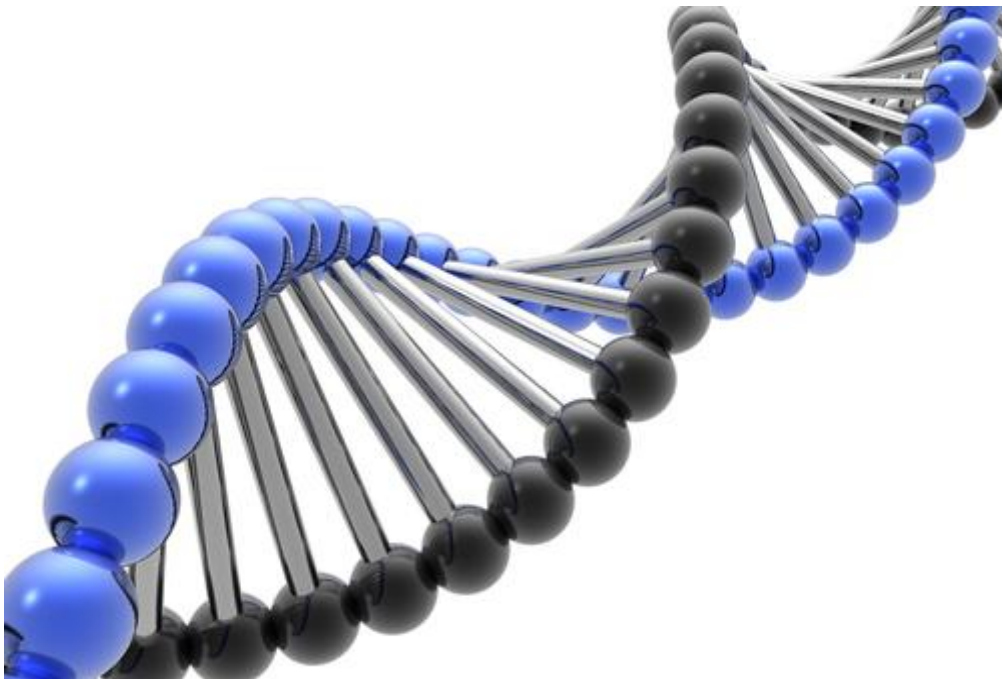




**ΦΥΛΛΑΔΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ
ΑΣΚΗΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ**

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ II

**Ε. ΚΑΚΑΝΗ
Α. ΑΥΓΟΥΣΤΙΝΟΣ
Κ. ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ**



**ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΦΟΙΤΗΤΕΣ ΤΟΥ
ΠΕΜΠΤΟΥ ΕΞΑΜΗΝΟΥ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**



**ΦΥΛΛΑΔΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ
ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ**

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ II

**Ε. ΚΑΚΑΝΗ
Α. ΑΥΓΟΥΣΤΙΝΟΣ
Κ. ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΦΟΙΤΗΤΕΣ ΤΟΥ
ΠΕΜΠΤΟΥ ΕΞΑΜΗΝΟΥ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ

ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ II

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ	ΘΕΜΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Εργαστήριο 1	Απομόνωση DNA από έντομα	7
Εργαστήριο 2	a) Ηλεκτροφόρηση DNA b) PCR ενίσχυση γονιδιακού τόπου με εκφυλισμένους εκκινητές	11
Εργαστήριο 3	Πέψη προϊόντων PCR με ένζυμα περιορισμού	15
Εργαστήριο 4	Ανάλυση πολυμορφισμού - χάρτες σημείων πέψης ενζύμων περιορισμού (θεωρητικό)	17
SOUTHERN ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ		
Εργαστήριο 5A	a) Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης b) Μεταφορά προϊόντων πέψης σε μεμβράνη	21
Εργαστήριο 5B	SOUTHERN ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ Υβριδοποίηση του ανιχνευτή	25
Εργαστήριο 5C	SOUTHERN ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ Ανίχνευση σήματος	29
Εργαστήριο 6	Χρήση Η/Υ για Ανάλυση Δεδομένων	33
Εργαστήριο 7	Προετοιμασία εργασίας (θεωρητικό)	
Παράρτημα	A. Ανάλυση πρωτοδιάταξης DNA αλληλουχίας (sequencing)	37
	B. Χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής	41
	C. Εικόνα επεξεργασίας προ-rRNAs	45
	D. Ηλεκτροφόρηση	47
	E. PCR	51
	F. Πέψη με ένζυμα περιορισμού	55

ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

- Όλοι οι εκπαιδευόμενοι πρέπει να φορούν εργαστηριακή μπλούζα κατά την εκτέλεση της άσκησης.
- Όλα τα διαλύματα πρέπει να μεταφέρονται με σιφώνια (πιπέτες). Δεν επιτρέπεται η αναρρόφηση με το στόμα.
- Το μηχάνημα PCR ανεβάζει τη θερμοκρασία σε σημείο που προκαλεί εγκαύματα. Δεν το αγγίζουμε κατά τη λειτουργία.
- Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξιγόνο και πρέπει να αποφεύγεται η επαφή του με το δέρμα καθώς και η εισπνοή του. Κατά τον χειρισμό του αντιδραστηρίου αυτού, καθώς και άλλων που θα επισημανθούν από τους υπεύθυνους του εργαστηρίου, οι εκπαιδευόμενοι πρέπει να φορούν χειρουργικά γάντια.
- Όλοι οι φοιτητές οφείλουν να δίνουν ιδιαίτερη προσοχή στις οδηγίες των εκπαιδευτών τους, ειδικά σε ό,τι αφορά πιθανώς επικίνδυνα υλικά και αντιδραστήρια του εργαστηρίου.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΤΟΠΟ 18S DNA ΕΝΤΟΜΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1960 η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των φυσικών πληθυσμών στηριζόταν αποκλειστικά στη χρήση μορφολογικών χαρακτήρων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 40 ετών η εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας στο μοριακό επίπεδο έχει αποβεί εξαιρετικά χρήσιμη για τη μελέτη της γενετικής δομής και τη διερεύνηση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών. Η τεχνική του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA έδωσε επιπλέον ώθηση στην αποκάλυψη της γενετικής ποικιλότητας αποκωδικοποιώντας τη γενετική πληροφορία στο επίπεδο του DNA. Λόγω της πολυπλοκότητας της τεχνικής αλλά και του μεγάλου οικονομικού κόστους που απαιτείτο δεν ήταν εύκολο να εφαρμοστεί σε μεγάλο αριθμό ατόμων. Η κατάσταση αυτή βελτιώθηκε με την ανακάλυψη της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) η οποία περιόρισε σημαντικά το χρόνο και το οικονομικό κόστος, επιτρέποντας τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε σχετικά μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

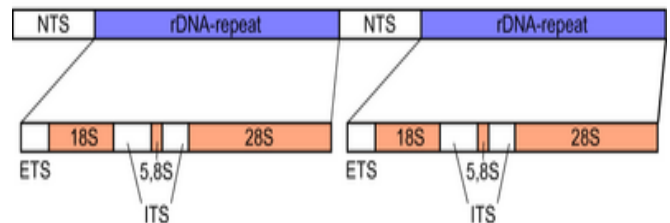
Το 18S RNA ΤΩΝ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το rRNA αντιπροσωπεύει το 80% του συνολικού RNA που υπάρχει στο κύτταρο. Το 45% του rRNA βρίσκεται στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα ενώ στη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα βρίσκεται το 55% του rRNA. Το 18S rRNA της μικρής υπομονάδας των ευκαρυωτικών ριβοσωμάτων έχει MB 700 kD. Στη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα υπάρχουν τρία είδη rRNA: το 28S rRNA με MB 1400 kD, το 5,8S rRNA με MB 50 kD και το 5S rRNA με MB 41 kD. Η αλληλουχία των βάσεων ενός δεδομένου τύπου rRNA είναι παρόμοια σε στενά συγγενή είδη. Όμως, μεταξύ φυλογενετικά απομακρυσμένων οργανισμών υπάρχουν πολύ λίγες ομοιότητες στην αλληλουχία βάσεων του συγκεκριμένου rRNA. Ο βαθμός στον οποίον η πρωτοταγής δομή ενός συγκεκριμένου rRNA είναι όμοια μεταξύ δύο διαφορετικών ειδών αντανακλά την εξελικτική ιστορία και τη συγγένεια των

οργανισμών. Το 5S rRNA είναι το πλέον εξελικτικά σταθερό απ' όλα τα είδη rRNA.

Η αλληλουχία βάσεων των διαφόρων rRNA αποκαλύπτει ότι κάθε τύπος περιέχει ανεστραμμένες αλληλουχίες που μπορούν να σχηματίσουν μια μεγάλη ποικιλία "φουρκετών" και άλλων δευτεροταγών δομών. Το 18S rRNA, π.χ., περιέχει αρκετές ανεστραμμένες αλληλουχίες που μπορούν να δημιουργήσουν 10.000 διαφορετικές δευτεροταγείς δομές. Με ορισμένες εξαιρέσεις, η δευτεροταγής και όχι η πρωτοταγής δομή έχει διατηρηθεί κατά την πορεία της εξέλιξης. Αυτό σημαίνει ότι οι περισσότερες περιοχές που παρουσιάζουν δευτεροταγή δομή, και όχι η πρωτοταγής αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, είναι υπεύθυνες για τη συγκρότηση και τη λειτουργία των ριβοσωμάτων.

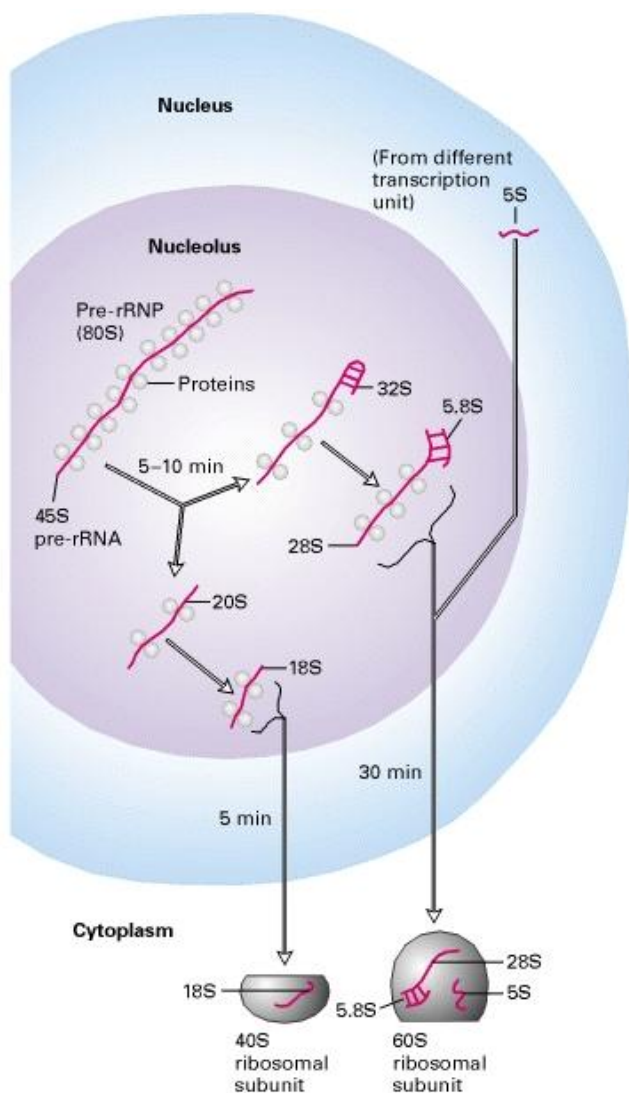
Στα ευκαρυωτικά κύτταρα τα 28S, 18S και 5,8S rRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II με τη μορφή πρόδρομου rRNA, το μέγεθος του οποίου κυμαίνεται από 37S μέχρι 45S, ανάλογα με το είδος (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Δομή του πρόδρομου mRNA των 28S, 18S και 5,8S rRNA

Η μεταγραφή και η παραπέρα επεξεργασία αυτών των rRNA γίνεται στον πυρηνίσκο. Η διαδικασία για τη δημιουργία των 28S, 18S και 5,8S rRNA ξεκινά ενώ δεν έχει ακόμη τελειώσει η μεταγραφή του μεγάλου πρόδρομου μορίου rRNA. Οι χημικές τροποποιήσεις, κυρίως μεθυλιώσεις, γίνονται πάρα πολύ γρήγορα, σε περιοχές του μορίου που διατηρούνται στα 28S, 18S και 5,8S rRNA. Το τέλος της μεταγραφής ακολουθείται σχεδόν αμέσως από αντιδράσεις που αποκόπτουν και ξεχωρίζουν τα 28S, 18S και 5,8S rRNA από το μεγάλο πρόδρομο μόριο rRNA. Αν και οι θέσεις θραύσης διαφέρουν κάπως στα διαφορετικά είδη, στους περισσότερους οργανισμούς οι αρχικές θραύσεις από τις RNA ενδονουκλεάσες γίνονται κοντά στα 5' και 3' άκρα, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα μόριο 18S

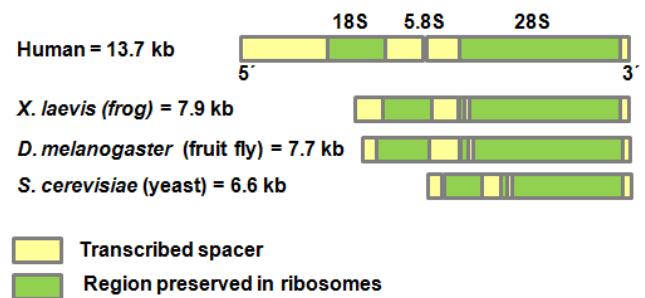
rRNA στην τελική του μορφή. Τα 28S και 5,8S rRNA σχηματίζονται με περαιτέρω θραύση του τμήματος που έχει απομείνει. Ενώ γίνονται οι αντιδράσεις θραύσης, οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες προστίθενται στα σχηματιζόμενα μόρια rRNA (Εικόνα 2, Εικόνα στο Παράρτημα). Αντίθετα, το 5S rRNA (που δεν πρέπει να συγχέεται ούτε με το 5,8S των ευκαρυωτών ούτε με το 5S των προκαρυωτών) συνήθως βρίσκεται (επίσης σε συστοιχίες πολλών αντιγράφων στη σειρά) σε διαφορετική περιοχή από τα υπόλοιπα rRNA γονίδια και μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση III.



Εικόνα 2: Επεξεργασία προ-rRNA και συν-αρμολόγηση των ριβοσωμάτων στους ευκαρυώτες

Τα προκαρυωτικά rRNA είναι σημαντικά μικρότερα απ' ό,τι τα αντίστοιχα ευκαρυωτικά. Οι μικρές υπομονάδες των βακτηριακών ριβοσωμάτων

περιέχουν 16S rRNA το οποίο είναι ισοδύναμο σε δευτεροταγή δομή και λειτουργία με το 18S rRNA των ευκαρυωτικών ριβοσωμάτων. Οι μεγάλες ριβοσωμικές υπομονάδες στα βακτήρια περιέχουν 23S rRNA και 5S rRNA, τα οποία είναι ισοδύναμα με τα 28S rRNA και 5S rRNA των ευκαρυωτικών ριβοσωμάτων. Το βακτηριακό 5S rRNA έχει ορισμένες ομοιότητες στην αλληλουχία αλλά και στη δευτεροταγή διαμόρφωση με το ευκαρυωτικό 5S rRNA. Δεν έχει βρεθεί στα προκαρυωτικά ριβοσώματα άλλο rRNA, αντίστοιχο με το ευκαρυωτικό 5,8S rRNA. Το μικρότερο μέγεθος των rRNA στα προκαρυωτικά κύτταρα, αντανακλάται στις διαστάσεις των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων, τα οποία είναι μικρότερα σε μέγεθος και έχουν λιγότερες ριβοσωμικές πρωτεΐνες απ' ό,τι τα ευκαρυωτικά ριβοσώματα (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Σύγκριση του μεγέθους των 18S, 5.8S και 28S rRNA ορισμένων οργανισμών

ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ

Στη σειρά των εργαστηριακών ασκήσεων θα αναλύσουμε τη γενετική ποικιλότητα του 18S DNA διαφόρων εντόμων που θα συλλέξετε εσείς. Αρχικά θα ενισχύσουμε την εν λόγω περιοχή με αντίδραση PCR, και στη συνέχεια θα χρησιμοποιήσουμε το PCR προϊόν για να ελέγξουμε τις διαφορές των θραυσμάτων που δημιουργούνται μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού (δημιουργώντας παράλληλα και χάρτες σημείων πέψης περιοριστικών ενζύμων - restriction maps). Η σύγκριση των χαρτών των διαφόρων ατόμων θα αποτελέσει τη βάση των συμπερασμάτων μας για τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσά τους. Παράλληλα, θα επιβεβαιώσουμε την πιστότητα του προϊόντος με υβριδοποίηση κατά Southern.

ΑΣΚΗΣΗ 1.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΣΥΛΛΕΓΜΕΝΑ ΕΝΤΟΜΑ

Τα έντομα αντιπροσωπεύουν μια από τις πλέον σημαντικές μορφές ζωής στον πλανήτη. Έχουν επηρεάσει την ανθρώπινη ύπαρξη από τη γένεσή της και συνεχίζουν να ελέγχουν πολλές από τις ανθρώπινες δραστηριότητες.

Αν κοιτάξουμε μόνο μερικούς αριθμούς θα δούμε ότι η αναλογία εντόμων προς ανθρώπους είναι 200 εκατομμύρια προς 1, και ότι υπάρχουν περίπου 40 εκατομμύρια έντομα σε κάθε εκτάριο γης. Ίσως σκεφτείτε όμως ότι ο άνθρωπος είναι οικολογικά πιο επιτυχής αφού έχει αντισταθμίσει το μικρότερο αριθμό ατόμων με μεγαλύτερη μάζα του στο οικοσύστημα. Και εδώ οι υπολογισμοί λένε ότι στις ΗΠΑ, για παράδειγμα, σε 400 κιλά βιομάζας εντόμων ανά εκτάριο αντιστοιχούν μονάχα 7 κιλά σάρκας και οστών. Ακόμα και στον Αμαζόνιο, μόνο η βιομάζα των μυρμηγκιών είναι 4 φορές περισσότερη από τη βιομάζα όλων των σπονδυλωτών. Έτσι λοιπόν, αν στηριχτούμε σε αριθμούς και βιομάζα, τα έντομα είναι τα πλέον επιτυχή ζώα στον πλανήτη. Σε αντίθεση με την κρατούσα άποψη ότι η ευφυΐα είναι το πλέον αποτελεσματικό συστατικό της εξελικτικής πορείας.

