

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 24

Η ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

ΕΝΟΤΗΤΑ 24.1

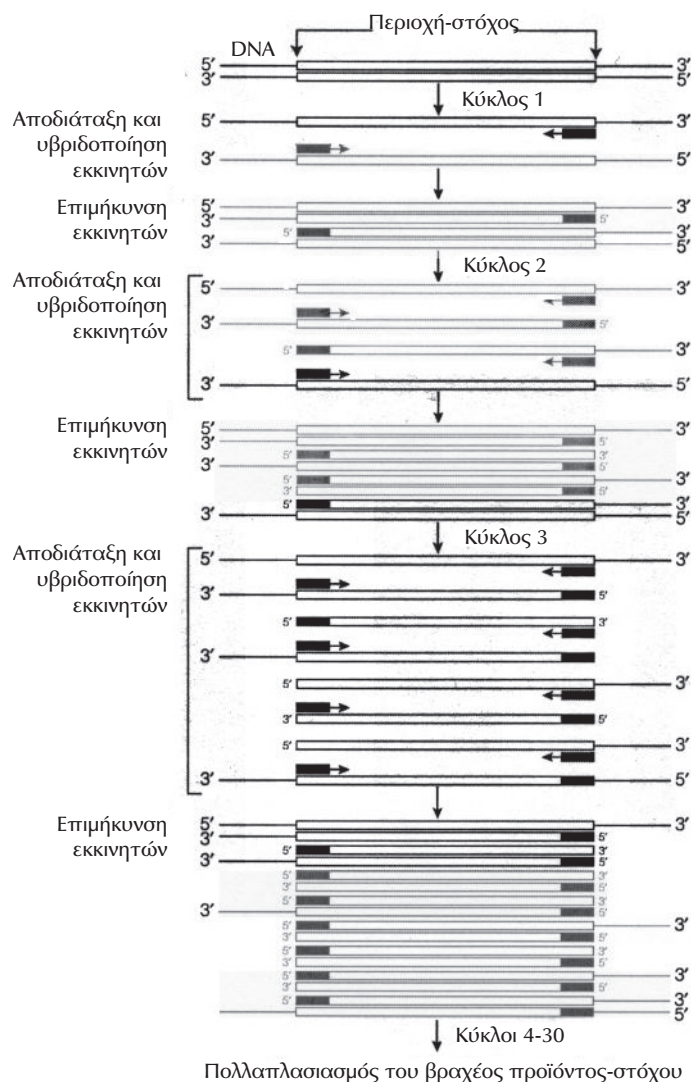
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΙΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται ορισμένοι μαθηματικοί υπολογισμοί που αφορούν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction). Σκοπός του κεφαλαίου δεν είναι να αποτελέσει έναν πλήρη οδηγό για την PCR. Πρόκειται για μια εισαγωγή στους υπολογισμούς που θα χρειαστεί να κάνουμε όταν θελήσουμε είτε να πραγματοποιήσουμε για πρώτη φορά είτε να βελτιστοποιήσουμε μια PCR.

Η τεχνική της PCR περιγράφηκε αρχικά από τον Kary Mullis το 1983. Από τότε έχει υποστεί πολλές τροποποιήσεις και έχει γίνει μία από τις πιο σημαντικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας. Η PCR επιτρέπει στους ερευνητές να επιλέξουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχο του DNA η οποία βρίσκεται σε μικρή ποσότητα και να παραγάγουν δεκάδες εκατομμύρια αντίγραφα της. Ας υποθέσουμε, για παράδειγμα, πως ένας ερευνητής μελετάει το γονίδιο ενός συγκεκριμένου ανθρώπινου χαρακτηριστικού που έχει μέγεθος 1.000 ζεύγη βάσεων (bp, base pairs). Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από περίπου 3,2 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων. Επομένως, αν απομονώσουμε DNA από κύτταρα, το γονίδιο αυτό θα συνιστά μόνο το 0,00003% της συνολικής ποσότητας DNA που θα απομονωθεί. Η PCR μας επιτρέπει να παράγουμε επιλεκτικά εκατομμύρια αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Ας υποθέσουμε επίσης πως ένας επιστήμονας πραγματοποιεί αναλύσεις σε DNA που απομονώθηκε από το σάλιο που βρέθηκε σε ένα γραμματόσημο. Πάνω στο γραμματόσημο υπάρχει μια πολύ μικρή ποσότητα DNA. Αν επιθυμούμε να αναλύσουμε κάποια περιοχή του DNA αυτού, πρέπει προηγουμένως να την πολλαπλασιάσουμε εκατομμύρια φορές. Το εργαλείο που χρειαζόμαστε για να πετύχουμε κάτι τέτοιο είναι η PCR.

Η PCR μιμείται τη φυσική ικανότητα ενός κυττάρου να αντιγράφει το DNA του χρησιμοποιώντας ένζυμα τα οποία ονομάζονται DNA πολυμεράσες. Η αντιγραφή πραγματοποιείται φυσιολογικά κάθε φορά που διαιρείται ένα κύτταρο. Κατά την αντιγραφή μέσω PCR (Εικόνα 1), το δείγμα DNA στο οποίο περιέχεται η αλληλουχία-στόχος που μας ενδιαφέρει, η **μήτρα DNA** (template DNA), αρχικά εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες, συνήθως μεταξύ 92 και 94 °C ώστε να αποδιαταχθεί, δηλαδή να διαχωριστούν οι δύο αλυσίδες του μορίου. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία μειώνεται σε μια κατάλληλη τιμή, συνήθως 47-72 °C. Τότε, ειδικά σχεδιασμένοι **ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές** (oligonucleotide primers) υβριδοποιούνται (δηλαδή προσδένονται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων) στη μήτρα DNA. Σε μια PCR χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές. Ο ένας είναι συμπληρωματικός με την περιοχή που βρίσκεται ακριβώς ανοδικά της αλληλουχίας-στόχου στον ένα κλώνο του DNA και συχνά αναφέρεται ως **ανοδικός** (upstream) ή **εμπρόσθιος** (forward) εκκινητής. Ο άλλος είναι συμπληρωματικός με την περιοχή που βρίσκεται ακριβώς καθοδικά της αλληλουχίας-στόχου στον άλλο κλώνο του DNA και συχνά αναφέρεται ως **καθοδικός** (downstream) ή **ανάστροφος** (reverse) εκκινητής. Οι εκκινητές προσδένονται στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου και οριοθετούν το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Στο τελευταίο στάδιο της αντίδρασης, το οποίο συνήθως πραγματοποιείται στους 72 °C, η Taq, μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, αντιγράφει τους δύο κλώνους ξεκινώντας από τους εκκινητές. Για να επιτευχθεί αυτό, στο μείγμα της αντίδρασης συμπεριλαμβάνονται και τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (A, T, G και C), *τα οποία αναφέρονται ως dNTP* (deoxyribonucleotide Triphosphate). Αυτά τα τρία βήματα αποτελούν έναν κύκλο της PCR, στο τέλος του οποίου ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο έχει διπλασιαστεί. Κατόπιν, η διαδικασία επαναλαμβάνεται, με αποτέλεσμα ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο να τετραπλασιάζεται, στη συνέχεια να οκταπλασιάζεται και ούτω καθεξής. Συνήθως η διαδικασία πραγματοποιείται για 25-40 κύκλους, οπότε δημιουργούνται εκατομμύρια αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου.

