

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Σχεδίαση και Υλοποίηση Συσκευής Θερμικού
Κυκλοποιητή για Εφαρμογή σε Μεθόδους PCR»



Του φοιτητή
Γεώργιου Σεβαστίδη
Αρ. Μητρώου: 515129

Επιβλέπων
Χατζόπουλος Αργύριος
Επίκουρος Καθηγητής
Συνεπιβλέπων
Δελημαράς Βασίλειος
Ακαδημαϊκός Υπότροφος

Ημερομηνία 29/08/24

Τίτλος Δ.Ε. Σχεδίαση και Υλοποίηση Συσκευής Θερμικού Κυκλοποιητή για Εφαρμογή σε Μεθόδους PCR

Κωδικός Δ.Ε. 22154

Όνοματεπώνυμο φοιτητή Σεβαστίδης Γεώργιος
Όνοματεπώνυμο εισηγητή Χατζόπουλος Αργύριος

Ημερομηνία ανάληψης Δ.Ε. 13-03-2022

Ημερομηνία περάτωσης Δ.Ε. 29/08/24

Βεβαιώνω ότι είμαι ο συγγραφέας αυτής της εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, έχω καταγράψει τις όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών, εικόνων και κειμένου, είτε αυτές αναφέρονται ακριβώς είτε παραφρασμένες. Επιπλέον, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία προετοιμάστηκε από εμένα προσωπικά, ειδικά ως διπλωματική εργασία, στο Τμήμα Μηχανικών Πληροφορικής και Ηλεκτρονικών Συστημάτων του ΔΙ.ΠΑ.Ε.

λημα

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή Γεωργιού Σεβαστίδη που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης, ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσης της εργασίας διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο της εργασίας, δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού, ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, πώληση, εμπορική χρήση, διανομή, έκδοση, μεταφόρτωση (downloading), ανάρτηση (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιοδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού.

Η έγκριση της διπλωματικής εργασίας από το Τμήμα Μηχανικών Πληροφορικής και Ηλεκτρονικών Συστημάτων του Διεθνούς Πανεπιστημίου της Ελλάδος, δεν υποδηλώνει απαραίτητα και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα, εκ μέρους του Τμήματος.

Πρόλογος

Η τεχνολογία του Πολυμερούς Αλυσίδας Αντιδράσεων, γνωστή ως PCR, έχει αποτελέσει επανάσταση στον τομέα της γενετικής και της ιατρικής διάγνωσης. Προκειμένου να εκμεταλλευτούν αυτή την πρωτοποριακή τεχνολογία, πολλές χώρες, κυρίως οι υποανάπτυκτες, αντιμετωπίζουν προκλήσεις λόγω του περιορισμένου κόστους και της έλλειψης πρόσβασης σε κεντρικά εργαστήρια.

Σε αυτό το πλαίσιο, αυτή η εργασία εξετάζει τη δυνατότητα κατασκευής μιας συσκευής PCR στο σπίτι, χρησιμοποιώντας διαθέσιμα και οικονομικά υλικά. Αντιμετωπίζοντας το ζήτημα της ανισότητας στην υγεία, η εργασία αυτή επιδιώκει να προσφέρει μια λύση για χώρες με περιορισμένους οικονομικούς πόρους που αντιμετωπίζουν δυσκολίες στην πρόσβαση σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

Εξετάζοντας τη διαδικασία κατασκευής και την αποτελεσματικότητα της συσκευής PCR στο σπίτι, αναλύονται οι προκλήσεις, οι πιθανοί κίνδυνοι και οι δυνητικοί καρποί αυτής της πρωτοβουλίας. Επιπλέον, εξετάζεται η σημασία της συσκευής PCR στη διάγνωση ασθενειών, την παρακολούθηση της εξέλιξής τους και την έγκαιρη αντίδραση σε επιδημίες.

Στο πλαίσιο της παγκόσμιας υγείας και της κοινωνικής δικαιοσύνης, η προσπάθεια να κατασκευαστεί μια προσιτή συσκευή PCR για χρήση σε σπίτια ανοίγει νέους ορίζοντες στη μάχη κατά των ασθενειών και στην προώθηση της ισότητας στην υγεία. Η προσπάθεια αυτή αναδεικνύει τον ρόλο της τεχνολογίας στην αντιμετώπιση παγκόσμιων προκλήσεων και υπογραμμίζει την ανάγκη για διασφάλιση της πρόσβασης όλων σε βασικές υπηρεσίες υγείας.

Περίληψη

Αυτή η διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στον σχεδιασμό, την κατασκευή και τη λειτουργία μιας συσκευής PCR χαμηλού κόστους, χρησιμοποιώντας διαθέσιμα υλικά και εξαρτήματα. Ο στόχος είναι η δημιουργία μιας προσιτής και λειτουργικής συσκευής PCR, που μπορεί να κατασκευαστεί και να χρησιμοποιηθεί από ερευνητές και φοιτητές στο σπίτι ή σε μικρά εργαστήρια.

Αρχικά, γίνεται ανάλυση των βασικών αρχών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και της σημασίας της στη μοριακή βιολογία. Στη συνέχεια, περιγράφεται η διαδικασία σχεδιασμού των εκκινήτων, απαραίτητοι για την επιτυχή ενίσχυση του DNA, και τα βήματα κατασκευής της συσκευής.

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της κατασκευής αυτής της συσκευής είναι το χαμηλό κόστος σε σύγκριση με τις εμπορικές συσκευές PCR, ενώ παράλληλα προσφέρει την ευελιξία προσαρμογής και βελτίωσης από τον ίδιο τον χρήστη. Η εργασία εξετάζει επίσης τη δυνατότητα λειτουργίας και ελέγχου της συσκευής μέσω εφαρμογής, προσφέροντας μια σύγχρονη προσέγγιση στη διαχείριση των πειραμάτων PCR.

Τα αποτελέσματα της εργασίας δείχνουν ότι η κατασκευή μιας συσκευής PCR στο σπίτι είναι εφικτή και μπορεί να προσφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα για την ανάλυση DNA. Η συσκευή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εκπαιδευτικούς σκοπούς, ρουτίνες αναλύσεις και μικρής κλίμακας ερευνητικά πειράματα, προσφέροντας μια οικονομική και πρακτική λύση στην κατανόηση και εφαρμογή της τεχνολογίας PCR.

« Design and Implementation of a Thermal Cycler Device for PCR Applications »

George Sevastidis

Abstract

This thesis focuses on the design, construction, and operation of a low-cost PCR device using readily available materials and components. The goal is to create an affordable and functional PCR device that can be built and used by researchers and students at home or in small laboratories.

Initially, an analysis of the basic principles of the polymerase chain reaction (PCR) and its significance in molecular biology is conducted. Following this, the process of designing primers, essential for the successful amplification of DNA, and the steps for constructing the device are described.

One of the main advantages of constructing this device is the low cost compared to commercial PCR devices, while also offering the flexibility for customization and improvement by the user. The thesis also examines the potential for operating and controlling the device through an application, providing a modern approach to managing PCR experiments.

The results of the thesis show that constructing a PCR device at home is feasible and can yield satisfactory results for DNA analysis. The device can be used for educational purposes, routine analyses, and small-scale research experiments, offering an economical and practical solution for understanding and applying PCR technology.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Τμήματος Μηχανικών Πληροφορικής και Ηλεκτρονικών Συστημάτων, οι οποίοι, με τις γνώσεις και τη διδασκαλία τους, συνέβαλαν καθοριστικά στην ακαδημαϊκή μου κατάρτιση και στη διαμόρφωση της σκέψης μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ για τη στήριξή τους και την προθυμία τους να απαντούν στις απορίες μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην οικογένειά μου, στους φίλους μου, καθώς και στη σύντροφό μου για την ηθική υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Η αγάπη και η κατανόησή τους ήταν καθοριστικοί παράγοντες που με ώθησαν να συνεχίσω και να ολοκληρώσω αυτή την προσπάθεια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν, με οποιονδήποτε τρόπο, στην ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας, είτε με την παροχή βιβλιογραφίας και υλικού είτε με την πολύτιμη συζήτηση και ανταλλαγή ιδεών.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	iii
Περίληψη.....	iv
Abstract	v
Περιεχόμενα.....	vii
Κεφάλαιο 1ο: Απομόνωση DNA	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Πηγες και τεχνικές απομόνωσης DNA.....	1
1.3 Στάδια απομόνωσης DNA : Βασικά Στάδια	1
1.4 Απομόνωση DNA με εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων	2
1.5 Αυτοματοποιημένα Συστήματα Απομόνωσης DNA με Μαγνητικά Σφαιρίδια	4
1.5.1 Παράρτημα Β Πρακτικό μέρος Απομόνωση DNA από επιθηλιακά κύτταρα παρειάς... 6	
1.6 Επίλογος.....	6
Κεφάλαιο 2ο: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR	7
2.1 Εισαγωγή	7
2.2 Ιστορία της PCR	7
2.3 <i>Thermus aquaticus</i> (Taq)	8
2.3.1 Βασικά Χαρακτηριστικά του Taq:.....	8
2.3.2 Ανακάλυψη και Σημασία:.....	8
2.3.3 Χρήση της Taq Πολυμεράσης:.....	8
2.3.4 Χαρακτηριστικά Ανάπτυξης:.....	8
2.3.5 Ταξινόμηση και Μελέτη:.....	8
2.4 Στάδια της PCR	9
2.5 Τα συστατικά της PCR.....	12
2.5.1 Διαδικασία Σχεδιασμού Εκκνητών και Ανίχνευσης Πολυμορφισμού στην PCR.....	13
2.6 Επίλογος.....	14
Κεφάλαιο 3ο: Συσκευή PCR.....	15
3.1 Εισαγωγή	15
3.2 Κύκλωμα ελέγχου θερμοκρασίας	15
3.3 Υλικά και εξαρτήματα για την Κατασκευή Συσκευής PCR.....	16
3.3.1 Χρήση MOSFET για Έλεγχο Θέρμανσης και Ψύξης.....	16
3.3.2 Nodemcu-32s	17
3.3.3 Πλακέτα Θερμαντικής Επιφάνεια	18

3.3.4	Θερμαντικά στοιχεία.....	19
3.3.5	Ψύξη με Στοιχείο Peltier και Ανεμιστήρα.....	19
	Κατασκευή του Στοιχείου Peltier.....	20
	Συνολική Λειτουργία.....	21
3.3.6	Αισθητήρες Θερμοκρασίας DS18B20	21
3.3.7	Φιαλίδια φυγοκέντρισης(Vials).....	22
3.3.8	Keypad 4x5 Matrix Thin	22
3.3.9	Οθόνη lcd 16x2 διεπαφή IIC/I2C/TWI/SPI.....	23
3.3.10	DC-DC Converter Step-Down 5V 1A	24
3.3.11	Γραμμικός Ρυθμιστής Τάσης L7805CV.....	24
3.3.12	Power Supply Industrial 12V 20A 240W - SN-HS-240-12.....	24
3.4	Κώδικας σε γλώσσα C++ για την πλακέτα ESP32 μέσω της πλατφόρμας Arduino IDE....	25
3.4.1	Περιγραφή του κώδικα:.....	34
3.5	Οδηγός Χρήσης του Προγράμματος.....	35
3.6	Φωτογραφίες συσκευής.....	37
3.7	Επίλογος.....	41
	Κεφάλαιο 4ο: Συμπεράσματα ή/και προτάσεις βελτίωσης.....	42
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α Στάδια απομόνωσης DNA.....	45
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β Πρακτικό μέρος.....	46
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ C Λεπτομέρειες Συστατικών PCR.....	50

Κεφάλαιο 1ο: Απομόνωση DNA

1.1 Εισαγωγή

Το DNA περιέχει τις γενετικές πληροφορίες που καθορίζουν τη βιολογική ανάπτυξη των κυττάρων και πολλών ιών. Μερικοί ιοί έχουν RNA αντί για DNA. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το DNA βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα, με μικρές ποσότητες σε οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες.

Το DNA ενός ευκαρυωτικού κυττάρου έχει συνολικό μήκος πάνω από 2 μέτρα, γι' αυτό πρέπει να συμπυκνωθεί για να χωρέσει στον πυρήνα. Αυτό επιτυγχάνεται με την σύνδεση του DNA με πρωτεΐνες που ονομάζονται ιστόνες, καθώς και άλλες μη ιστονικές πρωτεΐνες. Το DNA τυλίγεται γύρω από τις ιστόνες, σχηματίζοντας δομές που ονομάζονται νουκλεοσώματα, τα οποία είναι η βασική μονάδα της χρωματίνης.

Οι ιστόνες διακρίνονται σε πέντε τύπους: H1/H5, H2A, H2B, H3 και H4. Κάθε νουκλεόσωμα αποτελείται από ένα κεντρικό σύμπλεγμα ιστονών (δύο από κάθε τύπο H2A, H2B, H3 και H4) και περιβάλλεται από 145-147 ζεύγη βάσεων DNA. Τα νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους με ιστόνες τύπου H1 ή H5 και DNA μήκους έως 80 ζευγών βάσεων, σχηματίζοντας μια αλυσίδα σαν χάντρες κομπολογιού. Αυτές οι αλυσίδες περιελλίσονται και σχηματίζουν νημάτια διαμέτρου 30 nm, που αποτελούν τη χρωματίνη.

Η σύνδεση του DNA με τις ιστόνες και η περιέλιξή του στη χρωματίνη, εκτός από τη συμπύκνωση, παρέχει προστασία και επιτρέπει τον ακριβή έλεγχο της αντιγραφής και της γονιδιακής έκφρασης. [1]

1.2 Πηγες και τεχνικές απομόνωσης DNA.

Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής απομόνωσης DNA καθορίζεται από πολλές παραμέτρους,

- όπως το **αρχικό υλικό** (π.χ. κύτταρα, ιστός, αίμα)
- το **είδος** (π.χ. χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό, ιικό κ.λπ.)
- και την **ποιότητα** του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε.

Στους ανθρώπους, η πιο συνηθισμένη πηγή DNA είναι τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, από τα οποία απομονώνεται εύκολα γενετικό υλικό υψηλής ποιότητας και συγκέντρωσης. Εναλλακτικά, DNA μπορεί να απομονωθεί εύκολα από τα κύτταρα της στοματικής κοιλότητας, με πλεονέκτημα την αποφυγή της παρεμβατικής διαδικασίας της αιμοληψίας

Με την πρόοδο της τεχνολογίας και των μεθόδων απομόνωσης, DNA μπορεί πρακτικά να απομονωθεί από οποιοδήποτε υλικό περιέχει εμπύρηντα κύτταρα, όπως κύτταρα από βιοψία τροφοβλάστης, μουσειακά εκθέματα, ρίζες τριχών, δόντια, οστά, βιοψίες ιστού σε κύβους παραφίνης κ.ά. [1]

1.3 Στάδια απομόνωσης DNA : Βασικά Στάδια

- Λύση Κυτταρικών Μεμβρανών:

Χρήση διαλυμάτων με απορρυπαντικά όπως το SDS για να απελευθερωθεί το DNA.

- Αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών:

Χρήση πρωτεϊνάσης K για την αποδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών και απενεργοποίηση των DNA.

- Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες:

Χρήση αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και αιθανόλης για την κατακρήμνιση του DNA.

- Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων :

Πλύσιμο του DNA με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 70%.

- Ανασύσταση του DNA :
- Διάλυση του DNA σε διάλυμα Tris-EDTA (TE) για προστασία και σταθερότητα.

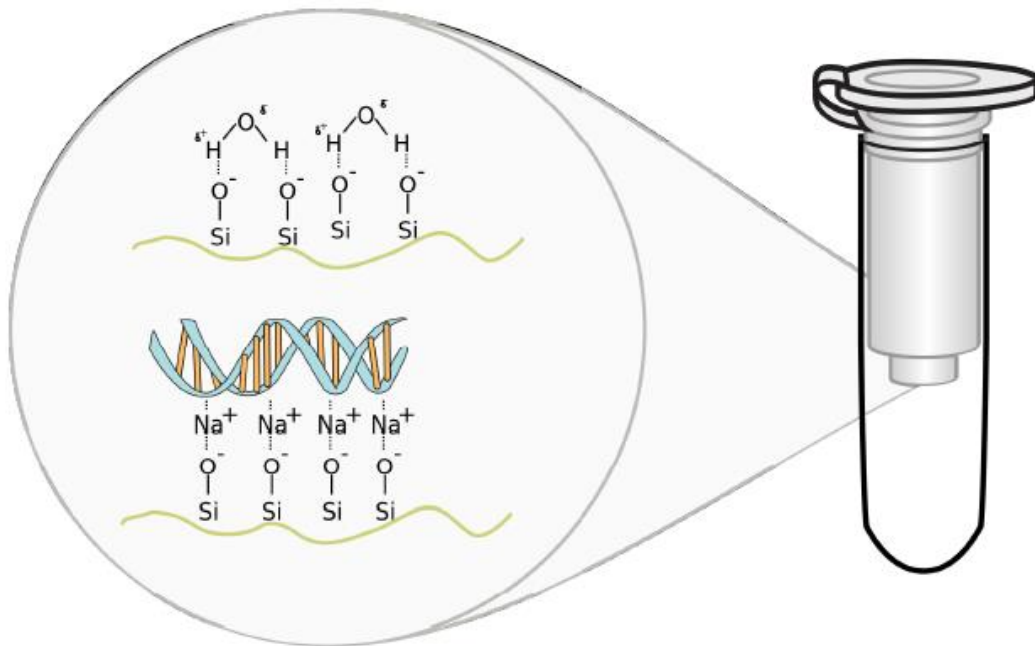
(Παράρτημα Α) [1]

1.4 Απομόνωση DNA με εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων

Τα εμπορικά διαθέσιμα κιτ έχουν απλοποιήσει την απομόνωση DNA και η χρήση τους γίνεται όλο και πιο συχνή.

Η απομόνωση DNA με κιτ βασίζεται στην πρόσδεση του DNA σε μια μεμβράνη με γέλη πυριτίου, που βρίσκεται σε στήλες. Σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, το αρνητικά φορτισμένο DNA προσδένεται στη θετικά φορτισμένη μεμβράνη πυριτίου. Η πρόσδεση αναστρέφεται με τη χρήση ελαφρά αλκαλικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος, επιτρέποντας την εκλούση του DNA από τη μεμβράνη.

