

ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Spyros Pournaras

Professor and Director
Laboratory of Clinical Microbiology
ATTIKON University Hospital
Medical School, University of Athens, Greece

Attending Guest Professor
Laboratory of Medical Microbiology and Infection Prevention
University Medical Center, Groningen, The Netherlands

Σκοπός της διάλεξης:

- Η εξοικείωση των φοιτητών με τις μεθόδους μοριακής βιολογίας που έχουν **εφαρμογή**:
 - Στη διάγνωση των λοιμώξεων
 - Τη διερεύνηση της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά
 - Στην επιδημιολογική επιτήρηση και έλεγχο των λοιμώξεων
- Η κατανόηση της **αναγκαιότητας και της συνεισφοράς του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας στην κλινική έρευνα**

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

A) Μοριακή διάγνωση του λοιμογόνου παράγοντα

- **Εμπορικά** ΚΙΤ:
 - παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα λόγω:
 - απλουστευμένης χρήσης
 - βεβαιωμένης επαναληψιμότητας
- **in-house** πρωτόκολλα:
 - δεν είναι προτυποποιημένα
 - επιδέχονται αλλαγές/προσθήκες/βελτιώσεις

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

A1) Μοριακή διάγνωση λοιμογόνου παράγοντα: Μέθοδοι Υβριδισμού

Τεχνικές ανίχνευσης των παθογόνων **χωρίς προηγούμενο πολλαπλασιασμό** του στόχου: επιτρέπουν την απευθείας ανίχνευση στο κλινικό δείγμα

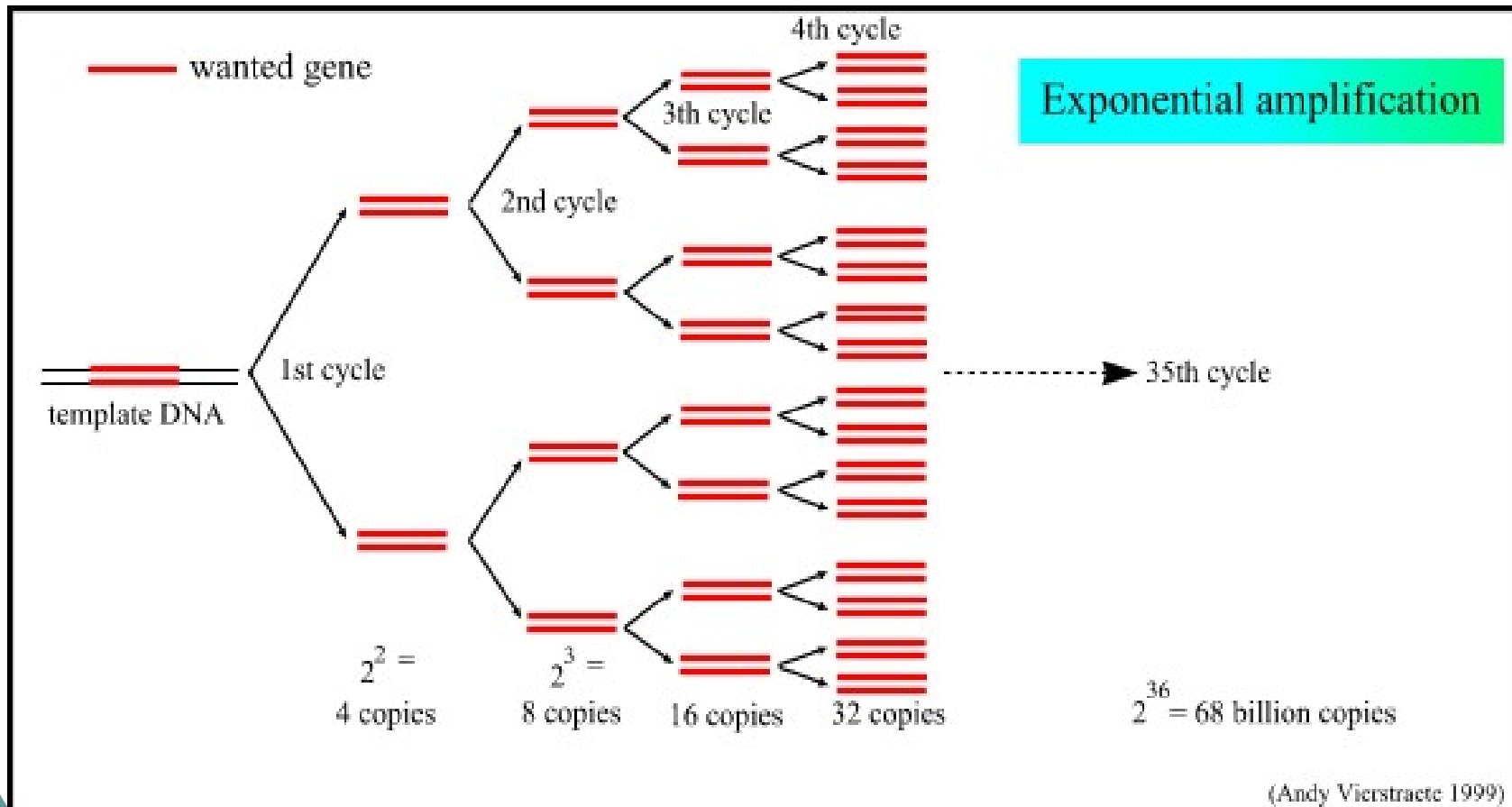
- Βασικό μειονέκτημα η **έλλειψη ευαισθησίας**
- Μετά τον υβριδισμό του ιχνηθέτη στο στόχο το σήμα που εκπέμπεται ενισχύεται και το ελάχιστο ανιχνεύσιμο φορτίο μειώνεται. Ωστόσο, ακόμα και μετά την **ενίσχυση του σήματος**, η ευαισθησία των σχετικών τεχνικών είναι σαφώς υποδεέστερη σε σχέση με τα πρωτόκολλα πολλαπλασιασμού

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

A2) Μοριακή διάγνωση: Μέθοδοι Πολλαπλασιασμού (PCR)

- Οι τεχνικές πολλαπλασιασμού των νουκλεϊκών οξέων επιτρέπουν τη **στοχευμένη διαγνωστική προσπέλαση** ακόμα και αν ο παθογόνος στόχος βρίσκεται σε **μικρή συγκέντρωση** στο δείγμα
- Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**Polymerase Chain Reaction - PCR**) πλέον χρησιμοποιείται ευρέως τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς
- Εκτός από τον ποιοτικό έλεγχο των κλινικών δειγμάτων, η PCR επιτρέπει **ποσοτικό προσδιορισμό** του φορτίου του παθογόνου (π.χ. **HCV, HIV, HBV**)
- Η PCR είναι πολύτιμη για **βραδέως αναπτυσσόμενα παθογόνα** όπως τα *Mycobacteria*

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

B) Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά

- Οι κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές μελέτης της ευαισθησίας των μικροβίων στα αντιβιοτικά χρησιμεύουν για την **εκλογή της θεραπείας** και **δύσκολα μπορούν να αντικατασταθούν από τις μοριακές τεχνικές** παρά το ότι είναι **χρονοβόρες**
- Ωστόσο, οι συμβατικές τεχνικές υστερούν στην ανίχνευση **μοριακών παραγόντων αντοχής** όπως για παράδειγμα στις περιπτώσεις των φαινομενικά ευαίσθητων στην οξακιλίνη *S. aureus* οι οποίοι όμως είναι θετικοί για το γονίδιο *mecA* που κωδικοποιεί για την PBP2a
- Στις περιπτώσεις αυτές η PCR μπορεί να ανιχνεύσει τα **γονίδια αντοχής** ή για τους ιούς συγκεκριμένες **σημειακές μεταλλάξεις** που προσδίδουν αντοχή στα αντιικά φάρμακα

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

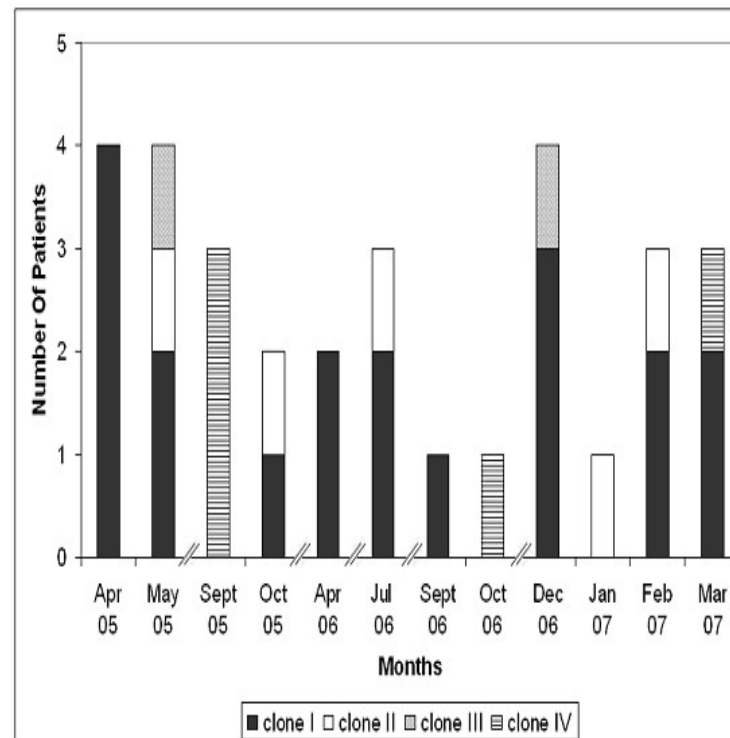
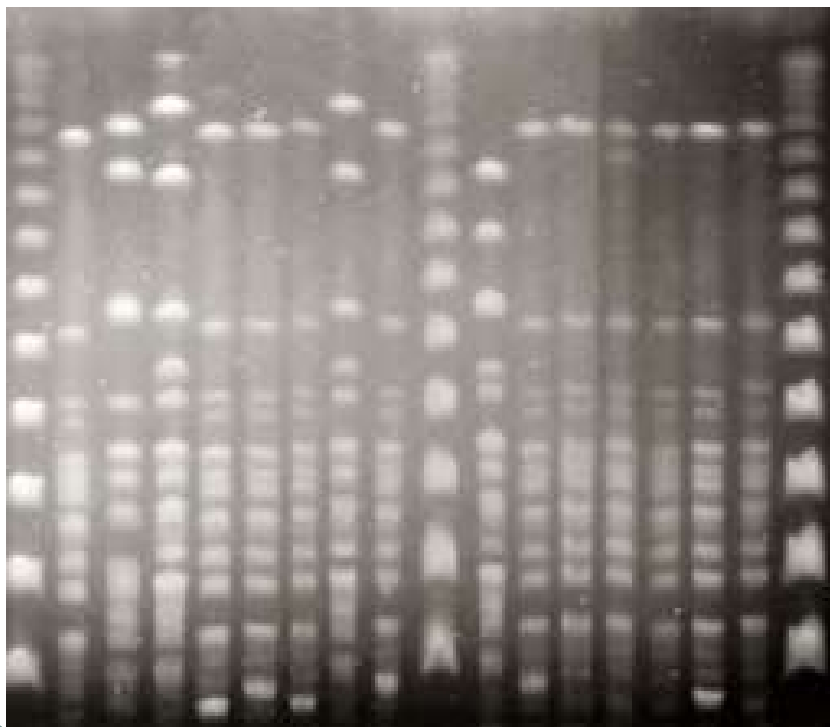
B) Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά

- Σημαντικό ωστόσο πλεονέκτημα των συμβατικών μικροβιολογικών μεθόδων ελέγχου της ευαισθησίας, είναι ότι ανιχνεύουν την αντοχή σε έναν αντιμικροβιακό παράγοντα **είτε οφείλεται σε γνωστό μηχανισμό είτε σε καινούριο** σε αντίθεση με τις μοριακές μεθόδους που ανιχνεύουν γνωστούς μόνο μηχανισμούς αντοχής
- Επίσης, η παρουσία ενός γονιδίου αντοχής **δε σημαίνει απαραίτητα** και τη λειτουργική του έκφραση όπως επίσης και η απουσία ενός τέτοιου γονιδίου δεν εξαιρεί την αντοχή στο αντιβιοτικό λόγω άλλου μηχανισμού αντοχής

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Γ) Χρήση των μοριακών μεθόδων για σκοπούς μοριακής επιδημιολογίας.