ΕΙΚΟΝΑ 1



Εικόνα 1. Η ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ. Στο πρώτο βήμα της PCR, οι δύο κλώνοι της μήτρας DNA διαχωρίζονται με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία. Έπειτα, η θερμοκρασία μειώνεται, ούτως ώστε οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινήτες να υβριδοποιηθούν στις θέσεις πρόσδεσης εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου. Στο τελευταίο βήμα της PCR, μια DNA πολυμεράση συνθέτει νέους κλώνους DNA που περιέχουν την αλληλουχία-στόχο, προσθέτοντας στους εκκινήτες νουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς τη μήτρα DNA. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 25-40 κύκλους. Αν υποθέσουμε πως η απόδοση της αντίδρασης είναι 100%, τότε ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. (Αναδημοσιεύεται με την άδεια της Promega, <http://www.promega.com/paguide/chap1.htm>)

Στην PCR, ο αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου θεωρητικά διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Επομένως, η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου είναι εκθετική (Εικόνα 2), όπως η αύξηση του αριθμού των βακτηρίων στις καλλιέργειες, όταν αυτά διπλασιάζονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα (βλ. Κεφάλαιο 17). Θεωρώντας πως η απόδοση της PCR είναι 100%, μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου μετά από έναν συγκεκριμένο αριθμό κύκλων χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

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

όπου: N είναι ο τελικός αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου,
 t είναι ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης και

N_0 είναι ο αρχικός αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου.

Παρατηρούμε πως ο τύπος αυτός είναι ουσιαστικά ίδιος με τον τύπο που περιγράφει το βακτηριακό πολλαπλασιασμό.

ΠΡΟΒΛΗΜΑ:

Σε ένα δείγμα υπάρχουν 20 αντίγραφα μιας αλληλουχίας-στόχου. Αν πραγματοποιήσετε 20 κύκλους PCR, ποιος είναι ο αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου που θεωρητικά αναμένετε να πάρετε;

ΑΠΑΝΤΗΣΗ:

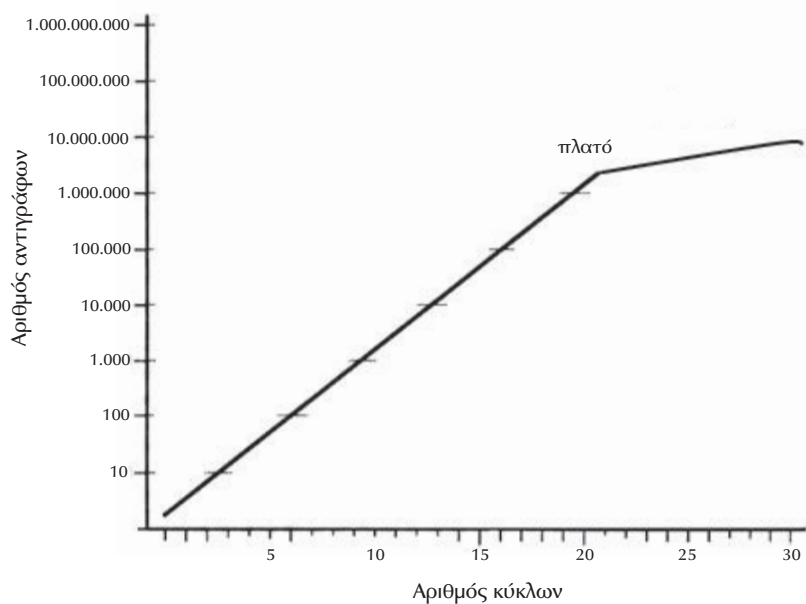
$$N = 2^t (N_0)$$

$$N = 2^{20} (20) \approx 2,1 \times 10^7$$

Επομένως, ξεκινώντας από 20 μόνο αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου, καταλήγουμε σε περισσότερα από δέκα εκατομμύρια.

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

ΕΙΚΟΝΑ 2



ΕΙΚΟΝΑ 2. Ο ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ-ΣΤΟΧΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ PCR ΕΙΝΑΙ ΕΚΘΕΤΙΚΟΣ. Μέχρι να φτάσει η αντίδραση σε ένα πλατό, ο αριθμός αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου αυξάνεται εκθετικά από κύκλο σε κύκλο.

ΕΝΟΤΗΤΑ 24.2

Η PCR ΕΙΝΑΙ ΜΙΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η PCR, όπως συμβαίνει και με κάθε ενζυμική αντίδραση, πρέπει να ετοιμαστεί σε ένα σωληνάριο το μείγμα με τα συστατικά της αντίδρασης στις σωστές συγκεντρώσεις. Τα κύρια συστατικά της PCR είναι: η μήτρα DNA, το ένζυμο, οι εκκινητές και τα dNTP (Πίνακας 1). Επίσης, χρησιμοποιείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο διατηρεί σταθερό το pH, καθώς και μαγνήσιο, το οποίο είναι απαραίτητος συμπράγοντας των πολυμερασών. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ποικίλλει, αλλά συνήθως είναι μεταξύ 25 και 100 μL . Παρατηρούμε στον Πίνακα 1 ότι οι συγκεντρώσεις των συστατικών του μείγματος κυμαίνονται εντός ορισμένων ορίων. Αυτό συμβαίνει επειδή οι βέλτιστες συγκεντρώσεις της αντίδρασης εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η συγκεκριμένη θερμοσταθερή πολυμεράση που χρησιμοποιείται και η φύση της μήτρας DNA (π.χ. αν είναι γονιδιωματικό DNA ή πλασμίδιο). Σε ειδικές περιπτώσεις προστίθενται επιπλέον συστατικά, όπως γλυκερόλη, τα οποία ενδέχεται να βελτιώσουν την απόδοση και την ειδικότητα της αντίδρασης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 ΤΑ ΚΥΡΙΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΜΙΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR		
ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΚΟΠΟΣ	ΣΥΝΗΘΗΣ ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ Ή ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΜΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ
<i>Ρυθμιστικό διάλυμα</i>	Ρυθμίζει το pH.	1×
<i>MgCl₂ (ορισμένες φορές περιλαμβάνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα)</i>	Απαραίτητος συμπράγοντας της πολυμεράσης.	1,5-2,5 mM
<i>Μήτρα DNA</i>	Το μόριο DNA που περιέχει την αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.	0,0001-1,0 μg (σε ιατροδικαστικές αναλύσεις τυπικά χρησιμοποιούνται 0,5-10 ng DNA)
<i>Εμπρόσθιος εκκινητής</i>	Μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό με την περιοχή που βρίσκεται ακριβώς ανοδικά της αλληλουχίας-στόχου. Από το 3' υδροξύλιό του ξεκινάει η αντιγραφή της μίας αλυσίδας της αλληλουχίας-στόχου.	0,05-2,0 μM
<i>Ανάστροφος εκκινητής</i>	Μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό με την περιοχή που βρίσκεται ακριβώς καθοδικά της αλληλουχίας-στόχου. Από το 3' υδροξύλιό του ξεκινάει η αντιγραφή της άλλης αλυσίδας της αλληλουχίας-στόχου.	0,05-2,0 μM
<i>dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)</i>	Υπομονάδες του DNA που απαιτούνται για την αντιγραφή του.	200 μM το καθένα
<i>Θερμοσταθερή DNA πολυμεράση</i>	Ένζυμο που συνθέτει DNA.	0,01-0,05 μονάδες/ μL (U/ μL)

ΕΝΟΤΗΤΑ 24.3

PCR: ΓΕΝΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Ας σχεδιάσουμε ένα απλό πείραμα PCR. Υποθέτουμε ότι έχουμε στη διάθεσή μας πυκνά διαλύματα όλων των συστατικών που απαιτούνται σύμφωνα με το πρωτόκολλό μας. Να σημειωθεί πως ίσως χρειαστεί να τροποποιήσουμε τη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω, με βάση το συγκεκριμένο πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται στο εργαστήριό μας, όμως στην ενότητα αυτή θα δούμε τον γενικό τρόπο σκέψης που ακολουθεί κάποιος προκειμένου να πραγματοποιήσει ένα πείραμα PCR. (Η διαδικασία που περιγράφεται εδώ βασίζεται στο βιβλίο «PCR Protocols: Current Methods and Applications», Chapter 1, Ed. Bruce A. White, Humana, New Jersey, 1993, σελ. 17.)

