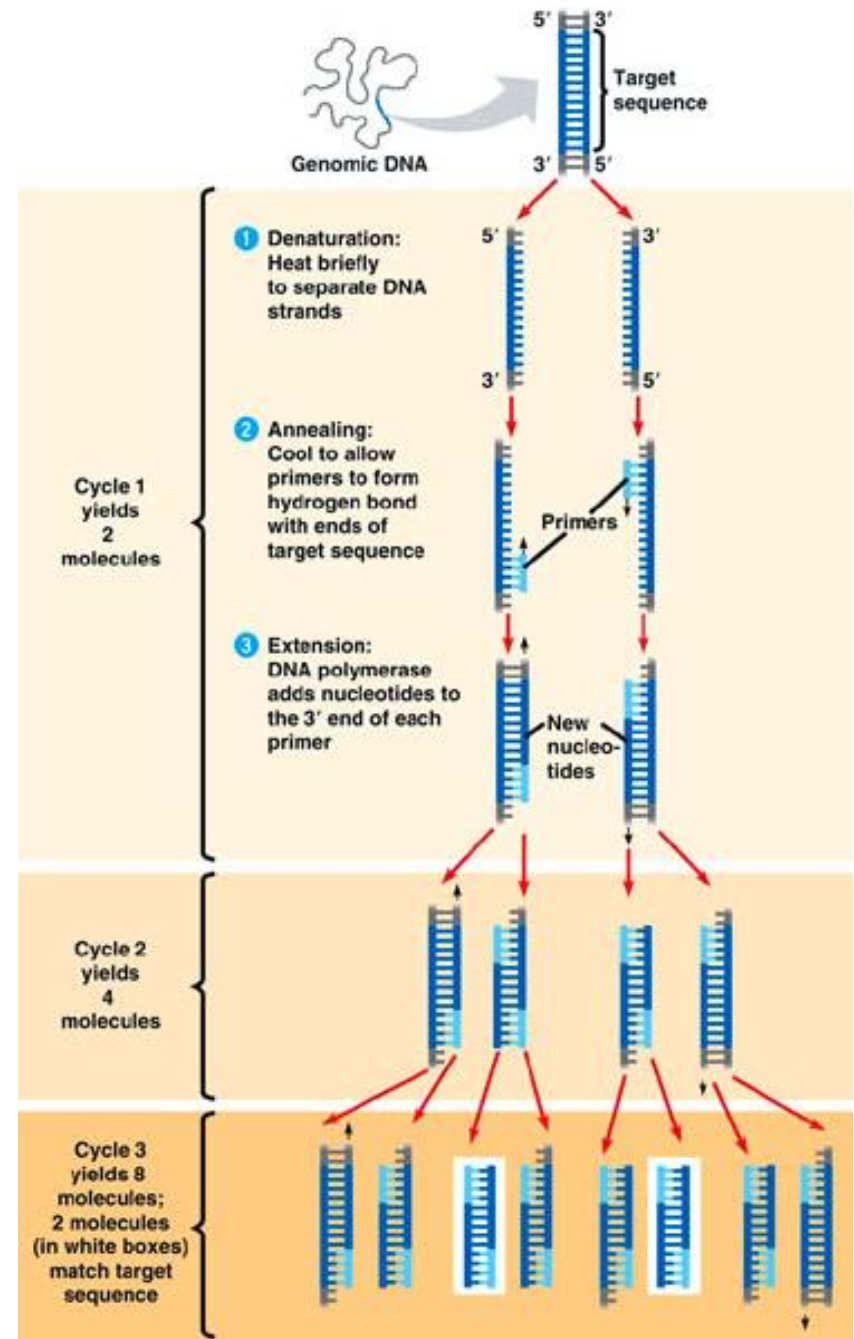


PCR Εφαρμογές-2

RACE

Site directed mutagenesis

Σκοπός της αντίδρασης PCR
(Polymerase Chain Reaction)
είναι το να φτιάξει ένα
μεγάλο αριθμό αντιγράφων.

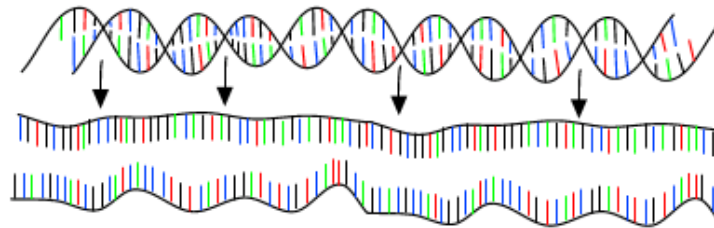


ΒΗΜΑΤΑ

1. ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ
2. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ
3. ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

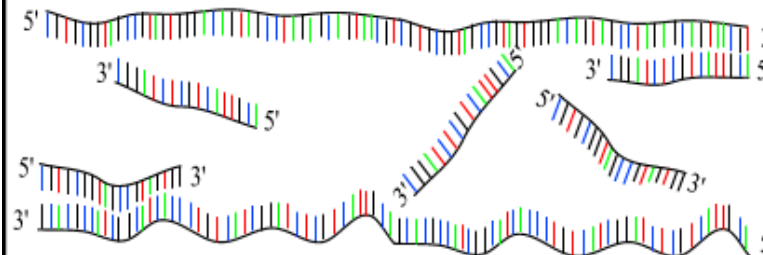
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

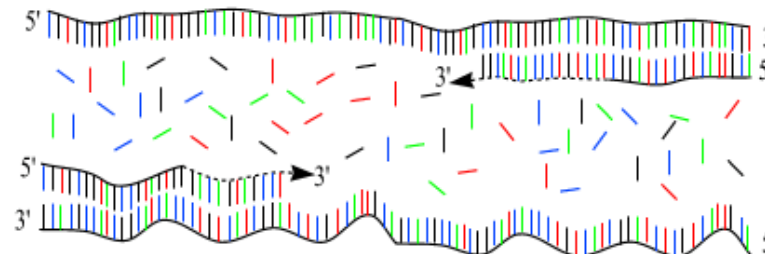
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

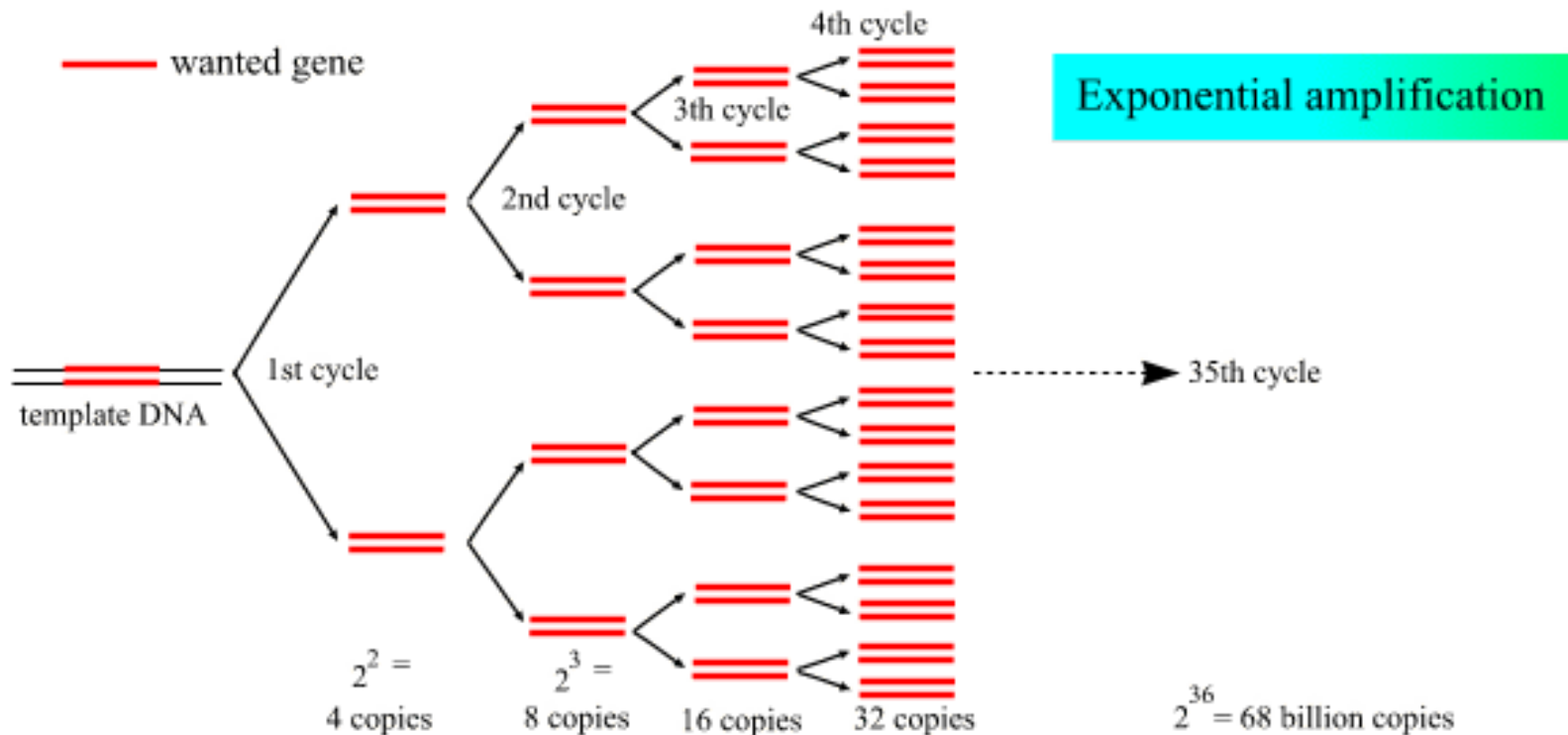
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's