Υπάρχουν διαφορετικά κιτ ανάλογα με την πηγή του DNA (π.χ. αίμα, ιστοί, κύτταρα, φυτά, βακτήρια) και την ποσότητα DNA που πρόκειται να απομονωθεί (mini, midi, maxi).



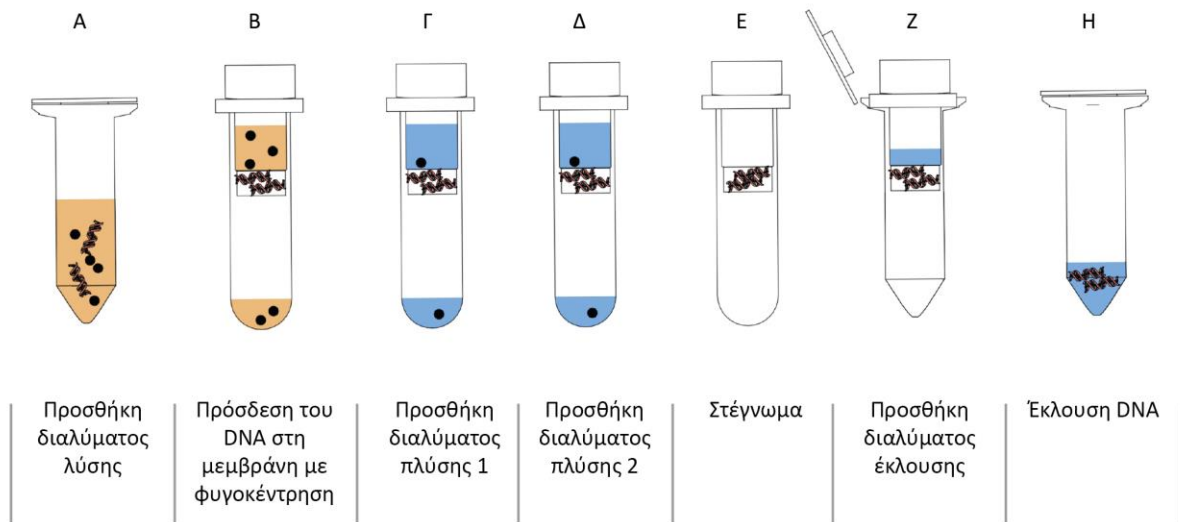
Εικόνα 1.1 Στη μεμβράνη πυριτίου μιας στήλης δεσμεύονται μόρια νερού (Α) και μόρια DNA παρουσία [1]

Τα βασικά πλεονεκτήματά της χρήσης κιτ για απομόνωση DNA είναι:

- Εύκολη χρήση και αναλυτικές οδηγίες.
- Ταυτόχρονη επεξεργασία πολλών δειγμάτων.
- Ταχύτητα.
- Αποφυγή επικίνδυνων χημικών (π.χ. φαινόλη, χλωροφόρμιο).
- Υψηλή ποιότητα DNA.
- Επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων. [1]

Στάδια απομόνωσης DNA:

1. **Λύση κυττάρων:** Προσθήκη χαιτοτροπικών αλάτων και πρωτεΐνάσης K, ακολουθούμενη από αιθανόλη για πρόσδεση DNA στη μεμβράνη. (εικόνα 1.2 Α) .
2. **Φυγοκέντρηση:** Τα δείγματα φορτώνονται στη στήλη και το DNA προσροφάται στη μεμβράνη, ενώ οι πρωτεΐνες και τα άλλα συστατικά συλλέγονται σε σωληνάριο. (εικόνα 1.2 Β).
3. **Πλύσεις:** Το DNA παραμένει στη μεμβράνη και πλένεται με αιθανόλη για απομάκρυνση αλάτων και πρωτεϊνών. (1.2 Γ και Δ).
4. **Στέγνωμα:** Η μεμβράνη στεγνώνεται με φυγοκέντρηση. (εικόνα 1.2 Ε).
5. **Εκλούση DNA:** Το καθαρό DNA εκλύεται από τη μεμβράνη με ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας. (εικόνα 1.2 Ζ).



Εικόνα 1.2 Στάδια απομόνωσης γενομικού DNA με στήλες που φέρουν μεμβράνη πυριτίου. [1]

Διαλύματα λύσης:

Τα διαλύματα λύσης που χρησιμοποιούνται στα περισσότερα κιτ απομόνωσης DNA περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις χαοτροπικών αλάτων, όπως:

- **Υδροχλωρική γουανιδίνη (Guanidine hydrochloride)**
- **Θειοκυανιούχος γουανιδίνη (Guanidine thiocyanate)**
- **Ουρία (Urea)**
- **Υπερχλωρικό λίθιο (Lithium perchlorate)**

Αυτά τα άλατα καταστρέφουν τους δεσμούς υδρογόνου, τις δυνάμεις Van der Waals και τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, μειώνοντας τη διαλυτότητα του DNA στο νερό και αποσταθεροποιώντας τις πρωτεΐνες.

Τα διαλύματα λύσης περιέχουν επίσης απορρυπαντικά για τη διάσπαση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών, καθώς και για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Συχνά χρησιμοποιείται το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) ως απορρυπαντικό, το οποίο διασπά τις μεμβράνες και δεσμεύει τις πρωτεΐνες, καθιστώντας τες υδατοδιαλυτές.

Επιπλέον, τα διαλύματα λύσης περιέχουν την πρωτεϊνάση K, ένα ένζυμο που παραμένει δραστικό ακόμα και παρουσία χαοτροπικών αλάτων και απορρυπαντικών. Η πρωτεϊνάση K αποικοδομεί τις πρωτεΐνες, εξασφαλίζοντας την απομάκρυνσή τους και αποτρέποντας την καταστροφή του DNA από ενδογενείς νουκλεάσες (DNA).. [1]

1.5 Αυτοματοποιημένα Συστήματα Απομόνωσης DNA με Μαγνητικά Σφαιρίδια

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί ρομποτικά συστήματα για την απομόνωση DNA και RNA που χρησιμοποιούν μαγνητικά σφαιρίδια. Αυτά τα συστήματα εκτελούν όλα τα απαραίτητα βήματα αυτόματα, από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την έκλυση του καθαρού γενετικού υλικού.

Πλεονεκτήματα:

- Μειώνεται ο κίνδυνος επιμόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων.

- Σύντομος χρόνος απομόνωσης (30-45 λεπτά για 6-16 δείγματα).
- Ελάχιστη ενασχόληση του χειριστή, καθιστώντας τη διαδικασία πιο αποδοτική.

Μειονεκτήματα:

- Αδυναμία απομόνωσης DNA από πιο δύσκολες πηγές (π.χ. δόντια, τρίχες, βιοψίες σε κύβους παραφίνης).
- Υψηλό κόστος των αντιδραστηρίων και των μηχανημάτων.

Χρήση Μαγνητικών Σφαιριδίων:

- Τα μαγνητικά σφαιρίδια έχουν πυρήνα σιδήρου και επικάλυψη που βοηθά στη δέσμευση των επιθυμητών μορίων.
- Μπορούν να έχουν διάφορες επικαλύψεις, όπως δευτερογενές αντίσωμα, στρεπταβιδίνη ή ουρά πολυ-T, ανάλογα με την εφαρμογή.
- Για απομόνωση DNA, χρησιμοποιούνται σφαιρίδια με επικάλυψη διοξειδίου του πυριτίου, που επιτρέπει ισχυρή πρόσδεση του DNA υπό συνθήκες χαμηλού pH και υψηλής συγκέντρωσης αλάτων.

Τυπικά Βήματα Απομόνωσης:

1. **Τοποθέτηση Δείγματος:** Το δείγμα τοποθετείται σε σωληνάριο μέσα στο μηχανήμα.
2. **Προετοιμασία Αντιδραστηρίων:** Τα αντιδραστήρια (μαγνητικά σωματίδια, διάλυμα λύσης, πλύσης, έκλουσης) αναδεύονται και τοποθετούνται στη σωστή εσοχή. (εικόνα 1.3)
3. **Επιλογή Προγράμματος:** Επιλέγεται το κατάλληλο πρόγραμμα απομόνωσης ανάλογα με τον τύπο του δείγματος.

Τα συστήματα αυτά παρέχουν μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων, κατάλληλη για διάφορες εφαρμογές στη μοριακή βιολογία και γενετική έρευνα.



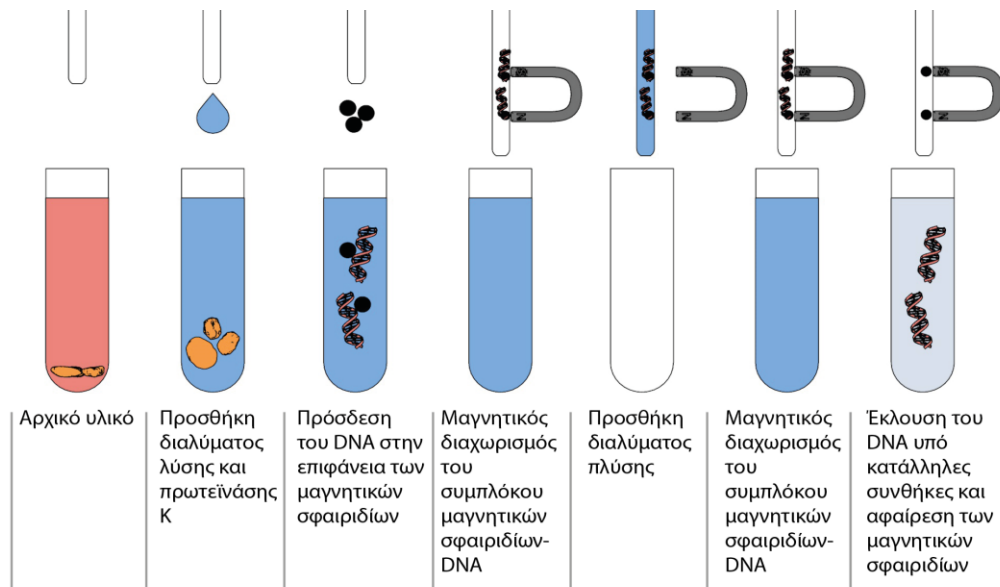
Εικόνα 1.3 Κασέτα με προδιανεμημένα αντιδραστήρια. Η κασέτα περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη διαδικασία απομόνωσης του DNA και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με αυτόματα συστήματα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων [1]

Η διαδικασία απομόνωσης αποτελείται από

- **Λύση Δείγματος:** Το δείγμα αναμιγνύεται με χαστροπικά άλατα και απορρυπαντικό για να σπάσουν οι κυτταρικές μεμβράνες και να ελευθερωθεί το DNA.

- **Δέσμευση DNA:** Εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο για να δεσμεύσει το DNA σε μαγνητικά σωματίδια με επικάλυψη διοξειδίου του πυριτίου.
- **Απομάκρυνση Άχρηστων Στοιχείων:** Τα μη δεσμευμένα κυτταρικά συστατικά απομακρύνονται.
- **Πλύσεις:** Το DNA πλένεται διαδοχικά για να απομακρυνθούν τα άλατα και άλλοι αναστολείς.
- **Έκλυση DNA:** Το καθαρό DNA αποσπάται από τα σωματίδια με ένα ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας.

(εικόνα 4). [1]



Εικόνα 2 Στάδια απομόνωσης γενομικού DNA με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων. Αρχικά πραγματοποιείται λύση του δείγματος παρουσία κατάλληλου διαλύματος και πρωτεΐνάσης K, προστίθενται τα μαγνητικά σφαιρίδια και εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο. Τα μόρια DNA προσροφώνται σε μαγνητικά σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου και τα μη δεσμευμένα κυτταρικά στοιχεία απομακρύνονται. Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις για απομάκρυνση των αλάτων και άλλων αναστολέων και, τέλος, έκλυση του καθαρού DNA σε ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας. [1]

1.5.1 Παράρτημα Β Πρακτικό μέρος Απομόνωση DNA από επιθηλιακά κύτταρα παρειάς

1.6 Επίλογος

Σε αυτό το κεφάλαιο, εξετάσαμε τις διάφορες πηγές απομόνωσης DNA και τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του γενετικού υλικού σε καθαρή μορφή. Αναλύσαμε τη σημασία του DNA στη βιολογική ανάπτυξη και τη δομή του στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, εστιάζοντας στη διαδικασία συμπύκνωσης του DNA με ιστόνες. Περιγράψαμε τις παραδοσιακές μεθόδους απομόνωσης DNA, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των εμπορικών κιτ, καθώς και την τεχνολογία των αυτοματοποιημένων συστημάτων με μαγνητικά σφαιρίδια. Κάθε τεχνική απομόνωσης έχει τα δικά της μοναδικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, αλλά όλες συμβάλλουν σημαντικά στην πρόοδο της μοριακής βιολογίας και της γενετικής έρευνας.

Κεφάλαιο 2ο: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

2.1 Εισαγωγή

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος που επιτρέπει τον εκθετικό πολλαπλασιασμό μικρών ποσοτήτων DNA, χρησιμοποιώντας μια ειδική πολυμεράση που αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως αυτή από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq). Το *Thermus aquaticus* είναι ένα βακτήριο που ζει σε θερμές πηγές και μπορεί να επιβιώνει σε υψηλές θερμοκρασίες.

Στην PCR, χρησιμοποιούνται δύο μικρά κομμάτια συνθετικού DNA που ονομάζονται εκκινητές. Αυτοί οι εκκινητές προσκολλώνται σε συγκεκριμένα σημεία του μορίου DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε. Κάθε εκκινητής προσκολλάται σε έναν από τους δύο κλώνους του δίκλωνου DNA (dsDNA). Οι εκκινητές καθορίζουν την περιοχή του DNA που θα αντιγραφεί.

Η Taq πολυμεράση ξεκινά από τους εκκινητές και προσθέτει διαδοχικά δεσοξυνουκλεοτίδια (τα δομικά στοιχεία του DNA) για να δημιουργήσει νέους κλώνους DNA. Η διαδικασία της PCR συνήθως περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. **Αποδιάταξη:** Το δείγμα θερμαίνεται στους 94 ή 95°C για να διαχωριστούν οι δύο κλώνοι του DNA.
2. **Υβριδοποίηση:** Οι εκκινητές προσκολλώνται στους μονόκλωνους κλώνους DNA σε μια θερμοκρασία που εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία τους.
3. Επιμήκυνση των εκκινητών στους 72° C. [2]

2.2 Ιστορία της PCR

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), που εφευρέθηκε το 1985 από τον Kary B. Mullis, επέτρεψε στους επιστήμονες να δημιουργούν εκατομμύρια αντίγραφα ενός μικρού δείγματος DNA. Αυτή η τεχνική έχει φέρει επανάσταση σε πολλούς τομείς της έρευνας, συμπεριλαμβανομένης της διάγνωσης γενετικών ελαττωμάτων και της ανίχνευσης του ιού του AIDS σε ανθρώπινα κύτταρα. Η PCR χρησιμοποιείται επίσης στην εγκληματολογία για τη σύνδεση ατόμων με δείγματα αίματος ή μαλλιών μέσω σύγκρισης DNA και στις εξελκτικές μελέτες για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων DNA από απολιθώματα που περιέχουν μόνο ίχνη DNA.

Ο Mullis ανέπτυξε την τεχνική PCR ενώ εργαζόταν ως χημικός στην εταιρεία βιοτεχνολογίας Cetus Corporation στην Καλιφόρνια. Η διαδικασία απαιτούσε την απομόνωση της θερμοσταθερής πολυμεράσης Taq από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, επιτρέποντας την επαναλαμβανόμενη θέρμανση και ψύξη του DNA χωρίς την ανάγκη προσθήκης νέας πολυμεράσης σε κάθε κύκλο. Η πρώτη μηχανή θερμοκύκλωσης, "Mr. Cycle", αναπτύχθηκε από τους μηχανικούς της Cetus για να αντιμετωπίσει την ανάγκη για προσθήκη νέου ενζύμου σε κάθε κύκλο θέρμανσης και ψύξης.

Η πολυμεράση Taq αναγνωρίστηκε ευρέως το 1989, όταν το περιοδικό Science την ανακήρυξε "Μόριο της Χρονιάς". Το 1988, η Cetus Corporation εμπορευματοποίησε την τεχνική PCR και άρχισε να λαμβάνει αιτήσεις για άδειες χρήσης για διαγνωστικούς σκοπούς. Το 1989, η Cetus ανακοίνωσε τη συνεργασία της με την Hoffman-LaRoche για την ανάπτυξη και εμπορευματοποίηση προϊόντων και

υπηρεσιών βασισμένων στην τεχνολογία PCR. Τελικά, η Roche Molecular Systems αγόρασε την πατέντα της PCR και την τεχνολογία της από την Cetus για 300 εκατομμύρια δολάρια.

Στην ανάπτυξη της PCR συνέβαλαν σημαντικά επιστήμονες, μηχανικοί και διοικητικά στελέχη από τις εταιρείες Cetus Corporation, Roche Molecular Systems και Perkin-Elmer Corporation. Αυτά τα άτομα είχαν καθοριστικό ρόλο στη βελτίωση και την εμπορευματοποίηση της PCR, καθιστώντας την μια από τις πιο σημαντικές τεχνικές στη μοριακή βιολογία και τη γενετική έρευνα. [3]

2.3 Thermus aquaticus (Taq)

Το *Thermus aquaticus* (Taq) είναι ένα βακτήριο που ανήκει στο γένος *Thermus*. Είναι αερόβιο, θερμόφιλο, Gram-αρνητικό και έχει σχήμα ράβδου. Ανακαλύφθηκε από τον Thomas D. Brock τη δεκαετία του 1960 στις θερμές πηγές του Εθνικού Πάρκου Yellowstone στο Wyoming των ΗΠΑ.

2.3.1 Βασικά Χαρακτηριστικά του Taq:

1. **Θερμόφιλο Βακτήριο:**
 - ο Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες έως 79°C.
2. **Gram-αρνητικό:**
 - ο Είναι ένα βακτήριο με χαρακτηριστικό κυτταρικό τοίχωμα που δεν διατηρεί την κρυσταλλική ιώδη χρώση του Gram test.
3. **Ραβδοειδές Σχήμα:**
 - ο Έχει σχήμα ράβδου.

