




ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Μάθημα 3^ο

- 
- ✓ PCR
 - ✓ Cloning
 - ✓ Υβριδοποίηση
 - ✓ Ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων
 - ✓ Τεχνικές διαχωρισμού DNA
 - ✓ Αλληλούχηση DNA

Η διαδικασία της Κλωνοποίησης

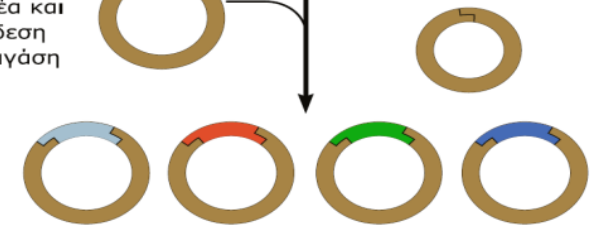
(α) Επιλογή του DNA



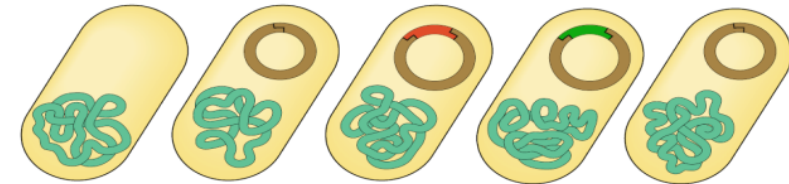
(β) Πέψη του DNA με ένζυμο περιορισμού



(γ) Ανάμειξη με το γραμμοποιημένο πλασμιδιακό φορέα και σύνδεση με λιγάση

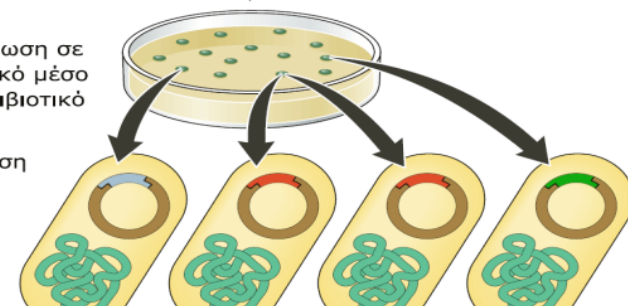


(δ) Εισαγωγή σε βακτήρια



Επίστρωση σε θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό

(ε) Απομόνωση αποικιών



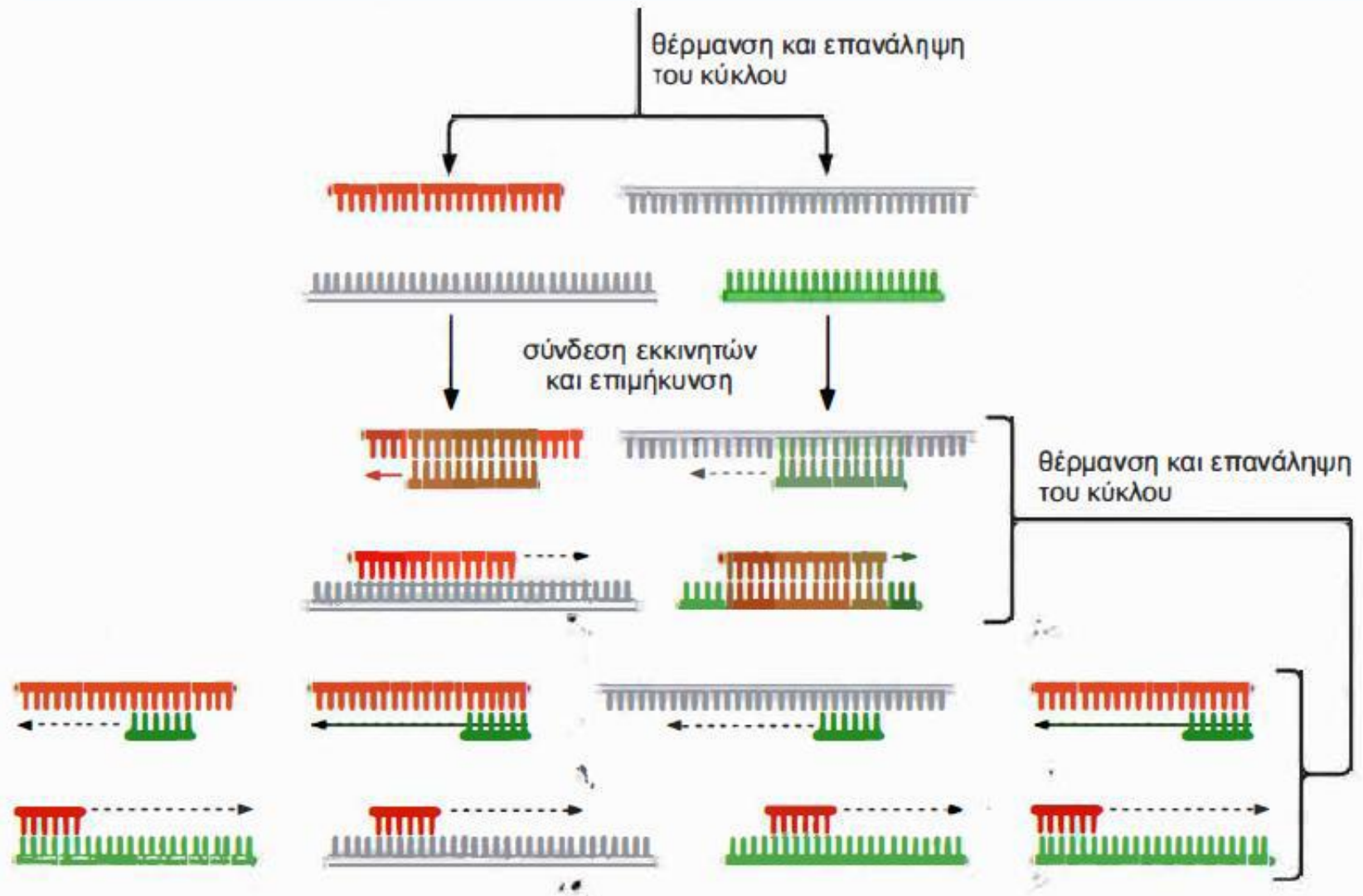
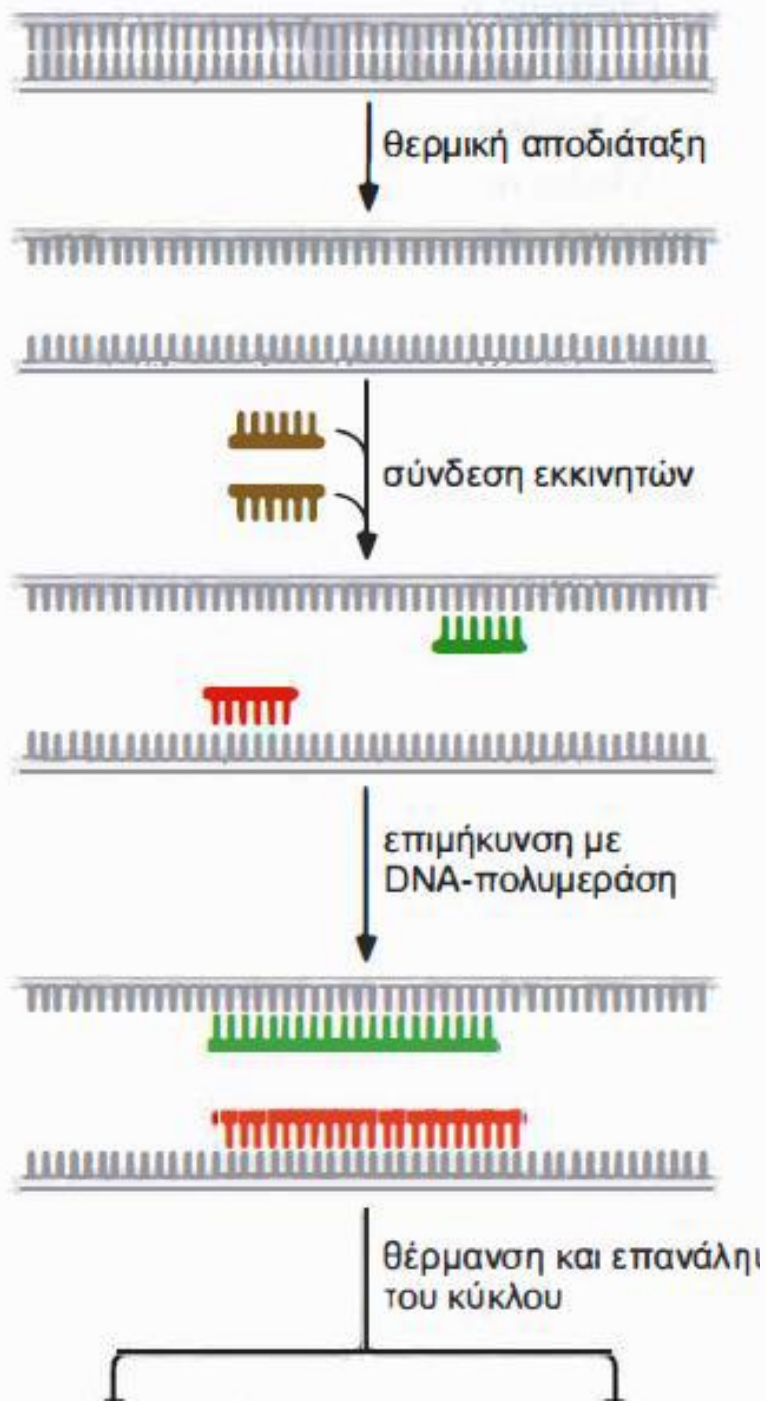
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Polymerase Chain Reaction (PCR)

Μία δυναμική μέθοδος ενίσχυσης (πολλαπλασιασμού) συγκεκριμένων τμημάτων DNA από ένα πολύπλοκο δείγμα DNA, *in vitro*.

Αντιδραστήρια

- DNA πολυμεράση
- Ολιγονουκλεοτίδια
- εκκινητές - primers
- Δεοξυ Νουκλεοτίδια - dNTPs
- Εκμαγείο DNA (δείγμα DNA που έχει απομονωθεί)
- Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει διάφορα ιόντα και έχει την κατάλληλη τιμή pH ώστε η DNA πολυμεράση να λειτουργεί βέλτιστα.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Polymerase Chain Reaction (PCR)