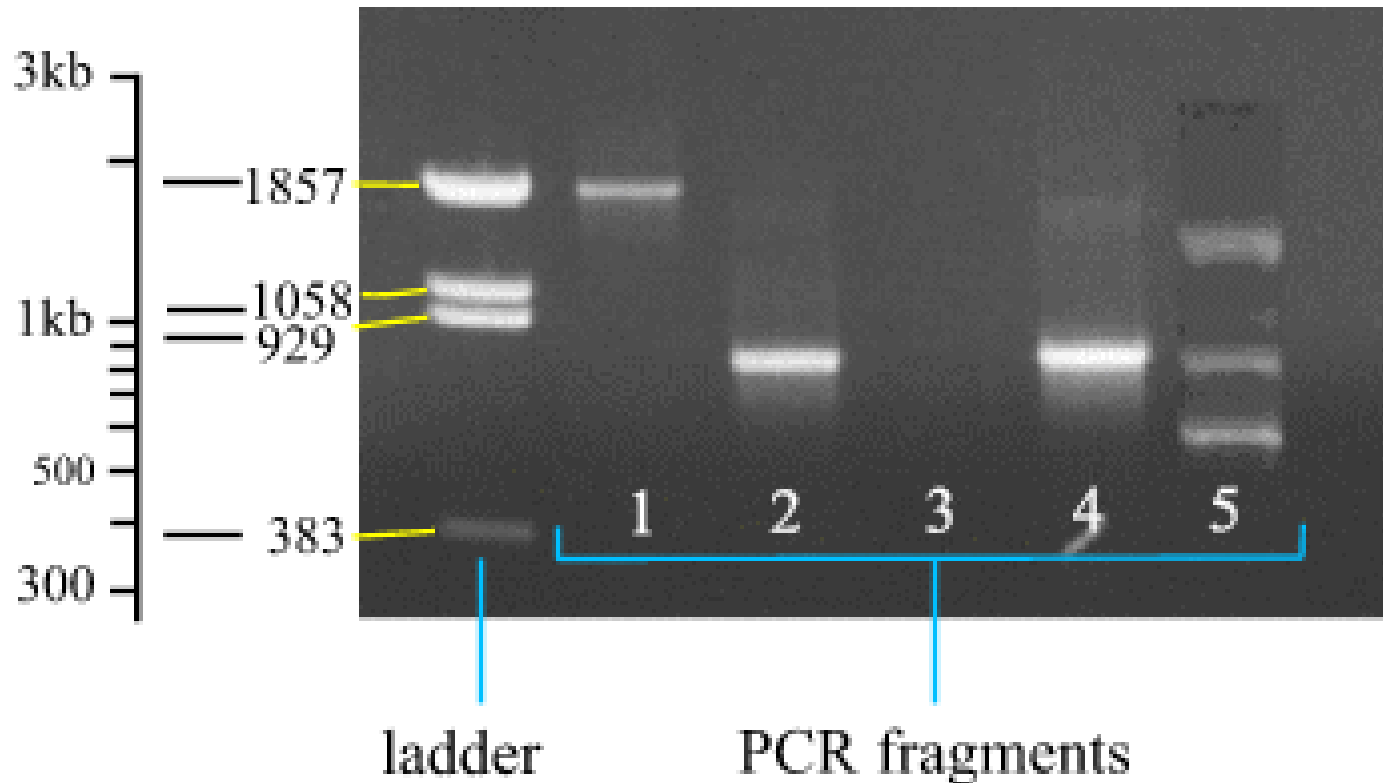
- Επειδή κατά την αντίδραση PCR αντιγράφονται και οι δύο αλυσίδες, υπάρχει μια εκθετική αύξηση στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου.



(Andy Vierstraete 1999)

Ενισχύθηκε κάποιο γονίδιο στην PCR και αν ναι, είναι στο σωστό μέγεθος?

Verification of PCR product on agarose or sepaside gel



Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

LON V. KENDALL, DVM AND LELA K. RILEY, PHD

Purpose: Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is similar to the PCR except its allows amplification of small amounts of ribonucleic acid (RNA). RT-PCR is used to detect viruses with an RNA genome and to detect RNA transcripts.

Method:



FIG. 1. RNA template. Prior to initiating reverse transcription the template RNA must be isolated from the sample to be tested. This figure shows a polyadenylated mRNA.



FIG. 2. Priming for reverse transcription. To generate cDNA using the enzyme reverse transcriptase (RT), a primer is annealed to the template RNA. The primer can be gene specific primers, random primers or oligo-dT primers for mRNA. In this example, oligo-dT primers are used to initiate cDNA synthesis from mRNA.

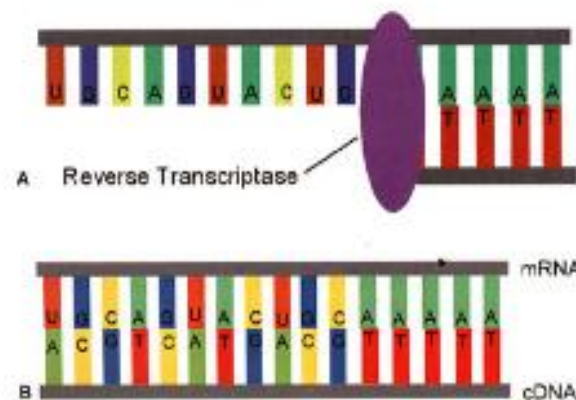


FIG. 4. Removal of RNA. The template strand of RNA is removed by treatment with RNase H. The cDNA can now be used for amplification by PCR.

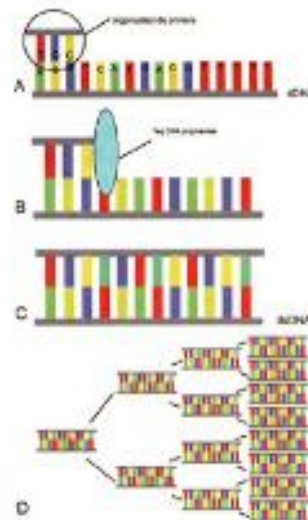


FIG. 5. The PCR reaction. The oligonucleotide primer is allowed to anneal to the template cDNA (A). Taq polymerase adds complementary nucleotides beginning at the primer annealing site (B). The result an product is a double stranded cDNA (C). The three step process of denaturation, primer annealing and extension are repeated to yield a detectable PCR product (D). The product can be visualized on an ethidium bromide stained agarose gel following electrophoresis.

Alternative Techniques: Northern blot analysis, RNase Protection Assay

Advantages: 1) RT-PCR has high sensitivity due to exponential amplification of the template RNA. 2) RT-PCR is very specific when using gene specific primers in the synthesis of cDNA. 3) The RT-PCR technique can be completed in one to two working days providing rapid results.

Disadvantages: 1) Similar to those seen with PCR. 2) RT-PCR detects transcripts, not functional protein.

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

(one-sided PCR or anchored PCR)

Η τεχνική αυτή:

- ✓ Χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της πλήρους μήκους αλληλουχίας ενός RNA μετάγραφου όταν δεν μας είναι γνωστή
- ✓ Μας παρέχει την πλήρους μήκους αλληλουχία ενός RNA μετάγραφου όταν γνωρίζουμε μια περιοχή μόνο της αλληλουχίας του στο εσωτερικό του.