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

Αφού αποφασίσουμε ποιο πρωτόκολλο θα ακολουθήσουμε και πόσα δείγματα θα αναλύσουμε, μπορούμε να σχεδιάσουμε έναν πίνακα όπως ο 2Α. Στον πίνακα αυτό περιλαμβάνονται τα συστατικά που θα πρέπει να περιέχει κάθε αντίδραση, καθώς και η συγκέντρωση και ο όγκος όλων των αντιδραστηρίων. Η τελευταία στήλη συμπληρώνεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να περιληφθούν στο πείραμα.

Ας υποθέσουμε πως έχουμε εννέα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων και των δειγμάτων ελέγχου (controls), και επομένως σχεδιάζουμε να πραγματοποιήσουμε εννέα αντιδράσεις. Αυτό σημαίνει πως θα έχουμε εννέα σωληνάρια, ένα για κάθε δείγμα, και κάθε σωληνάριο θα περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την PCR (μήτρα, dNTP κτλ.). Μια καλή πρακτική θα ήταν να παρασκευάσουμε λίγο περισσότερο κεντρικό μείγμα (συνήθως για ένα επιπλέον δείγμα) από αυτό που θεωρητικά θα χρειαστούμε, προκειμένου να είμαστε σίγουροι πως θα μας φτάσει. Στον Πίνακα 2Β παρουσιάζεται η τελευταία στήλη συμπληρωμένη για 10 (9 + 1) δείγματα. Για παράδειγμα, για κάθε αντίδραση απαιτούνται 8 μL dNTP, οπότε για να παρασκευάσουμε αρκετό κεντρικό μείγμα για δέκα αντιδράσεις, θα χρειαστούμε 80 μL dNTP. Να σημειωθεί ότι η μήτρα DNA δεν περιλαμβάνεται στο κεντρικό μείγμα, επειδή συνήθως διαφέρει από δείγμα σε δείγμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2Α			
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ PCR 1 – ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΜΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ			
ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΥΚΝΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΜΕΙΓΜΑ
Ρυθμιστικό διάλυμα με MgCl_2	10×	10 μL	
dNTP	2,5 mM από το καθένα	8 μL	
Εμπρόσθιος εκκινητής	50 pmol/ μL	1 μL	
Ανάστροφος εκκινητής	50 pmol/ μL	1 μL	
DNA πολυμεράση Taq	5 U/ μL	0,5 μL	
Νερό		Όσο απαιτείται ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης (με τη μήτρα DNA) να είναι 100 μL .	
Μήτρα DNA	10^5 - 10^6 αντίγραφα σε 10 μL	10 μL	

ΠΙΝΑΚΑΣ 2B ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ PCR 1 – ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΜΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ			
ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΥΚΝΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΜΕΙΓΜΑ
<i>Ρυθμιστικό διάλυμα με MgCl₂</i>	10×	10 μL	100 μL
<i>dNTP</i>	2,5 mM από το καθένα	8 μL	80 μL
<i>Εμπρόσθιος εκκινητής</i>	50 pmol/μL	1 μL	10 μL
<i>Ανάστροφος εκκινητής</i>	50 pmol/μL	1 μL	10 μL
<i>DNA πολυμεράση Taq</i>	5 U/μL	0,5 μL	5 μL
<i>Νερό</i>		Όσο απαιτείται ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης (με τη μήτρα DNA) να είναι 100 μL.	695 μL
<i>Μήτρα DNA</i>	10 ⁵ -10 ⁶ αντίγραφα σε 10 μL	10 μL	

Τα συστατικά της αντίδρασης βασίζονται σε ένα πρωτόκολλο από το βιβλίο «*Biotechnology: Proteins to PCR: A Course in Strategies and Laboratory Techniques*», David Burden & Donald Whitney, Birkhäuser Press, 1995.

Βήμα 2. Ετοιμάζουμε το κεντρικό μείγμα.

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

Βήμα 3. Προσθέτουμε τη μήτρα DNA.

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

Βήμα 4. Προσθέτουμε το ένζυμο στο κεντρικό μείγμα.

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

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

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

Βήμα 6. Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή.

Τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή εκτίθενται σε ελεγχόμενες αλλαγές της θερμοκρασίας για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Ως προς τις συνθήκες θερμοκρασίας και τον χρόνο, ο θερμοκυκλοποιητής προγραμματίζεται ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες του συγκεκριμένου πειράματος.

ΕΝΟΤΗΤΑ 24.4

ΤΟ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΗΣ PCR

Έχουμε μελετήσει τη γενική διαδικασία της PCR, με την προϋπόθεση πως έχουμε στη διάθεσή μας όλα τα απαραίτητα πυκνά διαλύματα. Ωστόσο, κάποιες φορές ίσως χρειαστεί να ετοιμάσουμε εμείς τα πυκνά διαλύματα που θα χρησιμοποιήσουμε και να βελτιστοποιήσουμε τις συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης. Στην περίπτωση αυτή, θα χρειαστεί να πραγματοποιήσουμε υπολογισμούς για καθένα από τα συστατικά του μείγματος της PCR. Στις επόμενες ενότητες του κεφαλαίου αυτού μελετώνται ένα προς ένα τα κύρια συστατικά μιας PCR και οι υπολογισμοί που σχετίζονται με αυτά.

Το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR διατηρεί σταθερό το pH του μείγματος της αντίδρασης. Επίσης, συχνά περιέχει μαγνήσιο, το οποίο δρα ως συμπαραγοντας της πολυμεράσης. Άλλες φορές το μαγνήσιο προστίθεται ξεχωριστά. Το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR συνήθως παρασκευάζεται και αποθηκεύεται σε συγκέντρωση 10× (δηλαδή συγκεντρωμένο κατά δέκα φορές). Στη συνέχεια, αραιώνεται και χρησιμοποιείται στο μείγμα της αντίδρασης. Τα κύρια συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος της PCR στις συγκεντρώσεις 10× και 1× είναι:

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

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

ΠΡΟΒΛΗΜΑ:

Έχετε παρασκευάσει τα ακόλουθα πυκνά διαλύματα (μελετήστε τα Κεφάλαια 12 και 14 για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή των αντιδραστηρίων). Πόσο όγκο από το καθένα θα χρειαστείτε προκειμένου να παρασκευάσετε 1.000 μL ρυθμιστικού διαλύματος της PCR 10×

ΠΥΚΝΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Tris 1 M, pH 8,3

KCl 1 M

MgCl₂ 1 M**ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΗΣ PCR 10×**

Tris 100 mM, pH 8,3

KCl 500 mM

MgCl₂ 15 mM

νερό μέχρι τελικό όγκο 1.000 μL

ΑΠΑΝΤΗΣΗ:

Το πρόβλημα αυτό αποτελεί μια κλασική περίπτωση αραιώσης όπου από ένα πυκνό διάλυμα παρασκευάζουμε ένα αραιότερο. Επομένως, εφαρμόζουμε την εξίσωση $C_1V_1 = C_2V_2$. Χρησιμοποιούμε την εξίσωση τρεις φορές, μία για κάθε συστατικό. (Να σημειωθεί ότι 1 M = 1.000 mM.)