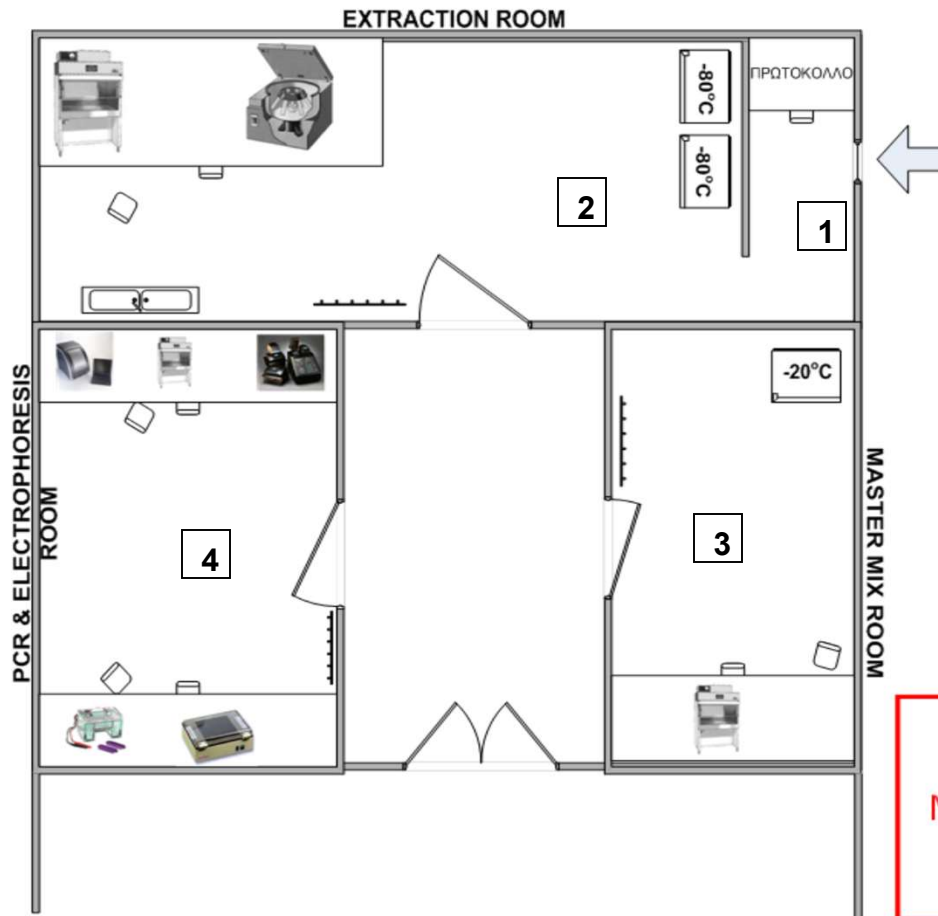
- Η διερεύνηση της συγγένειας των παθογόνων έχει ιδιαίτερη σημασία στη μελέτη της **διασποράς της μικροβιακής αντοχής** και του **ελέγχου των λοιμώξεων**.



ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ:

- Χωροταξική οργάνωση του εργαστηρίου: **PCR** → το DNA που ανιχνεύεται στο εργαστήριο **πολλαπλασιάζεται** δεκάδες διαδοχικές φορές → το τελικό φορτίο του φτάνει σε **εκατομμύρια αντίγραφα** → δυνητικά μπορεί να **επιμολύνει** **κάθε** αντιδραστήριο, όργανο μέχρι και εργαστηριακή μπλούζα.
- Το δεδομένο αυτό δημιουργεί την ανάγκη να χωριστεί το εργαστήριο σε:
 - α) ένα **χώρο παραλαβής του δείγματος και εξαγωγής** του DNA ή RNA
 - β) ένα χώρο πραγματοποίησης της **αντίδρασης** της PCR και **ανάλυσης** των προϊόντων της
 - γ) ξεχωριστό χώρο **προετοιμασίας** των αντιδραστηρίων

ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ II:



Για την αποφυγή επιμολύνσεων κατά το χειρισμό των κλινικών δειγμάτων θα πρέπει να ακολουθείται συγκεκριμένη πορεία μέσα στο εργαστήριο:

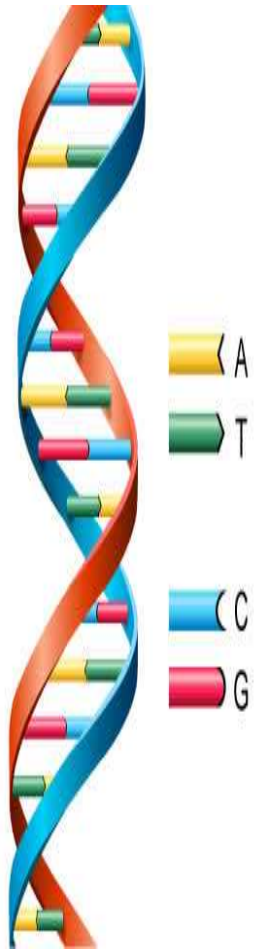
1. Παραλαβή – πρωτόκολλο
2. Εξαγωγή DNA στο Extraction room → φύλαξη DNA/RNA στους -80°C .
3. Ετοιμασία PCR master mix στο αντίστοιχο δωμάτιο.
4. Το DNA μπαίνει στο PCR & Electrophoresis Room και η ηλεκτροφόρηση γίνεται στον ίδιο χώρο αλλά σε διαφορετικό πάγκο.

**ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΛΟΓΟ ΚΡΙΝΕΤΑΙ
ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ Η ΑΛΛΑΓΗ ΠΟΔΙΑΣ
ΜΕ ΤΗΝ ΕΙΣΟΔΟ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ
ΧΩΡΟ ΤΟΥ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ**

Τεχνικές Μοριακής Μικροβιολογίας

- **A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA**
- **B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA**
- **Γ. Εξαγωγή και ανάλυση πρωτεϊνών**
- **Δ. Ειδικές εφαρμογές:**
 - **Εξαγωγή και ανάλυση πλασμιδιακού DNA**
 - **Ανάλυση του γενώματος των μικροβίων με περιοριστική πέψη και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο**
 - **Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA**
 - **Ανάλυση αμινοξικής αλληλουχίας**

A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA



- DNA => εκπληκτική **σταθερότητα** που εξασφαλίζεται από τη **δομή** του (οι δραστικές χημικές ομάδες των οργανικών βάσεων βρίσκονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας η οποία προφυλάσσεται από τις φωσφορικές ομάδες και τα σάκχαρα στο εξωτερικό της)
- Το μοναδικό πρόβλημα κατά την επεξεργασία του κλινικού δείγματος για την εξαγωγή του DNA είναι η παρουσία **νουκλεασών**.
- Όσο όμως σταθερό είναι το μόριο του DNA στην επίδραση χημικών παραγόντων, τόσο **εύθραυστο** είναι όταν καταπονείται μηχανικά ακόμα και στην ήπια ανάδευσή του.

A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

Κατά την απομόνωση του DNA λαμβάνουμε υπόψη:

1. Το κλινικό δείγμα από το οποίο θα απομονωθεί το DNA

Π.χ. το ολικό αίμα δεν χρειάζεται κάποια ιδιαίτερη προεργασία ενώ οι βρογχικές εκκρίσεις πρέπει να κατεργαστούν με βλεννολυτικές ουσίες (N-acetyl L-cysteine).

2. Το είδος των κυττάρων και των μικροοργανισμών από τα οποία θα απομονωθεί το DNA

Π.χ. τα Gram⁻ απαιτούν Proteinase K και lysozyme στο διάλυμα λύσης τους ενώ τα Gram⁺ απαιτούν επιπροσθέτως και lysostaphin. Οι μύκητες απαιτούν πιο έντονη κατεργασία.

ΟΜΩΣ τα ανθρώπινα κύτταρα, από τα οποία επιθυμούμε να λάβουμε το DNA του μικροοργανισμού (λευκά αιμοσφαίρια, επιθήλιο), δεν απαιτούν περαιτέρω χειρισμούς λύσης.

3. Ο χρονικός περιορισμός

Αυτοματοποιημένα συστήματα.

A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

Κατά την απομόνωση του DNA λαμβάνουμε υπόψη:

4. Η χρήση του DNA μετά την απομόνωσή του

Ίσως η σημαντικότερη παράμετρος που θα καθορίσει το πρωτόκολλο απομόνωσης του μορίου. Π.χ. η ανάλυση του DNA με υβριδισμό κατά Southern απαιτεί τη μηχανική ακεραιότητα του μορίου ενώ σε εφαρμογές PCR αυτό δεν είναι καθόλου σημαντικό.

5. Η καθαρότητα του DNA

Εξίσου σημαντική παράμετρος που για συγκεκριμένες μεθοδολογίες είναι καθοριστική. Π.χ. η χρήση ηπαρίνης ως αντιπηκτικού στα φιαλίδια που χρησιμοποιούνται για γενικές αίματος αποφεύγεται όταν από το δείγμα πρόκειται να ζητηθεί μοριακός έλεγχος με PCR. Αυτό συμβαίνει διότι η ηπαρίνη δεσμεύει τα μεταλλικά ιόντα που είναι απαραίτητα για τη δράση της Taq πολυμεράσης και αναστέλλεται έτσι η αντίδραση.

