



Γενική Ιολογία Φυτών

Ενότητα 4: Μέθοδοι διάγνωσης φυτικών ιών

Νικόλαος Κατής - Βαρβάρα Μαλιόγκα
Τμήμα Γεωπονίας



Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΑΝΟΙΚΤΑ
ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΑ
ΜΑΘΗΜΑΤΑ



Μέθοδοι διάγνωσης φυτικών ιών



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Περιεχόμενα ενότητας (1)

1. Διάγνωση Ιών.
2. Μέθοδοι διάγνωσης φυτικών ιών.
 - i. Κλινική Διάγνωση.
 - ii. Αιτιολογική Διάγνωση.
3. Βήματα στη διάγνωση φυτικών ιών.
4. Κριτήρια επιλογής μιας διαγνωστικής μεθόδου
5. Τρόπος μετάδοσης, εύρος ξενιστών, συμπτωματολογία.



Περιεχόμενα ενότητας (2)

6. Ιδιότητες του ιού in vitro.
 - i. Σημείο θερμικής αδρανοποίησης.
 - ii. Οριακή αραίωση.
7. Δοκιμές σταυροειδούς προστασίας.
8. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία (ΗΜ).
 - i. Αρχές λειτουργίας ΗΜ.
 - ii. Διαφορές ΗΜ και ΦΜ.
 - iii. Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα ΗΜ.



Περιεχόμενα ενότητας (3)

9. Ορολογικές δοκιμές.
 - i. Αντιγόνο (Antigen) ή Ανοσογόνο.
 - ii. Αντιορός (Antiserum).
 - iii. Αντισώματα.
 - iv. Επίτοποι ή αντιγονικοί καθοριστές.
 - v. Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα.
 - vi. Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων σε ζώα.
 - vii. Διαδικασία παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων.
 - viii. Πλεονεκτήματα πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων.
 - ix. Δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης (καθίζησης) σε δοκιμαστικό σωλήνα.
 - x. Ανοσοδιάχυση σε πηκτή αγαρόζης.



Περιεχόμενα ενότητας (4)

10. Ανοσοενζυμικές Δοκιμές.

- i. Ανοσοενζυμική δοκιμή (ELISA).
- ii. Πλεονεκτήματα της ELISA.

11. Μέθοδοι συνδυασμού ορολογικών δοκιμών και ΗΜ.

- i. Μέθοδος ISEM.
- ii. Μέθοδος Decoration.
- iii. Κυτταρικές Μεταβολές.



Περιεχόμενα ενότητας (5)

12. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR).

- i. Στάδια της αντίδρασης.
- ii. Αναδιπλασιασμός του DNA.
- iii. Εξειδίκευση της PCR.
- iv. Διαδικασία RT-PCR.Εστιασμένη PCR.
- v. Πλεονεκτήματα PCR.



Περιεχόμενα ενότητας (6)

13. Μοριακή Υβριδοποίηση.
14. Απομόνωση και χαρακτηρισμός dsRNA.
15. Προοπτικές στη διαγνωστική Ιολογία.



Σκοποί ενότητας

- Να περιγραφούν οι διαγνωστικές μέθοδοι των φυτικών ιών.
- Να αναφερθούν τα κριτήρια επιλογής της κάθε μεθόδου και να περιγραφούν τα βήματα για την εφαρμογή τους.
- Να αναλυθούν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κάθε μεθόδου και να γίνει σαφές ποιες είναι οι κατάλληλες για κάθε περίπτωση.





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Διάγνωση φυτικών ιών

Διάγνωση φυτικών ιών

Είναι βασική προϋπόθεση για τη λήψη προληπτικών μέτρων αντιμετώπισης ενός ιού.



Γιατί;

Οι ιοί διαφέρουν ως προς την οικολογία και την επιδημιολογία τους και συνεπώς στα μέτρα αντιμετώπισης της ασθένειας που προκαλούν.



Διάγνωση Ιών (1)

- Η διάδοση των φυτικών ιών παγκοσμίως οφείλεται στη ευρεία διακίνηση πολλαπλασιαστικού υλικού και συνεπώς η διάγνωση αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στη λήψη μέτρων καραντίνας που θα πρέπει να λαμβάνονται από κάθε χώρα.



Διάγνωση Ιών (2)

- Γιατί η ταυτοποίηση του παθογόνου αιτίου απαιτεί στις περισσότερες περιπτώσεις εργαστηριακή επιβεβαίωση;
- Ένα παράδειγμα...



Συμπτώματα του ιού CMV στη τομάτα

- Μωσαϊκό φύλλων, νεκρώσεις καρπών.
- Νημάτωση φύλλων, νεκρώσεις καρπών.
- Φύλλα χωρίς συμπτώματα, νεκρώσεις καρπών.
- Νεκρώσεις βλαστών, φύλλων παραμορφωμένοι καρποί με βυθισμένες νεκρώσεις (κηλίδες ή δακτύλιοι (CMV-CARNA 5)).



Συμπτώματα «γκρίζου τοιχώματος»* (gray wall) προκαλούν

- Οι ιοί ToMV και CMV.
- Η έλλειψη φωτισμού.
- Οι χαμηλές θερμοκρασίες.
- Η υπερβολική εδαφική υγρασία.
- Το συμπιεσμένο έδαφος.
- Η χαμηλή αναλογία K/N.

* παρουσία ενεργούς πολυφαινολοξειδάσης





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Μέθοδοι διάγνωσης φυτικών ιών

Μέθοδοι διάγνωσης φυτικών ιών (1)

- **Ανίχνευση** (detection): μαζικοί έλεγχοι ή δοκιμές ρουτίνας για τον έλεγχο φυτικού υλικού για ένα ιό ο οποίος είναι ήδη γνωστός ή εικάζεται ότι υπάρχει ή έλεγχος απουσίας (έλεγχος ΠΥ πατάτας).
- **Διάγνωση** (Diagnosis: diagignoskein): περιλαμβάνει τις τεχνικές που οδηγούν στη διερεύνηση του ιού-αιτίου μιας ασθένειας (κριτήρια του Koch).



Μέθοδοι διάγνωσης φυτικών ιών (2)

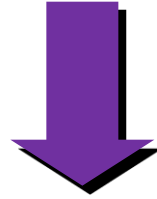
- **Πρώτο βήμα:** «κλινική» παρατήρηση των ασθενών φυτών (αγρό, θερμοκήπιο).
- **Συλλογή πληροφοριών:** τρόπος ανάπτυξης της «ασθένειας» στον αγρό ή το θερμοκήπιο.
- **Ιστορικό της ασθένειας:** προέλευση του μολύσματος της ασθένειας, τρόπος διασποράς.



Κλινική Διάγνωση



Κλινική Διάγνωση



Αιτιολογική Διάγνωση

Ταυτοποίηση ιού-αιτίου της
ασθένειας.



Αιτιολογική Διάγνωση

- Αρκετά δύσκολη/αδύνατη σε ορισμένες περιπτώσεις.
- Απαιτεί καλά οργανωμένα ιολογικά εργαστήρια.
- Απαιτεί εξειδικευμένο ερευνητικό/τεχνικό προσωπικό.



Προβλήματα στη διάγνωση των φυτικών ιών

- Μεγάλος αριθμός φυτικών ειδών.
- Σημαντικός αριθμός ιών/ιώσεων.
 - Διεθνώς χαρακτηρίστηκαν > 1000 ιοί.
 - Στη χώρα μας > 140 .



Εφαρμογές διάγνωσης φυτικών ιών

- Παραγωγή πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού (δενδρώδη, άμπελος, πατάτα).
- Λήψη μέτρων αντιμετώπισης (χρησιμοποίηση πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού, εκρίζωση, καταπολέμηση φορέων).
- Επιδημιολογικές μελέτες.
- Ιοί καραντίνας.



Βήματα στη διάγνωση φυτικών ιών (1)

1. Ταυτοποίηση του είδους και της ποικιλίας του ασθενούς φυτού.
2. Μελέτη και καταγραφή των συμπτωμάτων.
3. Περιγραφή του τρόπου διασποράς της ασθένειας και συχνότητα εμφάνισης.
4. Μελέτη μολυσματικότητας του ιού.
 - Μηχανική μετάδοση.
 - Μετάδοση με έντομα, νηματώδεις, ακάρεα.
 - Μετάδοση με εμβολιασμό και κουσκούτα.



Βήματα στη διάγνωση φυτικών ιών

(2)

5. Μόλυνση ή εμβολιασμό φυτοδεικτών και επαναμόλυνση διαφόρων φυτοδεικτών για να:
 - Διερευνηθούν οι πολλαπλές μολύνσεις.
 - Διαχωριστούν οι υπό μελέτη ιοί.
 - Προσδιορισθούν πειραματικού εύρους ξενιστές και συμπτωματολογίας.

6. Διατήρηση της μολυσματικότητας σε φυτικό εκχύλισμα για τον προσδιορισμό της:
 - Διάρκειας ζωής *in vitro* (ΔZ *in vitro*).
 - Οριακή αραίωση (ΟΑ).
 - Σημείο θερμικής αδρανοποίησης (ΣΘΑ).



Βήματα στη διάγνωση φυτικών ιών

(3)

7. Ηλεκτρονική Μικροσκόπηση (ΗΜ).
 - Σε φυτικό εκχύλισμα (μορφολογία ιοσωματίων, ανίχνευση πιθανής μόλυνσης).
 - Σε καθαρό υικό παρασκεύασμα.
 - Σε λεπτές τομές φυτικών ιστών (ιστοπαθολογία για ανεύρεση εξειδικευμένων κυτταρικών μεταβολών).
8. Εφαρμογή ορολογικών δοκιμών και τεχνικών.



Βήματα στη διάγνωση φυτικών ιών

(4)

9. Καθαρισμός του ιού: προσδιορισμός φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και, εάν απαιτείται, παραγωγή εξειδικευμένου αντιορού.
10. Μόλυνση υγιών φυτών της ίδιας ποικιλίας (όπου αρχικά εντοπίστηκε η ασθένεια) με καθαρό παρασκεύασμα: ικανοποίηση κριτηρίων Koch.



Μέθοδοι ανίχνευσης/διάγνωσης φυτικών ιών

- Τρόπος μετάδοσης, εύρος ξενιστών, συμπτωματολογία.
- Ιδιότητες *in vitro* (Διάρκεια ζωής *in vitro*, ΟΑ, ΣΘΑ).
- Δοκιμές σταυροειδούς προστασίας.
- Ηλεκτρονική Μικροσκοπία (ΗΜ).
- Ορολογικές Δοκιμές.
- Κυτταρικές μεταβολές.
- Μοριακή υβριδοποίηση.
- Απομόνωση δίκλωνου RNA (dsRNA).
- Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR).



Κριτήρια επιλογής μιας διαγνωστικής μεθόδου

- Ευαισθησία.
- Αξιοπιστία και επαναληψιμότητα.
- Αριθμός δειγμάτων/τεχνικό.
- Κόστος αντιδραστηρίων.
- Βαθμός εκπαίδευσης προσωπικού.
- Εφαρμογή σε εργαστήριο με ελάχιστη υποδομή ή εάν είναι δυνατό απευθείας στον αγρό.



Ευαισθησία διαφόρων διαγνωστικών μεθόδων (Bar-Joseph and Garsney, 1981; Matthews, 1993)

Μέθοδος	Όριο ανίχνευσης ng/ml
---------	-----------------------

Ορολογικές δοκιμές

Ανοσοδιάχυση	500-20.000
--------------	------------

ELISA	1-10
-------	------

ISEM	1-10
------	------

Μοριακές τεχνικές

Στύπωμα Western (Western blotting)	1-10
------------------------------------	------

Μοριακή υβριδοποίηση	<0,001 (RNA)
----------------------	--------------

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	<0,0001 (RNA)
--	---------------

<i>Δοκιμές μολυσματικότητας</i>	50
---------------------------------	----



Κριτήρια (Κανόνες) του Koch

- Να συνδέεται σταθερά με την ασθένεια.
- Απομόνωση από το ασθενές φυτό.
 - Αναπαραγωγή σε ξενιστή διαφοροποίησης.
 - Φυσικοχημική απομόνωση και καθαρισμός.
- Προσδιορισμό φυσικοχημικών ιδιοτήτων.
- Αναπαραγωγή της ασθένειας μετά από μόλυνση υγιών φυτών (ιδίου είδους και ποικιλίας).
- Απομόνωση από τον πειραματικό ξενιστή.



Μέθοδοι διάγνωσης φυτικών

- Τρόπος μετάδοσης, εύρος ξενιστών, συμπτωματολογία.



Τρόπος μετάδοσης, εύρος ξενιστών, συμπτωματολογία (1)

- Τα μοναδικά διαθέσιμα χαρακτηριστικά για την ανίχνευση/διάγνωση ιών τις αρχές του αιώνα.
- Ο τρόπος μετάδοσης παραμένει σημαντικό εργαλείο διάγνωσης (μετάδοση με νηματώδεις του γένους *Xiphinema*: *Nepovirus*).
- Το εύρος ξενιστών/συμπτωματολογία θα πρέπει να αξιολογείται με πολύ προσοχή.
- **Nepovirus**: τοπικές κηλίδες, διασυστηματική στιγματώση/νέκρωση της κορυφής στο *Chenopodium* spp.
- **Μωσαϊκό σέλινου**: περιορίζεται στα Umbelliferae.



Τρόπος μετάδοσης, εύρος ξενιστών, συμπτωματολογία (2)

Χρήσιμες πληροφορίες για τη δημιουργία μιας εικόνας των γενικών χαρακτηριστικών ενός άγνωστου ιού.

**Όμως, σπανίως οδηγούν
στη διάγνωση**

Πληροφορίες για το εύρος ξενιστών: CMI/AAB
descriptions of Plant Viruses



Το δημοσιευμένο εύρος ξενιστών δεν αποτελεί αξιόπιστο κριτήριο διάγνωσης καθώς: (1)

- Συνήθως δημοσιεύονται μόνον θετικά αποτελέσματα.
- Στην περίπτωση απουσίας συμπτωμάτων μετά τη μόλυνση δεν γίνεται έλεγχος για πιθανή λανθάνουσα μόλυνση.
- Ο τρόπος μόλυνσης μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα.
- Οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτοδεικτών μπορεί να επηρεάσουν τη συμπτωματολογία.



Το δημοσιευμένο εύρος ξενιστών δεν αποτελεί αξιόπιστο κριτήριο διάγνωσης καθώς: (2)

- Ακόμη και στενά συγγενικές φυλές ενός ιού διαφέρουν ως προς το εύρος ξενιστών.
- Οι πρωτοπλάστες μεσόφυλλου μολύνονται σχετικά εύκολα από έναν ιό που μολύνει με δυσκολία ή δεν μολύνει το άθικτο φυτό.



Αγρός ζαχαροτεύτλων με προσβολή από τη ριζομανία των τεύτλων (BNYVV)



Χαρακτηριστικά συμπτώματα προσβολής του ΒΝΥVV σε κύριες ρίζες ζαχαροτεύτλων



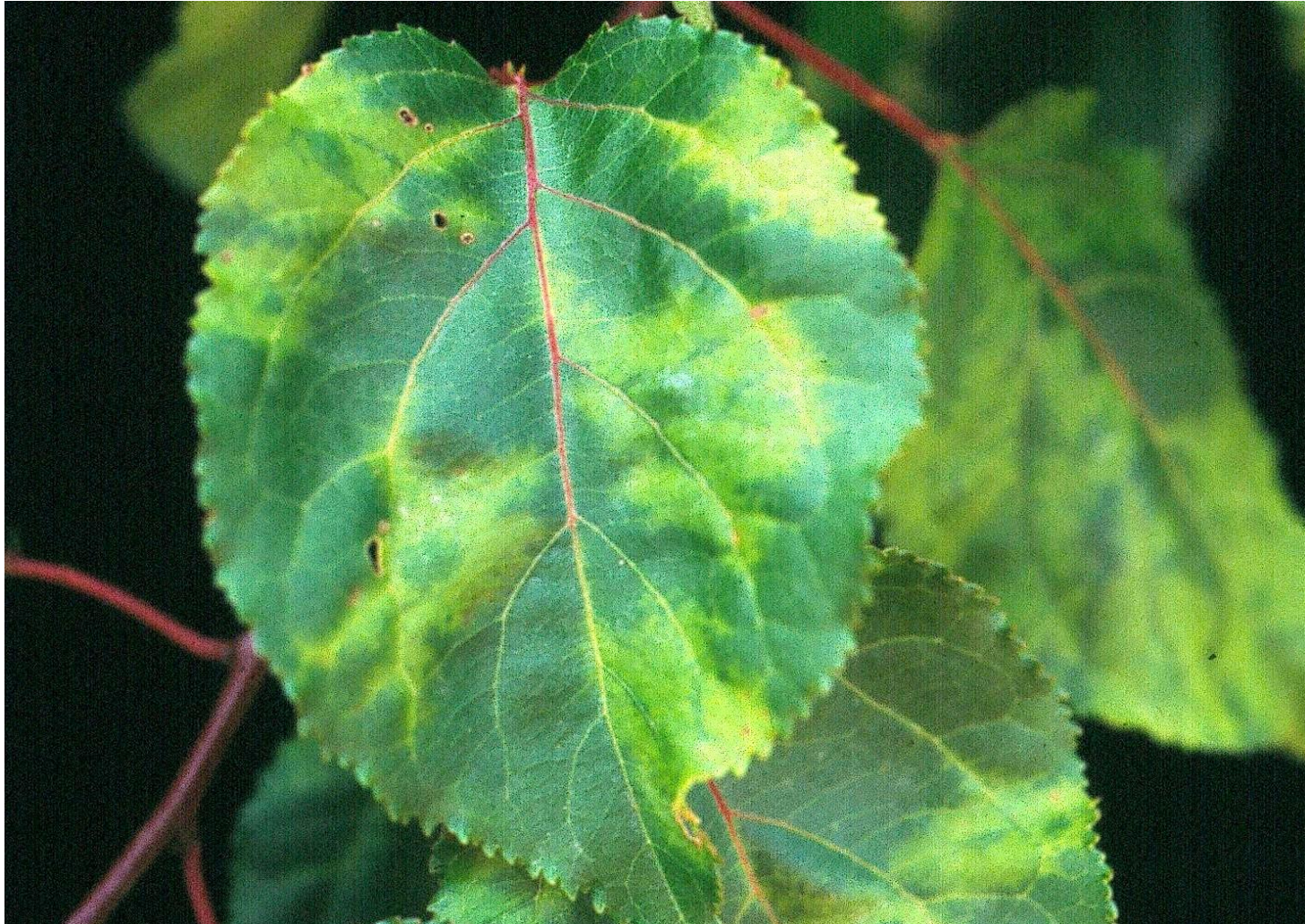
Νεκρώσεις των αγγειωδών δεσμίδων σε ρίζες ζαχαροτεύτλων μολυσμένες από ΒΝΥΝV



Νεκρώσεις των αγγειωδών δεσμίδων σε κύριες ρίζες
ζαχαροτεύτλων ποικιλίας Kaweduca (αριστερά κύρια
ρίζα ζαχαροτεύτλου ανθεκτικής ποικιλίας)



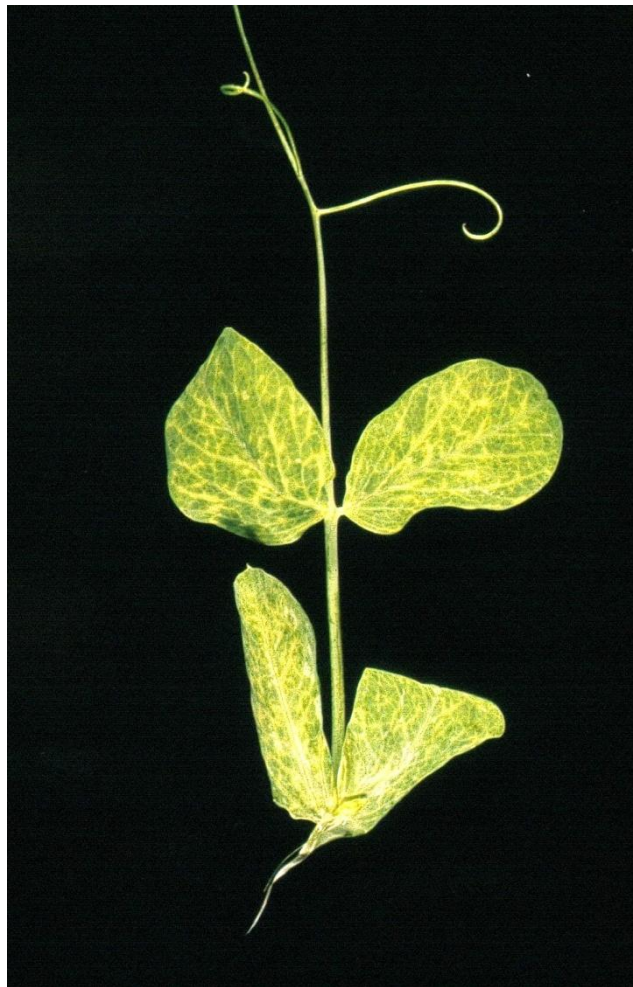
Συμπτώματα στα φύλλα ροδακινιάς μετά από προσβολή από τον ιό της ευλογιάς της δαμασκηνιάς (PPV)



Συμπτώματα από τον RPV σε ροδάκινα και χαρακτηριστικοί αποχρωματισμοί του πυρήνα



Συμπτώματα προσβολής από τον RPV σε φύλλα φασολιάς



Διασυστηματικά συμπτώματα του BMV στο φυτοδείκτη *C. amaranticolor* (αριστερά υγιές φύλλο)





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Ιδιότητες του ιού *in vitro*

Ιδιότητες *in vitro* (1)

- Διάρκεια ζωής *in vitro*.
- Οριακή Αραίωση.
- Σημείο Θερμικής Αδρανοποίησης.



Ιδιότητες *in vitro* (2)

- Απλές, χρήσιμες δοκιμές για τη λήψη στοιχείων σταθερότητας και συγκέντρωσης ενός ιού στους ιστούς των ξενιστών.
- Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιείται φυτικό εκχύλισμα και μια τυπική διαδικασία.
- Σήμερα έχουν πολύ περιορισμένη διαγνωστική αξία (Hamilton et al., 1981).



Σημείο θερμικής αδρανοποίησης (Thermal inactivation point, TIP)

- Η θερμοκρασία στην οποία ο ιός χάνει την μολυσματικότητά του (10' σε διάφορες θερμοκρασίες).
- **TSWV**: 45 °C (θερμοευαίσθητος).
- **TMV**: 95 °C (θερμοανθεκτικός).
- Συνήθως 55-70 °C.



Διάρκεια ζωής *in vitro*

- Ο μέγιστος χρόνος διατήρησης της μολυσματικότητας ενός ιού, σε εκχύλισμα ενός ξενιστή, σε θερμοκρασία εργαστηρίου (~20°C).
- **ApMV**: 1 ώρα.
- **TMV**: 1 έτος.



Οριακή αραίωση (Ο.Α.)

- Η μικρότερη αραίωση φυτικού εκχυλίσματος, στην οποία το εκχύλισμα από ασθενές φυτό μολύνει μηχανικά έναν φυτοδείκτη.
- Γενικώς κυμαίνεται από 10^{-1} - 10^{-7} .
- **ArMV**: 10^{-3} - 10^{-4} .
- **TMV**: 10^{-6} .
- Εξαρτάται: από τη συγκέντρωση του ιού και το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης.





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Δοκιμές σταυροειδούς προστασίας

Σταυροειδής προστασία

Φυτά μολυσμένα από μια φυλή ενός ιού δεν επαναμολύνονται από άλλη φυλή του ίδιου ιού.
(McKinney, 1929).

- Τα πρώτα χρόνια: χρήσιμη πληροφορία για τη διάγνωση ιών.

**Όμως, δεν παρατηρείται
πάντοτε μεταξύ συγγενικών
φυλών.**

(Gibbs and Harrison, 1976)





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Ηλεκτρονική Μικροσκοπία (ΗΜ)

Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Μέγεθος, σχήμα, χαρακτηριστικά επιφάνειας
ιοσωματίων.



Βασικά στοιχεία αναγνώρισης.



Γένος ή οικογένεια ιών.

Χαρακτηριστική μορφολογία:

- Παρασφαιρικά 80-110 nm, Tosronivirus.
- Ραβδόμορφα 300X18 nm, Tobamovirus (TMV).



Αρχές λειτουργίας ΗΜ

Ηλεκτρόνια (σύρμα βολφραμίου, 2300°C)



3 ζεύγη ηλεκτρομαγνητικών φακών (υπό κενό 10⁻⁴ mm

Hg)



1^ο ζεύγος ΗΦ (συμπυκνωτής)



2^ο ζεύγος ΗΦ (αντικειμενικός)



3^ο ζεύγος ΗΦ (φακοί
προβολής)



Αρνητική χρώση

Οι χρωστικές εισχωρούν και καλύπτουν όλα τα κενά,
εκτός των ιοσωματίων.

Τα ηλεκτρόνια διαπερνούν τα βιολογικά μακρομόρια
αλλά όχι τα μόρια της χρωστικής.



Αρνητικό είδωλο
αντικειμένου



Διαφορές ΗΜ και ΦΜ

Μικροσκόπιο	ΗΜ	ΦΜ
Πηγή ενέργειας	Ηλεκτρόνια	Φωτόνια
Είδος φακών	3 ζεύγη ΗΦ	Γυάλινοι φακοί
Μηχανισμός σχηματισμού ειδώλου	Σκεδασμός ηλεκτρονίων	Απορρόφηση φωτός
Διακριτική ικανότητα	2Å	2000Å



Ηλεκτρονική μικροσκοπία

- **Νηματοειδείς ιοί:** μήκος και μορφολογία χαρακτηριστικά του γένους.
- **Ιοί της οικ. Rhabdoviridae:** χαρακτηριστικά βληματορμμορφα ιοσωμάτια.
- **Σφαιρικοί ιοί:** δύσκολη η ταυτοποίηση (τουλάχιστον 100 ιοί έχουν μέγεθος 28-30 nm) καθώς μοιάζουν με κυτταρικά οργανίδια (ριβοσώματα).
- **ΗΜ:** απαιτείται καθαρό παρασκεύασμα του ιού (δυνατότητα λεπτομερούς μελέτης της δομής) ή σε φυτικό εκχύλισμα (σοβαρό πρόβλημα η χαμηλή συγκέντρωση ορισμένων ιών).

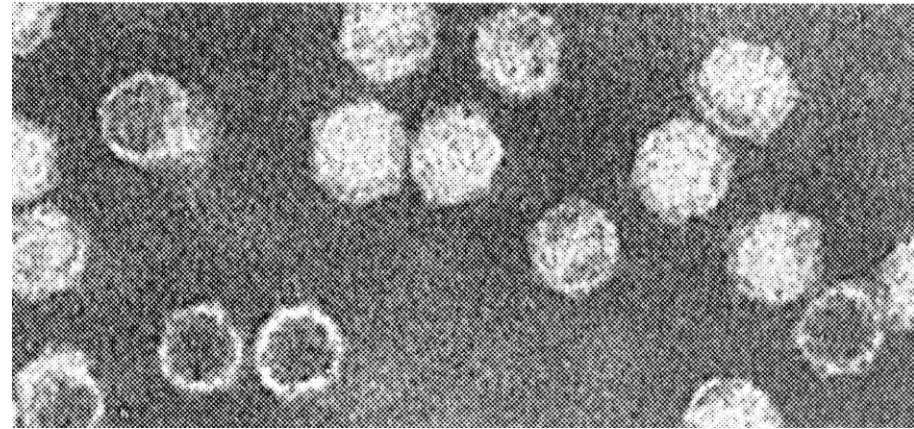
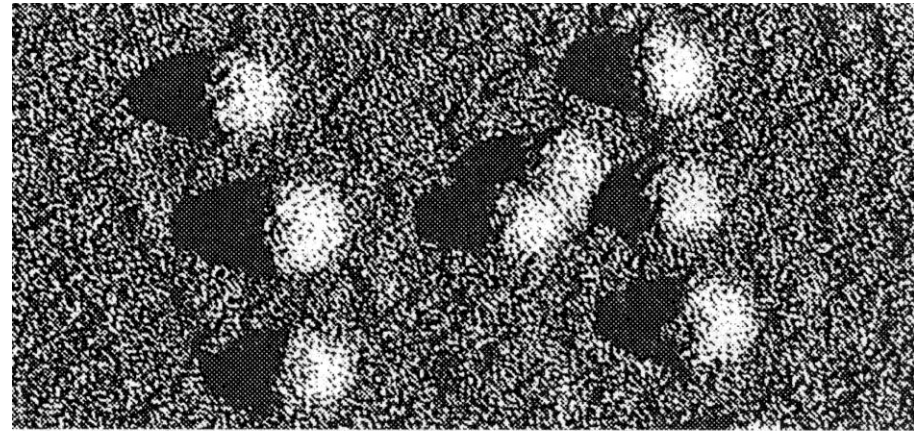
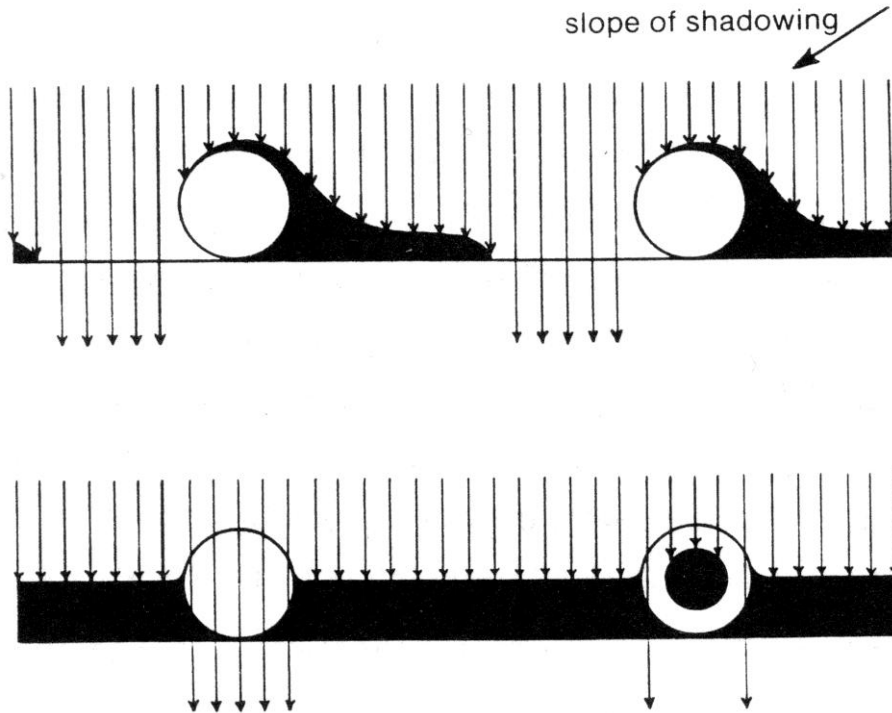


Ιστός που χρησιμοποιείται στην Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

- Συνήθως χρησιμοποιείται ιστός φύλλων που παρουσιάζουν έντονα συμπτώματα.
- Σπανίως τα παλαιότερα φύλλα περιέχουν υψηλή συγκέντρωση ιοσωματίων (π.χ. ιός του μωσαϊκού του γογγυλιού (TuMV) σε φύλλα λάχανου).



ΗΜ: Αρνητική χρώση



Χρωστικές ουσίες αρνητικής χρώσης

- Φωσφοροβολφραμικό νάτριο (phosphotungstate, ΡΤΑ).
- Μολυβδαινικό αμμώνιο (ammonium molybdate).
- Οξικό ουρανίλιο (uranyl acetate, UΑ).

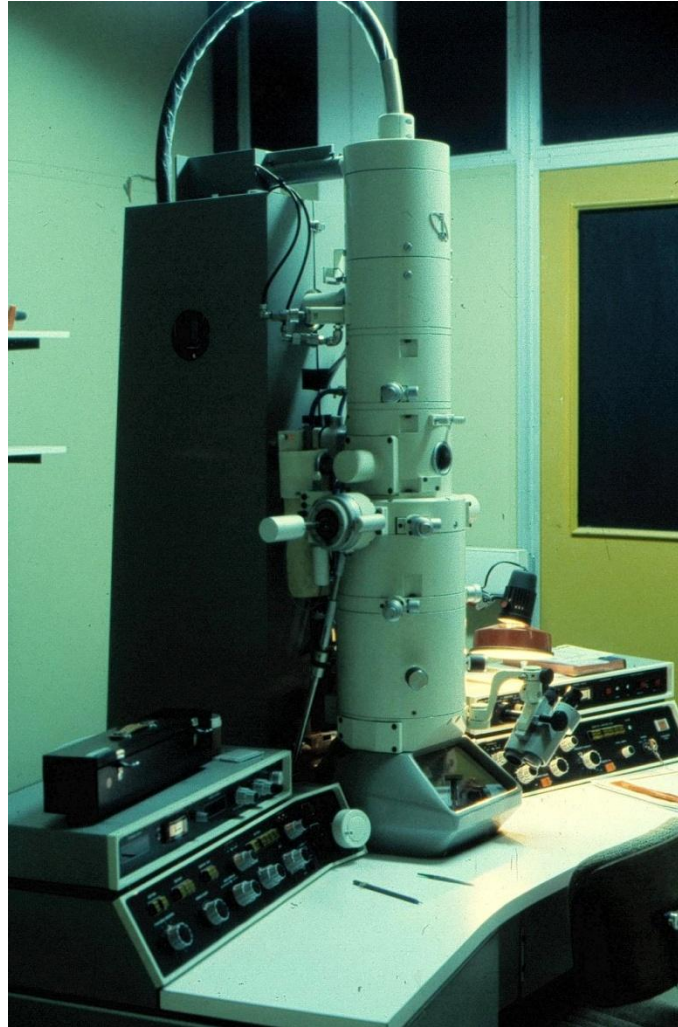


Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του ΗΜ

- Διακριτική ικανότητα ή δύναμη ανάλυσης που είναι 2A (διάκριση αντικειμένων που βρίσκονται σε απόσταση 2A).
- Διακριτική ικανότητα φωτονικού: 2000 A.