2.3.2 Ανακάλυψη και Σημασία:

Το *Thermus aquaticus* απομονώθηκε από ουδέτερες έως αλκαλικές θερμές πηγές σε διάφορες γεωγραφικές τοποθεσίες. Η ανακάλυψή του οδήγησε στην απομόνωση αρκετών ειδών του γένους *Thermus* από διάφορα θερμά περιβάλλοντα. Η Taq πολυμεράση από το *Thermus aquaticus* είναι σημαντική για τη μοριακή βιολογία επειδή παραμένει δραστητική σε υψηλές θερμοκρασίες και χρησιμοποιείται στην PCR.

2.3.3 Χρήση της Taq Πολυμεράσης:

Η Taq πολυμεράση επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη θέρμανση και ψύξη κατά τη διάρκεια της PCR χωρίς να καταστρέφεται, κάνοντας την PCR πιο αποτελεσματική.

2.3.4 Χαρακτηριστικά Ανάπτυξης:

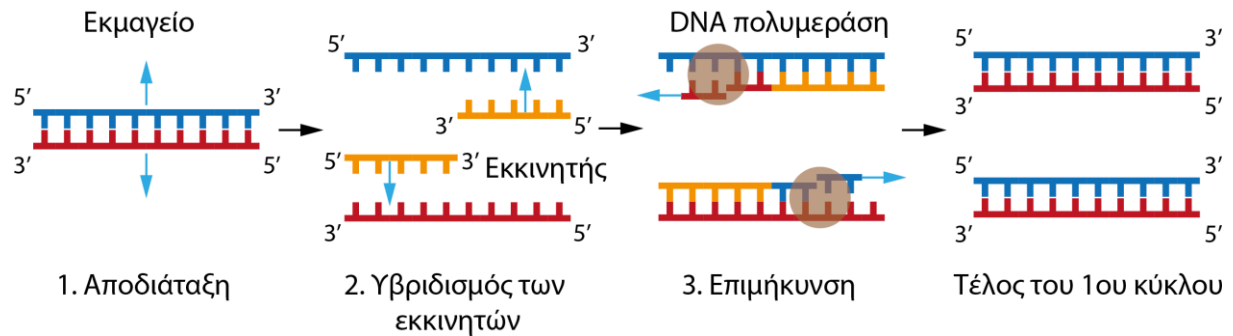
Το Taq βακτήριο αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 50°C έως 79°C. Είναι μη σποριογόνο, μη κινητό και μπορεί να σχηματίσει μακριές νηματοειδείς μορφές. Η δεσοξυριβονουκλεϊκή οξύτητα της σύνθεσης του Taq είναι 65,4-67,4 mol% G+C.

2.3.5 Ταξινόμηση και Μελέτη:

Το *Thermus aquaticus* είναι το πιο μελετημένο και καλά χαρακτηρισμένο είδος του γένους *Thermus*. Χρησιμοποιούνται διάφορες μοριακές τεχνικές για την ταξινόμησή του, όπως ο χαρακτηρισμός του γονιδιακού μακρο-περιοριστικού πολυμορφισμού μήκους θραύσματος (RFLP) και η ηλεκτροφόρηση πεδίου με παλμικό πεδίο (PFGE).

Με βάση το κείμενο, το *Thermus aquaticus* είναι ένα βακτήριο με σημαντική βιοτεχνολογική αξία λόγω της θερμοσταθερής Taq πολυμεράσης του, που είναι κρίσιμη για την PCR και άλλες μοριακές βιολογικές εφαρμογές. [4]

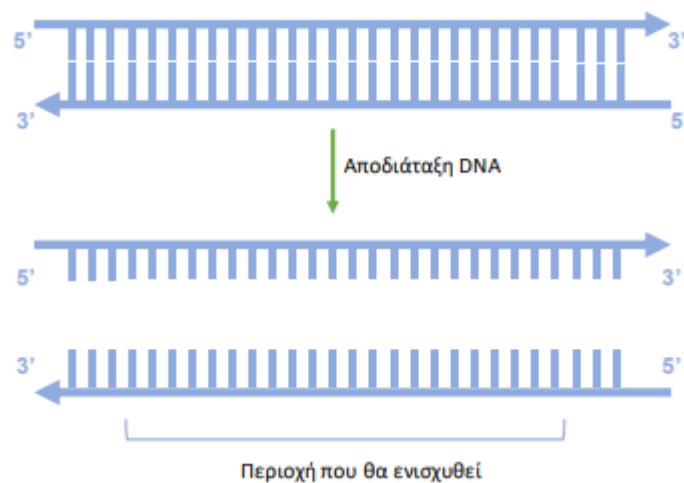
2.4 Στάδια της PCR



Εικόνα 2.1 Τα στάδια της αντίδρασης PCR. [1]

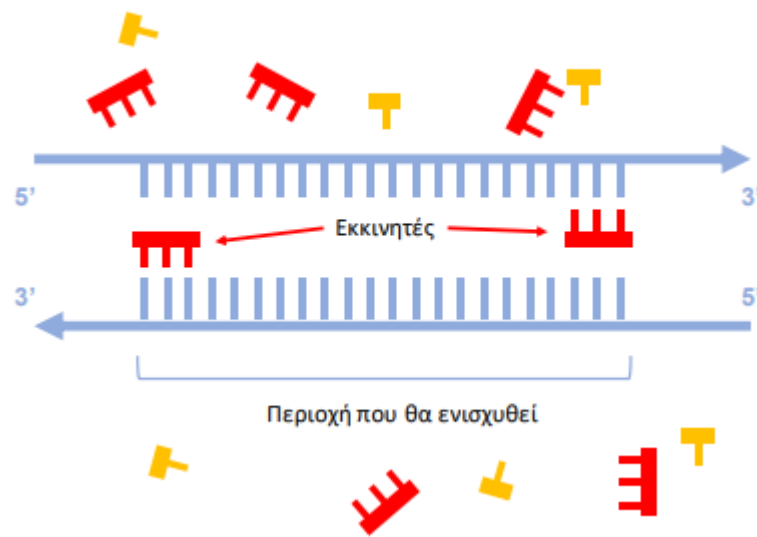
Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά

1. **Αποδιάταξη:** Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (φάση αποδιάταξης, denaturation) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min. (Εικόνα5)



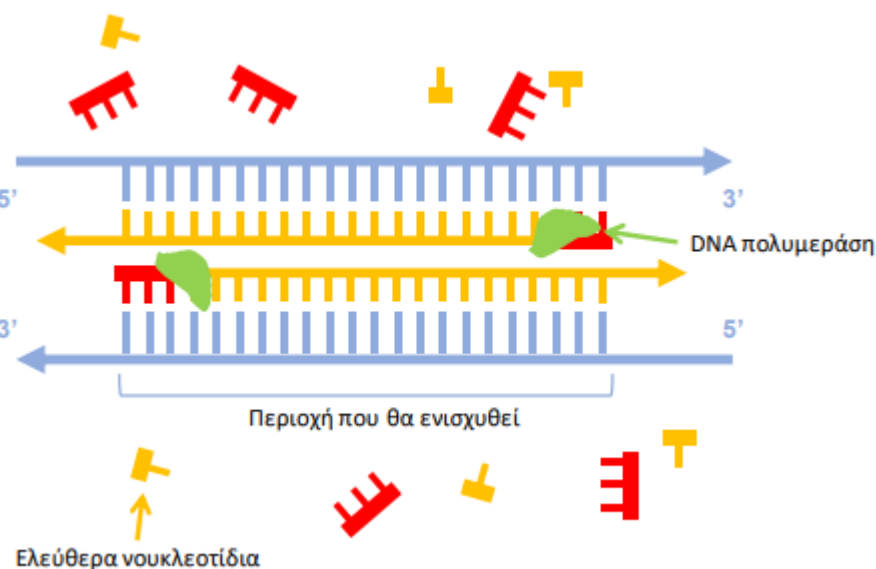
Εικόνα 2.2. Αναδιάταξη DNA [5]

2. **Υβριδισμός εκκινητών:** Με μείωση της θερμοκρασίας στους 50-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.



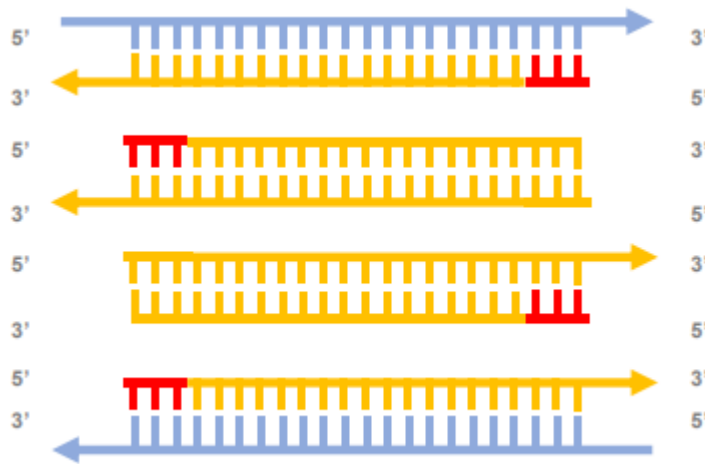
Εικόνα 2.3 Φάση υβριδοποίησης. [5]

3. **Επιμήκυνση:** Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.



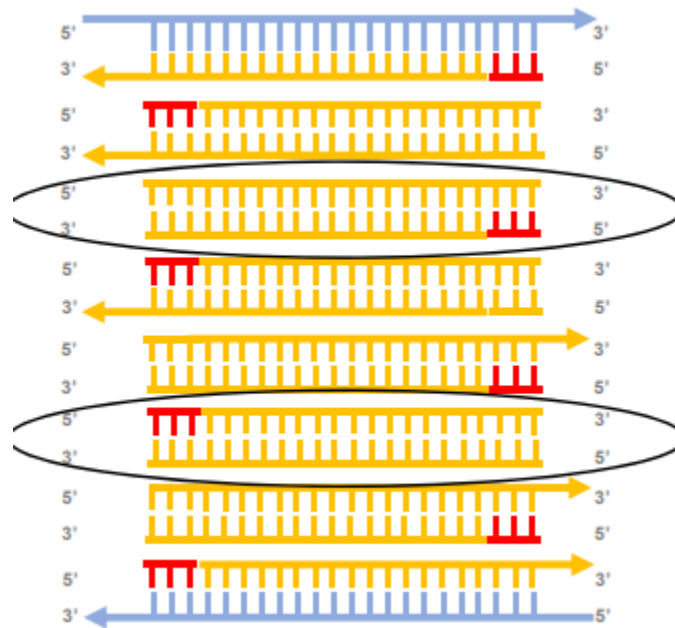
Εικόνα 2.4 Φάση επιμήκυνσης [5]

Μετά από τον δεύτερο κύκλο της PCR αντίδρασης έχουν παραχθεί τέσσερα μόρια DNA που περιέχουν τόσο την περιοχή που μας ενδιαφέρει όσο και γειτονικές



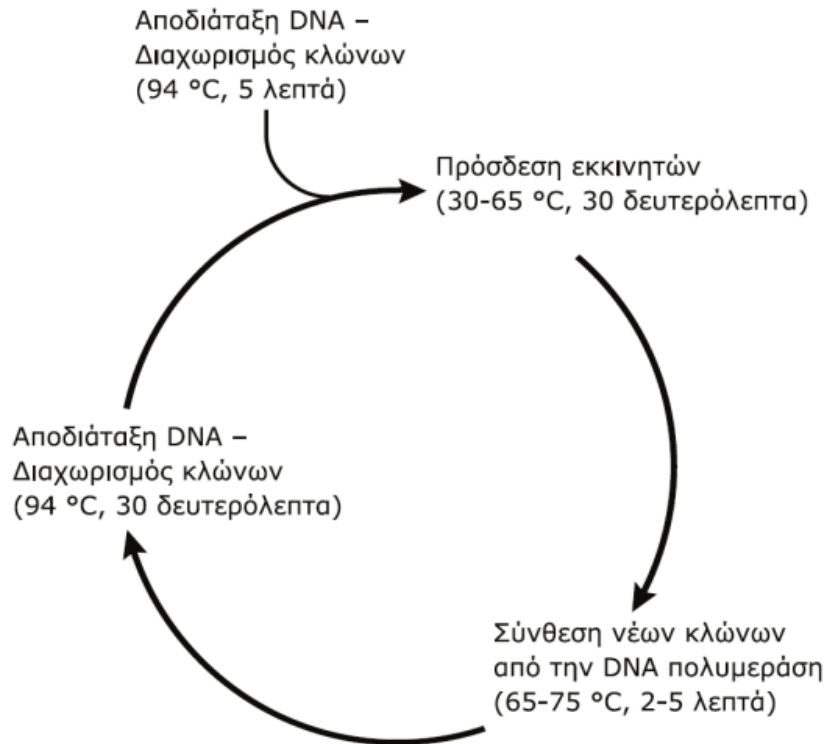
Εικόνα 2.5 [5]

Μετά από τον τρίτο κύκλο της PCR επιτυγχάνεται η παραγωγή των δύο πρώτων τμημάτων DNA που περιέχουν αποκλειστικά την περιοχή που θέλουμε να ενισχύσουμε



Εικόνα 2.6 Μετά τον τρίτο κύκλο της PCR έχουμε την παραγωγή των δύο πρώτων αλληλουχιών-στόχων (κυκλωμένα) [5]

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον **θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler)**, συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους. Ένα τυπικό πρόγραμμα PCR στον θερμικό κυκλοποιητή για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA μεγέθους 500 bp. [1] [5]



Εικόνα 2.7 Ο κύκλος της τεχνικής PCR

2.5 Τα συστατικά της PCR

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

1. DNA πολυμεράση
2. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές
3. Γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος
4. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+}
5. Νουκλεοτίδια (dNTPs) [1]

DNA πολυμεράση

Η DNA πολυμεράση είναι ένα ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς, όπως ευκαρυωτικούς, προκαρυωτικούς και ιούς, και παίζει καθοριστικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA. Δεν μπορεί να δημιουργήσει ένα νέο μόριο DNA από το μηδέν, αλλά μπορεί να αντιγράψει ένα υπάρχον μόριο DNA που χρησιμεύει ως πρότυπο.

Στην PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης), χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* που ζει σε θερμές πηγές. Η Taq πολυμεράση είναι ικανή να λειτουργεί σε υψηλές θερμοκρασίες, με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους $72^{\circ}C$, και δεν καταστρέφεται ακόμα και όταν θερμαίνεται στους $95^{\circ}C$ για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Η Taq πολυμεράση μπορεί να συνθέσει μια νέα αλυσίδα DNA χρησιμοποιώντας ένα μονόκλωνο μόριο DNA ως πρότυπο και έναν εκκινητή ως σημείο εκκίνησης. Η σύνθεση της νέας αλυσίδας γίνεται με κατεύθυνση 5' προς 3'. Με κάθε κύκλο της PCR, η απόδοση και η ακρίβεια της αντιγραφής

μπορεί να μειώνονται, αυξάνοντας τον αριθμό των λαθών που εισάγονται στη νέα αλυσίδα DNA. Η απλή DNA πολυμεράση κάνει περίπου ένα λάθος σε κάθε 100.000 βάσεις.

Υπάρχουν επίσης πολυμεράσες υψηλής πιστότητας, γνωστές ως proofreading πολυμεράσες, οι οποίες έχουν 3'-5' εξωνουκλεάση δραστηριότητα και μπορούν να διορθώσουν τα λάθη που δημιουργούνται κατά τη σύνθεση του DNA. Αυτό μειώνει σημαντικά τον αριθμό των λαθών, καθιστώντας την διαδικασία πιο ακριβή και αξιόπιστη.

Εκκινητές

Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR.

Σχεδιασμός των εκκινητών: Μέγεθος των εκκινητών, Αλληλουχία των εκκινητών, Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών

Γενετικό υλικό (αλληλουχία στόχος)

Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA.

Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και συγκέντρωση Mg²⁺

Το διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα Mg²⁺, που είναι απαραίτητος συμπαραγόντας της DNA πολυμεράσης.

Νουκλεοτίδια

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στα 80-800 μM. [1]

Παράρτημα C Λεπτομέρειες Συστατικών PCR

2.5.1 Διαδικασία Σχεδιασμού Εκκινητών και Ανίχνευσης Πολυμορφισμού στην PCR

1. Σχεδιασμός Εκκινητών:

Σχεδιάζουμε μικρά τμήματα DNA (εκκινητές) που θα βοηθήσουν στην ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος του γονιδίου.

2. Ανάκτηση Αλληλουχίας:

Χρησιμοποιούμε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου από βάση δεδομένων.

3. Επιλογή Τμήματος για Ενίσχυση:

Επιλέγουμε το τμήμα του γονιδίου που θέλουμε να ενισχύσουμε για να ανιχνεύσουμε έναν συγκεκριμένο γενετικό πολυμορφισμό.

4. Αποφυγή Ανεπιθύμητων Θέσεων:

Αποφεύγουμε να ενισχύσουμε περιοχές που περιέχουν ανεπιθύμητες θέσεις αναγνώρισης ενζύμων.

5. Εκτέλεση PCR:

Εκτελούμε την PCR για να ενισχύσουμε το επιλεγμένο τμήμα του DNA.

6. Πέψη PCR Προϊόντος:

Χρησιμοποιούμε ένα ένζυμο για να κόψουμε το ενισχυμένο DNA σε συγκεκριμένα σημεία, ώστε να ανιχνεύσουμε τον πολυμορφισμό.

Με αυτά τα βήματα, μπορούμε να ενισχύσουμε και να αναλύσουμε συγκεκριμένα τμήματα του DNA για να ανιχνεύσουμε γενετικές διαφορές. [1]

2.6 Επίλογος

Στο δεύτερο κεφάλαιο, εξετάσαμε την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), μια τεχνική που έχει φέρει επανάσταση στη μοριακή βιολογία. Αρχικά, αναλύσαμε την ιστορία της PCR, από την ανακάλυψη της θερμοσταθερής Taq πολυμεράσης από το βακτήριο *Thermus aquaticus* στις θερμές πηγές του Εθνικού Πάρκου Yellowstone, μέχρι την εμπορευματοποίηση της τεχνικής και την ευρεία της χρήση στη σύγχρονη έρευνα και διαγνωστική.

