



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας
Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών
«Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

“Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων/πολυμορφισμών με τη χρήση της εργαλειοθήκης της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)”

Άννα Ζεμπέκη

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: κ. Αικατερίνη Κωνσταντίνου

Πάτρα, Φεβρουάριος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της Άννας Ζεμπέκη («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης η συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσης στους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας της συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση της συγγραφέα/δημιουργού. Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

“Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων/πολυμορφισμών με τη
χρήση της εργαλειοθήκης της Αλυσιδωτής Αντίδρασης
Πολυμεράσης (PCR)”

Άννα Ζεμπέκη

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: κ. Κωνσταντίνου Αικατερίνη

Συνεπιβλέπουσα Καθηγήτρια: κ. Μαρκοπούλου Σουλτάνα

Πάτρα, Φεβρουάριος 2024

Στη Σοφία, στο Σταύρο και στη Δέσποινα.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Αικατερίνη Κωνσταντίνου για την επιλογή του θέματος της διπλωματικής εργασίας, και τις πολύτιμες συμβουλές της κατά την διάρκεια της συγγραφής της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τα παιδιά μου και το σύζυγό μου για την στήριξη, την υπομονή τους και το χρόνο που τους στερήσα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανακάλυψη όλο και περισσότερων γνωστών/αγνώστων μεταλλάξεων/πολυμορφισμών, παθογόνων μικροοργανισμών (ηπατίτιδας Β και C, HIV-1, κ.α.), η ανάγκη για διάγνωση γενετικών ασθενειών (θαλασσαιμίες, κυστική ίνωση, μυϊκή δυστροφία κ.α), η σωστή και έγκαιρη κλινική διάγνωση ασθενειών, η κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή, η ασφάλεια ποιότητας τροφίμων, ο κίνδυνος αλλοιωμένων, νοθευμένων, αλλεργιογόνων τροφίμων στον πληθυσμό απαιτούν τεχνικές ανάλυσης γρήγορες και με ευαισθησία. Αντίστοιχα, η ανίχνευση δακτυλικών αποτυπωμάτων DNA, η ανάλυση σύνθετου μείγματος σωματικών υγρών, οι βιασμοί, οι δολοφονίες, η διαλεύκανση υποθέσεων στην ιατροδικαστική και στη εγκληματολογία απαιτούν κατάλληλες τεχνικές. Ο κατάλληλος μοριακός προσδιορισμός για πρόγνωση, προσαρμογή-παρακολούθηση μιας θεραπείας και αξιολόγηση για πιθανή ύφεση/υποτροπή μιας ασθένειας, επιλογή καταλληλότερου φαρμάκου, είναι απαραίτητος για τον σύγχρονο άνθρωπο

Στο κεφάλαιο ένα γίνεται αναφορά στην PCR. Μια in vitro τεχνική πολ/σμού (έως και 109 φορές) αλληλουχίας DNA, μια διαδικασία τριών βημάτων (35-40 κύκλοι). Αναπτύχθηκε από τον βιοχημικό Kary Mullis (1983-1985), εξελίχθηκε, διαφοροποιήθηκε ανάλογα με τις ανάγκες από πολλούς επιστήμονες έως και σήμερα. Στο κεφάλαιο αναφέρονται οι μεταλλάξεις /πολυμορφισμοί, δίνονται ορισμοί, προέλευση, η δομή του DNA κ.α. Το κεφάλαιο τρία ορίζει προδιαγραφές (ευαισθησία, καταλληλότητα μεθόδου, κόστος, προδιαγραφές ανάλυσης) και σημεία ελέγχου για την εφαρμογή μοριακών μεθόδων ανίχνευσης τους. Αναλύονται οι μέθοδοι, η βασική αρχή λειτουργίας τους, αξιολόγηση παραμέτρων, πλεονεκτήματα, μειονεκτήματα και μέθοδοι εντοπισμού μιας μετάλλαξης. Το κεφάλαιο τέσσερα επισημαίνει τα σημεία επιλογής της καταλληλότερης μεθόδου PCR αναφορικά με το ποσοστό εκλεκτικότητας, εμπλουτισμού γνωστών μεταλλάξεων. Ενώ στο κεφάλαιο πέντε αναδεικνύονται τα συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτή τη μελέτη, ξεκινώντας από τη μέθοδο με τα περισσότερα πλεονεκτήματα.

Στόχος της εργασίας είναι να μελετηθούν μεθοδολογίες PCR, όπως HRM, Real Time, Multiplex, Allele-Specific κ.α. για ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων πολυμορφισμών. Η μελέτη ανέδειξε ένα σύνολο μεθόδων με πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα για κάθε μια. Αξιολογήθηκαν σύμφωνα με το βαθμό ευαισθησίας τους ευελιξίας, κόστους, κ.α.

Λέξεις - Κλειδιά:

Μεταλλάξεις, πολυμορφισμοί, σημειακές μεταλλάξεις, νοθευμένα, αλλεργιογόνα τρόφιμα, φάρμακα, PCR, HRM, Real Time PCR, Multiplex, Allele-Specific, ψηφιακή PCR, RFLP

Abstract

The discovery of more and more known/unknown mutations/polymorphisms, pathogenic microorganisms (hepatitis B and C, HIV-1, etc.), the need to diagnose genetic diseases (thalassemias, cystic fibrosis, muscular dystrophy, etc.), the correct and on time clinical diagnosis of diseases, appropriate medication, food quality safety, the risk of spoiled, adulterated, allergenic foods in the population, require fast and sensitive analysis techniques. Accordingly, DNA fingerprinting, complex body fluid analysis, rape, murder, forensics and criminology cases require appropriate techniques. Appropriate molecular determination for prognosis, adjustment-monitoring of a treatment and evaluation for possible remission/relapse of a disease, selection of more appropriate drugs, is essential for modern man

In chapter one reference is made to PCR. An in vitro amplification (up to 10⁹-fold) DNA sequencing technique, a three-step process (35-40 cycles). It was developed by the biochemist Kary Mullis (1983-1985), it has been developed and differentiated according to the needs of many scientists until today. The chapter mentions mutations / polymorphisms, gives definitions, origin, the structure of DNA, etc.

Chapter three defines specifications (sensitivity, method suitability, cost, analysis specifications) and control points for the application of molecular methods of their detection. The methods are analyzed, their basic operating principle, parameter evaluation, advantages, disadvantages and methods of detecting a mutation.

Chapter four highlights the selection points of the most appropriate PCR method in terms of selectivity rate, enrichment of known mutations. While chapter five highlights the conclusions, drawn from this study, starting with the method with the most advantages.

The aim of this study is to evaluate PCR methodologies, such as HRM, Real Time, Multiplex, Allele-Specific etc. for detection of point mutation polymorphisms. The study highlighted a number of methods with advantages and disadvantages for each and every one of them. They were evaluated according to their degree of sensitivity, flexibility, cost, etc.

Keywords:

Mutations, polymorphisms, point mutations, adulterated allergenic food, drugs, PCR, HRM, Real Time PCR, Multiplex, Allele-Specific, digital PCR, RFLP.

Πίνακας περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	- 1 -
Εισαγωγή	- 1 -
1.1 PCR	- 1 -
1.2 Συμβατική PCR	- 3 -
A. Η αρχή της μεθόδου	- 3 -
B. Στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης πολυμεράσης	- 4 -
1.3.Ανίχνευση των προϊόντων	- 5 -
1.4. Μέθοδοι διαχωρισμού προϊόντων PCR	- 7 -
1.5 Ιστορική αναδρομή της PCR	- 11 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	- 15 -
2.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ – ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ (SNPs)	- 15 -
2.1.1. Δομή DNA, Γονιδίωμα	- 15 -
2.1.2. Αντιγραφή γενετικού υλικού και επιδιόρθωση λαθών	- 18 -
2.1.3. Ορισμός Μεταλλάξεων	- 19 -
2.1.4. Προέλευση Μεταλλάξεων	- 19 -
2.1.5. Αιτίες Μεταλλάξεων	- 19 -
1. Διμερή Θυμίνης	- 19 -
• 2. Μεθυλιωμένες Κυτοσίνες	- 20 -
• 3. Ελλείψεις ή Ενθέσεις βάσεων	- 20 -
• 4. Υδρολυτικές απαμινώσεις	- 20 -
2.2 ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ – ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	- 21 -
2.2.1. Γονιδιακές Μεταλλάξεις	- 22 -
2.2.2. Χρωμοσωμικές Μεταλλάξεις	- 25 -
2.2.4. Πολυμορφισμοί (SNPs)	- 29 -
2.2.5. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ	- 32 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	- 35 -
Μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλάξεων και πολυμορφισμών που βασίζονται στην PCR	- 35 -
3.1 Προδιαγραφές και σημαντικά σημεία ελέγχου για την εφαρμογή μοριακών μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων / πολυμορφισμών	- 35 -
3.1.1 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ	- 37 -
3.1.2 ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ ΤΥΠΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	- 37 -
3.1.3 ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΟ ΤΥΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ	- 38 -
3.1.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΘΕΙΣΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA	- 38 -
3.1.5 ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ	- 39 -
3.1.6 ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	- 39 -

3.1.7	ΑΡΧΙΚΟ ΚΟΣΤΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΚΟΣΤΟΣ ΣΥΝΕΧΟΥΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	39 -
3.1.8	ΑΠΑΙΤΗΣΗ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΧΕΙΡΙΣΜΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ PCR	39 -
3.2	ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	40 -
3.2.1	Ψηφιακή PCR (Digital PCR)	40 -
3.2.2	Ανάλυση PCR με περιοριστικά ένζυμα, (Restriction Fragment Length Polymorphism) (RFLP)	42 -
3.2.3	Υβριδισμός με συνθετικά ολογονουκλεοτίδια (ASO Hybridization)..... (Allele-Specific Oligonucleotide Hybridization).....	46 - 46 -
3.2.4	Ανίχνευση μεταλλάξεων με ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (Σύστημα ενίσχυσης ανθεκτικής μετάλλαξης)	50 -
3.2.5	Ανίχνευση μεταλλάξεων με AS-PCR: Allele-Specific PCR (PCR για ειδικά αλληλόμορφα).....	53 -
3.2.6	Ανίχνευση μεταλλάξεων με RT-PCR (Reverse-transcription-polymerase-chain-reaction) (PCR Αντίστροφης Μεταγραφάσης)	55 -
3.2.7	Ανίχνευση μεταλλάξεων με Real Time PCR (Πραγματικού Χρόνου PCR) RT-PCR ...	58 -
3.2.8	Ανίχνευση μεταλλάξεων με Multiplex PCR (Πολυπλεξία-PCR).....	74 -
3.2.9	Ανίχνευση μεταλλάξεων με COLD PCR	76 -
3.2.10	Ανίχνευση μεταλλάξεων με Μέθοδος HRM (High resolution melting PCR) (Υψηλή Ανάλυση Τήγματος PCR)	78 -
3.2.11	Ανάλυση για μεταλλάξεις με LAMP (PCR με ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου) (Loop-mediated isothermal amplification PCR).....	92 -
3.2.12	Η ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου αντίστροφης μεταγραφής PCR (RT-LAMP PCR)	99 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	102 -
4.1	Σημεία επιλογής της καταλληλότερης μεθόδου PCR	102 -
A.	Μέθοδοι μέτριας έως υψηλής εκλεκτικότητας και εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων :	102 -
B.	Μέθοδοι με πολύ υψηλή εκλεκτικότητα και εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων: -	104 -
C.	Εμπλουτισμός και ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων	106 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	108 -
Συμπεράσματα	108 -

ΕΙΚΟΝΕΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΑ

ΕΙΚΟΝΑ 1 ΘΕΡΜΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗΣ	- 3 -
ΕΙΚΟΝΑ 2 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	- 5 -
ΕΙΚΟΝΑ 3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ DNA ΜΕ PCR ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΡΟΦΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	- 6 -
ΕΙΚΟΝΑ 4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΔΦ508	- 8 -
ΕΙΚΟΝΑ 5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΕΝΟΣ ΚΛΩΝΟΥ (SSCP)	- 10 -
ΕΙΚΟΝΑ 6 ΔΟΜΗ DNA, ΠΟΥΡΙΝΕΣ (C, T)-ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΕΣ(G, A) ΚΑΙ ΔΕΣΜΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (Δ.Η.)- 15	
ΕΙΚΟΝΑ 7 ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ	- 16 -
ΕΙΚΟΝΑ 8 ΟΜΟΛΟΓΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	- 17 -
ΕΙΚΟΝΑ 10 ΔΙΜΕΡΗ ΘΥΜΙΝΗΣ	- 19 -
ΕΙΚΟΝΑ 11 ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΕΣ ΚΥΤΟΣΙΝΕΣ	- 20 -
ΕΙΚΟΝΑ 12 ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΕΛΛΕΙΨΕΙΣ-ΕΝΘΕΣΕΙΣ	- 20 -
ΕΙΚΟΝΑ 13 ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΕΣ ΑΠΑΜΙΝΩΣΕΙΣ	- 20 -
ΕΙΚΟΝΑ 14 ΑΛΚΥΛΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	- 21 -
ΕΙΚΟΝΑ 15 ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	- 22 -
ΕΙΚΟΝΑ 16 ΣΙΩΠΗΛΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	- 22 -
ΕΙΚΟΝΑ 17 ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΜΙΑΣ ΒΑΣΗΣ (ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ)	- 23 -
ΕΙΚΟΝΑ 18 ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΜΙΑΣ ΒΑΣΗΣ	- 24 -
ΕΙΚΟΝΑ 19 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΜΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	- 24 -
ΕΙΚΟΝΑ 20 ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	- 25 -
ΕΙΚΟΝΑ 21 ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΑΤΟΜΟΥ ΜΕ ΤΡΙΣΩΜΙΑ 21/ ΣΥΝΔΡΟΜΟ DOWN	- 26 -
ΕΙΚΟΝΑ 22 ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΑΤΟΜΟΥ ΜΕ ΤΡΙΣΩΜΙΑ 13/ΣΥΝΔΡΟΜΟ PATAU	- 26 -
ΕΙΚΟΝΑ 23 ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΑΤΟΜΟΥ ΜΕ ΤΡΙΣΩΜΙΑ 18/EDWARDS SYNDROME	- 26 -
ΕΙΚΟΝΑ 24 TURNER SYNDROME (X0)	- 27 -
ΕΙΚΟΝΑ 25 KLINEFELTER SYNDROME (XXY)	- 27 -
ΕΙΚΟΝΑ 26 ΒΑΣΙΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ (ΔΦ 508) ΣΤΟ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 7, ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΚΗΣ ΉΝΩΣΗΣ	- 28 -
ΕΙΚΟΝΑ 27 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 7 (CFTR 7Q31.2)	- 28 -
ΕΙΚΟΝΑ 28 ΤΥΠΟΙ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ (SNPS)	- 30 -
ΕΙΚΟΝΑ 29 ΑΠΛΟΤΥΠΟΙ	- 31 -
ΕΙΚΟΝΑ 30 ΨΗΦΙΑΚΗ PCR	- 41 -
ΕΙΚΟΝΑ 31 ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ	- 43 -
ΕΙΚΟΝΑ 32 SNPS (ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΕΝΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ) ΠΟΥ ΔΗΜΙΟΥΡΓΟΥΝ Η ΚΑΤΑΣΤΡΕΦΟΥΝ ΘΕΣΕΙΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ	- 44 -
ΕΙΚΟΝΑ 33 ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ G551D ΚΑΙ R553X	- 45 -
ΕΙΚΟΝΑ 34 ΑΝΑΛΥΣΗ RFLP ΣΕ ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ	- 46 -
ΕΙΚΟΝΑ 35 ΕΙΔΙΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ (ASO HYBRIDIZATION)	- 47 -
ΕΙΚΟΝΑ 36 ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ASO (ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ)	- 49 -
ΕΙΚΟΝΑ 37 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΤΙΒΩΝ ΑΜΠΛΙΚΟΝΙΟΥ DNA	- 50 -
ΕΙΚΟΝΑ 38 ΕΙΔΙΚΗ ΓΙΑ ΤΟ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ PCR (AS-PCR)	- 54 -
ΕΙΚΟΝΑ 39 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ-ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (RT-PCR) - 56	
ΕΙΚΟΝΑ 40 ΣΗΜΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΚΥΚΛΩΝ	- 59 -
ΕΙΚΟΝΑ 42 ΚΑΜΠΥΛΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ	- 60 -
ΕΙΚΟΝΑ 41 ΚΑΜΠΥΛΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ PCR ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ	- 60 -
ΕΙΚΟΝΑ 43 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (STANDARD CURVE) STRATEGENE 2007)	- 62 -
ΕΙΚΟΝΑ 45 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΤΗΣΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ RT-PCR	- 63 -
ΕΙΚΟΝΑ 47 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ	- 66 -

ΕΙΚΟΝΑ 48 (Α)ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΤΑQΜΑΝ ΚΑΙ (Β) ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ FRET	- 68 -
ΕΙΚΟΝΑ 49 ΔΥΟ ΤΥΠΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ FRET (Α) ΑΝΑΛΟΓΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΚΑΙ (Β) ΣΒΗΣΜΕΝΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ	- 69 -
ΕΙΚΟΝΑ 50 ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ ΤΑQΜΑΝ.	- 70 -
ΕΙΚΟΝΑ 51 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΦΑΡΟΙ	- 71 -
ΕΙΚΟΝΑ 52 MULTIPLEX PCR.....	- 75 -
ΕΙΚΟΝΑ 53 COLD-PCR.....	- 76 -
ΕΙΚΟΝΑ 54 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΞΕΩΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (HRM).....	- 80 -
ΕΙΚΟΝΑ 55 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΔΙΚΛΩΝΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΜΕ ΣΤΑΔΙΑΚΗ ΑΥΞΗΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ	- 80 -
ΕΙΚΟΝΑ 56 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΤΗΞΗΣ, ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (-DF/DT) ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ (Τ).....	- 83 -
ΕΙΚΟΝΑ 57 ΚΑΜΠΥΛΗ ΤΗΞΗΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ ΓΝΩΣΤΩΝ SNPS	- 84 -
ΕΙΚΟΝΑ 58 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΓΙΑ ΑΓΝΩΣΤΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ.....	- 85 -
ΕΙΚΟΝΑ 59 HRM ΑΝΑΛΥΣΗ.....	- 85 -
ΕΙΚΟΝΑ 60 ΤΑ ΔΥΟ ΑΜΠΛΙΚΟΝΙΑ ΦΕΡΟΥΝ ΤΗΝ ΙΔΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	- 86 -
ΕΙΚΟΝΑ 61 ΔΥΟ ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ.....	- 86 -
ΕΙΚΟΝΑ 62 ΤΡΙΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	- 87 -
ΕΙΚΟΝΑ 63 LAMP METHOD	- 94 -

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

PCR	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
HIV-1	Human immunodeficiency virus 1
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome,
Taq πολυμεράση	Είδος DNA πολυμεράσης
Pfu DNA πολυμεράση	Είδος DNA πολυμεράσης
Thermus aquaticus	θερμόφιλο ευβακτηριακό μικροοργανισμό
dATP,	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
dTTP,	Τριφωσφορική Θυμίνη
dGTP,	Τριφωσφορική Γουανίνη
dCTP	Τριφωσφορική Κυτοσίνη
Mg ²⁺	κατιόντα Μαγνησίου
K ⁺	κατιόντα Καλίου
C	Celcius
min	minutes
sec	second
dNTPs	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
EtBr	Ethidium Bromide
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
nm	nanometers
SNP	Singlenucleotide polymorphism
A	Αδενίνη
G	Γουανίνη
C	Κυτοσίνη
T	Θυμίνη
Φ.Δ.	Φωσφοδιεστερικός Δεσμός
Δ.Η.	Δεσμός Υδρογόνου
C	Carbon

RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
U.V.	Ultra Violet
Z.β.	Ζεύγη βάσεων
HA	Heterodouplex
PTT	Δοκιμή περιστολής πρωτεϊνών
FSSCP	φθορίζων πολυμορφισμός διαμόρφωσης ενός κλώνου
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Kbp	Χιλιάδες ζεύγη βάσεων
ASO Hybridization	Υβριδισμός με συνθετικά ολογονουκλεοτίδια
PAGE GEL ELECTROPHORESIS	Ανίχνευση μεταλλάξεων/πολυμορφισμών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
SSCP	ΜΟΝΟΚΛΟΝΙΚΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΔΙΑΠΛΑΣΗΣ
DGGE	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΜΕ ΚΛΙΣΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟΥ
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
RT-PCR	Reverse-transcription-polymerase-chain-reaction
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
cri-du-chat	Η φωνή της γάτας
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
DHPLC	Denaturing high-performance liquid chromatography
PTT	Δοκιμή περιστολής πρωτεϊνών
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ASO Hybridization	Υβριδισμός με συνθετικά ολογονουκλεοτίδια
dPCR	Ψηφιακή PCR
AS-PCR:	Allele-Specific PCR
Eco32I	Escherichia Coli 32
RT-PCR	Reverse-transcription-polymerase-chain-reaction
cDNA	Complementary DNA
qPCR	Ποσοτική PCR

SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer
MS PCR	Methylation-specific pcr
T _c	Κρίσιμη θερμοκρασία μετουσίωσης
T _m	θερμοκρασία τήξεως
wt	Wild type
mt	mutant
HRM Analysis	High resolution melt analysis
-dF/dT	Αρνητικής παραγώγου του φθορισμού
LAMP Analysis	Loop-mediated isothermal amplification

ΠΙΝΑΚΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ T_M ($^{\circ}\text{C}$) ΣΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ ΤΗΞΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΛΛΑΓΗ ΒΑΣΗΣ	- 84 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΙΑΣ ΕΩΣ ΥΨΗΛΗΣ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟ ΓΝΩΣΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ	- 102 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕ ΠΟΛΥ ΥΨΗΛΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟ ΓΝΩΣΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ	- 104 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΕΜΠΛΟΥΤΙΖΟΥΝ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΟΥΝ ΑΓΝΩΣΤΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ.....	- 106 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 PCR

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) αποτελεί τη βάση για τη σύγχρονη μοριακή κλωνοποίηση. Είναι μια *in vitro* τεχνική πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας DNA με εξαιρετική απόδοση. Μπορεί να ενισχυθεί γρήγορα και επιλεκτικά μία καθορισμένη αλληλουχία στόχος που υπάρχει μόνο μία φορά μέσα στο γονιδίωμα ενός οργανισμού. Μια αντίδραση απλή, οικονομική και εφόσον κάποιος γνωρίζει την αλληλουχία που αναζητά είναι γρήγορη ευέλικτη και ευαίσθητη. (1) Η βασική τεχνική περιλαμβάνει μια διαδικασία τριών βημάτων σε πολλούς επαναλαμβανόμενους κύκλους για τον πολλαπλασιασμό μιας επιλεγμένης αλληλουχίας στόχου (έως και 10^9 φορές) και την ταυτοποίηση του προϊόντος με σύστημα ανίχνευσης βασισμένο σε κάποια φθορίζουσα χρωστική. Αρχικά αναπτύχθηκε από τον βιοχημικό Kary Mullis τη χρονική περίοδο 1983-1985. Ανιχνεύει γνωστές και άγνωστες μεταλλάξεις / πολυμορφισμούς στο δείγμα του DNA. Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιολογία και την ιατρική για την ανίχνευση και την ανάλυση γονιδιακών αλληλουχιών, για την αναπαραγωγή DNA σε εργαστηριακές συνθήκες, όπως στην κλωνοποίηση cDNA και γονιδιωματικού DNA και στην ανίχνευση πολύ λίγου ή μη καθαρού DNA σε δείγματα, όπως αυτά που προέρχονται από ιούς ή βακτηρία για ανάλυση, ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών, όπως οι ιοί της ηπατίτιδας B και C, ο HIV-1 (που προκαλεί AIDS), τα *Chlamydia trachomatis*, το *Mycobacterium tuberculosis*, ο ανθρώπινος Ιός θηλώματος και κυτταρομεγαλοϊός. Μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις, πολυμορφισμούς γονιδιακής επέκτασης που σχετίζονται με γενετικές ασθένειες όπως οι θαλασσαιμίες, η κυστική ίνωση, η μυϊκή δυστροφία κ.α. με σκοπό τη διάγνωση τους, καθώς και ανίχνευση υπερέκφρασης ογκογονιδίων. Στην ιατροδικαστική στη εγκληματολογία (διαλεύκανση υποθέσεων, ανίχνευση δακτυλικών αποτυπωμάτων DNA, ανάλυση σύνθετου μείγματος σωματικών υγρών χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών κυττάρων, βιασμοί, δολοφονίες κ.α.) αναλύονται μικροποσότητες αίματος και άλλων ιστών, και όχι απαραίτητα καθαρό DNA, προκειμένου να αναγνωριστεί ο δότης από το γενετικό του «δακτυλικό αποτύπωμα». Η τεχνική χρησιμοποιείται για την ενίσχυση θραυσμάτων DNA που βρέθηκαν σε διατηρημένους ιστούς, όπως αυτά ενός κατεψυγμένου μαλλιάρου μαμούθ ηλικίας 40.000 ετών ή ενός

ανθρώπου ηλικίας 7.500 ετών που βρέθηκε σε τύρφη καθώς και στην Παλαιοντολογία για τη μελέτη DNA από απολιθώματα.(114), (2) Μπορεί ακόμη να ανιχνεύσει γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα και φυτά.(3), (1-5) (115)

Η ασφάλεια των τροφίμων επιβάλλει την ανίχνευση, τον χαρακτηρισμό παθογόνων μικροοργανισμών και την ανάπτυξη στρατηγικών για την εξάλειψη των επιπτώσεών τους στην υγεία. Εκατομμύρια περιπτώσεις ασθενειών λόγω των τροφίμων προκύπτουν κάθε χρόνο. Ενώ τα αλλοιωμένα τρόφιμα αποτελούν κίνδυνο για τον πληθυσμό, τα αλλεργιογόνα τρόφιμα προβληματίζουν το 3% περίπου του ενήλικου πληθυσμού και το 6-8% των παιδιών επηρεάζονται από τροφικές αλλεργίες και πρέπει να αποφεύγουν την κατανάλωση αλλεργιογόνων για αυτούς τροφών. Στο εμπόριο, επίσης εντοπίζονται τρόφιμα νοθευμένα, διακυβεύοντας την ποιότητα των προϊόντων γενικότερα. Επιβάλλεται λοιπόν να ελέγχονται ενδελεχώς και να γίνεται ταυτοποίηση των στενά συγγενών ειδών τροφίμων, ποικιλιών τροφίμων καθώς και η πιθανότητα ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών σε αυτά.(116)

Η ικανότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων του DNA στα σωματικά κύτταρα καθώς και των σπάνιων αλληλόμορφων μέσα σε ένα αγρίου τύπου δείγμα DNA γίνεται όλο και πιο αναγκαία στις μέρες μας, πρώτα για τον αρχικό χαρακτηρισμό, αλλά και για τη μετέπειτα πορεία της θεραπείας και της κατάστασης ενός ασθενή. Στόχος είναι να διευκολύνουν τον εμπλουτισμό των σπάνιων παραλλαγών DNA επιλέγοντας εκείνες τις τεχνικές που εμπλουτίζουν και ανιχνεύουν γνωστές και άγνωστες μεταλλαγμένες αλληλουχίες, και στη συνέχεια προσδιορίζουν επακριβώς τη μετάλλαξη.

Ο μοριακός προσδιορισμός για πρόγνωση ή προσαρμογή-παρακολούθηση μιας θεραπείας και αξιολόγηση για πιθανή ύφεση/υποτροπή μιας ασθένειας, κρίνεται απαραίτητος. Η χρήση μεθόδων εμπλουτισμού είναι αναγκαία, ιδιαίτερα για μεταλλάξεις χαμηλού επιπέδου νοσημάτων (π.χ. 10^{-3} έως 10^{-6} μεταλλαγμένο DNA αγρίου τύπου), καθώς απαιτείται τόσο υψηλή εκλεκτικότητα όσο και εμπλουτισμός σπάνιων αλληλόμορφων για επιτυχή ανίχνευση, ταυτοποίηση, εξασφαλίζοντας παράλληλα ακρίβεια, ευκολία και χαμηλό κόστος στη μέθοδο.

Η συλλογή και η εκτίμηση των αναλυτικών μεθόδων που βασίζονται στην PCR για την ανίχνευση γνωστών και αγνώστων μεταλλάξεων / πολυμορφισμών είναι ένα ευρύ θέμα και εξαρτάται από το συγκεκριμένο πρωτόκολλο και τη μέθοδο που χρησιμοποιείται.

1.2 Συμβατική PCR

Α. Η αρχή της μεθόδου

Η αρχή της PCR (συμβατική PCR) βασίζεται στην *in vitro* ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, δημιουργώντας ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων του τμήματος αυτού, από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών κυττάρων, με τη χρήση διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας. Το τμήμα του DNA που κλωνοποιείται με τη μέθοδο αυτή έχει γνωστή αλληλουχία στα άκρα του.

Για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση PCR χρειάζονται:

- Μία αρχική αλληλουχία DNA (αμπλικόνιο) (ελάχιστη ποσότητα αρκεί), που θα λειτουργήσει σαν εκμαγείο προκειμένου να παραχθούν πολλαπλά αντίγραφα.
- Το ένζυμο είναι μια DNA πολυμεράση θερμοανθεκτική Taq, ή Pfu (*Thermus aquaticus* ή *Pyrococcus furiosus*)
- Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (συνήθως 18-21 βάσεις) που λειτουργούν ως εκκινητές (σε ζεύγος) θα ορίσουν και το μέγεθος των αντιγράφων DNA.
- Ένα μείγμα με τα 4 δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα για να βελτιστοποιηθεί η αντίδραση και η δράση του ενζύμου της πολυμεράσης και περιέχει κατιόντα Μαγνησίου (Mg^{2+}) και κατιόντα Καλίου (K^+).

Το ένζυμο που συνήθως χρησιμοποιείται είναι η Taq DNA πολυμεράση. Προέρχεται από

Εικόνα 1 θερμικός κυκλοποιητής



ένα θερμοφίλο μικροοργανισμό, το βακτήριο *Thermus aquaticus*, από τον οποίο απομονώθηκε αρχικά από τους Chien et al. το 1976, με αντοχή ενεργότητας στους 95°C για 40 min και βέλτιστη δράση στους 72°C. Ένα επίσης συνηθισμένο είδος πολυμεράσης που επιλέγεται συχνά είναι η Pfu DNA πολυμεράση, ενώ και τα δύο αυτά ένζυμα παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα-αντοχή, στην ιδιαίτερα υψηλή θερμοκρασία της μεθόδου. (5) Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή (Εικ. 1) ώστε η μετάβαση στις επιθυμητές θερμοκρασίες να γίνεται εύκολα. Ένα γενικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει τρία στάδια. (Εικ. 2)

B. Στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης πολυμεράσης.

- Αρχικά:

Αποδιάταξη του δείγματος (denaturation) στους 95°C για 15 min ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου και να καταστραφούν οι δευτεροταγείς και οι τριτοταγείς δομές προκειμένου να προκύψουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες DNA.

- Επόμενο στάδιο :

Υβριδίαση (annealing) με τη θερμοκρασία να κυμαίνεται μεταξύ 50°C – 71°C για 30-60 sec ώστε να προσδεθούν οι εκκινητές (περίπου 20 βάσεις) στο 3' άκρο του μονόκλωνου μορίου DNA εκμαγείου της κάθε αλυσίδας.

- Τελευταίο στάδιο:

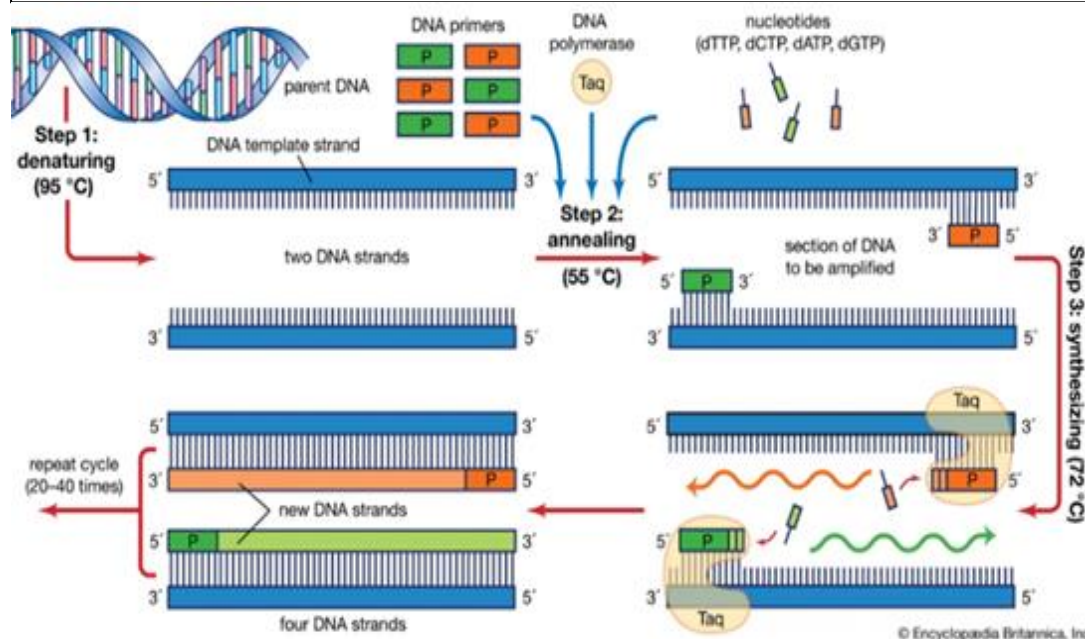
Προέκταση (extension) ή *Επιμήκυνση* (elongation) στους 72°C (θερμοκρασία η οποία είναι μέσα στο εύρος της DNA πολυμεράσης και παράλληλα δεν επιτρέπει την δημιουργία πολλών λαθών κατά την αντιγραφή των αρχικών κλώνων) για σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA για περίπου έως 3 min. Σε ορισμένα πρωτόκολλα, γίνεται χρήση ανιχνευτών Taqman, και επιμηκώνουν το μόριο DNA στους 60 °C (16)

Κατά την επιμήκυνση συντίθεται η συμπληρωματική αλυσίδα και η DNA πολυμεράση επιμηκώνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5' προς 3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA στόχο όπου έχουν προσδεθεί οι εκκινητές.

Αποδιάταξη προϊόντων με τη θερμοκρασία στους 94°C για 30-60sec ώστε να αποδιαταχθούν και πάλι τα νέα δίκλινα τμήματα DNA που παράχθηκαν και να λειτουργήσουν ως νέα εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο της αντίδρασης, ενώ αυτό επαναλαμβάνεται για 25-40 κύκλους.

Εικόνα 2 Αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Πηγή: <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>



Στον τελευταίο κύκλο η προέκταση διαρκεί περίπου 10 min ώστε να προλάβουν να επεκταθούν όλα τα νέα τμήματα DNA από το ένζυμο.

Στο τέλος κάθε κύκλου, ιδανικά θα έπρεπε να έχουμε διπλάσια ποσότητα δίκλωνων μορίων DNA. Όμως, αφού περάσουν κάποιοι κύκλοι, η αυξητική πορεία της αντίδρασης αγγίζει μια μέγιστη τιμή πέραν της οποίας η ενίσχυση της αλληλουχίας δεν αλλάζει πλέον ταχύτητα. Ο εκθετικός ρυθμός παραγωγής του προϊόντος γίνεται γραμμικός, και στη συνέχεια μηδενίζεται, με τον τελικό αριθμό παραγόμενων αντιγράφων, να είναι σε κάθε ανάλυση της ίδιας τάξης μεγέθους, ανεξαρτήτου αρχικού αριθμού αντιγράφων. (5), (57)

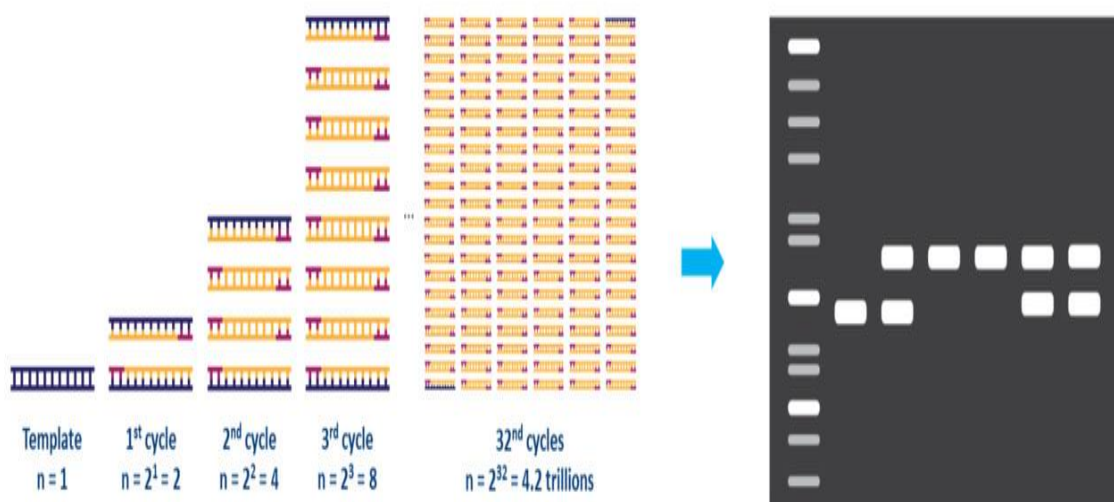
1.3.Ανίχνευση των προϊόντων

Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR γίνεται ανάλογα με τον ιχνηθέτη που έχει χρησιμοποιηθεί. Συνήθως πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση πηκτώματος που διαχωρίζει μόρια DNA με βάση το μέγεθος του δείγματος. Τα μεγαλύτερα μόρια DNA κινούνται πιο αργά μέσα από τους πόρους του πηκτώματος οπότε και διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος .

Η τεχνική του διαχωρισμού νουκλεϊκών οξέων γίνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου και φθορίζουσες χρωστικές βάφουν το πήκτωμα μετά την ηλεκτροφόρηση ώστε να γίνουν

Εικόνα 3 Ενίσχυση πρότυπου DNA με PCR και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης

Πηγή <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/>



ορατά τα μόρια που διαχωρίστηκαν. Καθώς προσδένεται η φθορίζουσα χρωστική στο DNA τα προσδεμένα σε αυτή μόρια του δημιουργούν ζώνες που η κάθε μία χαρακτηρίζει το μέγεθος του μορίου.

Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) στη γέλη, όπου «συναντήσει» τμήμα DNA προσδένεται ανάμεσα στους δύο συμπληρωματικούς κλώνους και φθορίζει στην παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας αποδίδοντας πορτοκαλί χρώμα κάτω από UV ακτινοβολία και επιτυγχάνοντας έτσι ποιοτικό προσδιορισμό του προϊόντος.(17)

Χρησιμοποιούνται δύο τύποι πηκτωμάτων, της αгарόζης και του πολυακρυλαμιδίου.

Το πήκτωμα αгарόζης, (ποικίλει ανάλογα με την % συγκέντρωση της αгарόζης), (Εικ. 3). περιέχει πόρους διαφορετικού μεγέθους που επιτρέπουν την διέλευση του νουκλεϊκού οξέος. Μικρά ή συμπαγή μόρια κινούνται γρηγορότερα, έχει μικρότερη διακριτή ικανότητα από αυτή του πολυακρυλαμιδίου, αλλά διαχωρίζει μόρια DNA έως και εκατοντάδων κιλοβάσεων.

Το πολυακρυλαμίδιο προσδίδει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα από ότι το αντίστοιχο της αгарόζης. Μπορεί να διαχωρίσει μόρια ακόμη και με ένα ζεύγος διαφορά, (διαχωρίζει μέχρι 0,2%, μία βάση σε κάθε 500 βάσεις), αλλά για μεγέθη έως και μερικών εκατοντάδων βάσεων DNA.(108)(109)

Για τα προϊόντα της PCR, (αρχικά ανίχνευση και μετά διαχωρισμός), μπορεί να επιτευχθεί διαχωρισμός με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) στα 260nm ή και με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση όπου επιτυγχάνεται ποιοτική αλλά και ποσοτική ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης.

1.4. Μέθοδοι διαχωρισμού προϊόντων PCR

A. Ανίχνευση μεταλλάξεων με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis

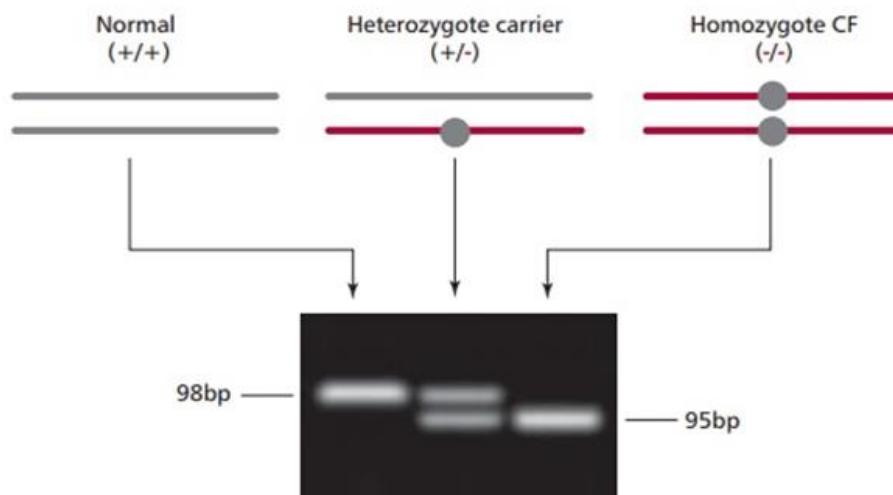
Τεχνική που χρησιμοποιείται στη βιοχημεία, την εγκληματολογική χημεία, τη γενετική, τη μοριακή βιολογία και τη βιοτεχνολογία για να διαχωριστούν μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα, ανάλογα με το μήκος, τη διαμόρφωση του μορίου και το φορτίο τους. Μπορεί να ανιχνεύσει είτε προσθήκες είτε ελλείματα βάσεων (ενός ή και πιο πολλών) με PCR και στη συνέχεια ανάλυση των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου τόσο μειώνεται το μέγεθος των πόρων μετά τον πολυμερισμό. Το τζελ πολυακρυλαμιδίου με μικρούς πόρους βοηθά στην καλύτερη εξέταση μικρότερων μορίων

Το δείγμα που αναλύεται συνήθως αναμειγνύεται με κάποιο μετουσιωτικό χημικό, συνήθως SDS για πρωτεΐνες ή ουρία για νουκλεϊκά οξέα. Το SDS, ανιονικό απορρυπαντικό, μετουσιώνει δευτερογενείς και μη δισουλφιδικές τριτοταγείς δομές και δημιουργεί αρνητικό φορτίο σε κάθε πρωτεΐνη ανάλογα με τη μάζα της. Η ουρία διασπά τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ζευγών βάσεων του νουκλεϊκού οξέος, διαχωρίζοντας τους σε δύο κλώνους. Η θέρμανση τουλάχιστον στους 60 °C προάγει περαιτέρω τη μετουσίωση των δειγμάτων.(7), (8)

Ακολουθεί προσθήκη μιας χρωστικής παρακολούθησης, (για πρωτεΐνες, συνηθέστερα με Coomassie brilliant blue R-250 ή αυτοακτινογραφία, για νουκλεϊκά οξέα, βρωμιούχο αιθίδιο ή και για τα δύο, χρώση αργύρου), επιτρέποντας την απεικόνισή τους.

Εικόνα 4 Ανίχνευση μετάλλαξης ΔΦ508

Πηγή: https://www.brainkart.com/article/Cystic-Fibrosis--Diagnosis-and-treatment---Plasma-Membrane-Disorders_16393



Για παράδειγμα η μετάλλαξη ΔΦ508 στο γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης είναι γνωστή για έλλειψη τριών βάσεων. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει μετάλλαξη ή όχι σχεδιάζονται εκκινητές τόσο για το φυσιολογικό γονίδιο όσο και για το μεταλλαγμένο. Κατά τον έλεγχο με PCR ο ένας τοποθετείται στο 5' άκρο και ο άλλος στο 3' άκρο. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8% με το φυσιολογικό γονίδιο να δίνει τμήμα μήκους 98 bp και το μεταλλαγμένο γονίδιο να δίνει τμήμα μήκους 95bp (Εικ.4) γεγονός που διευκολύνει το διαχωρισμό τους κατά την ηλεκτροφόρηση λόγω της διαφοράς μήκους τους.

Επίσης μπορεί κάποιος να διαγνωσθεί, αν είναι ετεροζυγώτης για τη μετάλλαξη ή όχι, λόγω της παρουσίας ετεροδιμερών. Σχηματίζονται ανάμεσα στη φυσιολογική και στη μεταλλαγμένη αλληλουχία DNA κατά την PCR και παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα εξαιτίας της διαφοροποιημένης τριτοταγούς δομής τους κατά την ηλεκτροφόρηση και είναι εύκολα αναγνωρίσιμα. (9)

B. Ανάλυση της διαμόρφωσης της μονόκλωνης δομής του DNA

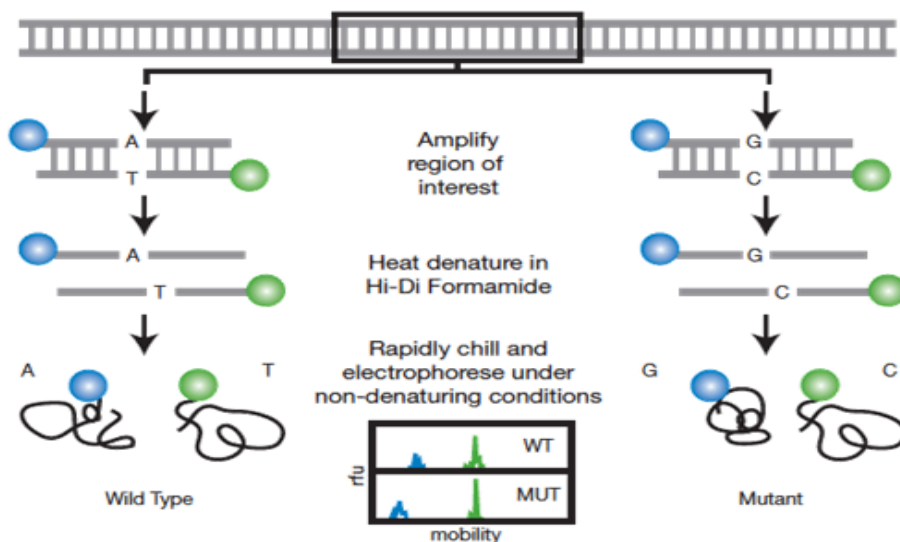
SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism

Με αυτή τη μέθοδο μπορούμε να εντοπίσουμε οποιαδήποτε σημειακή μετάλλαξη σε ένα μόριο DNA.

Μεμονωμένες αλλαγές νουκλεοτιδίων σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία, ενός δίκλωνου μορίου DNA, δεν μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν με τεχνικές ηλεκτροφόρησης πηκτής, δεδομένου ότι οι φυσικές ιδιότητες των δίκλωνων μορίων είναι σχεδόν πανομοιότυπες και για τα δύο αλληλόμορφα. Λόγω της μετουσίωσης, το μονόκλωνο DNA υφίσταται μια αναδίπλωση με χαρακτηριστική διαμόρφωση σύμφωνα με την αλληλουχία του DNA. Η διαφορά στο σχήμα δύο μονόκλωνων κλώνων DNA με διαφορετικές αλληλουχίες προκαλεί διαφορετική μετακίνηση σε γέλη ηλεκτροφόρησης, παρότι ο αριθμός των νουκλεοτιδίων είναι ο ίδιος. Οι ενδομοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται στη δευτεροταγή δομή του μονόκλωνου μορίου DNA είναι χαρακτηριστικές για αυτή τη συγκεκριμένη αλληλουχία. Εκείνα τα μόρια DNA που διαφέρουν έστω και κατά μόνο μια βάση δίνουν διαφορετική δευτεροταγή δομή από αυτή του φυσιολογικού μορίου και κινούνται με διαφορετική ταχύτητα μέσα στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης χωρίς αποδιατακτικές ουσίες.

Γίνεται ενίσχυση με PCR στην περιοχή του DNA που ελέγχεται για σημειακές μεταλλάξεις, ακολουθεί αποδιάταξη με φορμαμίδιο σε υψηλή θερμοκρασία και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. (Εικ. 5) Η κινητικότητα μιας ζώνης καθορίζει ή όχι την παρουσία μετάλλαξης. Κατά την αντίδραση της PCR, ενσωματώνοντας ραδιοσημασμένο dNTP μπορεί να γίνει ανίχνευση των τμημάτων του DNA με ιχνηθέτηση και χρήση νιτρικού αργύρου και βρωμιούχου αιθιδίου ώστε να δεσμευτεί το DNA και παρατηρείτε η χρωματισμένη γέλη στο υπεριώδες φως, για επιβεβαίωση των τελικών προϊόντων της PCR, και πραγματοποιείται τελικού σημείου ποιοτική δοκιμασία PCR.

Εικόνα 5 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης ενός κλώνου (SSCP)
https://lovemalank.live/product_details/36248735.html



Όταν στο τμήμα του DNA που ελέγχεται δεν υπάρχουν σημειακές μεταλλάξεις τότε προκύπτουν μόνο δύο ζώνες που αντιστοιχούν μια για κάθε μονόκλωνο DNA. Όταν όμως υπάρχει σημειακή μετάλλαξη προκύπτουν τέσσερις ζώνες που οι δύο αντιστοιχούν στην μεταλλαγμένη αλληλουχία και οι άλλες δυο στη φυσιολογική αλληλουχία του DNA.

Κάποιες από τις ζώνες αυτές δεν μπορούν να διαχωριστούν στη γέλη και εμφανίζονται ως μία ζώνη. Αυτή η μέθοδος μπορεί εύκολα να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, που όμως η ταυτόχρονη χρήση αρνητικών και θετικών δειγμάτων ελέγχου και η αυστηρή βελτιστοποίηση, την καθιστούν ως μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανάλυσης μεταλλάξεων.

Παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το μέγεθος των προϊόντων επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου. Το μέγεθος των προϊόντων συνήθως δεν ξεπερνά τις 300bp και για μεγαλύτερα μεγέθη ενδείκνυται η χρήση περιοριστικών ένζυμων, ώστε να προκύψουν μικρότερου μήκους προϊόντα, για καλύτερα αποτελέσματα.(100)

Μπορούν έτσι να ανιχνευθούν νέοι πολυμορφισμοί DNA(11). Αποτελεί διαγνωστικό εργαλείο στη μοριακή βιολογία στην ανίχνευση ομόζυγων ατόμων διαφορετικών αλληλόμορφων, καθώς και ετερόζυγων ατόμων που θα πρέπει να έχουν διαφορετικό αποτέλεσμα μετά την ηλεκτροφόρηση(10)

Χρησιμοποιείται επίσης στην ιολογία για ανίχνευση διαφορετικών στελεχών ενός ιού, αφού ανάμεσα στα δύο στελέχη θα πρέπει να εμφανίζονται αλλαγές λόγω μετάλλαξης οι οποίες αλλαγές θα μπορούν να δώσουν διαφορετικές δομές οπότε και, ορατές διαφοροποιήσεις στο πήκτωμα SSCP.(12)

1.5 Ιστορική αναδρομή της PCR

Η αρχή της τεχνικής PCR είναι απαραίτητη για τη διάγνωση γενετικών ασθενειών, για την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων ιογενούς λοίμωξης και την ανίχνευση των SNP ή των μεταλλάξεων.

