



Εισαγωγή στην Μοριακή Βιολογία

Κυτταρική και Μοριακή βιολογία

Αντώνης Γιακουντής

Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



*Δομή και οργάνωση
γονιδίων*



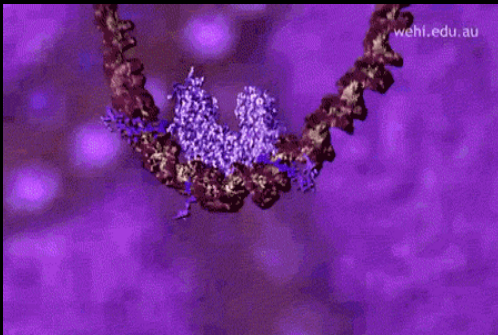
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ



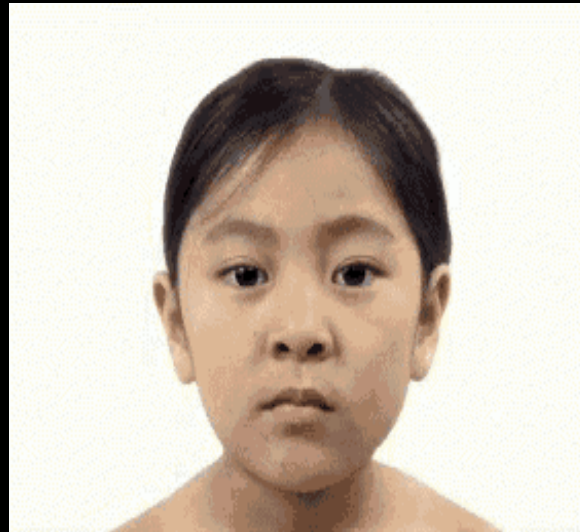
**Γονότυπος
(DNA)**



**Επιγενετική
(γονιδιακή ρύθμιση)**



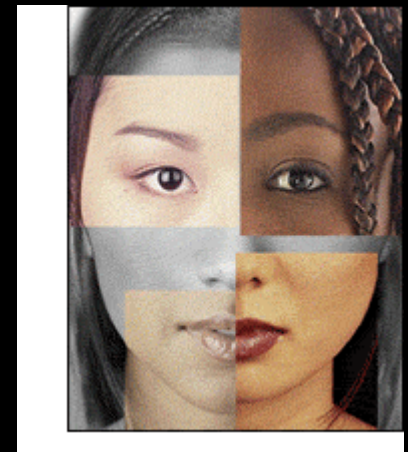
**Φαινότυπος
(δυναμικά χαρακτηριστικά)**



**Περιβάλλον
(stress)**



**Ιστορία ζωής
(βιώματα)**

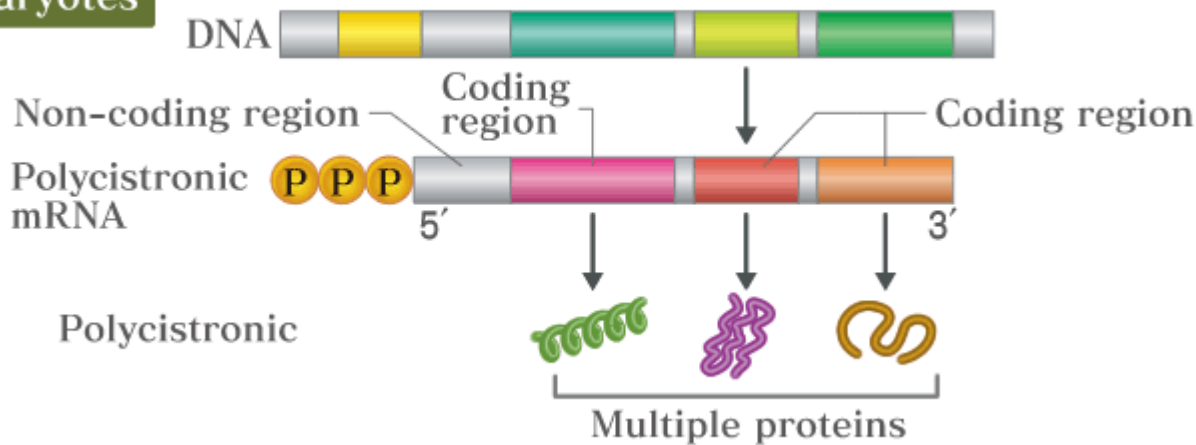




Η ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΔΙΑΦΕΡΕΙ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΕ ΠΡΟΚΑΡΥΟΤΕΣ ΚΑΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΕΣ

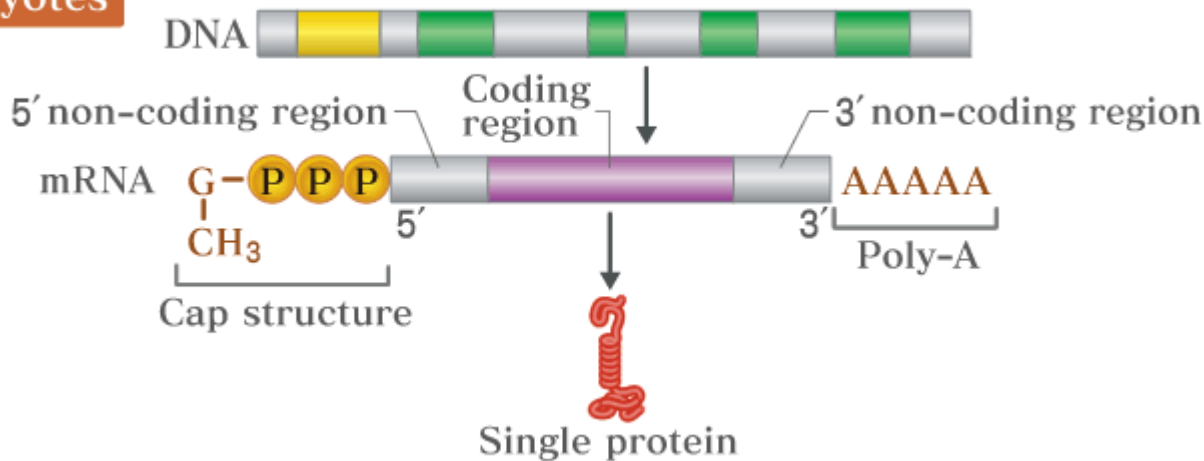


Prokaryotes



- Ρύθμιση από υποκινητές
- Απουσία ιντρονίων
- Απουσία τροποποιήσεων
- Πολυσιστρονικά γονίδια

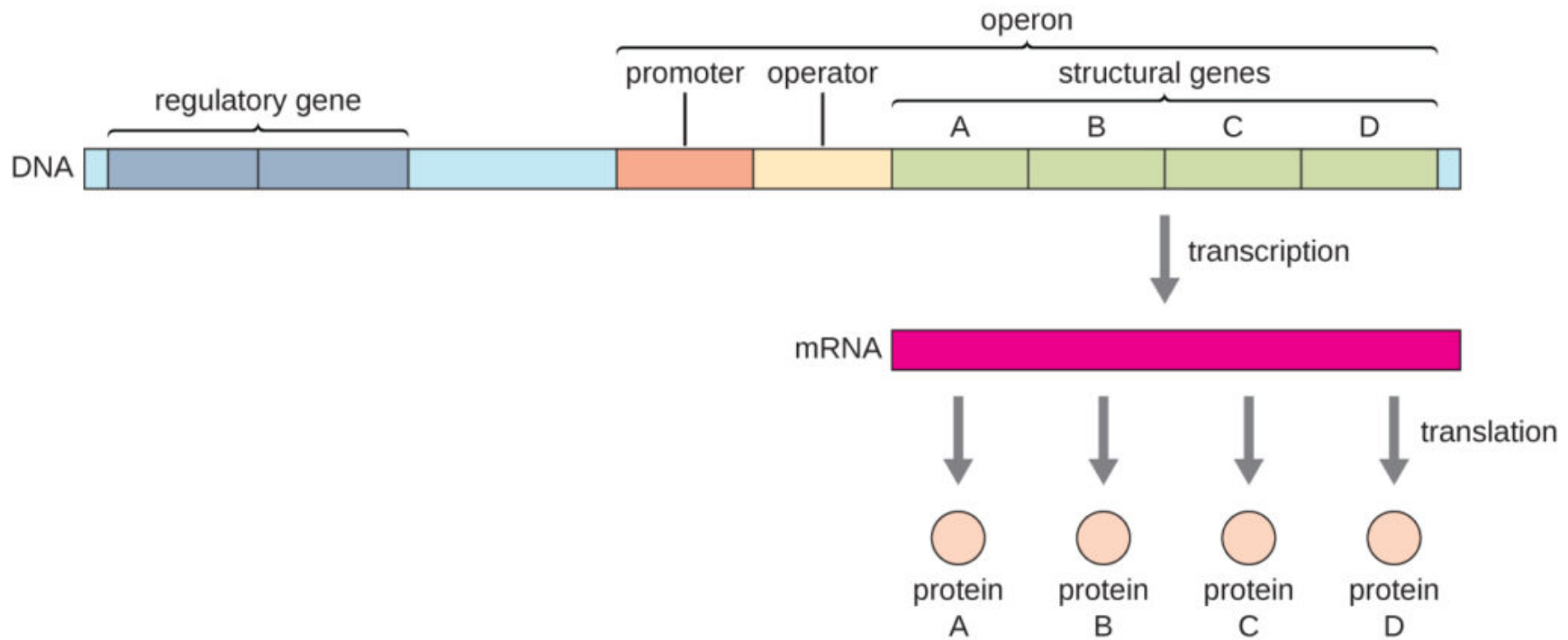
Eukaryotes



- Ρύθμιση από υποκινητές/ενισχυτές
- Παρουσία ιντρονίων
- Ύπαρξη τροποποιήσεων
- Ύπαρξη ισομορφών
- Μια (!) πρωτεΐνη αναίσομορφη



ΔΟΜΗ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ



Τα προκαρυωτικά γονίδια είναι συχνά **πολυσιστρονικά**.