Η Taq πολυμεράση είναι θεμελιώδης για την PCR λόγω της ικανότητάς της να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες, επιτρέποντας την επαναλαμβανόμενη θέρμανση και ψύξη κατά τους κύκλους της PCR χωρίς να καταστρέφεται. Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά την PCR εξαιρετικά αποδοτική και αξιόπιστη για την αντιγραφή DNA.

Επιπλέον, αναλύσαμε τη διαδικασία της PCR, η οποία περιλαμβάνει τον σχεδιασμό εκκινητών (primers), την εκτέλεση των κύκλων θερμοκρασίας και τη σημασία της αποφυγής ανεπιθύμητων θέσεων αναγνώρισης ενζύμων. Οι εκκινητές είναι κρίσιμοι για την επιτυχία της PCR και η σωστή τους σχεδίαση, που λαμβάνει υπόψη το μέγεθος, την αλληλουχία και τη θερμοκρασία αποδιάταξης, μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την απόδοση της διαδικασίας.

Στο πρακτικό μέρος της άσκησης, εστίασαμε στον σχεδιασμό των εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου TAS2R38 και την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs1726866. Αυτό το παράδειγμα υπογραμμίζει τη σημασία της PCR για την ανάλυση γενετικών πολυμορφισμών και την κατανόηση της γενετικής βάσης των φαινοτύπων.

Συνοψίζοντας, η PCR είναι ένα αναπόσπαστο εργαλείο στη μοριακή βιολογία που επιτρέπει την ταχεία και ακριβή αντιγραφή DNA, καθιστώντας δυνατές πολλές σύγχρονες τεχνικές και εφαρμογές στη γενετική έρευνα και διάγνωση.

Κεφάλαιο 3ο: Συσκευή PCR

3.1 Εισαγωγή

Σε αυτό το κεφάλαιο, θα ασχοληθούμε με την κατασκευή και τη λειτουργία μιας συσκευής PCR (θερμοκυκλοποιητής). Η PCR είναι μια τεχνική που επιτρέπει την αντιγραφή συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων θέρμανσης και ψύξης.

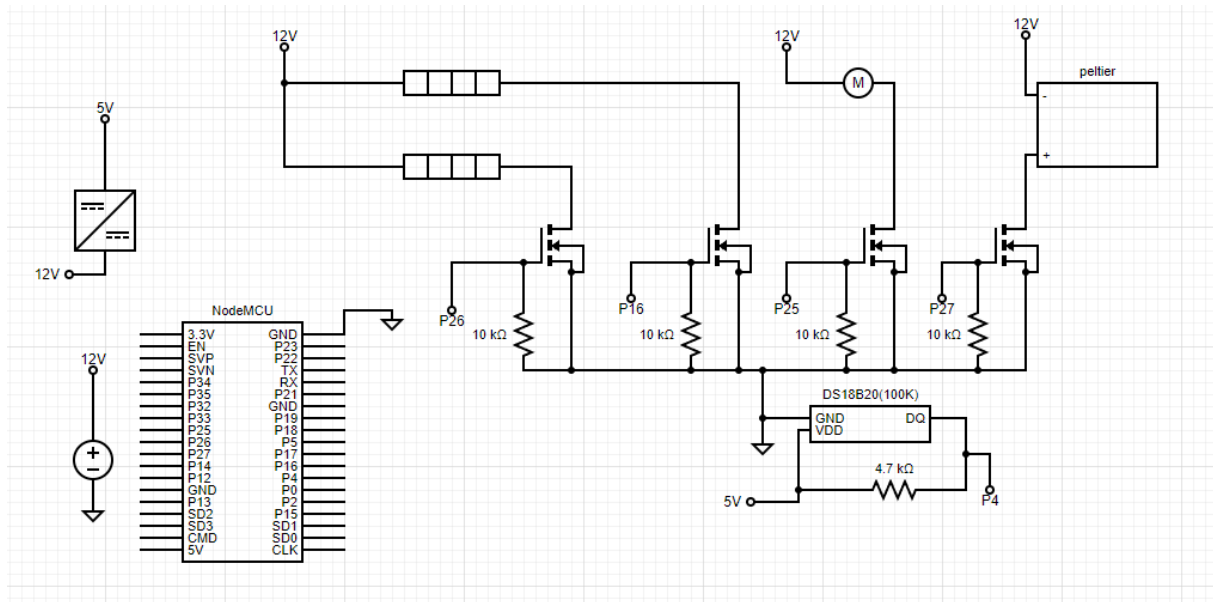
Θα δούμε τα βασικά στοιχεία που αποτελούν μια συσκευή PCR, τα υλικά και τα εξαρτήματα που χρειάζονται, καθώς και τα βήματα για την κατασκευή της. Θα αναλύσουμε επίσης πώς λειτουργεί η συσκευή και πώς μπορούμε να ελέγχουμε τις θερμοκρασίες και τους χρόνους κάθε κύκλου.

Με την ολοκλήρωση αυτού του κεφαλαίου, θα είμαστε σε θέση να κατασκευάσουμε και να χρησιμοποιήσουμε μια απλή και λειτουργική συσκευή PCR για την αντιγραφή DNA σε ένα εργαστήριο.

3.2 Κύκλωμα ελέγχου θερμοκρασίας

Η συσκευή PCR (Polymerase Chain Reaction) ελέγχει με ακρίβεια τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πολλαπλασιασμού του DNA. Θα χρησιμοποιήσουμε έναν μικροελεγκτή ESP32 και θα το συνδυάσουμε

- **Πληκτρολόγιο (Keypad):** Επιτρέπει στον χρήστη να ρυθμίσει επιθυμητές θερμοκρασίες, διάρκεια φάσεων και επαναλήψεις.
- **Οθόνη LCD:** Εμφανίζει την τρέχουσα θερμοκρασία, την επιθυμητή θερμοκρασία και άλλες πληροφορίες.
- **Αισθητήρας Θερμοκρασίας (Dallas Temperature Sensor):** Μετρά την τρέχουσα θερμοκρασία του συστήματος.
- **Στοιχεία Θέρμανσης/Ψύξης (Heater/Peltier):** Χρησιμοποιούνται για την προσαρμογή της θερμοκρασίας.
- **Αλγόριθμος PID (Proportional-Integral-Derivative):** Βελτιώνει την ακρίβεια και τη σταθερότητα του ελέγχου θερμοκρασίας.

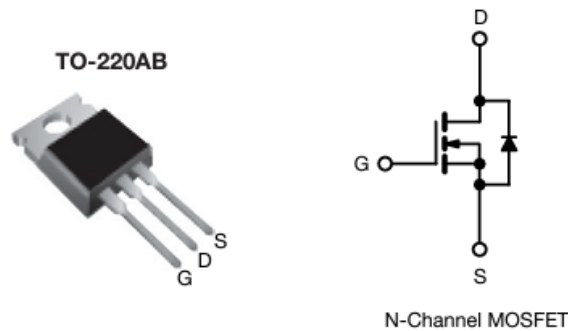


Σχήμα 1

3.3 Υλικά και εξαρτήματα για την Κατασκευή Συσκευής PCR

3.3.1 Χρήση MOSFET για Έλεγχο Θέρμανσης και Ψύξης

Θα χρησιμοποιηθούν τα mosfet IRLB8743 για ψύξη και το IRLZ44 για θέρμανση είναι και τα δύο N-Channel MOSFETs, έχουν υψηλή απόδοση και χαμηλή αντίσταση κατά την κατάσταση λειτουργίας. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διάφορες εφαρμογές όπως η ψύξη και η θέρμανση σε κυκλώματα ισχύος.



Εικόνα 3.1 [6]

Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικά του IRLZ44 στους 25°C [6]

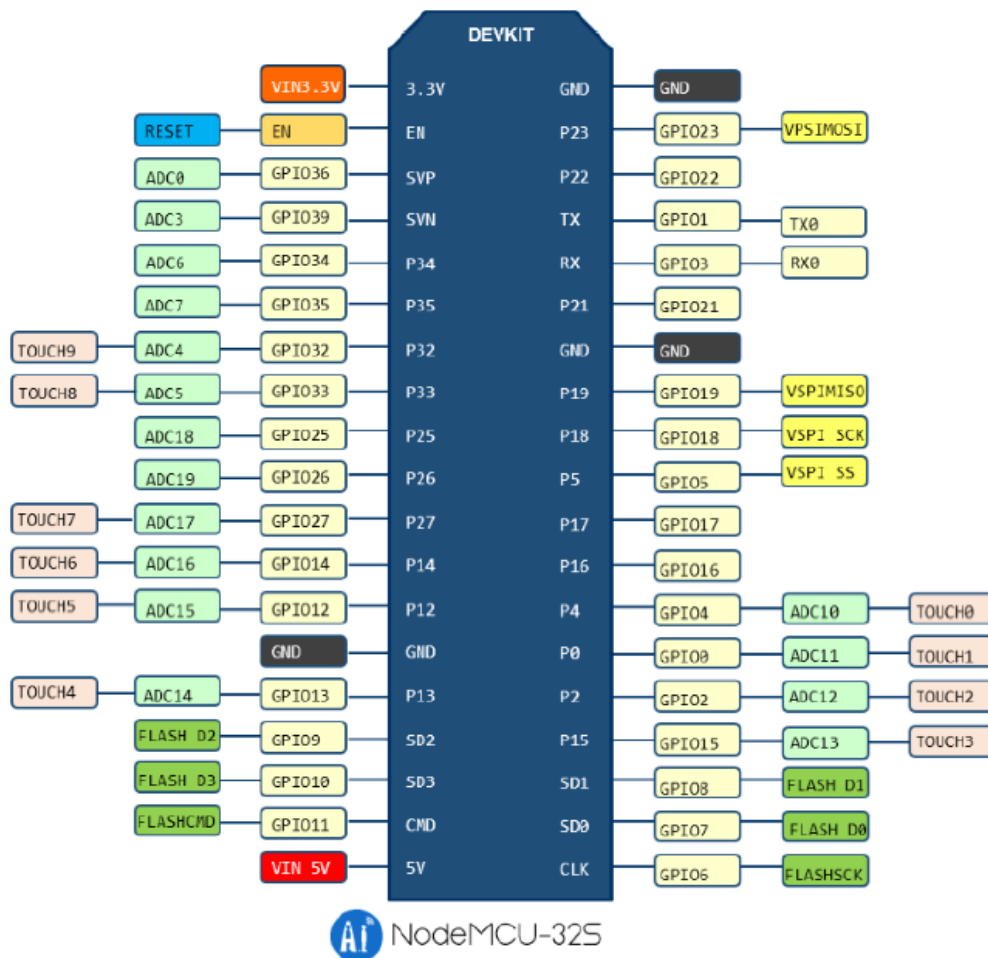
V _{ds}	Μέγιστη Τάση Drain-Source	60V
I _d	Μέγιστο Ρεύμα Drain	50A
R _{ds(on)}	Αντίσταση Ενεργοποίησης	0.028 Ω
V _{gs(th)}	Τάση Κατωφλίου Πύλης	1.0V έως 2.0V
P _{max}	Μέγιστη Ισχύς Διάχυσης	150W

Πίνακας 3.2: Χαρακτηριστικά του IRLB8743 στους 25°C [7]

V _{ds}	Μέγιστη Τάση Drain-Source	30V
I _d	Μέγιστο Ρεύμα Drain	78A
R _{ds(on)}	Αντίσταση Ενεργοποίησης	0.0032 Ω
V _{gs(th)}	Τάση Κατωφλίου Πύλης	1.35V έως 2.35V
P _{max}	Μέγιστη Ισχύς Διάχυσης	140W

3.3.2 Nodemcu-32s

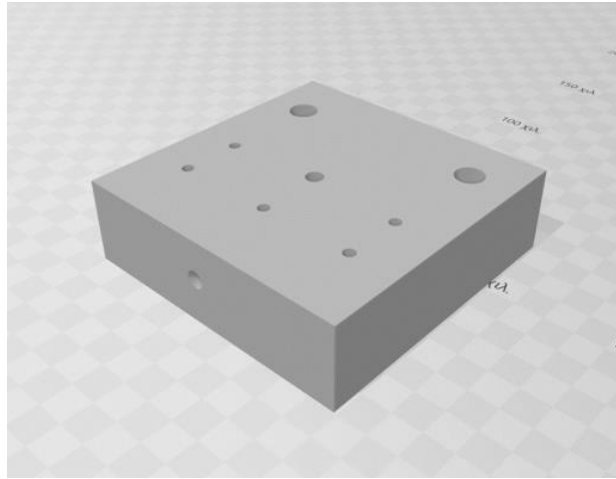
Το ESP32 είναι ένας ισχυρός μικροελεγκτής με ενσωματωμένο Wi-Fi και Bluetooth, σχεδιασμένος από την Espressif Systems. Διαθέτει δύο πυρήνες CPU που λειτουργούν ανεξάρτητα με ρυθμιζόμενη συχνότητα από 80 MHz έως 240 MHz. Υποστηρίζει Wi-Fi και Bluetooth Low Energy (BLE), καθιστώντας το ιδανικό για εφαρμογές IoT. Προσφέρει υψηλή απόδοση με ταχύτητες μετάδοσης δεδομένων έως 150 Mbps και ισχύ εξόδου κεραίας 20 dBm. Το ESP32 είναι ευέλικτο, με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, και χρησιμοποιείται σε έξυπνα σίτια, φορητές συσκευές, βιομηχανικό αυτοματισμό και προσωπικά έργα DIY.



Εικόνα 3. 2 Το Nodemcu-32s διαθέτει συνολικά 38 ακίδες [8]

3.3.3 Πλακέτα Θερμαντικής Επιφάνεια

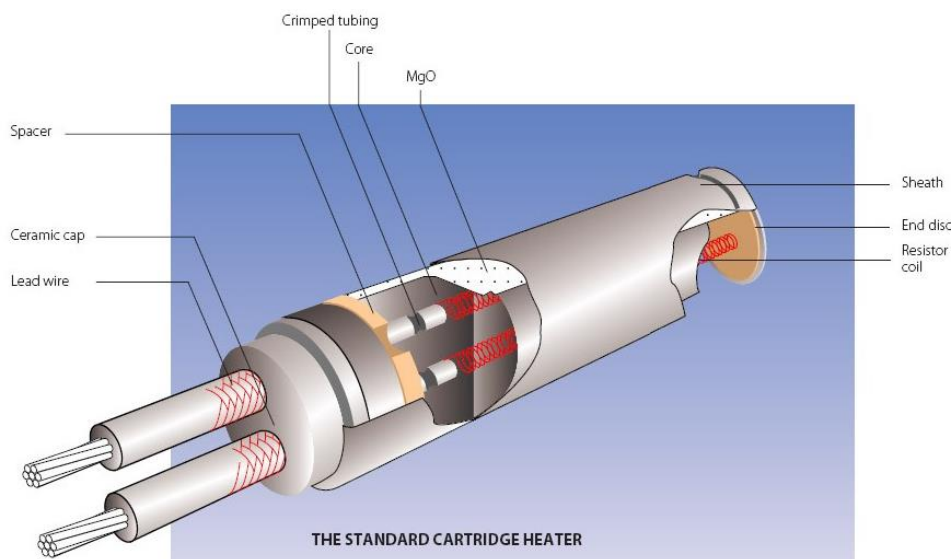
Πρόκειται για μια επίπεδη επιφάνεια κατασκευασμένη από αλουμίνιο. Χρησιμοποιείται για τη θέρμανση των δειγμάτων DNA κατά τη διάρκεια της PCR. Το αλουμίνιο επιλέγεται λόγω της εξαιρετικής θερμικής αγωγιμότητάς του, που επιτρέπει την ομοιόμορφη κατανομή της θερμότητας σε όλη την επιφάνεια. Η θέρμανση της αλουμινένιας επιφάνειας επιτυγχάνεται μέσω ενσωματωμένων θερμαντικών στοιχείων, όπως αντιστάσεις, που θερμαίνονται όταν διαπερνά ρεύμα. Αυτή η ομοιόμορφη θέρμανση είναι κρίσιμη για την αποδιάταξη του DNA και την υβριδοποίηση των εκκινητών, διασφαλίζοντας ότι όλα τα δείγματα θερμαίνονται και ψύχονται με τον ίδιο ρυθμό.



Εικόνα 3.3 3D σχέδιο της Θερμαντικής Επιφάνεια 10x10x3 cm με 5 θέσεις για σωλήνα χωρητικότητας 0,2ml και 2 θέσεις για σωλήνα χωρητικότητας 0,5ml

3.3.4 Θερμαντικά στοιχεία

Δυο κεραμικά θερμαντικά στοιχεία τύπου κασέτας (Ceramic Cartridge Heater) των 12v και 40W. Το κεραμικό θερμαντικό στοιχείο λειτουργεί με τάση 12V και ισχύ 40W. Όταν διαπερνά ρεύμα, το στοιχείο θερμαίνεται και, μέσω της αλουμινένιας επιφάνειας, μεταδίδει ομοιόμορφα τη θερμότητα στα δείγματα DNA. Αυτό επιτρέπει την επίτευξη των υψηλών θερμοκρασιών που απαιτούνται για την αποδιάταξη των κλώνων DNA κατά τη διάρκεια της PCR.