Για το Tris: (1.000 mM) (:) = (100 mM) (1.000 μL) ; = 100 μL

Για το KCl: (1.000 mM) (:) = (500 mM) (1.000 μL) ; = 500 μL

Για το MgCl₂: (1.000 mM) (:) = (15 mM) (1.000 μL) ; = 15 μL

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΗΣ PCR 10×

<u>ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ</u>	<u>ΟΓΚΟΣ</u>	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
Tris 1 M, pH 8,3	100 μ L	100 mM
KCl 1 M	500 μ L	500 mM
MgCl ₂ 1 M	15 μ L	15 mM
νερό	385 μ L	

Αποθηκεύουμε το πυκνό (10×) ρυθμιστικό διάλυμα της PCR έως ότου χρειαστεί. Όταν πρόκειται να πραγματοποιήσουμε μια PCR, προσθέτουμε από αυτό στην αντίδραση όσο όγκο χρειάζεται ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 1×.

ΠΡΟΒΛΗΜΑ:

Ας υποθέσουμε πως επιθυμείτε ο τελικός όγκος μιας αντίδρασης PCR να είναι 50 μ L. Πόσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος της PCR 10× πρέπει να συμπεριλάβετε στην αντίδραση;

ΑΠΑΝΤΗΣΗ:

Το πρόβλημα αυτό αποτελεί μια κλασική περίπτωση αραίωσης όπου από ένα πυκνό διάλυμα παρασκευάζουμε ένα αραιότερο. Επομένως, θα χρησιμοποιήσουμε την εξίσωση $C_1V_1 = C_2V_2$.

$$\begin{array}{l} C_1 \quad V_1 = C_2 \quad V_2 \\ (10\times) (x) = (1\times) (50 \mu\text{L}) \end{array} \quad ; = 5 \mu\text{L}$$

Συνεπώς, για μια αντίδραση 50 μ L θα χρησιμοποιήσουμε 5 μ L πυκνού (10×) ρυθμιστικού διαλύματος της PCR.

ΕΝΟΤΗΤΑ 24.5

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Οι εκκινητές είναι μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια με μήκος συνήθως 18-28 bp, συμπληρωματικά με τις αλληλουχίες εκατέρωθεν του DNA-στόχου. Οι εκκινητές είναι απαραίτητο συστατικό της PCR, καθώς οι DNA πολυμεράσες ξεκινούν από αυτούς τον πολυμερισμό των νουκλεοτιδίων. Η βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών ποικίλλει και προσδιορίζεται εμπειρικά. Αν βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση, μπορεί να προκαλέσουν τον πολλαπλασιασμό επιπλέον αλληλουχιών πέραν της επιθυμητής αλληλουχίας-στόχου, ενώ όταν βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, μπορεί η απόδοση της αντίδρασης να είναι περιορισμένη. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, η συγκέντρωση των εκκινητών στην PCR είναι τυπικά 0,05-2 mM.

Ας υποθέσουμε πως έχουμε στη διάθεσή μας εκκινητές οι οποίοι έχουν συντεθεί από μια εμπορική εταιρεία. Είναι πιθανό να τους έχουμε παραλάβει λυοφιλωμένους (αφυδατωμένους) σε ένα φιαλίδιο, μαζί με κάποιο πιστοποιητικό με πληροφορίες γι' αυτούς. Οι αφυδατωμένοι εκκινητές πρέπει να ενυδατωθούν, κατόπιν να κατανεμηθούν σε ξεχωριστά σωληνάρια και να αποθηκευτούν στην κατάψυξη.

Για παράδειγμα, ας υποθέσουμε πως έχουμε αγοράσει δύο εκκινητές των οποίων το πιστοποιητικό ανάλυσης φαίνεται στην Εικόνα 3. Το πιστοποιητικό αυτό παρέχει μια σειρά από σημαντικές πληροφορίες:

- *Στις δύο πρώτες στήλες αναφέρονται τα ονόματα των εκκινητών και ένας αριθμός που τους αποδίδεται.*
- *Κατόπιν, αναφέρεται το μήκος τους (σε νουκλεοτίδια) και το μοριακό τους βάρος. Το μοριακό τους βάρος μπορούμε να το υπολογίσουμε κι εμείς με βάση την αλληλουχία τους, όπως μάθαμε στην Ενότητα 22.10.*
- *Στη συνέχεια, αναφέρεται η θερμοκρασία τήξης τους. Η θερμότητα διασπά τους δεσμούς υδρογόνου που συγκρατούν τις αλυσίδες των δίκλωνων νουκλεϊκών οξέων. Ως θερμοκρασία τήξης (T_m) ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία τα μισά μόρια του εκκινητή ζευγαρώνουν με τη μήτρα DNA, ενώ τα άλλα μισά δε σταθεροποιούνται πάνω σε αυτήν και παραμένουν ελεύθερα. Σε μια PCR είναι σημαντικό να γνωρίζουμε το T_m των εκκινητών. Αν η θερμοκρασία στο στάδιο της υβριδοποίησης υπερβαίνει σημαντικά το T_m , οι εκκινητές δε θα προσδεθούν αποτελεσματικά στη μήτρα DNA. Αντίθετα, αν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή, οι εκκινητές τείνουν να προσδεθούν μη ειδικά και σε άλλες, τυχαίες αλληλουχίες του DNA με τις οποίες εμφανίζουν μερική συμπληρωματικότητα. Κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει στον πολλαπλασιασμό παραπροϊόντων.*
- *Ακολουθούν τρεις στήλες όπου αναφέρονται στοιχεία σχετικά με την ποσότητα του εκκινητή που περιέχεται σε κάθε φιαλίδιο, η οποία προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά. Η οπτική πυκνότητα (OD, Optical Density) είναι το ίδιο μέγεθος με την απορρόφηση (βλ. Ενότητα 22.12). Όπως είχαμε πει, OD (στα 260 nm) ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ολιγονουκλεοτιδίου περίπου 33 $\mu\text{g/mL}$. Οι ελαφρώς διαφορετικές τιμές που αναφέρονται εδώ (31,8 και 31,0 $\mu\text{g/OD}$) είναι πιο ακριβείς, καθώς βασίζονται στην αλληλουχία των συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδίων. Η OD στην επόμενη στήλη είναι η τιμή που προσδιόρισε με ένα φασματοφωτόμετρο ο κατασκευαστής των εκκινητών κατά τον έλεγχο τους. Αν πολλαπλασιάσουμε τα $\mu\text{g/OD}$ με την OD, θα βρούμε πόσα μg εκκινητή περιέχονται στο αντίστοιχο φιαλίδιο. Η πληροφορία αυτή αναγράφεται στην επόμενη στήλη.*
- *Η στήλη «nmol» υποδεικνύει την ποσότητα κάθε εκκινητή σε nmol. Όπως θα δούμε σε ένα πρόβλημα παρακάτω, θα μπορούσαμε να υπολογίσουμε την τιμή αυτή με βάση τα μg των εκκινητών.*
- *Τέλος, στη δεξιά στήλη αναφέρονται οι αλληλουχίες των εκκινητών.*

ΕΙΚΟΝΑ 3



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

Εικόνα 3. Πιστοποιητικό ανάλυσης που συνοδεύει δύο εκκινητές, οι οποίοι έχουν συντεθεί από μια εμπορική εταιρεία. Οι πληροφορίες που αναφέρονται στο πιστοποιητικό επεξηγούνται στο κείμενο.