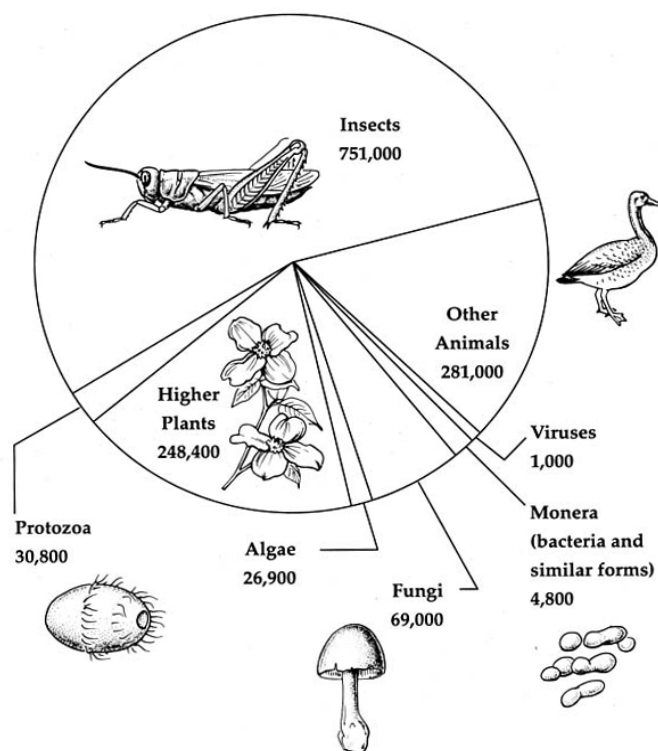
Μαζί με τους ανθρώπους, τα έντομα ζουν σχεδόν σε όλα τα βιώσιμα μέρη της γης, εκτός από τα βάθη των ωκεανών. Είναι οι βασικοί καταναλωτές των φυτών, είναι οι κύριοι θηρευτές των καταναλωτών των φυτών, παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης, εξυπηρετούν τις διατροφικές ανάγκες άλλων ζώων.

Με βάση μόνο αυτά τα λίγα οικολογικά στοιχεία, θα περιμέναμε ότι αυτοί οι οργανισμοί είναι πολύ διαφορετικοί μεταξύ τους αλλά και πολύ προσαρμοσμένοι σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί περισσότερα από 900.000 είδη εντόμων και πιστεύεται ότι υπάρχουν έως και δέκα φορές περισσότερα που ακόμα περιμένουν να ανακαλυφθούν. Έτσι κι εσείς δεν θα πρέπει να αντιμετωπίσετε κανένα πρόβλημα στο να συναντήσετε και να συλλέξετε κάποιο έντομο από το οικείο σας περιβάλλον. Ακρίδες, πεταλούδες, μύγες, αφίδες, οτιδήποτε μπορείτε να συλλάβετε (ίσως χρειαστείτε λίγη φαντασία για τον τρόπο σύλληψης) είναι ικανό για

την εργαστηριακή σας άσκηση. Στη συνέχεια το τοποθετείτε σε ένα σωληνάκι τύπου erpendorf και μετά το φυλάσσετε στην κατάψυξη σας για να διατηρηθεί το DNA του ακέραιο. Η απομόνωση του DNA θα πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο βασισμένη στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε την περασμένη χρονιά.

Number of Living Species of All Kinds of Organisms Currently Known (According to Major Group)

ALL ORGANISMS: TOTAL SPECIES, 1,413,000



ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το DNA είναι η απαραίτητη πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της Μοριακής Βιολογίας. Η απομόνωσή του σε καθαρή μορφή είναι προϋπόθεση για κάθε παραπέρα διαδικασία. Φυσικά, για κάθε διαφορετικό τύπο DNA (χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό κλπ), υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης. Όλες, όμως, έχουν κοινά στοιχεία:

1. Ελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων όπως οι πυρήνες.
2. Διαχωρισμός του DNA από άλλα μακρομόρια.

Η μέθοδος που θα ακολουθήσουμε ξεκινάει με την ομογενοποίηση των ιστών του εντόμου σε διάλυμα το οποίο:

- α. διατηρεί την οσμωτικότητα του διαλύματος ώστε να μη γίνει απότομη ρήξη των μεμβρανών κατά τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων (παρουσία σουκρόζης και NaCl στο buffer ομογενοποίησης),
- β. διασπά τα μεμβρανικά τοιχώματα (παρουσία SDS), ιδιαίτερα στους 65°C,
- γ. διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή (~7.3) (παρουσία του ρυθμιστικού Tris),
- δ. παρεμποδίζει τη δράση νουκλεασών με την παρουσία χηλικού παράγοντα (EDTA). Γενικά όλα τα κύτταρα περιέχουν ενεργές δεσοξυριβονουκλεάσες που θα μπορούσαν να καταστρέψουν το DNA. Για να δράσει όμως η DNAάση έχει ανάγκη από δισθενή κατιόντα. Το EDTA παρεμποδίζει αποτελεσματικά τη δράση του ενζύμου αυτού γιατί δεσμεύει Ca^{+2} και Mg^{+2} .

Στη συνέχεια κατακρημνίζονται κυτταρικά υπολείμματα και ένα μεγάλο ποσοστό πρωτεϊνών παρουσία υψηλής συγκέντρωσης οξικού καλίου. Για την πλήρη απομάκρυνση των πρωτεϊνών χρειάζεται εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο, κάτι που δεν είναι απαραίτητο στην παρούσα άσκηση.

Τέλος ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA σε διάλυμα αιθανόλης και επαναδιάλυση σε αραιό διάλυμα αλάτων, αφού το DNA είναι αδιάλυτο στην αιθανόλη και διαλυτό σε διαλύματα αλάτων.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής εργασίας πρέπει να τηρούνται ορισμένες συνθήκες για να αποφύγουμε μεγάλη αλλαγή στην τριτοταγή δομή του DNA. Στο DNA μπορεί να προκληθούν δομικές αλλαγές από διάφορους παράγοντες. Κάτω από τις συνθήκες που γίνεται η απομόνωση μπορεί να συμβεί:

1. Σπάσιμο φωσφοδιεστερικών δεσμών
 - a. Από επίδραση νουκλεολυτικών ενζύμων (DNAase)
 - b. Από επίδραση οξέος (pH<2)
 - c. Από επίδραση θερμότητας (θερμοκρασία > 90°C)
2. Σπάσιμο των N-γλυκοσιδικών δεσμών μεταξύ δεσοξυριβόζης και πουρινών με την επίδραση οξέος (pH < 2).
3. Καταστροφή των υδρογονικών δεσμών που κρατούν μαζί τις δύο αλυσίδες του DNA.
 - a. Από επίδραση αλκάλειος (pH > 10).
 - b. Από επίδραση οξέος (pH < 2).
 - c. Από επίδραση θερμότητας (θερμοκρασία > 80°C).
 - d. Από μειωμένη ιονική ισχύ. Η θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA εξαρτάται από την ιονική ισχύ. Σε αποσταγμένο νερό η θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA είναι μικρότερη των 25°C.
4. Σπάσιμο της διπλής αλυσίδας σε μικρότερα κομμάτια με την επίδραση μηχανικών αιτίων.

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από διάφορα έντομα ή τμήματα αυτών. Η απομόνωση αυτή αποφέρει DNA το οποίο δεν έχει το βαθμό καθαρότητας που έχουν άλλα πρωτόκολλα απομόνωσης που έχετε κάνει σε άλλες εργαστηριακές ασκήσεις. Είναι όμως αρκετά καθαρό ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια σειρά από πειραματικές διεργασίες που δεν απαιτούν πλήρη καθαρότητα, όπως για παράδειγμα πέψη με ένζυμα περιορισμού, υβριδοποίηση κατά Southern, ακόμα και δημιουργία μερικών βιβλιοθηκών. Αντίθετα, δεν συνιστάται για εύρεση καμπύλης τήξης και άλλες ποσοτικές μετρήσεις, αντιδράσεις σύνδεσης, δημιουργία ολοκληρωμένων βιβλιοθηκών, αντιδράσεις αλληλούχισης (sequencing) του DNA και άλλα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που προτείνεται από τον Ashburner (1989).

Υλικά:

Έντομα ή τμήματα εντόμων μεγέθους όσο περίπου μισή οικιακή μύγα.

Διάλυμα ομογενοποίησης (100mM NaCl, 200mM sucrose, 100mM Tris 7.4, 50mM EDTA, 0.5% SDS)

8M KAcetate

Αιθανόλη 95% και 70%

Διάλυμα επαναδιάλυσης DNA (TE: 10mM Tris 7.4, 1mM EDTA)

Σωληνάκια τύπου errendorf, έμβολα ομογενοποίησης, υδατόλουτρο, φυγόκεντρος

Πειραματική διαδικασία:

1. Τοποθετούμε το τμήμα του εντόμου σε ένα σωληνάκι τύπου errendorf που περιέχει 50μl διαλύματος ομογενοποίησης. Ομογενοποιούμε με τα μπλε έμβολα γυρνώντας τουλάχιστον δέκα φορές το έμβολο. Παρατηρούμε την πρόοδο της ομογενοποίησης.
2. Ξεπλύνουμε το έμβολο με άλλα 50μl διαλύματος ομογενοποίησης. Φυγοκεντρούμε για λίγα δευτερόλεπτα στη μικροφυγόκεντρο ώστε να συγκεντρωθούν τα υπολείμματα από τα τοιχώματα του σωλήνα στο βάθος του σωλήνα.
3. Επωάζουμε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 65⁰C για 20 λεπτά.
Προσθέτουμε 14 μl 8M KAc (τελική συγκέντρωση 1M) ενώ τα σωληνάκια είναι ακόμα ζεστά. Αναδεύουμε χτυπώντας ελαφρά τα σωληνάκια με το δάκτυλό μας.
4. Επωάζουμε στον πάγο για 20 λεπτά.
5. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στη μικροφυγόκεντρο σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καινούργιο σωληνάκι.
6. Προσθέτουμε 200μl 95% αιθανόλης, αναδεύουμε καλά και επωάζουμε στον πάγο για 10 λεπτά.
7. Φυγοκεντρούμε στη μικροφυγόκεντρο για 10 λεπτά. Προσεκτικά αποχύνουμε το υπερκείμενο.
8. Προσθέτουμε 200μl 70% παγωμένης αιθανόλης στο ίζημα του DNA και φυγοκεντρούμε ξανά για 5 λεπτά.
9. Προσεκτικά αποχύνουμε το υπερκείμενο και απομακρύνουμε τις τελευταίες σταγόνες αιθανόλης με την πιπέτα.
Αφήνουμε τα σωληνάκια ανοικτά έως ότου στεγνώσει το ίζημα του DNA.
10. Επαναδιαλύουμε σε 30 μl διαλύματος TE.

ΑΣΚΗΣΗ 2.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΚΑΙ PCR ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΤΟΠΟΥ 18S rRNA ΜΕ ΕΚΦΥΛΙΣΜΕΝΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης μορίων με εφαρμογή στη μοριακή βιολογία, τη βιοχημεία, την πρωτεϊνική χημεία, τη φαρμακολογία κ.α.

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα, μετανάστευση). (Για περισσότερες πληροφορίες ανατρέξτε στο Παράρτημα)

PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* (χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών, όπως η *E. coli* ή οι ζύμες) επιλεγμένων αλληλουχιών DNA.

Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA (γνωστού ή αγνώστου) με τη βοήθεια μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σχεδιασμένων σε γνωστές αλληλουχίες. Έτσι, ένα δείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα δύο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές, primers) και την ειδική DNA πολυμεράση. Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95°C για να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως ψύχεται στους 50-65°C για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72°C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές έως ότου συντεθεί αρκετή ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος (Για

περισσότερες πληροφορίες ανατρέξτε στο Παράρτημα).

ΕΚΦΥΛΙΣΜΕΝΟΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Οι εκφυλισμένοι εκκινητές αποτελούν μίγματα παρόμοιων εκκινητών που μια ή περισσότερες από τις θέσεις μπορούν να έχουν εναλλακτικές βάσεις. Οι εκφυλισμένες αυτές βάσεις αντιπροσωπεύονται με συγκεκριμένα γράμματα, κάθε ένα από τα οποία υποδηλώνουν έναν τύπο παραλλαγής (Εικόνα 2.1). Για παράδειγμα η παρουσία του γράμματος B στην ακολουθία ενός εκκινητή υποδηλώνει ότι ορισμένοι εκκινητές στο μίγμα μπορεί να έχουν κυτοσίνη (C) σε εκείνη τη θέση ενώ άλλοι μπορεί να έχουν γουανίνη (G) ή θυμίνη (T).

B	D	H	K	M	N	R	S	V	W	Y
C/G/T	A/G/T	A/C/T	G/T	A/C	A/C/G/T	A/G	G/C	A/C/G	A/T	C/T

Εικόνα 2.1: The following letters are used to designate degenerate bases in a primer sequence

Οι εκφυλισμένοι εκκινητές χρησιμοποιούνται στην περίπτωση όπου είναι αναγκαία η ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA ενός οργανισμού, η οποία είναι γνωστή σε συγγενή οργανισμό ή η ταυτόχρονη ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA σε διαφορετικούς οργανισμούς δεδομένου ότι οι αλληλουχίες παρουσιάζουν ομοιότητα σε μεγάλο βαθμό. Όσο περισσότερο απομακρυσμένοι είναι οι οργανισμοί, τόσο δυσκολότερο είναι να σχεδιαστούν οι εκκινητές.

Επιπλέον, οι εκφυλισμένοι εκκινητές χρησιμοποιούνται όταν ο σχεδιασμός των εκκινητών βασίζεται στην πρωτεϊνική ακολουθία. Δεδομένου ότι διαφορετικά κωδικόνια μπορούν να κωδικοποιήσουν ένα αμινοξύ, είναι δύσκολο να συναχθεί ποιο κωδικόνιο χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση. Για παράδειγμα, η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο αμινοξύ ισολευκίνη μπορεί να είναι η ATH, όπου το A αντιστοιχεί στην αδενίνη, το T στη θυμίνη και το H να αντιστοιχεί είτε στην αδενίνη, είτε στη θυμίνη είτε στη κυτοσίνη, σύμφωνα με το γενετικό κώδικα για το κάθε κωδικόνιο.

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η ηλεκτροφόρηση ποσότητας του απομονωμένου γονιδιωματικού DNA της προηγούμενης άσκησης (Άσκηση 1) ώστε να εκτιμηθεί η ποσότητα και η ποιότητα του DNA και στη συνέχεια η PCR ενίσχυση του γονιδιακού τόπου 18S rRNA χρησιμοποιώντας εκφυλισμένους εκκινητές και ως μήτρα την ποσότητα DNA που υπολογίσαμε από την ηλεκτροφόρηση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Παρασκευή 1% πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση

1. Σε κωνική φιάλη προσθέτουμε τις σωστές ποσότητες σκόνης αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος. Για τη δημιουργία 100 ml πηκτώματος, αναμιγνύουμε 10ml stock διαλύματος 5xTBE σε 90ml απιονισμένο νερό και προσθέτουμε 1g αγαρόζης.
2. Θερμαίνουμε ανακινώντας μέχρις ότου τηχθεί η αγαρόζη και γίνει το διάλυμα τελείως διαυγές (χρειάζεται να βράσει). Στη συνέχεια αφήνουμε να μειωθεί η θερμοκρασία περίπου στους 55°C (κωνική φιάλη να είναι ανεκτή στην παρειά) ώστε το ζεστό διάλυμα να μην επηρεάσει τη μήτρα πολυμερισμού (βάση) της ηλεκτροφορητικής συσκευής (στάδιο 4).
3. Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο (από διάλυμα 10 mg/ml που φυλάσσεται σε σκούρο μπουκάλι στο ψυγείο) έτσι ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση περίπου 0.25 μg/ml. ΠΡΟΣΟΧΗ: Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξιγόνο και δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το δέρμα σας.
4. Αποχύνουμε προσεκτικά το ζεστό διάλυμα της αγαρόζης στη βάση όπου θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα. Προηγούμενα έχουμε τοποθετήσει κάθετα στην κατάλληλη θέση τα "χτενάκια" ώστε να δημιουργηθούν ειδικές θέσεις "πηγαδάκια" για τη φόρτωση των δειγμάτων, όταν στερεοποιηθεί η αγαρόζη.
5. Όταν στερεοποιηθεί η αγαρόζη τα "χτενάκια" απομακρύνονται και η βάση τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.
6. Σε 10 μl από τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προσθέτουμε χρωστική που περιέχει 5-10% γλυκερόλη και 0.025% μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανού της ξυλόλης.
7. Κατά την ηλεκτροφόρηση μπορούμε να παρακολουθούμε το διαχωρισμό των ζωνών του DNA με έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία (πρέπει να φοράμε ειδικά ή κοινά απορροφητικά γυαλιά στα μάτια).
8. Χρησιμοποιώντας υπεριώδες φως μπορούμε να φωτογραφίσουμε το πήκτωμα μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

B. PCR ΕΝΙΣΧΥΣΗ

Η ενίσχυση του DNA θα πραγματοποιηθεί σε τελικό όγκο 20 μl.

Διατηρείτε τα αντιδραστήρια σε πάγο. Ιδιαίτερα εκείνα που περιέχουν ένζυμα

1. Σε σωληνάκι τύπου PCR των 0.2 ml προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα των παρακάτω συστατικών για μια αντίδραση όγκου 0.02 ml

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Αντίδραση 1	
		Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
Γονιδιωματικό DNA			30 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα		10X	1X
dNTPs		10 mM	0.8 mM
MgCl ₂		50 mM	1.5 mM
Εκκινητής εμπρόσθιος P1		10 μM	0.5 μM
Εκκινητής ανάστροφος P2		10 μM	0.5 μM
Taq DNA πολυμεράση		5 u/μl	1 unit
H ₂ O			
Τελικός όγκος	20 μl		

Η αντίδραση θα πραγματοποιηθεί στις εξής συνθήκες:

αρχικός κύκλος αποδιάταξης

35 κύκλοι: { 95°C για 5 λεπτά
94°C για 1 λεπτό (αποδιάταξη)
48°C για 30 δευτερόλεπτα (επαναδιάταξη)
72°C για 2 λεπτά (επέκταση)
72°C για 7 λεπτά (τελική επέκταση)

Μετά το τέλος της αντίδρασης οι αντιδράσεις PCR θα φυλαχτούν στο ψυγείο (4°C) μέχρι την επόμενη εργαστηριακή άσκηση.

Οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν είναι οι εξής:

18S F1: CTGGTTGATYCTRCCAGT

18S R1: CYGCAGGTTACCTACRG

όπου Y=C ή T και R=G ή A.

ΑΣΚΗΣΗ 3.

ΠΕΨΗ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και τέμνουν κατά τρόπο καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο το δίκλωνο DNA. Λόγω του επαναλήψιμου τρόπου πέψης, τα ένζυμα αυτά επιτρέπουν α) τη σηματοδότηση οποιασδήποτε αλληλουχίας DNA (χαρτογράφηση), β) την πέψη

(τεμαχισμό) της αρχικής αλληλουχίας DNA σε μικρά τμήματα τα οποία είναι δυνατόν να μελετηθούν χωριστά και γ) την επανασύνδεση των τμημάτων αυτών και την επανασυγκρότηση της αρχικής αλληλουχίας. Η δράση τους εστιάζεται στην αναγνώριση ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας. (Για περισσότερες πληροφορίες ανατρέξτε στο Παράρτημα).

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η πέψη των PCR προϊόντων της προηγούμενης άσκησης (Άσκηση 2) ώστε να εκτιμηθεί η πολυμορφικότητα του γονιδιακού τόπου 18S rRNA στα διαφορετικά έντομα που έχετε συλλέξει.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Θα πραγματοποιηθεί πέψη ενός μέρους του προϊόντος της PCR αντίδρασης χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *HindIII*.

1. Ετοιμάστε τις αντιδράσεις πέψης σε δύο σωληνάκια τύπου erpendorf (1.E και 2.H)

Αντιδραστήρια	Αντίδραση <i>EcoRI</i>			Αντίδραση <i>HindIII</i>		
	Ποσότητες	Αρχική C	Τελική C	Ποσότητες	Αρχική C	Τελική C
Προϊόν PCR αντίδρασης	8 μl			8 μl		
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)		10X	1X		10X	1X
Ένζυμο <i>EcoRI</i>		10 u/μl	2 units		-	-
Ένζυμο <i>HindIII</i>		-	-		10 u/μl	2 units
H ₂ O						
Τελικός όγκος	20 μl			20 μl		

2. Επιάστε τις αντιδράσεις σας για περίπου 2 h σε θερμοκρασία 37°C.
3. Ακολουθως οι αντιδράσεις φυλάσσονται στο ψυγείο μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

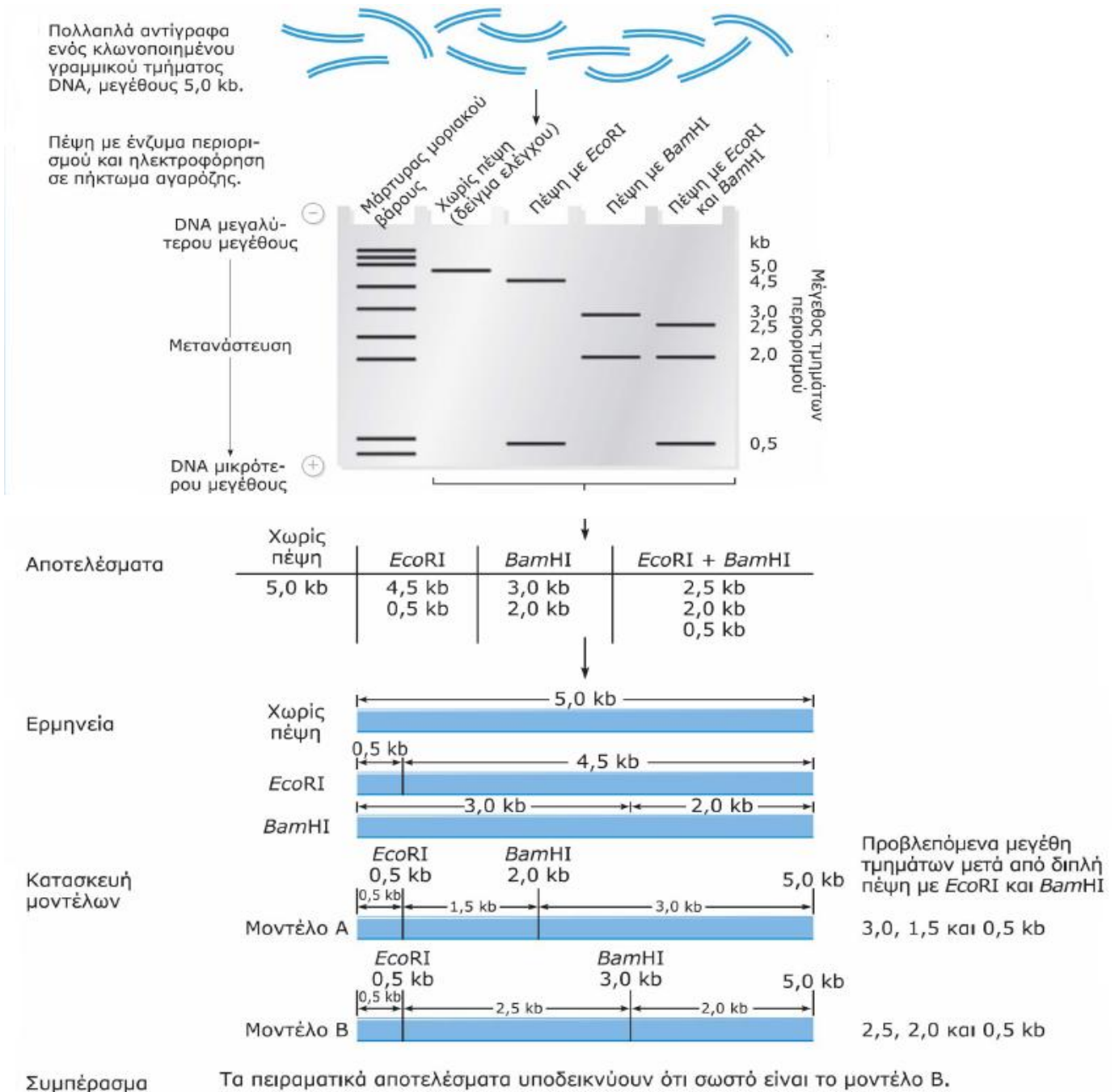
ΑΣΚΗΣΗ 4.

4-1. ΧΑΡΤΕΣ ΣΗΜΕΙΩΝ ΠΕΨΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RESTRICTION MAPS)

Ένας χάρτης περιορισμού αποτελεί τη δομική ανάλυση (τον προσδιορισμό δηλαδή των σημείων αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού) μιας αλληλουχίας DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού. Η πέψη ενός τμήματος DNA με ένζυμα περιορισμού θα οδηγήσει στη δημιουργία τμημάτων περιορισμού με διαφορετικό αριθμό και μήκος τμήματα των οποίων

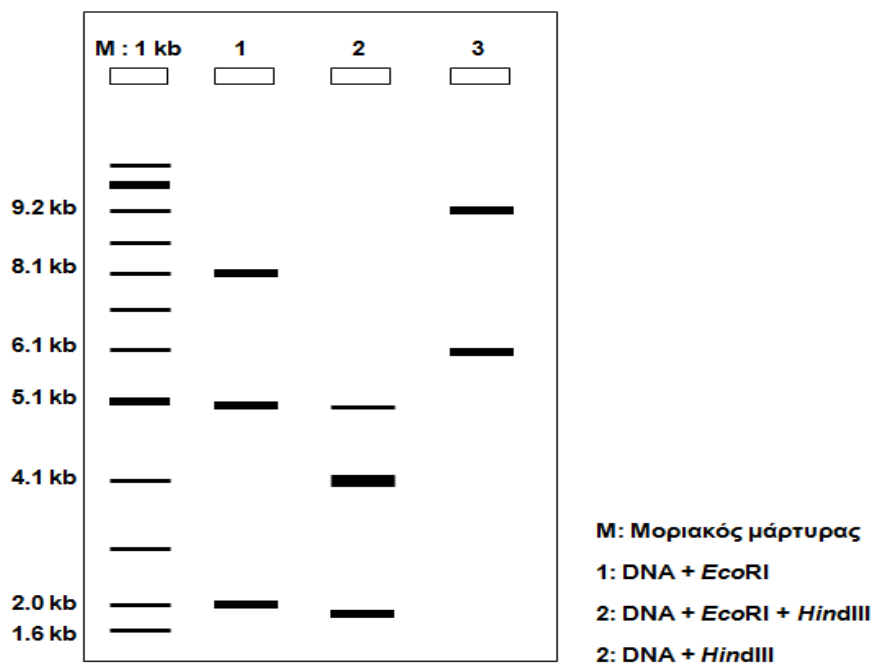
το άθροισμα θα είναι ίσο με το αρχικό τμήμα. Συγκρίνοντας το μέγεθος των διαφορετικών αυτών τμημάτων περιορισμού μπορεί να δημιουργηθεί ένας χάρτης περιορισμού της συγκεκριμένης αλληλουχίας. Ο χάρτης αυτός θα αντικατοπτρίζει τη διεύθετη καθενός σημείου περιορισμού σε σχέση με τα γειτονικά του σημεία περιορισμού που αναγνωρίζονται αντίστοιχα από άλλες ενδονουκλεάσες.

Στην απλή αυτή αρχή βασίζεται η δημιουργία των χαρτών σημείων πέψης ενζύμων περιορισμού, όπως φαίνεται στο σχήμα:



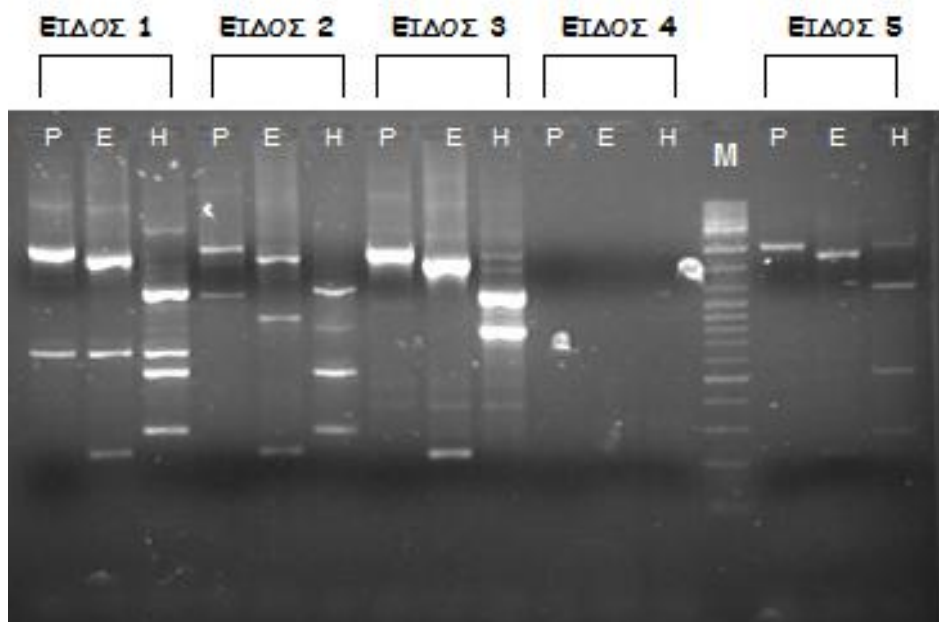
ΕΡΩΤΗΣΗ 1

Προσπαθείστε να κατασκευάσετε τον χάρτη των σημείων πέψης των ενζύμων *EcoRI* και *HindIII* από το εξής πήκτωμα αγαρόζης απλών και διπλών πέψεων:



ΕΡΩΤΗΣΗ 2

Η παρακάτω εικόνα είναι από τα πηκτώματα των περσινών ομάδων. Προσπαθείστε να κατασκευάσετε το χάρτη των σημείων πέψης των ενζύμων της εργαστηριακής άσκησης.



P: Άκοπτο PCR προϊόν
 E: PCR προϊόν κομμένο με *EcoRI*
 H: PCR προϊόν κομμένο με *HindIII*
 L: Μάρτυρας μοριακού βάρους

**4-2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΗΜΕΙΩΝ
ΠΕΨΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ PCR
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

Με τον όρο DNA πολυμορφισμός εννοούμε την παρουσία δύο ή περισσότερων εναλλακτικών αλληλουχιών σε μία γενετική θέση που διαφέρουν στη νουκλεοτιδική αλληλουχία ή περιοχές με διαφορετικό αριθμό νουκλεοτιδικών επαναλήψεων.

Οι διαφορές ανάμεσα στους χάρτες σημείων πέψης ενζύμων περιορισμού διαφορετικών ατόμων οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις που δημιουργούν ή καταστρέφουν την αλληλουχία

αναγνώρισης του ενζύμου. Οι διαφορές αυτές αποτελούν τη βάση σύγκρισης των ατόμων αυτών. Έτσι, πρώτα κατασκευάζουμε τους χάρτες αυτούς, στη συνέχεια ομαδοποιούμε τα άτομα και τέλος προσπαθούμε να εξάγουμε συμπεράσματα φυλογενετικής συγγένειας ανάλογα με τις ομοιότητές τους. Συνήθως αυτή η πληροφορία συγκεντρώνεται σε μία μήτρα δυαδικών χαρακτήρων παρουσίας/απουσίας των σημείων πέψης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Πόσους απλότυπους παρατηρείτε στον Πίνακα και ποιές οι σχέσεις μεταξύ τους; Κάνετε το ίδιο για τα αποτελέσματά σας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Μήτρα παρουσίας/απουσίας σημείων πέψης περιοριστικού ενζύμου. Στο παράδειγμα συγκρίνονται 34 θέσεις 10 ατόμων.

a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+
b	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
c	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
d	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
e	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
f	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
g	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
h	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
i	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
j	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Άσκηση 5Α.

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΕΨΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΝΑΥΛΟΝ ΜΕΜΒΡΑΝΗ (SOUTHERN)

Το φαινόμενο της υβριδοποίησης, δηλαδή της δυνατότητας ενός μονόκλωνου μορίου νουκλεϊνικού οξέος να σχηματίζει δίκλωνη έλικα με ένα άλλο μονόκλωνο μόριο, αποτελεί τη βάση για πολλές τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, μεταξύ αυτών και της υβριδοποίησης κατά Southern. Η υβριδοποίηση κατά Southern (φέρει το όνομα του E.M Southern που την ανέπτυξε) χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών σε δείγμα DNA (Southern, 1975).

Η διαδικασία εμπερικλείει τις εξής φάσεις:

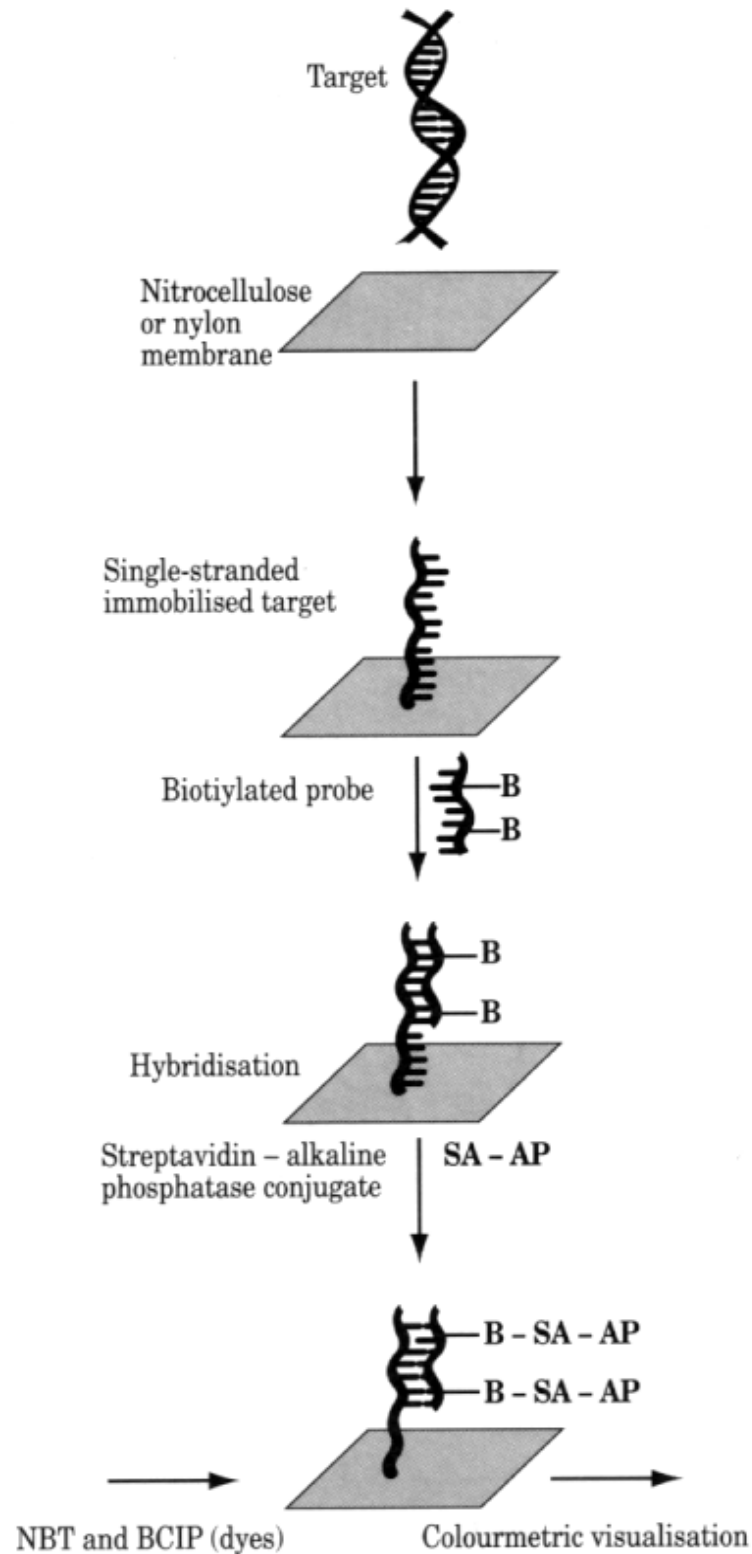
1. Μεταφορά του DNA και σταθεροποίησή του σε νάυλον μεμβράνη (Άσκηση 5Α).
2. Σήμανση ανιχνευτή.
3. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή (Άσκηση 5Β).
4. Ανίχνευση σήματος (Άσκηση 5C).