Αυτό συνεπάγεται ρύθμιση **ενός** μεταγράφου από τον **ίδιο** υποκινητή

Το μεταγράφο αφού παραχθεί μεταφράζεται σε **πολλές πρωτεΐνες** λόγω **πολλαπλών** κωδικονίων έναρξης και λήξης της μετάφρασης



ΤΟ ΟΠΕΡΟΝΙΟ LAC



Τα οπερόνια εξασφαλίζουν άμεση και συντονισμένη μεταγραφική απόκριση στο περιβάλλον

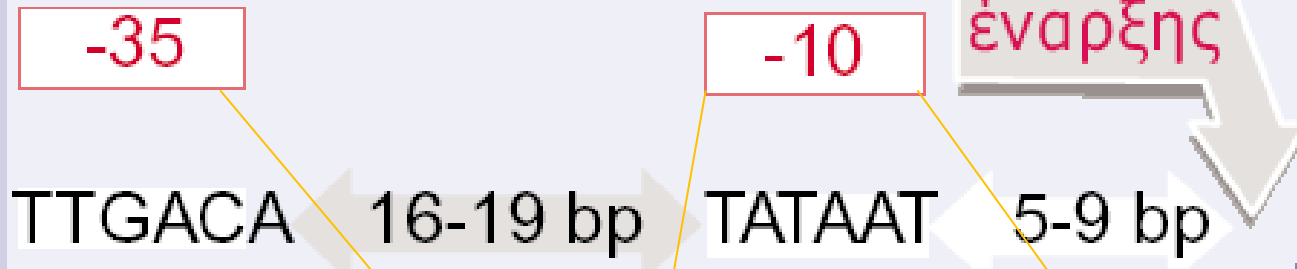
Αντώνης Γιακουντής – Δομή και οργάνωση γονιδίων



ΔΟΜΗ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΩΝ



Ο υποκινητής αποτελείται από 3 στοιχεία



T₈₂T₈₄G₇₈A₆₅C₅₄A₄₅

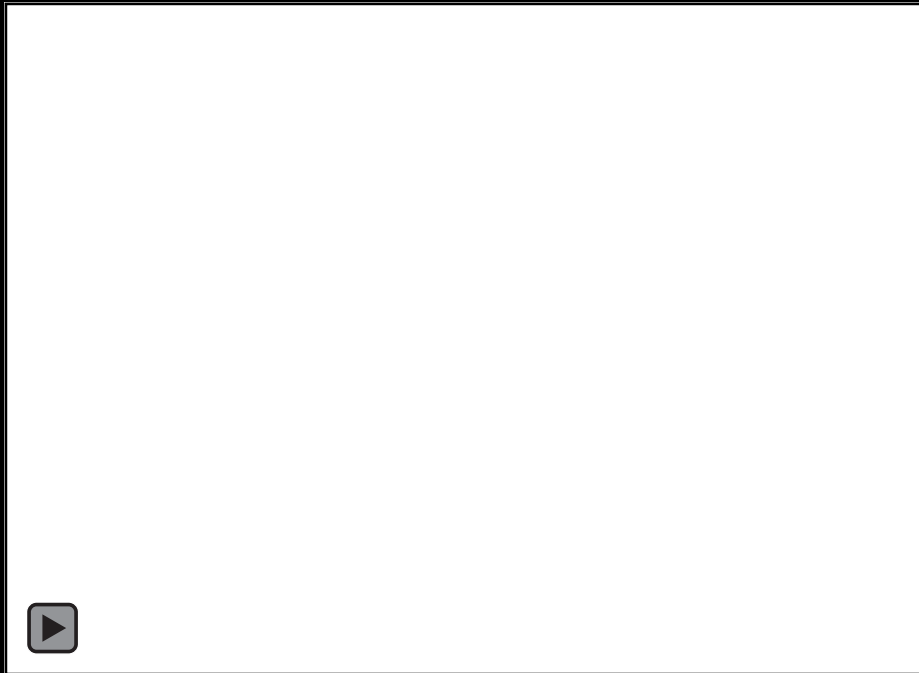
T₈₀A₉₅T₄₅A₆₀A₅₀T₉₆

Ένας τυπικός προκαρυωτικός υποκινητής αποτελείται από τα εξής στοιχεία:

- Την πρότυπη αλληλουχία στη θέση -10
- Την πρότυπη αλληλουχία στη θέση -35
- Την απόσταση ανάμεσα στις θέσεις -35 και -10
- Το σημείο έναρξης



ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ



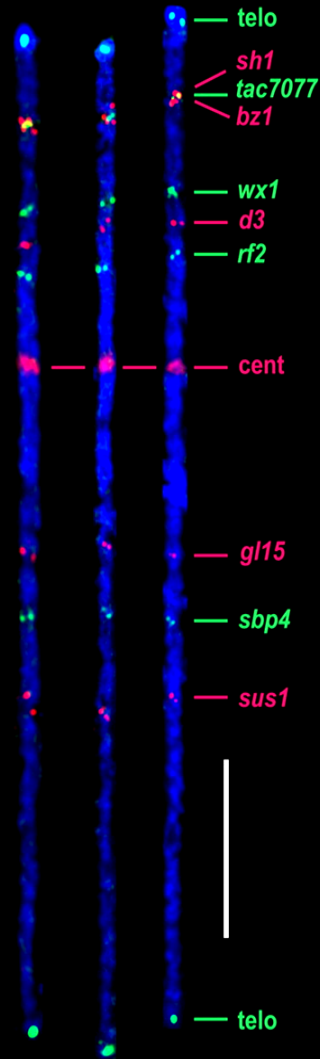
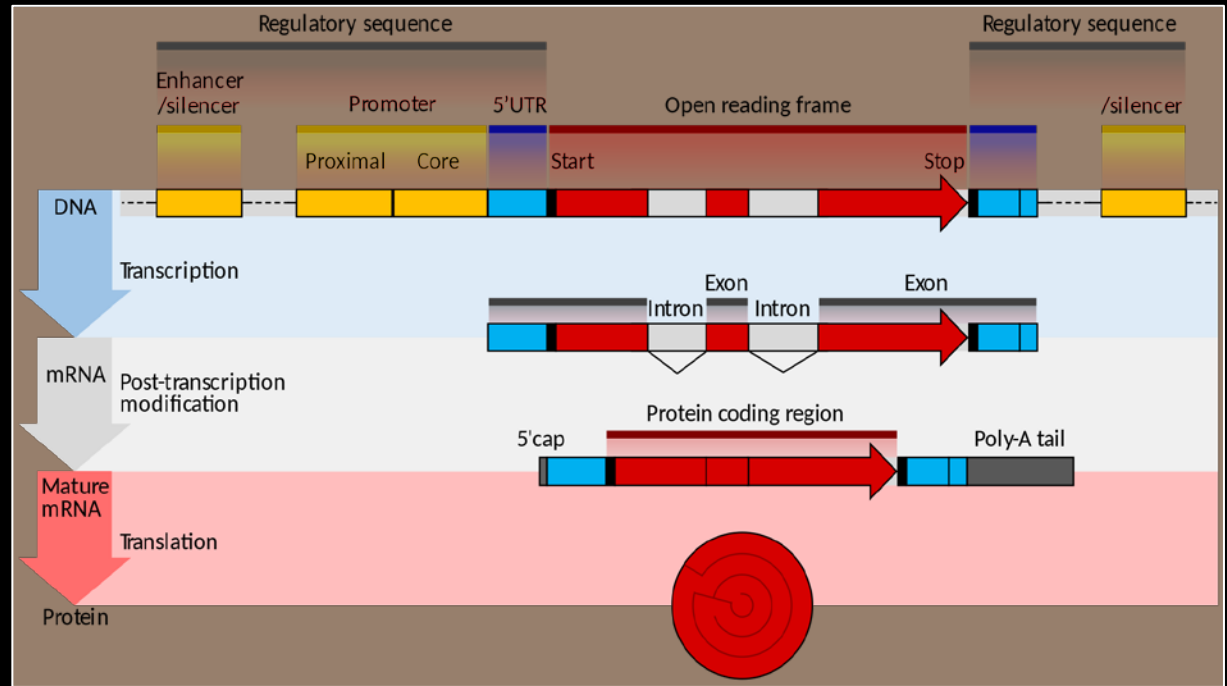
- **Αναγνώριση της μήτρας**
 - Κλειστό σύμπλοκο
 - Ανοικτό σύμπλοκο
- **Έναρξη**
 - Ολοκληρώνεται εάν και εφόσον το ένζυμο κατά-φέρει να μετακινηθεί από την αρχική του θέση.
- **Επιμήκυνση**
- **Τερματισμός**

Οι υποκινητές και οι τερματιστές οριοθετούν τις μεταγραφικές μονάδες στο προκαρυωτικό γονιδίωμα

ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ



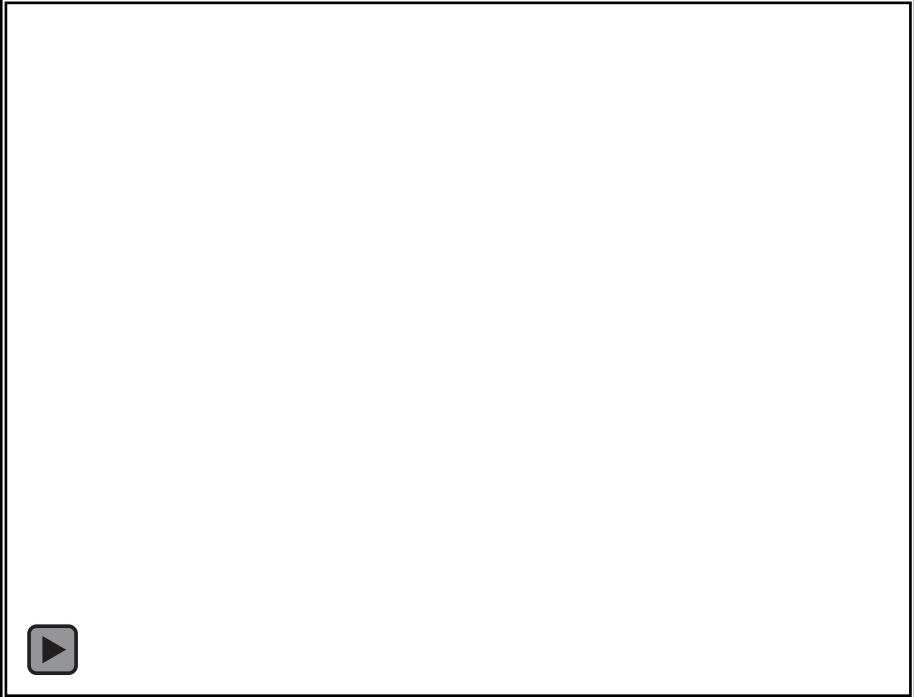
Το κεντρικό δόγμα (?) της βιολογίας



- Ένα αντίγραφο (με εξαιρέσεις)
- Ρύθμιση από υποκινητές/ενισχυτές → **Ιστοειδική/αναπτυξιακή ρύθμιση**
- Μεταγραφή από RNA Pol II
- Εναλλακτική συρραφή → **Ένα γονίδιο, πολλά ισόμορφα**
- Στοιχειοθεσία RNA (editing) → **Ένα ισόμορφο, πολλές λειτουργίες**