Real time PCR

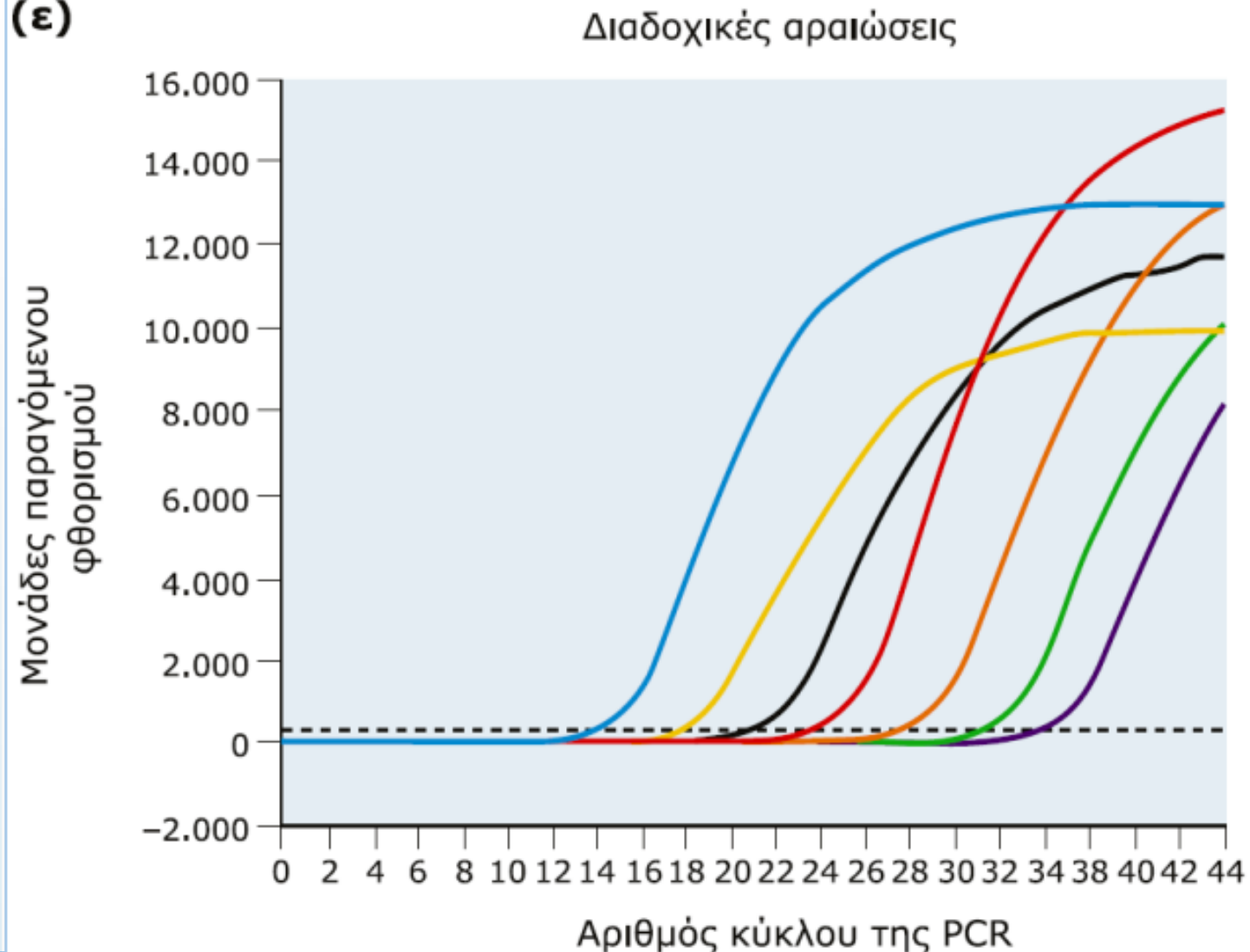
Χρήση χρωστικών που δεσμεύονται στο DNA ή χρήση επισημασμένων ιχνηθετών (probe) με φθορίζουσες ουσίες.

Στην πρώτη περίπτωση το φαινόμενο του φθορισμού εμφανίζεται μόνο αν υπάρχει δίκλωνο μόριο DNA .

Στην δεύτερη ο φθορισμός προκύπτει μετά την αποικοδόμηση του ιχνηθέτη (probe) μετά από τη δράση της δράσης εξωνουκλεάσης που έχει η DNA πολυμεράση.

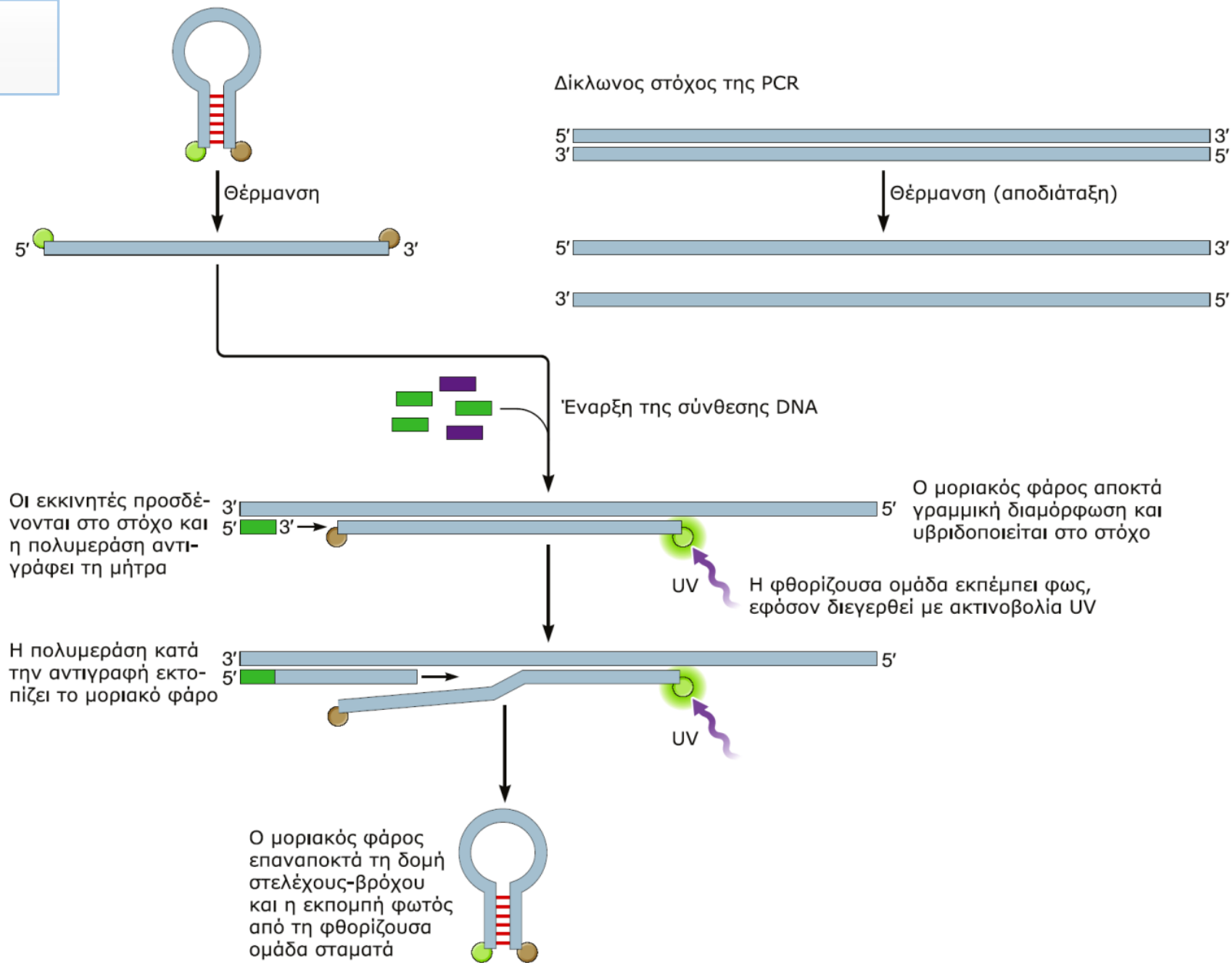
5' Φθορίζουσα ουσία 3'
Αποσιωπητής quencher)

(ε)



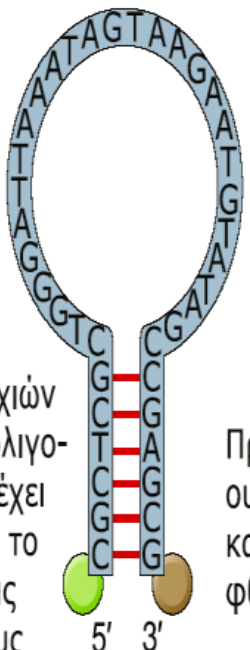
Real time PCR

(β)



(α)

Η παρουσία συμπληρωματικών αλληλουχιών στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας δομής στελέχους-βρόχου



Οι αλληλουχίες του βρόχου είναι συμπληρωματικές με μία εσωτερική περιοχή του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος

Προσαρτάται μία φθορίζουσα ουσία στο 5' άκρο του ιχνηθέτη και μία ουσία απορρόφησης φθορισμού στο 3' άκρο του

- 
- ✓ Ηλεκτροφόρηση
 - ✓ Επιλογή & συνένωση των τμημάτων DNA

Ηλεκτροφόρηση DNA (2)

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (gel) αγορόζης μετά την πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

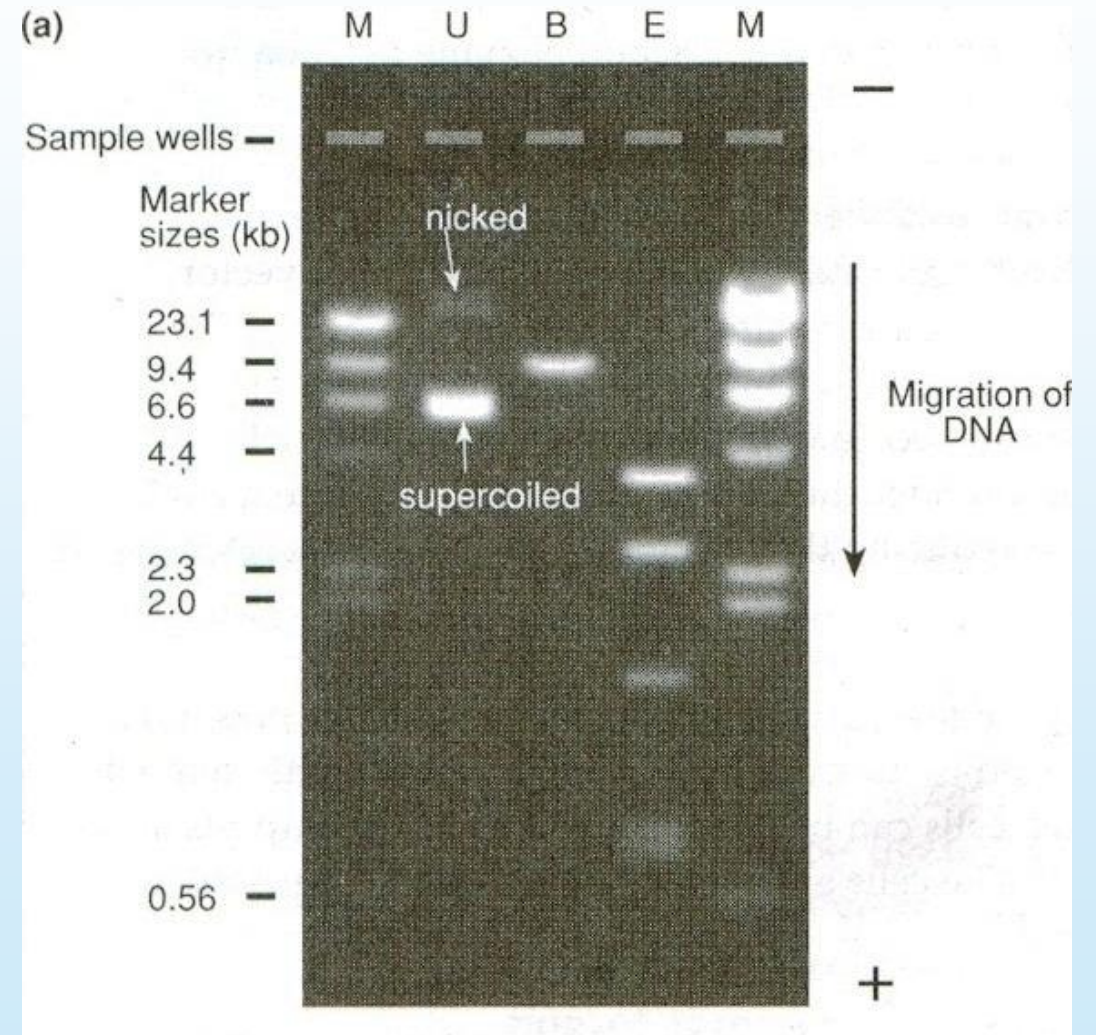
M: μάρτυρας μεγέθους;


U: άκοπο πλασμίδιο;

B: πέψη με το *Bam*HI, που προκύπτει ένα θραύσμα;

E: πέψη με *Eco*RI που προκύπτουν 5 θραύσματα (ένα σε κάθε φωτεινή ζώνη της στήλης E)

Ηλεκτροφόρηση: γραμμικά τμήματα DNA





1. Πέψη πλασμιδίου και PCR προϊόντος με δυο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες

2. Καθαρισμός

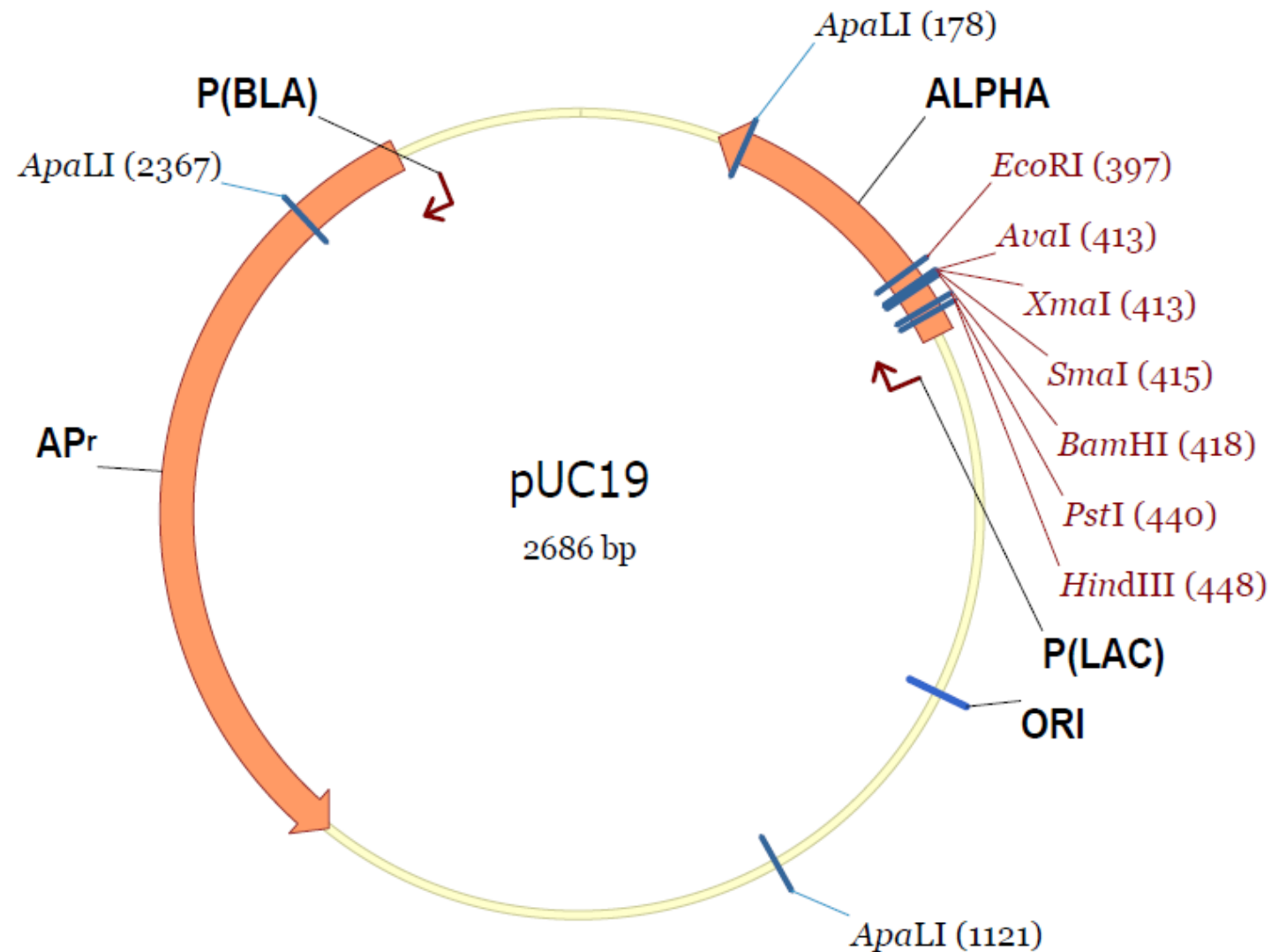
3. Ηλεκτροφόρηση για έλεγχο πέψης και εκτίμηση ποσότητας

4. Φωτομέτρηση

5. Αντίδραση συρραφής

- Συμπληρωματικά άκρα, Πλασμίδιο / Ένθεμα : 1:3
- Λεία άκρα, Πλασμίδιο / Ένθεμα : 1:6

Απαραίτητες ιδιότητες ενός πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης



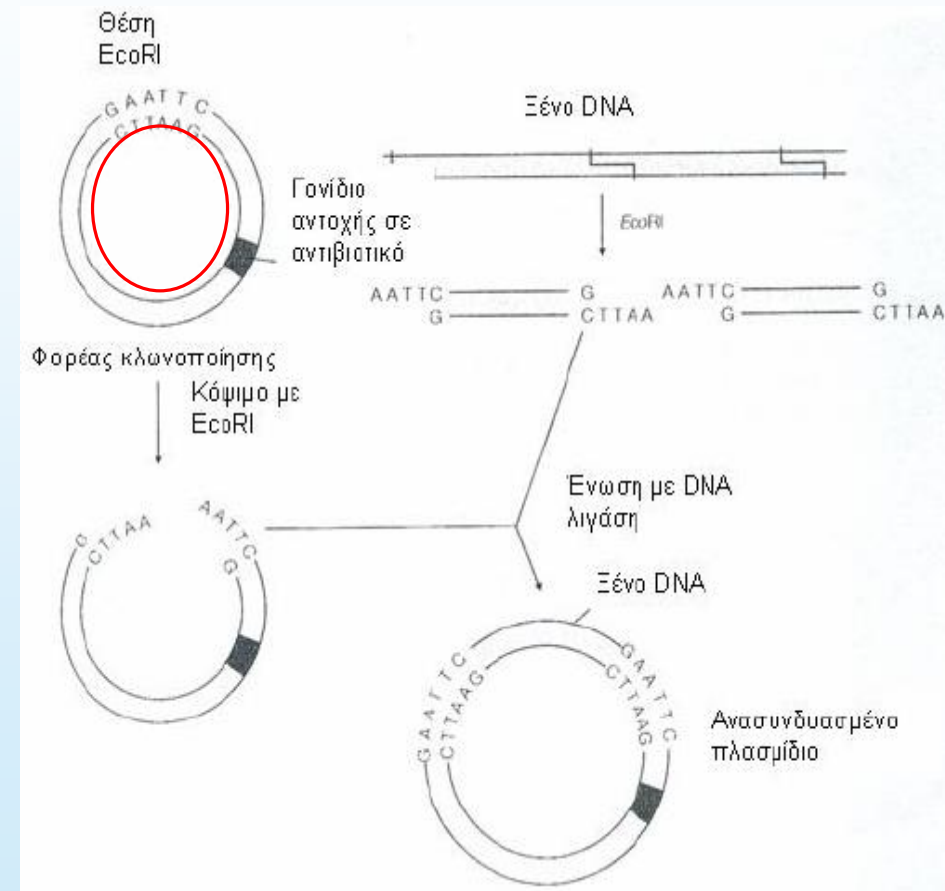




Απαραίτητες ιδιότητες ενός πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης

- 1) Αλληλουχίες έναρξης αντιγραφής (ORI).
- 2) Γονίδιο που επιτρέπει εύκολη επιλογή (π.χ. Αντίσταση σε αντιβιοτικό).
- 3) Αλληλουχίες που επιτρέπουν κοπή από αρκετές ενδονουκλεάσες περιορισμού (polylinker).
- 4) Έναν υποκινητή που να επιτρέπει ρυθμιζόμενη έκφραση.

Δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA

- Μεταφορά ξένου τμήματος DNA σε πλασμίδιο (ανασυνδυασμένο πλασμίδιο) ή άλλο φορέα κλωνοποίησης, που έχει ενσωματώσει το νέο τμήμα DNA
- Πλασμίδιο & DNA με την επιθυμητή γενετική περιοχή κλωνοποίησης κόβονται με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση φτιάχνοντας συμπληρωματικά άκρα
- Η DNA-λιγάση ενώνει τα συμπληρωματικά άκρα και έτσι δημιουργείται το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, που φέρει και το νέο τμήμα DNA



- 
- 
- ✓ Μετασχηματισμός
 - ✓ Επιλογή αποικιών που φέρουν τον κλώνο επιθυμητό DNA

Μετασχηματισμός

Η διαδικασία εισόδου του πλασμιδίου σε κύτταρα ονομάζεται μετασχηματισμός. Η ονομασία αυτή υποδηλώνει ότι το κύτταρο αλλάζει φαινότυπο (π.χ. ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό που του προσφέρει το πλασμίδιο).

Δυο τρόποι μετασχηματισμού:

1. Χημικός μετασχηματισμός (Chemical Transformation)

Τα κύτταρα γίνονται δεκτικά στην είσοδο του πλασμιδίου (competent) με τη χρήση κατάλληλων χημικών αντιδραστηρίων.

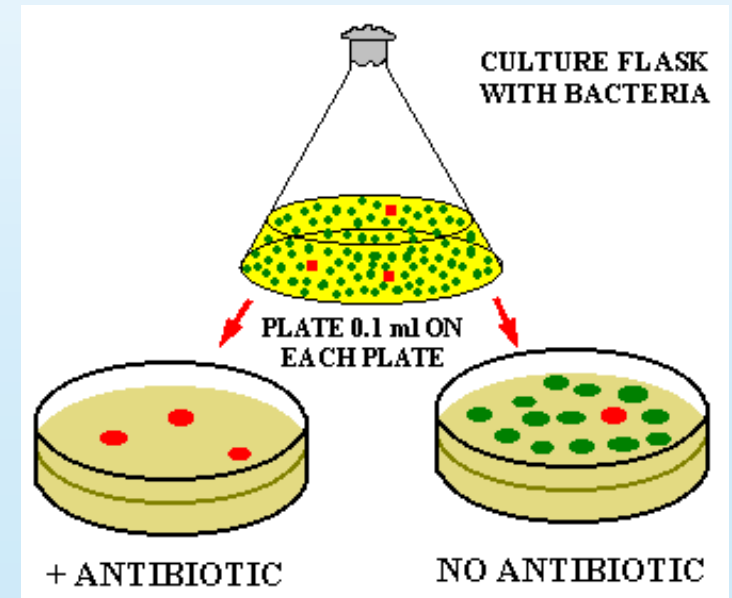
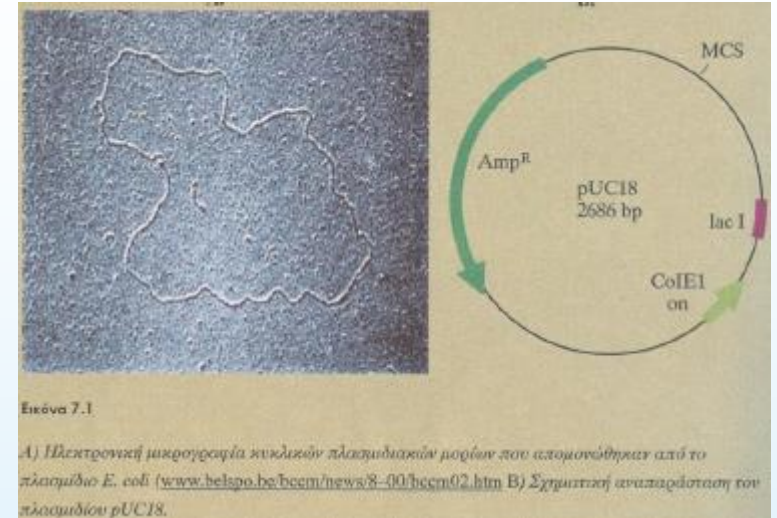
2. Ηλεκτρικός μετασχηματισμός (electroporation)

Η εισαγωγή του πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα γίνεται με τη χρήση ηλεκτρικού παλμού υψηλής διαφοράς δυναμικού, όπου τα μόρια DNA αποκτούν πολύ μεγάλη ταχύτητα και συγκρουόμενα με τα βακτηριακά κύτταρα καταφέρνουν να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα και να βρεθούν εντός του κυττάρου.