Τα βασικά στάδια μιας υβριδοποίησης κατά Southern με βιοτινυλιωμένο ανιχνευτή φαίνονται στη Εικόνα 5Α.1.

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΝΑΥΛΟΝ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων, αφού προηγηθεί η αποδιάταξή τους ώστε να καταστούν μονόκλινα, σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι μεμβράνες. Τα ακινητοποιημένα νουκλεϊνικά οξέα στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως "στόχοι" σε πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση των κατάλληλων κατά περίπτωση ανιχνευτών. Η μεταφορά σε μεμβράνη από πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις διαφορετικές διαδικασίες: α. τριχοειδής μεταφορά (Lichtenstein et al., 1990; Chomczynski, 1992), β. ηλεκτροφορητική μεταφορά (Stellwag & Dahlberg, 1980; Church & Gilbert, 1984) και γ. μεταφορά με χρήση κενού (Olszewska & Jones, 1988; Trnovsky, 1992) ενώ υπάρχουν και τρία είδη

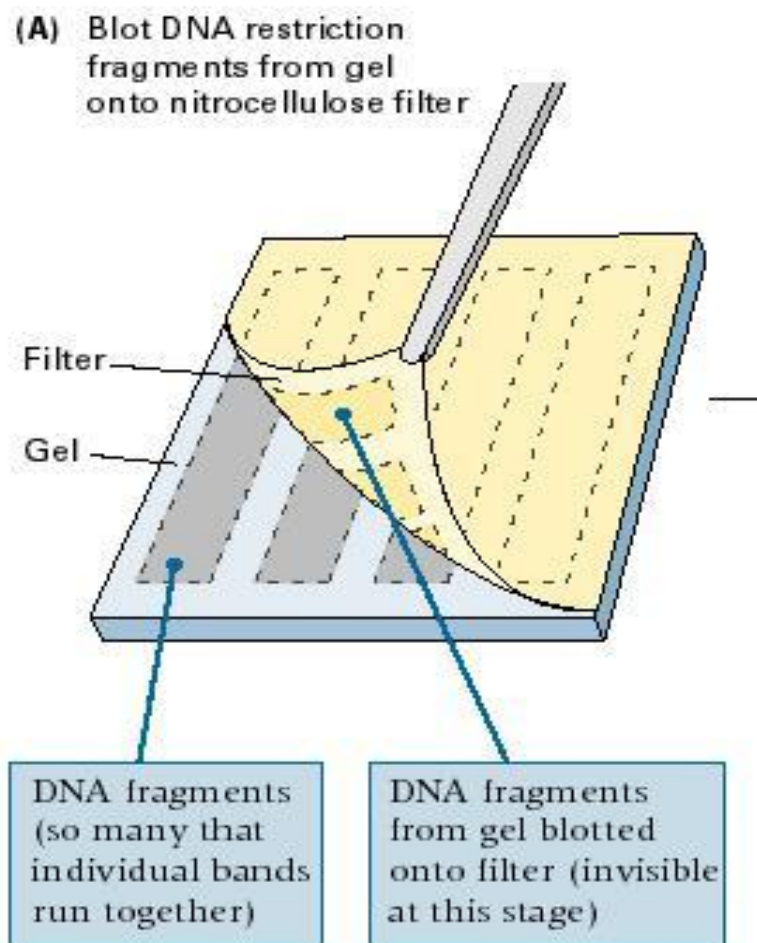
μεμβρανών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, νάυλον ουδέτερη μεμβράνη και νάυλον θετικά φορτισμένη μεμβράνη.



Εικόνα 5Α.1: Τα βασικά στάδια υβριδοποίησης κατά Southern

Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί είναι η τριχοειδής μεταφορά όπου βασίζεται στη μεταφορά ενός ρυθμιστικού διαλύματος από μία περιοχή υψηλού υδατικού δυναμικού σε περιοχή χαμηλού δυναμικού. Το διάλυμα μεταφοράς παρασύρει μέσα στο πήκτωμα και τη μεμβράνη λόγω των τριχοειδών φαινομένων με αποτέλεσμα να συμπαρασύρει μαζί και το μονόκλωνο DNA. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε θετικά φορτισμένη νάυλον μεμβράνη, η οποία διευκολύνει την δέσμευση του DNA λόγω των ιονικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου

DNA και της θετικά φορτισμένης μεμβράνης. Ο ρυθμός μεταφοράς του DNA εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA, το πάχος του πηκτώματος και τη συγκέντρωση της αγαρόζης του πηκτώματος. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί η σταθεροποίηση των νουκλεϊνικών οξέων στη μεμβράνη είτε με έκθεση σε UV ακτινοβολία συγκεκριμένης έντασης είτε με ξήρανση σε υψηλή θερμοκρασία.



Εικόνα 5A.2: Μεταφορά του DNA από πήκτωμα αγαρόζης σε μεμβράνη

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης της άσκησης 3 και η μεταφορά τους σε νάυλον μεμβράνη, ώστε να ακολουθήσει υβριδοποίηση με κατάλληλο ανιχνευτή (Άσκηση 5B). Πριν τη μεταφορά στη μεμβράνη, το πήκτωμα θα φωτογραφηθεί, ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανάλυση του πολυμορφισμού των θέσεων αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Παρασκευή 1% πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση

Η διαδικασία που θα ακολουθήσετε είναι ακριβώς η ίδια με αυτήν που περιγράφεται στην Άσκηση 2.

B. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΝΑΥΛΟΝ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Υλικά:

Διάλυμα Αποδιάταξης A:	1.5M NaCl, 0.5M NaOH.
Διάλυμα Εξουδετέρωσης E:	1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH7.2
20xSSC:	3M NaCl, 0.3M Na ₃ citrate.

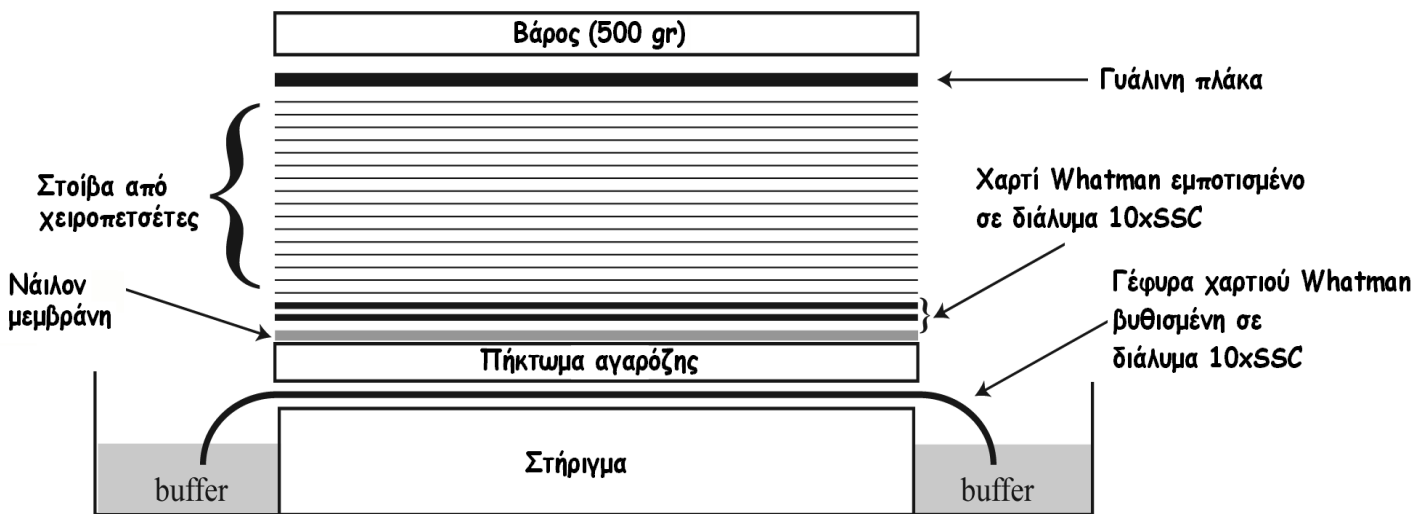
Πειραματική διαδικασία:

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται, αφού έχει τοποθετηθεί κατά μήκος του χάρακα, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση του σήματος της μεμβράνης με τη φωτογραφία του πηκτώματος και κατά συνέπεια ο προσδιορισμός του τμήματος που υβριδοποιήθηκε.
2. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο και επωάζεται σε διάλυμα αποδιάταξης σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 15 λεπτά.
3. Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 2.
4. Προστίθεται διάλυμα εξουδετέρωσης και το πήκτωμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 20 λεπτά.
5. Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
6. Το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 2X SSC σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά και τοποθετείται σε γέφυρα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM, του οποίου οι άκρες εμβαπτίζονται σε διάλυμα 6X SSC.
7. Η μεμβράνη με διαστάσεις λίγο μικρότερες από το πήκτωμα διαβρέχεται με ddH₂O και στη συνέχεια με διάλυμα 6X SSC και τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
8. Φύλλα (2) διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM, ίσων διαστάσεων με τη μεμβράνη, διαβρέχονται με ddH₂O και τοποθετούνται πάνω στη μεμβράνη, ακολουθούν επιπλέον φύλλα (2) διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM και τέλος απορροφητικά χαρτιά, μικρότερων διαστάσεων της μεμβράνης κατά 5 mm. Στη κορυφή τοποθετείται βάρος περίπου 500 gr για να εξασφαλιστεί η επαφή μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης (Εικόνα 5A.3).
9. Η μεταφορά του DNA ολοκληρώνεται μετά από 16-18 ώρες, οπότε αφαιρούνται τα απορροφητικά χαρτιά και τα φύλλα Whatman 3MM και σημαδεύεται η μεμβράνη ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της και η θέση των πηγαδιών.

10. Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί το DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Σημειώσεις

- ✓ Ο χειρισμός των μεμβρανών πρέπει να γίνεται με γάντια και με ειδικές λαβίδες τύπου Millipore με πεπλατυσμένα άκρα.
- ✓ Εάν τα τμήματα DNA υπερβαίνουν τις 15 kb, το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 0.2N HCl υπό ανάδευση για 10 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί μερική υδρόλυση του DNA και να διευκολυνθεί η μεταφορά των θραυσμάτων DNA (Wahl et al., 1979).
- ✓ Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς του DNA, το πήκτωμα μετά το τέλος της διαδικασίας εξετάζεται κάτω από υπεριώδες φως.



Εικόνα 5A.3: Κατασκευή γεφύρας για τη μεταφορά του DNA από πήκτωμα αγαρόζης σε μεμβράνη

ΑΣΚΗΣΗ 5B.

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ

Η διαδικασία υβριδοποίησης των νουκλεϊνικών οξέων συνίσταται από τα στάδια της προϋβριδοποίησης και της υβριδοποίησης. Το στάδιο της προϋβριδοποίησης πραγματοποιείται για την μείωση του background με την κάλυψη των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης (θέσεις όπου δεν υπάρχει DNA), οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη ειδική δέσμευση του ανιχνευτή. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης του ανιχνευτή στην επιφάνεια της μεμβράνης είναι τα: Denhardt's (Denhardt's reagent), το SDS και το DNA από σπέρμα σολωμού (ssDNA, salmon sperm DNA). Το αντιδραστήριο Denhardt's περιέχει φικόλη (ficol) και PVP, τα οποία είναι μεγάλα μόρια και καταλαμβάνουν χώρο καθώς και BSA, η οποία είναι μη ειδική πρωτεΐνη.

Κατά το στάδιο της υβριδοποίησης επιτυγχάνεται ο σχηματισμός των υβριδίων μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλυσίδων. Το ποσοστό σχηματισμού των υβριδίων καθορίζεται από τις συνθήκες υβριδοποίησης. Η άριστη θερμοκρασία υβριδοποίησης στη περίπτωση DNA:DNA υβριδοποίησης είναι 25°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία T_m (θερμοκρασία τήξης) του υβριδίου. Το σημείο τήξης T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία η μισή ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου βρίσκεται σε μονόκλινη μορφή. Οι παράμετροι που επηρεάζουν τη T_m είναι η αναλογία των βάσεων (GC), η συγκέντρωση άλατος και το μέγεθος του ανιχνευτή, και συνδέονται μεταξύ τους με τη εξίσωση: $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \log M + 0.41 (\%G+C) - 500/n$ όπου M είναι η συγκέντρωση των ιόντων του άλατος [Na⁺] και n ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν το υβρίδιο. Η συγκέντρωση των ιόντων Na πρέπει να είναι υψηλή ώστε να επιτευχθεί υβριδοποίηση. Τα μονοσθενή κατιόντα αντιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων μειώνοντας τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κλώνων και σταθεροποιώντας έτσι το υβρίδιο. Αντίθετα, με τη συγκέντρωση του άλατος, η υβριδοποίηση κατά Southern φτάνει τα όρια της ευαισθησίας της όταν

χρησιμοποιούνται μικρού μήκους ανιχνευτές. Υπό βέλτιστες συνθήκες, η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται περίπου σε 100 fg όταν χρησιμοποιείται βιοτυνιλιωμένος ανιχνευτής.

ΣΗΜΑΝΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ

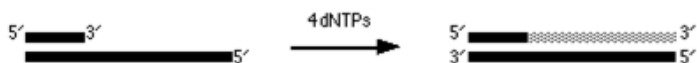
Οι ανιχνευτές είναι μονόκλινα μόρια τα οποία έχουν καθορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και είναι σημασμένα ώστε να μπορούν να εντοπίζονται. Η μεγάλη εξειδίκευση της αντίδρασης υβριδοποίησης ανάμεσα στο μόριο ανιχνευτή και τις αναζητούμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων επιτρέπει τον εντοπισμό τους ακόμη και αν στο κύτταρο ή το διάλυμα περιέχονται εκατομμύρια διαφορετικών αλληλουχιών DNA ή RNA. Η σήμανση των διάφορων τύπων ανιχνευτών (DNA, RNA ανιχνευτών) πραγματοποιείται με την προσθήκη σημασμένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ή ριβονουκλεοτιδίων (NTPs), εάν πρόκειται για DNA ή RNA ανιχνευτές αντίστοιχα, είτε κατά τη διαδικασία παραγωγής των ανιχνευτών (μέθοδος τυχαίων εκκινήτων), είτε μετά την παραγωγή τους (σήμανση στο 5' ή 3' άκρο του ανιχνευτή). Η σήμανση των νουκλεοτιδίων μπορεί να γίνει με ραδιενέργεια (³²P, ³⁵S, ³H) ή με μη ραδιενεργούς σημαντές [βιοτίνη (Bio), διγοξιγενίνη (DIG)]. Οι μη ραδιενεργοί σημαντές παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι είναι λιγότερο επικίνδυνοι για την υγεία και επιπλέον, μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία -20°C και να είναι διαθέσιμοι προς χρήση για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

ΣΗΜΑΝΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

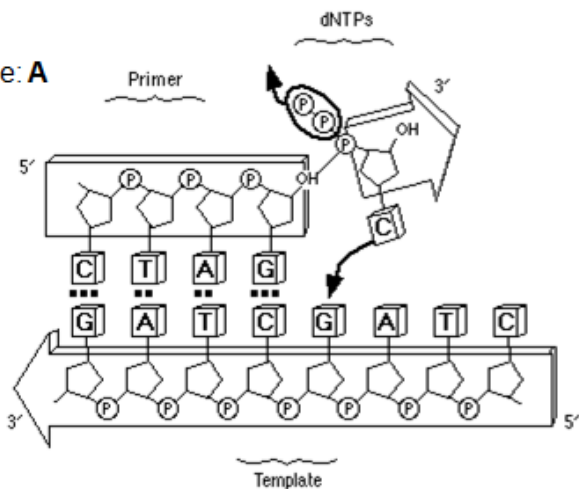
Η μέθοδος περιγράφηκε αρχικά από τους Feinberg & Vogelstein (1983). Τα βασικά στάδια περιλαμβάνουν την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος και την επακόλουθη βαθμιαία αναδιάταξη κάθε αλυσίδας με τη βοήθεια τυχαίων εκκινήτων (random primers) και την πολυμεριστική δράση του ενζυμικού κλάσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι το κομμάτι Klenow (Klenow fragment - μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης I) δεν έχει την 5'→3' εξωνουκλεοτική δράση του ολοενζύμου, ενώ διατηρεί τη δράση της 5'→3' πολυμεράσης και της 3'→5' εξωνουκλεάσης (Εικόνα 5B.1). Η αλληλουχία που πρόκειται να σημανθεί αποδιατάσσεται με βρασμό στους 100°C και

αναμιγνύεται στους 37°C με τυχαία ολιγονουκλεοτίδια (εξαμερή ή δεκαμερή), την Klenow υπομονάδα της DNA πολυμεράσης και δεοξυνουκλεοτίδια, παρουσία αλάτων και ρυθμιστικού διαλύματος που ευνοούν τη λειτουργία της πολυμεράσης. Στις συνθήκες αυτές, τα ολιγο-νουκλεοτίδια λειτουργούν ως εκκινήτες για την DNA πολυμεράση η οποία δημιουργεί νέες αλυσίδες πάνω στο εκμαγείο του αποδιαταγμένου DNA

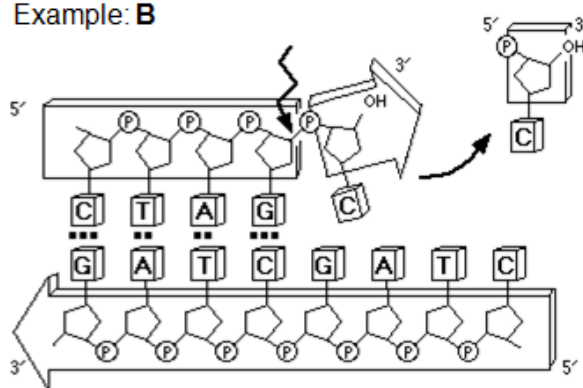
ενσωματώνοντας τα διατεθειμένα δεοξυνουκλεοτίδια. Εάν ένα από τα δεοξυνουκλεοτίδια φέρει κάποιο φορτίο (σήμα), τότε και η νέα αλυσίδα που θα δημιουργηθεί θα είναι σημασμένη. Η σήμανση των μορίων DNA για τη συγκεκριμένη άσκηση γίνεται με τη συμπλήρωση των 3' υπολειμματικών άκρων του με βιοτυνιλιωμένο δεοξυνουκλεοτίδιο (Biotin-11-dUTP).