1. Μεταγραφικοί παράγοντες

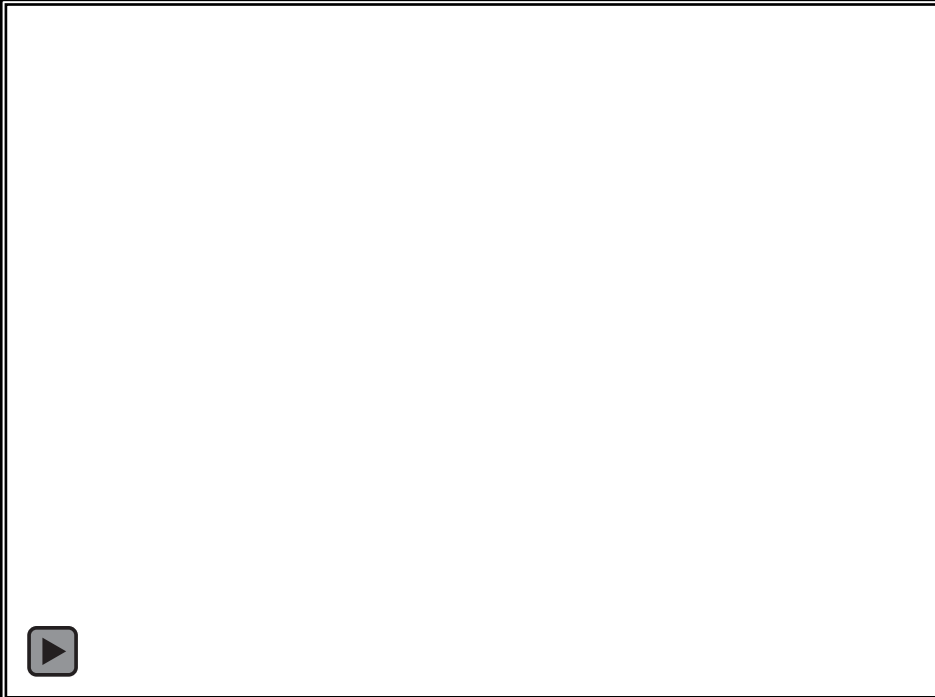


- Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το DNA
- Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης είναι η έναρξη της μεταγραφής
- Οι μεταγραφικοί παράγοντες “σκανάρουν” φευγαλέα αλλά συνεχώς το DNA
- Ειδική αλληλεπίδραση γίνεται με αναγνώριση συγκεκριμένων μοτίβων DNA και αλλαγή της δομής του παράγοντα

- Οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορεί να ενεργοποιούν την μεταγραφή (ενεργοποιητές) ή να την καταστέλλουν (καταστολείς).
- Πρωτεΐνες που παρεμποδίζουν την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA ονομάζονται αναστολείς



2. Μεταγραφή γονιδίων



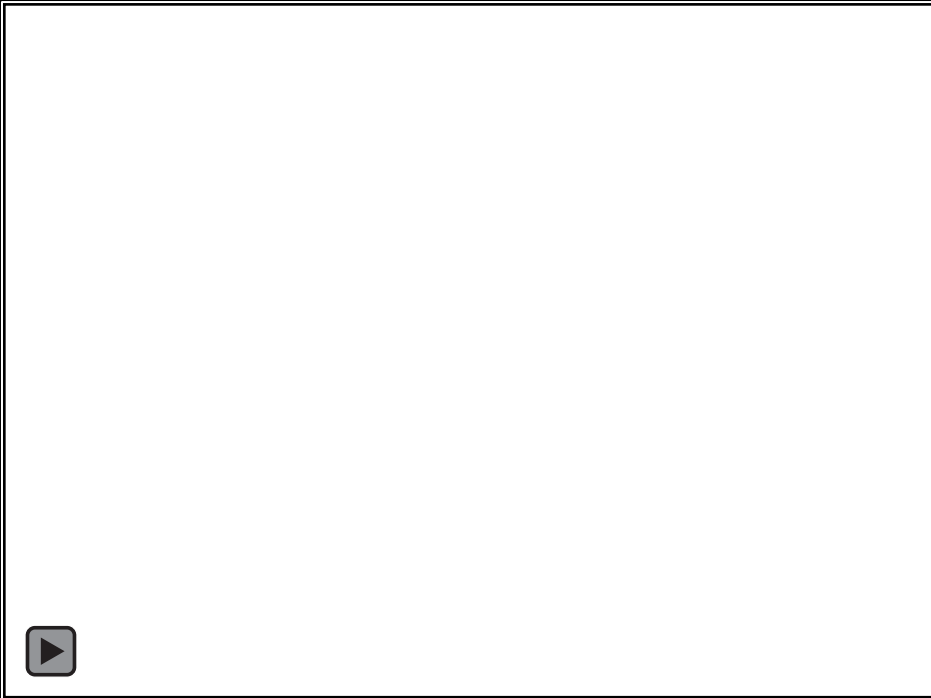
- Η ευκαρυωτική ρύθμιση έχει πολλά στάδια ελέγχου πριν, κατά την διάρκεια και μετά την παραγωγή του RNA
- Η μεταγραφή των ευκαρυωτικών γονιδίων στηρίζεται σε πλήθος ρυθμιστικών στοιχείων
- Τα κυριότερα ευκαρυωτικά ρυθμιστικά στοιχεία είναι οι υποκινητές και οι ενισχυτές

■ Οι υποκινητές βρίσκονται ανοδικά και πλησίον του γονιδίου. Δεσμεύουν μεταγραφικούς παράγοντες, προσελκύοντας την RNA πολυμεραση. Δρουν ομόρροπα με την μεταγραφή

■ Οι ενισχυτές βρίσκονται σε απομακρυσμένες ανοδικές και καθοδικές θέσεις ανοδικά έναντι του γονιδίου. Δεσμεύουν μεταγραφικούς παράγοντες, εξειδικεύοντας την μεταγραφή. Δρουν ομόρροπα ή και αντίρροπα με την μεταγραφή



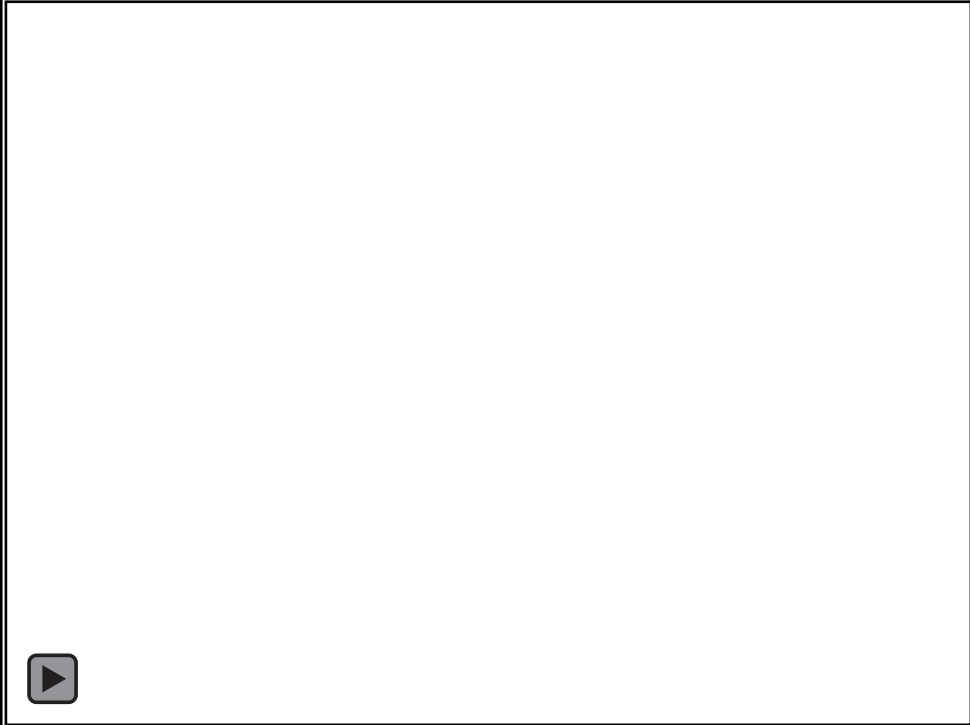
3. Επεξεργασία RNA



- Το **RNA** που παράγεται από την μεταγραφή είναι **ασταθές**
- Για να φτάσει στα ριβοσώματα πρέπει να υποστεί **χημικές τροποποιήσεις**
- Αυτές περιλαμβάνουν την προσθήκη μιας **μεθυλιωμένης κεφαλής** στο **5'** άκρο και μιας **πολυαδενυλιωμένης ουράς** στο **3'** άκρο
- Η **μεθυλιωμένη κεφαλή** προστίθεται στο RNA στην αρχή της **μεταγραφής**
- Η πολυαδενυλίωση καταλύεται από ένζυμα **αποκοπής**. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη **CPSF** προσδένεται στο **μοτίβο πολυαδενυλίωσης AAUAAA** και κόβει το RNA **10-30** νουκλεοτίδια προς το **3'** άκρο.
- Οι πρωτεΐνες **CstF** και **CFI** προσδένονται σε μια πλούσια σε **GU** περιοχή του RNA και **σταθεροποιούν** την πρόσδεση της **CPSF**
- Η πρόσδεση των παραπάνω προσελκύει την **RNA polyA** που θα **αποκόψει** το **3'** άκρο του RNA και θα **συνθέσει** την **πολυαδενυλιωμένη ουρά**



4.Εναλλακτική συρραφή



- Ο μηχανισμός που μετατρέπει το **pre-(m)RNA** σε **mature (m)RNA**
- Τουλάχιστον το **70%** των ανθρώπινων γονιδίων υπόκειται σε συρραφή
- Κατά μέσο όρο κάθε γονίδιο δίνει **4** **ισομορφές**
- Συνολικά τα **25.000** γονίδια μπορούν να δώσουν **90-100.000** πρωτεΐνες

■ Σημασία στη **φυσιολογία** ➔ **Μηχανισμός** αύξησης της πρωτεϊνικής δεξαμενής χωρίς να μεταβάλλεται η γονιδιακή δεξαμενή

■ Σημασία στην **παθολογία** ➔ **Εσφαλμένη** εναλλακτική συρραφή μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες **η/και να αποτρέψει την διάγνωση τους**



Η δομή **προκαρυωτικών** και **ευκαρυωτικών** γονιδίων διαφέρει ριζικά

Τα **προκαρυωτικά** γονίδια είναι **πολυσιστρονικά** δηλαδή παράγουν **πολλές** πρωτεΐνες από ένα μόριο RNA

Τα **ευκαρυωτικά** γονίδια αποτελούνται από **ιντρόνια** και **εξόνια** ενώ ρυθμίζονται από **υποκινητές** και από ενισχυτές

Μέσω **εναλλακτικής συρραφής** από ένα **ευκαρυωτικό** μετάγραφο μπορούν να προκύψουν **πολλά μετάγραφα** (ισομορφές) με **μια** πρωτεΐνη το καθένα



INTERMISSION

15 λεπτών...

