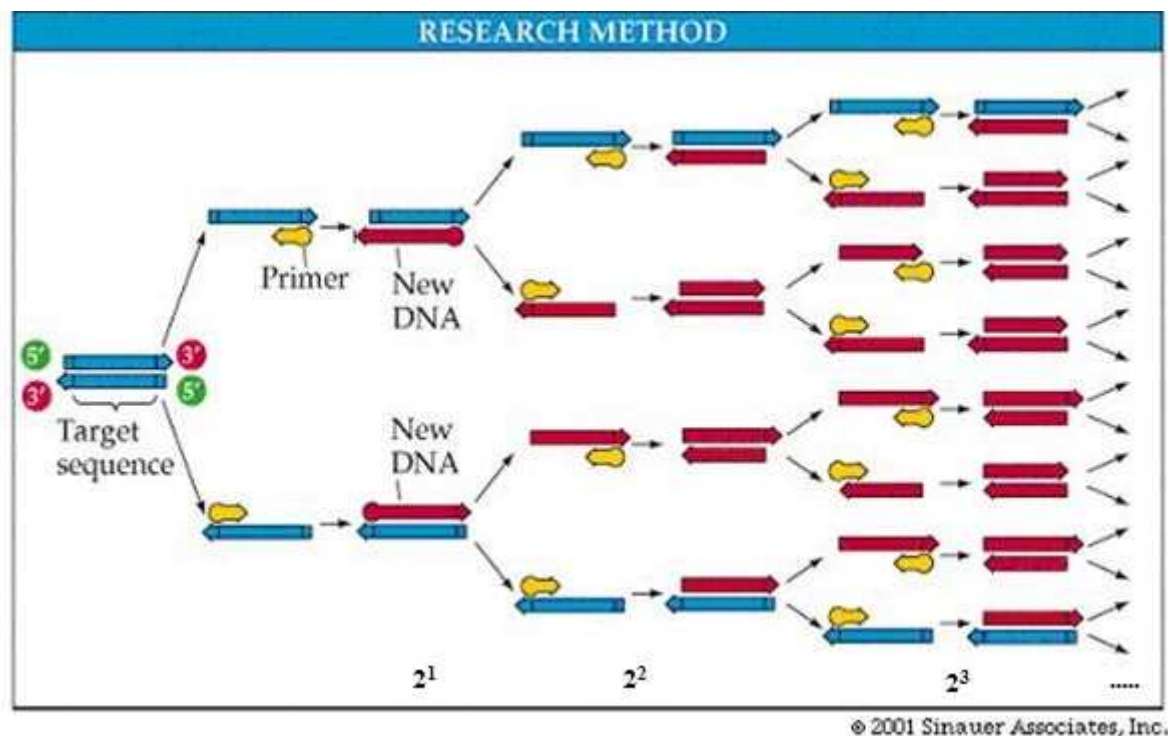
- **Vent polymerase:** είναι μία επίσης θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που έχει απομονωθεί από το *Thermococcus litoralis* και ονομάζεται αλλιώς Tli polymerase. Διαθέτει επίσης την 3' προς 5' επιδιορθωτική ικανότητα και χρησιμοποιείται συνήθως στην συμβατική PCR και στην RT-PCR (Promega, 2009).

- **Tth polymerase:** είναι θερμοανθεκτική πολυμεράση και έχει απομονωθεί από το *Thermus thermophilus*. Η Tth polymerase βοηθάει στην σύνθεση τμήματος DNA με την προσθήκη νουκλεοτιδίων με 5' προς 3' κατεύθυνση υπό την παρουσία MgCl₂, αλλά δεν διαθέτει την 3' προς 5' επιδιορθωτική ικανότητα. Μπορεί να χρησιμοποιήσει αλληλουχία RNA για την σύνθεση cDNA ή για RT-PCR (Promega, 2009).

Μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης που αφορά την PCR εκτός από τους εκκινητές, τις πολυμεράσες και το τμήμα DNA, υπάρχουν επίσης και: τα dNTP's τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates) που είναι απαραίτητα νουκλεοτίδια (ATP, TTP, CTP και GTP) για τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων, τα ιόντα μαγνησίου (Mg⁺⁺) που απαιτούνται για την ενζυματική δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης και ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για την διατήρηση του pH στις τιμές 7.5-8.0 (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Η διαδικασία της PCR μπορεί να ολοκληρωθεί σε αρκετούς κύκλους, συνήθως όμως 30 με 40 κύκλοι είναι αρκετοί για να συντεθούν εκατομμύρια αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA. Σε κάθε κύκλο πραγματοποιείται διπλασιασμός του αριθμού

των αντιγράφων του αρχικού τμήματος DNA και τα αντίγραφα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο (Εικ. 3).



Εικόνα 3. Παρουσίαση του τρόπου λειτουργίας της μεθόδου και εκθετικού πολλαπλασιασμού των προϊόντων (Sinauer Associates, Inc., 2001).

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων εφαρμόζεται η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης μαζί με μοριακούς δείκτες των οποίων τα μεγέθη θα είναι γνωστά (molecular markers). Έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την βαφή του Βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium bromide) το οποίο φθορίζει έντονα κάτω από υπεριώδεις ακτίνες UV όταν συγκεντρώνεται στις περιοχές DNA προϊόντων της PCR, εφόσον παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών των βάσεων του διπλόκλωνου DNA (Hunt, 2006). Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να ενσωματωθεί στη πηκτή αγαρόζης πριν την ηλεκτροφόρηση ή να εμβαπτιστεί η πηκτή σε διάλυμα του μετά την ηλεκτροφόρηση.

Πέρα όμως από την συμβατική (standard) PCR σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της, ορισμένες από τις οποίες είναι οι παρακάτω:

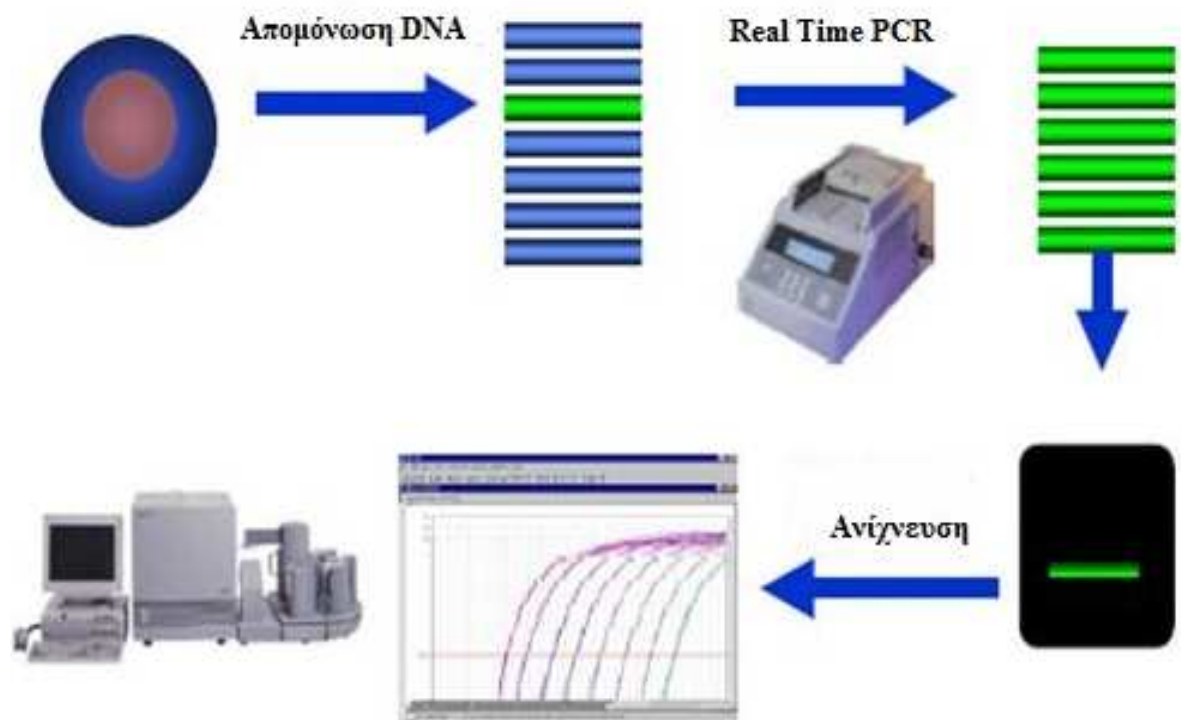
- **Multiplex PCR** : Είναι μια τεχνική που δίνει δυνατότητα εξέτασης πολλών αλληλουχιών-στόχων σε ένα μόνο δείγμα, χωρίς να απαιτούνται πολλές αντιδράσεις. Η Multiplex PCR επιτρέπει την χρήση πολλών διαφορετικών ζευγαριών εκκινητών σε μία μόνο αντίδραση καθώς και την χρήση πολλαπλών ιχνηλατών με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές για την διάκριση κάθε προϊόντος που θα παραχθεί από τους διάφορους εκκινητές της αντίδρασης. Χρησιμοποιείται για τη ανίχνευση διάφορων γενετικών ασθενειών και παθογόνων (Mackay, 2004).
- **Nested PCR** : Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιείται ένα ζευγάρι εκκινητών όπως στην συμβατική PCR, ενώ στην δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιούνται εκκινητές (nested primers) που ενώνονται σε τμήμα της αλληλουχίας του προϊόντος της πρώτης PCR. Τα προϊόντα της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιούνται ως αλληλουχία-στόχος για την δεύτερη. Το προϊόν που παράγεται από την δεύτερη αντίδραση είναι μικρότερου μεγέθους (Davidson, 2002).
- **Hotstart PCR**: Είναι μία μέθοδος στην οποία αλλάζει ο τρόπος που θερμαίνεται το διάλυμα της αντίδρασης στο πρώτο στάδιο του κύκλου (βλ. σελ. 12). Στην συμβατική PCR όταν αρχίζει η θέρμανση του διαλύματος η Taq πολυμεράση είναι ήδη ενεργή ενώ το τμήμα DNA δεν έχει αποδιαταχθεί ακόμα και έτσι υπάρχει η πιθανότητα να έχουμε ένωση των εκκινήτων μεταξύ τους (primer dimer formation) ή να προσδεθούν σε λάθος θέσεις (π.χ. μερικώς συμπληρωματικές αλληλουχίες με τις δικές τους). Με την μέθοδο της Hotstart PCR μπορούμε να θερμάνουμε πρώτα το διάλυμα στους 90-95 °C και μετά να προσθέσουμε την Taq πολυμεράση, αποφεύγοντας έτσι το φαινόμενο ένωσης μεταξύ των εκκινητών ή ανεπιθύμητων προϊόντων PCR (Promega, 2009).
- **Touchdown PCR**: Είναι άλλη μια μέθοδος που έχει ως σκοπό την αποφυγή δημιουργίας ανεπιθύμητων προϊόντων PCR. Για να επιτευχθεί, η πρόσδεση των εκκινητών κατά τους πρώτους κύκλους γίνεται σε θερμοκρασία 3-5°C πάνω από την τιμή αποδιάταξης (T_m) (βλ. σελ. 21) των εκκινητών, και ακολουθεί μια σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας πρόσδεσης εκκινητών στους επόμενους κύκλους (Korbie, 2008).

- **Reverse transcriptase PCR (RT-PCR):** Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση mRNA που προέρχεται από κάποιο ιστό. Θα πρέπει πρώτα να απομονωθεί το mRNA από τον ιστό και έπειτα να αντιγραφεί σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με την βοήθεια του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Στη συνέχεια ακολουθεί η συμβατική PCR. Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως στον έλεγχο και ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (Promega, 2009).
- **Long PCR:** Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός μεγάλων τμημάτων DNA (πολλών κιλοβάσεων). Για την μέθοδο αυτή γίνεται συνδυασμός δυο πολυμερασών, εκ των οποίων η πρώτη δεν έχει την 3' προς 5' επιδιορθωτική ικανότητα ενώ η δεύτερη την έχει. Με τον συνδυασμό των δύο πολυμερασών υπάρχει αύξηση της απόδοσης (Promega, 2009).
- **In situ PCR:** Η μέθοδος αυτή συνδιάζει την ευαισθησία της PCR με την τεχνική της *In situ* υβριδοποίησης και εφαρμόζεται σε ιστούς ή κύτταρα. Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται με σημασμένους ιχνηλάτες ή με σημασμένα νουκλεοτίδια και για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου θα πρέπει να γίνουν αλλαγές στις παραμέτρους της αντίδρασης (π.χ. στην συγκέντρωση του MgCl₂) (Promega, 2009).

Υπάρχουν και άλλες παραλλαγές της PCR όπως η **Real time PCR**, η οποία αναλύεται στη συνέχεια.

A.1.2. Η αρχή λειτουργίας της Real Time PCR

Η **Real Time PCR** αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο (Wikipedia, 2005). Συχνά αναφέρεται και με άλλες ονομασίες όπως **Quantitative real-time PCR (QRT-PCR)** ή **Kinetic PCR**, ενώ πολύ συχνά συγχέεται με την μέθοδο της Αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcription PCR) εξαιτίας της συντομογραφίας RT-PCR.



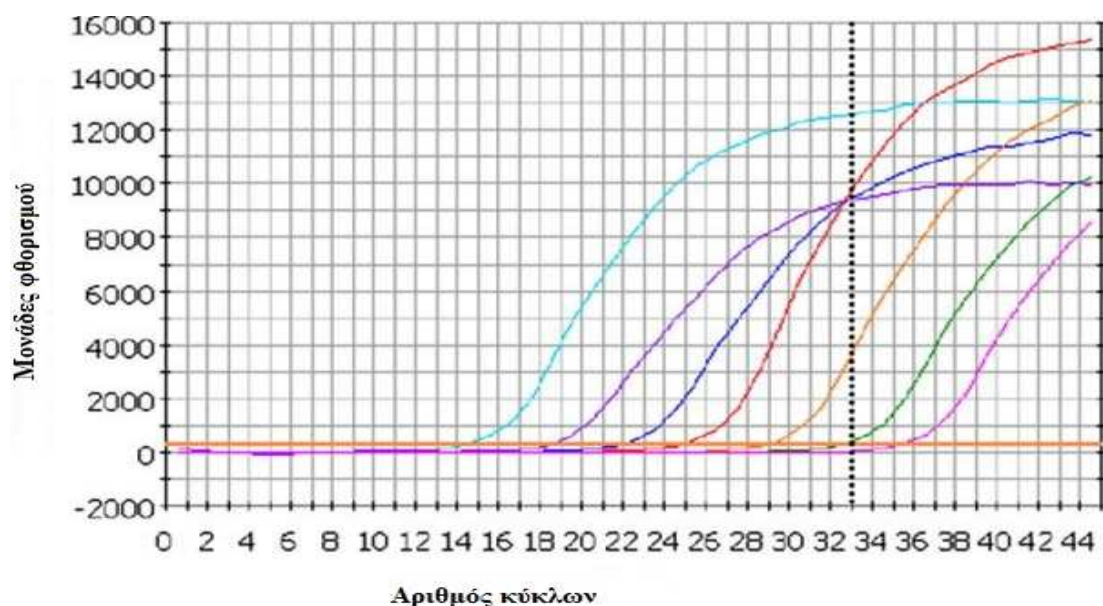
Εικόνα 4. Η διαδικασία της μεθόδου Real Time PCR. Ξεκινάει από την απομόνωση του DNA, συνεχίζει στην αντίδραση της Real Time PCR και τελειώνει με την ανίχνευση των προϊόντων (AppliedBiosystems, XX).

Με την Real Time PCR συνήθως επιδιώκεται ανάλυση DNA, είναι δυνατόν όμως να πραγματοποιηθεί ανάλυση και τμημάτων cDNA ή RNA αν συνδυάσουν οι μέθοδοι της Real time PCR με την μέθοδο της Reverse transcription PCR.

Παρόλο που η μέθοδος της Real time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της PCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα και σε μικρότερο χρόνο απ'ότι η PCR και δίνει την δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Εικ. 4) (Houghton et al, 2006). Το διάλυμα της αντίδρασης της Real Time PCR αποτελείται από τα ίδια αντιδραστήρια με αυτά της συμβατικής PCR έκτος από τους μηχανισμούς ανίχνευσης DNA που αφορούν την προσθήκη συγκεκριμένων χρωστικών (Houghton et al, 2006).

Τα δείγματα προς ανάλυση παρακολουθούνται με την βοήθεια αυτοποιημένου μηχανήματος ειδικού για την Real time PCR που είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή και

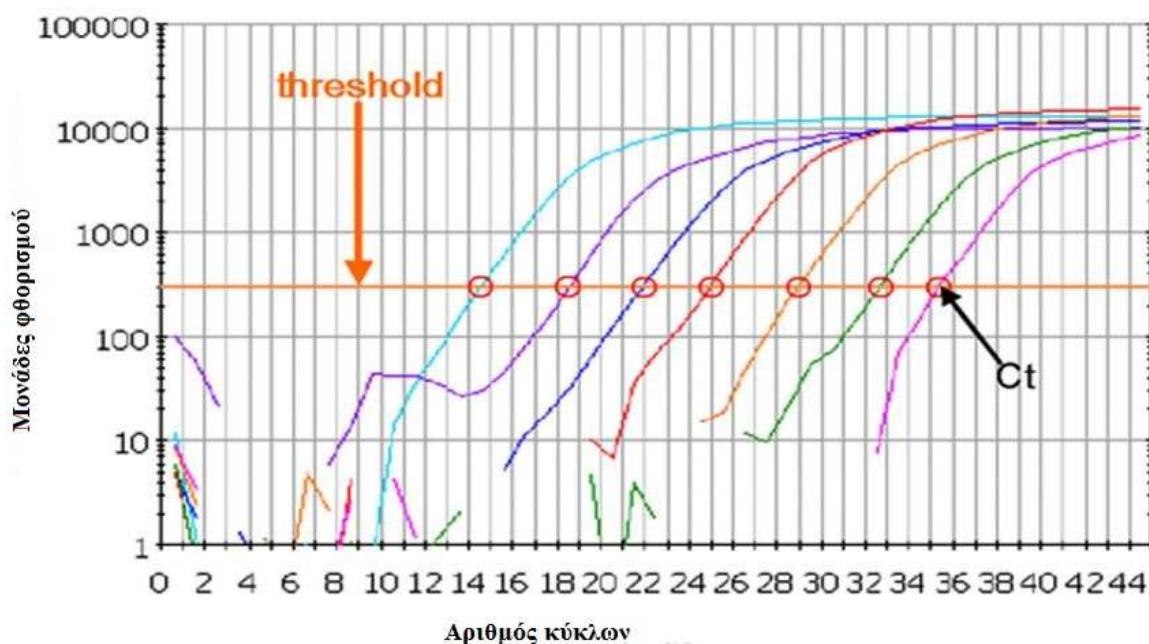
το οποίο παρέχει την δυνατότητα ανάλυσης και ποσοτικοποίησης του σήματος ανίχνευσης του DNA μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης (Εικ. 4, 5).



Εικόνα 5. Καταγραφή τιμών φθορισμού της χρωστικής SYBR Green που απεικονίζει την σταδιακή αύξηση της έντασης του φθορισμού σε σχέση με την αύξηση των αντιγράφων σε κάθε κύκλο (Hunt, 2006)

Στην Real time PCR η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA που παράγεται στην αντίδραση γίνεται με την σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια (fluorescent reporter molecule), στα πρώτα στάδια της αντίδρασης (εκθετική φάση). Τα μόρια αυτά εκπέμπουν φθορισμό, ο οποίος μετράται σε κάθε κύκλο και βοηθάει στη ποσοτικοποίηση του προϊόντος (Εικόνα 5). Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Stratagene, 2006).

Η γραμμή **Threshold** (Εικ. 6) είναι το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το φόντο, ενώ ο κύκλος κατά την διάρκεια του οποίου, το δείγμα φτάσει την γραμμή Threshold ονομάζεται **Threshold cycle (Ct)** ή **τιμή Ct** (Applied Biosystems, XX)



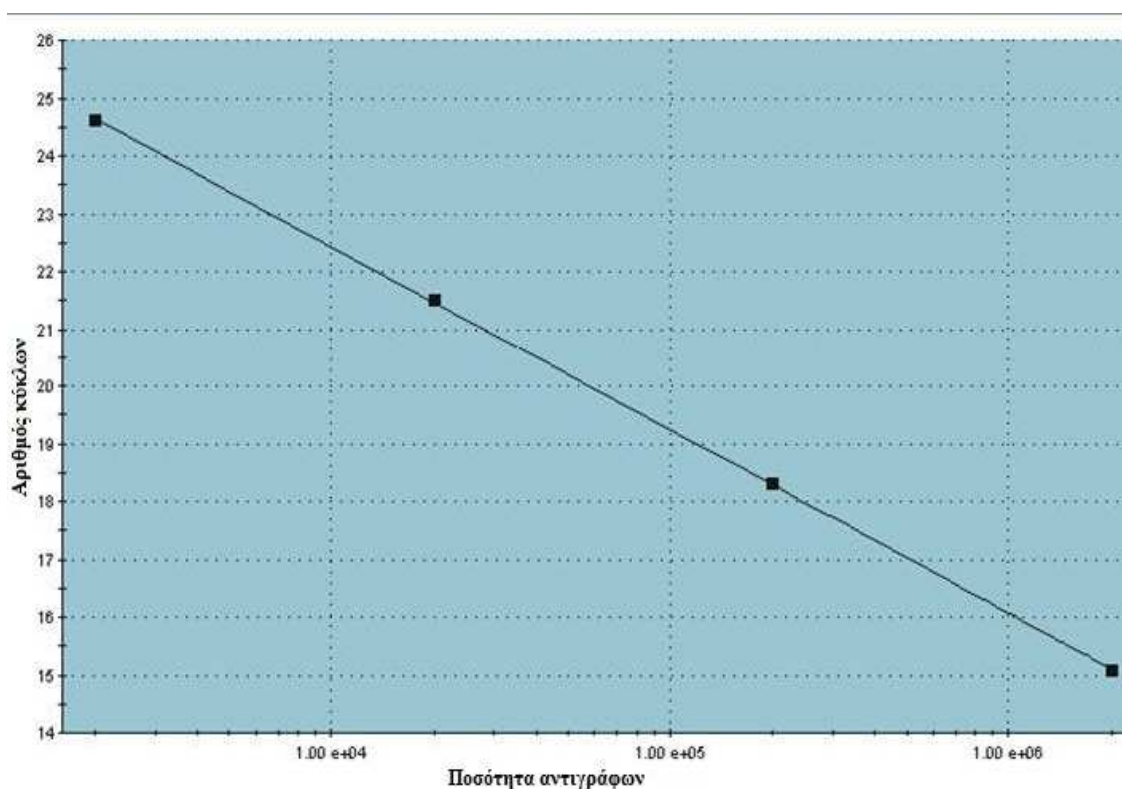
Εικόνα 6. Με την οριοθέτηση του σημείου threshold γίνεται πιο εύκολος ο προσδιορισμός της τιμής Ct, (Hunt, 2006)

Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct για κάθε δείγμα, δηλαδή αναλογικά η Ct θα είναι μικρότερη (Wong et al, 2005).

Ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος, αν δηλαδή απαιτείται να υπολογισθεί η σχετική ποσότητα DNA ή ο ακριβής αριθμός αντιγράφων, υπάρχουν δυο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης που μπορούν να επιλεγθούν. Οι μέθοδοι αυτές είναι: Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) και Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification) (Livak et al, 2001).

Η **Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification)** παρέχει την μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση δειγμάτων της Real time PCR και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητο για το πείραμα να μετρηθεί η ακριβής ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση μίας **καμπύλης αναφοράς (standard curve, Εικ. 7)**, με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να επιλέχθει μια γνωστή συγκέντρωση-μάρτυρα, που μπορεί να προέρχεται από DNA, γενωμικό DNA, RNA, cDNA, ανασυνδιασμένο

(recombinant) πλασμιδιακό DNA (recDNA) ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (Stratagene, 2006). Αυτή τη συγκέντρωση-μάρτυρα θα υποβληθεί σε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων και στη συνέχεια τα αραιωμένα δείγματα θα περάσουν από τις ίδιες συνθήκες της Real Time PCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα.



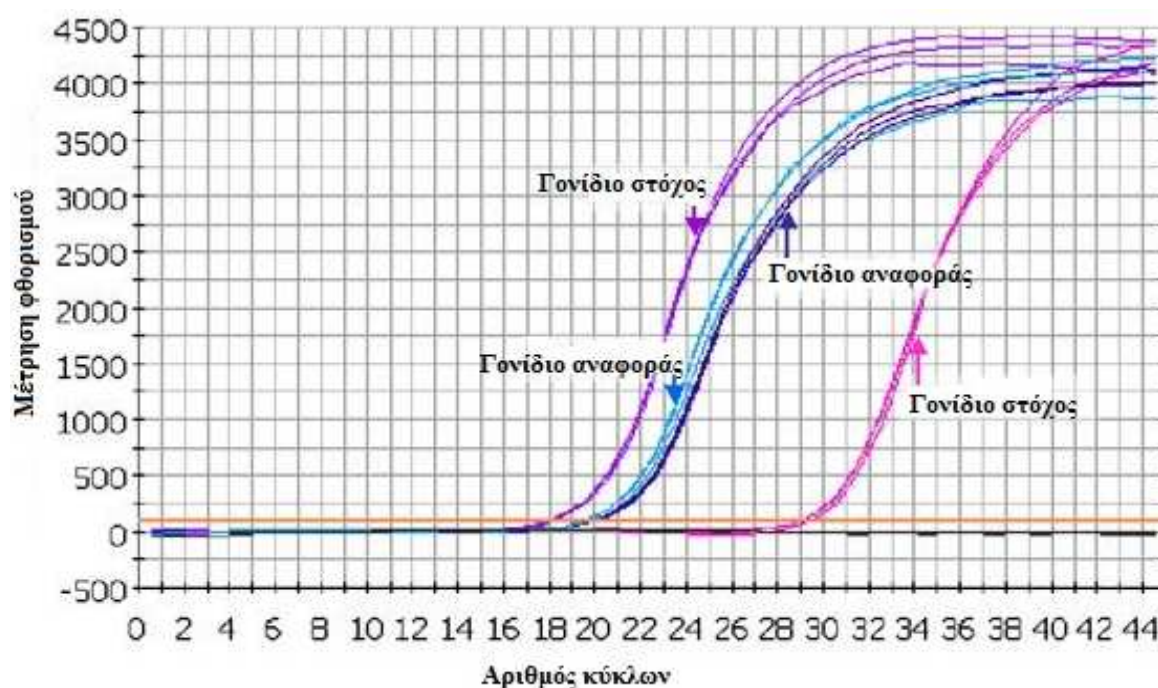
Εικόνα 7. Παράδειγμα καμπύλης αναφοράς (standard curve) που σχηματίζεται από τέσσερα σημεία, δηλαδή από τέσσερις αραιώσεις του αρχικού μάρτυρα (Stratagene, 2006).

Μετά το τέλος της αντίδρασης η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων του αρχικού μάρτυρα και τις Ct values της κάθε αραιώσης. Η καμπύλη αναφοράς πρέπει να βασίζεται σε τουλάχιστον 4 σημεία (γνωστής συγκέντρωσης) και θα πρέπει τα σημεία αυτά να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Στην περίπτωση που δεν καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων τότε μπορεί η ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη δειγμάτων να μην είναι αξιόπιστη (Stratagene, 2006). Στη συνέχεια μπορεί με την βοήθεια της συσκευής της Real time PCR να γίνει σύγκριση των τιμών Ct των

πειραματικών δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και έτσι να ποσοτικοποιηθούν τα άγνωστα δείγματα (Stratagene, 2006).

Η **Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification)** είναι πιο εύκολη στη χρήση της σε σχέση με την απόλυτη ποσοτικοποίηση και με την μέθοδο αυτή δεν είναι απαραίτητη η χρήση της καμπύλη αναφοράς.

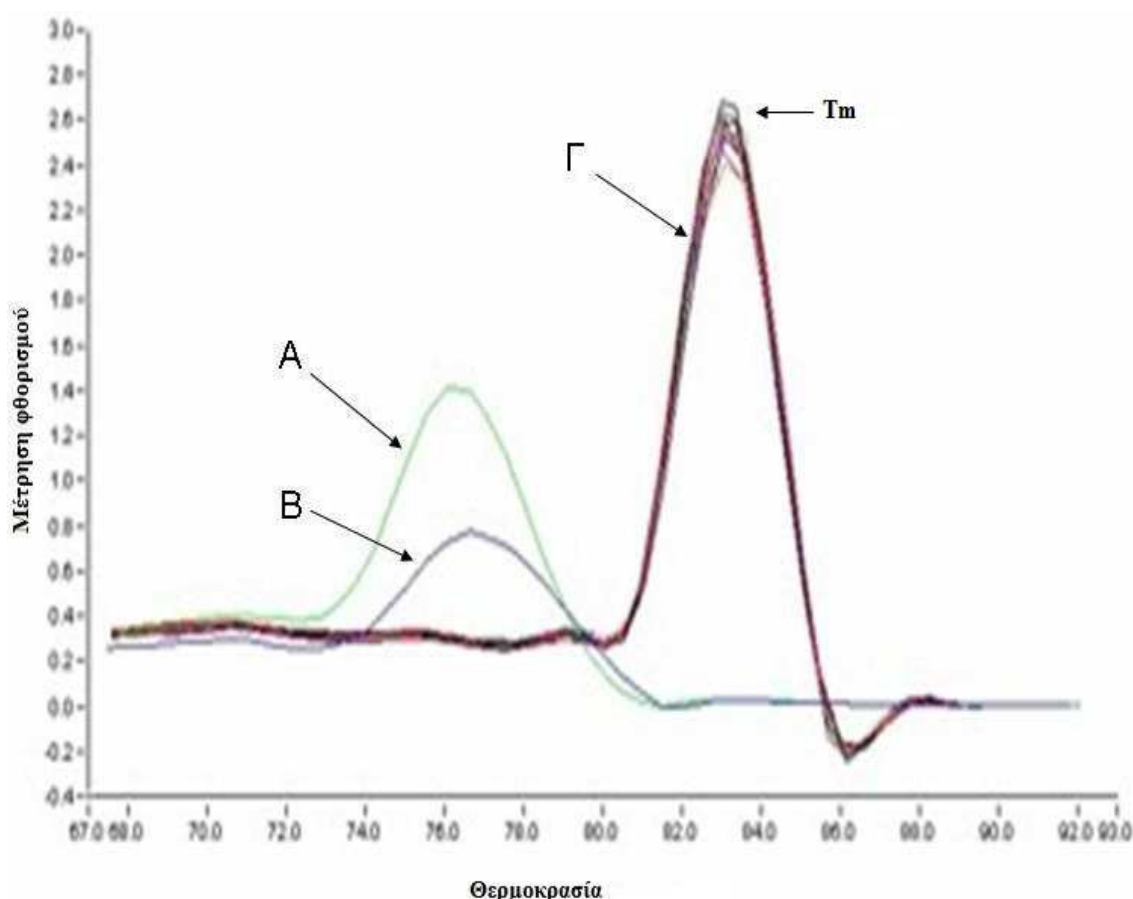
Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπο μελέτη γονιδίου μετά από αλυσιδωτή ενίσχυση με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή control gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση (Pfaffl, 2002) (Εικόνα 8). Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουμε την έκφραση του υπο μελέτη γονιδίου σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (π.χ. το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl), (Pfaffl, 2002).



Εικόνα 8. Σύγκριση καμπύλης του υπο μελέτη γονιδίου (γονίδιο στόχος) με το γονίδιο αναφοράς (reference gene) (Hunt, 2006).

Μια ακόμα δυνατότητα που παρέχει η τεχνολογία της Real Time PCR είναι η κατασκευή **καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve ή Dissociation curve)** με την οποία μπορούν να αξιολογηθούν τα προϊόντα της αντίδρασης, να δούμε δηλαδή αν τα

προϊόντα που παρήχθησαν είναι αυτά που θέλουμε ή όχι. Η καμπύλη αυτή βασίζεται στην **θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature ή Tm)** των προϊόντων της αντίδρασης (Houghton et al, 2006).



Εικόνα 9. Παράδειγμα καμπύλης αποδιάταξης στην οποία εμφανίζονται τρεις διαφορετικές κορυφές (A, B και Γ). Η υψηλότερη κορυφή (Γ) αντιστοιχεί στην θερμοκρασία αποδιάταξης του επιθυμητού προϊόντος. Οι κορυφές A και B αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης από αυτή της κορυφής Γ (Lee et al, XX).

Η Tm είναι η θερμοκρασία στην οποία αποδιατάσσεται το κάθε τμήμα DNA και εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA. Τα προϊόντα της αντίδρασης θα πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, εκτός και αν υπάρχει επιμόλυνση ή τμήματα που προέρχονται από ένωση μεταξύ των εκκινητών ή τμήματα που προέρχονται από τοποθέτηση των εκκινητών σε παρόμοιες συμπληρωματικές

αλληλουχίες (mispriming) (Hunt, 2006). Εάν τα προϊόντα έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης τότε θα εμφανιστεί μια κορυφή στην καμπύλη, ενώ στην περίπτωση που ανάμεσα στα προϊόντα υπάρχουν και τμήματα διαφορετικού μεγέθους, τότε θα παρατηρηθούν στην καμπύλη και άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης (T_m) (Εικόνα 9), επειδή για κάθε προϊόν η αποδιάταξη γίνεται σε διαφορετική θερμοκρασία.

Η μεθοδολογία της εφαρμογής της αντίδραση της Real Time PCR θα πρέπει να περιλαμβάνει πάντα και αρνητικούς μάρτυρες (κενά DNA) μαζί με άγνωστα δείγματα προς ανάλυση. Τα αρνητικά αυτά δείγματα αφορούν την εφαρμογή κανονικής αντίδρασης με χρήση όλων των υλικών της PCR πλην της προσθήκης του DNA (όπως στην περίπτωση της αντίδρασης των αγνώστων δειγμάτων). Συνήθως χρησιμοποιείται νερό αντί του αντίστοιχου όγκου DNA, για να εξεταστεί η περίπτωση επιμόλυνσης του διαλύματος της αντίδρασης PCR του αγνώστου δείγματος υπό εξέταση με DNA άλλου οργανισμού.

A.1.3. Οι διαφορές μεταξύ PCR και Real Time PCR.

Παρόλο που η Real Time PCR είναι παραλλαγή της PCR υπάρχουν ορισμένες βασικές διαφορές στον τρόπο που λειτουργούν οι δύο μέθοδοι. Η PCR είναι μια κυρίως ποιοτική μέθοδος που δεν μπορεί να εκφράσει τα αποτελέσματα της αντίδρασης με συγκεκριμένα νούμερα, ενώ με την Real Time PCR μπορεί να γίνει ακριβή ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης. Τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR μπορούν να ελεγχθούν μόνο μετά το τέλος της διαδικασίας και αφού πρώτα γίνει ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων σε πηκτη αгарόζης (Hunt, 2006). Ενώ η Real Time PCR επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας των προϊόντων οποιαδήποτε στιγμή μέσω κάμερας που διαθέτει η συσκευή της Real Time PCR, κάνοντας επισπεύδοντας την διαδικασία. Η κάμερα αυτή καταγράφει τον φθορισμό που εκπέμπουν τα προϊόντα που σχηματίζονται και στην συνέχεια δίδει τα δεδομένα στον υπολογιστή με τον οποίο είναι συνδεδεμένη η συσκευή (Houghton et al, 2006).

Άλλη μια διαφορά είναι η φάση κατά την οποία γίνεται η ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης. Στην PCR η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται στην φάση

του plateau (Εικόνα 2Γ), όταν δηλαδή η αντίδραση βρίσκεται στο τέλος της διαδικασίας και έχει αρχίσει να μειώνεται ο ρυθμός δημιουργίας αντιγράφων, λόγω ελάττωσης των αντιδραστηρίων και μειωμένης δραστηριότητας της Taq πολυμεράσης. Αντίθετα στην Real Time PCR τα προϊόντα ανιχνεύονται κατά την διάρκεια της εκθετικής (exponential) φάσης (Εικ. 2Α), όπου τα αποτελέσματα είναι πιο ακριβή (Gachon et al., 2004).

Ακόμα στο διάλυμα της Real Time PCR προστίθεται συγκεκριμένη χρωστική ουσία όπως π.χ. (SYBR Green I ή probes) που αποτελεί και τον μηχανισμό ανίχνευσης για την παρακολούθηση της αντίδρασης μέσω καταλληλού ανιχνευτή της ακτινοβολίας της χρωστικής, ενώ στην PCR η ανίχνευση προϊόντων γίνεται με την προσθήκη του Ethidium bromide στη πηκτή αγαρόζης, μετά δηλαδή την ολοκλήρωση της αντίδρασης (Hunt, 2006).

Μια τελευταία διαφορά είναι ότι με την Real Time PCR είναι δυνατό να μπορούμε να αξιολογίσουμε αν τα προϊόντα της αντίδρασης προέρχονται όντως από το τμήμα DNA που χρησιμοποιήθηκε ως στόχος, με την βοήθεια της Melting curve (βλ. σελ. 21), ενώ η PCR δεν έχει τέτοια δυνατότητα (Houghton et al, 2006).

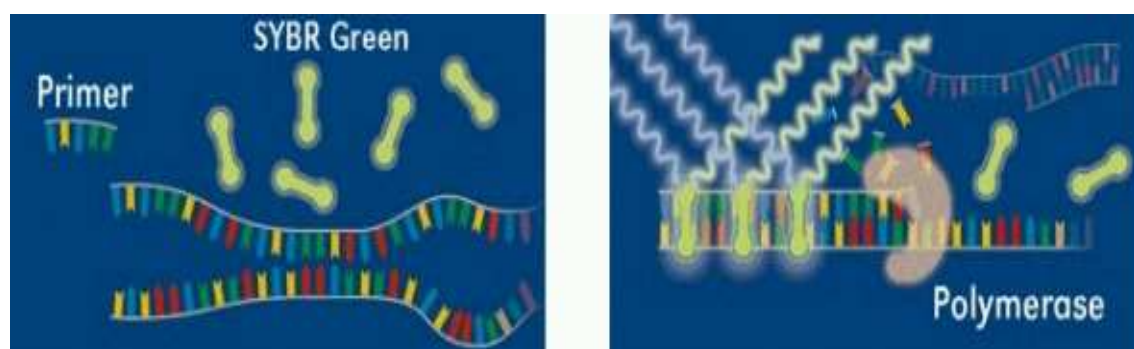
A.1.4. QPCR και οι διαφορετικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται.

Η **Quantitative PCR (QPCR)** ή αλλιώς ποσοτική PCR χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της ποσότητας της αλληλουχίας DNA μέσα στο δείγμα. Η ποσότητα προϊόντος που ανιχνεύεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης σχετίζεται άμεσα με την αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στόχου μέσα στο δείγμα. Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθούν ποσότητες DNA ή RNA. Στην QPCR υπάρχουν δύο μέθοδοι ανίχνευσης που μπορούν να εφαρμοστούν για την σήμανση των προϊόντων της Real time PCR (Vandesompele, XX). Η μια μέθοδος βασίζεται στην χρήση χρωστικών που παρεμβάλλονται μεταξύ ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA (**DNA binding dyes**) π.χ. SYBR Green I, και η άλλη στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων-ιχνηλατών (**probes**). Οι μεθοδολογίες αυτές περιγράφονται παρακάτω.

Α) Η χρωστική **SYBR Green I** όταν παρεμβάλλεται σε δίκλωνο DNA τότε φθορίζει έντονα πράσινο χρώμα, ενώ όταν βρίσκεται ελεύθερη μέσα στο διάλυμα

εμφανίζει σχετικά χαμηλό φθορισμό (Εικόνα 10). Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται ως αναλογική συνάρτηση της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA στο διάλυμα (Stratagene, 2006). Η μέθοδος είναι εύκολη στη χρήση της και έχει μικρό κόστος, γι' αυτό και προτιμάται από τους ερευνητές.

Ένα μειονέκτημα της SYBR Green I είναι ότι δεν παρουσιάζει εξειδίκευση και μπορεί να δεθεί με ένα οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA (Εικ. 10), ακόμα και σε τμήμα που δημιουργήθηκε από ένωση των εκκινητών μεταξύ τους (εσφαλμένος διμερισμός εκκινητών, primer-dimer artifacts). Έτσι δεν είναι δυνατόν η χρήση της SYBR Green I να πιστοποιήσει ότι το σήμα που εκπέμπεται αντιστοιχεί στην συγκέντρωση των αντιγράφων της αλληλουχίας DNA που μας ενδιαφέρει (Houghton et al, 2006).



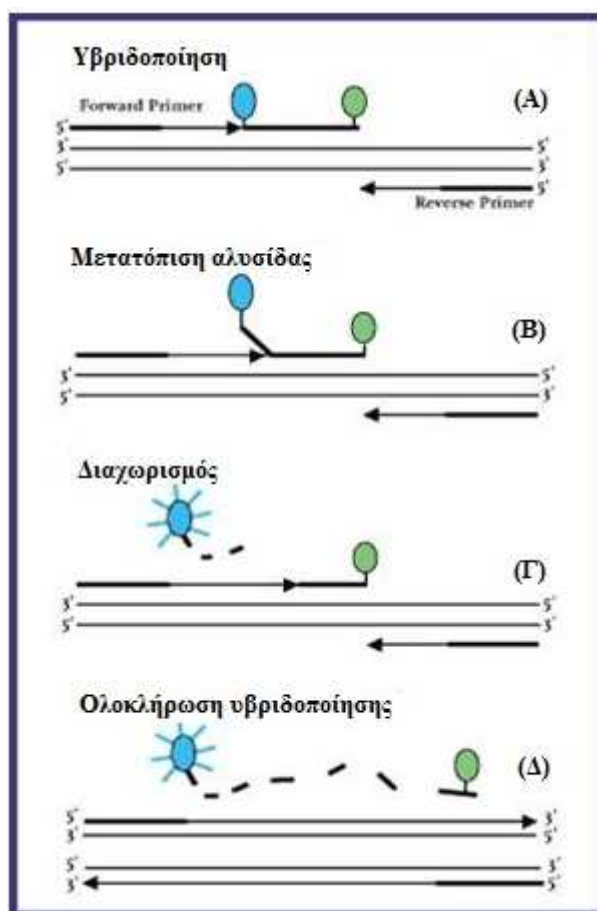
Εικόνα 10. Τρόπος λειτουργίας της μεθόδου Real Time PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I (Lee et al, XX).

Ένας τρόπος για να ελεγχθεί η ύπαρξη διαφορετικών προϊόντων στην αντίδραση της Real Time PCR είναι η καμπύλη αποδιάταξης (**Melting curve**, βλ. σελ.21) (Wong et al, 2005).

B) Η μέθοδος των ολιγονουκλεοτιδίων-ιχνηλατών (**molecular-probes**) παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια και εξειδίκευση σε σχέση με την μέθοδο της SYBR Green I. Ο ιχνηλάτης (probe) έχει συνδεδεμένη στο ένα άκρο του μια **φθορίζουσα χρωστική (fluorophore)** και στο άλλο άκρο έχει συνδεδεμένο ένα **μόριο-αποσβέστη** του φθορισμού (**quencher**) και σχεδιάζεται με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA-στόχου έτσι ώστε να υβριδοποιείται μόνο αν εντοπίσει την αλληλουχία της

επιλογής μας μέσα στην αντίδραση και στην περίπτωση που δεν την εντοπίσει να μην φθορίζει καθόλου (Stratagene, 2006). Η εκπομπή φθορίζοντος σήματος από τους ιχνηλάτες γίνεται με τον διαχωρισμό της φθορίζουσας χρωστικής (fluorophore) από το μόριο-αποσβέστη (quencher) κατά την υβριδοποίηση του ιχνηλάτη στην αλληλουχία-στόχο (Gibson, 2006). Ενώ όσο παραμένουν ενωμένοι η φθορίζουσα χρωστική και ο αποσβέστης φθορισμού πάνω στον ιχνηλάτη δεν υπάρχει εκπομπή φθορίζοντος σήματος, διότι ο φθορισμός της φθορίζουσας χρωστικής απορροφάται από το μόριο-αποσβέστη (Stratagene, 2006). Ένα ακόμα πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η δυνατότητα της σήμανσης ιχνηλατών με διαφορετικές χρωστικές. Συνδυάζοντας τις χρωστικές αυτές είναι δυνατό να ανιχνευθούν περισσότερες από μία αλληλουχίες σε μία μόνο αντίδραση, ενώ ένα μειονέκτημα είναι το υψηλό κόστος της μεθόδου. Υπάρχουν διάφορα είδη τέτοιων ιχνηλατών που χρησιμοποιούνται: 1) γραμμικοί ιχνηλάτες (linear probes), 2) ιχνηλάτες με δευτεροταγή δομή (structured probes), 3) ιχνηλάτες τύπου σκορπιού (Scorpion probe) και 4) οι ιχνηλάτες τύπου FRET (fluorescence resonance energy transfer).