Η PCR είναι μια τεχνική που αναφέρθηκε αρχικά από τους Saiki et al.(1985) (13) και τους(14) Mullis και Faloona το 1987 με ενίσχυση της αλληλουχίας γονιδιώματος β-σφαιρίνης για διάγνωση δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Με τη μέθοδο αυτή ενισχύθηκαν εκθετικά αλληλουχίες στόχοι, χρησιμοποιώντας εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και θραύσματα klenow της Escherichia coli DNA πολυμεράσης I.

Το 1988, οι Saiki et al (1988) (15) αντικατέστησαν την DNA πολυμεράση που χρησιμοποιούσαν αρχικά με μεγαλύτερης ανθεκτικότητας σε υψηλότερες θερμοκρασίες πολυμεράση, προερχόμενη από το βακτήριο Thermus aquaticus (Taq πολυμεράση). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου βελτιώθηκε, καθιστώντας την καινοτόμο, πολύ γρήγορη και ευαίσθητη.

Οι Holland et al. (1991) (16) πρότειναν με την PCR να γίνεται ποσοτική αξιολόγηση των μορίων-στόχων μέσα από μια ομοιογενή διαδικασία με την ενίσχυση και την ανίχνευση να εξελίσσονται μέσα σε ένα σωλήνα. Η ανίχνευση των προϊόντων PCR γίνεται με την εξωνουκλεάση 5'-3' Taq πολυμεράση. Εκτός από τους εκκινητές, χρησιμοποιήθηκαν και επισημασμένοι ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων 5'-γ³² ATP και 3'-μπλοκ φωσφορικών, για υβριδισμό εντός της αλληλουχίας στόχου ενδιάμεσα των εκκινητών. Η δράση της 5'-3' εξωνουκλεάσης Taq πολυμεράσης, υποβάθμιζε τους ανιχνευτές εφόσον ήταν συνδεδεμένοι με την ακολουθία στόχο. Μετά από 30-40 κύκλους υπολόγισαν την ποσότητα του αποικοδομημένου καθετήρα αποδεικνύοντας ότι η ποσότητα της αποικοδόμησης του

ανιχνευτή επηρεάστηκε από τον αρχικό αριθμό των μορίων-στόχων, τη συγκέντρωση του ανιχνευτή και τον αριθμό των κύκλων PCR.

Οι Higuchi et al.(1992) (17) πρόσθεσαν βρωμιούχο αιθίδιο σε μείγμα αντίδρασης PCR για την αξιολόγηση της διαδικασίας, αφού μπορούσαν να παρατηρήσουν εξωτερικά την αύξηση του φθορισμού του EtBr παρουσία των dsDNA. Η αυξανόμενη ανίχνευση φθορισμού λόγω δέσμευσης του dsDNA στο EtBr ήταν εφικτή και κατά τη διάρκεια των θερμοκύκλων.

Το 1993, οι Higuchi et al. (18) απέδειξαν τη άμεση συσχέτιση του αρχικού αριθμού αντιγράφων DNA με τη συσσώρευση του φθορισμού κατά τη διάρκεια του θερμοκύκλου. Πραγματοποίησαν PCR σε δύο διαφορετικούς κύκλους με θερμοκρασίες στους 94⁰C για 15sec (μετουσίωση) και στους 68⁰C για 30sec (ανόπτηση/επέκταση), ενώ βιντεοσκοπούσαν τη φάση ανόπτησης/επέκτασης, καταγράφοντας εικόνες φθορισμού, δείχνοντας ότι θα μπορούσαν να παρέχονται σημαντικές πληροφορίες με εκτεταμένη παρακολούθηση της κινητικής ανάλυσης κατά τη διάρκεια του θερμοκύκλου, ενώ ταυτόχρονα έδειξαν ότι η διαδικασία ενίσχυσης της PCR είναι εκθετική.

Την 5'-3' δράση εξωνουκλεάσης από την Taq πολυμεράση που ήδη προανέφεραν οι Holland et al (16) χρησιμοποιούν και οι Lee et al (19), ώστε να εξασφαλίσουν αλληλική διάκριση με δοκιμασία μετάφρασης nick. Επισημασμένοι ανιχνευτές με χρωστική ένδειξη φθορισμού (6-καρβοξυφθορεσκεΐνη, 6FAM, TET) χρησιμοποιήθηκαν στο 5' άκρο, και μια κοινή χρωστική σβέση (6-καρβοξυτετραμεθυλοροδαμίνη, TMR) στο έβδομο νουκλεοτίδιο από το 5'-άκρο. Η δοκιμασία με βάση τον ανιχνευτή βασίστηκε στη μεταφορά ενέργειας φθορισμού, στην οποία η εγγύτητα των χρωστικών δεικτών και σβέστη στους μη αποικοδομημένους αισθητήρες μειώνει το φθορισμό της χρωστικής δείκτη. Η δράση της 5'-3'Taq εξωνουκλεάσης υποβαθμίζει τους ανιχνευτές, αποκαθίσταται ο φθορισμός της χρωστικής ένδειξης λόγω μείωσης του αποτελέσματος απόσβεσης. Ο φθορισμός μελετάται μετά το πέρας των 35 κύκλων στο τελικό σημείο. Η χρήση καθετήρα περιλαμβάνει δείκτες και βαφές σβέσης για ομοιογενή ανάλυση χωρίς επεμβάσεις μετά το τέλος της PCR. Επιπρόσθετα, η μελέτη τους παρείχε τη βασική επίδειξη για το γονότυπο SNP με ανιχνευτή TaqMan.

Το 1995 οι Livak et al (20) ανέπτυξαν τον “ανιχνευτή TaqMan”. Σύγκριναν ανιχνευτές με χρωστική ουσία απόσβεσης που είναι προσκολλημένοι σε ένα εσωτερικό νουκλεοτίδιο –

σαν τους ανιχνευτές που ανέφεραν οι Lee et al (19), με ανιχνευτές όπου η χρωστική ουσία που “σβήστηκε” ήταν συνδεδεμένη με νουκλεοτίδιο στο 3’ άκρο. Έδειξαν ότι οι ανιχνευτές με χρωστικές ουσίες, probe και σβέστη, προσκολλημένες στα αντίθετα άκρα, έδωσαν μεγαλύτερο σήμα φθορισμού κατά την PCR 5’-νουκλεάσης σε σχέση με άλλες κατηγορίες ανιχνευτών. Οι φθοριογόνοι ανιχνευτές διπλής επισήμανσης (ανιχνευτής TaqMan) που χρησιμοποιούμε στις μέρες μας τους οφείλουμε στους Lee et al (19) και στους Livak et al (20).

Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες, νέοι ανιχνευτές προστέθηκαν επισημασμένοι με γ -³²ATP, χρωστικές ή ανιχνευτές φθορισμού κατάλληλοι να δεσμεύσουν DNA σε μείγματα PCR έτσι ώστε να μπορούμε να παρακολουθήσουμε ή και να ποσοτικοποιήσουμε το PCR αμπλικόνιο που αντικατοπτρίζει την ποσότητα των αρχικών δειγμάτων. Έτσι αναπτύχθηκαν αυτοματοποιημένα όργανα για PCR σε πραγματικό χρόνο.

Οι Heid et al (21) και οι Gibson et al (22) το 1996 εισήγαγαν έναν νέο ανιχνευτή αλληλουχίας, τον ABI Prism, για αλληλούχιση σε πραγματικό χρόνο, μια ποσοτική PCR ή μια ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφάσης σε πραγματικό χρόνο, εκμεταλλευόμενοι τη δραστηριότητα της 5’ νουκλεάσης Taq και διπλής επισήμανσης με φθοριογόνους ανιχνευτές TaqMan.

Το 1997 οι Wittwer et al. (23, 24) αξιολόγησαν το Light Cycler, ως κατάλληλο να πραγματοποιεί γρήγορες εναλλαγές θερμοκρασίας, να παρακολουθεί συνέχεια τους γρήγορους κύκλους ενίσχυσης DNA κάνοντας χρήση τριών διαφορετικών τεχνικών φθορισμού, τη δίκλωνη βαφή DNA SYBR Green I, τον ανιχνευτή TaqMan καθώς και χρήση παρακείμενων ανιχνευτών υβριδισμού με σήμανση φλουορεσκεΐνης και Cys.

Οι Volgestein Kinzler το 1999 (25) εισήγαγαν την τεχνική της Ψηφιακής PCR που είναι χρήσιμη για την ανίχνευση SNP/μεταλλάξεων. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κλασματοποίηση του δείγματος σε μέρη ίσου όγκου μέσω πολλαπλών αραιώσεων και επιτρέπουν την πραγματοποίηση υπερευαίσθητων αντιδράσεων (nano και pico λίτρα).

Η nested PCR συνήθως χρησιμοποιείται για ενίσχυση μικρού αριθμού προτύπων. Όμως οι Volgestein και Kinzler αύξησαν τους κύκλους της μεθόδου σε 60, παρακάμπτοντας, πιθανή μόλυνση εξαιτίας της nested PCR, την περεταίρω εργαστηριακή ανάλυση αλλά ενίσχυσαν περισσότερο και το δείγμα.

Οι Tyagi και Kramer το 1996 (26) πρόσθεσαν μοριακό φάρο για ανάλυση προϊόντων PCR άγριας και μεταλλαγμένης αλληλουχίας. Δύο μοριακοί φάροι επισημασμένοι με διαφορετικές φθορίζουσες βαφές προστίθενται στο μείγμα μετά την PCR για να ξεχωρίσουν οι δυο αλληλουχίες του αγρίου και του μεταλλαγμένου τύπου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

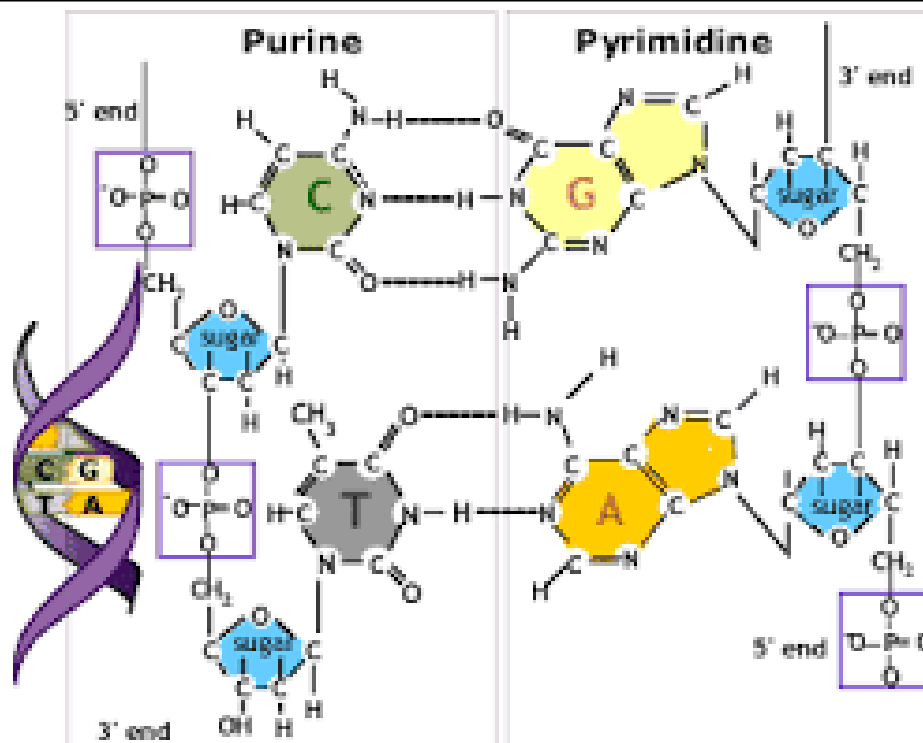
2.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ – ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ (SNPs)

2.1.1. Δομή DNA, Γονιδίωμα

Το 1920 ο Γερμανός Η. Winkler αναφέρθηκε στα απλοειδή αλληλόμορφων χρωμοσωμάτων και τα χαρακτήρισε ως «γονιδίωμα». Στις μέρες μας, το γονιδίωμα αναφέρεται σε ολόκληρο το κληρονομικό υλικό ενός κυττάρου (κωδικοποιούσες και μη κωδικοποιούσες περιοχές του DNA), φέρει πληροφορίες για την ανάπτυξη ενός οργανισμού, την επιβίωση, την αναπαραγωγή, τη μετάδοση κληρονομικών πληροφοριών και την εξέλιξή του. Ο δομικός λίθος του γονιδιώματος είναι η δεξιόστροφη διπλή έλικα του DNA (Watson & Crick, 1953) που αποτελείται από τέσσερα ζεύγη νουκλεοτιδίων, την αδενίνη (A), τη γουανίνη (G) γνωστές ως πουρίνες και τη θυμίνη (T) και την κυτοσίνη (C) γνωστές ως πυριμιδίνες, συνδεδεμένες στον άνθρακα 1' του μορίου της δεοξυριβόζης. (Εικ. 6)

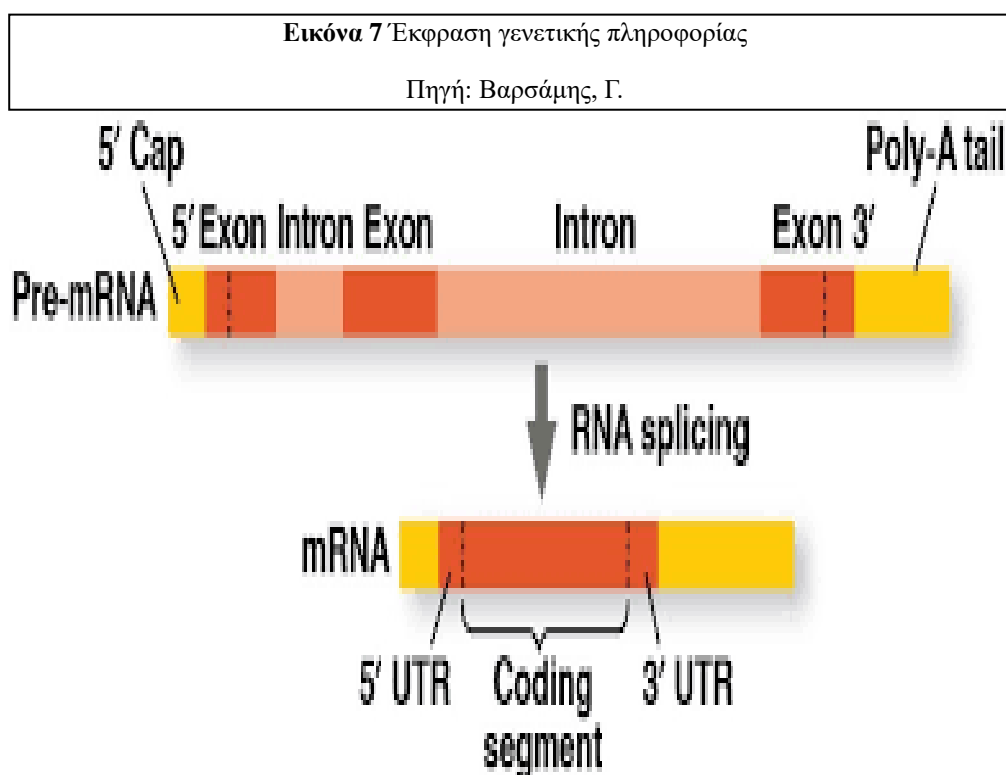
Εικόνα 6 Δομή DNA, Πουρίνες (C, T)-Πυριμιδίνες(G, A) και Δεσμοί Υδρογόνου (Δ.Η.)

Πηγή: https://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/bdavies/dna_structurepg%202.htm



Σε κάθε κλώνο τα σάκχαρα μαζί με μία από τις τέσσερις βάσεις (στο C'1) συνδέονται μεταξύ τους με 3'-5'Φ.Δ., και οι δύο κλώνοι της έλικας ενώνονται με Δ.Η. μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων πουρινών-πυριμιδίων, όπου σύμφωνα με τον κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων, η αδενίνη (A) συνδέεται με διπλό δεσμό υδρογόνου με τη θυμίνη (T) (A-T), και η γουανίνη (G) συνδέεται με τριπλό δεσμό υδρογόνου με την κυτοσίνη (C) (G-C), και αντίστροφα. Ο κάθε κλώνος έχει κατεύθυνση 5' προς 3'.(Εικ. 6) Οι δύο κλώνοι είναι μεταξύ τους συμπληρωματικοί και αντιπαράλληλοι. Στο δίκλωνο μόριο DNA η αναλογία πουρινών και πυριμιδίων ισούται πάντοτε με ένα, ($A+G/T+C=1$).

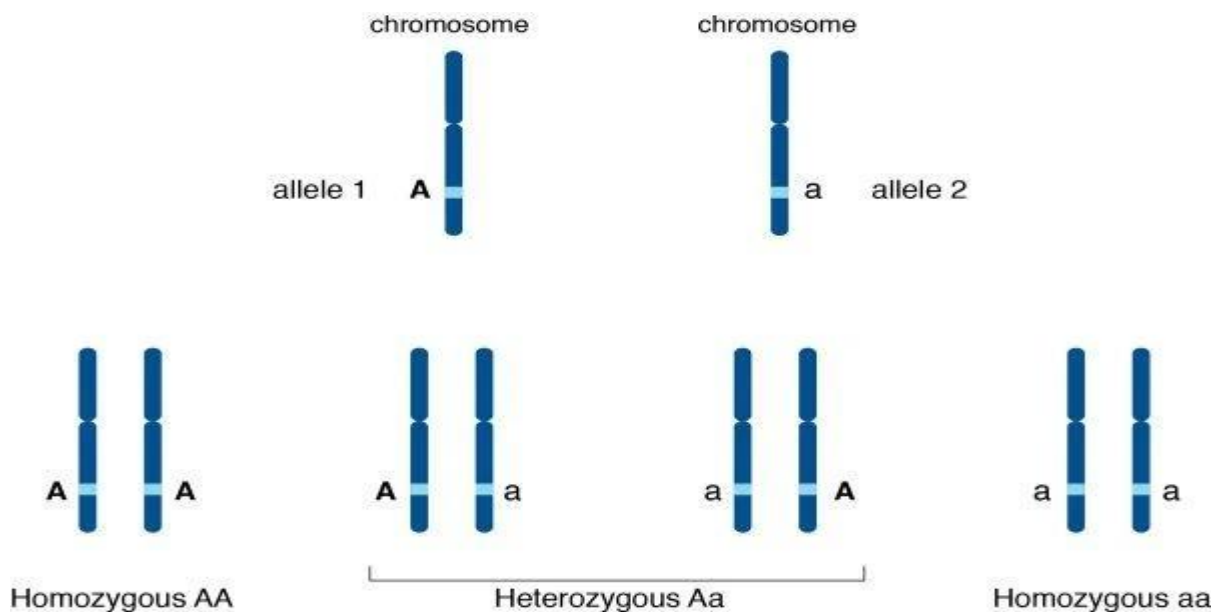
Με τη διαδικασία της μεταγραφής και της μετάφρασης εκφράζεται η γενετική πληροφορία,(Εικ. 7), παράγονται οι πρωτεΐνες σύμφωνα με το γενετικό κώδικα όπου σε κάθε αμινοξύ αντιστοιχούν τρία νουκλεοτίδια.



Στο γονίδιο, η κωδικοποιούσα περιοχή του, καθορίζει το είδος της πρωτεΐνης που θα παραχθεί και παρέχει την αλληλουχία των βάσεων της πρωτεΐνης. Το μόριο του DNA έχει μήκος περίπου 2 μέτρα, φέρει περίπου 3,3 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων (3×10^6 b.p.)

Εικόνα 8 Ομόλογα χρωμοσώματα και πιθανοί συνδυασμοί των αλληλόμορφων γονιδίων

Πηγή: Γονιδιακή Αλληλομορφία, Βιολογικά Φαινόμενα, Γενετική, Science Wiki



Το ανθρώπινο γονιδίωμα είναι δομημένο σε 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων. Κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από γονίδια και εκτιμάται ότι ο άνθρωπος έχει 20.000 με 25.000 γονίδια. Στους διπλοειδείς οργανισμούς τα χρωμοσώματα κάθε οργανισμού υπάρχουν σε ζεύγη και ονομάζονται ομόλογα χρωμοσώματα. Σε κάθε ομόλογο ζεύγος χρωμοσωμάτων το ένα αλληλόμορφο είναι πατρικής ενώ το άλλο αλληλόμορφο είναι μητρικής προέλευσης. Τα χρωμοσώματα αυτά έχουν ίδια μορφή, ίδιο μέγεθος και στον καρυότυπο του οργανισμού ταξινομούνται κατά ζεύγη. Κάθε γονίδιο βρίσκεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή του χρωμοσώματος, γνωστή ως γενετική θέση. Τα γονίδια που βρίσκονται στην αντίστοιχη γενετική θέση στα ομόλογα χρωμοσώματα ελέγχουν την ίδια ιδιότητα αλλά όχι πάντα με τον ίδιο τρόπο.

Για όλους τους οργανισμούς που ανήκουν στο ίδιο είδος, στην ίδια γενετική θέση εδράζονται αλληλόμορφα ομόζυγα (A,A) για το επικρατές ή ομόζυγα (a, a) για το υπολειπόμενο αλληλόμορφο, ή ετερόζυγα (A, a) ως προς το αλληλόμορφο γονίδιο (Εικ. 8). Τα γονίδια φέρουν το DNA του οργανισμού, δηλαδή φέρουν πληροφορίες για την παραγωγή γονιδιακών προϊόντων (πρωτεΐνες), είναι υπεύθυνα για την κληρονομικότητα των χαρακτήρων, έχουν δομικό και λειτουργικό ρόλο στο κύτταρο. Κάθε ζεύγος γονιδίων μπορεί να αποτελείται από δύο επικρατή γονίδια, δύο υπολειπόμενα γονίδια ή ένα επικρατές και ένα υπολειπόμενο γονίδιο.

Ανάμεσα στους ανθρώπους, το γονιδίωμα διαφέρει, εκτός από αυτό των ομοζυγωτικών διδύμων, με τις διαφορές να εστιάζονται τόσο στα εξώνια όσο και στις μη κωδικοποιητικές περιοχές τους. Κάποιες μεταλλάξεις οδηγούν σε πολυμορφισμούς, οι οποίοι όταν υπερβαίνουν το 1% δημιουργούν γενετικούς πολυμορφισμούς, ενώ κάτω του 1% δημιουργούν τα σπάνια αλληλόμορφα, αφήνοντας ένα 0.02 % να ευθύνεται για τις φυσιολογικές διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στους ανθρώπους, όπως χρώμα ματιών, χρώμα μαλλιών και ομάδα αίματος, ενισχύοντας έτσι τη γενετική ποικιλότητα στον πληθυσμό, απαραίτητη για την εξέλιξη στον πλανήτη. Πολλές κληρονομικές ασθένειες είναι συνέπεια μεταλλάξεων. Τα χρωμοσώματα του ανθρώπου διαφέρουν μεταξύ τους σε μέγεθος και αποτελούνται από μερικές εκατοντάδες ως και 2 εκατομμύρια βάσεις DNA.

2.1.2. Αντιγραφή γενετικού υλικού και επιδιόρθωση λαθών

Με την αντιγραφή του γενετικού υλικού διασφαλίζεται η εκπληκτική ακρίβεια (πιστότητα) του DNA, με τη βοήθεια του κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων (A-T, G-C και αντίστροφα) και με τον επιδιορθωτικό ρόλο που έχουν οι DNA πολυμεράσες.

Οι DNA πολυμεράσες, ένζυμα που ένας από τους ρόλους τους είναι να επιδιορθώνουν λάθη που προκύπτουν κατά παράβαση του κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Μπορούν να αναγνωρίζουν και να απομακρύνουν νουκλεοτίδια που οι ίδιες τοποθέτησαν, κατά παράβαση του κανόνα συμπληρωματικότητας (A-T), (G-C) και τα αντικαθιστούν ενσωματώνοντας στη θέση τους, τα αντίστοιχα συμπληρωματικά. Όμως, αυτό έχει ως αποτέλεσμα ανά 100.000 νουκλεοτίδια, ένα νουκλεοτίδιο να ενσωματώνεται λάθος. Έτσι με τη βοήθεια άλλων ειδικών επιδιορθωτικών ενζύμων μπορεί να επιδιορθώνεται εκ νέου, σε μεγάλο ποσοστό, ένας αριθμός λαθών που δεν αντικαταστάθηκαν εν τέλει από τις DNA πολυμεράσες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο αριθμός των λαθών κατά την αντιγραφή τελικά να περιορίζεται για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς στο ένα λανθασμένα τοποθετημένο νουκλεοτίδιο ανά 10^{10} βάσεις. Οπότε με αυτό τον τρόπο πιθανόν και να προκύπτει μια μετάλλαξη, με επιπτώσεις ανάλογες με τη θέση που βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία, και έχει τοποθετηθεί εκεί ένα μη συμπληρωματικό νουκλεοτίδιο

2.1.3. Ορισμός Μεταλλάξεων

Με τον όρο μετάλλαξη ορίζουμε μια μόνιμη αλλαγή στην αλληλουχία ή στον αριθμό των νουκλεοτιδίων (Εικ. 9) στο γονιδίωμα ενός οργανισμού.

2.1.4. Προέλευση Μεταλλάξεων

Οι μεταλλάξεις χωρίζονται σε αυτές που κληρονομούνται από τη μια γενιά στην άλλη διότι συμβαίνουν στα γενετικά κύτταρα (ωάριο, σπερματοζωάριο), και σε αυτές που μπορεί να προκληθούν κάποια στιγμή στη ζωή ενός ατόμου (επίκτητες μεταλλάξεις) από τον οποιοδήποτε λόγο. Αν και οι περισσότερες μεταλλάξεις κατά κανόνα συμβαίνουν κυρίως στα σωματικά κύτταρα, αφού έτσι και αλλιώς είναι και πολύ περισσότερα αριθμητικά στον οργανισμό. Οι μεταλλάξεις αυτές δε μεταβιβάζονται στους απογόνους. Οι επίκτητες μεταλλάξεις δεν μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά, εκτός και εάν εντοπιστούν σε εκείνο το γαμέτη (σπερματοζωάριο/ωάριο) που συμβάλλει στη δημιουργία ενός ζυγωτού.

2.1.5. Αιτίες Μεταλλάξεων

Μια μετάλλαξη μπορεί να προκύψει λόγω βλάβης του DNA από περιβαλλοντικούς ή χημικούς παράγοντες, ακτινοβολίες. (π.χ. UV ακτινοβολία, κοσμική ακτινοβολία κ.α.) ή και λόγω γενετικών φαινομένων (π.χ. ανασυνδυασμός), ή λάθη κατά την αντιγραφή (όπως προαναφέρθηκε). (28)

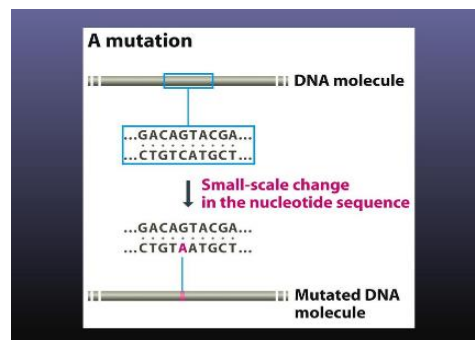
Μετάλλαξη μπορεί να προκύψει :

1. Διμερή Θυμίνης

Η υπεριώδης ακτινοβολία (μέγιστη απορρόφηση των νουκλεϊκών οξέων στα 260 nm). προκαλεί μοριακές αλλοιώσεις που δημιουργούν *διμερή Θυμίνης* ή πυριμιδίνης (κυτοσίνη, θυμίνη) (Εικ. 10) ανάμεσα σε γειτονικές βάσεις θυμίνης ή κυτοσίνης με αποτέλεσμα την αύξηση σφαλμάτων κατά την αντιγραφή του DNA.

Εικόνα 1 Μια μετάλλαξη βάσης

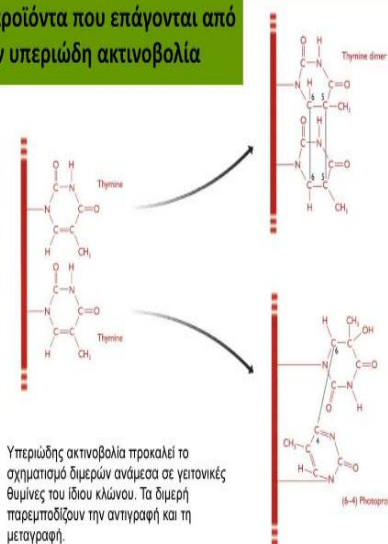
<https://slideplayer.gr/slide/12101417/>



Εικόνα 9 Διμερή Θυμίνης

Πηγή <https://slideplayer.gr/slide/12101417/>

Φωτοπροϊόντα που επάγονται από την υπεριώδη ακτινοβολία



Υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί το σχηματισμό διμερών ανάμεσα σε γειτονικές θυμίνες του ίδιου κλώνου. Τα διμερή παρεμποδίζουν την αντιγραφή και τη μεταγραφή.

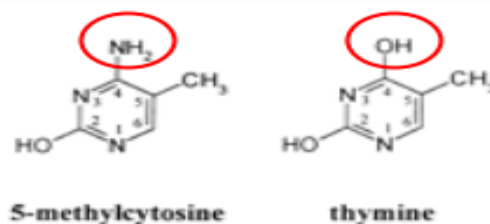
Η κύρια αιτία του μελανώματος είναι η έκθεση στο UV. Το Xeroderma pigmentosum, είναι μια σπάνια ασθένεια, αποτέλεσμα της αδυναμίας επιδιόρθωσης των διμερών της θυμίνης. Τα διμερή παραμένουν και παρεμποδίζουν την αντιγραφή του DNA.

- 2. Μεθυλιωμένες Κυτοσίνες

Όταν μεθυλιωμένες κυτοσίνες απαμινωθούν σε θυμίνες.(Εικ. 11)

Εικόνα 10 Μεθυλιωμένες Κυτοσίνες

Πηγή <https://slideplayer.gr/slide/12101417/>

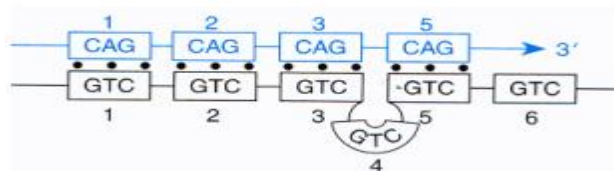


- 3. Ελλείψεις ή Ενθέσεις βάσεων

Όταν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες προκαλέσουν ελλείψεις ή ενθέσεις (deletions – insertions).(Εικ. 12)

Εικόνα 11 Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ελλείψεις-ενθέσεις

<https://slideplayer.gr/slide/12101417/>



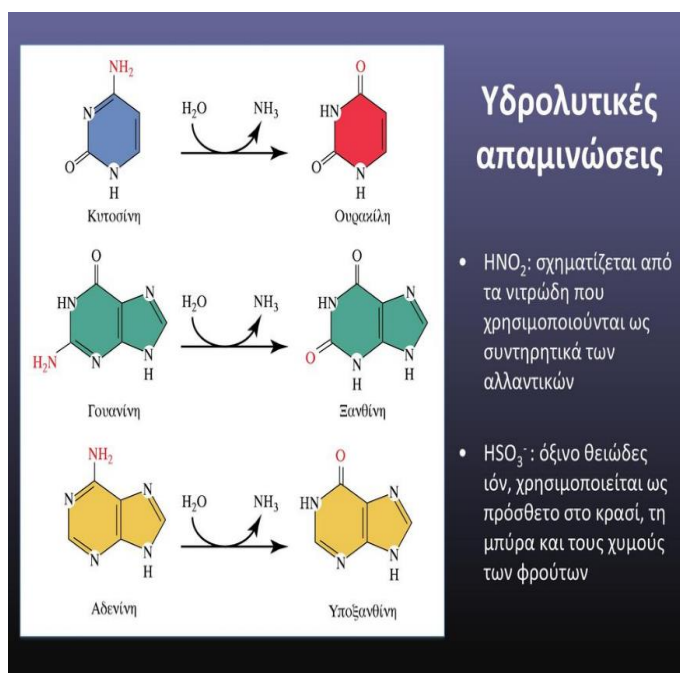
Εικόνα 12 Υδρολυτικές απαμινώσεις

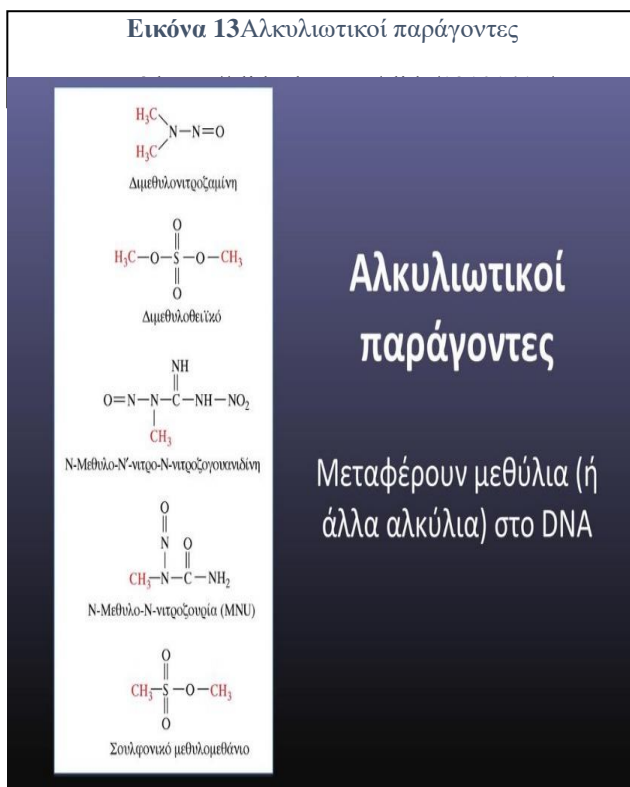
Πηγή <https://slideplayer.gr/slide/12101417/>

- 4. Υδρολυτικές απαμινώσεις

Λόγω Υδρολυτικών απαμινώσεων όπου προκύπτουν νιτρώδη και όξινα θειώδη ιόντα που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά αλλαντικών και ως πρόσθετα στο κρασί, στη μύρα και τους χυμούς φρούτων.

Η Κυτοσίνη© μετατρέπεται σε Ουρακίλη(U), η Γουανίνη(Γ) σε Ξανθίνη και η Αδενίνη(A) σε Υποξανθίνη (Εικ. 13)





- 5.: Αλκυλιωτικοί παράγοντες

Λόγω Αλκυλιωτικών Παραγόντων όταν μεταφέρονται μεθύλια ή άλλα αλκύλια στο DNA(Εικ. 14)

2.2 ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ – ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Τρεις κανόνες καθορίζουν το γενετικό κώδικα.

Ο πρώτος καθορίζει ότι τα κωδικόνια ‘διαβάζονται’ με κατεύθυνση 5’ προς 3’στην αλληλουχία των βάσεων.

Σύμφωνα με τον δεύτερο κανόνα τα κωδικόνια είναι συνεχή και μη επικαλυπτόμενα.

Ο τρίτος κανόνας λέει ότι η πληροφορία μεταφράζεται σύμφωνα με ένα σταθερό πλαίσιο ανάγνωσης το οποίο και καθορίζεται από το κωδικόνιο έναρξης (5’ATG3’) που εδράζεται στο 5’ άκρο της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του πεπτιδίου.

Οι σημειακές μεταλλάξεις έχουν την ιδιότητα να μπορούν να αλλάζουν την κωδικοποιούσα αλληλουχία του γονιδίου με διαφορετικό αποτέλεσμα κάθε φορά.

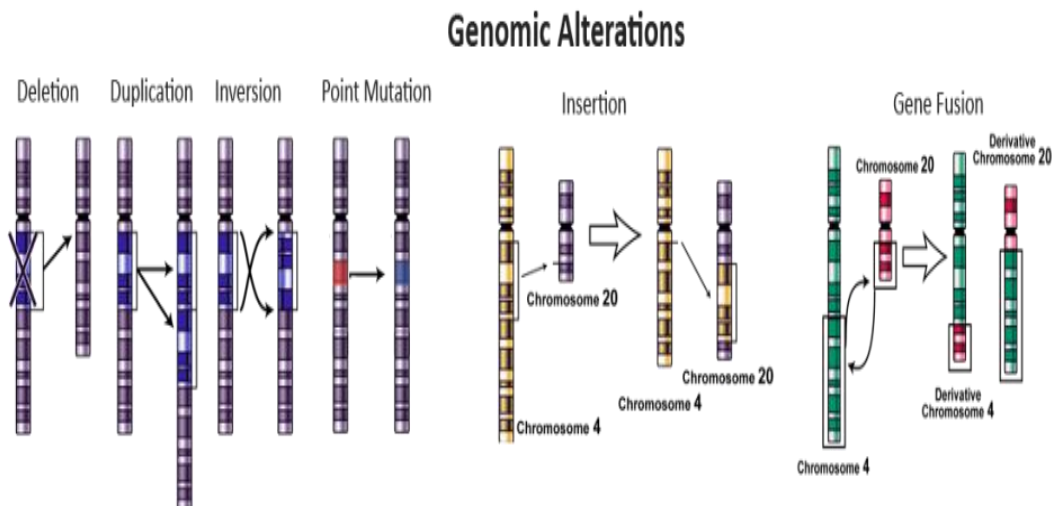
Τις μεταλλάξεις τις κατατάσσουμε ανάλογα με την έκτασή τους σε δύο κατηγορίες. Στις γονιδιακές και στις χρωμοσωμικές μεταλλάξεις.

2.2.1. Γονιδιακές Μεταλλάξεις

- Στις γονιδιακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων (αντικατάσταση, διπλασιασμό, προσθήκη ή έλλειψη μικρού αριθμού βάσεων)

Εικόνα 14 Γονιδιακές μεταλλάξεις

Πηγή <https://complit.gr/gonidiakes-metalaxeis/?lang=el>



(Εικ.15) και προκύπτει ποιοτικός γενετικός πολυμορφισμός, με ποιο συχνές τις υποκαταστάσεις του ενός νουκλεοτιδίου (SNP)

Εικόνα 15 Σιωπηλή μετάλλαξη

Πηγή <https://slideplayer.gr/slide/13192820/>



Με την αντικατάσταση μιας βάσης προκύπτει :

1. Σιωπηλή Μετάλλαξη

Μία νέα τριπλέτα νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί το ίδιο αμινοξύ (δημιουργία συνώνυμου κωδικονίου) και προκύπτει μία σιωπηλή μετάλλαξη.

Για παράδειγμα μία αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της αδενίνης (A) από την γουανίνη (G) (Εικ. 16) και παρόλα αυτά δεν προκύπτει αλλαγή στο αμινοξύ (GLU) λόγω σιωπηλής μετάλλαξης.

2.Ουδέτερη Μετάλλαξη

Μπορεί να προκύψει ένα διαφορετικό αμινοξύ, χωρίς όμως αυτό να διαφοροποιεί σημαντικά τη δομή της πρωτεΐνης, οπότε δεν μεταβάλλεται και η λειτουργικότητά της, δηλαδή προκύπτει μία ουδέτερη μετάλλαξη.

3.Αντικατάσταση κωδικονίου – παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή ('missense mutation')

Λόγω της αλλαγής ενός κωδικονίου ενδέχεται να αλλάξει και η δομή της πρωτεΐνης με συνέπεια να αλλάξει και η λειτουργικότητά της (συνήθως χάνεται ή μειώνεται). Μία τέτοια αλλαγή καλείται παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή (missense mutation)

Όπως η περίπτωση της αιμοσφαιρίνης Α, (Εικ. 17), όπου έγινε αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος (Glu) στην 6^η θέση της β' πολυπεπτιδικής αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης από τη βαλίνη (Val), αφού το κωδικόνιο GAG διαφοροποιήθηκε σε GTG, με την αντικατάσταση της αδενίνης (A) σε θυμίνη (T), γεγονός που οδήγησε στην αλλαγή της στερεοδιάταξης της Αιμοσφαιρίνης Α και κατά συνέπεια προέκυψε ασθένεια (Δρεπανοκυτταρική αναιμία). (Sickle-cell anemia)

Εικόνα 16 Αντικατάσταση μιας βάσης
(Δρεπανοκυτταρική αναιμία)

Πηγή
<https://slideplayer.gr/slide/13192820/>

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ: ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

HBB Sequence in Normal Adult Hemoglobin (Hb A):

Nucleotide	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT
Amino Acid	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser
	3			6			9

HBB Sequence in Mutant Adult Hemoglobin (Hb S):

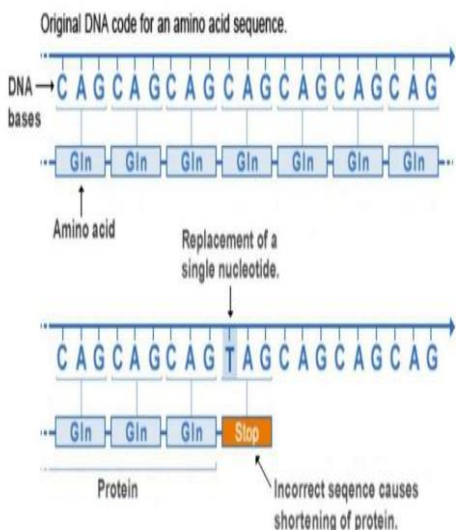
Nucleotide	CTG	ACT	CCT	GTG	GAG	AAG	TCT
Amino Acid	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	Lys	Ser
	3			6			9

4. Πρόωρο κωδικόνιο λήξης- *nonsense ή stop mutation*

Εικόνα 17 Αντικατάσταση μιας βάσης

<https://slideplayer.gr/slide/13192820/>

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ : ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ



Όταν διαφοροποιηθεί το κωδικόνιο λήξης της αλυσίδας συνήθως η μετάλλαξη θεωρείται πιο σοβαρή. Είναι γνωστή ως *ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη (nonsense) ή τερματική μεταλλαγή (stop mutation)*

Μπορεί να προκύψει ένα νέο κωδικόνιο λήξης (πρόωρο) (Εικ. 18) πιο νωρίς στην αλληλουχία των βάσεων παράγοντας ένα ημιτελές πολυπεπτίδιο όπου επηρεάζει και τη μετάφραση, λόγω πρόωρου τερματισμού της αλυσίδας καταστρέφοντας έτσι πιθανόν τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Ανάλογα με τη θέση μεταλλαγής μέσα στην αλυσίδα αξιολογείται πόσο σημαντική ή όχι είναι η μετάλλαξη.

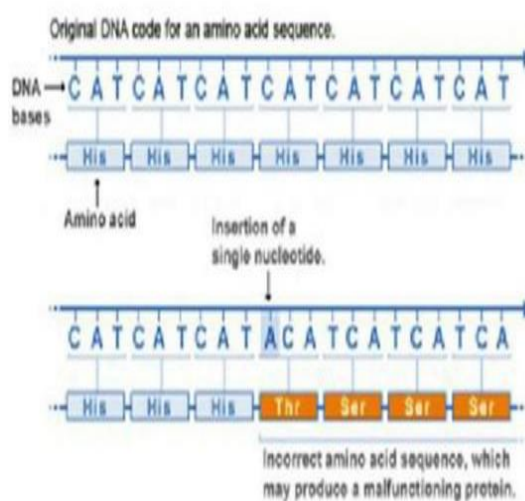
5. Μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης- *frameshift mutation*

Αν αντικατασταθεί κάποιο από τα τρία νουκλεοτίδια του κωδικονίου έναρξης (5'ATG3') οπότε και σταματάει να υφίσταται κωδικόνιο έναρξης στο γονίδιο, ή αν προκύψει νέο κωδικόνιο έναρξης σε διαφορετική θέση, μετατοπισμένο σε πιο πριν ή σε πιο μετά θέση στην αλληλουχία, πιθανόν να αλλάξει και το πλαίσιο ανάγνωσης της μετάφρασης, (Εικ. 19) δηλαδή γίνεται μία «Μεταλλαγή μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης» (*frameshift mutation*). Επίσης μπορούν να προκύψουν από ενθέσεις ή ελλείψεις ζεύγους ή μικρού αριθμού ζευγών βάσεων (όχι όμως πολλαπλάσιου του τρία)

Εικόνα 18 Προσθήκη μιας βάσης στην αλληλουχία

Πηγή <https://slideplayer.gr/slide/13192820/>

Insertion mutation



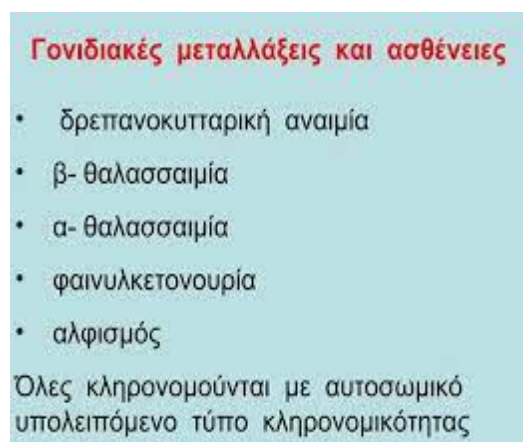
6. Προσθήκη ή έλλειψη μικρού αριθμού βάσεων

Κατά την Προσθήκη ή Έλλειψη αριθμού βάσεων, πολλαπλάσιο του τρία, επηρεάζεται μόνο εκείνο το συγκεκριμένο κωδικόνιο που προκύπτει η αλλαγή. Για το πόσο θα επηρεαστεί η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης παίζει ρόλο πόσο μακριά ή πόσο κοντά στο ενεργό κέντρο προκύπτει αυτή η διαφοροποίηση. Αν η προστιθέμενη τριπλέτα είναι ένα από τα τρία κωδικόνια λήξης τότε θα έχουμε πρόωρο τερματισμό. Μπορεί επίσης με την προσθήκη τριπλέτας να προκύψει νέο κωδικόνιο έναρξης πριν από το είδη υπάρχον κωδικόνιο στην αλυσίδα, οπότε και πάλι επηρεάζεται η έκφραση του γονιδίου ανάλογα κάθε φορά.

Αν όμως ο αριθμός των βάσεων δεν είναι πολλαπλάσιος του τρία, τότε οι νέες ‘τριπλέτες’ που δημιουργούνται από εκεί και πέρα διαφοροποιούνται, αλλάζοντας εξ ολοκλήρου το αναγνωστικό πλαίσιο της αλυσίδας, με τον ανάλογο αντίκτυπο πάντα κάθε φορά στην πρωτεΐνη που προκύπτει. (29)

Εικόνα 19 Γονιδιακές μεταλλάξεις και ασθένειες

Πηγή <https://slideplayer.gr/slide/3096103/>



Γονιδιακές μεταλλάξεις και ασθένειες

- δρεπανοκυτταρική αναιμία
- β-θαλασσαιμία
- α-θαλασσαιμία
- φαινυλκετονουρία
- αλφισμός

Όλες κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας

Πολλές νόσοι σχετίζονται με γονιδιακές (σημειακές) μεταλλάξεις, (Εικ. 20) με τις πιο συχνές μέσα στον πληθυσμό να είναι η Δρεπανοκυτταρική αναιμία, η β-θαλασσαιμία, η φαινυλκετονουρία, ο αλφισμός η κυστική ίνωση που κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας.

2.2.2. Χρωμοσωμικές Μεταλλάξεις

Οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις, συνήθως σχετίζονται με μεγάλης έκτασης αλλαγές στην αλληλουχία του DNA και επηρεάζουν ένα μέρος ή ολόκληρο το χρωμόσωμα. Προκαλούν μη φυσιολογική μορφολογία ή μη φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων και είναι ορατές στον καρυότυπο του ατόμου.

Διακρίνονται σε:

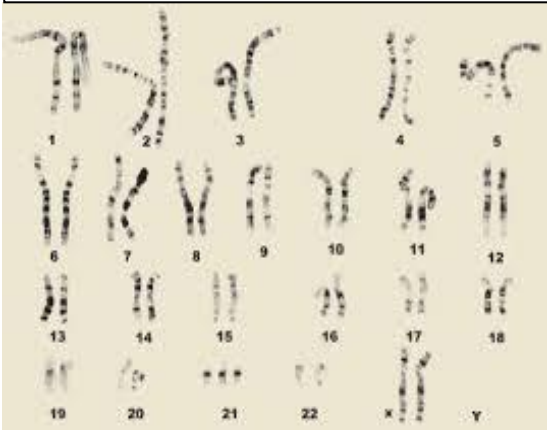
1. Αριθμητικές χρωμοσωμικές

Οι μεταλλάξεις αυτές ευθύνονται για αλλαγές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Οι συχνότερα εμφανιζόμενες στον άνθρωπο αφορούν τα:

- Αυτοσωμικά χρωμοσώματα, όπως το σύνδρομο Down(τρισωμία 21)(Εικ. 21), οι τρισωμίες 13 (Σύνδρομο Patau) (Εικ. 22) και τρισωμία 18 (Σύνδρομο Edwards) (Εικ.23) όπως και άλλες.