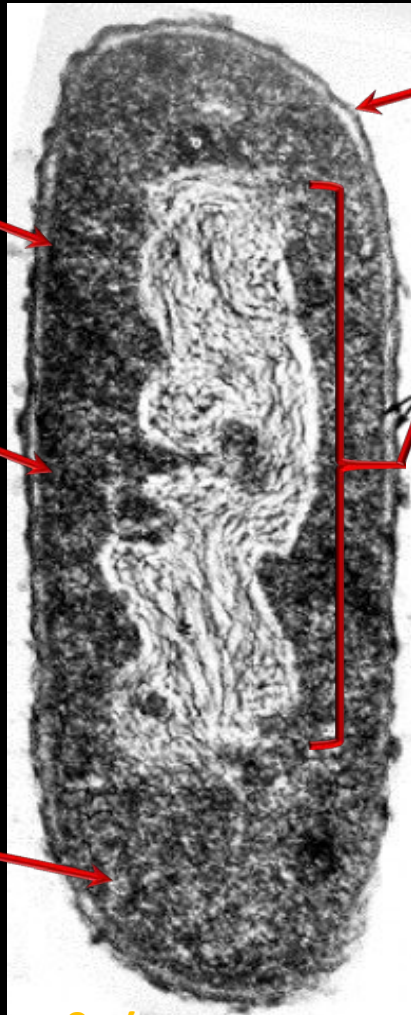




Δομή και οργάνωση
Γονιδιωμάτων



ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

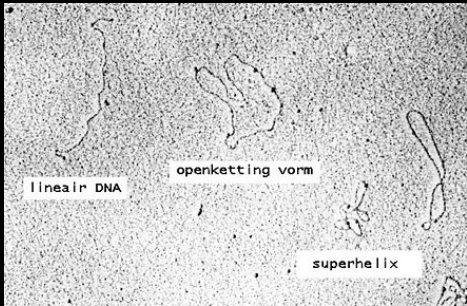


**Κυτταρική μεμβράνη
(εσωτερική)**

**Κυτταρική μεμβράνη
(εξωτερική)**

Ριβόσωμα

Νουκλεοειδές (γονιδιωματικό DNA)



■ Ένα κλειστό (κυκλικό) ή γραμμικό μόριο.

■ Σύμπλοκα με πρωτεΐνες (πυρηνοειδές)

■ DNA συνήθως δεσμευμένο στη μεμβράνη και προσβάσιμο από το κυτταρόπλασμα.

Πλασμίδιο

■ Κωδικοποιεί τις απαραίτητες λειτουργίες του προκαρυώτη

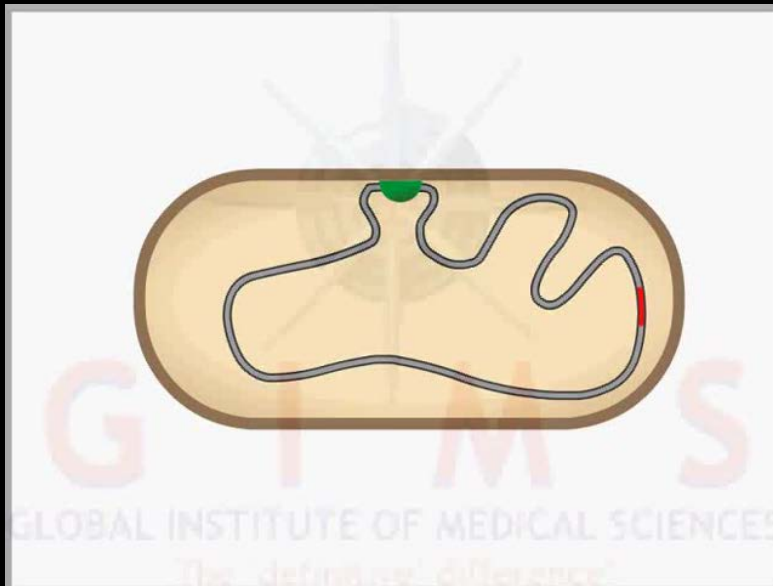
■ Δεν συμπλέκεται με πρωτεΐνες

■ Δεν δεσμεύεται στη μεμβράνη

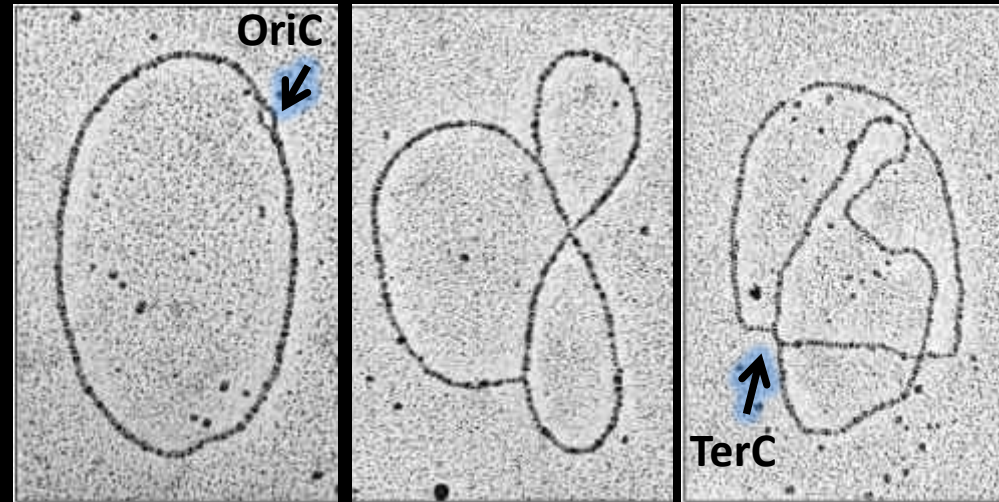
■ Κωδικοποιεί ειδικές λειτουργίες του προκαρυώτη (π.χ ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά)



ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ



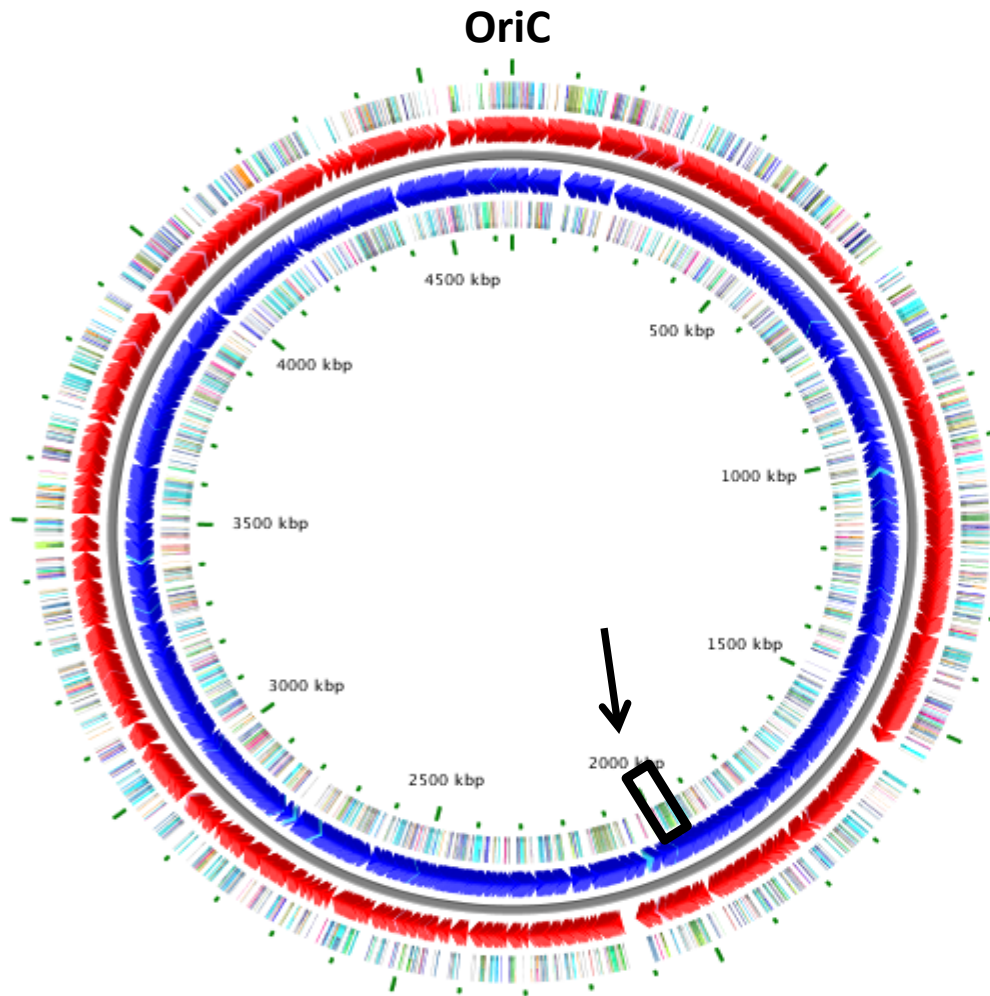
Διχάλα αντιγραφής



- Το **OriC** είναι και το σημείο **βαθμονόμησης** του γονιδιώματος
- Η αντιγραφή ξεκινά **ταυτόχρονα** προς τις δύο κατευθύνσεις από το **OriC**
- Η διαδικασία ολοκληρώνεται στο σημείο τερματισμού που ονομάζεται **terC**
- Εκτός της **κλασσικής** αντιγραφής προκαρυωτικό DNA πολλαπλασιάζεται και μέσω **μηχανισμών οριζόντιας μεταφοράς** με κλινικές επιπτώσεις



ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ *E. coli*



Μήκος 4.6 Mb = 4255 γονίδια

BacMap

PROTEINS

- Forward strand
- Reverse strand

FUNCTIONAL RNA

- Forward strand
- Reverse strand

INFORMATION STORAGE AND PROCESSING

- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- RNA processing and modification
- Transcription
- Replication, recombination and repair
- Chromatin structure and dynamics

CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING

- Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
- Nuclear structure
- Defense mechanisms
- Signal transduction mechanisms
- Cell wall/membrane/envelope biogenesis
- Cell motility
- Cytoskeleton
- Extracellular structures
- Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- Posttranslational modification, protein turnover, chaperones

METABOLISM

- Energy production and conversion
- Carbohydrate transport and metabolism
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Coenzyme transport and metabolism
- Lipid transport and metabolism
- Inorganic ion transport and metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