Πριν ετοιμάσουμε τα πυκνά διαλύματα των εκκινητών, καλό είναι να μελετήσουμε το πρωτόκολλο που πρόκειται να ακολουθήσουμε. Για παράδειγμα, στο Πρωτόκολλο 1, το οποίο περιγράφεται στον Πίνακα 2, για την ενυδάτωση των εκκινητών χρησιμοποιείται τόσος όγκος νερού ώστε η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος που θα προκύψει να είναι 50 pmol/μL, ενώ σε κάθε αντίδραση προστίθεται 1 μL από το πυκνό διάλυμα κάθε εκκινητή. Στο Πρωτόκολλο 2, το οποίο περιγράφεται στον Πίνακα 3, η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος των εκκινητών και οι ακριβείς τελικές συγκεντρώσεις τους σε κάθε αντίδραση δεν προσδιορίζονται. Ο χρήστης πρέπει να αποφασίσει ποια θα είναι η συγκέντρωση των πυκνών διαλυμάτων του και η τελική συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση και έπειτα να υπολογίσει τον όγκο του πυκνού διαλύματος που θα χρειαστεί να προσθέσει σε κάθε αντίδραση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ PCR 2		
ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Ρυθμιστικό διάλυμα με $MgCl_2$ (5×)	10 μL	1×
dNTP (10 mM το καθένα)	1 μL	0,2 mM από κάθε dNTP
Εμπρόσθιος εκκινητής	x μL	0,1-1,0 μM
Ανάστροφος εκκινητής	y μL	0,1-1,0 μM
DNA πολυμεράση Taq (5 U/μL)	0,25 μL	1,25 U
Μήτρα DNA	z μL	< 0,5 μg/50 μL
Νερό	Όσο απαιτείται ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης (με τη μήτρα DNA) να είναι 50 μL.	

Βασισμένο σε ένα πρωτόκολλο της εταιρείας Promega Corporation.

Στα δύο παρακάτω προβλήματα επεξηγούνται οι υπολογισμοί που αφορούν τους εκκινητές στα πρωτόκολλα τα οποία παρουσιάζονται στους Πίνακες 2 και 3.

ΠΡΟΒΛΗΜΑ:

Στο πρόβλημα αυτό φαίνεται ο τρόπος υπολογισμού του όγκου του νερού στον οποίο πρέπει να επαναδιαλυθεί ένας εκκινητής ώστε η συγκέντρωσή του στο πυκνό διάλυμα να είναι 50 pmol/μL (βλ. Πίνακα 2).

Έστω ότι έχετε στη διάθεσή σας ένα φιαλίδιο που περιέχει 72 nmol από τον πρώτο εκκινητή (όπως φαίνεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης στην Εικόνα 3). Σε πόσο όγκο θα ενυδατώσετε τον λυοφιλιωμένο εκκινητή προκειμένου να έχει συγκέντρωση 50 pmol/μL;

ΑΠΑΝΤΗΣΗ:

Ξεκινάμε μετατρέποντας τα nmol σε pmol:

$$72 \text{ nmol} = 72.000 \text{ pmol}$$

Στη συνέχεια, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μια εξίσωση αναλογίας (βλ. Κεφάλαιο 6): Αν χρειαζόμαστε συγκέντρωση 50 pmol/μL, τότε σε πόσα μL πρέπει να ενυδατωθούν τα 72.000 pmol;

$$\frac{50 \text{ pmol}}{1 \mu\text{L}} = \frac{72.000 \text{ pmol}}{x} \quad ; = 1.440 \mu\text{L}$$

Επομένως, θα επαναδιαλύσουμε τον εκκινητή σε 1.440 μL νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος. (Ο όγκος του λυοφιλιωμένου εκκινητή υποτίθεται πως είναι αμελητέος.) Όταν πρόκειται να πραγματοποιήσουμε μια PCR ακολουθώντας το πρωτόκολλο του Πίνακα 3, θα χρησιμοποιήσουμε 1 μL από αυτό το πυκνό διάλυμα του εκκινητή.

(Διαθέτουμε επίσης 54,9 nmol από τον δεύτερο εκκινητή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Επομένως, θα τον διαλύσουμε σε 1.098 μL νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος προκειμένου το πυκνό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 50 pmol/μL.)

ΠΡΟΒΛΗΜΑ:

Στο πρόβλημα αυτό φαίνεται ο τρόπος υπολογισμού του όγκου του νερού στον οποίο πρέπει να επαναδιαλυθεί ένας εκκινητής ώστε η συγκέντρωσή του στο πυκνό διάλυμα να είναι 0,1-1 μM (βλ. Πίνακα 3).

Στο πρωτόκολλο του Πίνακα 3 δεν προσδιορίζεται η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος των δύο εκκινητών, επομένως πρέπει να την καθορίσουμε εμείς. Θα ήταν χρήσιμο να εκφράσουμε τις συγκεντρώσεις των πυκνών διαλυμάτων σε μM, καθώς η τελική συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση είναι 0,1-1 μM. Ας υποθέσουμε, για παράδειγμα, πως επιλέγουμε ως συγκέντρωση τα 20 μM. (Η Sigma Corporation συστήνει την αποθήκευση των εκκινητών σε συγκέντρωση τουλάχιστον 20 μM, επειδή θεωρεί πως τα ολιγονουκλεοτίδια είναι λιγότερο σταθερά όταν αποθηκεύονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.)

- Σε πόσο όγκο θα ενυδατώσετε τα 72 nmol του λυοφιλιωμένου εκκινητή προκειμένου το πυκνό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 20 μM;
- Όταν πρόκειται να πραγματοποιήσετε μια PCR, πόσο όγκο πυκνού διαλύματος κάθε εκκινητή θα χρειαστείτε ανά αντίδραση προκειμένου η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 μM;

ΑΠΑΝΤΗΣΗ:

- α. Ξεκινάμε μετατρέποντας τα 72 nmol σε μmol:

$$72 \text{ nmol} = 0,072 \text{ μmol}$$

Εξ ορισμού, ένα διάλυμα που έχει συγκέντρωση 20 μM περιέχει 20 μmol σε 1 λίτρο ($1 \text{ L} = 10^6 \text{ μL}$). Μπορούμε λοιπόν να χρησιμοποιήσουμε την ακόλουθη εξίσωση αναλογίας:

$$\frac{20 \text{ μmol}}{10^6 \text{ μL}} = \frac{0,072 \text{ μmol}}{x} \quad ; = 3.600 \text{ μL}$$

Επομένως, αν επαναδιαλύσουμε αυτόν τον εκκινητή σε 3.600 μL νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος, θα έχουμε ένα πυκνό διάλυμα με συγκέντρωση 20 μM.