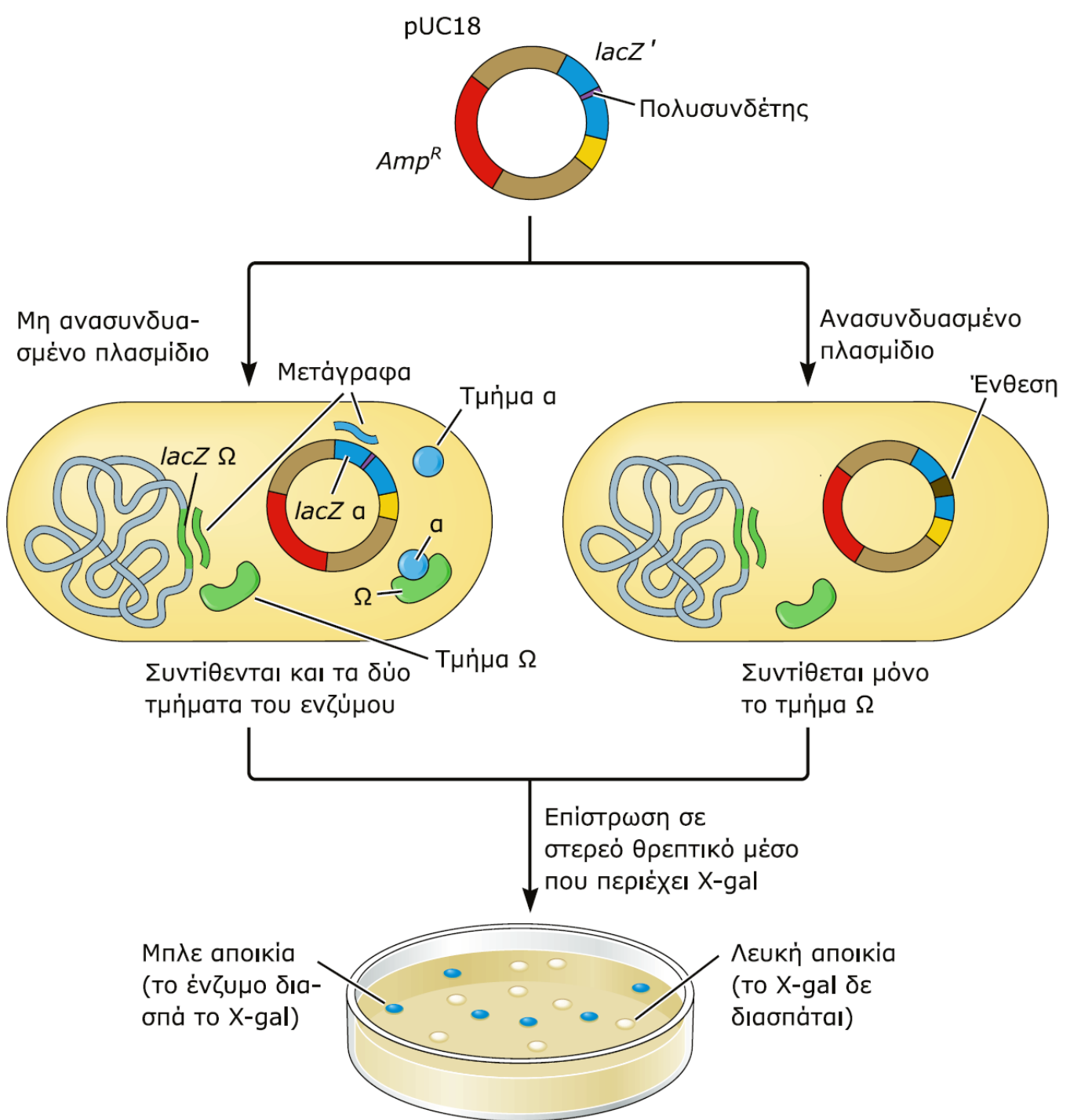
Απόδοση electroporation > απόδοση Chemical Transformation)

Στάδια παραγωγής ανασυνδυασμένου DNA και κλωνοποίησή του (2)

- ▶ Το γονίδιο *Amp^R* κωδικοποιεί το ένζυμο β-λακταμάση και η έκφρασή του προσδίδει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος
- ▶ Η β-λακταμάση εκκρίνεται από το βακτήριο στο περιβάλλον θρεπτικό μέσο και καταστρέφει το αντιβιοτικό; Αυτό επιτρέπει στο βακτήριο να συνθέσει κυτταρικό τοίχωμα και έτσι να αναπτυχθεί



Εντοπισμός ανασυνδυασμένων φορέων



Γενετικός κώδικας (1)

- Η αλληλουχία των νουκλεοτιδικών βάσεων του mRNA καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες βάσει του **γενετικού κώδικα**
- **Τρία νουκλεοτίδια αντιστοιχούν σε ένα αμινοξύ** και κάθε νουκλεοτίδιο ανήκει σε ένα μόνο κωδικόνιο
- Στο γενετικό κώδικα υπάρχουν τα **κωδικόνιο έναρξης** (το AUG, που κωδικοποιεί το αμινοξύ μεθειονίνη) και **τρία κωδικόνια λήξης** (τα UAG, UGA και UAA)
- Η παρουσία των κωδικονίων λήξης στο μόριο του mRNA οδηγεί στον τερματισμό της (πρωτεΐνο)σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Γενετικός κώδικας (2)

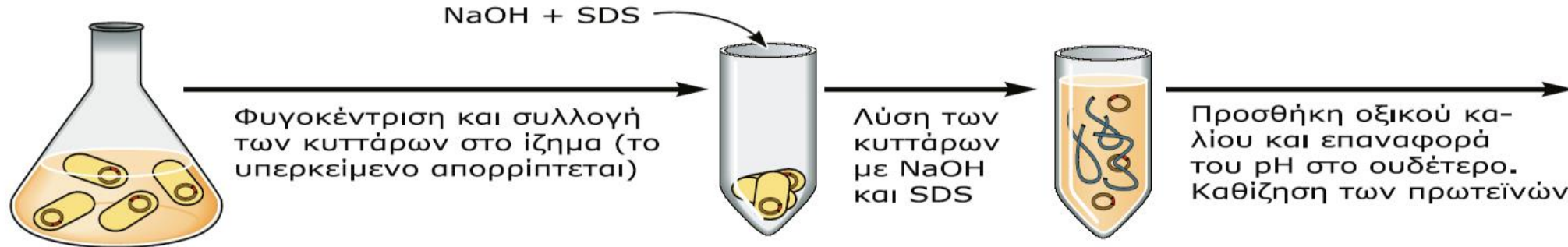
		Δεύτερο γράμμα					
		U	C	A	G		
Πρώτο γράμμα	U	UUU } φαινυλαλανίνη (phe) UUC } UUA } λευκίνη (leu) UUG }	UCU } UCC } σερίνη (ser) UCA } UCG }	UAU } τυροσίνη (tyr) UAC } UAA } λήξη UAG } λήξη	UGU } κυστεΐνη (cys) UGC } UGA } λήξη UGG } τρυπτοφάνη (trp)	U	Τρίτο γράμμα
	C	CUU } λευκίνη (leu) CUC } CUA } CUG }	CCU } CCC } προλίνη (pro) CCA } CCG }	CAU } ιστιδίνη (his) CAC } CAA } γλουταμίνη (gln) CAG }	CGU } CGC } αργινίνη (arg) CGA } CGG }	U	
	A	AUU } ισολευκίνη (ile) AUC } AUA } AUG } μεθειονίνη (met) ένορξη	ACU } ACC } θρεονίνη (thr) ACA } ACG }	AAU } ασπαργίνη (asn) AAC } AAA } λυσίνη (lys) AAG }	AGU } σερίνη (ser) AGC } AGA } αργινίνη (arg) AGG }	U	
	G	GUU } βαλίνη (val) GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } αλανίνη (ala) GCA } GCG }	GAU } ασπαρτικό οξύ (asp) GAC } GAA } γλουταμινικό οξύ (glu) GAG }	GGU } GGC } γλυκίνη (gly) GGA } GGG }	U	

Χάρτης περιορισμού (1)

- ▶ Τα παραγόμενα τμήματα DNA από τη δράση περιοριστικής ενδονουκλεάσης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μέγεθός τους, σε πήκτωμα αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση
- ▶ Χρησιμοποιώντας πολλά διαφορετικά ένζυμα περιορισμού μεμονωμένα και σε συνδυασμούς (απλές & διπλές πέψεις) είναι δυνατό να κατασκευαστεί ο χάρτης περιορισμού (*restriction map*) του DNA, όπου σημειώνονται οι θέσεις περιορισμού των χρησιμοποιούμενων ενζύμων
- ▶ Στην πήκτη αγαρόζης ηλεκτροφορούνται συγχρόνως και γνωστού MB θραύσματα DNA (*ladder*) και έτσι καθορίζονται τα μεγέθη των τμημάτων του δείγματος DNA



Πολλαπλασιασμός των αντιγράφων ενός γονιδίου με κλωνοποίηση



Καλλιέργεια βακτηρίων παρουσία αντιβιοτικού

Φυγοκέντρωση και συλλογή των κυττάρων στο ίζημα (το υπερκείμενο απορρίπτεται)

Λύση των κυττάρων με NaOH και SDS

Προσθήκη οξικού καλίου και επαναφορά του pH στο ουδέτερο. Καθίζηση των πρωτεϊνών

Κατακρήμνιση των τεϊνών με φυγοκέντρωση

Συλλογή του υπερκείμενου

Τα πλασμίδια παραμένουν στο υπερκείμενο

Το γονιδιωματικό DNA και οι πρωτεΐνες καταλήγουν στο ίζημα

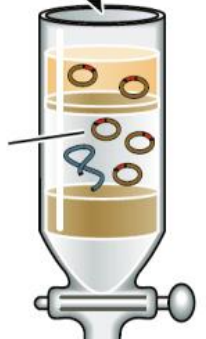
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με πρόσδεση σε ειδικό υπόστρωμα

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με φυγοκέντρωση και κλίση χλωριούχου

Μεταφορά του υπερκείμενου σε μία κολόνα

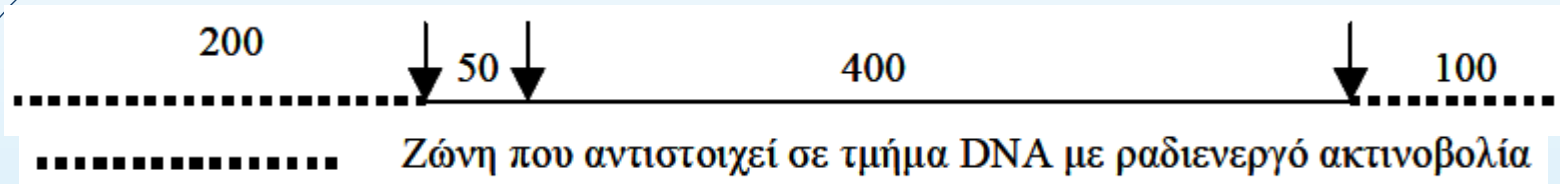
Κατακρήμνιση του υπερκείμενου με προσθήκη αιθέρα και φυγοκέντρωση

Παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων το πλασμίδιο προσδένεται στην κολόνα



Χάρτης περιορισμού (2)