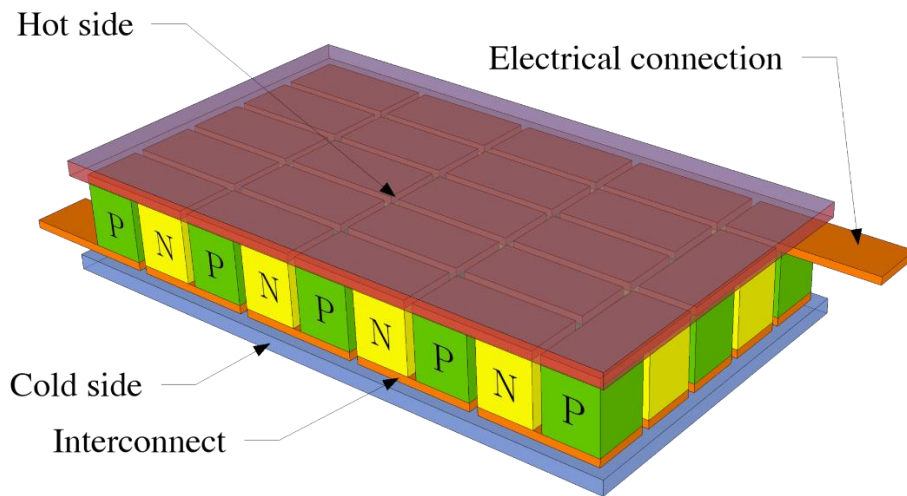


Εικόνα 3. 1 Η εσωτερική δομή ενός κεραμικού θερμαντικού στοιχείου τύπου κασέτας (Cartridge Heater) [9]

3.3.5 Ψύξη με Στοιχείο Peltier και Ανεμιστήρα

Το στοιχείο Peltier, γνωστό και ως θερμοηλεκτρικός ψύκτης, χρησιμοποιεί το φαινόμενο Peltier για να δημιουργήσει ροή θερμότητας στην ένωση δύο διαφορετικών υλικών. Είναι μια συσκευή που μεταφέρει θερμότητα από τη μία πλευρά στην άλλη, καταναλώνοντας ηλεκτρική ενέργεια, ανάλογα

με την κατεύθυνση του ρεύματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ψύξη ή θέρμανση, αν και η κύρια εφαρμογή του είναι η ψύξη.



Εικόνα 3.2.1 Στο επάνω και στο κάτω μέρος χρησιμοποιούνται μονωτικοί διανομείς θερμότητας και θεωρείται ότι συνδέονται με δεξαμενές θερμότητας και κρύου, αντίστοιχα. Φαίνονται ημιδιαφανείς. Τα θερμοηλεκτρικά υλικά τύπου P και n στοιβάζονται ηλεκτρικά σε σειρά και θερμικά παράλληλα. [10]



Εικόνα 3.2.2 Ψύξη θερμικής επιφάνειας του στοιχείου peltier με ψήκτρα και ανεμιστήρα.

Κατασκευή του Στοιχείου Peltier

Το στοιχείο Peltier αποτελείται από:

1. Ημιαγωγούς:

- Δύο διαφορετικούς τύπους ημιαγωγών, έναν τύπου n και έναν τύπου p, που έχουν διαφορετικές πυκνότητες ηλεκτρονίων. Οι ημιαγωγοί είναι τοποθετημένοι θερμικά παράλληλα και ηλεκτρικά σε σειρά.

2. Θερμοηλεκτρικά Στοιχεία:

- Οι εναλλασσόμενοι τύποι ημιαγωγών τοποθετούνται σε σειρά και συνδέονται με δύο θερμικά αγωγίμες πλάκες, συνήθως από κεραμικό υλικό, για να εξασφαλίσουν θερμική αγωγιμότητα και ηλεκτρική μόνωση.

3. Θερμοηλεκτρική Δομή:

- Όταν εφαρμόζεται τάση στις άκρες των ημιαγωγών, δημιουργείται ροή συνεχούς ρεύματος μέσω των ενώσεων των ημιαγωγών, προκαλώντας διαφορά θερμοκρασίας. Η πλευρά με την ψυχρή πλάκα απορροφά θερμότητα, η οποία μεταφέρεται μέσω των ημιαγωγών στην άλλη πλευρά της συσκευής.

Συνολική Λειτουργία

1. Ψυχρή Πλευρά:

- Το στοιχείο Peltier απορροφά θερμότητα από τα δείγματα DNA μέσω της ψυχρής πλευράς, ψύχοντας τα δείγματα.

2. Θερμή Πλευρά:

- Η θερμότητα που απορροφάται μεταφέρεται στην θερμή πλευρά και αποβάλλεται στο περιβάλλον μέσω της ψύκτρας και του ανεμιστήρα.

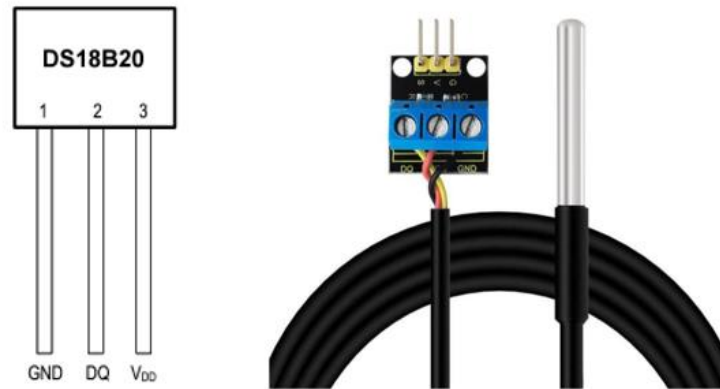
Με αυτή τη ρύθμιση, εξασφαλίζεται η αποτελεσματική ψύξη των δειγμάτων DNA στη συσκευή PCR, επιτρέποντας την ακριβή και γρήγορη εναλλαγή θερμοκρασιών που απαιτείται για την διαδικασία της PCR. [10]

Πίνακας 3.2: Thermoelectric Cooler - 40x40mm [9]

I _{max}	7A
V _{max}	15,4V
R	1,7Ω
Max Operating Temp	70°C
Min Operating Temp	-30°C

3.3.6 Αισθητήρες Θερμοκρασίας DS18B20

Ο αισθητήρας θερμοκρασίας DS18B20 είναι ένας ψηφιακός αισθητήρας που παρέχει ακριβείς μετρήσεις θερμοκρασίας σε εύρος από -55°C έως +125°C. Χρησιμοποιεί το πρωτόκολλο 1-Wire, επιτρέποντας τη σύνδεση πολλών αισθητήρων στην ίδια γραμμή δεδομένων. Απαιτεί μια εξωτερική αντίσταση pull-up (4.7kΩ) για τη σταθερή λειτουργία του. Ο DS18B20 είναι αξιόπιστος, εύχρηστος και προσφέρει ακρίβεια ±0.5°C στην περιοχή από -10°C έως +85°C.



Εικόνα 3. 3 [11]

3.3.7 Φιαλίδια φυγοκέντρισης(Vials)

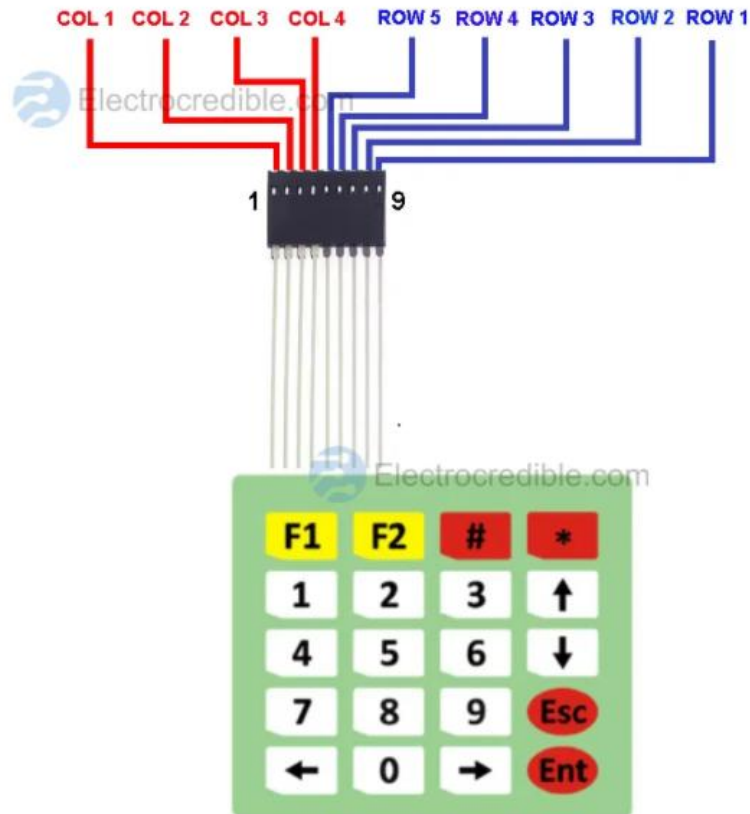
Ο σωλήνας φυγοκέντρισης Eppendorf είναι ένας σωλήνας μιας χρήσης κατασκευασμένος από προπυλένιο, σχεδιασμένος για ανάμιξη, φυγοκέντριση, μεταφορά και αποθήκευση τόσο υγρών όσο και στερεών δειγμάτων και αντιδραστηρίων.



Εικόνα 3.4 [12]Τα vials με υδρατμούς λόγω της θέρμανσης της μεταλλικής πλάκας

3.3.8 Keypad 4x5 Matrix Thin

Το πληκτρολόγιο λειτουργεί με τη μέθοδο "σάρωσης γραμμών και στηλών". Ο μικροελεγκτής στέλνει σήμα στις στήλες και διαβάζει τις γραμμές για να ανιχνεύσει ποιο πλήκτρο έχει πατηθεί. Όταν πατηθεί ένα πλήκτρο, η σύνδεση της αντίστοιχης στήλης και γραμμής επιτρέπει την ανίχνευση του πατημένου πλήκτρου.



Εικόνα 3. 5 Η εικόνα απεικονίζει τη συνδεσμολογία ενός πληκτρολογίου μεμβράνης 4x5 [13]

3.3.9 Οθόνη lcd 16x2 διεπαφή IIC/I2C/TWI/SPI

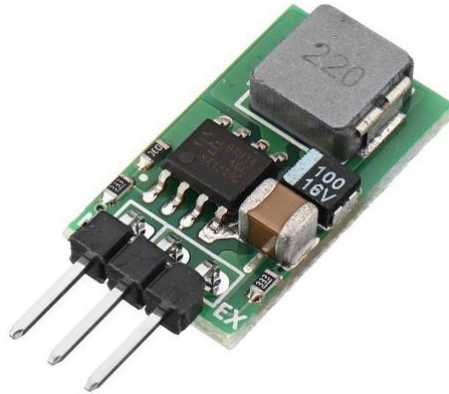
Η οθόνη 16x2 Character LCD Display Module με διασύνδεση IIC/I2C/TWI/SPI εμφανίζει 16 χαρακτήρες σε δύο σειρές. Διαθέτει LED οπισθοφωτισμό και είναι εύκολη στη σύνδεση και προγραμματισμό, καταναλώνοντας ελάχιστη ενέργεια.



Εικόνα 3. 6 [9]

3.3.10 DC-DC Converter Step-Down 5V 1A

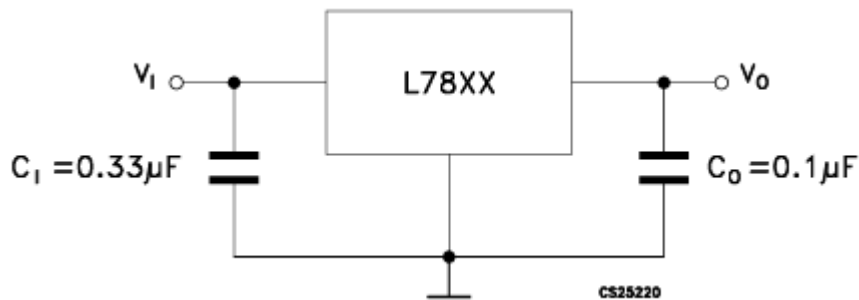
Ο DC-DC synchronous rectification step-down module είναι ένας υψηλής απόδοσης μετατροπέας τάσης με χαμηλή παραγωγή θερμότητας. Μπορεί να δεχτεί είσοδο από 5.5V έως 32V DC και παρέχει σταθερή έξοδο 5V με ρεύμα 1A. Είναι σχεδιασμένος για μακροχρόνια χρήση χωρίς ανάγκη πρόσθετης ψύξης και είναι συμβατός με τους ακροδέκτες του ρυθμιστή τάσης LM7805, επιτρέποντας την άμεση αντικατάστασή του.



Εικόνα 3. 7 [9]

3.3.11 Γραμμικός Ρυθμιστής Τάσης L7805CV

Ο L7805CV είναι ένας γραμμικός ρυθμιστής τάσης που παρέχει σταθερή έξοδο 5V και μέγιστο ρεύμα 1.5A. Είναι γνωστός για την αξιοπιστία του, την προστασία από υπερθέρμανση, υπερρεύμα και βραχυκύκλωμα, και την εύκολη χρήση του. Θα χρησιμοποιηθεί για την τροφοδοσία του μικροελεγκτή και της οθόνης LCD



Εικόνα 4.11 [14]

3.3.12 Power Supply Industrial 12V 20A 240W - SN-HS-240-12

Το τροφοδοτικό παρέχει σταθερή τάση 12V με ρεύμα έως 20A, προσφέροντας συνολική ισχύ 240W. Διαθέτει προστασία από υπερφόρτωση, υπερβολική τάση και βραχυκύκλωμα, εξασφαλίζοντας την ασφαλή λειτουργία των συνδεδεμένων συσκευών. Το συμπαγές και ανθεκτικό του περίβλημα το

καθιστά κατάλληλο για εγκατάσταση σε διάφορα περιβάλλοντα, διασφαλίζοντας αξιόπιστη και σταθερή τροφοδοσία.



Εικόνα 3.12 [9]

3.4 Κώδικας σε γλώσσα C++ για την πλακέτα ESP32 μέσω της πλατφόρμας Arduino IDE

Το πρόγραμμα διαχειρίζεται ένα σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας χρησιμοποιώντας έναν θερμαντήρα και ένα ψυκτικό στοιχείο Peltier. Ο έλεγχος θερμοκρασίας πραγματοποιείται μέσω ενός PID ελεγκτή. Ο κώδικας περιλαμβάνει επίσης τη διασύνδεση με πληκτρολόγιο και οθόνη LCD για την εισαγωγή και εμφάνιση δεδομένων.

Κεφάλαιο 3

```
1 #include <Wire.h>
2 #include <LiquidCrystal_I2C.h>
3 #include <Keypad.h>
4 #include <OneWire.h>
5 #include <DallasTemperature.h>
6
7 // Ορισμός των pins για τα GPIO
8 #define HEATER_PIN 16
9 #define PELTIER_PIN 25
10 #define HEATER_PIN_2 26
11 #define PELTIER_PIN_2 27
12 #define SENSOR_PIN 4
13
14 OneWire oneWire(SENSOR_PIN);
15 DallasTemperature sensors(&oneWire);
16
17 // Ρύθμιση PID
18 double input, output, setpoint;
19 double Kp = 70, Ki = 2, Kd = 20;
20 double errorSum = 0, lastError = 0;
21 unsigned long lastTime;
22 unsigned long startTime; // Χρονικό σημείο έναρξης κάθε φάσης
23 int phase = 0; // Φάση του προγράμματος θερμοκρασίας
24 const int maxIntegral = 1000;
25
26 // Ρύθμιση πληκτρολογίου 5x4
27 const byte ROWS = 5; // πέντε σειρές
28 const byte COLS = 4; // τέσσερις στήλες
29
30 char keys[ROWS][COLS] = {
31     {'F', 'E', '#', '*'},
32     {'1', '2', '3', 'U'},
33     {'4', '5', '6', 'D'},
34     {'7', '8', '9', 'L'},
35     {'B', '0', 'A', 'R'}
36 };
37
38 // Σύνδεση pins του πληκτρολογίου με την ESP32
39 byte rowPins[ROWS] = {18, 5, 17, 32, 33}; // Συνδέσεις γραμμών
40 byte colPins[COLS] = {0, 2, 15, 13}; // Συνδέσεις στηλών
41
```

```

41
42 Keypad keypad = Keypad(makeKeymap(keys), rowPins, colPins, ROWS, COLS);
43 LiquidCrystal_I2C lcd(0x27, 16, 2); // Δημιουργία αντικειμένου LCD με διεύθυνση 0x27
44
45 enum State {MAIN_MENU, SET_TEMP, SET_TIME, SET_REPEATS, RUNNING, STOPPED, NOT_CONFIGURED, SET_DEFAULT, PHASE_MENU};
46 State currentState = NOT_CONFIGURED;
47
48 int repeats = 0;
49 unsigned long programDuration = 0;
50 bool programRunning = false;
51 bool phaseStarted = false;
52 unsigned long durations[3] = {0, 0, 0};
53 double temperatures[3] = {0.0, 0.0, 0.0};
54 int menuIndex = 0;
55 int stageIndex = 0;
56 char mode = '\0';
57
58 void setup() {
59     Serial.begin(115200);
60     sensors.begin();
61     pinMode(HEATER_PIN, OUTPUT);
62     pinMode(PELTIER_PIN, OUTPUT);
63     pinMode(HEATER_PIN_2, OUTPUT);
64     pinMode(PELTIER_PIN_2, OUTPUT);
65
66     lcd.init();
67     lcd.backlight();
68
69     input = sensors.getTempCByIndex(0);
70     setpoint = temperatures[0]; // Αρχική επιθυμητή θερμοκρασία
71     lastTime = millis();
72     startTime = lastTime;
73
74     showInitialSetupMessage();
75 }
76
77 void computePID() {
78     unsigned long now = millis();
79     unsigned long timeChange = (now - lastTime);
80