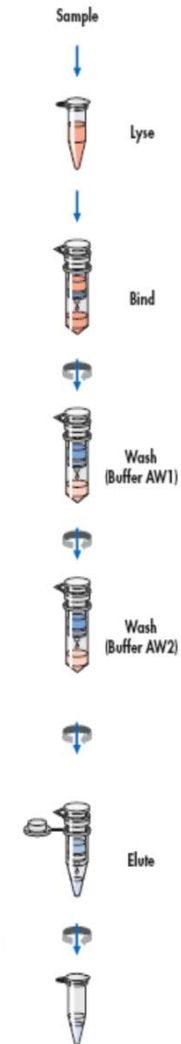
A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

- Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με τη χρήση εμπορικού kit (*QIAamp Mini Kit, QIAGEN*)



A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

QIAamp Spin Procedure



Pure genomic or viral DNA

1. Σε eppendorf tube των 1.5ml προσθέτω 20μl Protease ή Proteinase K (**λύση**) και προσθέτω 200μl από το δείγμα.
2. Προσθέτω 200μl διάλυμα AL (**λύση**) και κάνω vortex για 15 sec. Επωάζω στους 56 °C για 10min (**για να δράσει η PrK**).
3. Προσθέτω 200μl 100% EtOH (**κατακρήμνιση DNA**) και vortex για 15sec. Μεταφέρω σε στήλη και φυγοκεντρώ στις 8000 rpm για 1min (**δέσμευση DNA στη στήλη**).
4. Προσθέτω 500μl διάλυμα AW1 (**ξέπλυμα της στήλης από προσμίξεις**) και φυγοκεντρώ στις 8000rpm για 1min. Προσθέτω 500μl διάλυμα AW2 (**ξέπλυμα της στήλης από προσμίξεις**) και φυγοκεντρώ στις 13000rpm για 3min.
5. Μεταφέρω τη στήλη σε eppendorf tube των 1.5ml και προσθέτω 200μl διάλυμα AE (**ιοντικής ισχύος, ώστε να απομονωθεί το DNA από τη στήλη**). Αφήνω σε RT για 1min και φυγοκεντρώ στις 8000 rpm για 1min.

A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

Ανάλυση του DNA

- Η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανάλυσης του DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (**agarose gel electrophoresis**) => γραμμικός πολυσακχαρίτης (περίπου 800 μονομερή).
- Τα γραμμικά πολυμερή συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοσιδικούς δεσμούς δημιουργώντας ελικοειδείς και υπερελικοειδείς ίνες.

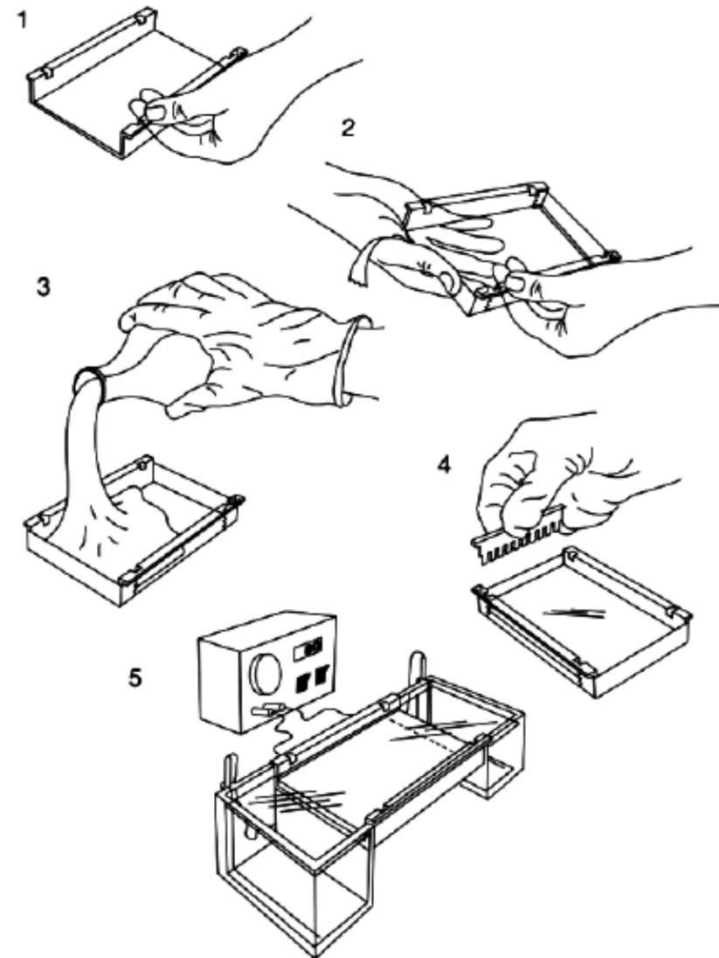
A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

Ανάλυση του DNA

- Όταν θερμαίνεται η αγαρόζη διαλύεται και το διάλυμά της τοποθετείται σε ειδική **συσκευή** ηλεκτροφόρησης όπου αφήνεται μέχρι να κρυώσει, να στερεοποιηθεί και να δημιουργήσει πηκτή.
- Αυτή η δομή αποτελεί πλέον έναν **ηθμό** με κανάλια, η διάμετρος των οποίων εξαρτάται από τη **συγκέντρωση** της αγαρόζης στη πηκτή. Στη συνέχεια η πηκτή εμβαπτίζεται στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (**running buffer**).

A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

Ανάλυση του DNA



A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

Ανάλυση του DNA

- Το DNA τοποθετείται σε θέσεις πλησίον του **αρνητικού** πόλου της ηλεκτροφορητικής συσκευής και στα άκρα της συσκευής εφαρμόζεται **διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού**.
- Τα μόρια του DNA κινούνται προς το **θετικό** πόλο εξαιτίας του αρνητικού φορτίου των φωσφορικών ομάδων.
- Για να εγχυθεί το δείγμα στα βοθρία της πηκτής, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα (**loading buffer**) που έχει μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το running buffer ώστε το δείγμα να κατακάθεται στον πυθμένα του βοθρίου. Το loading buffer περιέχει επίσης χρωστικές (π.χ. bromophenol blue) για τη παρακολούθηση της **εξέλιξης** της ηλεκτροφόρησης αφού οι χρωστικές αυτές κινούνται παράλληλα με το DNA.

A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

Ανάλυση του DNA

- Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα φθορίζουσας χρωστικής όπως το **EtBr** και τα τμήματα του DNA παρατηρούνται υπό φωτισμό **UV**.
- Εναλλακτικά, το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να προστεθεί στην αгарόζη πριν τη στερεοποίηση της πηκτής ή απλώς στο δείγμα του DNA μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης.
- Ακόμη πιο ευαίσθητες χρωστικές, όπως η **SYBR Gold**, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν αντί για το **EtBr**.



A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

Οι παρακάτω παράγοντες επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA:

- **Το μέγεθος των μορίων DNA**

Όσο μικρότερο είναι ένα μόριο DNA, τόσο ευκολότερα περνά ανάμεσα στους ηθμούς της πηκτής και επομένως τόσο γρηγορότερα κινείται κατά την ηλεκτροφόρηση.

- **Η συγκέντρωση της αγαρόζης**

Το εύρος ανάλυσης μορίων DNA σε πηκτή αγαρόζης είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης της αγαρόζης.

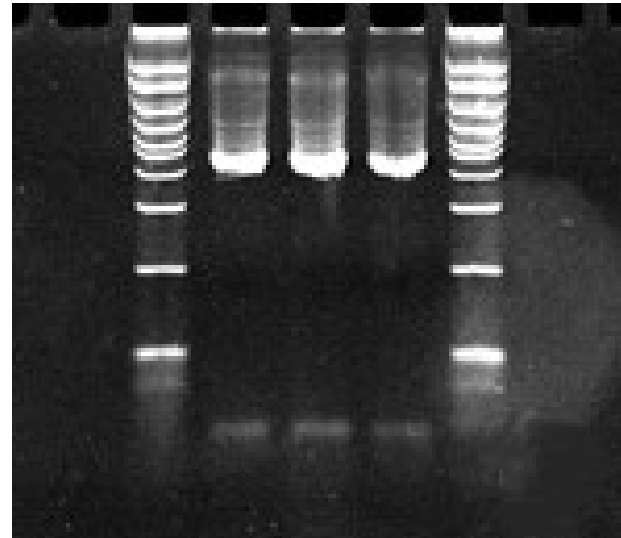
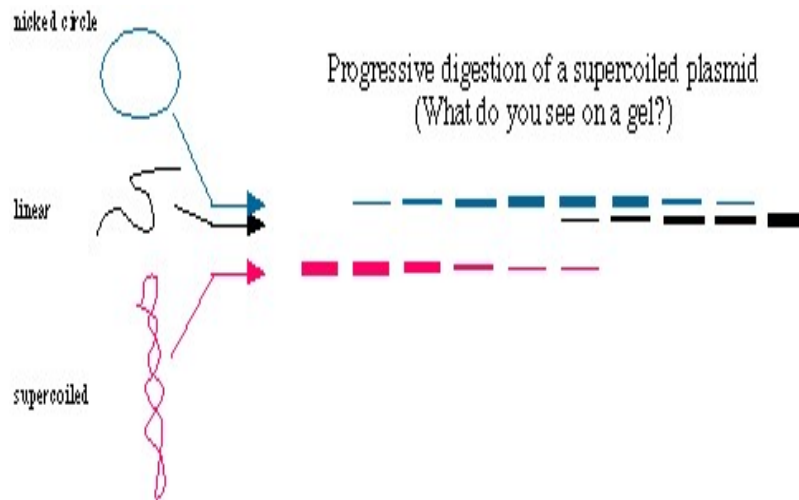
- **Η τρισδιάστατη διαμόρφωση του DNA**

Π.χ. κατά την ηλεκτροφόρηση πλασμιδίου σε πηκτή αγαρόζης συνήθως προκύπτουν τρεις ζώνες DNA που αντιστοιχούν στο υπερελικωμένο DNA, στο κυκλικό μόριο που περιέχει εγκοπή και στο γραμμικό DNA.

A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

AGAROSE (%)	STANDARD	HIGH GEL STRENGTH	LOW GELLING/MELTING TEMPERATURE	LOW GELLING/MELTING TEMPERATURE LOW VISCOSITY
0.3				
0.5	700 bp to 25 kb			
0.8	500 bp to 15 kb	800 bp to 10 kb	800 bp to 10 kb	
1.0	250 bp to 12 kb	400 bp to 8 kb	400 bp to 8 kb	
1.2	150 bp to 6 kb	300 bp to 7 kb	300 bp to 7 kb	
1.5	80 bp to 4 kb	200 bp to 4 kb	200 bp to 4 kb	
2.0		100 bp to 3 kb	100 bp to 3 kb	
3.0			500 bp to 1 kb	500 bp to 1 kb
4.0				100 bp to 500 bp
6.0				10 bp to 100 bp

A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA



A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

Οι παρακάτω παράγοντες επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA:

- **Η παρουσία EtBr στη πηκτή**

Το EtBr παρεμβάλλεται ανάμεσα στο DNA και μειώνει την ευελιξία του.

- **Η παρουσία πρωτεϊνών που προσδένονται στο DNA**

Παρατηρείται συνήθως μείωση της κινητικότητάς του συμπλόκου.

- **Η διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού που εφαρμόζεται**

Σε υψηλές τιμές μειώνεται το εύρος μεγέθους DNA που μπορεί να αναλυθεί με τη μέθοδο αυτή. Για βέλτιστα αποτελέσματα=> 5–7 volts/cm.