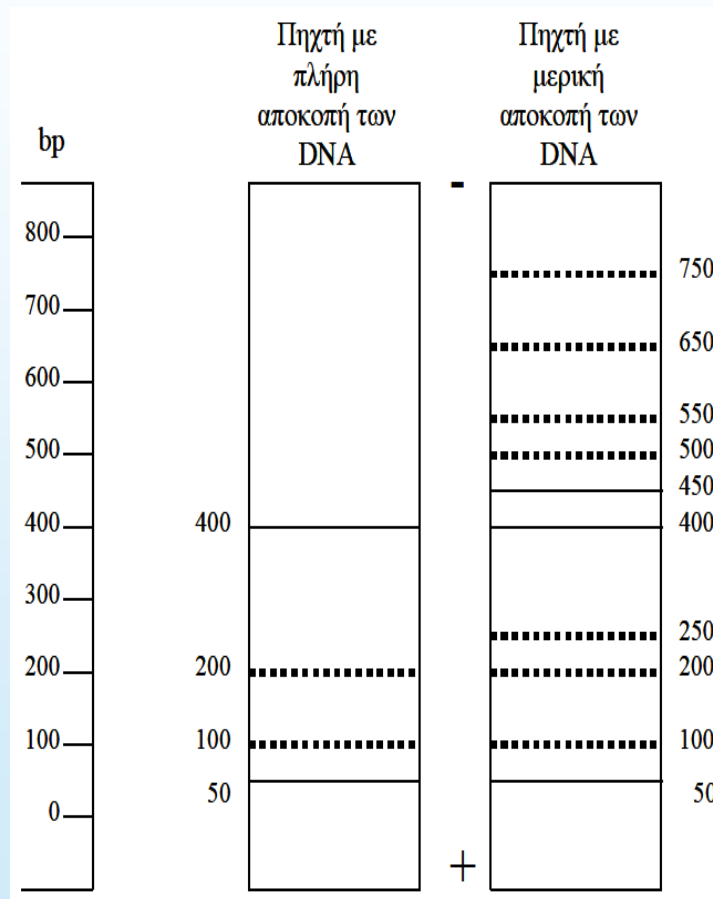
- ▶ Υποθετικό τμήμα DNA 750 bp με τα δυο 5' άκρα του να έχουν σημειωθεί με ραδιενεργό φωσφόρο (^{32}P)
- ▶ Το DNA κόβεται με ένα περιοριστικό ένζυμο σε τρία σημεία και άρα στην πηκτική ηλεκτροφόρηση των τμημάτων θα προκύψουν 4 ζωνώσεις (200, 50, 400, 100 bp)



- ▶ Οι ζωνώσεις των 100 & 200 bp που ακτινοβολούν, προέρχονται από τα δύο άκρα του DNA; Άγνωστη όμως η θέση των τμημάτων 50 bp & 400 bp
- ▶ Η θέση των τμημάτων αυτών προσδιορίζεται με επανάληψη της διαδικασίας, όπου σε νέα τμήματα DNA σαν το αρχικό εφαρμόζεται το περιοριστικό ένζυμο μόνο για μικρό χρονικό διάστημα ή σε πιο χαμηλή θερμοκρασία, ώστε να επιβραδύνει την αντίδραση κοπής του DNA

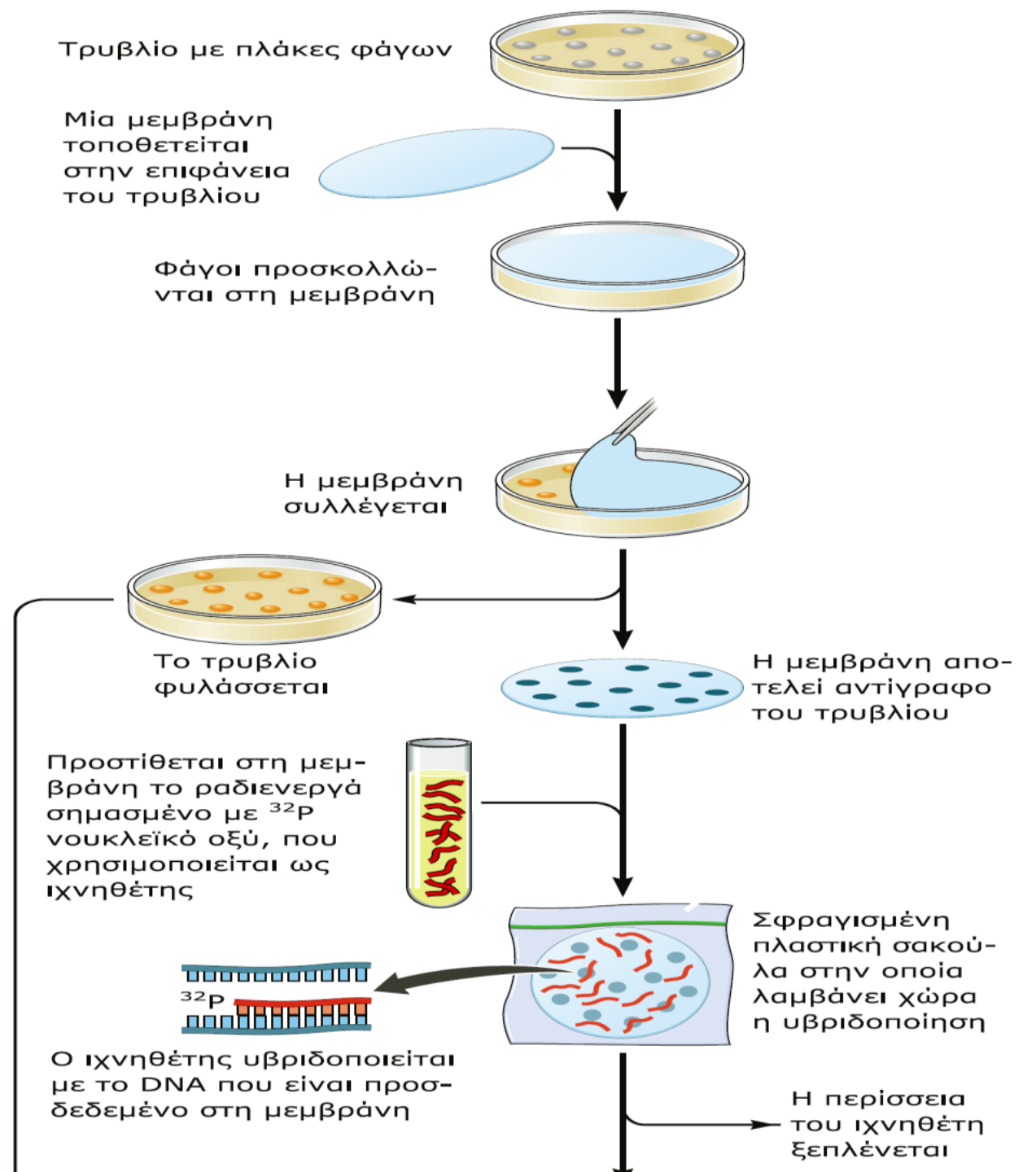
Χάρτης περιορισμού (3)

- ▶ Τώρα κάποια τμήματα DNA μπορεί να κοπούν και στα τρία σημεία, άλλα μόνο στο 1^ο σημείο, άλλα μόνο στο 2^ο, κ.ο.κ.
- ▶ Έτσι προκύπτουν διάφορα τμήματα (250 bp, 650 bp, 500 bp κ.λπ.), οπότε η ηλεκτροφόρηση των τμημάτων αυτών θα δώσει διάφορες ζωνώσεις
- ▶ Συμβολή στον προσδιορισμό των ενδιάμεσων τμημάτων (50 & 400 bp) στο πήκτωμα με μερική αποκοπή των τμημάτων DNA: με ραδιενεργό τμήμα των 250 bp (και όχι των 150 bp), σημαίνει ότι τα 50 bp είναι παρακείμενο αυτού με 200 bp, καθώς επίσης προκύπτει ραδιενεργό τμήμα των 500 (και όχι των 600 bp), άρα το τμήμα των 400 bp είναι παρακείμενο αυτού με 100 bp

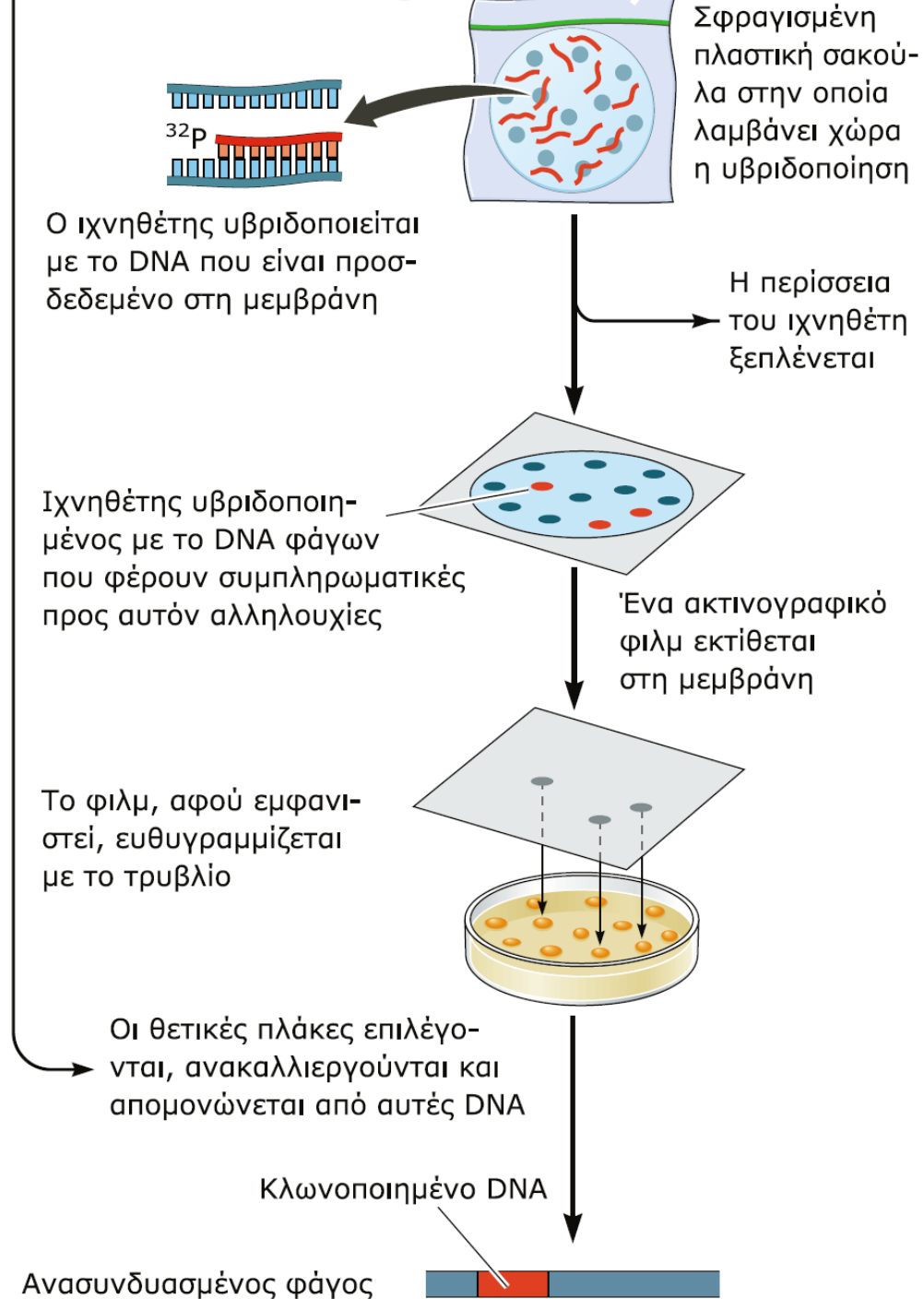


RFLP

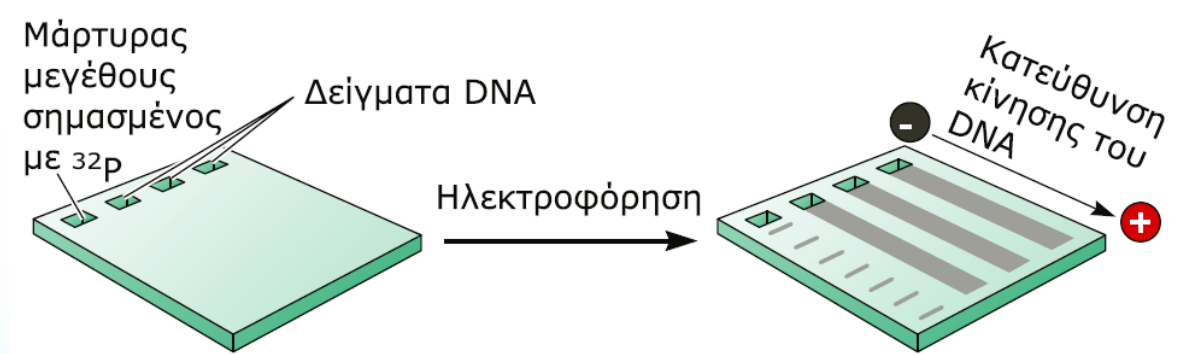
Αναγνώριση αποικιών θετικών κλώνων με υβριδισμό-1