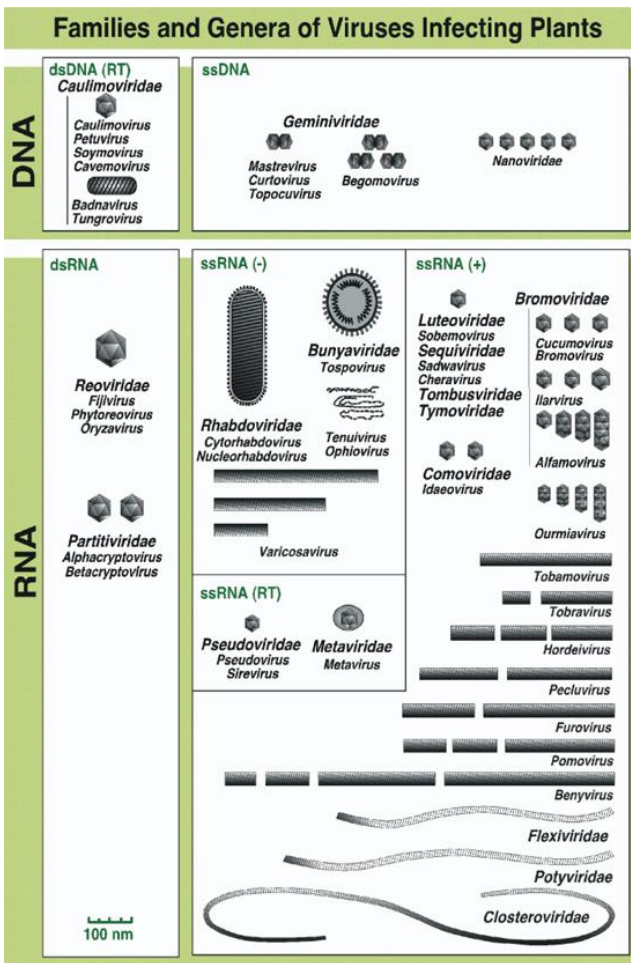
Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



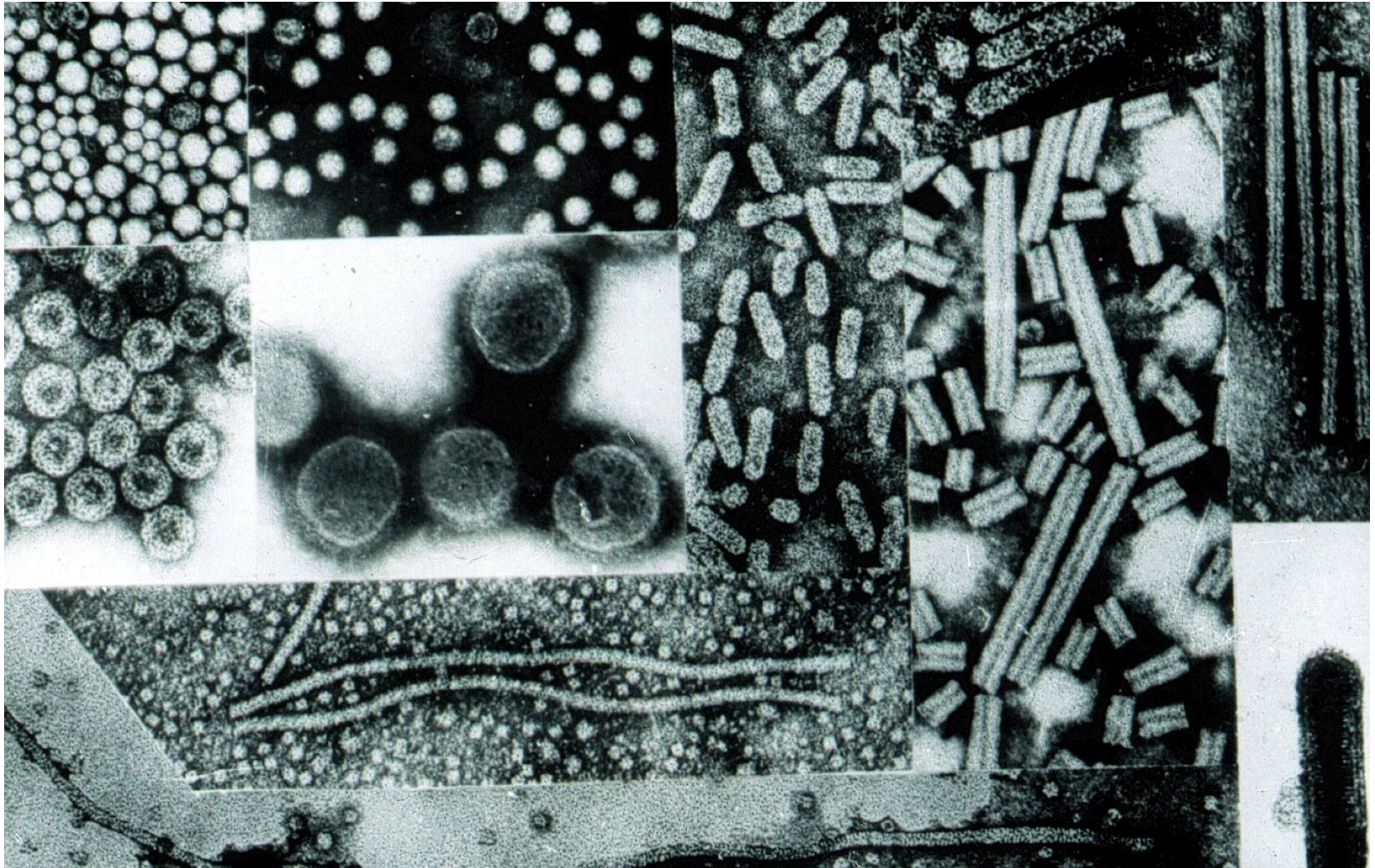
Ιολογία Φυτών
Τμήμα Γεωπονίας



Οικογένειες και γένη των φυτικών ιών



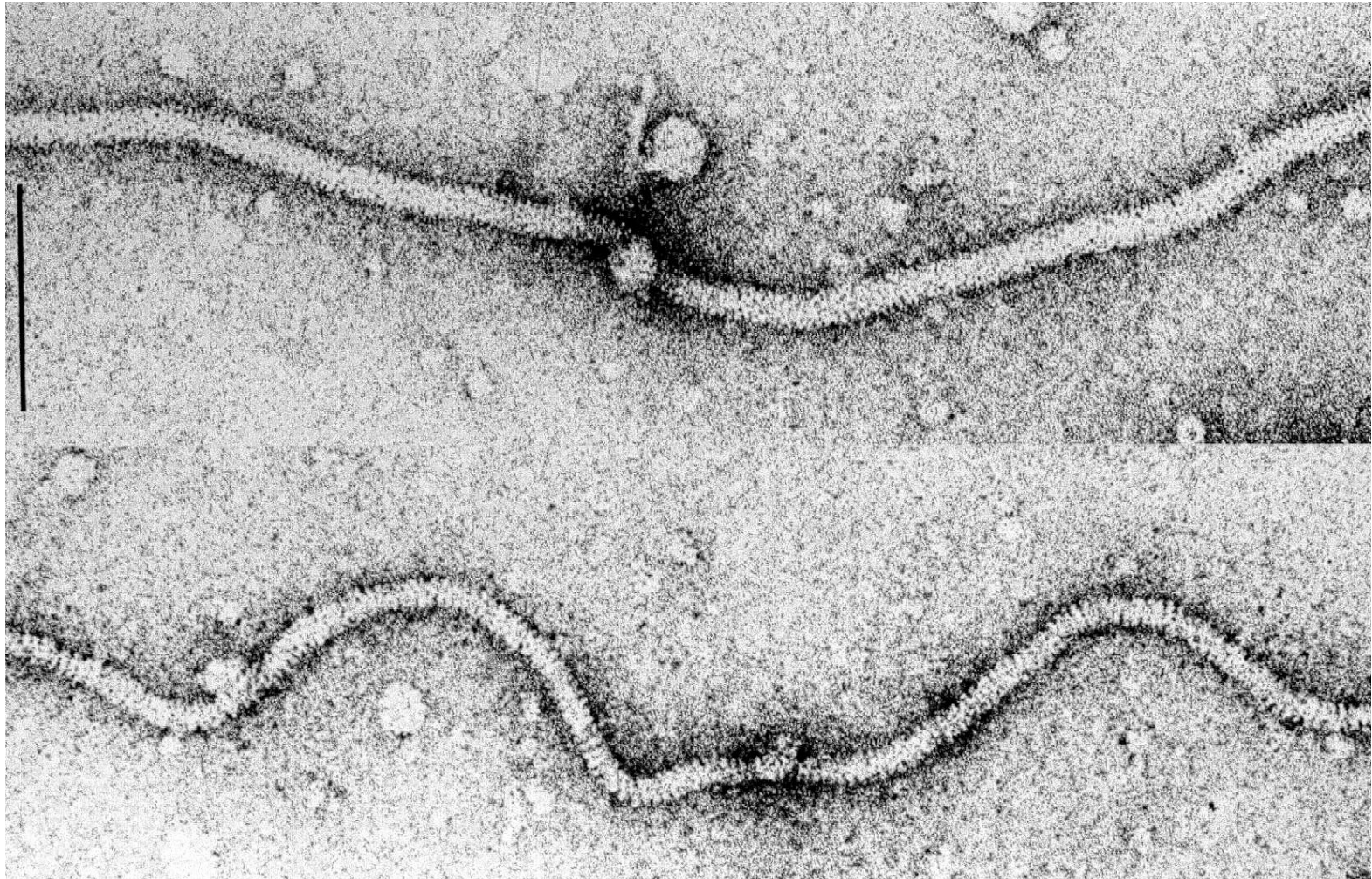
Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (1)



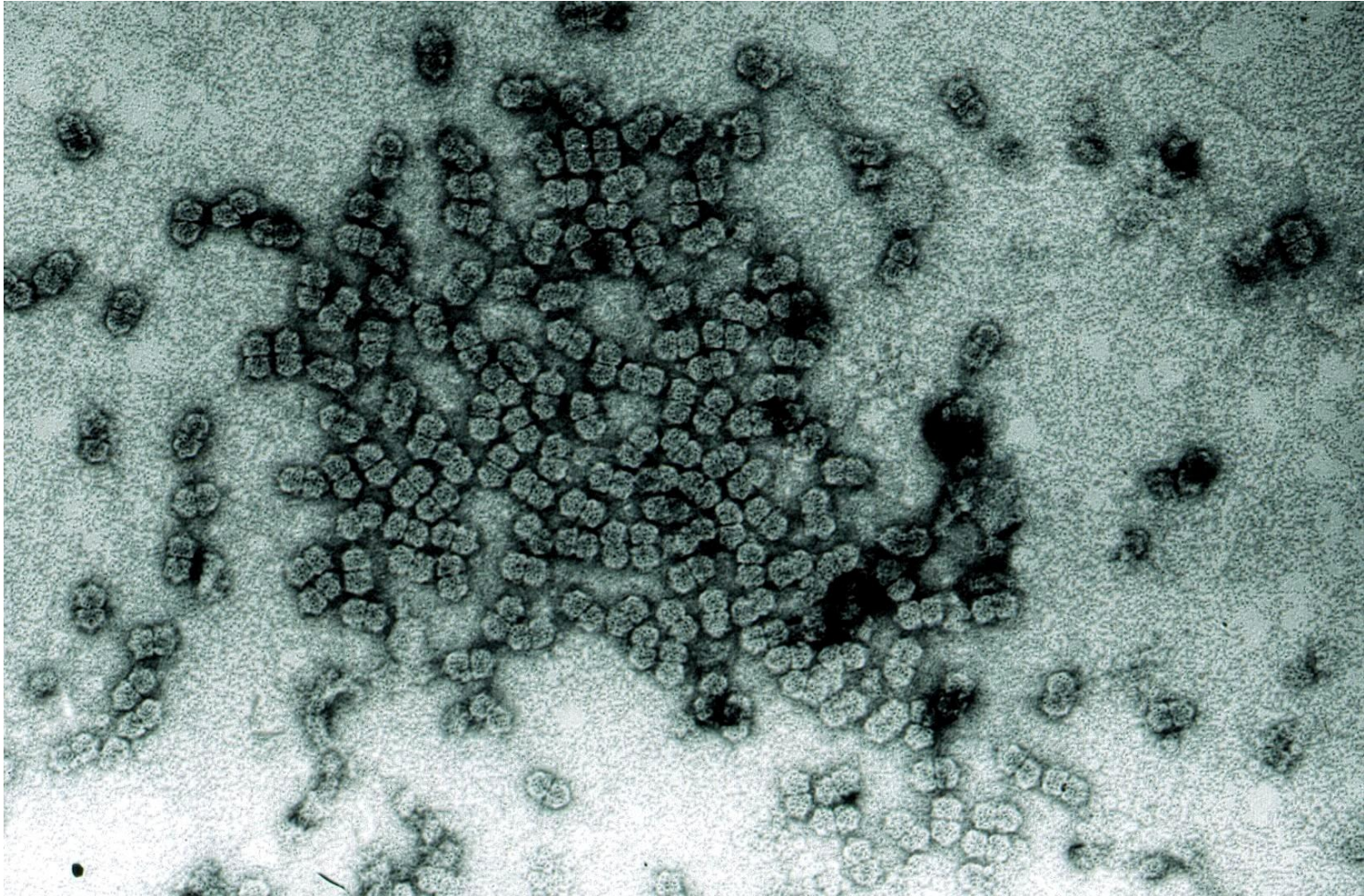
Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (2)



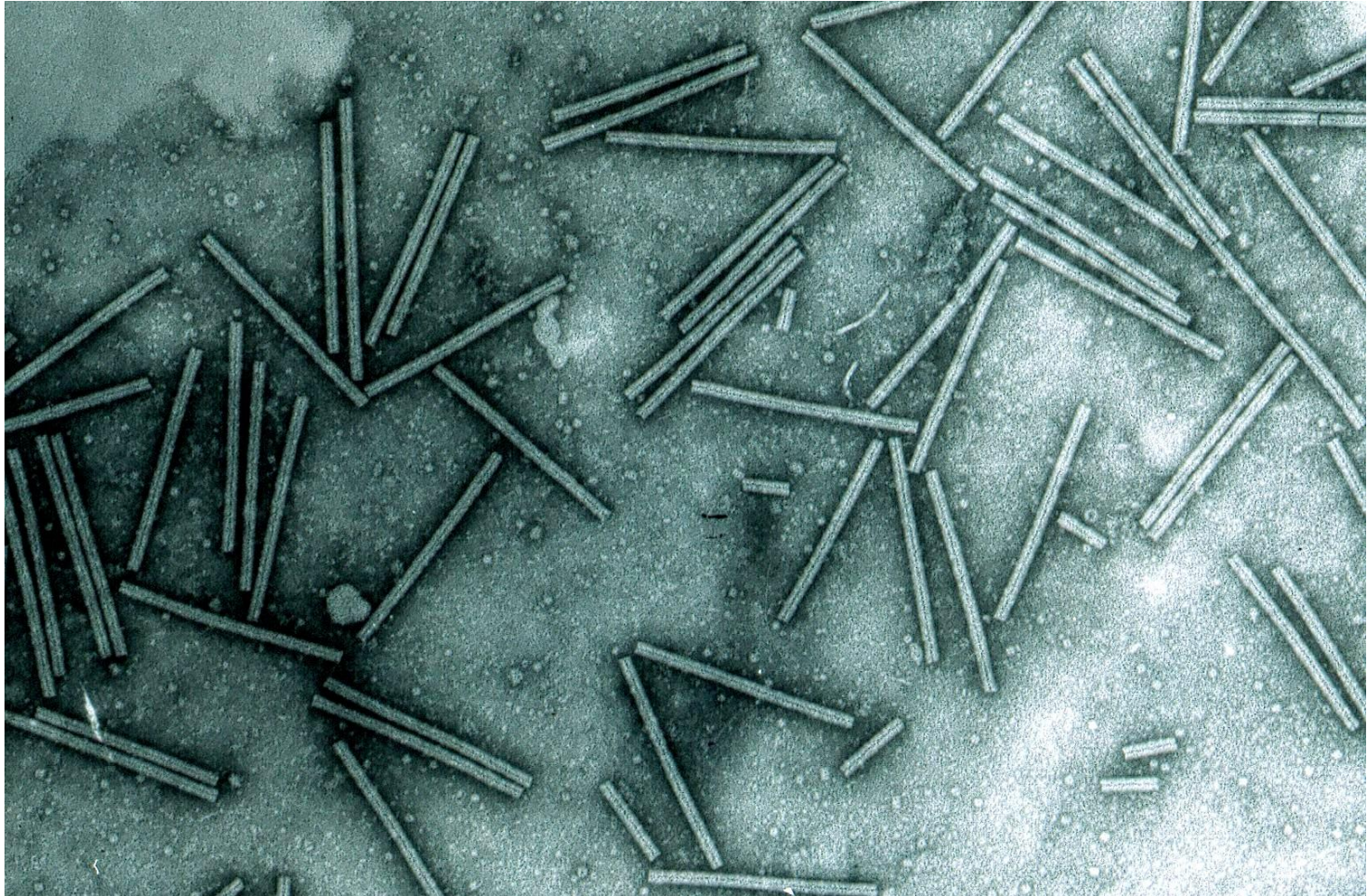
Ιοσωμάτια του GVA στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



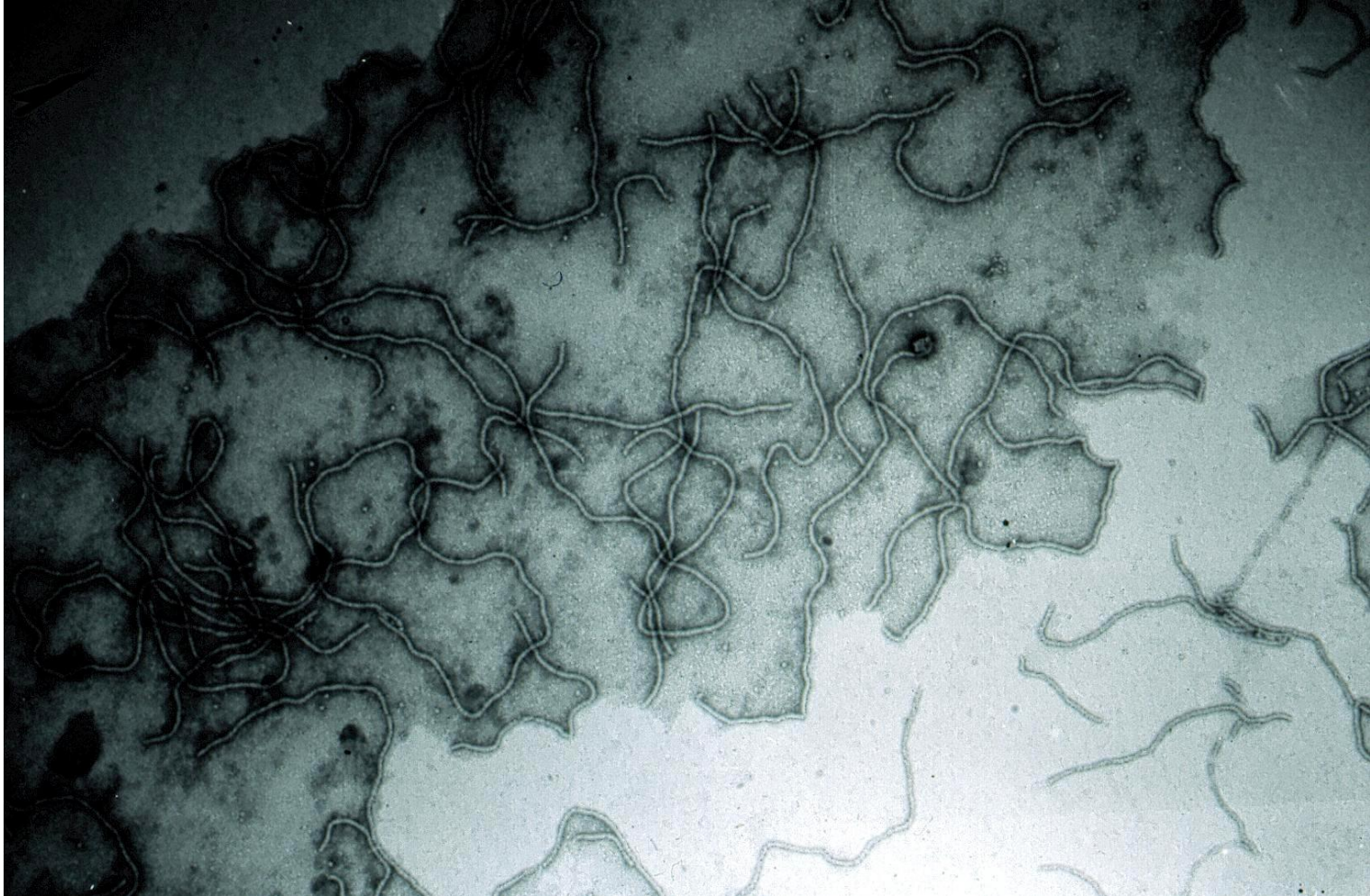
Ιοσωμάτια του MSV στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



Ιοσωμάτια του TMV στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



Ιοσωμάτια του ΒΥΝ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα ΗΜ

Πλεονεκτήματα

Ταχεία: 5 λεπτά

Απλή: δεν απαιτείται ιδιαίτερη εμπειρία

Άμεση γνώση μορφολογίας

Μειονεκτήματα

Υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης

Ειδικό τεχνικό προσωπικό

Όχι για διαγνώσεις ρουτίνας

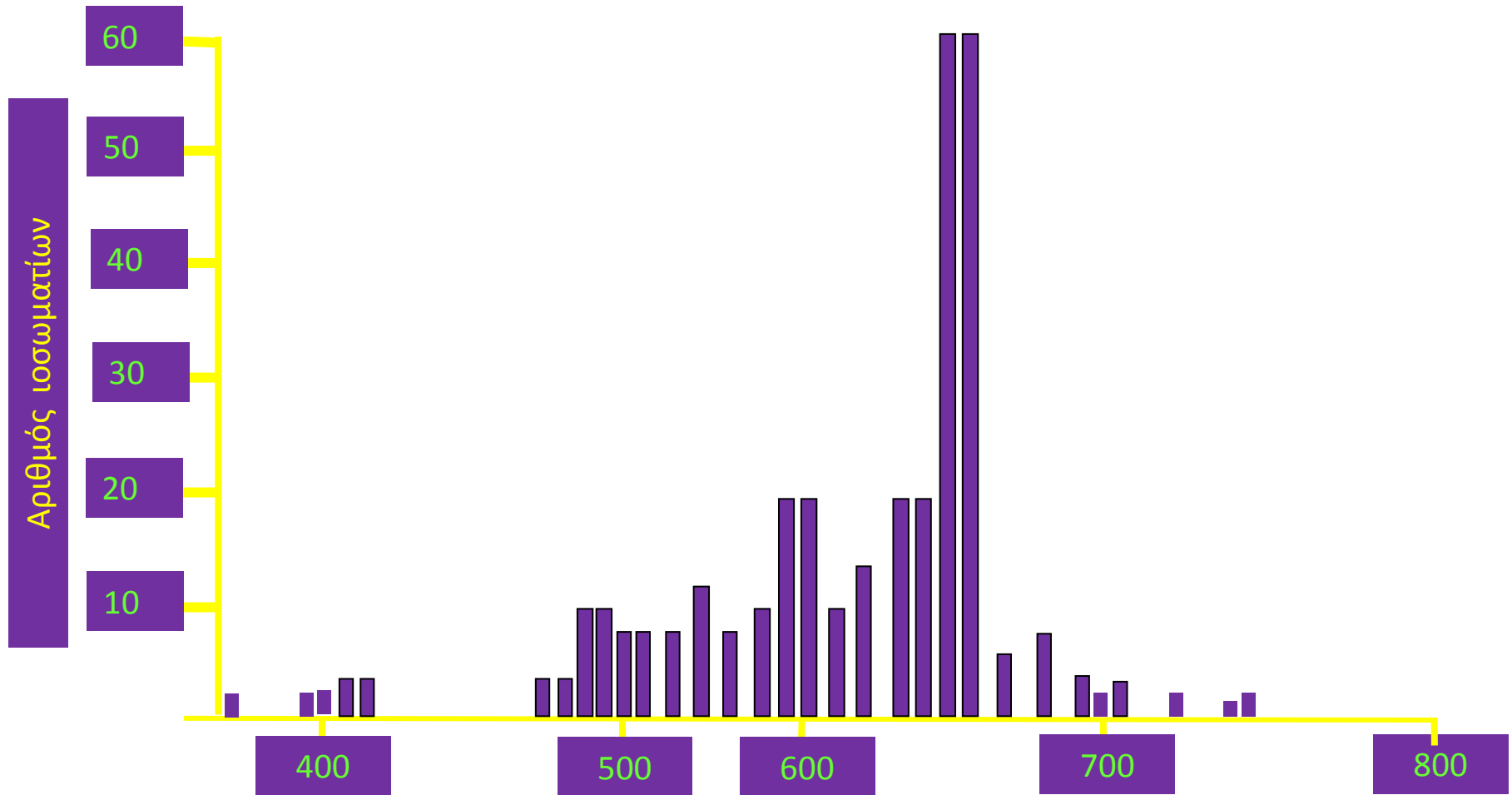


Εκτίμηση των διαστάσεων των ιοσωματίων

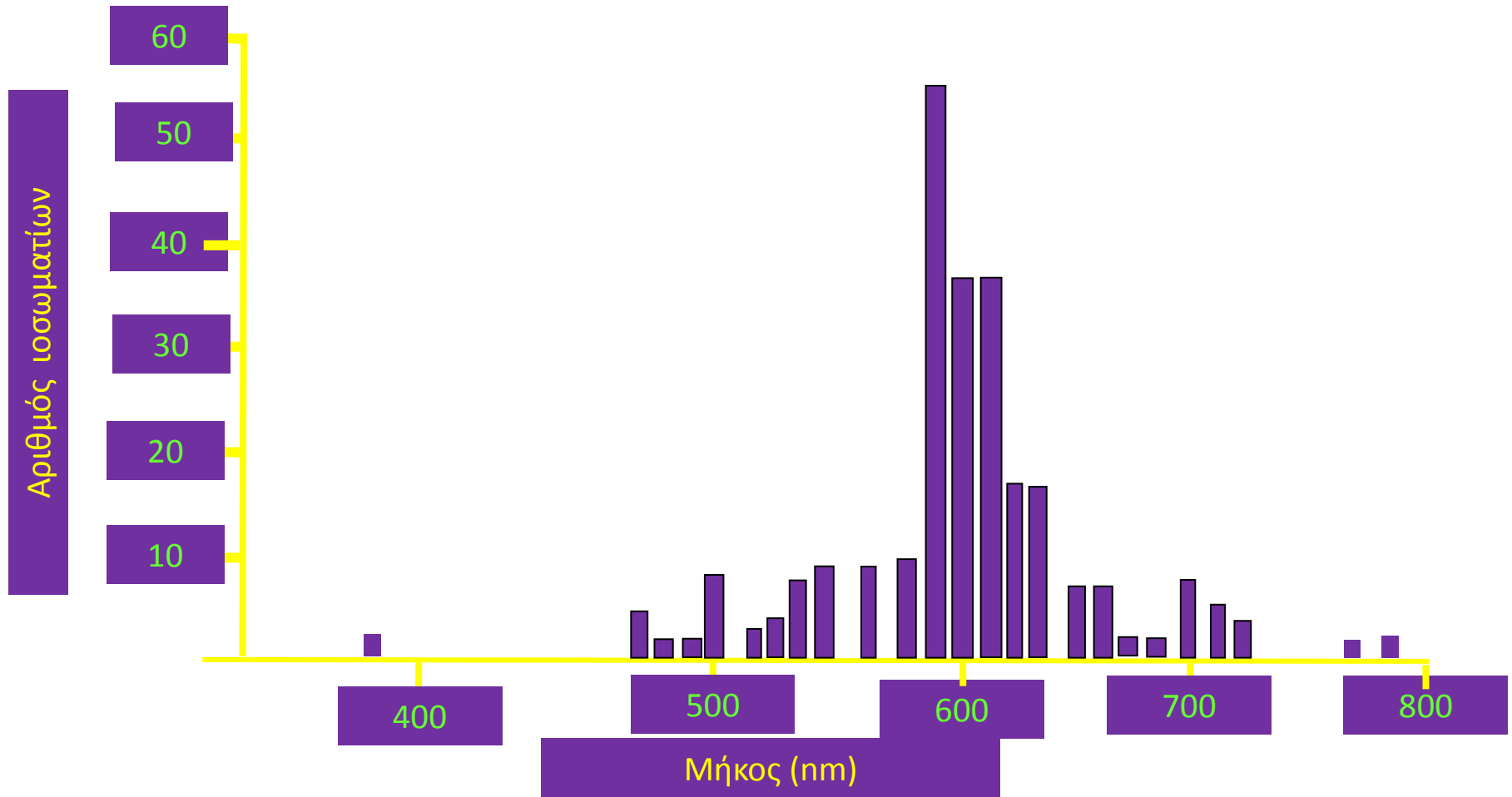
- Μεγεθύνσεις 100.000-200.000 για ακριβή μέτρηση των διαστάσεων.
- Η μορφολογία και το μέγεθος των ιοσωματίων επηρεάζεται από τη διαδικασία απομόνωσης (καθαρισμού) του ιού.
- Το μήκος των νηματοειδών ιών επηρεάζεται από την παρουσία ιόντων Mg^{2+} .
- Βαθμολόγηση της μεγέθυνσης του ΗΜ (TMV, κρύσταλλοι καταλάσης).
- Πρέπει να μετρηθούν τουλάχιστον 1000 ιοσωμάτια.



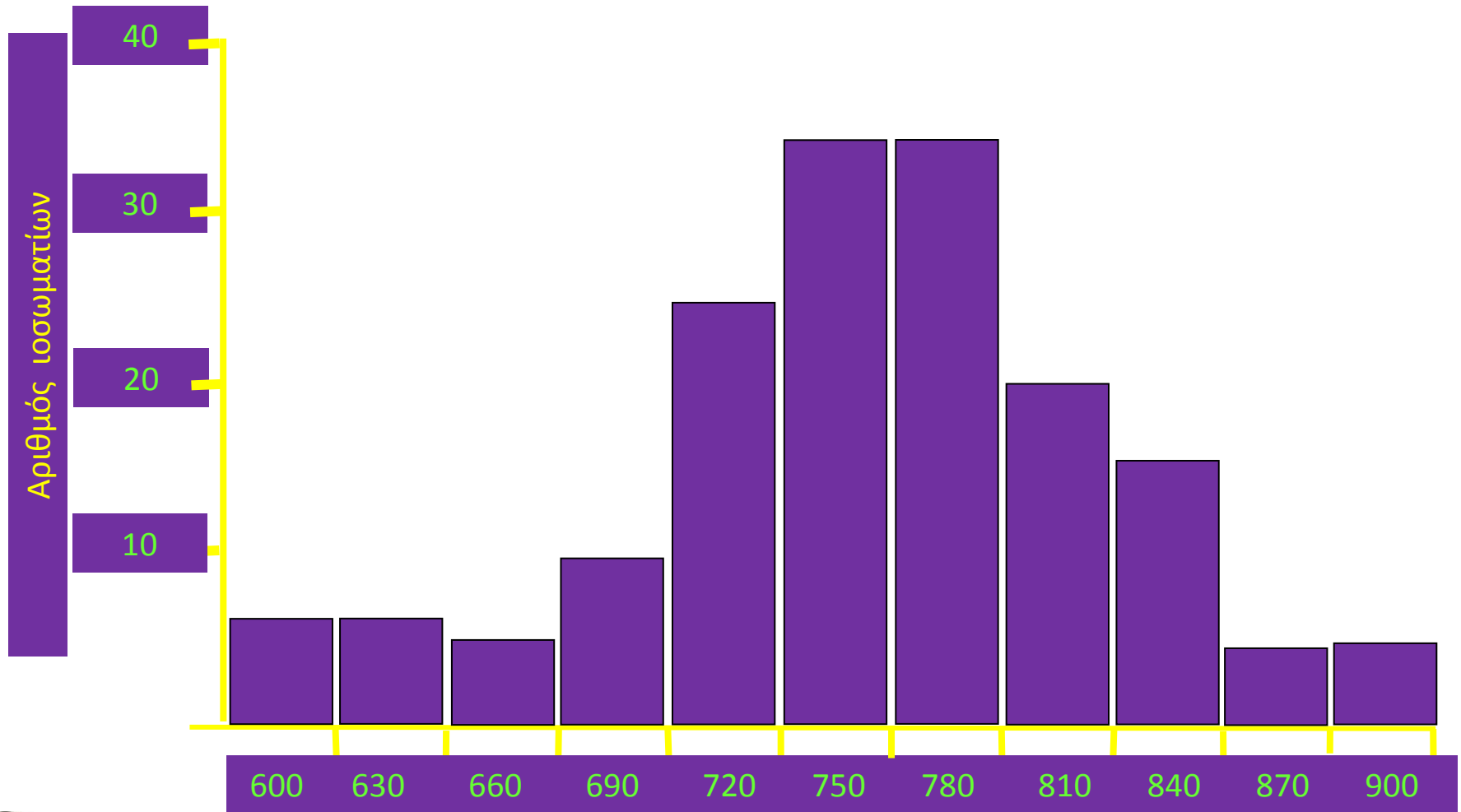
Κατανομή του μήκους ισωματίων του ιού T της πατάτας σε καθαρό παρασκεύασμα (χρώση με οξικό ουρανύλιο)



Κατανομή του μήκους ισωματίων του ιού T της πατάτας σε καθαρό παρασκεύασμα (χρώση με φωσφοροβολφραμικό οξύ, pH 6,0)



Η κατανομή του μήκους των ισωματίων του ιού του κίτρινου μωσαϊκού του σκόρδου





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Ορολογικές δοκιμές

Ορολογικές μέθοδοι (1)

Ανίχνευση ικών πρωτεϊνών.

- Ιικά ιοσωμάτια (καψιδιακή πρωτεΐνη).
- Μερικώς αποδομημένα ιοσωμάτια (πρωτεϊνικές υπομονάδες).
- Μη δομικές πρωτεΐνες (έγκλειστα σωμάτια Ροτυ-ιών).



Ορολογικές μέθοδοι (2)

- Η εφαρμογή τους εξαρτάται από τη χρήση αντισωμάτων που παράγονται συνήθως σε κουνέλια εναντίον δομικών πρωτεϊνών (ΚΠ).
- Χρησιμοποιείται είτε ακατέργαστος αντιορός ή καθαρή IgG.
- Θεωρητικά τα αντισώματα αντιδρούν μόνο με το ομόλογο αντιγόνο.



Ορολογικές μέθοδοι (3)

Εφαρμογές:

- Για τη διάγνωση ιών.
- Για τον προσδιορισμό της συγγένειας μεταξύ διαφορετικών ιών.
- Για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός ιού σε φυτικό εκχύλισμα/ιστό.
- Για τον εντοπισμό ενός ιού σε ιστούς ή κύτταρα ενός ξενιστή.
- Για τη μελέτη της δομής ενός ιού.



Αντιγόνο (Antigen) ή Ανοσογόνο

Κάθε «ξένο» (ουσία) μακρομόριο που μπορεί να επάγει ανοσοαπόκριση (παραγωγή αντισωμάτων) ή μπορεί να συμμετέχει σε ανοσολογικές αντιδράσεις.

Φύση Αντιγόνων

- Τουλάχιστον 2 επιτόπους.
- Μ.Β. >5.000.
- Χαρακτηριστική τριτοταγή δομή.
- Πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες.