A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA

Οι παρακάτω παράγοντες επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA:

- **Ο τύπος της αγαρόζης**

Η κινητικότητα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον τύπο που χρησιμοποιείται.

- **Το ρυθμιστικό διάλυμα**

Γενικά, όσο υψηλότερη είναι η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος, τόσο υψηλότερη είναι η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Επομένως, η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος επηρεάζει την κινητικότητα του DNA. Υψηλή ένταση ρεύματος σημαίνει έκλυση μεγάλου ποσού θερμότητας που συνεπάγεται αύξηση της θερμοκρασίας της πηκτής.

B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA

- Η απομόνωση καλής ποιότητας RNA εξαρτάται αποκλειστικά από την αποτελεσματική αδρανοποίηση των **ριβονουκλεασών**.
- Οι ριβονουκλεάσες είναι εξαιρετικά **σταθερά** ένζυμα.
- Η λύση των κυττάρων ελευθερώνει ριβονουκλεάσες από τα κυτταρικά οργανίδια με αποτέλεσμα την ταχύτατη **αποικοδόμηση** του RNA.
- Εκτός από το παρασκεύασμα, πηγή ριβονουκλεασών μπορεί να είναι και **κάθε** υλικό ή αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο, με κυριότερη πηγή επιμόλυνσης τον **ανθρώπινο** παράγοντα.
- Κατά συνέπεια όταν απομονώνουμε ή δουλεύουμε με RNA, δυο πηγές επιμόλυνσης πρέπει να ελεγχθούν:

α) τα αντιδραστήρια και υλικά και

β) οι ενδογενείς ριβονουκλεάσες του παρασκευάσματος μας

B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA

Παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την απομόνωση του RNA:

1. Η χρησιμοποίηση RNase free αντιδραστηρίων και αναλώσιμων υλικών
2. Η χρησιμοποίηση αντιδραστηρίων και υλικών αποκλειστικά για το χειρισμό του RNA
3. Η αδρανοποίηση των ριβονουκλεασών στα διαλύματα με την χρήση του DEPC (diethyl-pyrocabonate)

Το DEPC είναι ένας μη ειδικός αναστολέας των ριβονουκλεασών. Αντιδρά επίσης με τις αδερίνες και γι' αυτό – όπως και για το λόγο ότι είναι ισχυρό δηλητήριο – μετά την κατεργασία των διαλυμάτων πρέπει να αφαιρούνται τα υπολείμματα του με θέρμανση ή κλιβανισμό υπό πίεση. Κατεργασία σε υδατικό διάλυμα DEPC και επακόλουθο ξηρό κλιβανισμό πρέπει να υφίστανται και τα γυαλικά ή τα μεταλλικά σκεύη.

B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA

Παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την απομόνωση του RNA:

- 4. Να αποφεύγουμε οποιαδήποτε επαφή αντιδραστηρίων ή υλικών με γυμνά χέρια**
- 5. Να κατεργαζόμαστε άμεσα το παρασκεύασμα**

Διαφορετικά απαιτείται άμεση τοποθέτησή του σε υγρό άζωτο και φύλαξη σε βαθιά κατάψυξη μέχρι τη λύση του.

B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA

Τα διαλύματα λύσης περιέχουν δύο ειδών αναστολείς των ριβονουκλεασών:

- A) **ισχυρές χαστροπικές και αποδιατακτικές ενώσεις** οι οποίες αποικοδομούν το κύτταρο, απελευθερώνουν το RNA από τις πρωτεΐνες και ταυτόχρονα αδρανοποιούν τις ριβονουκλεάσες.
- B) **Μη ειδικούς (π.χ. ηπαρίνη) ή ειδικούς αναστολείς (RNasin)** των ριβονουκλεασών που χρησιμοποιούνται κυρίως σε πρωτόκολλα απομόνωσης RNA μετά από κλασμάτωση των κυτταρικών συστατικών ή οργανιδίων.

Η παρουσία αναστολέων των ριβονουκλεασών είναι αναγκαία καθ' όλα τα στάδια μέχρι τον πλήρη καθαρισμό του RNA.

B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA

Πρωτόκολλο εξαγωγής RNA (Εταιρείας Ambion)



- Το kit στηρίζεται σε ένα μείγμα όξινης φαινόλης και (υδροχλωρικής) γουανιδίνης. Η **γουανιδίνη** είναι ισχυρότατος αναστολέας των ριβονουκλεασών η οποία περνά στην υδατική φάση και προστατεύει το RNA.
- Χρησιμοποιείται για την απομόνωση ολικού RNA καθαρού από DNA από ιστούς, κύτταρα ή άλλα υγρά.
- Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με **χλωροφόρμιο** το οποίο ανοίγει τις μεμβράνες των κυττάρων.
- Η όξινη **φαινόλη** παίρνει στη φάση της το DNA ενώ αφήνει στην υδατική το RNA. Ως φαινόλη, παίρνει και τις πρωτεΐνες ενώ το χλωροφόρμιο απομακρύνει λιπίδια και ίχνη φαινόλης.

B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA

Homogenization



RNA Extraction



RNA Precipitation and Wash



RNA Solubilization



1. Σε DEPC-treated eppendorf tube των 1.5-2 ml ομογενοποιώ το βακτηριακό εναιώρημα με RNAwiz (1ml/10⁷ κύτταρα) (**λύση**). Επωάζω σε RT για 5min.
2. Προσθέτω 1/5 του όγκου του RNAwiz χλωροφόρμιο (χωρίς ισοαμυλική αλκοόλη) (**λύση**). Ανακινώ με δύναμη για 20sec και επωάζω σε RT για 10min. Φυγοκεντρώ στις 11000rpm για 15min και στους 4°C.
3. Παίρνω τρεις φάσεις:
ανώτερη = RNA, μεσόφαση = DNA, ίζημα = οργανική φάση
Χωρίς να διαταράξω τη μεσόφαση μεταφέρω την ανώτερη υδατική φάση σε νέο DEPC-treated tube.
4. Προσθέτω 1/2 του όγκου του RNAwiz DEPC-treated H₂O και ανακατεύω καλά. Προσθέτω ίσο όγκο με το όγκο του RNAwiz ισοπροπανόλη (**κατακρημνίζει εκλεκτικά το RNA**), ανακατεύω καλά και επωάζω σε RT για 10min. Φυγοκεντρώ στις 11000rpm για 15min και στους 4°C για να πάρω το pellet του RNA.
5. Αφαιρώ το υπερκείμενο και ξεπλένω το pellet με τουλάχιστον ίσο όγκο με τον όγκο του RNAwiz, ψυχρής 75% αιθανόλης κάνοντας vortex (**καθαρισμός RNA από άλατα**). Φυγοκεντρώ στις 11000rpm για 5min και στους 4°C. Αφαιρώ το υπερκείμενο. Στεγνώνω το pellet αφήνοντας το tube ανοιχτό για 10min.
6. Αναδιαλύω το RNA σε αντίστοιχο όγκο DEPC-treated H₂O.

B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA

Ανάλυση του RNA

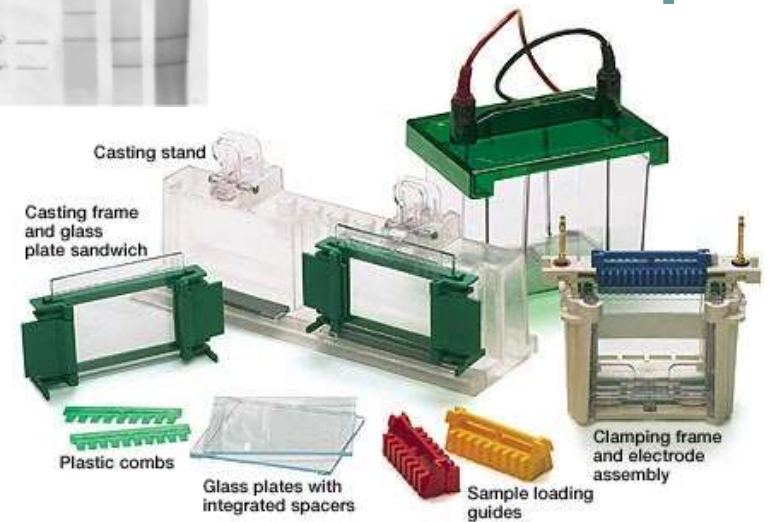
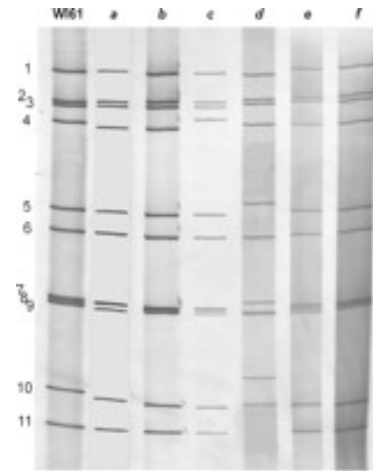
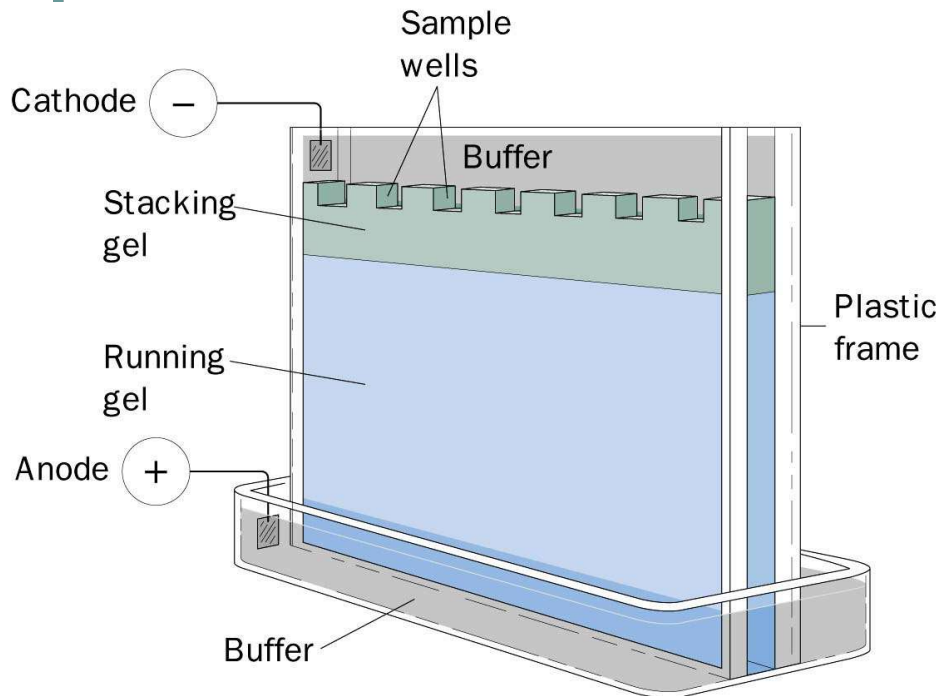
- Δύο τύποι ηλεκτροφόρησης:

- A) πηκτές **αγαρόζης** σε οριζόντιες συσκευές (όπως και για το DNA) ηλεκτροφόρησης και
- B) πηκτές **ακρυλαμίδης** σε κάθετες συσκευές.