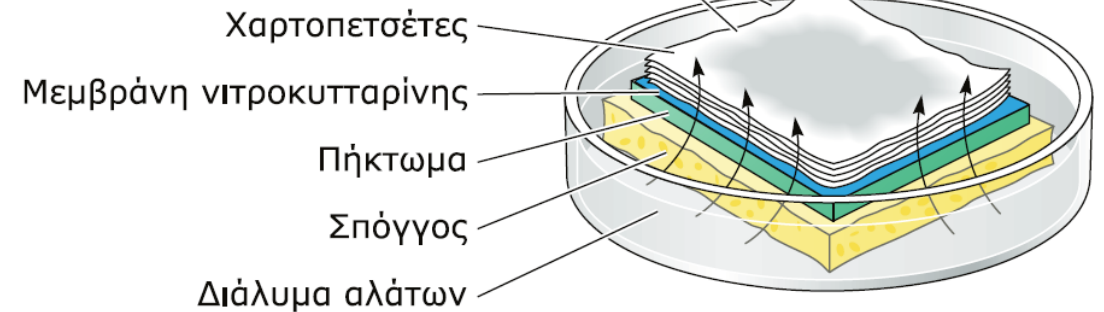
Αναγνώριση & απομόνωση αποικιών θετικών κλώνων με υβριδισμό-2



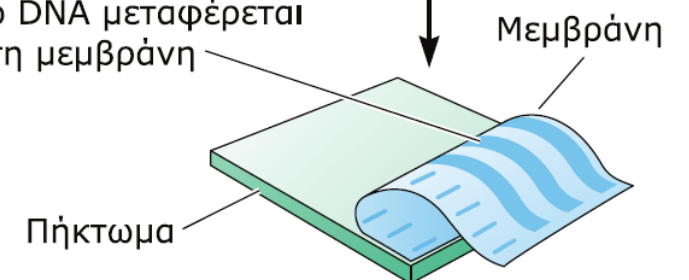
Υβριδισμός κατά Southern (1)



Το διάλυμα διερχόμενο από το πήκτωμα και τη μεμβράνη μετακινείται προς τις χαρτοπετσέτες



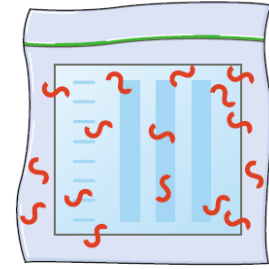
Το DNA μεταφέρεται στη μεμβράνη



Υβριδισμός κατά Southern (2)

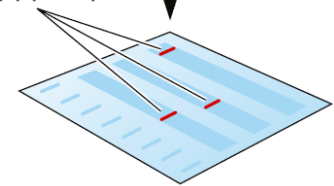
Προστίθεται στη μεμβράνη το ραδιενεργά σημασμένο με ^{32}P νουκλεϊκό οξύ, που χρησιμοποιείται ως ιχνηθέτης

Σφραγισμένη πλαστική σακούλα στην οποία λαμβάνει χώρα η υβριδοποίηση



Ιχνηθέτης υβριδοποιημένος με τις συμπληρωματικές προς αυτόν αλληλουχίες, που βρίσκονται καθηλωμένες στη μεμβράνη

Η περίσσεια του ιχνηθέτη ξεπλένεται



Ένα ακτινογραφικό φιλμ εκτίθεται στη μεμβράνη

Αποτέλεσμα της αυτοραδιογραφίας

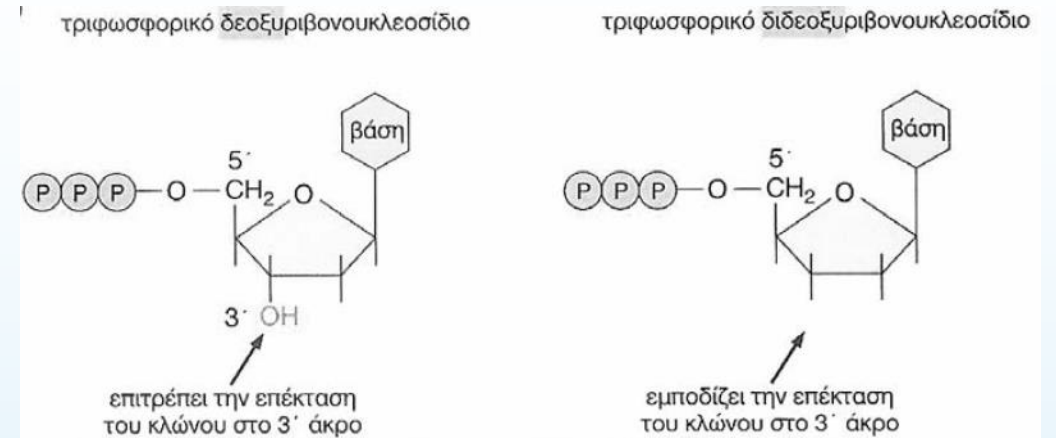




✓ Προσδιορισμός αλληλουχίας DNA-
Αλληλούχηση κατά Sanger

Αλληλούχηση DNA με την ενζυμική μέθοδο Sanger (1)

■ Στηρίζεται στη χρήση των τριφωσφορικών **δι**-δεοξυριβονουκλεοτιδίων (αναλόγων των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων χωρίς την 3'-υδροξυλομάδα/OH)

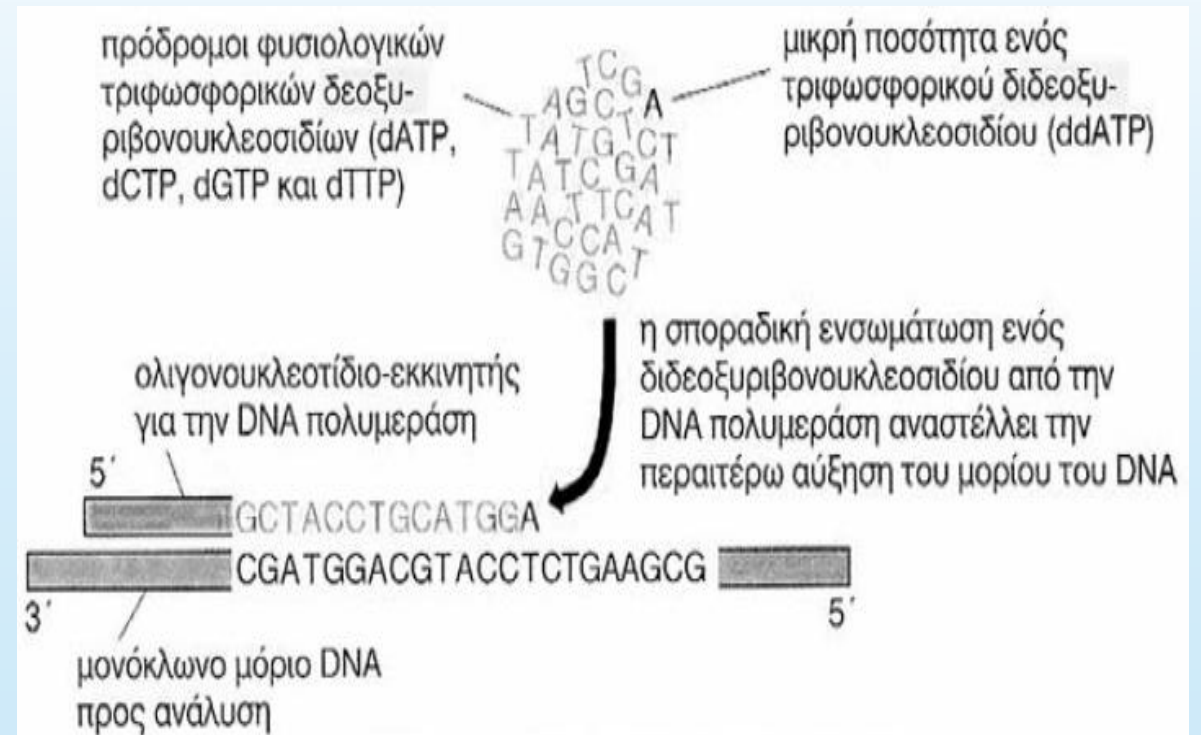


- Σύνθεση *in vitro* DNA σε μείγμα (φιαλίδιο) που περιέχει: μονόκλιωνα μόρια DNA προς αλληλούχηση, DNA πολυμεράση, μικρό DNA-εκκινητή (βοηθά την πολυμεράση να ξεκινήσει την αντιγραφή) και τα 4 δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dTTP, dCTP; Ένα από αυτά ίσως είναι ραδιοσημασμένο)
- Αν ένα ανάλογο **δι**-δεοξυριβονουκλεοτίδιο προστεθεί στο μείγμα των δεοξυριβονουκλεοτιδίων, τότε θα ενσωματωθεί στην αυξανόμενη αλυσίδα; Η αλυσίδα δεν διαθέτει πλέον 3'-OH, οπότε αναστέλλεται η προσθήκη του επόμενου νουκλεοτιδίου και η συνέχειά της σταματά σε αυτό το σημείο

Αλληλούχηση DNA με την ενζυμική μέθοδο Sanger (2)

- Στο μείγμα των νουκλεοτιδίων έχει συμπεριληφθεί π.χ. μικρή ποσότητα διδεοξυ-ATP (ddATP), το οποίο συναγωνίζεται με την περίσσεια του δεοξυ-ATP (dATP) και σποραδικά ενσωματώνεται, κατά τύχη, σε έναν αυξανόμενο κλώνο DNA

Παράγεται τελικά μια ομάδα μορίων DNA με διαφορετικό μήκος, τα οποία θα είναι συμπληρωματικά με το DNA-εκμαγείο, που αναλύεται και θα τερματίζουν σε καθένα από τα διαφορετικά νουκλεοτίδια A