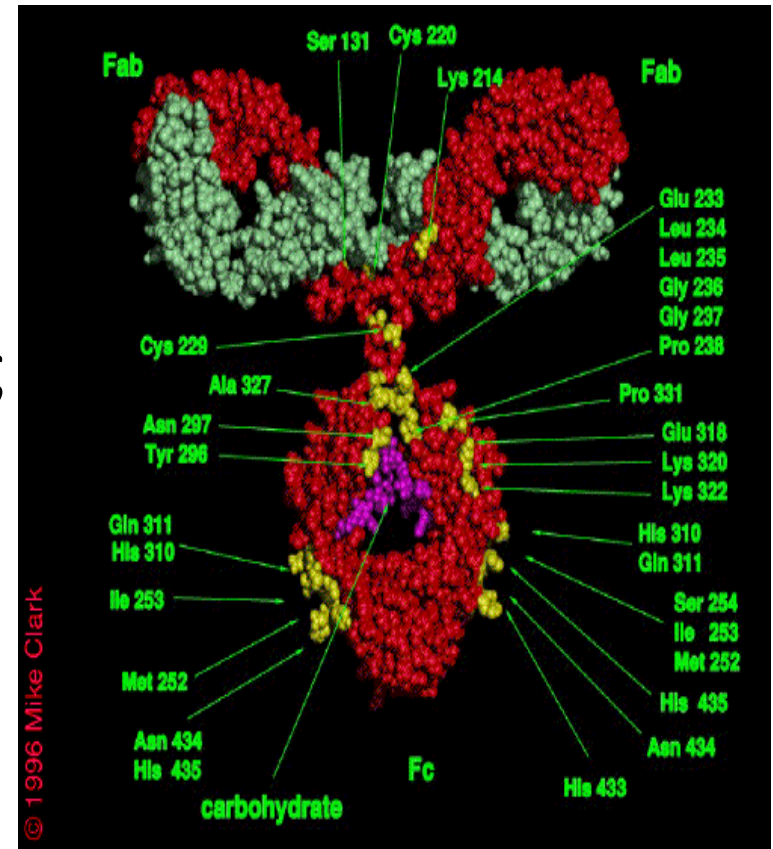
Αντιορός (Antiserum)

Ορός από κάποιο ζώο που περιέχει αντισώματα εναντίον κάποιου αντιγόνου (μικροοργανισμού/ιού).



Αντισώματα

Αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες (IgG) είναι πολυλειτουργικές γλυκοπρωτεΐνες που παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών σε απόκριση της παρουσίας «ξένου μορίου» στο σώμα και είναι ουσιώδη για την αντιμετώπιση μολύνσεων από μικροοργανισμούς.



Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει τις ακόλουθες ιδιότητες

- Μνήμη.
- Εξειδίκευση.
- Αναγνώριση των «ξένων».

Κυτταρική Ανοσία: μύκητες, παράσιτα, ιοί, καρκινικά κύτταρα, ξένοι ιστοί.

Χυμική Ανοσία: εξωκυτταρικά βακτήρια, ιοί.



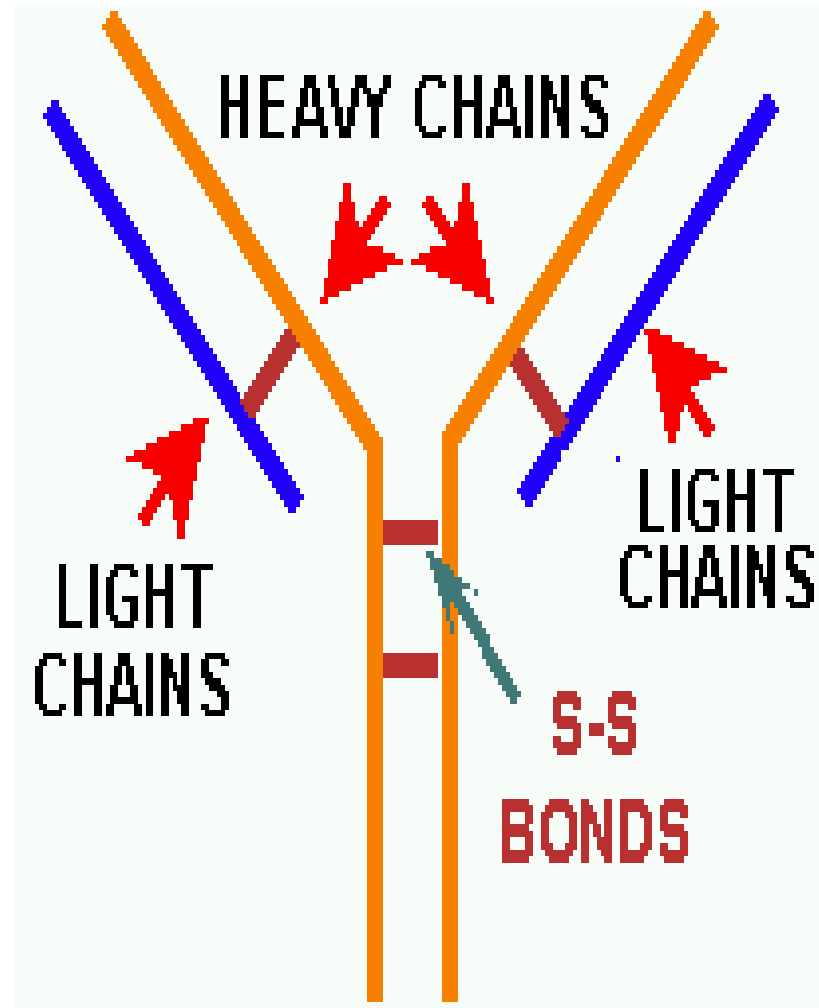
Επίτοποι ή αντιγονικοί καθοριστές

- Ειδικές περιοχές του αντιγόνου που συνδέονται εξειδικευμένα με τα ομόλογα αντισώματα.
- Ένα μόριο αντιγόνου μπορεί να διαθέτει πολλούς διαφορετικούς ή έναν επαναλαμβανόμενο επίτοπο.
- Παράτοπος: περιοχή του αντισώματος που συνδέεται με τον επίτοπο (αντιγόνο).



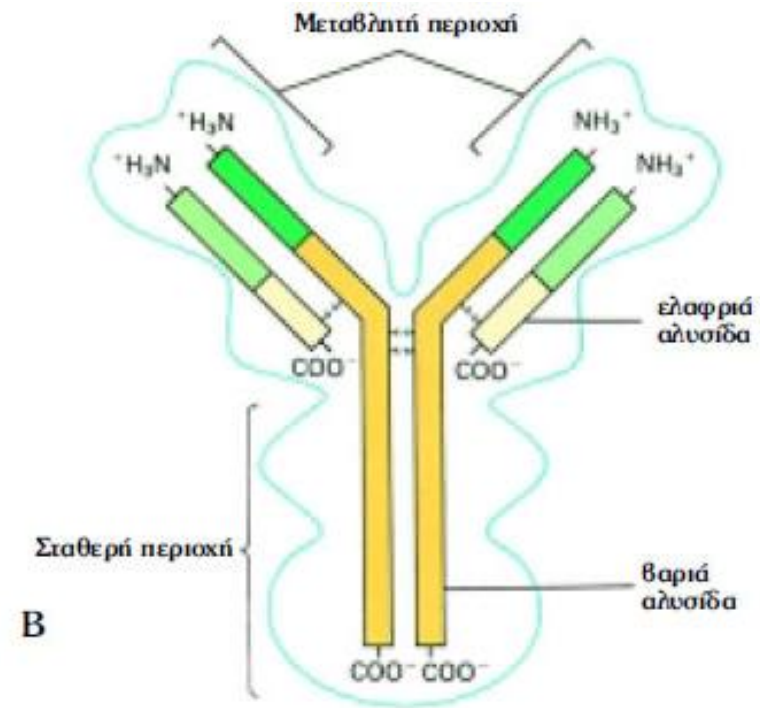
Μόριο IgG

Κάθε μόριο IgG αποτελείται από ελαφριές αλυσίδες MB 25 000, ταυτόσημων αλληλουχιών αμινοξέων και δυο βαριών MB 50 000 επίσης ταυτόσημων αλληλουχιών αμινοξέων. Οι ελαφριές αλυσίδες είναι συνδεδεμένες ομοιοπολικά με τις βαριές αλυσίδες με δισουλφιδικών δεσμών οι βαριές αλυσίδες είναι παρομοίως μεταξύ τους διαμέσου μιας ή περισσότερων δισουλφιδικών δεσμών.

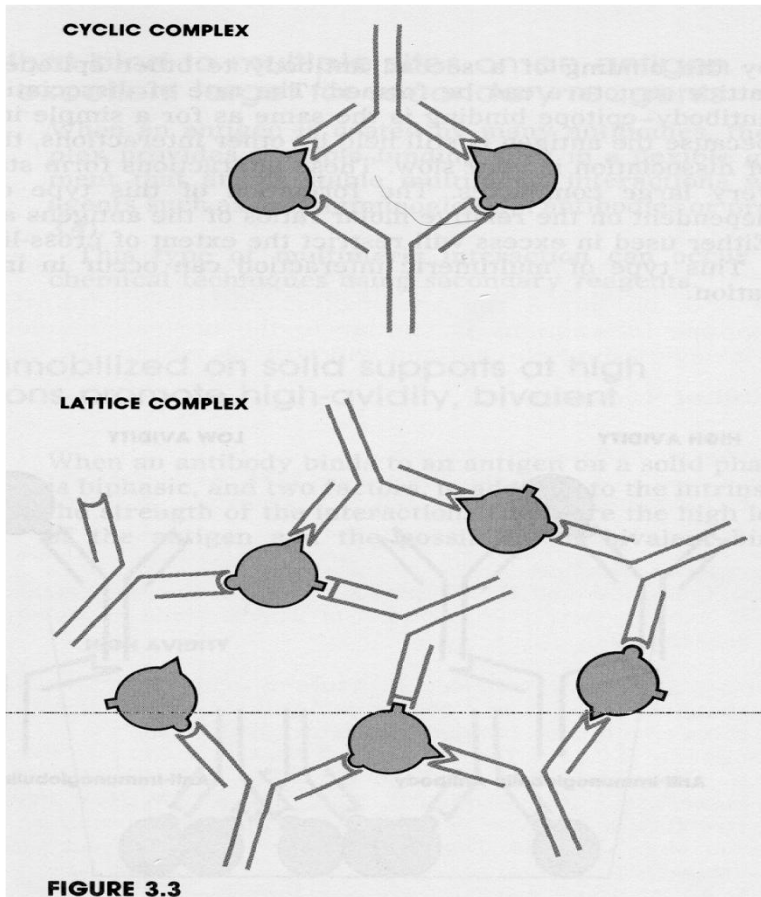


Το μόριο ενός αντισώματος

Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες που συνδέονται πολύ ισχυρά με τους στόχους τους (τα αντιγόνα). Παράγονται στα σπονδυλωτά ως άμυνα εναντίον των λοιμώξεων. Κάθε αντίσωμα αποτελείται από δύο ταυτόσημες ελαφριές αλυσίδες και δύο ταυτόσημες βαριές αλυσίδες. Επομένως, ταυτόσημες είναι και οι δύο θέσεις σύνδεσης με το αντιγόνο.



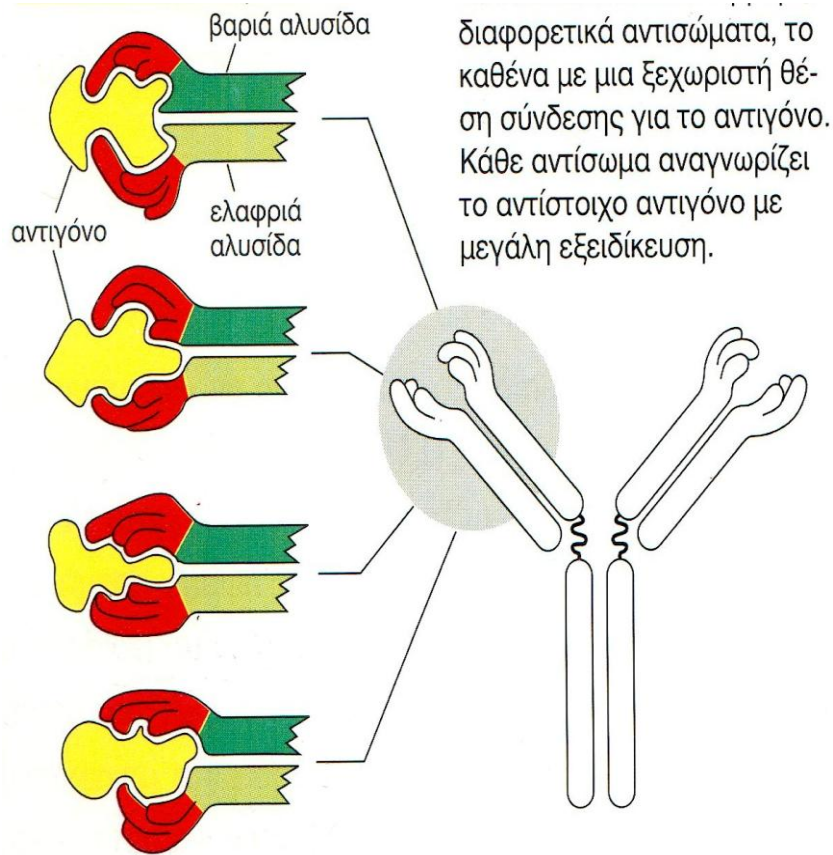
Σύμπλοκο Αντιγόνου-Αντισώματος



- Τα αντισώματα εκκρίνονται από τα Β-λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.
- Τα αντισώματα κυκλοφορούν μέσω του αίματος και του λεμφώματος όπου συνδέονται στο ειδικό αντιγόνο εναντίον του οποίου παρήχθησαν.
- Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος απομακρύνεται από την κυκλοφορία από τα μακροφάγα (φαγοκύτωση).
- Η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος είναι ειδική, και τα αντισώματα είναι σημαντικά στην ανοσολογική έρευνα και στην κλινική διαγνωστική.



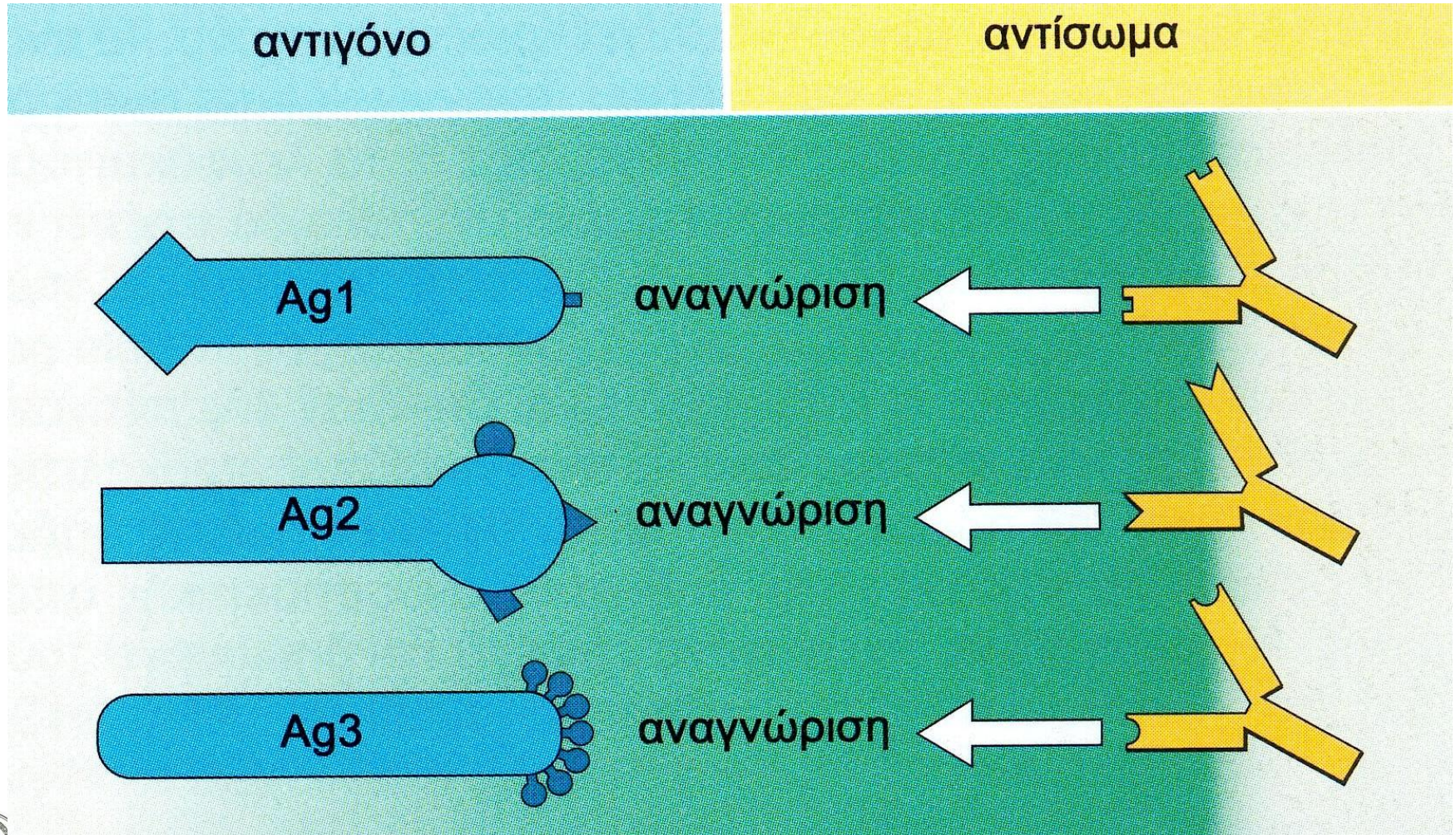
Εξειδίκευση των αντισωμάτων



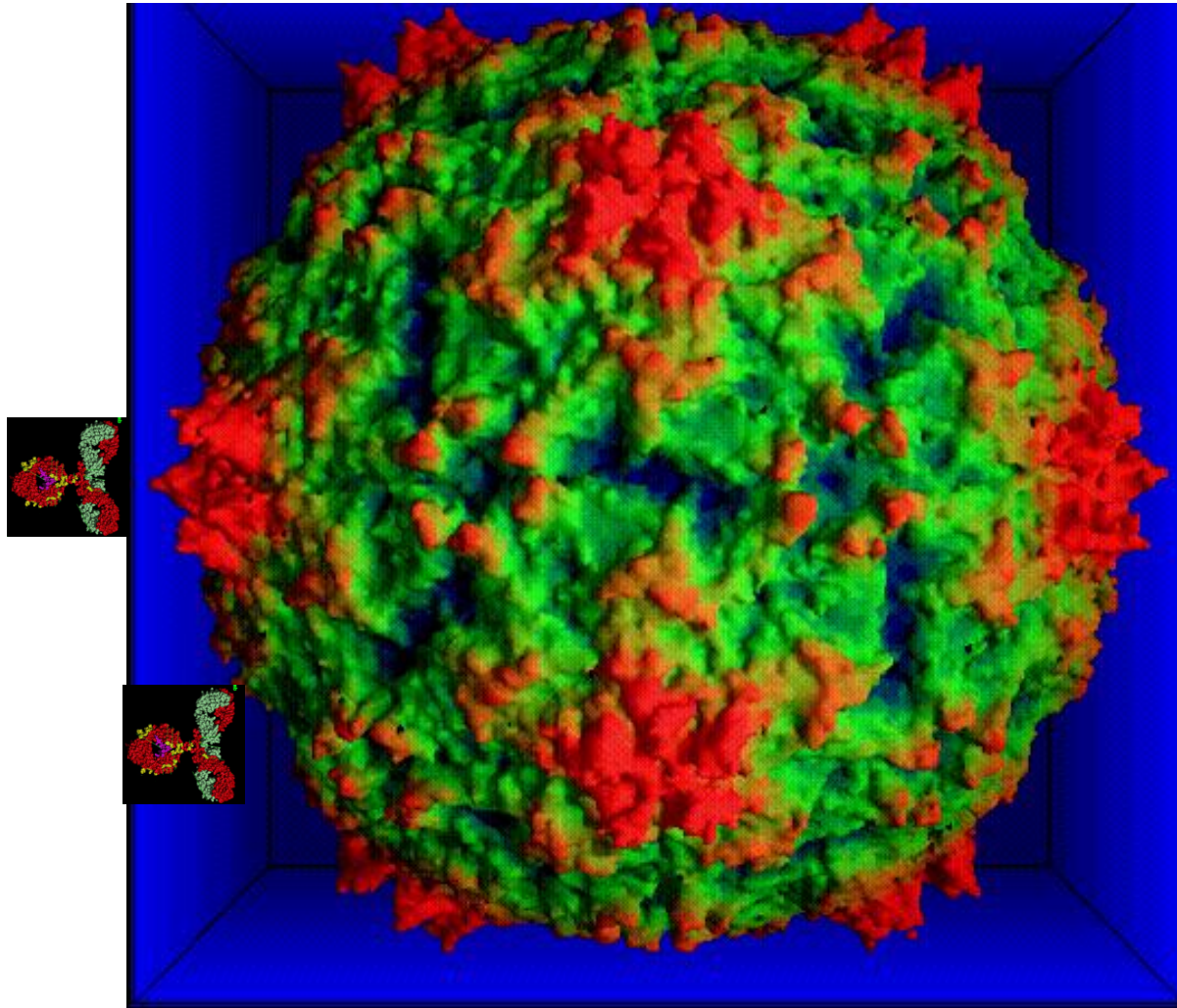
- Κάθε ζώο έχει τη δυνατότητα να συνδέσει δισεκατομμύρια διαφορετικά αντισώματα, το καθένα με μια ξεχωριστή θέση σύνδεσης για το αντιγόνο.
- Κάθε αντίσωμα αναγνωρίζει το αντίστοιχο αντιγόνο με μεγάλη εξειδίκευση.



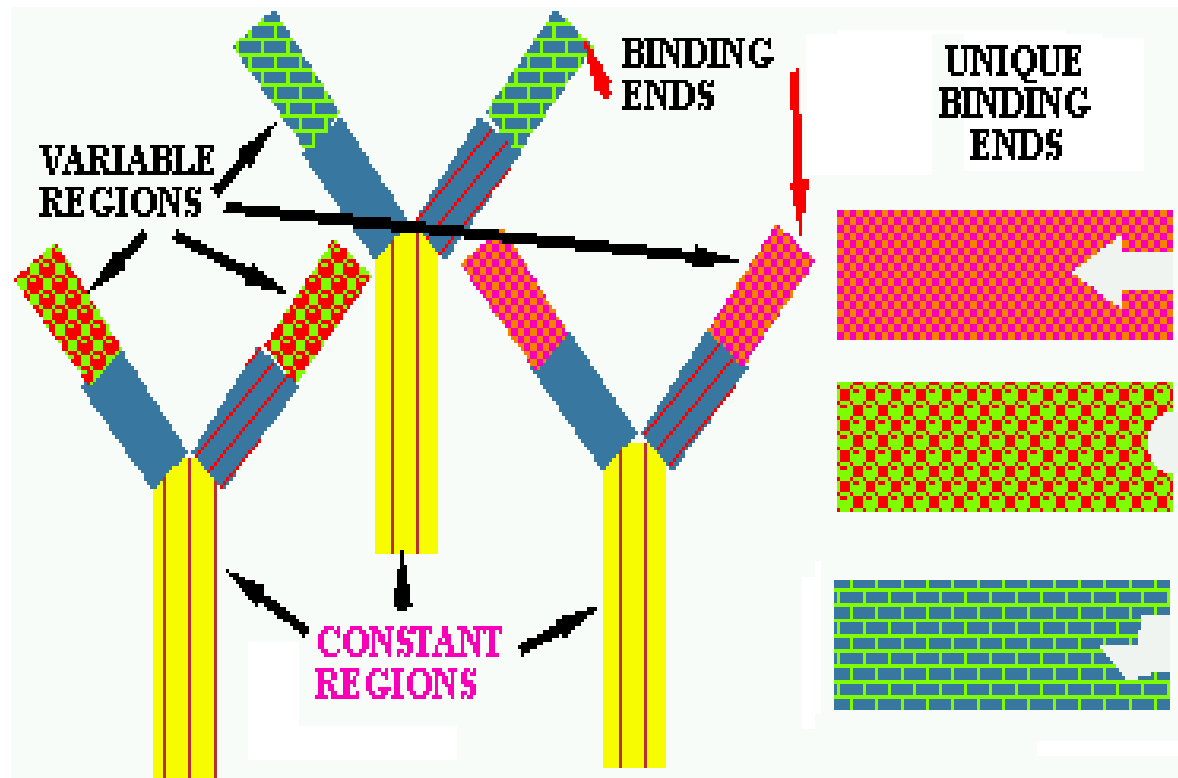
Αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος



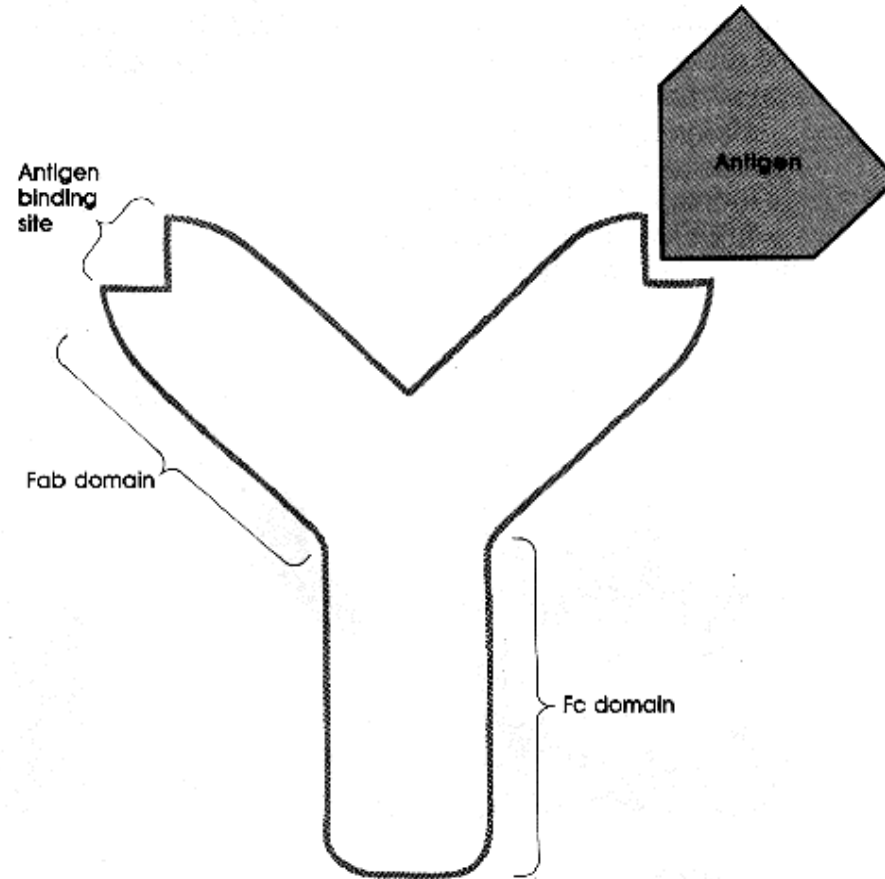
Southern Bean Mosaic Virus



Τρία μόρια αντισωμάτων IgG



Περιοχές αντισωμάτων



Antibody domains.



Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα

- Το κλάσμα ανοσογλοβουλίνης του ορού αποτελείται από ένα μίγμα αντισωμάτων εξειδικευμένα για το κάθε αντιγόνο στο οποίο έχουν εκτεθεί (προέρχονται από διαφορετικούς κλώνους κυττάρων).
- Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι αντισώματα μιας εξειδίκευσης καθώς προέρχονται έναν μόνο κλώνο κυττάρων.



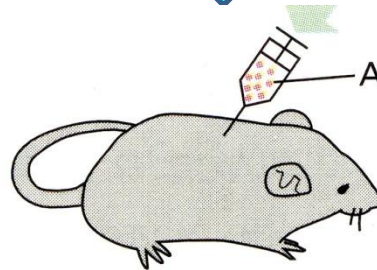
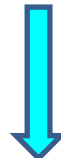
Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων σε ζώα (1)

- Ζώα που χρησιμοποιούνται:
 - Άλογα, ποντικοί, κουνέλια, κοτόπουλα, πρόβατα, κατσίκες.
- Διαδικασία ανοσοποίησης:
 - Πρωτόκολλα εμπειρικά.
 - Σειρά ενδομυϊκών ενέσεων (κάθε 2 εβδομάδες): 10-15.
- Ποσότητα αντιγόνου:
 - Συνήθως 1-10 mg (για κάθε ένεση).
 - BYDV: 200-350 μg (για κάθε ένεση).

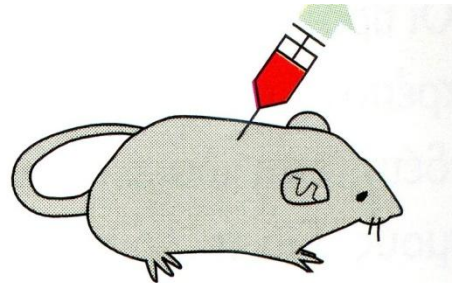


Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων σε ζώα (2)

Καθαρισμός ιού



ένεση αντιγόνου A



λήψη αίματος αργότερα

Πολυκλωνικά αντισώματα

- Παράγονται σε περιορισμένη ποσότητα.
- Η ποιότητά τους διαφέρει από κάθε αιμοληψία.
- Παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των κουνελιών που χρησιμοποιούνται.

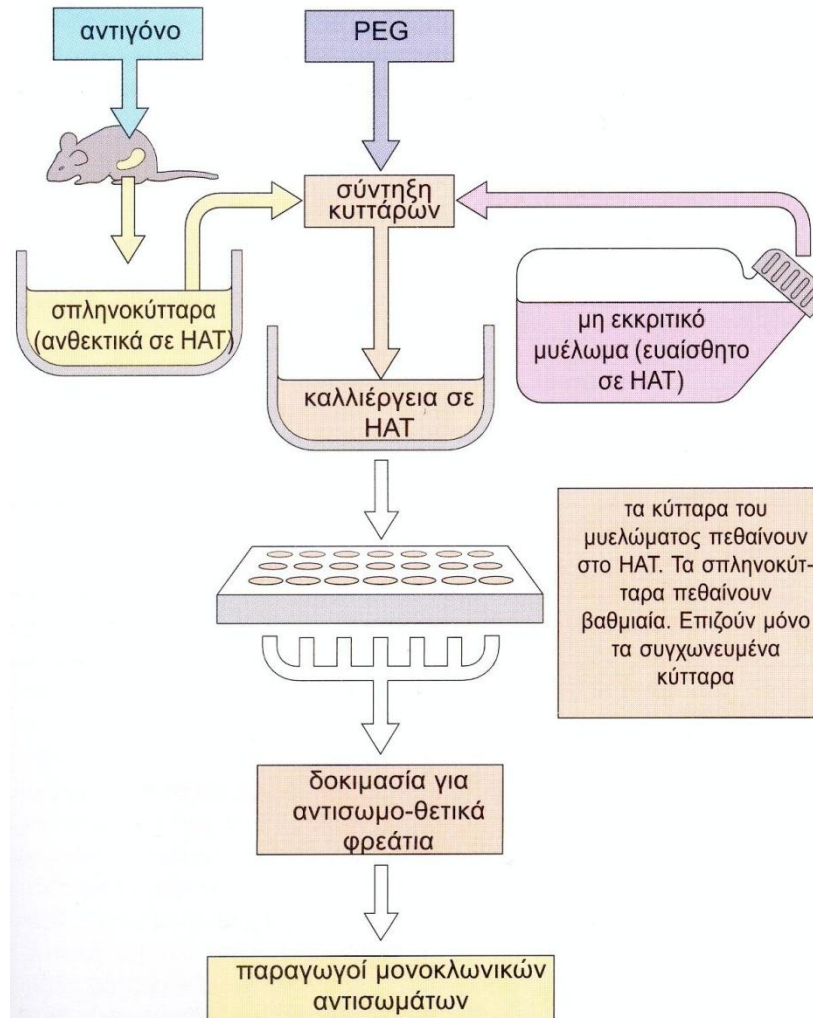


Διαδικασία παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων (1)

- Κάθε Β λεμφοκύτταρο συνθέτει μόνον ένα (άρα μονοκλωνικό: αντιδρά με έναν μόνο επίτοπο του αντιγόνου) αντίσωμα, το ζητούμενο είναι να αθανатоποιήσουμε και να πολλαπλασιάσουμε τα Β λεμφοκύτταρα.
- HAT (καλλιεργητικό μέσο): μίγμα υποξανθίνης, αμινοπτερίνης και θυμιδίνης.



