

Απομόνωση DNA & ανίχνευση Δρεπανοκυτταρικής Αναιμίας με PCR

Απαιτήσεις

Εξοπλισμός εργαστηρίου: Υλικά συλλογής στοματικού δείγματος, εργαλεία υγροχειρισμού, συσκευή φυγοκέντρωσης, σωληνάρια μικροκλίμακας, γενικά ρυθμιστικά για λύση κυττάρων και πρωτεόλυση, μέσο καταβύθισης νουκλεϊνικών οξέων, σύστημα καθαρισμού DNA σε στερεή φάση (στήλη), απεσταγμένο νερό, θερμοκυκλοποιητής PCR, βασικά αντιδραστήρια PCR (εκκινητές, ένζυμο, νουκλεοτίδια, ρυθμιστικό).

Εξοπλισμός ασφαλείας: Τυπικός ΑΠΕ (ποδιά, γάντια).

Προεργαστηριακή προετοιμασία: Υπενθύμιση αρχών εκχύλισης DNA και PCR, ασηψίας και ορθής διαχείρισης βιολογικών δειγμάτων/αποβλήτων.

Επισκόπηση μαθήματος

Οι συμμετέχοντες απομονώνουν γονιδιωματικό DNA από σάλιο, το καθαρίζουν και προετοιμάζουν αντιδράσεις PCR ειδικές για αλληλόμορφα, με στόχο την ανίχνευση της μετάλλαξης που σχετίζεται με τη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία. Το μάθημα εστιάζει στη λογική κάθε σταδίου (λύση—καταβύθιση—καθαρισμός—ενίσχυση) και στη σωστή οργάνωση αντιδράσεων, θέτοντας τη βάση για την ανάλυση αποτελεσμάτων στην επόμενη συνεδρία.

Βασικοί μαθησιακοί στόχοι

- Δομημένη προσέγγιση απομόνωσης DNA από στοματικό δείγμα.
- Ορθή προετοιμασία μίγματος PCR με εκκινητές ειδικούς για αλληλόμορφα.
- Ρύθμιση/εκκίνηση προγράμματος PCR και κατανόηση των φάσεων μετουσίωσης—ανόπτησης—επέκτασης.

Δομή μαθήματος

1. Συλλογή δείγματος & αρχική λύση

Εστίαση: Λήψη στοματικού δείγματος χαμηλού κινδύνου και έναρξη λύσης κυττάρων.

Τι εξετάζουμε: Ήπια ανάμιξη δείγματος με κατάλληλο ρυθμιστικό ώστε να απελευθερωθεί DNA με ασφαλή, αναπαραγώγιμο τρόπο.

2. Διάσπαση μεμβρανών & πρωτεόλυση

Εστίαση: Απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων αναστολέων που συνοδεύουν το DNA.

Τι εξετάζουμε: Συνδυασμός ρυθμιστικού και ενζύμου πρωτεόλυσης, επαρκής επώαση και ήπιοι χειρισμοί για καθαρό λυσάτο.

3. Καταβύθιση νουκλεϊνικού οξέος

Εστίαση: Συγκέντρωση του DNA από το λυσάτο με χρήση κατάλληλου μέσου καταβύθισης.

Τι εξετάζουμε: Ομοιόμορφη ανάδευση, σωστή φυγοκέντρωση και προσεκτικός χειρισμός ιζήματος για ελαχιστοποίηση απωλειών.

4. Καθαρισμός σε στερεή φάση

Εστίαση: Δέσμευση–πλύσεις–έκλουση DNA σε στήλη καθαρισμού.

Τι εξετάζουμε: Αποτελεσματική απομάκρυνση προσμίξεων (πρωτεΐνες, άλατα, αναστολείς PCR) και ανάκτηση DNA σε κατάλληλο όγκο για downstream εφαρμογές.

5. Προετοιμασία μίγματος PCR (allele-specific)

Εστίαση: Διαμόρφωση αντιδράσεων με εκκινητές που στοχεύουν το φυσιολογικό και/ή το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.

Τι εξετάζουμε: Οργάνωση «καθαρής ζώνης» προετοιμασίας, σωστή αναλογία συστατικών και κατάλληλοι έλεγχοι (θετικός/αρνητικός) για έγκυρη ερμηνεία.

6. Εκτέλεση PCR στον θερμοκυκλοποιητή

Εστίαση: Εφαρμογή προγράμματος κύκλων για εκλεκτική ενίσχυση του επιθυμητού στόχου.

Τι εξετάζουμε: Σταθερότητα ρυθμίσεων, ιχνηλασιμότητα δειγμάτων και καλή εργαστηριακή πρακτική μέχρι την ολοκλήρωση της ενίσχυσης. (Η ανάλυση προϊόντων γίνεται σε επόμενη συνεδρία.)

Σημειώσεις ασφάλειας & δεοντολογίας

Πλήρεις παράμετροι (όγκος, συγκεντρώσεις, θερμοκρασίες, χρονισμοί) παρέχονται αποκλειστικά επιτόπου από τον/την εκπαιδευτή/τρια.

Όλα τα βήματα με βιολογικά δείγματα γίνονται υπό επίβλεψη, με ΑΠΕ και προβλεπόμενη απόρριψη αποβλήτων.

Διασφάλιση αποφυγής επιμολύνσεων: διαχωρισμός χώρων/σταδίων, αλλαγή αναλωσίμων, τήρηση καθαρής ροής εργασίας.