Μπορεί να πραγματοποιηθεί ενίσχυση άγνωστης περιοχής που βρίσκεται

είτε στο 5' άκρο: **5'-RACE-PCR**

είτε στο 3' άκρο: **3'-RACE-PCR**

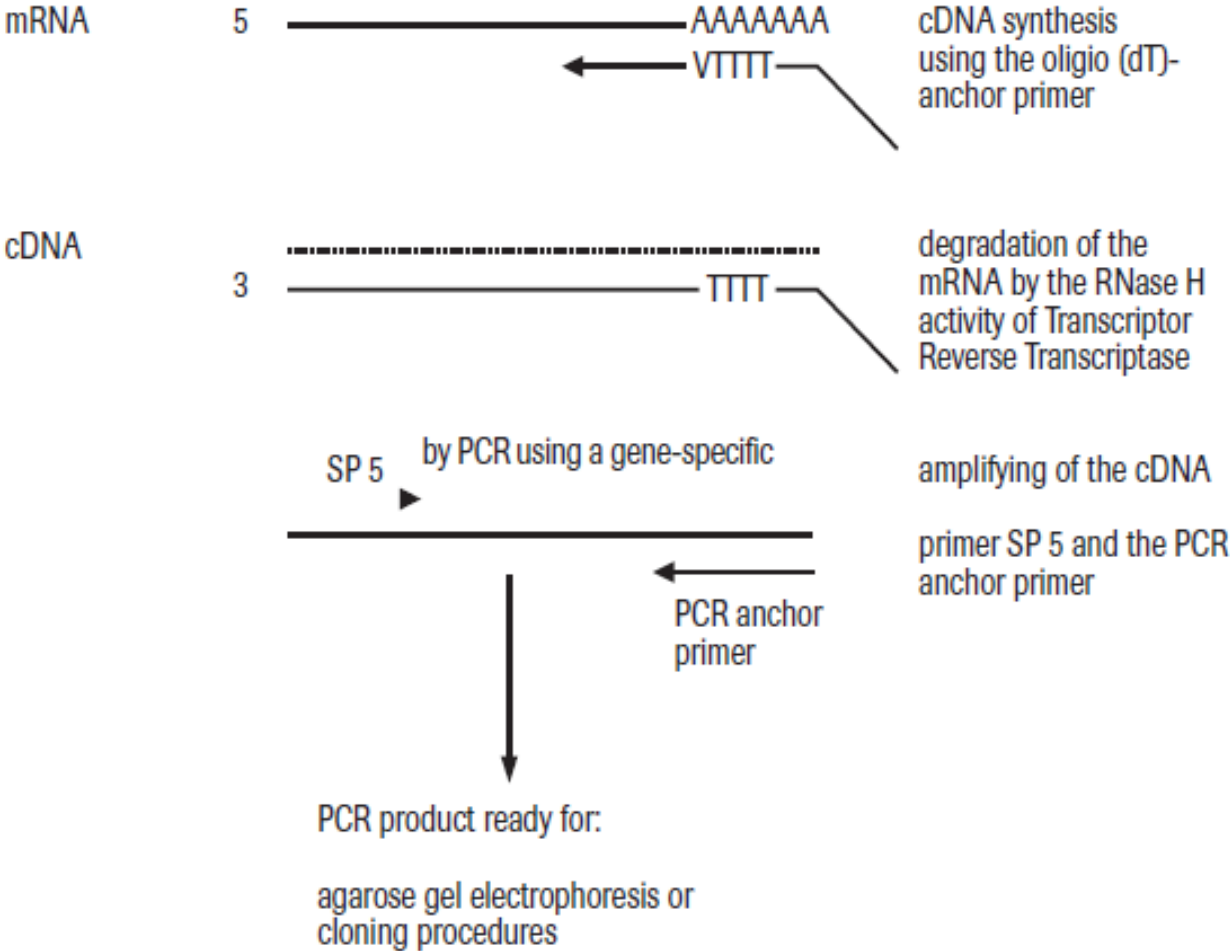
Ευθυγράμμιση δύο αλληλουχιών



3' RACE PCR

Το 3' RACE επιτρέπει την ενίσχυση άγνωστης περιοχής στο 3' άκρο ενός mRNA

Overview / 3 RACE



V = A, C or G

Overview / 3'-RACE

Σύνθεση cDNA

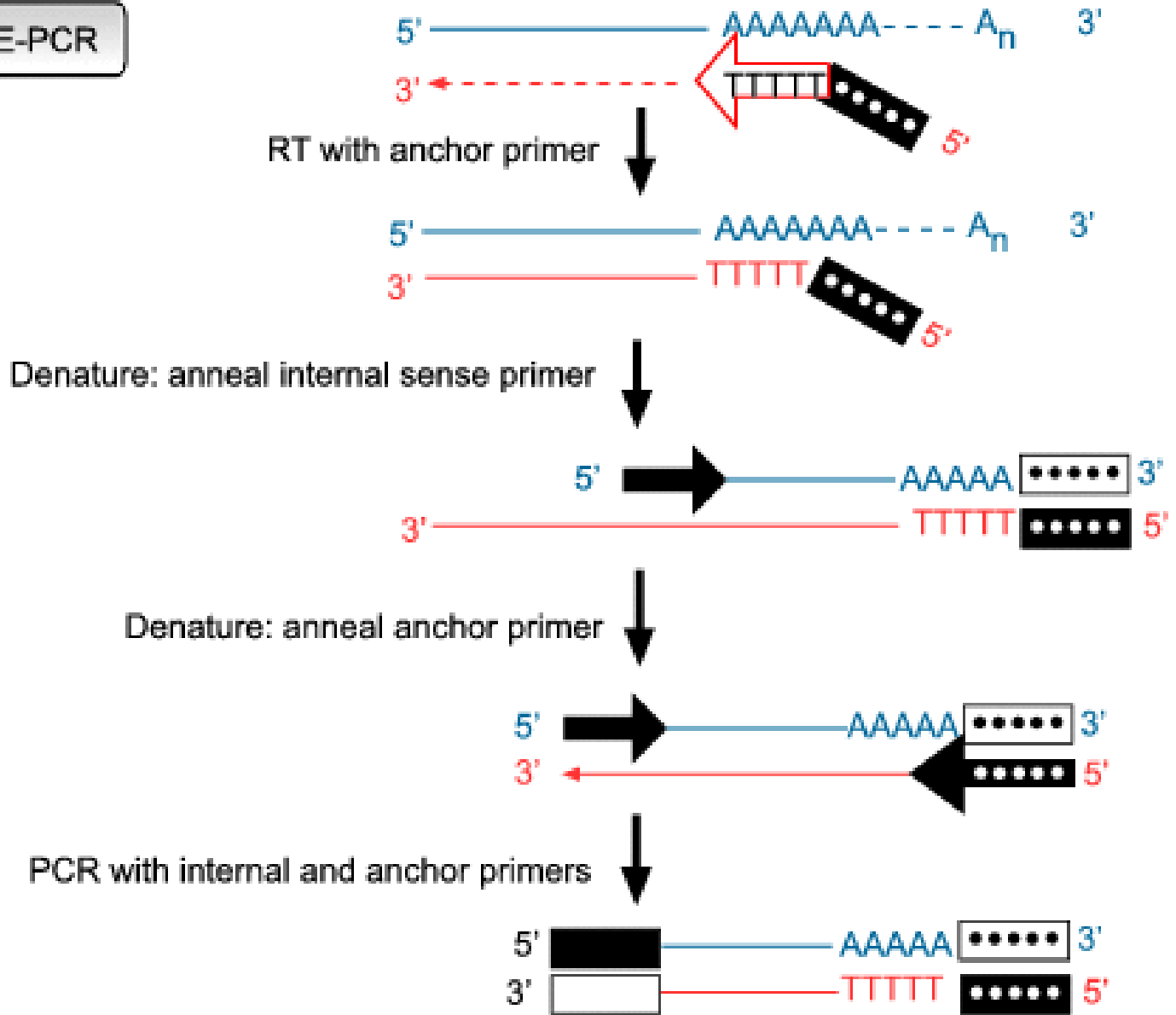
Χρησιμοποιώντας RNA και τον εκκλινητή
oligo-dT-anchor



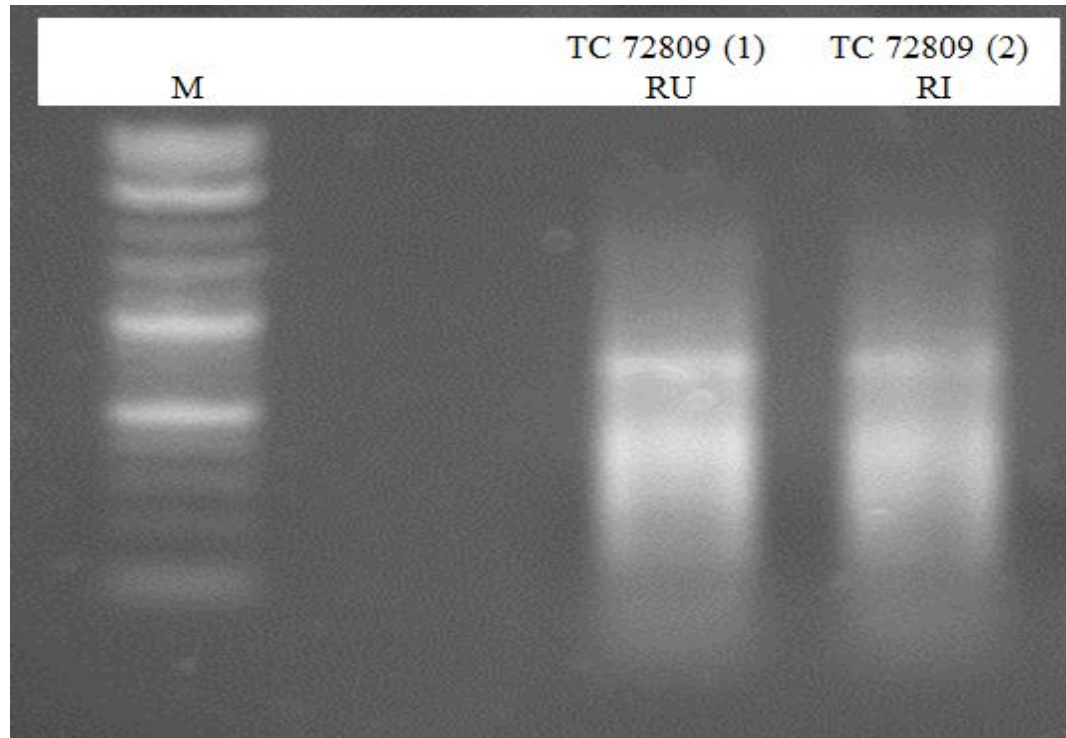
αντίδραση PCR

Χρησιμοποιώντας έναν ειδικό εκκλινητή (SP) και
τον εκκλινητή PCR-anchor

3' RACE-PCR



Παράδειγμα ανάλυσης των προϊόντων PCR μετά από 3'-RACE



Η εφαρμογή RACE-PCR είναι λιγότερο ειδική από άλλες εφαρμογές RT-PCR γιατί χρησιμοποιείται ένας μόνο εκκινητής ειδικός για το γονίδιο

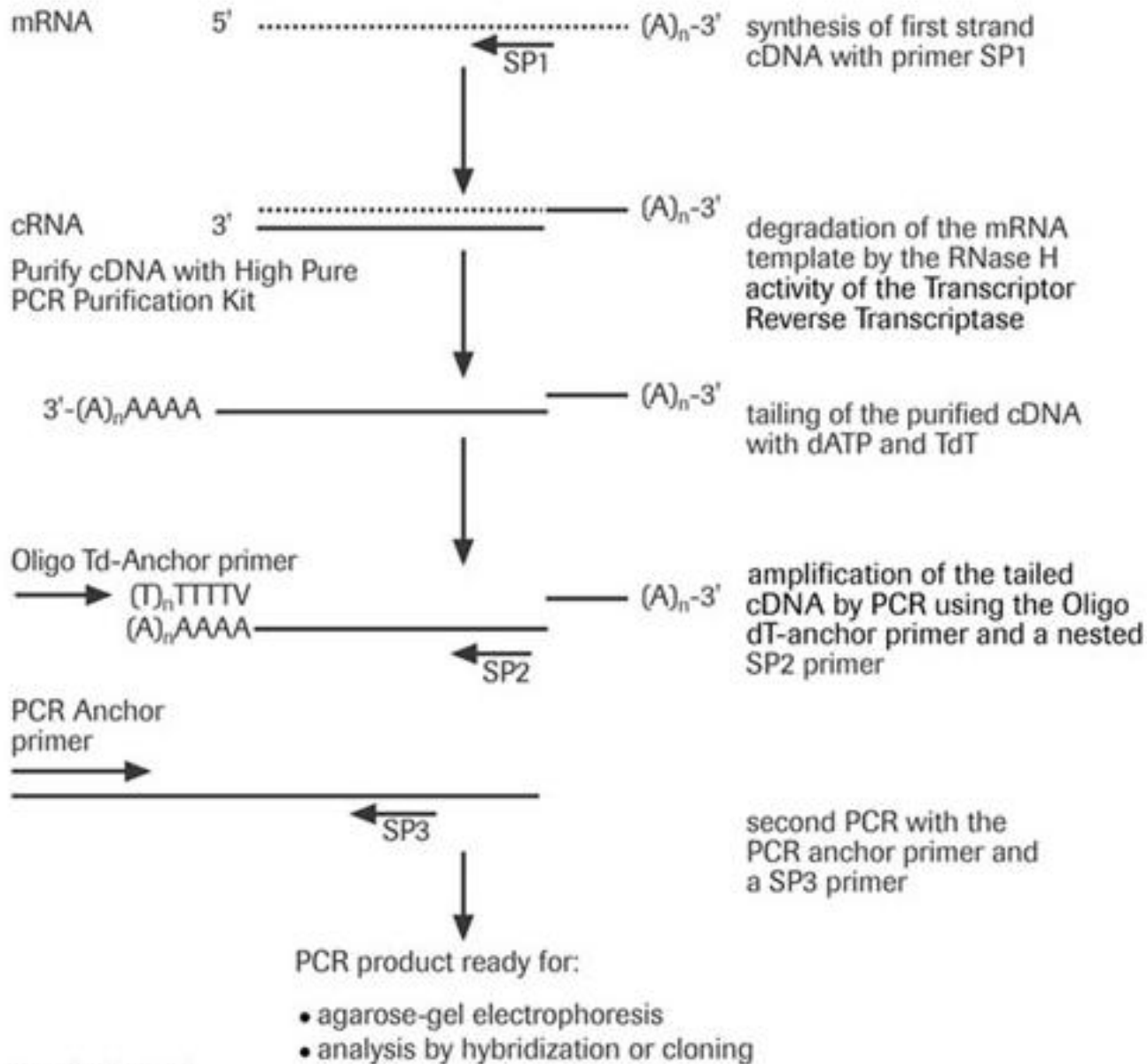
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τα προϊόντα του RACE-PCR μπορεί να είναι α) ένα μοναδικό προϊόν, β) πολλαπλά προϊόντα ή και γ) μια μουτζούρα όπου δεν διαχωρίζει κάποιο προϊόν