Η διαχωριστική ικανότητα της πρώτης κυμαίνεται από λίγες δεκάδες έως και πολλές χιλιάδες βάσεις ενώ της δεύτερης από λίγες έως και 1000 βάσεις.

- Το RNA μπορεί να αναδιπλωθεί και να αποκτήσει **δευτεροταγή** δομή. Για να εξασφαλισθεί κατά συνέπεια ο διαχωρισμός του, αποκλειστικά και **μόνο** με βάση το **μέγεθος**, θα πρέπει να εκμηδενιστεί η επίδραση της δευτεροταγούς δομής στην κινητικότητα του μορίου και αυτό επιτυγχάνεται με την ηλεκτροφόρησή του σε **αποδιατακτικές** συνθήκες.
- Τα αποδιατακτικά μέσα σε πηκτές αγαρόζης είναι η **φορμαλδεΰδη** ή το υδροξείδιο του μεθυλ-μερκουρικού και στις πηκτές πολυακρυλαμίδης η **ουρία** και το φορμαμίδιο.

B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA



B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA

Ανάλυση του RNA

- Για διαγνωστικούς σκοπούς, ο μοναδικός λόγος ηλεκτροφόρησης του RNA είναι η διαπίστωση της **ακεραιότητάς** του (μπορεί να γίνει και σε πηκτή **αγαρόζης**) ώστε ο χειριστής να προχωρήσει στα επόμενα στάδια του πρωτοκόλλου. Με **φωτομέτρηση** του RNA (260/280nm) μπορεί επίσης να εξακριβωθεί η συγκέντρωση και η καθαρότητά του, στοιχεία τα οποία είναι σημαντικά σε επιμέρους διαγνωστικά και ερευνητικά πρωτόκολλα.

Γ. Εξαγωγή και ανάλυση πρωτεϊνών

- Για σκοπούς διαγνωστικής λοιμώξεων, το πιο συνηθισμένο είναι να ζητείται ο τίτλος **αντισωμάτων** (π.χ. anti-HBs) ή **αντιγόνων** (π.χ. HBsAg) στον ορό ή να ζητείται η ταυτοποίηση ενός παθογόνου με **ανοσοφθορισμό** κατά τον οποίο ειδικό αντίσωμα προσδένει στον αντιμικροβιακό επίτοπο in situ.
- Και στις δύο περιπτώσεις **δεν** απαιτείται ιδιαίτερος χειρισμός του δείγματος με σκοπό την εξαγωγή μορίων πρωτεϊνικής φύσεως.

Γ. Εξαγωγή και ανάλυση πρωτεϊνών

- Η απομόνωση μία ενδοκυττάριας πρωτεΐνης είναι μία σειρά βημάτων **κλασμάτωσης**.
- Κατά τη διάρκεια της απομόνωσης παρακολουθούμε **παραμέτρους** όπως τον ολικό όγκο του δείγματος, την ολική πρωτεΐνη του δείγματος και τις μονάδες ενεργότητας της επιθυμητής πρωτεΐνης.
- Το πιο κρίσιμο σημείο σε κάθε διαδικασία απομόνωσης πρωτεϊνών είναι η καθιέρωση μιας ειδικής δοκιμασίας **ανίχνευσης** της πρωτεΐνης. Η δοκιμασία αυτή μπορεί να βασίζεται πάνω σε μοναδικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης στόχου. Ιδανικά, μια τέτοια δοκιμασία πρέπει να είναι ειδική, γρήγορη, ευαίσθητη (δεν είναι επιθυμητό να καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες δείγματος για τη δοκιμασία) και ποσοτική (χρειάζεται ένας ακριβής τρόπος να υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης).

Γ. Εξαγωγή και ανάλυση πρωτεϊνών

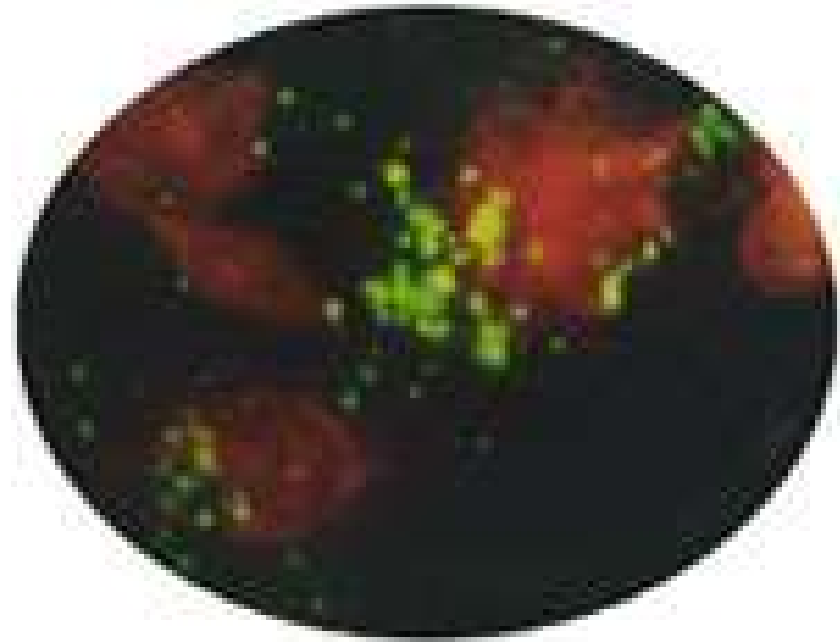
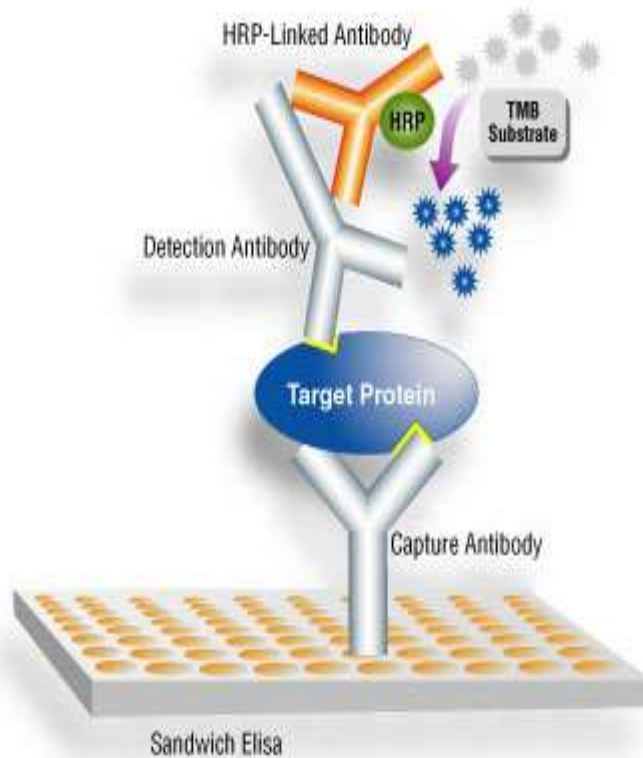
- Το **πρωτόκολλο** εξαγωγής περιλαμβάνει:
 - **Λήψη του περιεχομένου του κυττάρου**
 - **Αρχικός διαχωρισμός**
 - **Επιλεκτική κατακρήμνιση**
 - **Χρωματογραφία στήλης**
- Κριτήρια καθαρότητας του παρασκευάσματος στην επιθυμητή πρωτεΐνη είναι είτε ότι περαιτέρω βήματα καθαρισμού δεν αυξάνουν την **ειδική** ενεργότητα του παρασκευάσματος είτε ότι η ηλεκτροφόρηση ή η ανάλυση του N-τελικού άκρου στο παρασκεύασμα δείχνει την ύπαρξη του **ειδικού** προϊόντος.

Γ. Εξαγωγή και ανάλυση πρωτεϊνών

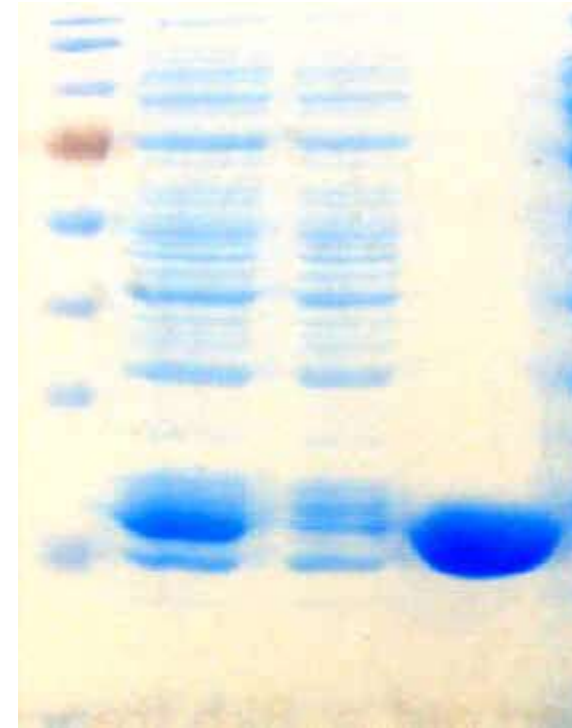
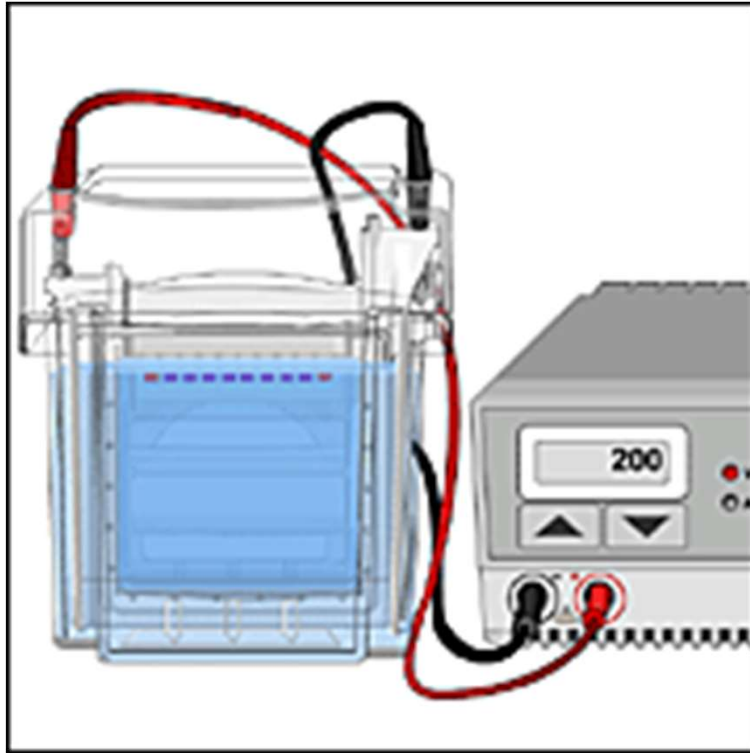
Ανάλυση των πρωτεϊνών

- Με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή **ακρυλαμίδης**, διαφορετικής όμως σύστασης από αυτή που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων.
- Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως η χρώση **αργύρου** και η **Coomasie**.
- Εναλλακτικά, η πρωτεΐνη στόχος ανιχνεύεται με ειδικό αντίσωμα. Η ειδική αυτή πρόσδεση ανιχνεύεται από την εκπομπή είτε ραδιενέργειας είτε φωταύγειας και το όλο πρωτόκολλο αναφέρεται ως *enzyme-linked immunosorbent assay* (**ELISA**). Γενικά, η μεθοδολογική αρχή της ειδικής πρόσδεσης αντιγόνου-αντισώματος είναι αυτή που πρακτικά χρησιμοποιείται στη ρουτίνα του διαγνωστικού εργαστηρίου είτε ως ELISA είτε ως ανοσοφθορισμός.