Διαδικασία παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων (2)



Πλεονεκτήματα πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων

Μονοκλωνικά αντισώματα

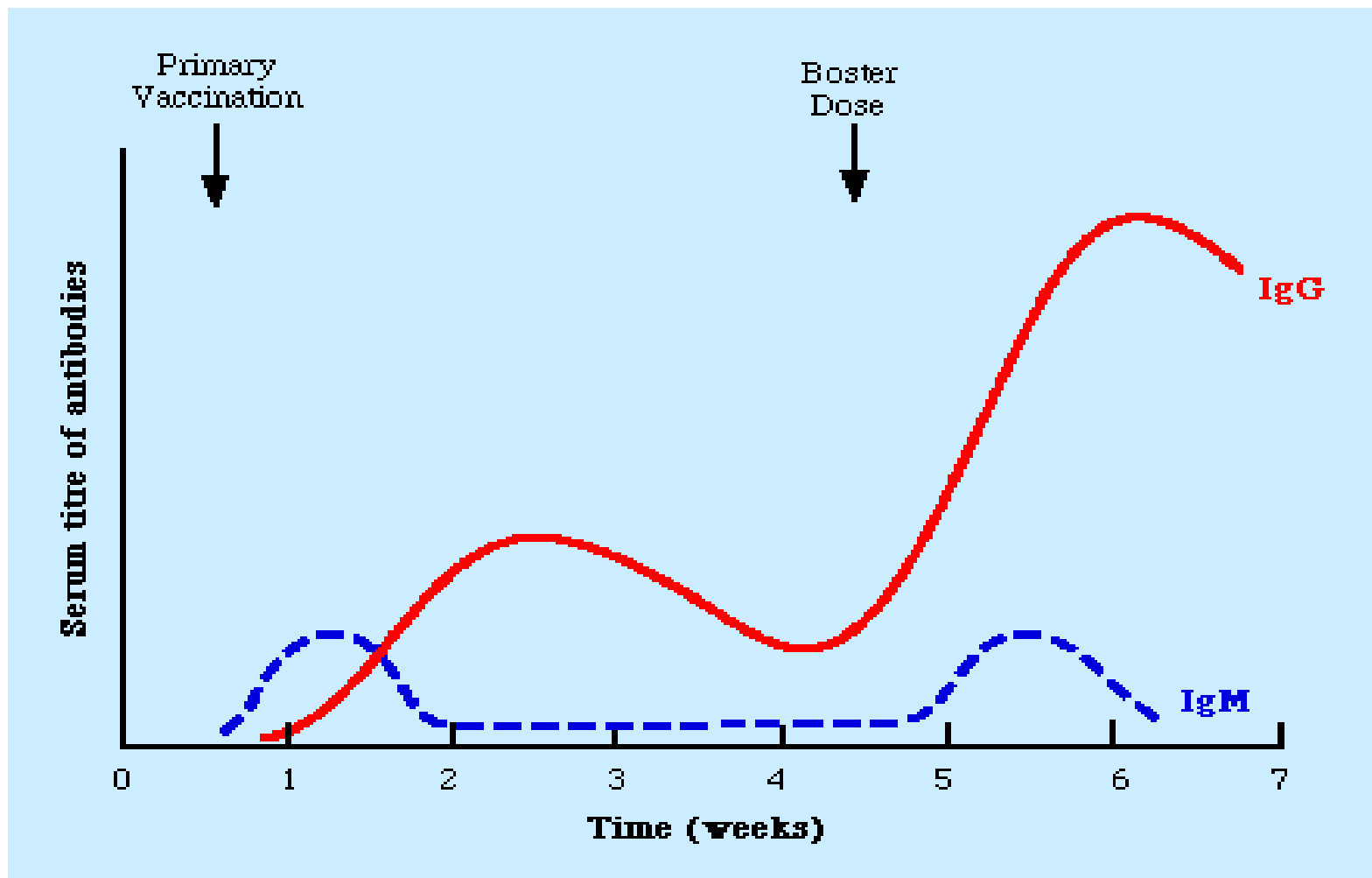
- Παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων.
- Υψηλή εξειδικευμένη.
- Ομοιογενείς παρτίδες.
- Μικρότερη ποσότητα αντιγόνου για ανοσοποίηση ($100\mu\text{g}$ ή $<$).
- Δεν απαιτείται καθαρισμός του αντιγόνου.
- Παραγωγή αντισωμάτων για ασυνήθη/σπάνια αντιγόνα.

Πολυκλωνικά αντισώματα

- Μεγαλύτερο εύρος αντίδρασης.
- Μεγαλύτερη σταθερότητα σε διάφορα pH και συγκεντρώσεις αλάτων.
- Δεν υπάρχει κίνδυνος απώλειας κλώνων.
- Απλή μεθοδολογία παραγωγής. Χαμηλότερο κόστος παραγωγής /αγοράς.



Επίπεδα IgG και IgM που ανιχνεύονται σε περιπτώσεις επαναμόλυνσης



Ορολογικές δοκιμές

- Δοκιμές συγκόλλησης σε δοκιμαστικό σωλήνα.
- Δοκιμασία διαφασικής ζώνης με δακτύλιο.
- Ανοσοδιάχυση σε πηκτή αγαρόζης.
- Δοκιμές συγκόλλησης.
- Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA.



Δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης (καθίζησης) σε δοκιμαστικό σωλήνα (1)

Μορφή ιζήματος

Νηματοειδείς



Θρομβώδες

Σφαιρικοί



Κοκκώδες



Δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης (καθίζησης) σε δοκιμαστικό σωλήνα (2)

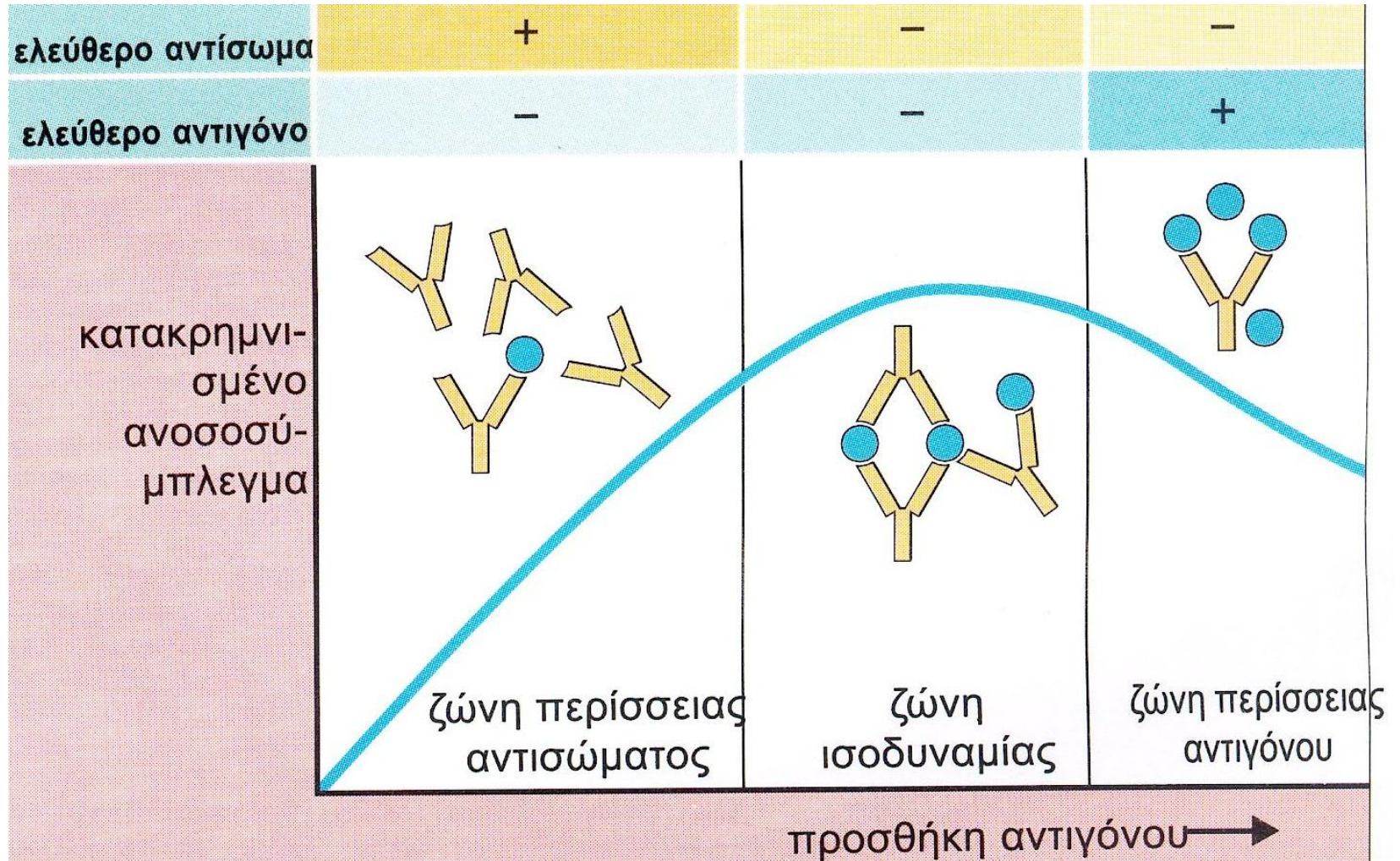
Περιορισμένη χρήση ως μέθοδος ανίχνευσης.

- Σπατάλη αντιορού.
- Μικρή ευαισθησία.

Εφαρμόζεται: **εκτίμηση** του
τίτλου
αντιορού και **αντιγόνου**.



Αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης



Ανοσοδιάχυση σε πηκτή αγαρόζης (1)

Πλεονεκτήματα

- Απλή.
- Σχετικώς οικονομική.

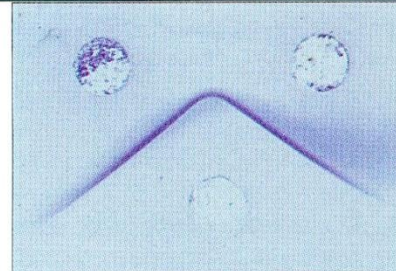
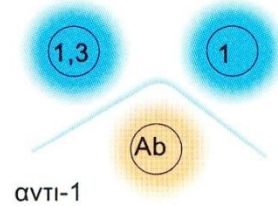
Μειονεκτήματα

- Περιορισμένης ευαισθησίας.
- Δυσκολία διάχυσης νηματοειδών ιών (διάσπαση με SDS, υπερήχους).

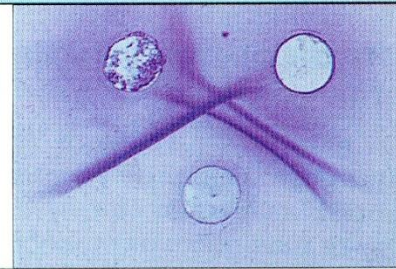
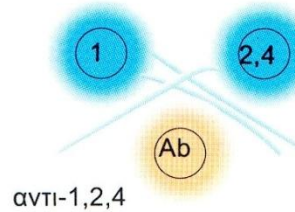


Ανοσοδιάχυση σε πηκτή αγαρόζης (2)

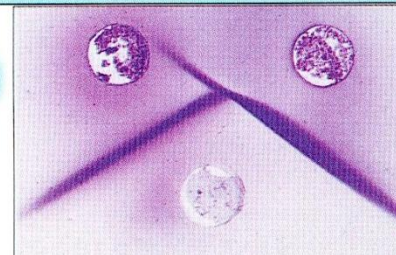
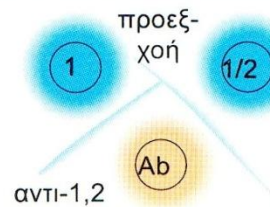
1. ταυτότητα



2. μη ταυτότητα



3. μερική ταυτότητα



Ανοσοενζυμικές Δοκιμές (Enzyme immuno-assays)

- Στις ανοσοενζυμικές δοκιμές η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος είναι απαραίτητη.
- Συνήθως ένα από τα δυο αντιδραστήρια ακινητοποιούνται σε μια σταθερή επιφάνεια όπως το πολυστηρένιο ή νιτροκυτταρίνη.
- Σήμανση της IgG με ένζυμο και προσθήκη υποστρώματος προκαλεί την παραγωγή χρώματος (συνήθως κίτρινο).
- Στις δοκιμές ELISA η αντίδραση εκτελείται σε μικροπλάκες σε διάλυμα των αντιδραστηρίων.



Ανοσοενζυμική δοκιμή (ELISA)

ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay

1. Coat wells with first (primary) antibody



3. Add sample
4. Wash wells



5. Add second (detection) antibody
6. Wash wells



7. Add detection reagent



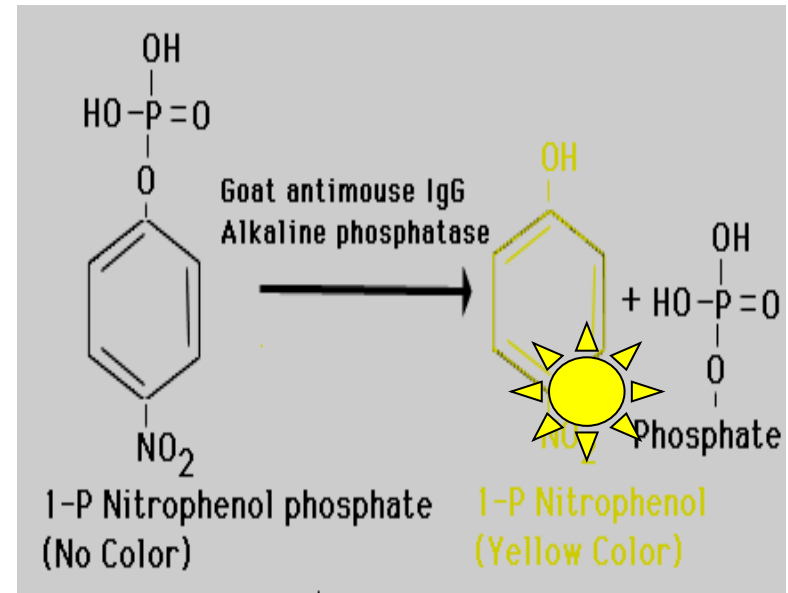
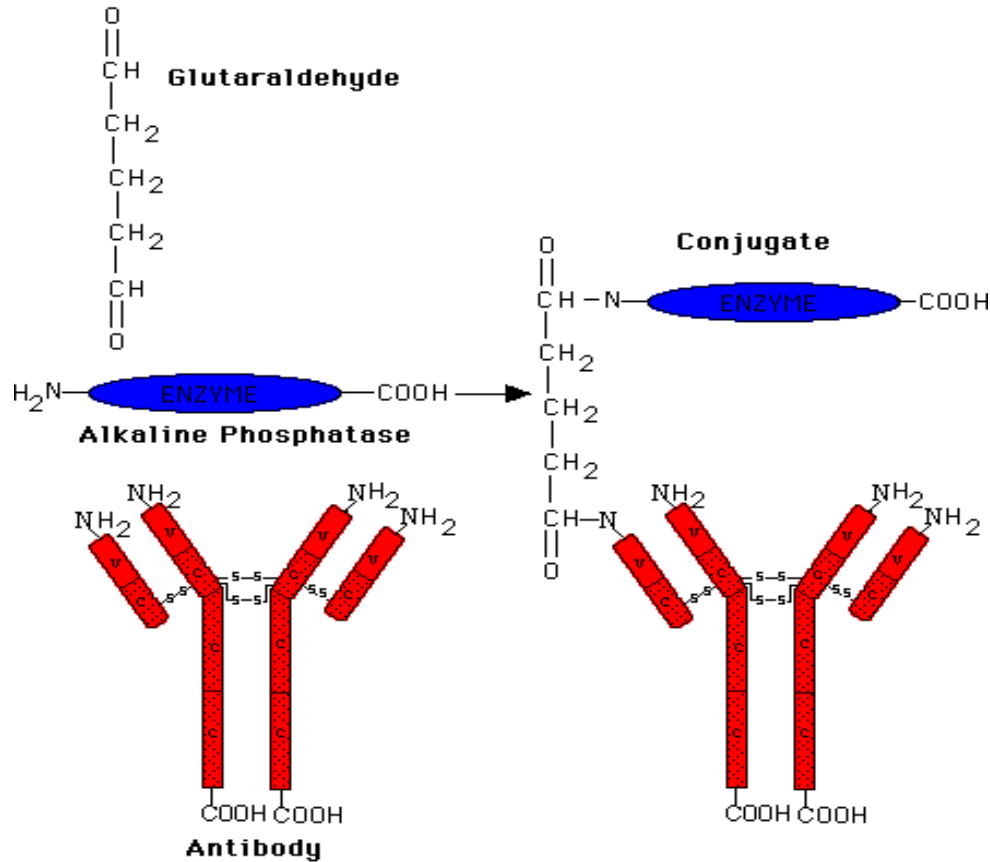
Σύζευγμα ενζύμου-αντισώματος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του αντιγόνου (1)

- Σε όλες τις δοκιμές ELISA ένα αντιδραστήριο είναι σημασμένο με ένα ένζυμο που διασπά χημικώς ένα άχρωμο υπόστρωμα και σχηματίζεται χρώμα.
- Το πιο κοινό ένζυμο είναι η αλκαλική φωσφατάση και υπόστρωμα το PNPP.



Σύζευγμα ενζύμου-αντισώματος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του αντιγόνου (2)

Binding of an enzyme to an antibody



Πλεονεκτήματα της ELISA (1)

- Υψηλή ευαισθησία (1-10 ng/ml αντιγόνου).
- Ταχύτητα (συνήθως 6-24 ώρες).
- Δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης του αντιγόνου.
- Δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε ελέγχους ρουτίνας.
- Ανίχνευση ιών σε φυτικό εκχύλισμα ή/και καθαρό παρασκεύασμα.
- Εξειδίκευση (διαφοροποίηση οροτύπων).



Πλεονεκτήματα της ELISA (2)

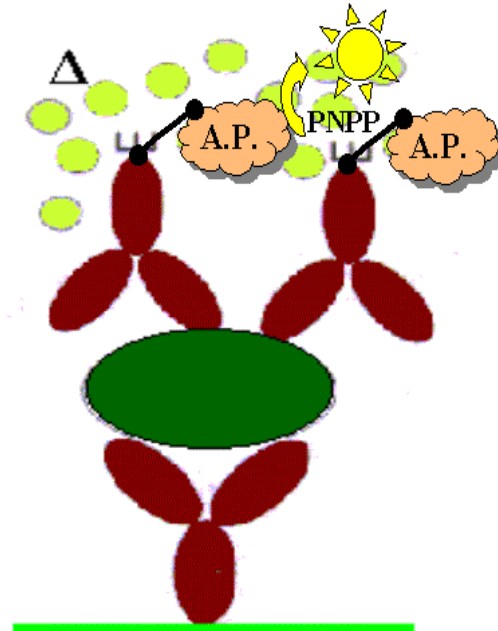
- Ανίχνευση τεμαχισμένων ή άθικτων ιοσωματίων.
- Ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης ενός αντιγόνου.
- Δυνατότητα αυτοματοποίησης και παραγωγής kit.
- Χαμηλό κόστος ανά δείγμα και μακρόχρονη διατήρηση των αντιδραστηρίων.
- Δεν απαιτείται ακριβός εξοπλισμός.
- Χρήση μικρών ποσοτήτων αντιορού.



Double Antibody Sandwich-ELISA (DAS-ELISA) Άμεση μέθοδος

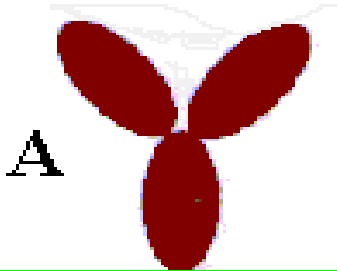
Το σημασμένο
αντίσωμα (IgG)
αντιδρά άμεσα με το
συνδεδεμένο
αντιγόνο.

DAS - ELISA
Add substrate (PNPP, p-nitrophenolphosphate)

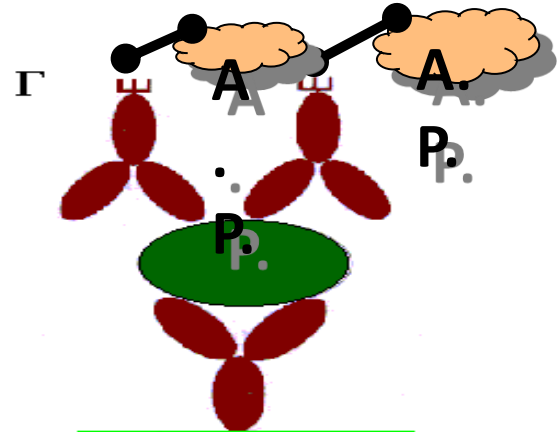


Άμεση ELISA (DAS – ELISA)

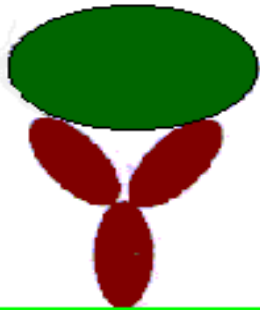
Προσθήκη IgG



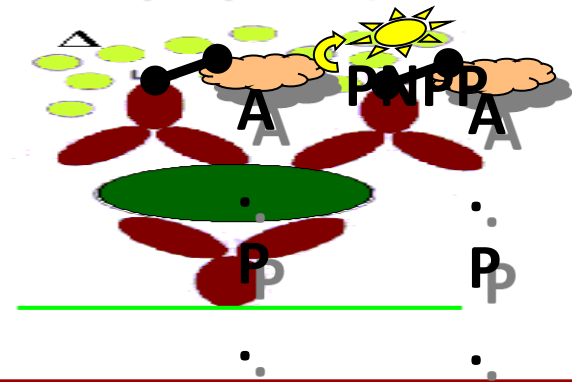
Συζευγμένη IgG



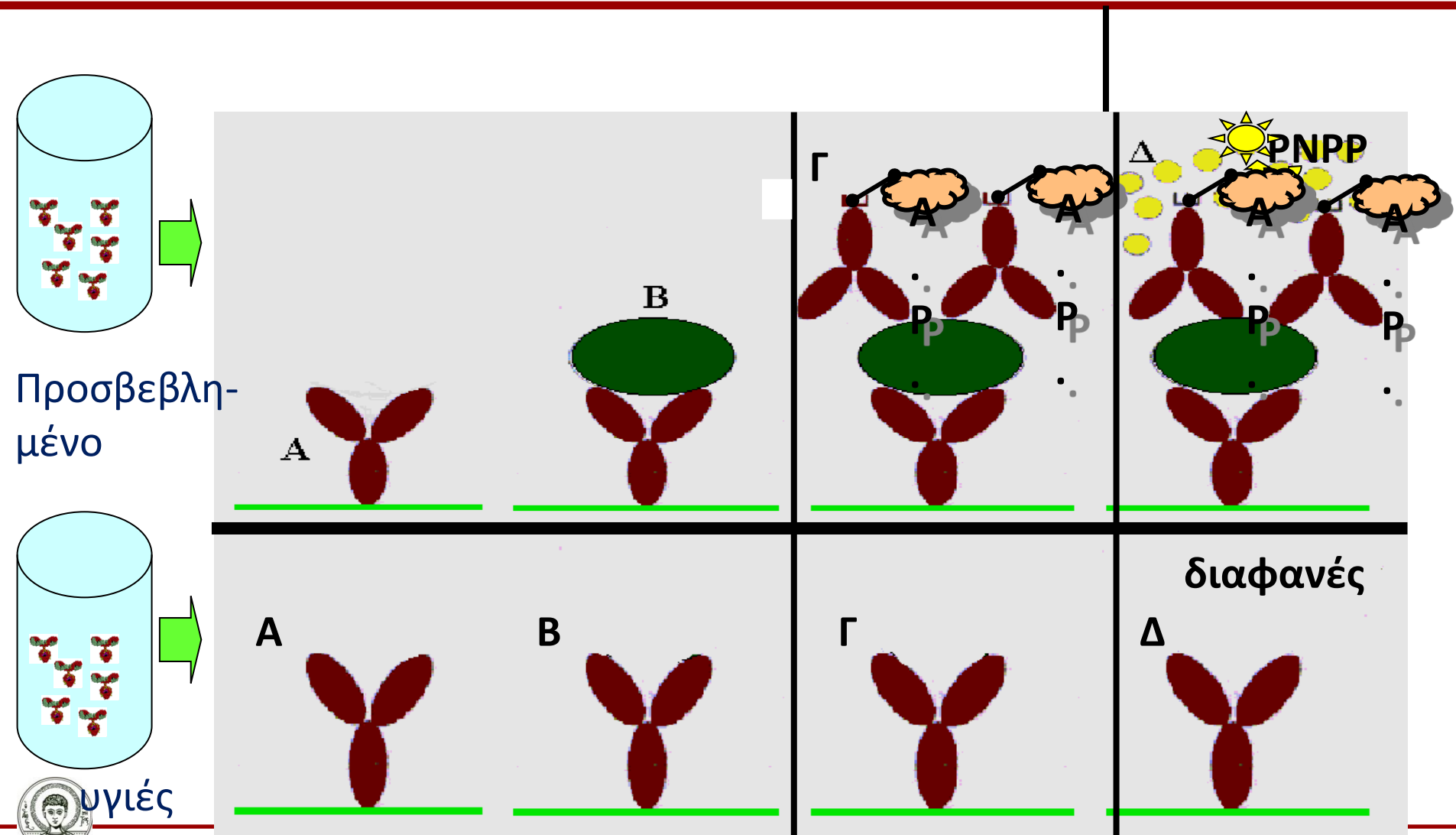
Προσθήκη
αντιγόνου
B



Προσθήκη
υποστρώματος



DAS – ELISA



Ιολογία Φυτών

Τμήμα Γεωπονίας



Υγιές

Άμεση μέθοδος

Πλεονεκτήματα

- Ταχεία μεθοδολογία καθώς χρησιμοποιείται μόνο ένα αντίσωμα.

Μειονεκτήματα

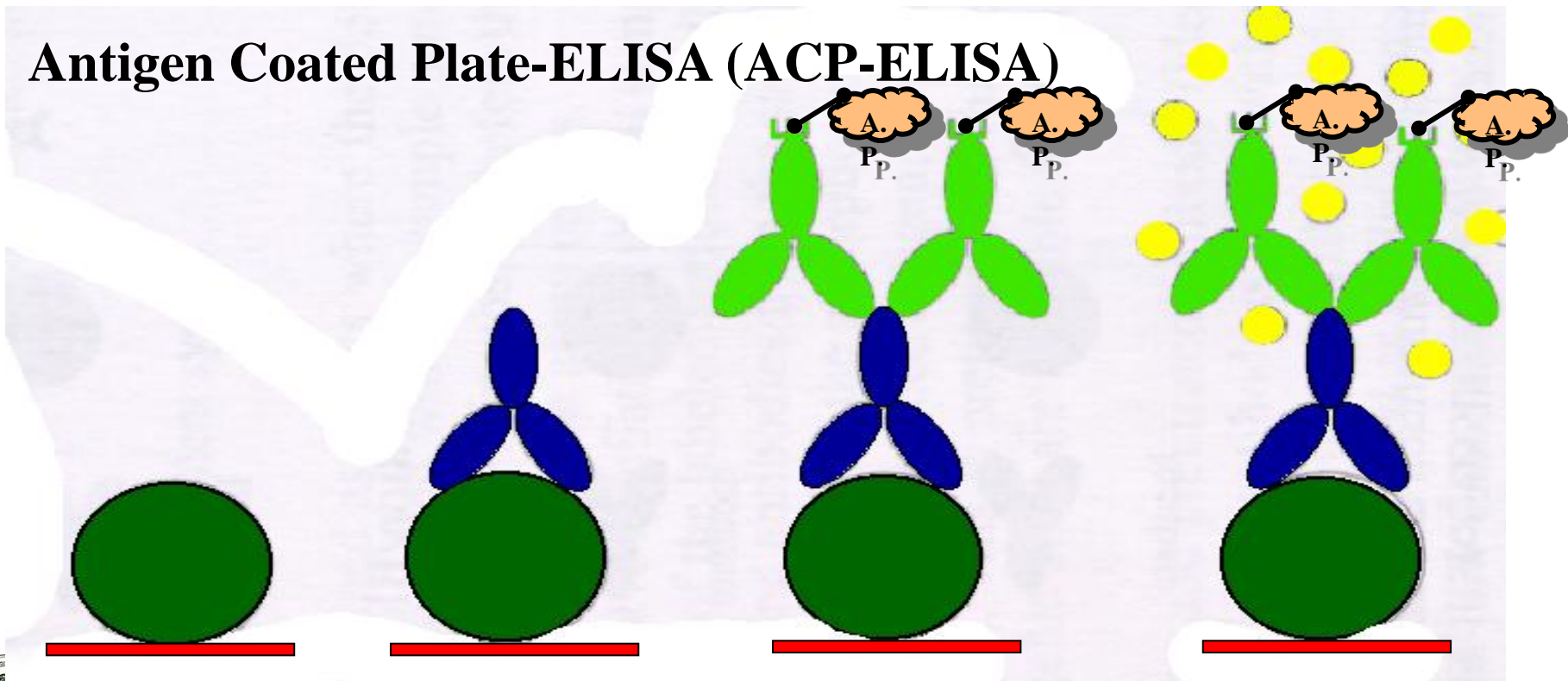
- Απαιτεί την προετοιμασία για κάθε ιό νέου συζεύγματος.
- Παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση.



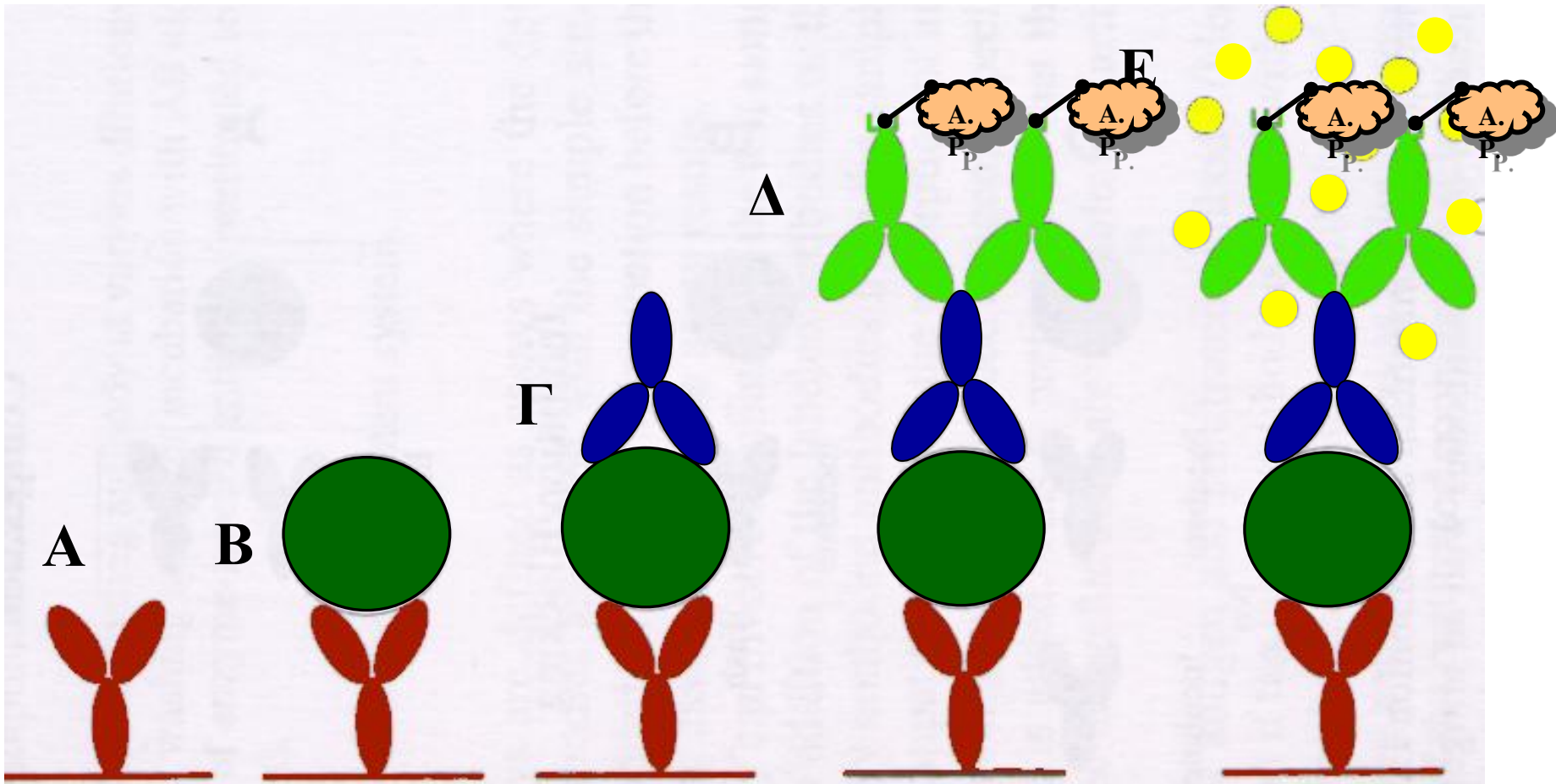
Έμμεση ELISA (Indirect ELISA)

Η έμμεση μέθοδος έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της άμεσης.

Antigen Coated Plate-ELISA (ACP-ELISA)



Triple Antibody Sandwich-ELISA (TAS-ELISA)



Ερμηνεία αποτελεσμάτων

- οπ (οπτική πυκνότητα) διπλάσια της οπ της μέσης οπ του υγιούς μάρτυρα ($2x$).
- οπ (οπτική πυκνότητα) διπλάσια της οπ της μέσης οπ του υγιούς μάρτυρα ($2x$) + διπλάσιο της τυπικής απόκλισης ($2x(-) + 2sx$).



Διασταυρωτή αντίδραση (cross reaction)

- Αντισώματα που παράγονται κατά ενός αντιγόνου μπορεί να προσδένονται και με άλλα, δομικά παρόμοια, αντιγόνα.



Ετερόλογα αντισώματα



Ανίχνευση ιών στον αγρό

(on site testing, DeTector TM, in field detection)

- Καλλιεργητές.
- Τεχνικούς Φυτωριακών μονάδων.
- Συμβούλους (consultants).
- Εξασφαλίζει:
 - Ταχεία (10-15 min).
 - Αξιόπιστη διάγνωση.

Εφαρμογές: PVX, PVA, PVY, PVS, PVV, PPV (CSL, HRI).





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Μέθοδοι συνδυασμού ορολογικών δοκιμών και ΗΜ

Μέθοδοι συνδυασμού ορολογικών δοκιμών και ΗΜ

- Ανοσοπροσροφητική ηλεκτρονική μικροσκοπία (Immunosorbent electron microscopy, ISEM).
- Διακόσμηση (Decoration).



Παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Ειδικός αντιορός (xx)



Πλέγμα καλυμμένο με άνθρακα

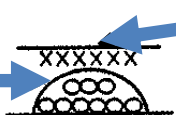
Ειδικός αντιορός (xx)



Πλέγμα καλυμμένο με άνθρακα

Ασθενούς φυτού εκχυλισμα (oo)

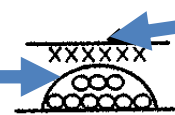
Επώαση



Πλέγμα καλυμμένο με αντοορό

Ασθενούς φυτού εκχυλισμα (oo)

Επώαση



Πλέγμα καλυμμένο με αντοορό

Επώαση προσθήκη αρνητικής χρώσης

Πλέγμα+ αντιορός+ ιός



Αρνητική χρώση

Επώαση

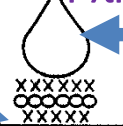
Ειδικός αντιορός



Πλέγμα+ αντιορός+ιός

Επώαση Αρνητική χρώση

Πλέγμα+ αντιορός+ ιός



Αρνητική χρώση

Παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ΜΕΘΟΔΟΣ ISEM

Παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ΜΕΘΟΔΟΣ DECORATION



Μέθοδος ISEM

Εφαρμόζεται για:

- Την ανίχνευση ιών που απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (πιο ευαίσθητη από την απλή ΗΜ).
- Τον έλεγχο μικρού αριθμού δειγμάτων.
- Την επιβεβαίωση αποτελεσμάτων της ELISA.



Μέθοδος Decoration

Εφαρμόζεται για:

- Την ταυτοποίηση άγνωστων ιών.
- Τον έλεγχο μικρού αριθμού δειγμάτων.
- Την επιβεβαίωση αποτελεσμάτων της ELISA.



Πλεονεκτήματα μεθόδου Decoration

- Εύκολη αξιολόγηση αποτελέσματος.
- Ευαίσθητη (παρόμοια της ELISA).
- Αποφυγή μη ειδικής προσκόλλησης φυτικών ουσιών στο πλέγμα.
- Χρησιμοποίηση αντιορού χωρίς καθαρισμό ή σύζευξη με ένζυμο.
- Χρησιμοποίηση αντιορού χαμηλού τίτλου.