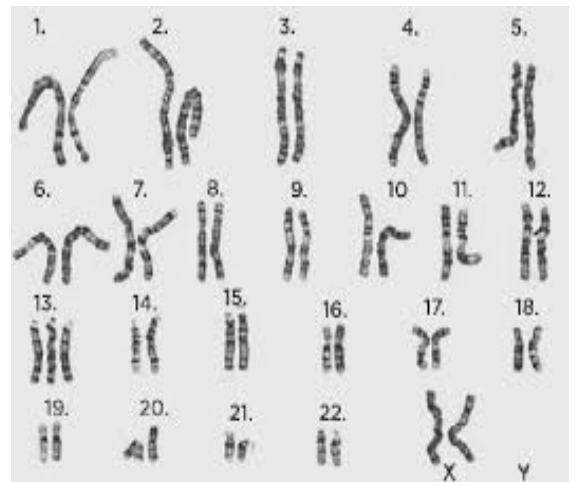
Εικόνα 20 Καρυότυπος ατόμου με Τρισωμία 21/
Σύνδρομο Down

Πηγή: <https://ndss.org/about>



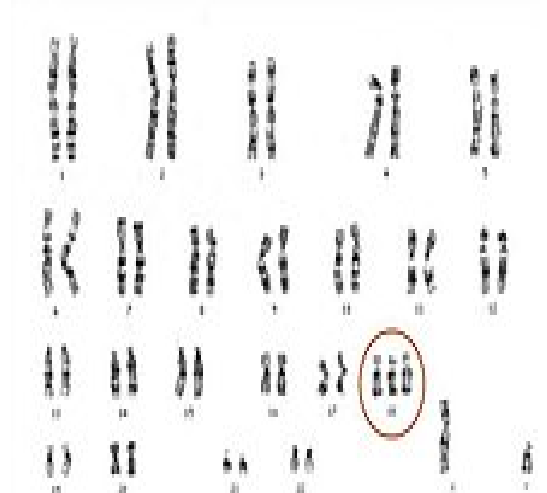
Εικόνα 21 Καρυότυπος ατόμου με Τρισωμία
13/Σύνδρομο Patau

Πηγή: https://www.genetics.edu.au/PDF/Trisomy_13_Patau_syndrome_fact_sheet-CGE.pdf



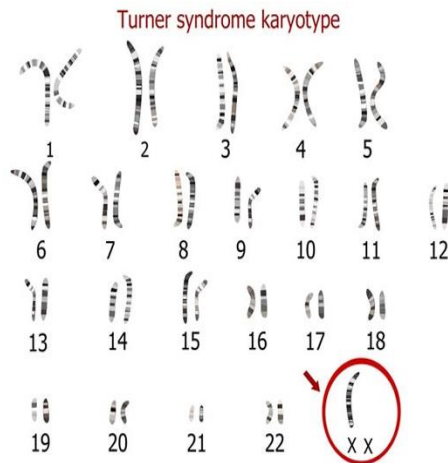
Εικόνα 22 Καρυότυπος ατόμου με Τρισωμία
18/Edwards syndrome

Πηγή : https://en.wikipedia.org/wiki/Trisomy_18



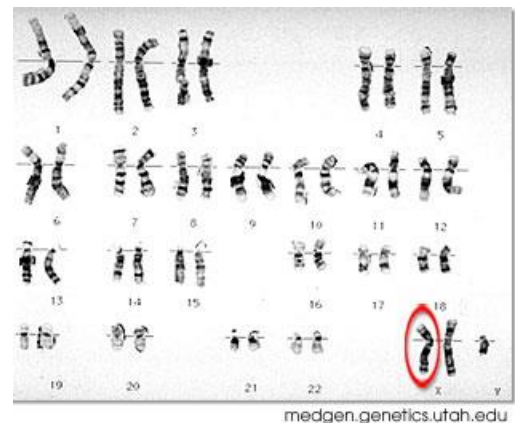
- Φυλετικά χρωμοσώματα, όπως είναι το Σύνδρομο Klinefelter (τρισωμία σε φυλετικό χρωμόσωμα (XXY) (Εικ. 25)), όπως και η μοναδική μονοσωμία που επιβιώνει ο οργανισμός και τη συναντάμε μόνο σε άτομα γένους θηλυκού και είναι η Turner (X0) (Εικ.24).

Εικόνα 23 Turner Syndrome (X0)



Εικόνα 24 Klinefelter Syndrome (XXY)

Πηγή <https://southeastmedical.com.au/mens-health/klinefelter-syndrome/>



2. Δομικές χρωμοσωμικές

Αφορούν αλλαγές στη δομή του χρωμοσώματος, αυτόματες ή εξαιτίας μεταλλαξιογόνων παραγόντων, λόγω :

1. Έλλειψης π.χ. στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (cri-du-chat),
2. Διπλασιασμού τμήματος γενετικού υλικού,
Αναστροφής ή Μετατόπισης λόγω θραύσεις τμήματος από ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα και στη συνέχεια λανθασμένη επανένωσή του, ή και
3. Αμοιβαία μετατόπιση τμήματος, με αποτέλεσμα την αλλαγή στην ποσότητα ή στη διάταξη της γενετικής πληροφορίας στα χρωμοσώματα, ή σε ολόκληρο το γονίδιο από άνισο επιχiasμό (άνιση ανταλλαγή DNA μεταξύ χρωμοσωμάτων).

Με αυτές τις χρωμοσωμικές αλλαγές μπορεί να προκύψει αύξηση ή μείωση ή αναδιάταξη της γενετικής πληροφορίας σε σχέση με το αντίστοιχο φυσιολογικό χρωμόσωμα και αυτό μπορούμε να το διαπιστώσουμε για τις δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες με τεχνικές που δημιουργούν ζωνώσεις στα χρωμοσώματα, όπως ζωνώσεις Giemsa, ενώ στις αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες το διαπιστώνουμε με μέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων με την κατασκευή καρυότυπου.

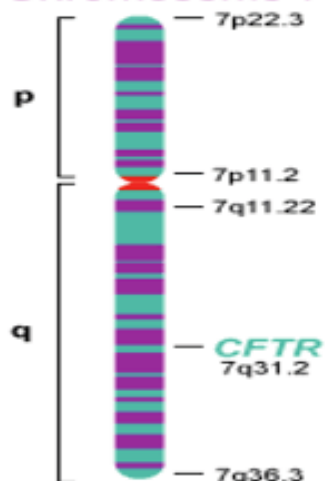
2.3 Γενετικές Διαταραχές - Ασθένειες.

Εάν μια μετάλλαξη που προκύπτει σε μια θέση στο γονίδιο (Εικ. 27) επηρεάζει τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου, τότε μπορεί να διαταράξει τη φυσιολογική ανάπτυξη του ατόμου έως και να προκληθεί ασθένεια. Μια τέτοια κατάσταση που προκύπτει από μεταλλάξεις σε ένα ή περισσότερα γονίδια, δημιουργεί γενετική διαταραχή, οπότε εάν κάποιος άνθρωπος είναι φορέας για παράδειγμα για το «γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης», σημαίνει πως φέρει μετάλλαξη στο γονίδιο CFTR που ευθύνεται για την ασθένεια, σε ένα από τα δύο αλληλόμορφα του.(Εικ.26, 27) Εάν και οι δύο γονείς είναι φορείς για το παθολογικό αντίγραφο του γονιδίου έχουν πιθανότητα 25% να φέρουν στον κόσμο ένα παιδί που θα πάσχει από κυστική ίνωση.

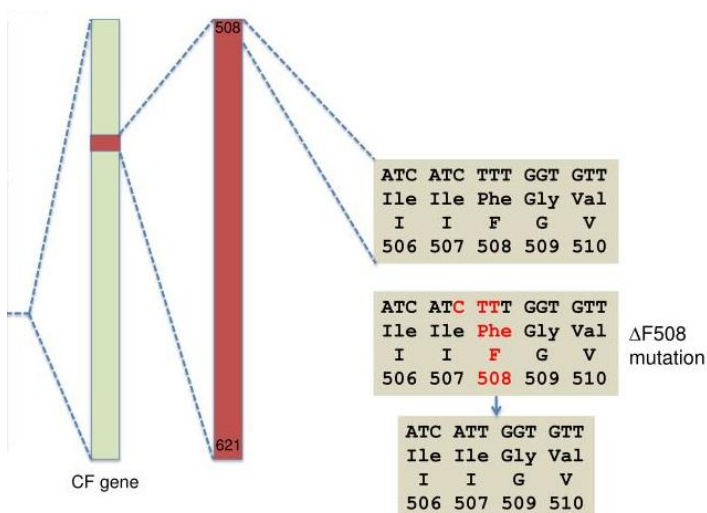
Εικόνα 26 Χρωμόσωμα 7 (CFTR 7q31.2)

Πηγή: Σηφάκης Στ. ΥΠΕΡΧΟΓΡΑΦΙΑ ΤΟΜ.14,
ΤΕΥΧ.1, ΣΕΛ. 19-30, 2017

Chromosome 7



Εικόνα 25 Βασική μετάλλαξη (ΔF 508) στο
χρωμόσωμα 7, υπεύθυνη για την ασθένεια της Κυστικής
Ίνωσης



Αντιλαμβανόμαστε την ύπαρξη μιας μετάλλαξης όταν μελετάμε την αλληλουχία ενός γονιδίου και συγκρίνουμε την αλληλουχία του με την αλληλουχία αντίστοιχων γονιδίων στον ευρύτερο πληθυσμό, λαμβάνοντας αυτά ως πρότυπα αναφοράς, οπότε και καταγράφουμε τις φαινοτυπικές συνέπειες (π.χ. παθογένεια) της μετάλλαξης.

2.2.4. Πολυμορφισμοί (SNPs)

Αρχικά η αλληλούχιση του γονιδιώματος ανάμεσα στις διαφορετικές φυλές αποκάλυψε μια εκπληκτική ομοιότητα στην αρχική δομή του DNA τους. Το γονιδίωμα όλων των ανθρώπων αποδείχθηκε σχεδόν κατά 99,9% να είναι ταυτόσημο, αναφορικά με τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων τους.

Ως βάση της ποικιλομορφίας ορίζεται η μεταβολή του αριθμού και της κατανομής των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του DNA στα χρωμοσώματα και ιδιαίτερα των υποκαταστάσεων ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) που προκύπτουν περίπου στα 290 ζεύγη βάσεων (bp). Ο αριθμός των γνωστών SNPs το 2003 ήταν στα 4 εκατομμύρια ενώ το 2007 είχε αυξηθεί σχεδόν στα 9 εκατομμύρια.

Ως πολυμορφισμός μπορεί να οριστεί μια παραλλαγή σε κάποιο γονιδιωματικό τόπο σε ένα ποσοστό ατόμων του πληθυσμού, σε ποσοστό (>1%) και υπολογίζεται σιωπηρά ως μη παθογόνος, παρ' ότι η πραγματική παθογένεια μπορεί να είναι άγνωστη, δημιουργώντας έτσι διαφορετικούς γονότυπους σε αυτόν τον πληθυσμό. Ο πολυμορφισμός μπορεί επίσης να οριστεί ως μεντελικό χαρακτηριστικό στον πληθυσμό, με τη συχνότητα του πιο σπάνιου από τα δύο αλληλόμορφα μεγαλύτερη από 1-2% .(30). (31)

1. Ορισμός

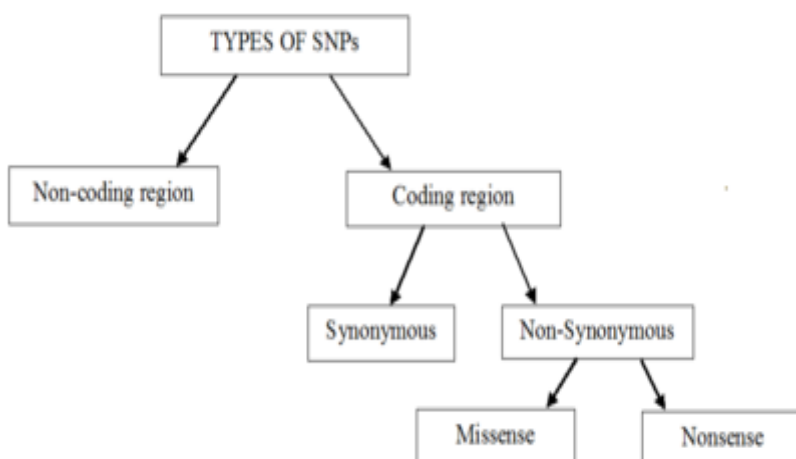
Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single-nucleotide polymorphisms-SNPs) ή αλλιώς σημειακή μετάλλαξη ενός νουκλεοτιδίου, είναι μικρές αλλαγές σε ένα συγκεκριμένο τμήμα της αλυσίδας του DNA στο γονιδίωμα, καθώς μια βάση αντικαθίσταται από μια άλλη, και εφόσον η διακύμανση υπάρχει σε περισσότερο από το 1% του πληθυσμού, αφού λιγότερο από αυτό, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια σπάνια παραλλαγή (ανώμαλη αλλαγή). Οι παραλλαγές αυτές στο DNA θα πρέπει να συνυπολογίζονται σε εφαρμογές μοριακής διάγνωσης, κατά το σχεδιασμό των εκκινητών για μια PCR ανάλυση αφού το αρχικό δείγμα DNA μπορεί να περιέχει ανάλογους πολυμορφισμούς. (32), (33)

Τα SNPs υπάρχουν φυσιολογικά στο DNA κάθε ατόμου. Υπολογίζεται πως υπάρχουν περίπου 10 εκατομμύρια SNPs στο σύνολο του ανθρώπινου γονιδιώματος. Εμφανίζονται φυσικά στο DNA όλων και προκύπτουν περίπου κάθε 300- 2000 ζεύγη βάσεων κατά μήκος όλου του γονιδιώματος. Μεταξύ των SNPs, οι μεταβάσεις (A↔G ή C↔T) είναι πιο διαδεδομένες από τις μετατροπές (A↔C ή T και G↔C ή T). (30), (31)

Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου μπορεί να εμπίπτουν σε κωδικοποιητικές αλληλουχίες γονιδίων, μη κωδικοποιητικές περιοχές γονιδίων ή στις περιοχές μεταξύ των γονιδίων. SNPs που εμφανίζονται μέσα στην κωδικοποιούσα αλληλουχία δεν διαφοροποιούν όλες τις φορές την αλληλουχία αμινοξέων της παραγόμενης πρωτεΐνης, λόγω εκφυλισμού του γενετικού κώδικα. (34)

Εικόνα 27 Τύποι μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNPs)

Πηγή https://en.wikipedia.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism



2. Συνώνυμα και μη Συνώνυμα SNPs

Στην κωδικοποιούσα περιοχή υπάρχουν δύο τύποι SNPs, τα συνώνυμα και τα μη συνώνυμα SNPs (Εικ. 28)

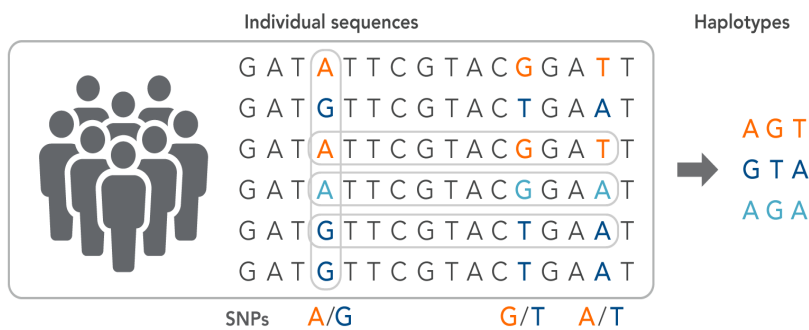
Τα συνώνυμα SNPs δεν διαφοροποιούν την αλληλουχία της πρωτεΐνης, ενώ τα μη συνώνυμα SNPs διαφοροποιούν την αλληλουχία των αμινοξέων, όπως π.χ. της Κυστικής Ίνωσης που προκαλείται από τη μετάλλαξη G542X στο γονίδιο CFTR.(35).

Οι πολυμορφισμοί και ιδιαίτερα τα SNPs, όταν εντοπίζονται συνήθως στα εξώνια τροποποιούν τα αμινοξέα που τους αντιστοιχούν μέσα στο εκάστοτε πεπτίδιο λόγω νουκλεοτιδικών αλλοιώσεων. Λόγω των πολυμορφισμών αυτών προκύπτουν πρωτεΐνες με τροποποιημένη λειτουργικότητα

3. Νουκλεοτιδικές αλλοιώσεις

Οι νουκλεοτιδικές αλλοιώσεις που αναφέρθηκαν, μπορεί να προκύψουν μετά από αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων, εισαγωγές, διπλασιασμούς, ή και συντήξεις νουκλεοτιδίων, όπως προαναφέραμε και οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο (A, T, G, ή C) από τα άλλα τρία νουκλεοτίδια μπορεί να πάρει τη θέση του στην αλληλουχία της αλυσίδας.

Εικόνα 28 Απλότυποι



Οι απλότυποι είναι ομάδες SNP που κληρονομούνται ως ένα ενιαίο μπλοκ. Ένα παράδειγμα SNPs (A ή G, G ή T, και A ή T) που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση στο γονιδίωμα. Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής, αυτά τα τρία SNPs κληρονομούνται ως ομάδα. (Εικ. 29) Επομένως, ένα άτομο μπορεί να κληρονομήσει έναν από τους τρεις διακριτούς απλότυπους (AGT, GTA, AGA) ανάλογα με το προφίλ SNP των γονέων του.

4. Μοριακά χαρακτηριστικά - Γενετικοί δείκτες

Μοναδικά μοριακά χαρακτηριστικά ανακαλύπτονται μετά από μελέτη της μοριακής δομής των πολυμορφισμών, συμπεριλαμβανομένων και των SNPs, εξειδικευμένα για κάθε άτομο, ενώ οι περισσότεροι από αυτούς δεν επηρεάζουν άμεσα την υγεία ή την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Οι παραλλαγές που προκύπτουν στις αλληλουχίες του DNA, όπου ένας ή περισσότεροι μαζί «μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί» (SNPs) αξιοποιούνται ως γενετικοί δείκτες προκειμένου να διερευνηθούν διατομικές διαφορές σχετικά με την ανταπόκριση σε μια φαρμακευτική αγωγή και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, τα εμβόλια ή τις πιθανότητες εκδήλωσης συγκεκριμένων πολυπαραγοντικών παθήσεων, όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι μεταβολικές διαταραχές, αυτοάνοσα νοσήματα, η ουρική αρθρίτιδα καθώς και για τη λήψη εξατομικευμένης

θεραπείας, ιατρικής (36-41), την ευαισθησία μας απέναντι σε εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως τοξίνες) και το πόσο επιρρεπείς είμαστε σε μολύνσεις, υποδεικνύοντας τη βιοχημική μοναδικότητα του ατόμου.

Έτσι μελετώντας τα SNPs στον ανθρώπινο οργανισμό δύναται να φτιαχτούν γονιδιωματικοί χάρτες στους οποίους ομαδοποιούνται αλληλουχίες DNA αναφορικά με ασθένειες, ώστε ένα μόνο SNP να μπορεί να αναγνωρίσει πολλά συνδεδεμένα SNP, συνεισφέροντας έτσι υπέρ των ασθενών. (42)

Το ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να περιέχει εκατομμύρια SNPs, και φαίνεται πως τα περισσότερα από αυτά εμφανίζονται στις μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος. (44) Πάνω από το 95% των SNPs ανακαλύφθηκαν από το SNP Consortium (TSC) και το δημόσιο Πρόγραμμα Ανθρώπινου Γονιδιώματος (HGP). (42)

Μεταλλάξεις ενός νουκλεοτιδίου δίνουν τέτοια γονίδια όπως το EGFR, TP53, KRAS, FLT3 καθώς και άλλα που εμπλέκονται σε παθογένειες σχετικές με καρκίνο του πνεύμονα, όγκο του παχέος εντέρου, κακοήθειες του αίματος. Έτσι ανάλογη θα πρέπει να είναι τόσο η πρόγνωση όσο και η θεραπευτική ανταπόκριση των ασθενών. Τέτοιου τύπου μεταλλάξεις δηλώνουν άμεσα την παρουσία καρκινικών κυττάρων. Μπορούμε λοιπόν να αξιοποιήσουμε τις μεταλλάξεις αυτές ως βιοδείκτες, είτε κατά τη διάρκεια μιας θεραπείας είτε σαν συνοδευτική διάγνωση σε μια μοριακή θεραπεία. (43-48)

Η εμφάνιση τέτοιων μεταλλάξεων υποδηλώνει άμεσα την παρουσία ή και υπολείμματα καρκινικών κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας τέτοιων υπολειμματικών ασθενειών καθώς και στη συνοδευτική διάγνωση για τη μοριακή θεραπεία μπορούν οι μεταλλάξεις να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες.

2.2.5. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Το 1995 το Εθνικό Ινστιτούτο του Ανθρώπινου Γονιδιώματος σε συνεργασία με τα εργαστήρια του Ηνωμένου Βασιλείου, της Γαλλίας, Γερμανίας, Ρωσίας και Ιαπωνίας ξεκίνησαν το πρόγραμμα για το «Ανθρώπινο Γονιδίωμα» όπου δημιουργήθηκαν αλληλουχικοί χάρτες και αποκωδικοποιήθηκε η ακριβής πρωτοταγής αλληλουχία των νουκλεοτιδίων σε όλο το μήκος του μορίου του DNA. Αρχικά είχε σχεδιαστεί να ολοκληρωθεί σε 15 χρόνια, αλλά μια πρώτη έκδοση του ανθρώπινου γονιδιώματος

ανακοινώθηκε τον Ιούνιο του 2000 με τη συμμετοχή 1100 επιστημόνων από 160 ερευνητικά κέντρα, και δημοσιεύτηκε στο «Nature» (Feb 15, 2001)

Το Ινστιτούτο Μελέτης Ανθρώπινου Γονιδιώματος (ΗΠΑ) τον Οκτώβριο του 2002 ξεκίνησε ένα Διεθνές Πρόγραμμα Χαρτογράφησης Απλοτύπων («Haploid Map») στο οποίο βασίστηκε η μελέτη των γενετικών πολυμορφισμών με πρωτοβουλία μια διεθνούς επιστημονικής κοινοπραξίας αποτελούμενη από 200 ερευνητές από διάφορες χώρες (ΗΠΑ, Ηνωμένο Βασίλειο, Καναδά, Ιαπωνία, Κίνα, Νιγηρία), με στόχο να δημιουργηθεί ένας «γενωμικός χάρτης επόμενης γενιάς», βασιζόμενος στην κατανομή των μονονουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων (SNPs) στο απλοειδές γονιδίωμα των 23 ανθρώπινων χρωμοσωμάτων, περιγράφοντας τα κοινά μοτίβα των ανθρώπινων γενετικών παραλλαγών.(49)

Η πλήρης αλληλούχιση ολοκληρώθηκε τον Απρίλιο του 2003 με την πλειονότητα των γονιδίων (περίπου 2,9 δισεκατομμύρια ζ. β.) να βρίσκονται στις ευχρωματικές χρωμοσωμικές περιοχές. Ενώ υπολογίζεται ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται 46 ανθρώπινα χρωμοσώματα (22 ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων και 2 φυλετικών) τα οποία φιλοξενούν σχεδόν 3 δισεκατομμύρια βάσεων DNA που περιλαμβάνει περίπου 20.500 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες . Οι περιοχές κωδικοποίησης αποτελούν λιγότερο από το 5% του γονιδιώματος (η λειτουργία του υπόλοιπου DNA δεν είναι σαφής) και ορισμένα χρωμοσώματα έχουν υψηλότερη πυκνότητα γονιδίων από άλλα. Περίπου τα 20000 από αυτά έχουν ταυτοποιηθεί και τα 11000 έχουν χαρτογραφεί σε χρωμοσώματα. Το πρώτο ζευγάρι ανθρώπινων χρωμοσωμάτων φέρει 3140 γονίδια, 950 ψευδογονίδια (δεν έχουν την ικανότητα της έκφρασης λόγω μεταλλάξεων) και 350 κληρονομικές ασθένειες και κακοήθειες νεοπλασίες που σχετίζονται με αυτά τα γονίδια. (50)

Τα γονίδια στο χρωμόσωμα X έχουν υπολογιστεί να είναι 1098 ενώ τα 99 από αυτά ελέγχουν την αναπαραγωγική λειτουργία ή έχουν σχέση με τον καρκίνο.(51)

Γονίδια (170 συνολικά) σχετίζονται με τις πιο σπάνιες κληρονομικές ασθένειες. Σχεδόν όλες οι κληρονομικές ασθένειες (περίπου 320 στο σύνολό τους) ελέγχθηκαν για ύπαρξη γονδιακών μεταλλάξεων έως το 2001, ενώ έως το 2003 περίπου 1500 ανθρώπινες ασθένειες ελέγχθηκαν για μεταλλάξεις. (52, 53)

Για να ολοκληρωθεί η διάγνωση ενός γενετικού νοσήματος είναι απαραίτητο να είναι γνωστό το υπεύθυνο για το νόσημα γονίδιο, το μέγεθός του, η αλληλουχία των βάσεων του,

το είδος της μετάλλαξης αλλά και η συχνότητα εμφάνισής της μέσα στον πληθυσμό. Έχουν χαρτογραφηθεί περισσότερα από 30.000 γονίδια με γνωστές τις αλληλουχίες των εξωνίων στα περισσότερα από αυτά στον Ανθρώπινο Γενετικό Κώδικα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την σύνθεση πάνω από 300.000 πρωτεΐνες. (54)

Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν έτσι ώστε να μπορούν να κατασκευαστούν φυλόδεντρα όπου θα είναι καταχωρημένη η χρονική και γεωγραφική εξέλιξη των ειδών καθώς και οι διάφορες μεταναστεύσεις που έχουν κάνει οι λαοί-πληθυσμοί σε βάθος χρόνου στον πλανήτη.

Έτσι η γονοτύπηση θα στοχεύει πλέον στη ταξινόμηση τμημάτων SNPs, ή και απλοτύπων SNP καθώς είναι πλέον σαφές ότι οι ανασυνδυασμοί μπορούν να διατηρήσουν αυτά τα κομμάτια απλοτύπων σε ουσιαστικές αποστάσεις. (55).

Αυτό που καθιστά τα SNPs ιδιαίτερα ελκυστικά είναι η προοπτική αυτοματοποιημένης ανάλυσης υψηλής απόδοσης αξιοποιώντας την τεχνολογία των <<μικροκυκλωμάτων>> ή της συστοιχίας. (56)

Παρόλα αυτά σχετικά με την ανίχνευση των SNPs γενικότερα, υπάρχει ποικιλία τεχνικών ανίχνευσης μεταλλάξεων που μπορούν να εφαρμοστούν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλάξεων και πολυμορφισμών που βασίζονται στην PCR

3.1 Προδιαγραφές και σημαντικά σημεία ελέγχου για την εφαρμογή μοριακών μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων / πολυμορφισμών

Η εφαρμογή μοριακών τεχνικών για ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών βρίσκει πρόσφορο έδαφος τόσο στη διάγνωση γενετικών νοσημάτων όσο και στην ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών.

Η πρόληψη επιτυγχάνεται με ανίχνευση των φορέων, δηλαδή μέσω προγεννητικού ελέγχου ή προκλινικής διάγνωσης με μοριακή ανάλυση των γενετικών ασθενειών. Σε όποιες περιπτώσεις δεν μπορούν να αξιοποιηθούν οι βιοχημικοί δείκτες για να εντοπιστούν οι φορείς των ασθενειών τότε η μοριακή διάγνωση αποκτά ιδιαίτερη αξία.

Σε ένα εργαστήριο είναι πολύ σημαντικό να μπορούν να ανιχνεύονται κλινικά τα SNPs ή οι μεταλλάξεις και αυτό πραγματοποιείται με διάφορες μεθόδους. Η ανίχνευση των διαφοροποιήσεων κατά ένα νουκλεοτίδιο είναι πολύ πιο δύσκολη σε σχέση με την ανίχνευση των πολλαπλών αλλοιώσεων. Οι τεχνικές θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες με το μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό ευαισθησίας που επιτρέπει η κάθε μέθοδος. Μπορούν να διαχωριστούν σε τεχνικές που αναγνωρίζουν γνωστές μεταλλάξεις και σε αυτές που σαρώνουν γενικότερα κατά μήκος το γονιδίωμα για οποιαδήποτε πιθανή μετάλλαξη αναγνωρίσουν στη συγκεκριμένη περιοχή στόχου. Τα SNPs μπορούμε να τα συναντήσουμε είτε σε ομόζυγη είτε σε ετερόζυγη κατάσταση στο γονίδιο. Ακόμη και στην ετερόζυγη κατάσταση το νουκλεοτίδιο που έχει αντικατασταθεί αλλά και το αρχικό βρίσκονται σε μια αναλογία ένα προς ένα στην ανάλυση.

Αρχικά γίνεται ανίχνευση της μετάλλαξης προσπαθώντας να γίνει αναγνώριση των μεταβολών που έχει υποστεί το γονίδιο, πιθανές αναδιατάξεις νουκλεοτιδίων ίσως και μεθυσίωση κάποιων βάσεων, κάνοντας χρήση διαφόρων μεθόδων γονοτύπησης και σάρωσης. (58, 59).

Αυξημένο οφείλει να είναι και το ποσοστό της ειδικότητας, αναφερόμενο πάντα στο ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Επισημαίνουμε πάλι ότι είναι πιο δύσκολο

να ανιχνευθεί η αλλοίωση μίας μόνο βάσης από τις αλλοιώσεις πολλαπλών βάσεων, έτσι οι μέθοδοι που επιλέγονται πρέπει να έχουν υψηλή ειδικότητα /επιλεκτικότητα, χωρίς να αδιαφορούμε για το κόστος της δουλειάς μας καθώς και την απόδοση.

Το ιδανικό θα ήταν στο δείγμα ανάλυσης να υπήρχε μόνο ένα τύπος νουκλεοτιδίου. Όμως στους ασθενείς (φορείς) συνήθως συνυπάρχουν και τα δύο αλληλόμορφα, το μεταλλαγμένο αλλά και αυτό του αγρίου τύπου, κάνοντας έτσι επιτακτική την ανάγκη χρήσης μεθόδων ανάλυσης τόσο με υψηλή ευαισθησία όσο και με υψηλή ειδικότητα.

Μπορεί να γίνει σάρωση μεταλλάξεων δηλαδή η αναζήτηση νέων παραλλαγών αλληλουχίας σε ένα καθορισμένο θραύσμα DNA, εκμεταλλευόμενοι τις διαφορετικές φυσικές χημικές και βιολογικές συνέπειες της παραλλαγής της αλληλουχίας του DNA που έχει προκύψει ώστε να διευκολυνθεί η σάρωση της μετάλλαξης.

Ιδανική θεωρείται εκείνη η σάρωση που μπορεί να ελέγχει τα μήκη βάσεων (kilobase) του DNA με 100% ευαισθησία και ειδικότητα και επίσης να μπορεί να καθορίζει πλήρως τη μετάλλαξη.(55) Το κόστος και ο χρόνος ανάλυσης δεδομένων παραμένουν σημαντικά εμπόδια για την κάλυψη της ζήτησης για γενετικές δοκιμές και καμία από τις τρέχουσες μεθόδους δεν πληροί όλα τα προαναφερθέντα κριτήρια.

Κατά την ανάλυση ενός θραύσματος οι περισσότερες μέθοδοι σάρωσης δεν μπορούν να προσδιορίσουν επακριβώς τη διαφοροποίηση στην αλληλουχία του DNA, παρότι κάποιες από αυτές μπορούν να ανιχνεύσουν τη θέση της μετάλλαξης. Οπότε οι περισσότερες μέθοδοι σάρωσης είναι κατάλληλες αρχικά για την ανεύρεση εκείνων των δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις. Κατόπιν γίνεται αλληλούχιση υτών των δειγμάτων προκειμένου να καθοριστεί η μετάλλαξη.

Παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή της μεθόδου σάρωσης είναι η ευαισθησία ανίχνευσης μεταλλάξεων, η καταλληλότητα για προτεινόμενο τύπο δείγματος, και για προβλεπόμενο τύπο μετάλλαξης, τα χαρακτηριστικά της αναλυθείσας αλληλουχίας DNA, ζητήματα υγείας και ασφάλειας, οι αναμενόμενες απαιτήσεις για την απόδοση δείγματος, το αρχικό κόστος για τον εξοπλισμό και το συνεχιζόμενο κόστος λειτουργίας, και απαίτηση περαιτέρω χειρισμών μετά την PCR.

3.1.1 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Ανεξαρτήτου τεχνικής που χρησιμοποιείται για ανάλυση είναι σχεδόν αδύνατο να υπάρξει τεχνική που να ανιχνεύσει το 100% των μεταλλάξεων παρότι είναι πολύ σημαντικό να ανιχνεύονται κλινικά τα SNPs ή οι μεταλλάξεις. Η ανίχνευση των διαφοροποιήσεων κατά ένα νουκλεοτίδιο είναι πολύ πιο δύσκολη σε σχέση με την ανίχνευση των πολλαπλών αλλοιώσεων, έτσι οι τεχνικές θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες ιδιαίτερα σε ένα κλινικό διαγνωστικό περιβάλλον. Παράγοντες που επηρεάζουν αυτή την ευαισθησία περιλαμβάνουν την ανάλυση θραυσμάτων, την αντιδραστικότητα ενζύμων ή χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται καθώς και χαρακτηριστικά προτύπου, όπως η αλληλουχία (π.χ. περιεκτικότητα σε G+C) το μήκος και η δευτερεύουσα δομή.(59, 61)

Η μέτρηση της ευαισθησίας είναι εμπειρική. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλά παραδείγματα πολλών μη τυφλών μελετών ή μελετών που έχουν χρησιμοποιήσει μικρές σειρές, κάτι που δυσκολεύει την διεξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά την απόδοση των διαδικασιών. Κατά τη διεξαγωγή μιας ανάλυσης προελέγχου, ο μεγάλος αριθμός ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, ευθύνεται για μειωμένη ειδικότητα και μπορεί να δημιουργήσει υπερβολική ανάλυση downstream μειώνοντας έτσι το πλεονέκτημα του προελέγχου. Επίσης κάποιες περιοχές με προσausξημένο πολυμορφισμό παράγουν μεγάλο αριθμό δειγμάτων και απαιτούν περαιτέρω ανάλυση.

3.1.2 ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ ΤΥΠΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ανάλογα με τον τύπο του δείγματος γονιδιωματικού DNA που μελετάται, προσαρμόζεται και η ανάλογη μέθοδος ανάλυσης του. Κατά την ανάλυση DNA δειγμάτων όγκων, στο μέλλον πιθανόν να απαιτείται προσausξημένη ανάλυση του, συγκρινόμενη με μια ανάλυση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος για παράδειγμα. Τα δείγματα όγκων εμφανίζουν μια σειρά προβλημάτων που παρόμοια δεν συναντώνται κατά τη μελέτη του DNA της βλαστικής σειράς. Στα δείγματα βλαστικής σειράς, μεταλλάξεις μπορεί να εμφανίζονται στο 0% (ομόζυγος ή ημίζυγος άγριος τύπος), στο 50% (ετερόζυγος) ή στο 100% (ομόζυγη ή ημιζυγωτικού τύπου μετάλλαξη) του συνολικού DNA. Σε δείγματα όγκων, μεταλλάξεις μπορεί να υπάρχουν σε οποιοδήποτε ποσοστό του συνολικού DNA, λόγω απώλειας ετεροζυγωτίας, επιμόλυνσης του όγκου με περιβάλλον υλικό άγριου τύπου και μεταβλητές αναλογίες μεταλλαγμένων κυττάρων στον όγκο. Μεταλλάξεις που προκύπτουν σε μικρό

ποσοστό σε ένα δείγμα μπορούν να αναλυθούν καλλίτερα με κάποιες μεθόδους όπως την DHPLC.(62) Προκειμένου να επιτευχθεί η ανίχνευση μεταλλάξεων, πολλές μέθοδοι εξαρτώνται από τη δημιουργία ετερόπλευρου DNA. Ανάλογα με το αν οι αναμενόμενες μεταλλάξεις υπάρχει πιθανότητα να είναι σε ομοζυγωτία, ημιζυγωτία ή ετεροζυγωτία, μπορεί να είναι ή και όχι απαραίτητο, να προστεθεί 50% DNA άγριου τύπου στα δείγματα ελέγχου.

3.1.3 ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΟ ΤΥΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ

Επιπλέον δεν δύναται όλες οι μέθοδοι να ανιχνεύσουν όλους τους τύπους μεταλλάξεων. Η μέθοδος DHPLC δεν μπορεί να ανιχνεύσει με αξιοπιστία ομόζυγες μεταλλάξεις. Η ανάλυση heteroduplex (HA) ανιχνεύει εισαγωγές/διαγραφές με υψηλότερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τις υποκαταστάσεις και η δοκιμή περιστολής πρωτεϊνών (PTT), ανιχνεύει μόνο μεταλλάξεις που τερματίζουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Όταν λοιπόν το είδος της μετάλλαξης δεν είναι γνωστό, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια μέθοδος ανίχνευσης ουδέτερη απέναντι σε όλα τα είδη μετάλλαξης. Όταν κυριαρχεί μόνο ένας τύπος μετάλλαξης, σε κάποια γονίδια ίσως είναι πιο σωστό να επιλεγεί μια μέθοδος σχεδιασμένη κατάλληλα για την ανίχνευση μόνο αυτού του τύπου μετάλλαξης.

3.1.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΘΕΙΣΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA

Η ύπαρξη κοινών πολυμορφισμών στο θραύσμα μπορεί να επηρεάσει την επιλογή της μεθόδου ανάλυσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι πληροφορίες που μας παρέχονται υποδεικνύουν μόνο αν μια μετάλλαξη είναι παρούσα ή απύσα, με εξαίρεση τις μεθόδους σάρωσης που προσδιορίζουν με σαφήνεια ποια μετάλλαξη υπάρχει. Μέθοδοι όπως το DHPLC και ο φθορίζων πολυμορφισμός διαμόρφωσης ενός κλώνου (FSSCP) μπορεί να παράγουν ένα προφίλ μετάλλαξης, το οποίο, τουλάχιστον επιφανειακά, φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό για αυτή τη μετάλλαξη (63, 64), αλλά κάποια στοιχεία υποδηλώνουν ότι θα μπορούσε να είναι και αναξιόπιστο (65, 66). Έτσι, δείγματα που εμφανίζουν μια διαφοροποίηση σε σχέση με το μοτίβο του άγριου τύπου είναι συνήθως απαραίτητο να γίνει αλληλούχιση DNA. Σε περίπτωση εμφάνισης κοινού πολυμορφισμού, ένα μεγάλο ποσοστό δειγμάτων μπορεί να χρειάζεται να αναλυθεί τόσο με τη μέθοδο της σάρωσης όσο και με αλληλούχιση DNA δίνοντάς της το προβάδισμα ως την πιο κατάλληλη επιλογή.

3.1.5 ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

Εναλλακτικές τεχνικές απαιτούνται να υπάρχουν τόσο από τη νομοθεσία όσο και από την ορθή πρακτική των εργαστηρίων προκειμένου να υπάρχει η επιλογή της πιο ασφαλούς μεθόδου. Μέθοδοι ανίχνευσης μη ραδιενεργών ουσιών είναι προτιμότερες από αυτές με ανίχνευση ραδιενέργειας και οι μέθοδοι που αποφεύγουν τη χρήση τοξικών χημικών ουσιών είναι προτιμότερες από εκείνες τις μεθόδους που εξαρτώνται από τη χρήση τοξικών χημικών ουσιών.

3.1.6 ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η αύξηση της αυτοματοποίησης, η ελάττωση του χρόνου ανάλυσης και της πολυπλοκότητας, η μείωση του αριθμού των χειρισμών και η αύξηση του επιπέδου πολυπλεξίας κρίνονται αναγκαία και απαραίτητα ενώ αυξάνεται η αναμενόμενη απόδοση.(67)

3.1.7 ΑΡΧΙΚΟ ΚΟΣΤΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΚΟΣΤΟΣ ΣΥΝΕΧΟΥΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Μεγάλες επενδύσεις σε εξοπλισμό απαιτούνται αρχικά για να εγκατασταθεί μια τεχνική σε ένα εργαστήριο. Τέτοιες τεχνικές είναι το DHPLC, οι μικροσυστοιχίες καθώς και όλες οι τεχνικές που χρειάζονται φθορίζουσα σήμανση.

3.1.8 ΑΠΑΙΤΗΣΗ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΧΕΙΡΙΣΜΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ PCR

Όσο μικρότερος είναι ο αριθμός των σταδίων που απαιτείται για μια ανάλυση τόσο μειώνεται και η πιθανότητα σφαλμάτων του χειριστή. Η αυξανόμενη πολυπλοκότητα μιας τεχνικής μειώνει την απόδοση της, ενώ μειώνει και την δυνατότητα αυτοματοποίησής της. Η απαίτηση περαιτέρω αντιδράσεων μετά από μια PCR, τείνει να οδηγεί σε αυξημένο κόστος ανά γονότυπο.

3.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Οι περισσότερες μοριακές τεχνικές αξιοποιούν την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), που ανιχνεύει σημειακές μεταλλάξεις/ πολυμορφισμούς που προκαλούν γενετικές διαταραχές/ανωμαλίες με στόχο την γρήγορη και αξιόπιστη διάγνωση των γενετικών ασθενειών. Μπορούμε να ανιχνεύσουμε γνωστές μεταλλάξεις με ικανότητα ανεύρεσης της θέσης της μετάλλαξης στο γονίδιο, και ενώ αρχικά προσδιορίζεται η περιοχή της γνωστής ή άγνωστης μετάλλαξης στη συνέχεια απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση με εφαρμογή άμεσης μεθόδου για πλήρη πιστοποίηση της μετάλλαξης. Σε γονίδια με μικρό αριθμό μεταλλάξεων πολυμορφισμών για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων δεν απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

3.2.1 Ψηφιακή PCR (Digital PCR)

Η Ψηφιακή PCR είναι χρήσιμη για ανίχνευση και μελέτη παραλλαγών στις αλληλουχίες γονιδίων - όπως παραλλαγές αριθμού αντιγράφων και σημειακές μεταλλάξεις. Πραγματοποιεί άμεση ποσοτικοποίηση και ενίσχυση κλώνων νουκλεϊκών οξέων, (DNA, cDNA ή RNA).

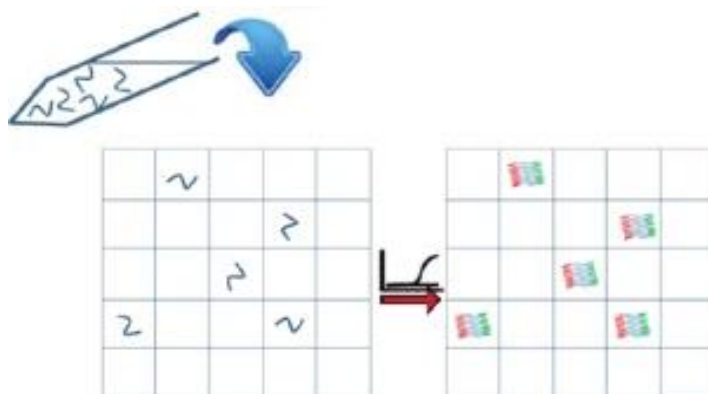
Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κλασματοποίηση του δείγματος σε μέρη ίσου όγκου μέσω πολλαπλών αραιώσεων και επιτρέπουν την πραγματοποίηση υπερευαίσθητων αντιδράσεων (nano και pico λίτρα). Το διάλυμα PCR διαιρείται σε δεκάδες χιλιάδες σταγονίδια μεγέθους νανολίτρου, και πραγματοποιείται ξεχωριστή αντίδραση PCR σε κάθε ένα από αυτά. Ο σκοπός της διαμερισματοποίησης είναι να υπάρχει ένα ή κανένα αντίγραφο της αλληλουχίας ενδιαφέροντος στο κάθε κλάσμα, οπότε μετρώντας τον αριθμό των «θετικών» κατατμήσεων (ανιχνεύσιμη αλληλουχία) έναντι των «αρνητικών» κατατμήσεων (μη ανιχνεύσιμη), οι επιστήμονες μπορούν να προσδιορίσουν ακριβώς πόσα αντίγραφα ενός μορίου DNA υπήρχαν στο αρχικό δείγμα.

Πολλές διαφορετικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαίρεση δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων πλακών μικροφρεατίων, τριχοειδών αγγείων, γαλακτώματος ελαίου και συστοιχιών μικροσκοπικών θαλάμων με επιφάνειες δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος. (68)

Μια αξιοσημείωτη εφαρμογή της ψηφιακής PCR είναι η ικανότητά της να μπορεί να διακρίνει την ύπαρξη ή όχι μιας παραλλαγής στο κάθε αλληλόμορφο ή και δύο παραλλαγές σε ένα αλληλόμορφο, χωρίς να απαιτείται κλωνοποίηση των προϊόντων PCR. Ωστόσο ο αριθμός από τα πηγαδάκια που αναλύονται καθορίζει και το όριο στην ψηφιακή PCR, κάτι που επηρεάζει και την ευαισθησία της ανάλυσης. Η ψηφιακή PCR βασίζεται στην καλή αραίωση των προτύπων DNA και όσο αυξάνεται ο αριθμός των φρεατίων που αναλύονται τόσο αυξάνεται και η ευαισθησία της ανάλυσης. Η δυνατότητα να πραγματοποιηθεί η ανάλυση σε μορφή μικροσυστοιχίας αυξάνει και την ευαισθησία της ανάλυσης. (69, 26)

Εικόνα 29 Ψηφιακή PCR

Πηγή : <https://www.nature.com/articles/nmeth.2027>



Υπερευαίσθητη και υψηλής ακριβείας μοριακή τεχνική, ανιχνεύει και ποσοτικοποιεί πολύ μικρές ποσότητες του επιθυμητού στόχου. Κατάλληλη για ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων, για να διακρίνουν τη διαφορική έκφραση αλληλόμορφων, (70) για την παρακολούθηση των ιών που μολύνουν μεμονωμένα βακτηριακά κύτταρα, (71) για την ανίχνευση εμβρυϊκού DNA στο κυκλοφορούντα αίμα (72) και για μοριακή ανίχνευση σπάνιων γενετικών μεταλλαγών.

Η ψηφιακή PCR έχει αποδειχθεί ικανή να ανιχνεύει μεταλλαγμένο DNA παρουσία 200.000 φορές περίσσειας υποβάθρου άγριου τύπου, το οποίο είναι 2.000 φορές πιο ευαίσθητο από ό, τι μπορεί να επιτευχθεί με τη συμβατική q PCR.

Ενώ η συμβατική PCR στηρίζεται στην εκθετική ενίσχυση του δείγματος και πραγματοποιεί μία αντίδραση ανά μεμονωμένο δείγμα. Η d PCR πραγματοποιεί επίσης μία αντίδραση ανά δείγμα, αλλά το δείγμα διαμερισματοποιείται και διεξάγεται ξεχωριστά η

ανάλυση για κάθε ένα του διαμέρισμα.(Εικ. 30) Αυτός ο διαχωρισμός επιτρέπει μια πιο αξιόπιστη συλλογή και ευαίσθητη μέτρηση των ποσοτήτων νουκλεϊκών οξέων.

"Αν θέλετε να διακρίνετε μεταξύ 2 και 3 αντιγράφων, χρειάζεστε 200 θαλάμους. Αν θέλετε να διακρίνετε μεταξύ 10 και 11, χρειάζεστε 8.000», εξηγεί ο Mikael Kubista.(25), (73)

3.2.2 Ανάλυση PCR με περιοριστικά ένζυμα, (Restriction Fragment Length Polymorphism) (RFLP)

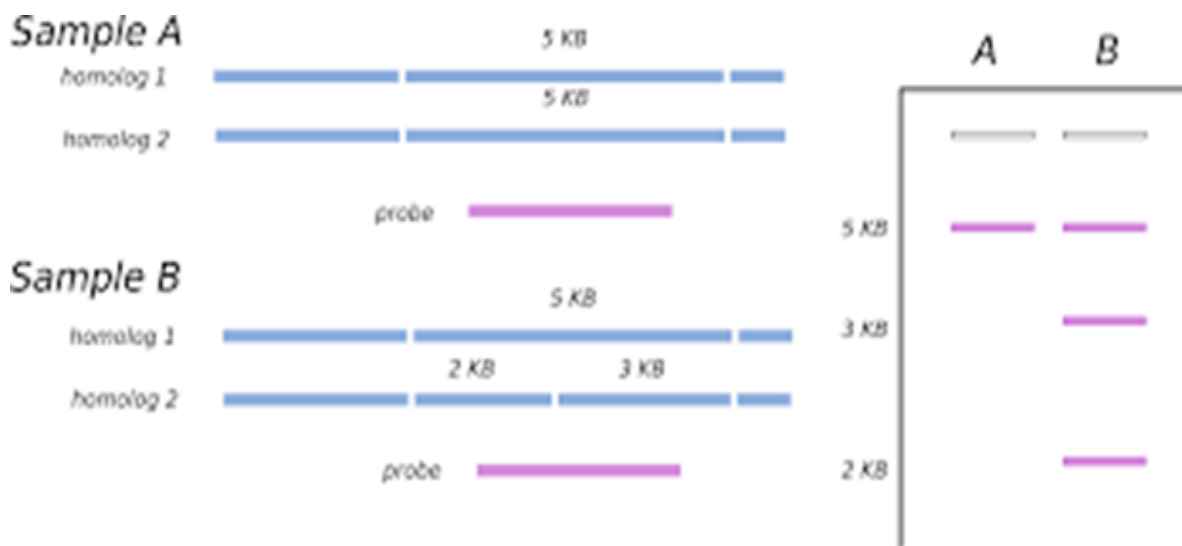
Η μέθοδος RFLP στηρίζεται στην παρουσία ή στην απουσία ενός στόχου για μια περιοριστική ενδονουκλεάση εξαιτίας του πολυμορφισμού σε μία βάση. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν τα περιοριστικά ένζυμα να επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα του μορίου του DNA σε συγκεκριμένες θέσεις κατά μήκος των βάσεων.

Μπορούμε εύκολα να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη σημειακής μετάλλαξης αφού πρώτα πολλαπλασιάσουμε το τμήμα του DNA με την υπό διερεύνηση μετάλλαξη/ πολυμορφισμό. Μετά γίνεται πέψη με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό.

Η παρουσία σημειακής μετάλλαξης δημιουργεί θέση δράσης του περιοριστικού ενζύμου το οποίο «τεμαχίζει» το αρχικό μόριο του DNA σε δύο μικρότερα κομμάτια (restriction fragments) συνήθως διαφορετικού αριθμού βάσεων. Η δράση του ενζύμου σε ετερόζυγη μετάλλαξη δημιουργεί τρία τμήματα αλληλουχιών με διαφορετικό αριθμό βάσεων ενώ επί ομοζυγωτίας τα τμήματα του DNA είναι δύο. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η παρουσία σημειακής μετάλλαξης σε ένα γονίδιο πιθανόν να καταργεί τη θέση δράσης του περιοριστικού ενζύμου με αποτέλεσμα να μη προκύπτουν τα αναμενόμενα φυσιολογικά δύο τμήματα του DNA, ενώ στους ετεροζυγώτες τα αναμενόμενα τμήματα πρέπει να είναι τρία και στους ομοζυγώτες να μένει αμετάβλητο το προϊόν της PCR (ένα τμήμα).

Εικόνα 30 Ανάλυση γονιδιώματος με περιοριστικά ένζυμα

Πηγή https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biotechnology/BioOER_%28CUNY%29/08%3A_Analyzing_DNA/8.06%3A_DNA_Fingerprinting_%28RFLP%29

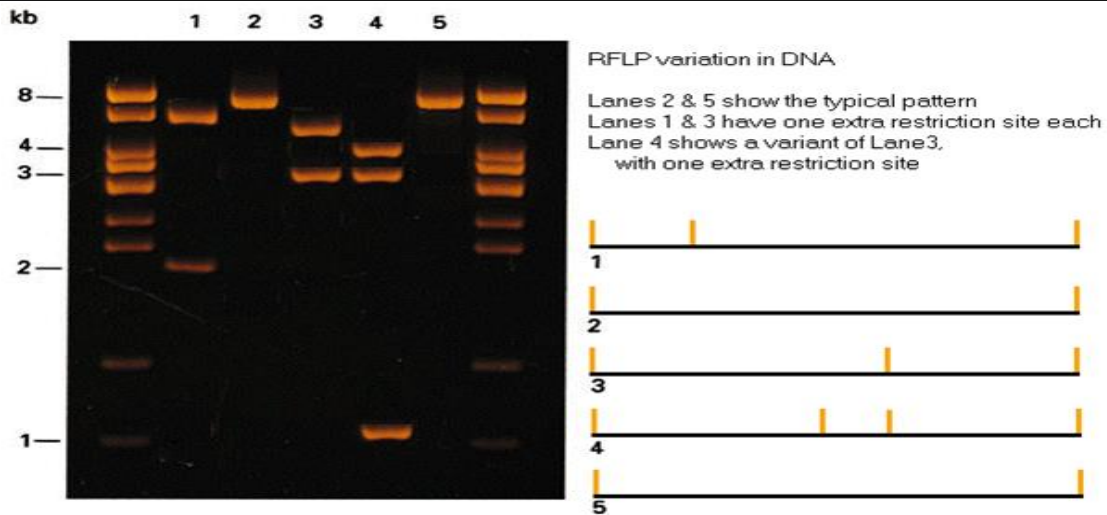


Όταν ένα δείγμα Α αποκαλύπτει μόνο μία ζώνη μετά την επεξεργασία, (Εικ. 31) εξηγείται επειδή αυτό το άτομο είναι ομόζυγο για το ίδιο αλληλόμορφο. Όταν όμως το δείγμα Β είναι ετερόζυγο τότε αυτό αποκαλύπτει τρεις ζώνες σε μια ηλεκτροφόρηση σε ένα πήκτωμα αγαρόζης.