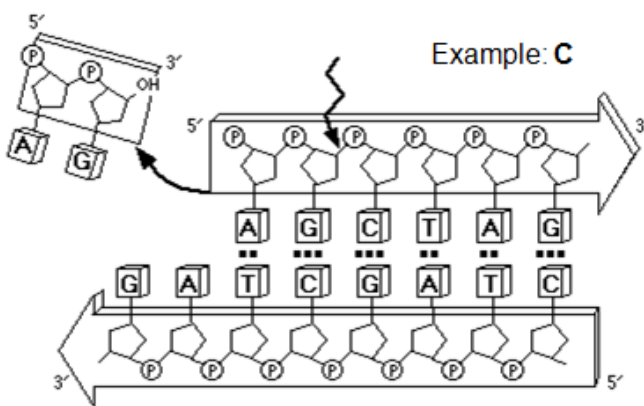
Example: **A**



Example: **B**



Example: **C**



Εικόνα 5B.1: **A.** DNA polymerase 5'- 3' polymerase activity; **B.** DNA polymerase 3'-5' exonuclease activity; **C.** DNA polymerase 5'- 3' exonuclease activity

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η υβριδοποίηση του DNA από τις αντιδράσεις πέψης που μεταφέραμε σε μεμβράνη στη προηγούμενη άσκηση (Άσκηση 5A) με ανιχνευτή περιοχή του γονιδιακού τόπου του 18S rRNA που έχει ήδη σημανθεί με 11-bio-dUTP με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων (random priming). Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι δεκανουκλεοτίδια.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά:

Διάλυμα Υβριδοποίησης: 6xSSC, 5xDenhard's, 0.5% SDS, 100μg/ml denaturated salmon sperm DNA
Διάλυμα 50X Denhardt's: 1% φικόλλη, 1% PVP, 1% BSA.

Πειραματική διαδικασία:

Η μεθοδολογία περιγράφεται από τους Church & Gilbert (1984).

Προϋβριδοποίηση

1. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα υβριδοποίησης, ο οποίος περιέχει ποσότητα διαλύματος υβριδοποίησης ανάλογα με το εμβαδό της (εμβαδό x 0.2 = ml διαλύματος υβριδοποίησης).
2. Επιπλέον, προστίθεται DNA από σπέρμα σολομού (ssDNA) σε συγκέντρωση 100 μg/ml διαλύματος υβριδοποίησης, το οποίο προηγουμένως έχει θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.
3. Ο σωλήνας τοποθετείται σε θάλαμο υβριδοποίησης και επωάζεται περιστρεφόμενος για 2 ώρες στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή.

Υβριδοποίηση

4. Το διάλυμα προϋβριδοποίησης αποχύνεται και προστίθεται νέο διάλυμα προϋβριδοποίησης (10 ml/100 cm²) και ο ανιχνευτής (100-200 ng/ml διαλύματος), ο οποίος έχει θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.
5. Ο σωλήνας μεταφέρεται σε θάλαμο υβριδοποίησης και η υβριδοποίηση πραγματοποιείται για 16-18 ώρες στην ίδια θερμοκρασία με την προϋβριδοποίηση.

Σημειώσεις

- ✓ Εάν το διάλυμα προϋβριδοποίησης και υβριδοποίησης περιέχουν φορμαμίδιο, η θερμοκρασία υβριδισμού είναι πολύ χαμηλότερη σύμφωνα με τη σχέση : $T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 \log M + 0.41 (\%G+C) - 0.63 (\% \text{φορμαμίδιο}) - 500/n$ (Bolton & McCarthy, 1962). Η χρήση φορμαμιδίου συνιστάται σε περιπτώσεις όπου η υβριδοποίηση πρέπει να γίνει σε χαμηλή θερμοκρασία, έτσι ώστε να μειωθεί το background.
- ✓ Το φορμαμίδιο είναι οργανικός διαλύτης, ο οποίος μειώνει τη θερμική σταθερότητα των δεσμών και με αυτόν τον τρόπο δεν ευνοεί τη μη ειδική δέσμευση του ανιχνευτή.
- ✓ Όσο μικρότερος είναι ο όγκος του διαλύματος υβριδοποίησης τόσο αποτελεσματικότερη είναι η υβριδοποίηση διότι η κινητική και η επανασύνδεση των νουκλεϊνικών οξέων είναι πιο γρήγορη.

ΑΣΚΗΣΗ 5C.

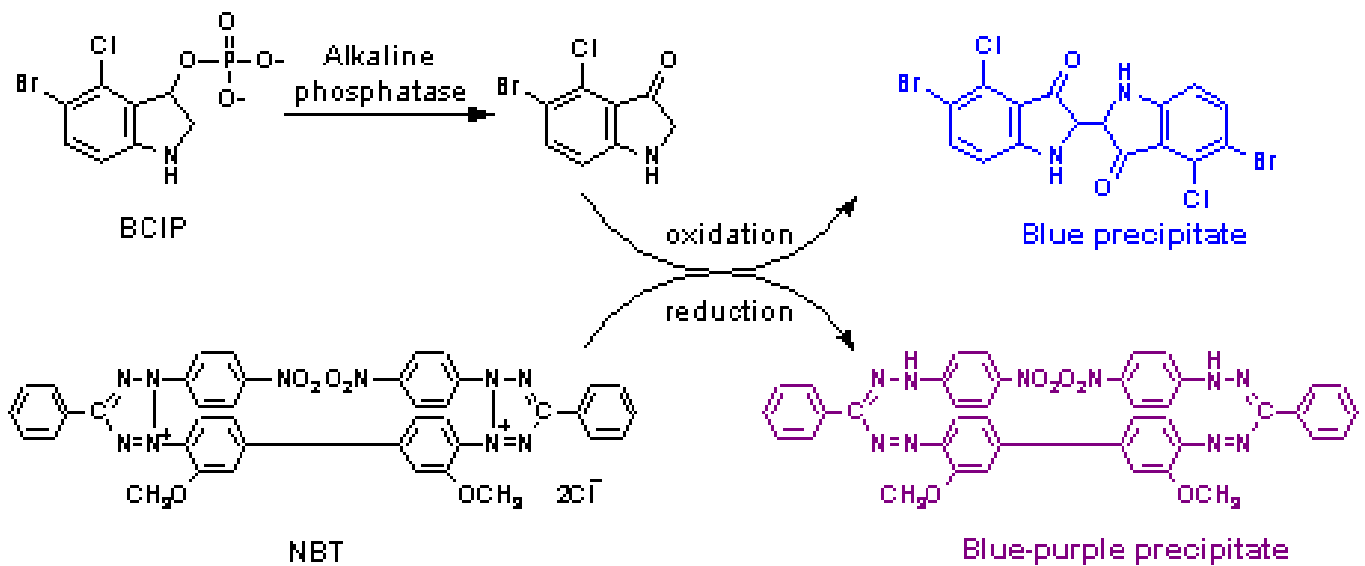
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

Η διαδικασία συνίσταται στην απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου ανιχνευτή (βήμα 1-5), στην πρόσδεση της στρεπταβιδίνης [σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης (AP)] στη βιοτίνη (βήμα 6-8) και στην ανίχνευση του σήματος (βήμα 9-10). Η απομάκρυνση της περίσσειας του ανιχνευτή, ο οποίος δεν έχει προσδεθεί καθόλου ή έχει ασθενώς υβριδοποιηθεί μη ειδικά, με αλληλουχίες με τις οποίες μπορεί να έχει μια μικρού βαθμού ομολογία επιτυγχάνεται με διαλύματα που περιέχουν άλατα (SSC) σε προοδευτικά μειούμενες συγκεντρώσεις και την κατάλληλη ποσότητα SDS. Η πρόσδεση της στρεπταβιδίνης πραγματοποιείται με την προσθήκη της σε διάλυμα που περιέχει αποβουτυρωμένο γάλα,

ώστε να μειωθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του αντισώματος.

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην ικανότητα ισχυρής σύνδεσης ανάμεσα στη βιοτίνη και την στρεπταβιδίνη, η οποία είναι συνδεδεμένη με αλκαλική φωσφατάση, και την ιδιότητά της να καταλύει μία χρωμογόνο αντίδραση με το X-phosphate και το NBT. Το X-phosphate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt) χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση και το 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl που σχηματίζεται αντιδρά αυθόρμητα με το O₂ για να δώσει μία αδιάλυτη ερυθροκυανή χρώση, ενώ το NBT χρησιμοποιείται ως δέκτης ηλεκτρονίων αντί του O₂. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της δραστηριότητας του ανιχνευτή και αντιστρόφως ανάλογη του μήκους (Εικόνα 5C.1).



Εικόνα 5C.1: Η χρωμογόνος αντίδραση των NBT/ BCIP με την αλκαλική φωσφατάση

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η ανίχνευση υβριδίων μεταξύ του DNA που απομονώσαμε από διάφορα έντομα και του ανιχνευτή που χρησιμοποιήσαμε, ώστε να επιβεβαιώσουμε την πιστότητα του προϊόντος που ενισχύσαμε με PCR χρησιμοποιώντας εκφυλισμένους εκκινητές στην Άσκηση 2. Η εμφάνιση σήματος θα καταδείξει την ύπαρξη υβριδίων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά:

Διάλυμα Πλύσης 1:	2xSSC, 0.1%SDS
Διάλυμα Πλύσης 2:	0.2xSSC, 0.1%SDS
Διάλυμα A:	100mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.5
Διάλυμα B:	Διάλυμα A, 1% Blocking solution.
Blocking διάλυμα:	Είναι διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος. Συνήθως κατασκευάζουμε ένα stock διάλυμα 10%, δηλαδή διαλύουμε 10gr αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη σε 100ml Διαλύματος A.
Διάλυμα C:	100mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl ₂ , pH 9.5

Πειραματική διαδικασία:

Πλύσεις

1. Το διάλυμα υβριδοποίησης όπου περιέχει τον ανιχνευτή συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon και διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C, έως ότου επαναχρησιμοποιηθεί.
2. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό δοχείο, το οποίο περιέχει διάλυμα πλύσης A και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά.
3. Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα.
4. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα πλύσης B υπό ανάδευση στη θερμοκρασία όπου πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση για 15 λεπτά.
5. Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.

Σημείωση

- ✓ Όσο μειώνεται η συγκέντρωση του SSC στο διάλυμα πλύσης (μείωση ιοντικής ισχύς), τόσο ευκολότερα απομακρύνεται ο ανιχνευτής.

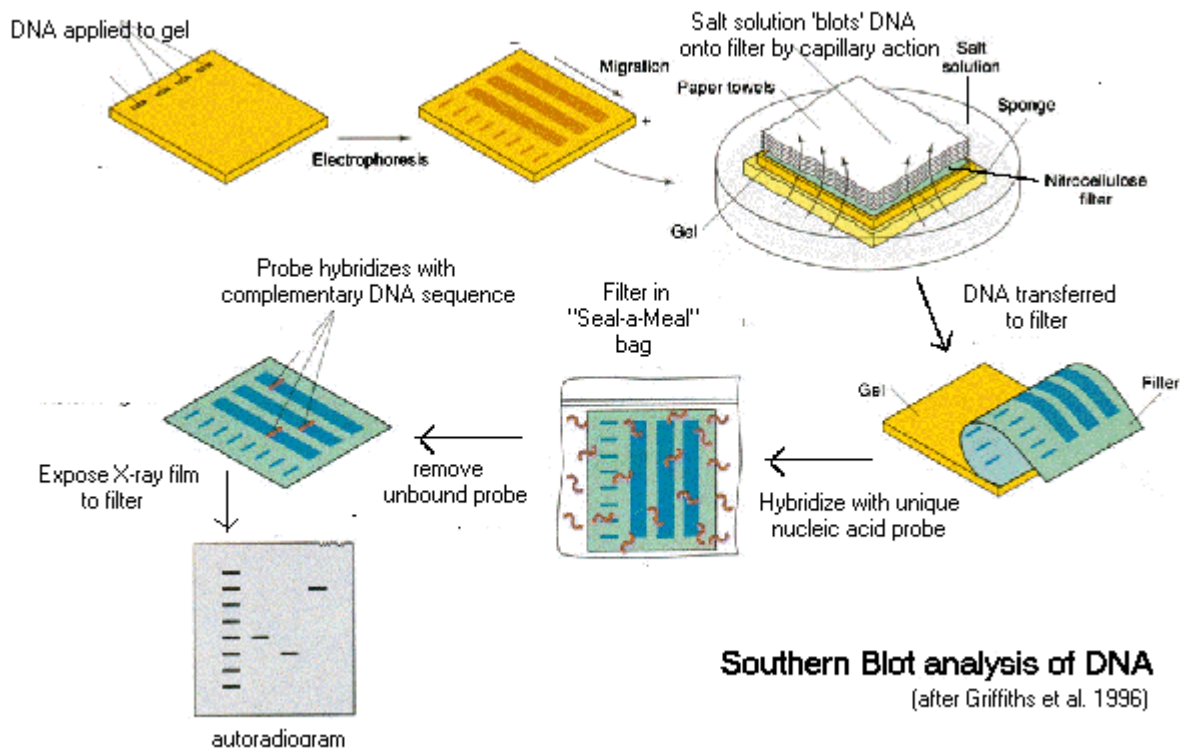
Εμφάνιση σήματος

**Όλες οι επόμενες διεργασίες πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου*

6. Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα A για 1 λεπτό και στη συνέχεια επωάζεται σε διάλυμα B για τουλάχιστον 25 λεπτά.
7. Το διάλυμα B απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα B, το οποίο περιέχει 5 μl συμπλόκου στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης ανά 10 ml, και επωάζεται για 25 λεπτά.
8. Η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα A για 10 λεπτά και επαναλαμβάνεται το βήμα.
9. Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα C για 2 λεπτά.
10. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται με κάλυψη της μεμβράνης με πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος C, το οποίο περιέχει 50 μl NBT και 37.5 μl BCIP ανά 10 ml διαλύματος.
11. Η εμφάνιση διακόπτεται με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με dH₂O.

Σημειώσεις

- ✓ Μετά την εμφάνιση, η μεμβράνη είναι δυνατόν να αποχρωματιστεί με επώαση σε διάλυμα DMF (dimethylformamide) σε θερμοκρασία 50°C για 10 λεπτά.
- ✓ Όταν ο ανιχνευτής είναι βιοτινυλιωμένος, η μεμβράνη μπορεί να απούβριδοποιηθεί με επώαση σε διάλυμα 1X SSC / 1% SDS σε θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά και εξισορρόπησή της σε διάλυμα 1X SSC σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.



ΑΣΚΗΣΗ 6.

ΧΡΗΣΗ Η/Υ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA Η ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ GENBANK

Η GenBank είναι μια βάση δεδομένων με ελεύθερη πρόσβαση, η οποία περιέχει αλληλουχίες DNA και πρωτεϊνών (Benson et al, 2002). Η πρόσβαση στην GenBank γίνεται μέσω του συστήματος Entrez του NCBI (National Center for Biotechnology Information), το οποίο είναι διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο www.ncbi.nlm.nih.gov. Για την ανάκτηση μιας αλληλουχίας DNA ή πρωτεΐνης χρησιμοποιείται ο αντίστοιχος αριθμός πρόσβασης της αλληλουχίας ή κατάλληλη λέξη-κλειδί.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA Η ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι συγκρίσεις με τις νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές αλληλουχίες της GenBank πραγματοποιήθηκαν με χρήση των προγραμμάτων της οικογένειας BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al, 1990), που είναι διαθέσιμα στο δικτυακό τόπο του NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Τα προγράμματα αυτά χρησιμοποιούνται με σκοπό:

- ✓ τη σύγκριση μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων (BLASTN),
- ✓ τη σύγκριση μιας αμινοξικής αλληλουχίας με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων (BLASTP),

Το αποτέλεσμα της σύγκρισης απεικονίζεται από το λογισμικό BLAST με τη μορφή νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών αλληλουχιών (BLAST hits) στοιχισμένων με την αλληλουχία που αποτελεί το ερώτημα (Query) της σύγκρισης. Επιπλέον, αναφέρεται το ποσοστό ταυτότητας μεταξύ του κάθε BLAST hit και της αλληλουχίας Query, καθώς και η τιμή E, η οποία εκφράζει τη στατιστική σπουδαιότητα κάθε στοίχισης, δηλαδή την πιθανότητα η στοίχιση να είναι τυχαία. Για όλες τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε εξ ορισμού ως όριο η τιμή $E=10$ και οι μικρότερες από αυτήν τιμές θεωρήθηκαν από το πρόγραμμα στατιστικά σημαντικές. Οι αποδεκτές στοίχισεις είχαν σχεδόν μηδενική τιμή E.

ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA Ή ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (CLUSTAL) ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ (MEGA)

Η στοίχιση νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών αλληλουχιών μπορεί να πραγματοποιηθεί με το πρόγραμμα ClustalW στο δικτυακό τόπο www.ebi.ac.uk/clustalw. Για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με βάση τη στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί το πρόγραμμα MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.1) (Kumar et al, 2001). Η κατασκευή τους πραγματοποιείται με τη μέθοδο των αποστάσεων UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), με βάση την οποία το μήκος των κλάδων του δέντρου εκφράζουν τις αντικαταστάσεις αμινοξέων. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίζονται (p-distances) ανά ζεύγος συγκρινόμενων πρωτεϊνών εκφράζουν το ποσοστό των αμινοξέων που είναι διαφορετικά στις δύο πρωτεΐνες ($p=N_d / L$, όπου p είναι η εξελικτική απόσταση, N_d ο αριθμός των διαφορετικών αμινοξέων και L ο συνολικός αριθμός των αμινοξέων που συμμετέχουν στη στοίχιση). Το αποτέλεσμα της ανάλυσης αξιολογείται από τον ίδιο αλγόριθμο εφαρμόζοντας τη στατιστική δοκιμή 'Bootstrap test' (Kumar et al, 2001). Ως 'αξιόπιστη' θεωρείται η τοπολογία του δέντρου με 'τιμή Bootstrap' μεγαλύτερη από 90%.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ OMIGA 2.0

Η επεξεργασία των αλληλουχιών DNA *in silico*, όπως για παράδειγμα η μετάφραση τους σε πρωτεΐνη, οι θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, εύρεση αναγνωστικού πλαισίου κ.α, μπορεί να πραγματοποιηθεί με το πρόγραμμα μοριακής ανάλυσης Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd) (Kramer, 2001). Το Omiga 2.0 παρέχει ένα λειτουργικό περιβάλλον για την επεξεργασία νουκλεϊνικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών περιλαμβάνοντας γραφικά και πρόσβαση σε δικτυακές συνδέσεις (BLAST, βάση δεδομένων Genbank).