```

```
80
81 if (timeChange >= 500) { // Ανανέωση κάθε 0,5 δευτερόλεπτο
82     sensors.requestTemperatures();
83     input = sensors.getTempCByIndex(0);
84
85     double error = setpoint - input;
86     errorSum += error * timeChange;
87     errorSum = constrain(errorSum, -maxIntegral, maxIntegral);
88
89     double dError = (error - lastError) / timeChange;
90
91     output = Kp * error + Ki * errorSum + Kd * dError;
92
93     output = constrain(output, 0, 255);
94
95     lastError = error;
96     lastTime = now;
97 }
98 }
99
100 void controlTemperature() {
101     computePID();
102     if (input < setpoint) {
103         analogWrite(HEATER_PIN, output);
104         analogWrite(HEATER_PIN_2, output);
105         analogWrite(PELTIER_PIN, 0);
106         analogWrite(PELTIER_PIN_2, 0);
107     } else {
108         analogWrite(HEATER_PIN, 0);
109         analogWrite(HEATER_PIN_2, 0);
110         int coolingOutput = max(100, 255 - int(output));
111         analogWrite(PELTIER_PIN, coolingOutput);
112         analogWrite(PELTIER_PIN_2, coolingOutput);
113     }
114 }
115
116 void loop() {
117     char key = keypad.getKey();
118     if (key) {
119         handleKey(key);
120     }
121 }
```

```
121
122   if (programRunning) {
123       if (!phaseStarted) {
124           if (abs(input - setpoint) <= 1) {
125               phaseStarted = true;
126               startTime = millis();
127           }
128       } else {
129           unsigned long currentDuration = millis() - startTime;
130
131           if (currentDuration >= durations[phase]) {
132               phase++;
133               if (phase >= 3) {
134                   phase = 0;
135                   repeats--;
136                   if (repeats <= 0) {
137                       programRunning = false;
138                       currentState = MAIN_MENU;
139                       showMainMenu();
140                       return;
141                   }
142               }
143               setpoint = temperatures[phase];
144               phaseStarted = false;
145           }
146       }
147
148       controlTemperature();
149       Serial.print("Current Temp: ");
150       Serial.print(input);
151       Serial.print(" C, Setpoint: ");
152       Serial.print(setpoint);
153       Serial.print(" C, Output: ");
154       Serial.println(output);
155
```

```

155
156     lcd.setCursor(0, 0);
157     lcd.print("Temp: ");
158     lcd.print(input);
159     lcd.print("C ");
160     lcd.setCursor(0, 1);
161     lcd.print("Set: ");
162     lcd.print(setpoint);
163     lcd.print("C ");
164     delay(1000);
165 }
166 }
167 void handleKey(char key) {
168     static String inputString = "";
169
170     if (currentState == NOT_CONFIGURED) {
171         if (key == '#') {
172             currentState = SET_TEMP;
173             showSetTempMenu();
174         }
175         return;
176     }
177     if (key >= '0' && key <= '9') {
178         inputString += key;
179         lcd.setCursor(0, 1);
180         lcd.print(inputString);
181     } else if (key == '#') {
182         if (inputString.length() > 0) {
183             double value = inputString.toDouble();
184             if (currentState == SET_TEMP) {
185                 temperatures[stageIndex] = value;
186                 Serial.print("Temperature for Phase ");
187                 Serial.print(stageIndex + 1);
188                 Serial.print(" set to: ");
189                 Serial.println(temperatures[stageIndex]);
190                 stageIndex++;
191                 if (stageIndex >= 3) {
192                     currentState = SET_TIME;
193                     stageIndex = 0;
194                     showSetTimeMenu();
195                 } else {
196                     showSetTempMenu();

```

```

196     | showSetTempMenu();
197     | }
198   } else if (currentState == SET_TIME) {
199     durations[stageIndex] = value * 1000;
200     Serial.print("Time for Phase ");
201     Serial.print(stageIndex + 1);
202     Serial.print(" set to: ");
203     Serial.println(value);
204     stageIndex++;
205     if (stageIndex >= 3) {
206       currentState = SET_REPEATS;
207       showSetRepeatsMenu();
208     } else {
209       showSetTimeMenu();
210     }
211   } else if (currentState == SET_REPEATS) {
212     repeats = value;
213     Serial.print("Repeats set to: ");
214     Serial.println(repeats);
215     currentState = MAIN_MENU;
216     showMainMenu();
217   }
218   inputString = "";
219 }
220 } else if (key == '*') {
221   if (inputString.length() > 0) {
222     inputString.remove(inputString.length() - 1);
223     lcd.setCursor(0, 1);
224     lcd.print(inputString);
225     lcd.print(" ");
226   } else {
227     inputString = "0";
228     lcd.setCursor(0, 1);
229     lcd.print("0 ");
230   }
231 } else if (key == 'A') {
232   if (currentState == SET_TEMP || currentState == SET_TIME) {
233     stageIndex = (stageIndex + 1) % 3;
234     if (currentState == SET_TEMP) {
235       showSetTempMenu();
236     } else {
237       showSetTimeMenu();
238     }

```

```
238     |   }
239     |   }
240 } else if (key == 'B') {
241     |   if (currentState == SET_TEMP || currentState == SET_TIME) {
242     |       |   stageIndex = (stageIndex - 1 + 3) % 3;
243     |       |   if (currentState == SET_TEMP) {
244     |       |       |   showSetTempMenu();
245     |       |       |   } else {
246     |       |       |   showSetTimeMenu();
247     |       |       |   }
248     |       |   }
249 } else if (key == 'U') {
250     |   if (currentState == SET_TEMP) {
251     |       |   currentState = SET_TIME;
252     |       |   showSetTimeMenu();
253     |   } else if (currentState == SET_TIME) {
254     |       |   currentState = SET_REPEATS;
255     |       |   showSetRepeatsMenu();
256     |   } else if (currentState == SET_REPEATS) {
257     |       |   currentState = SET_TEMP;
258     |       |   showSetTempMenu();
259     |   }
260 } else if (key == 'D') {
261     |   if (currentState == SET_TEMP) {
262     |       |   currentState = SET_REPEATS;
263     |       |   showSetRepeatsMenu();
264     |   } else if (currentState == SET_REPEATS) {
265     |       |   currentState = SET_TIME;
266     |       |   showSetTimeMenu();
267     |   } else if (currentState == SET_TIME) {
268     |       |   currentState = SET_TEMP;
269     |       |   showSetTempMenu();
270     |   }
271 } else if (key == 'R' && currentState == MAIN_MENU) {
272     |   startProgram();
273 } else if (key == 'L') {
274     |   stopAndResetProgram();
275 }
276 }
277 }
```

```

315 }
316
317 void startProgram() {
318     if (temperatures[0] == 0.0 || durations[0] == 0 || repeats == 0) {
319         showInitialSetupMessage();
320         return;
321     }
322     programRunning = true;
323     currentState = RUNNING;
324     phase = 0;
325     startTime = millis();
326     setpoint = temperatures[phase];
327     phaseStarted = false;
328     Serial.println("Program started");
329     lcd.clear();
330     lcd.print("Program started");
331 }
332
333 void stopAndResetProgram() {
334     programRunning = false;
335     currentState = NOT_CONFIGURED;
336     phase = 0;
337     repeats = 0;
338     for (int i = 0; 3; i++) {
339         durations[i] = 0;
340         temperatures[i] = 0.0;
341     }
342     errorSum = 0;
343     lastError = 0;
344     setpoint = 0.0;
345     input = 0.0;
346     output = 0.0;
347     phaseStarted = false;
348     Serial.println("Program stopped and reset");
349     lcd.clear();
350     lcd.print("Program stopped");
351     lcd.setCursor(0, 1);
352     lcd.print("and reset");
353     delay(2000);
354     showInitialSetupMessage();
355 }

```

```

277
278 void showInitialSetupMessage() {
279     Serial.println("Please configure system");
280     lcd.clear();
281     lcd.print("Set Temps, press");
282     lcd.setCursor(0, 1);
283     lcd.print("# to confirm");
284 }
285
286 void showSetTempMenu() {
287     lcd.clear();
288     lcd.print("Set Temp Phase ");
289     lcd.print(stageIndex + 1);
290     lcd.setCursor(0, 1);
291     lcd.print("0");
292 }
293
294 void showSetTimeMenu() {
295     lcd.clear();
296     lcd.print("Set Time Phase ");
297     lcd.print(stageIndex + 1);
298     lcd.setCursor(0, 1);
299     lcd.print("0 sec");
300 }
301
302 void showSetRepeatsMenu() {
303     lcd.clear();
304     lcd.print("Set Repeats:");
305     lcd.setCursor(0, 1);
306     lcd.print("0");
307 }
308
309 void showMainMenu() {
310     lcd.clear();
311     lcd.setCursor(0, 0);
312     lcd.print("Press Ent to start");
313     lcd.setCursor(0, 1);
314     lcd.print("Press Esc to stop");
315 }
316

```

3.4.1 Περιγραφή του κώδικα:

Λειτουργία Προγράμματος

1. **Αρχική Ρύθμιση:**
 - Ο χρήστης εισάγει τις επιθυμητές θερμοκρασίες, τη διάρκεια κάθε φάσης και τον αριθμό των επαναλήψεων.
2. **Εκκίνηση Προγράμματος:**
 - Το πρόγραμμα ξεκινά τον κύκλο θέρμανσης/ψύξης.
3. **Έλεγχος Θερμοκρασίας:**
 - Ο αισθητήρας μετρά συνεχώς τη θερμοκρασία.
 - Ο αλγόριθμος PID υπολογίζει την απόκλιση από την επιθυμητή θερμοκρασία
4. **Εναλλαγή Φάσεων:**
 - Όταν ολοκληρωθεί ο χρόνος μιας φάσης, το πρόγραμμα μεταβαίνει στην επόμενη, αλλάζοντας την επιθυμητή θερμοκρασία και επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία ελέγχου.

5. Τερματισμός:

- Όταν ολοκληρωθούν όλες οι επαναλήψεις, το πρόγραμμα σταματά.

PID (Proportional-Integral-Derivative)

Ο PID είναι ένας αλγόριθμος ελέγχου που βελτιώνει την ακρίβεια και την απόκριση ενός συστήματος ελέγχου. Στο συγκεκριμένο πρόγραμμα, ο PID βοηθά στη διατήρηση της επιθυμητής θερμοκρασίας. Αποτελείται από τρεις όρους:

- **Proportional (P):** Αντιδρά στην τρέχουσα απόκλιση από την επιθυμητή θερμοκρασία. Όσο μεγαλύτερη είναι η απόκλιση, τόσο μεγαλύτερη είναι η διόρθωση.
- **Integral (I):** Λαμβάνει υπόψη το ιστορικό των αποκλίσεων. Διορθώνει συστηματικά μικρές αποκλίσεις που επιμένουν στο χρόνο.
- **Derivative (D):** Προσπαθεί να προβλέψει τη μελλοντική απόκλιση με βάση τον ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας. Βοηθά στην αποφυγή υπερβολικής διόρθωσης.

Εξισώσεις PID

$$\text{output} = K_p \times \text{error} + K_i \times \text{integral} + K_d \times \text{derivative}$$

όπου:

- output: Η τιμή εξόδου που ελέγχει το σύστημα.
- K_p , K_i , K_d : Οι παράμετροι του PID που ρυθμίζουν τη συμπεριφορά του.
- error: Η απόκλιση από την επιθυμητή θερμοκρασία.
- integral: Το άθροισμα των προηγούμενων αποκλίσεων.
- derivative: Ο ρυθμός μεταβολής της απόκλισης.



3.5 Οδηγός Χρήσης του Προγράμματος



Βήμα 1 Εκκίνηση Συσκευής: Όταν η συσκευή ενεργοποιηθεί, η οθόνη LCD θα εμφανίσει το μήνυμα: Set Temps, press # to confirm. Με το πάτημα # ξεκινάει διαδικασία για να οριστούν οι τιμές.

Βήμα 2: Ρύθμιση Θερμοκρασιών, Χρονών και Επαναλήψεων

Η οθόνη θα εμφανίσει το μήνυμα: Set Temp Phase 1 μόλις ο χρήστης θα εισάγει την επιθυμητή θερμοκρασία με το πάτημα # επιβεβαιώνετε η τιμή .

Επαναλαμβάνονται τα παραπάνω βήματα για τις φάσεις 2 και 3.

Με τα πλήκτρα  (B) και  (A) υπάρχει η δυνατότητα πλοήγησης στις φάσεις

Με τα πλήκτρα  (U) και  (D) για να μεταβεί στο επόμενο ή προηγούμενο μενού Θερμοκρασιών, Χρονών και Επαναλήψεων

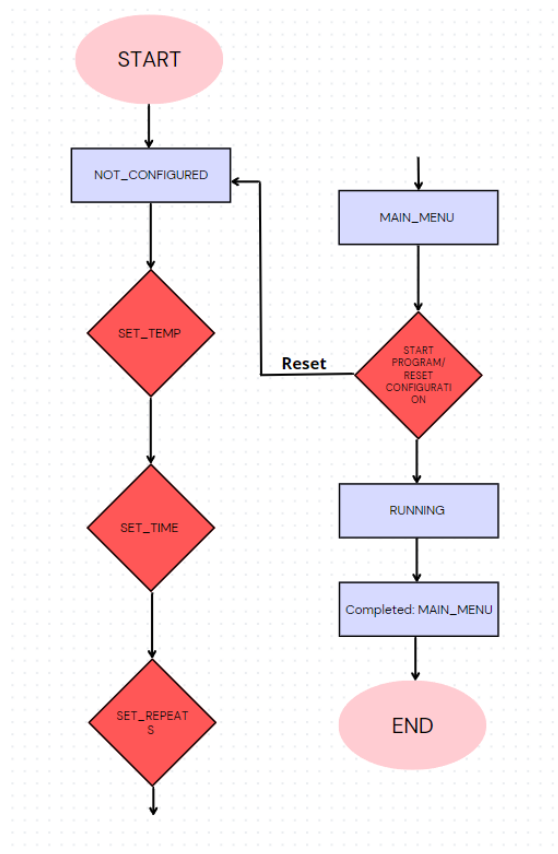
Βήμα 3: Ρύθμιση Χρόνου.

Βήμα 4: Ρύθμιση Αριθμού Επαναλήψεων.

Βήμα 5: Έναρξη Προγράμματος: Πάτημα Ent (R) για εκκίνηση και Esc (L) Παύση διαδικασίας

Διάγραμμα Ροής Μενού

Το διάγραμμα περιλαμβάνει τις κύριες καταστάσεις και τις μεταβάσεις της εφαρμογής ελέγχου θερμοκρασίας, παρέχοντας μια καθαρή οπτική αναπαράσταση του τρόπου με τον οποίο η εφαρμογή κινείται μεταξύ των διαφόρων σταδίων και επιλογών μενού