Τα προϊόντα της επώασης στη συνέχεια αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο και τελικά με τη βοήθεια της υπεριώδους ακτινοβολίας και τη χρήση κατάλληλων δεικτών μοριακών βαρών, αξιολογούμε τα αποτελέσματα, αφού η παρουσία δύο ταινιών στην ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR του γονιδίου μετά τη δράση του περιοριστικού ενζύμου αποκλείει την παρουσία σημειακής μετάλλαξης στα άτομα που μελετήσαμε, ενώ η εμφάνιση τριών ταινιών κατά την ηλεκτροφόρηση δηλώνει την παρουσία ετερόζυγου μετάλλαξης. Έτσι διαπιστώνουμε κατά πόσο το ένζυμο κόβει τα προϊόντα PCR ή όχι στις αναμενόμενες περιοριστικές θέσεις.

Εικόνα 31 SNPs (πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου) που δημιουργούν ή καταστρέφουν θέσεις περιορισμού

Πηγή https://www.mun.ca/biology/scarr/RFLP_variation.html



Όταν τα SNPs (πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου) δημιουργούν ή καταστρέφουν θέσεις περιορισμού, (Εικ. 32) οδηγούνται σε ανίχνευση με RFLP ηλεκτροφόρηση πηκτής.

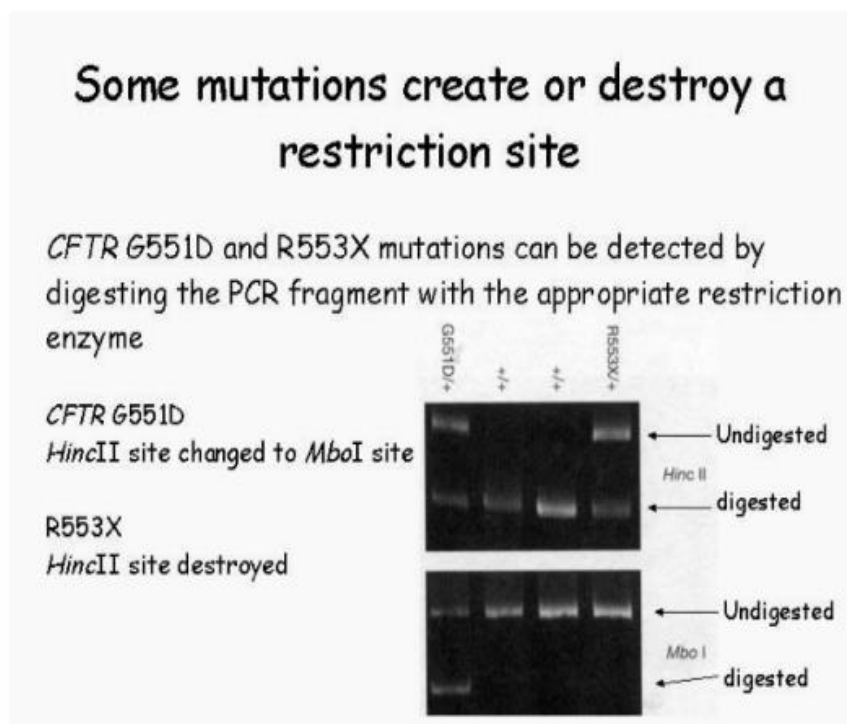
- Οι εξωτερικές λωρίδες είναι πρότυπα μοριακού μεγέθους.
- Οι λωρίδες 2 & 5 είναι το τυπικό μοτίβο ενός μεμονωμένου τμήματος 8 Kbp.
- Οι λωρίδες 1 & 3 εμφανίζουν δύο παραλλαγές που προκύπτουν από την παρουσία μιας επιπλέον τοποθεσίας περιορισμού.
- Η λωρίδα 4 δείχνει μια παραλλαγή του γονότυπου στη λωρίδα 3, λόγω επιπλέον τοποθεσίας περιορισμού.

[Οι χάρτες δεξιά της εικόνας 32 δεν μπορούν να ανακατασκευαστούν από τα δεδομένα πηκτής, αλλά θα μπορούσαν να χαρτογραφηθούν με αναφορά σε δεδομένα από άλλα περιοριστικά ένζυμα].

Για παράδειγμα οι σημειακές μεταλλάξεις που προκύπτουν μπορεί να δημιουργήσουν ή να καταστρέψουν τέτοιες θέσεις αναγνώρισης – τομής ενός περιοριστικού ενζύμου. στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη «ρυθμιστή της διαμεμβρανικής διακίνησης ιόντων» (CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) της Κυστικής Ίνωσης, η μετάλλαξη G551D καταστρέφει την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου HincII (από GTCAAC σε ATCAAC) ενώ με την αλλαγή των βάσεων που γίνεται προκύπτει μια νέα θέση αναγνώρισης από το ένζυμο MboI (από GGTC σε GATC). (74)

Εικόνα 32 Οι μεταλλάξεις G551d και R553X

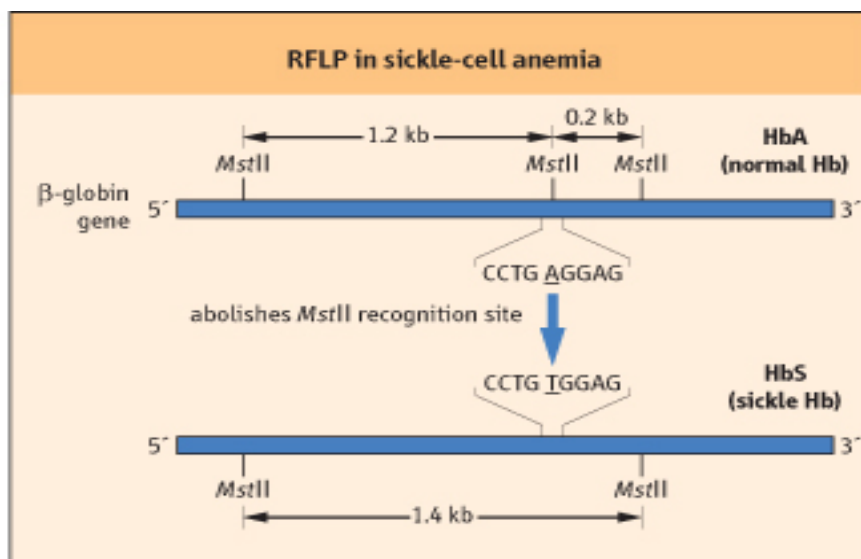
Πηγή http://www.mdche.u-szeged.hu/~kovacs/04_Genomika_1.pdf



Οι μεταλλάξεις G551D και R553X (Εικ. 33) καταστρέφουν την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου HincII. Για την G551D έτσι προκύπτει μία νέα θέση που μπορεί να κοπεί από το ένζυμο MboI.

Εικόνα 33 Ανάλυση RFLP σε δρεπανοκυτταρική αναιμία

Πηγή: <http://aris.gusc.lv/ChemFiles/MedBiochem2edBaynes07/HTML/bookcont>



Για παράδειγμα σε μια ανάλυση RFLP για ανίχνευση ύπαρξης ή όχι δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (Εικ.34) παρατηρούμε μια υποκατάσταση βάσης A>T στο κωδικόνιο 6 του γονιδίου β -σφαιρίνης(το CCTGAGGAG σε CCTGTGGAG), η οποία καταργεί μια θέση αναγνώρισης για τα ένζυμα, *Mst*II, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της παρουσίας ή της απουσίας της μετάλλαξης μελετώντας το πρότυπο RFLP.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ RFLP-PCR

Η RFLP-PCR τεχνική θεωρείται αρκετά επιλεκτική στον εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων ενώ ταυτόχρονα είναι απλή και οικονομική. Η χρήση ενδονουκλεασών (πριν την ενίσχυση της PCR ή και κατά την PCR) αυξάνοντας την πέψη, καταστέλλοντας τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου ενισχύει την μετάλλαξη.(75, 76))

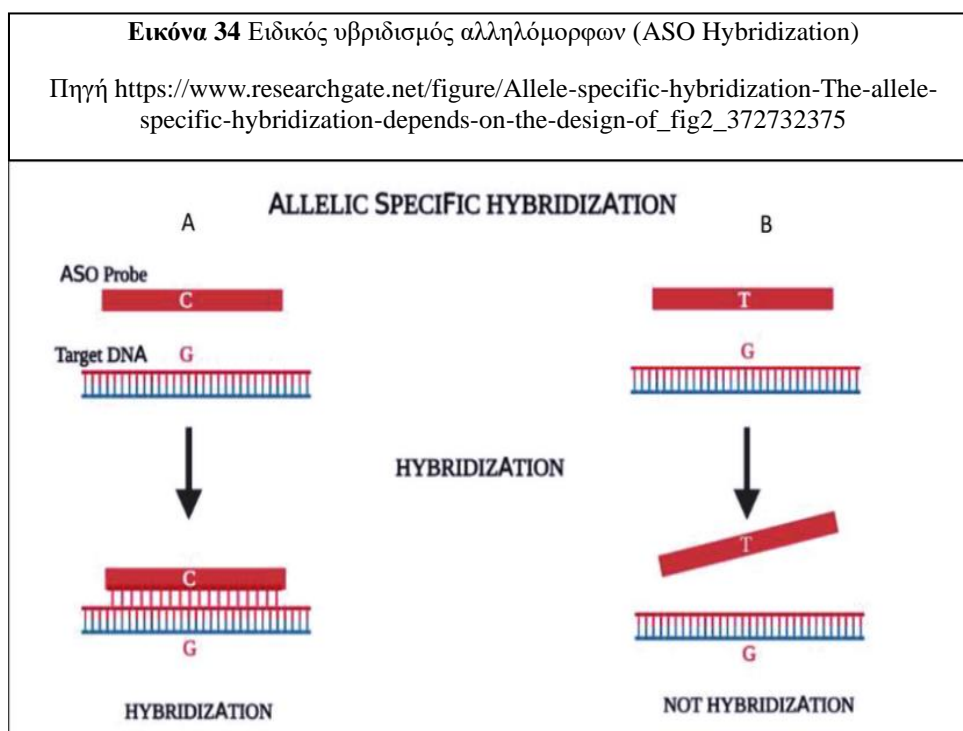
3.2.3 Υβριδισμός με συνθετικά ολογονουκλεοτίδια (ASO Hybridization).

(Allele-Specific Oligonucleotide Hybridization)

Ο υβριδισμός με συνθετικά ολογονουκλεοτίδια είναι μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γενετικών πολυμορφισμών και οποιασδήποτε σημειακής μετάλλαξης στο ανθρώπινο DNA από ανάλυση των προϊόντων PCR χρωματισμένο σε βρωμιούχο αιθίδιο πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου.

Χρησιμοποιείται σε διαγνωστικές τεχνικές με βάση το DNA που αφορούν η διάγνωση γενετικών και μολυσματικών ασθενειών, ενώ η ύπαρξη έστω και ενός μόνο νουκλεοτιδίου που υπάρχει κατά παράβαση του κανόνα συμπληρωματικότητας αποτρέπει τον υβριδισμό.

Ο Ειδικός υβριδισμός αλληλόμορφων (ASO) εξαρτάται από το σχεδιασμό των ανιχνευτών. Οι ειδικοί ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων (ASO) έχουν μια πολυμορφική θέση στο μέσο του καθετήρα. (Εικ 35)



(A) Υβριδισμός του ASO στο DNA στόχο

(B) Μη υβριδισμός μεταξύ ASO και DNA στόχου λόγω έλλειψης αντιστοιχίας στην πολυμορφική θέση.

Προκειμένου να ανιχνευτεί η μετάλλαξη δημιουργούνται δύο ανιχνευτές. Ο ένας είναι συμπληρωματικός με την φυσιολογική αλληλουχία και ο άλλος είναι όμοιος με αυτόν εκτός από ένα νουκλεοτίδιο περίπου στο μέσο της αλληλουχίας που δεν ακολουθεί τον κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων και αντιστοιχεί στη επιθυμητή μετάλλαξη για ανίχνευση. Ο ανιχνευτής που φέρει τη φυσιολογική αλληλουχία νουκλεοτιδίων θα υβριδιστεί με εκείνα τα δείγματα που έχουν το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ενώ ο μεταλλαγμένος ανιχνευτής θα υβριδιστεί και αυτός με τη σειρά του με όσα δείγματα

φέρουν τη μεταλλαγμένη αλληλουχία και θα υβριδιστούν και με τους δύο ανιχνευτές, όσα δείγματα DNA είναι ετερόζυγα στη μετάλλαξη. Πριν ξεκινήσει η υβριδοποίηση, στο 5' άκρο των ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών ενσωματώνονται ραδιοϊσότοπα με σκοπό να είναι εφικτή η διαπίστωση της υβριδοποίησης. Πρόσφατα όμως η χρήση ραδιοϊσοτόπων έχει περιορισθεί και αντικαθίσταται με μη ραδιενεργές μεθόδους σήμανσης. Κατά τον υβριδισμό με συνθετικά νουκλεοτίδια πολλαπλασιάζεται με PCR το τμήμα εκείνο του γονιδίου που φέρει τη γνωστή μετάλλαξη και στη συνέχεια το προϊόν που έχει παραχθεί υβριδίζεται σε μεμβράνη υβριδισμού με τον ανιχνευτή σε συνθήκες ανάλογες με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται.(74)

Με τη διαφοροποίηση της αλληλουχίας των βάσεων είναι δυνατόν να καταργηθούν ή να προκύψουν κάθε φορά κάποιες νέες θέσεις διάσπασης της αλληλουχίας αναφερόμενες πάντα στις υπάρχουσες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η μέθοδος Southern blotting του γονιδιωματικού DNA σε συνδυασμό με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες ήταν από τις πρώτες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν σχετικά με τη γενετική χαρτογράφηση και τη διάγνωση (77, 78) δεδομένου ότι αυτό το τμήμα συνθετικού DNA λειτουργεί ως ανιχνευτής για την παρουσία του στόχου σε μια δοκιμασία κηλίδας Southern. Στις μέρες μας όμως η βασική μέθοδος επιλογής για μια γονοτύπηση είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (79), καθώς είναι δύσκολο πλέον να ολοκληρωθεί ένας μοριακός έλεγχος χωρίς να περιλαμβάνει μία ανάλυση με PCR.

Παράγονται ανάλογα αμπλικόνια ώστε να πλαισιώσουν μια πολυμορφική θέση περιορισμού με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών, υποβάλλονται σε πέψη και η ύπαρξη ή η απουσία της θέσης προσδιορίζεται υποβάλλοντας το αφομοιωμένο αμπλικόνιο σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης και απεικονίζεται με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου και υπεριώδους ακτινοβολίας.

Τροποποιώντας τα αμπλικόνια είναι δυνατόν να προκύψουν νέες θέσεις περιορισμού αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των πολυμορφισμών που μπορούν να ελεγχθούν.

Εικόνα 35 Ανιχνευτής ASO (Δρεπανοκυτταρική Αναιμία)

Πηγή https://en.wikipedia.org/wiki/Allele-specific_oligonucleotide



Η αντικατάσταση της βάσης αδενίνη (A) από τη θυμίνη (T) στην κωδική αλυσίδα του γονιδίου, όπου το 6^ο αμινοξύ (γλουταμινικό οξύ) της β αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης από GAG μετατρέπεται σε GTG (βαλίνη) και δημιουργεί μια γενετική ασθένεια, τη **δρεπανοκυτταρική αναιμία** που οφείλεται σε συγκεκριμένη γονιδιακή μετάλλαξη και διαφοροποιεί τη στερεοδιάταξη της αιμοσφαιρίνης.

Πραγματοποιείται σύνθεση ενός ανιχνευτή ASO (Εικ.36) συμπληρωματικό προς τη μεταλλαγμένη αλληλουχία ώστε να ελεγχθεί η παρουσία της μετάλλαξης σε ένα δείγμα DNA, που π.χ. χαρακτηρίζεται ως "S". Ως στοιχείο ελέγχου, ένας άλλος ανιχνευτής ASO θα συντεθεί που φέρει την κανονική ακολουθία "A". Κάθε ανιχνευτής ASO που είναι πλήρως συμπληρωματικός στην αλληλουχία στόχου του (θα δεσμεύεται ισχυρά), αλλά όταν υπάρχει μία μόνο αναντιστοιχία έναντι του μη στοχευμένου αλληλόμορφου του (θα έχει ασθενέστερη αλληλεπίδραση). Το πρώτο διάγραμμα δείχνει πώς ο ανιχνευτής "S" είναι πλήρως συμπληρωματικός προς τον στόχο "S" (πάνω), αλλά είναι εν μέρει αναντιστοιχία με τον στόχο "A" (κάτω).

Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα

Για έλεγχο ρουτίνας σε διαγνωστικό εργαστήριο αξιολογείται ως επίπονη μέθοδος. Με την προηγούμενη μέθοδο, (RFLP) δεν απαιτείται να είναι γνωστή η αλλαγή της αλληλουχίας από την αρχή, αλλά η μετάλλαξη έπρεπε να επηρεάσει τη θέση διάσπασης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Η δοκιμασία RFLP μπόρεσε να προσαρμοστεί στη χρήση ανιχνευτών ολιγονουκλεοτιδίων, (13) αλλά η ανάλυση ASO του DNA χρειάστηκε να ενισχυθεί με μία αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), προκειμένου να γίνεται η

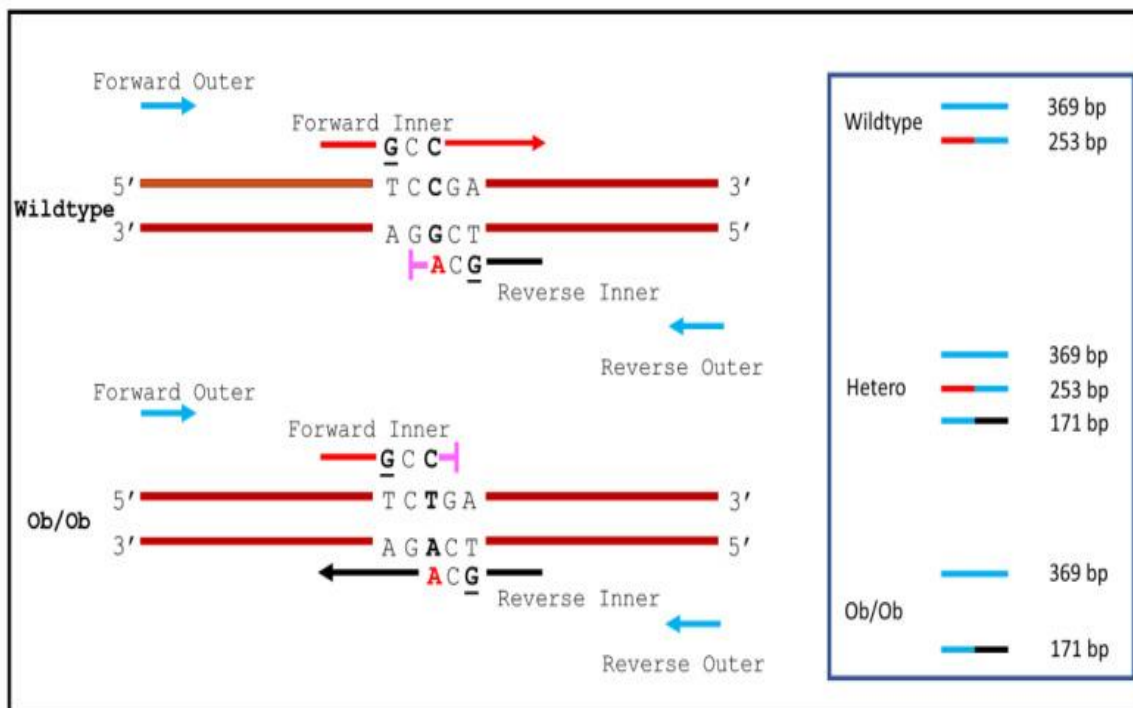
ανίχνευση πολυμορφισμών. (80) Ο συνδυασμός μεθόδων PCR / ASO δίνει μια απλή και ευέλικτη μεθοδολογία συνεχή χρήση της, χωρίς ραδιενεργή επισήμανση, και σε μορφή "αντίστροφης κηλίδας κουκκίδας" αφού οι ανιχνευτές ASO μπορούν να συνδεθούν σε μεμβράνη και το ενισχυμένο δείγμα DNA να χρησιμοποιηθεί για υβριδισμό.

3.2.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων με ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (Σύστημα ενίσχυσης ανθεκτικής μετάλλαξης)

Η τεχνική ARMS-PCR μπορεί να ανιχνεύσει σημειακές μεταλλάξεις καθώς και μικρές ενθέσεις ή ελλείψεις. Η ARMS είναι μια παραλλαγή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης που επιτρέπει εξειδικευμένο πολλαπλασιασμό ενός τμήματος αλληλόμορφου από το συνολικό γονίδιο, και στηρίζεται στην *in vitro* ενίσχυση της αλληλουχίας DNA με PCR και απαιτεί την τέλεια σύνδεση των εκκινήτων στο 3' άκρο της αλληλουχίας τους στο εκμαγείο DNA.

Εικόνα 36 Διάγραμμα μοτίβων αμπλικονίου DNA

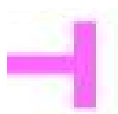
Πηγή <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9558987/>



Το διάγραμμα των μοτίβων (Εικ. 37) αντιπροσωπεύει διαφορετικούς γονότυπους σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν σε διαφορετικούς εκκινητές που συμμετέχουν στην αντίδραση PCR.

Οι δύο εξωτερικοί εκκινητές (μπλε χρώματος) ανόπτουν σε θέσεις με διαφορετικές αποστάσεις από τη θέση SNP για να εξασφαλιστεί η παραγωγή δύο ειδικών για το αλληλόμορφο PCR amplicons διαφορετικών μεγεθών που διακρίνονται στο πήκτωμα αγαρόζης.

Η υπογραμμισμένη βάση "G" στον εμπρόσθιο εσωτερικό εκκινητή (κόκκινο) και στον αντίστροφο εσωτερικό εκκινητή (μαύρο) τοποθετήθηκαν επιτούτου στη θέση -2 από τον ακροδέκτη 3' ειδικό εκκινητή αλληλόμορφων για να αυξηθεί η ειδικότητα της αντίδρασης PCR.



: Ανθεκτικό στη μετάλλαξη, επομένως η αντίδραση PCR δεν μπορεί να προχωρήσει

Έχει τροποποιηθεί ένα από τα amplicon έτσι ώστε να έχει την πολυμορφική βάση στο πρότυπο στη θέση 3'(3).

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των PCR εκκινητών όπου όταν ένα ολιγονουκλεοτίδιο δεν έχει συμπληρωματικό το 3' άκρο του δεν θα μπορεί να λειτουργήσει ως εκκινητής στην αντίδραση της PCR.

Εξαιτίας της αναντιστοιχίας βάσης η Taq πολυμεράση δεν μπορεί να επιμηκυνθεί, αφού ένα προϊόν PCR δημιουργείτε μόνο εάν η βάση 3' στο αστάρι ταιριάζει με το πρότυπο.

Οι εκκινητές για τη μέθοδο ARMS σχεδιάζονται έτσι ώστε να προσδιορίζουν τη φυσιολογική αλλά και τη μεταλλαγμένη αλληλουχία στο DNA για κάθε μετάλλαξη που ελέγχεται.

Η τεχνική μπορεί να πολυπλέκεται για την πληκτρολόγηση έως και 20 SNPs ταυτόχρονα.

Παρασκευάζονται δύο αντιδράσεις πολλαπλασιασμού για κάθε δείγμα, στις οποίες ο ένας εκκινητής είναι κοινός και για τις δύο αντιδράσεις ενώ ο άλλος είναι συμπληρωματικός και σχετίζεται με τη θέση που εξετάζεται για την ύπαρξη συγκεκριμένης μετάλλαξης, ενώ ο δεύτερος διαφέρει στις δύο αντιδράσεις ως προς το 3' άκρο του.

Η μια αντίδραση αντιστοιχεί στη φυσιολογική αλληλουχία και η άλλη στη μεταλλαγμένη. Για να γίνει πιο συγκεκριμένος ο υβριδισμός τους στη συμπληρωματική τους αλληλουχία

στο DNA τόσο ο φυσιολογικός όσο και ο μεταλλαγμένος εκκινητής έχουν μια μετάλλαξη μιας βάσης 3-4 νουκλεοτίδια πριν το 3' άκρο τους. Πρακτικά απαιτείται μια επιπρόσθετη αναντιστοιχία τριών νουκλεοτιδίων, στη θέση 3' για την αποσταθεροποίηση της δέσμευσης του εκκινητή για μια πιο ισχυρή δοκιμασία.

Η ARMS επίσης περιλαμβάνει ένα ζεύγος σταθερών PCR εκκινητών που πολλαπλασιάζει μια γειτονική περιοχή του DNA γεγονός που επιτρέπει ένα εσωτερικό έλεγχο της PCR. Στη συνέχεια το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και ελέγχεται με υπεριώδη ακτινοβολία.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

Ιδανική για ανίχνευση μικρού αριθμού σημειακών μεταλλάξεων με σχετικά μικρό όγκο αναλύσεων. Με μεγάλη ευκολία μπορούν να γίνουν πράξη αναλύσεις για πολλαπλές μεταλλάξεις. Είναι μια ανάλυση χαμηλού κόστους και δεν απαιτείται ιδιαίτερα ακριβός εργαστηριακός εξοπλισμός για να γίνει η ανίχνευση.

Είναι σύντομη η διάρκεια της αντίδρασης. Ανιχνεύει διαφορετικά SNPs που σχετίζονται με ασθένειες και δεν χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν ένζυμα περιορισμού στην ανίχνευση πολυμορφισμού, ούτε ανάλυση αλληλουχίας προϊόντων PCR

Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα άμεσης αξιολόγησης των αποτελεσμάτων μετά την αντίδραση PCR χωρίς να υπάρχει ανάγκη υβριδισμού με ραδιενεργά ολιγονουκλεοτίδια. Προσδιορίζει εύκολα το εάν ένα άτομο είναι ετερόζυγο ή ομόζυγο σε έναν γονιδιακό τόπο. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων σε αρκετά γενετικά νοσήματα όπως είναι η Κυστική Ίνωση, η Μεσογειακή Αναιμία και η Δρεπανοκυτταρική Αναιμία. (81). Είναι μια ανάλυση χαμηλού κόστους κάνοντας χρήση ένα τυπικό εργαστηριακό εξοπλισμό.

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

Μπορεί να ανιχνεύσει μόνο γνωστές μεταλλάξεις και πολυμορφισμούς. Υπάρχουν περιορισμοί στην ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Διαφορετικά θα πρέπει να συνδυαστεί και με άλλες μεθόδους μοριακής διαγνωστικής.

Για μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων και μεγάλο αριθμό αναλύσεων δεν θεωρείται και η πλέον καταλληλότερη τεχνική. Δεν αναγνωρίζει διαγραφές καθώς και επαναλήψεις.

Άλλο ένα αρνητικό σημείο της ARMS είναι ότι χρειάζονται δύο σωληνάκια, ένα με το αγρίου τύπου και ένα με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, με στόχο ένα πλήρη γονότυπο, γεγονός που ενισχύει την πιθανότητα επιμόλυνσης. Ωστόσο διαφοροποιώντας το μήκος στο αστάρι (ή την ετικέτα φθορισμού εάν πραγματοποιείται ανάλυση φθορισμού), είναι δυνατόν να παραχθούν διαφορετικά προϊόντα από κάθε αλληλόμορφο.. Εφόσον γίνει χρήση συστημάτων ανάλυσης κλειστού σωλήνα ή πηκτή υψηλής απόδοσης (τύπου MADGE) τότε μπορούμε να πετύχουμε υψηλότερες αποδόσεις. (82, 3, 83)

3.2.5 Ανίχνευση μεταλλάξεων με AS-PCR: Allele-Specific PCR (PCR για ειδικά αλληλόμορφα)

Η μέθοδος ASPCR είναι μια εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) που επιτρέπει άμεση ανίχνευση για οποιαδήποτε σημειακή μετάλλαξη στο ανθρώπινο DNA αναλύοντας τα προϊόντα PCR σε αгарόζη ή πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Χρησιμοποιεί εκκινητές ή ανιχνευτές ειδικούς για το SNP ή μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο προκειμένου να ανιχνευθούν γνωστές μεταλλάξεις. Η παρουσία του αμπλικονίου PCR επιβεβαιώνει την ταυτοποίηση του SNP ή της μετάλλαξης. Η ASPCR χρησιμοποιεί νουκλεοτίδια που αποκλείουν ή συσφίγγουν τα μη στοχευμένα δείγματα.

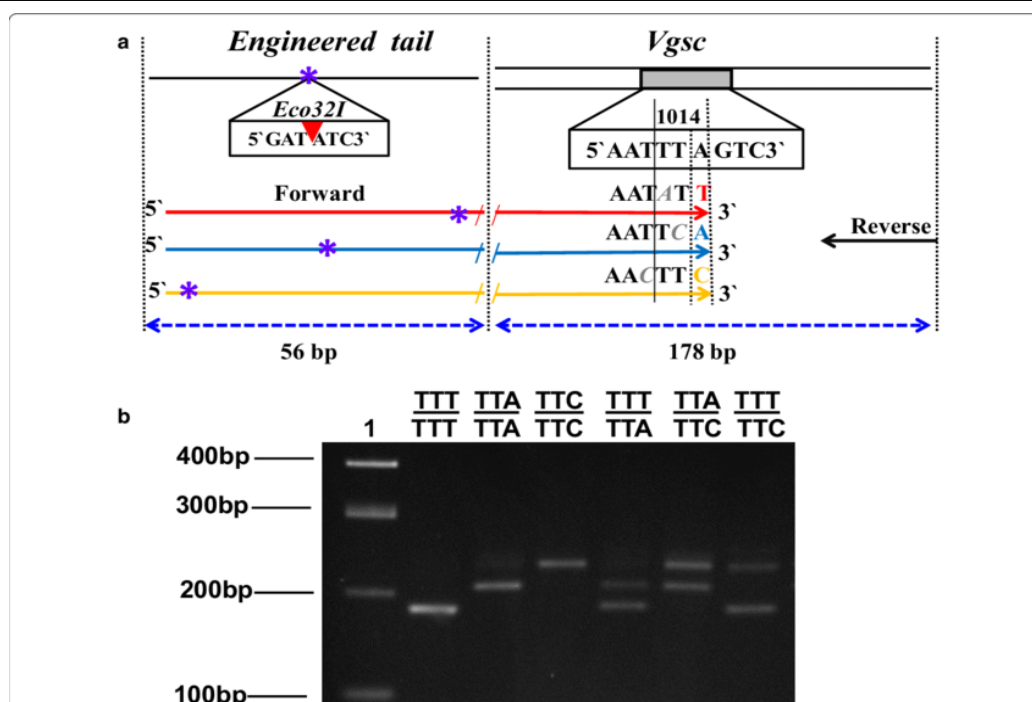
Το AS-PCR βασίζεται στην επέκταση του εκκινητή μόνο όταν το 3' άκρο του είναι τέλεια συμπληρωματικό με το πρότυπο.(84)

Τα SNPs μπορούν να ανιχνευθούν με κατάλληλους εκκινητές PCR σύμφωνα με το τελευταίο νουκλεοτίδιο 3' ενός εκκινητή που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη θέση SNP. Όμως η διάκριση μεταξύ των αλληλόμορφων δεν είναι πάντα αξιόπιστη. Οπότε προστίθεται ένα διαφοροποιημένο ζεύγος βάσεων ανάμεσα στις τρεις βάσεις που βρίσκονται πλησιέστερα στη θέση SNP (85, 86). Για μία βάση αναντιστοιχίας που τοποθετείτε σε συγκεκριμένη θέση SNP, προκύπτουν τουλάχιστον 18 πιθανοί εκκινητές (84). Κριτήρια έχουν προταθεί για το σχεδιασμό εκκινητών AS-PCR. Οι αναντιστοιχίες ζευγών βάσεων μέσω μετατροπών T-G ή C-A στην τρίτη βάση από το άκρο 3' μπορούν να αυξήσουν την ειδικότητα των αλληλόμορφων (87). Ενώ η μετατροπή A-T και η μετάβαση A-G είναι χρήσιμες αναντιστοιχίες ζευγών βάσεων για να βελτιωθεί η ειδική ενίσχυση αλληλόμορφων (88).

Ειδική για το αλληλόμορφο PCR (AS-PCR) (Εικ. 38), παρουσιάζετε μια σχηματική αναπαράσταση σχεδιασμού με θέσεις εκκινήτων και προβλεπόμενο μέγεθος προϊόντων PCR. Τα βέλη υποδεικνύουν τη θέση των εκκινήτων PCR. Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τον γενικό αντίστροφο εκκινήτη και τα κόκκινα, μπλε και κίτρινα βέλη υποδεικνύουν κάθε ειδικό εκκινήτη αλληλόμορφων (κωδικόνια TTT, TTA και TTC, αντίστοιχα). Οι βάσεις που επισημαίνονται με γκρι χρώμα στα 3'-άκρα κάθε συγκεκριμένου αστάρι είναι σκόπιμες αναντιστοιχίες. Οι μπλε αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν τη θέση περιορισμού του ενζύμου Eco32I. Οι αλληλουχίες εκκινήτων πλήρους μήκους αναφέρονται στον πίνακα 1.β Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης πηκτής ETAS-PCR/Vgsc-1014.

Εικόνα 37 Ειδική για το αλληλόμορφο PCR (AS-PCR)

Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Allele-specific-PCR-AS-PCR-for-genotyping-tri-allelic-Vgsc-L1014F-variation-in-C_fig1_333115459



Λωρίδα 1: Σκάλα DNA 100 bp.

Λωρίδες 2-4: ομοζυγώτης για κάθε κωδικόνιο: TTT, TTA και TTC, αντίστοιχα.

Λωρίδες 5-6: ετερόζυγα άτομα TTT/TTA, TTA/TTC και TTT/TTC, αντίστοιχα

Οι εκκινήτες περιέχουν μία μόνο νουκλεοτιδική τεχνητή αναντιστοιχία εντός των τριών βάσεων που βρίσκονται πλησιέστερα στο 3' άκρο (θέση SNP). Έτσι για έναν ισότοπο SNP,

μπορούν να δημιουργηθούν πιθανές αναντιστοιχίες μεταξύ των τριών βάσεων και ο τρόπος επιλογής του σωστού για την αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή εξακολουθεί κάθε φορά να αποτελεί μία πρόκληση.

Πραγματοποιείται ιδιαίτερα αξιόπιστη διάκριση μεταξύ δύο αλληλόμορφων, με την προσθήκη τεχνητών αναντιστοιχιών εντός των τριών βάσεων από το 3' άκρο των εκκινητών (84). Αν και η τρίτη θέση από το 3' άκρο έχει εντοπιστεί ως η καλύτερη για να τοποθετηθεί μια βάση αναντιστοιχίας στο primer προηγούμενως (87), πραγματικά δεν γνωρίζουμε ποιο είδος αναντιστοιχίας (για κάθε βάση, υπάρχουν τρία είδη αναντιστοιχιών) είναι η καλύτερη επιλογή στην 3η θέση.

Η ειδική μέθοδος PCR για αλληλόμορφα αναπτύχθηκε για την ανάλυση αλληλόμορφων κλινικά σημαντικών μεταλλάξεων. Κατά την προσθήκη τεχνητών αναντιστοιχιών εντός των τριών βάσεων από το 3' άκρο των εκκινητών, η τρίτη θέση έχει εντοπιστεί ως η καλύτερη για να τοποθετείτε η βάση αναντιστοιχίας (87), χωρίς να είναι γνωστό ποιο είδος αναντιστοιχίας (για κάθε βάση, υπάρχουν τρία είδη αναντιστοιχιών) είναι η καλύτερη επιλογή. Ως επίλυση του προβλήματος προστίθεται μεγάλη ποσότητα εκκινητών SNP που σχεδιάστηκαν με σκοπό να εισάγουν αναντιστοιχίες εντός των τριών βάσεων πλησιέστερα στο 3' άκρο τους.

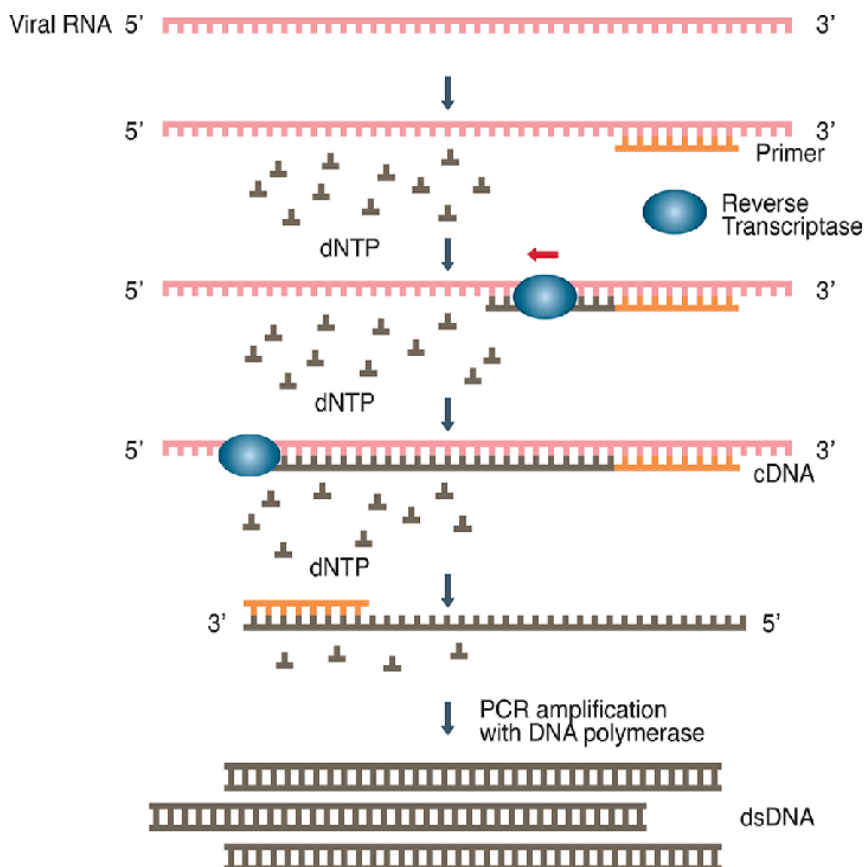
3.2.6 Ανίχνευση μεταλλάξεων με RT-PCR (Reverse-transcription-polymerase-chain-reaction) (PCR Αντίστροφης Μεταγραφάσης)

Η DNA πολυμεράσες έχουν έναν σημαντικό περιορισμό, ότι πρέπει να χρησιμοποιούν ως πρότυπο μόνο DNA, δηλαδή γεν έχουν την ικανότητα να ενισχύσουν RNA. Το ζήτημα αυτό είναι διαχειρίσιμο με τη χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης.

Η RT-PCR (Εικ. 39) δημιουργεί ένα αντίγραφο cDNA ενός συγκεκριμένου τμήματος του ιικού RNA, το οποίο μετατρέπεται σε dsDNA και ενισχύεται εκθετικά

Εικόνα 38 Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής-πολυμεράσης (RT-PCR)

Πηγή .https://www.researchgate.net/figure/Reverse-transcription-polymerase-chain-reaction-RT-PCR-The-RT-PCR-creates-a-cDNA-copy_fig1_341062500



Η RT-PCR είναι μία ημιποσοτική τεχνική που καθιστά εφικτή την ενίσχυση αλληλουχιών RNA. Αρχικά το mRNA μεταγράφεται αντίστροφα, *in vitro* σε cDNA με το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης και ενισχύει το cDNA που προκύπτει με συμβατική PCR, προκειμένου να πολλαπλασιαστεί το εξεταζόμενο τμήμα DNA

Μπορεί να γίνει η μέτρηση της ποσότητας ενός συγκεκριμένου RNA με χρήση φθορισμού, (PCR σε πραγματικό χρόνο ή ποσοτική PCR (qPCR)). Ο συνδυασμός των δύο μεθόδων, RT-PCR και qPCR συνήθως εξυπηρετεί στην ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA καθώς και ποσοτικοποίηση υικού RNA σε ερευνητικό ή κλινικό επίπεδο. Χρησιμοποιείται επίσης για κατασκευή cDNA βιβλιοθηκών.(89)

Πλεονεκτήματα

Η RT-PCR είναι βασική τεχνική για ανίχνευση ή/και σύγκριση επιπέδων RNA διότι:

(α) δεν χρειάζεται περαιτέρω επεξεργασία μετά την PCR, (β) υπολογίζεται ένα ευρύ φάσμα ($>10^7$ φορές) RNA και (γ) μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για ποιοτικά αλλά και για ποσοτικά δεδομένα.(90)

Είναι μία τεχνική απλή, εξειδικευμένη κατάλληλη για μεγάλη ποικιλία δειγμάτων, αλλά και ευαίσθητη. Η RT-PCR βρίσκει εφαρμογή σε ευρύ φάσμα πειραμάτων για απλές εφαρμογές(ποσοτικοποίηση των κυττάρων ζύμης στο κρασί),αλλά και για πιο σύνθετες χρήσεις ως διαγνωστικό εργαλείο στη διάγνωση λοιμώξεων, μολυσματικών παραγόντων προερχόμενων από RNAϊούς (ο ιός της γρίπης των πτηνών και ο SARS-CoV-2), καθώς και στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας αντιμικροβιακών θεραπειών (91, 92, 93)

Μειονεκτήματα

Είναι το υψηλό κόστος των προϊόντων, αλλά και η δημιουργία διαφορετικών κατάλληλων ιχνηθετών για κάθε νέα αντίδραση

Το RNA είναι εξαιρετικά ασταθές μόριο συγκριτικά με το DNA, κατά την απομόνωση του, θα πρέπει να γίνονται πολύ προσεκτικοί χειρισμοί ώστε να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του RNA όσο και η απομάκρυνση των μολυσματικών νουκλεασών, του γονιδιωματικού DNA. Αυτό μπορεί να δημιουργήσει θέματα ιδιαίτερα με τα κλινικά δείγματα, αναφερόμενοι σε ασυνέπειες στο μέγεθος του δείγματος, τη συλλογή, την αποθήκευση και τη μεταφορά τους. Έτσι πιθανόν και να μεταβάλλεται η ποιότητα των προτύπων RNA. Η μετατροπή του RNA σε cDNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης RT υπόκειται επίσης σε μεταβλητότητα επειδή υπάρχουν πολλαπλά ένζυμα ανάστροφης μεταγραφάσης με διαφορετικά χαρακτηριστικά και διαφορετικές κατηγορίες ολιγονουκλεοτιδίων (π.χ. τυχαίοι, πολυ-dT ή ειδικοί εκκινητές γονιδίων) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκκίνηση της RT.

Πιθανά προβλήματα συνήθως χρεώνονται περισσότερο στο ανθρώπινο λάθος, στη λανθασμένη ανάλυση, επεξεργασία δεδομένων ή αδικαιολόγητα συμπεράσματα, παρά στη τεχνολογία που χρησιμοποιείται για αυτό το είδος τεχνικής. Οι εκκινητές πρέπει να σχεδιάζονται με αυστηρά κριτήρια για να διασφαλιστεί η ειδικότητα και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

Τα ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψιν για το σχεδιασμό μιας ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών

Ο συνδυασμός REALTIME και RT-PCR χρησιμοποιείται ευρέως για ανίχνευση RNAίων (ιός γρίπης, ιός SARS-Cov2 και εντεροϊού).(90, 101, 102))(5)(94)

Μέθοδος πιο δαπανηρή από άλλες. Απαιτεί σχολαστικές τεχνικές αλλά και ξεχωριστές εγκαταστάσεις και ειδικά όργανα.

3.2.7 Ανίχνευση μεταλλάξεων με Real Time PCR (Πραγματικού Χρόνου PCR) RT-PCR

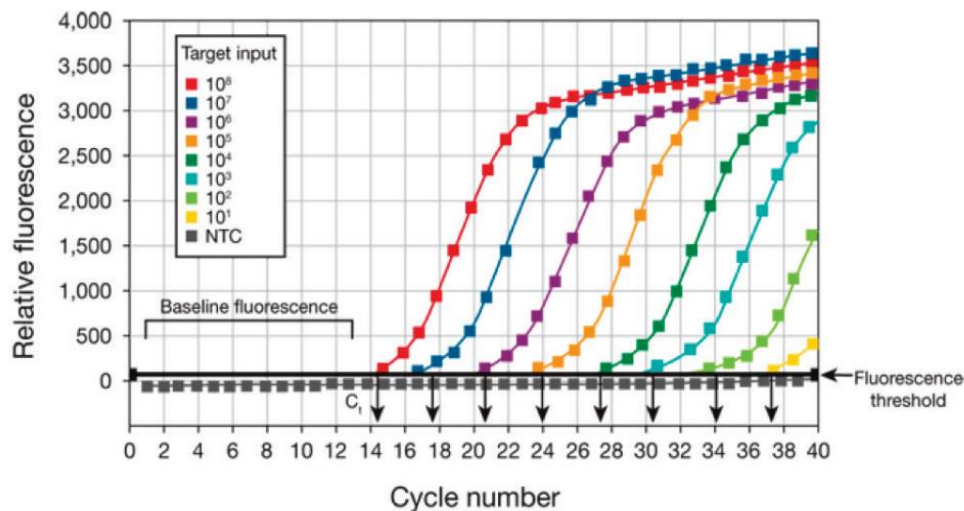
Η REAL TIME PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και ισχυρή μέθοδος. Μπορεί να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει με ακρίβεια πολύ μικρές ποσότητες συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων. Για κλινική μοριακή διάγνωση, η PCR σε πραγματικό χρόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση ιικών ή βακτηριακών φορτίων ή την αξιολόγηση της κατάστασης του καρκίνου. Βασίζεται στην επαναστατική μέθοδο PCR, κατ'έκταση, η μεγάλη ευαισθησία της PCR συνδυάζεται με την ακρίβεια που προέρχεται από την παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας στόχου σε πραγματικό χρόνο και μέσω της αύξησης φθορισμού της χρωστικής κάνει ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων PCR.(97)

Η δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης και το χαρακτηριστικό γνώρισμα της δέσμευσης μιας χρωστικής στα δίκλινα μόρια (dsDNA) έχουν αναπτύξει την Real Time PCR. Το σήμα φθορισμού της χρωστικής αυξάνει ανάλογα με το συντιθέμενο προϊόν και σχετίζεται επίσης και με την ποσότητα που έχει αρχικά το υπόστρωμα.

Κατά την ενίσχυση το πόσο γρήγορα το σήμα φθορισμού θα φτάσει σε επίπεδο κατωφλιού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στόχου δίνοντας έτσι τη δυνατότητα της ποσοτικοποίησης.

Εικόνα 39 Σήμα φθορισμού σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων

Πηγή: Real Time PCR Handbook 'Basics in PCR' ThermoFisher SCIENTIFIC)



Καμπύλη ενίσχυσης είναι μια γραφική παράσταση (Εικ. 40) που παράγει το όργανο της PCR πραγματικού χρόνου ενώ σχεδιάζει το φθορισμό σε σχέση με το χρόνο, και δείχνει πόσα προϊόντα παράγονται σε κάθε κύκλο, ενώ έχουμε και εκτίμηση σχετικά με τα αρχικά αντίγραφα του δείγματός μας.

Διακρίνεται σε φάσεις.:

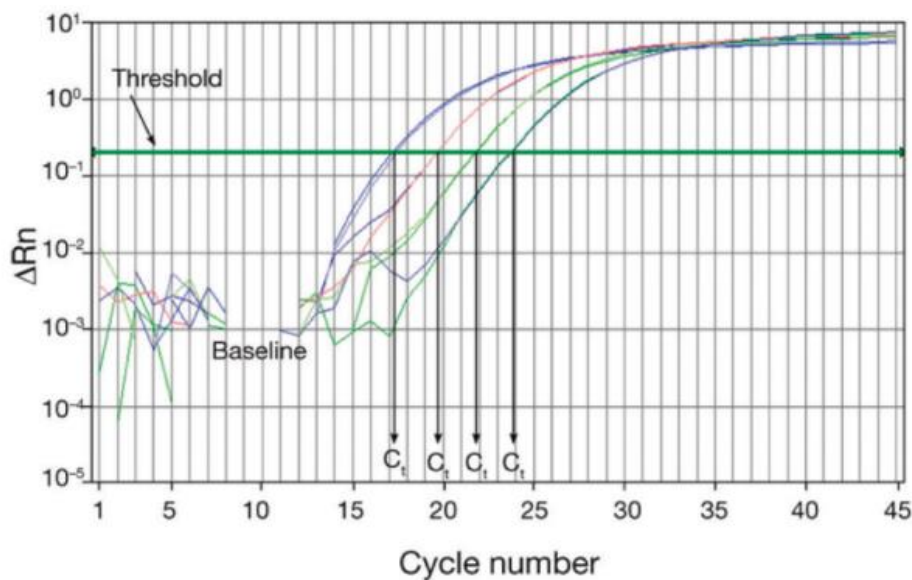
- Η Φάση έναρξης είναι κατά τους πρώτους κύκλους της μεθόδου, όπου ο εκπεμπόμενος φθορισμός από τα παραγόμενα μόρια, δεν μπορεί ακόμη να διακριθεί από την baseline.
- Η Εκθετική ή Λογαριθμική Φάση όπου ευνοείται ο διπλασιασμός του DNA μορίου στόχου σε κάθε ενίσχυσης, λαμβάνοντας το 100% της απόδοσης.
- Η Γραμμική Φάση που βρίσκεται στο επάνω τμήμα της Εκθετικής φάσης με το μόριο στόχο να μην διπλασιάζεται πλέον σε κάθε φάση, δεδομένου πως κάποια από τα αντιδραστήρια έχουν μειωθεί πολύ. Και
- Η Φάση Κορεσμού που δεν παρατηρείται πλέον φθορισμός αφού τα αντιδραστήρια έχουν εξαντληθεί.