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την πληροφορία που είναι διαθέσιμη από την ανάλυση πρωτοδιάταξης άλλων ειδών του γενετικού τόπου που μας ενδιαφέρει, ώστε να προχωρήσουμε σε φυλογενετική ανάλυση μεταξύ των ειδών. Θα χρησιμοποιήσουμε τα παρακάτω πακέτα ανάλυσης:

1. Αναζητούμε στη βάση **Entrez-Pubmed** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>) τις αλληλουχίες που μας ενδιαφέρουν
2. Η αλληλουχία του είδους που μας ενδιαφέρει αναλύεται στο πρόγραμμα **Omiga**. Το πρόγραμμα αυτό δίνει πληθώρα επιλογών, όπως εύρεση θέσεων αναγνώρισης από ένζυμα περιορισμού, σύνθεση εκκινητών, σύγκριση και ιδιότητες αλληλουχιών κ.α.
3. Οι αλληλουχίες εισάγονται στην επιλογή Clustal του προγράμματος **Mega**. Το πρόγραμμα αυτό δίνει τη δυνατότητα στοιχίσης των αλληλουχιών. Στο τέλος όλες οι αλληλουχίες αποκτούν το ίδιο μήκος.
4. Από τη στιγμή που οι αλληλουχίες που μας ενδιαφέρουν έχουν ίδιο μήκος, μπορούν να εισαχθούν στο πρόγραμμα ανάλυσης **Mega 3.1**. Το πρόγραμμα αυτό δίνει τη δυνατότητα φυλογενετικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων καθώς και ανάλυσής τους με τη μέθοδο bootstrap. Τα αποτελέσματα οπτικοποιούνται με τη μορφή δεντρογράμματος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

A. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ DNA ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (SEQUENCING)

Προκειμένου να μάθουμε το είδος της πληροφορίας που είναι αποθηκευμένη σε ένα γονίδιο, θα πρέπει να γνωρίζουμε την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του μορίου. Υπάρχουν δύο τεχνικές με τις οποίες μπορούμε να μάθουμε τη δομή ενός μορίου DNA. Η πρώτη που αναπτύχθηκε από τους **Maxam-Gilbert** (βραβείο Nobel), είναι η λεγόμενη χημική μέθοδος (ή μέθοδος χημικής υποβάθμισης – chemical degradation method). Η δεύτερη είναι η ενζυμική μέθοδος (dideoxy-termination method) που αναπτύχθηκε από τον **Sanger** (επίσης βραβείο Nobel). Αρχικά, η πρώτη ήταν πιο διαδεδομένη γιατί χρησιμοποιούσε πιο απλά αντιδραστήρια, σήμερα όμως χρησιμοποιείται κυρίως η δεύτερη ή τροποποιήσεις της (δίνει καλύτερα αποτελέσματα και χρησιμοποιεί λιγότερο επικίνδυνα αντιδραστήρια).

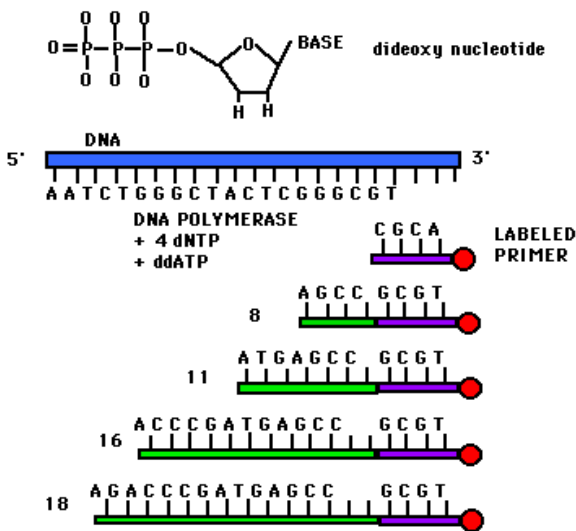
Κατά τη **χημική μέθοδο**, η διαδικασία ξεκινά με μια ομάδα ίδιων δίκλωνων μορίων DNA επισημασμένων στο 5' άκρο, που έχουν παραχθεί με τη βοήθεια της πολυνουκλεοτιδικής κινάσης. Στο πρώτο στάδιο οι κλώνοι της διπλής έλικας διαχωρίζονται και εκτίθενται σε ήπια κατεργασία με μια χημική ένωση που καταστρέφει μία από τις τέσσερις βάσεις στο DNA, π.χ. την αδενίνη. Επειδή η κατεργασία είναι ήπια, συνήθως μόνο μια αδενίνη καταστρέφεται σε κάθε μόριο, τυχαία. Αυτό δίνει μια οικογένεια τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους, που αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές περιοχές στις οποίες υπάρχει αδενίνη στο αρχικό μόριο DNA. Αυτά τα τμήματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα και ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία. Μόνο τα τμήματα που διαθέτουν μια 5' τελική ³²P φωσφορική ομάδα θα εμφανιστούν στο πήκτωμα και τα μεγέθη τους αποκαλύπτουν τις αποστάσεις από το επισημασμένο άκρο στις οποίες προκύπτουν οι αδενίνες. Για να προσδιοριστεί ολόκληρη η αλληλουχία, παρόμοιες διαδικασίες ακολουθούνται παράλληλα σε τέσσερα ξεχωριστά δείγματα του ίδιου επισημασμένου DNA μορίου, χρησιμοποιώντας χημικά αντιδραστήρια που κόβουν το DNA σε θυμίνη στο πρώτο δείγμα, κυτοσίνη στο δεύτερο, γουανίνη στο τρίτο και αδενίνη στο τέταρτο δείγμα. Τα τμήματα αυτά διαχωρίζονται σε παράλληλες διαδρομές ενός πηκτώματος, δίνοντας ένα μοτίβο ραδιενεργών ζωνών DNA από το οποίο διαβάζεται η αλληλουχία του DNA.

Η **μέθοδος Sanger**, γνωστή και ως διδεόξυ-μέθοδος, βασίζεται στον βασηο-ειδικό τερματισμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης επέκτασης εκκινητή. Τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις γίνονται ταυτόχρονα, που όλες περιέχουν εκκινητή, DNA - μήτρα, ένζυμο πολυμερισμού και τα τέσσερα δεοξυ-νουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), αλλά κάθε μία περιέχει και ένα τροποποιημένο νουκλεοτίδιο, το οποίο σταματά την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Το νουκλεοτίδιο αυτό είναι ένα διδεόξυ-νουκλεοτίδιο, το οποίο μπορεί και ενσωματώνεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, όμως δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με επόμενο νουκλεοτίδιο, γιατί λείπει το υδροξύλιο στην 3' θέση. Συνεπώς, σε κάθε αντίδραση παράγεται ένα μίγμα θραυσμάτων που όλα τερματίζουν στο ίδιο τροποποιημένο νουκλεοτίδιο (Σχ.1). Όταν τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων ηλεκτροφορηθούν στη σειρά, η ακολουθία με την οποία τα νουκλεοτίδια προστίθενται στον εκκινητή μπορεί να βρεθεί από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στις τέσσερις σειρές του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης (Σχ.2). Η θέση των θραυσμάτων αυτών αποκαλύπτεται με την σήμανσή τους (ραδιενεργή ή φθορίζουσα), πριν ή κατά την διάρκεια των αντιδράσεων επέκτασης.

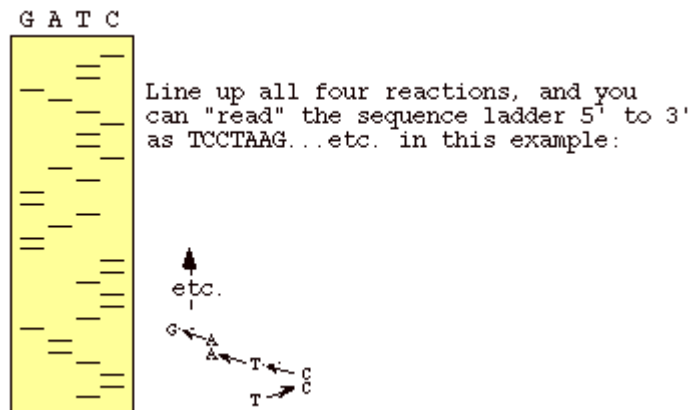
Μεθοδολογία:

1. Το δείγμα DNA που θέλουμε να αναλύσουμε γίνεται μονόκλωνο και χωρίζεται σε τέσσερα δείγματα.
2. Σημαίνουμε με κάποιο τρόπο τον εκκινητή ή κάποιο νουκλεοτίδιο.
3. Σε κάθε δείγμα προστίθενται ο εκκινητής, τα τέσσερα δεοξυ-νουκλεοτίδια, DNA πολυμεράση και ένα από τα τέσσερα διδεόξυ-νουκλεοτίδια (αυτό σε περιορισμένη ποσότητα).
4. Ακολουθεί η επέκταση του DNA, η οποία τερματίζεται όταν ενσωματωθεί το διδεόξυ-νουκλεοτίδιο (δίνοντας έτσι τμήματα DNA διαφόρων μεγεθών, ανάλογα με το πότε ενσωματώθηκε το διδεόξυ-νουκλεοτίδιο).
5. Το DNA αποδιατάσσεται και ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, όπου τα κομμάτια διαχωρίζονται βάση μεγέθους
6. Η οπτικοποίηση γίνεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, αν η σήμανση έγινε με ραδιενέργεια, ή σε υπεριώδες φως, αν η σήμανση έγινε με φθορισμό.

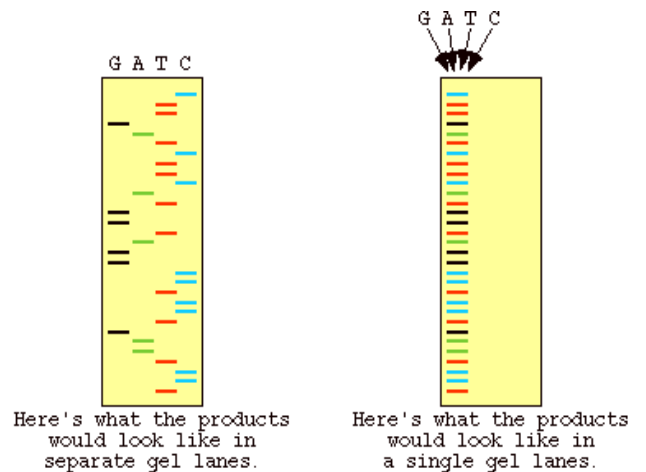
Σχήμα 1



Σχήμα 2



Σχήμα 3



DYE TERMINATOR SEQUENCING

Η ανάπτυξη των διαφόρων φθορίζουσών χρωστικών έχει επιτρέψει την εξέλιξη της μεθόδου. Σημαίνοντας τα νουκλεοτίδια τερματισμού, όχι με ραδιενέργεια, αλλά με χρωστικές που μπορούν να εκπέμπουν φθορισμό σε διαφορετικά μήκη κύματος, είναι δυνατό να ηλεκτροφορηθούν οι 4 αντιδράσεις στην ίδια διαδρομή. Έτσι η μέθοδος γίνεται πιο γρήγορη και εύκολη (Σχ.3).

Οι σύγχρονες συσκευές αλληλούχησης μπορούν να αναλύσουν ως και 384 δείγματα σημασμένα με φθορισμό σε ένα 'τρέξιμο' και μπορούν να τρέξουν 24 φορές δείγματα σε μια ημέρα. Μπορούν να διαβάσουν ως και 1000 ζεύγη βάσεων μήκος αλληλουχίας

PYROSEQUENCING

Η τελευταία ανάπτυξη στην ανάλυση της πρωτοδιάταξης DNA αλληλουχιών. Είναι μια μέθοδος για το διάβασμα μικρών αλληλουχιών DNA, καθώς και για ανάλυση μεταλλάξεων και SNPs. Τυπικά απαιτούνται περίπου 10 λεπτά για τις αντιδράσεις 96 δειγμάτων και 30-45 λεπτά για την ανάλυση των 40-50 βάσεων. Δεν χρησιμοποιεί πηκτώματα ή χρωστικές σήμανσης.

Μεθοδολογία:

1. Ένας εκκινήτης αλληλούχησης (sequencing primer) υβριδίζεται σε μονόκλωνο DNA, που έχει προκύψει μέσω PCR και επωάζεται με τα ένζυμα DNA πολυμεράση, ATP σουλφορυλάση, λουσιφεράση και νουκλεοτιδάση, καθώς και με τα υποστρώματα adenosine 5' phosphosulfate (APS) και λουσιφερίνη.

2. Το πρώτο από τα τέσσερα dNTPs προστίθεται στην αντίδραση. Η DNA πολυμεράση καταλύει την ενσωμάτωσή του στην αλυσίδα του DNA, αν είναι συμπληρωματική με τη βάση στη μήτρα DNA. Κάθε ενσωμάτωση συνοδεύεται από την απελευθέρωση διφωσφορικής ομάδας, ισομοριακής με το ποσό του νουκλεοτιδίου που ενσωματώνεται (Σχ.4).

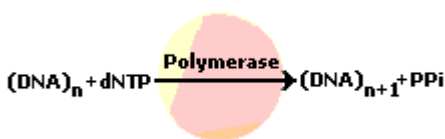
3. Η ATP σουλφορυλάση μετατρέπει τη διφωσφορική ομάδα σε ATP, παρουσία του APS. Αυτό το ATP οδηγεί στην προκαλούμενη από τη λουσιφεράση μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυ-λουσιφερίνη, που παράγει ορατό φως σε ποσό ανάλογο του ATP. Το φως αυτό ανιχνεύεται από μια 'κάμερα' και εμφανίζεται ως κορυφή σε ένα 'πυρόγραμμα'. Κάθε σήμα φωτός είναι ανάλογο του αριθμού των νουκλεοτιδίων που ενσωματώθηκαν (Σχ.5).

4. Η νουκλεοτιδάση (apyrase), ένα ένζυμο που διασπά νουκλεοτιδικά, συνεχώς αποδομεί τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτιδικά και την περίσσεια του ATP. Μετά την ολοκλήρωση της αποδόμησης, το επόμενο νουκλεοτιδικό προστίθεται (Σχ.6).

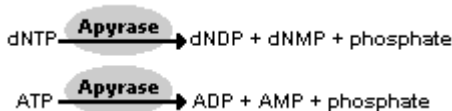
5. Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων γίνεται ένα κάθε φορά. Σημειώνεται ότι η deoxyadenosine alpha-thio triphosphate (dATPαS) χρησιμοποιείται ως αντικαταστάτης της τριφωσφορικής δεόξυ-αδενοσίνης (dATP), επειδή αναγνωρίζεται από την DNA πολυμεράση, αλλά όχι από τη λουσιφεράση.

Καθώς συνεχίζεται η διαδικασία, η συμπληρωματική αλυσίδα σχηματίζεται βήμα-βήμα και η νουκλεοτιδική αλληλουχία καθορίζεται από τις κορυφές στο πυρόγραμμα.

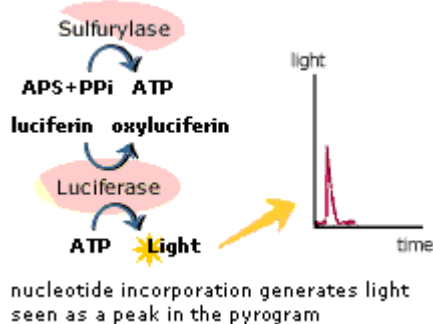
Σχήμα 4



Σχήμα 6



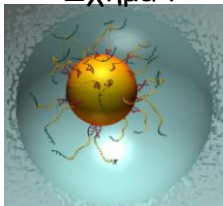
Σχήμα 5



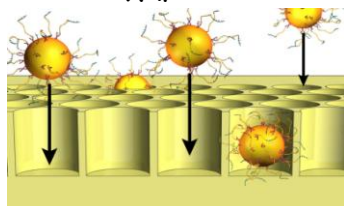
454 SEQUENCING

Είναι ένα σύστημα για μαζική αλληλούχιση κατά τη σύνθεση, που βασίζεται στη μέθοδο pyrosequencing. Μπορεί να αναλύσει ως και 20 Mbp, σε 4,5 ώρες, χρησιμοποιώντας τη συσκευή αλληλούχισης GS20 (Σχ.9). Η μέθοδος ξεκινάει με τον τεμαχισμό του DNA σε τμήματα 300 – 500 bp. Στα άκρα των θραυσμάτων προσθέτονται κοντοί συνδέτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως εκκινήτες για την PCR ενίσχυση των κομματιών αυτών, καθώς και ως εκκινήτες για την αλληλούχισή τους. Επίσης, ο ένας από τους δύο εκκινήτες περιέχει βιοτίνη, η οποία χρησιμεύει για τη δέσμευση των κομματιών αυτών πάνω σε σφαιρίδια καλυμμένα με στρεπταβιδίνη (Σχ.7). Ακολουθεί PCR και τοποθέτηση των σφαιριδίων σε πηγαδάκια διαμέτρου 44μm του PicoTiterPlate, το οποίο είναι ένα τσιπάκι οπτικών ινών (Σχ.8). Μετά από επιδιόρθωση εγκοπής (nick repair), η μη βιοτυνιλιωμένη αλυσίδα DNA απελευθερώνεται και χρησιμοποιείται ως μονόκλωνη μήτρα. Στο κάθε πηγαδάκι τοποθετείται και μείγμα από πολυμεράση, σουλφορυλάση και λουσιφεράση και το τσιπάκι τοποθετείται στη συσκευή αλληλούχισης. Σε αυτή τη φάση τα τέσσερα νουκλεοτιδικά 'ρέουν' με τη σειρά πάνω από τα πηγαδάκια και συνεπώς όλα τα εκατοντάδες χιλιάδες ακινητοποιημένα DNAs αναλύονται ταυτόχρονα. Το βασικό μειονέκτημα αυτής της τεχνολογίας είναι η αδυναμία να αναλύσει σωστά αλληλουχίες που έχουν πάνω από οκτώ ίδια νουκλεοτιδικά στη σειρά (είναι δύσκολη η διάκριση της έντασης του φωτός που εκπέμπεται).