POORLY CHARACTERIZED

- General function prediction only
- Function unknown
- No COG

<http://bacmap.wishartlab.com/>

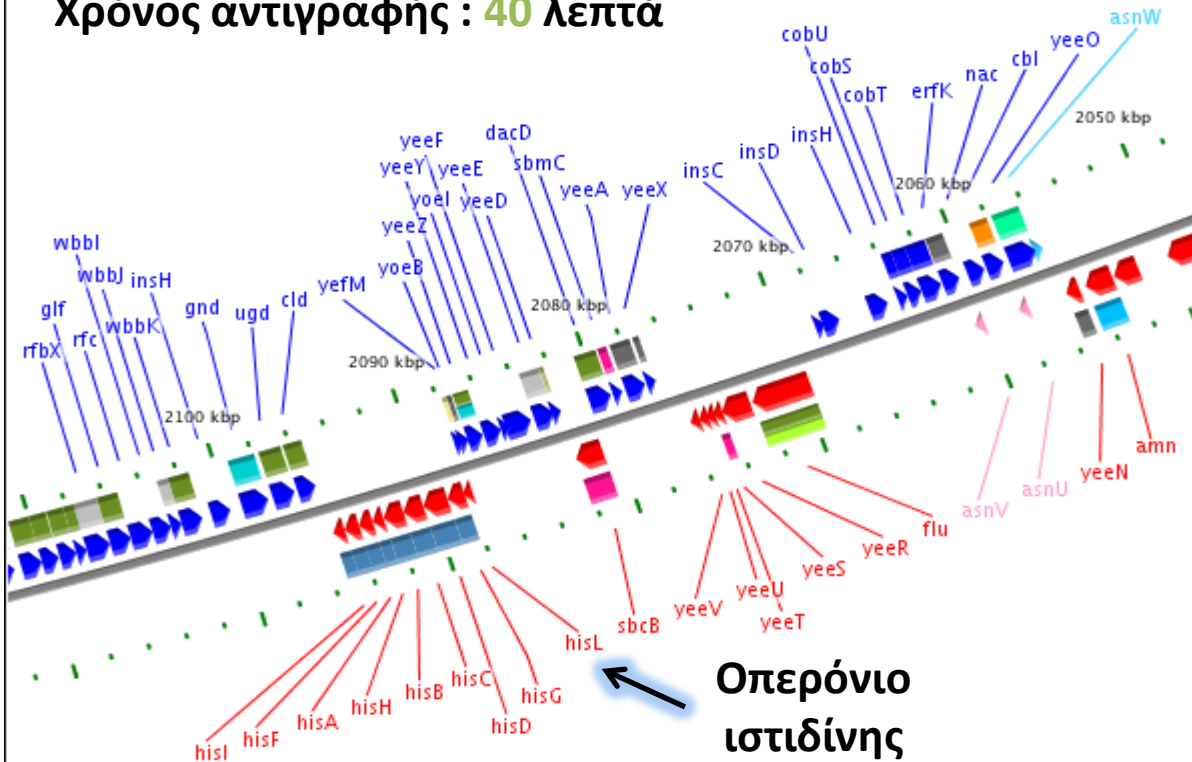


ΟΠΕΡΟΝΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ



Χρόνος γενεάς : 60 λεπτά

Χρόνος αντιγραφής : 40 λεπτά



Οπερόνιο
ιστιδίνης

■ Τα οπερόνια είναι θέσεις με διαδοχικά γονίδια που μοιράζονται τον ίδιο υποκινητή

■ Συν-μεταγράφονται και παράγουν χωριστές πρωτεΐνες

■ Υψηλά εκφρασμένα γονίδια διατάσσονται δίπλα στο OriC

BacMap

PROTEINS

- Forward strand
- Reverse strand

FUNCTIONAL RNA

- Forward strand
- Reverse strand

INFORMATION STORAGE AND PROCESSING

- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- RNA processing and modification
- Transcription
- Replication, recombination and repair
- Chromatin structure and dynamics

CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING

- Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
- Nuclear structure
- Defense mechanisms
- Signal transduction mechanisms
- Cell wall/membrane/envelope biogenesis
- Cell motility
- Cytoskeleton
- Extracellular structures
- Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- Posttranslational modification, protein turnover, chaperones

METABOLISM

- Energy production and conversion
- Carbohydrate transport and metabolism
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Coenzyme transport and metabolism
- Lipid transport and metabolism
- Inorganic ion transport and metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

POORLY CHARACTERIZED

- General function prediction only
- Function unknown
- No COG

<http://bacmap.wishartlab.com/>

ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Το σώμα σας περιέχει **23 ζεύγη** χρωμοσωμάτων σε κάθε κύτταρο

Το μήκος τους ανέρχεται στα **5 cm** κατά μέσο όρο...

...έχετε **10 τρισεκατομμύρια** κύτταρα...



...που σημαίνει ότι το **συνολικό μήκος του DNA** σας...

...θα μπορούσε να τυλιχτεί γύρω από την Γη και την σελήνη **1500 φορές!**

ΠΩΣ ΧΩΡΑΕΙ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ ΔΑΣΚΑΛΕ ????



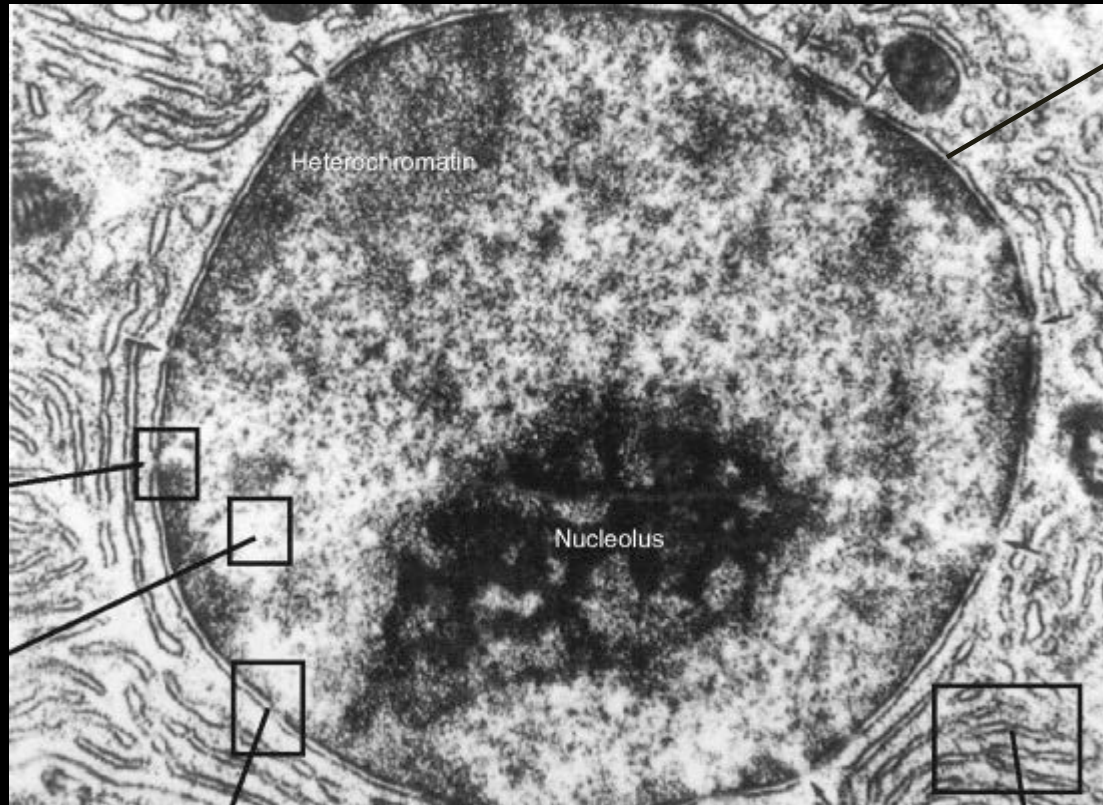
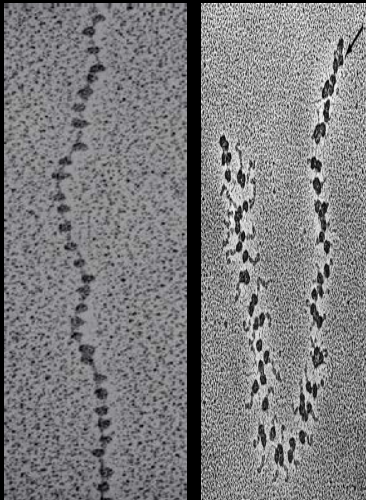
ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ



Πυρηνική μεμβράνη



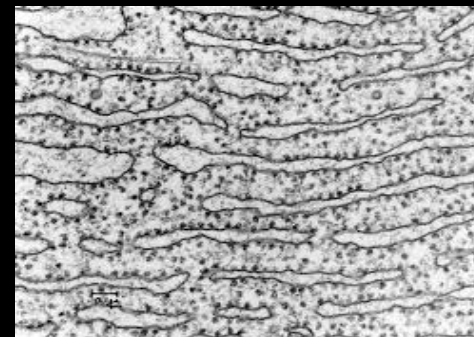
Ευχρωματίνη



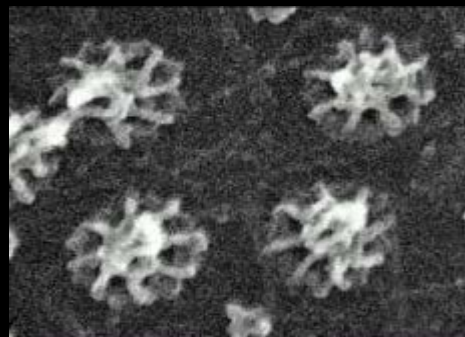
Ετεροχρωματίνη



Ενδοπλασματικό δίκτυο

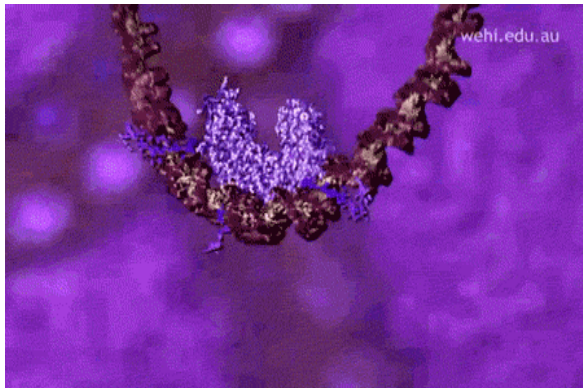


Πυρηνικοί πόροι

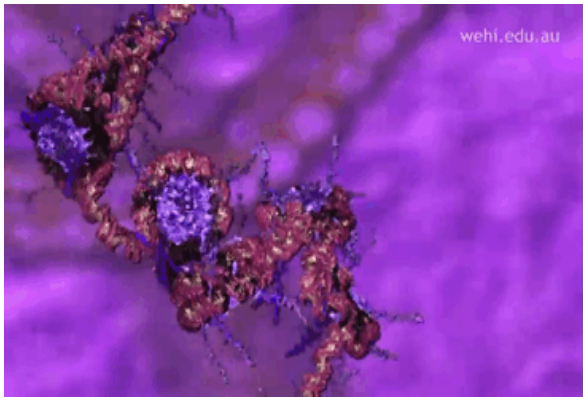




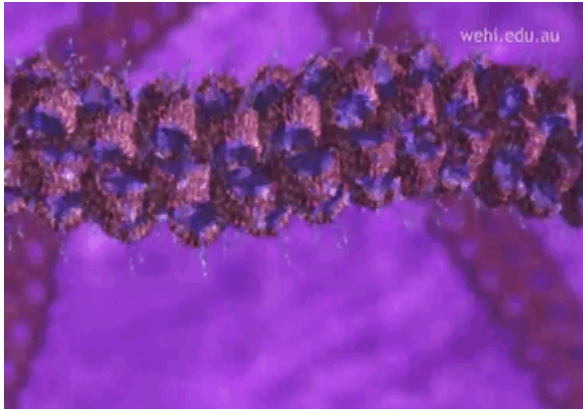
ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ



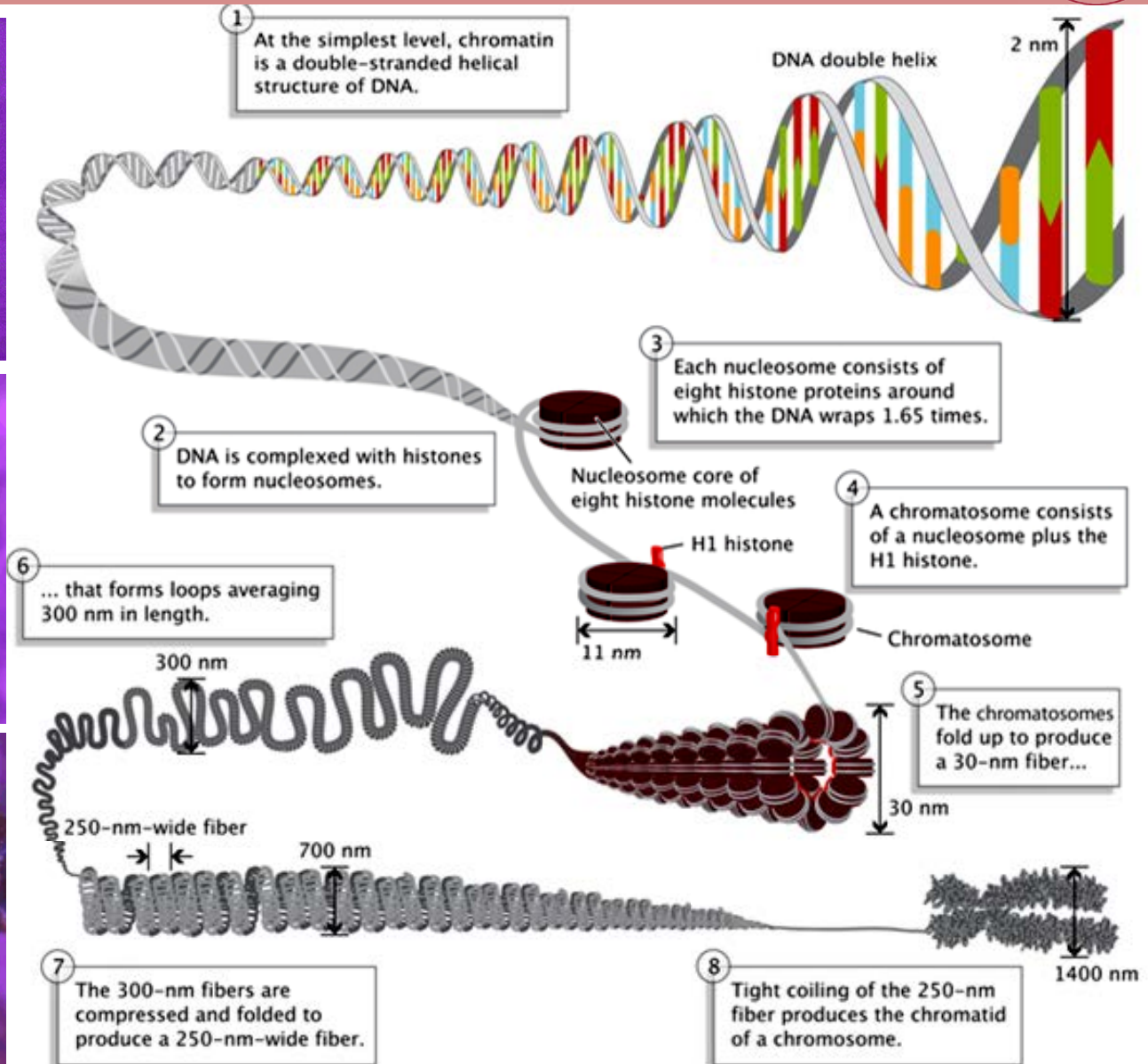
wehi.edu.au

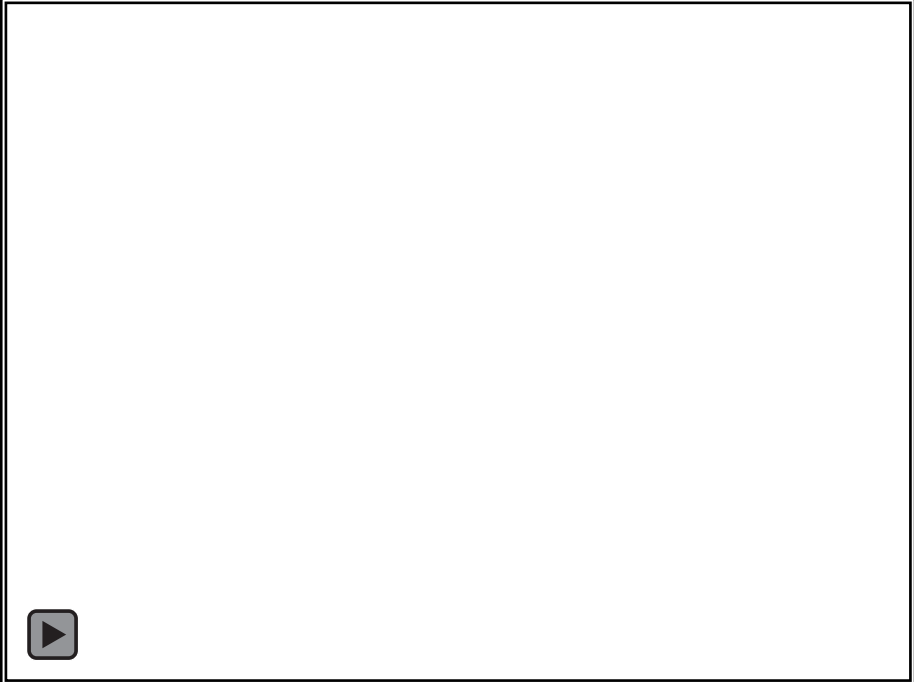


wehi.edu.au



wehi.edu.au



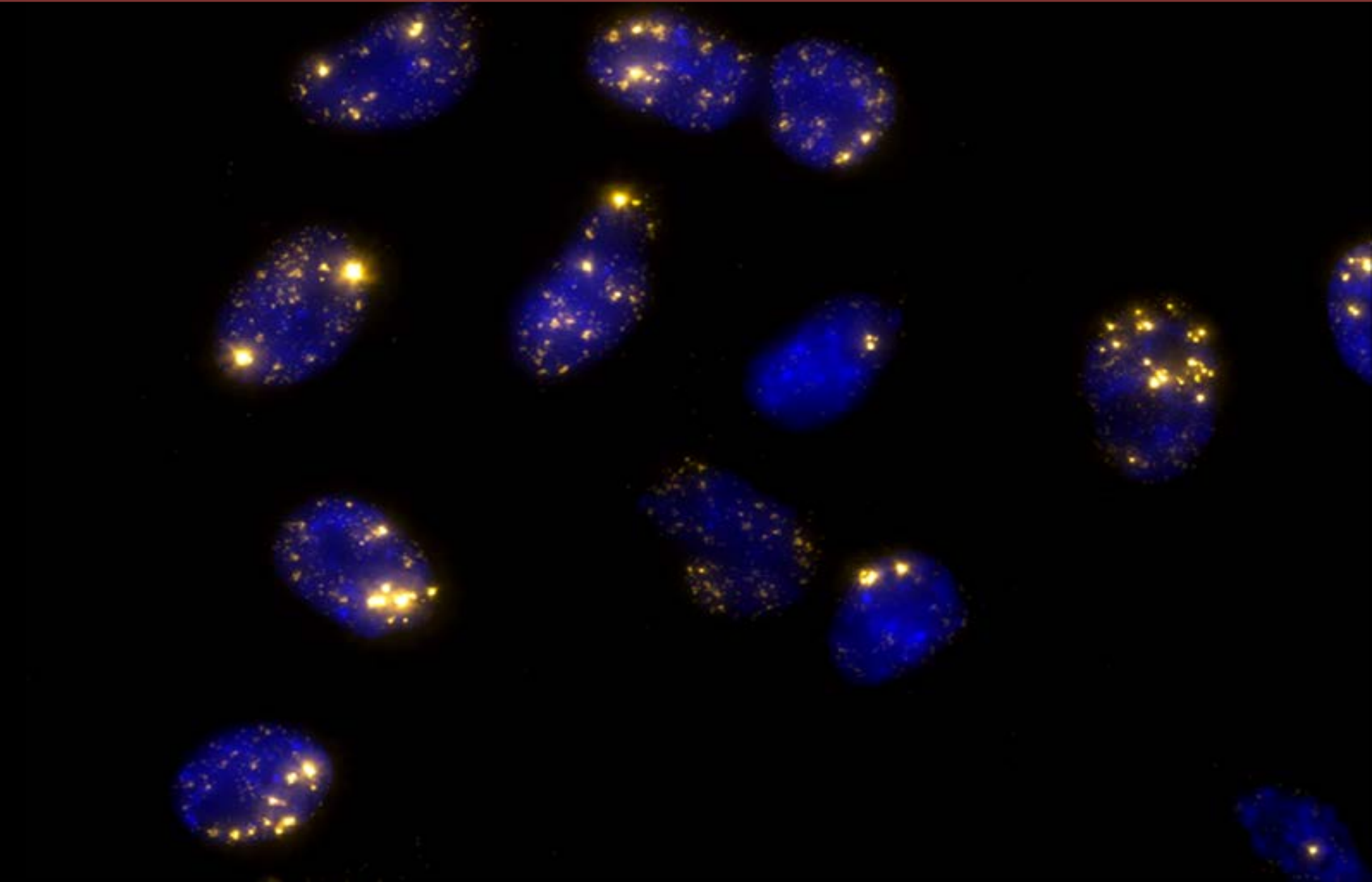


- Το DNA στον πυρήνα σχηματίζει σύμπλοκα με πρωτεΐνες που ονομάζονται χρωματίνη
 - Το νουκλεόσωμα αποτελεί την βασική μονάδα της χρωματίνης
 - Αποτελείται από τέσσερις πυρήνες ιστονών, την H2A, H2B, H3 και H4
 - Αμινοξικές ουρές προεξέχουν από όλες τις ιστόνες.
-
- Τα κατάλοιπα τους γίνονται στόχος τροποποιήσεων που επηρεάζουν την δομή και τις ιδιότητες ολόκληρου του νουκλεοσώματος
 - Ανιχνεύοντας αυτές τις τροποποιήσεις μπορούμε να έχουμε δυναμικού τύπου πληροφορία για τις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος





Η ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

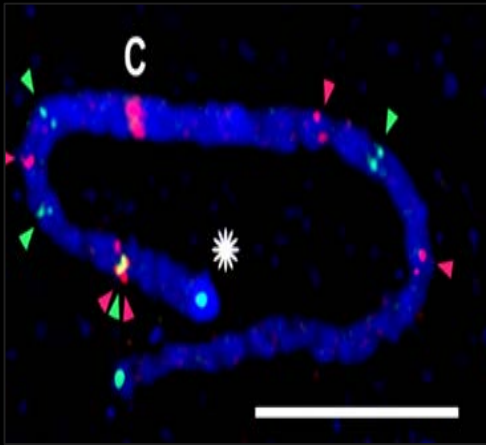




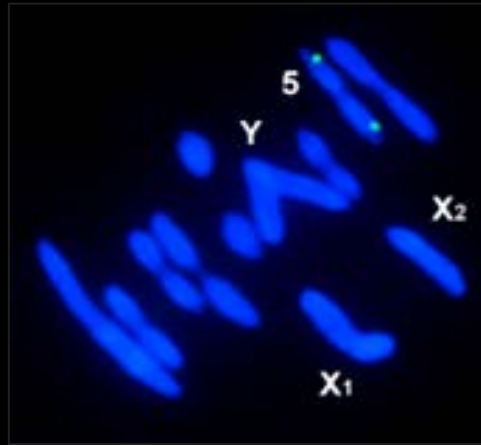
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ



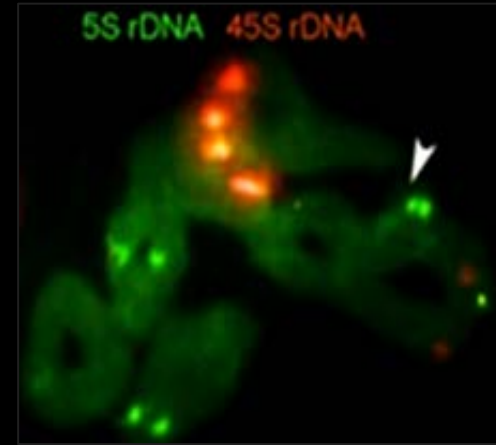
Γονίδια



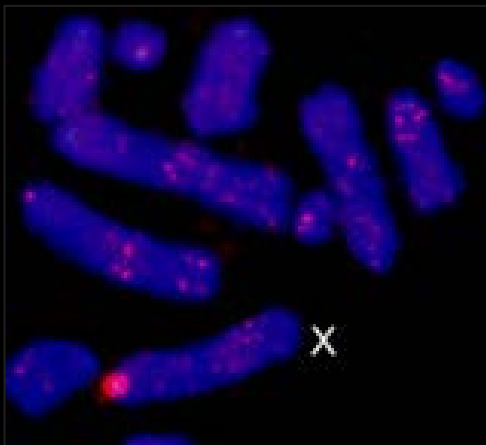
Οικογένειες



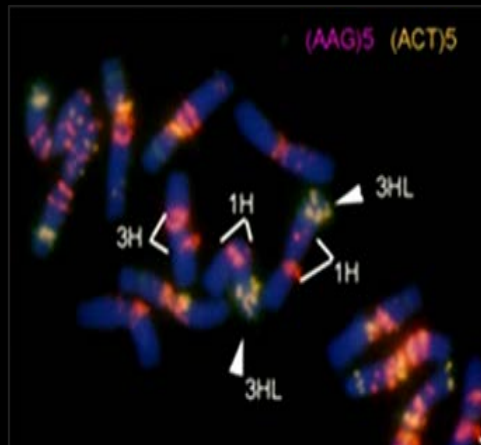
Συστοιχίες rDNA



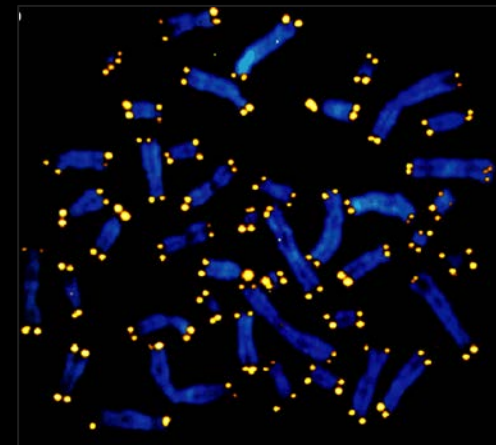
Μινιδορυφόροι



Μικροδορυφόροι



Τελομερή



Διάσπαρτα

Κεντρομερές

Χρωμοσωμικά
άκρα

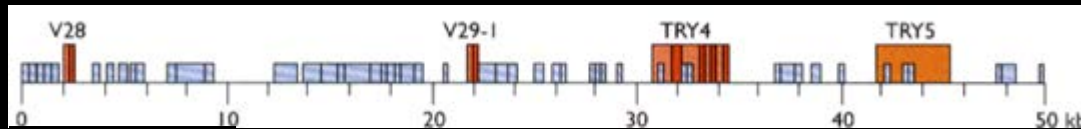


ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ



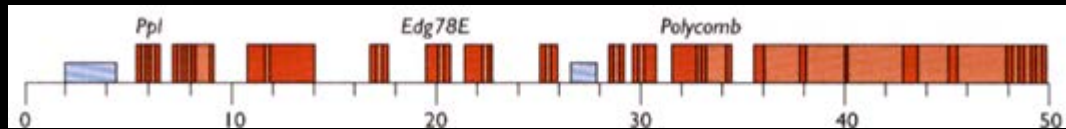
Ρυθμιστική
πολυπλοκότητα

Άνθρωπος

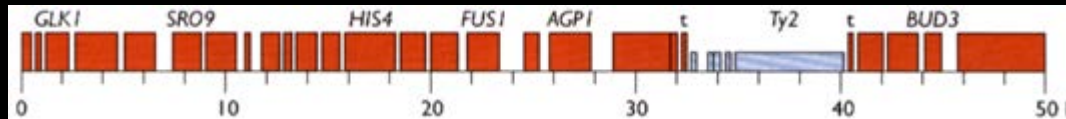


Γονιδιακή
πυκνότητα

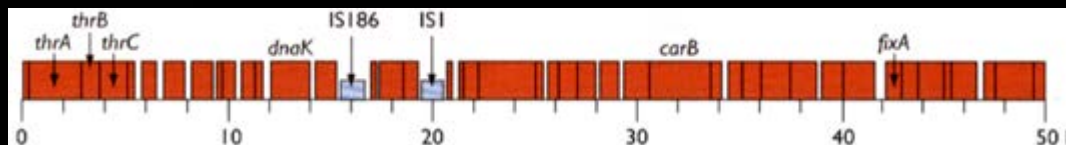
Μύγα του κρασιού



Ζύμη



E. coli



KEY

■ Gene ■ Intron ■ Human pseudogene ■ Genome-wide repeat t tRNA gene





ΣΥΝΟΨΗ



Στα **προκαρυωτικά** γονιδιώματα τα γονίδια οργανώνονται σε **οπερόνια**

Τα **οπερόνια** επιτρέπουν στον προκαρυώτη να αποκρίνεται **άμεσα** και να μεταγράφει **συντονισμένα μέρος** του γονιδιώματός του

Τα **ευκαρυωτικά** γονιδιώματα είναι **ετερογένη** και λόγω μεγέθους στηρίζονται στην **επιγενετική** για να χωρέσουν στον πυρήνα

Το **παράδοξο της τιμής C** αντανακλά την επίδραση της γονιδιωματικής **πολυπλοκότητας** των ευκαρυωτικών (**πολυκύτταρων**) γονιδιωμάτων στην γονιδιακή τους **πυκνότητα**



INTERMISSION

15 λεπτών...

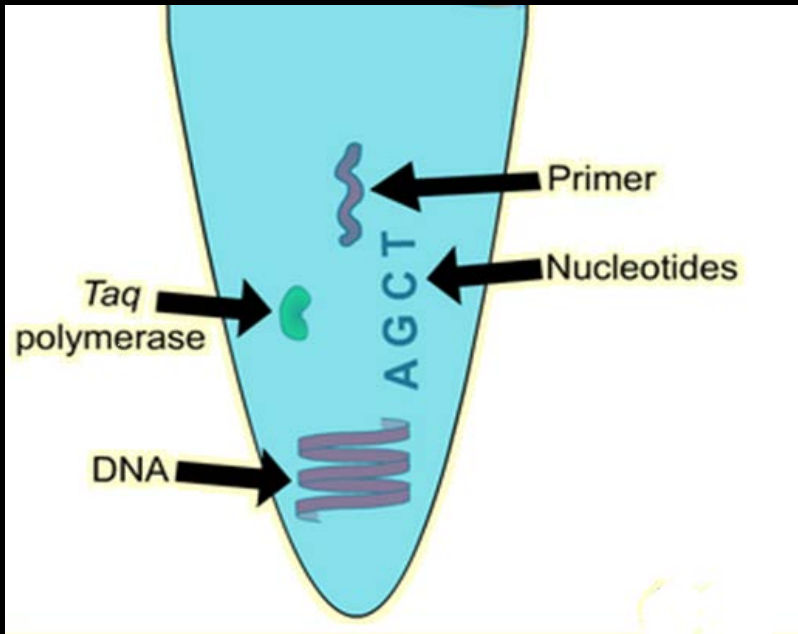




***Εισαγωγή σε τεχνικές
Μοριακής Βιολογίας***



ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΜΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ



Όπως κάθε ενζυματική αντίδραση έτσι και η PCR στηρίζεται σε ένα **ένζυμο** και αξιοποιεί συγκεκριμένα **συστατικά** για να τροποποιήσει ένα **υπόστρωμα**

Τα πιο συνηθισμένα συστατικά μιας PCR είναι οι **εκκινητές**, τα **κατιόντα μαγνησίου** και τα **νουκλεοτίδια**.