Μειονεκτήματα μεθόδου Decoration

- Αδυναμία εντοπισμού ιικών δομών μικρότερων της Δ.Ι. του Η.Μ.
- Μερικές φορές δεν δουλεύει.
- Απαιτεί Η.Μ. (υψηλό κόστος).
- Δύσκολη η ποσοτική εκτίμηση του ιού.



Ιοσωμάτια του ήπιου μωσαϊκού του κριθαριού μετά από “decoration” με ομόλογα αντισώματα

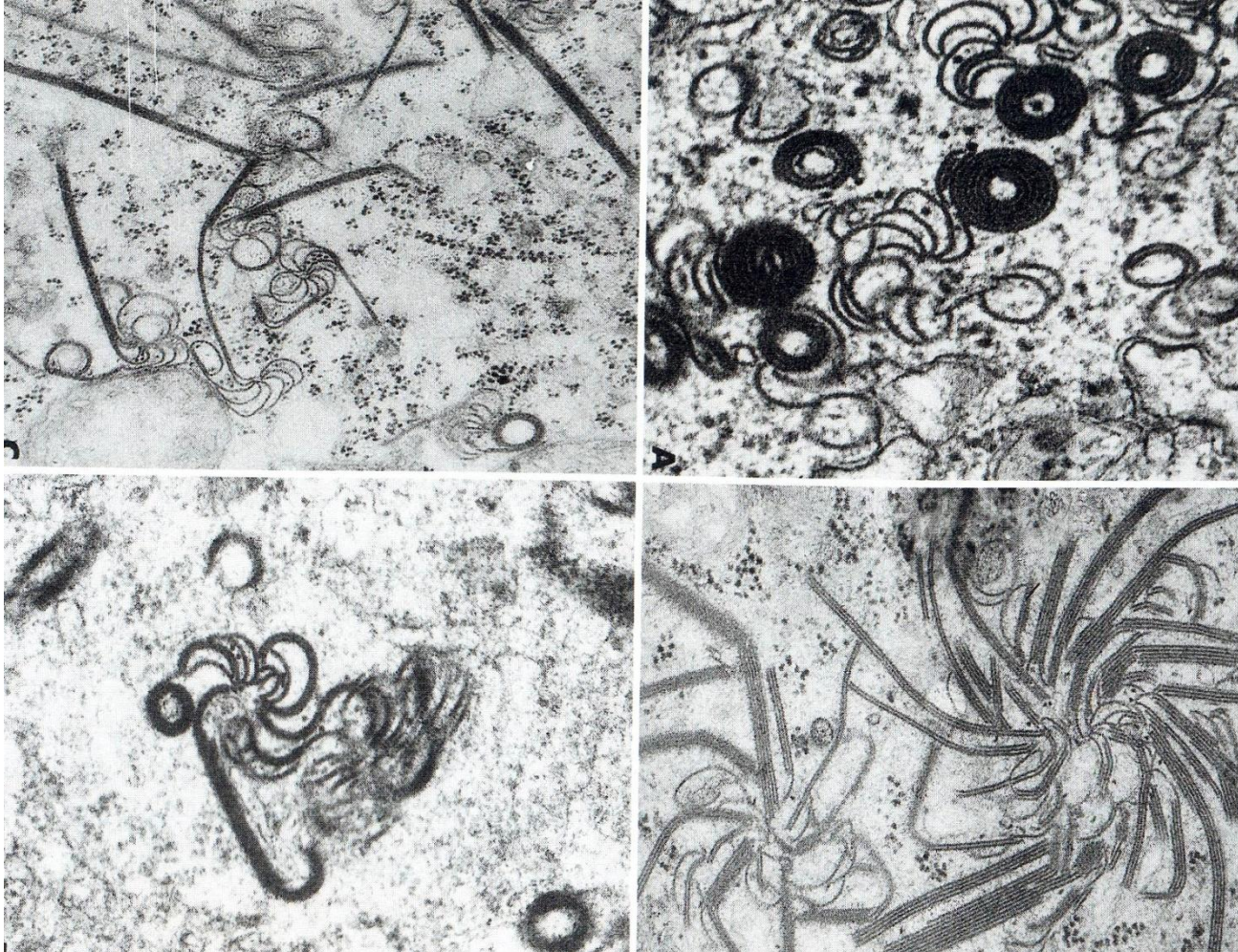


Κυτταρικές Μεταβολές

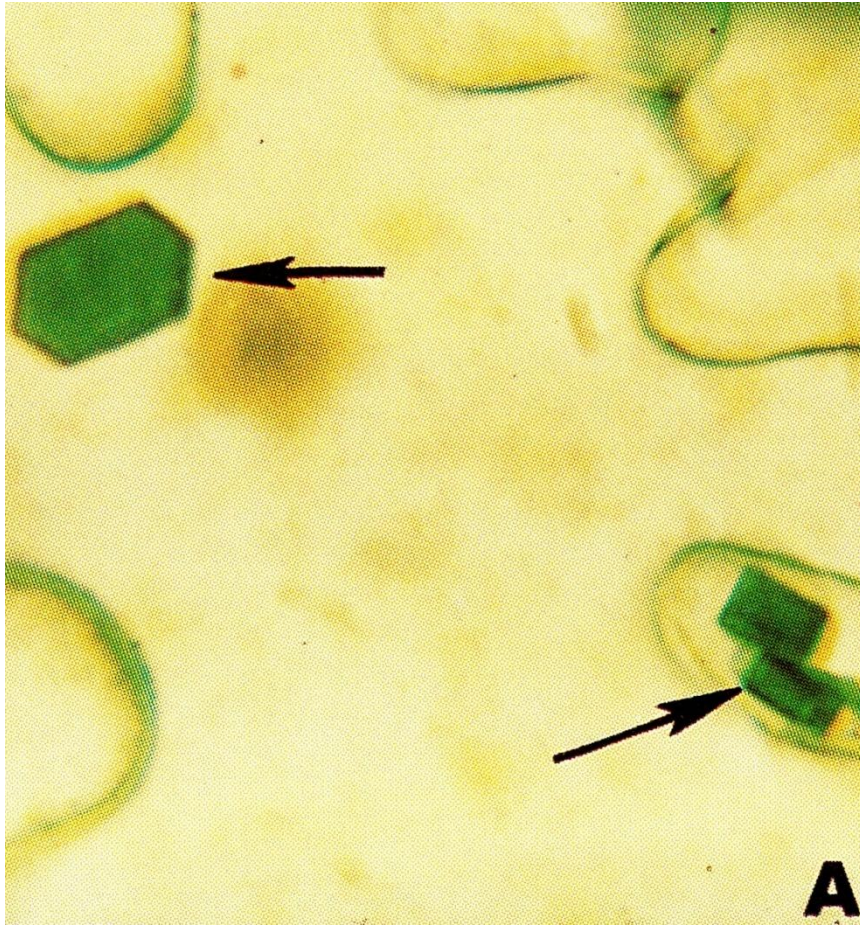
- Κυττοπλασματικά κυτταρικά έγκλειστα (γένος Potyvirus).
- Κρυσταλλικά έγκλειστα (TMV, BYMV).
- Κυττοπλασματικά έγκλειστα συσσωματωμάτων ιοσωματίων (TSWV).



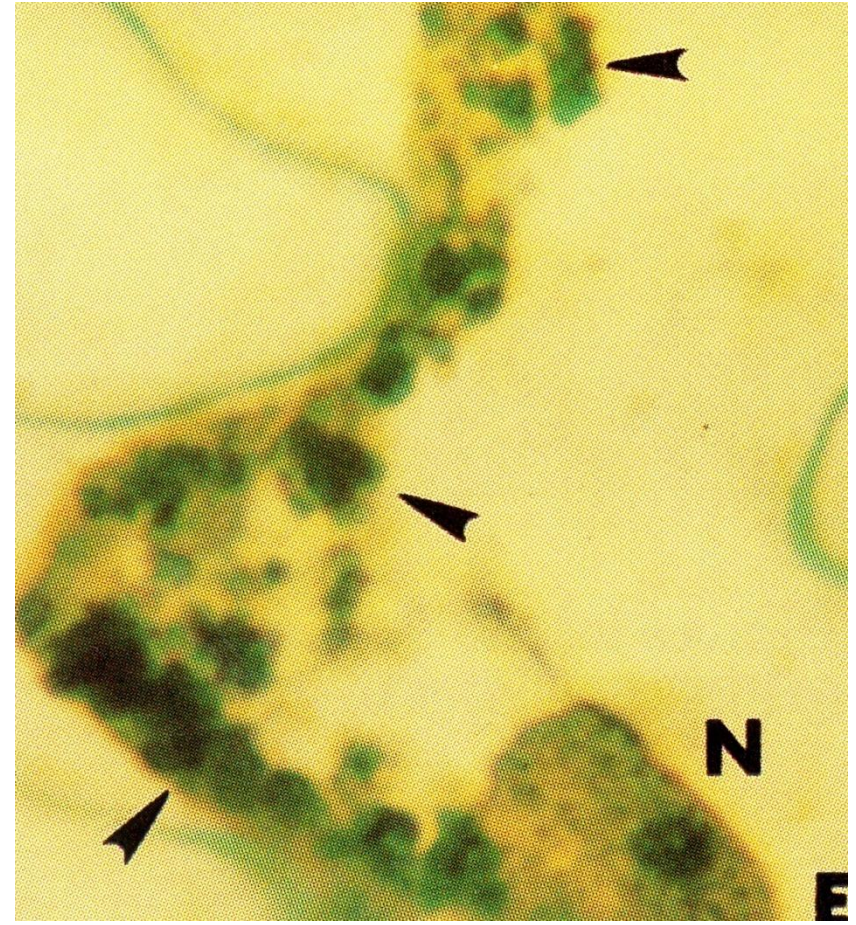
Κυττοπλασματικά κυτταρικά έγκλειστα (γένος Potyvirus)



Κρυσταλλικά έγκλειστα

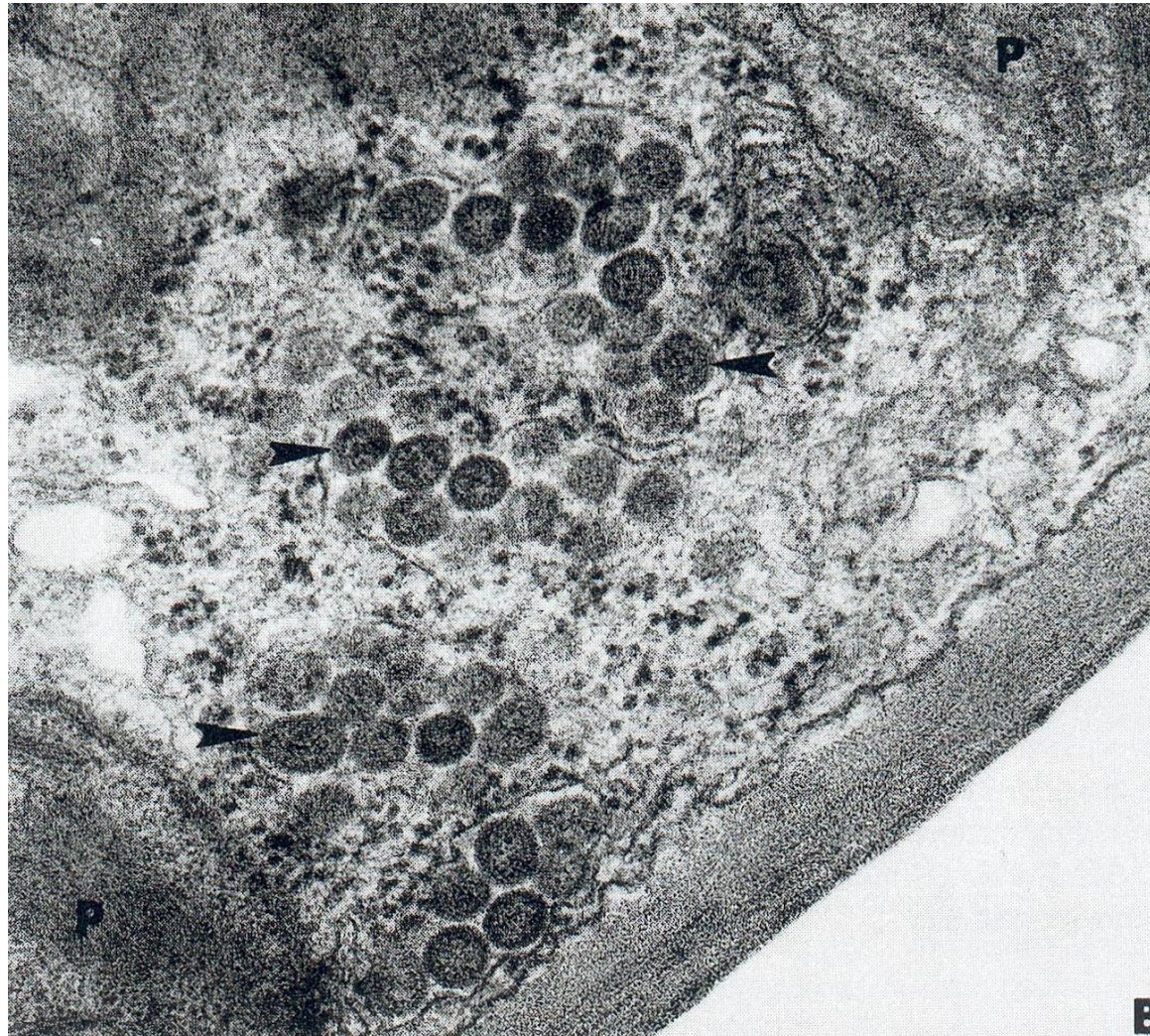


TMV



BYMV

Κυττοπλασματικά έγκλειστα συσσωμαμάτων ιοσωματίων (TSWV)



Ανίχνευση ιικών/ιοειδών νουκλεϊκών οξέων

- Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).
- Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων (Hybridization).
- Απομόνωση (Ανάλυση) και χαρακτηρισμός δίκλωνου RNA (Isolation and Characterization of dsRNA).





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (1)

Η ανακάλυψή της από τον Karry Mullis (1986) ήταν για τα γονίδια ό,τι και για τον γραπτό λόγο η ανακάλυψη της τυπογραφίας από τον Γουτεμβέργιο.

- **Τυπογραφείο:** αντίγραφα ενός βιβλίου.
- **PCR:** παράγει πολλαπλά αντίγραφα μιας δεδομένης ακολουθίας βάσεων DNA.



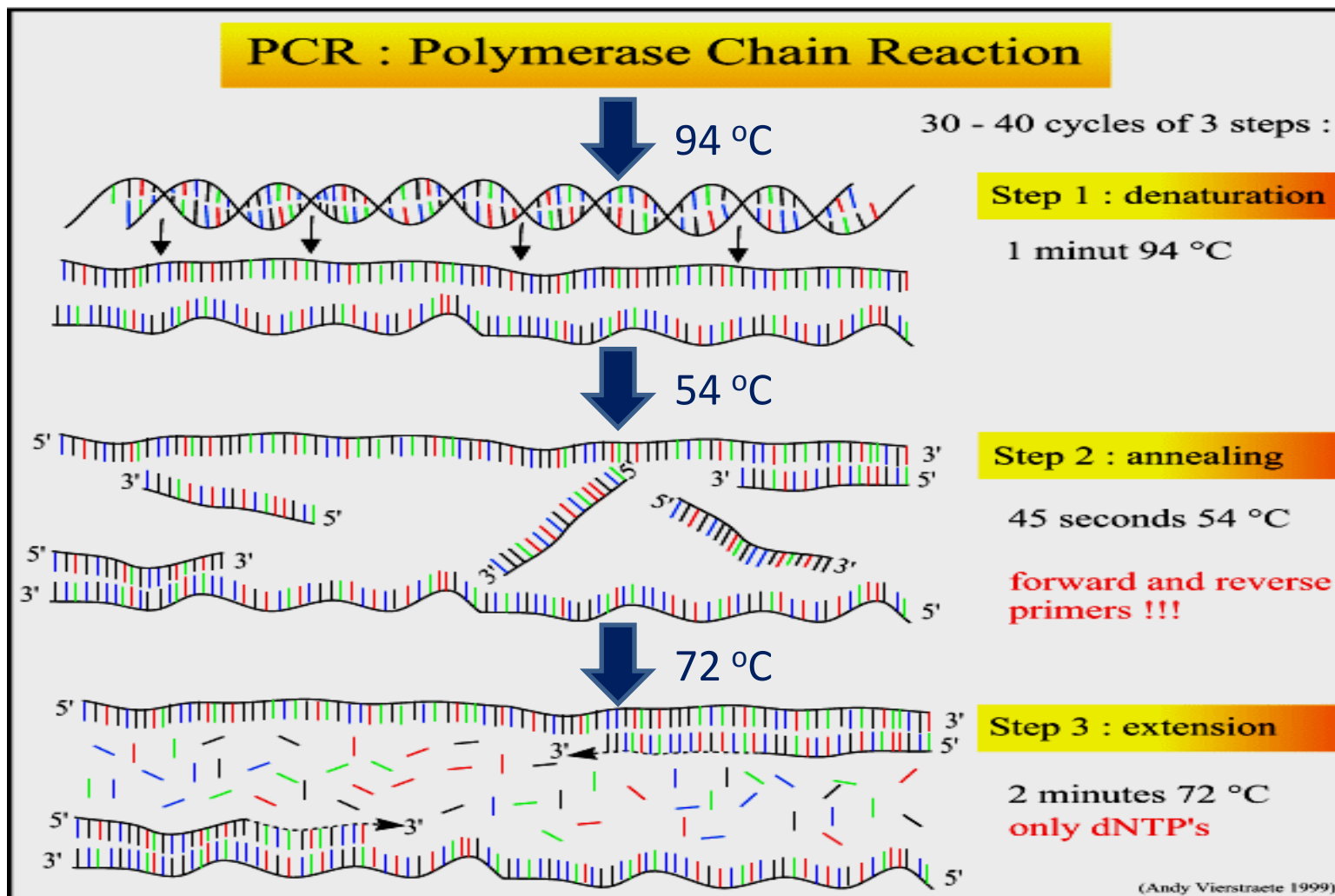
Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (2)

Η PCR έδωσε τρομακτική ώθηση στη **Μοριακή Βιολογία** και σε άλλα πεδία της βιολογικής έρευνας και τεχνολογίας, όπως η Διαγνωστική, η Ταξινόμηση κ.ά.

Karry Mullis: Nobel Χημείας 1992



Σχηματική απεικόνιση της PCR



Στάδια της αντίδρασης

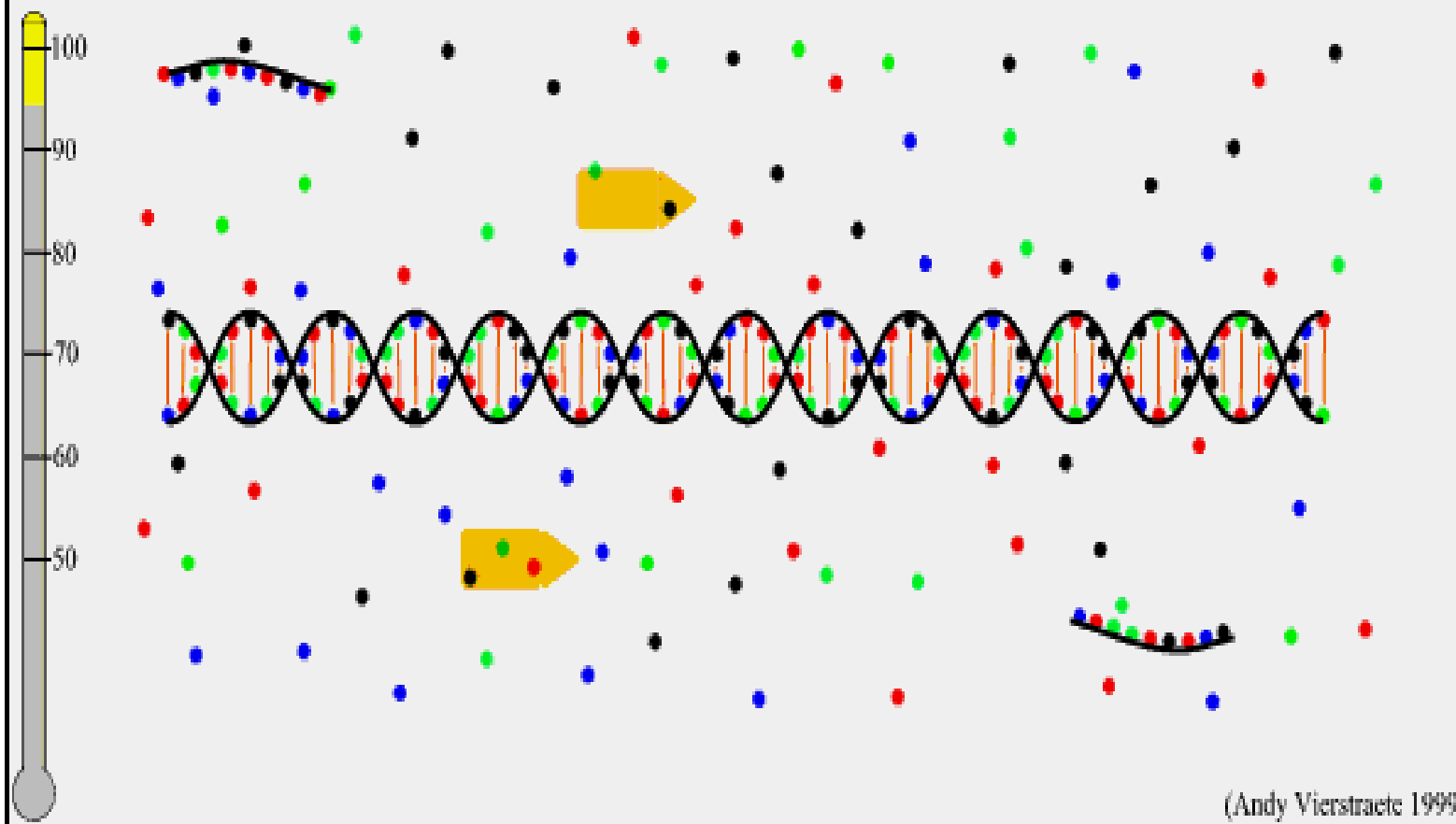
- a. **Αποδιάταξη** του εκμαγείου DNA (95°C).
- b. **Επανασύνδεση** των εκκινητών με το εκμαγείο (50-65°C).
- c. **Επέκταση** του εκκινητή (σχηματισμός δίκλωνου DNA) (72°C).



Αποδιάταξη DNA

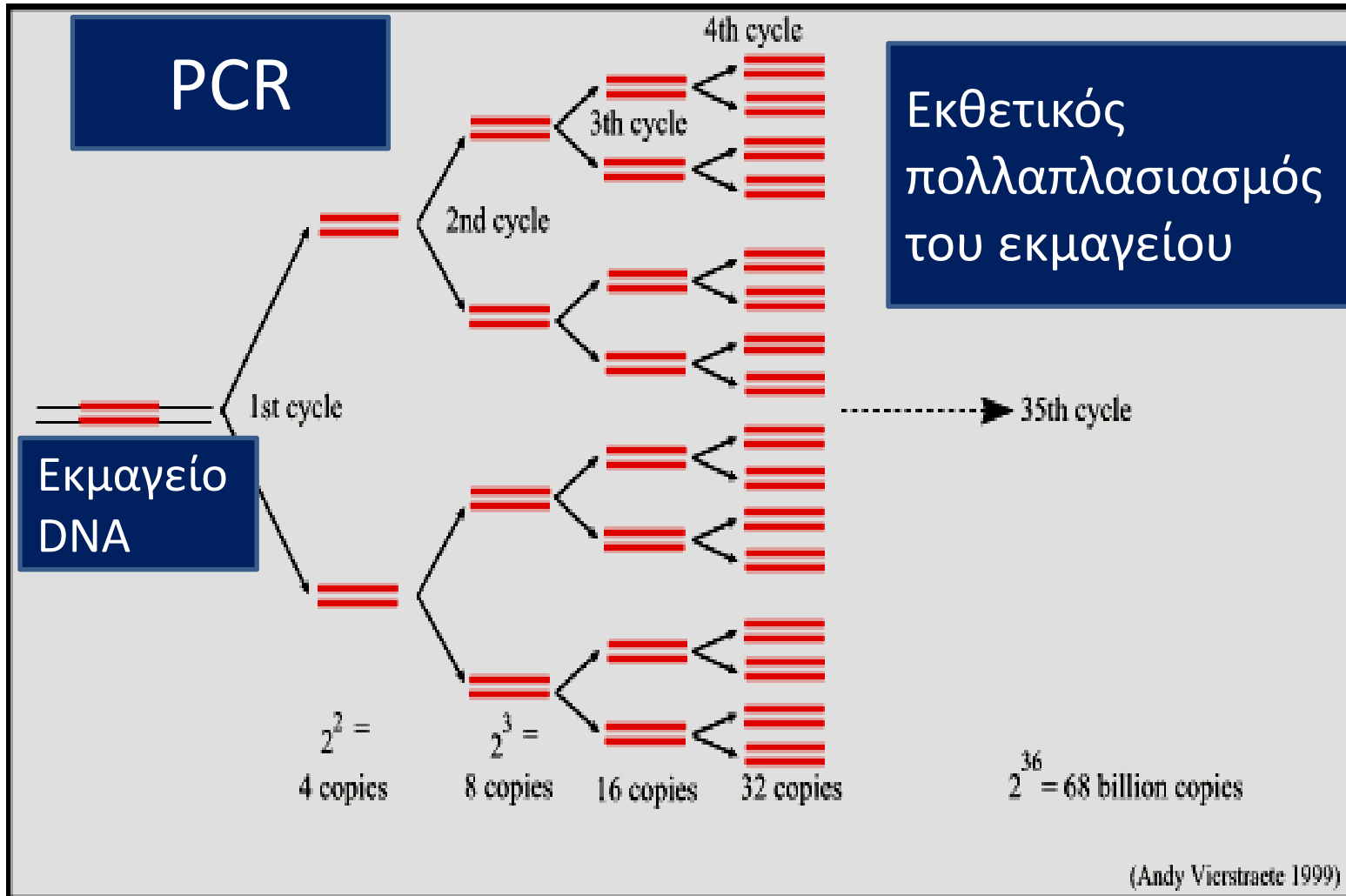
PCR :

Denaturation 94°C



(Andy Vierstraete 1999)

Στάδια PCR



(Andy Vierstraete 1999)



Πολλαπλασιασμός του DNA

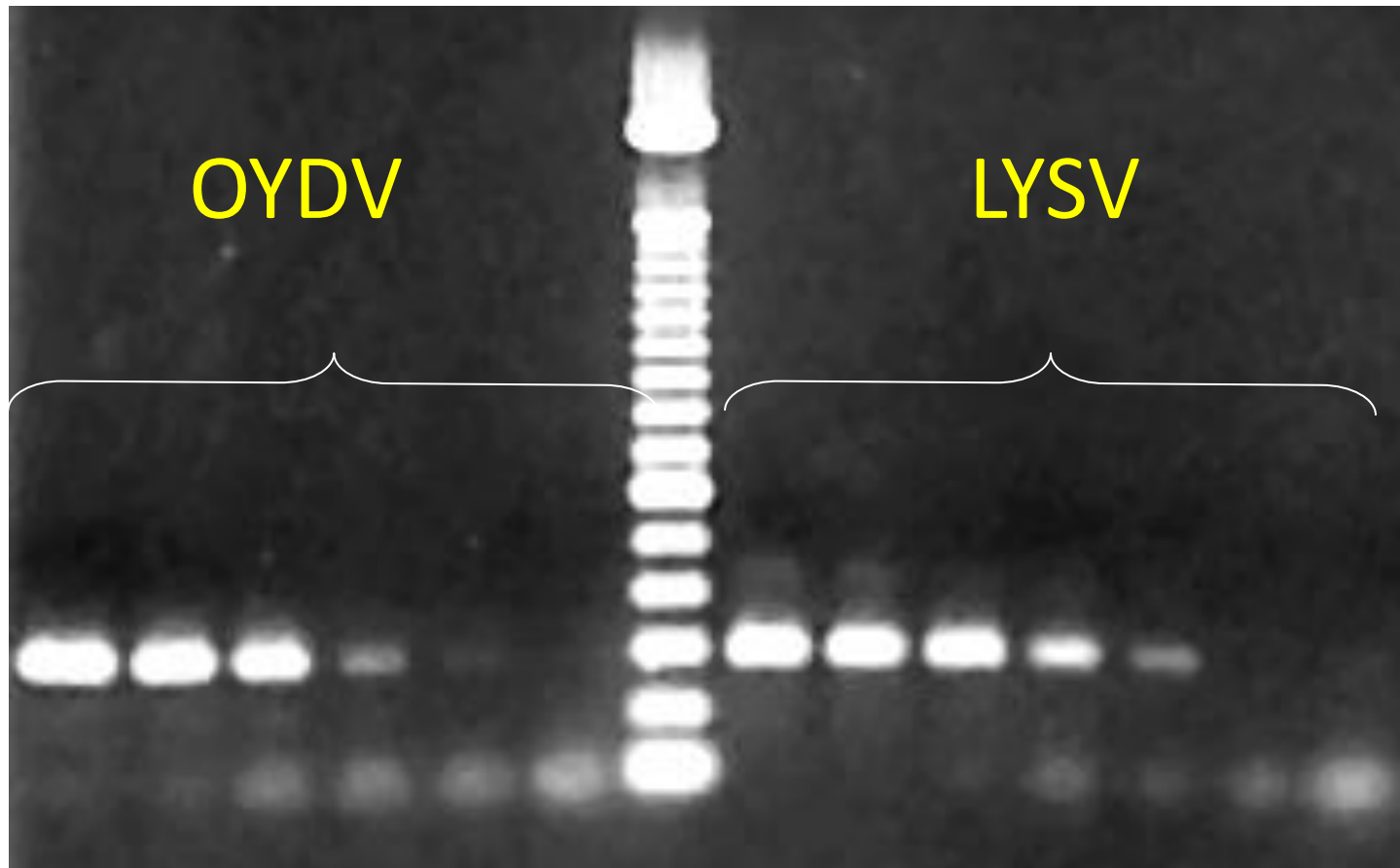
Θεωρητικά
προβλεπόμενη
κινητική
πολλαπλασιασμού
του DNA ως
συνάρτηση του
αριθμού κύκλων
της PCR.