(Διαθέτουμε επίσης 54,9 nmol από τον δεύτερο εκκινητή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Επομένως, θα τον διαλύσουμε σε 2.745 μL νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος προκειμένου το πυκνό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 20 pmol/μL.)

- β. Το πρόβλημα αυτό αποτελεί μια κλασική περίπτωση αραίωσης όπου από ένα πυκνό διάλυμα παρασκευάζουμε ένα αραιότερο. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3, ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης είναι 50 μL. Μπορούμε λοιπόν να χρησιμοποιήσουμε την ακόλουθη εξίσωση αναλογίας:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad ; = 2,5 \text{ μL}$$

$$(20 \text{ μM}) (x) = (1 \text{ μM}) \times (50 \text{ μL})$$

Επομένως, θα χρησιμοποιήσουμε 2,5 μL από το πυκνό διάλυμα κάθε εκκινητή ανά αντίδραση.

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΕΞΑΣΚΗΣΗ

1. Για τον πρώτο εκκινητή της Εικόνας 3, να δείξετε ότι $411,3 \text{ μg} \approx 72 \text{ nmol}$.
2. Για τον δεύτερο εκκινητή της Εικόνας 3, να δείξετε ότι $342,0 \text{ μg} \approx 54,9 \text{ nmol}$.
3. Οι συγκεντρώσεις του πυκνού διαλύματος των εκκινητών στο Πρωτόκολλο 1 είναι 50 pmol/μL. Από το πυκνό διάλυμα κάθε εκκινητή προσθέτετε 1 μL σε 100 μL τελικού όγκου αντίδρασης. Ποια είναι η συγκέντρωση κάθε εκκινητή στην αντίδραση εκφρασμένη σε μM; Βρίσκεται η τιμή που προκύπτει εντός του εύρους των τιμών συγκέντρωσης των εκκινητών στον Πίνακα 1;

ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

1. Προκειμένου να μετατρέψουμε τα μικρογραμμάρια σε nmol, πρέπει να γνωρίζουμε το μοριακό βάρος του εκκινητή. Αυτό, όπως υποδεικνύεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης της Εικόνας 3, είναι 5.716,7. Ακόμα όμως και αν δε μας δινόταν έτοιμο, θα μπορούσαμε να το υπολογίσουμε με βάση την αλληλουχία του εκκινητή (βλ. Ενότητα 22.10, πρόβλημα για εξάσκηση 1).

Μοριακό βάρος 5.716,7 σημαίνει πως 1 mol του συγκεκριμένου ολιγονουκλεοτιδίου ζυγίζει 5.716,7 g. Επομένως, 1 nmol ζυγίζει:

$$5.716,7 \times 10^{-9} \text{ g} = 5,7167 \text{ }\mu\text{g}$$

Αν 1 nmol ζυγίζει 5,7167 μg , τότε πόσα nmol είναι τα 411,3 μg ;

$$\frac{1 \text{ nmol}}{5,7167 \text{ }\mu\text{g}} = \frac{\quad}{411,3 \text{ }\mu\text{g}} \quad ; \approx 72 \text{ nmol}$$

2. Το μοριακό βάρος αυτού του εκκινητή, όπως φαίνεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης της Εικόνας 3, είναι 6.227,9. Θα μπορούσαμε επίσης να το υπολογίσουμε με βάση την αλληλουχία του εκκινητή (βλ. Ενότητα 22.10, πρόβλημα για εξάσκηση 1).

Μοριακό βάρος 6.227,9 σημαίνει πως 1 mol του συγκεκριμένου ολιγονουκλεοτιδίου ζυγίζει 6.227,9 g.

Επομένως, 1 nmol ζυγίζει:

$$6.227,9 \times 10^{-9} \text{ g} = 6,2279 \text{ }\mu\text{g}$$

Αν 1 nmol ζυγίζει 6,2279 μg , τότε πόσα nmol είναι τα 342,0 μg ;

$$\frac{1 \text{ nmol}}{6,2279 \text{ }\mu\text{g}} = \frac{\quad}{342,0 \text{ }\mu\text{g}} \quad ; \approx 54,9 \text{ nmol}$$

3. Εξ ορισμού, 1 $\mu\text{M} = 1 \text{ }\mu\text{mol/L}$.

Η συγκέντρωση κάθε εκκινητή είναι 50 pmol/ μL και προσθέτουμε 1 μL στην αντίδραση, επομένως προσθέτουμε 50 pmol. Αυτά τα 50 pmol βρίσκονται σε όγκο 100 μL . Επομένως:

$$\frac{50 \text{ pmol}}{100 \text{ }\mu\text{L}} = \frac{50 \times 10^{-6} \text{ }\mu\text{mol}}{100 \text{ }\mu\text{L}} = \frac{50 \times 10^{-6} \text{ }\mu\text{mol}}{100 \times 10^{-6} \text{ L}} = \frac{0,5 \text{ }\mu\text{mol}}{\text{L}} = 0,5 \text{ }\mu\text{M}$$

Η τιμή που προκύπτει βρίσκεται εντός του εύρους των τιμών συγκέντρωσης των εκκινητών στον Πίνακα 1.

ΕΝΟΤΗΤΑ 24.6

ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

Η συγκέντρωση του μείγματος των dNTP πάντα αφορά καθένα από τα τέσσερα τριφωσφορικά ξεχωριστά δεοξυριβονουκλεοτίδια. Αυτό σημαίνει πως, όταν λέμε ότι «ένα μείγμα dNTP έχει συγκέντρωση 2,5 mM», εννοούμε πως περιέχει 2,5 mM από καθένα από τα τέσσερα νουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP και dTTP), δηλαδή η συνολική συγκέντρωσή του σε νουκλεοτίδια είναι 10 mM. Μπορούμε να αγοράσουμε έτοιμο ένα μείγμα dNTP ή να αγοράσουμε ξεχωριστά κάθε νουκλεοτίδιο και να παρασκευάσουμε το μείγμα μόνοι μας.

Τα ξεχωριστά dNTP συνήθως πωλούνται σε συγκέντρωση 100 mM. Αυτά τα χρησιμοποιούμε για να παρασκευάσουμε ένα πυκνό διάλυμα στο οποίο η συγκέντρωση κάθε νουκλεοτιδίου είναι συνήθως μεταξύ 2,5 mM και 10 mM. Στη συνέχεια, αυτό το πυκνό διάλυμα το μοιράζουμε σε σωληνάρια και το αποθηκεύουμε μέχρι να το χρειαστούμε. Ας υποθέσουμε πως θέλουμε να παρασκευάσουμε 20 μL ενός πυκνού μείγματος dNTP, στο οποίο κάθε νουκλεοτίδιο έχει συγκέντρωση 10 mM. Χρησιμοποιούμε την εξίσωση $C_1V_1 = C_2V_2$:

$$\begin{array}{ccc} C_1 & V_1 & = & C_2 & V_2 \\ 100 \text{ mM} & (;) & = & 10 \text{ mM} & (20 \mu\text{L}) \end{array} \quad ; = 2 \mu\text{L}$$