5' RACE PCR

Το 5' RACE επιτρέπει την ενίσχυση άγνωστης περιοχής στο 5' άκρο ενός mRNA

Overview / 5' RACE

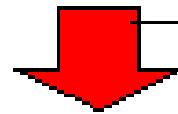


Terminal transferase

V = A, C, or G

Terminal transferase

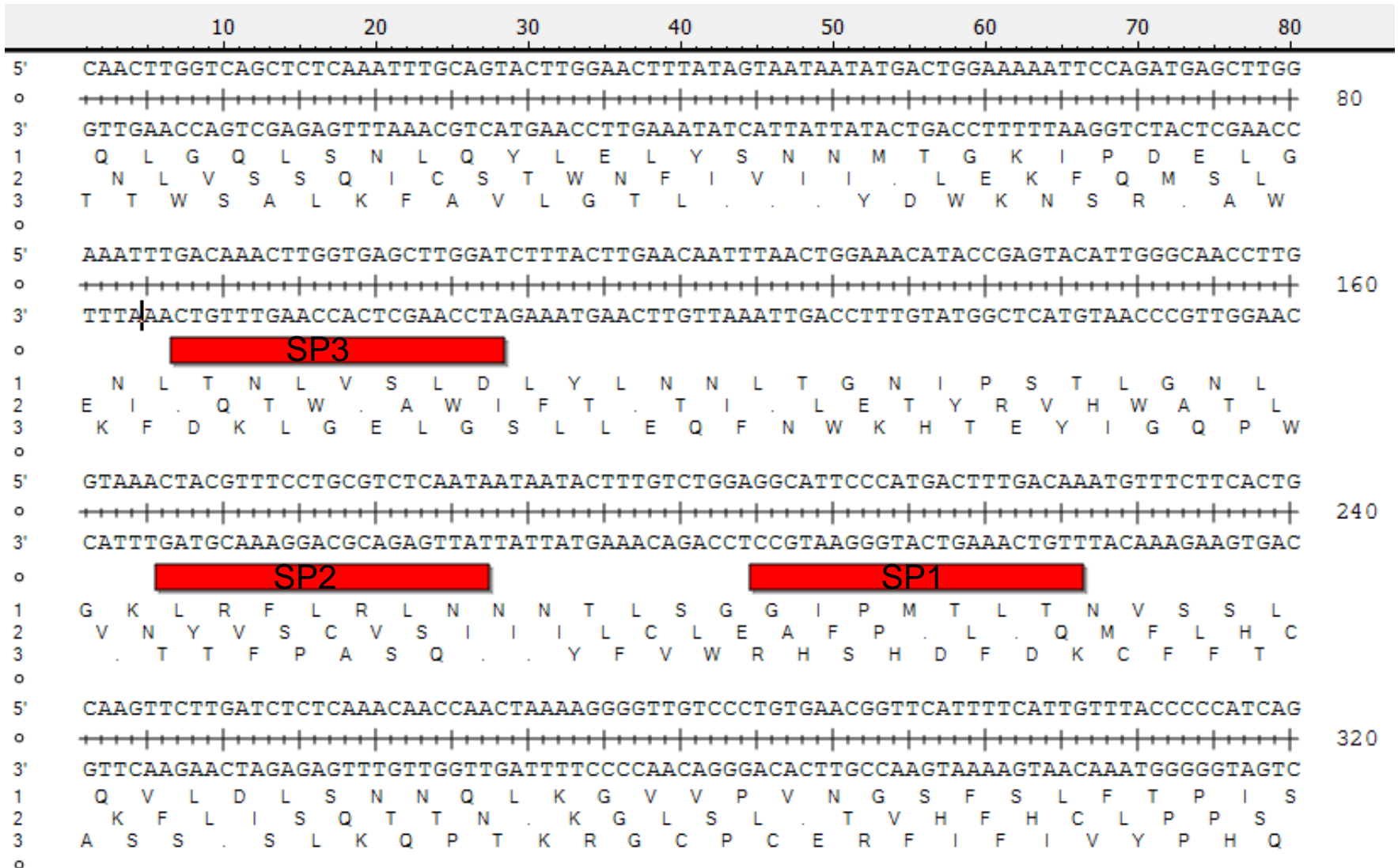
προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο μονόκλωνου DNA



Terminal transferase
+
dTTP

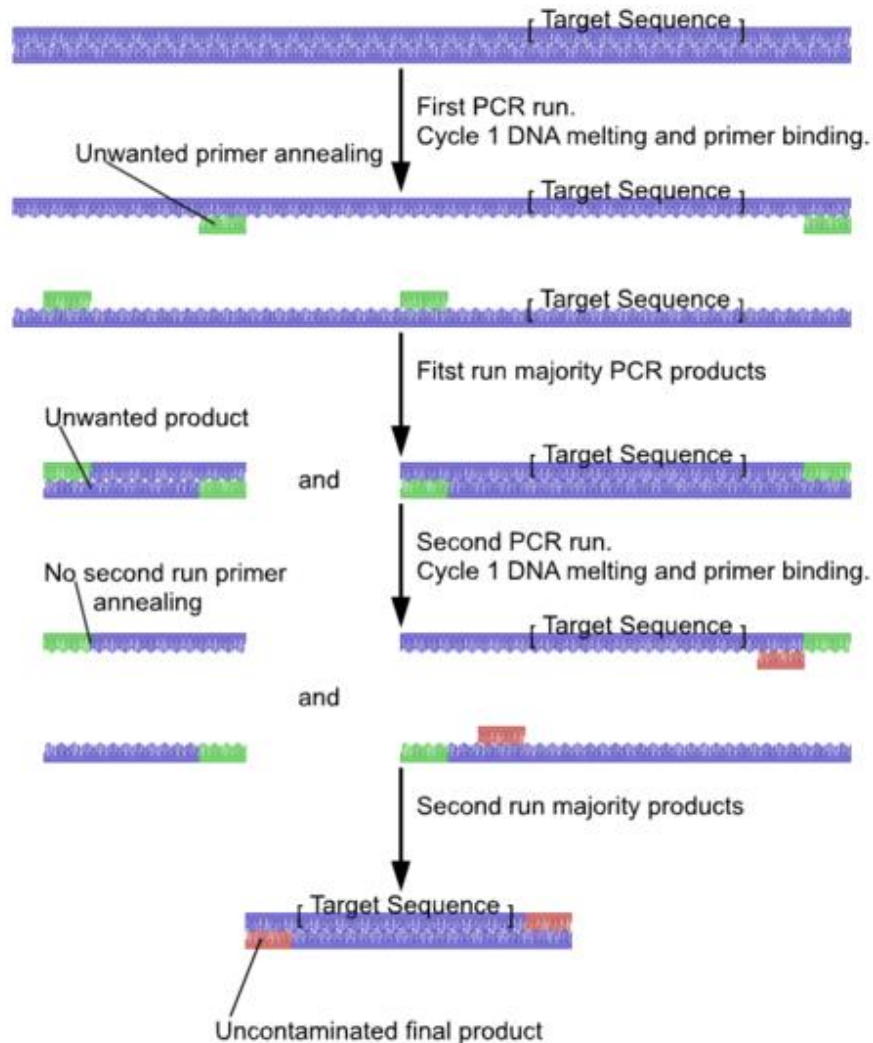


Στο 5'-RACE η διαδοχική ενίσχυση των προϊόντων με «nested» εκκινητές αυξάνει την εξειδίκευση



Nested-PCR

Μειώνει τον αριθμό των μη-ειδικών προϊόντων τα οποία προκύπτουν σε μια αντίδραση PCR εξαιτίας της μη-αναμενόμενης πρόσδεσης των εκκινητών σε θέσεις εκτός του γονιδίου-στόχου



Overview / 5'-RACE

Σύνθεση cDNA

Χρησιμοποιώντας RNA και τον πρώτο ειδικό εκκινητή (SP1)



Προσθήκη πολύ-A ουράς

Χρησιμοποιώντας dATP και τελική μεταφοράση



1^η αντίδραση PCR

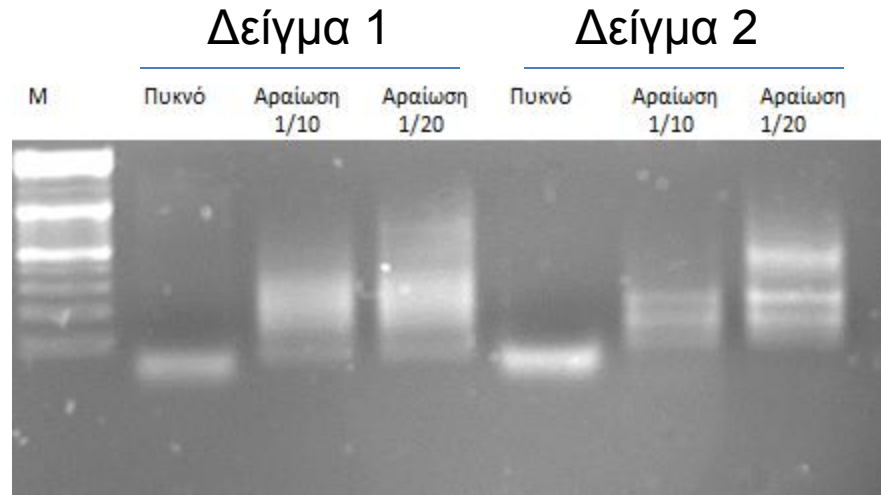
Χρησιμοποιώντας το δεύτερο ειδικό εκκινητή (SP2) και τον εκκινητή oligo-dT-anchor