1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1,024
13	2,048
14	4,096
15	8,192
16	16,384
17	32,768
18	65,536
19	131,072
20	262,144
21	524,288
22	1,048,576
...	...
30	268,435,456



Προϊόντα ανίχνευσης του ΟΥΔV και LYSV με αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR) σε φύλλα σκόρδου

1 2 3 4 5 H M 7 8 9 10 11 12 H



283

Ζεύγη
βάσεων

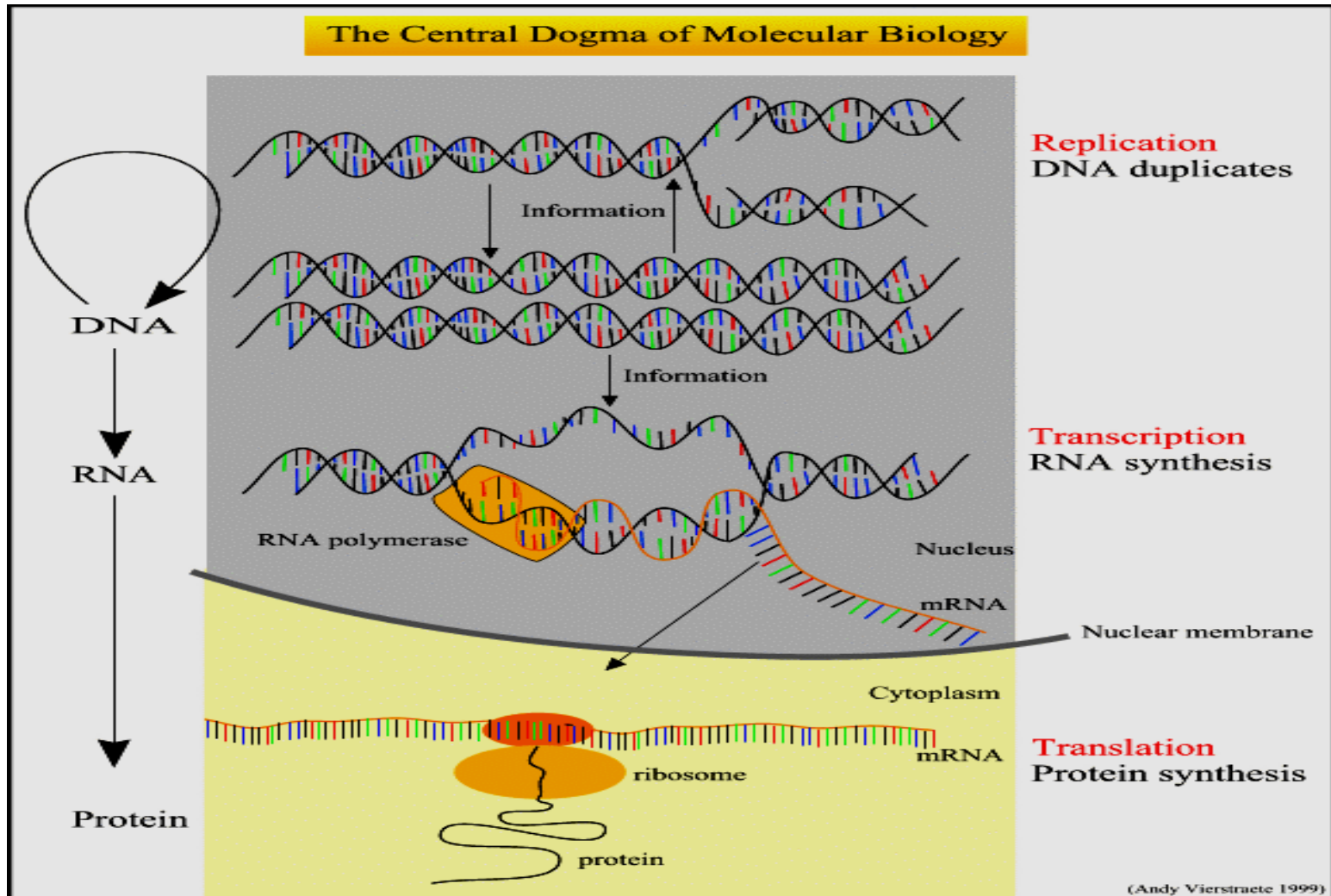


300

Ζεύγη
βάσεων

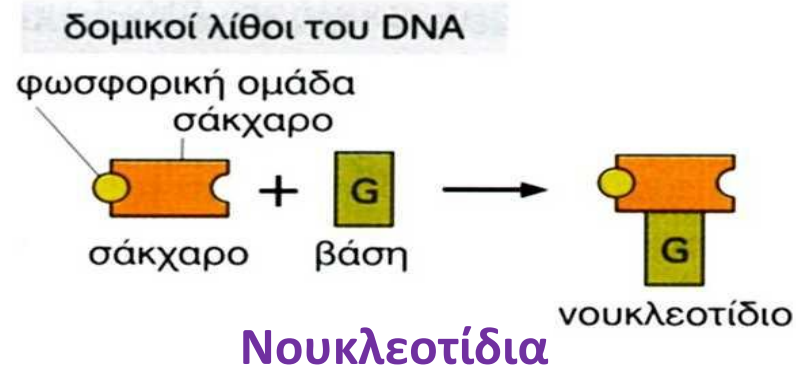
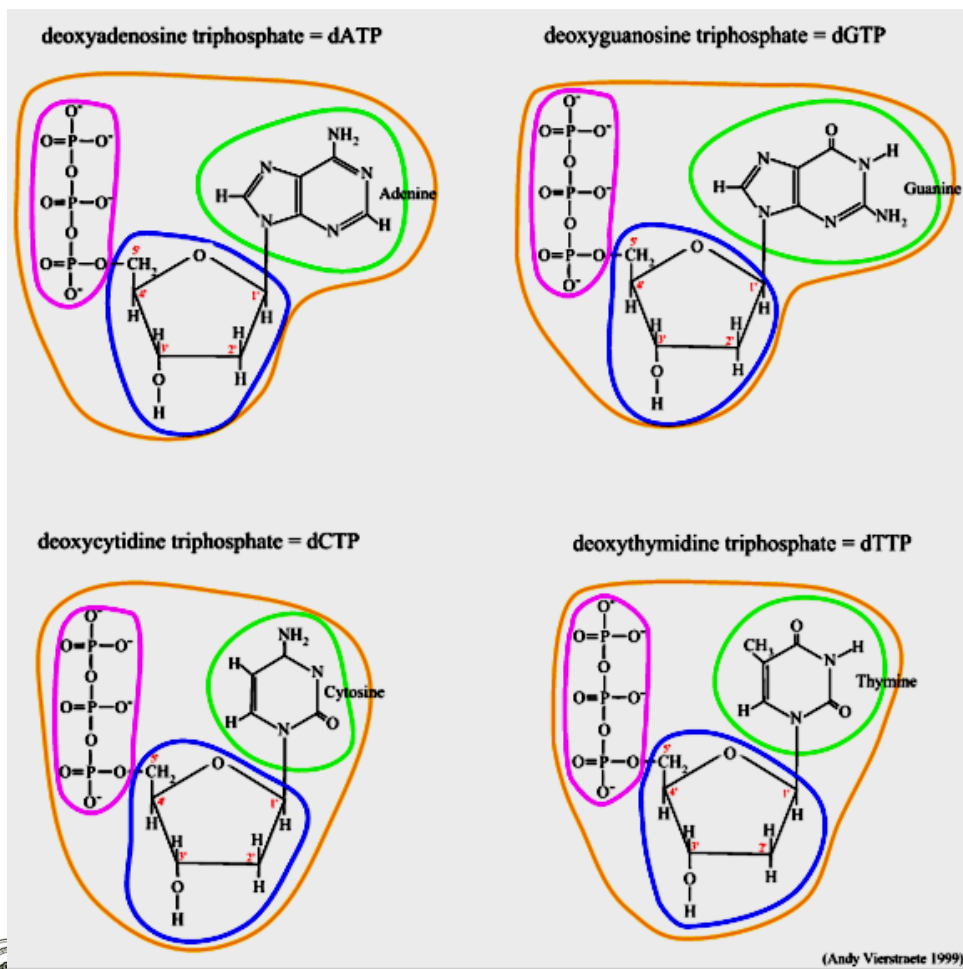


Ο αναδιπλασιασμός βασίζεται στην ιδιότητα της συμπληρωματικότητας των οργανικών βάσεων του DNA



Νουκλεοτίδια

Τα συστατικά των νουκλεοτιδίων

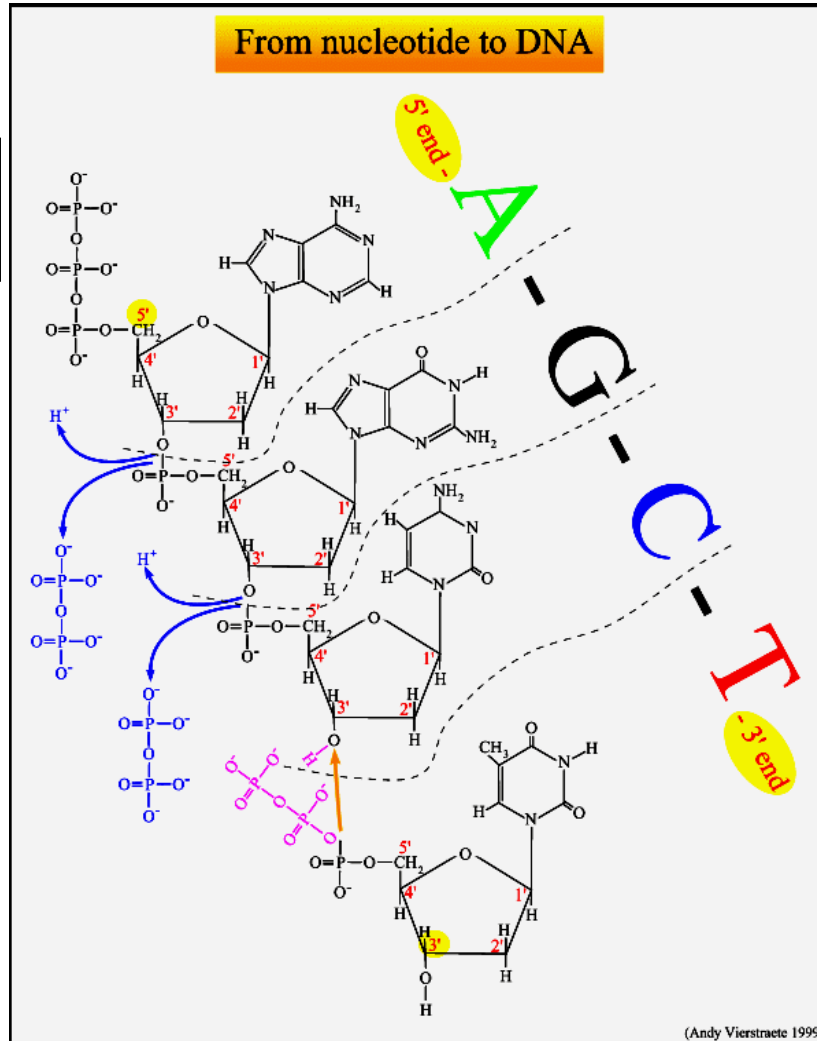
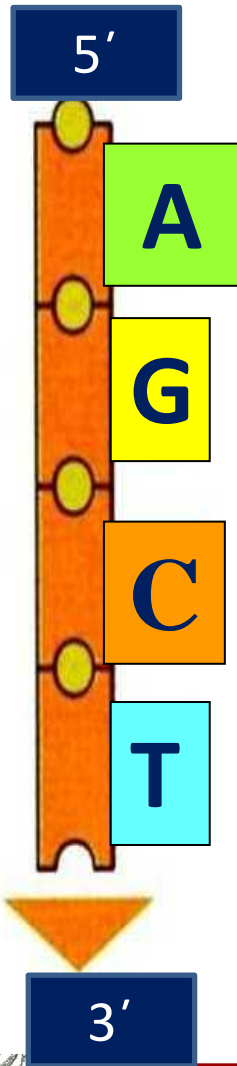


dATP : deoxyadenosine triphosphate
dGTP : deoxyguanosine triphosphate
dTTP : deoxythymidine triphosphate
dCTP : deoxycytidine triphosphate

dNTP's
(deoxynucleoside triphosphates)
τριφωσφορικά
δεοξυριβονουκλεοτίδια



Από τα νουκλεοτίδια στο DNA

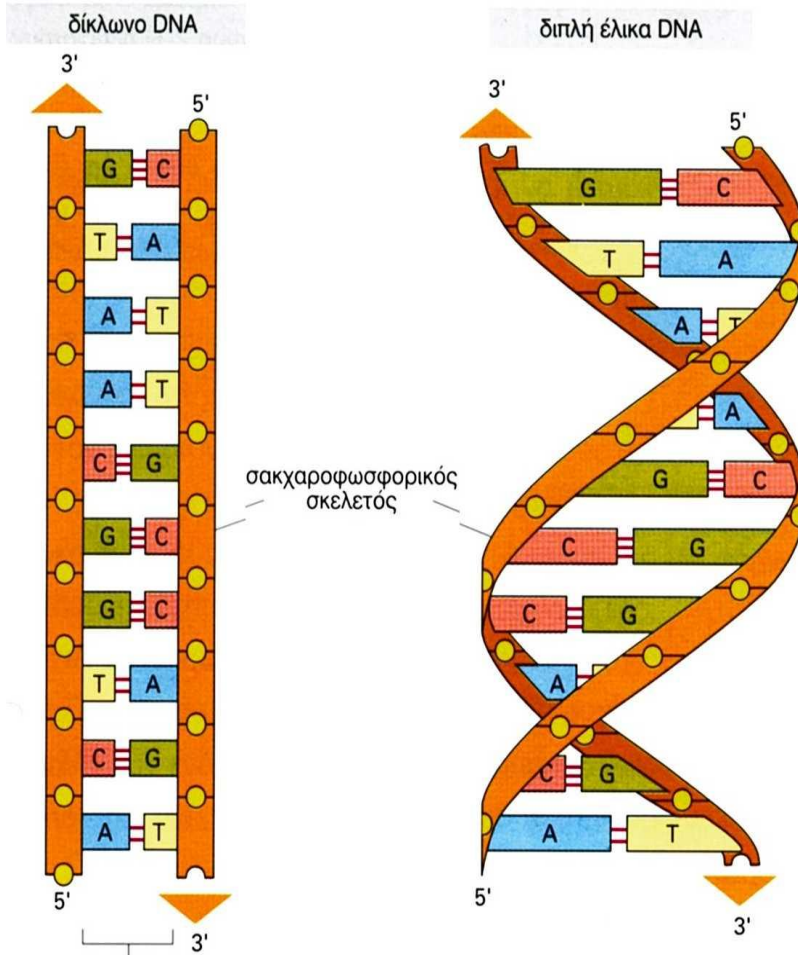


Η μία υδροξυλομάδα, στο άτομο άνθρακα C-3' της ριβόζης συνάπτει φωσφοδιεστερικό δεσμό με την φωσφορική ομάδα στο C-5' της ριβόζης του επόμενου νουκλεοτίδιου.

Νέα νουκλεοτίδια προσθέτονται πάντοτε στην 3' άκρη της αλυσίδας.



Το δίκλωνο DNA



Το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες τοποθετημένες αντιπαράλληλα, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους εξαιτίας των επιλεκτικών δεσμών υδρογόνου των αδενινών της μίας αλυσίδας με τις θυμίνες της άλλης, ή αντίστοιχα των κυτοσινών, με τις γουανίνες.



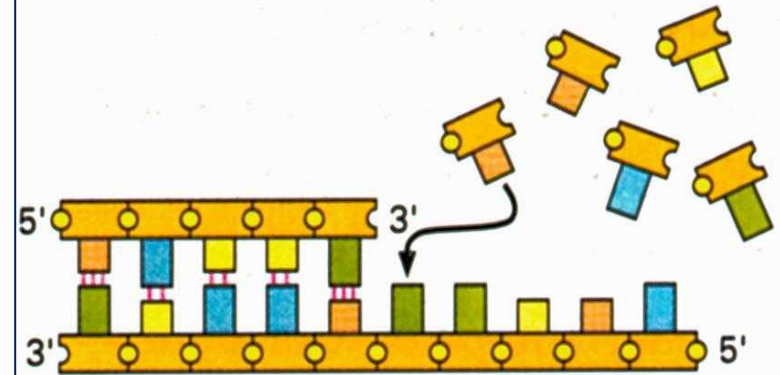
DNA

Στη διατήρηση της δομής του δίκλωνου μορίου, συνεισφέρουν οι υδροφοβικοί δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ των δακτυλίων των βάσεων, τα ιόντα του περιβάλλοντος (διαλύματος), η θερμοκρασία, κ.λπ.

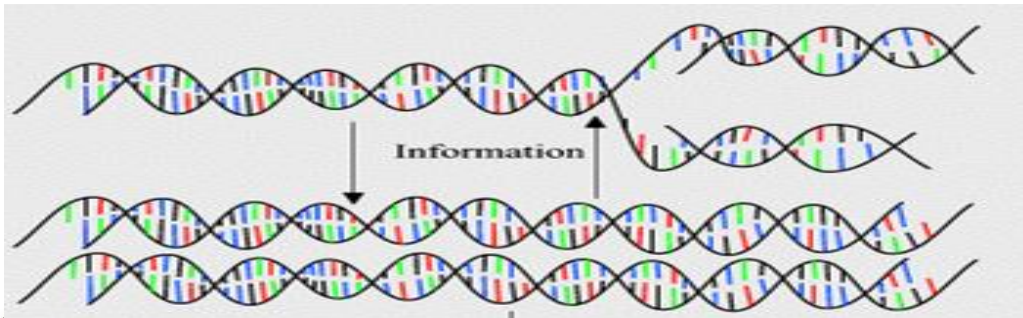


Αναδιπλασιασμός του DNA

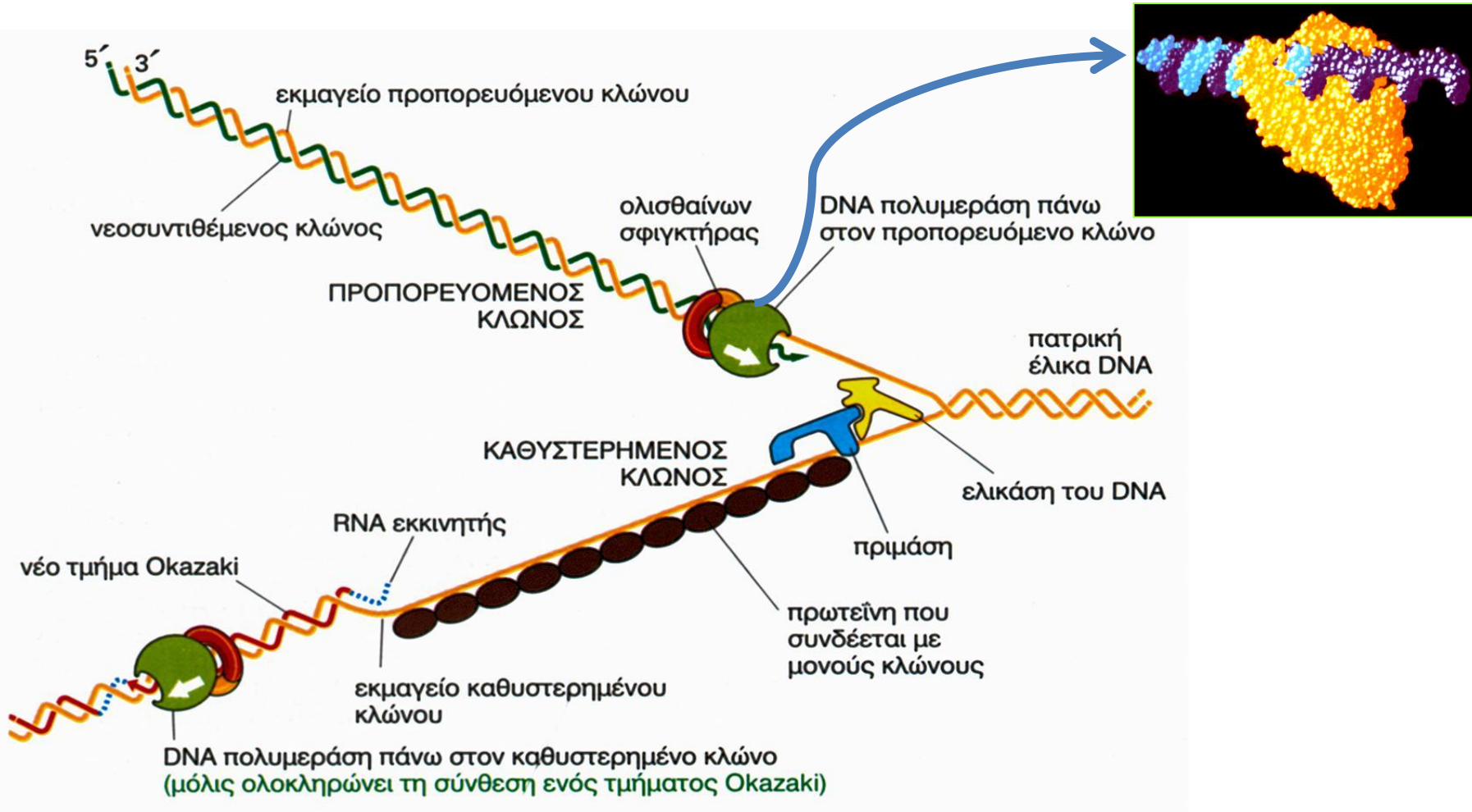
Η βιοσύνθεση του DNA γίνεται με τον πολυμερισμό τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) σε νέες αλυσίδες DNA συμπληρωματικές ως προς τις αρχικές πατρικές.



Η αντίδραση καταλύεται από ένα ολοένζυμο την DNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση.



Διαδικασία αναδιαπλασιασμού του DNA

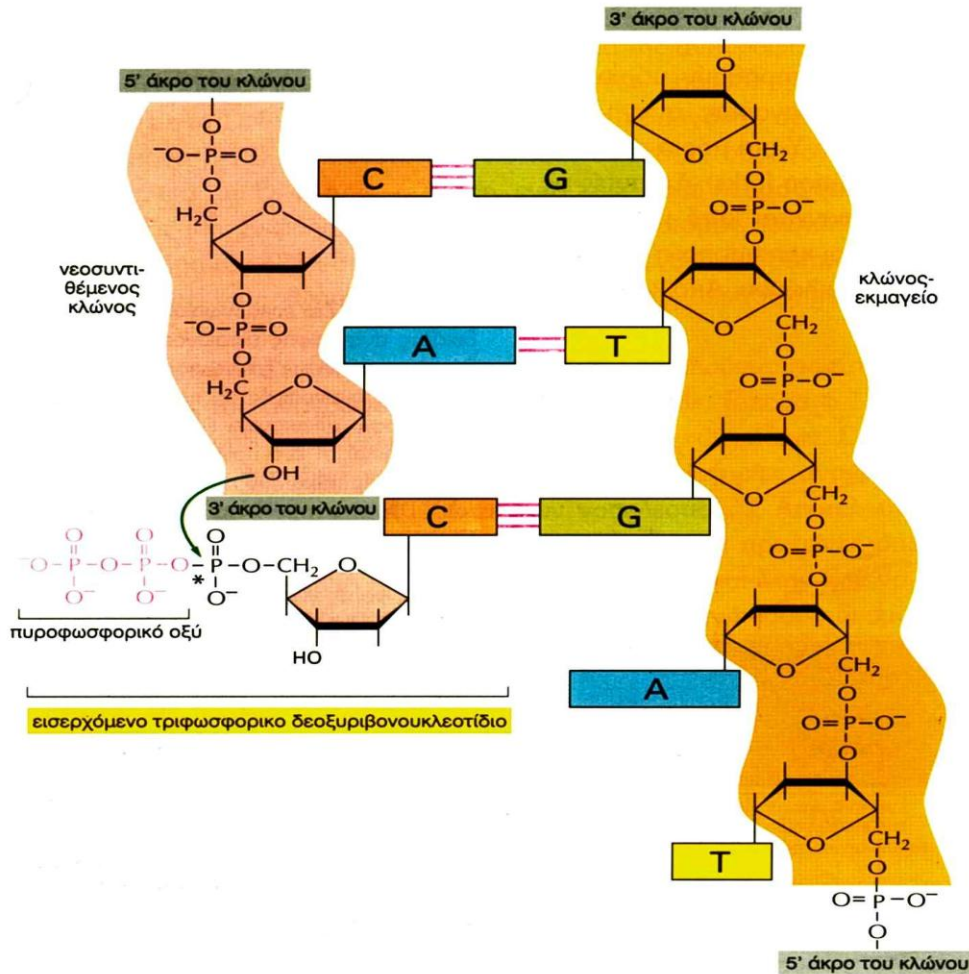


DNA πολυμεράσες

- Οι περισσότερες DNA πολυμεράσες δεν μπορούν εξ αρχής από μονόκλωνη περιοχή να μεταγράψουν το DNA και απαιτούν την παρουσία μιας μικρής δίκλωνης περιοχής.
- Οι δύο αλυσίδες του DNA είναι αντιπαράλληλες έτσι ώστε το ακραίο 5' PO₄ τμήμα της μιας αλυσίδας να βρίσκεται απέναντι από το 3' OH άκρο της άλλης.
- Η βιοσύνθεση του DNA αρχίζει από το 3' OH άκρο της δίκλωνης περιοχής.



Χημεία της αντιγραφής του DNA



Η μία υδροξυλομάδα, στο άτομο άνθρακα C-3' της ριβόζης συνάπτει φωσφοδιεστερικό δεσμό με την φωσφορική ομάδα στο C-5' της ριβόζης του επόμενου νουκλεοτίδιου.



Ιδιότητες της πολυμεράσης

- Υπάρχουν πολλές θερμο-ανθεκτικές πολυμεράσες που προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς και χρησιμοποιούνται στην PCR.
- Η Taq πολυμεράση προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Ενώ οι συνηθισμένες DNA-εξαρτώμενες DNA πολυμεράσες έχουν ως βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης τους 37°C, οι θερμο-ανθεκτικές παρουσιάζουν ένα εύρος βέλτιστων θερμοκρασιών μεταξύ 60 έως 80°C.
- Η Taq πολυμεράση έχει ως βέλτιστη θερμοκρασία τους 74°C. Ο χρόνος ημιζωής, $t(1/2)$, ανέρχεται σε 40' στους 95°C.



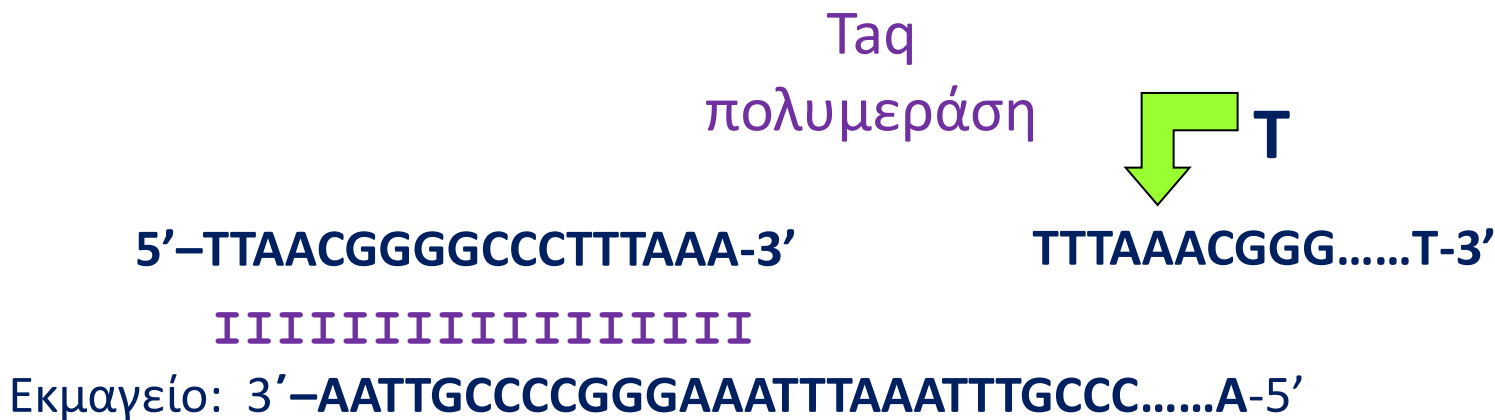
Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

- Εργαστηριακά ελεγχόμενη (in vitro: στο δοκιμαστικό σωλήνα) αντίδραση πολυμερισμού του DNA (μιμείται ως ένα βαθμό τη φυσική διαδικασία αναδιπλασιασμού του DNA).
- Επιτυγχάνει τη σύνθεση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA (DNA στόχος).
- Από λίγα αρχικά μόρια DNA, συνθέτει έναν τεράστιο αριθμό (εκατομμύρια έως δισεκατομμύρια) αντίγραφα.
- Ο πολλαπλασιασμός του DNA στόχου γίνεται σε βαθμό που η ποσότητα του να είναι ευχερώς ανιχνεύσιμη.



Ο ρόλος των εκκινητών στην PCR

- Εκκινητής: ολιγονουκλεοτίδιο συμπληρωματικό με την περιοχή του DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε «Υβριδοποιείται» με το αποδιαταγμένο μόριο DNA (εκμαγείο), επιτρέποντας την Taq πολυμεράση να αρχίσει την επέκταση του νέου μορίου DNA.





5'- AATTGCCCCGGGAAATTT.... 300bp....AAATTTGGGCCCAA -3'
3'- TTAACGGGGCCCTTTAAA.... 300bp....TTTAAACCCGGGTTT -5'

Ανοδικός Εκκνητής

5'-AATTGCCCCGGGAAATTT -3'>

Συνδέεται με:

3'- TTAACGGGGCCCTTTAAA.... 300bp....TTTAAACCCGGGTTT -5'

Καθοδικός Εκκνητής

<..... 3'-TTTAAACCCGGGTTT-5'

Συνδέεται με :

5'- AATTGCCCCGGGAAATTT.... 300bp....AAATTTGGGCCCAA -3'

Διαδικασία PCR

PCR

Συνολικός όγκος 20μl

- 20 mM Tris-HCL (pH: 8,4)
- 50 mM KCl
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,2 mM κάθε dNTP
- 0,2 μM κάθε εκκινητής
- 2 μl (0.05-1.0μg) DNA
- 0,5 μονάδες *Taq* πολυμεράση

Στάδια αντίδρασης

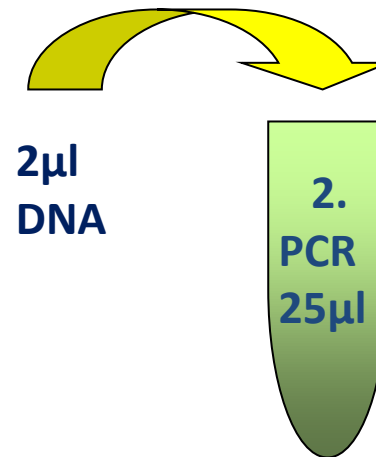
2 min 94° C

30 sec 94° C

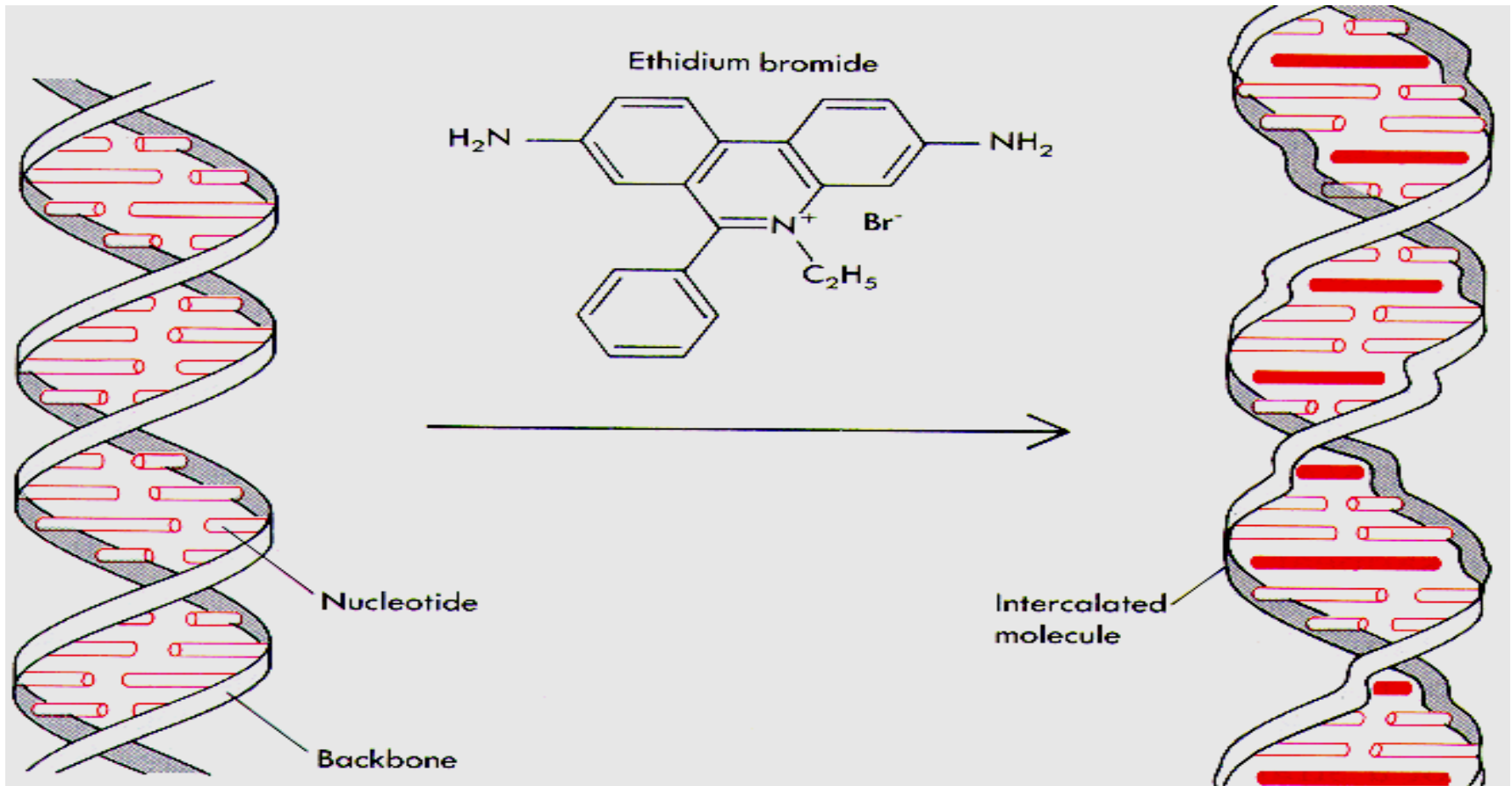
30 sec 56° C

1:00 min 72° C

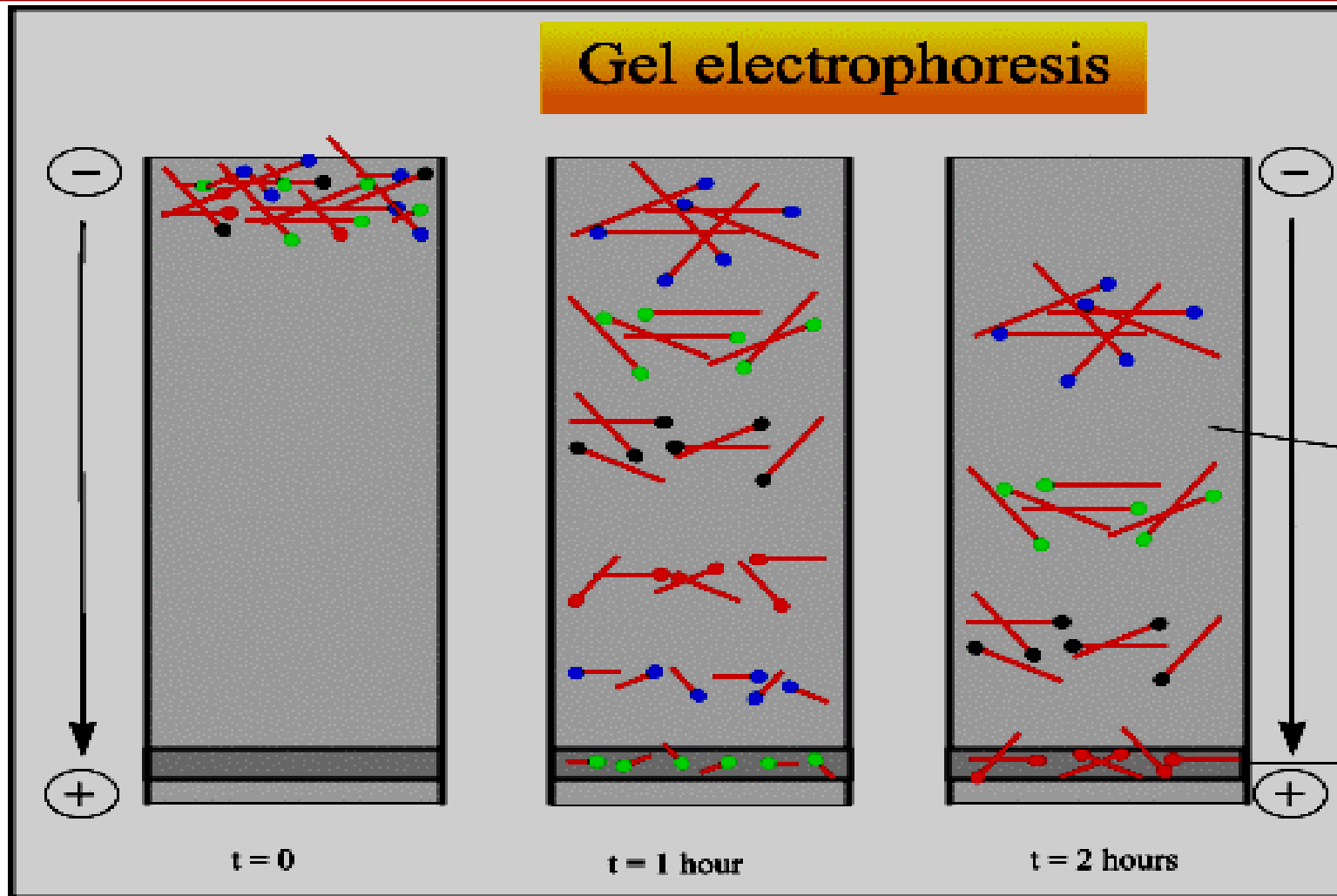
10 min 72° C



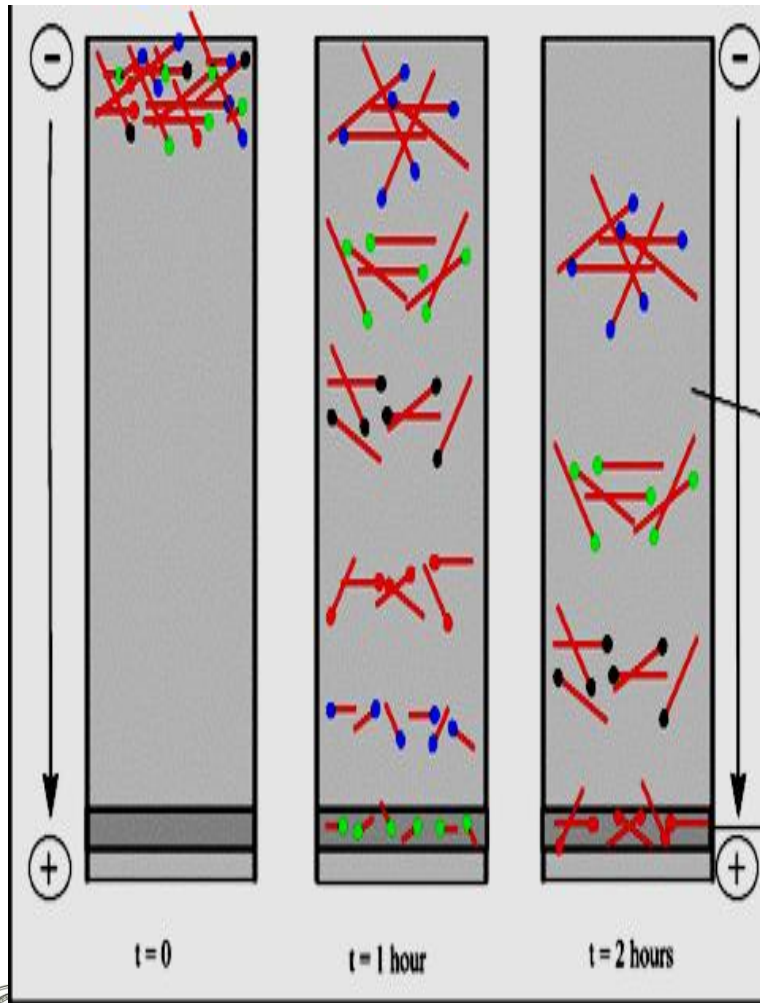
Βρωμιούχο αιθίδιο, ένας παράγοντας παρεμβολής στη διπλή έλικα του DNA



Ηλεκτροφόρηση Αγαρόζης



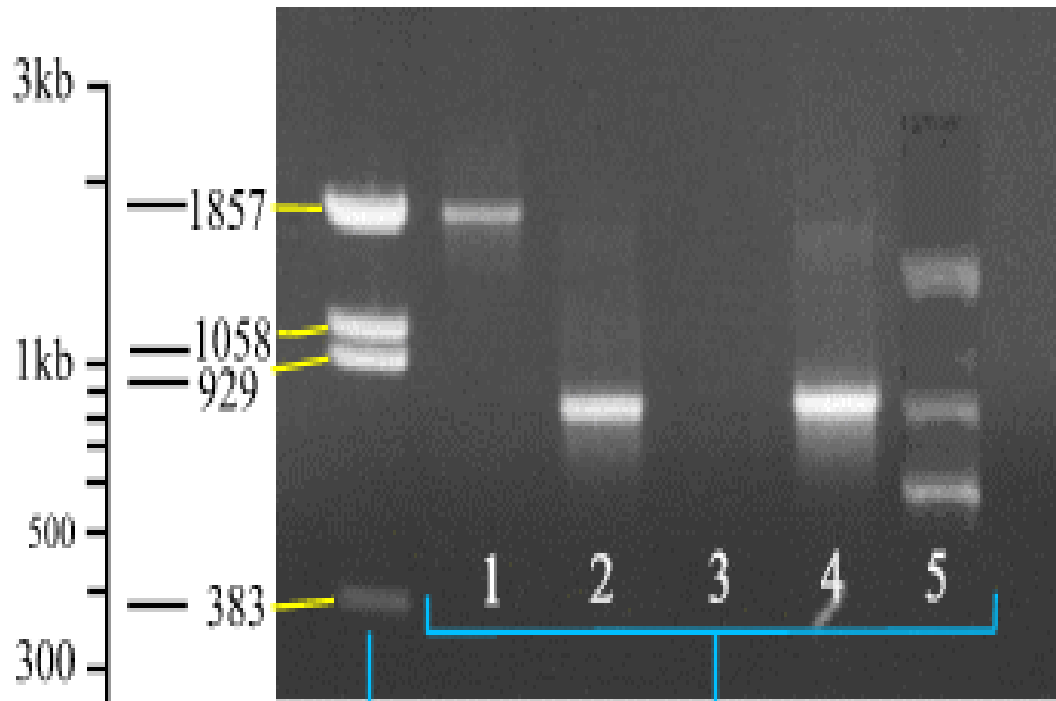
Δείκτης μοριακού βάρους



Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ένα μείγμα από μόρια DNA γνωστού μήκους ζευγών βάσεων.