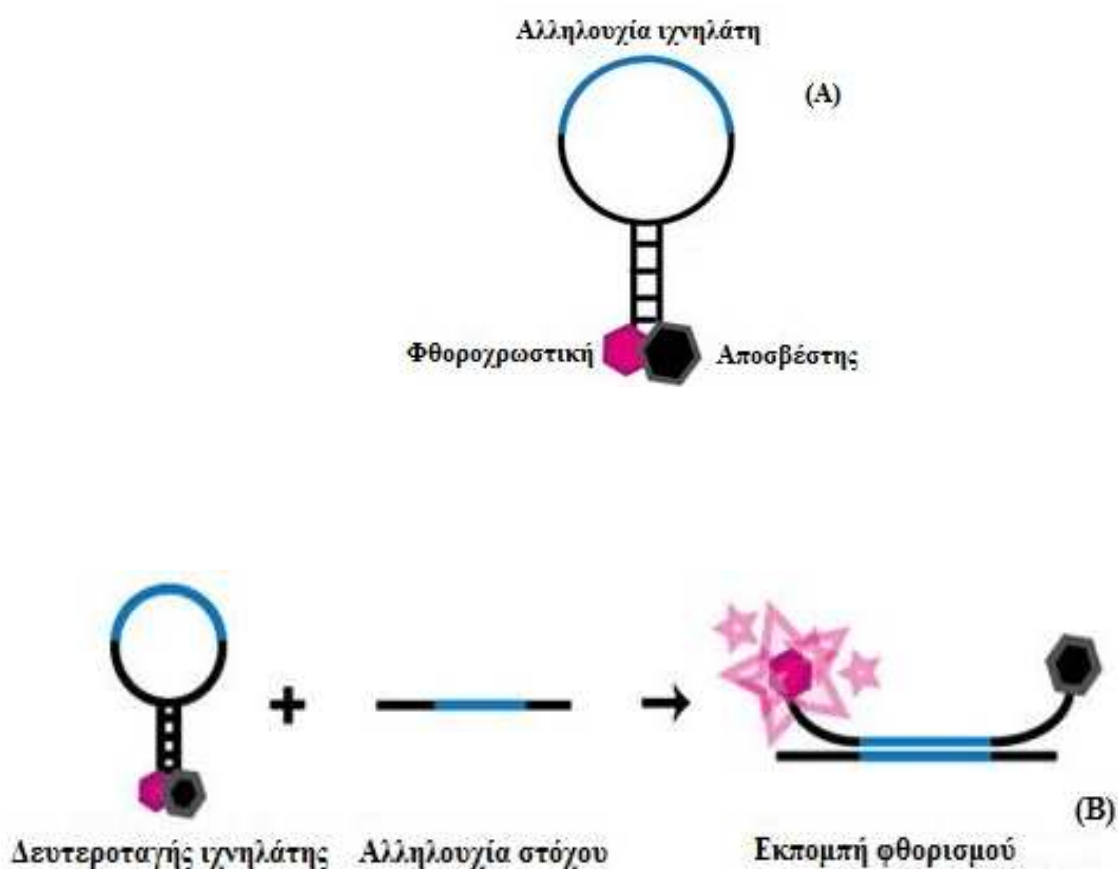
1) Οι γραμμικοί ιχνηλάτες (hydrolysis ή TaqMan probes) είναι ολιγονουκλεοτίδια 20-30 βάσεων και είναι πιο διαδεδομένοι σε σχέση με τους άλλους τύπους ιχνηλατών. Φέρουν στο 5' άκρο τους μια φθορίζουσα χρωστική (fluorophore), όπως π.χ. 6-carboxyfluorescein (FAMTM), tetrachlorofluorescein (TETTM), McGown et al, 2000) κ.α. και στο 3' άκρο ένα μόριο-αποσβέστη του φθορισμού (quencher, όπως π.χ. tetramethylcarboxyrhodamine (TAMRATM), Weller, 2000) (Εικ. 11). Ο ιχνηλάτης συνδέεται στην έλικα του DNA μετά το σημείο που έχει τοποθετηθεί ο εκκινητής. Κατά την επέκταση των εκκινητών όταν η Taq πολυμεράση φτάσει στον ιχνηλάτη (Εικ. 11 Β) και εξαιτίας της επιδιορθωτικής ικανότητας (3' προς 5' εξωνουκλεολυτικής δράσης της Taq πολυμεράσης) θα ελευθερωθεί η φθορίζουσα χρωστική στο διάλυμα (Εικ. 11 Γ, Δ). Όσο παραμένουν ενωμένα η φθορίζουσα χρωστική και ο αποσβέστης δεν ανιχνεύεται καθόλου σήμα (Εικ. 11Α, Stratagene, 2006). Κάποια από τα μειονεκτήματα των γραμμικών ιχνηλατών είναι η δυσκολία σχεδιασμού του ιχνηλάτη, καθώς και το υψηλό κόστος (Houghton et al, 2006).



Εικόνα 11. Τρόπος λειτουργίας ενός γραμμικού ιχνηλάτη: (Α) Υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία DNA, (Β) Υβριδοποίηση του ιχνηλάτη, (Γ) Διαχωρισμός της φθορίζουσας χρωστικής από το μόριο αποσβέστη και (Δ) Εκπομπή του φθορίζον σήματος (Gloffke, 2003).

2) Οι ιχνηλάτες με δευτεροταγή δομή (π.χ. Molecular Beacons) έχουν την μορφή «έμμισχης-θηλιάς» που μοιάζει με φουρκέτα. Η αλληλουχία που είναι μέσα στην θηλιά είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία του DNA στόχου που μας ενδιαφέρει, ενώ το τμήμα του μίσχου (τμήμα δίκλωνης αλυσίδας) αποτελείται από συμπληρωματικές αλληλουχίες (Εικ. 12 Α). Το ένα άκρο, όπως και στους γραμμικούς ιχνηλάτες, έχει μια φθοροχρωστική (fluorophore) και το άλλο έχει έναν αποσβέστη φθορισμού (quencher) και όσο βρίσκονται σε μικρή απόσταση δεν φθορίζουν (Εικ. 12 Α). Ο μηχανισμός των Molecular Beacons δεν στηρίζεται στην 3' προς 5' δράση εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης όπως οι

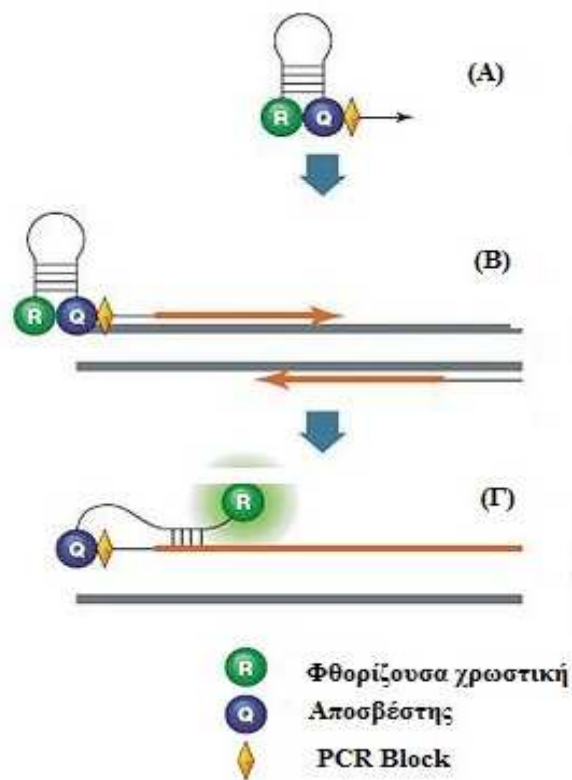
γραμμικοί ιχνηλάτες προκειμένου να ελευθερωθεί η φθορίζουσα χρωστική στο διάλυμα (Stratagene, 2006), αλλά στις υψηλές θερμοκρασίες που δημιουργούνται κατά την διάρκεια της αντίδρασης (Espy et al, 2006). Σε υψηλές θερμοκρασίες ο ιχνηλάτης συνδέεται με την αλληλουχία-στόχο και τότε η θηλιά ανοίγει, τα δυο άκρα της απομακρύνονται και εμφανίζεται το σήμα φθορισμού (Εικ. 12B).



Εικόνα 12. (A) Δομή ιχνηλάτη με δευτεροταγή μορφή (Molecular Beacons), (B) Τρόπος λειτουργίας του ιχνηλάτη μέσα στην αντίδραση (Wikipedia, 2007).

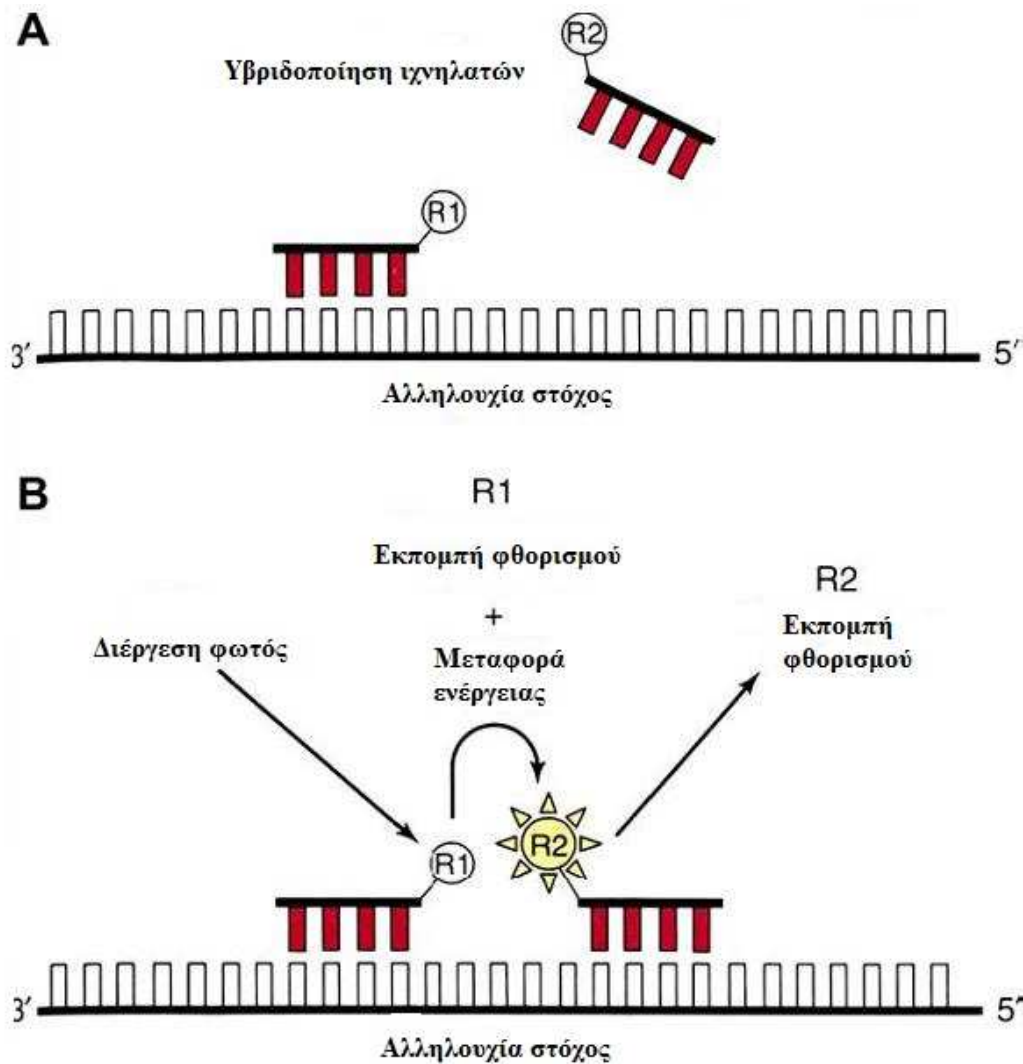
3) Ο μηχανισμός των ιχνηλατών τύπου Σκορπιού (**Scorpion probes**) έχει παρόμοια λειτουργία με αυτή των Molecular Beacons. Έχουν και αυτοί μια έμμισηχη-θηλιά, η οποία είναι ενσωματωμένη στον ένα εκκινητή (Εικ. 13). Η φθορίζουσα χρωστική είναι στο 5' άκρο του εκκινητή και το 3' άκρο είναι

συμπληρωματικό στην αλληλουχία-στόχο, ενώ ο αποσβέστης (quencher) βρίσκεται ανάμεσα στον εκκινητή και το ιχνηλάτη probe (Arya et al, 2005).



Εικόνα 13. Δείγμα δομής και λειτουργίας του ιχνηλάτη τύπου Σκορπιού. (Α) Δομή του ιχνηλάτη, (Β) Κατά την αποδιάταξη των αλυσίδων ο εκκινητής που είναι ενωμένος με τον ιχνηλάτη ενώνεται με την αλληλουχία στόχο και επιμηκύνεται, (Γ) Ανοίγει η δομή του ιχνηλάτη και απομακρύνεται η φθοροχρωστική από τον αποσβέστη, εκπέμποντας έτσι σήμα (Bio-Rad, 2010).

4) Για την υβριδοποίηση τύπου FRET χρειάζονται δύο εκκινητές αλλά και δύο ιχνηλάτες. Οι ιχνηλάτες τύπου FRET έχουν σημειωθεί με διαφορετικές χρωστικές και όταν υβριδοποιούνται στην αλληλουχία στόχο βρίσκονται ανάμεσα στους εκκινητές. Ο ένας ιχνηλάτης φέρει μια φθορίζουσα χρωστική δότη στο 3' άκρο ενώ ο άλλος φέρει μια φθορίζουσα χρωστική αποδέκτη στο 5' άκρο (Εικ. 14, Α). Όταν οι δύο ιχνηλάτες υβριδοποιηθούν ο ένας δίπλα στον άλλο τότε ενέργεια φθορισμού μεταφέρεται από το δότη στον αποδέκτη και έτσι γίνεται εκπομπή του φθορίζοντος σήματος που μετράται (Εικ. 14 Β, Houghton et al, 2006).



Εικόνα 14. Α) Τρόπος υβριδισμού πάνω στην αλληλουχία στόχος και Β) Τρόπος λειτουργίας των ιχνηλατών FRET (Houghton et al,2006).

A.1.5. Εφαρμογές της Real time PCR.

Οι τομείς στους οποίους μπορεί να εφαρμοστεί η Real Time PCR δεν διαφέρουν πολύ από αυτούς της συμβατικής PCR. Η μέθοδος της Real time PCR εφαρμόζεται ευρέως στην έρευνα της μοριακής βιολογίας και της ιατρικής εξαιτίας της μεγάλης ακρίβειας αλλά και αποδοτικότητας που παρουσιάζει ως μέθοδος. Στον χώρο της ιατρικής η Real time PCR εφαρμόζεται συχνά για την διάγνωση λοιμωδών ασθενειών

που οφείλονται σε συγκεκριμένους ιούς, βακτήρια, μύκητες ή παράσιτα, όπως είναι η φυματίωση, που προκαλείται από το μυκοβακτηρίδιο *Mycobacterium tuberculosis*, ο ιός Epstein-Barr (EBV), ο ιός ηπατίτιδα τύπου Β (HBV) καθώς και για την ανίχνευση και παρακολούθηση ιικού φορτίου (π.χ. HIV) σε άτομα φορείς (Espy et al., 2006). Με την Real time PCR υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης και ανάλυσης γονιδιακών μεταλλάξεων που σχετίζονται με γενετικές ανωμαλίες, με κληρονομικές ασθένειες αλλά και ασθένειες όπως διάφοροι τύποι καρκίνου (Gibson et al., 2006). Ένα παράδειγμα γονιδιακής μετάλλαξης (πολυμορφισμού) που αναλύεται με την Real time PCR είναι το Single Nucleotide Polymorphism (SNP), που οφείλεται στην αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου σε ένα γονίδιο (Gibson et al., 2006) και είναι η πιο συχνή μορφή μετάλλαξης που συναντάται, ενώ μια μορφή καρκίνου που μελετάται με την ίδια μέθοδο είναι η λευχαιμία (Houghton, 2006). Ένας άλλος τομέας στον οποίο η μέθοδος της Real time PCR έχει εφαρμογές είναι αυτός της βιομηχανίας τροφίμων όπου χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ασφάλειας τροφίμων. Σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης γίνεται στα τρόφιμα έλεγχος για περίπτωση νοθείας, περιεκτικότητα σε αλλεργιογόνες ή τοξικές ουσίες (Gibson, 2006), επιμόλυνση φυτών από παθογόνα π.χ. μόλυνση φυτών πατάτας και ginger από το *Ralstonia solanacearum* (Kutin et al., 2009) καθώς και για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMOs) σε επιμολυσμένα τρόφιμα. Άλλες εφαρμογές της μεθόδου της Real time PCR είναι η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (gene expression), η επαλήθευση δεδομένων από μικροστοιχείες γονιδίων (microarray data, Gibson, 2006), και ο έλεγχος των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMOs).

A.2. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.

A.2.1. Τι είναι οι Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί.

Οι Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί (ΓΤΟ) είναι οργανισμοί που έχουν υποστεί αλλαγή στο γενετικό τους υλικό (DNA) με μη φυσικό τρόπο (Βαρζάκας και

Αρβανιτογιάννης, 2006). Άλλη ονομασία των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών είναι «διαγονιδιακοί οργανισμοί», ενώ στους καταναλωτές είναι περισσότερο γνωστοί με τον όχι ορθό όρο, «μεταλλαγμένοι».

Η γενετική τροποποίηση του DNA ενός οργανισμού επιτυγχάνεται με την προσθήκη DNA από κάποιο άλλο οργανισμό ή με την τροποποίηση του γενετικού υλικού του ίδιου του οργανισμού (π.χ. αφαίρεση ή τροποποίηση ενδογενών γονιδίων του οργανισμού) και έχει ως στόχο την δημιουργία οργανισμών με νέα και επιθυμητά χαρακτηριστικά (π.χ. φυτά με ανθεκτικότητα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, μικρόβια που συνθέτουν νεους μεταβολίτες) (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Γενετική τροποποίηση μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους ζώντες οργανισμούς όπως φυτά, ζώα, μικροοργανισμούς (π.χ. βακτήρια, ζύμες) και ιούς. Η κατασκευή γενετικά τροποποιημένων οργανισμών γίνεται με τις μεθόδους της Γενετικής Μηχανικής (τεχνολογία ανασυνδιασμένου DNA) και γενικότερα της μοριακής Βιοτεχνολογίας. Σε αντίθεση με την κλασσική γενετική, με την οποία είναι δυνατή η ανταλλαγή γενετικού υλικού μόνο μεταξύ συγγενών ειδών ή οργανισμών του ίδιου είδους, η τεχνολογία της γενετικής τροποποίησης μας δίνει την δυνατότητα μεταφοράς «ετερόλογου» γενετικού υλικού (DNA) μεταξύ οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικές ποικιλίες ή ακόμα και μεταξύ οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικά είδη (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Ορισμένες τεχνικές με τις οποίες μπορεί να εισαχθεί DNA οργανισμούς είναι: 1) η χρήση φορέων κλωνοποίησης, 2) η μικροέγχυση ή μακροέγχυση DNA και 3) η ηλεκτροδιάτρηση (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Ο πρώτος γενετικά τροποποιημένος μικροοργανισμός (βακτήριο) επιτεύχθηκε το 1973 (Wikipedia, 2007), ενώ γενετική τροποποίηση φυτών επιτεύχθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του '80 (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

A.2.2. Που χρησιμοποιούνται και γιατί υπάρχει ανάγκη ανίχνευσης.

Οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί είτε είναι φυτά, ζώα ή μικροοργανισμοί παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών. Χρησιμοποιούνται στον χώρο της έρευνας, της αγροτικής, περιβαλλοντικής βιοτεχνολογίας και της

ιατρικής, με σκοπό την παραγωγή φαρμάκων, εμβολίων, βελτιωμένων τροφίμων και βελτιωμένων ποικιλιών φυτών.

Οι γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται συνήθως στην ιατρική, την αγροτική βιοτεχνολογία καθώς και στην παραγωγή τροφίμων. Ορισμένα παραδείγματα τέτοιων μικροοργανισμών είναι: βακτήρια που παράγουν πρωτεΐνες απαραίτητες στον άνθρωπο όπως ινσουλίνη (αντιμετώπιση διαβήτη) (Singer, 2010) και η ιντερφερόνη καθώς και ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυριού (π.χ. χυμοσίνη) (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006) αλλά και σε πολλές άλλες δραστηριότητες. Άλλα βακτήρια χρησιμοποιούνται (πειραματικά) για την απορρύπανση του εδάφους και την διευκόλυνση της ανάπτυξης καλλιέργειας αλλά δεν έχουν χρησιμοποιηθεί εκτός εργαστηρίου (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Η γενετική τροποποίηση στα ζώα γίνεται με στόχο την ταχύτερη ανάπτυξη (π.χ. ΓΤ σολωμός), την ανθεκτικότητα σε ασθένειες και την επιβίωση σε αντίξοες συνθήκες (π.χ. υπερβολικό ψύχος) (Garvin et al., 1998), ενώ γενετικά τροποποιημένα ζώα χρησιμοποιούνται στην έρευνα της ιατρικής για την κατανόηση και θεραπεία ασθενειών όπως ο καρκίνος και για την παραγωγή φαρμάκων (π.χ. μέσω των πρωτεϊνών στο γάλα) (Garvin et al., 1998).

Οι πιο γνωστοί όμως γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί είναι τα φυτά που παράγονται, με την βοήθεια της αγροτικής βιοτεχνολογίας, για την παραγωγή τροφίμων με μεγαλύτερη θρεπτική αξία (π.χ. το golden rice), για καλύτερη ποιότητα και αυξημένη ποσότητα παραγωγής (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006), ανθεκτικότητα σε έντομολογικούς εχθρούς και ιούς (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006), επιβράδυνση της μετασυλλεκτικής ωρίμανσης ή καλύτερη ανάπτυξη σε ακραίες συνθήκες (π.χ. ψύχος) (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006). Με τα γενετικά τροποποιημένα φυτά μπορούμε να επιτύχουμε μείωση του κόστους καλλιέργειας, με μείωση της χρήσης εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων ή μυκητοκτόνων (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006). Τα φυτά αυτά χρησιμοποιούνται έκτος από την ανθρώπινη διατροφή και ως ζωοτροφές. Γενετικά τροποποιημένα φυτά που κυκλοφορούν εμπορικά ως ζωοτροφές είναι κυρίως η σόγια, το βαμβάκι, η ελαιοκράμβη, ο αραβόσιτος (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Η τεχνολογία της γενετικής τροποποίησης διάφορων οργανισμών έχει δημιουργήσει μεγάλη ανησυχία τόσο στην επιστημονική κοινότητα όσο και στο ευρύ κοινό. Η ανασφάλεια των καταναλωτών σχετίζεται με την μέθοδο της γενετικής τροποποίησης, την ελευθερωσή τους στο εξω-εργαστηριακό περιβάλλον και τον ελλιπή έλεγχο των ενδεχομένων επιπτώσεών τους από κρατικούς οργανισμούς (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006). Ο φόβος των καταναλωτών σχετίζεται με επιπτώσεις, ιδιαίτερα μακροχρόνιες, στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.