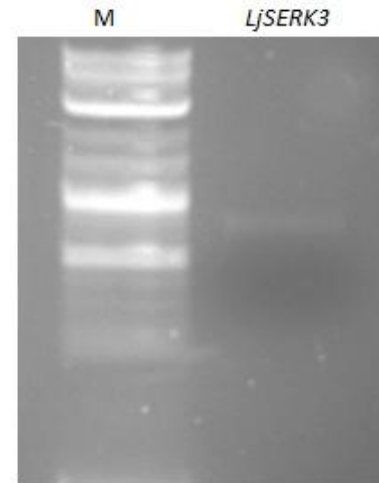
2^η αντίδραση (nested) PCR

Χρησιμοποιώντας τον τρίτο ειδικό εκκινητή (SP3) και τον εκκινητή PCR-anchor

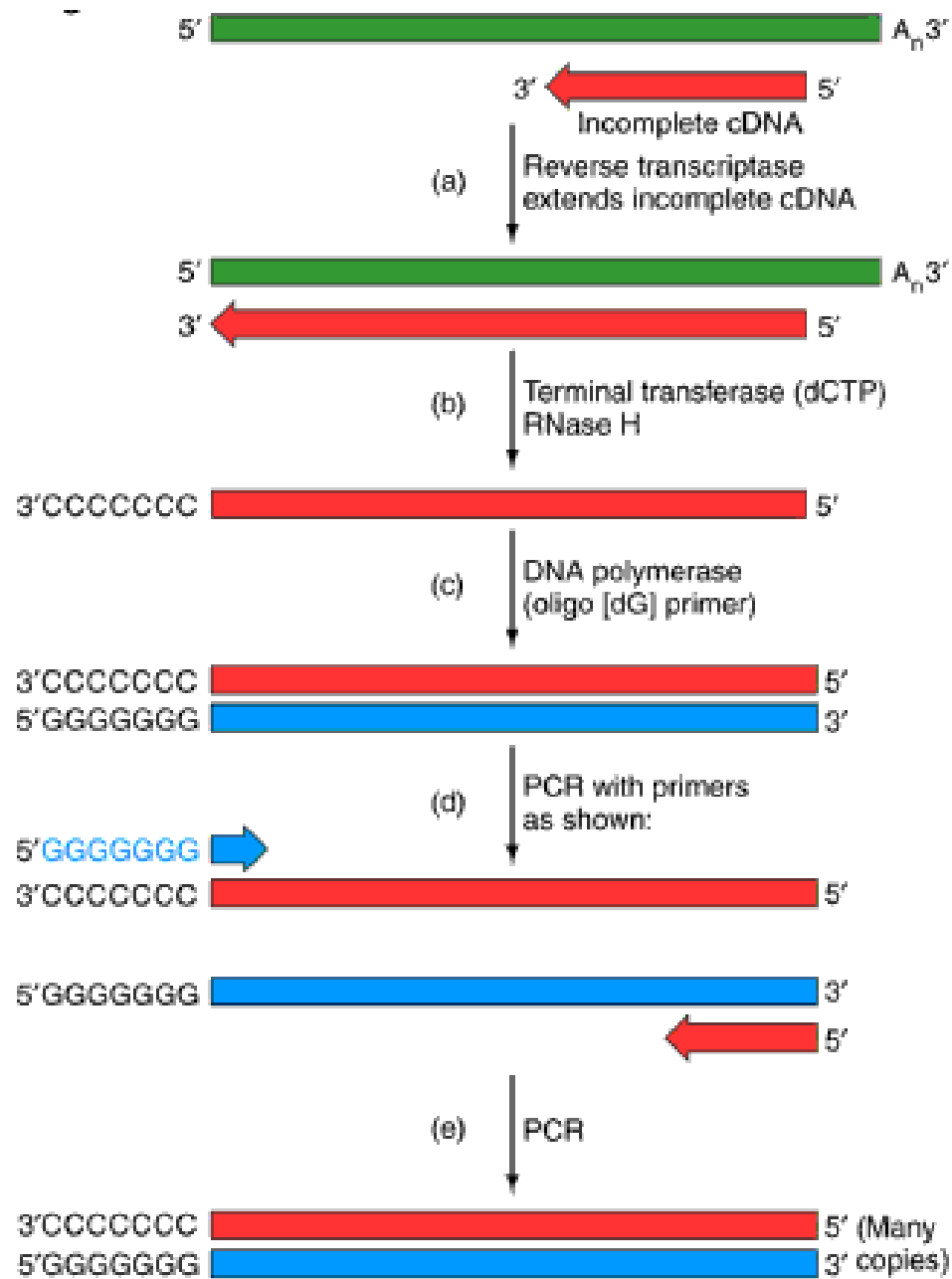
Παράδειγμα ανάλυσης των προϊόντων PCR μετά από 5'-RACE.
Παρουσιάζεται η τελευταία αντίδραση με τον εκκινητή SP3.



Μετά το στάδιο της PCR μπορεί να γίνει απομόνωση ζώνης του DNA από πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα. Το πλασμίδιο στέλνεται για αλληλούχιση



5'-RACE-PCR



Site-directed mutagenesis

site-specific mutagenesis or oligonucleotide-directed mutagenesis

Η τεχνική αυτή

✓ Χρησιμοποιείται για τη δημιουργία μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα σημεία των μορίων DNA

✓ Χρησιμοποιείται κυρίως στην πρωτεϊνική μηχανική, αλλά επίσης, στη μελέτη των στοιχείων των υποκινητών και στην τροποποίηση πλασμιδιακών φορέων

* Αυτός ο τρόπος μεταλλαξιγένεσης απαιτεί να γνωρίζουμε την αλληλουχία αγρίου τύπου

Σε μια αλληλουχία DNA μπορούμε να επιφέρουμε:

- Εισαγωγή νουκλεοτιδίων
- Έλλειψη (αφαίρεση) νουκλεοτιδίων
- Σημειακή μετάλλαξη

Αφαίρεση νουκλεοτιδίων

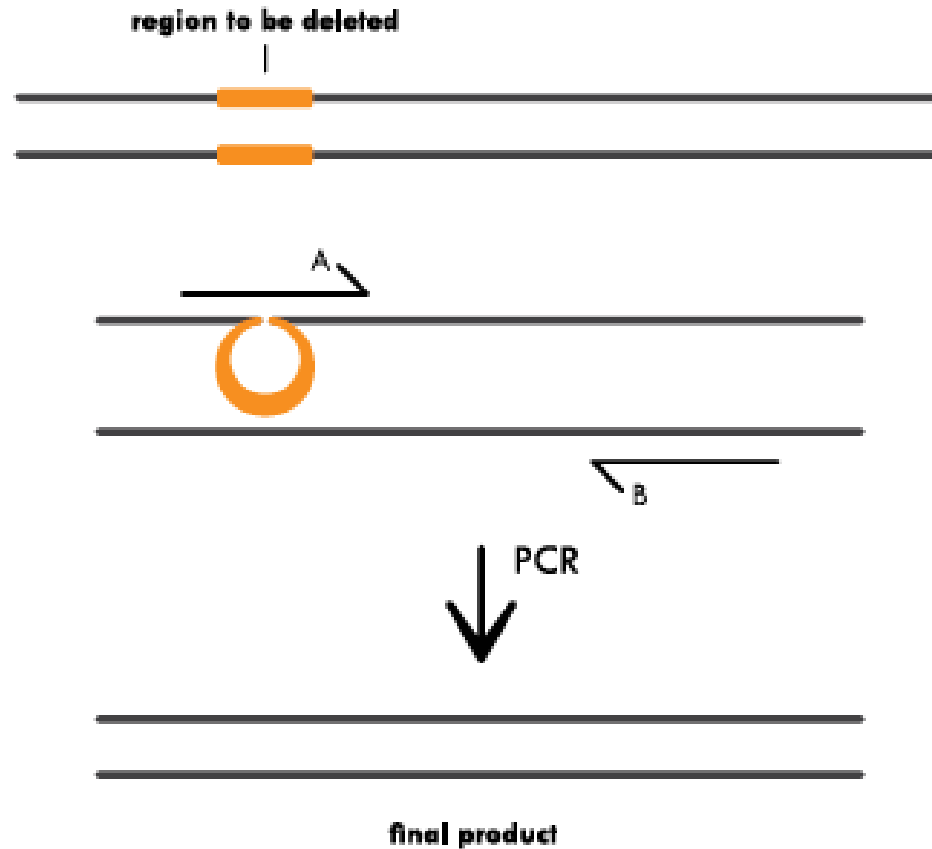


Figure 1B. PCR for Deletions. Primer A contains complementary sequence to the regions flanking the area to be deleted. During PCR, primer binding will cause a region of the template to loop out, and amplify only the complementary region. The final product is shorter because it is missing the deleted sequence.

Προσθήκη νουκλεοτιδίων στα άκρα

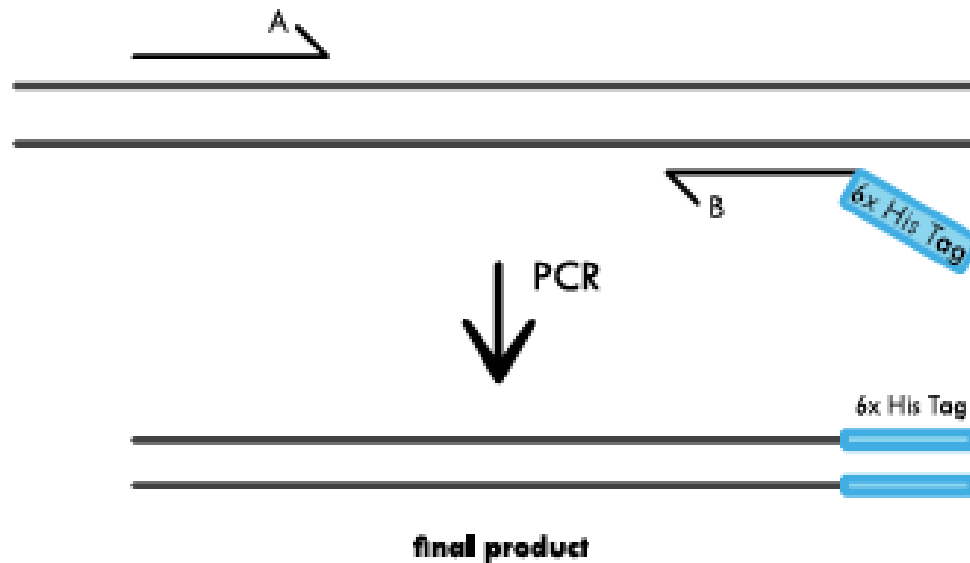
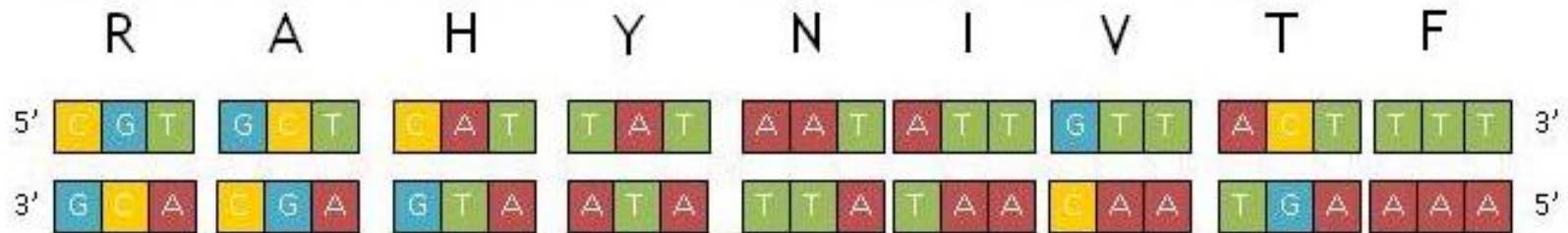
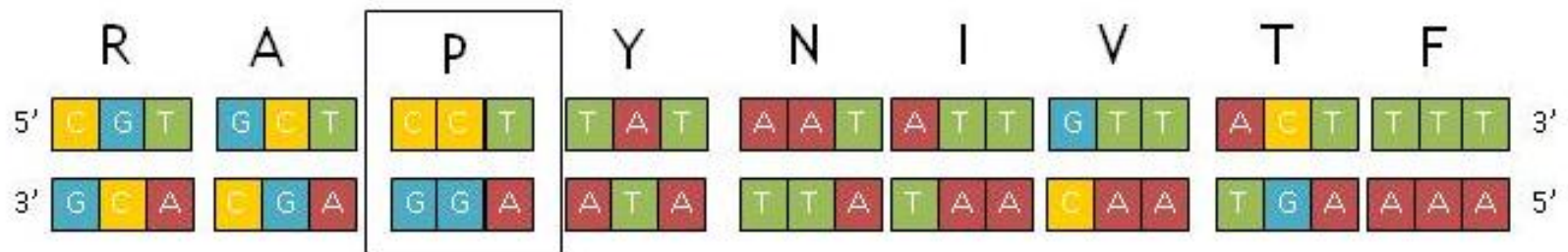


Figure 1C. PCR for Terminal Additions. An Ultramer™ primer containing an addition to the sequence on the 5' end (the 6X His tag, primer B) is used along with the complementary primer A to amplify a new product containing the terminal addition.

Εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης

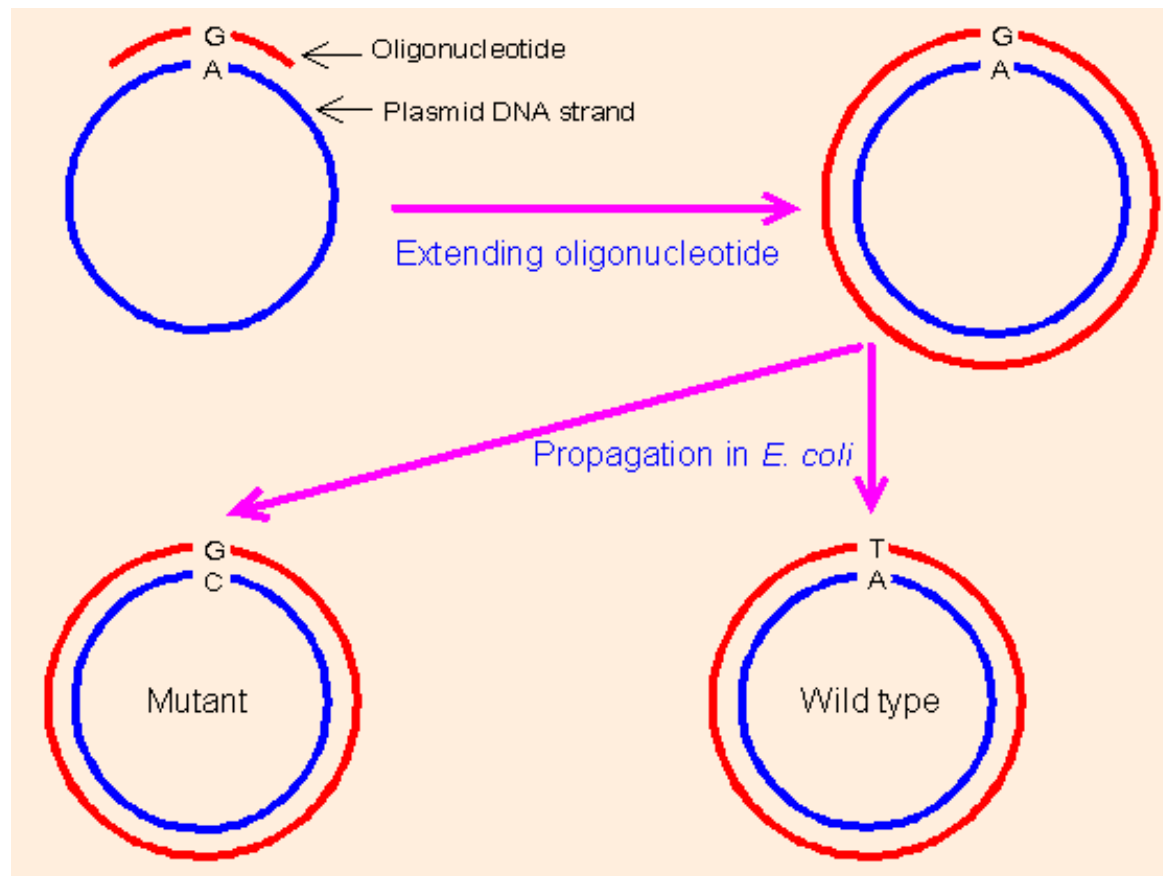


eg. substituting the Histidine at position 3 (CAT) for a Proline (CCT)

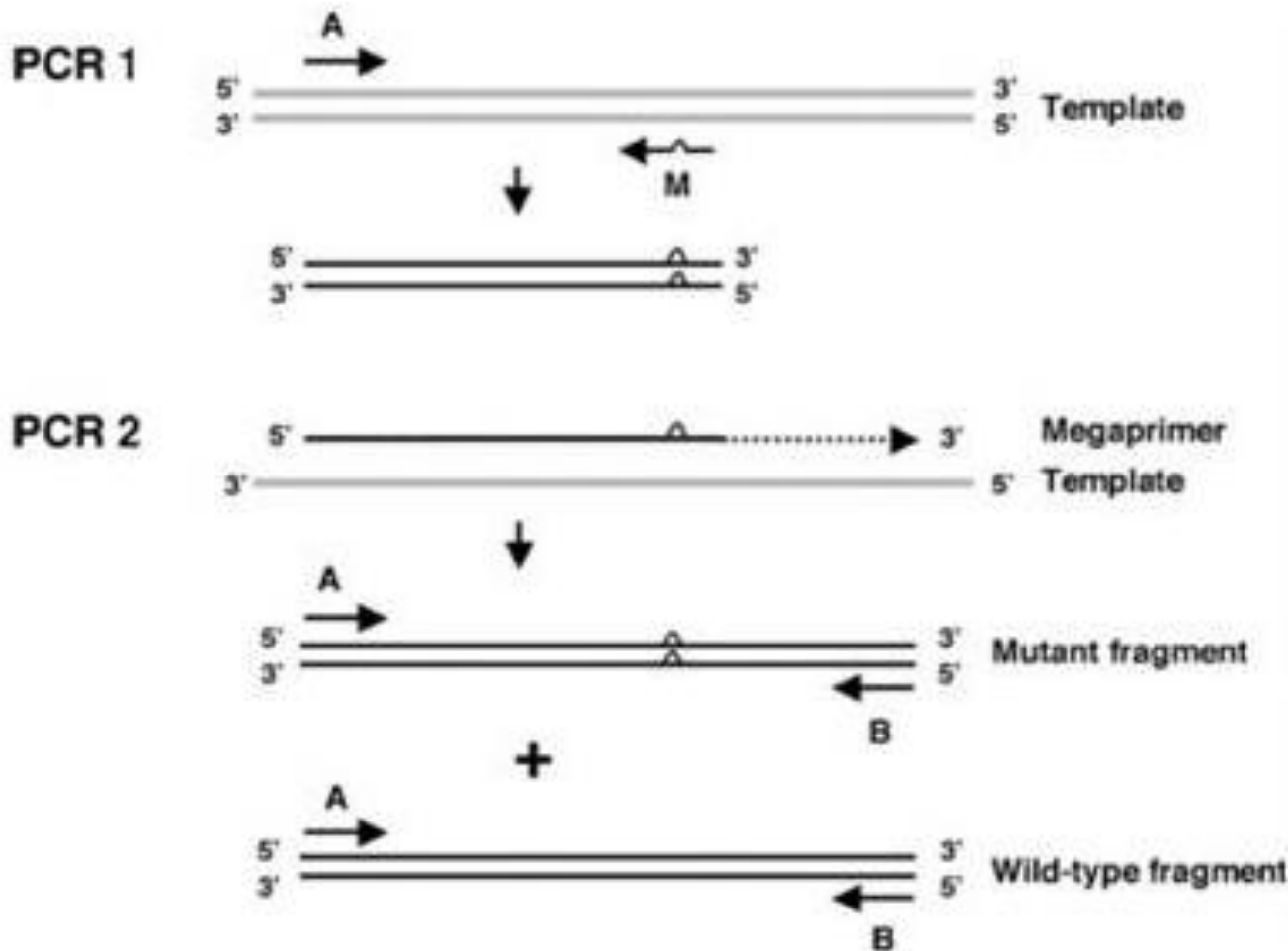


Εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης

- ✓ Συνθέτουμε έναν εκκινητή με αλλαγμένη αλληλουχία
- ✓ Κάνουμε αντίδρασης PCR χρησιμοποιώντας πολυμεράση που δεν κάνει λάθη (proofreading polymerase)