Εξακρίβωση του προϊόντος της PCR σε αγαρόζη ή separide gel



Γραμμή 1: Το προϊόν της PCR είναι 1850 ζεύγη βάσεων.

Γραμμές 2 και 4: Το προϊόν της PCR είναι 800 ζεύγη βάσεων.

Γραμμή 3: Αποτυχία της αντίδρασης.

Γραμμή 5: Πολλά προϊόντα παράγονται γιατί κάποιος από τους εκκινητές συνδέεται σε διαφορετικές περιοχές του DNA.

Δείκτης
Μοριακού
Βάρους

Προϊόντα της
PCR



Εξειδίκευση της PCR (1)

- Οι εκκινητές είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει την εξειδίκευση του προϊόντος της αντίδρασης.
- Επιλέγουμε ως θέσεις δέσμευσης εκείνα τα σημεία ενός εκμαγείου που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη μοναδικότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων.



Εξειδίκευση της PCR (2)

- Όσο σταθερότερο είναι ένα μόριο, τόσο μεγαλύτερη προσφορά ενέργειας απαιτείται για να ξεχωρίσουν οι αλυσίδες και η ενέργεια αυτή παρέχεται με τη μορφή θερμότητας.
- Όσο περισσότερες βάσεις είναι συμπληρωματικές μεταξύ των δύο αλυσίδων, τόσο σταθερότερο είναι το δίκλωνο DNA, επειδή περισσότεροι υδρογονικοί δεσμοί συμμετέχουν στη σταθεροποίηση του μορίου.



Εξειδίκευση της PCR (3)

- Δύο απολύτως συμπληρωματικές αλυσίδες (A/A') θα παραμείνουν σε δίκλωνη κατάσταση σε υψηλότερη θερμοκρασία, συγκρινόμενες με δύο άλλες αλυσίδες (A/B') του ίδιου μήκους με τις A/A', που περιέχουν και μη συμπληρωματικές μεταξύ τους βάσεις.

T_m 52° C



Εξειδίκευση της PCR (4)

- Όσο υψηλότερη η θερμοκρασία της αντίδρασης, τόσο μικρότερη η πιθανότητα να διατηρηθεί σε δίκλωνη μορφή ένα μόριο που δεν αποτελείται από απολύτως συμπληρωματικές αλυσίδες.



Εξειδίκευση της PCR (5)

- Εάν η θερμοκρασία επανασύνδεσης είναι μικρότερη της βέλτιστης, είναι δυνατό ο εκκινητής να δεσμευθεί και σε άλλες περιοχές του εκμαγείου που δεν είναι απολύτως συμπληρωματικές. Όσο ελαττώνεται η θερμοκρασία, τόσο περισσότερες περιοχές καθίστανται υποψήφιας για τη δέσμευσή του.

T_m 52° C

Εκκινητής: 5'end–**TTAACGTTTCCCTCTAGG**–3'end

T_a 47° C

IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII

Εκμαγείο: 3'end–**AATTGCAAAGGGAGATCCAAATTTGCC**.....A–5'end

Εκκινητής: 5'end–**TTAACGTTTCCCGCTAGG**–3'end



T_a 19° C

IIIIIIII

Εκμαγείο: 3'end–**TCGATGGCTTGCGATCCAAATTTGCC**.....A–5'end



Ευθυγράμμιση αλληλουχιών του LYSV

GV2CPA	:	GA TTTTATGAAAGTCAC TCAAGAACACCAGTTAGAGC	CGCGAGGGCTCACGCACAAATGAAAGCAGCGGC	:	1244
LYSCP	:	GATTTTTATGAAAGTCAC TCAAGAACACCAGTTAGAGC	CGCGAGGGCTCACGCACAAATGAAAGCAGCGGC	:	89
AB005612	:	GACTTTTATGAAAGTCAC TCAAGAACACCAGTTAGAGC	CGCGAGGGCTCACGCACAAATGAAAGCAGCGGC	:	954
LYSPVPOLY	:	GACTTTTATGAAAGTCAC TCAAGAACACCAGTTAGAGC	CGCGAGGGCTCACGCACAAATGAAAGCAGCGGC	:	1141
GPVPRC	:	GATTTTTATGAAAGTCAC TCAAGAACACCAGTTAGAGC	CGCGAGGGCTCACGCACAAATGAAAGCAGCGGC	:	2628
E03282	:	GATTTTTATGAAAGTCAC TCAAGAACACCAGTTAGAGC	CGCGAGGGCTCACGCACAAATGAAAGCAGCGGC	:	887
AB005610	:	GACTTTTATGAAAGTCAC TCAAGAACACCAGTTAGAGC	CGCGAGGGCTCACGCACAAATGAAAGCAGCGGC	:	951
E03283	:	GACTTTTATGAAAGTCAC TCAAGAACACCAGTTAGAGC	CGCGAGGGCTCACGCACAAATGAAAGCAGCGGC	:	485
AB005611	:	GACTTTTATGAAAGTCAC TCAAGAACACCAGTTAGAGC	CGCGAGGGCTCACGCACAAATGAAAGCAGCGGC	:	954
					
GV2CPA	:	c T cG AAttCAAGGcCaAGgCTGTTTGGAcTaGACGGTAAcGTcACAACcAcGGATGAGGACACGGAGA			
LYSCP	:	CTACGTAATTCAAGGCCAAGGCTGTTTGGACTAGACGGTAAcGTcACAACcAcGGATGAGGACACGGAGA			1315
AB005612	:	CTTGGCAAATTCAAAGCCAAGGCTGTTTGGACTAGACGGTAAcGTcACAACcAcGGATGAGGACACGGAGA			160
LYSPVPOLY	:	CTTGGCAAATTCAAAGCCAAGGCTGTTTGGACTAGACGGTAAcGTcACAACcAcGGATGAGGACACGGAGA			1025
GPVPRC	:	CTTGGCAAATTCAAAGCCAAGGCTGTTTGGACTAGACGGTAAcGTcACAACcAcGGATGAGGACACGGAGA			1212
E03282	:	CTTGGCAAATTCAAAGCCAAGGCTGTTTGGACTAGACGGTAAcGTcACAACcAcGGATGAGGACACGGAGA			2699
AB005610	:	CTTGGCAAATTCAAAGCCAAGGCTGTTTGGACTAGACGGTAAcGTcACAACcAcGGATGAGGACACGGAGA			958
AB005611	:	CTTGGCAAATTCAAAGCCAAGGCTGTTTGGACTAGACGGTAAcGTcACAACcAcGGATGAGGACACGGAGA			1022
E03283	:	CTTGGCAAATTCAAAGCCAAGGCTGTTTGGACTAGACGGTAAcGTcACAACcAcGGATGAGGACACGGAGA			556
AB005611	:	CTTGGCAAATTCAAAGCCAAGGCTGTTTGGACTAGACGGTAAcGTcACAACcAcGGATGAGGACACGGAGA			1025
GV2CPA	:	GGCACACAGCACATG CGTGAATGCACGGATGCACCATCTTGATGGTgGcGcATATGCAGTgatgtttcggg			1386
LYSCP	:	GGCACACAGCACATG CGTGAATGCACGGATGCACCATCTTGATGGTgGcGcATATGCAGTgatgtttcggg			231
AB005612	:	GGCACACAGCACATG CGTGAATGCACGGATGCACCATCTTGATGGTgGcGcATATGCAGTgatgtttcggg			1096
LYSPVPOLY	:	GGCACACAGCACATG CGTGAATGCACGGATGCACCATCTTGATGGTgGcGcATATGCAGTgatgtttcggg			1283
GPVPRC	:	GGCACACAGCACATG CGTGAATGCACGGATGCACCATCTTGATGGTgGcGcATATGCAGTgatgtttcggg			2770
E03282	:	GGCACACAGCACATG CGTGAATGCACGGATGCACCATCTTGATGGTgGcGcATATGCAGTgatgtttcggg			1017
AB005610	:	GGCACACAGCACATG CGTGAATGCACGGATGCACCATCTTGATGGTgGcGcATATGCAGTgatgtttcggg			1093
E03283	:	GGCACACAGCACATG CGTGAATGCACGGATGCACCATCTTGATGGTgGcGcATATGCAGTgatgtttcggg			615
AB005611	:	GGCACACAGCACATG CGTGAATGCACGGATGCACCATCTTGATGGTgGcGcATATGCAGTgatgtttcggg			1096
GV2CPA	:	t aaccggttatgg cttooa taaaaagtc cag ggc a cttgtattt ggtagt tagtga			
LYSCP	:	TAGTAACCGGTTATGGGCTTCCAATTAAAAAGTCCCGAGTGCCAAAATTGTATTTTGGCTAGTGTAGTGAA			1457
AB005612	:	TAGTAACCGGTTATGGGCTTCCAATTAAAAAGTCCCGAGTGCCAAAATTGTATTTTGGCTAGTGTAGTGAA			302
LYSPVPOLY	:	TAGTAACCGGTTATGGGCTTCCAATTAAAAAGTCCCGAGTGCCAAAATTGTATTTTGGCTAGTGTAGTGAA			1167
GPVPRC	:	TAGTAACCGGTTATGGGCTTCCAATTAAAAAGTCCCGAGTGCCAAAATTGTATTTTGGCTAGTGTAGTGAA			1354
E03282	:	TAGTAACCGGTTATGGGCTTCCAATTAAAAAGTCCCGAGTGCCAAAATTGTATTTTGGCTAGTGTAGTGAA			2841
AB005610	:	TAGTAACCGGTTATGGGCTTCCAATTAAAAAGTCCCGAGTGCCAAAATTGTATTTTGGCTAGTGTAGTGAA			1164
E03283	:	TAGTAACCGGTTATGGGCTTCCAATTAAAAAGTCCCGAGTGCCAAAATTGTATTTTGGCTAGTGTAGTGAA			1167
AB005611	:	TAGTAACCGGTTATGGGCTTCCAATTAAAAAGTCCCGAGTGCCAAAATTGTATTTTGGCTAGTGTAGTGAA			1167
					
GV2CPA	:	ctatgattcactcgttcaaggcagtttctact t			1492
LYSCP	:	ACTATGATTCACTCGTTC AAGGCAGTTTCTACTTT			337
AB005612	:	GCTATGATTCACTCGTTC AAGGCAGTTTCTACTTT			1202
LYSPVPOLY	:	GCTATGATTCACTCGTTC AAGGCAGTTTCTACTTT			1389
GPVPRC	:	ACTATGATTCACTCGTTC AAGGCAGTTTCTACTTT			2876
E03282	:	ACTATGATTCACTCGTTC AAGGCAGTTTCTACTTT			-
AB005610	:	ACTATGATTCACTCGTTC AAGGCAGTTTCTACTTT			1199
E03283	:	ACTATGATTCACTCGTTC AAGGCAGTTTCTACTTT			-
AB005611	:	ACTATGATTCACTCGTTC AAGGCAGTTTCTACTTT			1202

Εκκλητές 5'-TC AAG AAC ACC AGT TAG AGC-3'
5'-GTA GAA ACT GCC TTG AAC GAG TG-3'



Σταθερότητα δίκλωνου μορίου DNA

Η σταθερότητα ενός δίκλωνου μορίου DNA εξαρτάται από:

- Τη θερμοκρασία του διαλύματος.
- Τη συμπληρωματικότητα των βάσεων.
- Την αλατότητα του διαλύματος.



Θερμοκρασία τήξεως (Tm)

Ως Tm ορίζεται θερμοκρασία ενός διαλύματος DNA, στην οποία το 50% των μορίων DNA είναι σε δίκλωνη μορφή. Το ύψος του Tm ενός εκκινητή αυξάνει με:

- Μήκος.
- Περιεκτικότητα σε G και C.
- $Tm \text{ } ^\circ\text{C} = N1 (A+T) \times 2 + N2 (G+C) \times 4$.
- Συγκέντρωση του εκκινητή.
- Χρόνο επώασής του.
- Αλατότητα της αντίδρασης.

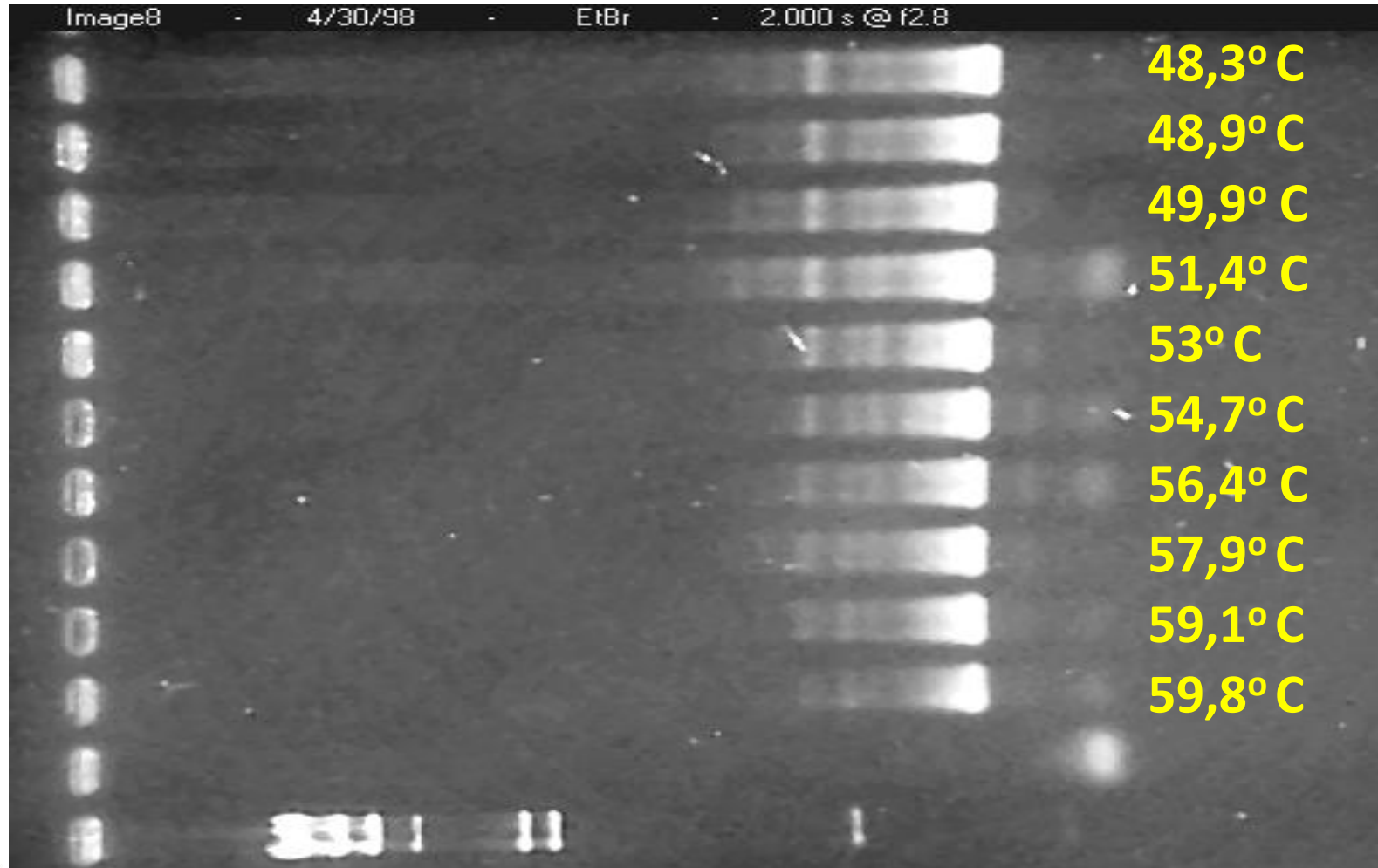


Θερμοκρασία Υβριδισμού (T_a)

- Η εξειδίκευση της αντίδρασης οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στη θερμοκρασία υβριδισμού (T_a , annealing temperature) των εκκινητών.
- Συνήθως η θερμοκρασία υβριδισμού επιλέγεται να είναι κατά 5°C μικρότερη της T_m .



Επίδραση της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών (primers) στο προϊόν της PCR



Ανίχνευση μορίων RNA

- Μετατροπή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase).

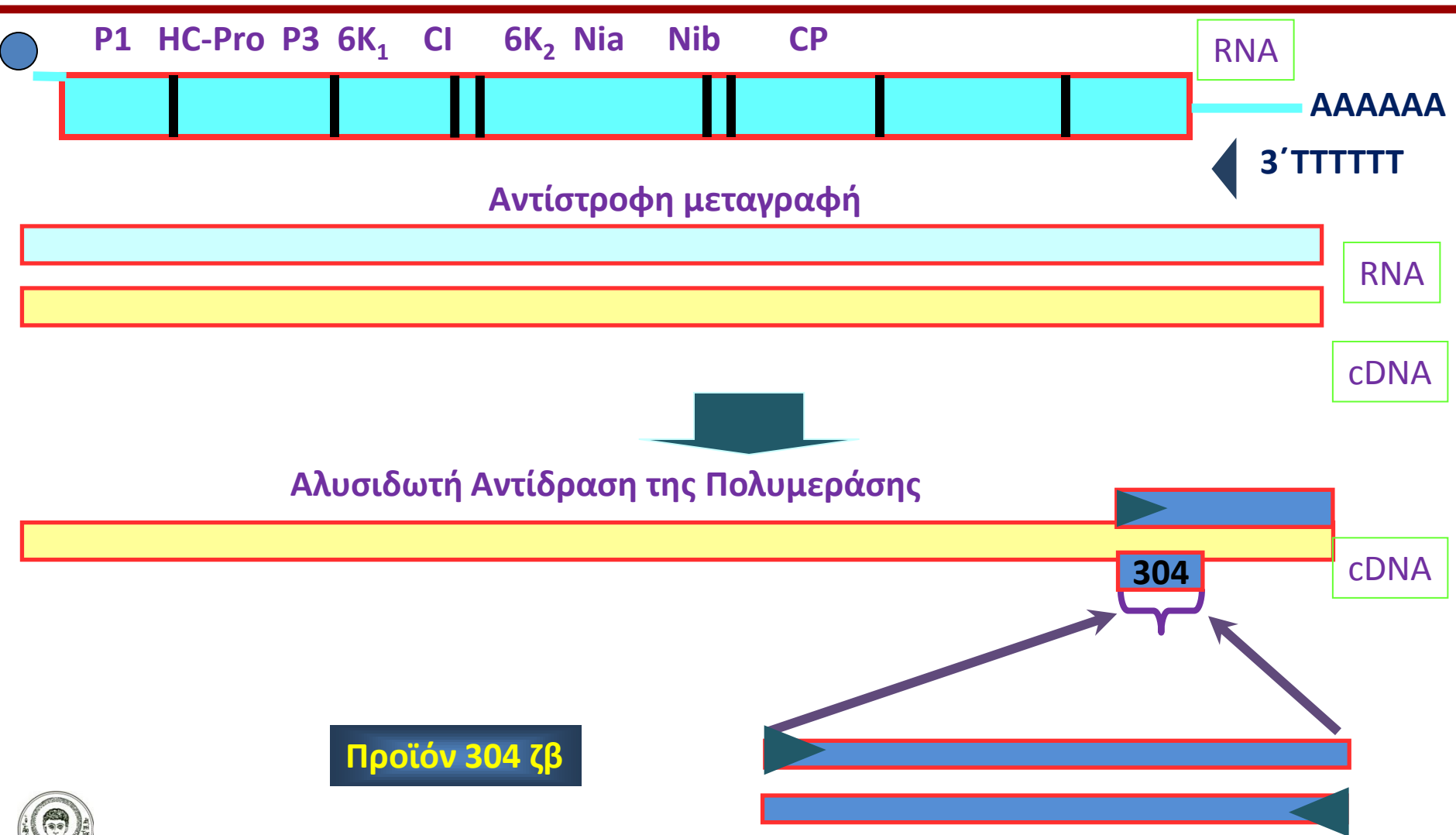


Πολλαπλασιασμός RNA εκμαγείων (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR) Αντίστροφη μεταγραφή-PCR

- Σύνθεση μονόκλωνου, cDNA είτε με έναν ειδικό εκκινητή, ή με πληθυσμό τυχαίων εκκινητών, μέσω του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcriptase, AMV, MMLV, rTth).
- 1/10 του RNA-cDNA υβριδίου χρησιμοποιείται περαιτέρω σε κανονική PCR με κατάλληλους εκκινητές.



Πολλαπλασιασμός RNA εκμαγείων



Το Εκμαγείο

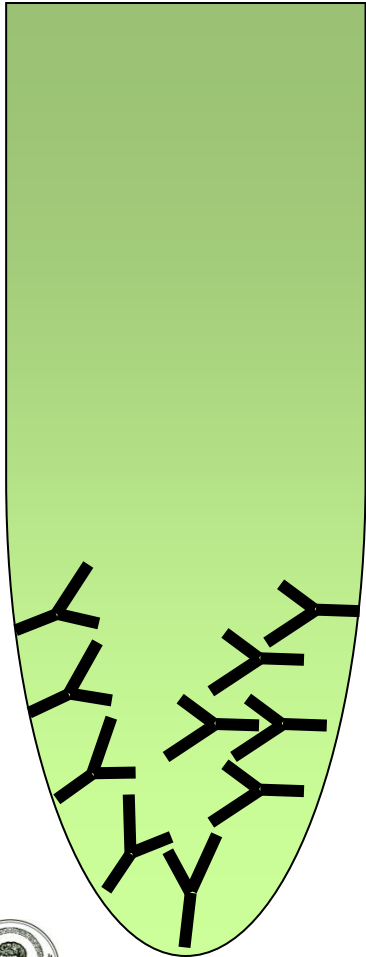
Ως εκμαγείο μπορεί να χρησιμοποιηθούν:

- i. Καθαρό ή εμπλουτισμένο παρασκεύασμα DNA οποιουδήποτε οργανισμού (1 έως 50 ng πλασμιδιακού, ή 10 έως 200 ng χρωμοσωμικού).
- ii. Άθικτο ή βρασμένο κυτταρικό αιώρημα.
- iii. Εκχύλισμα προσβλημένων φυτών (1 μl ανά 15μl αντίδρασης).
- iv. Αιώρημα ιοσωματίων ή καθαρό ιικό RNA.



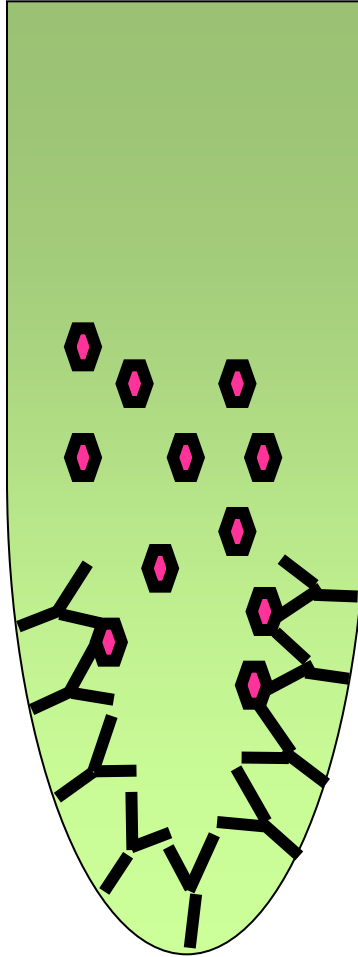
IC-RT-PCR

1. IgG επίστρωση



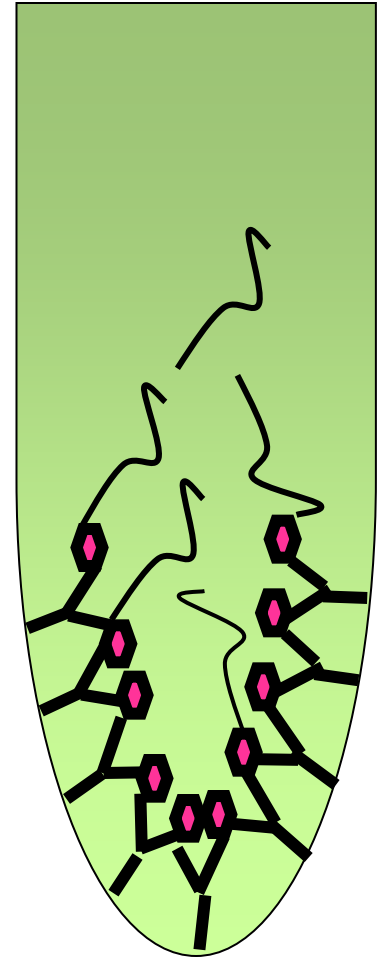
πλύσιμο

2. Προσθήκη δείγματος



πλύσιμο

3. RT-PCR



Ιός – εκκλητηές – προϊόντα

Ιός	Εκκλητηές	Προϊόντα
OYDV	5'-GAA GCA CAC ATG CAA ATG AAG G-3' 5'-GCC ACA ACT AGT GGT ACA CCA C-3'	283 bp
LYSV	5'-CAC ATC AAG AAC ACC AGT TAG AGC-3' 5'-GTA GAA ACT GCC TTG AAC GAG TG-3'	304 bp

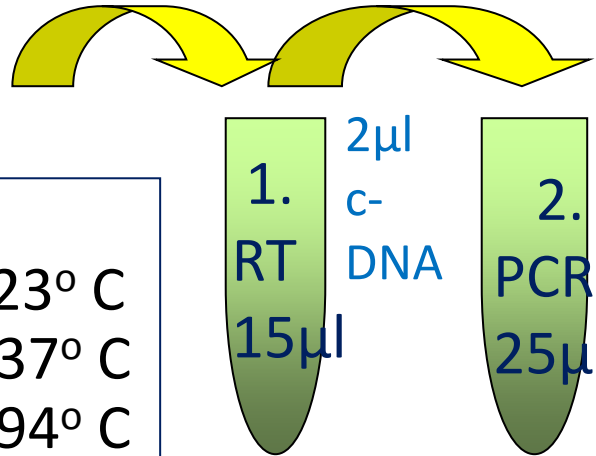


Διαδικασία RT-PCR (1)

1μl ολικό RNA

1. RT (MMLV)

Επώαση	10 min	23° C
	60 min	37° C
	10 min	94° C



2. PCR (Taq)

35 κύκλοι	2 min	94° C
	30 sec	94° C
	30 sec	56° C
	30 sec	72° C
	10 min	72° C



Διαδικασία RT-PCR (2)

RT: Συνολικός όγκος 15 μ l

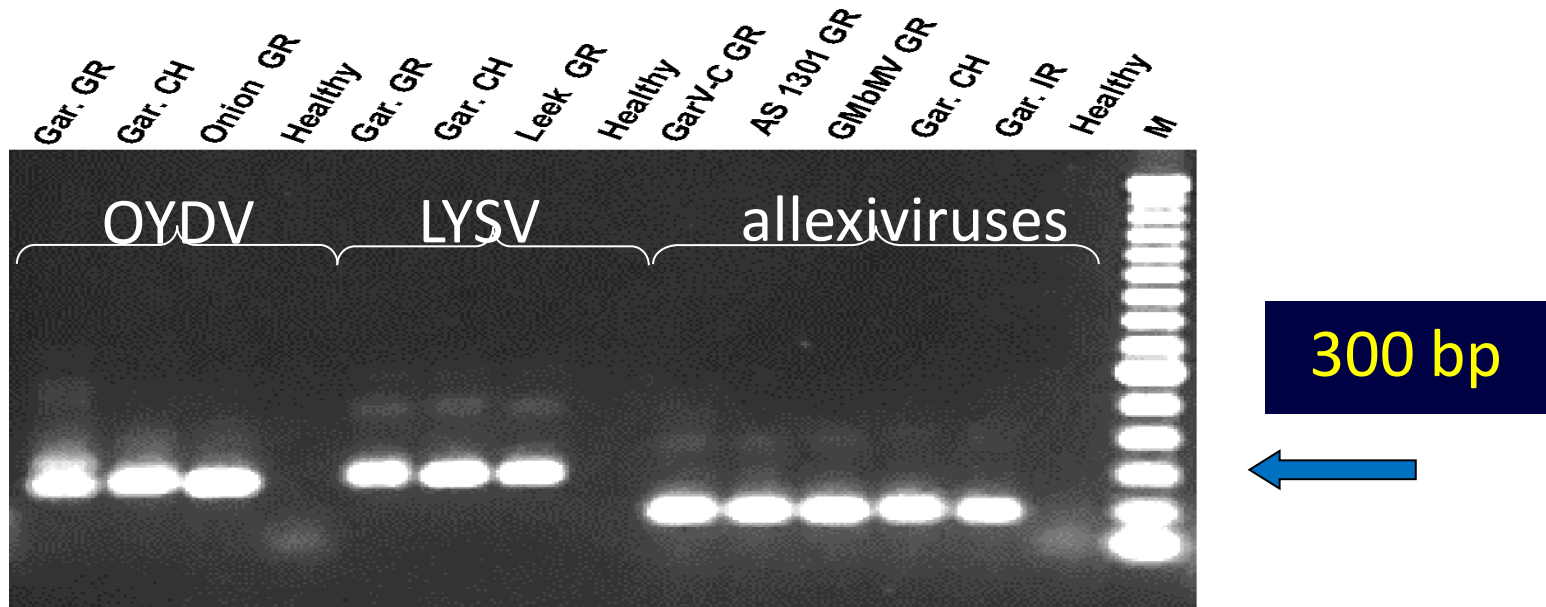
- 50 mM Tris-HCL (pH: 8,3).
- 75 mM KCl.
- 10 mM DTT.
- 3 mM $MgCl_2$.
- 0.5 mM κάθε dNTP.
- 1 μ M καθοδικός εκκινητής.
- 15 μονάδες RNASEOUT.
- 60 μονάδες M-MLV (Αντίστροφη μεταγραφή).
- 1 μ l δείγμα.

PCR Συνολικός όγκος 20 μ l

- 20 mM Tris-HCL (pH: 8,4).
- 50 mM KCl.
- 1,5 mM $MgCl_2$.
- 0,2 mM κάθε dNTP.
- 0,2 μ M κάθε εκκινητής.
- 2 μ l RT προϊόν (C-DNA).
- 0,5 μονάδες *Taq* πολυμεράση.



Διαδικασία RT-PCR (3)



Ιός

OYDV

Εκκινητές

5'-GAA GCA CAC ATG CAA ATG AAG G-3'

5'-GCC ACA ACT AGT GGT ACA CCA C-3'

LYSV

5'-CAC ATC AAG AAC ACC AGT TAG AGC-3'

5'-GTA GAA ACT GCC TTG AAC GAG TG-3'

Allexivirus spp.