Κάποιες από αυτές τις επιπτώσεις τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στο περιβάλλον είναι:

- Η δημιουργία τοξινών σε τρόφιμα (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).
- Η εμφάνιση νέων αλλεργιών, εξαιτίας της παραγωγής νέων πρωτεϊνών (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).
- Η ενδεχόμενη μείωση της θρεπτικής αξίας των τροφίμων (χωρίς αυτό συνήθως να εξειδικεύεται) (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).
- Η πιθανή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά λόγω μεταφοράς βακτηριακών γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια επιλογής στην γενετική τροποποίηση (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).
- Η επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα (μεταφορά γονιδίων από τα γενετικά τροποποιημένα φυτά σε άλλα φυτά) (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).
- Η δημιουργία νέων ανθεκτικών ζιζανίων και συγχρόνως η ανάγκη χρήσης νέων αγροχημικών για την καταπολεμησή τους (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).
- Η επιπτώσεις σε οργανισμούς μη-στόχους (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Η φοβία του κόσμου προς τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς καθώς και η ζήτηση για καλύτερη αξιολόγηση τόσο της μεθόδου της γενετικής τροποποίησης όσο και των οργανισμών που προκύπτουν, αλλά και η απαίτηση για δυνατότητα επιλογής μεταξύ ενός συμβατικού οργανισμού και ενός γενετικά τροποποιημένου οργανισμού έχουν οδηγήσει στην ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων για την ανίχνευση της πιθανής παρουσίας των οργανισμών αυτών (π.χ., προσμίξεις σε συμβατικό πολλαπλασιαστικό υλικό ή προϊόντα διατροφής) από το στάδιο της παραγωγής μέχρι

την διάθεση τους στην αγορά. Με την ανίχνευση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών μπορεί να παρακολουθείται η πιθανότητα ύπαρξης επιπτώσεων και είμαστε σε θέση να επιλέξουμε αν θα καταναλώσουμε ένα γενετικά τροποποιημένο τρόφιμο ή ένα τρόφιμο που περιέχει συστατικά από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς ή όχι. Αυτοί είναι οι λόγοι οδήγησαν την Ευρωπαϊκή Ένωση, την διεθνή κοινότητα αλλά και την κάθε χώρα ξεχωριστά, στην θέσπιση νομοθεσίας και κανονισμών που θα καλύπτουν τον τρόπο παραγωγής ενός γενετικά τροποποιημένου οργανισμού, τις απαιτήσεις που πρέπει να πληρεί για να εγκριθεί, την ανίχνευσή του και μετά την έγκριση, αλλά και τους κανόνες διακινήσής τους μεταξύ χωρών. Υπάρχουν πολλοί οργανισμοί και εργαστήρια που ασχολούνται με την ανίχνευση και γενικά την παρακολούθηση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών ή συστατικών τους, όπως είναι η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) για την Ενωμένη Ευρώπη, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων για τις ΗΠΑ (FDA) και ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ) για την Ελλάδα (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

A.2.3. Πως ανιχνεύονται οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί.

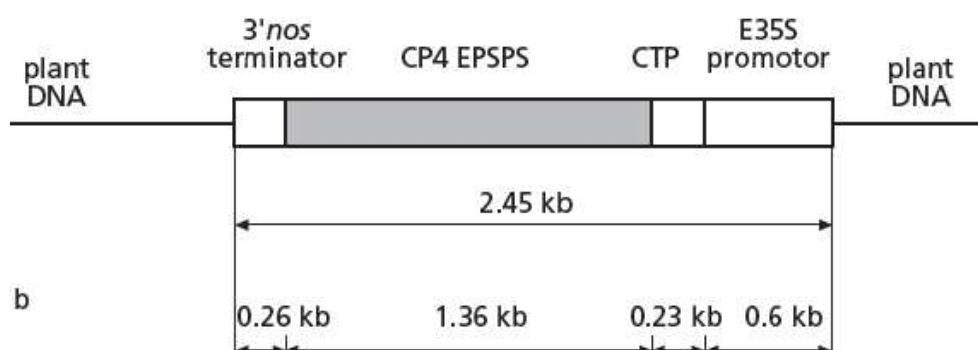
Σύμφωνα με τον Κανονισμό 1830/2003/ΕΚ και τον Κανονισμό 1829/2003 της Ευρωπαϊκής Ένωσης καθιερώνεται η ανίχνευση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών και των προϊόντων που παράγονται από αυτούς τόσο κατά την παραγωγή τους όσο και κατά την διακίνησή τους στην αγορά (Akritidis et al, 2008).

Ένας τρόπος παρακολούθησης των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών είναι η καταγραφή αυτών των οργανισμών σε ένα διεθνές σύστημα με την βοήθεια κωδικών (**Unique Identifiers**) (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2001). Με αυτούς τους κωδικούς διευκολύνεται η καταγραφή των πληροφοριών σε διαφορετικές βάσεις δεδομένων. Κάθε κωδικός αντιστοιχεί σε μια περίπτωση γενετικής τροποποίησης και ένα παράδειγμα τέτοιου κωδικού είναι ο κωδικός CGN-89564-2. Ο κωδικός αποτελείται από τρία διαφορετικά στοιχεία που χωρίζονται από παύλες. Το πρώτο στοιχείο (π.χ. CGN για την εταιρεία Calgene) αφορά την εταιρεία που κάνει την αίτηση, το δεύτερο (π.χ. 89564) είναι κωδικός της γενετικής τροποποίησης (το είδος της γενετικής τροποποίησης) ενώ το τρίτο και τελευταίο

στοιχείο (π.χ. 2) είναι ένα ψηφίο που βοηθάει απλά στην επαλήθευση (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004). Ο κωδικός αυτός δεν μπορεί όμως να μας αποκαλύψει το είδος του οργανισμού που έχει υποστεί την γενετική τροποποίηση. (Lezaun, 2006).

Η ανίχνευση που γίνεται μπορεί να αφορά την ύπαρξη ή όχι γενετικής τροποποίησης σε έναν οργανισμό (με ποιοτική μέθοδο) αλλά και την μέτρηση της συγκέντρωσης ενός γενετικά τροποποιημένου οργανισμού σε ένα προϊόν (με ποσοτική μέθοδο). Οι μέθοδοι ανίχνευσης στηρίζονται στην ανίχνευση DNA, RNA ή πρωτεϊνών. Οι περισσότερες μέθοδοι εφαρμόζονται για την ανίχνευση DNA, ενώ ελάχιστες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πρωτεϊνών (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Μια απλή μέθοδος ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένων οργανισμών είναι η μέθοδος που στηρίζεται στην ανίχνευση των ρυθμιστικών αλληλουχιών (regulatory sequences) (Lezaun, 2006). Οι αλληλουχίες αυτές, αφορούν ρυθμιστικό DNA που χρησιμοποιείται στη μεθοδολογία της γενετικής τροποποίησης φυτών όπως είναι ο προαγωγέας (promoter) 35S και η ληκτική αλληλουχία nos (terminator). Οι αλληλουχίες αυτές είναι τμήματα DNA που περικλείουν το γονίδιο που θέλουμε να εισάγουμε (Εικόνα 15) και χρησιμεύουν στην αναγνώριση του εισαχθέντος ξένου γονιδίου από τα ένζυμα του φυτού που εμπλέκονται στην μεταγραφή του για την παραγωγή μιας λειτουργικής πρωτεΐνης



Εικόνα 15. Δείγμα αλληλουχίας εισαγόμενου γονιδίου CP4 EPSPS που περικλείεται από τον προαγωγέα (promoter) 35S και την ληκτική αλληλουχία (terminator) 3' nos (Lezaun, 2006).

Η μέθοδος αυτή μας δίνει την δυνατότητα διάκρισης μεταξύ ενός οργανισμού που έχει υποστεί γενετική τροποποίηση (επειδή θα περιέχει τις υπό εξέταση ρυθμιστικές αλληλουχίες) και ενός συμβατικού οργανισμού (που δεν τις περιέχει), αλλά δεν παρέχει την δυνατότητα διάκρισης μεταξύ διαφορετικών γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, εφόσον και οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται συχνά για την δημιουργία διαφορετικών γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (Lezaun, 2006).

Για την εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου ανίχνευσης εφαρμόζεται πιο συχνά είναι η κλασική PCR, η οποία απαιτεί την χρήση εξειδικευμένων εκκινητών και με την οποία μπορεί να γίνει ποιοτική αλλά και ποσοτική ανίχνευση (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006). Άλλες τεχνολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών καθώς και παραγώγων τους είναι η Real Time PCR και οι μικροστοιχίες γονιδίων (microarray data) (βλ. σελ. 31).

Η μέθοδος Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) και η μέθοδος Western blot χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πρωτεϊνών (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006). Οι ανοσοχημικές αυτοί μέθοδοι χρησιμοποιούνται για ποιοτική ανίχνευση και στηρίζονται στην σύνδεση των πρωτεϊνών με μόρια αντισωμάτων, τα οποία είναι συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες. Η μέθοδος ELISA μπορεί να δώσει εκτός από ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

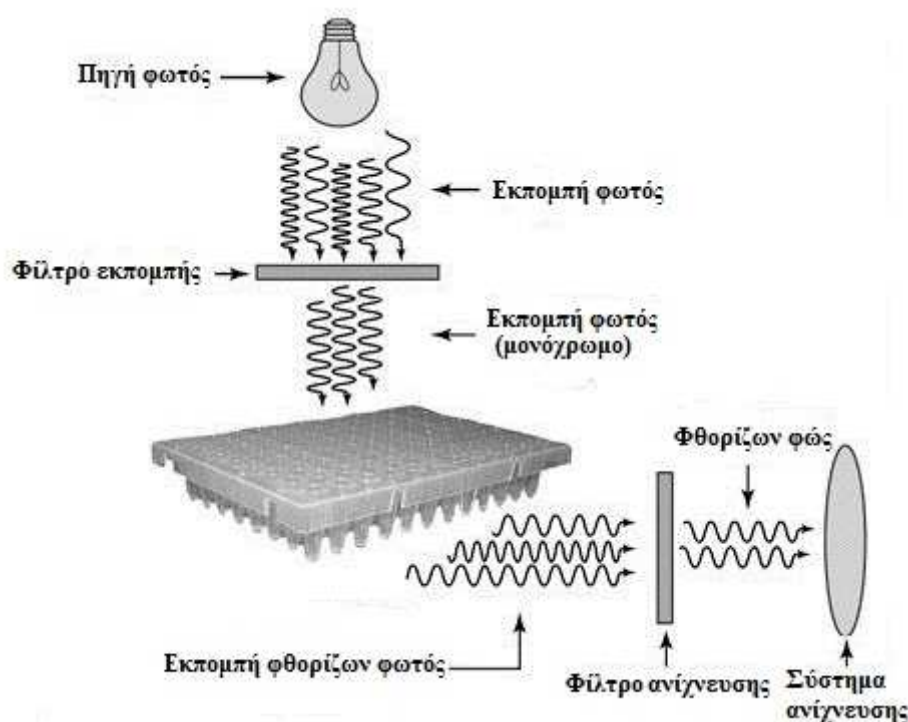
Άλλη μια μέθοδος ανίχνευσης που βρίσκεται σε εξέλιξη είναι ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (Immunomagnetic separation, IMS) (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006). Η μέθοδος αυτή βοηθάει στην ανίχνευση μικροοργανισμών σε τρόφιμα και βασίζεται στην χρήση σφαιριδίων 2-5μ, τα οποία είναι μαγνητισμένα θετικά ή αρνητικά και τα οποία καλύπτονται από ένα αντίσωμα που είναι ειδικό για κάθε μικροοργανισμό. Ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός παρουσιάζει ένα πλεονέκτημα σε σχέση με την PCR, μπορεί να ελαττώσει ή να καταργήσει το στάδιο εμπλουτισμού της αλληλουχίας (PCR), μειώνοντας έτσι τον χρόνο διάρκειας της διαδικασίας. Μπορεί όμως να συνδιαστεί και με την τεχνική της PCR. (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006)

Η ανίχνευση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών πρέπει να γίνεται από διαπιστευμένα εργαστήρια που θα παρέχουν εξειδικευμένο εξοπλισμό και προσωπικό.

A.3. ΣΥΣΚΕΥΗ REAL TIME PCR

A.3.1. Περιγραφή του οργάνου της Real time PCR

Όλες οι συσκευές της Real time PCR συνδιάζουν την τεχνολογία της συμβατικής PCR για την παραγωγή/ πολλαπλασιασμό προϊόντων με την συστήματα για παραγωγή, ανίχνευση και ανάλυση του φθορίζον σήματος που παράγεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Υπάρχουν πολλές εταιρίες που διαθέτουν συσκευές Real Time PCR και το κόστος της κάθε μιας διαφέρει ανάλογα με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Fraga et al, 2008).



Εικόνα 16. Διάγραμμα με τον βασικό τρόπο λειτουργίας γενικά όλων των συσκευών Real Time PCR (Fraga, 2008).

Η μεγαλύτερη διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στις διάφορες συσκευές είναι το λογισμικό που διαθέτει η κάθε συσκευή για την ανάλυση των δεδομένων και το σύστημα ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης χρωστικής φθορισμού (Εικ. 16, Gene-Quantification, XX).



Εικόνα 17. Η συσκευή Real Time PCR μοντέλο Mx3005P της εταιρίας Stratagene (Stratagene, 2007)

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος της παρούσας εργασίας που θα αναφερθεί στην ενότητα του Πειραματικού μέρους (σελ. 55) και το οποίο θα περιγραφεί στη συνέχεια είναι το μοντέλο Mx3005P της εταιρείας Stratagene (Εικ. 17). Το Mx3005P είναι ένα σύστημα QPCR που έχει την δυνατότητα διεξαγωγής αντίδρασης Real Time-QPCR και PCR, ολοκλήρωσης της αντίδρασης σε 40 κύκλους και διαχωρισμό δειγμάτων με 5000 και 10000 αντίγραφα της αλληλουχίας με ποσοστό βεβαιότητας 99,7%. Το οπτικό σύστημα του Mx3005P αποτελείται από την πηγή φωτός (λάμπα), τα φίλτρα και την κεφαλή ανίχνευσης (Εικ. 18). Η συσκευή Mx3000P είναι συνδεδεμένη με ένα υπολόγιστη που συλλέγει και αναλύει τα δεδομένα της αντίδρασης. Τα διάφορα μέρη του οργάνου περιγράφονται παρακάτω.

A.3.2. Τα μέρη του οργάνου

A.3.2.1. Πηγή φωτός.

Η πηγή φωτός είναι σημαντικό κομμάτι στην συσκευή γιατί σ' αυτή βασίζεται η παραγωγή του φθορισμού στον οποίο στηρίζεται η ανίχνευση των δεδομένων. Η πηγή φωτός της συσκευής Mx3005P αποτελείται από μία λάμπα αλογόνου-βολφραμίου με χαλαζία που προσφέρει μεγάλο εύρος διέγερσης (Εικόνα 18 A). Το φως που εκπέμπεται από τις διεγερμένες χρωστικές του δείγματος περνάει πρώτα από φίλτρα

πριν διοχετευθεί στο σύστημα ανίχνευσης και παρουσιάζει εύρος διέγερσης 350 με 750nm.

A.3.2.2 Είδη φίλτρων, αριθμός και ποιότητα φωτός.

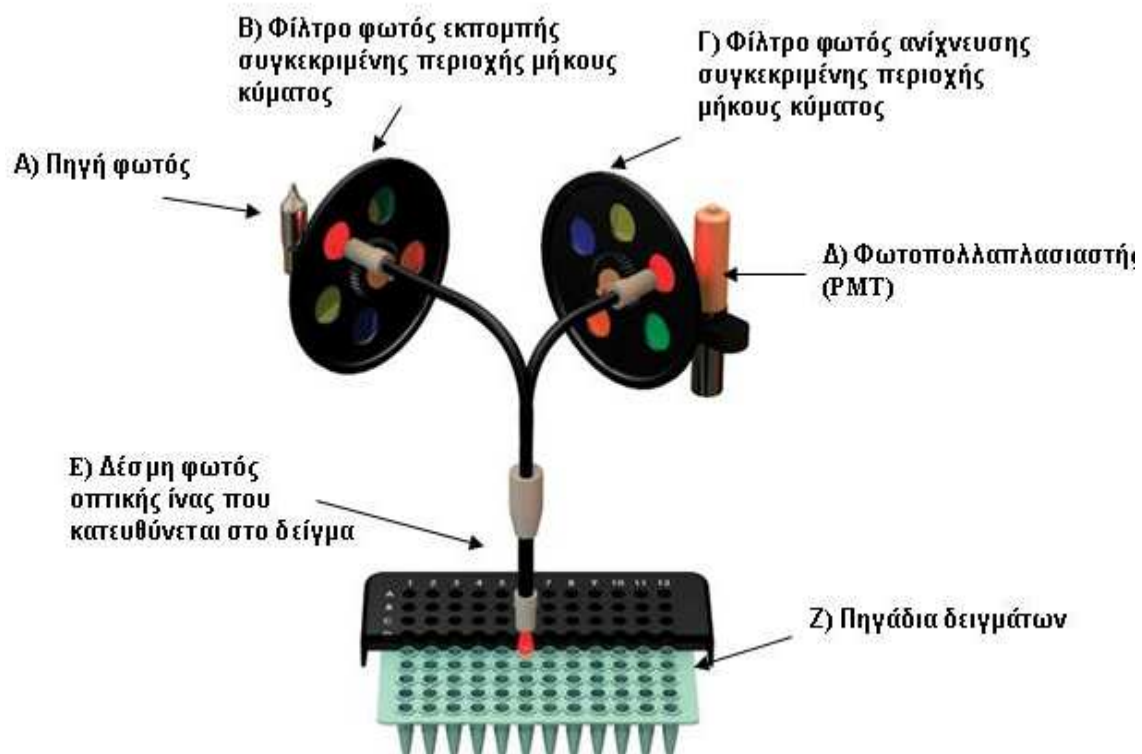
Κάθε συσκευή φέρει ένα τροχό με 5 διαφορετικά φίλτρα (Εικ. 18 Β, Γ), τα οποία προεπιλέγονται από τον χρήστη του Mx3005P. Υπάρχουν πολλές επιλογές σε χρωστικές από τις οποίες μπορεί να διαλέξει ο χρήστης. Ορισμένες από αυτές τις χρωστικές με το αντίστοιχο εύρος διέγερσης τους είναι: ALEXA Fluor® 350 (350nm-440nm), FAM™/ SYBR® Green I (492nm-516nm), TET (517nm-538nm), HEX™/JOE™/VIC™ (535nm-555nm), Cy3™ (545nm-568nm), TAMRA™ (556nm-580nm), ROX™/Texas Red® (585nm-610nm), και Cy5™ (635nm-665nm). Τα φίλτρα αυτά χρησιμοποιούνται στο οπτικό σύστημα και στο σύστημα ανίχνευσης, για να εμποδίζουν την παρεμβολή εξωτερικού σήματος στο σήμα που εκπέμπουν τα δειγματά μας και έτσι να έχουμε ένα καθαρό σήμα (Εικόνα 18B και Γ).

A.3.2.3. Ανίχνευση και συστήματα ανίχνευσης.

Το σύστημα ανίχνευσης αποτελείται από οπτικές ίνες και ένα σωλήνα ανίχνευσης, τον φωτοπολλαπλασιαστή (PMT) (Εικόνα 18Δ και Ε). Η δέσμη των οπτικών ινών παρέχει διπλή λειτουργία, μεταφέρει το φως που περνάει από την λάμπα και τα φίλτρα αλλά και μεταφέρει το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται από κάθε δείγμα προς τον ανιχνευτή. Το σύστημα αυτό προσφέρει μέγιστη ένταση με μικρή απώλεια σήματος και σε συνδιασμό με τα φίλτρα εκπομπής ανιχνεύει το σήμα που εκπέμπει το κάθε πηγάδι αποβάλλοντας τυχόν εξωτερικά σήματα.

A.3.2.4. Πηγάδια δειγμάτων.

Η συσκευή Mx3005P διαθέτει ένα σύστημα θερμαντικής πλάκας (thermal block) που αποτελείται από 96 πηγάδια δειγμάτων (Εικόνα 18Ζ). Η θερμαντική αυτή πλάκα είναι φτιαγμένη με σύστημα θέρμανσης Peltier και μπορεί να δεχθεί σωλήνες τύπου eppendorf όγκου έως 200μl. Το σύστημα Peltier διασφαλίζει ομοιόμορφη θέρμανση της όλης της πλάκας καθ όλη την διάρκεια της αντίδρασης για την καλύτερη απόδοση της εφαρμογής.



Εικόνα 18. Αναλυτική περιγραφή των τμημάτων που αποτελούν την συσκευή Mx3005 της εταιρίας Stratagene (Stratagene, 2007).

A.3.2.5. Λογισμικό.

Το λογισμικό του Mx3005P παρέχει την δυνατότητα επεξεργασίας του σήματος ανίχνευσης για την χρήση έως και 5 διαφορετικών χρωστικών ταυτοχρόνως, ενώ παρακολουθεί την πορεία της ενίσχυσης του σήματος εκπομπής σε πραγματικό χρόνο και αναλύει τα δεδομένα κατά την διάρκεια της PCR. Άλλες δυνατότητες του λογισμικού είναι ο αυτόματος υπολογισμός της θερμοκρασίας αποδιάταξης για την ανάλυση με καμπύλη αποδιάταξης, απόδοση όλων των διαφορετικών χρωστικών από διαφορετικά πειράματα σε διαφορετικά γραφήματα ενίσχυσης ή σε ένα γράφημα ενίσχυσης. Το λογισμικό αυτό έχει επίσης την δυνατότητα να μετατρέψει και παρουσιάσει τα δεδομένα σε μορφή Excel ή PowerPoint. Υπάρχει η δυνατότητα το λογισμικό να συνδεθεί με διαφορετικά μηχανήματα (έως 6) σε ένα μόνο υπολογιστή (Stratagene, 2007).

A.3.2.6. Είδη ανάλυσης.