Baseline είναι το επίπεδο του φθορισμού στους 3 με 15 αρχικούς κύκλους όπου το επίπεδο φθορισμού μπορεί να εξομοιωθεί με το «θόρυβο υποβάθρου» της αντίδρασης. (Εικ.41)

Ο κύκλος εκείνος της αντίδρασης που ο φθορισμός ξεπερνάει το κατώφλι ανίχνευσης για το δείγμα αποδίδεται με την τιμή **Ct** (threshold cycle) (Εικ.41)

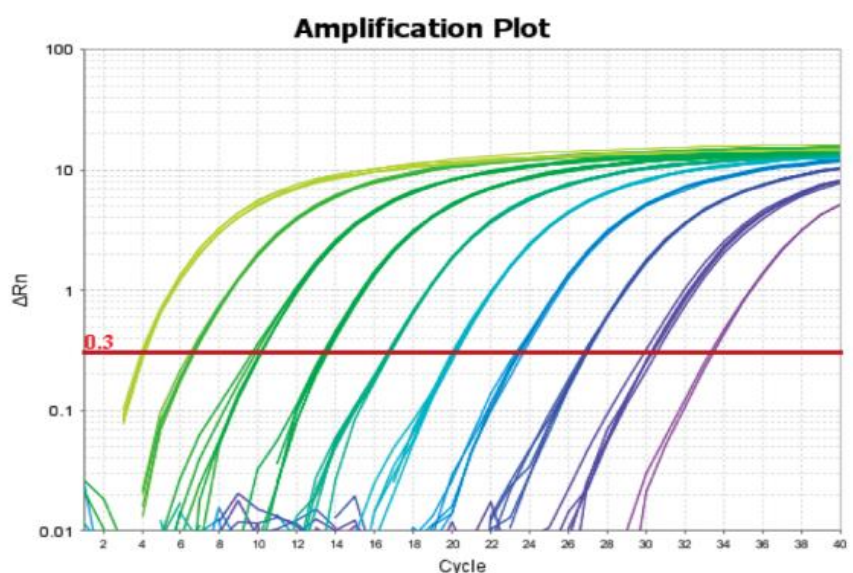
Εικόνα 41 Καμπύλη ενίσχυσης PCR σε πραγματικό χρόνο

Πηγή :Real Time PCR Handbook 'Basics in PCR' ThermoFisher SCIENTIFIC)



Εικόνα 40 Καμπύλη ενίσχυσης

Πηγή: Real Time PCR Handbook 'Basics in PCR' ThermoFisher SCIENTIFIC



Καμπύλη ενίσχυσης PCR σε πραγματικό χρόνο (Εικ. 40) ορίζεται ένα επίπεδο κατωφλίου αρκετά πάνω από το υπόβαθρο και καταγράφεται ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την επίτευξη του κατώτατου ορίου, CT

Κατώφλι (threshold) της Real Time PCR ορίζεται 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**. Όσο πιο νωρίς η καμπύλη ενίσχυσης περάσει το κατώφλι, τόσο πιο πολλά μόρια στόχους έχει το δείγμα και θα ανιχνευθεί φθορισμός σε πιο νωρίς κύκλο.

Σε μία Καμπύλη Ενίσχυσης,(Εικ.42) όταν η ποσότητα του προτύπου μειώνεται, ο αριθμός του κύκλου στον οποίο παρατηρείται σημαντική ενίσχυση αυξάνεται. Με πολλαπλές αραιώσεις (10 φορές), οι τιμές Ct απέχουν ~ 3,3 κύκλους μεταξύ τους

Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής συγκέντρωσης του μορίου στόχου (DNA ή RNA) και χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του αριθμού των μορίων σε κάθε δείγμα. (57) Οπότε 'όσο μμεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct για το δείγμα.

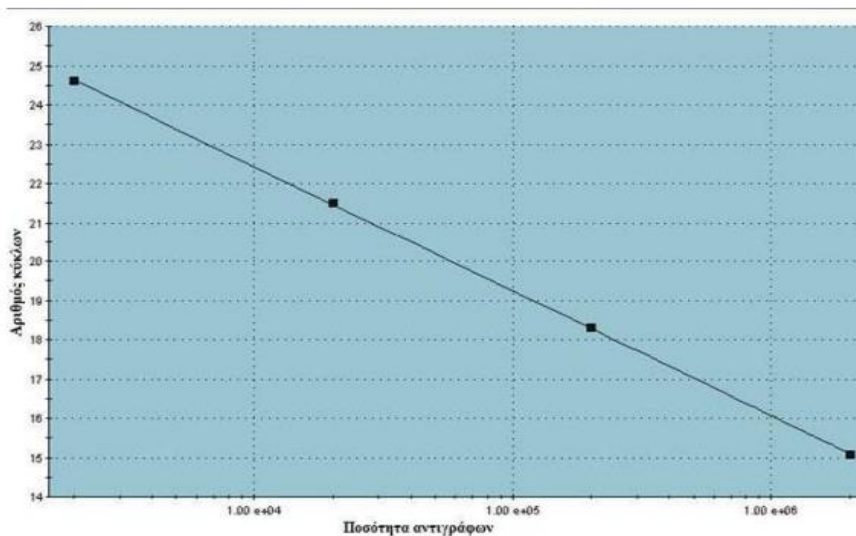
Αν πρέπει να υπολογισθεί ο ακριβής αριθμός αντιγράφων πραγματοποιείται με δύο μεθόδους ποσοτικοποίησης. Την **Απόλυτη ποσοτικοποίηση** (Absolute quantification) και τη **Σχετική ποσοτικοποίηση** (Relative quantification).(98)

Η **Απόλυτη ποσοτικοποίηση** ποσοτικοποιεί τα δείγματα της Real Time PCR με μεγαλύτερη ακρίβεια, εφόσον απαιτείται να υπολογισθεί με ακρίβεια η ποσότητα της αλληλουχίας στόχου. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με την **καμπύλη αναφοράς (standard curve)** στην οποία το φθορίζον σήμα είναι συνάρτηση του χρόνου διάρκειας της αντίδρασης.

Για το σχεδιασμό της καμπύλης απαιτούνται μία γνωστή συγκέντρωση-μάρτυρα (DNA, RNA ή cDNA) και συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Μετά από διαδοχικές αραιώσεις στα δείγματα αυτά, γίνεται Real Time PCR καθώς και των δειγμάτων που απαιτείται έλεγχος κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια δημιουργείται η καμπύλη αναφοράς (Εικ. 43) από τέσσερα σημεία (οι τέσσερις αραιώσεις του αρχικού μάρτυρα) δηλαδή ένα γράφημα που απεικονίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού μάρτυρα και των Ct τιμών της κάθε

αραίωσης, και τα σημεία της οφείλουν να καλύπτουν όλο το εύρος των συγκεντρώσεων των δειγμάτων. Έπειτα γίνεται σύγκριση των τιμών Ct των άγνωστων δειγμάτων σε μία Real Time PCR (Εικ. 44) με αυτές των καμπυλών αναφοράς και ποσοτικοποίηση των προς έλεγχο δειγμάτων.(99)

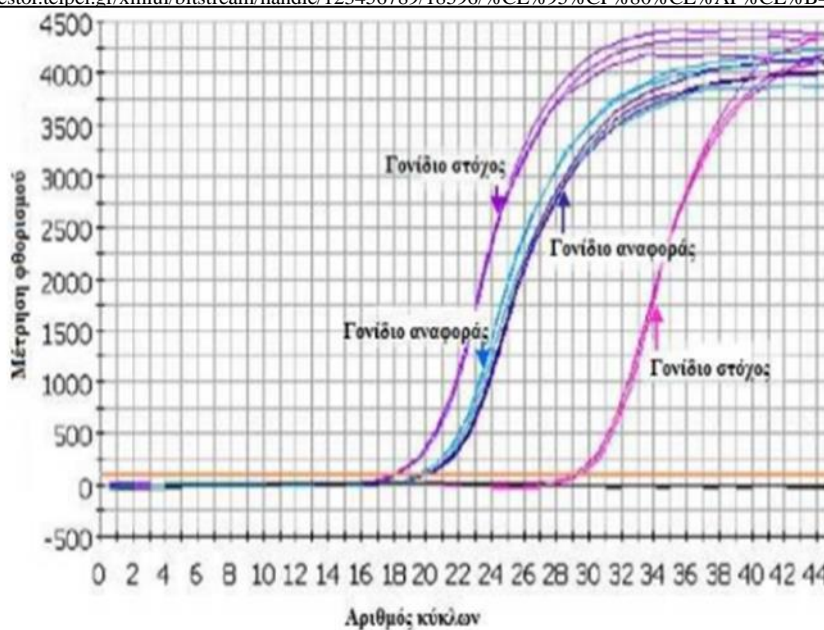
Εικόνα 42 Καμπύλη αναφοράς (standard curve) Strategene 2007)



Εικόνα 44 Σύγκριση καμπύλης ενίσχυσης του γονιδίου-αλληλουχίας στόχου με το γονίδιο-αλληλουχία αναφοράς

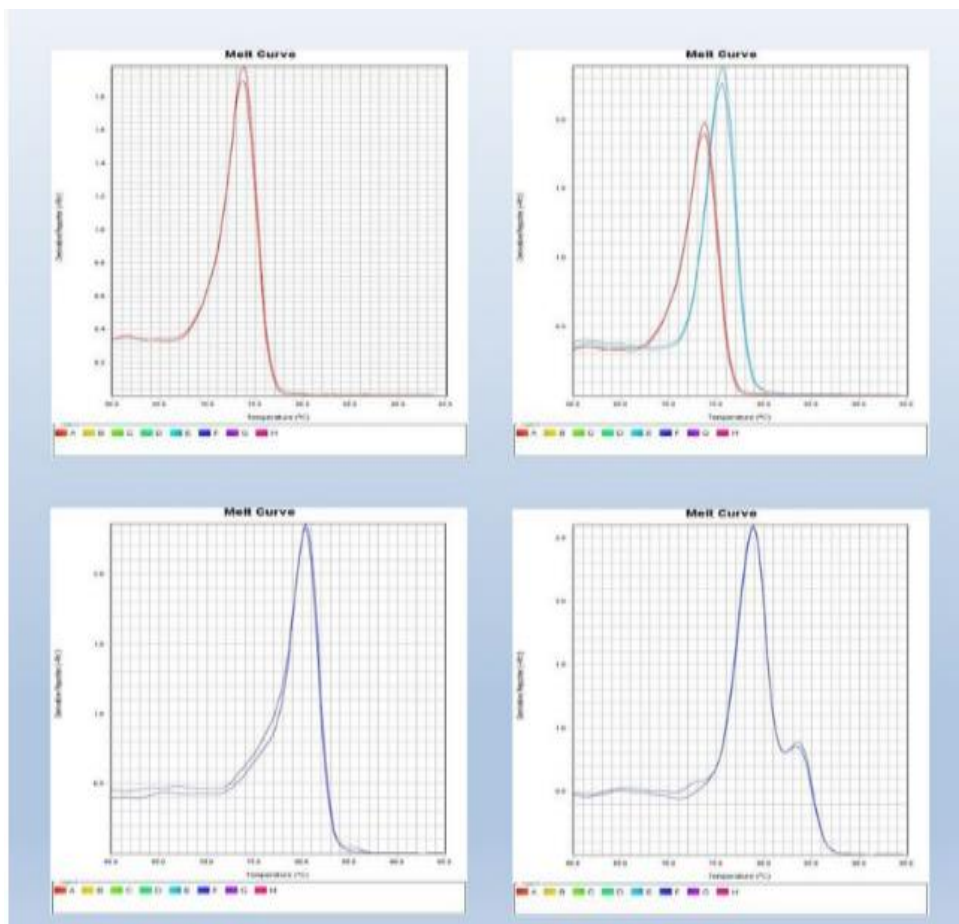
Πηγή

<http://nestor.teipel.gr/xmlui/bitstream/handle/123456789/18596/%CE%95%CF%80%CE%AF%CE%B4%CF%81%CE%B1%CF>



Εικόνα 43 Καμπύλες τήξης προϊόντων της RT-PCR

Πηγή <https://slideplayer.gr/slide/14449523/>



Σύμφωνα με την καμπύλη αποδιάταξης των αλληλουχιών στόχων παράγεται η **καμπύλη τήξης (Melting curve)** (Εικ. 45) ώστε να μπορεί να γίνει αξιολόγηση για το αν τα παραγόμενα μόρια είναι αυτά που μας ενδιαφέρουν

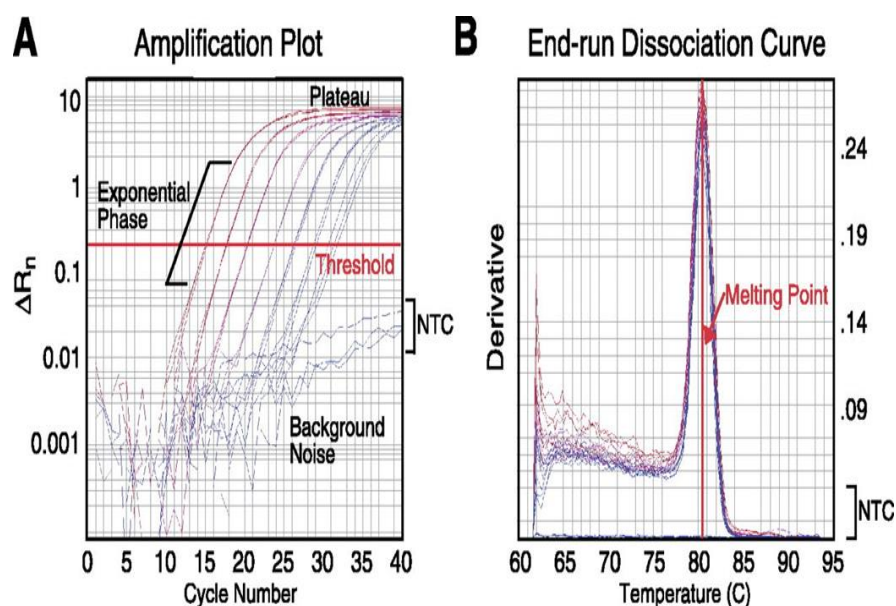
Η **θερμοκρασία αποδιάταξης** εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου στόχου DNA. Εφόσον στην αλληλουχία στόχο δεν υπάρχουν διαφορετικά νουκλεοτίδια (SNPs) ή επιμόλυνση ή τμήματα που έχουν προστεθεί από παρόμοιες συμπληρωματικές αλληλουχίες (misprinting) τότε τα προϊόντα θα πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης και η ανάλυση να δίνει μόνο μία κορυφή στην καμπύλη.

Εάν στην καμπύλη (Εικ.45) προκύπτουν και άλλες κορυφές που αντιστοιχούν σε άλλες θερμοκρασίες αποδιάταξης τότε γίνεται αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για ύπαρξη άλλων παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα στόχους και θα πρέπει να γίνεται έλεγχος και σε

αρνητικούς μάρτυρες για σύγκριση. Για αποκλεισμό εξωτερικής επιμόλυνσης στα δείγματα ελέγχεται αντίστοιχος όγκος νερού αντι της αλληλουχίας στόχου DNA στο διάλυμα της PCR. Βασίζεται στην ένταση φθορισμού

Εικόνα 46 Τυπικά αποτελέσματα PCR σε πραγματικό χρόνο

Πηγή https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/advan.00019.2005?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org



Στις εικόνες 46A και 46B εμφανίζονται τυπικά αποτελέσματα μίας ανάλυσης αλληλουχιών στόχων με PCR σε πραγματικό χρόνο

Το διάγραμμα ενίσχυσης (Εικ. 46^A) απεικονίζει την αύξηση του σήματος φθορισμού του reporter στον άξονα y, με κάθε κύκλο PCR (άξονας x). Οι μονάδες του άξονα y (ΔR_n) στην πραγματικότητα αντικατοπτρίζουν το σήμα αναφοράς κανονικοποιημένο σε παθητική χρωστική αναφορά στο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης. Οι καμπύλες που παρατηρήθηκαν με έναν έλεγχο χωρίς πρότυπο (NTC), ο οποίος στερείται πρόσθετου DNA, δείχνουν ότι οι εκκινητές από μόνοι τους δεν παράγουν σήμα και ότι τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτόν τον προσδιορισμό δεν έδειξαν μόλυνση DNA.

Η καμπύλη διάστασης (Εικ. 46B) για αυτή την ανάλυση δείχνει μια ενιαία, απότομη κορυφή, υποδηλώνοντας ότι μόνο ένα συγκεκριμένο προϊόν PCR δημιουργήθηκε με αυτό το σύνολο εκκινητών.(5)

Τρόποι παρακολούθησης της ανάλυσης.

Στόχος των ανιχνευτών αλλά και των βαφών δέσμευσης DNA, όπως EtBr ή SYBR Green I, ανιχνευτές υδρόλυσης (ανιχνευτές 5'-νουκλεάσης) Taqman, μοριακοί φάροι, εκκινητές σκορπιού είναι να μπορεί ο ερευνητής να παρακολουθεί την πρόοδο της ενίσχυσης του DNA σε πραγματικό χρόνο. Βασικός τρόπος δράσης όλων τους είναι να συνδέσουν μια αλλαγή στον φθορισμό με την ενίσχυση του DNA.(5)

Υπάρχουν δύο κατηγορίες χρωστικών :

A Οι μη ειδικές χρωστικές (SYBR Green).

Ελεύθερες (SYBR Green) στο διάλυμα φθορίζουν ελάχιστα ή και καθόλου. Φθορίζουν μόνο και εφόσον είναι συνδεδεμένες με την ελάσσονα αύλακα του dsDNA, εκπέμποντας 1.000 φορές μεγαλύτερο φθορισμό από ό,τι όταν είναι ελεύθερο σε διάλυμα το δίκλωνο μόριο DNA. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm και η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Γίνεται καταγραφή του φθορισμού σε κάθε κύκλο αφού τελειώσει η επιμήκυνση των μορίων DNA. Όσο περισσότερα είναι τα προϊόντα της PCR, δηλ. τα δίκλιωνα μόρια DNA που παράχθηκαν, τόσο περισσότερος θα είναι και ο φθορισμός που έχει καταγραφεί. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται με τη συσσώρευση προϊόντος. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR Green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe). Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της SYBR Green είναι ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται πιθανά διμερή εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα είναι πιθανό να προκύπτουν. Αυτό οδηγεί σε λανθασμένη εκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Όμως υπάρχει τρόπος να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί.

Τεχνική σχετικά απλή, δεν απαιτείται σχεδιασμός ανιχνευτών. Όμως επειδή η χρωστική δεν μπορεί να διαχωρίσει το δίκλωνο DNA από τα προϊόντα της PCR και από τα διμερή-εκκινητή η τελική συγκέντρωση συνήθως είναι λανθασμένη (υπερεκτιμημένη) εφόσον δεν απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός προϊόντων είναι μία οικονομική και εύκολη σε πραγματικό χρόνο μέθοδος.

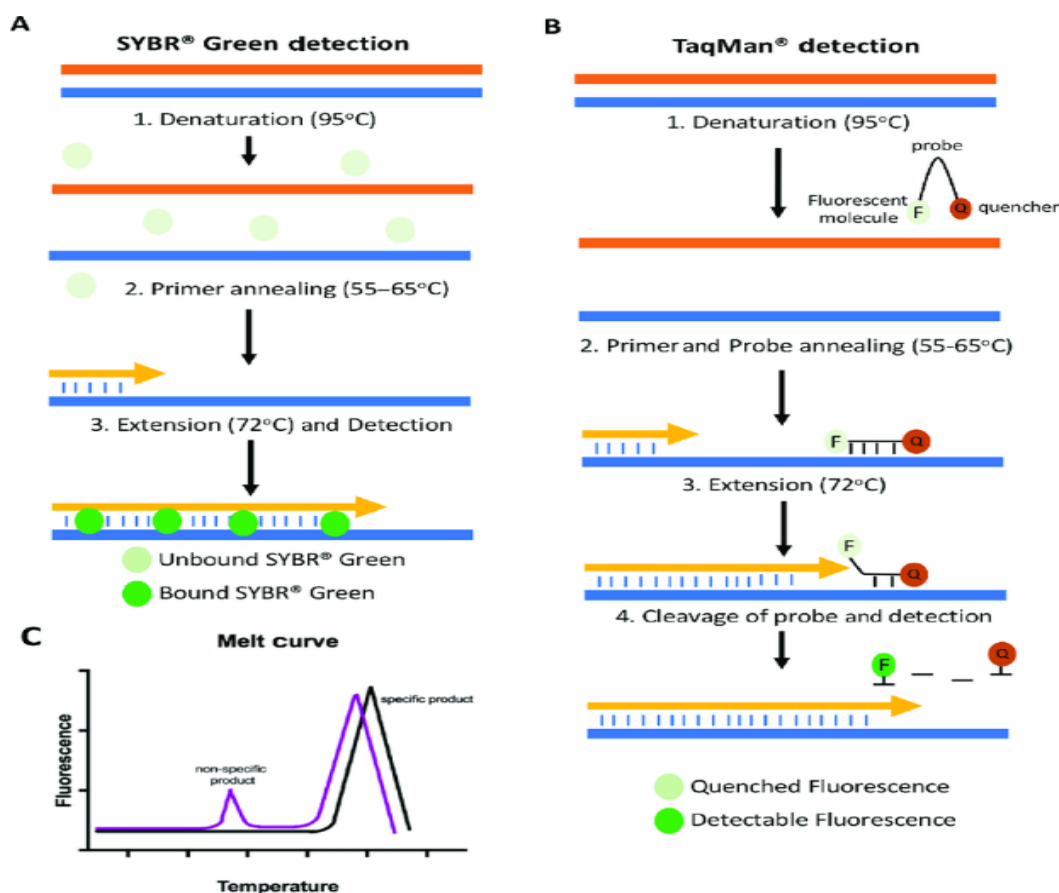
Μετά τη μετουσίωση του cDNA, (Εικ.47^A) οι εκκινητές ανοπτούν και καθώς επεκτείνονται το SYBR Green συνδέεται με το δίκλωνο DNA (dsDNA), εκπέμποντας σήμα φθορισμού που μπορεί να ανιχνευτεί.

Οι ανιχνευτές TaqMan (Εικ. 47B) δεσμεύονται κατάντη των εκκινητών σε μονόκλωνο cDNA. Κατά την επιμήκυνση του μορίου, η πολυμεράση διασπά τον καθετήρα, επιτρέποντας την ανίχνευση του σήματος φθορισμού λόγω της απώλειας εγγύτητας με το τμήμα απόσβεσης.

Η Καμπύλη τήγματος (Εικ. 47C) μετρά τη διάσταση του dsDNA σε υψηλές θερμοκρασίες. Εκείνο το DNA που παράγεται από συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών θα έχει μόνο μία κορυφή (μαύρη γραμμή) και πολλαπλά είδη DNA ή διμερή εκκινητών θα έχουν από δύο και πάνω κορυφές (μωβ) κάτι που υποδεικνύει μη ειδικούς

Εικόνα 44 Σύγκριση ανίχνευσης παρεμβαλλόμενης χρωστικής ουσίας και ανιχνευτή

Πηγή https://www.researchgate.net/figure/Comparison-of-intercalating-dye-and-hydrolysis-based-probe-detection-A-SYBR-R-Green_fig3_342182497



B Οι ειδικές χρωστικές

Οι φθορογόνοι ιχνηθέτες Taqman, ανιχνευτής υδρόλυσης ή ανιχνευτές 5'-νουκλεάσης επειδή η δραστηριότητα 5'-εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης διασπά τον καθετήρα, είναι διπλά ολιγονουκλεοτίδια- ιχνηθέτες (25-30bp DNA), σημειωμένα, υβριδίζονται με το προϊόν της PCR, και εκπέμπουν σήμα φθορισμού μόλις αποικοδομηθούν.

Φέρουν μία φθορίζουσα χρωστική συνδεδεμένη με ομοιοπολικό δεσμό στο 5' άκρο τους και έναν αποσβέστη-μόριο σιώπησης φθορισμού(Quencher) στο 3' άκρο τους, η οποία απορροφά και εξουδετερώνει το σήμα που προέρχεται από την πρώτη.

Για όσο χρόνο φθοροφόρο και αποσβέστης είναι σε κοντινή απόσταση, η απόσβεση αναστέλλει τα σήματα φθορισμού και η T_m του ιχνηθέτη χρειάζεται να είναι 5-10°C μεγαλύτερη από αυτή των εκκινητών.

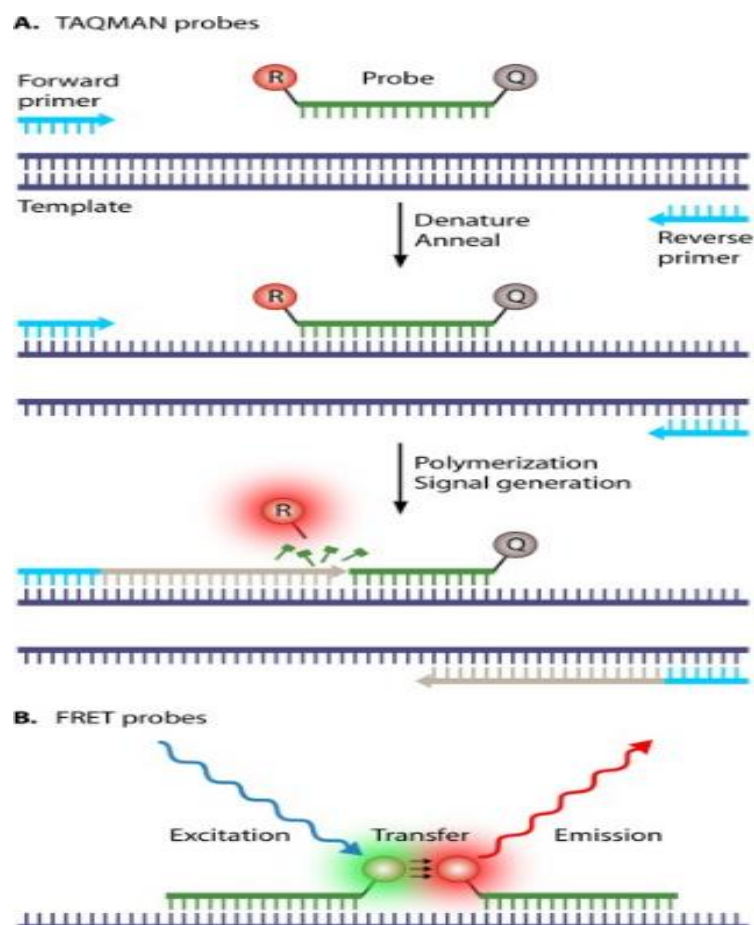
Πριν αρχίσει η αντίδραση ενίσχυσης (Εικ. 47Α) ο ιχνηθέτης είναι ακέραιος με τη χρωστική να είναι σε μικρή απόσταση από το μόριο αποσιώπησης οπότε και συμβαίνει φαινόμενο FRET. Μετά ιχνηθέτης και εκκινητές υβριδοποιούνται δηλαδή γίνεται πολυμερισμός. Όταν ο ιχνηθέτης υδρολύεται λόγω της 5'-3' δράση της Taq πολυμεράσης (εξωνουκλεική δράση) η φθορίζουσα χρωστική αποσπάται και φεύγει μακριά από το μόριο αποσιώπησης και έτσι ανιχνεύεται φθορισμός από τον θερμοκυκλοποιητή. Ο φθορισμός προκύπτει μετά από διέγερση ενός μορίου με φως. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται με την εξέλιξη της αντίδρασης καθώς προσανέχονται τα μόρια φθορισμού. Έτσι, η καταστροφή ή υδρόλυση του ολιγονουκλεοτιδίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του σήματος αναφοράς και αντιστοιχεί στην ειδική ενίσχυση του DNA.

Η χρήση του ιχνηθέτη Taqman, βασίζεται στο φαινόμενο FRET (Εικ. 48B) (Fluorescent Resonance Energy Transfer) και στην 5'-3' εξωνουκλεοτιδική δράση της Taq πολυμεράσης (δραστηριότητα 5'-νουκλεάσης).

Κάνοντας χρήση δύο χρωστικών, (Εικ. 48) η μία εκπέμπει σε μικρότερο μήκος κύματος (πράσινη) από την άλλη (κόκκινη) και έχει μεγαλύτερη ενέργεια εκπομπής. Όταν βρίσκονται και οι δύο πολύ κοντά η μία στην άλλη, τότε η διέγερση της πρώτης προκαλεί μεταφορά εκπομπής ενέργειας στη δεύτερη και η πρώτη δεν εκπέμπει πλέον σήμα. Εάν όμως υπάρχει κάποια σχετική απόσταση ανάμεσα στις δύο χρωστικές τότε η πρώτη χρωστική δεν επηρεάζεται πλέον και εκπέμπει σήμα κανονικά.

Το ζεύγος FRET (Εικ. 48B) μπορεί να σχηματιστεί από δύο φθοροφόρα ή από ένα φθοροφόρο δότη και ένα μόριο αποσβέστη (δέκτης FRET). Έτσι, μπορούν να σχεδιαστούν δύο διαφορετικοί τύποι αισθητήρων: αναλογιομετρικοί και σβησμένοι αισθητήρες

Εικόνα 45 (Α)Ανιχνευτής TaqMan και (Β) φαινόμενο FRET
<https://europepmc.org/article/pmc/pmc3993103>

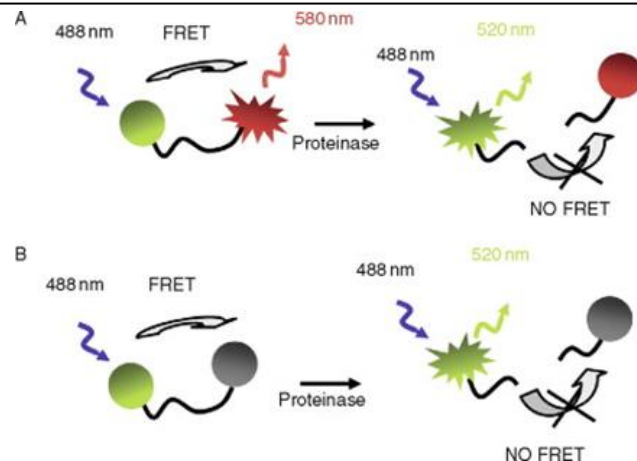


(Α) Οι αναλογιομετρικοί ανιχνευτές (Εικ. 49) σχηματίζονται από δύο φθορίζοντα μόρια που επιτρέπουν τον προσδιορισμό του λόγου εκπομπής.

(Β) Οι σβησμένοι ανιχνευτές(Εικ. 49) διαθέτουν φθοροφόρο δότη και αποσβέστη. Ανιχνεύεται η αύξηση των εκπομπών του δότη μετά την απελευθέρωση του δέκτη.

Εικόνα 46 Δύο τύποι ανιχνευτών FRET (A) αναλογιομετρικοί ανιχνευτές και (B) σβησμένοι ανιχνευτές

Πηγή: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0075753508000065>



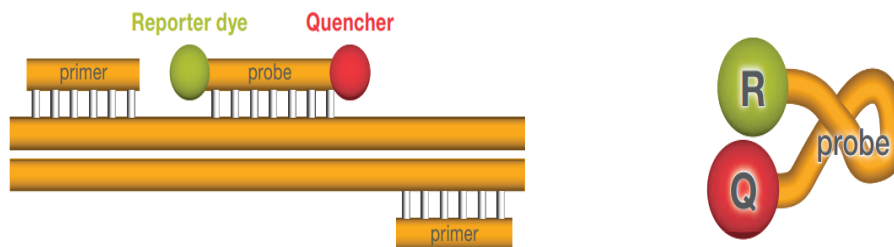
Και οι δύο τύποι χρησιμοποιούνται συχνά για την κατασκευή ανιχνευτών πρωτεϊνών

Η δραστηριότητα 5'-εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης χρησιμοποιείται στη ιχνηθέτηση TaqMan για γονότυπο SNP. Χρησιμοποιούνται εκκινητές PCR προς τα εμπρός και προς τα πίσω που θα ενισχύσουν μια περιοχή που περιλαμβάνει την πολυμορφική θέση SNP.

Η αυξημένη εξειδίκευση του ιχνηθέτη TaqMan εξηγείται λόγω της συμπληρωματικότητας εκκινητών και ιχνηθέτη με την ακολουθία στόχο και στο ότι θα προκύψει σήμα φθορισμού μόνο και εφόσον κατά την ενίσχυση της ακολουθίας ο ιχνηθέτης προσδεθεί στην ακολουθία στόχο.

Στο στάδιο ενίσχυσης της PCR, εφόσον ο ειδικός ανιχνευτής αλληλόμορφων είναι εξολοκλήρου συμπληρωματικός με το αλληλόμορφο SNP, θα προκύψει σύνδεση με τον DNA στόχο και ενώ η 5'-3' δράση της Taq πολυμεράσης επεκτείνει τον κλώνο από τους εκκινητές θα τον ανοικοδομήσει. Έτσι θα διαχωριστεί το φθοροφόρο από το σβέστη, δίνοντας ένα ανιχνεύσιμο σήμα. Εάν ο ειδικός ανιχνευτής αλληλόμορφων δεν είναι απόλυτα συμπληρωματικός, θα δώσει μικρότερη θερμοκρασία τήξης και δεν θα μπορέσει να δεσμευτεί το ίδιο αποτελεσματικά όπως πριν, γεγονός που θα εμποδίσει την Taq πολυμεράση να δράσει στον ανιχνευτή(95)

Εικόνα 47 Ιχνηθέτης Taqman.



Ο ιχνηθέτης TaqMan (Εικ. 50^A) είναι συνδεδεμένος ανάμεσα σε δύο εκκινητές PCR. Στο 5' άκρο του είναι ο 'Reporter' και στο 3' άκρο του είναι υνδεδεμένος ο 'Quencher'.

Ο ιχνηθέτης παρουσιάζεται (Εικ.50B)όπως είναι μέσα στο διάλυμα ελεύθερος με το πορτοκαλί τμήμα του να αντιστοιχεί στα ολιγονουκλεοτίδια που συνδέουν Reporter Quencher.

Η ιχνηθέτηση TaqMan μπορεί να συνδυάσει την ανίχνευση έως και επτά SNP σε μία αντίδραση, παρότι για κάθε SNP είναι απαραίτητος ξεχωριστός ανιχνευτής, εξαρτάται από την απόσταση που είναι τοποθετημένα τα SNPs. Γενικά, ο TaqMan αξιοποιείται για τη μελέτη μικρού αριθμού SNPs, αφού οι βέλτιστοι ανιχνευτές και οι συνθήκες μιας αντίδρασης πρέπει να μελετώνται για κάθε SNP χωριστά (96).

Η χρήση Taqman πλεονεκτεί έναντι άλλων ιχνηθετών διότι μπορεί να εξασφαλίσει ποσοτικοποίηση του επιθυμητού προϊόντος ακόμα και αν υπάρχει ταυτόχρονη μη ειδική ενίσχυση και άλλου δευτέρου προϊόντος. Ο ιχνηθέτης μπορεί να υβριδίζεται μόνο στις αλληλουχίες στόχο και όχι και σε άλλες ομόλογές τους, αλλά ούτε και σε διμερή εκκινητών ή παραπροϊόντα της PCR. Έτσι δεν υπάρχει η πιθανότητα να προκύψει κάποιο ψευδώς θετικό σήμα φθορισμού. Αυξάνει την ακρίβεια και την ευαισθησία της ποσοτικοποίησης, ενώ δεν απαιτεί καμπύλη τήξης για τον ποιοτικό έλεγχο της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

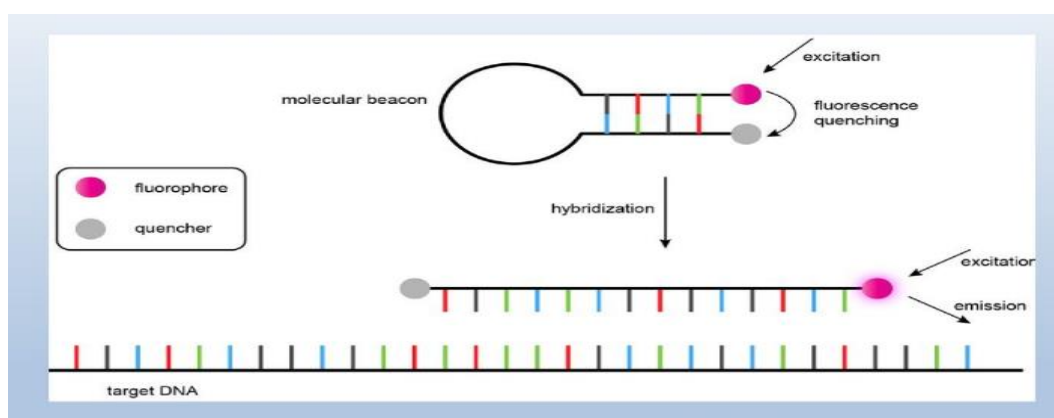
Μοριακοί Φάροι

Είναι ολιγονουκλεοτίδια με συμπληρωματικά άκρα. Όταν αναδιπλωθούν, (Εικ. 51) η δομή τους αλλάζει και αποτελείται από ένα δίκλωνο μίσχο και μια μονόκλωνη θηλιά συμπληρωματική με τη μια εσωτερική περιοχή της ενισχυμένης αλληλουχίας στόχου. Μια

φθορίζουσα χρωστική, έχει προστεθεί στο ένα άκρο. Στο άλλο άκρο τους φέρουν ένα άλλο μόριο χρωστικής, για να εξουδετερώνει το φθορίζον σήμα που παράγει η πρώτη. Όταν τα ολιγονουκλεοτίδια είναι ελεύθερα στο διάλυμα το σήμα εξουδετερώνεται και αποκτούν μία δομή θηλιάς-μίσχου, με αποτέλεσμα τα δύο μόρια χρωστικής να έρχονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, και να προκαλείται μεταφορά ενέργειας μεταξύ τους (φαινόμενο FRET) οπότε αποτρέπει και ο φθορισμός.

Εικόνα 48 Μοριακοί Φάροι

(Πηγή : <https://slideplayer.gr/slide/14449523/>)



Η αλληλεπίδραση μεταξύ ανιχνευτή και μορίου στόχου είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκότερη από ότι η δομή της θηλιάς με το μίσχο του ανιχνευτή έτσι κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ο ανιχνευτής προσδένεται με μεγαλύτερη εξειδίκευση με το προϊόν. Η πρόσδεση του ολιγονουκλεοτιδίου στο προϊόν της αντίδρασης οδηγεί στην απομάκρυνση των δύο μορίων χρωστικών και στην αδυναμία μεταφοράς ενέργειας μεταξύ τους μέσω FRET, οπότε και παράγεται φθορισμός.

Οι Molecular beacon ανιχνευτές είναι πιο εξειδικευμένοι συγκριτικά με τους συμβατικούς ανιχνευτές ανάλογου μήκους. Έχουν ευρεία εφαρμογή στον εντοπισμό σημειακών μεταλλάξεων, πολυμορφισμών και στην ποσοτικοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών.

Αξιοποιούνται στην ανάλυση προϊόντων PCR άγριας και μεταλλαγμένης αλληλουχίας. Δύο μοριακοί φάροι επισημασμένοι με διαφορετικές φθορίζουσες βαφές προστίθενται στο μείγμα μετά την PCR προκειμένου να ξεχωρίσουν οι δυο αλληλουχίες του αγρίου και του μεταλλαγμένου τύπου.

Ανιχνευτές Scorpion

Λειτουργούν όπως και οι μοριακοί Φάροι σχετικά με το φθορισμό. Χρησιμοποιούνται ένα εκκινητής και ένα νουκλεοτίδιο, που χρησιμεύει ως εκκινητής και ως ανιχνευτής. Στο νουκλεοτίδιο που δρα ως εκκινητής, δίπλα εκτείνεται μια αλληλουχία βάσεων με δομή θηλιάς-μίσχου που στο 3' άκρο του φέρει μία χρωστική συμπληρωματική με το φθορίζον μόριο από το 5' άκρο. Καθώς επεκτείνεται ο ανιχνευτής συνδέεται με το συμπλήρωμά του ανοίγει η δομή του σκορπιού, δεν επιτρέπει έτσι να συμβεί φαινόμενο FRET οπότε και μπορεί να μετρηθεί το σήμα φθορισμού, δηλαδή το δεύτερο μόριο χρωστικής εξουδετερώνει το σήμα του πρώτου μορίου λόγω φαινομένου FRET.

Οι ανιχνευτές Scorpions χρησιμοποιούνται όπως και οι Molecular Beacon για την ανίχνευση μεταλλάξεων, καθώς και σε μελέτες ποσοτικοποίησης. Έχουν όμως ένα ακόμη πλεονέκτημα λόγω του γρηγορότερου μηχανισμού αντίδρασής τους και της εμφάνισης χαμηλότερου μη ειδικού σήματος (background).

Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα

Η PCR σε πραγματικό χρόνο είναι ιδανική για την ανάλυση μεταλλάξεων, και μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), ενώ συχνά αντικαθιστά άλλες τεχνικές όπως η αλληλούχιση, οι δοκιμασίες πολυμορφισμού διαμόρφωσης ενός κλώνου και την ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραύσματος περιορισμού. Η ανάλυση καμπύλης τήξης κατά την ανίχνευση μεταλλάξεων πραγματοποιείται αυτόματα στο ενισχυμένο προϊόν (amplicon) αμέσως μετά τη μέτρηση του θερμοκύκλου και του φθορισμού PCR. Ανιχνευτές υβριδισμού προτιμούνται για την ανίχνευση μεταλλάξεων παρότι οποιαδήποτε από τις φθορίζουσες χημικές ουσίες που έχουν αναφερθεί θα λειτουργούσε.

Μετά την ολοκλήρωση της PCR, οι ανιχνευτές υβριδισμού συνδέονται παράλληλα με το αμπλικόνιο, επιτρέποντας τη μεταφορά ενέργειας από τον δότη στο φθοροφόρο δέκτη, το οποίο εκπέμπει ένα σήμα. Καθώς η θερμοκρασία του δοχείου αντίδρασης αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης της καμπύλης τήξης, ο ανιχνευτής δότη θα διαχωριστεί, με αποτέλεσμα τη μείωση του φθορισμού. Εάν όμως υπάρχουν μεταλλάξεις στο amplicon (στην περιοχή υβριδισμού), ο ανιχνευτής δότης θα δεσμευτεί λιγότερο έντονα και θα διαχωριστεί σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Μία μετάλλαξη μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί παρατηρώντας εάν υπάρχει μετατόπιση στο σημείο τήξης του προϊόντος PCR ή όχι. Αυτός

ο τύπος ανάλυσης μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για γονότυπους ατόμων ή πειραματικών οργανισμών (δηλαδή, αλληλική διάκριση).(5)

Η REAL TIME PCR εξυπηρετεί πολύ στην κλινική διάγνωση διότι μπορεί να ανιχνεύει, να παρακολουθεί πολύ μικρές ποσότητες ιικού φορτίου και να ποσοτικοποιεί τα νουκλεϊκά οξέα. Παρουσιάζει εξαιρετική ευαισθησία, επιτρέποντας την ανίχνευση λιγότερων από πέντε αντιγράφων (ίσως και μόνο ένα αντίγραφο σε ορισμένες περιπτώσεις) μιας αλληλουχίας στόχου, καθιστώντας δυνατή την ανάλυση μικρών δειγμάτων. Υπολογίζει τον αριθμό των αντιγράφων από την αλληλουχία στόχο που προκύπτουν μετά από κάθε κύκλο με τη βοήθεια των πρότυπων καμπυλών. Έτσι με αυτό τον τρόπο ανιχνεύει τον ιό, μετά υπολογίζει ιογενείς λοιμώξεις ,παρακολουθεί το ιικό φορτίο, τις αλληλεπιδράσεις ιού-ξενιστή και την ανταπόκριση του ασθενούς στη θεραπεία του, λειτουργώντας έτσι ως δείκτης μιας ενεργούς λοίμωξης.

Τα αυτοματοποιημένα όργανα REAL TIME PCR έχουν ευρεία εφαρμογή, και η τεχνολογία REAL TIME PCR σε πολλές έρευνες και πολλά εργαστήρια χρησιμοποιείται ως βασική μέθοδος ανίχνευσης SNP/μεταλλάξεων.

Τέλος, η PCR σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιείται σε κλειστό δοχείο αντίδρασης, με πλαστικές πλατφόρμες των 96 δειγμάτων, κάτι που επιτρέπει τον έλεγχο σε ένα εξαιρετικά μεγάλο αριθμό δειγμάτων ταυτόχρονα, πολύ μικρής ποσότητας δείγματος, χωρίς να απαιτεί επιπλέον χειρισμούς μετά την PCR, ελαχιστοποιώντας έτσι τις πιθανότητες διασταυρούμενης μόλυνσης στο εργαστήριο.

Μειονέκτημα της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος των προϊόντων, αλλά και η δημιουργία διαφορετικών κατάλληλων ιχνηθετών για κάθε νέα αντίδραση Real Time PCR

Η τεχνική της PCR ενδέχεται να ανασταλεί από ενώσεις που υπάρχουν σε ορισμένα βιολογικά δείγματα όπως κλινικές και ιατροδικαστικές χρήσεις για PCR σε πραγματικό χρόνο μπορεί να επηρεαστούν από αναστολείς που βρίσκονται σε ορισμένα σωματικά υγρά όπως η αιμοσφαιρίνη ή η ουρία. Οι μικροβιολογικές εφαρμογές τροφίμων ενδέχεται να συναντήσουν οργανικούς και φαινολικούς αναστολείς. Για να παρακαμφθεί αυτό το πρόβλημα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές πολυμεράσες DNA (π.χ. Tfl, Pwo, Tth κ.λπ.) που είναι ανθεκτικές σε συγκεκριμένους αναστολείς.(5)

Πιθανά προβλήματα συνήθως χρεώνονται περισσότερο στο ανθρώπινο λάθος, στη λανθασμένη ανάπτυξη ανάλυσης, επεξεργασία δεδομένων ή αδικαιολόγητα συμπεράσματα, παρά στη τεχνολογία που χρησιμοποιείται για αυτό το είδος τεχνικής. Οι εκκινητές πρέπει να σχεδιάζονται με αυστηρά κριτήρια για να διασφαλιστεί η ειδικότητα και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

Τα ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψιν για το σχεδιασμό μιας ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών

Ο συνδυασμός; REALTIME και RT-PCR χρησιμοποιείται ευρέως για ανίχνευση RNAίων (ιός γρίπης, ιός SARS-Cov2 και εντεροϊού).(90, 101, 102))(5)

3.2.8Ανίχνευση μεταλλάξεων με Multiplex PCR (Πολυπλεξία-PCR)

Η πολυπλεξία-PCR περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1988 ως μέθοδος ανίχνευσης διαγραφών στο γονίδιο δυστροφίνης. (103) Το 2008, η πολυπλεξία-PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση μικροδορυφόρων και SNP. (104) Το 2020,αξιοποιήθηκε από το Κέντρο Νοσημάτων και Ελέγχου σε μία μόνο αντίδραση για να αυξήσουν την προσβασιμότητα και την απόδοση των μοριακών δοκιμών για τη διάγνωση του SARS-CoV-2 για πολλαπλούς γονιδιακούς στόχους.(105)

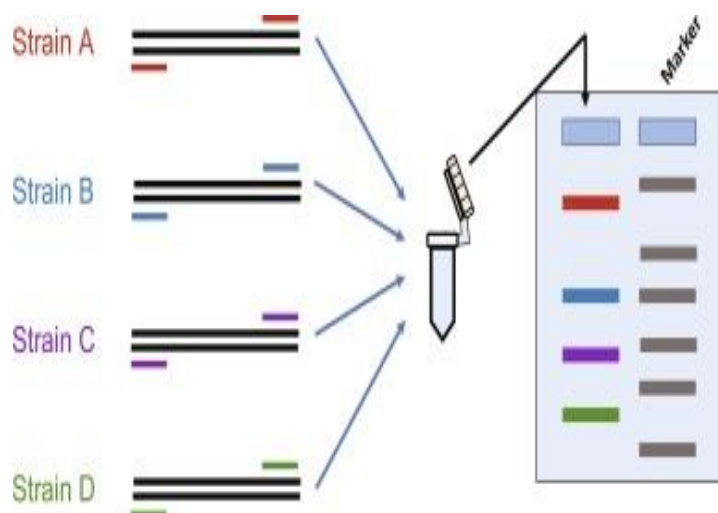
Η multiplex PCR έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να ανιχνεύει περισσότερους από έναν στόχο σε κάθε αντίδραση με ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών διαφορετικών τμημάτων DNA. Για κάθε τμήμα σχεδιάζεται ένα ξεχωριστό ζεύγος εκκινητών. Τα ζεύγη (Εικ. 52) ομαδοποιούνται και προστίθενται στο μείγμα. Όσο πιο κοντά είναι οι τιμές των T_m των εκκινητών τόσο καλύτερα θα είναι τα αποτελέσματα της μεθόδου διότι ο διαχωρισμός θα γίνεται από συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA σε παραπλήσιες θερμοκρασίες, επιτρέποντας σε κάθε ενίσχυση να προχωρήσει ξεχωριστά στην επιλεγμένη θερμοκρασία. Αυτή η διαδικασία δεν θα μπορούσε να γίνει εάν ένα σετ αστάρι είχε ανόπτηση τη στιγμή που ένα άλλο σετ αστάρι αποσυνδεόταν από το στόχο του. Επομένως, όλοι οι εκκινητές πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε τα T_m τους να βρίσκονται σε απόσταση λίγων βαθμών ($^{\circ}\text{C}$) το ένα από το άλλο. Κάθε ενίσχυση πραγματοποιείται ανεξάρτητα από τις άλλες, δεδομένου ότι τα αντιδραστήρια υπάρχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

Κατάλληλη μέθοδος για διάγνωση γενετικών ανωμαλιών. – ‘όπως μυϊκή δυστροφία - γονίδιο που χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμικές ελλείψεις με υψηλή συχνότητα εμφάνισης σε συγκεκριμένα σημεία του γονιδίου (hot spots). Η χρήση εκκινητών με στόχο αυτές τις

θέσεις κατά μήκος των αλληλουχιών του γονιδίου, παρέχει σημαντικές διαγνωστικές πληροφορίες για ύπαρξη και επέκταση της νόσου.

Εικόνα 49 Multiplex PCR

Πηγή: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/multiplex-polymerase-chain-reaction>



Εφαρμογή επίσης βρίσκει στην ιατροδικαστική έρευνα (106) αλλά και στην ταυτοποίηση ύπαρξης πολλών μικροοργανισμών μέσα στο ίδιο δείγμα. Η τεχνική έτσι μπορεί να εξοικονομήσει κόστος, χρόνο και προσπάθεια, αλλά όμως είναι πιο περίπλοκη στην ανάπτυξη και συχνά είναι λιγότερο ευαίσθητη από την PCR ενός εκκινητή. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται σε πολυπλεκτικές αντιδράσεις πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά ώστε να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες ανόπτησης, χωρίς να αλληλοσυμπληρώνονται.

Πλεονεκτήματα

Η multiplex PCR πλεονεκτεί στο ότι έχει αυξημένη απόδοση . Αναλύονται πολλά δείγματα ανά πλάκα κάνοντας χρήση ενός δείγματος στόχου με λίγα αντιδραστήρια, καθώς και του ίδιου συνόλου εκκινητών ως εσωτερικό έλεγχο. Όταν θα αναλύσει όμως μόνο ένα στόχο θα κάνει χρήση της ίδιας ποσότητας αντιδραστηρίων Έτσι αυξάνεται η απόδοση ενώ μειώνεται το κόστος των αντιδραστηρίων. Μπορεί λοιπόν να εξοικονομήσει τη δαπανηρή πολυμεράση καθώς και ένα πρότυπο σε έλλειψη.

Επίσης μειώνονται τα λάθη ακριβείας που πιθανόν να προκύπτουν λόγω μειωμένων χειρισμών χρήσης πιπέτας. Έτσι εξαλείφουμε την πιθανότητα ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων.