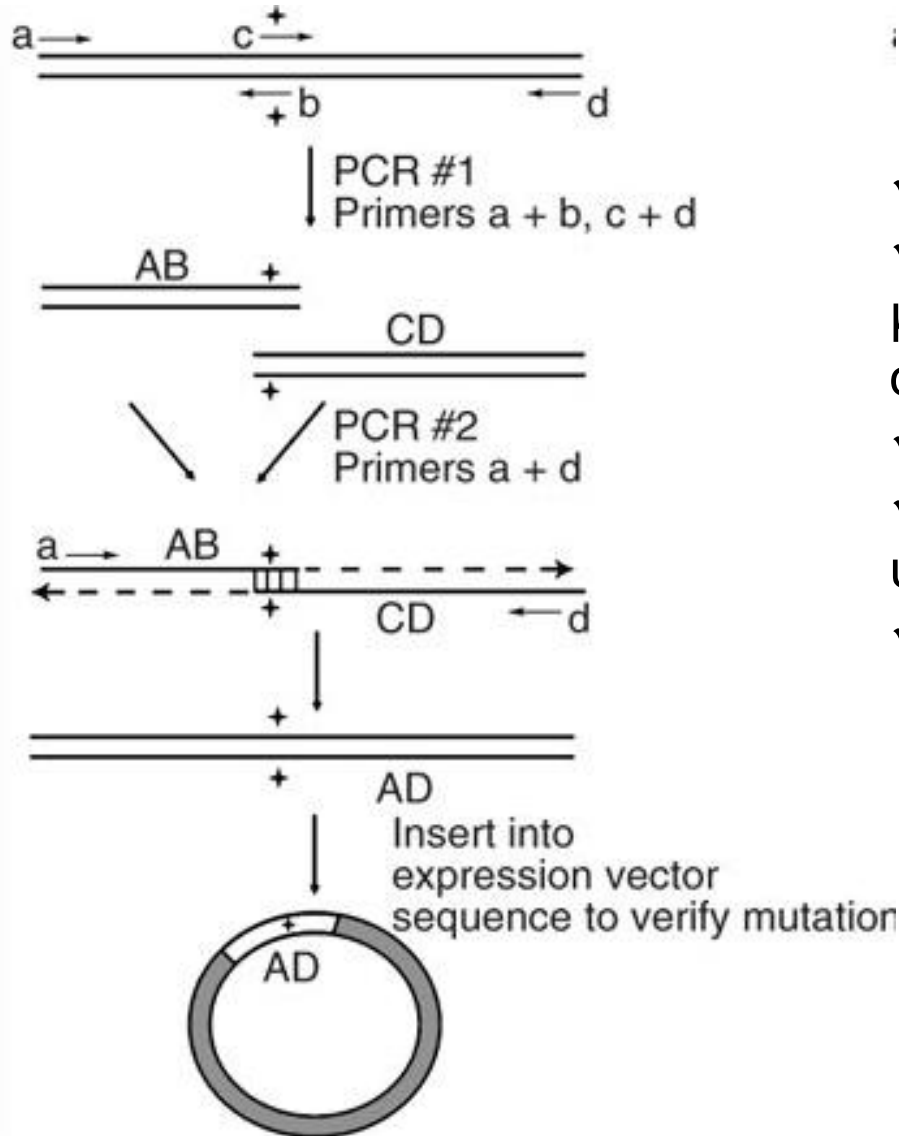


Εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης με δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR και 3 εκκινητές



- ✓ Σχεδιάζονται 3 εκκινητές
- ✓ Ο εσωτερικός (M) φέρει τη μετάλλαξη
- ✓ 1^η αντίδραση PCR (A,M)
- ✓ Το προϊόν της 1^{ης} αντίδρασης αποτελεί «μεγα-εκκινητή» μιας 2^{ης}
- ✓ 2^η αντίδραση PCR με εξωτερικούς εκκινητές (A, B)
- ✓ Ευνοείται ο πολ/σμός του μεταλλαγμένου προϊόντος παρά του αγρίου-τύπου

Εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης με δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR και 4 εκκινητές

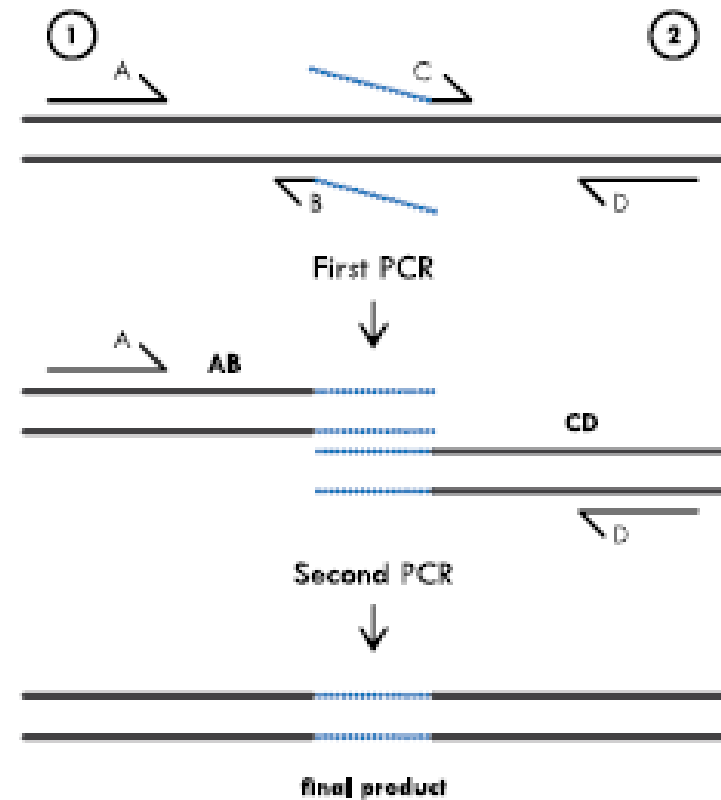


- ✓ Σχεδιάζονται 2 ζεύγη εκκινητών
- ✓ Οι ενδιάμεσοι (c, d) φέρουν τη μετάλλαξη και είναι σχεδιασμένοι στην ίδια περιοχή
- ✓ 1^η αντίδραση PCR (ab, cd)
- ✓ Τα προϊόντα αποδιατάσσονται και υβριδίζουν στην κοινή περιοχή
- ✓ 2^η αντίδραση PCR (ad)

Εισαγωγή ένθεσης

με δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR και 4 εκκλινητές

Figure 2A. *Primer Extension for an Insertion.* Primers B and C contain the complementary sequence that will be inserted (indicated by the blue line). The first round of PCR uses two reactions with primer pairs A/B (1) and C/D (2). The two resulting PCR products are mixed together with primer pair A/D for a second round of PCR. The overlapping regions of the two, first-round PCR products allow the strands to hybridize and the second round of PCR creates the final, full-length product with the desired insertion.



Αφαίρεση νουκλεοτιδίων με δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR και 4 εκκινητές

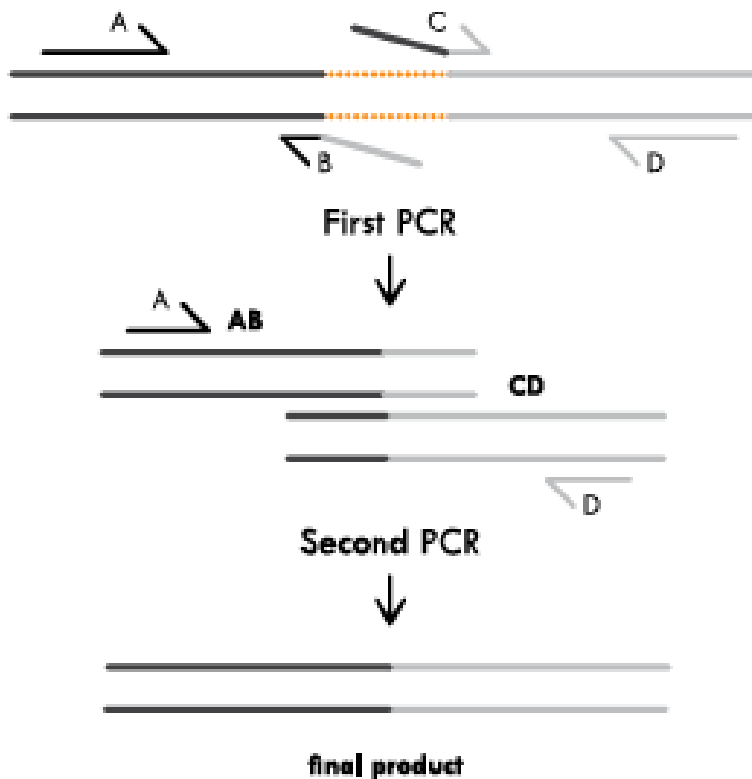
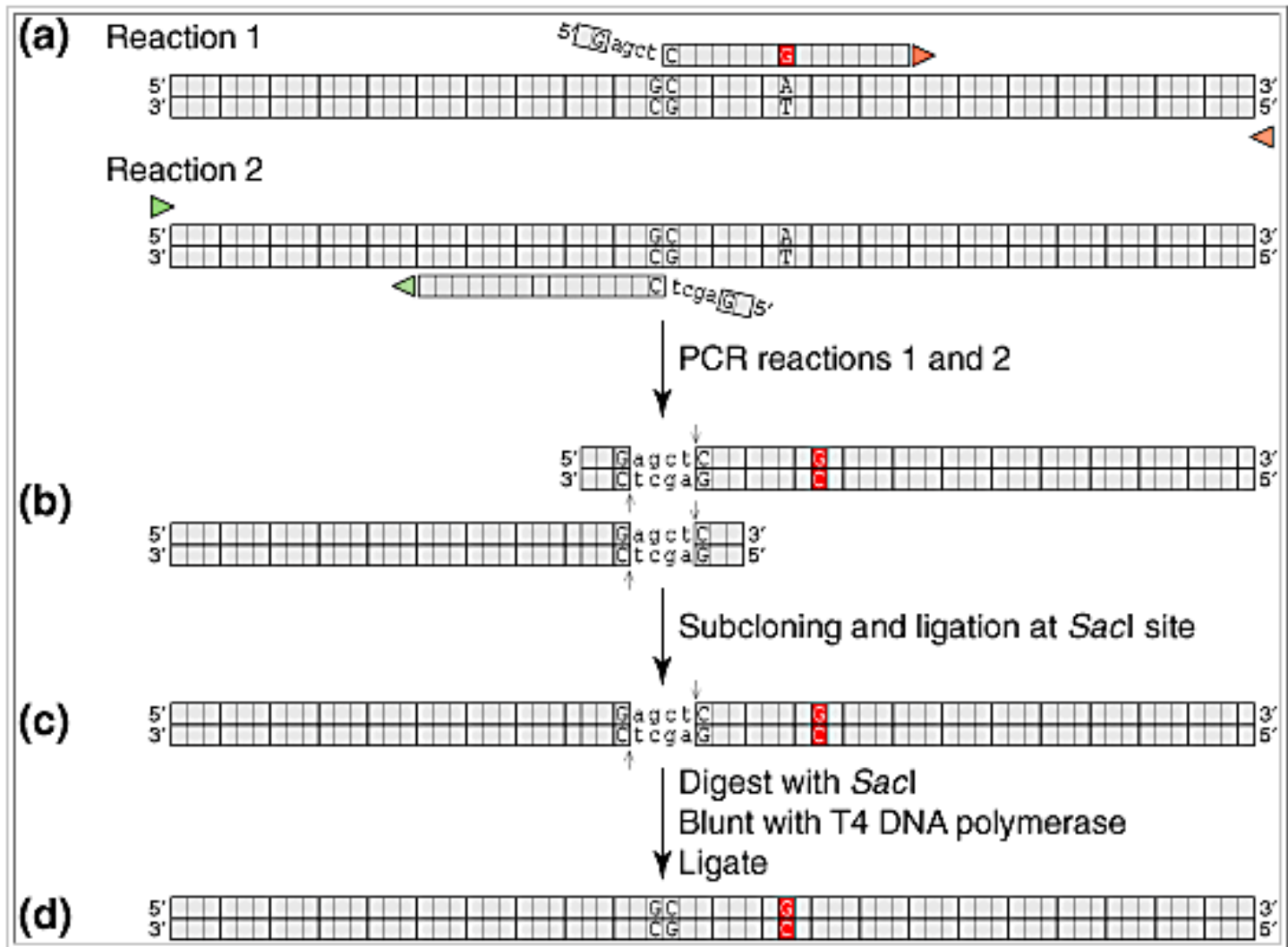