Η συσκευή Mx3005P προσφέρει μέσω του λογισμικού που διαθέτει, διάφορα είδη ανάλυσης που είναι εύκολα στην χρήση. Ορισμένα είδη ανάλυσης είναι: 1) οι καμπύλες ενίσχυσης (amplification plot) που δείχνουν την σχέση μεταξύ του αριθμού των κύκλων και της τιμής φθορισμού που δίδει κάθε δείγμα, 2) γράφημα της καμπύλης αναφοράς (standard curve) που δείχνει σε μορφή καμπύλης την σχέση μεταξύ των υπό μελέτη δειγμάτων και δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, 3) καμπύλη αποδιάταξης (melting curve) που εμφανίζει την θερμοκρασία στην οποία αποδιατάχθηκε κάθε δείγμα και 4) τελική αναφορά στην οποία εμφανίζονται όλα τα δεδομένα των δειγμάτων που έλαβαν μέρος στην αντίδραση.

A.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η αξιοποίηση της μηχανής Mx3005P Real Time PCR για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων στελεχών του βακτηρίου *Escherichia coli* με την μέθοδο της Real Time PCR.

Τα βασικά μέρη της πειραματικής εργασίας περιλαμβάνουν:

- απομόνωση των στελεχών που έχουν επιλεγεί με συγκεκριμένα πρωτόκολλα απομόνωσης
- εφαρμογή της μεθόδου Real Time PCR για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του γενετικά τροποποιημένου στέλεχους
- εφαρμογή της μεθόδου συμβατικής PCR για την ανίχνευση του γενετικά τροποποιημένου στέλεχους.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους χώρους του Εργαστηρίου “Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών” του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής του ΤΕΙ-Κρήτης.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1.1. Αναλώσιμα Υλικά

Ορισμένα από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος είναι: Χλωροφόρμιο (Chloroform, CHCl_3), Φαινόλη (Phenol, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), 99,8% αιθανόλη (Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), TE (10mM Tris HCl pH 7,5, 1mM EDTA), Υδροξείδιο νατρίου (NaOH), 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$), Ισοπροπανόλη (Isopropanol, $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$), Χλωριούχο νάτριο (NaCl), Proteinase K (Πρωτεάση), 10% CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide, $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$). Τα αντιδραστήρια αυτά είναι της εταιρίας Sigma. Η 70% αιθανόλη (Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) είναι της εταιρίας Scharlau, το Bacto-tryptone της εταιρίας Lab M, ενώ η αγαρόζη (agar) ήταν της εταιρείας Invitrogen.

Στο πρωτόκολλο απομόνωσης Βακτηριακού DNA με Αλκαλική λύση (μέθοδος miniprep) χρησιμοποιήθηκε το **Διάλυμα I** (50mM glucose, 25mM Tris HCl (pH8), 10mM EDTA (pH 8)), το **Διάλυμα II** (0,2 N NaOH, 1% SDS) και το **Διάλυμα III** (5M potassium acetate, glassial acetic acid, H_2O), τα οποία παρασκευάστηκαν με αντιδραστήρια της εταιρείας Sigma.

Τα Buffer A1, A2, AQ και AE που χρησιμοποιήθηκαν στο έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο απομόνωσης «NucleoSpin Plasmid Quick Pure» είναι της εταιρίας Macherey-Nagel και συμπεριλαμβάνονται μέσα στο έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο (kit). Καθώς και τα Buffer T1, B5, BW και BE (5mM Tris HCl, pH 8,5) από το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο «NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue» είναι της εταιρείας Macherey-Nagel και συμπεριλαμβάνονται μέσα στην συσκευασία του έτοιμου εμπορικού πρωτόκολλου.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της αντίδρασης PCR και Real Time PCR: MgCl_2 (50mM), 10xbuffer, dNTPs (25mM), Taq Polymerase (5u/μl), primers (10mM) της εταιρίας HyTest, ενώ το Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix και η Reference dye (SYBR Green) προέρχονται από την εταιρεία Stratagene. Τα Buffer NT, NT3 και NE (5mM Tris HCl, pH 8,5) για το πρωτόκολλο «NucleoSpin ExtractII: PCR clean up, Gel extraction» της εταιρείας Macherey-Nagel παρέχονται από τον κατασκευαστή.

B.1.2. Εργαστηριακά στελέχη *Eschericia coli*

Τα εργαστηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος δόθηκαν από το εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών, στο οποίο και έγινε η γενετική τροποποίηση του στελέχους, από προηγούμενο ερευνητικό πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 2003.

a) Γενετικά τροποποιημένα στελέχη:

το JM83 F-*araΔ(lac-proAB)rpsL(StrR)[φ80dlacΔ(lacZ)M15]thi* (pESC-HIS-4CL 33).

b) Μη γενετικά τροποποιημένα στελέχη:

το JM83 [F-*araΔ(lac-proAB)rpsL(StrR)[φ80dlacΔ(lacZ)M15]thi*].

Η γενετική τροποποίηση του στελέχους JM83 με το πλασμίδιο pESC-HIS-4CL 33 έγινε προηγούμενα στο εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών, του ΤΕΙ Κρήτης.

B.1.3. Πειραματική διαδικασία- Μέθοδοι

B.1.3.1. Καλλιέργεια των στελεχών *E. coli*

Η καλλιέργεια των δύο στελεχών της *E. coli* έγινε σε στερεά και υγρά θρεπτικά υποστρώματα. Η μεταφορά του βακτηριακού μολύσματος έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο νηματικής ροής.

Η παρασκευή των στερεών καλλιεργειών έγινε σε τριβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα LB Medium (Luria-Betrani Medium) και άγαρ (agar). Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος ανά λίτρο είναι 10 gr bacto-tryptone, 5 gr bacto-yeast extract, 10 gr NaCl και 15 gr agar, με pH 7. Για κάθε τριβλίο χρησιμοποιήθηκαν 25 ml θρεπτικού υποστρώματος ενώ για την ανάπτυξη του γενετικά τροποποιημένου στελέχους προστέθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα και το αντιβιοτικό αμικικιλίνη ώστε να επιτευχθεί μόνο η ανάπτυξη του επιθυμητού στελέχους του βακτηρίου στην επιθυμητή τελική συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Το στέλεχος μάρτυρας αναπτύχθηκε απουσία αμικικιλίνης, γιατί δεν φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη. Τα τριβλία επώαστηκαν σε θάλαμο επώασης με θερμοκρασία 37⁰C για 15-17 ώρες.

Για την παρασκευή των υγρών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες στους οποίους προσθέσαμε 11 ml θρεπτικού υποστρώματος LB medium ανά

καλλιέργεια (Σύστασης: 10 gr bacto-tryptone, 5 gr bacto-yeast extract, 10 gr NaCl και 15 gr agar, pH 7). Στον δοκιμαστικό σωλήνα που προοριζόταν για την ανάπτυξη του γενετικά τροποποιημένου στελέχους προσθέσαμε επίσης αμπικιλίνη. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης με συνεχή ανάδευση 400 rpm σε θερμοκρασία 37⁰C για 12-16 ώρες. Η παρακολούθηση της ανάπτυξης του βακτηρίου των υγρών καλλιέργειών έγινε μέσω της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (OD) του υγρού μέσου ανάπτυξης με φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος ίσο με 600 nm.

B.1.3.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα δύο στελέχη του E.coli

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA των δύο στελεχών εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι: α) το πρωτόκολλο Απομόνωσης Βακτηριακού DNA με Αλκαλική λύση (μέθοδος miniprep) (Sambrook et al, 1989) και β) το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο (kit) “NucleoSpin: Plasmid quick pure” της εταιρείας Macherey-Nagel.

B.1.3.2.1. Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με το πρωτόκολλο Απομόνωσης Βακτηριακού DNA με Αλκαλική λύση (μέθοδος miniprep)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA του γενετικά τροποποιημένου στελέχους αλλά και του άγριου στελέχους έγινε με το πρωτόκολλο των miniprep (Sambrook, 1989). Η διαδικασία του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω :

- Όγκος 1,5 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωλήνες erpendorf και φυγοκεντρήθηκαν για 2 min στους 4⁰C για να κατακαθήσουν τα βακτηριακά κύτταρα. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και από τα erpendorf (ένα για κάθε καλλιέργεια), αφήνοντας τα ιζήματα όσο πιο στεγνά γίνεται.
- Επαναδιαλύθηκαν οι πελέτες των κυττάρων με 100 μl κρύου Διαλύματος I (βλ. Υλικά σελ. 44) με vortex.
- Προστέθηκαν 200 μl φρέσκου Διαλύματος II (βλ. Υλικά σελ.44) στους σωλήνες erpendorf και αφού ανακινήθηκαν 5-6 φορές, ώστε να αναμιχθεί σωστά όλο το διάλυμα εντός του erpendorf, αφέθηκαν στον πάγο για 5 min.
- Κατόπιν προστέθηκαν σε κάθε erpendorf 150 μl κρύου Διαλύματος III (βλ. Υλικά, σελ.44), ανακινήθηκαν ελαφρά, για να έρθει σε επαφή το διάλυμα με τα προϊόντα λύσης και παρέμειναν πάλι στον πάγο για 5 min.

- Φυγοκεντρήθηκαν για 10 min και μεταφέρθηκε το υπερκείμενο από τα eppendorf σε καθαρά eppendorf.
- Προστέθηκε σε κάθε σωλήνα eppendorf ουδέτερη φαινόλη ίσου όγκου με το υπάρχον διάλυμα και ανακινήθηκαν ξανά.
- Φυγοκεντρήθηκαν για 5 min και κατόπιν μεταφέρθηκαν τα υπερκείμενα σε καθαρά eppendorf.
- Μετά προστέθηκε ίσος όγκος συγκεκριμένης αναλογίας χλωροφορμίου (CHCl_3): Ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), ανακινήθηκαν τα eppendorf και αφού φυγοκεντρήθηκαν για 5 min, μεταφέρθηκαν τα δύο υπερκείμενα σε νέα eppendorf.
- Στην συνέχεια προκλήθηκε ιζηματοποίηση του πλασμιδιακού DNA προσθέτοντας 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης.
- Αφού ανακινήθηκαν, αφέθηκαν για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά φυγοκεντρήθηκαν για 10 min, για την κατακρήμνιση του DNA.
- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο των δύο eppendorf προσεκτικά με πιπέτα και μετά τα σωληνάκια αφέθηκαν ανοιχτά και ανάποδα για να στεγνώσουν τα κυτταρικά ιζήματα (πελλέτες).
- Ξεπλύθηκε το Πλασμιδιακό dsDNA με 1 ml 70% αιθανόλης στους 4°C , απομακρύθηκε το υπερκείμενο των eppendorf με πιπέτα και αφέθηκαν οι πελλέτες να στεγνώσουν για 10 min.
- Στο τέλος επαναδιαλύθηκε κάθε πελέτα DNA με 50 μl από το Buffer AE (βλ. Υλικά, σελ.45) του NucleoSpin: Plasmid quick pure και αποθηκεύθηκαν τα δύο eppendorf στους -20°C .

B.1.3.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το «NucleoSpin Plasmid Quick Pure»

Η χρήση του έτοιμου εμπορικού πρωτοκόλλου (kit) «NucleoSpin Plasmid Quick Pure» της εταιρείας Macherey-Nagel περιλαμβάνει σύμφωνα με τον κατασκευαστή του 6 στάδια για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, τα οποία περιγράφονται παρακάτω:

1. Ποσότητα 2ml της κάθε καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε eppendorf, και φυγοκεντρήθηκε για 30sec στις 11,000 στροφές και μετά αφαιρέθηκε το υπερκείμενο.
2. Αρχικά προστέθηκαν 250 μl από το Buffer A1 και επαναδιαλύθηκαν οι πελλέτες με δόνηση vortex, μέχρι να διαπιστωθεί ότι δεν έχουν παραμείνει συστάδες κυττάρων. Στην συνέχεια προστέθηκαν 250μl Buffer A2, ανακινήθηκαν τα eppendorf ελαφρά 6-8 φορές και αφέθηκαν να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 5min. Κατόπιν προστέθηκαν 300μl Buffer A3 στα eppendorf και ανακινήθηκαν ελαφρά 6-8 φορές.
3. Φυγοκεντρήθηκαν οι σωλήνες eppendorf για 5min στις 11,000 στροφές, σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μεταφέρθηκαν 750 μl από το υπερκείμενο του κάθε σωλήνα eppendorf σε δύο NucleoSpin Plasmid Quick Pure στήλες (column) (παρέχονται από τον κατασκευαστή), οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε δυο eppendorf των 2 ml. Τα διηθήματα αυτά φυγοκεντρήθηκαν για 1min στις 11,000 στροφές και στην συνέχεια αφού αφαιρέθηκαν οι NucleoSpin Plasmid Quick Pure στήλες από τους σωλήνες eppendorf αδειάστηκε το περιεχόμενο των σωλήνων eppendorf και επανατοποθετήθηκαν οι NucleoSpin Plasmid Quick Pure στήλες. Το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε μέχρι να φορτωθεί όλο το υπερκείμενο των δύο eppendorf (στάδιο 3) στις στήλες NucleoSpin Plasmid Quick Pure.
5. Κατόπιν προστέθηκαν 450μl Buffer AQ και φυγοκεντρήθηκαν για 3min στις 11,000 στροφές.
6. Τοποθετήθηκαν οι NucleoSpin Plasmid Quick Pure στήλες σε eppendorf των 1.5 ml και προστέθηκαν 50 μl Buffer AE σε κάθε στήλη για να αφαιρεθεί το DNA που δεσμεύτηκε σε κάθε στήλη. Αφού επώαστηκαν τα eppendorf για 1min σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκαν για 1 min στις 11,000 στροφές και στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -20.

B.1.3.3. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από τα δύο στελέχη *E. coli*

Για την απομόνωση χρωμοσωμικού DNA των δύο στελεχών *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν: α) το πρωτόκολλο Απομόνωσης ολικού βακτηριακού DNA

(Sambrook et al, 1989) και β) το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue της εταιρείας Macherey-Nagel.

B.1.3.3.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού βακτηριακού DNA με το πρωτόκολλο Απομόνωσης ολικού Βακτηριακού DNA.

- Τοποθετήθηκαν 2 ml καλλιέργειας από κάθε στέλεχος σε δύο σωλήνες erpendorf και φυγοκεντρήθηκαν για 5min στις 12,000 στροφές.
- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο από κάθε erpendorf και επαναδιαλύθηκαν οι πελέτες σε 400 μl Buffer TE (βλ. Υλικά, σελ.44) με δόνηση vortex.
- Ακολούθησε λύση των βακτηριακών κυττάρων με προσθήκη 50 μl 10% SDS και 2 μl Proteinase K και κατόπιν επώασθηκαν σε υδατόλουτρο για 1 ώρα επώαση στους 55°C.
- Κατόπιν προστέθηκαν 100μl 5M NaCl και 100 μl 10% CTAB (βλ. Υλικά, σελ.44) και τα erpendorf τοποθετήθηκαν για επώαση στους 65°C για 20 min.
- Προστέθηκαν 650μl φαινόλης/χλωροφόρμιο, αναδεύθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 13.000 στροφές.
- Στην συνέχεια μεταφέρθηκε το υπερκείμενο των δύο erpendorf σε δύο νέα erpendorf και αφού προστέθηκαν 650μl χλωροφόρμιου, έγινε ανάδευση και φυγοκέντρωση για 10min στις 13.000 στροφές.
- Μεταφέρθηκε πάλι το υπερκείμενο σε δύο καθαρά erpendorf και αφού προστέθηκε 1 όγκος καθαρής ισοπροπανόλης και έγινε ήπια ανάδευση.
- Ακολούθησε επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με την βοήθεια γυάλινων πιπετών Pasteur, οι οποίες μετατράπηκαν σε σχήμα γάντζου με την βοήθεια φλογίστρου, έγινε το «ψάρεμα» του γενωμικού DNA που ήταν πλέον ευδιάκριτο.
- Ξεπλύθηκαν οι πελλέτες γενωμικού DNA με 1 ml 70% παγωμένης αιθανόλης (4°C) και αναδεύθηκαν ήπια.
- Κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν 10 min στις 13.000 στροφές και αφού αφέθηκαν οι πελλέτες να στεγνώσουν καλά και επαναδιαλύθηκαν με 50 μl από το Elution Buffer BE (βλ. Υλικά σελ.44) του έτοιμου εμπορικού πρωτόκολλο «NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue» της εταιρείας Macherey-Nagel.

B.1.3.3.2 Απομόνωση Γενομικού DNA με το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο «NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue» (Macherey-Nagel)

Η απομόνωση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας:

- Μεταφέρθηκε 1ml από τις δύο καλλιέργειες σε δύο eppendorf, τα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 8,000 x g και στην συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο.
- Επαναδιαλύθηκαν οι πελλέτες με την προσθήκη 180 μl από το Buffer T1 με την βοήθεια πιπέτας. Προστέθηκαν 25 μl Proteinase K, έγινε δόνηση vortex και επώαστηκαν στους 56°C για τουλάχιστον 1-3 ώρες.
- Ακολούθησε ξανά δόνηση vortex και στην συνέχεια προστέθηκαν 200 μl από το Buffer B3. Έγινε πάλι vortex και επώαστηκαν για 10 min στους 70°C.
- Προστέθηκαν 210 μl αιθανόλης (96-100%) στα δείγματα και ακολούθησε δόνηση vortex.
- Μεταφέρθηκαν τα δείγματα από τους σωλήνες eppendorf σε δύο NucleoSpin Tissue στήλες (παρέχονται από τον κατασκευαστή), οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε δυο eppendorf (των 2 ml). Φυγοκεντρήθηκαν για 1min στις 11,000×g και μετά αφού αδειάστηκε ότι υπήρχε στα σωληνάκια eppendorf τοποθετήθηκαν ξανά μέσα οι NucleoSpin Tissue στήλες.
- Προστέθηκαν 500 μl από το Buffer BW, φυγοκεντρήθηκαν για 1min στις 11,000×g και στην συνέχεια αφαιρέθηκε ότι υπήρχε μέσα στα eppendorf.
- Κατόπιν προστέθηκαν 600μl από το Buffer B5 στις στήλες και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 1min στις 11,000×g. Αφαιρέθηκε πάλι ότι είχε μείνει στα eppendorf.
- Φυγοκεντρήθηκαν πάλι για 1min στις 11,000×g, ώστε να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα αιθανόλης.
- Τοποθετήθηκαν οι NucleoSpin Tissue στήλες (column) σε δύο eppendorf των 1.5ml και προστέθηκαν 100 μl από το Elution Buffer BE (βλ. Υλικά, σελ. 44), αφού πρώτα θερμάνθηκε στους 70°C. Ακολούθησε επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρωση 1min στις 11,000×g και τέλος αποθήκευση στους -20°C.

B.1.3.4. Σήμανση και κωδικοποίηση των δειγμάτων

Για μεγαλύτερη διευκόλυνση τα δείγματα του στελέχους JM83 που απομονώθηκαν με τα πρωτόκολλα, που περιγράφονται στην παραπάνω ενότητα θα αναφέρονται στην εργασία με κωδικοποιημένες ονομασίες, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

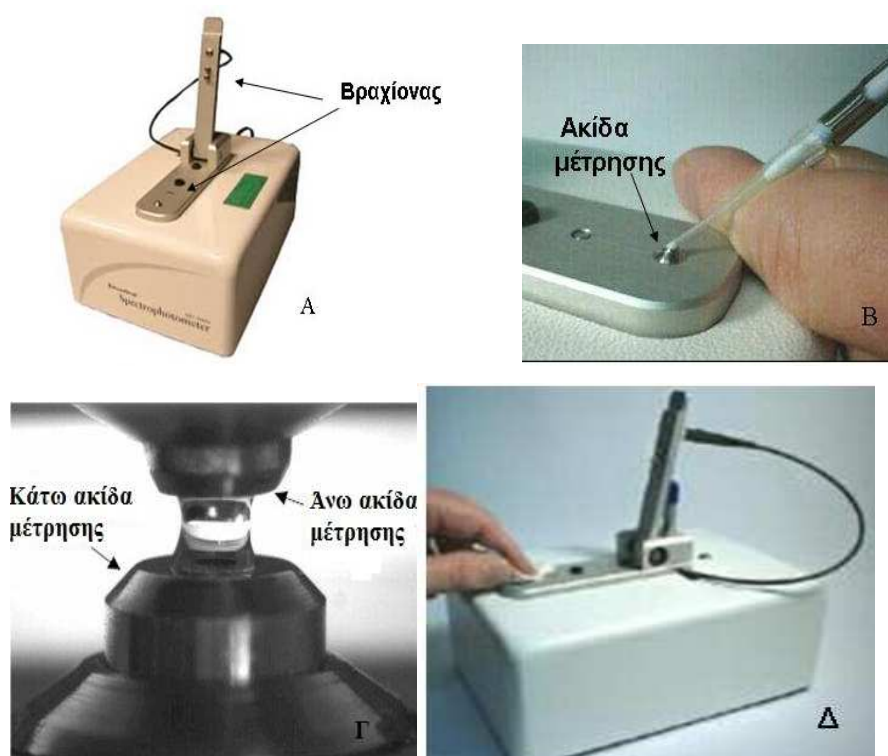
Πίνακας 1. Παρουσίαση πλήρους ονομασίας των δειγμάτων και της κωδικοποιημένης ονομασίας.

	ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
1	Πλασμιδιακή απομόνωση με Αλκαλική λύση στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL	4CL Plasm Minirep
2	Πλασμιδιακή απομόνωση με Αλκαλική λύση στελέχους JM83 χωρίς το πλασμίδιο 4CL	JM83 Plasm Miniprep
3	Πλασμιδιακή απομόνωση με το NucleoSpin Plasmid Quick Pure στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL	4CL Plasm Kit
4	Πλασμιδιακή απομόνωση με το NucleoSpin Plasmid Quick Pure στελέχους JM83 χωρίς το πλασμίδιο 4CL	JM83 Plasm Kit
5	Χρωμοσωμική απομόνωση με το πρωτόκολλο ολικού Βακτηριακού DNA στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL	4CL Chrom
6	Χρωμοσωμική απομόνωση με το πρωτόκολλο ολικού Βακτηριακού DNA στελέχους JM83 χωρίς το πλασμίδιο 4CL	JM83 Chrom
7	Γενομική απομόνωση με το πρωτόκολλο NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL	4CL Chrom Kit
8	Γενομική απομόνωση με το πρωτόκολλο NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue στελέχους JM83 χωρίς το πλασμίδιο 4CL	JM83 ChromKit
9	Γενομική απομόνωση με το πρωτόκολλο NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL (13/5)	4CL Chrom Kit (13/5)
10	Γενομική απομόνωση με το πρωτόκολλο NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue στελέχους JM83 χωρίς το πλασμίδιο 4CL (13/5)	JM83 Chrom Kit (13/5)
11	Πλασμιδιακή απομόνωση με Αλκαλική λύση στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL (24/3)	4CL Plasm (24/3)
12	Πλασμιδιακή απομόνωση με Αλκαλική λύση στελέχους JM83 χωρίς το πλασμίδιο 4CL (24/3)	JM83 Plasm (24/3)
13	Στέλεχος JM83 με το πλασμίδιο 4CL για την καμπύλη αναφοράς	4CL Standard

Τα δείγματα 9, 10, 11 και 12 προέρχονται από παλαιότερες απομονώσεις και συνοδεύονται από την ημερομηνία στην οποία έγινε η κάθε απομόνωση. Τα δείγματα 9 και 10 προέρχονται από απομόνωση που έγινε στις 13/5, ενώ τα δείγματα 11 και 12 προέρχονται από απομόνωση που έγινε στις 24/3.