Σχήμα 2

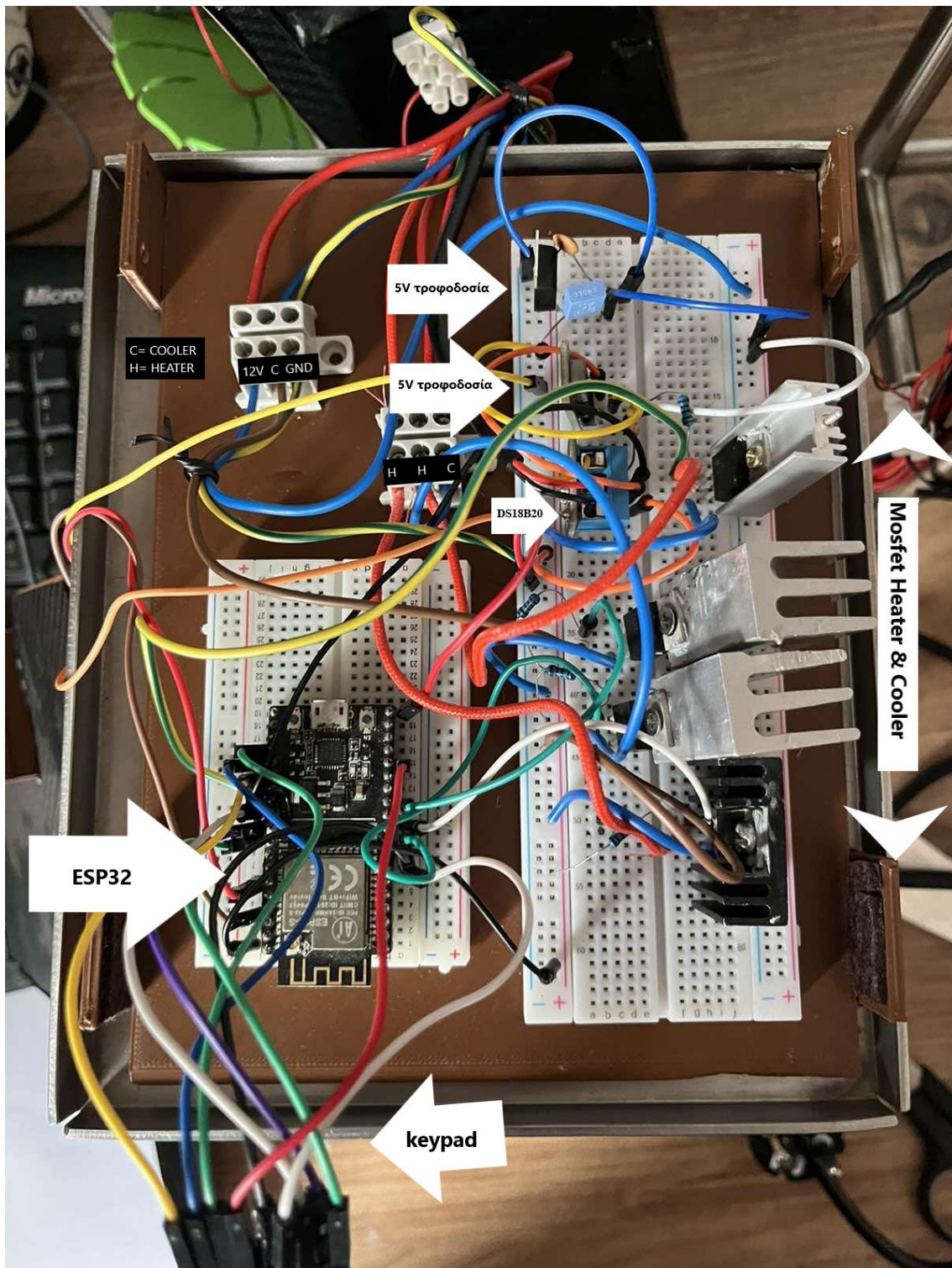
3.6 Φωτογραφίες συσκευής



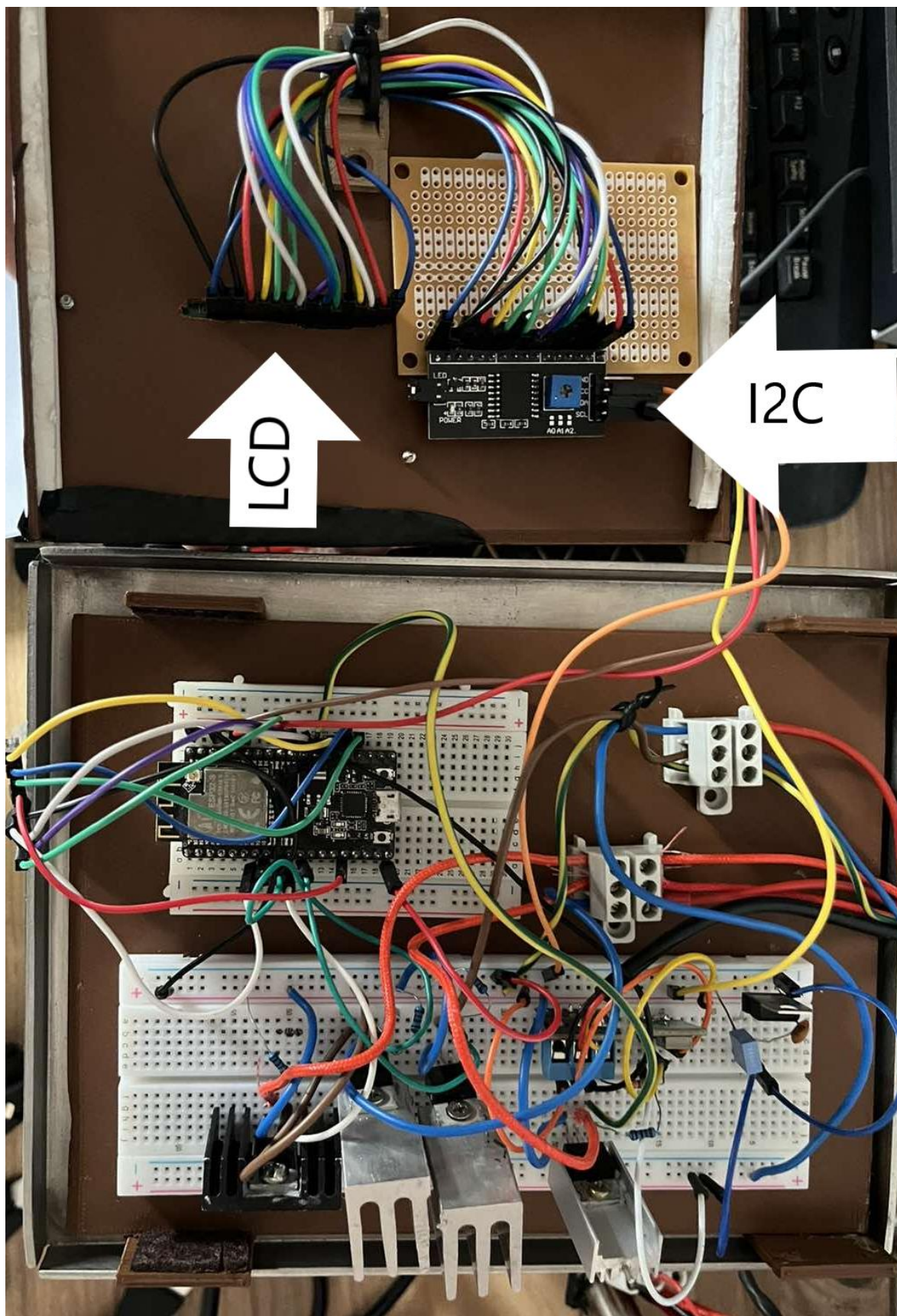
Εικόνα 3.13 Ένδειξη θερμοκρασίας με ψηφιακό θερμόμετρο καθώς η συσκευή είναι σε λειτουργία



Εικόνα 3.13 Ένδειξη θερμοκρασίας με διαφορετικό θερμόμετρο καθώς η συσκευή είναι σε λειτουργία



Εικόνα 3.14 Κύκλωμα της συσκευής στο ράστερ.



Εικόνα 3.15 Κύκλωμα της συσκευής στο ράστερ.

3.7 Επίλογος

Στο τρίτο κεφάλαιο, εστιάσαμε στην κατασκευή και λειτουργία μιας συσκευής PCR, αναλύοντας τα κύρια εξαρτήματα και τη λειτουργία τους. Συγκεκριμένα, εξετάσαμε τη χρήση του θερμαντικού στοιχείου (Ceramic Cartridge Heater 12v 40W) για τη θέρμανση των δειγμάτων DNA και την ενσωμάτωση ενός Peltier στοιχείου για την αποτελεσματική ψύξη, με τη βοήθεια ενός ανεμιστήρα και ψύκτρας για τη διαχείριση της θερμότητας. Επιπλέον, περιγράψαμε τη σημασία του αισθητήρα θερμοκρασίας Keyestudio DS18B20 για την ακριβή παρακολούθηση και ρύθμιση της θερμοκρασίας, καθώς και τη σημασία της σωστής συνδεσμολογίας και της χρήσης της pull-up αντίστασης για την αξιόπιστη λειτουργία του αισθητήρα.

Αναλύσαμε επίσης τη λειτουργία των MOSFET για τον έλεγχο της θέρμανσης και της ψύξης, και τη χρήση του ESP32 για την κεντρική διαχείριση και έλεγχο της συσκευής. Τέλος, περιγράψαμε την αλληλεπίδραση με τον χρήστη μέσω ενός πληκτρολογίου και μιας οθόνης LCD, διευκολύνοντας την εύκολη εισαγωγή δεδομένων και την παρακολούθηση της διαδικασίας PCR.

Κεφάλαιο 4ο: Συμπεράσματα ή/και προτάσεις βελτίωσης

Συμπερασματικά, η κατασκευή μιας συσκευής PCR στο σπίτι αποδεικνύει ότι η βιοτεχνολογία δεν είναι πλέον αποκλειστικό προνόμιο εξειδικευμένων εργαστηρίων. Με τη χρήση διαθέσιμων και οικονομικά προσιτών εξαρτημάτων, μπορούμε να δημιουργήσουμε μια λειτουργική συσκευή PCR με μικρό κόστος. Αυτό καθιστά τη βιοτεχνολογία πιο προσιτή για εκπαιδευτικούς σκοπούς, προσωπικά projects, και μικρές ερευνητικές εφαρμογές.

Η δυνατότητα κατασκευής τέτοιων συσκευών στο σπίτι ανοίγει νέες προοπτικές για τη διάδοση της γνώσης και της πρακτικής εμπειρίας στον τομέα της μοριακής βιολογίας. Οι φοιτητές, οι εκπαιδευτικοί και οι ερασιτέχνες ερευνητές μπορούν να αποκτήσουν πρακτική εμπειρία χωρίς την ανάγκη για μεγάλα κεφάλαια ή πρόσβαση σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

Η σημαντική μείωση του κόστους είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που καθιστούν τη DIY συσκευή PCR ελκυστική. Μια εμπορική συσκευή PCR μπορεί να κοστίσει χιλιάδες ευρώ, ενώ η κατασκευή μιας DIY συσκευής με τα παραπάνω υλικά μπορεί να κοστίσει μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτού του ποσού. Αυτό επιτρέπει την ευρύτερη διάδοση της τεχνολογίας και τη δυνατότητα για περισσότερα άτομα να εμπλακούν σε μοριακές βιολογικές έρευνες και εκπαιδευτικές δραστηριότητες.

Παράλληλα, υπάρχουν περιθώρια βελτίωσης στη σχεδίαση και τη λειτουργικότητα της συσκευής. Κάποιες προτάσεις περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση ενός πιο ακριβούς συστήματος ελέγχου θερμοκρασίας, τη χρήση υλικών με καλύτερη θερμική αγωγιμότητα για πιο ομοιόμορφη κατανομή της θερμότητας και την προσθήκη ενός πιο ευέλικτου λογισμικού ελέγχου.

Επιπλέον, η ενσωμάτωση λειτουργίας μέσω εφαρμογής για smartphone ή υπολογιστή θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά τη χρηστικότητα της συσκευής. Η δυνατότητα ορισμού και παρακολούθησης των παραμέτρων της PCR μέσω μιας εφαρμογής θα επέτρεπε στους χρήστες να διαχειρίζονται και να προσαρμόζουν τις αντιδράσεις τους πιο εύκολα και αποδοτικά.

Η εξέλιξη αυτών των συσκευών και η διαρκής βελτίωση των υλικών και της τεχνολογίας θα συνεχίσουν να διευρύνουν τις δυνατότητες και την προσβασιμότητα της βιοτεχνολογίας σε ένα ευρύτερο κοινό. Με τη συνεχή αναβάθμιση των εξαρτημάτων και των τεχνικών, μπορούμε να επιτύχουμε μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα και ευκολία στη χρήση αυτών των DIY βιοτεχνολογικών εργαλείων.

Πίνακας 4.1: Εξαρτήματα και κόστος

Εξαρτήματα	Τεμάχια	Κόστος σε Ευρώ
Τροφοδοτικό 12V 20A	1	20
Peltier	1	5
Ψήκτρα ανεμιστήρας	1	12
Heater	2	3,8
Lcd I2C Interface	1	4,4
L7805CV+ 2 Πυκνωτές 0,33μF 0,1μF	1	1
DC-DCConverterStep-Down	1	2
Αισθητήρας θερμοκρασίας	1	7
Esp32 NodeMCU-32S	1	11
Keypad 4x5	1	1,6
Mosfet	4	6
Αλουμινένια πλάκα 10x10x3cm	1	20
Κόστος επεξεργασίας πλάκας		40
Σύνολο		133,8

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Δ. Π. Ε. Κ. Κ. Χ. Τ. Μ. Τ. Κ. Λ. Λ. Δ. ΓΙΩΡΓΟΣ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ, Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής στον Υπολογιστή και στον Πάγκο, Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2015.
- [2] W. Α. Γεώργιος Π. Πατρινός, Μοριακή Διαγνωστική, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισθανού, 2005.
- [3] «<https://siarchives.si.edu>,» Smithsonian Institution Archives, Washington, D.C., [Ηλεκτρονικό]. Available: https://siarchives.si.edu/collections/siris_arc_217745.
- [4] C. Nair, «Encyclopedia of Food Microbiology,» 1999.
- [5] Σ. Μ. Ph.D, ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.
- [6] V. [Siliconix], *Power MOSFET IRLZ44*.
- [7] Internaional IOR Rectifer, RLB8743PbF.
- [8] S. A.-T. T. Co., *Nodemcu 32s*.
- [9] <https://grobotronics.com/>, «<https://grobotronics.com/>,» [Ηλεκτρονικό].
- [10] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Thermoelectric_cooling.
- [11] M. integrated, *DS18B20*.
- [12] Δ. μάθηση, «<https://www.why.gr/>,» [Ηλεκτρονικό].
- [13] A. Das, «<https://electrocredible.com/matrix-keypad-raspberry-pi-pico-micropython/>,» [Ηλεκτρονικό].
- [14] jameco electronics, L7800 series.

διάλυμα, η πρωτεΐνωση Κ απενεργοποιεί αμέσως τις ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες) του κυττάρου, που μπορεί να κατακεραματίσουν το DNA κατά τη διαδικασία απομόνωσης. Ένα πλεονέκτημα της πρωτεΐνωσης Κ είναι ότι παραμένει δραστική ακόμη και παρουσία SDS και χηλικών παραγόντων όπως το Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

- Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες

Ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλυμάτων αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης (100%) αιθανόλης, με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης - χλωροφορμίου, με πρόσδεση σε μεμβράνη ιοντοανταλλαγής ή σε μαγνητικά σφαιρίδια. Στη συνέχεια θα αναφερθούμε στη μέθοδο που βασίζεται στην προσθήκη διαλυμάτων υψηλής ιοντικής ισχύος, την οποία και θα εφαρμόσουμε στο εργαστήριο. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων διασπούν τους δεσμούς του DNA με τα μόρια του νερού και το κάνουν λιγότερο υδρόφιλο – άρα και υδατοδιαλυτό. Η προσθήκη της αιθανόλης παρουσία αλάτων προκαλεί δομικές αλλαγές στο μόριο του DNA, με αποτέλεσμα να κατακρημνίζεται εκτός διαλύματος και όταν η ποσότητά του είναι μεγάλη να γίνεται ορατό σαν μια λευκή κλωστή. Μετά από φυγοκέντρηση το DNA βρίσκεται ως ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου και το υπερκείμενο απομακρύνεται.

- Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 70%
- Ανασύσταση του DNA σε διάλυμα TE

Το διάλυμα Tris-EDTA (TE) είναι ένα ελαφρά αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8-9), που περιέχει EDTA. Το EDTA προστατεύει το DNA, δεσμεύοντας δισθενή ιόντα, όπως Mg^{2+} ή Ca^{2+} , που είναι απαραίτητα για τη δράση ενζύμων όπως οι νουκλεάσες (που διασπούν το DNA) και οι πρωτεάσες.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β Πρακτικό μέρος

Απομόνωση DNA από επιθηλιακά κύτταρα παρειάς

Το πρωτόκολλο απομόνωσης που περιγράφεται στη συνέχεια αποτελεί προσαρμογή πρωτοκόλλου χαμηλού κόστους για εκπαιδευτική χρήση που αναπτύχθηκε από τους R. P. Hearn και K. E. Arblaster. Κατά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου χρησιμοποιείται ισοτονικό αναφυκτικό του εμπορίου, που έχει ευχάριστη γεύση και είναι ασφαλές. Ένα πλεονέκτημα που προκύπτει από τη χρήση του αναφυκτικού είναι ότι περιέχει χρωστική που καθιστά το ίζημα ορατό και διευκολύνει τη διάκριση της υδατικής φάσης του διαλύματος κατά τα στάδια της απομόνωσης. Η χρήση του αναφυκτικού δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την καθαρότητα του DNA και τη δυνατότητα διεξαγωγής περαιτέρω αντιδράσεων, όπως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση.

Απαραίτητα υλικά

Για την εκτέλεση της άσκησης θα χρειαστούμε:

- 10 ml ισοτονικού αναφυκτικού (POWERADE ION4)
- Πλαστικό ποτήρι

- 1 πλαστική ράβδο (εναλλακτικά οδοντογλυφίδα με πλατύ άκρο)
- 3 σωληνάρια πολυπροπυλενίου 1,5 ml (τύπου Eppendorf)
- 1 ακρυλικό δοκιμαστικό σωλήνα 5 ml
- 1 γυάλινη πιπέττα pasteur
- 3 πλαστικές πιπέττες pasteur
- Tips για μικροπιπέττες των 20 και 200 μL
- 1 ml διαλύματος λύσης (TE, pH 8 +1% SDS)
- 20 μL διαλύματος πρωτεΐνάσης K (Proteinase K, 20 mg/mL)
- 100 μL NaCl 2,5 M
- 1 mL 100% αιθανόλης και 500 μL 70% αιθανόλης
- Διάλυμα ανασύστασης TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, EDTA 1 mM)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρο για μικροσωληνάρια
- Θερμαντική πλάκα στους 56° C
- Συσκευή ανάδευσης (Vortex)

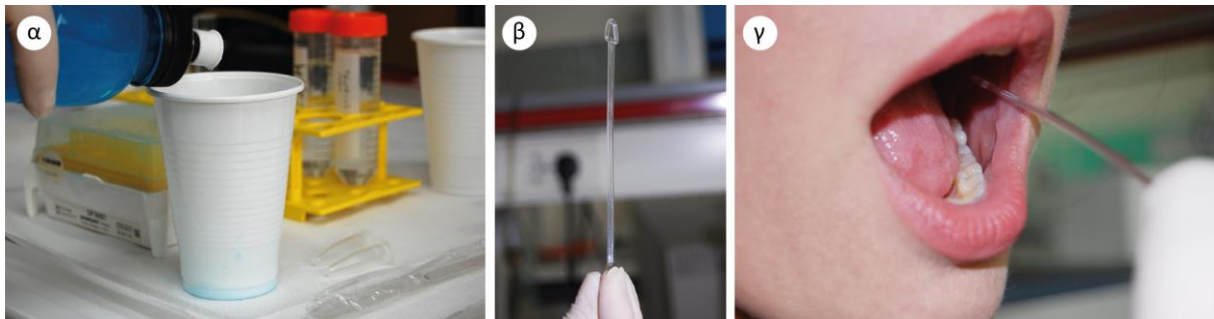
Πειραματική διαδικασία

Βήμα 1ο: Συλλογή κυττάρων

1. Γεμίζουμε το πλαστικό ποτήρι με 10 mL ισοτονικό αναψυκτικό (μέχρι την πρώτη χαραγή) (εικόνα B1 α).

2. Ξύνουμε το βλεννογόνο των παρειών με την πλαστική ράβδο για 1 min αποφεύγοντας την κατάποση. Εναλλακτικά ξύνουμε χρησιμοποιώντας το πεπλατυσμένο άκρο μιας οδοντογλυφίδας (εικόνα 5.7 β, γ). Προσοχή! Η ποσότητα DNA που θα παραλάβουμε στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την επιμέλεια με την οποία θα υλοποιήσουμε αυτό το βήμα!

3. Βάζουμε το αναψυκτικό στη στοματική κοιλότητα και το κρατάμε κάνοντας κινήσεις ξεπλύματος για 60 δευτερόλεπτα προκειμένου να αυξηθεί η ποσότητα των κυττάρων που θα συλλέξουμε.

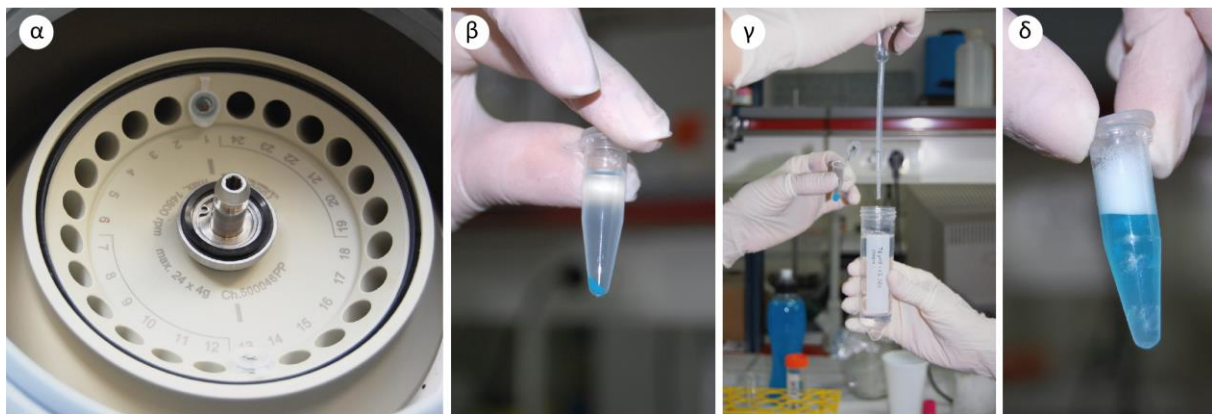


Εικόνα B1 Διαδικασία συλλογής κυττάρων για απομόνωση DNA: (α) προσθήκη 10 ml ισοτονικού αναψυκτικού σε πλαστικό ποτήρι, (β) πλαστική ράβδος, (γ) ξύσιμο επιθηλίου παρειών με την βοήθεια πλαστικής ράβδου.