Επομένως, αναμειγνύουμε τα ακόλουθα συστατικά:

ΑΓΟΡΑΣΜΕΝΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΥΚΝΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ
dATP 100 mM	2 μL	10 mM
dGTP 100 mM	2 μL	10 mM
dCTP 100 mM	2 μL	10 mM
dTTP 100 mM	2 μL	10 mM
Νερό	<u>12 μL</u>	
	20 μL	

Όταν πρόκειται να πραγματοποιήσουμε μια PCR, πόσο όγκο από το πυκνό διάλυμα των dNTP θα χρειαστούμε; Ας υποθέσουμε πως ο όγκος της αντίδρασης θα είναι 50 μL και θέλουμε η τελική συγκέντρωση κάθε dNTP να είναι 200 μM . Πρόκειται πάλι για ένα πρόβλημα στο οποίο θα χρησιμοποιήσουμε την εξίσωση $C_1V_1 = C_2V_2$. Πριν βάλουμε τις αριθμητικές τιμές στην εξίσωση, πρέπει να σιγουρευτούμε πως οι μονάδες συγκέντρωσης ταιριάζουν μεταξύ τους. (10 mM = 10.000 μM .)

$$\begin{array}{ccc} C_1 & V_1 & = & C_2 & V_2 \\ (10.000 \mu\text{M}) \times (;) & = & (200 \mu\text{M}) \times (50 \mu\text{L}) \end{array} \quad ; = 1 \mu\text{L}$$

ΕΝΟΤΗΤΑ 24.7

DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ

Το ένζυμο που χρησιμοποιείται συννηθέστερα στην PCR είναι η DNA πολυμεράση Taq. Ωστόσο, συχνά χρησιμοποιούνται και άλλες DNA πολυμεράσες. Οποιαδήποτε πολυμεράση και αν χρησιμοποιούμε, πρέπει να είναι θερμοσταθερή, διαφορετικά θα καταστρέφεται στις θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA. Αν το ένζυμο καταστρεφόταν, θα ήταν απαραίτητο να προστίθεται εκ νέου σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, γεγονός που θα καθιστούσε την πραγματοποίηση της PCR ιδιαίτερα περίπλοκη.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η τελική συγκέντρωση της DNA πολυμεράσης Taq στην αντίδραση είναι 0,025 μονάδες/μL (U/μL). Πολύ υψηλή συγκέντρωση ενζύμου μπορεί να οδηγήσει στον πολλαπλασιασμό παραπροϊόντων, ενώ αν δεν υπάρχει αρκετή ποσότητα ενζύμου, παράγεται λιγότερο προϊόν. Ας υποθέσουμε πως ο όγκος της αντίδρασής μας είναι 50 μL και το πυκνό διάλυμα της DNA πολυμεράσης Taq που έχουμε στη διάθεσή μας έχει συγκέντρωση DNA 5 U/μL. Στο μείγμα της αντίδρασης θέλουμε το ένζυμο να βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,025 U/μL.

Χρησιμοποιούμε την εξίσωση $C_1 V_1 = C_2 V_2$ προκειμένου να υπολογίσουμε πόσο όγκο από το πυκνό διάλυμα θα χρειαστούμε:

$$\begin{array}{rclcl} C_1 & V_1 & = & C_2 & V_2 \\ (5 \text{ U/}\mu\text{L}) \times (;) & = & (0,025 \text{ U/}\mu\text{L}) \times (50 \mu\text{L}) & & ; = 0,25 \mu\text{L} \end{array}$$

Θα ήταν πολύ δύσκολο να μετρήσουμε με ακρίβεια έναν τόσο μικρό όγκο. Ωστόσο, όπως είδαμε παραπάνω, συνήθως παρασκευάζουμε ένα κεντρικό μείγμα, στο οποίο προσθέτουμε το ένζυμο και άλλα συστατικά στις ποσότητες που χρειάζονται για τον συνολικό αριθμό αντιδράσεων που πρόκειται να πραγματοποιήσουμε. Αν δεν παρασκευάσουμε κεντρικό μείγμα, τότε θα πρέπει να αραιώσουμε το πυκνό διάλυμα του ενζύμου έτσι ώστε ο όγκος που θα προσθέσουμε σε κάθε αντίδραση να είναι μεγαλύτερος από 0,25 μL.

ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΓΙΑ ΕΞΑΣΚΗΣΗ

Ποια είναι η τελική συγκέντρωση της DNA πολυμεράσης Taq στο Πρωτόκολλο 1 του Πίνακα 2 και στο Πρωτόκολλο 2 του Πίνακα 3; Να συγκρίνετε τις συγκεντρώσεις αυτές μεταξύ τους και με το προτεινόμενο στον Πίνακα 1 εύρος συγκεντρώσεων για την DNA πολυμεράση.

ΑΠΑΝΤΗΣΗ

Πρωτόκολλο 1:

Προσθέτουμε 0,5 μL από το πυκνό διάλυμα του ενζύμου, το οποίο έχει συγκέντρωση 5 U/μL. Επομένως, έχουμε 2,5 μονάδες σε μια αντίδραση όγκου 100 μL, δηλαδή $2,5 \text{ U}/100 \mu\text{L} = 0,025 \text{ U/}\mu\text{L}$.

Πρωτόκολλο 2:

Προσθέτουμε 0,25 μL από το πυκνό διάλυμα του ενζύμου, το οποίο έχει συγκέντρωση 5 U/μL. Επομένως, έχουμε 1,25 μονάδες σε μια αντίδραση όγκου 50 μL, δηλαδή $1,25 \text{ U}/50 \mu\text{L} = 0,025 \text{ U/}\mu\text{L}$.

Άρα, οι συγκεντρώσεις είναι οι ίδιες και στα δύο πρωτόκολλα και εμπίπτουν στο προτεινόμενο στον Πίνακα 1 εύρος συγκεντρώσεων για την DNA πολυμεράση.

ΕΝΟΤΗΤΑ 24.8

ΜΗΤΡΑ

Η μήτρα της PCR ποικίλλει. Μπορεί να είναι πλασμιδιακό, ιικό ή γονιδιωματικό DNA. Εναλλακτικά μπορεί να είναι cDNA παρασκευασμένο από RNA. Άλλοτε υπάρχει σε σημαντικές ποσότητες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, για παράδειγμα σε ιατροδικαστικά δείγματα και σε αναλύσεις αρχαίων δειγμάτων, η διαθέσιμη ποσότητα είναι πολύ περιορισμένη. Επίσης, η αλληλουχία-στόχος μπορεί να συνιστά μεγάλο τμήμα της μήτρας DNA ή, αντίθετα, ενδέχεται να αποτελεί ένα αναλογικά πολύ μικρό τμήμα αυτής. Για παράδειγμα, το DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα μπορεί να είναι ένα πλασμίδιο μεγέθους 4 Kb και η αλληλουχία-στόχος να έχει μέγεθος 1 Kb. Στην περίπτωση αυτή, η αλληλουχία-στόχος αναλογεί στο 25% της μήτρας DNA. Ωστόσο, μια αλληλουχία-στόχος μεγέθους 1 Kb μέσα στο ανθρώπινο γονιδίωμα $3,2 \times 10^9$ bp αντιπροσωπεύει μόνο περίπου το 0,00003% της μήτρας DNA. Προκειμένου να έχουμε την αλληλουχία-στόχο στην ίδια συγκέντρωση όπως στο παράδειγμα με το πλασμίδιο, απαιτείται περίπου 800.000 φορές περισσότερο ανθρώπινο γονιδιωματικό DNA. Επομένως, είναι εύκολο να πετύχουμε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της αλληλουχίας-στόχου όταν χρησιμοποιούμε πλασμίδια, όχι όμως και όταν χρησιμοποιούμε γονιδιωματικό DNA. Να σημειωθεί πως, όταν χρησιμοποιείται πολύ μεγάλη ποσότητα DNA σε μια αντίδραση, αυξάνεται η πιθανότητα μη ειδικού πολλαπλασιασμού περιοχών πέραν της αλληλουχίας-στόχου και κατά συνέπεια αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης παραπροϊόντων. Από την άλλη πλευρά, αν η συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου είναι χαμηλή, αυξάνεται η πιθανότητα η τελική ποσότητα του προϊόντος να είναι μικρότερη του επιθυμητού.