B.1.3.5. Μέτρηση των συγκεντρώσεων προϊόντων των απομονώσεων DNA με Νανόμετρο (Nanodrop)

Πρίν γίνει αντίδραση της Real Time PCR και της PCR έπρεπε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του προϊόντος του γενετικού υλικού από τις απομονώσεις με κάθε πρωτόκολλο. Η μέτρηση αυτή έγινε με την βοήθεια της συσκευής Nanodrop (στο τμήμα Βιολογίας στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Κρήτης). Η συσκευή Nanodrop παρέχει την δυνατότητα μέτρησης πολύ μικρών ποσοτήτων (1μl) DNA ή RNA σε ελάχιστο χρόνο (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Τα μέρη της συσκευής Nanodrop και ο τρόπος χρήσης της: Α) Ο βραχίονας που φέρει τις ακίδες μέτρησης, Β) Τοποθέτηση σταγόνας δείγματος στην ακίδα, Γ) Άνω και κάτω ακίδα μέτρησης και Δ) Καθαρισμός ακίδας (NanoDrop Technologies, Inc., 2007).

Η λειτουργία της συσκευής στηρίζεται στην τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την συγκράτηση του δείγματος κατά την διάρκεια της μέτρησης χωρίς την χρήση κυψελίδας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μέσω ενός προγράμματος στον υπολογιστή με τον οποίο συνδέεται το μηχάνημα.

Η συσκευή αποτελείται από βραχίονα που στο κάθε άκρο του διαθέτει από μια ακίδα δειγματολειτουργίας. Για να γίνει η μέτρηση τοποθετήθηκε 1 μl από το υπό ανάλυση δείγμα στην ακίδα του κάτω άκρου και όταν έκλεισε ο βραχίονας και ήρθε σε επαφή η πάνω ακίδα με την κάτω έγινε η μέτρηση του δείγματος. Μετά το τέλος της μέτρησης καθαρίστηκαν οι ακίδες στα δύο άκρα για να την επόμενη μέτρηση (NanoDrop Technologies, Inc., 2007).

B.1.3.6. Προετοιμασία καμπύλης αναφοράς (Standard curve)

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων σ' αυτή την πειραματική εργασία έγινε με την βοήθεια καμπύλης αναφοράς (standard curve) που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων της κάθε αραιώσεως και τις τιμές Ct που παρουσιάζει η κάθε μια (βλ. σελ.20). Για την κατασκευή της καμπύλης επιλέξαμε ως μήτρα το εκχύλισμα πλασμιδιακού DNA από το στέλεχος JM83 με το πλασμίδιο 4CL το οποίο αφαιρέθηκε από πηκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το έτοιμο πρωτόκολλο «NucleoSpin ExtractII: PCR clean up, Gel extraction» της εταιρίας Macherey-Nagel (βλ σελ 55) και το οποίο υποβλήθηκε στην συνέχεια σε διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος DNA γνωστής συγκέντρωσης. Η δημιουργία της καμπύλης αναφοράς έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας Applied Biosystems (Applied Biosystems, 2003). Για τον υπολογισμό της μάζας του πλασμιδίου σε κάθε αραιώση χρησιμοποιήθηκε ο τύπος :

$$\text{Copy of interest} \times \text{mass of single plasmid (bp)} = \text{mass of plasmid DNA needed}$$

Για τον υπολογισμό της μάζας του πλασμιδίου χρειάστηκε το μέγεθος του πλασμιδίου (8375 bp) αλλά και το μέγεθος του γονιδίου 4 CL (1697 bp), ενώ οι αραιώσεις που έγιναν ήταν για 30.000.000, 3.000.000, 300.000, 30.000, 3.000, 300, 30 και 3 αντίγραφα.

B.1.3.6.1. Απομάκρυνση ποσότητας DNA με το έτοιμο πρωτόκολλο «NucleoSpin ExtractII: PCR clean up, Gel extraction» της εταιρείας Macherey-Nagel

- Αφαιρέθηκε με καθαρό νυστέρι το κομμάτι που περιείχε το τμήμα DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και τοποθετήθηκε σε ένα σωλήνα eppendorf των 2 ml. Στην συνέχεια προστέθηκαν 200μl από το Buffer NT και επώαστηκε στους 50⁰C μέχρι που διαλύθηκαν εντελώς όλα τα κομμάτια από το πήκτωμα αγαρόζης (5-10 λεπτά). Έγινε δόνηση vortex κάθε 2-3 min μέχρι το τέλος της επώασης.
- Το δείγμα μεταφέρθηκε σε μια Nucleo Spin Exrtact II στήλη, η οποία είχε τοποθετηθεί σ'ένα σωλήνα συλλογής και φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 11,000 στροφές. Μετά την φυγοκέντρωση αφαιρέθηκε η Nucleo Spin Exrtact II στήλη και πετάχτηκε ότι υπήρχε μέσα στον σωλήνα συλλογής και επανατοποθετήθηκε η Nucleo Spin Exrtact II στήλη πίσω.
- Προστέθηκαν 600 μl Buffer NT3 και ακολούθησε φυγοκέντρωση του δείγματος για 1 min στις 11,000 στροφές. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε η Nucleo Spin Exrtact II στήλη και πετάχτηκε ότι υπήρχε μέσα στον σωλήνα συλλογής και επανατοποθετήθηκε η Nucleo Spin Exrtact II στήλη πίσω.
- Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 2 min στις 11,000 στροφές ώστε να αφαιρεθεί ποσοτικά το Buffer NT3. Τοποθετήθηκε η Nucleo Spin Exrtact II στήλη σε ένα σωλήνα eppendorf των 1,5 ml και προστέθηκαν 15-50 μl Buffer NE. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματιού για 1 min και στην συνέχεια έγινε φυγοκέντρωση για 1 min στις 11,000 στροφές. Μετά την φυγοκέντρωση αφαιρέθηκε η Nucleo Spin Exrtact II και ότι παρέμεινε μέσα στον σωλήνα eppendorf φυλάχτηκε στους -20⁰C.

B.1.3.7. Μελέτη των δύο στελεχών με αντίδραση της Real Time PCR.

Στην αντίδραση της Real Time PCR χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα τα δείγματα που προήλθαν από τις απομονώσεις πλασμιδιακού, χρωμοσωμικού και γενωμικού DNA και των δύο στελεχών *E. coli* (με και χωρίς το πλασμίδιο pESC-HIS-4CL). Πιο συγκεκριμένα, στη συσκευή μετρήθηκαν συνολικά 23 δείγματα από τα οποία τα 8 αφορούν την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, τα 3 περιείχαν H₂O αντί του DNA ως αρνητικό δείγμα (αρνητικός μάρτυρας), τα 4 ήταν δείγματα από απομονώσεις DNA

προηγούμενου πειράματος και τα υπόλοιπα ήταν τα δείγματα από τις πρόσφατες απομονώσεις που περιγράφονται σε προηγούμενη ενότητα. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή τόσο της Real Time PCR όσο και της PCR είναι η συσκευή Mx3000P της εταιρίας Stratagene, για την οποία έγινε αναφορά σε προηγούμενη ενότητα.

Για την ανίχνευση των προϊόντων της Real Time PCR επιλέχθηκε η μέθοδος της χρωστικής SYBR Green I, η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω ενσωματώνεται σε δίκλιωνα τμήματα DNA. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έγινε με την βοήθεια του σήματος που έδωσε η SYBR Green I κατά τη δεσμευσή της στα μόρια DNA.

Για την κάθε αντίδραση της Real Time PCR παρασκευάστηκε ένα αρχικό ολικό διάλυμα, το οποίο περιείχε H₂O, Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix, το ζεύγος των εκκινητών και την Reference Dye (Πίνακας 2). Για κάθε δείγμα προστέθηκε σε ένα PCR σωλήνα erppendorf 1 μl DNA και 24 μl από το ολικό διάλυμα.

Πίνακας 2. Αναλυτική παρουσίαση της σύστασης της αντίδρασης Real Time PCR.

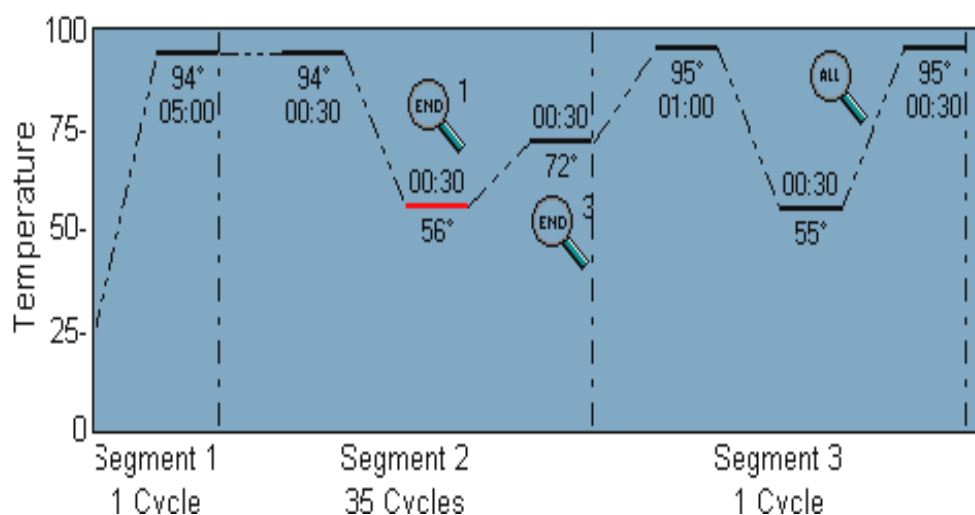
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μl)	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
H ₂ O	10,375	
Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (2x)	12,500	1x
Primer Reverse (10mM)	0,375	0,15mM
Primer Forward (10mM)	0,375	0,15mM
Reference Dye (1mM)	0,375	0,015mM
DNA	1	0,18ng
Τελικός όγκος	25	

Το τμήμα του DNA που ενισχύεται με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση έχει μέγεθος 194 bp και βρίσκεται μέσα στο γονίδιο 4CL από το σημείο 1486 έως 1679. Οι αλληλουχίες των δύο εκκινητών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

Όνομασία	Αλληλουχία εκκινητών
Primer F (Forward)	5'- TGA GTG GCG GCG GTT TCT A-3'
Primer R (Reverse)	5'- GTT CCT GTT GCC TTC GTT GTG A-3'

Η προετοιμασία της αντίδρασης Real Time PCR έγινε σε ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής για αποφυγή μολύνσεων και το πρόγραμμα της αντίδρασης ολοκληρώθηκε σε 35 κύκλους. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών/χρόνου (amplification profile) που ακολουθήθηκε για την διεξαγωγή της Real Time PCR όπως φαίνεται διαγραμματικά και στην Εικόνα 20 ήταν το εξής: **1)** στάδιο αποδιάταξης στους 94°C για 5 min, **2)** στάδιο ενίσχυσης (στους 94°C για 30 sec, στους 56°C για 30 sec και στους 72°C για 30 sec) το στάδιο αυτό συντελέστηκε για 30 φορές και **3)** τελικό στάδιο (στους 95°C για 1 min, στους 55°C για 30 sec και στους 95°C για 30 sec). Η διαδικασία της αντίδρασης ολοκληρώθηκε σε 2 περίπου ώρες.



Εικόνα 20. Παρουσίαση του προγράμματος με τις παραμέτρους που επιλέχθηκαν για τις συνθήκες της αντίδρασης Real Time PCR.

B.1.3.8. Μελέτη των δύο στελεχών του *E. coli* με την μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολύμεράσης (PCR)

Πρέπει να αναφερθεί πως η αντίδραση της συμβατικής PCR που θα περιγραφεί στις επόμενες ενότητες είναι από προηγούμενο πείραμα με δείγματα τα ίδια στελέχη του βακτηρίου *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν και στην αντίδραση της Real Time PCR, τα οποία είχαν αναπτυχθεί και απομονωθεί με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στις παραπάνω ενότητες (σελ.45-50). Το συγκεκριμένο πείραμα προστέθηκε σ' αυτή την πειραματική εργασία για σύγκριση ανάμεσα στην μέθοδο της Real Time PCR και αυτή της συμβατικής PCR. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο συμβατικής PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της συμβατικής PCR

	ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΣΥΝΤΟΜΕΥΜΕΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
1	Πλασμιδιακή απομόνωση με Αλκαλική λύση στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL	4CL Plasm Miniprep
2	Πλασμιδιακή απομόνωση με Αλκαλική λύση στελέχους JM83 χωρίς το πλασμίδιο 4CL	JM83 Plasm Miniprep
3	Πλασμιδιακή απομόνωση με το NucleoSpin Plasmid Quick Pure στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL	4CL Plasm Kit
4	Πλασμιδιακή απομόνωση με το NucleoSpin Plasmid Quick Pure στελέχους JM83 χωρίς το πλασμίδιο 4CL	JM83 Plasm Kit
5	Χρωμοσωμική απομόνωση με το πρωτόκολλο ολικού Βακτηριακού DNA στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL	4CL Chrom
6	Χρωμοσωμική απομόνωση με το πρωτόκολλο ολικού Βακτηριακού DNA στελέχους JM83 χωρίς το πλασμίδιο 4CL	JM83 Chrom
7	Γενομική απομόνωση με το πρωτόκολλο NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL	4CL Chrom Kit
8	Γενομική απομόνωση με το πρωτόκολλο NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4CL	JM83 ChromKit

B.1.3.8.1. Τρέξιμο ποσότητας DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (0,8%)

Πριν την παρασκευή της αντίδρασης της PCR, 3μl διαλύματος DNA από κάθε εκχύλιση με προσθήκη 5μl H₂O και 2 μl διαλύματος φόρτωσης για DNA υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (συγκέντρωσης 0.8%), για επιβεβαίωση της παρουσίας DNA σε αυτά. Για την παρασκευή του πηκτώματος, η αγαρόζη διαλύθηκε σε 50 ml TBE και μετά από θέρμανση προστέθηκαν 2 μl χρωστικής (βρωμιούχου αιθιδίου, ethidium bromide) με ανάδευση. Στην συνέχεια το διάλυμα φορτώθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφού στερεοποιήθηκε προστέθηκε το διάλυμα TBE. Κατόπιν προστέθηκαν τα δείγματα προς ανάλυση DNA (που πήραν μέρος στην αντίδραση PCR) και το μέγεθος τους ταυτοποιήθηκε με βάση τα γνωστά μεγέθη του μοριακού δείκτη λHindIII.

B.1.3.8.2. Προετοιμασία της αντίδρασης της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις της PCR ήταν η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την Real Time PCR που προαναφέρθηκε.

Για την αντίδραση PCR προετοιμάστηκε διάλυμα το οποίο περιείχε H₂O, ρυθμιστικό διάλυμα (10×buffer, 200mM Tris (pH 8,4), 50mM KCl), MgCl₂, dNTP's, το ζεύγος των εκκινητών (Forward, Reverse) και Taq πολυμεράση (Πίνακας 5). Στην συνέχεια το διάλυμα αυτό μοιράστηκε σε PCR σωληνάκια (PCR tubes) από 47μl και προστέθηκε 3 μl DNA από κάθε δείγμα DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50 μl. Πιο αναλυτικά η σύσταση της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 5. Στην αντίδραση της PCR προστέθηκε αποστειρωμένο H₂O ως αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή ως δείγμα που δεν περιείχε DNA. Οι εκκινητές της αντίδρασης ήταν οι ίδιοι με αυτούς της Real Time PCR (βλ. σελ. 56).

Μετά το τέλος των αντιδράσεων της PCR φορτώθηκαν 10μl από κάθε δείγμα μαζί με 2 μl χρωστική σε πήκτωμα αγαρόζης (1.5%) για ηλεκτροφόρηση, ώστε να παρατηρηθούν τα αποτελέσματα της μεθόδου PCR. Μαζί με τα δείγματα φορτώθηκε ένας δείκτης μοριακών δεικτών γνωστού μοριακού βάρους DNA (molecular size ladder) για να γίνει ο υπολογισμός του μεγέθους του προϊόντος που έδωσε η PCR και να γίνει βεβαίωση ότι το προϊόν της PCR είναι το αναμενόμενο.

Πίνακας 5. Η σύσταση της αντίδρασης που χρησιμοποιήσαμε στην PCR.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μl)	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
MgCl ₂ (50mM)	1.5 μl	1.5mM
10×buffer	5 μl	1x
dNTP's (25mM)	0.3 μl	0.15mM
Primer F (10 mM)	1 μl	0.2mM
Primer R(10 mM)	1 μl	0.2mM
Taq polymerase(5u/μl)	0.2 μl	1 unit
H ₂ O	38 μl	
DNA	3 μl	
Τελικός όγκος	50 μl	

B.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

B.2.1. Αποτελέσματα της μέτρησης με την συσκευή Nanodrop

Χρησιμοποιήθηκε 1μl από το προϊόν της κάθε απομόνωσης για την μέτρηση, το οποίο τοποθετήθηκε στην ακίδα της συσκευής Nanodrop και τα αποτελέσματα που έδωσε το όργανο, μέσω του υπολογιστή με τον οποίο είναι συνδεδεμένο, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 6 κάθε δείγμα που μετρήθηκε με την συσκευή Nanodrop έδωσε διαφορετική συγκέντρωση DNA. Τα δείγματα του στελέχους JM83 που περιείχαν το πλασμίδιο pESC-HIS-4CL και προέρχονται από πλασμιδιακή απομόνωση, τόσο με το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο (kit) όσο και με το πρωτόκολλο Αλκαλικής Λύσης, παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τα δείγματα του στελέχους που δεν περιέχει το πλασμίδιο και προέρχονται από πλασμιδιακή

απομόνωση. Τα δείγματα χρωμοσωμικής απομόνωσης και των δύο στελεχών εμφανίζουν την μικρότερη συγκέντρωση ανάμεσα σ' όλα τα δείγματα που μετρήθηκαν, ενώ αυτά που προέρχονται από γενωμική απομόνωση εμφανίζουν μια σχετικά υψηλά συγκέντρωση DNA. Τα δείγματα 9, 10, 11 και 12 είναι αυτά από παλαιότερη πειραματική προσπάθεια και ιδίως τα δείγματα 11, 12 παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' όλα τα δείγματα που μετρήθηκαν (Για τις ονομασίες των δειγμάτων βλ. Πίνακα 1, σελ. 51).

Πίνακας 6. Αποτελέσματα μέτρησης της συγκέντρωσης του DNA στα εκχυλίσματα με το Nanodrop.

	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/μl)
1	4CL Plasm Miniprep	131,09
2	JM83 Plasm Miniprep	20,8
3	4CL Plasm Kit	88,65
4	JM83 Plasm Kit	23,99
5	4CL Chrom	4,56
6	JM83 Chrom	13,89
7	4CL Chrom Kit	60,39
8	JM83 Chrom Kit	54,61
9	4CL Chrom Kit 13/5	41,03
10	JM83 Chrom Kit 13/5	61,64
11	4CL Plasm 24/3	4811,49
12	JM83 Plasm 24/3	4794,93
13	4CL Standard	11,46

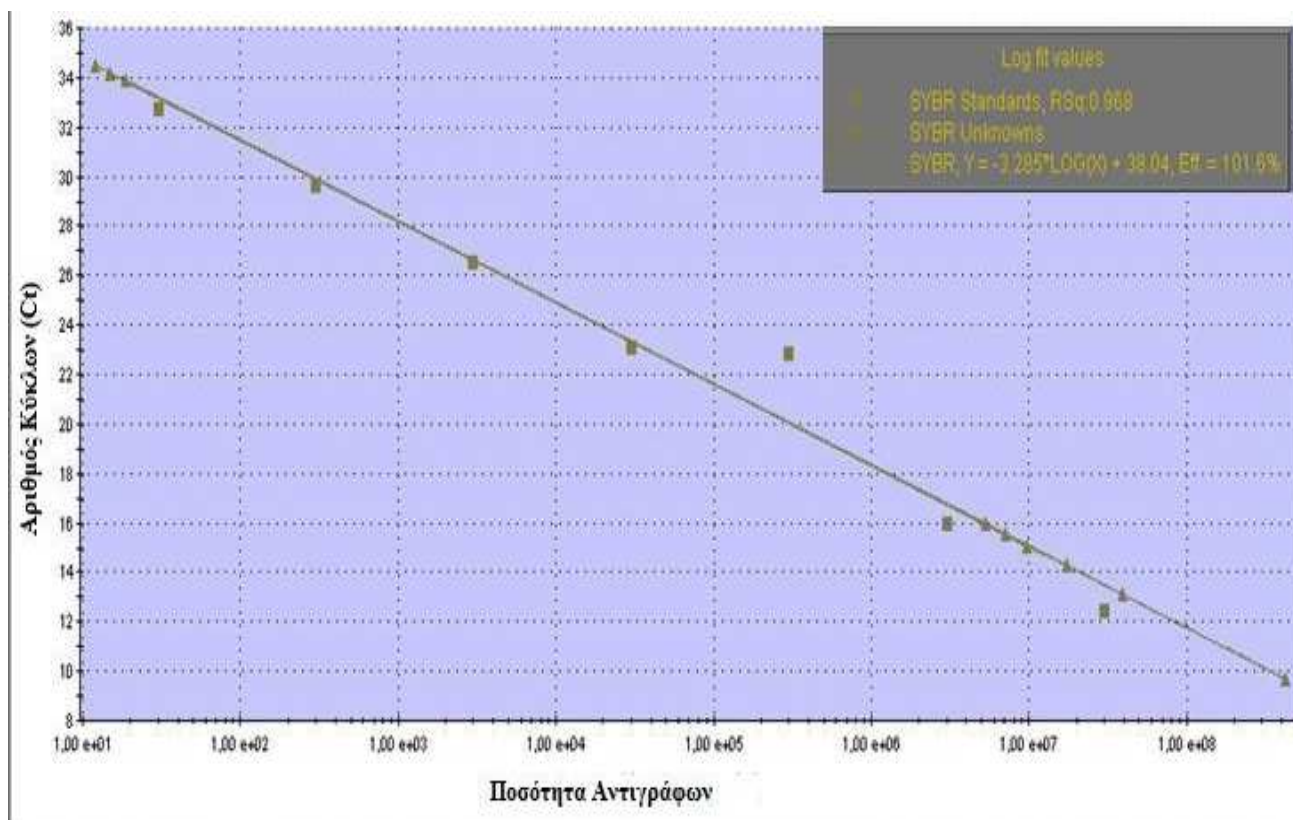
Επειδή όμως σκοπός ήταν να χρησιμοποιηθεί η ίδια ποσότητα DNA από κάθε δείγμα στην αντίδραση της Real Time PCR, έτσι ώστε να γίνει αντιπροσωπευτική σύγκριση, έγινε αραίωση ποσότητας των δειγμάτων με ποσότητα νερού (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Οι αραιώσεις των δειγμάτων με ποσότητα νερού για τελικό όγκο 20 μ l.