5'-AGC TAA GCT ATA TGC TGA ATG G-3'

5'-GTT CCA AGG TAA GTT TAG CAA TAT CAA C-3'

Προϊόντα

283 bp

304 bp

183 to 192 bp



Εστιασμένη PCR (1)

Αποτελείται από δύο διαφορετικές, αλληπάλληλες δοκιμές PCR.

- 1. Πρώτη PCR:** χρησιμοποιείται ένα "εξωτερικό" ζεύγος εκκινητών.
 - 2. Δεύτερη PCR:** Το προϊόν χρησιμοποιείται παρουσία ενός νέου ζεύγους εκκινητών, που δεσμεύονται σε δύο σημεία στο εσωτερικό του προϊόντος της πρώτης PCR.
- **Πλεονέκτημα:** αυξημένη ευαισθησία (>10³).
 - **Μειονεκτήματα:** αυξημένο κόστος, χρόνος, υλικά.



Εστιασμένη PCR (2)

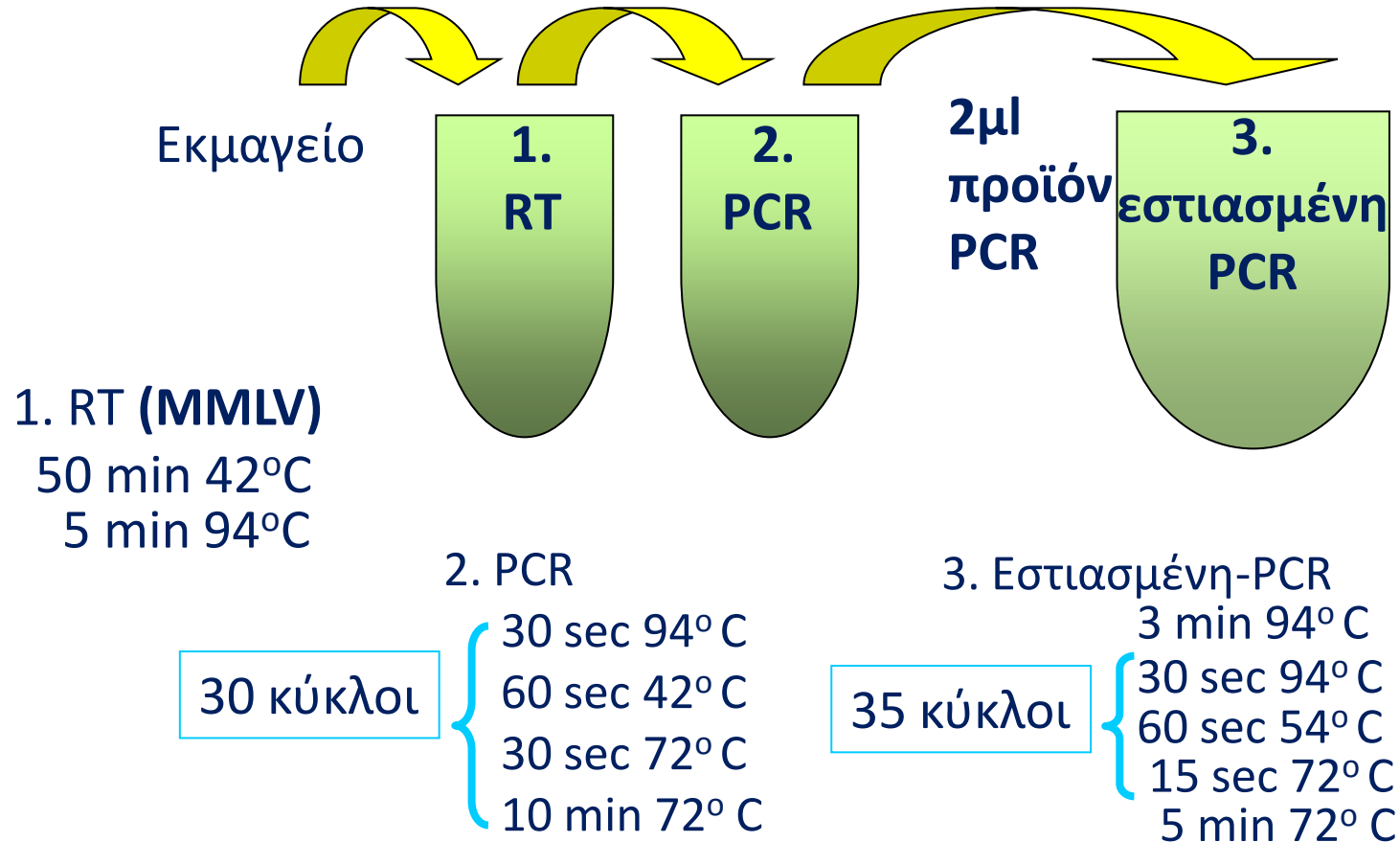
1ος γύρος:



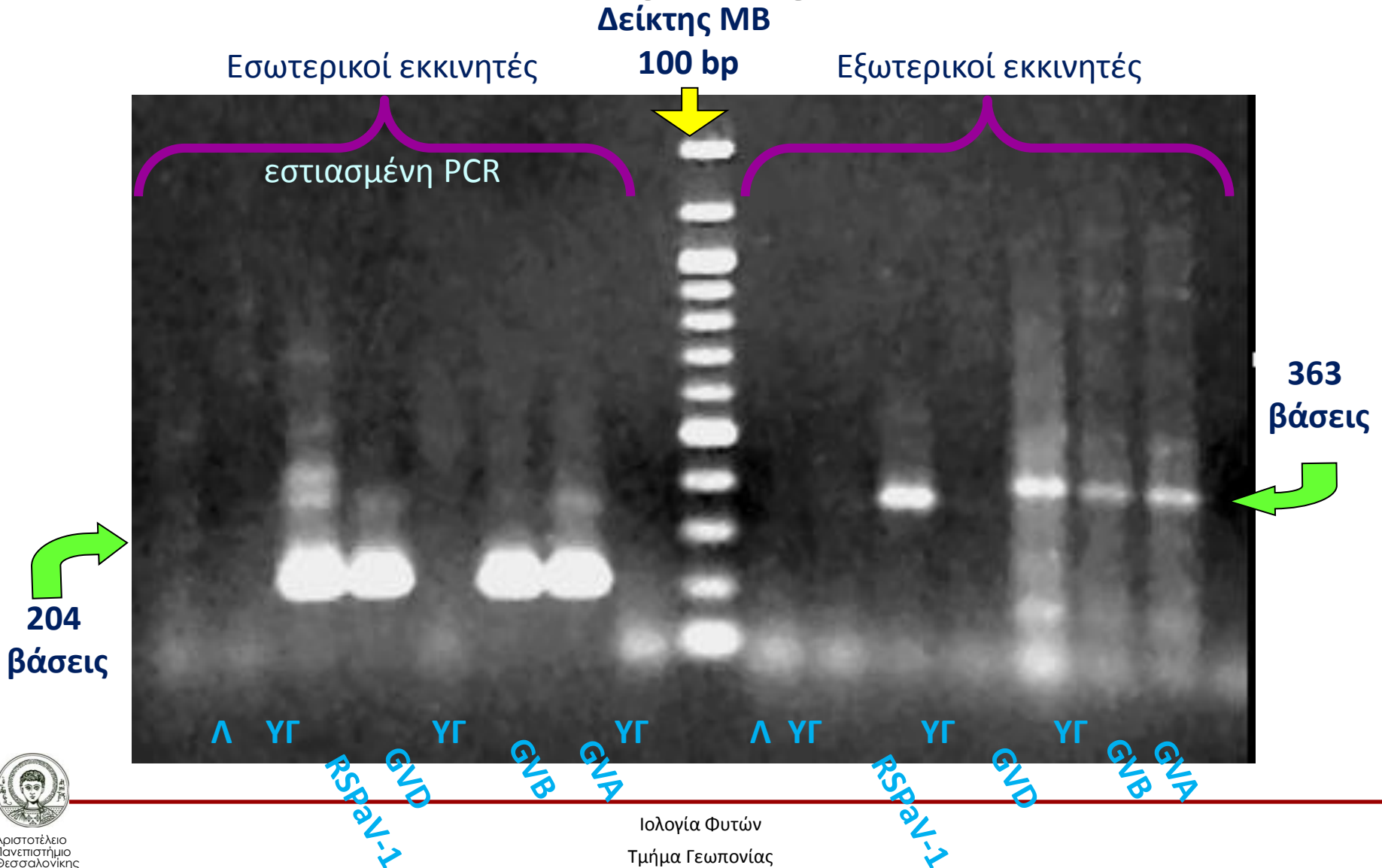
2ος γύρος:



Διαδικασία



Ανάλυση προϊόντων PCR και εστιασμένης PCR



Πλεονεκτήματα PCR

- Πιο ευαίσθητη από την ELISA.
- Δεν απαιτεί απομόνωση και καθαρισμό του ιού για την παραγωγή αντισωμάτων (ανίχνευση ιών για τους οποίους δεν έχουν παραχθεί αντισώματα).
- Το εύρος ανίχνευσης μπορεί να μεταβληθεί κατ' επιλογή. Ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών, επιτρέπει την ανίχνευση πολλών ιών ενός γένους ή ενός ιού ή τη διάκριση φυλών ενός ιού.
- Είναι δυνατή η ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών στόχων στην ίδια αντίδραση (πολλαπλή PCR).



Προβλήματα PCR

- Παρουσία αναστολέων, αντίδρασης στα φυτικά εκχυλίσματα.
- Χρονοβόρα διαδικασία επεξεργασίας των δειγμάτων.
- Προβληματική η διαδικασία απομόνωσης ιικού RNA.
- Ψευδή θετικά αποτελέσματα (επιμολύνσεις, αναπαραγωγή μη στόχων).
- Απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό.
- Υψηλό κόστος αντιδραστηρίων (Πληρωμή δικαιωμάτων πατέντας).
- Προβλήματα επαναληψιμότητας στα διαφορετικά εργαστήρια.

Δύσχρηστη η εφαρμογή της σε μαζικούς ελέγχους ρουτίνας.



Τοποθέτηση dC απέναντι από την dI, κατά την PCR

Πρώτος κύκλος PCR

Υβριδοποίηση και επέκταση του πάνω εκκινητή 'HSP π 1'

'HSP π1'
5' GGIHTIGAIITTAGGGIACIACITTTGTGTAGTGAT
3' CCTTAGCTCAATCCATGGTGC AAacacatcacta...5'

Δεύτερος κύκλος PCR, επέκταση του κάτω εκκινητή

5' GGIATIGAIITTAGGGIACIACITTTGTGTAGTGAT...3'
← CCTCAATCCCTGCTGC AAacacatcacta...5'

Τρίτος κύκλος PCR

Υβριδοποίηση και επέκταση του πάνω εκκινητή 'HSP π 1G'

'HSP π1G'
5' -GTTYGGGACGACGTTTGTGTAGTGAT
3' CCCTACCTCAATCCCTGCTGC AAacacatcacta...5'





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Μοριακή Υβριδοποίηση (Molecular Hybridization)

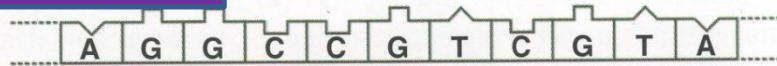
Μοριακή υβριδοποίηση

Ανιχνευτής
(probe)

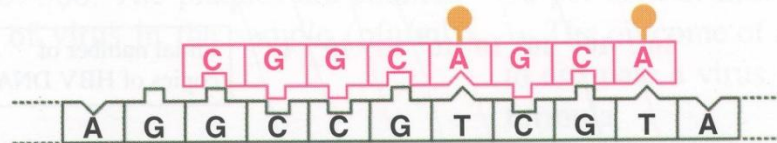
Σήμανση (label)



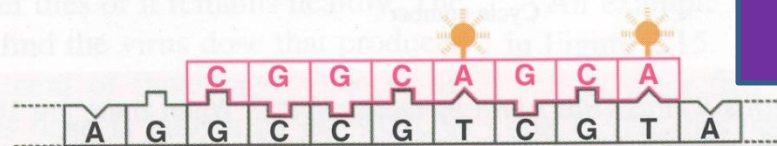
ΝΟ «στόχος»



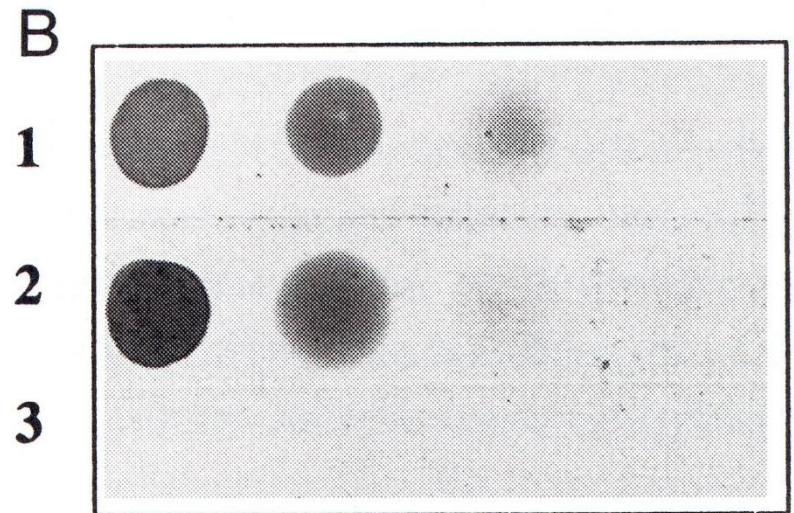
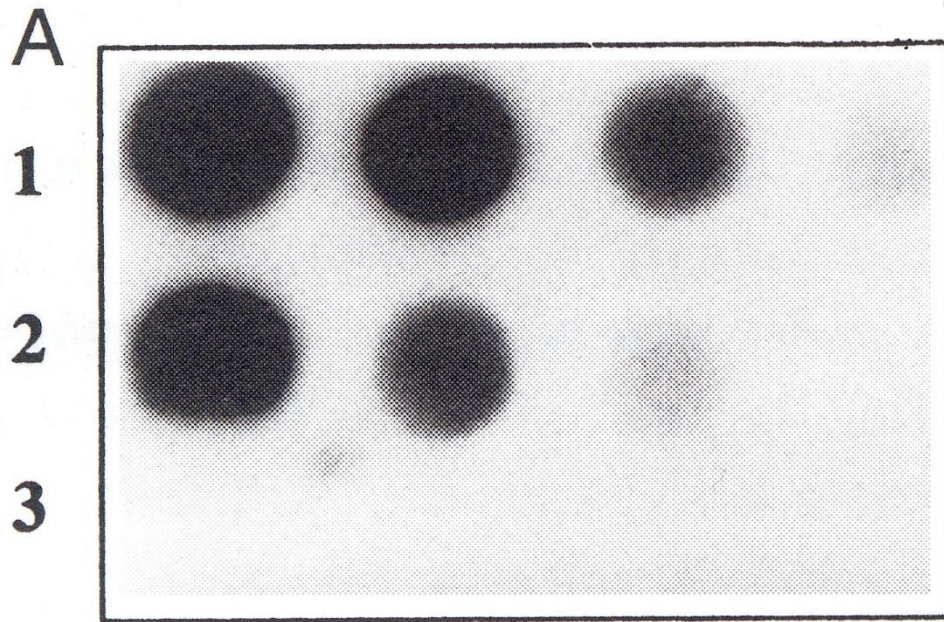
Υβριδοποίηση



Ανίχνευση



Υβριδοποίηση



Σήμανση A: σε P32, B: σε βιοτίνη



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός dsRNA

Μόρια dsRNA σε φυτικό ιστό

- Γονιδίωμα φυτικού ιού (ορισμένοι φυτικοί ιοί διαθέτουν dsRNA ως γονιδίωμα).
- Το dsRNA είναι το «ενδιάμεσο» μόριο κατά την αναπαραγωγή ιών με +ssRNA ή -ssRNA.



Φυτό μολυσμένο με ιό.



Ανάλυση dsRNA

Η πλειονότητα των φυτικών ιών έχουν +ssRNA και αναπαράγονται μέσω dsRNA (αναπαραγωγικό ενδιάμεσο).

+ssRNA

ds RNA

-ssRNA

«ενδιάμεσο»



Αντίγραφα +ssRNA

Καψιδίωση (μόλυνση νέων φυτών)



Απομόνωση και χαρακτηρισμός dsRNA (1)

- Ανίχνευση dsRNA γνωστών ιών
(Tobamo-, Furo-, Carla, Cucumo- κ.λπ.).
- Ανίχνευση dsRNA άγνωστων ιών.
 - Ασθένεια διογκωμένων νεύρων μαρουλιού (LBVYV).
 - Ασθένεια της βοθρίωσης του *Rupestris* (RSPD).
- Ανίχνευση dsRNA φυτοπαθογόνων και εδώδιμων μυκήτων (*Ophiostoma ulmi*, *Rhizoctonia solani*).



Απομόνωση και χαρακτηρισμός dsRNA (2)

- Πολλοί ιοί έχουν ssRNA, dsRNA γονιδίωμα.
- Μερικοί ιοί έχουν διηρημένο RNA γονιδίωμα (αριθμός, μέγεθος RNA: διαγνωστική αξία).
- Σε φυτά προσβλημένα με (+)RNA ιούς:
 - Πληθυσμός μορίων (+)RNA (ως μήτρα αναπαραγωγής).
 - Ιικό RNA για καψιδίωση.
 - dsRNA ως ενδιάμεσο αναπαραγωγής.
 - Υπογενωμικό RNA.

Παρουσία, αριθμός, μέγεθος μορίων dsRNA έχουν διαγνωστική αξία.

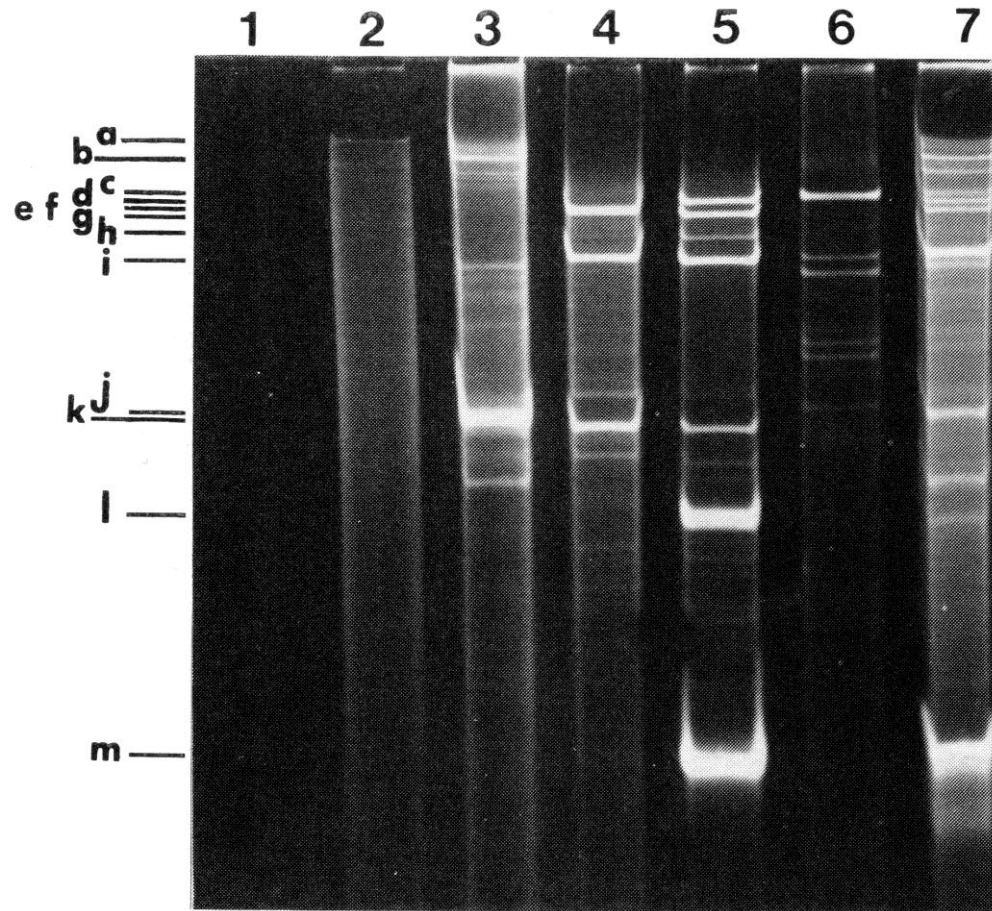


Απομόνωση και χαρακτηρισμός dsRNA - περιορισμοί

- Δυσκολία ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων.
- Αξιολόγηση αποτελεσμάτων.
- Αδυναμία εφαρμογής για όλα τα γένη.
- Όλοι οι οργανισμοί μολύνονται από ιούς (αμπέλι: dsRNA από επιμόλυνση μυκήτων).
- Αδυναμία διάγνωσης DNA ιών (δυσκολία ανίχνευσης dsRNA Rhabdo-ιών).



Απομόνωση και χαρακτηρισμός dsRNA



Προοπτικές στη διαγνωστική Ιολογία

- Παραγωγή ανασυνδυασμένων αντισωμάτων για το σύνολο των ιών.
- Απλοποίηση προετοιμασίας δειγμάτων για PCR (αποφυγή καθαρισμού ΝΟ).
- Βελτιστοποίηση PCR (νέες προσθετικές ουσίες).
- Ενοποίηση σταδίων PCR.
- Μείωση του κόστους (ELISA, PCR, κλπ).
- Ανάπτυξη μικροσυστοιχιών (DNA-chips, microarrays).



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (1/17)

- Το Έργο αυτό κάνει χρήση των ακόλουθων έργων:
- Εικόνες/Φωτογραφίες
- Εικόνα 1: < Αγρός ζαχαροτεύτλων με προσβολή από τη ριζομανία των τεύτλων (BNYVV)>< Φωτογραφικό αρχείο N. Κατή >
- Εικόνα 2: < Νεκρώσεις των αγγειωδών δεσμίδων σε κύριες ρίζες ζαχαροτεύτλων ποικιλίας Kaweduca (αριστερά κύρια ρίζα ζαχαροτεύτλου ανθεκτικής ποικιλίας) ><Φωτογραφικό αρχείο N. Κατή>
- Εικόνα 3: < Συμπτώματα στα φύλλα ροδακινιάς μετά από προσβολή από τον ιό της ευλογιάς της δαμασκηνιάς (PPV)>< Φωτογραφικό αρχείο N. Κατή >
- Εικόνα 4,5: < Συμπτώματα από τον PPV σε ροδάκινα και χαρακτηριστικοί αποχρωματισμοί του πυρήνα >< Φωτογραφικό αρχείο N. Κατή />



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (2/17)

- Εικόνα 6: <Συμπτώματα προσβολής από τον PPV σε φύλλα φασολιάς >< Φωτογραφικό αρχείο N. Κατή >
- Εικόνα 7: < Διασυστηματικά συμπτώματα του BMV στο φυτοδείκτη *C. amaranticolor* (αριστερά υγιές φύλλο) >< Φωτογραφικό αρχείο N. Κατή >
- Εικόνα 8,9: < ΗΜ: Αρνητική χρώση >< Επεξεργασία N. Κατής >
- Εικόνα 10: < Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο >
<http://www.bioimaging.ubc.ca/equipment/electron-microscopes/> >
- Εικόνα 11: < Οικογένειες και γένη των φυτικών ιών >
<http://www.emporia.edu/ksn/v53n1-april2006> >
- Εικόνα 12,13: < Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Επεξεργασία N. Κατής.



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (3/17)

- Εικόνα 14: < Ιοσωμάτια του GVA στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο>< <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=383&figno=06> >
- Εικόνα 15: < Ιοσωμάτια του MSV στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο>< Ν. Κατής (2000). «Ιολογία Φυτών». Εκδόσεις Πήγασος >
- Εικόνα 16: < Ιοσωμάτια του TMV στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο>< Ν. Κατής (2000). «Ιολογία Φυτών». Εκδόσεις Πήγασος >
- Εικόνα 17: < Ιοσωμάτια του BYV στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο>< Ν. Κατής και Α. Αυγελής (1997). «Ιολογικές Ασθένειες Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας. Εκδόσεις Αγροτύπος α.ε.>
- Εικόνα 18: <Αντισώματα>< <http://www.biosyn.com/tew/tools-for-genomics-epigenetics-and-proteomics.aspx> >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (4/17)

- Εικόνα 19: < Μόριο IgG ><
http://www.gch.ulaval.ca/agarnier/bcm20329/hur_c16.htm >
- Εικόνα 20: < Το μόριο ενός αντισώματος><
<http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-C106/151/1086,3992/> >
- Εικόνα 21: < Σύμπλοκο Αντιγόνου-Αντισώματος >< Επεξεργασία Ν. Κατής>
- Εικόνα 22: < Εξειδίκευση των αντισωμάτων><
https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=antibody%20specificity&lang=1 >
- Εικόνα 23: < Αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος>< Επεξεργασία Ν. Κατής >
- Εικόνα 24: < Southern Bean Mosaic Virus><
<http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=sbm> >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (5/17)

- Εικόνα 25: < Τρία μόρια αντισωμάτων IgG ><
<http://www.geocities.ws/micro2052000/immunity.htm> >
- Εικόνα 26: <Περιοχές αντισωμάτων >< <http://89-97-218-226.ip19.fastwebnet.it/web1/memoimm/file/anticorpi.htm> >
- Εικόνα 27: < Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων σε ζώα ><
Επεξεργασία Ν. Κατής >
- Εικόνα 28: < Διαδικασία παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων ><
Επεξεργασία Ν. Κατής >
- Εικόνα 29: < Επίπεδα IgG και IgM που ανιχνεύονται σε περιπτώσεις επαναμόλυνσης >< <http://virology-online.com/viruses/Rubella.htm> >
- Εικόνα 30: < Αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης ><
<http://www.seekbio.com/biotech/Immunity/2013/130747.html> >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (6/17)

- Εικόνα 31: < Ανοσοδιάχυση σε πηκτή αγαρόζης >< <http://pixgood.com/ouchterlony-double-diffusion.html> >
- Εικόνα 32: < Ανοσοενζυμική δοκιμή (ELISA)>< Επεξεργασία Ν. Κατής >
- Εικόνα 33,34: < Σύζευγμα ενζύμου-αντισώματος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του αντιγόνου >< Επεξεργασία Ν. Κατής >
- Εικόνα 35: < Double Antibody Sandwich-ELISA (DAS-ELISA) Άμεση μέθοδος >< Επεξεργασία Ν. Κατής >
- Εικόνα 36: < Ιοσωμάτια του ήπιου μωσαϊκού του κριθαριού μετά από “decoration” με ομόλογα αντισώματα>< Ν. Κατής (2000). «Ιολογία Φυτών». Εκδόσεις Πήγασος >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (7/17)

- Εικόνα 37: < Κυττοπλασματικά κυτταρικά έγκλειστα (γένος Potyvirus)><
<http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tkt/novenyvirusok-virologiai/ch10s02.html> >
- Εικόνα 38: < Κρυσταλλικά έγκλειστα TMV><
<http://www.freshfromflorida.com/Divisions-Offices/Plant-Industry/Science/Florida-Plant-Viruses-and-Their-Inclusions/Material-and-Methods-for-the-Detection-of-Viral-Inclusions/Tobacco-mosaic-virus-TMV-Inclusions> >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (8/17)

- Εικόνα 39: < Κρυσταλλικά έγκλειστα BYMV><
<http://www.freshfromflorida.com/Divisions-Offices/Plant-Industry/Science/Florida-Plant-Viruses-and-Their-Inclusions/Material-and-Methods-for-the-Detection-of-Viral-Inclusions/Bean-yellow-mosaic-virus-BYMV-Inclusions> >
- Εικόνα 40: < Κυττοπλασματικά έγκλειστα συσσωματωμάτων ιοσωματίων (TSWV)><
<http://www.freshfromflorida.com/Divisions-Offices/Plant-Industry/Science/Florida-Plant-Viruses-and-Their-Inclusions/Material-and-Methods-for-the-Detection-of-Viral-Inclusions/Tomato-spotted-wilt-virus-TSWV-in-Pepper> >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (9/17)

- Εικόνα 41: < Σχηματική απεικόνιση της PCR>< Andy Vierstraete, 1999 σε <http://www2.le.ac.uk/departments/genetics/vgec/highereducation/topics/recombinanttechniques>>
- Εικόνα 42: < Αποδιάταξη DNA>< Andy Vierstraete, 1999 σε <http://www.gene-quantification.de/movie.html> >
- Εικόνα 43: < Στάδια PCR>< Andy Vierstraete, 1999 σε http://dev.htds.fr/english/life_sciences/pcr_uk.php >
- Εικόνα 44: < Προϊόντα ανίχνευσης του ΟΥΔV και LYSV με αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR) σε φύλλα σκόρδου>< N. Κατής (2000). «Ιολογία Φυτών». Εκδόσεις Πήγασος >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (10/17)

- Εικόνα 45: < Ο αναδιπλασιασμός βασίζεται στην ιδιότητα της συμπληρωματικότητας των οργανικών βάσεων του DNA>< Andy Vierstraete, 1999 σε <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/centraldogma.html> >
- Εικόνα 46: < Δομικοί λίθοι του DNA>< <https://quizlet.com/9936014/macromolecules-flash-cards/> >
- Εικόνα 47: < Τα συστατικά των νουκλεοτιδίων>< Andy Vierstraete, 1999 σε <https://www.google.gr/search?sa=G&hl=el&tbs=simg:CAESxwEaxAELEKjU2AQaAggKDasQslynCBpiCmAIAxlothPWAs4HqRORCL4ItxPEB84duBPFPeEznD3GPZ4-4zPEPZ8-nT24NBowkYsCPqadLcTkt4TzYFUyEAuASd2UTTMD-hWvQdl6YIGi9ceMrQh2gBbnKma7FDd3IAIMCxCOrv4IGgoKCAgBEgQgRTPdDA sQne3BCRoyCgkKB3Byb2R1Y3QKCCQoHZGhZ3JhbQoHCgVvcmdhbgoGCgRmb250CgkKB2Nhc nRvb24M&q=nucleotides&tbm=isch&ved=0CCQQsw5qFQoTCI-jiN6L78gCFcLAFaodLXwlCw&biw=1600&bih=809#imgrc=UcYhreN4CiOYMM%3A> >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (11/17)

- Εικόνα 48: < Από τα νουκλεοτίδια στο DNA>< Andy Vierstraete, 1999 σε <http://images.1233.tw/what-is-dna/> >
- Εικόνα 49: < Το δίκλωνο DNA>< <http://www.uic.edu/classes/phar/phar331/lecture4/> >
- Εικόνα 50: < Αναδιπλασιασμός του DNA>< <http://course.cau-edu.net.cn/course/Z0387/ch06/se01/slide/slide02.html> >
- Εικόνα 51: < Αναδιπλασιασμός του DNA>< http://anthro.palomar.edu/biobasis/bio_5.htm >
- Εικόνα 52: < Διαδικασία αναδιπλασιασμού του DNA >< <http://www.uic.edu/classes/phar/phar331/lecture4/> >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (12/17)

- Εικόνα 53: < Χημεία της αντιγραφής του DNA>< <http://www.uic.edu/classes/phar/phar331/lecture4/> >
- Εικόνα 54: < Βρωμιούχο αιθίδιο, ένας παράγοντας παρεμβολής στη διπλή έλικα του DNA>< <http://www.chimicare.org/curiosita/la-chimica-dei-materiali/dose-ed-effetto-connubio-perfetto-i-meccanismi-tossicita-delle-sostanze//> >
- Εικόνα 55: < Ηλεκτροφόρηση Αγαρόζης>< Andy Vierstraete, 1999 σε <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/seq.html> >
- Εικόνα 56: < Εξακρίβωση του προϊόντος της PCR σε αγαρόζη ή separide gel>< <http://slideplayer.cz/slide/3729263/> >
- Εικόνα 57: < Ευθυγράμμιση αλληλουχιών του LYSV>< Ν. Κατής (2000). «Ιολογία Φυτών». Εκδόσεις Πήγασος



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (13/17)

- Εικόνα 58: < Επίδραση της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών (primers) στο προϊόν της PCR >< Αρχείο δεδομένων N. Κατή >
- Εικόνα 59: < Διαδικασία RT-PCR >< Αρχείο δεδομένων N. Κατή >
- Εικόνα 60: < Μοριακή υβριδοποίηση >< Επεξεργασία N. Κατής >
- Εικόνα 61,62: < Υβριδοποίηση >< Επεξεργασία N. Κατής >
- Εικόνα 63: < Απομόνωση και χαρακτηρισμός dsRNA >< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37141999000300012 >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (14/17)

- Το Έργο αυτό κάνει χρήση των ακόλουθων έργων:
- Σχήματα
- Σχήμα 1: < Τοποθέτηση dC απέναντι από την dI, κατά την PCR>< Αρχείο δεδομένων N. Κατή>



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (15/17)

- Το Έργο αυτό κάνει χρήση των ακόλουθων έργων:
- Πίνακες
- Πίνακας 1: < Επίδραση της θερμοκρασίας και της έντασης του φωτός στην ένταση των συμπτωμάτων που προκαλεί ο CMV στην κολοκυθιά>< Αρχείο δεδομένων Ν. Κατή>



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (16/17)

- Το Έργο αυτό κάνει χρήση των ακόλουθων έργων:
- Διαγράμματα:
- Διάγραμμα 1: < Κατανομή του μήκους ισωματίων του ιού T της πατάτας σε καθαρό παρασκεύσμα (χρώση με οξικό ουρανύλιο)>< Salazar and Harisson, 1978 σε N. Κατής (2000). «Ιολογία Φυτών». Εκδόσεις Πήγασος >
- Διάγραμμα 2: < Κατανομή του μήκους ισωματίων του ιού T της πατάτας σε καθαρό παρασκεύασμα (χρώση με φωσφοροβολφραμικό οξύ, pH 6,0)>< Salazar and Harisson, 1978 σε N. Κατής (2000). «Ιολογία Φυτών». Εκδόσεις Πήγασος >



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (17/17)

- Διάγραμμα 3: < Η κατανομή του μήκους των ισωματίων του ιού του κίτρινου μωσαϊκού του σκόρδου>< Smohamed and Young, 1981 σε Ν. Κατής (2000). «Ιολογία Φυτών». Εκδόσεις Πήγασος >



Σημείωμα Αναφοράς

- Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Νικόλαος Κατής - Βαρβάρα Μαλιόγκα. «Ιολογία Φυτών. Μέθοδοι διάγνωσης φυτικών ιών». Έκδοση: 1.0. Θεσσαλονίκη 2014. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://opencourses.auth.gr/courses/OCRS511/>



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά - Παρόμοια Διανομή [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

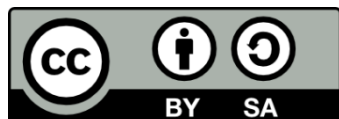
[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>





Τέλος ενότητας

Επεξεργασία: Χρυσάνθη Χαρατσάρη
Θεσσαλονίκη, Εαρινό εξάμηνο 2013-2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Σημειώματα

Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει)

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