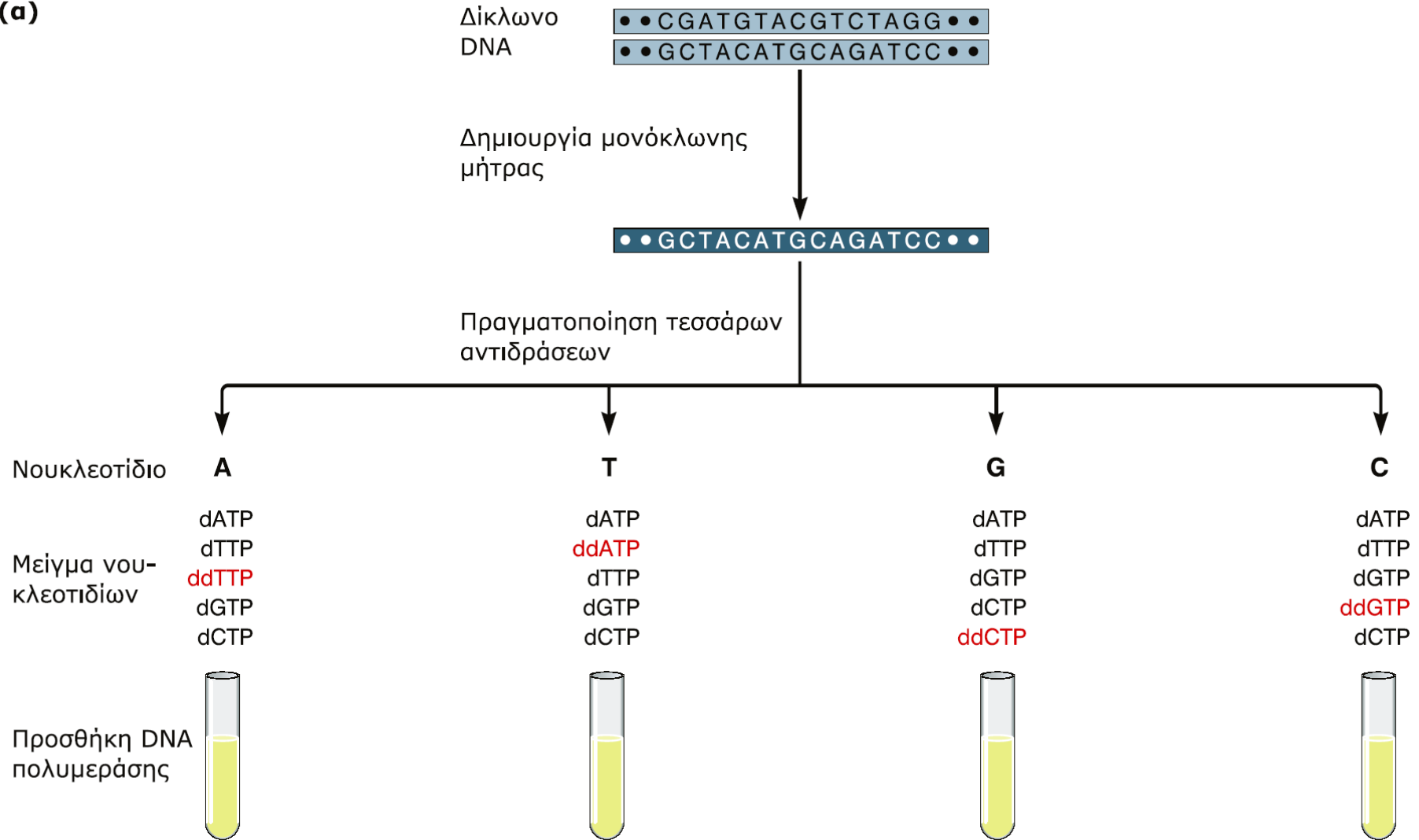


Αλληλούχηση DNA με την ενζυμική μέθοδο Sanger (3)

- ▶ Για τον καθορισμό της πλήρους αλληλουχίας κλάσματος DNA, αρχικά το δίκλωνο DNA διαχωρίζεται (μετουσίωση) στους επιμέρους κλώνους του (με θέρμανση) & ένας από αυτούς χρησιμοποιείται ως εκμαγείο, για τις περισσότερες αντιδράσεις
- ▶ Τα 4 διαφορετικά διδεοξυριβονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται σε 4 ξεχωριστές αντιδράσεις σύνθεσης αντιγράφων του ίδιου μονόκλωνου DNA εκμαγείου; Κάθε σωλήνας με ένδειξη G, A, T ή C περιέχει τα 4 dNTPs, την DNA πολυμεράση και το ddGTP, ddATP, ddTTP ή ddCTP, αντίστοιχα
- ▶ Καθώς συντίθεται DNA, τα νουκλεοτίδια προσθέτονται στην αυξανόμενη αλυσίδα από τη DNA-πολυμεράση; Κάθε αντίδραση παράγει ομάδα μορίων DNA, τα οποία σταματούν σε διαφορετικά σημεία της αλληλουχίας τη στιγμή, που ένα δι-δεοξυριβονουκλεοτίδιο ενσωματωθεί στην αλυσίδα στη θέση ενός κανονικού νουκλεοτιδίου

Αλληλούχηση DNA με την ενζυμική μέθοδο Sanger (3β)

(α)

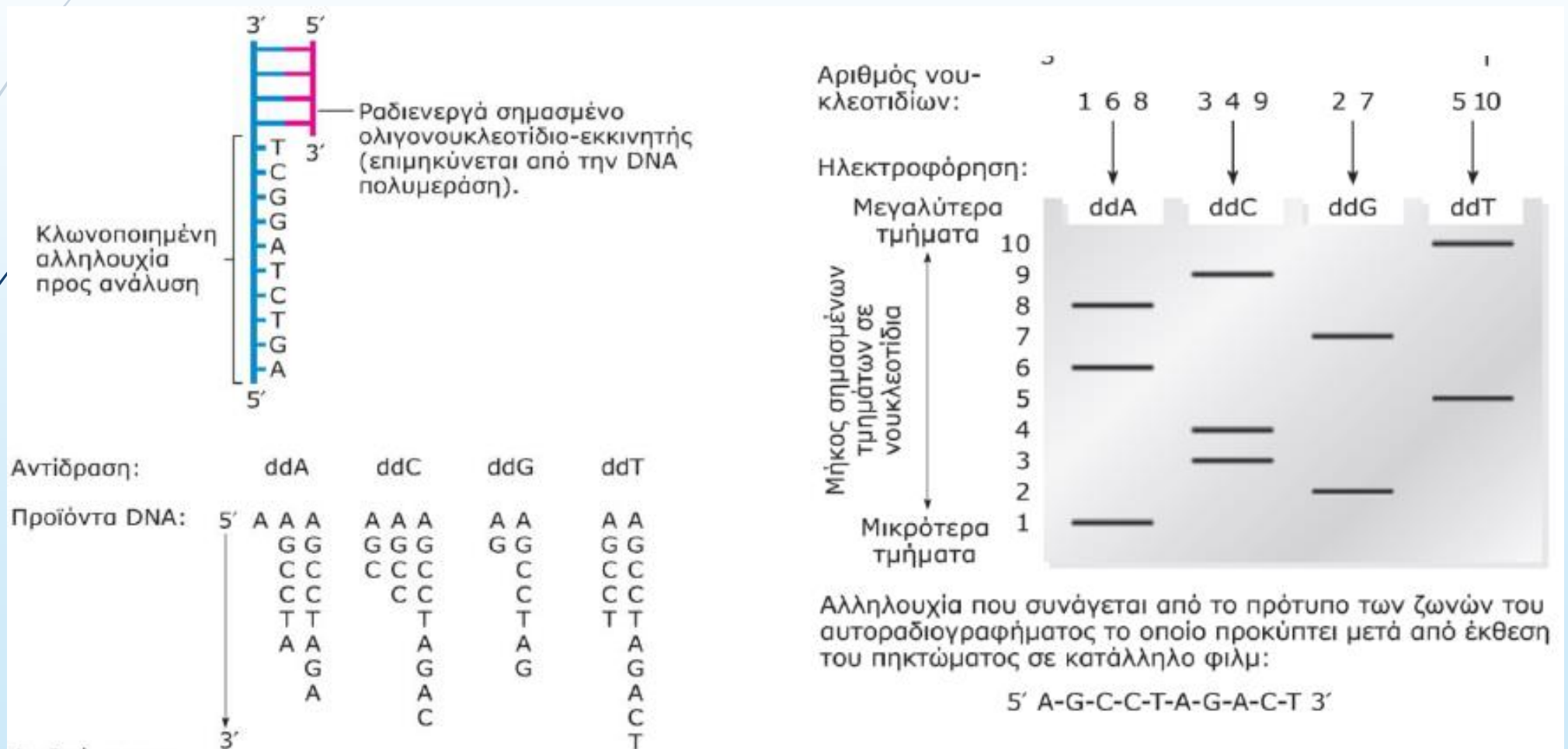


Αλληλούχηση DNA με την ενζυμική μέθοδο Sanger (4)

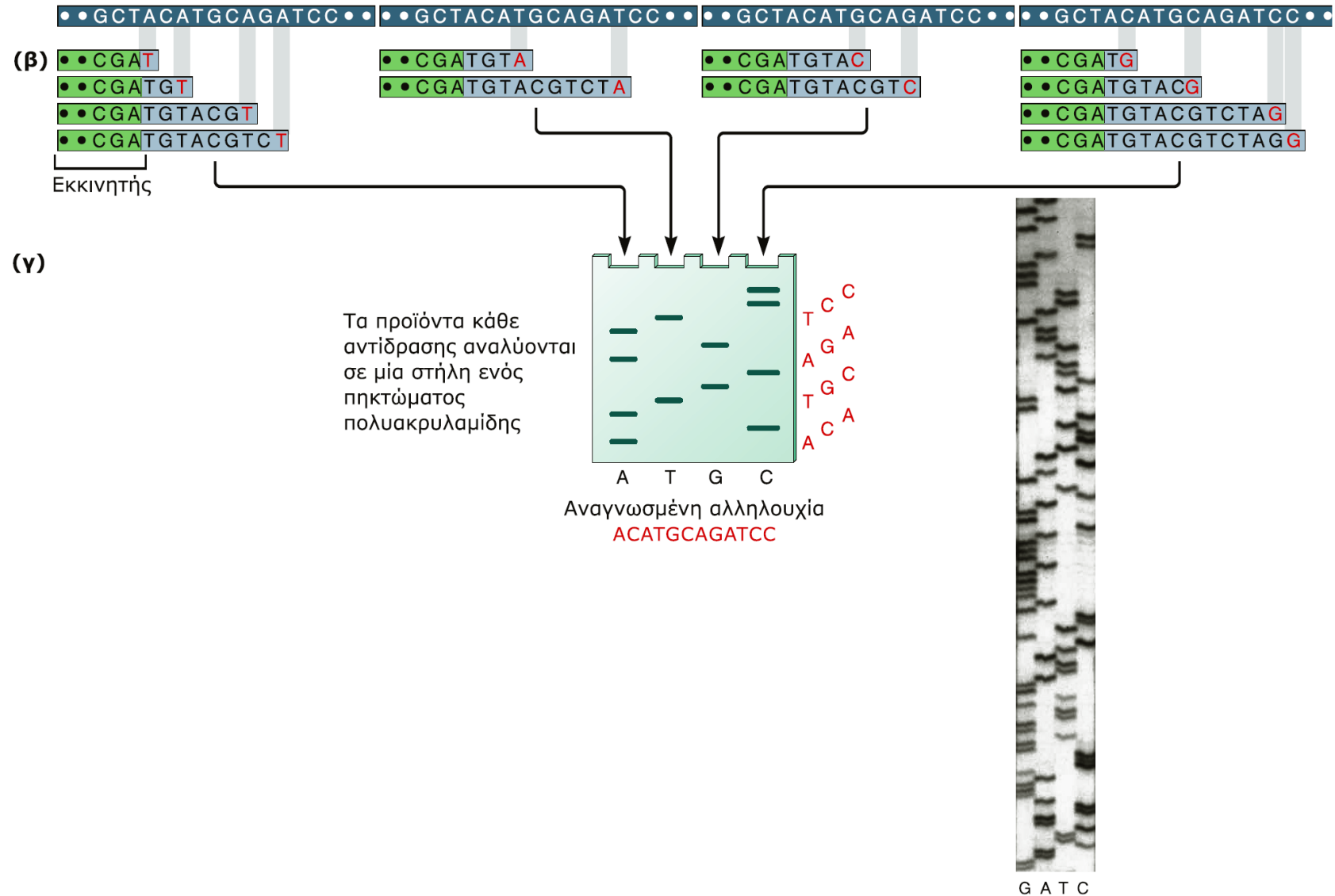
- ▶ Τα προϊόντα αυτών των 4 αντιδράσεων διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε 4 παράλληλες στήλες μιας πηκτής πολυακρυλαμίδης (A, T, G, C)
- ▶ Τα νεοσυντιθέμενα κλάσματα ανιχνεύονται βάση (ραδιενεργού ή φθορίζοντα) δείκτη, που έχει ενσωματωθεί είτε στον εκκινητή, είτε σε ένα από τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, που χρησιμοποιούνται, για την επέκταση της αλυσίδας του DNA
- ▶ Σε κάθε στήλη, οι ζώνες αναπαριστούν κλάσματα που έχουν τερματιστεί σε ένα ορισμένο νουκλεοτίδιο, αλλά σε διαφορετικές θέσεις του DNA; Η αλληλουχία του νεοσυντιθέμενου κλώνου καθορίζει με ανάγνωση των ζωνώσεων αρχίζοντας από το κάτω μέρος της πηκτής