Σχήμα 7



Σχήμα 8



Σχήμα 9

B. ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ



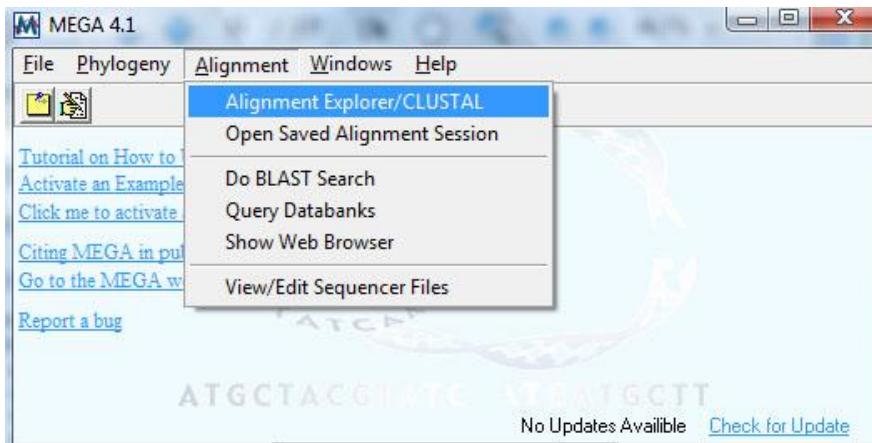
MEGA 4.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

Το πρόγραμμα αυτό παρέχει τη δυνατότητα φυλογενετικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων καθώς και ανάλυσής τους με τη μέθοδο bootstrap. Τα αποτελέσματα οπτικοποιούνται με τη μορφή δενδρογράμματος (B), αφού προηγηθεί η στοίχιση των αλληλουχιών (A).

A. Στοίχιση αλληλουχιών

Απαραίτητο στάδιο στην εύρεση της γενετικής απόστασης μεταξύ των οργανισμών και την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων αποτελεί η στοίχιση των υπό μελέτη αλληλουχιών (alignment). Η στοίχιση των αλληλουχιών του εργαστηρίου στο MEGA 4.1 θα πραγματοποιηθεί με το πρόγραμμα ClustalW, το οποίο ευθυγραμμίζει αυτόματα ακολουθίες βάσεων ή αμινοξέων και προτείνει ποσοστιαίες αποστάσεις μεταξύ των ακολουθιών βασισμένες στον αριθμό και το είδος των μεταλλαγών που παρατηρούνται.

1. Εκκίνηση προγράμματος MEGA 4.1
2. Στη γραμμή εργασιών του κεντρικού παραθύρου του προγράμματος επιλέγουμε την εντολή *Alignment* και στη συνέχεια την υποεντολή *Alignment Explorer/CLUSTAL*

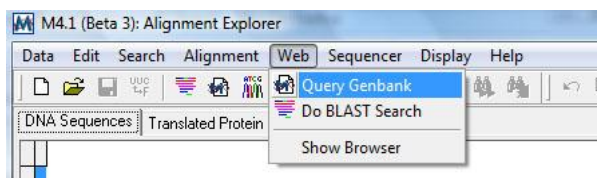


3. Επιλέγουμε τη δημιουργία νέας στοίχισης αλληλουχιών:

Create new alignment

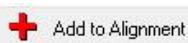


4. Επιλέγουμε την εντολή YES ή NO στο παράθυρο διαλόγου που εμφανίζεται για να προσδιορίσουμε εάν δημιουργούμε νουκλεοτιδική ή πρωτεϊνική αλληλουχία, αντίστοιχα.
5. Στη γραμμή εργασιών του παραθύρου *Alignment Explorer* επιλέγουμε την εντολή *Web* και στη συνέχεια την υποεντολή *Query Genbank*



6. Στο παράθυρο της ιστοσελίδας *NCBI Entrez* που ανοίγει, αναζητούμε τις αλληλουχίες με βάση το *Accession Number* (της λίστας του εργαστηρίου) και τις προσθέτουμε στο παράθυρο *Alignment Explorer* με την εντολή

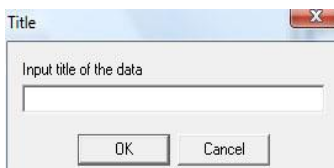
Add to Alignment



7. Εφόσον έχουν εισαχθεί όλες οι αλληλουχίες, κλείνουμε το παράθυρο της ιστοσελίδας *NCBI Entrez* και του παραθύρου *Alignment Explorer* (θα περιέχει όλες τις ακολουθίες που προσθέσαμε). Στα μηνύματα που

εμφανίζονται για την αποθήκευση του αρχείου στοίχισης “*current alignment session*” και του “*MEGA file*” επιλέγουμε *Yes*.

8. Εισάγουμε έναν τίτλο στο παράθυρο “*Title*” που εμφανίζεται ενώ στο επόμενο παράθυρο διαλόγου επιλέγουμε



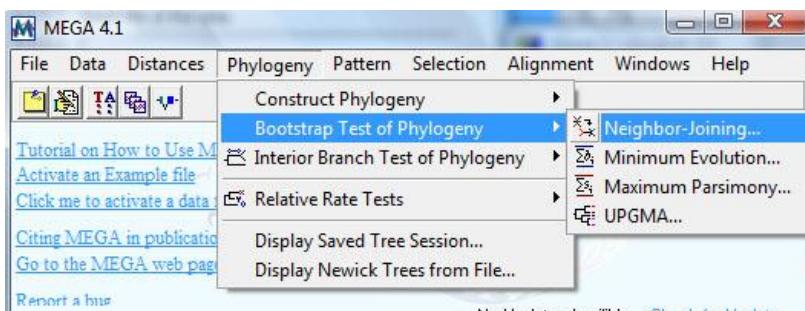
No στην ερώτηση “*Protein-coding nucleotide sequence data*”.

9. Στο τελικό παράθυρο διαλόγου και στην ερώτηση “*Open the data file in MEGA*” που εμφανίζεται επιλέγουμε *Yes*

Το αρχείο MEGA που ανοίγει παρουσιάζει την στοίχιση των αλληλουχιών σύμφωνα με το πρόγραμμα Clustal.

B. Κατασκευή δένδρογράμματος

10. Στη γραμμή εργασιών του κεντρικού παραθύρου του προγράμματος επιλέγουμε την εντολή *Phylogeny* και στη συνέχεια την υποεντολή *Bootstrap Test of Phylogeny* και *Neighbor Joining*.



11. Επιλέγουμε  ώστε να οπτικοποιηθεί η στοίχιση των αλληλουχιών με τη μορφή δένδρογράμματος.



PHYLIP (Phylogeny Inference Package)

Το PHYLIP αποτελεί ένα πακέτο προγραμμάτων που παρέχουν τη δυνατότητα φυλογενετικής ανάλυσης αποτελεσμάτων, τα οποία μπορεί να αφορούν αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, αλληλουχίες πρωτεϊνών, συχνότητες αλληλομόρφων, θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού κ.α. Το πρόγραμμα που θα χρησιμοποιήσουμε στο εργαστήριο είναι το *Restml*.

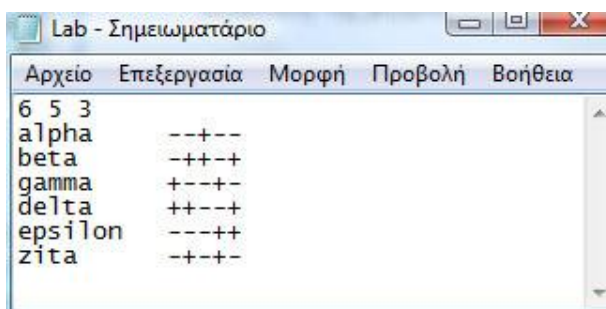
Restml (Restriction sites Maximun Likelihood)

Το *Restml* βασίζεται στον πολυμορφισμό που εμφανίζουν οι διάφορες αλληλουχίες ως προς τις θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού, ώστε να κατασκευάσει ένα φυλογενετικό δένδρογραμμα.

Απαραίτητο βήμα αποτελεί η δημιουργία μιας μήτρας δυαδικών χαρακτήρων παρουσίας/απουσίας σημείων πέψης με τη μορφή txt. **(A)** και στη συνέχεια η ανάλυση της μήτρας στο πρόγραμμα **(B)**.

A. Δημιουργία μήτρας

Η μήτρα πρέπει να δημιουργηθεί ως αρχείο *txt*. (για παράδειγμα στο Σημειωματάριο-WordPad) και να παρουσιάζει την ακόλουθη μορφή



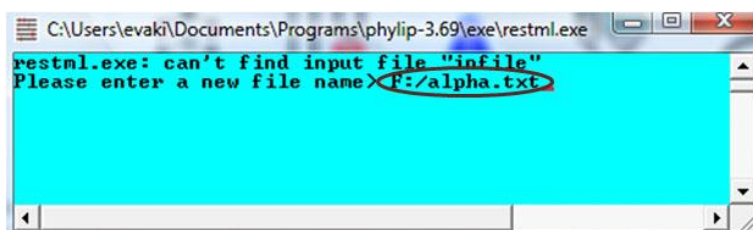
1. Στη πρώτη σειρά σημειώνουμε τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, τον αριθμό των θέσεων αναγνώρισης των ενζύμων καθώς και τον αριθμό των ενζύμων περιορισμού.
 - Ο πρώτος αριθμός (6) αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ειδών που θα μελετηθούν (alpha, beta, gamma, delta, epsilon, zeta)
 - Ο δεύτερος στη σειρά αριθμός (5) αντιστοιχεί στον αριθμό των θέσεων αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού (η παρουσία ή απουσία μία θέσης αναγνώρισης ενζύμου περιορισμού σημειώνεται με + ή -, αντίστοιχα).
 - Ο τρίτος αριθμός αντιστοιχεί στον αριθμό των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν.
2. Στη συνέχεια σημειώνουμε το κάθε είδος με τον απλότυπο του (π.χ. alpha ---+)
 - Το όνομα του είδους πρέπει να περιέχει μέχρι 10 χαρακτήρες
 - Ο απλότυπος σημειώνεται από τον ενδέκατο χαρακτήρα (εάν κάποιο όνομα είναι μικρότερο σε μέγεθος, αφήνουμε κενό μέχρι και το χαρακτήρα 10)
3. Αποθηκεύουμε το αρχείο σε μορφή *txt*.

B. Ανάλυση της μήτρας στο πρόγραμμα Restml

4. Άνοιγμα του φακέλου *Phylip-3.69* και στην συνέχεια άνοιγμα του υποφακέλου *exe*
5. Εκκίνηση του προγράμματος Restml

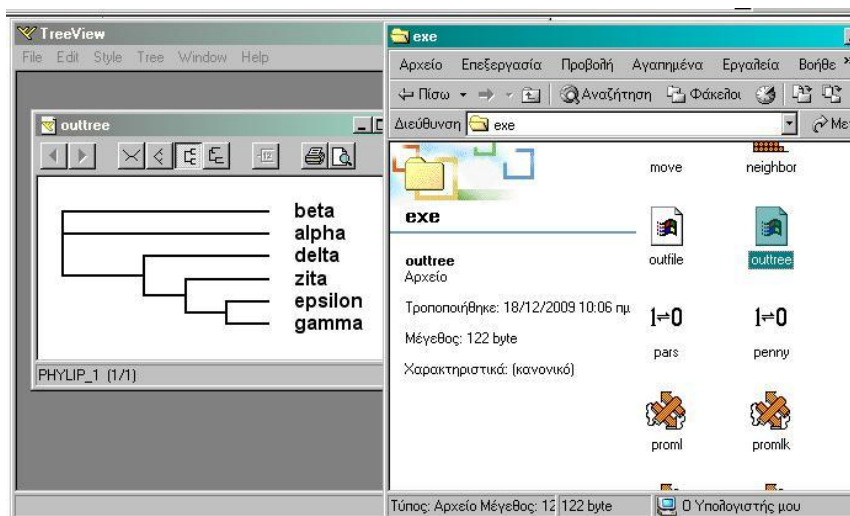


6. Στο παράθυρο εντολών MS-DOS που ανοίγει, αναζητούμε το αρχείο *txt*. που δημιουργήσαμε

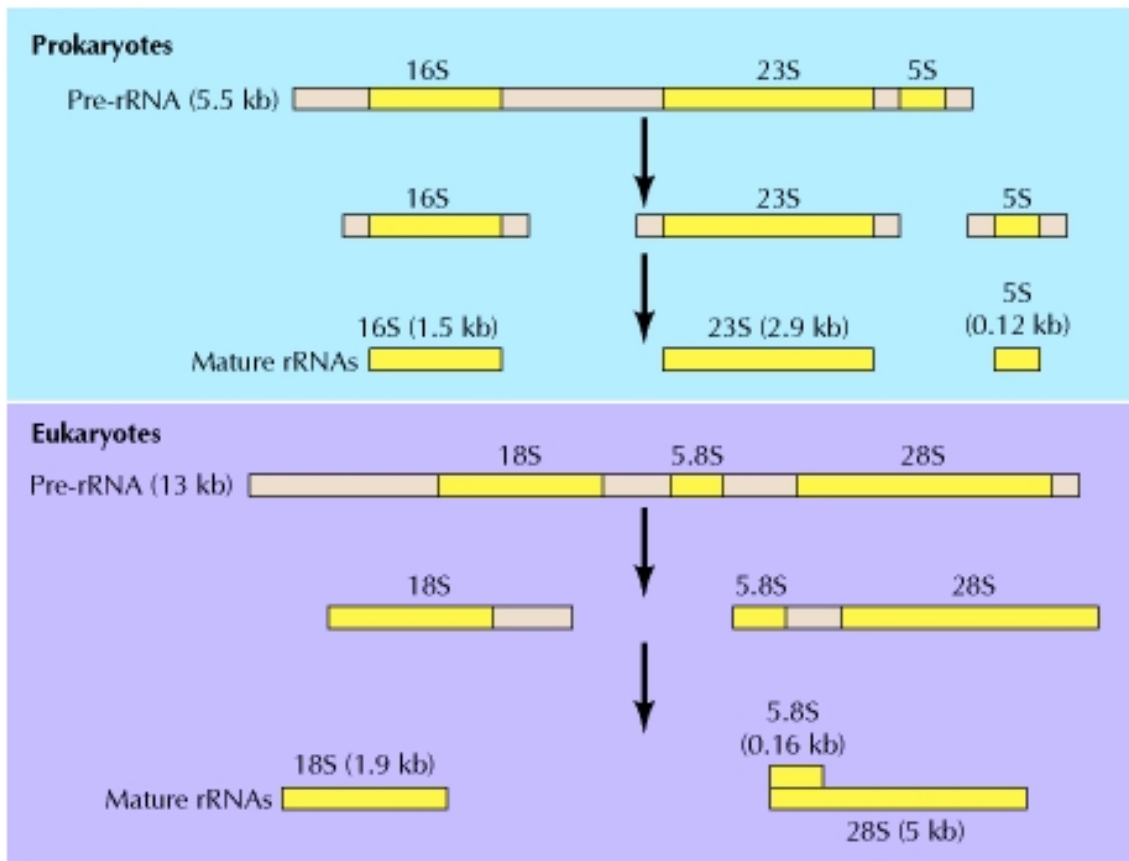


7. Στην επόμενη εντολή που εμφανίζεται (παρουσιάζονται οι παράμετροι που θα χρησιμοποιήσει το πρόγραμμα) πληκτρολογούμε το γράμμα *Y* και στη συνέχεια *Enter*, ώστε να ολοκληρωθεί η ανάλυση.
8. Πληκτρολογούμε *Enter* για να κλείσει το πρόγραμμα. Στο φάκελο *exe* του PhYLIP πρέπει να υπάρχει ένα αρχείο "*Outtree*".

9. Για να εμφανιστεί το δενδρόγραμμα, εκκινούμε το πρόγραμμα TreeView και σύρουμε σε αυτό (drag and drop) το αρχείο Outtree.



C



Τα προκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν τρία rRNAs (16S, 23S και 5S), τα οποία σχηματίζονται από ένα πρόδρομο rRNA μετάγραφο. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν τέσσερα rRNAs. Ένα από αυτά (5S rRNA) μεταγράφεται από διαφορετικό γονίδιο ενώ τα υπόλοιπα τρία (18S, 28S και 5.8S) μεταγράφονται από ένα κοινό πρόδρομο rRNA (pre-rRNA). Το 5.8S rRNA, το οποίο βρίσκεται μόνο στους ευκαρυώτες, αφού αποκοπεί στη συνέχεια συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με το 28S rRNA.

D. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

* Το κεφάλαιο D προέρχεται από την Άσκηση 2 του εργαστηριακού οδηγού της Μοριακής Βιολογίας I

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης μορίων με εφαρμογή στη μοριακή βιολογία, τη βιοχημεία, την πρωτεϊνική χημεία, τη φαρμακολογία κ.α. Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της καθαρότητας ενός δείγματος καθώς και το διαχωρισμό μιγμάτων μορίων, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές, όπως π.χ. με φυγοκέντρηση με βαθμίδωση πυκνότητας. Δείγμα μπορεί να αποτελέσει κάθε μόριο το οποίο φέρει φορτίο - από ολόκληρα κύτταρα έως πρωτεΐνες, πεπτιδία, νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), αμινοξέα, κ.α.

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα, μετανάστευση).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτώματα (gels) αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η επιλογή εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του τμήματος που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μορίων όταν απαιτείται μεγάλη διακριτική ικανότητα, ακόμη και μεταξύ μορίων που διαφέρουν σε μέγεθος μόνο κατά 0.1% (ακόμη και 1 βάση). Αντίθετα, τα πηκτώματα αγαρόζης παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού μεταξύ των μορίων (από 50 bp έως Mb) (Sambrook et al., 1991).

Η πρώτη καταγραφή ηλεκτροφόρησης μορίων πραγματοποιήθηκε το 1942, όπου οι Coleman και Miller ανέφεραν τη μετακίνηση ουδέτερων εξόζων (hexoses) προς την άνοδο σε διάλυμα βορικού νατρίου, ενώ η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου ως μέσο χρώσης για την οπτικοποίηση του DNA εισήχθη το 1972 (Aaij & Borst, 1972).