Γίνεται μία προσθήκη δείγματος στα ίδια πηγάδια οπότε αν υπάρχει κάποιο λάθος θα επηρεαστούν όλα τα ίδιο, και για αναλύσεις που απαιτούν ακρίβεια, όλα τα δείγματα θα έχουν τον ίδιο βαθμό ακρίβειας. (107)

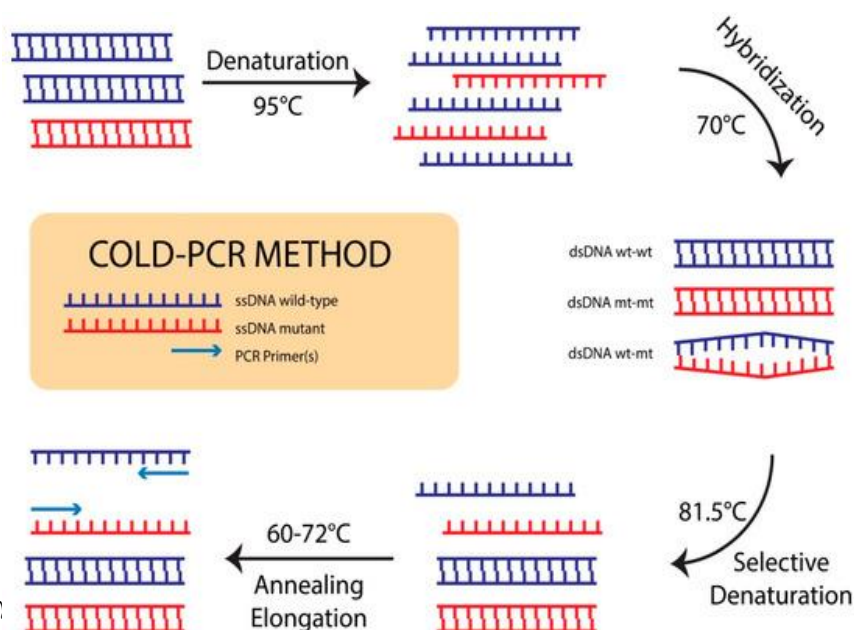
3.2.9 Ανίχνευση μεταλλάξεων με COLD PCR

Μια νέα τεχνική PCR που εμπλουτίζει γνωστά και άγνωστα σπάνια μεταλλαγμένα αλληλόμορφα ανεξάρτητα που θα βρεθεί η μετάλλαξη και ενισχύει την αλληλουχία σε χαμηλότερη θερμοκρασία είναι η COLD-PCR (112)

Μέθοδος ενός βήματος που ενισχύει γνωστές αλλά και άγνωστες σπάνιες μεταλλάξεις κατά μήκος της αλληλουχίας του γενετικού υλικού για όλα τα είδη μεταλλάξεων και για όλες τις θέσεις που μεταλλάσσονται. Η λογική της μεθόδου είναι ότι όταν μία επιλεγμένη αλληλουχία DNA πλησιάζει σε μια κρίσιμη **θερμοκρασία μετουσίωσης (T_c)** το ποσοστό της μετουσίωσης ευαισθητοποιείται για αυτήν τη συγκεκριμένη αλληλουχία τόσο ώστε ακόμη και σημειακές μεταλλάξεις να διαφοροποιούν ουσιαστικά το αποτέλεσμα. Έτσι οι μεταλλάξεις εμπλουτίζονται παράγοντας ετεροδιμερή στα σημεία της μετάλλαξης, ενώ πραγματοποιείται η ανάλυση PCR. Κατά τη διάρκεια της PCR στο στάδιο της μετουσίωσης όταν μειώνουμε τη θερμοκρασία, εάν το δίκλωνο μόριο φέρει ετεροδιμερείς αναντιστοιχίες (heteroduplexes) αυτές μετουσιώνονται πρώτα. Τα ομοδιμερή μετουσιώνονται λιγότερο από τα ετεροδιμερή στη κρίσιμη θερμοκρασία μετουσίωσης αφού έχουν μεγαλύτερη θερμοκρασία τήξεως (T_m), οπότε και ενισχύονται λιγότερο.

Εικόνα 50 COLD-PCR

Πηγή : <https://www.mdpi.com/2075-4418/10/7/491>



Πραγματοποιείται ενίσχυση σε χαμηλότερη θερμοκρασία μετουσίωσης (Εικ.53) (COLD)-PCR. Αρκετοί γύροι συμβατικών κύκλων PCR παράγουν το αρχικό υλικό για τα αμπλικόνια-στόχους. Μετά τη μετουσίωση στους 95,0 °C, τα αμπλικόνια PCR επωάζονται στους 70,0 °C για διασταυρούμενο υβριδισμό. Η θερμοκρασία PCR αυξάνεται στο T_c (81,5 °C) για να μετουσιωθεί κατά προτίμηση το ετεροαμφίδρομο ds DNA wt-mt σε σύγκριση με το ds DNA wt-wt ή mt-mt, ακολουθούμενη από τη θερμοκρασία ανόπτησης (60,0 °C) και στη συνέχεια αυξάνεται στους 72,0 °C για επέκταση εκκινητή, ενισχύοντας έτσι κατά προτίμηση τα αλληλόμορφα που περιέχουν μετάλλαξη

Το 70% των μεταλλάξεων ανήκει στην κατηγορία αυτών που μειώνουν τη θερμοκρασία τήξης (T_m), όπως (G:C>T:A ή G:C>A:T) και με τη μέθοδο αυτή μπορούν να εμπλουτιστούν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα χωρίς να γίνει σχηματισμός ετεροδιμερών. Μια βέλτιστη θερμοκρασία μετουσίωσης (T_c) για να εμπλουτιστεί μια αλληλουχία σε μια Cold-PCR μπορεί να είναι κατά 10 °C μικρότερη από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) του αμπλικονίου, αν και κάποιες φορές η βέλτιστη θερμοκρασία μετουσίωσης μπορεί να είναι αποδοτική και να κυμαίνεται από 0,5 °C έως 1,5 °C χαμηλότερη της θερμοκρασίας τήξης (T_m).

Το (T_m) υπολογίζεται μετά από μια PCR, πειραματικά με καμπύλη τήξης.

Με την COLD-PCR επιτρέπεται η απευθείας ενίσχυση μεταλλαγμένων αλληλόμορφων κατά τη ανάλυση γονιδιωματικού DNA με PCR, με μία επιλεκτικότητα έως και 100 φορές σε σχέση με του αγρίου τύπου.

Πλεονεκτήματα

Η COLD-PCR πλεονεκτεί ως μέθοδος διότι είναι πολύ απλή κατά τη διαδικασία της ενίσχυσης δίκλωνου μορίου DNA (dsDNA) που περιέχει αναντιστοιχίες με άγνωστες μεταλλάξεις χωρίς να απαιτούνται περίπλοκα πρωτόκολλα, εξειδικευμένα ένζυμα, ανιχνευτές ή εκκινητές και με την ιδιαιτερότητα να επιτρέπει άμεση αλληλούχιση του ενισχυμένου προϊόντος.

Επιπλέον χωρίς να χρειάζεται επιπλέον χρόνο, κόστος ή περαιτέρω ανάλυση από τον χειριστή, μπορεί να πάρει τη θέση της συμβατικής PCR και να συνδυαστεί με τις περισσότερες από τις ήδη υπάρχουσες μεθόδους. Χρησιμοποιείται αντί της PCR για την

ανίχνευση τόσο γνωστών όσο και αγνώστων μεταλλάξεων, για διάφορες μεθόδους (Sanger, πυρόλυση MALDI-TOF) και η μέθοδος ανιχνευτών TaqMan (112).

Μειονεκτήματα

Βέβαια εκεί που μειονεκτεί είναι στην ανάγκη για ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας (έως 0,30 C) μετουσίωσης κατά την PCR, επίσης οι αλληλουχίες που αναλύονται δεν θα πρέπει να ξεπερνούν τα 20 ζεύγη βάσεων περίπου. Η ευπάθεια που δημιουργεί η πολυμεράση λόγω των σφάλματων που προκύπτουν, η μεταβλητότητα που προκύπτει από τη συνολική ενίσχυση/εμπλουτισμό των μεταλλάξεων που δημιουργείτε εξαρτώμενη από τη θέση του DNA και τις αντικαταστάσεις των νουκλεοτιδίων ενισχύουν τα μειονεκτήματα.

Πραγματοποιώντας επιπλέον κύκλους PCR μπορεί να πολλαπλασιαστεί η επιλεκτικότητα της μεθόδου για σημειακές μεταλλάξεις, όπως έχει ήδη αποδειχθεί για άγνωστες διαγραφές. (44). Ο εμπλουτισμός των μεταλλάξεων κατά την COLD-PCR περιορίζεται ουσιαστικά από τα τυχαία σφάλματα που προκύπτουν κατά τη δράση της πολυμεράσης, όπως κάτι ανάλογο συμβαίνει και με τις προσεγγίσεις βαθιάς αλληλούχισης που χρησιμοποιούν αλληλούχιση ενός μορίου (113).

Βέβαια τόσο οι πολυμεράσες όσο και η ικανότητες εμπλουτισμού αλληλουχιών της COLD-PCR βελτιώνονται συνεχώς, καθώς και η αλληλούχιση εις βάθος μετά από συνεχόμενους κύκλους PCR θα μπορούσε να αναδείξει πολύ σημαντικές πτυχές της βιολογίας διαφόρων ασθενειών και θεραπειών τους.

3.2.10 Ανίχνευση μεταλλάξεων με Μέθοδος HRM (High resolution melting PCR)

(Υψηλή Ανάλυση Τήγματος PCR)

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση στενά συγγενών ειδών, ποικιλιών, για ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, στον έλεγχο γενετικά τροποποιημένων οργανισμών και στην ανίχνευση αλλεργιογόνων τροφίμων, χωρίς τη χρήση ανιχνευτών, ενώ μπορεί να ανιχνεύσει παραλλαγές στην αλληλουχία στόχο ακόμη και στο ένα νουκλεοτίδιο.

Η ανάλυση HRM είναι μέθοδος που βασίζεται στη συμπεριφορά τήξης του δίκλωνου DNA. Είναι η ποσοτική ανάλυση των καμπυλών τήξης θραυσμάτων DNA μετά από ενίσχυση PCR. Χρησιμοποιείται σε δείγματα δίκλωνου DNA, αφού πρώτα έχει ενισχυθεί με PCR η

περιοχή του στόχου ενδιαφέροντος με τη μετάλλαξη, (αμπλικόνιο), παρουσία μίας χρωστικής κορεσμού και τέλος ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η HRM ανάλυση απαιτεί ένα όργανο για ποσοτική PCR με εξαιρετική θερμική σταθερότητα και ένα λογισμικό για ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Το προφίλ καμπύλης τήξης, ειδικό και ευαίσθητο, εξαρτάται από τον αριθμό των νουκλεοτιδίων GC, το μήκος, την αλληλουχία και τη συμπληρωματικότητα κλώνων του προϊόντος, και ενδείκνυται ιδιαίτερα για ανίχνευση παραλλαγών μονής βάσης και μικρών ενθέσεων ή ελλείψεων.

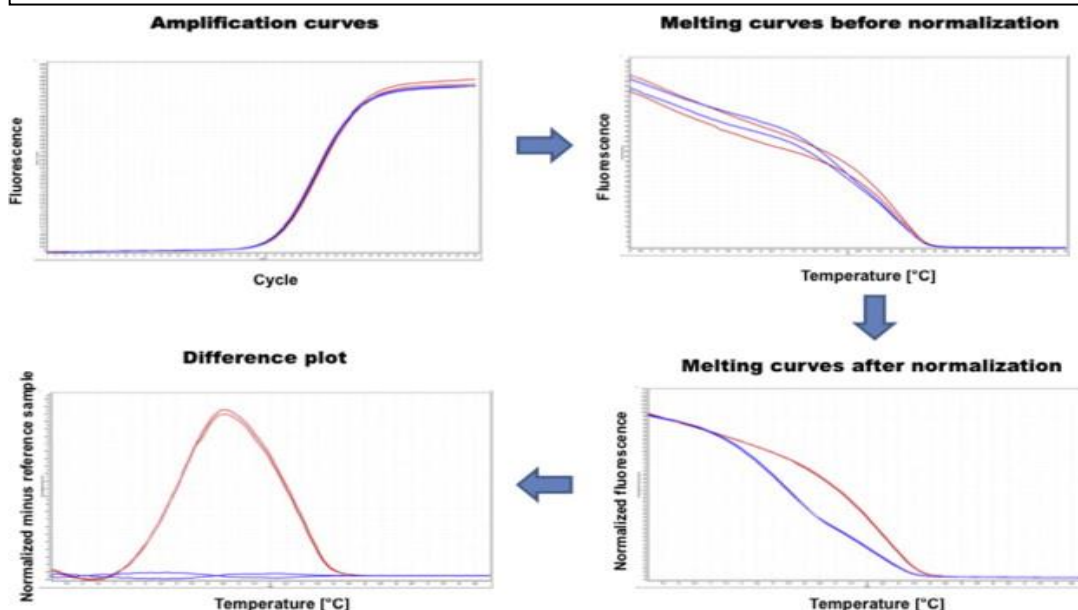
Οι εκκινήτες πρέπει να είναι σωστά σχεδιασμένοι για αποφυγή σχηματισμού μη ειδικών προϊόντων (π.χ. διμερή), και πρέπει να περιλαμβάνει τη μεγιστοποίηση των θερμοδυναμικών διαφορών μεταξύ προϊόντων PCR διαφορετικών γονοτύπων. Τα αμπλικόνια δεν θα πρέπει να φέρουν περισσότερα των 300bp διότι έτσι επηρεάζεται η ευαισθησία της ανάλυσης HRM. Όσο μεγαλώνει το μήκος ενός αμπλικονίου τόσο μικρότερη διαφορά θα προκύψει στην καμπύλη τήξης με τη διαφοροποίηση μιας μόνο βάσης. Είναι σημαντικό λοιπόν να μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια η καμπύλη τήξης των προϊόντων PCR κατά το σχεδιασμό εκκινήτων για να μπορούν να διακρίνουν τις διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία.

Για να προκύψει μια αποτελεσματική ενίσχυση θα πρέπει να υπάρχουν κύκλοι χαμηλού κατωφλιού (τιμές Ct) καθώς και καμπύλες που φτάνουν στο οροπέδιο

Παρουσιάζονται (Εικ. 54) οι καμπύλες ενίσχυσης, καμπύλες τήξεως πριν και τήξεως μετά την κανονικοποίηση, καθώς και το διάγραμμα διαφοράς.

Εικόνα 51 Ανάλυση τήξεως υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM)

Πηγή <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614002969>

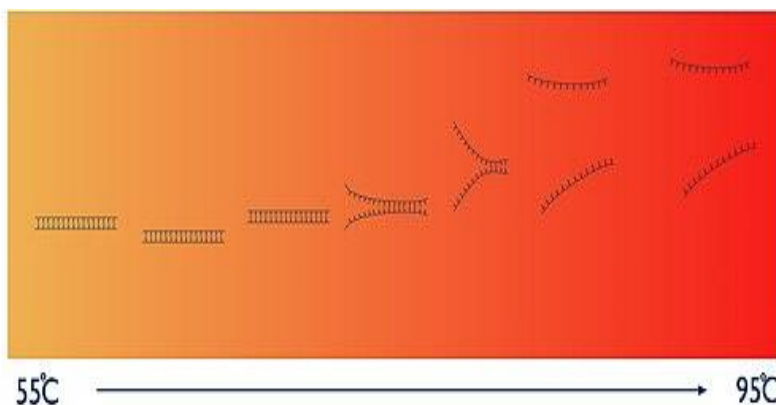


A. Τήξη υψηλής ανάλυσης

Ενώ σε θερμοκρασία δωματίου το δίκλωνο μόριο DNA είναι ένα εξαιρετικά σταθερό μόριο, με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας οι δύο κλώνοι του διαχωρίζονται σιγά σιγά έως

Εικόνα 52 Διαχωρισμός Δίκλωνου μορίου με σταδιακή αύξηση θερμοκρασίας

Πηγή :https://en.wikipedia.org/wiki/High-resolution_melting_analysis#cite_note-Reed07-10



όπου να ξεχωρίσουν πλήρως (Εικ. 55). Στις χαμηλές θερμοκρασίες του DNA οι φθορίζουσες χρωστικές παραμένουν προσδεμένες σε αυτό εκπέμποντας υψηλά επίπεδα φθορισμού.

Αρχικά θερμαίνονται τα αμπλικόνια από τους 50⁰C έως περίπου 95⁰C σταδιακά (π.χ. 0,1⁰C ή 0,2⁰C / 2sec). Ο ρυθμός που ελαττώνεται ο φθορισμός είναι μεγαλύτερος κοντά στη θερμοκρασία τήξης (T_m) του προϊόντος της PCR και στο τέλος της τήξης προκύπτουν καμπύλες τήξης που προσδιορίζουν την ένταση φθορισμού(F) σε συνάρτηση με το χρόνο(T), ενώ υπάρχει πιθανότητα να προκύψουν διαφορές στο σήμα φθορισμού (βλέπε εικόνα 54) που δικαιολογούνται με την ομαλοποίηση των απόλυτων επιπέδων φθορισμού που προκύπτουν πριν και μετά την τήξη σε 100% και 0% αντίστοιχα.

B. Θερμοκρασία Τήξης (T_m)

Θερμοκρασία Τήξης (T_m) ονομάζεται η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA είναι μονόκλωνο και εξαρτάται τόσο από το μήκος όσο και από την περιεκτικότητα του θραύσματος σε γουανίνη-κυτοσίνη (GC). Τα ζεύγη βάσεων GC συνδέονται μεταξύ τους με τριπλό δεσμό υδρογόνου, είναι πολύ σταθερά, σε αντίθεση με τα ζεύγη βάσεων AT που συνδέονται με διπλό δεσμό υδρογόνου και είναι λιγότερο σταθερά. Οπότε όσο μεγαλύτερο αριθμό ζευγών βάσεων GC φέρει ένα δίκλωνο μόριο DNA τόσο υψηλότερη τιμή T_m θα έχει. Υπολογίζοντας την τιμή T_m, μας βοηθάει να προβλέψουμε τα είδη, διότι κάθε οργανισμός έχει μια συγκεκριμένη καμπύλη τήξης. Η ανάλυση HRM όχι μόνο καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξης αλλά και του προφίλ τήξης ενός αμπλικονίου.

Οπότε το μήκος, η συμπληρωματικότητα των κλώνων (ετεροζυγωτία) και η αλληλουχία των βάσεων DNA είναι παράγοντες που καθορίζουν τη θερμοκρασία τήξης του αμπλικονίου, την καθιστούν απολύτως προβλέψιμη, και καθιστούν την HRM ιδιαίτερα εφαρμόσιμη στο να ανιχνεύσει παραλλαγές αλληλουχιών για διάγνωση αλλά και στην κλινική έρευνα.(117)

Προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των δύο κλώνων DNA, αναζητείται η κατάλληλη θερμοκρασία τήξης του αμπλικονίου ενώ ο διαχωρισμός παρακολουθείται σε ζωντανό χρόνο με χρήση φθορίζουσας βαφής τρίτης γενιάς κατάλληλης ώστε να μην αναστέλλετε η PCR. Η συγκέντρωση κορεσμού εμποδίζει την ανακατανομή των χρωστικών κατά τη διάρκεια της τήξης αυξάνοντας την ανάλυση της καμπύλης τήξης.

Κάνοντας χρήση χρωστικής SYBR Green δεν μπορούμε να διακρίνουμε ανάμεσα στα αμπλικόνια μικρές διακυμάνσεις αλληλουχιών, κάτι που μπορεί να ανιχνευτεί με την καμπύλη τήξης, κάνοντας χρήση χρωστικών φθορισμού 3ης γενιάς που δεν αναστέλλουν τη

δράση της DNA Πολυμεράσης σε υψηλές θερμοκρασίες. Προτείνεται ότι η έλλειψη ακρίβειας πιθανόν να προκύπτει από περιοχές του dsDNA που δεν είχαν ακόμη διαχωριστεί και στις οποίες προσδένεται η βαφή.(117, 118)

Τέτοιες χρωστικές είναι η Eva Green, LC Green , LC Green PLUS που μπορούν να επισημάνουν το προϊόν της PCR σε όλο του το μήκος, ώστε να ανιχνεύονται όλες οι περιοχές τήξης. (117) διότι σε κάθε βάση δεσμεύεται ένα μόριο χρωστικής , οπότε μπορούμε να υπολογίσουμε ακόμη και τη διαφορά της μία μόνο βάσης με αυτή τη χρωστική. Το αποτέλεσμα είναι ότι αφού διαφοροποιείται η στερεοδιαμόρφωση τους μειώνονται δραστικά και τα επίπεδα φθορισμού τους με την απουσία δίκλωνων μορίων DNA. Η Eva Green χρωστική, αξιοποιείται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενισχύοντας αρκετά το σήμα του υποστρώματος, δίνοντας μια πολύ καλή καμπύλη τήξης ενώ μειώνουν τις πιθανότητες να γίνει ανακατανομή της στις γειτονικές περιοχές του δίκλωνου μορίου.

Γ. Καμπύλη τήξης Αρνητικής παραγώγου του φθορισμού (-dF/dT)

Η μέθοδος βασίζεται στη διαφοροποίηση της συμπεριφοράς του μορίου στόχου κατά την τήξη του.

Στις χαμηλές θερμοκρασίες το μόριο στόχος παραμένει ως δίκλωνο μόριο και οι φθορίζουσες χρωστικές παραμένουν και αυτές συνδεδεμένες δίνοντας υψηλά επίπεδα φθορισμού.

Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία τα δίκλωνα μόρια αρχίζουν να αποδιατάσσονται με συνέπεια να απελευθερώνονται μόρια χρωστικής οπότε και να μειώνεται και ο φθορισμός.

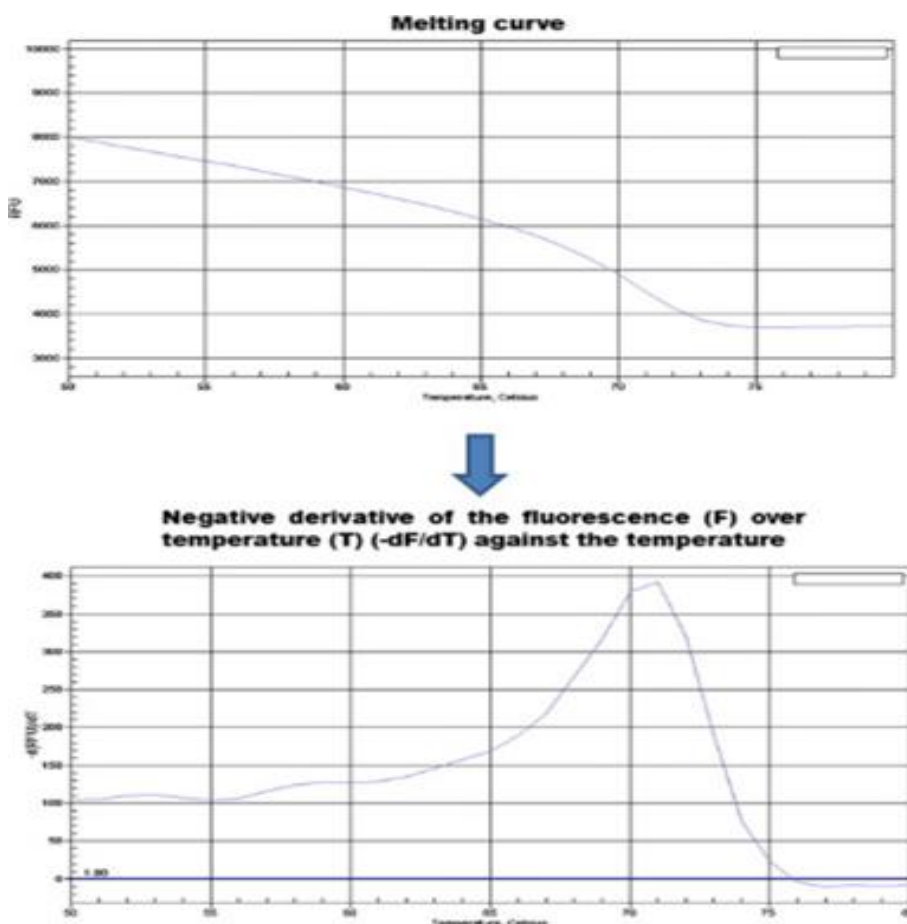
Η μείωση του φθορισμού από την αποδιάταξη μειώνεται όσο το προϊόν της PCR τείνει προς τη θερμοκρασία τήξης T_m του μορίου.

Όταν το μόριο φτάσει στη θερμοκρασία T_m , που ορίζουμε ως το σημείο καμπύλης τήξης, το μόριο στόχος πλέον έχει το 50% των μορίων του σε δίκλωνη μορφή και το άλλο 50% των μορίων του έχει πλέον αποδιαταχθεί δηλαδή είναι σε μονόκλωνη μορφή.

Αυτή τη διαδικασία μπορεί ο αναλυτής να την παρακολουθήσει, να υπολογίσει τη μείωση φθορισμού και να πάρει τα δεδομένα σε ένα γράφημα, γνωστό ως καμπύλη τήξης, (Εικ. 56) παρουσιάζοντας το επίπεδο φθορισμού έναντι της θερμοκρασίας της ανάλυσης. Το T_m του αμπλικονίου μπορεί να προσδιοριστεί από το σημείο καμψής της καμπύλης τήξης ή από την κορυφή τήξης από τη γραφική παράσταση της αρνητικής παραγώγου του φθορισμού ($-dF/dT$) έναντι της θερμοκρασίας (T) (Εικ.56) δηλ. ένα παράγωγο γράφημα καμπύλης τήξης που δείχνει το σημείο καμψής στην κλίση ως μια πιο εύκολα ορατή κορυφή τήξης, για μια πιο σαφή εικόνα της δυναμικής της τήξης.(119)

Εικόνα 53 Ανάλυση καμπύλης τήξης, αρνητική παράγωγος του φθορισμού ($-dF/dT$) έναντι της θερμοκρασίας (T)

Πηγή:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614002969>



Αναλύοντας την καμπύλη τήξης αξιολογούμε κατά τη θέρμανση, τα χαρακτηριστικά διάστασης του δίκλωνου DNA. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, το δίκλωνο μόριο αρχίζει να διασπάται αυξάνοντας την απορρόφηση.

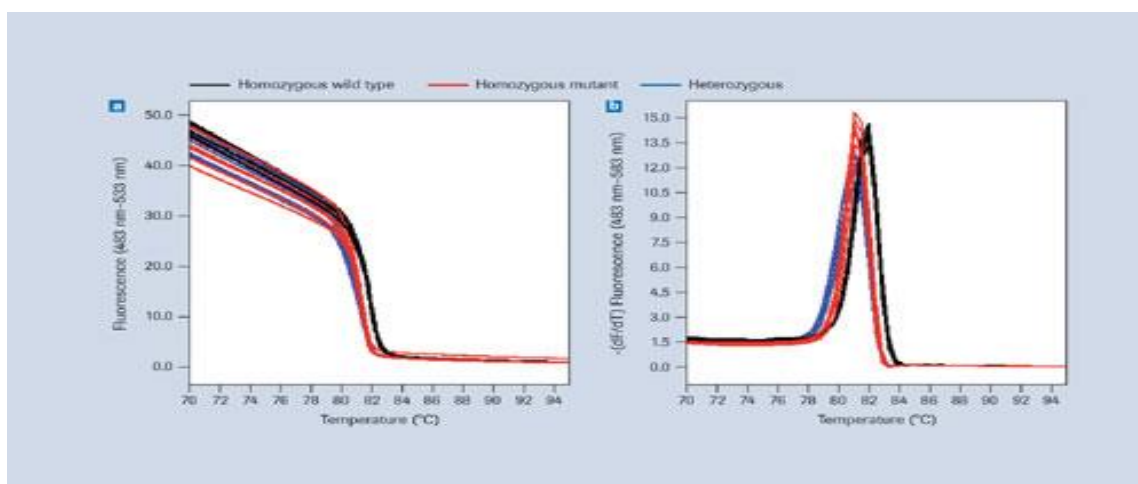
Η δυνατότητα ανίχνευσης στην ανάλυση HRM μπορεί να φτάσει έως και μικρότερο από 0,5°C. Ανάλογα με ποια βάση μεταλλάσσεται επηρεάζεται διαφορετικά η θερμοκρασία τήξης του αντιγράφου, έτσι

Πίνακας 1 Μετατόπιση της T_m (°C) στην καμπύλη τήξης ανάλογα με την αλλαγή βάσης

Για αλλαγές βάσης	Η μετατόπιση της T_m (°C) στην καμπύλη τήξης είναι:
C/T και G/A	κατά προσέγγιση >0.5
C/A	από 0,4 έως 0,5
G/T	από 0,2 έως 0,5
C/G	από 0,2 έως 0,4
A/T	<0,2

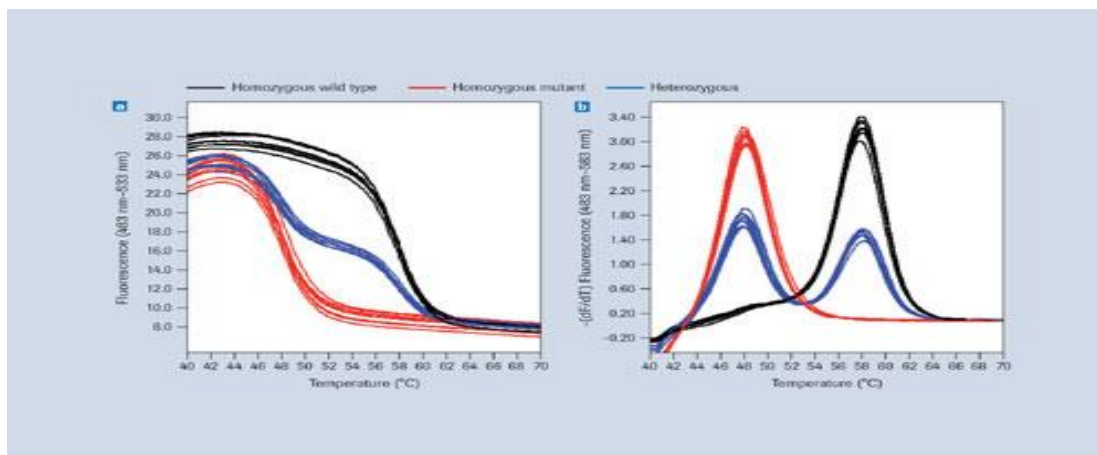
Μπορούμε με χρήση χρωστικών δέσμησης του κορεσμένου DNA να διαφοροποιήσουμε χωρίς δυσκολία ομόζυγα από ετερόζυγα δείγματα. Οι χρωστικές αυτές παρεμβαίνουν στην ενίσχυση και δίνουν έντονες καμπύλες τήξης. και για να γίνει η ανάλυση πιο εύκολη να αξιολογηθεί η αρνητική πρώτη παράγωγος υπολογίζεται και αξιολογείται.

Εικόνα 54 Καμπύλη τήξης για αλληλόμορφα γνωστών SNPs



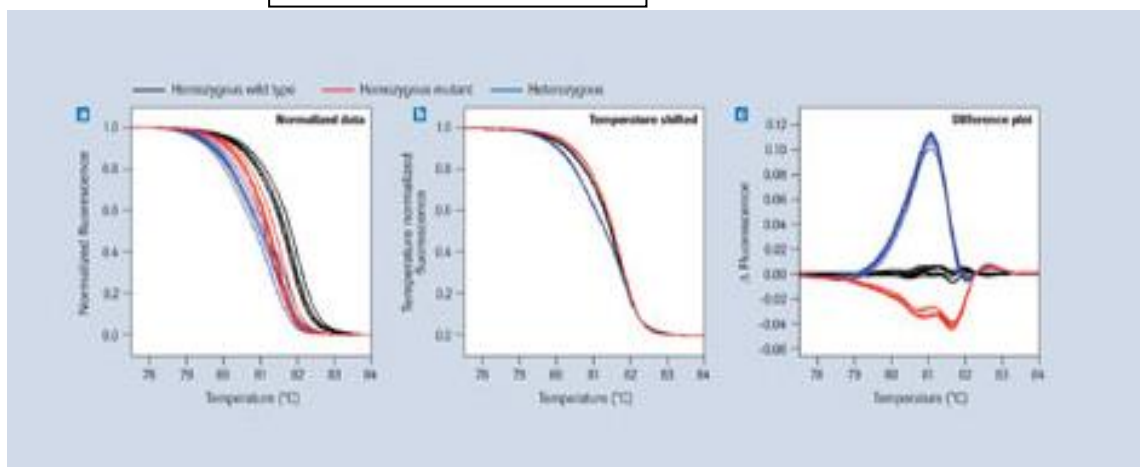
Τα αλληλόμορφα γνωστών SNPS (Εικ.57) αναλύονται καλύτερα με τήξη παρουσία ειδικών ανιχνευτών αλληλουχίας που συνδέονται σε διαφορετικά αλληλόμορφα ή συνδυασμούς αλληλόμορφων στην περιοχή που περιέχει SNP. Γραφική παράσταση φθορισμού έναντι θερμοκρασίας στη πρώτη γραφική ενώ στη δεύτερη είναι η αρνητική πρώτη παράγωγος της σε συνάρτηση με την θερμοκρασία.

Εικόνα 55 Καμπύλες για άγνωστες μεταλλάξεις



Άγνωστες μεταλλάξεις, πολυμορφισμοί δεν μπορούν να ανιχνευθούν με αυτό τον τρόπο, οπότε επεξεργασία με βαφές DNA και με ανάλυση με κατάλληλο λογισμικό ώστε να μπορούν να είναι εμφανή τα ετερόζυγα δείγματα λόγω διαφοροποιημένων καμπυλών

Εικόνα 56 HRM Ανάλυση



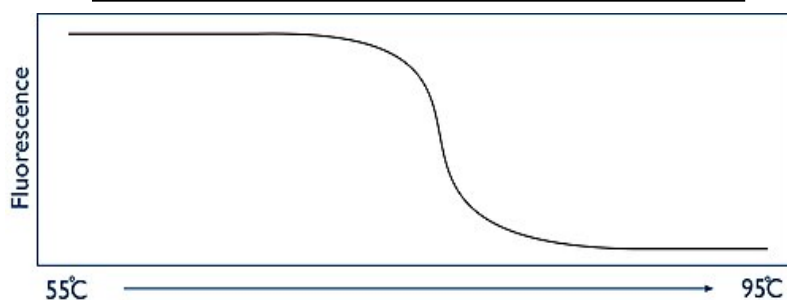
τήξης.(Εικ.58) Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των καμπυλών αυτών με αυτές των αγρίου τύπου δειγμάτων. Το λογισμικό αναλύει διαφορές (Εικ. 59A), κάνει κάποιες απαραίτητες ομαλοποιήσεις (Εικ. 59B) και τέλος σχεδιάζει τη διαφορά φθορισμού μεταξύ του κάθε δείγματος με το αγρίου τύπου (Εικ.59C) και έτσι μπορεί κάποιος να ταυτοποιήσει σχετικά εύκολα τα δείγματα των ετεροζυγωτών.

Δ. Καμπύλη Διαφοράς

Εάν οι διαφορές της καμπυλότητας των δειγμάτων είναι πολύ μικρές στο ευθυγραμμισμένο διάγραμμα τήξης και τα δείγματα πολλά, τότε με δυσκολία βρίσκονται αυτές οι διαφορές. Επειδή όμως από την ευθυγραμμισμένη καμπύλη τήξης προκύπτει ένα επιπλέον, η καμπύλη διαφοράς, τότε μπορεί να αποσαφηνιστούν οι γονότυποι μεταξύ των δειγμάτων και η καμπύλη αυτή προκύπτει από τη διαφορά της ευθυγραμμισμένης καμπύλης τήξης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων δειγμάτων ως προς κάποιο δείγμα «αναφοράς» που συνήθως είναι αυτό του αγρίου τύπου πολυμορφισμού.

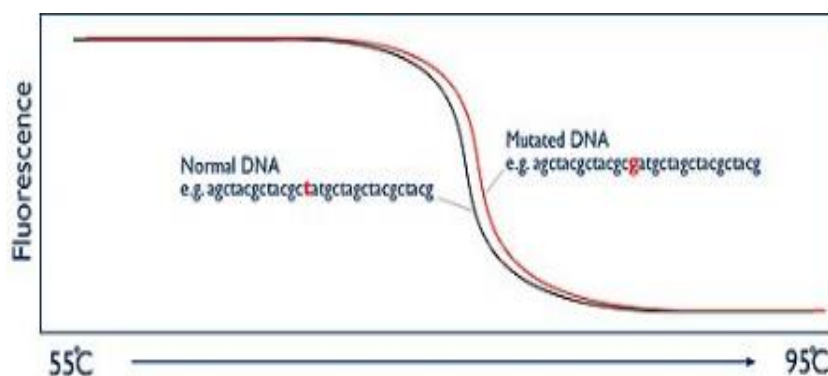
Όταν η καμπύλη δείγματος επικαλύπτεται πλήρως με την καμπύλη αναφοράς (Εικ. 60) δηλώνει ότι και τα δύο αμπλικόνια φέρουν την ίδια αλληλουχία, αν και μπορεί να μην έχουν ακριβώς την ίδια αλληλουχία βάσεων ενώ έχουν πανομοιότυπη συμπεριφορά τήξης διότι μπορεί να έχουν προκληθεί δύο μεταλλάξεις (π.χ. T σε G και G σε T) (Εικ.61).

Εικόνα 57 Τα δύο αμπλικόνια φέρουν την ίδια αλληλουχία



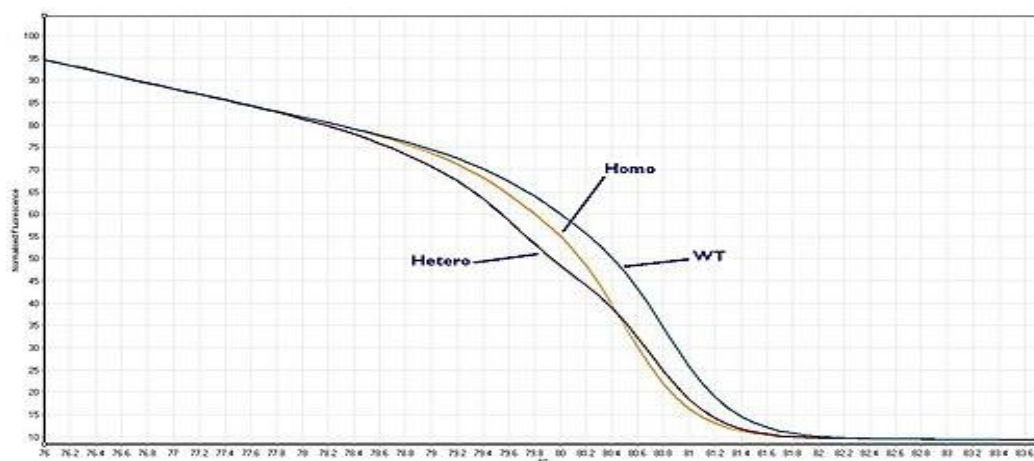
Εικόνα 58 Δύο αντίγραφα του γονιδίου με πιθανή μετάλλαξη

Πηγή https://en.wikipedia.org/wiki/High-resolution_melting_analysis#cite_note-Reed07-10



Εικόνα 59 Τρία διαφορετικά αλληλόμορφα

Πηγή https://en.wikipedia.org/wiki/High-resolution_melting_analysis#cite_note-Reed07-10



Κάθε οργανισμός έχει δύο (ή περισσότερα) αντίγραφα κάθε γονιδίου, τα αλληλόμορφα(Εικ. 62). Μετά την ενίσχυση του δείγματος με την πιθανή μετάλλαξη, με PCR, ενισχύονται και τα δύο αντίγραφα της περιοχής ενδιαφέροντος του DNA δίνοντας τρεις πιθανότητες:

- Κανένα αλληλόμορφο να μην φέρει τη μετάλλαξη και αυτό είναι γνωστό ως "άγριου τύπου" ή 'wt.'.
- το ένα από τα δύο αλληλόμορφα να φέρει τη μετάλλαξη γνωστό ως "ετεροζυγώτης", ή 'hetero' και.
- τα δύο αλληλόμορφα να φέρουν τη μετάλλαξη και είναι γνωστά ως "ομοζυγώτης" ή 'homo'.

Κάθε μία από αυτές τις περιπτώσεις δίνει μια καμπύλη τήξης, με τα ετερόζυγα δείγματα να δίνουν μία χαρακτηριστική σιγμοειδή καμπύλη τήξης(Εικ.62) ελαφρώς διαφορετική από τις άλλες. Με μια υψηλής ποιότητας ανάλυση HRM μπορούμε να διακρίνουμε ποιο από τα τρία αυτά σενάρια έχουμε. Η καμπύλη των ετεροζυγωτών αποκτά αυτό το τυπικό σχήμα επειδή η αλλαγή φθορισμού που ανιχνεύεται είναι υπέρθεση αλλαγών φθορισμού για όλα τα προϊόντα PCR που υπάρχουν στο δείγμα.(118)

Διαφορετικά άτομα, δίνουν ακριβώς την ίδια καμπύλη τήξης για συγκεκριμένη αλληλουχία δίκλωνου DNA. Σε περίπτωση όμως εμφάνισης μετάλλαξης σε αυτό το δίκλωνο τμήμα του DNA, τότε θα διαφοροποιηθεί και η θερμοκρασία τήξης του DNA, δίνοντας μία καμπύλη διαφορετική της πρώτης. Η διαφορά συνήθως είναι πολύ μικρή, ίσως ένα κλάσμα του βαθμού, αλλά υπάρχει η δυνατότητα παρακολούθησης της διαδικασίας σε «υψηλή ανάλυση», χωρίς να χαθούν οι αλλαγές και να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη μετάλλαξης. Έτσι η ανάλυση HRM είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για ανίχνευση διαφοροποίησης ακόμη και σε μία μόνο βάση στην ίδια αλληλουχία δείγματος αλλά και μικρών ενθέσεων ή διαγραφών ή για μικροβιολογική ταυτοποίηση.

Η ανάλυση καμπύλης τήξης μετά την PCR έχει έναν ιδιαίτερο τρόπο μέτρησης των δεδομένων και μπορεί να αντλεί πληροφορίες από την ίδια τη διαδικασία της ενίσχυσης. Για ένα γονοτυπικό σχεδιασμό χρειάζονται λιγότερα δεδομένα. Δεν χρειάζονται ειδικοί εκκινητές ή ανιχνευτές αλληλόμορφων, καθώς η ίδια χρωστική ουσία ή ανιχνευτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για όλα τα αλληλόμορφα. Η ανάλυση της καμπύλης τήξης με χρωστικές υψηλής ευκρίνειας προσφέρει μεγαλύτερη ευκολία και απόδοση από τις παραδοσιακές μεθόδους (π.χ. dHPLC) όταν πρόκειται να ελεγχθούν τα αμπλικόνια για την παρουσία νέων γενετικών παραλλαγών πριν ή αντί της αλληλούχισης.

Οπότε με την καμπύλη τήξης υψηλής ανάλυσης μπορούμε να βρούμε εάν υπάρχει ή δεν υπάρχει μία μετάλλαξη δηλαδή μπορεί να γίνει ποιοτική αλλά όχι ποσοτική ανάλυση. Η HRM συμβάλλει στην έρευνα και στη διάγνωση ασθενειών αφού μπορεί να ανιχνεύει γνωστούς πολυμορφισμούς, SNPs, γνωστές μεταλλάξεις, στην ανίχνευση βιοδεικτών, στην ανίχνευση και γονοτύπηση παθογόνων μικροοργανισμών και τέλος στην ανίχνευση των μεθυλιωμένων περιοχών.

Επίσης με την ανάλυση HRM γίνεται ταυτοποίηση και διαφοροποίηση στενά συγγενών ειδών και ποικιλιών προκειμένου να ανιχνευθεί η νοθεία των τροφίμων συγκρίνοντας τις καμπύλες τήξεως με εκείνες των δειγμάτων αναφοράς. Εάν το amplicon περιέχει αρκετές περιοχές τήξης, οι καμπύλες τήξης μπορούν, ωστόσο, να είναι μάλλον περίπλοκες. Οι καμπύλες τήξης από διαφορετικούς γονότυπους μπορεί να είναι πολύ παρόμοιες. Τα διαγράμματα διαφοράς, που προκύπτουν αφαιρώντας τις καμπύλες τήξεως δείγματος από την καμπύλη τήξεως ενός δείγματος αναφοράς, μπορεί να βοηθήσουν. Με την ανάλυση

HRM δεν απαιτούνται περαιτέρω βήματα επεξεργασίας μετά την PCR, οπότε θεωρείται πιο κατάλληλη για ανάλυση υψηλής απόδοσης και λιγότερο επιρρεπής σε μολύνσεις.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση του νοθευτή, μπορεί επίσης να εφαρμοστεί για γονότυπο και ορότυπο παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα τρόφιμα. Μπορεί να γίνει επαλήθευση της ταυτότητας των ποικιλιών αμπέλου, Ανίχνευση νοθείας ρυζιού Basmati, Διαφοροποίηση ειδών εσπεριδοειδών και υβριδίων, Έλεγχος γνησιότητας της ποικιλίας τροφίμου όπως π.χ. η φακή, Ταυτοποίηση ύπαρξης ειδών *Listeria* σε προϊόντα, Διαφοροποίηση απομονωμένων στελεχών της ομάδας *Bacillus cereus*, Διαφοροποίηση στελεχών *Escherichia coli*, Ανίχνευση δυνητικά αλλεργιογόνων αμυγδάλων, με χρήση μικροδορυφόρων που επιλέχθηκαν για ανίχνευση επανάληψης μοτίβων δινουκλεοτιδίων με μεγέθη αλληλόμορφων που κυμαίνονται από 129 bp έως 315 bp(123) ή την πιθανή ανίχνευση νοθείας ρυζιού Basmati με άλλα μη αρωματικά ρύζια (124).

Η ανάλυση HRM με μικροδορυφόρους επέτρεψε διάκριση δύο υποκειμένων που μοιράζονται ένα αλληλόμορφο και διαφέρουν μόνο κατά 2 bp (μία μόνο επανάληψη δινουκλεοτιδίων CT) στο άλλο αλληλόμορφο.

Η ανάλυση HRM είναι μια πολύ οικονομικά αποδοτική μέθοδος υψηλής απόδοσης για την ταυτοποίηση και διαφοροποίηση ποικιλιών και στενά συγγενών ειδών και επιτρέπει την εκτίμηση της ποσότητας νοθείας σε ένα δείγμα (124)

Τρόφιμα που περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς κατά την κατανάλωσή τους προκαλούν ασθένειες. Κακές πρακτικές υγιεινής των τροφίμων προκαλούν μολύνσεις σε οποιοδήποτε στάδιο της τροφικής αλυσίδας, από την παραγωγή, επεξεργασία, και διανομή του παρασκευάσματος και επιβάλλεται η ταυτοποίησή τους σε επίπεδο είδους και υποείδους, ώστε να γίνεται γνωστή η οδός και η πηγή μόλυνσης για να επιλέγεται κατάλληλο θεραπευτικό σχήμα (125).

Οι μικροοργανισμοί απαιτούν κατάλληλες συνθήκες επώασης ανάλογες του είδους τους, έτσι έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που βασίζονται στην PCR, όπως RFLP, SSCP, PCR-DGGE (μετουσίωση ηλεκτροφόρησης πηκτής κλίσης), ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου (PFGE) και πολλαπλή PCR σε πραγματικό χρόνο, με εξαίρεση την πολυπλεξία PCR σε πραγματικό χρόνο, ώστε θραύσματα DNA που διαφέρουν σε λίγα μόνο ζεύγη βάσεων να μπορούν να διαχωριστούν. Κάποιες από τις παραπάνω μεθόδους είναι πιο κατάλληλες σε

σχέση με τις υπόλοιπες ενώ η HRM δείχνει να είναι μια μάλλον δαπανηρή εναλλακτική λύση, επιτρέποντας την ακριβή ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα τρόφιμα σε επίπεδο είδους και στελέχους (126)

Ταυτοποιήσεις για είδη *Listeria* σε δείγματα τροφίμων (χυμός, γάλα, τυρί και κρέας), ο προσδιορισμός του ορότυπου *Salmonella* spp. προκαλείται από την κατανάλωση προϊόντων όπως το κρέας, τα πουλερικά, τα αυγά και το γάλα (127, 128)

Οι τοξίνες που παράγονται από τον *S. aureus*, ένα ευρέως απαντώμενο βακτήριο στο δέρμα των ανθρώπων, είναι συχνά υπεύθυνες για τροφική δηλητηρίαση (129 για την ομάδα *B. Cereus* που περιλαμβάνει έξι διαφορετικά είδη, συμπεριλαμβανομένων των *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* και *B. cereus sensu stricto*, και είναι μια συχνή αιτία τροφικής δηλητηρίασης (130)

Το *Escherichia coli* είναι μια ετερογενής ομάδα τυπικά μη παθογόνων βακτηρίων που υπάρχουν φυσικά στην εντερική χλωρίδα των ζώων και των ανθρώπων, (126)

Η γενετική τροποποίηση οργανισμών γίνεται προκειμένου να αποκτήσουν ένα νέο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό. Συνήθως βασίζεται στην εισαγωγή ενός γονιδίου (από άλλο είδος) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη εκείνη που του προσδίδει συγκεκριμένο όφελος. Τα φυτά τροποποιούνται βασικά για να γίνουν πιο ανθεκτικά στα ζιζανιοκτόνα ή/και στα έντομα.(131)

Το Γενετικά Τροποποιημένο προϊόν πρέπει να ταυτοποιείται με ειδικές μεθόδους PCR, που είναι ειδικές για την ανίχνευση της τροποποιημένης αλληλουχίας γονιδίων-στόχων και ανέπτυξαν μια πολυπλεκτική μέθοδο ανάλυσης PCR-HRM σε πραγματικό χρόνο για ανάλογη ανίχνευση. (132)

Οι τροφικές αλλεργίες είναι ανοσολογικές ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα τρόφιμα. Περίπου το 3% των ενηλίκων και το 6-8% των παιδιών επηρεάζονται από τροφικές αλλεργίες (133) από γενετικούς παράγοντες, πολιτιστικές και διατροφικές συνήθειες και ιδίως από το χρόνο έκθεσης στο συγκεκριμένο τρόφιμο κατά τη διάρκεια της ζωής. Οι αλλεργικοί ασθενείς υποφέρουν από μια ποικιλία συμπτωμάτων, καθώς και αντιδράσεις που επηρεάζουν το δέρμα, το γαστρεντερικό σωλήνα ή / και το αναπνευστικό σύστημα. Ωστόσο, η κατανάλωση αλλεργιογόνων τροφίμων μπορεί επίσης να οδηγήσει σε απειλητικές για τη ζωή αντιδράσεις όπως η αναφυλαξία, χωρίς να υπάρχει κάποια θεραπεία. Κατά τον έλεγχο

πρέπει να αποφεύγονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ενώ το όριο ανίχνευσης θα πρέπει να είναι περίπου 10 ppm ώστε να εκλείπουν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Παρουσιάστηκε μια νέα προσέγγιση για την ανίχνευση αλλεργιογόνων τροφίμων βασισμένη στην ανάλυση HRM. Η ανάλυση αλληλούχισης των προϊόντων PCR που ελήφθησαν για αμύγδαλα και συναφή είδη επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την ανάλυση HRM (134)

Η χρήση HRM μειώνει το χρόνο ανάλυσης και τις πιθανότητες επιμόλυνσης. Το HRM αξιολογείται ως μια πιο οικονομική λύση ενώ η υψηλή ανάλυση επιτρέπει τόσο τον προσδιορισμό του homo και της ετεροζυγωτίας, αλλά και πληροφορεί σχετικά με τον τύπο του homo και της ετεροζυγωτίας, με διαφορετικές γονιδιακές παραλλαγές που δημιουργούν διαφορετικά σχήματα καμπύλης τήξης.