	Δείγματα	Αρχική Συγκέντρωση (ng/μl)	Όγκος Δείγματος (μl)	Ποσότητα H₂O (μl)	Τελική Συγκέντρωση (ng/μl)
1	4CL Plasm Miniprep	131,09	0,70	19,30	4,56
2	JM83 Plasm Miniprep	20,8	4,38	15,62	4,56
3	4CL Plasm Kit	88,65	1,03	18,97	4,56
4	JM83 Plasm Kit	23,99	3,80	16,20	4,56
5	4CL Chrom	4,56	20,00	0,00	4,56
6	JM83 Chrom	13,89	6,57	13,43	4,56
7	4CL Chrom Kit	60,39	1,51	18,49	4,56
8	JM83 Chrom Kit	54,61	1,67	18,33	4,56
9	4CL Chrom Kit 13/5	41,03	2,22	17,78	4,56
10	JM83 Chrom Kit 13/5	61,64	1,48	18,52	4,56
11	4CL Plasm 24/3	4811,49	0,02	19,98	4,56
12	JM83 Plasm 24/3	4794,93	0,02	19,98	4,56
13	4CL Standard	11,46	7,96	12,04	4,56

B.2.2. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της καμπύλης αναφοράς (standard curve)

Στην Εικόνα 21 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς (standard curve) σύμφωνα με την οποία υπολογίστηκε η ποσότητα των αντιγράφων σε κάθε δείγμα μετά το τέλος της αντίδρασης. Τα υπο ανάλυση δείγματα εμφανίζονται πάνω στην καμπύλη αναφοράς μαζί με τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων του πλασμιδίου (άξονας y) που έχει το κάθε δείγμα και ανάλογα με τον κύκλο (άξονα x) που μετρήθηκε η ποσότητα.



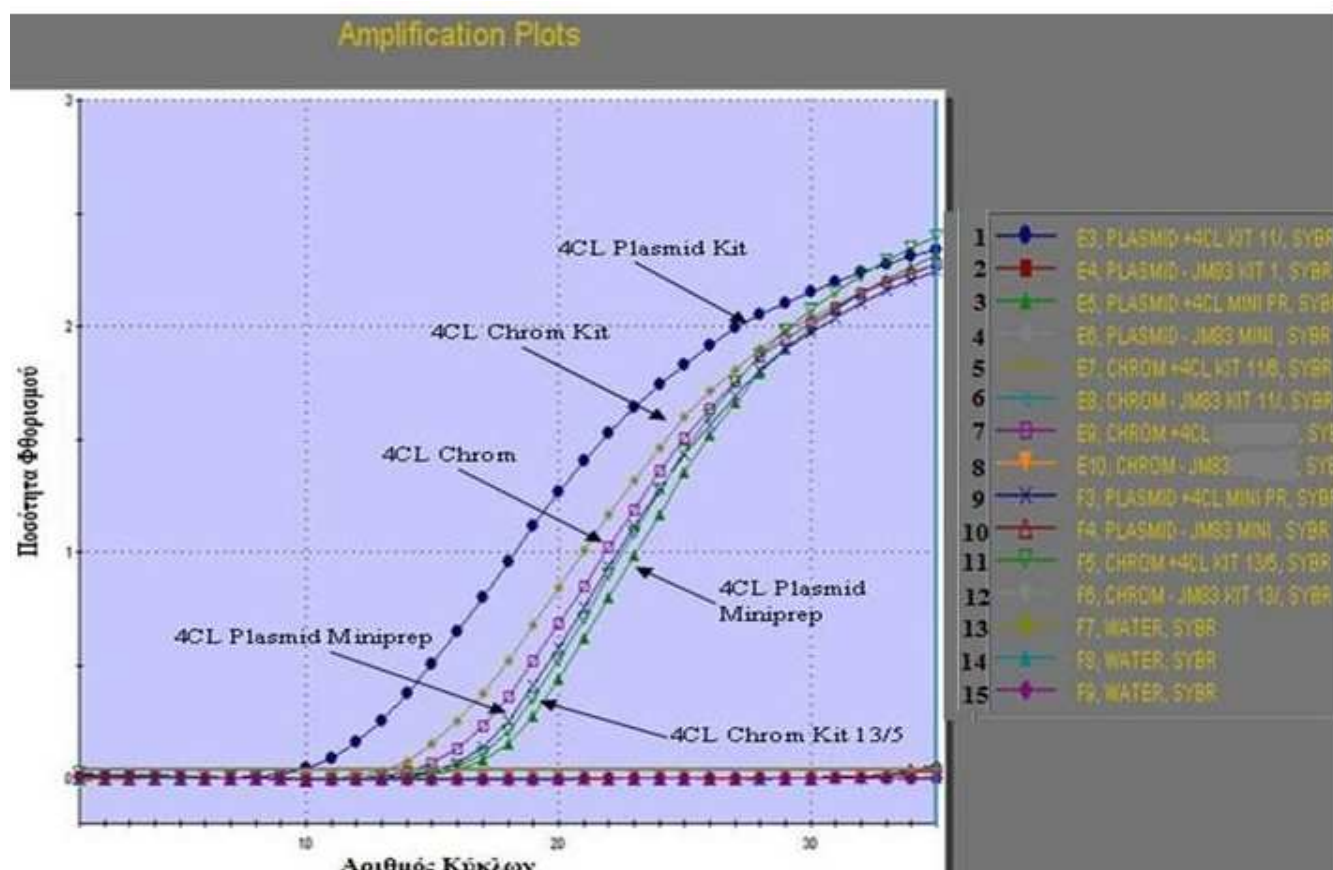
Εικόνα 21. Η καμπύλη αναφοράς με τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης και τα υπό μελέτη δείγματα.

B.2.3. Αποτελέσματα της αντίδρασης Real Time PCR

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα αποτελέσματα της αντίδρασης Real Time PCR καταγράφονται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μετρώντας την μεταβολή του φθορισμού και τα αποτελέσματα απεικονίζονται με την μορφή εκθετικής καμπύλης παρουσιάζοντας έτσι την ανάλογη αύξηση των προϊόντων. Στην Εικόνα 22 παρουσιάζονται τα τελικά αποτελέσματα της αντίδρασης με την μορφή καμπυλών. Τα δείγματα που προέρχονταν από το στέλεχος JM83 με το πλασμίδιο pESC 4CL εμφάνισαν καμπύλες που εκφράζουν την εκθετική αύξηση του προϊόντος σε συνάρτηση με το χρόνο (αριθμό κύκλου, Ct) που ξεκίνησε αυτή η αύξηση.

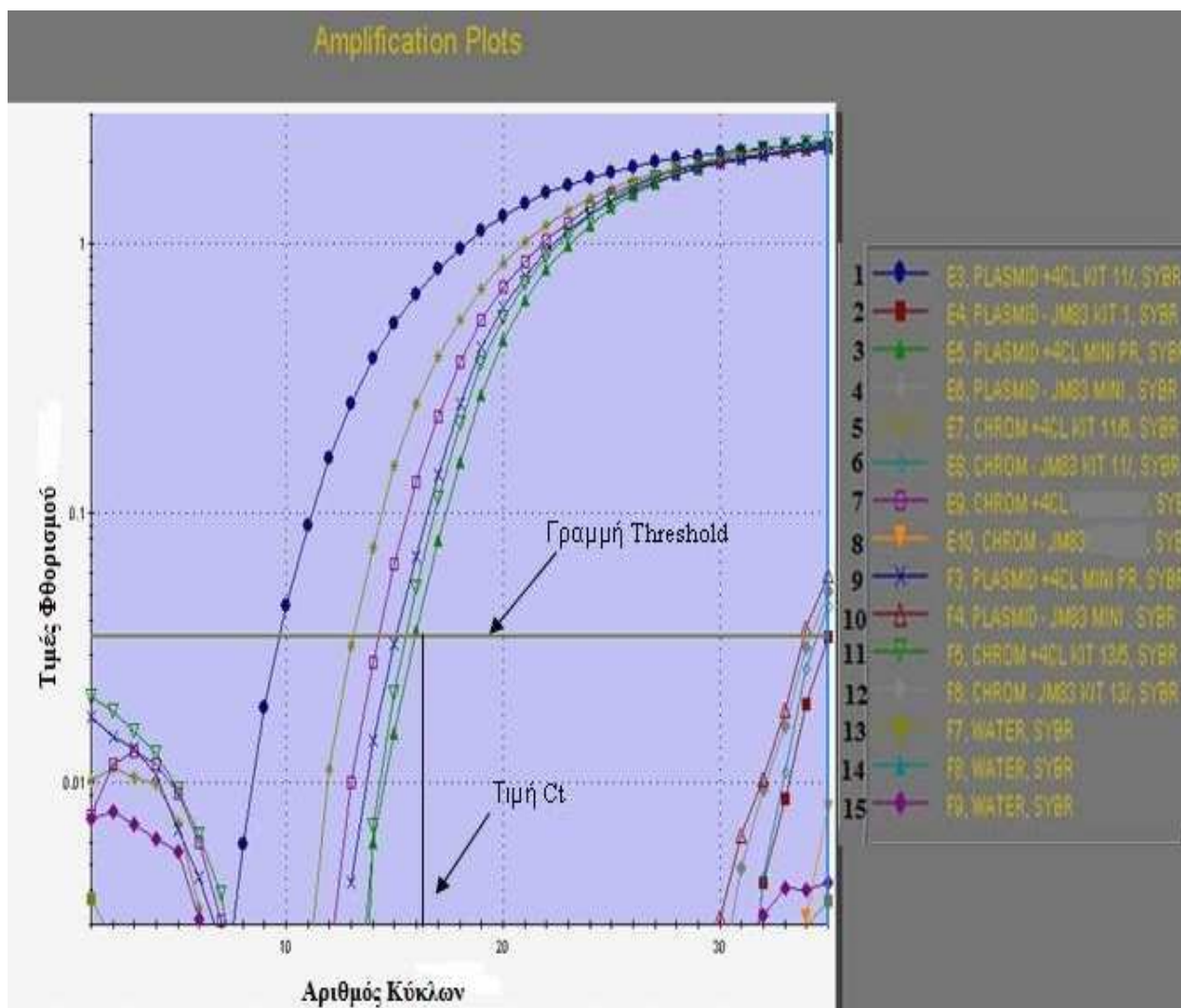
Παρατηρήθηκε ακόμα πώς τα δείγματα που εμφάνισαν την αύξηση προϊόντος της Real Time PCR προέρχονται τόσο από απομόνωση πλασμιδιακού DNA (με το πρωτόκολλο Αλκαλικής Λύσης (miniprep) και το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο NucleoSpin Plasmid Quick Pure, Kit) όσο και από την απομόνωση χρωμοσωμικού

DNA (με το πρωτόκολλο βακτηριακού DNA, Chrom) αλλά και από την απομόνωση γενωμικού DNA (με το έτοιμο πρωτόκολλο NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue, Chrom Kit).



Εικόνα 22. Στην εικόνα αυτή καταγράφονται οι τιμές φθορισμού της SYBR Green με την μέθοδο Real Time PCR, οι οποίες απεικονίζουν την εκθετική αύξηση των προϊόντων σε κάθε υπό ανάλυση δείγμα.

Παρόλο που στην Εικόνα 23 εμφανίζονται τα ίδια αποτελέσματα με την Εικόνα 22, η συγκεκριμένη εικόνα δίδει την δυνατότητα μιας πιο αναλυτικής εικόνας των αποτελεσμάτων. Στην εικόνα αυτή εμφανίζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια σε ποιιά χρονική στιγμή, δηλαδή σε ποιόν κύκλο (τιμή Ct) της αλυσιδωτής αντίδρασης, άρχισε η συγκέντρωση του προϊόντος DNA να υπερβαίνει εκείνη του αρχικού εκχυλίσματος (γραμμή threshold).

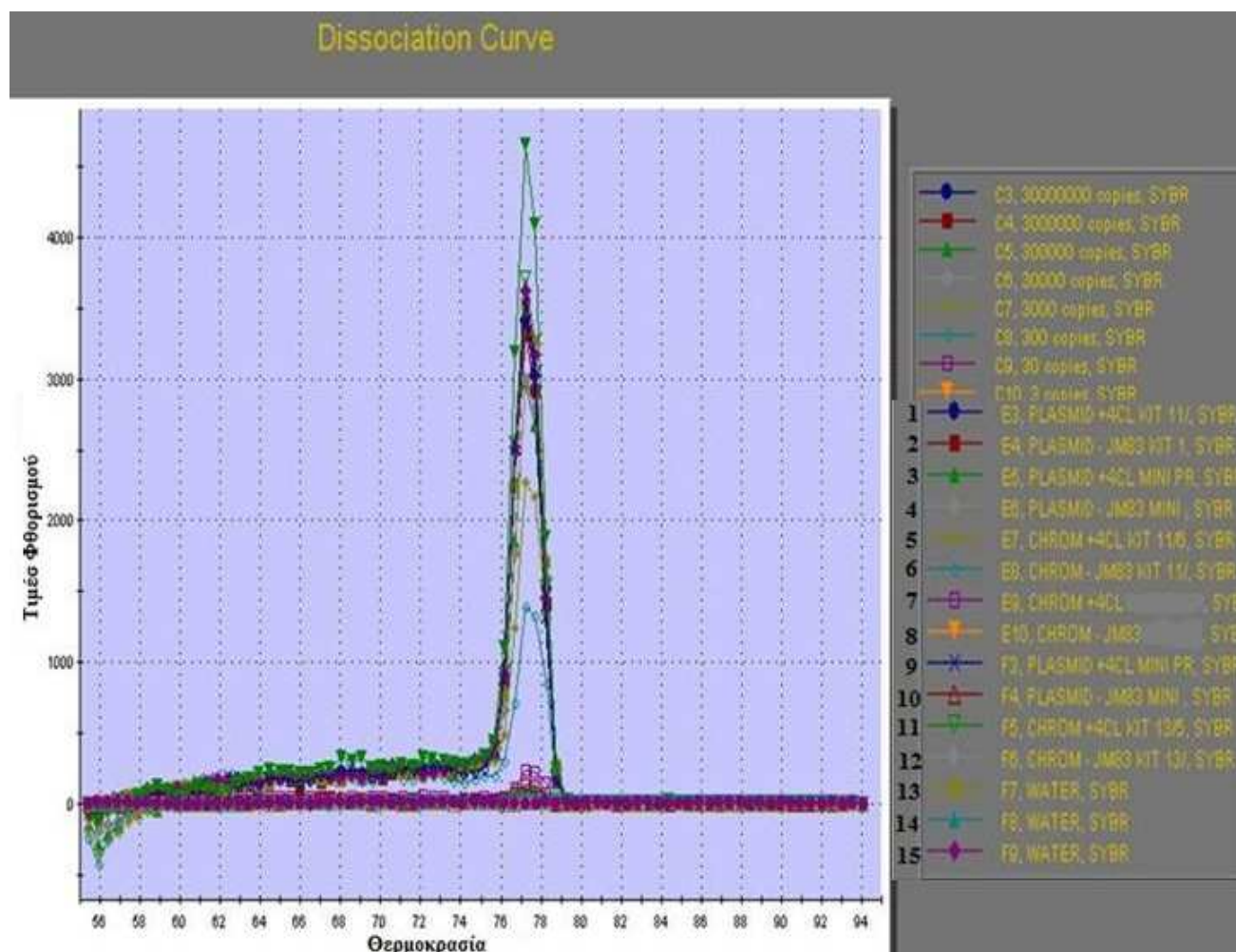


Εικόνα 23. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων με σαφή οριοθέτηση του σημείου threshold και της τιμής Ct.

Τα δείγματα που ξεκίνησαν πολύ νωρίς την εκπομπή σήματος σημαίνει πως είχαν μεγαλύτερη ποσότητα της αλληλουχίας DNA εξ αρχής.

Στην Εικόνα 24 εμφανίζεται η καμπύλη θερμικής αποδιάταξης (melting curve) όπου παρουσιάζεται η θερμοκρασία στην οποία αποδιάταχθηκε κάθε δείγμα κατά την διάρκεια της αντίδρασης, διευκολύνοντας έτσι την αναγνώριση του προϊόντος που παράχθηκε, αν δηλαδή το σήμα που έδωσε κάθε υπό ανάλυση δείγμα προερχόταν από το επιθυμητό προϊόν ή από κάτι άλλο. Αυτό που παρατηρήθηκε στην Εικόνα 22 είναι

πως τα όλα δείγματα αποδιατάχθηκαν στην ίδια θερμοκρασία αφού εμφάνισαν μία κορυφή με μέγιστο (αποδιάταξη) στην ίδια θερμοκρασία.



Εικόνα 24. Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης (Melting curves) όλων των δειγμάτων που δείχνουν την θερμοκρασία στην οποία αποδιατάχθηκε το καθένα στην αντίδραση Real Time PCR.

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της αντίδρασης για όλα τα δείγματα και δείχνει ξεκάθαρα ποιά από τα υπό ανάλυση δείγματα που ήταν στην αντίδραση της Real Time PCR ενισχύθηκαν και παρουσίασαν προϊόν, ποιά δεν έδωσαν καθόλου προϊόν καθώς και ποιος ήταν ο αριθμός των αντιγράφων που δημιουργήθηκαν.

Πίνακας 8. Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης Real Time Pcr. Καταγραφή τιμών Ct για κάθε δείγμα αλλά και ποσότητας αντιγράφων.

Αριθμός δείγματος	Ονομασία δείγματος	Μέθοδος	Τύπος δείγματος	Σημείο Threshold	Αριθμός κύκλου (Ct)	Ποσότητα (αντίγραφα)
C3	3x10 ⁷ (αντίγραφα)	Sybr	Standard	0.0346	12.43	3.00e+007
C4	3x10 ⁶ (αντίγραφα)	Sybr	Standard	0.0346	15.98	3.00e+006
C5	3x10 ⁵ (αντίγραφα)	Sybr	Standard	0.0346	22.85	3.00e+005
C6	3x10 ⁴ (αντίγραφα)	Sybr	Standard	0.0346	23.12	3.00e+004
C7	3x10 ³ (αντίγραφα)	Sybr	Standard	0.0346	26.55	3.00e+003
C8	3x10 ² (αντίγραφα)	Sybr	Standard	0.0346	29.64	3.00e+002
C9	3x10 ¹ (αντίγραφα)	Sybr	Standard	0.0346	32.74	3.00e+001
C10	3 (αντίγραφα)	Sybr	Standard	0.0346	No Ct	No Ct
1	4CL Plasmid Kit	Sybr	Unknown	0.0346	9.69	4.273e+008
2	JM83Plasmid Kit	Sybr	Unknown	0.0346	No Ct	No Ct
3	4CL Plasmid Miniprep	Sybr	Unknown	0.0346	15.94	5.321e+006
4	JM83Plasmid Miniprep	Sybr	Unknown	0.0346	34.18	1.488e+001
5	4CL Chrom Kit	Sybr	Unknown	0.0346	13.09	3.942e+007
6	JM83Chrom Kit	Sybr	Unknown	0.0346	34.50	1.196e+001
7	4CL Chrom	Sybr	Unknown	0.0346	14.25	1.747e+007
8	JM83Chrom	Sybr	Unknown	0.0346	No Ct	No Ct
9	4CL Plasmid Miniprep (24/3)	Sybr	Unknown	0.0346	15.08	9.737e+006
10	JM83Plasmid Miniprep (24/3)	Sybr	Unknown	0.0346	33.87	1.856e+001
11	4CL Chrom Kit (13/5)	Sybr	Unknown	0.0346	15.53	7.131e+006
12	JM83Chrom Kit (13/5)	Sybr	Unknown	0.0346	No Ct	No Ct
13	Water	Sybr	NTC	0.0346	No Ct	No Ct
14	Water	Sybr	NTC	0.0346	No Ct	No Ct
15	Water	Sybr	NTC	0.0346	No Ct	No Ct

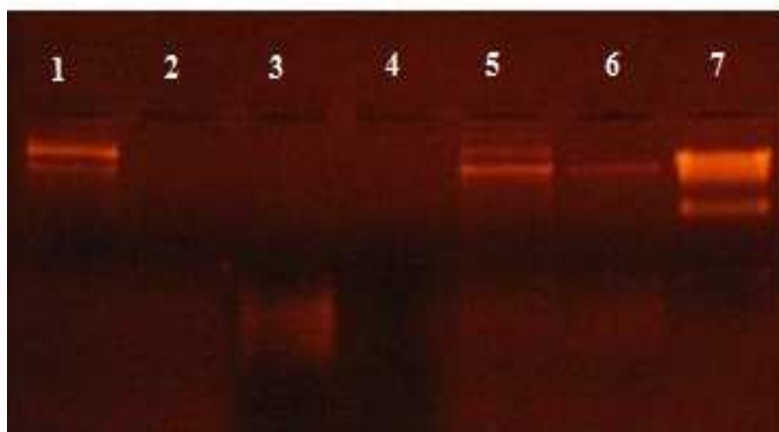
Αυτό που έδειξαν τα αποτελέσματα του Πίνακα 8 είναι πως το στέλεχος JM83 με το πλασμίδιο pESC 4CL παρουσίασε προϊόν τόσο στα δείγματα που προήλθαν από πλασμιδιακή απομόνωση (και στα δύο πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν) (δείγματα 1, 3 και 9, Πίνακα 8) όσο και στα δείγματα που προήλθαν από χρωμοσωμική (δείγμα

7) και γενωμική απομόνωση (δείγματα 5 και 11) και επίσης η παραγωγή αντιγράφων σ'αυτά τα δείγματα ξεκίνησε σχετικά νωρίς, δηλαδή σε μικρό αριθμό κύκλων (μικρή τιμή Ct). Το δείγμα 4CL Plasmid Kit (δείγμα 1) παρουσιάζει το μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων και σε μικρό αριθμό κύκλου. Το στέλεχος JM83 χωρίς το πλασμίδιο pESC 4CL δεν έδωσε καθόλου αντίγραφα (No Ct) στα δείγματα: JM83 Plasmid Kit (δείγμα 2), JM83 Chrom (δείγμα 8) και JM83 Chrom Kit 13/5 (δείγμα 12). Υπήρξαν όμως και δείγματα όπως τα JM83 Plasmid Miniprep (δείγμα 4), JM83 Chrom Kit (δείγμα 6) και JM83 Plasmid Miniprep 24/3 (δείγμα 10) τα οποία έδωσαν ένα μικρό αριθμό αντιγράφων που θεωρείται μηδαμινή και που εμφανίστηκε στους τελευταίους κύκλους της αντίδρασης γεγονός που παραπέμπει σε πειραματικό σφάλμα λόγω επιμόλυνσης με μη σχετικό DNA (για ονομασίες δειγμάτων βλ Πίνακα 1 σελ.51).