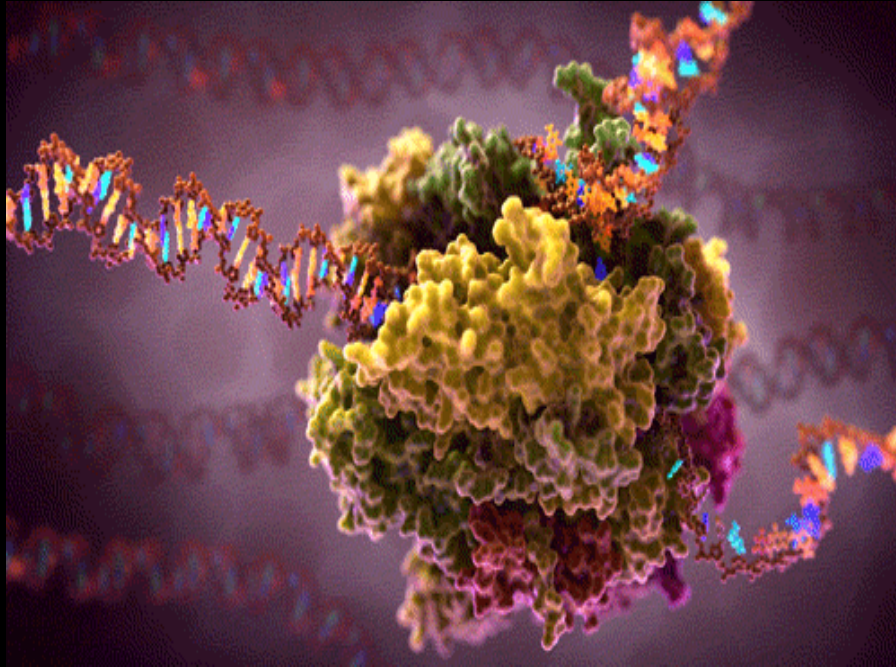
Οι **εκκινητές** θέτουν τα **όρια σύνθεσης** του προϊόντος (**amplicon**) της αντίδρασης (βλ. παρακάτω)

Τα **κατιόντα μαγνησίου** εξουδετερώνουν τις **ηλεκτροαπωστικές** τάσεις μεταξύ **εκκινητών** και **υποστρώματος**

Τα **νουκλεοτίδια** αποτελούν τους **δομικούς λίθους** που θα συνθέσουν το **προϊόν** της αντίδρασης



Η DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ ΚΑΤΑΛΥΕΙ ΤΗΝ PCR



Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο της **DNA πολυμεράσης** και απαιτεί την παρουσία ολιγονουκλεοτιδίων που ονομάζονται **εκκινητές**.

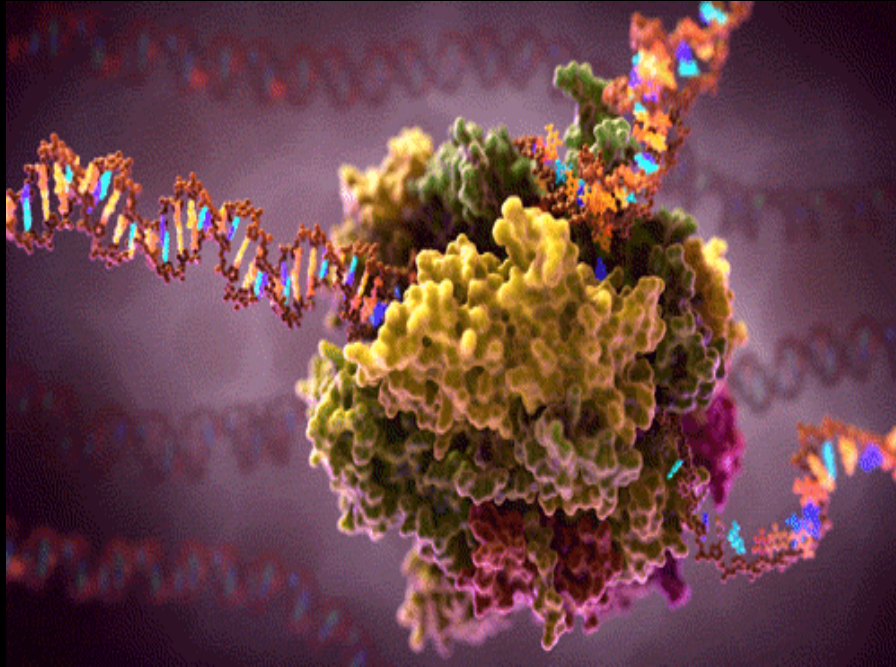
Υπάρχουν πολλές DNA πολυμεράσες με **διαφορετικές** ιδιότητες που όλες έχουν απομονωθεί από **προκαρυώτες**

Η πιο διαδεδομένη DNA πολυμεράση ονομάζεται **Taq** και έχει απομονωθεί από τον θερμόφιλο προκαρυώτη ***Thermus aquaticus***²

Αν και πρωτεΐνη, η Taq είναι **σταθερή** με ένα χρόνο ημιζωής μεγαλύτερο των **δύο ωρών** σε θερμοκρασίες έως **90 C** !



Η DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ ΚΑΤΑΛΥΕΙ ΤΗΝ PCR



Η Ταq είναι ένα πολύ **αποτελεσματικό** και **γρήγορο** ένζυμο. Μπορεί σε **10 sec** να αντιγράψει **1000 βάσεις DNA** !

Η **ταχύτητα** της συνοδεύεται από ένα **κόστος** : την χαμηλή πιστότητα αντιγραφής!

Υπάρχει μια **λάθος** σύνδεση (**μετάλλαξη**) για κάθε **5000** βάσεις³ που συνθέτει η Ταq!

Γι' αυτό τον λόγο έχουν απομονωθεί και άλλες πολυμεράσες (π.χ Q5, Phusion, Pfu) με **μικρότερη ταχύτητα** αλλά **μεγαλύτερη πιστότητα** αντιγραφής που αξιοποιούνται χωριστά ή και σε συνδυασμό με την Ταq



Η PCR ΔΙΕΞΑΓΕΤΑΙ ΣΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥΣ ΚΥΚΛΟΥΣ



Η PCR ονομάζεται **αλυσιδωτή** επειδή αποτελείται από **συνδεδεμένα** επιμέρους στάδια που ονομάζονται **κύκλοι**

Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία βήματα : την **αποδιάταξη**,
την **τήξη**,
την **επιμήκυνση**

Οι κύκλοι **επαναλαμβάνονται** δίνοντας το τελικό προϊόν της αντίδρασης

Η PCR χαρακτηρίζεται από αυξημένη **επιλεκτικότητα** και **ευαισθησία** : **ένα** μόριο υποστρώματος DNA μπορεί να αντιγραφεί τμηματικά σε **δισεκατομμύρια** αντίγραφα μέσα σε λίγες ώρες !



Το πρώτο στάδιο μιας PCR αφορά την **αποδιάταξη** του **υπόστρωματος**

Λαμβάνει χώρα στους **95-98 °C**

Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή του **δίκλωνου** υποστρώματος σε **μονόκλωνο**

Μόνο το **μονόκλωνο** DNA αποτελεί **υπόστρωμα** για το επόμενο βήμα της τήξης των εκκινητών

Η αποδιάταξη είναι **κρίσιμη** για την επιτυχία της αντίδρασης, ειδικά όταν το υπόστρωμα είναι **μεγαλομοριακό DNA** (π.χ **γονιδιωματικό DNA**)



Το δεύτερο στάδιο μιας PCR αφορά την **τήξη** των εκκινητών στο **υποστρώμα**

Λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία που εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών (συνήθως **55-60 °C**)

Σκοπός της τήξης είναι η οριοθέτηση του τμήματος που θα αντιγραφεί από την DNA πολυμεράση.

Η **τήξη** των εκκινητών είναι το πλέον **κρίσιμο** στάδιο για την επιτυχία της αντίδρασης. Καθορίζει την αναλογία **κύριου** προϊόντος έναντι των **παραπροϊόντων** της αντίδρασης



Το τρίτο στάδιο μιας PCR αφορά την **σύνθεση** του προϊόντος (**amplicon**) της αντίδρασης

Λαμβάνει χώρα στους **72 °C** (**Taq**)

Σκοπός της σύνθεσης είναι να αναγνωρίσει η πολυμεράση το

δίκλωνο τμήμα **υποστρώματος::εκκινητών** και να επιμηκύνει επιτυχώς την **ενδιάμεση αλληλουχία**

Η **διάρκεια** της σύνθεσης εξαρτάται από το **μήκος** του amplicon και την **ταχύτητα αντιγραφής** της πολυμεράσης που θα χρησιμοποιηθεί



τα **προϊόντα** της αντίδρασης συνήθως **ηλεκτροφόρηση** σε **πηκτή** αγαρόζης

ηλεκτρικού πεδίου, εξωθεί τα **αρνητικά** νουκλειικά οξέα στο να κινηθούν από **αρνητικό** προς τον **θετικό** πόλο.

Τα νουκλειικά κινούνται μέσα σε μια **πορώδη πηκτή** ενός πολυσακχαρήτη που ονομάζεται **αγαρόζη**. Έτσι αναλύονται με βάση το **μοριακό τους βάρος**.

Η **οπτικοποίηση** των νουκλειικών οξέων γίνεται μέσω της **πρόσδεσης** φθορίζουσων χρωστικών όπως το **βρωμιούχο αιθίδιο**.



ΣΥΝΟΨΗ



Η **Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης** ενισχύει τμήματα ενός υποστρώματος **DNA** παράγοντας εκατομμύρια **αντίγραφα**.

Η αντίδραση καταλύεται από την **DNA πολυμεράση**, ένα ένζυμο που **πολυμερίζει** νουκλεοτίδια για να **αντιγράψει** **δίκλιωνα** μόρια DNA.

Υπάρχουν πολλές παραλλαγές PCR όπως **RACE, qPCR, multiple PCR, hot start, ePAT, asymmetric, inverse** κ.α

Η PCR αποτελεί μια **θεμελιώδη** μεθοδολογία της Μοριακής Βιολογίας που βρίσκει εφαρμογές στην **βασική έρευνα**, την **βιοτεχνολογία**, την **ιατροδικαστική**, την **μοριακή παλαιοντολογία** κ.α



ΤΙ ΝΑ ΔΙΑΒΑΣΕΤΕ



Κείμενο από το αρχείο της διάλεξης

Κεφάλαιο 4 : Σελίδες 153-160

Κεφάλαιο 5 : Σελίδες 179-186

Κεφάλαιο 6 : Σελίδες 213-220, 231-241