Γ. Εξαγωγή και ανάλυση πρωτεϊνών



Γ. Εξαγωγή και ανάλυση πρωτεϊνών



Τεχνικές Μοριακής Μικροβιολογίας I

- **Δ. Ειδικές εφαρμογές:**
 - **Εξαγωγή και ανάλυση πλασμιδιακού DNA**
 - **Ανάλυση του γενώματος των μικροβίων με περιοριστική πέψη και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο**
 - **Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA**
 - **Ανάλυση αμινοξικής αλληλουχίας κατά Edman**

Εξαγωγή και ανάλυση πλασμιδιακού DNA

- **Εξωχρωμοσωμικό υπερελικωμένο DNA.**
- Γονίδια που καθορίζουν μία πληθώρα φαινοτυπικών χαρακτηριστικών: **αντοχή** στα αντιβιοτικά, **λοιμογόνος** δύναμη, **μεταβολικά** χαρακτηριστικά.
- Μερικά πλασμίδια έχουν την ικανότητα να μεταβιβάζονται από στέλεχος σε στέλεχος ή από είδος σε είδος (self-transferable ή **conjugative plasmids**) και το χαρακτηριστικό αυτό κωδικοποιείται από τα γονίδια *tra*.
- Ιδιαίτερα τη δεκαετία του 1980 η τυποποίηση πλασμιδίων αποτελούσε μέθοδο αναφοράς για τη διερεύνηση της κλωνικής σχέσης των στελεχών. Στελέχη με το ίδιο πλασμιδιακό προφίλ θεωρούνταν **κλωνικά** σχετιζόμενα.
- **ΟΜΩΣ** τα πλασμίδια αποτελούν ένα **ασταθές** χαρακτηριστικό των μικροβίων υπό την έννοια ότι αυτά είναι δυνατόν να αποβληθούν από το βακτήριο ή να μεταφερθούν σε είδη που φυσιολογικά δεν έχουν ή να έχουν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο λόγω υπερελίκωσης και διαφορετικής χωροδιάταξης.

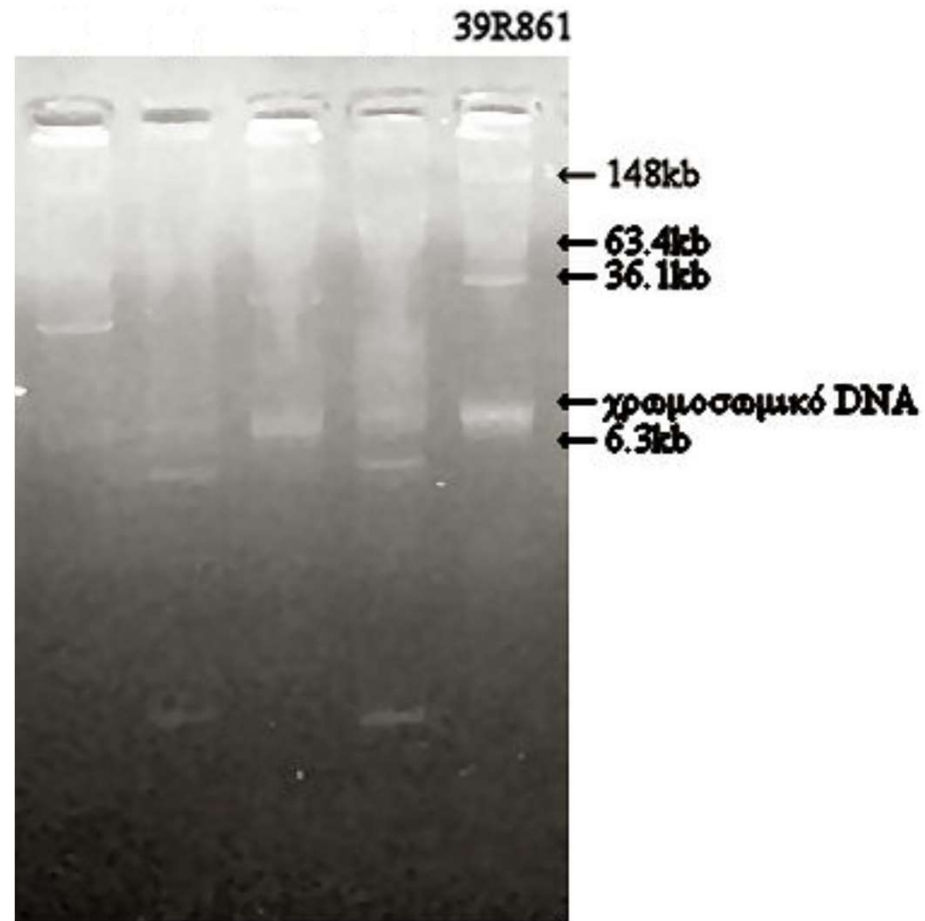
Εξαγωγή και ανάλυση πλασμιδιακού DNA

- Σήμερα, η μελέτη των πλασμιδίων γίνεται σχεδόν αποκλειστικά για την διερεύνηση των **γονιδίων αντοχής** στα αντιμικροβιακά που αυτά φέρουν.
- Οι μέθοδοι απομόνωσης και ανάλυσης του πλασμιδιακού DNA αποσκοπούν στη **διαφορική απομόνωση** του πλασμιδιακού από το χρωμοσωμικό DNA.
- Η αρχή της μεθοδολογίας βασίζεται στην αλκαλική λύση των μικροβίων, την επιλεκτική κατακρήμνιση του χρωμοσωμικού DNA με επίδραση **οξικών αλάτων** και το διαχωρισμό των διαφορετικών ενδοκυττάρων συστατικών με μίγμα **φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκόολης**. Τελικά το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη **αιθανόλης** στην ανώτερη υδατική φάση που προκύπτει από το προηγούμενο βήμα.

Εξαγωγή και ανάλυση πλασμιδιακού DNA

- Η ανάλυση των πλασμιδίων γίνεται σε πηκτές **αγαρόζης** (0.7 – 0.8%). Συνιστάται επίσης η χρήση στελεχών **αναφοράς** όπως το *Escherichia coli* 39R861 που περιέχουν πλασμίδια γνωστού μοριακού βάρους ώστε να ελέγχεται η ακρίβεια του πρωτοκόλλου εξαγωγής του πλασμιδιακού DNA και να υπολογίζεται το μοριακό βάρος των υπό μελέτη πλασμιδίων.
- Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι η ηλεκτροφόρηση των πλασμιδίων στη φυσική τους **υπερελικωμένη μορφή** παράγει διαφορετικά πρότυπα από την ηλεκτροφόρηση των ίδιων πλασμιδίων που έχουν υποστεί πέψη με ενδονουκλεάση και βρίσκονται σε **γραμμική μορφή**. Στη τελευταία περίπτωση, ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιείται συνήθως μείγμα γραμμικών θραυσμάτων DNA λάμδα φάγου μετά από πέψη με το ένζυμο *HindIII*.

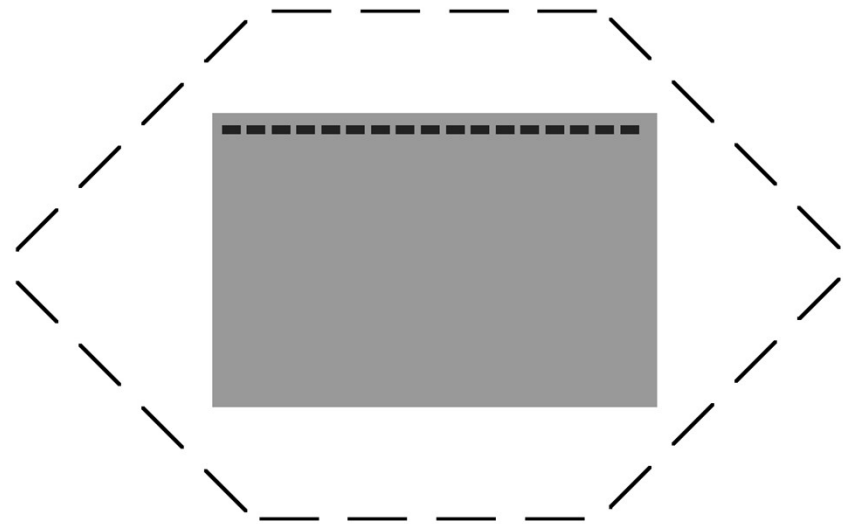
Εξαγωγή και ανάλυση πλασμιδιακού DNA



RFLP-PFGE

- Για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων (>50Kbp) χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση αγαρόζης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Οι διάφορες παραλλαγές της μεθόδου στηρίζονται στην **περιοδική αλλαγή** της κατεύθυνσης του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται στην πηκτή.
- Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου έγκειται στο ότι ένα μεγάλο μόριο DNA, προκειμένου να αλλάξει κατεύθυνση κίνησης μέσα στην πηκτή, πρέπει να αναδιοργανώσει την τρισδιάστατη μοριακή διαμόρφωση ώστε να χωράει στους πόρους της πηκτής προς την κατεύθυνση της κίνησης. Ο χρόνος που απαιτείται για την αλλαγή αυτή της **στερεοδιαμόρφωσης** του DNA εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου. Τα μικρότερα μόρια αλλάζουν κατεύθυνση κίνησης γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα μόρια και επομένως, κάθε φορά που αλλάζει η κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου, αποκτούν ένα μικρό προβάδισμα.
- Οι παράμετροι που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα αυτής της διαδικασίας και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά περίπτωση, ανάλογα με το εύρος του μεγέθους των τμημάτων DNA που διαχωρίζουμε, είναι: α) η **συχνότητα αλλαγής** κατεύθυνσης του ηλεκτρικού πεδίου, β) η **τάση** που εφαρμόζεται, γ) η **θερμοκρασία** ηλεκτροφόρησης, δ) το **ρυθμιστικό** διάλυμα που χρησιμοποιείται, ε) το είδος της αγαρόζης και στ) οι ιδιαιτερότητες της συσκευής που χρησιμοποιείται.