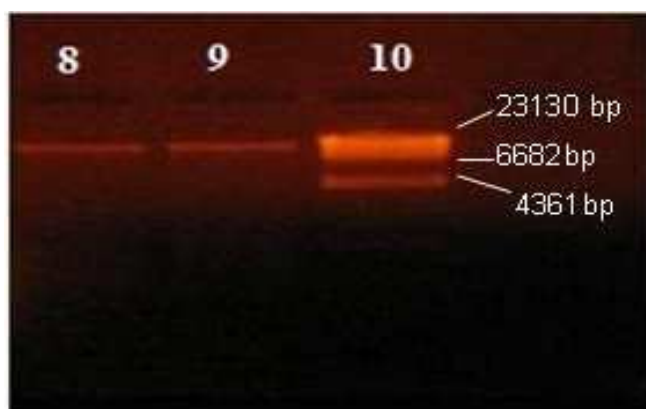
B.2.4. Αποτελέσματα της συμβατικής αντίδρασης PCR

B.2.4.1. Πήκτωμα αγαρόζης 0,8 %

Στις Εικόνες 25 και 26 παρουσιάζεται το πήκτωμα αγαρόζης 0,8% στο οποίο φορτώθηκε ποσότητα DNA (3μl) από όλα τα δείγματα που προήλθαν από τις απομονώσεις του στελέχους JM83 και του στελέχους JM83 με το πλασμίδιο pESC 4CL που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της συμβατικής PCR (βλ Πίνακα 4 σελ.57).



Εικόνα 25. Gel αγαρόζης 0,8% με κάποια δείγματα και τον δείκτη λHindIII. 1) JM83+4CL Plasmid Kit, 2) JM83 Plasmid Kit, 3) JM83+4CL Plasmid Miniprep, 4) JM83 Plasmid Miniprep, 5) JM83+4CL Chrom. Kit, 6) JM83 Chrom Kit., 7) λHindIII



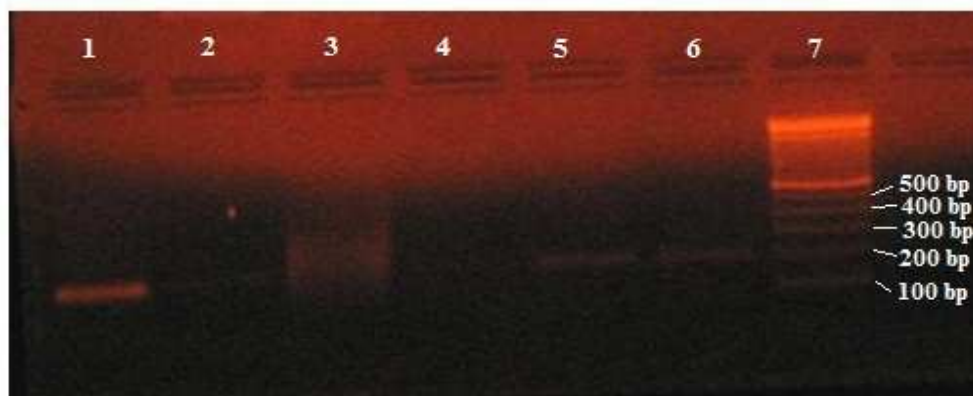
Εικόνα 26. Gel αγαρόζης 0,8% με ορισμένα από τα δείγματα και τον δείκτη λHindIII. 8) JM83+4CL Chrom, 9) JM83 Chrom, 10) λHindIII.

Όπως παρατηρήθηκε τα δείγματα που εμφάνισαν διακριτή ζώνη περιέχουν αρκετή ποσότητα DNA πριν την αντίδραση της PCR. Κάποια από τα δείγματα που περιείχαν το στέλεχος χωρίς το πλασμίδιο, όπως το δείγμα 4 (Εικόνα 25) και το δείγμα 9 στην Εικόνα 26 εμφάνισαν ζώνη, ενώ το δείγμα 3 (Εικόνα 25) που περιείχε το στέλεχος με το πλασμίδιο και ήταν από πλασμιδιακή απομόνωση δεν εμφάνισε ζώνη προϊόντος.

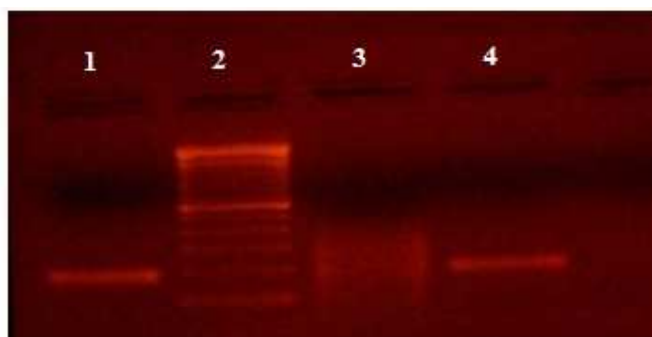
B.2.4.2. Αποτελέσματα της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%

Στις εικόνες 27 και 28 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%. Τα δείγματα του στελέχους JM83 με το πλασμίδιο 4C1 που προέρχονται από απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το πρωτόκολλο απομόνωσης της μεθόδου Αλκαλικής Λύσης αλλά και με το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο NucleoSpin Plasmid Quick Pure, Kit εμφάνισαν ορατή ζώνη, η οποία είναι πιο έντονη στο πρωτόκολλο της Αλκαλικής Λύσης. Τα δείγματα DNA από το στέλεχος JM83 χωρίς το πλασμίδιο δεν έπρεπε να δώσουν ορατή ζώνη, ιδιαίτερα στα δύο δείγματα που ήταν από απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Στις Εικόνες 27 και 28 φαίνεται πως ακόμα και τα δείγματα με το στέλεχος χωρίς το πλασμίδιο που εμφάνισαν στο πήκτωμα αγαρόζης αχνές ή έντονες ζώνες ανεξάρτητα με τι είδους πρωτόκολλο έχουν απομονωθεί. Αυτό που παρατηρήθηκε στις Εικόνες 27 και 28 είναι πιθανώς αποτέλεσμα επιμόλυνσης η οποία έγινε κατά την διάρκεια προετοιμασίας της αντίδρασης PCR καθώς και ο

μάρτυρας (αρνητικό δείγμα), στον οποίο προστέθηκε νερό αντί ποσότητα DNA, εμφάνισε μια έντονη ζώνη. Όλα τα δείγματα που εμφάνισαν ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης την εμφάνισαν στο ίδιο περίπου ύψος μεταξύ τους.



Εικόνα 27. Πήκτωμα αγαρόζης με δείγματα από την αντίδραση PCR και με τον δείκτη Mw Ladder. 1) JM83+4CL Plasmid Miniprep, 2) JM83 Plasmid Miniprep, 3) JM83+4CL Chrom., 4) JM83 Chrom., 5) JM83+4CL Plasmid Kit, 6) JM83 Plasmid Kit, 7) Mw Ladder.



Εικόνα 28. Πήκτωμα αγαρόζης με δείγματα της αντίδρασης PCR με τον δείκτη Mw Ladder. 1)H₂O, 2) Ladder, 3) JM83+4CL Chrom Kit, 4) JM83 Chrom Kit.

B. 3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σκοπός αυτής της πειραματικής εργασίας ήταν η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του DNA σε εκχυλίσματα από γενετικά τροποποιημένο στέλεχος του βακτηρίου *Escherichia coli* με την μέθοδο της Real Time PCR. Εκτός

όμως από την μέθοδο Real Time PCR η εργασία αυτή περιλαμβάνει ενότητα στην οποία περιγράφεται η ανίχνευση του στέλεχους με τη συμβατική μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (συμβατική PCR). Τα αποτελέσματα και από τις δύο μεθόδους έδειξαν πως υπήρξε ενίσχυση του DNA του στέλεχους του βακτηρίου με την εμφάνιση ζωνών στην περίπτωση της συμβατικής PCR και με την εμφάνιση χαρακτηριστικών καμπύλων, οι οποίες σχηματίστηκαν σύμφωνα με την ανίχνευση της χρωστικής SYBR Green στην περίπτωση της Real Time PCR. Ακόμα έγινε και ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του DNA σε κάθε εκχύλισμα που αναλύθηκε με την βοήθεια της καμπύλης αναφοράς στην Real Time PCR.

Στην περίπτωση όμως της συμβατικής PCR τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα, επειδή υπήρξε μάλλον επιμόλυνση DNA κατά την διάρκεια παρασκευής των μιγμάτων της αντίδρασης με αποτέλεσμα ορισμένα από τα δείγματα, όπως αυτά που δεν προστέθηκε εκχύλισμα DNA αλλά αντ' αυτού νερό (αρνητικός μάρτυρας) καθώς και το μη γενετικά τροποποιημένο στέλεχος τα οποία δεν έπρεπε να εμφανίσουν ζώνη. Έγινε αντιστοίχιση του προϊόντος που έδωσαν τα δείγματα από την αντίδραση της συμβατικής PCR, δηλαδή των ζωνών που εμφανίστηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης, με τις ζώνες του μοριακού δείκτη που προστέθηκε στο πήκτωμα για να προσδιοριστεί η ποσότητα DNA που προέκυψε από την αντίδραση.

Στα αποτελέσματα που έδωσε η Real Time PCR ήταν δυνατή η παρακολούθηση της ανίχνευσης του γενετικά τροποποιημένου στελέχους JM83 κατά την διάρκεια της αντίδρασης καθώς και η παρουσίαση της ποσότητας DNA που περιείχε κάθε υπο ανάλυση δείγμα στο τέλος της αντίδρασης.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα πειραματική εργασία είναι πως και οι δύο μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της παρουσίας/απουσίας τόσο του γενετικά τροποποιημένου στελέχους όσο και οποιασδήποτε άλλου εκχυλίσματος που περιέχει DNA, τα αποτελέσματα όμως που παρουσιάζονται από την μέθοδο της Real Time PCR είναι σαφώς πιο ικανοποιητικά. Η Real Time PCR απέδωσε τα αποτελέσματα με μεγαλύτερη ακρίβεια, ταχύτητα και έδωσε περισσότερες πληροφορίες για τα υπό μελέτη δείγματα σε σχέση με την συμβατική PCR (π.χ. η θερμοκρασία αποδιάταξης του κάθε δείγματος).

B.4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akritidis P., Pasentsis K., Tsaftaris A.S., Mylona P.V. and Polydoros A. N., 2008. "Identification of unknown genetically modified material admixed in conventional cotton seed and development of an event-specific detection method". *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol.11, No.2. Διαθέσιμο on line.: <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol11/issue2/full/11/index.html>. Τελευταία πρόσβαση: 14/6/2009.
- Arya M., Shergill I., Williamson M., Gommersall L., Arya N. and Hiteudra RH. P., 2005. "Basic principles of Real Time quantitative PCR". *Expert Reviews Molecular Diagnostics*, London, UK. Vol 5 No2, Σελ 209-219. Διαθέσιμο on line http://www.unictbiolmollab.it/figure_didattica/exp%20rev%20mol%202005-209.pdf. Τελευταία πρόσβαση: 14/6/2010.
- Applied Biosystems, χωρίς χρονολογία (XX). "Real-Time PCR vs Traditional PCR". Applied Biosystems. Σελ 1-15. Τελευταία πρόσβαση: 12/6/2010. Διαθέσιμο on line: http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtPCR_vs_tradPCR.pdf.
- Applied Biosystems, 2003. "Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Template for use in Quantitative PCR". Applied Biosystems. Σελ. 1-9. Διαθέσιμο online: http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf. Τελευταία πρόσβαση: 11/5/2010
- Βαρζάκας Χ. Θ. και Αρβανιτογιάννης Ι., 2000. "Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα". Εκδόσεις Εμβryo, Αθήνα. Σελ. 32-38, 87-91, 107-114, 172-178, 217-230, 261-298, 411- 418, 446- 448, 457- 467, 471- 511.
- Βερβερίδης Φ., 2003. "Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοτεχνολογίας φυτών". ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο. Σελ. 60-66.
- Berg J., Tymoczko J. and Stryer L., 2002. "Biochemistry, 5th edition". W.H. Freeman and Company, New York. Section 27.2 and 27.2.4. Διαθέσιμο on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=stryer&part=A3769>. Τελευταία πρόσβαση: 11/7/2010.

- Biochemica, 2001. “New FastStart Taq DNA Polymerase Broadens PCR Product Line”. Biochemica. No 1, Σελ 27-29. Διαθέσιμο online: http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/BIOCHEMI/No1_01/PDF/b101leous.pdf. Τελευταία πρόσβαση 8/10/2008.
- Bio-rad, 2010. “Real Time PCR Chemistries”. Bio-Rad Laboratories, Inc. Διαθέσιμο online: <http://www3.bio-rad.com/>. Τελευταία πρόσβαση 26/7/2010.
- Davidson, 2002. “Nested PCR”. Davidson College, Davidson. Διαθέσιμο online: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/NestedPCR.html>. Τελευταία πρόσβαση 8/10/2008.
- Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L. M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N. L., Rosenblatt J. E., Cockerill F. R. and Smith T. F., 2006. “Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing”. Clin Microbiol Rev. Vol 19, No 1, Σελ 165–256. Διαθέσιμο online <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1360278/>. Τελευταία πρόσβαση 15/4/2010.
- Fraga D., Meulia T. and Fenster S., 2008. “Real Time PCR”. John Wiley & Sons, Inc. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. Unit 10.3., Σελ 1.-34. Διαθέσιμο online: <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/0470089938/0470089938-sampleUnit.pdf>. Τελευταία πρόσβαση 16/3/2010.
- Gachon C., Mingam A. and Chaerrier B., 2004. “Real Time PCR: what relevance to plant studies ?”. Journal of Experimental Botany. Vol. 55, No. 402, Σελ 1445–1454.
- Garvin W., Harms U., Shearer C. and Simmoneaux L., 1998. “Transgenic animals, unit 11”. European Initiative for Biotechnology Education (EIBE). Unit 11, Σελ 1-29. Διαθέσιμο on line: <http://www.ut.ee/biodida/eibe/pdf/Unit11EN.pdf>. Τελευταία πρόσβαση 14/9/2009.
- Gene-quantification, χωρίς χροναλογία (XX). “Available Real Time PCR cyclers 1”. Gene-quantification. Info. Διαθέσιμο on line: <http://www.gene-quantification.de/platform.html>. Τελευταία πρόσβαση 28/7/2010.
- Gibson N. J., 2006. “The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis”. Clinika Chimica Acta. Vol 363, Σελ 32-47.

- Gloffke W., 2003. “Quantitative PCR Update”. The Scientist. Vol 17, No 8, Σελ 41. Διαθέσιμο on line: <http://f1000scientist.com/>. Τελευταία πρόσβαση 14/10/2009.
- Houghton S. and Cockerill F., 2006. “RealTime PCR: Overview and applications”. Surgery, Vol 139, No 1, Σελ. 1-5.
- Hunt M., 2006. “Real Time PCR Tutorial”. University of South Carolina. Διαθέσιμο online: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>. Τελευταία πρόσβαση 16/7/2009.
- Korbie D.J. and Mattick J.S., 2008. “Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification”. Nature Protocols. Vol 3, No 9, Σελ. 1452-1456. Διαθέσιμο online: <http://blog.bioon.net/UploadFiles/2008-9/132020719721.pdf>. Τελευταία πρόσβαση 18/7/2009.
- Kutin R., Alvarez A. and Jenkins D., 2009. “Detection of Ralstonia solanacearum in natural substrates using phage amplification integrated with real-time PCR assay”. Journal of Microbiological Methods, 76, Σελ 241–246.
- Lee Y. C., Campos A. and Josefsen K., χωρίς χρονολογία (XX). “Real Time PCR Experiences”. Διαθέσιμο on line: <http://realtimepcr.dk/principle.html>. Τελευταία πρόσβαση 11/5/2009.
- Lezaun J.. (2006). “Creating a New Object of Government: Making Genetically Modified Organisms Traceable”. Social Studies of Science 36/4, Σελ 499–531.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D., 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDC_T} Method”. Elsevier, Methods, USA. Vol 25, Σελ 402-408. Διαθέσιμο on line: <http://pharma.dxy.cn/upload/asset/2008/07/16/1216204807.pdf>. Τελευταία πρόσβαση 20/8/2009.
- Macherey-Nagel, 2008. “Έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο: NucleoSpin Plasmid Quick Pure”. Macherey-Nagel.
- Macherey-Nagel, 2008. “Έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο: NucleoSpin Tissue: Genomic DNA from Tissue”. Macherey-Nagel.
- Mackay I. M., 2004. “Real Time PCR in the microbiology laboratory”. Clinical Microbiology and infection, Chapter 10. Σελ 190-212. Διαθέσιμο on line

- <http://www.gmo-qpcr-analysis.com/mackay-2004.pdf>. Τελευταία πρόσβαση 23/10/2008.
- McGown E., Su M. and Dennis R., 2000. “ Measurement of molecular beacons in the SPECTRAmax GEMINI spectrofluorometer”. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75, Σελ. 942-944. Διαθέσιμο on line: http://www.molecular-beacons.org/download/mcgown_jctb00%2875%29942.pdf. Τελευταία πρόσβαση 7/8/2010.
- NanoDrop Technologies, Inc., 2007. “ND-1000 Spectrophotometer, V3.5 User’s Manual”. NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA. Σελ. 1-61. Διαθέσιμο online: <http://www.cvm.tamu.edu/dnacore/Documents/nd-1000-users-manual.pdf>. Τελευταία πρόσβαση 21/6/2010.
- Organisation for Economic Co-operation and Development, 2001. “Report on the OECD Workshop on Unique Identification Systems for Transgenic Plants”, Environment Directorate. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology. No. 17
- Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004. “Guidance for the Designation of a Unique Identifier for Transgenic Plants”, Environment Directorate. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology. No. 23.
- Pfaffl M.W., 2002. “Chapter 3: A-Z of quantitative PCR”. Εκδόσεις S.A. Bustin. International University Line, La jolla, CA. Σελ 1-23.
- Promega, 2009. “Protocols & Applications Guide”. Εκδόσεις Promega corporation, Έδρα Madison, USA. Κεφάλαιο 1: “PCR Applications”. Διαθέσιμο online: <http://www.promega.com/paguide/>. Τελευταία πρόσβαση 22/3/2009.
- Sambrook J., Fritsch E. K. and Maniatis T., 1989. “ Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA με αλκαλική λύση”. Βιβλίο: *Molecular cloning laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sambrook J., Fritsch E. K. and Maniatis T., 1989. “Πρωτόκολλο Απομόνωσης ολικού βακτηριακού DNA”. Βιβλίο: *Molecular cloning laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Sinauer Associates, Inc., 2001. Διαθέσιμο online: http://www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public_html/methods.htm. Τελευταία πρόσβαση 9/8/2010.
- Singer E., 2009. “Biotech bacteria could help diabetics”. Technology Review, MIT. Διαθέσιμο on line: <http://www.technologyreview.com/biomedicine/23302/>. Τελευταία πρόσβαση 10/2/2010.
- Stratagene, 2007. “Mx Pro QPCR Software”. Stratagene, La Jolla, CA. Σελ 4-5, 231-236, 241-243.
- Stratagene, 2006. “Introduction to Quantitative PCR”. Stratagene, La Jolla, CA. Σελ. 3-8, 9-11, 23-26.
- Trantas E., N. Panopoulos, F. Ververidis, 2009. “Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Metabol. Engin.* Vol 11, Σελ 355–366.
- Vandersompele J., χωρίς χρονολογία (XX). “QPCR guide”. Eurogentec s.a., Belgium. Σελ. 3-62. Διαθέσιμο on line: <http://www.eurogentec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>. Τελευταία πρόσβαση 18/7/2010.
- VanGuilder H. D., Vrana K. E. and Freeman W. M., 2008. “Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis”. *BioTechniques*
- Vierstraete A., 1999. “Principle of PCR”. Εκδόσεις University of Ghent. Διαθέσιμο online: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. Τελευταία πρόσβαση: 5/8/2009.
- Weller S. A., Elphinstone J. G., Smith N. C., Boonham N. and Stead D. E., 2000. “Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay”. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 66, No 7, Σελ 2853-2858.
- Wikipedia, 2004. “Klenow fragment”.. Εκδόσεις Wikipedia. Διαθέσιμο on line: http://en.wikipedia.org/wiki/Klenow_fragment. Τελευταία πρόσβαση 21/7/2010.
- Wikipedia, 2005. “Real-Time Polymerase chain reaction”. Εκδόσεις Wikipedia. Διαθέσιμο on line: http://en.wikipedia.org/wiki/Real_time_pcr. Τελευταία πρόσβαση 15/6/2009.

- Wikipedia, 2007. “SNP genotyping”. Εκδόσεις Wikipedia. Διαθέσιμο online: http://en.wikipedia.org/wiki/SNP_genotyping. Τελευταία πρόσβαση 15/9/2009.
- Wikipedia, 2008. “Polymerase chain reaction”. Εκδόσεις Wikipedia. Διαθέσιμο online: http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction. Τελευταία πρόσβαση 15/6/2009.
- Wikipedia, 2008. “Variants of PCR”. Εκδόσεις Wikipedia. Διαθέσιμο online: http://en.wikipedia.org/wiki/Variants_of_PCR. Τελευταία πρόσβαση 23/3/2009.
- Wong M. L. and Medrano J. F., 2005. “ Real Time PCR for m-RNA quantitation”. Εκδόσεις Biotechniques. Έδρα Hillsborough. Vol 39, σελ 75-85. Διαθέσιμο online: http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00011/BTN_A_05391R_V01_O_11901a.pdf. Τελευταία πρόσβαση 11/6/2009.