4. Φτύνουμε το αναφυκτικό στο ποτήρι. Σημειώνουμε τον αριθμό μητρώου μας στα σωληνάρια πολυπροπυλενίου 1,5 ml που έχουμε μπροστά μας.
5. Ανακατεύουμε το διάλυμα με μια πιπέτα pasteur (στο πρώτο ανακάτεμα είναι καλύτερα να χρησιμοποιήσουμε τη ράβδο με την οποία ξύσαμε τις παρειές, γιατί στην επιφάνειά της έχει προσκολλημένα επιπλέον κύτταρα). Λαμβάνουμε 1,5 ml διαλύματος και το τοποθετούμε στο σωληνάριο πολυπροπυλενίου.
6. Φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα (εικόνα B2 α, β).
7. Απορρίπτουμε απαλά το υπερκείμενο υγρό, αφήνοντας μια μικρή ποσότητα, που περιέχει το ίζημα. Προσοχή! Να μην απορρίψουμε και το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα!
8. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 5-7 προσθέτοντας στο ίδιο σωληνάριο κυτταρικό διάλυμα για δεύτερη φορά, ώστε να αυξήσουμε τον αριθμό των κυττάρων που συλλέγουμε

Βήμα 2ο: Λύση των κυττάρων

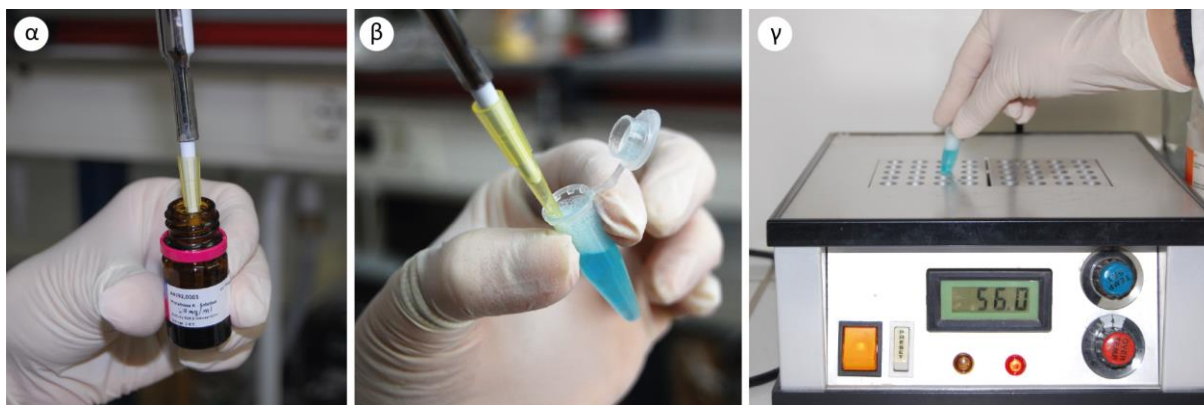
1. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου για δεύτερη φορά, προσθέτουμε στο ίζημα 1 ml διαλύματος λύσης (TE pH8 + 1% SDS) (εικόνα B2 γ).
2. Κάνουμε ανασύσταση του ιζήματος με ανάδευση στο vortex για περίπου 30 δευτερόλεπτα (εικόνα B2 δ).



Εικόνα B2 Προσθήκη διαλύματος λύσης: (α) φυγοκέντρηση δείγματος, (β) μετά την φυγοκέντρηση το ίζημα με τα κύτταρα συκεντρώνεται στο κάτω μέρος του σωληναρίου, (γ) προσθήκη διαλύματος λύσης, (δ) το δείγμα μετά την προσθήκη διαλύματος λύσης και την ανάδευση στο vortex.

Βήμα 3ο: Πέψη πρωτεϊνών

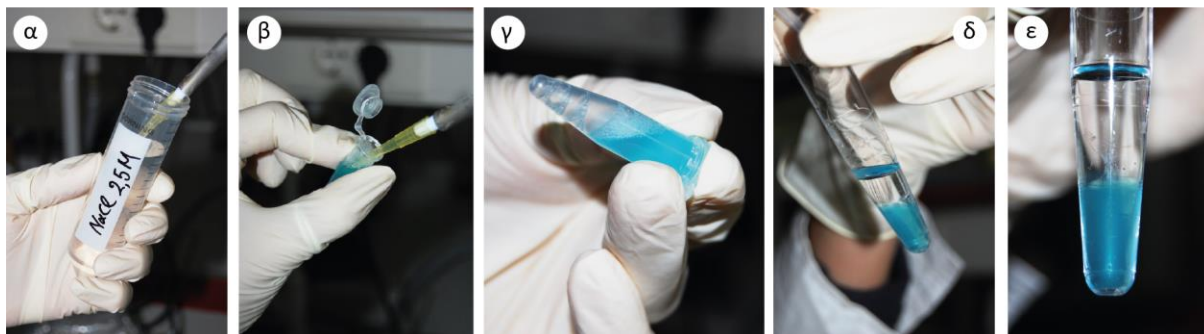
1. Προσθέτουμε 20 μ L διαλύματος πρωτεϊνάσης K (εικόνα B3 α, β).
2. Μεταφέρουμε το σωληνάριο στην πλάκα θέρμανσης και επωάζουμε στους 56° C για 10 λεπτά (εικόνα B3 γ).



Εικόνα B3 Επώαση δείγματος με πρωτεϊνάση K: (α) αναρρόφηση διαλύματος πρωτεϊνάσης K, (β) προ-σθήκη πρωτεϊνάσης K στο δείγμα, (γ) τοποθέτηση του δείγματος σε θερμαντική πλάκα προθερμασμένη στους 56° C.

Βήμα 4ο: Κατακρήμιση DNA με προσθήκη διαλύματος υψηλής αλατότητας

1. Προσθέτουμε 100 μ L NaCl 2,5 M (εικόνα 5.10 α, β).
2. Αναμιγνύουμε απαλά με αναστροφή του σωληναρίου πέντε φορές (εικόνα 5.10 γ).
3. Μεταφέρουμε το διάλυμα σε ακρυλικό δοκιμαστικό σωλήνα των 5 ml.
4. Με μια πιπέττα pasteur λαμβάνουμε περίπου ίσο όγκο (1 ml) παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (100% αιθανόλη), την οποία προσθέτουμε στον δοκιμαστικό σωλήνα. Κρατάμε τον σωλήνα σε γωνία 45° και προσθέτουμε την αιθανόλη αργά, με την άκρη της πιπέττας να εφάπτεται στα τοιχώματά του σωληναρίου. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζουμε μια ξεχωριστή στιβάδα πάνω από την υδατική φάση (εικόνα B4 δ).
5. Αφήνουμε το σωληνάριο για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το στάδιο το DNA θα αρχίσει να εμφανίζεται με τη μορφή κουβαριασμένης κλωστής στη φάση της αιθανόλης (εικόνα B4 ε).

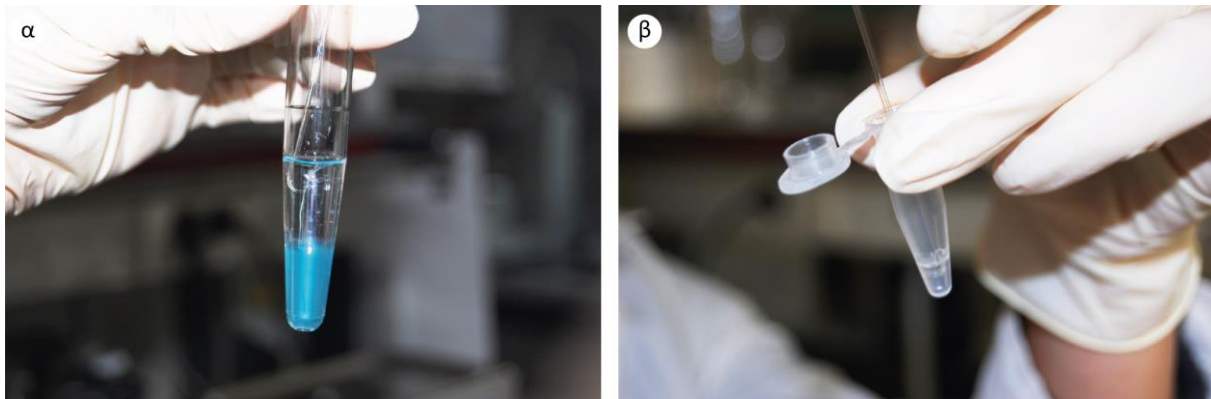


Εικόνα B4 Κατακρήμιση πρωτεϊνών και DNA: (α) αναρρόφηση και (β) προσθήκη διαλύματος NaCl 2,5 M στο δείγμα, (γ) απαλή ανάμιξη του σωληναρίου, (δ) προσθήκη παγωμένης απόλυτης αιθανόλης, (ε) το DNA εμφανίζεται στη φάση της αιθανόλης σαν κουβαριασμένη κλωστή.

Βήμα 5ο: Συλλογή και καθαρισμός του DNA

1. Ανάβουμε έναν λύχνο, με τη βοήθεια του οποίου λυγίζουμε την άκρη μιας γυάλινης ράβδου ώστε να πάρει τη μορφή γάντζου (μικρών διαστάσεων, ώστε να χωράει στον πυθμένα ενός σωληναρίου πολυπροπυλενίου).
2. Με τη βοήθεια της γυάλινης ράβδου «ψαρεύουμε» το DNA τυλίγοντάς το με ελαφρές περιστροφικές κινήσεις (εικόνα B5 α).
3. Βυθίζουμε την άκρη της ράβδου σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου 1,5 ml που περιέχει

500 μl 70% αιθανόλης για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αλάτων (εικόνα B5 β).



Εικόνα B5 Παραλαβή και καθαρισμός DNA: (α) ανάκτηση του DNA από την αλκοολική φάση με την βοήθεια γυάλινης ράβδου, (β) καθαρισμός DNA σε διάλυμα 70% αιθανόλης

4. Αφήνουμε τη γυάλινη ράβδο στον αέρα για 5 λεπτά για να εξατμιστεί η αιθανόλη. Είναι σημαντικό το DNA να στεγνώσει τελείως, γιατί ακόμη και ελάχιστη ποσότητα αιθανόλης μπορεί να αναστείλει τις ενζυμικές αντιδράσεις που θα ακολουθήσουν, όπως την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Βήμα 6ο: Αποθήκευση του DNA

1. Τοποθετούμε την άκρη της ράβδου σε νέο σωληνάριο πολυπροπυλενίου και προσθέτουμε 50-100 μL διαλύματος TE.
2. Ανακατεύουμε ώστε να διαλυθεί το DNA στο TE.
3. Φυλάμε το απομονωμένο DNA στους -20°C .

Στα παραρτήματα παρουσιάζονται πληροφορίες που δεν είναι κρίσιμες για την εργασία, αλλά σημαντικές για την απόδειξη συμπερασμάτων που αναπτύχθηκαν στην εργασία. Περιέχουν κώδικα λογισμικού, ερωτηματολόγια και απαντήσεις σε ερωτηματολόγια, κτλ.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ C Λεπτομέρειες Συστατικών PCR

DNA πολυμεράση

Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς (ευκαρυωτικοί, προκαρυωτικοί και ιοί) και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Δεν μπορεί να συνθέσει ένα νέο μόριο DNA, μπορεί όμως να αντιγράψει ένα υπάρχον που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές. Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστήκη σε υψηλές θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι 72°C , ενώ δεν καταστρέφεται από τη θέρμανση ακόμη και στους 95°C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Η DNA πολυμεράση μπορεί να συνθέσει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA χρησιμοποιώντας ένα μονόκλωνο μόριο ως αρχικό εκμαγείο και έναν εκκινήτη ως σημείο εκκίνησης. Η κατεύθυνση της σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι $5'-3'$. Με την πάροδο των κύκλων της PCR η λειτουργικότητα και η πιστότητα της αντιγραφής φθίνουν και αντίστοιχα αυξάνεται ο αριθμός των λανθασμένων βάσεων που εισάγονται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA. Η απλή DNA πολυμεράση κάνει περίπου ένα λάθος στις 100.000 βάσεις. Οι πολυμεράσες υψηλής πιστότητας (Proofreading polymerase), οι οποίες

έχουν δραστικότητα 3'-5' εξωνουκλεάσης, μπορούν να διορθώσουν τα λάθη που δημιουργούν κατά τη σύνθεση του μορίου DNA. Έτσι επιτυγχάνουν μικρότερα ποσοστά λαθών, της τάξης του 10⁻⁶.

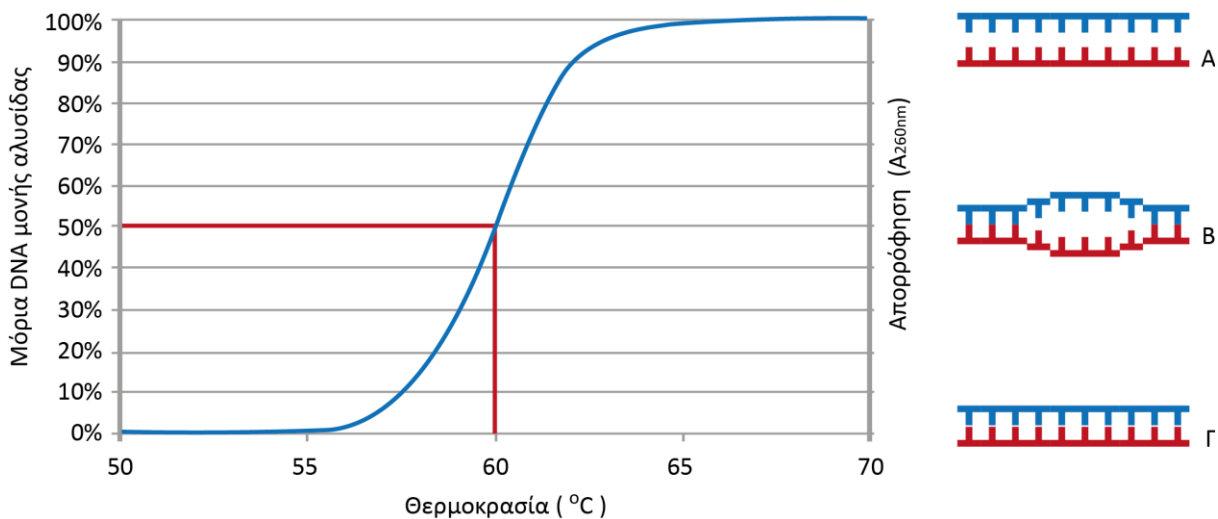
Εκκινητές

Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR. Ο σχεδιασμός των εκκινητών ακολουθεί συγκεκριμένες αρχές, που περιγράφονται παρακάτω:

Μέγεθος των εκκινητών: Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων. Μικρότεροι εκκινητές οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά αυξάνεται η πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού.

Αλληλουχία των εκκινητών: Οι εκκινητές πρέπει να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο, αλλά ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους. Ο υβριδισμός μεταξύ των εκκινητών οδηγεί στο σχηματισμό *διμερών εκκινητών* (Primer dimers) που έχουν μέγεθος 30-50 bp και μειώνουν την αποτελεσματικότητα της PCR. Επίσης, η ύπαρξη περιοχών συμπληρωματικότητας μέσα στον εκκινητή αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού στην αλληλουχία στόχο.

Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών: Η θερμοκρασία αποδιάταξης, Melting temperature (T_m), είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας. Υψηλό ποσοστό σε βάσεις G και C αυξάνει την T_m, καθώς οι βάσεις G και C ενώνονται με τις συμπληρωματικές τους στο δίκλωνο DNA με τρεις



Εικόνα 5 Καμπύλη αποδιάταξης μορίων δίκλωνου DNA [1]

Στην αντίδραση PCR η T_m των εκκινητών κυμαίνεται τυπικά στους 58-68 °C. Οι δύο εκκινητές δεν πρέπει να έχουν πολύ διαφορετικές T_m μεταξύ τους, με μια διαφορά <3-5 °C να θεωρείται αποδεκτή. Υπάρχουν πολλοί τύποι για τον υπολογισμό της T_m των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών. Ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους είναι ο ακόλουθος:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Αν και ο παραπάνω τύπος ισχύει με ακρίβεια για ολιγονουκλεοτίδια μέχρι 7 βάσεων, στην πράξη χρησιμοποιείται για τον αδρό υπολογισμό της T_m εκκινητών μέχρι και 20-22 νουκλεοτιδίων. Η T_m των εκκινητών επηρεάζει άμεσα τη θερμοκρασία υβριδισμού τους στην αλληλουχία στόχο. Αν και η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού πρέπει να προσδιοριστεί πειραματικά, ένα καλό σημείο εκκίνησης είναι 3 ° C λιγότεροι από τη χαμηλότερη T_m των δύο εκκινητών.

Γενετικό υλικό (αλληλουχία στόχος)

Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA, cDNA). Πολύ μικρές ποσότητες DNA (της τάξης των 25-100 ng ανά αντίδραση τελικού όγκου 50 μl) είναι επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR. Μεγάλη ποσότητα DNA μπορεί να αναστείλει την αντίδραση. Για τη βέλτιστη απόδοση της PCR το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση.

Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και συγκέντρωση Mg^{2+}

Το διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα Mg^{2+} , που είναι απαραίτητος συμπαραγόντας της DNA πολυμεράσης.

Τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές. Περίσσεια Mg^{2+} οδηγεί σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη ειδικά προϊόντα στην αντίδραση. Επίσης μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της Taq πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις Mg^{2+} οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Η βέλτιστη συγκέντρωση Mg^{2+} για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται εμπειρικά με δοκιμή διαδοχικών συγκεντρώσεων από 1 έως 4 mM.

Νουκλεοτίδια

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στα 80-800 μM. [1]