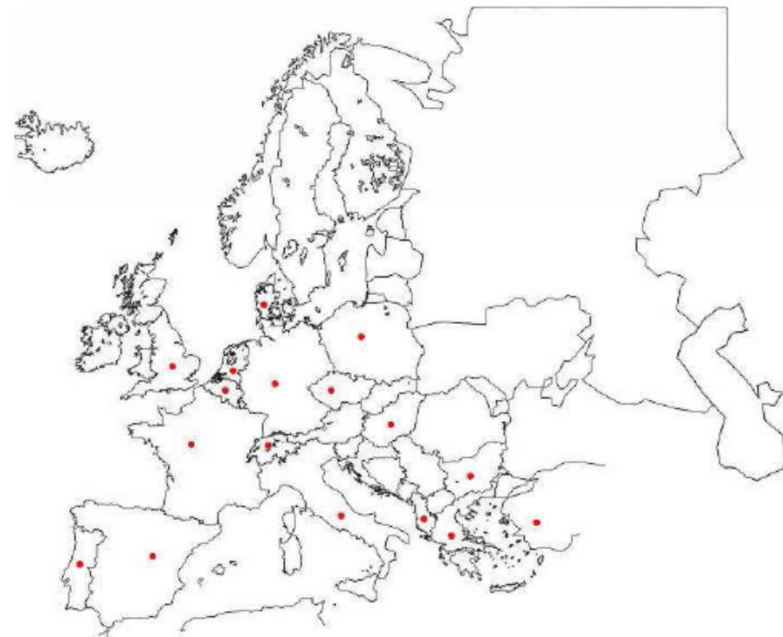
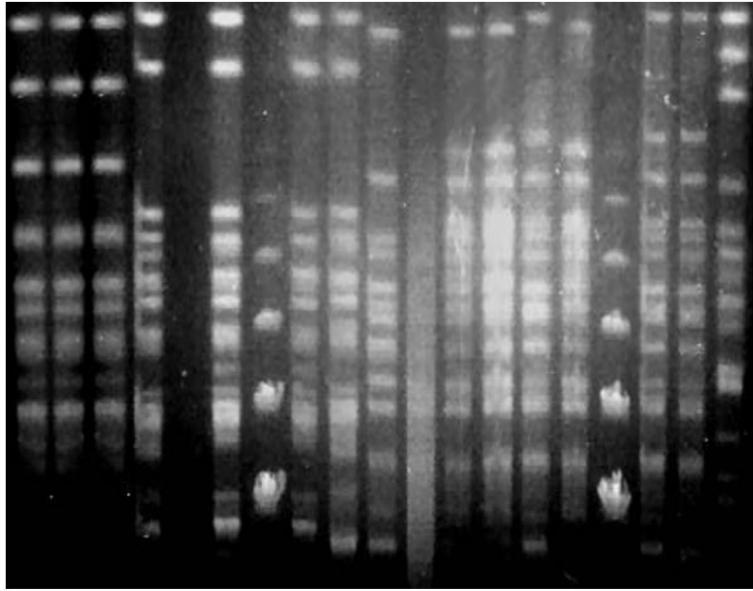
RFLP-PFGE



RFLP-PFGE

- Ως μέθοδος αναφοράς για την επιδημιολογική επιτήρηση των παθογόνων έχει καθιερωθεί η **μακρο-περιοριστική πέψη** του μικροβιακού DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) με **ηλεκτροφόρηση** των προϊόντων σε **μεταβαλλόμενο** ηλεκτρικό πεδίο (Pulse Field Gel Electrophoresis - PFGE), γιατί συνδυάζει την υψηλή επαναληψιμότητα με τη διακριτική ικανότητα.
- Το μικρόβιο ενσωματώνεται σε πηκτή αγαρόζης και η λύση του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και η πέψη του γενωμικού DNA γίνεται **in situ**. Διασφαλίζεται έτσι η προστασία του DNA από μηχανικές πιέσεις που ενδέχεται να προκαλέσουν μη ειδικές κατατμήσεις. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται εντός μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου και το **πρότυπο** των **ζωνών** που προκύπτει συγκρίνεται με τα υπόλοιπα στελέχη της μελέτης ώστε να βρεθεί ενδεχόμενη γενετική σχέση.
- Κριτήρια ανάλυσης των δεδομένων από RFLP-PFGE κατά **Tenover et al** (Tenover et al, *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233).

RFLP-PFGE



Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA

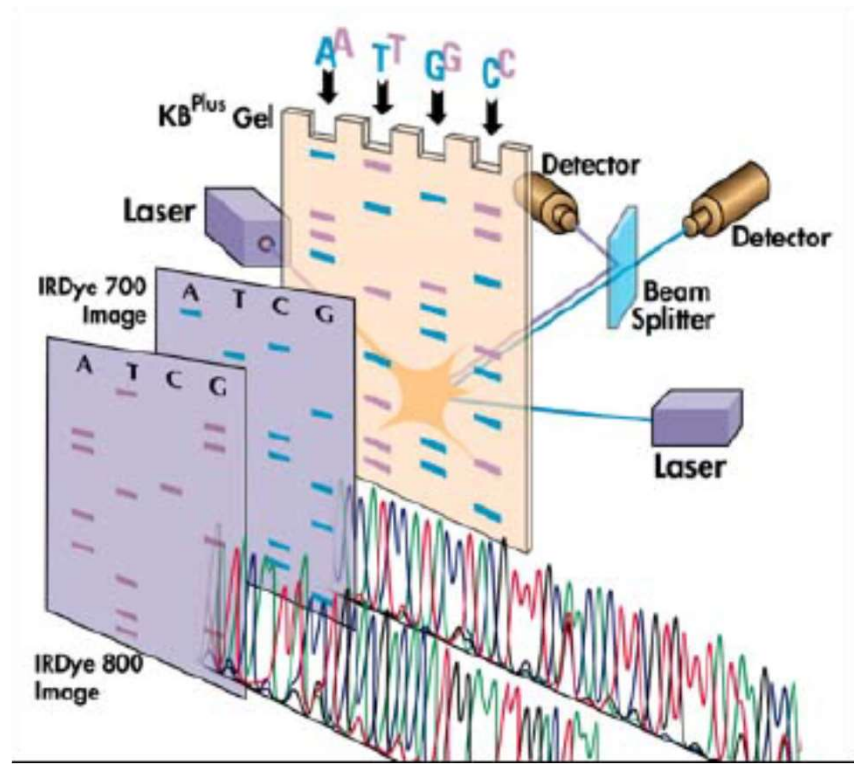
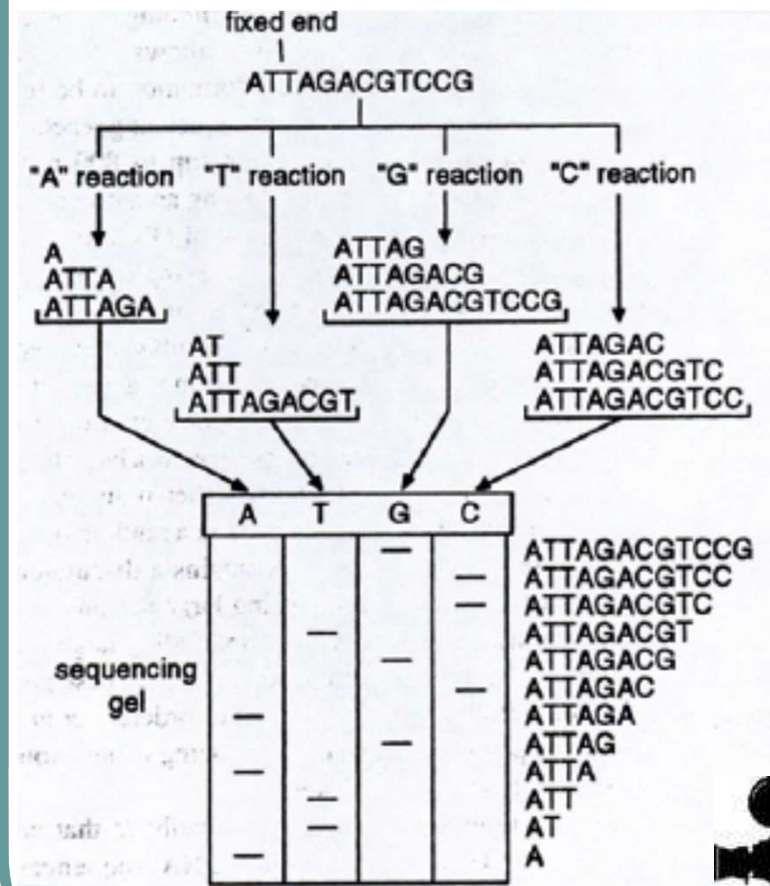
- Επιτρέπει την αναγνώριση της **ταυτότητας** κάποιου γονιδίου, την ανίχνευση μιας **μετάλλαξης**, τη ανακάλυψη νουκλεοτιδικών **πολυμορφισμών** κτλ.
- Σήμερα υπάρχουν οργανωμένα κέντρα ανάλυσης του DNA ή χρησιμοποιούνται οι **υπηρεσίες** εταιρειών που ειδικεύονται σε αυτόν τον τομέα. Οι γνωστότερες και πιο διαδεδομένες μέθοδοι ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας είναι η ενζυμική μέθοδος του **Sanger** και η τεχνική χημικής διάσπασης του DNA των **Maxam και Gilbert**.
- Η μέθοδος **Sanger** είναι η πλέον διαδεδομένη μέθοδος ανάλυσης του DNA διότι είναι ταχύτατη, επιτρέπει την ανάλυση μεγάλων τμημάτων DNA, δεν απαιτεί τη χρήση τοξικών χημικών, έχει τυποποιηθεί, είναι συμβατή με **αυτοματοποιημένο** εξοπλισμό κτλ.

Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA

Η αρχή της τεχνικής είναι η εξής:

1. Ένας συνθετικός **εκκινητής** υβριδίζεται στο μονόκλωνο DNA.
2. Δημιουργούμε **τέσσερις** αντιδράσεις. Κάθε μία περιέχει πολυμεράση του DNA και τα τέσσερα φυσιολογικά τριφωσφορικά νουκλεοτίδια συν, σε μικρή αναλογία, ένα 2', 3'-διδεοξυνουκλεοτίδιο.
3. Τα προϊόντα της κάθε αντίδρασης είναι επομένως ένας **πληθυσμός** μορίων διαφόρων μηκών. Το μήκος τους καθορίζεται από την απόσταση ανάμεσα στο 5' του εκκινητή και τη θέση ενσωμάτωσης του διδεοξυνουκλεοτιδίου.
4. Οι τέσσερις πληθυσμοί μορίων μπορούν να διαχωριστούν με **ηλεκτροφόρηση**. Η θέση κάθε ζώνωσης ανιχνεύεται και όταν οι τέσσερις αντιδράσεις φορτωθούν σε τέσσερις διαδοχικές θέσεις μιας πηκτής, τότε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του νεοσυντιθέμενου κλώνου μπορεί να διαβαστεί από το 5' προς το 3' διαβάζοντας τη σειρά των ζωνώσεων από το κάτω μέρος της πηκτής προς τα πάνω.