Αναφέρεται (118) ότι η φθορίζουσα επισήμανση στο αστάρι έχει αποδειχθεί ευνοϊκή σχετικά με τη χρήση μιας παρεμβαλλόμενης χρωστικής όπως το SYBR Green I. Ωστόσο, έχει σημειωθεί πρόοδος στην ανάπτυξη και χρήση βελτιωμένων παρεμβαλλόμενων βαφών (135) που μειώνουν το ζήτημα της αναστολής της PCR και τις ανησυχίες σχετικά με τη μη κορεσμένη παρεμβολή της βαφής.

Είναι μέθοδος που προσαρμόζεται σε δοκιμές διαλογής υψηλής απόδοσης ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα εξάπλωσης και μόλυνσης του amplicon στο εργαστήριο, λόγω της χρήσης κλειστού σωλήνα.

Ενώ με την συμβατική PCR μπορούμε να εξασφαλίσουμε τόσο ενίσχυση μιας συγκεκριμένης γενετικής περιοχής όσο και ποσοτικοποίηση των μεταγραφόμενων περιοχών (qPCR) με τη μέθοδο HRM κάνουμε ποιοτική ανάλυση δηλαδή διαπιστώνουμε αν έχουμε ή όχι τη μετάλλαξη.

Η ανάλυση HRM πλεονεκτεί πολύ έναντι των παραδοσιακών μεθόδων γονιδιακής σάρωσης και γονότυπου διότι πραγματοποιείται στον ίδιο σωλήνα με το στάδιο ενίσχυσης χωρίς να απαιτεί επιπλέον καθαρισμό ή διαχωρισμό των αμπλικονίων. Έτσι η ανάλυση HRM γίνεται πιο γρήγορη, λιγότερο επίπονη και πιο κατάλληλη για υψηλή απόδοση δείγματος από εναλλακτικές προσεγγίσεις όπως η ανάλυση πηκτής.(129). Επιπλέον, μειώνεται ο κίνδυνος επιμόλυνσης, γίνεται λιγότερο δαπανηρή από άλλες προσεγγίσεις, και ιδιαίτερα από τεχνικές αλληλούχισης. Διαφορετικοί ετεροζυγώτες παράγουν καμπύλες τήξης που

μπορούν να διακριθούν από τους ομοζυγώτες, αλλά φέρουν πολλές ομοιότητες για να διαφοροποιηθούν μεταξύ τους (136). Στην περίπτωση της σάρωσης μετάλλαξης, η παρουσία κοινών SNPs μπορεί να περιπλέξει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η διακριτική δύναμη της ανάλυσης HRM είναι πολύ υψηλή, αλλά χαμηλότερη από εκείνη του PFGE (τεχνική με την οποία το γονιδιωματικό DNA απομονώνεται από τον οργανισμό ενδιαφέροντος ακολουθούμενη από ανάλυση ενζύμου περιορισμού), του χρυσού προτύπου για τον γονότυπο και τον ορότυπο των βακτηρίων. Ωστόσο, δεδομένου ότι η ανάλυση HRM είναι λιγότερο χρονοβόρα, μπορεί να είναι ένα πρόσθετο εργαλείο ελέγχου σε περίπτωση κατάστασης επιδημίας.(137)

Με τις πληροφορίες αυτές μπορούμε να ταυτοποιήσουμε αν υπάρχει μεθυλίωση ή όχι, εάν υπάρχει συγκεκριμένη γνωστή μετάλλαξη, να ανιχνευθούν και να γονοτυπηθούν παθογόνοι μικροοργανισμοί, να ταυτοποιηθούν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP) και να γίνει διάκριση μεταξύ ομόζυγων αλληλόμορφων άγριου τύπου, ετερόζυγων και ομόζυγων μεταλλαγμένων λόγω των παραγόμενων μοτίβων διάστασης

3.2.11 Ανάλυση για μεταλλάξεις με LAMP (PCR με ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου) (Loop-mediated isothermal amplification PCR)

Μοριακή τεχνική που περιεγράφηκε αρχικά από τον Notomi T., et al το 2000. (138). Τεχνική που πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο χωρίς όμως να κάνει ποσοτική ανάλυση. Με χρήση φθορίζουσών χρωστικών ή ύπαρξη θολερότητας μπορεί να επιτευχθεί οπτική επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Ενισχύει το DNA με υψηλή ειδικότητα, ενώ είναι απλή, γρήγορη και οικονομική κάτω από ισοθερμικές συνθήκες για τη σύνθεση DNA μετατόπισης κλώνου χωρίς να απαιτούνται εξειδικευμένες συσκευές αύξησης ή ελέγχου της θερμοκρασίας όπως θερμικός κυκλοποιητής. Συγκρινόμενη με άλλες τεχνικές όπως η Real Time PCR και η PCR απαιτούνται λιγότερα βήματα. Ο θερμικός κυκλοποιητής υψηλής ακρίβειας σε PCR εμποδίζει την ευρεία χρήση αυτής της ισχυρής μεθόδου. Ιδιαίτερα ανθεκτική μέθοδος αναφορικά με την παρουσία αναστολέων, με πιθανές διαφοροποιήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων, έκθεσης των αντιδραστηρίων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αλλά και σε εκτεταμένα χρονικά διαστήματα προετοιμασίας των αντιδράσεων. Μπορεί να ενισχύσει μερικά αντίγραφα του DNA σε 10^9 σε λιγότερο από μία ώρα υπό ισοθερμικές συνθήκες και με μεγαλύτερη εξειδίκευση από άλλες μεθόδους.

Πραγματοποιείται με θέρμανση στους 65°C με χρήση απλού υδατόλουτρου ή θερμαινόμενου block, όπου το μονόκλωνο και το δίκλωνο DNA βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία χωρίς να απαιτείται στάδιο μετουσίωσης - αποδιάταξης του δίκλωνου μορίου, με την απόδοση ενίσχυσης του μορίου στόχου να είναι πολύ υψηλή.

Δεν απαιτείται στάδιο απομόνωσης του DNA από το δείγμα στόχο, και είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στην παρουσία αναστολέων της PCR ενώ η παρουσία φθοριζόντων χρωστικών μπορεί να προκαλέσει αναστολή.

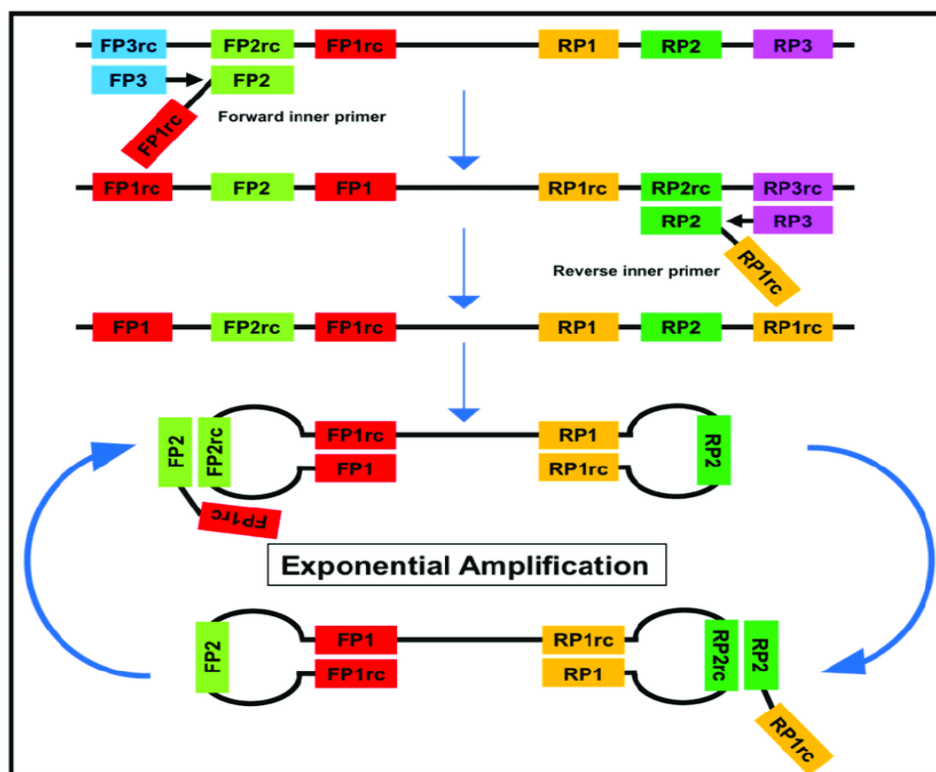
Τα υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι είτε DNA είτε RNA αφού πρώτα γίνει χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Το κόστος της μεθόδου είναι σχετικά χαμηλό δεδομένου ότι δεν χρειάζονται εξειδικευμένα αντιδραστήρια αλλά ούτε και περίπλοκος εξοπλισμός.

Μια DNA πολυμεράση (Bst) με υψηλή δραστηριότητα κυκλικής μετατόπισης κλώνων επιπλέον μιας δραστηριότητας αντιγραφής, και ένα σύνολο από τέσσερις ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές (δύο εσωτερικούς και δύο εξωτερικούς) που αναγνωρίζουν συνολικά έξι διακριτές αλληλουχίες στο DNA-στόχο, ενισχύουν και ανιχνεύουν την αλληλουχία στόχο σε ένα μόνο στάδιο, καθώς και οι εκκινητές βρόχου (loopforward και loopbackward) συμβάλλουν σε ένα εξαιρετικό αποτέλεσμα.

Αρχικά χρησιμοποιούνται και οι τέσσερις εκκινητές, οι εσωτερικοί εκκινητές (ο εμπρόσθιος εσωτερικός (FIP) και ο οπίσθιος εσωτερικός εκκινητής (BIP) και οι εξωτερικοί εκκινητές F3 και B3, ενώ στην πορεία της αντίδρασης χρησιμοποιούνται μόνο οι εσωτερικοί εκκινητές για τη σύνθεση DNA μετατόπισης κλώνου και ο καθένας τους φέρει από δύο διακριτές αλληλουχίες, περίπου 23-24 νουκλεοτιδίων που σχετίζονται με επιλεγμένο νουκλεϊκό στόχο για την έναρξη της ενίσχυσης. Οι δύο εσωτερικοί εκκινητές δημιουργούν από ένα βρόγχο στα άκρα των υπό ενίσχυση αλληλουχιών που παράγονται διότι περιέχουν τη νοηματική και αντινοηματική αλληλουχία, μία για αστάρωμα στο πρώτο στάδιο και η άλλη για αυτοπλήρωση σε μεταγενέστερα στάδια. Το ζεύγος των εξωτερικών εκκινητών F3 και B3, θέτει κατάλληλες συνθήκες ώστε η Bst πολυμεράση να μπορέσει να μετατοπίσει την αλυσίδα. Η ενίσχυση του στόχου επιταχύνεται με τους εκκινητές βρόχους (loopforward και loopbackward) διότι αυτοί έχουν ικανότητα πρόσδεσης σε περιοχές τέτοιες του μορίου που αδυνατούν να προσδεθούν οι εσωτερικοί αλλά και οι εξωτερικοί εκκινητές, και όταν υπάρχουν επισπεύδουν την ενίσχυση του DNA στόχου.

Εικόνα 60 Lamp Method

Πηγή https://www.researchgate.net/figure/The-loop-mediated-isothermal-amplification-LAMP-is-based-on-a-so-called-auto-cycling_fig1_345435479



Παρουσιάζετε η ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMP) (Εικ. 63) που βασίζεται στη λεγόμενη σύνθεση DNA μετατόπισης κλώνων αυτόματης ανακύκλωσης χρησιμοποιώντας μια πολυμεράση DNA μετατόπισης κλώνων και δύο ζεύγη εκκινητών ειδικών για το στόχο. Οι εσωτερικοί εκκινητές περιέχουν δύο αλληλουχίες που η καθεμία αντιστοιχεί στο διαφορετικό κλώνο του DNA-στόχου, αντίστοιχα, και συνδέονται με ένα διαχωριστικό TTTT. Οι εσωτερικοί εκκινητές ξεκινούν μια συμπληρωματική σύνθεση του DNA-στόχου, ενώ οι εξωτερικοί εκκινητές (FP1 και RP3) ξεκινούν μια σύνθεση μετατόπισης κλώνων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μονόκλωνου DNA που συνδέεται με εσωτερικούς εκκινητές. Το μονόκλωνο DNA σχηματίζει βρόχους με ανόπτηση των αντίστοιχων αλληλουχιών και λειτουργεί ως πρότυπο για εκθετική ενίσχυση.

Το δείγμα DNA που φέρει την αλληλουχία στόχο μαζί με τους τέσσερις εκκινητές υφίσταται αρχικά θερμική μετουσίωση καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών κλώνων και αμέσως ψύχεται σε πάγο. Με την προθήκη θραύσματος Bst πολυμεράσης ενεργοποιείται η αντίδραση LAMP για μία ώρα στους 65⁰ C.

Με τη μέθοδο LAMP αρχικά χρησιμοποιούνται τέσσερις εκκινητές και σε επόμενα στάδια χρησιμοποιούνται άλλοι δύο εκκινητές με στόχο να πραγματοποιηθεί μεγαλύτερη εξειδίκευση σχετικά με την ενίσχυση του στόχου. Δεδομένου ότι για να αρχίσει να ενισχύεται η σύνθεση του DNA απαιτούνται τέσσερις εκκινητές ενώ για να δημιουργηθεί το DNA-βρόχος απαιτούνται άλλοι δύο εκκινητές έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται πολύ επιλεκτικά η ενίσχυση του στόχου του DNA της LAMP σε σχέση με αυτό της PCR.

Μετά την αντίδραση της μιας ώρας στους 65 °C, τα παραγόμενα προϊόντα αρχικά είναι ορατά στο γυμνό μάτι σε πραγματικό χρόνο, λόγω δημιουργίας λευκού ιζήματος μετρώντας τη θολερότητα (139), από το ίζημα πυροφωσφορικού μαγνησίου στο διάλυμα ως υποπροϊόν της ενίσχυσης για μικρούς όγκους (140) είτε με φθορισμό χρησιμοποιώντας παρεμβαλλόμενες βαφές όπως το SYTO 9.(141)

Φθορίζουσες χρωστικές μπορούν να συμβάλλουν στην ανίχνευση της ενισχυμένης περιοχής του DNA μορίου αλλάζοντας το χρώμα της αντίδρασης, όπως SYBR Green I, EvaGreen, βρωμιούχο αιθίδιο P2, Malachite green, Picogreen. Με τη χρωστική SYBR Green I μπορεί να γίνει εύκολα η ανίχνευση της ενίσχυσης του DNA, και χρησιμοποιείται ευρύτατα διότι από κιτρινωπό πορτοκαλί μετατρέπεται σε κιτρινοπράσινο ενώ φθορίζει στο υπεριώδες φως δίνοντας υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης. Όμως υπάρχει η πιθανότητα να προκαλεί αναστολή της αντίδρασης LAMP η προσθήκη της χρωστικής πριν από την ισόθερμη επώαση της αλληλουχίας DNA. Έτσι προστίθεται μετά το πέρας της αντίδρασης, με κίνδυνο πάντα να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω πιθανής επιμόλυνσης από τους επιπλέον χειρισμούς, από την παραγωγή αεροζόλ και τη διασπορά του ήδη ενισχυμένου DNA σε πλαϊνούς γειτονικούς αρνητικούς σωλήνες αφού ανοίγονται τα σωληνάκια για να γίνει η προσθήκη χρωστικής.

Η ανίχνευση της ενίσχυσης του DNA στόχου μέσα στο σωλήνα της LAMP μπορεί να επιτευχθεί εφόσον φορτωθεί στην καλσεΐνη μαγγάνιο, και η οποία αρχίζει να φθορίζει κατά τη συμπλοκή του μαγγανίου με το πυροφωσφορικό κατά τη διάρκεια της *in vitro* σύνθεσης DNA.(142)

Η υβριδοποίηση των αμπλικονίων LAMP με συμπληρωματικό μονόκλωνο DNA (ssDNA) δεσμευμένο σε νανοσωματίδια χρυσού (AuNP) μπορεί να επιφέρει οπτική ανίχνευση αποτρέποντας την συνήθη αλλαγή χρώματος κόκκινου έως μωβ-μπλε χρώματος που θα

συνέβαινε κατά τη διάρκεια της επαγόμενης από αλάτι συσσώρευσης των σωματιδίων χρυσού.

Έτσι, η μέθοδος LAMP συνδυασμένη με ανίχνευση αμπλικονίων από AuNP φέρει πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων σχετικά με τον μειωμένο χρόνο ανάλυσης, την επιβεβαίωση αμπλικονίου με υβριδισμό και τη χρήση απλούστερου εξοπλισμού (χωρίς να απαιτείται θερμοκυκλοποιητής, εξοπλισμός ηλεκτροφόρησης ή λάμπα UV).(143, 144)

Επίσης μπορούν να γίνει ταυτοποίηση με χρήση περιοριστικών ενζύμων και υβριδισμό στυπώματος Southern και κατάλληλους ανιχνευτές. Η αξιολόγηση για την παρουσία ή την απουσία του DNA στόχου μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με το πέρας της αντίδρασης. Η ύπαρξη των πολλαπλών ζωνών στο πήκτωμα της αγαρόζης δηλώνουν ένα μείγμα μορίων DNA διαφορετικού μήκους το καθένα (stem-loop multiple-loops DNA) που δημιουργούνται από την υβριδοποίηση ανάμεσα σε εναλλασσόμενες ανεστραμμένες επαναλήψεις του DNA στόχου στον ίδιο πάντα κλώνο.

Η αποτελεσματικότητα του LAMP εξαρτάται από το μέγεθος του DNA-στόχου, διότι ο ρυθμός ενίσχυσης της μεθόδου πρακτικά είναι η σύνθεση DNA μετατόπισης κλώνων. Αναλύοντας διαφορετικά μεγέθη DNA στόχου πήραμε καλύτερα αποτελέσματα για κλώνους DNA από 130 έως 200 bp, ενώ κλώνοι DNA άνω των 500 bp ενισχύθηκαν, αλλά όχι καλά. Οπότε το μέγεθος του DNA-στόχου θα πρέπει να οριστεί για στόχους μικρότερους από 300 bp, συμπεριλαμβανομένων των F2 και B2 εκκινητών.

Λόγω του χαμηλού κόστους της τεχνικής και της ευκολίας της σε χρόνο διεξαγωγής, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί από κλινικούς γιατρούς ως μια δοκιμασία διαλογής.(145)

Θα μπορούσε να είναι μια ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος για τη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος αφού λόγω ισοθερμικότητας της μεθόδου κατά τη διαδικασία δεν απαιτούνται ακριβά όργανα όπως π.χ. ένας θερμοκυκλοποιητής που είναι αναγκαίος στην συμβατική PCR (146)

Το LAMP μελετάται ευρέως για την ανίχνευση μολυσματικών ασθενειών όπως η φιλαρίαση, (147, 148), η ασθένεια του ύπνου,(149) και ο SARS-CoV-2. (150)

Με την επιλογή μιας διαφορετικής πολυμεράσης στην LAMP, την Bst (Bacillus stearothermophilus) αντί για την Taq πολυμεράση η μέθοδος αποκτά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, γίνεται λιγότερο ευαίσθητη συγκρινόμενη με την PCR σε αναστολές σε

σύνθετα δείγματα όπως το αίμα. Αρκετές φορές έχουν αναφερθεί επιτυχημένες ανιχνεύσεις παθογόνων από ελάχιστα επεξεργασμένα δείγματα, όπως το θερμικά επεξεργασμένο αίμα, (150, 151) ή παρουσία κλινικών μητρών δειγμάτων. (152)

Σε περιβάλλοντα χαμηλού εισοδήματος ή πεδίου θα μπορούσε να είναι εξαιρετικά χρήσιμο, όπου μια συμβατική εκχύλιση DNA ή RNA πριν από τη διαγνωστική δοκιμή θα μπορούσε να μην είναι πρακτική.

Το LAMP μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αναγνώριση των σωματικών υγρών, αφού οι ερευνητές εύκολα και γρήγορα μπορούν να δοκιμάσουν ένα ή περισσότερα δείγματα, γεγονός που ενισχύει στη μείωση του αναγκαίου χρόνου που απαιτείται έως ότου να βγουν τα αποτελέσματα κάθε ανάλυσης. Με την προσθήκη της βαφής μεταλλικών δεικτών και του κόκκινου χρώματος της φαινόλης (ένας δείκτης pH), τη χρήση ενός smart phone και του γυμνού οφθαλμού, οι αναλυτές μπόρεσαν για να κάνουν την ταυτοποίηση ακόμη πιο απλή προκειμένου να αναλύσουν γρηγορότερα και καλλίτερα τα αποτελέσματα. (153, 154, 155)

Μειονεκτήματα

Η απαίτηση τεσσάρων ή έξι εκκινητών κάνει πολύπλοκη τη διαδικασία. Οι δύο μεγάλοι εκκινητές μάλιστα πρέπει να είναι εξαιρετικής καθαρότητας, βαθμού HPLC. Ως προς την πολλαπλή ανίχνευση μπαίνουν αρκετοί περιορισμοί δυσκολεύοντας το αποτέλεσμα (138, 157)

Περιορισμοί

Η LAMP είναι λιγότερο ευέλικτη από την PCR, ως τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, αλλά είναι κυρίως χρήσιμη ως τεχνική διάγνωσης ή ανίχνευσης. Η PCR χρησιμοποιείται περισσότερο για κλωνοποίηση. Η τεχνική LAMP χρησιμοποιεί 4 (ή 6) εκκινητές που στοχεύουν 6 (ή 8) περιοχές μέσα σε ένα πολύ μικρό τμήμα του γονιδιώματος και ο σχεδιασμός των εκκινητών είναι πολύ εξειδικευμένος και χρησιμοποιούνται εξειδικευμένα πακέτα λογισμικού για ένα σωστό αποτέλεσμα. Χρησιμοποιούνται γενικά για να βοηθήσουν στο σχεδιασμό τους επιτρέποντας μικρότερη έως καμία ελευθερία επιλογής της τοποθεσίας προορισμού από ό,τι με την PCR.

Σε μια διαγνωστική εφαρμογή, κάτι τέτοιο πρέπει να σταθμίζεται σχετικά με την ανάγκη επιλογής κατάλληλου στόχου (π.χ. μιας διατηρημένης θέσης σε ένα εξαιρετικά μεταβλητό ιικό γονιδίωμα ή ενός στόχου που είναι ειδικός για ένα συγκεκριμένο στέλεχος παθογόνου).

Πιθανόν να είναι απαραίτητες αρκετές εκφυλισμένες αλληλουχίες ώστε να καλυφθούν τα διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους. Η ανάγκη ύπαρξης αυτού του συνδυασμού των εκκινητών πιθανόν να μην επιτρέπει εξειδικευμένη ενίσχυση, ή να δημιουργεί μια καθυστερημένη ενίσχυση.

Οι προσεγγίσεις πολυπλεξίας για τη LAMP είναι λιγότερο ανεπτυγμένες από ότι για την PCR. Ο μεγαλύτερος αριθμός εκκινητών ανά στόχο στη LAMP αυξάνει την πιθανότητα αλληλεπιδράσεων εκκινητή-εκκινητή για πολυπλεκτικά σύνολα στόχων. Το προϊόν του LAMP είναι μια σειρά από concatemers της περιοχής-στόχου, δημιουργώντας ένα χαρακτηριστικό μοτίβο "σκάλας" ή ταινίας σε ένα τζελ, αντί για μια ενιαία ζώνη όπως με την PCR. Αν και αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα κατά την ανίχνευση μεμονωμένων στόχων με LAMP, οι «παραδοσιακές» (endpoint) εφαρμογές multiplex PCR όπου η ταυτότητα ενός στόχου επιβεβαιώνεται από το μέγεθος μιας ζώνης σε ένα gel δεν είναι εφικτές με το LAMP. Η πολυπλεξία στη LAMP έχει επιτευχθεί με την επιλογή μιας περιοχής-στόχου με μια θέση περιορισμού και την πέψη πριν από τη λειτουργία σε ένα τζελ, έτσι ώστε κάθε προϊόν να δημιουργεί ένα ξεχωριστό μέγεθος θραύσματος, αν και αυτή η προσέγγιση προσθέτει πολυπλοκότητα στον πειραματικό σχεδιασμό και πρωτόκολλο.(166)

Η χρήση μιας DNA πολυμεράσης μετατόπισης κλώνων στη LAMP δεν αφήνει περιθώρια χρήσης ανιχνευτών υδρόλυσης, π.χ. ανιχνευτών TaqMan, που βασίζονται στη δραστικότητα 5'-3' εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Βέβαια μια εναλλακτική προσέγγιση πολυπλεξίας σε πραγματικό χρόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί βασισμένη σε σβέστες φθορισμού(167)

Προσθήκη πράσινης βαφής SYBR Green χρησιμοποιείται ώστε να είναι ορατή η ανάλυση LAMP σε πραγματικό χρόνο, παρ' ότι η ενίσχυση εκκινητή-διμερούς μπορεί να δώσει ένα ψευδώς θετικό σήμα. Η χρήση ανόργανης πυροφωσφατάσης σε μείγμα αντιδράσεων SYBR Green επιτρέπει τη χρήση ανάλυσης τήγματος για τη διάκριση της σωστής ενίσχυσης(168)

Παρόλο που έχουν προταθεί διαφορετικές στρατηγικές μετριασμού για ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε δοκιμασίες με βάση αυτή τη μέθοδο, η μη ειδική ενίσχυση λόγω διαφόρων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της απουσίας μηχανισμών ρύθμισης της θερμοκρασίας, είναι ένας από τους σημαντικότερους περιορισμούς της ισοθερμικής ενίσχυσης με μεσολάβηση βρόχου.

Η τεχνική LAMP είναι μια ισοθερμική τεχνική (60°C - 65°C), που χρειάζεται κάποιο μηχανισμό θέρμανσης που πιθανόν να την καθιστά ως τεχνική λιγότερο ιδανική συγκρινόμενη με τεχνικές που λειτουργούν ιδανικά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε ένα διαγνωστικό κέντρο περίθαλψης.

3.2.12 Η ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου αντίστροφης μεταγραφής PCR (RT-LAMP PCR)

Είναι μέθοδος που συνδυάζει την ανίχνευση DNA LAMP με αντίστροφη μεταγραφή, ενός βήματος που πολλαπλασιάζει συγκεκριμένες αλληλουχίες RNA δημιουργώντας cDNA πριν από την αντίδραση. Κάνει διάγνωση μολυσματικών ασθενειών από RNA ιούς, όπως SARS-CoV-2(158)(Εικ.64). Και ο ιός Έμπολα(159) χωρίς να χρειάζεται θερμοκυκλοποιητής στους 60°C - 65°C . Έχει αξιολογηθεί ως φθηνότερη και ευκολότερη εναλλακτική μέθοδος ανάλυσης από την RT-PCR για την έγκαιρη διάγνωση ασθενών ατόμων με COVID-19.(160)

Με τις αναλύσεις να πραγματοποιούνται χωρίς να απαιτείται αρχικά απομόνωση RNA, ανιχνεύοντας τους ιούς απευθείας από επιχρίσματα(161) ή σάλιο(162)

Επίσης χρησιμοποιείται στην εγκληματολογία για να εντοπιστεί και να αναλυθούν δείγματα μόνο με αίμα(162)

Η τεχνική RT-LAMP (Εικ.64) αρχίζει παράγοντας DNA από την αλληλουχία RNA μετατρέποντας το με ένα ένζυμο την αντίστροφη μεταγραφάση, προερχόμενο από κατάλληλους ρετροϊούς για μια τέτοια μετατροπή.(163)

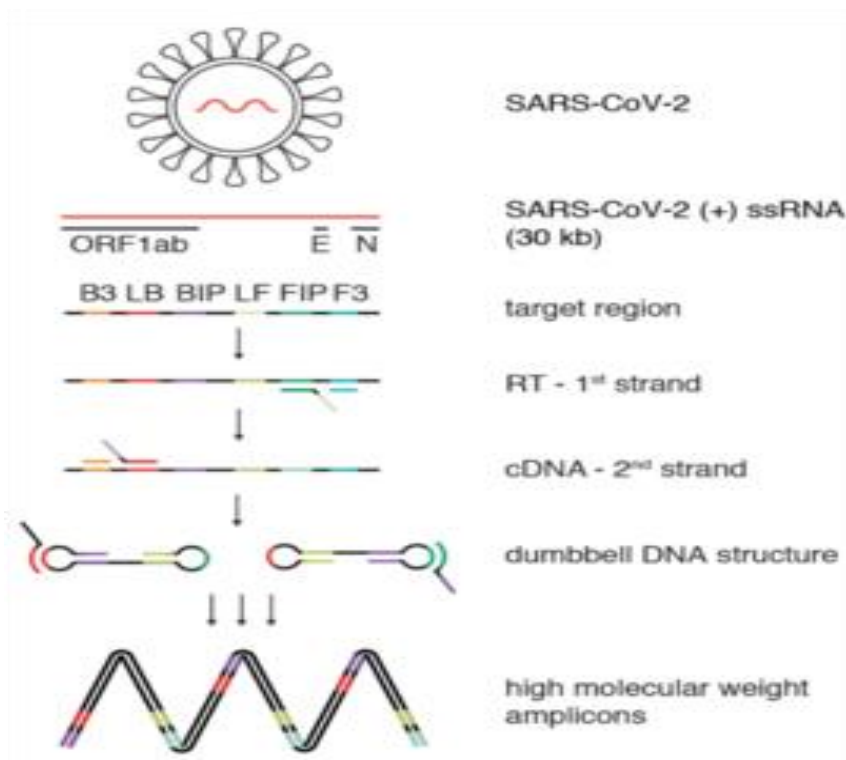
Το DNA που παράγεται καλείται cDNA ή συμπληρωματικό DNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί τον εκκινητή FIP για να παράξει ένα μονόκλωνο αντίγραφο DNA, ενώ το αστάρι F3 συνδέεται σε αυτήν την πλευρά του σκέλους προτύπου μετατοπίζοντας το παραγόμενο αντίγραφο, που είναι ένα μείγμα RNA στόχου και εκκινητών. Οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να έχουν μια ακολουθία τέτοια ώστε να σχηματίζουν έναν βρόχο.

Ο εκκινητής BIP συνδέεται με το άλλο άκρο αυτού του μονού κλώνου που χρησιμοποιείται από την πολυμεράση DNA Bst για να δημιουργήσει ένα συμπληρωματικό σκέλος, δημιουργώντας ένα δίκλωνο μόριο DNA. Ο εκκινητής F3 συνδέεται και εκτοπίζει, για άλλη

μια φορά, αυτό το νέο μονόκλωνο μόριο DNA με δομή αλτήρα καθώς τα άκρα του διπλώνουν, σχηματίζοντας δυο βρόχους, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως σημείο εκκίνησης για την ενίσχυση της LAMP. Η ενίσχυση πραγματοποιείται σε λιγότερο από μία ώρα, υπό ισοθερμικές συνθήκες μεταξύ 60 και 65 °C.

Εικόνα 1 Σχηματική αναπαράσταση ενίσχυσης RT-LAMP, για ανίχνευση SARS-CoV-2.

Πηγή https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_Transcription_Loopmediated_Isothermal_Amplification



Η τεχνική RT-LAMP μπορεί να είναι χρωματομετρική, μετρώντας είτε ιόντα pH είτε μαγνησίου. Με την αντίδραση ενίσχυσης μειώνεται τόσο το pH όσο και τα επίπεδα Mg^{+2} , και γίνεται ορατό με τη βοήθεια δεικτών, όπως το κόκκινο της φαινόλης, για το pH, και το μπλε της υδροξυναφθόλης (HNB), για το μαγνήσιο.(163) αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η χρωστική SYBR Green I(164)

Ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση βρόχου αντίστροφης μεταγραφής Χρωματομετρική ανίχνευση αντιδράσεων RT-LAMP σε σωλήνες erpendorf.

Μέθοδος ιδιαίτερα γρήγορη και σε ένα βήμα, καθώς σε σταθερή θερμοκρασία αναμιγνύεται το δείγμα με τους εκκινητές, την ανάστροφη μεταγραφάση και την DNA πολυμεράση. Δεν απαιτείται θερμοκυκλοποιητής όπως στην PCR, αλλά ένα απλό υδατόλουτρο

χαρακτηρίζοντας την αντίδραση γρήγορη και οικονομική και ευκολότερα προ βάσιμη όταν δεν είναι εύκολο να βρεθεί ένα εργαστήριο υψηλής τεχνολογίας. [3]

Ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ανάγκη σχεδιασμού ειδικών εκκινητών συμβατών με το DNA-στόχο, γεγονός που δυσκολεύει την ανάλυση και αποθαρρύνει τους ερευνητές από τη χρήση της μεθόδου LAMP(165) Παρότι υπάρχει ελεύθερο λογισμικό (Primer Explorer της Fujitsu) που βοηθάει στη δημιουργία των εκκινητών.

Επιπλέον για την RT-LAMP ισχύουν οι ίδιοι περιορισμοί όπως και στην απλή LAMP.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Σημεία επιλογής της καταλληλότερης μεθόδου PCR

Η επιλογή της μεθόδου γίνεται ανάλογα με το πόσο καλά εμπλουτίζεται, αλλά και ανιχνεύεται το δείγμα ελέγχου ώστε να αυξηθεί η χαμηλή συγκέντρωση γνωστών ή άγνωστων μεταλλάξεων στο DNA ενώ συνυπάρχει με DNA αγρίου τύπου, με μια PCR ανάλυση. Θα πρέπει επίσης να είναι εφικτή η ανίχνευση μεταλλαγμένων αλληλόμορφων σε κλινικά δείγματα όσο και να διατηρείται η ακρίβεια, η ευκολία της μεθόδου και το χαμηλό κόστος διεξαγωγής της. Πιο εύκολα μπορούν να σχεδιαστούν και να αναπτυχθούν μεθοδολογίες για γνωστές σημειακές μεταλλάξεις, σε προκαθορισμένες θέσεις DNA παρά για άγνωστες μεταλλάξεις. Διευκολύνουν περισσότερο τους αναλυτές να αναπτύξουν μεθόδους εμπλουτισμού και ανίχνευσης, διότι είναι συγκεκριμένα τα νουκλεοτίδια που θα στοχεύσουν, είναι πιο ευρύ το πεδίο με το οποίο θα ασχοληθούν, έτσι έχουν αναπτυχθεί και περισσότερες μέθοδοι αναφορικά με αυτές τις μεταλλάξεις.

Ο εμπλουτισμός έχει σαν στόχο να αυξήσει τη συγκέντρωση των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων που συνυπάρχουν με τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου, ώστε να είναι πιο εύκολα ανιχνεύσιμα.

A. Μέθοδοι μέτριας έως υψηλής εκλεκτικότητας και εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων :

Οι μέθοδοι που βασίζονται στη διαχείριση των νουκλεοτιδίων στο 3' τελικό άκρο για να ενισχυθεί εξειδικευμένα το αλληλόμορφο που φέρει κάποια διαφοροποίηση δηλαδή αυτό που είναι μεταλλαγμένο ή μειονοτικό. Οι παρακάτω μέθοδοι:

Πίνακας 2 Μέθοδοι μέτριας έως υψηλής εκλεκτικότητας και εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων

ARMS	10^{-1} - 10^{-3} (3),
ASPCR	10^{-1} - 10^{-3} (4)
MAMA	10^{-1} - 10^{-5} (85)
TaqMan RSM	5×10^{-4} (169)
TaqMAMA	5×10^{-5} (170)

εμπλουτίζουν σπάνια αλληλόμορφα (0,1%-1%) που συνυπάρχουν με το DNA αγρίου τύπου με ενισχυμένα αποτελέσματα με υψηλή ακρίβεια παρά τη μέτρια επιλεκτικότητα.

Στη συνέχεια, αυξάνοντας τον αριθμό των αναντίστοιχων νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο ενισχύετε η επιλεκτικότητα της μεθόδου, με την Ανταγωνιστική εκκίνηση νουκλεοτιδίων (COP)(171), την PCR εμπλουτισμού μεταλλαγμένων(EPCR)(170), ή εμπλουτισμένη με μετάλλαξη PCR (ME-PCR)(172), τη δοκιμασία μετάλλαξης αναντιστοιχίας MAMA(85) και την ειδική ενίσχυση μεταλλαγμένων αλληλόμορφων MASA(173) που είναι μέθοδοι με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και ικανότητα ενίσχυσης ενός μόνο σπάνιου αλληλόμορφου ανάμεσα σε 10^{-2} (COP, ME-PCR), και 10^{-5} (MAMA) αλληλόμορφων DNA αγρίου τύπου.

Υπάρχουν κάποιοι συνδυασμοί μεθόδων με την Real Time PCR που ενισχύουν με αποτελεσματικότητα τα σπάνια αλληλόμορφα μέτριας έως υψηλής εκλεκτικότητας. Το TaqMAMA 170) προκύπτει από το συνδυασμό του ανιχνευτή TaqMan και της μεθόδου MAMA προκειμένου να ανιχνεύσει αλληλόμορφο γνωστής παραλλαγής νουκλεοτιδίων.

Μια άλλη τεχνική προκύπτει όταν η Real Time PCR αξιοποιεί ένα εξειδικευμένο εκκινητή αλληλόμορφων που βασίζεται στην απόσβεση αντιεκκινητών (aQRT-PCR)(174) για να ενισχυθούν οι μεταλλαγμένες αλληλουχίες, να υπολογιστεί ο γονότυπος και να γίνει ποσοτικοποίηση προϊόντων σε κλειστό σωλήνα ενός βήματος και πραγματικό χρόνο.

Με επέμβαση με θερμοσταθερές περιοριστικές ενδονουκλεάσες οδηγούμαστε στην εκλεκτική PCR (REMS-PCR), αφού καταστρέφοντας συγκεκριμένα δείγματα αγρίου τύπου κατά την PCR ενισχύει έτσι τη συχνότητα των μεταλλαγμένων (175)

Εάν όμως δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, τότε δημιουργούμε τεχνητά μια νέα θέση περιορισμού AIRS-RFLP (176) ώστε η ενδονουκλεάση να αναγνωρίσει ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια κατά μήκος του DNA αγρίου τύπου προκειμένου να ανιχνευθεί ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ανάμεσα σε $2,5 \times 10^3$ νουκλεοτίδια αγρίου τύπου.(176)

Η τεχνική Taqman και ο ειδικός περιορισμός αλληλόμορφων λόγω περιοριστικών ενζύμων δίνει επιλεκτικότητα ανίχνευσης αλληλόμορφων 1 για $2,0 \times 10^3$ αλληλόμορφα αγρίου τύπου.(169)

Επίσης εναλλακτικές τεχνικές μέτριας έως υψηλής επιλεκτικότητας αξιοποιούν φυσικές μοριακές τροποποιήσεις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με την PCR

αντικαθιστώντας τους εκκινητές με πεπτιδικά νουκλεϊκά οξέα (PNAs)(177) και κλειδωμένα νουκλεϊκά οξέα (LNAs) (178) δημιουργώντας αυξημένες συγγένειες σύνδεσης αφού μπορούν να αντικατασταθούν οι εκκινητές με ανιχνευτές υβριδισμού, τους LNA ή PNA, κατάλληλους να καταστείλουν την ενίσχυση του DNA αγρίου τύπου, αυξάνοντας την ενίσχυση του μεταλλαγμένου νουκλεοτιδίου. Μεταλλάξεις μπορούν να ανιχνευθούν με την PCR Αποκλεισμού Αγρίων τύπων (WTB-PCR) σε συνδυασμό με τα LNAs καθώς και τα K-ras ενισχυμένα με PNAs μέσα σε 10^5 αλληλόμορφα αγρίου τύπου (179, 180). Βέβαια οι μέθοδοι που στηρίζονται στη χρήση PNA/LNA ενώ έχουν καλά αποτελέσματα απαιτείται αρκετός χρόνος και αυξημένο κόστος για αυτό το αποτέλεσμα.

Ο συνδυασμός της REMS-PCR με την FLAG (παραγωγή φθορίζοντος αμπλικονίου) (181) ενσωματώνοντας θερμοσταθερό ανιχνευτή ενδονουκλεάσης (PspGI) και PNAs σε σωλήνα κλειστό δίνει υψηλή απόδοση σε πραγματικό χρόνο, δεδομένου ότι η FLAG μπορεί να ανιχνεύει 1 μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο ανά 10^3 DNA νουκλεοτίδια αγρίου τύπου. Παρότι οι τεχνικές PNA/LNA είναι ελκυστικές καταναλώνουν πολύ χρόνο και μεγάλο κόστος, οπότε και δεν χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα.

B. Μέθοδοι με πολύ υψηλή εκλεκτικότητα και εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων:

Μέθοδοι με υψηλή επιλεκτικότητα και εμπλουτισμό για να ανιχνευθούν γνωστές μεταλλάξεις σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα.

Πίνακας 3 Μέθοδοι με πολύ υψηλή εκλεκτικότητα και εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων

RSM-PCR	10^{-3} - 10^{-8} (75) (182)
Ψηφιακή PCR	10^{-3} - 10^{-8} , (25), (183)
RMC-PCR	10^{-3} - 10^{-8} , (25), (183)

Η RFLP-PCR τεχνική θεωρείται αρκετά επιλεκτική στον εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων ενώ ταυτόχρονα είναι απλή και οικονομική. Η χρήση ενδονουκλεασών (πριν την ενίσχυση της PCR ή και κατά την PCR) αυξάνοντας την πέψη, καταστέλλοντας τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου ενισχύει την μετάλλαξη. Ωστόσο η μετάλλαξη θέσης

περιορισμού (RSM-PCR) (184) μπορεί να ανιχνεύει μια μετάλλαξη ανά 10^8 γονίδια αγρίου τύπου (75) (182) εμπλουτίζοντας τη θέση μετάλλαξης.

Η APRIL-ATM (ενισχύει τη μετάλλαξη μέσω απολίνωσης του εκκινητή) αξιοποιεί μια RFLP κατάλληλη για μετάλλαξη, για να αποκόψει μεταλλαγμένα προϊόντα PCR αλλά όχι DNA αγρίου τύπου. Τα τμήματα DNA που προκύπτουν στη θέση της μετάλλαξης συνδέονται με νουκλεοτίδια και τρέχει μια δεύτερη PCR ώστε να εμπλουτιστεί βασικά το μεταλλαγμένο DNA, με επιτυχία ανίχνευσής του $1,6 \cdot 10^{-6}$ έναντι του αγρίου τύπου.

Η RFLP-PCR και οι διάφοροι συνδυασμοί μεθόδων με αυτή είναι απλές με χαμηλό κόστος και ικανότητα ανίχνευσης της μετάλλαξης έναντι του αγρίου τύπου από 10^{-3} έως 10^{-4} .

Η τεχνική PAP-ASA χρησιμοποιεί ένα ολιγονουκλεοτίδιο με (P^*) που ενεργοποιείται με πυροφωσφορόλυση και πολυμερισμό DNA μέσα στην PCR. Παρουσία πυροφωσφορικού αφαιρείται ένα νουκλεοτίδιο από το 3' άκρο ενώ τοποθετείται με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης ένα άλλο νουκλεοτίδιο που φέρει ενεργοποιημένο (P^*), με ικανότητα ανίχνευσης του μεταλλαγμένου νουκλεοτιδίου σε 10^6 έως 10^9 αλληλόμορφα αγρίου τύπου (185). Μία τροποποίηση της μεθόδου (di-PAP-ASA) (186) κάνει χρήση δύο αντίθετης κατεύθυνσης στο 3' άκρο νουκλεοτίδια (P^*) προκειμένου να ενισχύσει την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων που συναντάμε με συχνότητα από 10^7 έως 10^9 ανάμεσα στα αγρίου τύπου νουκλεοτίδια. Βέβαια αυτή η επιλεκτικότητα της πυροφωσφορόλυσης δεν επιτυγχάνεται πάντα.

Ο συνδυασμός RMS(τυχαία σύλληψη μετάλλαξης) και DIGITAL PCR από τους Bielas και Loeb (183) μπορεί να ανιχνεύσει ένα μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο ανάμεσα σε 10^8 βάσεις αγρίου τύπου DNA, είναι μία πολύπλοκη διαχείριση ανίχνευσης με σήμανση βιοτίνης και στη συνέχεια κάνει διαχωρισμό με μαγνητικά σφαιρίδια και διάσπαση με TaqI, αραίωση του τελικού προϊόντος και ενίσχυση του μεταλλαγμένου φαινοτύπου με ποσοτική PCR.

Μέθοδοι συνδυασμένες με την ASA και την RFLP αποφέρουν μεγάλη επιλεκτικότητα καθώς και εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων. Όσες όμως από αυτές τις μεταλλάξεις είναι χαμηλού επιπέδου δεν μπορούν να τις ενισχύσουν τόσο ώστε να μπορούν να τις ανιχνεύσουν. Όμως όσο πιο επιλεκτική γίνεται μια διαδικασία ανίχνευσης μετάλλαξης τόσο πιο πολύ χρόνο θα απαιτεί, κάτι που την καθιστά σχετικά ακατάλληλη να χρησιμοποιηθεί ευρύτερα σε ένα διαγνωστικό εργαστήριο.

Κ.Εμπλουτισμός και ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων

Πίνακας 4 Μέθοδοι που εμπλουτίζουν και ανιχνεύουν άγνωστες μεταλλάξεις

Ηλεκτροφόρηση : HET, SSCP, DGGE	10^{-1} - 10^{-2} (187), (9),
Endo V-λιγάση PCR	10^{-1} - 10^{-2} , -(188)
MutY-LM-PCRb	10^{-1} – 10^{-2} , (189)
Iflp	10^{-3} - 10^{-5} (190)
Cold-PCR	10^{-1} -- 10^{-4} (191)

Αρχικά η ταυτοποίηση άγνωστων μεταλλάξεων είχε ταυτιστεί με την αλληλούχιση κατά Sanger. Όμως αξιόπιστη ήταν η μέθοδος που μπορούσε να ανιχνεύσει μεταλλάξεις που συνυπήρχαν με το αγρίου τύπου DNA για περισσότερο από 20%.(25) Αυτή η ποσοστία όμως δεν άφηνε μεγάλο βαθμό ευαισθησίας ιδιαίτερα για σωματικές μεταλλάξεις προκαρκινικών ιστών, ή ιστών μετά από θεραπεία, ή για την πιθανότητα εμφάνισης εκ νέου άλλης μετάλλαξης για όγκους που έχουν υποβληθεί σε ακτινοχημειοθεραπεία. Οπότε είναι μεγάλης σημασίας και ανάγκης ύπαρξης μεθόδων προσδιορισμού άγνωστων μεταλλάξεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκρινόμενες με το DNA αγρίου τύπου και επίσης να ακολουθεί προσδιορισμός για την ακριβή εύρεση της μετάλλαξης με μια αλληλούχιση. Παρόλο που υπάρχουν μέθοδοι σάρωσης με υψηλή επιλεκτικότητα μετάλλαξης συγκρινόμενες με τη μέθοδο της αλληλούχισης, (χημική διάσπαση αναντιστοιχιών (CCM), διάσπαση αναντιστοιχιών με ενδονουκλεάση V(endo V), endo VII, T4, MutY, τήξη υψηλής ανάλυσης (HRM) κ.α.) μας ενδιαφέρει ο εμπλουτισμός της άγνωστης μετάλλαξης στο DNA χωρίς να γίνεται καταστροφή στην περιοχή, για να γίνετε στη συνέχεια αλληλούχιση για εξακρίβωση στη θέση της αλλαγής βάσης πρώτα και μετά να ακολουθεί ο ακριβής προσδιορισμός της αλλαγής βάσης.

Εμπλουτισμός της άγνωστης μετάλλαξης στο DNA γίνεται με ηλεκτροφορητικές μεθόδους προϊόντων post-PCR, όπως ανάλυση ετεροαμφίδρομης (HET)(187), πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονής έλικας (SSCP) (9), ηλεκτροφόρηση πηκτής μετουσίωσης (DGGE) (192) και μετουσίωση HPLC (dHPLC) (193)

Μειονεκτήματα της dHPLC είναι ότι μέσω κλάσματος απαιτεί πολλά βήματα, ο διαχωρισμός μεταξύ αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων αλληλόμορφων με ηλεκτροφόρηση

δεν επαρκή, και ο εξοπλισμός είναι αρκετά ακριβός, ενώ όμως μπορεί το μεταλλαγμένο κλάσμα να εμπλουτιστεί κατά 10 φορές φτάνοντας έως και το 50%. (194)

Ένζυμα ανίχνευσης αναντιστοιχίας, όπως ακινητοποιημένα MutS χρησιμοποιούνται για εμπλουτισμό αλληλουχιών PCR με άγνωστες μεταλλάξεις. (195) συνδυάζοντας την PCR με τις γλυκοζυλάσες MutS και TDG πραγματοποιείται επιλεκτικός εμπλουτισμός των αλληλουχιών που περιέχουν τη μετάλλαξη. (189) ενώ περιορίζονται στην ανίχνευση μόνο ενός κλάσματος από όλες τις πιθανές μεταλλάξεις.

Η ευαισθησία αυτών των ενζυμικών προσεγγίσεων μειώνεται από την επιλεκτικότητα και αποτελεσματικότητα των ενζύμων που χρησιμοποιούνται. Η επιλεκτικότητα των ενζύμων ανίχνευσης αναντιστοιχίας θεωρείται υποδεέστερη από αυτή των ενδονουκλεασών περιορισμού. Το iFLP (αντίστροφο ενισχυμένο RFLP βασισμένο στην PCR) είναι μια ενδονουκλεάση περιορισμού που σαρώνει εξαιρετικά εκλεκτικά μία μετάλλαξη.(190) συνδυάζοντας αντίστροφη PCR,RFLP και dHPLC. Το ένζυμο TaqI δρά στο κυκλικό DNA και εφόσον υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης από το ένζυμο στην αλληλουχία λόγω μετάλλαξης, προκύπτουν διπλά λανθάνοντα γραμμικά θραύσματα DNA που συνδέονται με ειδικούς προσαρμογείς TaqI και ενισχύονται με PCR. Παρότι είναι μία μέθοδος χρονοβόρα και μπορεί να ανιχνεύει μόνο ένα κλάσμα όλων των πιθανών μεταλλάξεων, μπορεί να ανιχνεύσει μία άγνωστη μετάλλαξη ανάμεσα σε 10^5 αλληλουχίες αγρίου τύπου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (PCR) έχει αναδειχθεί ως μια ισχυρή και ευρέως χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία για βιολογική έρευνα, επειδή μπορεί να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει πολύ μικρές ποσότητες συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων DNA ή RNA για διάγνωση ασθενειών, ανίχνευση μεταλλάξεων, ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, στη μοριακή βιολογία, στην ιατροδικαστική, στη βιομηχανία τροφίμων κ.α.