Αλληλούχηση DNA με την ενζυμική μέθοδο Sanger (5)

- Η αλληλουχία αυτή είναι ταυτόσημη με την αλληλουχία του κλώνου 5' → 3' του αρχικού, δίκλωνου DNA



Αλληλούχηση DNA με την ενζυμική μέθοδο Sanger (5)

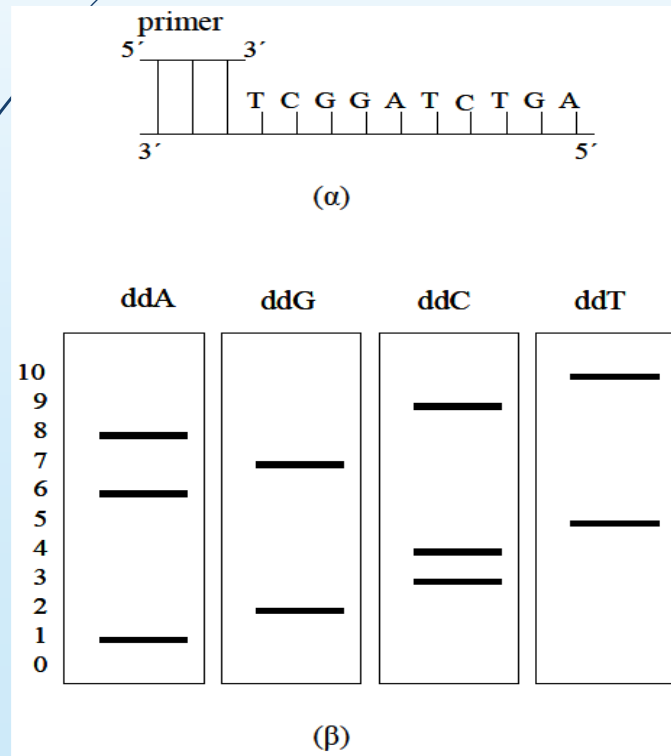


Παράδειγμα αλληλούχησης DNA με την ενζυμική μέθοδο Sanger (1)

- ▶ Παράδειγμα: έστω η αλληλουχία βάσεων τμήματος DNA 10 νουκλεοτιδίων και μετά τη μετουσίωσή της, έστω κατάλληλος 5'-3' primer, που υβριδίζεται πριν το τμήμα DNA, που μελετάται (**α**)
- ▶ Το υπόστρωμα **ddA** (από τα 4 συνολικά) θα δώσει τρία νέα τμήματα, το 1^ο μόνο με A (μία βάση), το 2^ο με σύνθεση AGCCTA (6 βάσεις) και το 3^ο με σύνθεση AGCCTAGA (8 βάσεις); Σε αυτό το μέσο θα γίνει σύνθεση της αλυσίδας μέχρι που σε κάποια θέση τοποθετηθεί ddA και άρα η περαιτέρω επιμήκυνση αναστέλλεται
- ▶ Με τον ίδιο τρόπο, το δεύτερο υπόστρωμα με τα απαραίτητα νουκλεοτίδια (και η ddG, σε μειωμένη αναλογία) θα δώσει δυο ζώνες, που θα αντιστοιχούν σε 2 και 7 βάσεις

Παράδειγμα αλληλούχησης DNA με την ενζυμική μέθοδο Sanger (2)

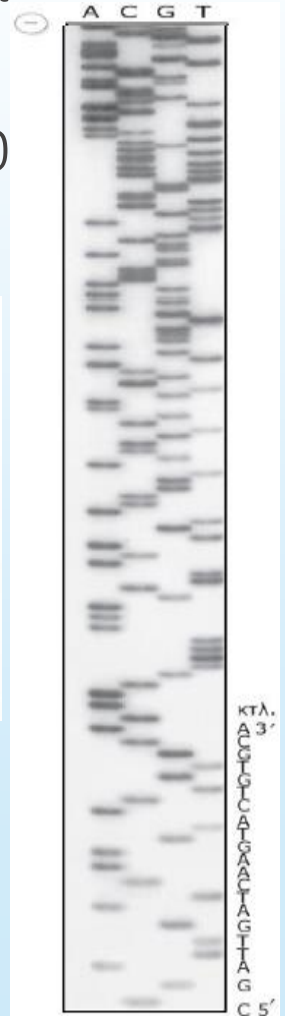
- Από τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας στα 4 διαφορετικά υποστρώματα θα προκύψουν τμήματα DNA, τα οποία στην ηλεκτροφόρηση θα δώσουν ζωνώσεις (β)
- Η συντιθέμενη αλυσίδα είναι μεγέθους AGCCTAGACT 10 βάσεων (γ)



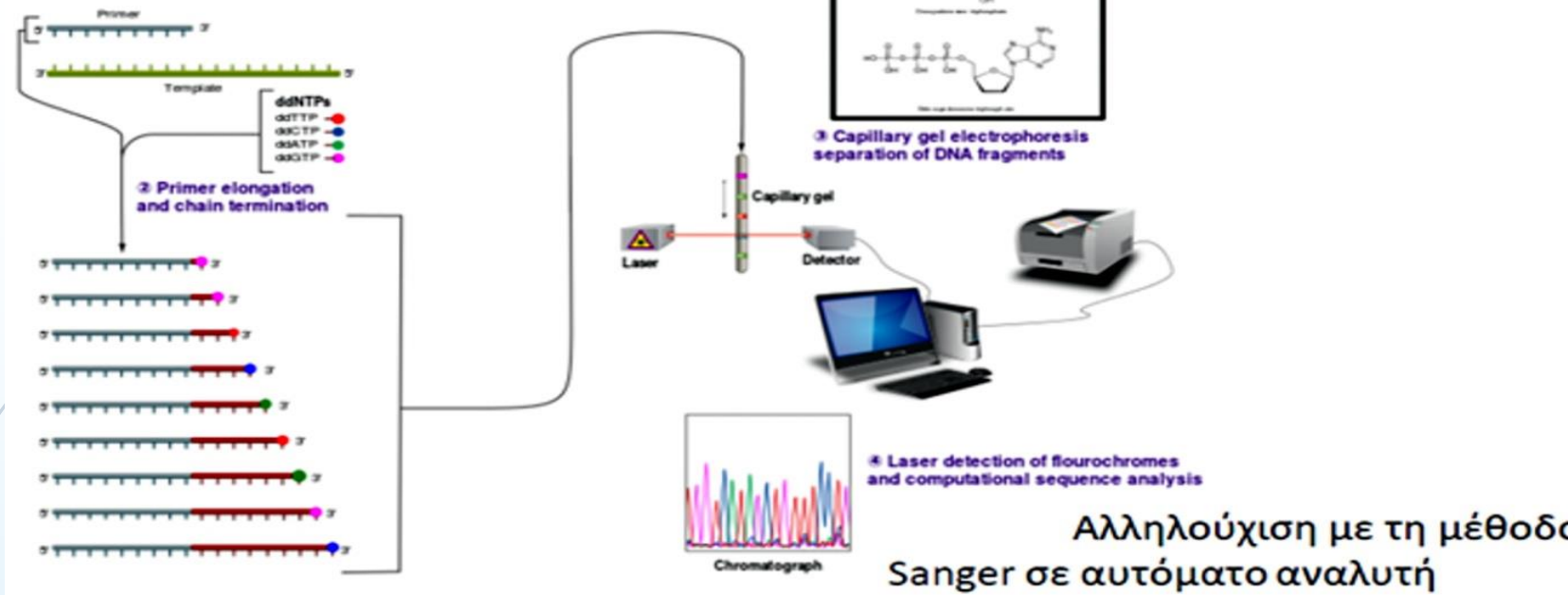
5' A-G-C-C-T-A-G-A-C-T 3'

(γ)

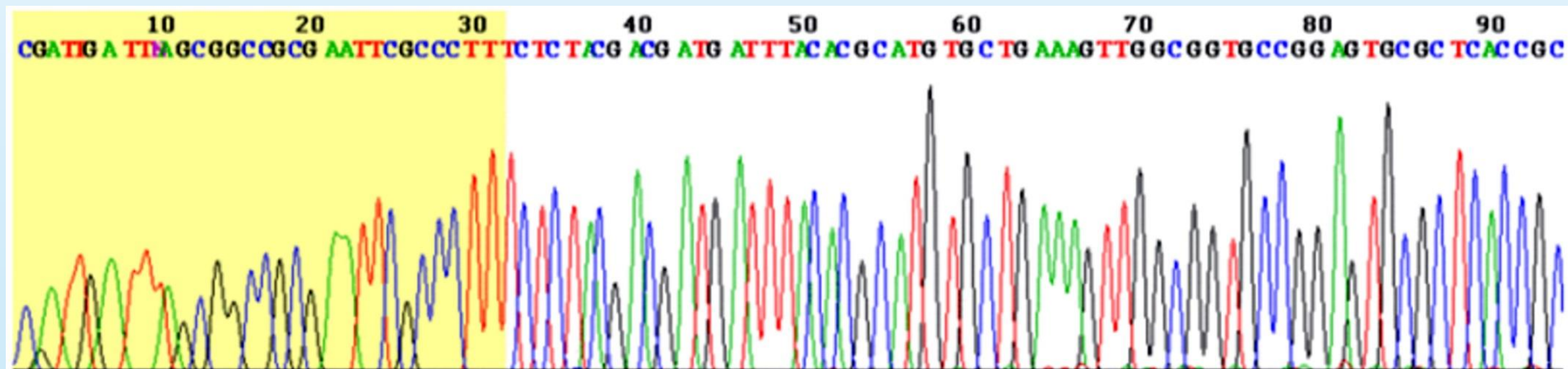
Αυτοραδιογράφημα πήκτωμα
αλληλούχησης DNA



- 1 Reaction mixture
- Primer and DNA template
- DNA polymerase
- ddNTPs with flouochromes
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)




Αλληλούχιση DNA με την ενζυμική μέθοδο Sanger (6)



Αποτελέσματα αλληλούχισης κατά Sanger

Φυσικοχημικές ιδιότητες DNA

- ▶ Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA βασίζεται στο ότι τα νουκλεϊκά οξέα δημιουργούν δίκλινα μόρια, όπου οι συμπληρωματικές αντιπαράλληλες αλυσίδες συστοιχίζονται μέσω υδρογονοδεσμών (A-T & G-C με 2 ή 3 υδρογονοδεσμούς ανά ζεύγος, αντίστοιχα)
- ▶ **Θερμική τήξη DNA** λαμβάνει χώρα, όταν διασπώνται οι υδρογονοδεσμοί και από δίκλινο (ds) μόριο μετατρέπεται σε δύο μονόκλινα (ss); Αυτή η θερμοκρασία που το μισό DNA-δείγμα είναι ss και το άλλο σε ds μορφή λέγεται **θερμοκρασία τήξης** : $T_m = 64.9 + 41 * (\gamma G + z C - 16.4) / (w A + x T + \gamma G + z C)$
- ▶ Όσο αυξάνει το %GC ενός μορίου DNA, τόσο αυξάνεται η θερμοκρασία τήξης του, αφού οι περισσότεροι υδρογονοδεσμοί απαιτούν μεγαλύτερη ενέργεια, για τη διάσπασή τους
- ▶ Οι συμπληρωματικές μονόκλινες αλυσίδες νουκλεϊκών οξέων δύναται να ανασυστοιχηθούν και να σχηματιστεί δίκλινο νουκλεϊκό οξύ, όταν η θερμοκρασία είναι υπό της θερμοκρασίας τήξης

- 
- ✓ PCR
 - ✓ Cloning
 - ✓ Υβριδοποίηση
 - ✓ Ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων
 - ✓ Τεχνικές διαχωρισμού DNA
 - ✓ Αλληλούχηση DNA