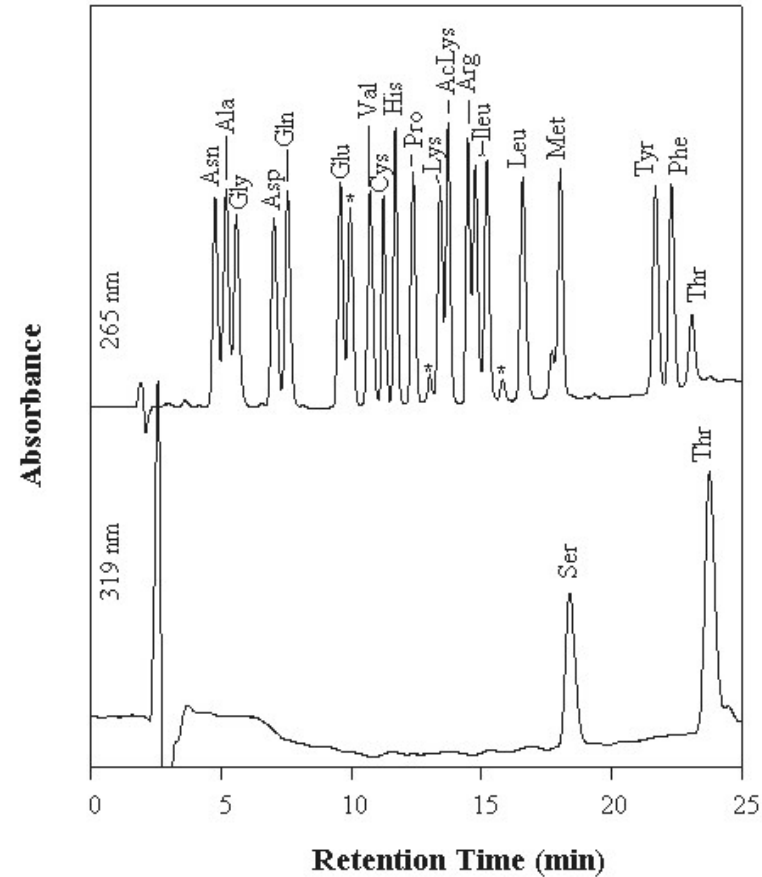
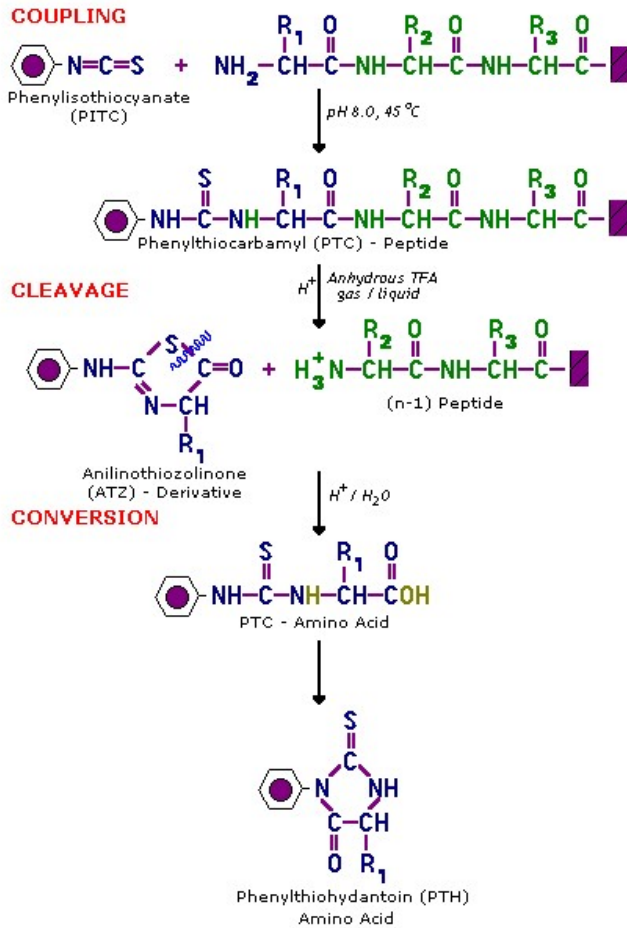
Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA



Ανάλυση αμινοξικής αλληλουχίας κατά Edman

- Είναι σύνηθες να ζητείται η αλληλουχία της πρωτεΐνης που απομονώθηκε, για ερευνητικούς κυρίως σκοπούς, με κυριότερο σκοπό τη **ταυτοποίησή** της.
- Την υπηρεσία ανάγνωσης της αμινοξικής αλληλουχίας αναλαμβάνουν εξειδικευμένες **εταιρείες** και ερευνητικά κέντρα μιας και δεν αποτελεί πρωτόκολλο ρουτίνας.
- Η μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η αποικοδόμηση κατά Edman κατά την οποία το N-τελικό αμινοξύ σημαίνεται και αποκόπτεται από το υπόλοιπο πεπτίδιο χωρίς να διαταραχθεί η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης. Με τεχνικές ηλεκτροφόρησης ή χρωματογραφίας το αμινοξύ ταυτοποιείται και ο κύκλος των αντιδράσεων επαναλαμβάνεται για περίπου **30** αμινοξικά κατάλοιπα.
- Εάν και η μέθοδος δεν μπορεί να αναγνώσει ολόκληρη τη πρωτεϊνική αλληλουχία ωστόσο ο αριθμός των γνωστών πλέον αμινοξέων είναι **αρκετός** για τη ταυτοποίηση της πρωτεΐνης. Επίσης, η μέθοδος μπορεί να βελτιωθεί αν η αρχική πρωτεΐνη καταταμηθεί σε επιμέρους πεπτίδια με **αλληλεπικαλυπτόμενη** πρωτοταγή δομή ώστε κάθε πεπτίδιο να υποστεί κατεργασία Edman.

Ανάλυση αμινοξικής αλληλουχίας κατά Edman



Ερωτήσεις αξιολόγησης:

1. Θέλετε να κάνετε PCR για να διαγνώσετε το DNA του HSV σε ένα περιστατικό εγκεφαλίτιδας. Για το σκοπό αυτό:

A) Χειρίζεστε το δείγμα άμεσα γιατί το νουκλεϊνικό οξύ είναι ασταθές.

B) Επιδράτε με βλεννολυτικές ουσίες στο ENY για να διευκολύνετε την εξαγωγή του ιικού DNA.

Γ) Ένα αξιόπιστο εμπορικό κιτ απομόνωσης ιικού DNA αρκεί για την απομόνωση.

Δ) Προσέχετε να κάνετε λεπτούς χειρισμούς κατά την εξαγωγή του ιικού DNA διότι διαφορετικά θα κατατμηστεί μηχανικά και θα είναι ακατάλληλο για PCR.

Ερωτήσεις αξιολόγησης:

2. Το προηγούμενο αποτέλεσμα της PCR (δίκλωνο DNA) πρέπει να το αναλύσετε σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Κυρίως προσέχετε:

A) Τη συγκέντρωση της αγαρόζης στη πηκτή και τη διαφορά δυναμικού στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

B) Να αποδιατάξετε το DNA ώστε αυτό να μην έχει στερεοδιαμόρφωση στο χώρο και να μετακινηθεί αποκλειστικά βάση του γραμμικού του μήκους.

Γ) Να τοποθετήσετε τους πόλους της ηλεκτροφορητικής συσκευής ορθά ώστε το DNA να μετακινηθεί προς τον αρνητικό πόλο.

Δ) Το A και το Γ είναι σωστό.

Ερωτήσεις αξιολόγησης:

3. Τη Παρασκευή το μεσημέρι λάβατε πλάσμα για μοριακή διάγνωση HCV (RNA ιός):

- A) Αφήνετε το δείγμα πάνω στο πάγκο της παραλαβής δειγμάτων για να το επεξεργαστείτε τη Δευτέρα το πρωί ώστε το εξαχθέν RNA να μη παραμείνει μεγάλο διάστημα εκτός του δείγματος.
- B) Κάνετε εξαγωγή του νουκλεϊνικού οξέος προσέχοντας μη μολυνθείτε και μη μολύνετε και για το λόγο αυτό φοράτε γάντια ενώ καταψύχετε (-80° C) το εξαχθέν RNA.
- Γ) Κάνετε εξαγωγή του νουκλεϊνικού οξέος στο χώρο φορώντας γάντια για να αποφύγετε επιμόλυνση του δείγματος με εξωγενείς νουκλεάσες και ηλεκτροφορείτε το RNA για να ανιχνεύσετε τον ιό.
- Δ) Βάζετε το δείγμα στο αυτοματοποιημένο σύστημα εξαγωγής RNA και το αφήνετε να δουλεύει ώστε Δευτέρα πρωί να παραλάβετε το νουκλεϊνικό οξύ. Τουλάχιστον έτσι το RNA δεν θα είναι πλέον εκτεθειμένο στις ενδογενείς νουκλεάσες του δείγματος.

Ερωτήσεις αξιολόγησης:

4. Για προληπτικούς λόγους απαιτείται ο έλεγχος των HBsAg στους έγκλειστους. Για το σκοπό αυτό:

A) Μία μέθοδος κλασμάτωσης των πρωτεϊνών σε δείγμα ορού ώστε να απομονώσουμε τη ζητούμενη πρωτεΐνη-αντιγόνο είναι ενδεδειγμένη λόγω της υψηλής ειδικότητας.

B) Η ELISA του ορολογικού εργαστηρίου είναι μέθοδος αναφοράς λόγω ταχύτητας και ευαισθησίας παρά το ποσοστό διασταυρούμενων αντιδράσεων που ενδογενώς δίνει η μεθοδολογία πρόσδεσης αντιγόνου-αντισώματος.

Γ) Η ανίχνευση πρωτεϊνών υστερεί έναντι των νουκλεϊνικών οξέων σε ευαισθησία και ειδικότητα και για το λόγο αυτό συστήνεται η ανίχνευση DNA.

Δ) Εφόσον δεν επείγει το περιστατικό το A είναι σωστό, διαφορετικά, σε περιστατικά οξείας ηπατίτιδας ενδείκνυται το B.

Ερωτήσεις αξιολόγησης:

5. Καλείστε να διερευνήσετε έξαρση κρουσμάτων σαλμονέλλωσης. Για το σκοπό αυτό:

- A) Η μελέτη των πλασμιδίων των στελεχών ενδείκνυται λόγω ταχύτητας της μεθόδου ενώ παράλληλα θα ανιχνεύσετε και φορείς αντοχής στα αντιβιοτικά.
- B) Η PFGE του κομμένου χρωμοσωμικού DNA θεωρείται καταλληλότερη παρόλο που σε ένα οργανωμένο εργαστήριο αναφοράς θα χρειαστούν τουλάχιστον 10 ημέρες εντατικής εργασίας.
- Γ) Πρακτικά και οι δύο παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούνται και εξαρτάται από τη τεχνική ρουτίνας του εκάστοτε εργαστηρίου.
- Δ) Πολύ πιο ειδικό και ευαίσθητο θα ήταν να ζητήσουμε ανάλυση της αλληλουχίας του DNA για χαρακτηριστικούς πολυμορφισμούς ώστε να τυποποιήσουμε τα στελέχη μας.