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

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

Ας υποθέσουμε πως έχουμε στη διάθεσή μας ένα πρωτόκολλο, όπως το Πρωτόκολλο 1 (Πίνακας 2) το οποίο καθορίζει τον αριθμό των αντιγράφων του στόχου που θα προσθέσουμε: 10^5 - 10^6 αντίγραφα σε 10 μ L διαλύματος. Για να υπολογίσουμε τον αριθμό των αντιγράφων που έχουμε στη διάθεσή μας, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τον αριθμό των αντιγράφων της μήτρας που διαθέτουμε και επίσης πόσες φορές ο συγκεκριμένος στόχος συναντάται σε κάθε αντίγραφο της μήτρας. Κάποιες αλληλουχίες-στόχοι συναντώνται μόνο μία φορά στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ενώ άλλες συναντώνται περισσότερες φορές.

Μπορούμε να μετατρέψουμε τις μονάδες βάρους του DNA, όπως μ g ή ng, σε αριθμό μορίων. Η μετατροπή από μ g σε μόρια έχει αναλυθεί στην Ενότητα 22.11. Επίσης, εδώ παρατίθενται κάποιοι εύχρηστοι, γενικοί κανόνες μετατροπών που μπορούμε να χρησιμοποιούμε (από το «PCR Protocols and Applications Guide», Promega Corporation, 9/04):

- $1 \mu\text{g RNA } 1 \text{ Kb} \approx 1,77 \times 10^{12} \text{ μόρια}$
- $1 \mu\text{g dsDNA } 1 \text{ Kb} \approx 9,12 \times 10^{11} \text{ μόρια}$
- $1 \mu\text{g DNA του φάγου } \lambda \approx 1,9 \times 10^{10} \text{ μόρια}$
- $1 \mu\text{g γονιδιωματικού DNA της } E. coli = 2 \times 10^8 \text{ μόρια}$
- $1 \mu\text{g ανθρώπινου γονιδιωματικού DNA} \approx 3,04 \times 10^5 \text{ αντίγραφα ανθρώπινου γονιδιωματικού DNA}$

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΕΞΑΣΚΗΣΗ

1. Να δείξετε ότι $1 \mu\text{g}$ ανθρώπινου γονιδιωματικού DNA περιέχει $3,04 \times 10^5$ αντίγραφα του.
2. Να δείξετε ότι $1 \mu\text{g}$ DNA του φάγου λ περιέχει $1,9 \times 10^{10}$ μόρια. Το μήκος ενός μορίου DNA του φάγου λ είναι 48.502 bp.
3. Να δείξετε ότι $1 \mu\text{g}$ γονιδιωματικού DNA του βακτηρίου *E. coli* περιέχει 2×10^8 μόρια. Το γονιδίωμα της *E. coli* έχει μέγεθος περίπου $4,6 \times 10^6$ bp.
4. Αν έχετε στη διάθεσή σας 500 ng ανθρώπινου γονιδιωματικού DNA, πόσα αντίγραφα ενός γονιδίου-στόχου θα υπάρχουν, εφόσον το συγκεκριμένο γονίδιο συναντάται μία μόνο φορά στο γονιδίωμα;

ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

1. Το μέγεθος του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι περίπου 3×10^9 bp (βλ. Ενότητα 22.11).
Το μοριακό του βάρος είναι: $660 \text{ D/bp} = 1,98 \times 10^{12} \text{ D}$.
Επομένως, 1 mol ανθρώπινου γονιδιωματικού DNA ζυγίζει περίπου $1,98 \times 10^{12} \text{ g}$ και περιέχει $6,022 \times 10^{23}$ αντίγραφα.
Πόσα mol υπάρχουν σε $1 \mu\text{g}$;
$$\frac{1 \text{ mol}}{1,98 \times 10^{12} \text{ g}} = \frac{\quad}{1 \times 10^{-6} \text{ g}} \quad ; = 5,05 \times 10^{-19} \text{ mol}$$
$$5,05 \times 10^{-19} \text{ mol} \times \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ αντίγραφα}}{\text{mol}} \approx 3,04 \times 10^5 \text{ αντίγραφα}$$

2. Το μοριακό βάρος του DNA του φάγου λ είναι:

$$\frac{660 \text{ D}}{1 \text{ bp}} \times (48.502 \text{ bp}) \approx 3,201 \times 10^7$$

Επομένως, 1 mol = $3,201 \times 10^7$ g και περιέχει $6,022 \times 10^{23}$ μόρια.

Πόσα mol υπάρχουν σε 1 μg;

$$\frac{1 \text{ mol}}{3,201 \times 10^7 \text{ g}} = \frac{\quad}{1 \times 10^{-6} \text{ g}} \quad ; = 3,12 \times 10^{-14} \text{ mol}$$

$$3,12 \times 10^{-14} \text{ mol} \times \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ μόρια}}{\text{mol}} \approx 1,9 \times 10^{10} \text{ μόρια}$$

3. Το γονιδίωμα του βακτηρίου *E. coli* έχει μέγεθος περίπου $4,6 \times 10^6$ bp. Το μοριακό βάρος του είναι:

$$\frac{660 \text{ D}}{1 \text{ bp}} \times (4,6 \times 10^6 \text{ bp}) = 3,036 \times 10^9$$

Επομένως, 1 mol = $3,036 \times 10^9$ g και περιέχει $6,022 \times 10^{23}$ μόρια.

Πόσα mol υπάρχουν σε 1 μg;

$$\frac{1 \text{ mol}}{3,036 \times 10^9 \text{ g}} = \frac{\quad}{1 \times 10^{-6} \text{ g}} \quad ; = 3,294 \times 10^{-16} \text{ mol}$$

$$3,294 \times 10^{-16} \text{ mol} \times \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ μόρια}}{\text{mol}} \approx 2 \times 10^8 \text{ μόρια}$$

4. Θεωρώντας ότι 1 μg ανθρώπινου γονιδιωματικού DNA περιέχει $3,04 \times 10^5$ αντίγραφα του, πόσα αντίγραφα θα υπάρχουν σε 500 ng;

$$500 \text{ ng} = 500 \times 10^{-3} \mu\text{g} = 0,5 \mu\text{g}$$

$$\frac{3,04 \times 10^5 \text{ μόρια}}{1 \mu\text{g}} = \frac{\quad}{0,5 \mu\text{g}} \quad ; = 1,52 \times 10^5 \text{ αντίγραφα του γονιδίου-στόχου}$$