Σε περιόδους παγκόσμιας επιδημίας, οι λήψεις ιατρικών αποφάσεων βασίζονται σε ακριβή, γρήγορα και αξιόπιστα εργαστηριακά αποτελέσματα τόσο στα εργαστήρια των νοσοκομείων όσο και στα ιδιωτικά διαγνωστικά κέντρα είτε αυτά είναι μεγάλα είτε μικρότερα. Τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων κατευθύνουν ανάλογα την κλινική διαχείριση, την εισαγωγή μέτρων πρόληψης ή απομόνωσης, την ιχνηλάτηση επαφών κ.λπ. Μετά από κάποιο χρόνο ανάπτυξης και χρήσης διαφορετικών δοκιμασιών ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, είναι εξαιρετικά σημαντικό να εντοπιστούν και να αποκλειστούν τα άτομα με χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα, πρώτον, για να αποφευχθεί η αναφορά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και η περιττή επιβάρυνση του συστήματος υγείας με ψευδώς θετικούς ασθενείς και, δεύτερον, για να αποφευχθεί η περαιτέρω έκθεση και μετάδοση της λοίμωξης από ψευδώς αρνητικούς ασθενείς.

Όλα τα παραπάνω προϋποθέτουν ότι οι ερευνητές έχουν στα χέρια τους κατάλληλες και αξιόπιστες μεθόδους, με την ανάλογη ευαισθησία καθώς και το πιο οικονομικό αποτέλεσμα.

Με βάση όσα αναφέρθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία:

Η ψηφιακή PCR υπερευαίσθητη και υψηλής ακριβείας μοριακή τεχνική είναι ικανή να ανιχνεύει μεταλλαγμένο DNA παρουσία 200.000 φορές περίσσειας υποβάθρου άγριου τύπου. Λόγω της διαμερισματοποίησης του δείγματος διεξάγεται η ανάλυση πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα. Είναι τεχνική που υπερτερεί σε παραμέτρους όπως η ευαισθησία, το κόστος και η εφαρμογή.

Η ψηφιακή PCR απαιτεί μεγάλη προσοχή στον σχεδιασμό των ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων κατά τη μελέτη σπάνιων μεταλλάξεων, καθώς και μεγάλο μέγεθος δειγμάτων ταυτόχρονα.

Η ψηφιακή PCR (digital PCR ή dPCR) προσφέρει απόλυτη ποσοτικοποίηση χωρίς διαδικασία βαθμονόμησης για μικρό κλάσμα μεταλλαγμένων αλληλουχιών. Ο διαμερισμός του δείγματος εξαλείφει τον «ανταγωνισμό» μεταξύ των μορίων, διότι τα μόρια υπόκεινται σε χιλιάδες ανεξάρτητες υπο-αντιδράσεις. Μπορεί να διακρίνει την ύπαρξη ή όχι μιας παραλλαγής στο κάθε αλληλόμορφο ή και δύο παραλλαγές σε ένα αλληλόμορφο, χωρίς να απαιτείται κλωνοποίηση των προϊόντων PCR. Βασίζεται στην καλή αραίωση των προτύπων DNA και όσο αυξάνεται ο αριθμός των φρεατίων που αναλύονται τόσο αυξάνεται και η ευαισθησία της ανάλυσης.

Έτσι, η ύπαρξη παραλλαγών στην αλληλουχία ενός ποσοστού των μορίων γίνεται πολύ πιο σαφής και η τεχνική καθίσταται πολύ χρήσιμη στην ανίχνευση μεταλλάξεων πάνω σε πολύ μικρό κλάσμα μορίων του δείγματος.

Ποσοτικοποιεί νουκλεϊκά οξέα, για να διακρίνει τη διαφορική έκφραση αλληλόμορφων, για την παρακολούθηση των ιών που μολύνουν μεμονωμένα βακτηριακά κύτταρα, για την ανίχνευση εμβρυϊκού DNA στο κυκλοφορούντα αίμα και για μοριακή ανίχνευση σπάνιων γενετικών μεταλλαγών.

Στην ανίχνευση μεταλλάξεων, προσφέρει μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία από την τυπική qPCR. Μπορεί να προσδιορίσει με μεγάλη ακρίβεια τον αριθμό των DNA αντιγράφων χωρίς να βασίζεται σε παραμέτρους όπως ο κύκλος κατωφλίου, η καμπύλη βαθμονόμησης ή την απόδοση των αντιδράσεων. Το γεγονός ότι η ποσοτικοποίηση γίνεται βάσει μόνο στατιστικών αρχών προσδίδει μεγάλη αξιοπιστία. Λόγω της φύσης της μεθόδου (διαμερισμός δείγματος), είναι πιο προστατευμένη από προβλήματα που έχουν να κάνουν με ακτινοβολία φθορισμού υποβάθρου (θόρυβος), καθώς και με αναστολές της αντίδρασης.

Η **ανάλυση HRM** είναι μια μάλλον δαπανηρή εναλλακτική λύση, επιτρέποντας την ακριβή ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα τρόφιμα σε επίπεδο είδους και στελέχους.

Η ανάλυση HRM δεν καθιστά απαραίτητη τη διεξαγωγή βημάτων επεξεργασίας μετά την PCR. Ως εκ τούτου, είναι πιο κατάλληλο για ανάλυση υψηλής απόδοσης και λιγότερο επιρρεπές σε μολύνσεις. Αν και ορισμένα έγγραφα αναφέρουν ότι η ανάλυση HRM μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση του νοθευτή, πρέπει να διεξαχθούν πιο λεπτομερή πειράματα επικύρωσης για να αποδειχθεί ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνονται είναι ακριβή.

Η καμπύλη τήξης αυξάνει την ειδικότητα και την ευαισθησία της μεθόδου, αφού μπορεί να γίνει διαφοροποίηση ακόμη και στη διαφορά ενός νουκλεοτιδίου, χωρίς να μπορούμε να κάνουμε ποσοτική επεξεργασία. Η διακριτική δύναμη της ανάλυσης HRM είναι πολύ υψηλή και λιγότερο χρονοβόρα.

Χρήση κατάλληλης χρωστικής τρίτης γενιάς ενισχύει την εμπιστοσύνη της μεθόδου

Μπορούμε να βρούμε εάν υπάρχει ή δεν υπάρχει μία μετάλλαξη δηλαδή μπορεί να γίνει ποιοτική αλλά όχι ποσοτική ανάλυση. Η HRM συμβάλλει στην έρευνα και στη διάγνωση ασθενειών αφού ανιχνεύει γνωστούς πολυμορφισμούς, SNPs, γνωστές μεταλλάξεις, βιοδείκτες, συμβάλλει στην ανίχνευση και γονοτύπηση παθογόνων μικροοργανισμών και τέλος στην ανίχνευση των μεθυλιωμένων περιοχών

Η REAL TIME PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και ισχυρή μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πολύ μικρών ποσοτήτων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA.

Ενισχύει το DNA αλληλουχίας ταυτόχρονα με την ανίχνευση παραγόμενου προϊόντος (φθορίζουσες χρωστικές) σε πραγματικό χρόνο, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, χωρίς ηλεκτροφόρηση.

Επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας των προϊόντων οποιαδήποτε στιγμή μέσω κάμερας που διαθέτει η συσκευή της Real Time PCR, επισπεύδοντας την διαδικασία.

Η προσθήκη συγκεκριμένης χρωστικής ουσίας όπως π.χ. (SYBR Green I ή probes) είναι και ο μηχανισμός ανίχνευσης για την παρακολούθηση της αντίδρασης μέσω ακτινοβολίας της χρωστικής.

Η μέθοδος των ολιγονουκλεοτιδίων-ιχνηλατών (molecular-probes) παρουσιάζει ακόμη μεγαλύτερη ακρίβεια και εξειδίκευση συγκριτικά με την SYBR Green I, αυξάνοντας την

εμπιστοσύνη της μεθόδου, όπου υβριδοποιείται μόνο αν εντοπίσει την αλληλουχία της επιλογής μας μμέσα στην αντίδραση

Ένα ακόμα πλεονέκτημα της μεθόδου 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. Αυτό όμως αυξάνει το κόστος της μεθόδου.

Με την καμπύλη τηξης (Melting curve) αξιολογούμε τα προϊόντα της αντίδρασης, αν προέρχονται όντως από την αλληλουχία DNA που χρησιμοποιήθηκε ως στόχος ή όχι, κάτι που ενισχύει την εμπιστοσύνη της τεχνικής, χωρίς να αμφισβητείται το αποτέλεσμα.

Οι τιμές Ct που αναφέρονται στην ενίσχυση του γονιδίου όταν δίνουν σαφώς ακραίες τιμές στο ιστόγραμμα, υποδηλώνουν πιθανά ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Είναι γνωστό ότι οι τιμές Ct υποδεικνύουν το επίπεδο συγκέντρωσης του ιού εάν το δείγμα λαμβάνεται σωστά. Επιπλέον, υψηλές τιμές Ct μπορεί να υποδηλώνουν ψευδή θετικότητα και συχνά εντοπίζονται σε εκείνους τους ασθενείς που δεν είναι πλέον μολυσματικοί

Ο συνδυασμός καλής ευαισθησίας και ειδικότητας είναι το πιο ίσως σημαντικό χαρακτηριστικό. Αφενός, η νόσος COVID-19 απαιτεί διαγνωστικές εξετάσεις με υψηλή ευαισθησία σε απειλητικές για τη ζωή συνθήκες και, αφετέρου, απαιτείται υψηλή ειδικότητα επειδή τα τεστ χρησιμοποιούνται μαζί.

H REAL TIME με ανιχνευτή TAQMAN. Ο ρόλος του ανιχνευτή Taqman είναι να μπορεί ο ερευνητής να παρακολουθεί την πρόοδο της ενίσχυσης του DNA σε πραγματικό χρόνο, μέσω μιας αλλαγής που προκύπτει στο φθορισμό της αντίδρασης κατά την αποικοδόμησή τους.

Η αυξημένη εξειδίκευση του ιχνηθέτη TaqMan εξηγείται λόγω της συμπληρωματικότητας εκκινητών και ιχνηθέτη με την ακολουθία στόχο και στο ότι θα προκύψει σήμα φθορισμού μόνο και εφόσον κατά την ενίσχυση της ακολουθίας ο ιχνηθέτης προσδεθεί στην ακολουθία στόχο.

Η ιχνηθέτηση TaqMan μπορεί να συνδυάσει την ανίχνευση έως και επτά SNP σε μία αντίδραση, και πλεονεκτεί έναντι άλλων ιχνηθετών διότι μπορεί να εξασφαλίσει

ποσοτικοποίηση του επιθυμητού προϊόντος ακόμα και αν υπάρχει ταυτόχρονη μη ειδική ενίσχυση και άλλου δευτέρου προϊόντος

Αυξάνει την ακρίβεια και την ευαισθησία της ποσοτικοποίησης, ενώ δεν απαιτεί καμπύλη τήξης για τον ποιοτικό έλεγχο της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου.

Η ARMS είναι ιδανική για ανίχνευση μικρού αριθμού γνωστών σημειακών μεταλλάξεων όμως για σχετικά μικρό όγκο αναλύσεων, πράγμα που κάνει απαγορευτική τη χρήση της για ένα νοσοκομείο με μεγάλο αριθμό δειγμάτων, ίσως όμως όχι και τόσο απαγορευτική για ένα μικρό διαγνωστικό κέντρο με μικρό αριθμό αναλύσεων.

Με μεγάλη ευκολία μπορούν να γίνουν πράξη αναλύσεις για πολλαπλές μεταλλάξεις. Είναι μια ανάλυση χαμηλού κόστους, μικρής διάρκειας και δεν απαιτείται ιδιαίτερα ακριβός εργαστηριακός εξοπλισμός για να γίνει η ανίχνευση.

Είναι σύντομη χρονικά η αντίδραση ανίχνευσης διαφορετικών SNPs σχετικών με ασθένειες χωρίς περιοριστικά ένζυμα αλλά ούτε και ανάλυση αλληλουχίας προϊόντων PCR.

Παρέχει τη δυνατότητα άμεσης αξιολόγησης των αποτελεσμάτων μετά την αντίδραση PCR χωρίς να υπάρχει ανάγκη υβριδισμού με ραδιενεργά ολιγονουκλεοτίδια.

Γίνεται ανίχνευση μόνο γνωστών σημειακών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε αρκετά γενετικά νοσήματα, χωρίς να αναγνωρίζει διαγραφές καθώς και επαναλήψεις.

Χρειάζονται δύο σωληνάκια, ένα με το αγρίου τύπου και ένα με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, με στόχο ένα πλήρη γονότυπο, γεγονός που ενισχύει βέβαια την πιθανότητα επιμόλυνσης.

Ο συνδυασμός μεθόδων **PCR / ASO** δίνει μια απλή και ευέλικτη μεθοδολογία συνεχούς χρήσης, χωρίς ραδιενεργή επισήμανση, και σε μορφή "αντίστροφης κηλίδας" αφού οι ανιχνευτές ASO μπορούν να συνδεθούν σε μεμβράνη και το ενισχυμένο δείγμα DNA να χρησιμοποιηθεί για υβριδισμό. Για έναν έλεγχο ρουτίνας όμως σε ένα διαγνωστικό εργαστήριο αξιολογείται ως επίπονη μέθοδος.

Με την **AS-PCR** μέθοδο πραγματοποιείται μια ιδιαίτερα αξιόπιστη διάκριση μεταξύ δύο αλληλόμορφων, με την προσθήκη τεχνητών αναντιστοιχιών εντός των τριών βάσεων από το 3' άκρο των εκκινητών. Οι εκκινητές περιέχουν μία μόνο νουκλεοτιδική τεχνητή αναντιστοιχία εντός των τριών βάσεων που βρίσκονται πλησιέστερα στο 3' άκρο (θέση

SNP). Έτσι για έναν ιστότοπο SNP, μπορούν να δημιουργηθούν πιθανές αναντιστοιχίες μεταξύ των τριών βάσεων και ο τρόπος επιλογής του σωστού για την αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή εξακολουθεί κάθε φορά να αποτελεί μία πρόκληση. Ως επίλυση του προβλήματος προστίθεται μεγάλη ποσότητα εκκινητών SNP που σχεδιάστηκαν με σκοπό να εισάγουν αναντιστοιχίες εντός των τριών βάσεων πλησιέστερα στο 3' άκρο τους, γεγονός που είναι και χρονοβόρο και κοστίζει αρκετά χρήματα κάθε φορά.

Έτσι παρόλο που ο δείκτης μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) είναι ένα ανεκτίμητο εργαλείο για κλωνοποίηση θέσης, μελέτη συσχέτισης και εξελικτική ανάλυση, η χαμηλή αποτελεσματικότητα ανίχνευσης SNP από την ειδική για το αλληλόμορφο PCR (AS-PCR) εξακολουθεί να περιορίζει την εφαρμογή του ως μοριακός δείκτης όπως άλλοι δείκτες. χαμηλής έως μέτριας απόδοσης και είναι πολύ κατάλληλη για χαρτογράφηση γονιδίων, κλωνοποίηση βάσει χάρτη και επιλογή με τη βοήθεια δεικτών σε καλλιέργειες.

Η **RFLP-PCR** τεχνική θεωρείται αρκετά επιλεκτική στον εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων ενώ ταυτόχρονα είναι απλή και οικονομική. Βασίζεται στην παρουσία ή στην απουσία ενός στόχου για μια περιοριστική ενδονουκλεάση εξαιτίας του πολυμορφισμού σε μία βάση. Η ύπαρξη σημειακής μετάλλαξης δημιουργεί θέση δράσης του περιοριστικού ενζύμου το οποίο «τεμαχίζει» το αρχικό μόριο του DNA σε μικρότερα κομμάτια συνήθως διαφορετικού αριθμού βάσεων και στη συνέχεια αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο και με υπεριώδους ακτινοβολίας και κατάλληλους δείκτες μοριακών βαρών, αξιολογούνται τα αποτελέσματα. θεωρείται αρκετά επιλεκτική στον εμπλουτισμό γνωστών μεταλλάξεων ενώ ταυτόχρονα είναι απλή και οικονομική.

Η μοριακή τεχνική **LAMP**, ενισχύει το DNA με υψηλή ειδικότητα, αποτελεσματικότητα και ταχύτητα υπό ισοθερμικές συνθήκες. Παρουσιάζει υψηλή και αυξημένη παραγωγή με 10⁹ αντίγραφα του στόχου σε λιγότερο από μία ώρα. Επειδή η LAMP αναγνωρίζει τον στόχο με έξι διακριτές αλληλουχίες αρχικά και με τέσσερις διακριτές αλληλουχίες στη συνέχεια, αναμένεται να ενισχύσει την ακολουθία-στόχο με υψηλή επιλεκτικότητα, χωρίς να επιτρέπει ποσοτική ανάλυση.

Είναι απλή, γρήγορη και οικονομική κάτω από ισοθερμικές συνθήκες για τη σύνθεση DNA μετατόπισης κλώνου χωρίς να απαιτούνται εξειδικευμένες συσκευές αύξησης ή ελέγχου της θερμοκρασίας, παρά μόνο τέσσερις εκκινητές, μια DNA πολυμεράση και ένα κανονικό εργαστηριακό υδατόλουτρο ή θερμικό μπλοκ για αντίδραση.

Η LAMP είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και ικανή να ανιχνεύσει DNA σε μόλις έξι αντίγραφα στο μείγμα αντίδρασης.

Σε συνδυασμό με αντίστροφη μεταγραφή, το LAMP μπορεί να ενισχύσει αλληλουχίες RNA με υψηλή απόδοση.

Η LAMP φαίνεται λιγότερο επιρρεπής στην παρουσία άσχετου DNA από την PCR και με υψηλή απόδοση υπό ισοθερμικές συνθήκες

Το όριο ανίχνευσής του είναι μερικά αντίγραφα, συγκρίσιμα με αυτά της PCR.

Λόγω του χαμηλού κόστους της τεχνικής και της ευκολίας της σε χρόνο διεξαγωγής, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί από κλινικούς γιατρούς ως μια δοκιμασία διαλογής. Θα μπορούσε επίσης να είναι μια ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος για τη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος αφού λόγω ισοθεμικότητας της μεθόδου κατά τη διαδικασία δεν απαιτούνται ακριβά όργανα όπως π.χ. ένας θερμοκυκλοποιητής που είναι αναγκαίος στην συμβατική PCR

Η απαίτηση όμως τεσσάρων ή έξι εκκινητών κάνει πολύπλοκη τη διαδικασία. Οι δύο μεγάλοι εκκινητές μάλιστα πρέπει να είναι εξαιρετικής καθαρότητας, βαθμού HPLC. Ως προς την πολλαπλή ανίχνευση μπαίνουν αρκετοί περιορισμοί δυσκολεύοντας το αποτέλεσμα.

Η **ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ PCR** είναι μία ημιποσοτική μέθοδος υπο συνθήκες, και ενέχει κίνδυνο επιμόλυνσης κατά την παρασκευή των δειγμάτων. Μετά την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου χρειάζεται πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου ώστε να μπορούν στη συνέχεια να γίνουν ορατά τα αποτελέσματα της ανάλυσης με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου.

Η **RT-PCR** όπως και η συμβατική PCR είναι ημιποσοτική τεχνική για ανίχνευση επιπέδων RNA. Μία τεχνική απλή, εξειδικευμένη κατάλληλη για μεγάλη ποικιλία δειγμάτων, αλλά και ευαίσθητη. Απαιτεί και αυτή πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου και βρωμιούχου αιθιδίου στη συνέχεια.

Λόγω μειωμένης σταθερότητας του μορίου του RNA συγκριτικά με το DNA , για να διασφαλιστεί η ακεραιότητά του θα πρέπει οι χειρισμοί να είναι πολύ προσεχτικοί.

Η **Multiplex PCR** σε πραγματικό χρόνο είναι μια πολύ αποτελεσματική τεχνική με αυξημένη επίδοση επειδή επιτρέπει την ανίχνευση πολλών παθογόνων μικροοργανισμών

ταυτόχρονα σε ένα και το αυτό πηγάδι, με ένα δείγμα στόχου και λίγα αντιδραστήρια. Μία τεχνική που εξυπηρετεί όταν υπάρχει περιορισμένη ποσότητα δείγματος ή αντιδραστηρίων.

Μέθοδος οικονομική διότι πραγματοποιεί την ανάλυση ανεξαρτήτου αριθμού δειγμάτων με την ίδια ποσότητα αντιδραστηρίων, αυξάνοντας την απόδοση και μειώνοντας το κόστος.

Αφού μειώνει το κόστος ελέγχου ανά δείγμα ενδεχομένως να εξυπηρετεί μικρά διαγνωστικά εργαστήρια με μικρό αριθμό αναλυτών.

Η **COLD-PCR** είναι πολύ απλή κατά τη διαδικασία της ενίσχυσης δίκλωνου μορίου DNA, που περιέχει αναντιστοιχίες με άγνωστες μεταλλάξεις χωρίς να απαιτούνται περίπλοκα πρωτόκολλα, εξειδικευμένα ένζυμα, ανιχνευτές ή εκκινητές και με την ιδιαιτερότητα να επιτρέπει άμεση αλληλούχιση του ενισχυμένου προϊόντος.

Χρησιμοποιείται αντί της PCR για την ανίχνευση τόσο γνωστών όσο και αγνώστων μεταλλάξεων.

Τεχνική PCR ενός βήματος που εμπλουτίζει γνωστά και άγνωστα σπάνια μεταλλαγμένα αλληλόμορφα, ανεξάρτητα που θα βρεθεί η μετάλλαξη και ενισχύει την αλληλουχία σε χαμηλότερη θερμοκρασία

Μειονεκτεί στην απαίτηση για ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας μετουσίωσης, και οι αλληλουχίες που αναλύονται δεν θα πρέπει να ξεπερνούν τα 20 ζεύγη βάσεων περίπου.

Μετά από όλες τις τεχνικές που αξιολογήσαμε, στις περιπτώσεις που το αρχικό μας δείγμα δεν είναι καθαρό δεν μπορούμε να εφαρμόσουμε καμία τεχνική PCR.

Εάν θελήσουμε να επιλέξουμε μια τεχνική καθαρά για νοσοκομειακή χρήση με μεγάλο όγκο δειγμάτων θα προτείναμε την REAL TIME PCR, η οποία εμφανίζει και αυξημένη ευαισθησία αλλά και εμπιστοσύνη. Το ότι μπορούν να εφαρμοστούν και να ελέγχουν ταυτόχρονα 96 δείγματα χωρίς να απαιτείται περαιτέρω έλεγχος σε πήκτωμα αγαρόζης είναι πολύ εξυπηρετικό και εύχρηστο τόσο σε χρόνο όσο και για οικονομικούς λόγους.

Επίσης όταν διαθέτουμε μικρή ποσότητα δείγματος αντίστοιχα επιλέγουμε και πάλι REAL TIME PCR και όλα τα παραπάνω ισχύουν ακόμη, έως ότου η ψηφιακή PCR παραμένει ακόμη πολύ κοστοβόρα ως μοριακή μέθοδος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. M.Green et al, (2019) “Polymerase Chain Reaction” Review COLD SPRING HARBOR PROTOCOL, doi:10.1101/pdb.top095109 PubMed NIH
2. Eleanor C. et al, (1997) “Introduction to PCR/OLA/SCS, a Multiplex DNA Test, and Its Application to Cystic Fibrosis” Genetic Testing Volume 1, Number 1, MARY ANN LIEBERT, Inc.
3. Newton CR, et al. (1989) “Analysis of any point mutation in DNA: the amplification refractory mutation system (ARMS)”. Nucleic Acids Res 17:2503–16.
4. Wu DY, et al, (1989) “Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle-cell anemia” Proc Natl Acad SciUSA;86:2757–60.
5. Valasek, M. A., et al, (2005). “The power of real-time PCR”. Advances in physiology education, 29(3), 151–159] doi:10.1152/advan.00019.2005 JOURNAL ADVANCES IN PHYSIOLOGY EDUCATION
6. Jonas Binladen, et al, (2007) “800000 year old mammoth DNA, modern elephant DNA or PCR artefact?” NIH Biol Lett. 2007 Feb 22; 3(1): 55–56.doi: 10.1098/rsbl.2006.0537.
7. Weber K, et al., (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis". J Biol Chem. 244 (16): 4406–12. doi:10.1016/S0021-9258(18)94333-4]
8. Laemmli UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature. 227 (5259): 680–5. Bibcode:1970 Natur. 227..680L. doi:10.1038/227680a0
9. J Rommens, et. al, (1990) “Rapid nonradioactive detection of the major cystic fibrosis mutation” Journal List, Am J Hum Genet v.46(2):395-396 (1990 Feb)., PMCID: PMC1684986
10. Oto M. et al., (1993). "Optimization of Non radio isotopic Single Strand Conformation Polymorphism Analysis with a Conventional Minis lab Gel Electrophoresis Apparatus". Analytical Biochemistry. ELSEVIER doi:10.1006/abio.1993.1379

11. Tahira T. et al. (2009). "Estimation of SNP allele frequencies by SSCP analysis of pooled DNA." Methods in Molecular Biology. Vol. 578. pp. 193–207. doi:10.1007/978-1-60327-411-1_12. ISBN 978-1-60327-410-4. PMID 19768595
12. Kubo K., et al (21 May 2009). "Evaluation of the genetic variability of orchid fleck virus by single-strand conformational polymorphism analysis and nucleotide sequencing of a fragment from the nucleocapsid gene". Archives of Virology. Virology Division of the International Union of Microbiological Societies. NIH doi:10.1007/s00705-009-0395-8
13. R.K. Saiki, et al, (1985) "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia", Science 230 1350–1354.
14. K.B. Mullis, et al., (1987) "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction", Methods Enzymol. 155, 335–350.
15. R.K. Saiki, et al., (1988) "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", Science 239, 487–491.
16. P.M. Holland, et al, (1991) "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 7276–7280.
17. R. Higuchi, et al, (1992) "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences", Biotechnology (NY) 10, 413–417.
18. R. Higuchi, et al, (1993) "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions", Biotechnology (NY) 11, 1026–1030.
19. L.G. Lee, et al, (1993) "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes", Nucleic Acids Res. 21, 3761–3766.
20. K.J. Livak, et al, (1995) "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization", PCR Methods Appl. 4, 357–362.
21. C.A. Heid, et al., (1996) "Real time quantitative PCR", Genome Res. 6, 986–994.
22. U.E. Gibson, et al, (1996) "A novel method for real time quantitative RT-PCR", Genome Res. 6, 995–1001

23. C.T. Wittwer, et. al., (1997) “The Light Cycler: a microvolume multi sample fluorimeter with rapid temperature control”, *Biotechniques* 22, 176–181.
24. C.T. Wittwer, et al, (1997) “Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification”, *Biotechniques* 22, 130–138.
25. B. Vogelstein, et al, (1999) “Digital PCR”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9236–9241.
26. S. Tyagi, et al, (1996) “Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization”, *Nat. Biotechnol.* 14, 303–308.
27. Watson et al., (2018) “Μοριακή Βιολογία του γονιδίου” 2η Ελλ. Έκδοση COLD SPRING HARBOR Lab Press, κεφ 4, 76-82, 89-91
28. Watson et al., (2018) “Μοριακή Βιολογία του γονιδίου” 2η Ελλ. Έκδοση COLD SPRING HARBOR Lab Press, κεφ 10, 316-320
29. Watson et al., (2018) “Μοριακή Βιολογία του γονιδίου” 2η Ελλ. Έκδοση COLD SPRING HARBOR Lab Press κεφ 16, 573-575
30. Risch, N. J., et al., (2000) “Searching for genetic determinants in the new millennium”. *Nature* 405, 847–856. doi: 10.1038/35015718.
31. Lander, E. S., et al. (2001) “Initial sequencing and analysis of the human genome”. *Nature* 409, 860–921. doi: 10.1038/35057062.
32. Khurana, et al, (2016). "Role of non-coding sequence variants in cancer". *Nature Reviews Genetics.* 17 (2): 93–108. doi:10.1038/nrg.2015.17]
33. Karki, Roshan, et al., (2015). "Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics". *BMC Medical Genomics.* Springer Science and Business Media LLC. 8 (1): 37. doi:10.1186/s12920-015-0115-z]
34. Spencer, Paige S.; et al., (2012). "Genetic code redundancy and its influence on the encoded polypeptides". *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 1: e201204006. doi:10.5936/csbj.201204006]
35. Cordovado SK, et, al., (2012). "CFTR mutation analysis and haplotype associations in CF patients". *Molecular Genetics and Metabolism.* 105 (2): 249–54. doi:10.1016/j.ymgme.2011.10.013
36. T. Aomori, et al., (2009) “Rapid single-nucleotide polymorphism detection of cytochrome P450 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genes for the warfarin dose adjustment by the S Mart-amplification process version 2”, *Clin. Chem.* 55, 804–812

37. T. Yin, et. al., (2007) “Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1—rationale and perspectives”, *Thromb. Res.* 120, 1–10.
38. S. Sanda, et. al., (2013) “A SNP in G6PC2 predicts insulin secretion in type 1 diabetes”, *Acta Diabetol.* 50, 459–462.
39. K. Stark, et. al., (2009) “Common polymorphisms influencing serum uric acid levels contribute to susceptibility to gout, but not to coronary artery disease”, *PLoS One* 4, e7729.
40. A. Penas-Steinhardt, et. al., (2011) “Association of common variants in JAK2 gene with reduced risk of metabolic syndrome and related disorders”, *BMC Med. Genet.* 12, 166.
41. R. Oguro, et al., (2012) “A single nucleotide polymorphism of the adenosine deaminase, RNA-specific gene is associated with the serum triglyceride level, abdominal circumference, and serum adiponectin concentration”, *Exp. Gerontol.* 47, 183–187.
42. Sachidanandam R., et al. (2001) “A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms”. *Nature* 409, 928–933.
43. D.H. Kim, et al., (2011) “A functional single nucleotide polymorphism at the promoter region of cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers, *Cancer* 117, 4080–4091.
44. K.W. Wagner, et al., (2012) “Genetic variations in epigenetic genes are predictors of recurrence in stage I or II non-small cell lung cancer patients”, *Clin. Cancer Res.* 18, 585–592.
45. I.N. Mates, et. al., (2012) “Single nucleotide polymorphisms in colorectal cancer: associations with tumor site and TNM stage”, *J. Gastrointest. Liver Dis.* 21, 45–52.
46. C. Park, et al., (2012) “Association between CASP7 and CASP14 genetic polymorphisms and the risk of childhood leukemia”, *Hum. Immunol.* 73, 736–739.
47. S. Han, et al., (2010) “Polymorphisms in innate immunity genes and risk of childhood leukemia”, *Hum. Immunol.* 71, 727–730.
48. A. Renneville, et al., (2008) “Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature”, *Leukemia* 22, 915–931.
49. International HapMap Consortium, (2005) “A haplotype map of the human genome”. *Nature*; Vol. 437: pp.1299–1317.
50. Gregory S, et al., (2006) “The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1”. *Nature*; Vol. 441: pp. 315–321.
51. Ross M. et al., (2005) “The DNA sequence of the human X chromosome”. *Nature*.

52. Hamosh A, et al., (2000) “Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)”. Hum. Mutat. Vol. 15: pp. 57–61
53. National Human Genome Research Institute. (2003) “What’s next? Turning Genomics Vision into Reality”. www.nhgri.nih.gov.
54. J.M. Claverie (2001) “Genome wide analysis of DNA, RNA and Protein”, Bioinformatics and Functional Genomics, 291: 1255-1257)
55. Reich, D. E., et al. (2001) “Linkage disequilibrium in the human genome”. Nature 411, 199–204.
56. Wang, D. G., et al. (1998) “Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome”. Science 280, 1077–1082.
57. Kubista, M., et. al., (2006). “The real-time polymerase chain reaction”. Molecular aspects of medicine, 27(2-3), 95–125
58. Vogel, F. et. al., (1986) “GENETIC DISEASES” Human Genetics pp257-360 GENE ACTION. Springer-Verlag, Berlin.
59. Taylor, G. R. 1997) “Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA”, CRC Press, Boca Raton, FL.
60. Cotton, R. G. H. (1997) “Slowly but surely towards better scanning for mutations”. Trends Genet. 13, 43–46.
61. Vogel, F. et. al., (1986) “Problems and Approaches”, Human Genetics. Springer-Verlag, Berlin.
62. Jones, A. C., et. al., (2000) “Application and evaluation of denaturing HPLC for molecular genetic analysis in tuberous sclerosis”. Hum. Genet. 106, 663–668
63. Nickerson, M. L., et. al (2001) “Random mutagenesis-PCR to introduce alterations into defined DNA sequences for validation of SNP and mutation detection methods”. Hum. Mutations. 17, 210–219
64. Arnold, N., et al. (1999) “A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers”. Hum. Mutation. 14, 333–339.
65. Dobson-Stone, C., et al. (2000) “Comparison of fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis and denaturing high-performance liquid chromatography for detection of EXT1 and EXT2 mutations in hereditary multiple exostoses”. Eur. J. Hum. Genet. 8, 24–32.
66. Klein, W., et al. (2000) “The IL-10 gene is not involved in the predisposition to inflammatory bowel disease”. Electrophoresis 21, 3578–3582

67. Mir, K. U. et. al., (1999) "Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays". *Nat. Biotechnology*. 17, 788–79.
68. Quan PL, et. al., (2018). "dPCR: A Technology Review". *Sensors*. 18 (4): 1271. doi:10.3390/s18041271. PMC 5948698
69. Tagliapietra A, et al., (2019). "Footprints of BK and JC polyomaviruses in specimens from females affected by spontaneous abortion". *Human Reproduction*. 34 (3): 433–440. doi:10.1002/jcp.27490. hdl:11392/2397717
70. Chen, R. et al. (2012) "Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes" *Cell* 148, 1293–1307.
71. Tadmor, A.D., et al., (2011) "Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR". *Science* 333, (6038): 58–62, doi: 10.1126/science.1200758.
72. Lo, Y.M. et al., (2007) "Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 13116–13121. doi: 10.1073/pnas.0705765104
73. Baker M. et al., (2012). "Digital PCR hits its stride". *Nature Methods*. 9 (6): 541–544. doi:10.1038/nmeth.2027
74. Kazazian H.H., Erlich H. A. (1989) "PCR Technology": Special Article, Volume 9, pages 437–447,
75. Parsons BL, et al., (1997) "Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations". *Mutat Res*; 387:97–121.
76. Jenkins GJS, et. al., (1998) "Mutation analysis using the restriction site mutation (RSM) assay. *Mutat Res*; 405:209 –20.
77. Kan, Y. W. et. al., (1978) "Antenatal diagnosis of sickle-cell anemia by D.N.A. analysis of amniotic-fluid cells". *Lancet* 2, 910–912.
78. Kan, Y. W., et al. (1975) "Deletion of alpha-globin genes in hemoglobin-H disease demonstrates multiple alpha-globin structural loci". *Nature* 255, 255–256.
79. Mullis, K., et al. (1986) "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986:51 Pt 1:263-73. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032
80. Saiki RK, et. al., (1986) "Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ DNA with allele-specific oligonucleotide probes" *Nature* vol. 324(6093) pp. 163–166

81. Jiangang Chen, et al., (2022) “Tetra-Primer Amplification-Refractory Mutation System (ARMS)—PCR for Genotyping Mouse Leptin Gene Mutation”. NIH doi: 10.3390/ani12192680
82. O’Dell, S. D., et al., (2000) “SNP genotyping by combination of 192-well MADGE, ARMS and computerized gel image analysis”. Short Technical Reports, Biotechniques 29, 500–506, DOI:10.2144/00293st01
83. Βασιλειάδης (2018) “Ανίχνευση Αλληλομορφοειδικών μεταλλάξεων με PCR-Arms” Μοριακή Διαγνωστική Κεφ 2, σελ. 19
84. Drenkard E, et. al., (2000) “A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in Arabidopsis”. Plant Physiol., 124: 1483-1492. 10.1104/pp.124.4.1483.
85. Cha RS, et. al., (1992) “Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene”. PCR Methods Appl., 2: 14-20. Doi:10.1101/gr.2.1.14.
86. Jing Liu, et. al., (2012) “An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application”. Plant Methods 8, Article number:34, BMC Part of Springer Nature.
87. Hayashi K, et. al., (2004) “Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus”. Theor Appl Genet. 2004, 108: 1212-1220. Doi:10.1007/s00122-003-1553-0.
88. Hirotsu N, et. al., (2010) “Protocol: a simple gel-free method for SNP genotyping using allele-specific primers in rice and other plant species. Plant Methods. 2010, 6: 12-10.1186/1746-4811-6-12.
89. Freeman WM, et. al., (1999) "Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential". Bio Techniques. 26 (1): 112–22, 124–5. doi:10.2144/99261rv01
90. Bustin SA, et. al., (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective". J. Mol. Endocrinol. 34 (3): 597–601. doi:10.1677/jme.1.01755.
91. Hierro N, et. al., (2006). "Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine". Appl. Environ. Microbiol. 72 (11): 7148–55. doi:10.1128/AEM.00388-06.
92. Slomka MJ, et al. (2009). "Validated Real Time reverse transcriptase PCR methods for the diagnosis and pathotyping of Eurasian H7 avian influenza viruses". Influenza and Other Respiratory Viruses. 3 (4): 151–64. doi:10.1111/j.1750-2659.2009.00083.

93. Mission summary: WHO Field Visit to Wuhan, China 20–21 January 2020: <https://www.who.int/china/news/detail/22-01-2020-field-visit-wuhan-china-jan-2020>
94. Κυριαζής Ι., et. al., (2014) “Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών” Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2014, 31(1):23-40
95. Mc Guiganet. al., (2002). "Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan". Psychiatric Genetics. 12 (3): 133–136. doi:10.1097/00041444-200209000-00003.
96. Syvänen AC et. al., (2001). "Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms". Nature Reviews. Genetics. 2 (12): 930–942. doi:10.1038/35103535.
97. Γουρζή Π. “Μέτρηση ιικού φορτίου του HCMV με Real Time PCR”, Εργαστ. Ασκήσεις ΕΑΠ σελ. 9.
98. Livak et al., (2001) “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT Method”. Elsevier, Methods, USA. Vol 25, Σελ 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
99. Stratagene, et. al. (2006). “Introduction to Quantitative PCR”. p. 3-8, 9-11, 23-26 “Chapter 3: A-Z of quantitative PCR
100. Orita M., et al., (1989) “Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms” Proc. Natl. Acad. Sci. 86(8): 2766-2770, Pub Med doi: 10.1073/pnas.86.8.2766.
101. Λαζανάκη Β., «Η χρήση της Real-Time PCR (RT-PCR) για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων στελεχών βακτηρίου (Escherichia coli)». Πτυχιακή εργασία. ΤΕΙ Κρήτης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, 2010
102. Holland, P. M. et. al., (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 88 (16): 7276–7280. doi:10.1073/pnas.88.16.727
103. Chamberlain JS, et. al., (1988). "Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification". Nucleic Acids Research. 16 (23): 11141–11156. doi:10.1093/nar/16.23.11141.
104. Hayden MJ, et. al., (2008). "Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping". BMC Genomics. 9: 80. doi:10.1186/1471-2164-9-80

105. Perchetti, GA; et. al., (2020). "Multiplexing primer/probe sets for detection of SARS-CoV-2 by qRT-PCR". Journal of Clinical Virology. 129: 104499. doi:10.1016/j.jcv.2020.104499
106. Office of Justice Programs seal, "Overview of Steps in Analyzing DNA Evidence: Basics of Analyzing", August 8, 2012.
107. "Multiplex polymerase chain reaction (PCR) using multiple primer studies, fingerprinting, and rapid identification 22, 23 studies should be used to assist in determining the specific cause". Ciotto's Disaster Medicine (Second Edition), 2016, Science Direct
108. Sambrook, J.et. al., (1989), "The Use of DNA Extraction for Molecular Biology and Biotechnology Training: A Practical and Alternative Approach", Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Creative Education, Vol.6 No.8, May 21, 2015
109. WATSON James et al "Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου" 2η Ελληνική Έκδοση COLD SPRING HARBOR LAB PRESS 2018 κεφ 7, 145
110. Zeschnigk, M., et. al., (1997) "A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus". Eur. J. Hum. Genet. 5, 94–98.
111. Muller-Tidow, C., et al. (2001) "Analyses of the genomic methylation status of the human cyclin A1 promoter by a novel real-time PCR-based methodology". FEBS Lett. 490, 75–78.
112. Li J, et. al., (2008) "Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing". Nat Med 2008; 14:579 –84.
113. Thomas RK, et al.,(2006) "Sensitive mutation detection in heterogeneous cancer specimens by massively parallel pico liter reactor sequencing". Nat Med 2006; 12:852–5.
114. Binlanden J. et al., (2006) 800000 year old mammoth DNA, modern elephant DNA or PCR artefact? NIH doi: 10.1098/rsbl.2006.0537
115. Π. Ακριτίδης 1,et. al., "Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών: Ρυθμιστικό Πλαίσιο, Τεχνικές Πρόκλησης και Εξέλιξης." Κ.Ε.Τ.Α., Ινστιτούτο Αγροβιοτεχνολογίας, 570 01 Θέρμη 2 Α.Π.Θ., Εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών, 540 06 Θεσσαλονίκη
116. Druml B. et al. (2014) "High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis". Food Chemistry Vol. 158, Sept. 2014 P. 245-254 ELSEVIER <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>

117. Reed et al., (2007) "High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics Pharmacogenomics, 8", pp. 597-608 doi:10.2217/14622416.8.6.597
118. Gundry CN, et. al., (2003). "Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes". Clin. Chem. 49 (3): 396–406. doi:10.1373/49.3.396
119. Ririe, K.M. et. al., (1997), "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction", Anal. Biochem., 245 (2): 154–60, doi:10.1006/abio.1996.9916,
120. Jones PA, et. al., (2002) "The fundamental role of epigenetic events in cancer". Nat. Rev. Genet. 2002; 3:415–428.
121. Trinh BN, et. al., (2002) "DNA methyltransferase deficiency modifies cancer susceptibility in mice lacking DNA mismatch repair". Mol. Cell. Biol. 2002; 22:2906–2917.
122. Tomasz K., et. al., (2007) "Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation" 'Nucleic Acids Res. 2007 Mar; 35(6): e41. doi:10.1093/nar/gkm013.
123. Mackay et al., 2008 "A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: Application to the verification of grapevine and olive cultivars" Plant Methods, Article number 8.
124. Ganopoulos et al., (2011) "Adulterations in Basmati rice detected quantitatively by combined use of microsatellite and fragrance typing with high resolution melting (HRM) analysis" Food Chemistry, 129 (2011), pp. 652-65
125. L. Settanni, et al., (2007) "The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review Journal of Microbiological Methods", 69 (2007), pp. 1-22
126. Kagkli et al., (2012) "Towards a pathogenic Escherichia coli detection platform using multiplex SYBR Green real-time PCR methods and high resolution melting analysis" PLoS ONE, 7 (6) (2012), p. e39287
127. Pietzka A. et. al., (2011) "Gene scanning of an internalin B gene fragment using high-resolution melting curve analysis as a tool for rapid typing of Listeria monocytogenes" Journal of Molecular Diagnostics, 13 (1) (2011), pp. 57-63, doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.11.002

128. Foley et al., (2008) “Salmonella challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates” *Journal of Animal Science*, 86 (Suppl. 14) (2008), pp. E149-E162, doi: 10.2527/jas.2007-0464
129. R. A. Lilliebridge et al., (2011) “The utility of high-resolution melting analysis of SNP nucleated PCR amplicons – An MLST based *Staphylococcus aureus* typing scheme” *PLoS ONE*, 6 (2011), p. e19749, doi:10.1371/journal.pone.0019749
130. Antolinos et al., (2012) Development of a high-resolution melting-based approach for efficient differentiation among *Bacillus cereus* group isolates” *Foodborne Pathogens Disease*, 9 (2012), pp. 777-785, doi: 10.1089/fpd.2012.1148.
131. James, C. (2011). “Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops” (Vol. 43). ISAAA, report
132. Hiroshi Akiyama et al., (2009) “A screening method for the detection of the 35S promoter and the nopaline synthase terminator in genetically modified organisms in a real-time multiplex polymerase chain reaction using high-resolution melting-curve analysis” *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32 (2009), pp. 1824-1829, doi: 10.1248/bpb.32.1824
133. H. A. Sampson, (2004) “Update on food allergy” *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113 (5) (2004), pp. 805-819, doi: 10.1016/j.jaci.2004.03.014
134. Costa et al., (2012) “High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods” *Food Chemistry*, 133 (2012), pp. 1062-1069 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.077>
135. Wittwer CT, et. al., (2003). "High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen". *Clin. Chem.* 49 (6 Pt 1): 853–60. doi:10.1373/49.6.853.
136. C.T. Wittwer, et. al., (2009) “High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations” *Human Mutation*, 30 (6) (2009), pp. 857-859, DOI: 10.1002/humu.20951
137. *Food Chemistry* Volume 158, 1 September 2014, Pages 245-254 Review High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis Author links open overlay panel <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>
138. Tsugunori Notomi, et. al., (2000) “Loop-mediated isothermal amplification of DNA” *Nucleic Acids Research*, Volume 28, Issue 12, Page e63, <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.

139. Mori Y, et. al., (2004). "Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA". J. Biochem. Biophys. Methods. 59 (2): 145–57. doi:10.1016/j.jbbm.2003.12.005. PMID 15163526.)
140. Mori Y, et. al., (2001). "Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation". Biochem. Biophys. Res. Commun. 289 (1): 150–4. doi:10.1006/bbrc.2001.5921].
141. Njiru ZK, et. al., (2008). "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of Trypanosoma brucei rhodesiense". PLOS Negl Trop Dis. 2 (1): e147. doi:10.1371/journal.pntd.0000147.
142. Tomita N, et. al., (2008). "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products". Nat Protoc. 3 (5): 877–82. doi:10.1038/nprot.2008.57.
143. Arunrut, Narong; et, al., (2019). "Double-Loop-Mediated Isothermal Amplification (D-LAMP) using colourimetric gold nanoparticle probe for rapid detection of infectious Penaeus stylirostris densovirus (PstDNV) with reduced false-positive results from endogenous viral elements". Aquaculture. 510: 131–137. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.05.049
144. Arunrut, Narong; et, al., (2021). "Rapid and sensitive colorimetric detection of microsporidian Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) based on spore wall protein (SWP) gene using loop-mediated isothermal amplification combined with DNA functionalized gold nanoparticles as probes". Aquaculture. 533: 736206. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736206
145. Sen K, et. al., (2011). "Environmental microbiology: current technology and water application". Norfolk, UK: Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-70-7
146. Macarthur G et. al., (2009). "Global health diagnostics: research, development and regulation". Academy of Medical Sciences Workshop Report (PDF). Academy of Medical Sciences (Great Britain). ISBN 978-1-903401-20-0.
147. Poole Catherine B.; et.al., (2017). "Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP)". PLOS ONE. 12 (2): e0169011. Bibcode:2017 PLoSO..1269011P. doi:10.1371/journal.pone.0169011
148. Calvert, Amanda E.et. al., (2017). "Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)". PLOS ONE. 12 (9): e0185340. doi:10.1371/journal.pone.0185340.

149. Njiru ZK, et. al., (2008). "African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA". Int. J. Parasitol. 38 (5): 589–99. doi:10.1016/j.ijpara.2007.09.006.
150. Curtis KA, et. al., (2008). "Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)". J. Virol. Methods. 151 (2): 264–70. doi:10.1016/j.jviromet.2008.04.011.
151. Sattabongkot J, et. al., (2014). "Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of malaria infections in an area of endemicity in Thailand". J. Clin. Microbiol. 52 (5): 1471–7. doi:10.1128/JCM.03313-13.
152. Francois P, et. al., (2011). "Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications". FEMS Immunol. Med. Microbiol. 62 (1): 41–8. doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x.
153. Jackson, Kimberly R. et. al., (2020). "A novel loop-mediated isothermal amplification method for identification of four body fluids with smartphone detection". Forensic Science International: Genetics. 45: 102195. doi:10.1016/j.fsigen.2019.102195.
154. Layne, Tiffany; et. al., (2021). "Optimization of novel loop-mediated isothermal amplification with colorimetric image analysis for forensic body fluid identification". Journal of Forensic Sciences. 66 (3): 1033–1041. doi:10.1111/1556-4029.14682.
155. Kitamura, Masashi; et. al., (2018). "Rapid screening method for male DNA by using the loop-mediated isothermal amplification assay". International Journal of Legal Medicine. 132 (4): 975–981. doi:10.1007/s00414-017-1661-z.
156. J. N. Wolff et. al., (2008) "Combining allele-specific fluorescent probes and restriction assay in real-time PCR to achieve SNP scoring beyond allele ratios of 1:1000", Pub Med, Biotechniques 2008 Feb;44(2):193-4, 196, 199. doi: 10.2144/00011271
157. Hisatoshi Kaneko et. al., (2007) "Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances" Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Volume 70, Issue 3, 10 April 2007, Pages 499-501 <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.008>
- 158 Habibzadeh, Parham, et. al., (2021). "Molecular diagnostic assays for COVID-19: an overview". Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 58 (6): 385–398. doi:10.1080/10408363.2021.1884640.

159. Kurosaki, Yohei et. al., (2016). "Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay Coupled with a Portable Device for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Disease in Guinea". PLOS Neglected Tropical Diseases. 10 (2): e0004472. doi:10.1371/journal.pntd.0004472.
160. "LAMP-based Test Could Enable Point-of-Care COVID-19 Testing". Diagnostics from Technology Networks.
161. Lalli, Matthew A.; et. al., (2020). "Rapid and extraction-free detection of SARS-CoV-2 from saliva with colorimetric LAMP". medRxiv 10.1101/2020.05.07.20093542
162. Nagura-Ikeda, Mayuet. Al., (2020). "Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test To Diagnose COVID-19". Journal of Clinical Microbiology. 58 (9). doi:10.1128/JCM.01438-20.
163. Kellner, Max J. et. al., (2020). "A rapid, highly sensitive and open-access SARS-CoV-2 detection assay for laboratory and home testing". bioRxiv: 2020.06.23.166397. doi:10.1101/2020.06.23.166397.
164. Bokelmann, Lukas, et. al., (2020). "Rapid, reliable, and cheap point-of-care bulk testing for SARS-CoV-2 by combining hybridization capture with improved colorimetric LAMP (Cap-iLAMP)". medRxiv 10.1101/2020.08.04.20168617
165. Mori Y, et. al., (2009). "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases". J. Infect. Chemother. 15 (2): 62–9. doi:10.1007/s10156-009-0669-9. PMC 7087713. PMID 19396514.]
166. Iseki, Hiroshi, et. al., (2007). "Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine Babesia parasites". Journal of Microbiological Methods. 71 (3): 281–7. doi:10.1016/j.mimet.2007.09.019
167. Tanner NA, et. al., (2012). "Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification". BioTechniques. 53 (2): 81–9. doi:10.2144/0000113902]
168. Tone K, et. al., (2017). "Enhancing melting curve analysis for the discrimination of loop-mediated isothermal amplification products from four pathogenic molds: Use of inorganic pyrophosphatase and its effect in reducing the variance in melting temperature values". J Microbial Methods. 132: 41–45. doi:10.1016/j.mimet.2016.10.020

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.