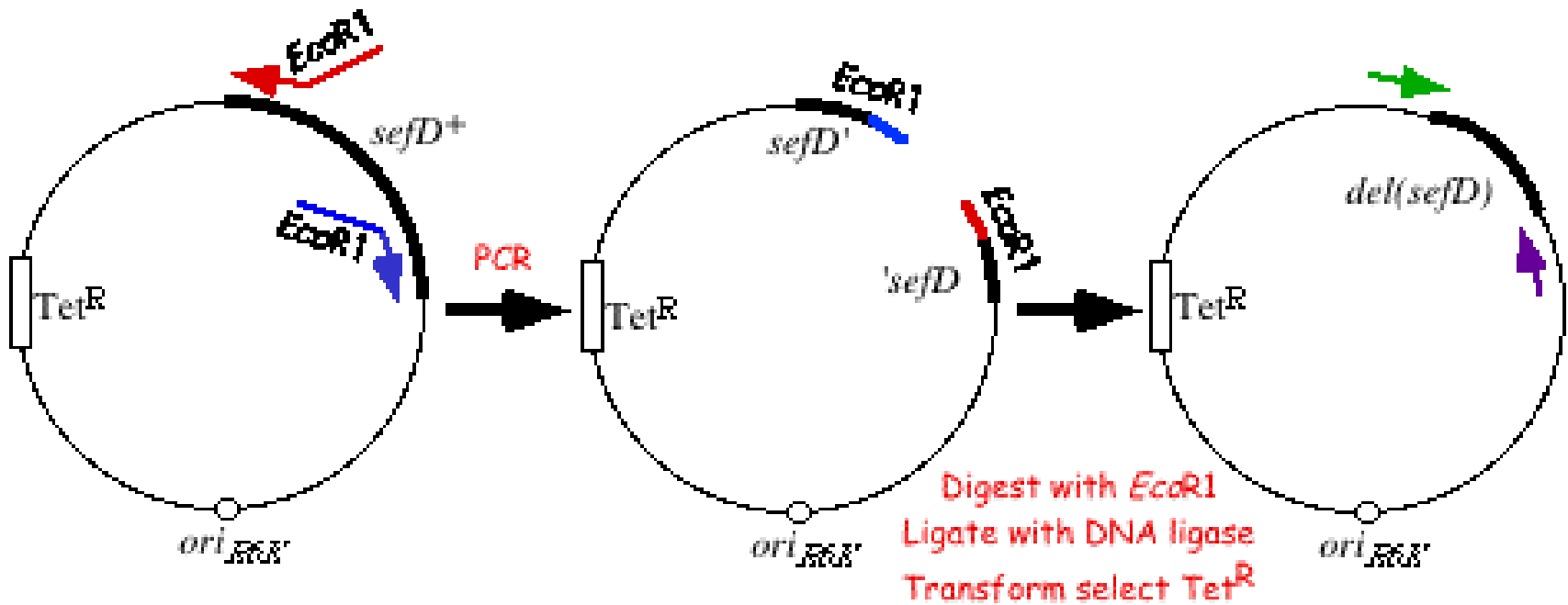
Figure 2B. *Primer Extension for Deletions.* Primers B and C are located on either side of the sequence to be deleted and contain sequence from both sides of the deletion (indicated by black or gray additions that match the black or gray original sequence). This sequence will allow them to overlap with the other fragment after the first round of PCR. The first round of PCR uses primer pairs A/B and C/D. The two resulting PCR products are mixed together with the primer pair A/D for a second round of PCR. The overlapping regions of these two, first-round PCR products allow the strands to hybridize and the second round of PCR creates the final, full-length product with the desired area deleted.

Εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης με τη χρήση μιας «προσωρινής» θέσης αναγνώρισης από ένζυμο περιορισμού



Αφαίρεση μιας περιοχής DNA από πλασμίδιο

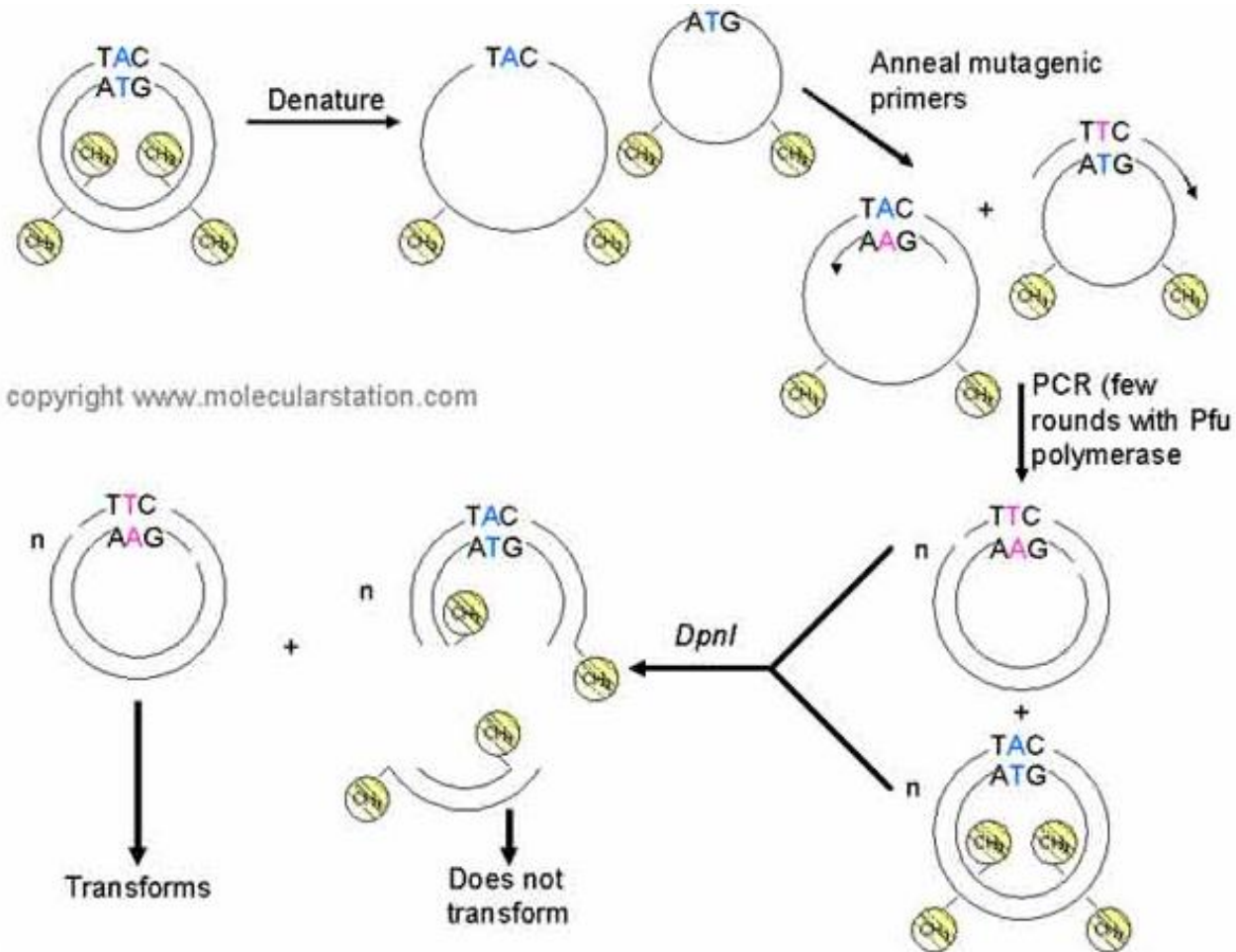
Inverse PCR



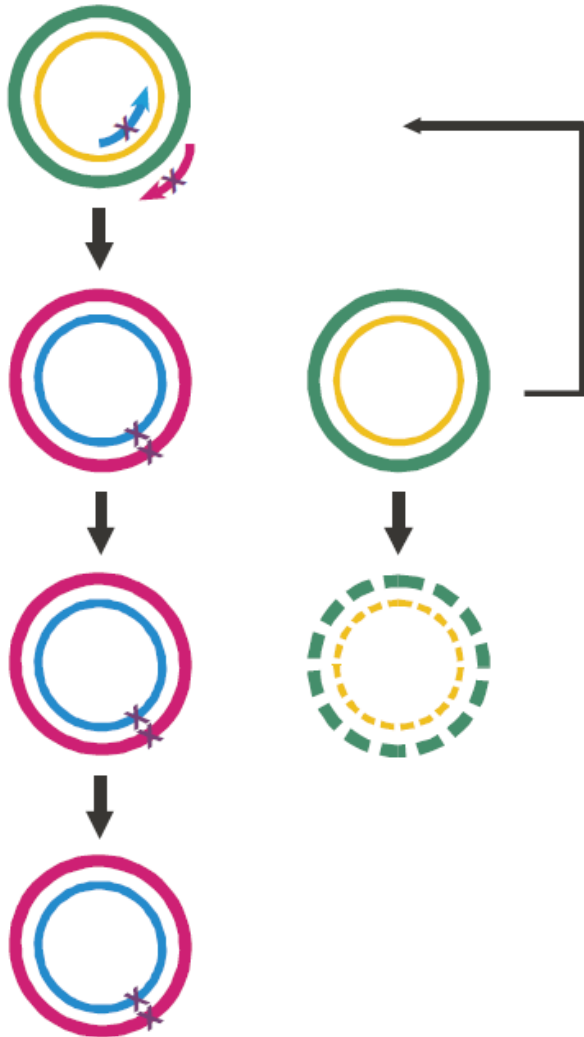
Επιλογή μόνο της μεταλλαγμένης αλληλουχίας

✓ Επεξεργαστήστε το DNA μετά την PCR με ένα περιοριστικό ένζυμο (DpnI) για να κόψουμε το μεθυλωμένο DNA αγρίου τύπου (το προϊόν PCR που φτιάξαμε *in vitro*, δεν είναι μεθυλωμένο και δεν κόβεται)

✓ Μετασχηματίζουμε κύτταρα *E. coli* και επιβιώνουν μόνο αυτά που φέρουν το μεταλλαγμένο DNA.



Εισαγωγή σημειακής μετάλλαξη σε πλασμίδιο *inverse PCR*



Mutant Strand Synthesis

Perform thermal cycling to:

- 1) Denature DNA template
- 2) Anneal mutagenic primers containing desired mutation
- 3) Extend primers with *PfuUltra* DNA polymerase

***Dpn* I Digestion of Template**

Digest parental methylated and hemimethylated DNA with *Dpn* I

Transformation

Transform mutated molecule into competent cells for nick repair