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτώμα αγαρόζης χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό μορίων δίκλωνου DNA σε ουδέτερο pH (π.χ. ύστερα από κατάτμηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού για τη χαρτογράφηση κλωνοποιημένων τμημάτων ή τη μεταφορά κατά Southern και την υβριδοποίηση καθώς και για την ανάλυση PCR προϊόντων όπως στη μοριακή διάγνωση ασθενειών). Υπό αυτές τις συνθήκες (ουδέτερο pH) το DNA φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών του ομάδων. Επομένως, αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-) θα κινηθούν προς την άνοδο (+).

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA καθορίζεται από τις εξής παραμέτρους :

α. το μέγεθος του DNA - δίκλινα γραμμικά μόρια DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου (log) του μοριακού τους βάρους (Helling et al., 1974),

β. τη συγκέντρωση της αγαρόζης – η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA (μ) και η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πηκτώμα (τ) συνδέονται με τον τύπο $\log \mu = \log \mu_0 - K\tau$, όπου μ_0 η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και $K\tau$ ο συντελεστής επιβράδυνσης, ο οποίος έχει σχέση με τις ιδιότητες του πηκτώματος, το μέγεθος και το σχήμα των κινούμενων μορίων,

% αγαρόζης στο πηκτώμα	Διαχωριστική ικανότητα γραμμικών DNA (kb)
0.3	5 – 60
0.6	1 – 20
0.7	0.8 – 10
0.8	0.5 – 7
0.9	0.4 – 6
1.2	0.2 – 4
2.0	0.1 – 3

γ. Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοικτή κυκλική μορφή (μορφή II) και γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης. Οι σχετικές

κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και το βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I του DNA. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η μορφή I κινείται γρηγορότερα από τη μορφή III. Κάτω από άλλες συνθήκες συμβαίνει το αντίστροφο. Μια μέθοδος αναγνώρισης των διαφορετικών στερεοδιατάξεων του DNA είναι να κάνουμε την ηλεκτροφόρηση παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων βρωμιούχου αιθιδίου. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου, περισσότερη χρωστική δεσμεύεται στο DNA. Έτσι, αναιρούνται προοδευτικά οι αρνητικές στροφές υπερέλικας της μορφής I και μειώνεται η κινητικότητά της. Στο κρίσιμο σημείο συγκέντρωσης ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου, όταν δηλαδή δεν υπάρχουν πλέον στροφές υπερέλικας, η μορφή I αποκτά την ελάχιστη κινητικότητά της. Αν αυξήσουμε ακόμα περισσότερο τη συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, δημιουργούνται θετικές στροφές υπερέλικας και η κινητικότητα της μορφής I αυξάνεται γρήγορα. Συγχρόνως, οι κινητικότητες των μορφών II και III μειώνονται με διαφορετικό ρυθμό η κάθε μία, πράγμα που είναι αποτέλεσμα της εξουδετέρωσης των φορτίων και της μεγαλύτερης "δυσκαμψίας" που αποκτά το DNA από τη δράση του βρωμιούχου αιθιδίου. Για τα περισσότερα δείγματα της μορφής I, η κρίσιμη συγκέντρωση ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου είναι από 0.1 έως 0.5 μg/ml. (Thorne, 1966),

δ. την τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται – σε χαμηλή τάση (volts) ρεύματος ο ρυθμός μετανάστευσης γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος της εφαρμοζόμενης τάσης, ενώ όσο αυξάνεται η τάση (αύξηση των volts), η κινητικότητα τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή για το κάθε τμήμα,

ε. την παρουσία χρωστικών – το βρωμιούχο αιθίδιο μειώνει την ηλεκτροφορητική ικανότητα των γραμμικών μορίων περίπου κατά 15%, λόγω του γεγονότος ότι παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο το μήκος τους και καθιστώντας τα πιο άκαμπτα,

ζ. τη σύσταση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Buffer) – απουσία ιόντων, η

ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη με αποτέλεσμα το DNA να κινείται με αργό ρυθμό, ενώ υψηλή ιοντική ισχύς μπορεί να οδηγήσει σε τήξη του πηκτώματος και αποδιάταξη του DNA λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που προκαλείται από την αυξημένη ηλεκτρική αγωγιμότητα.

Αγαρόζη

Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από διάφορα φύκη του είδους *Rhodophyceae* (*Geldium amansii*, *G. cartilagineum*) και το πήκτωμα που σχηματίζει δεν είναι συμπαγές αλλά περιλαμβάνει πόρους, το μέγεθος των οποίων είναι αντιστρόφως ανάλογο προς τη συγκέντρωση. Η ικανότητα της να δημιουργεί πηκτώματα οφείλεται στην ιδιότητα της να τήκεται σε θερμοκρασία βρασμού του νερού και να στερεοποιείται όταν η θερμοκρασία μειώνεται στους 40-42°C. Λόγω της μικρής μηχανικής αντοχής της αγαρόζης, τα πηκτώματα αγαρόζης ηλεκτροφορούνται σε οριζόντιες συσκευές.

Ρυθμιστικά διαλύματα (Buffer)

Ο ρόλος του ρυθμιστικού διαλύματος είναι να διατηρεί σταθερή την κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου, η οποία μετρείται σε volts / cm. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται περιέχουν Tris-οξικό, -βορικό ή -φωσφορικό σε συγκέντρωση 50-100 mM και EDTA με pH περίπου 8.0. Η προσθήκη του EDTA εξασφαλίζει τη δέσμευση των δισθενών κατιόντων ώστε να παρεμποδιστεί η δράση νουκλεασών. Συνήθως τα παρασκευάζουμε σε πενταπλάσια ή δεκαπλάσια συγκέντρωση (5X ή 10X) και τα διατηρούμε σε θερμοκρασία δωματίου.

Η ρυθμιστική ικανότητα του Tris-οξικού (TAE) είναι χαμηλή και γι αυτό προτιμάται να χρησιμοποιείται το Tris-φωσφορικό και το Tris-βορικό (TBE) που δίνουν εξίσου καλό διαχωρισμό κι έχουν υψηλή ρυθμιστική ικανότητα.

Βρωμιούχο αιθίδιο

Η πιο κοινή χρωστική που χρησιμοποιείται για την εμφάνιση των ζωνών του DNA σε πηκτώματα αγαρόζης είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική. Το μόριο του περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των

βάσεων DNA. Η UV ακτινοβολία, η οποία απορροφάται είτε από το DNA στα 260nm και μεταβιβάζεται στο βρωμιούχο αιθίδιο είτε από την ίδια τη χρωστική στα 302 nm και 366 nm, εκπέμπεται στα 590nm στην ερυθρο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος με αποτέλεσμα τα μόρια του DNA να φθορίζουν όταν εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία (Sharp et al., 1973). Η ένταση χρώσης είναι ανάλογη του μεγέθους του τμήματος DNA.

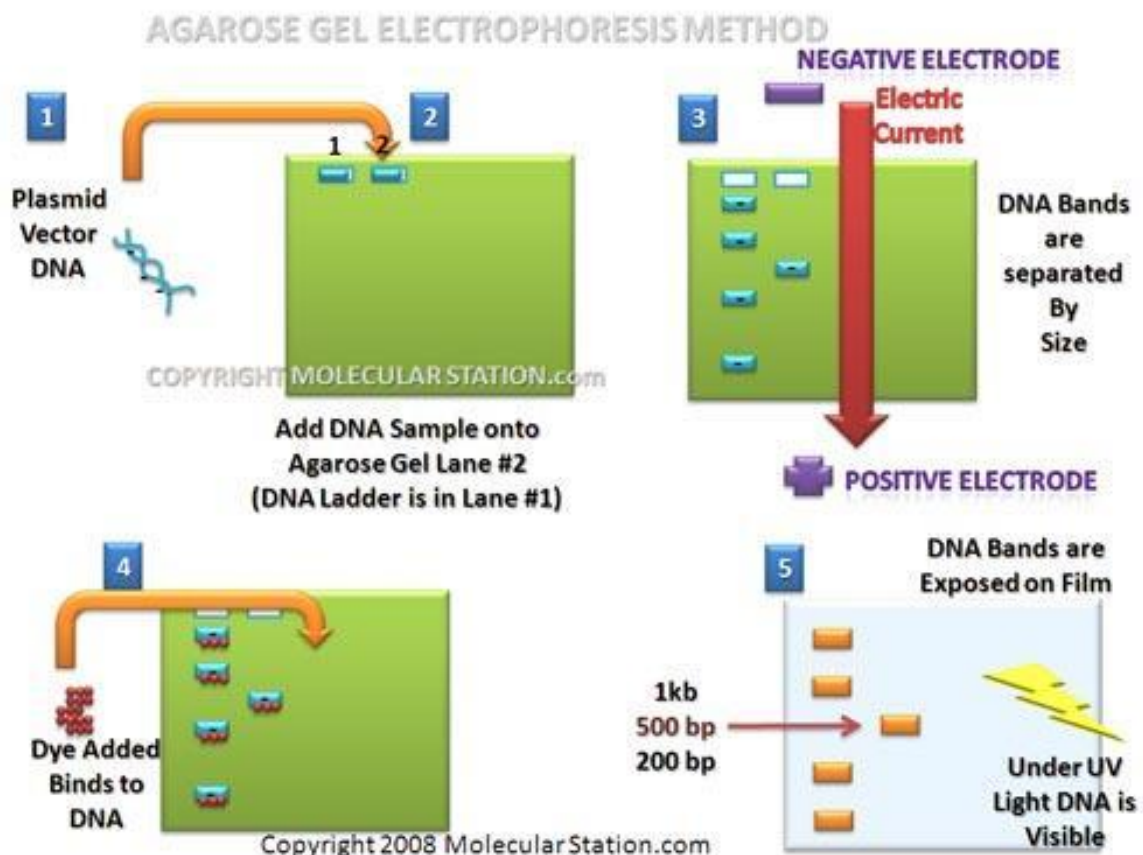
Χρωστική φόρτωσης (gel loading)

Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει κυανό της ξυλόλης, μπλε της βρωμοφαινόλης, γλυκερόλη και dH₂O. Το κυανό της ξυλόλης και το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι δύο χρωστικές ιχνηλασιμότητας χαμηλού μοριακού βάρους με αρνητικό φορτίο και επομένως κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA, επιτρέποντας τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Το μπλε της βρωμοφαινόλης μετακινείται περίπου όπως ένα τμήμα γραμμικού δίκλωνου DNA μεγέθους 300 bp, ενώ το κυανό της ξυλόλης όπως ένα τμήμα μεγέθους 4000 bp, σε

πήκτωμα αγαρόζης 1%. Επομένως, σε ένα πήκτωμα η πρώτη χρωστική που παρατηρείται είναι το κυανό της ξυλόλης και η δεύτερη – η οποία δεν πρέπει να φθάσει στο κατώτατο όριο του πήκτωματος όταν μελετάμε μικρού μεγέθους τμήματα DNA – είναι το μπλε της βρωμοφαινόλης. Η γλυκερόλη αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή τους στα “πηγαδάκια” του πήκτωματος.

Μάρτυρας

Ο μάρτυρας περιέχει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους και σύμφωνα με αυτόν και ανάλογα με τη θέση κάθε ζώνης υπολογίζεται το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA



Εικόνα 1: Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης

E. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

* Το κεφάλαιο E προέρχεται από την Άσκηση 1 του εργαστηριακού οδηγού της Μοριακής Βιολογίας I

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η τεχνική PCR είναι ένα σημαντικό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας και της Βιοχημείας με σπουδαιότητα για την έρευνα εφάμιλλη των ενζύμων περιορισμού και της υβριδοποίησης του DNA σε μεμβράνες.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* (χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών, όπως η *E. coli* ή οι ζύμες) επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Πρόκειται για μία εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδο, καθώς έχει δυνατότητα ανίχνευσης μιας αλληλουχίας από ένα μόνο μόριο DNA (Li et al., 1990).

Η PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του '80 (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986; Mullis & Faloona, 1987). Μετά την πρώτη ανακοίνωση, η τεχνική διαδόθηκε στην επιστημονική κοινότητα με την ταχύτητα *αλυσιδωτής αντίδρασης*. Καθώς όλο και περισσότεροι επιστήμονες ήρθαν σε επαφή με την PCR, εισήγαγαν μετατροπές, παραλλαγές και πληθώρα εφαρμογών και σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα η PCR έγινε μια τεχνική ρουτίνας για την έρευνα. Χαρακτηριστικό είναι ότι μέχρι το 1993, όπου ο K. Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την καθοριστική συμβολή του στην ανάπτυξη της τεχνικής, η PCR χρησιμοποιήθηκε σε περισσότερες από 7.000 επιστημονικές εργασίες. Σήμερα αντιμετωπίζεται σαν μια από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις της μοριακής βιολογίας και έχει αλλάξει με επαναστατικό τρόπο τη μελέτη του DNA.

Η τεχνική PCR λόγω της απλότητάς της χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα ερευνητικών εφαρμογών, όπως στον πολλαπλασιασμό μοναδικών γονιδίων μέσα από πολύπλοκες γονιδιωματικές αλληλουχίες, τη γρήγορη ταυτοποίηση και εύρεση

της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κλωνοποιημένου DNA κατευθείαν από αποικίες βακτηρίων ή πλάκες βακτηριοφάγων, τη γονιδιακή κλωνοποίηση, την *in vitro* κατευθυνόμενη μεταλλαξίγνεση, την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων. Ακόμη, εκτός των ερευνητικών εφαρμογών, πληθώρα διαγνωστικών εφαρμογών βασίζονται σε αυτή την τεχνική όπως: η αναγνώριση ιών και βακτηρίων (πχ, ανίχνευση του ιού του AIDS), η αναγνώριση διαφόρων παθογόνων σε τροφές και πόσιμο νερό, η ταυτοποίηση οικογενειακών σχέσεων αξιοποιώντας πολυμορφικές αλληλουχίες DNA, η αναγνώριση θυμάτων και ενόχων ακόμα και για εγκλήματα που διεπράχθησαν πριν από δεκαετίες ή εκατονταετίες, όπως και σε παλαιοντολογικές εξελικτικές μελέτες καθώς καθιστά δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών ακόμη και από ίχνη DNA που βρίσκονται σε απολιθώματα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA (γνωστού ή αγνώστου) με τη βοήθεια μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σχεδιασμένων σε γνωστές αλληλουχίες. Έτσι, ένα δείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα δύο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές, primers) και την ειδική DNA πολυμεράση. Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95°C για να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως ψύχεται στους 50-65°C για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72°C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές έως ότου συντεθεί αρκετή ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος.

ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΜΙΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR

Μία αντίδραση PCR πρέπει να περιέχει τα εξής συστατικά:

1. Μια ειδική DNA πολυμεράση, την Taq DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988) και επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης. Ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου σε

υψηλές θερμοκρασίες δίνεται από τον παρακάτω πίνακα:

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος ημιζωής
92.5	130
95.0	40
97.5	5-6

Η Taq πολυμεράση έχει μοριακό βάρος 94-kDa, παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού 75-80°C και ταχύτητα σύνθεσης 150 νουκλεοτίδια / μόριο ενζύμου το δευτερόλεπτο. Η Taq πολυμεράση δεν περιέχει 3' → 5' δράση εξωνουκλεάσης και έτσι στο τελικό προϊόν παραμένουν νουκλεοτίδια που έχουν εισαχθεί λανθασμένα. Επίσης, υψηλή συγκέντρωση ιόντων Mg⁺⁺ (>10 mM), νουκλεοτιδίων (>4-6 mM) ή/και μονοσθενών ιόντων Na⁺, K⁺ (>50 mM) αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για τη δράση της.

2. Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αποκαλούνται εκκινητές και καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί. Η συγκέντρωση των εκκινητών καθορίζεται συνήθως μεταξύ 0.4-0.6 μM ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν λανθασμένη έναρξη, ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων και δημιουργία διμερών (primer-dimer) που χρησιμοποιούνται επίσης ως DNA στόχος, ελαττώνοντας έτσι τη σύνθεση ειδικών προϊόντων. Τα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να είναι αντιπαράλληλου προσανατολισμού και καθένα συμπληρωματικό προς τη μία αλυσίδα του υπό μελέτη DNA. Όσον αφορά στο σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω:

- I. το μήκος τους να κυμαίνεται μεταξύ 18-24 νουκλεοτιδίων,
- II. η κατανομή των νουκλεοτιδίων να είναι τυχαία και η περιεκτικότητα σε G/C να είναι μεταξύ 40-60%. Επίσης πρέπει να αποφεύγονται περιοχές με πολυπουρίνες ή πολυπυριμιδίνες καθώς και επαναλήψεις νουκλεοτιδίων,
- III. να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους, ώστε να αποφεύγεται η χρησιμοποίησή τους ως υπόστρωμα και συνεπώς

η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων (primer-dimer),

- IV. να μην περιέχουν εσωτερικές παλινδρομες αλληλουχίες,
- V. να μην υπάρχουν επαναλήψεις 3 ή περισσότερων C ή G στο 3' άκρο, διότι μπορεί να χρησιμεύουν για λανθασμένη έναρξη σε περιοχές DNA που είναι πλούσιες σε G+C,
- VI. να παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές θερμοκρασίας τήξης T_m (melting temperature). Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται κατά προσέγγιση με την εξής σχέση: 2°C για κάθε A ή T και 4°C για κάθε G ή C [T_m= 2 x (A+T) + 4 x (G+C)]. Με αυτόν τον υπολογισμό είναι επιθυμητό η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών να βρίσκεται μεταξύ 50°C και 70°C.

Επίσης, ειδικοί εκκινητές μπορούν να σχεδιαστούν για διάφορες περιπτώσεις PCR, όπως με καθορισμένα νουκλεοτίδια στο 5' άκρο (που δεν παρουσιάζουν ομολογία με το υπόστρωμα DNA) και τα οποία χρησιμοποιούνται για την ενσωμάτωση αλληλουχιών, που αναγνωρίζονται από ένζυμα περιορισμού, στα άκρα του τελικού προϊόντος. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η κλωνοποίηση του προϊόντος (δείτε Άσκηση 3). Επιπρόσθετα νουκλεοτίδια στα άκρα εκκινητών χρησιμοποιούνται επίσης για την εισαγωγή ρυθμιστικών στοιχείων στην αλληλουχία ενός DNA, ή μιας τριπλέτας (ATG) για την έναρξη της μετάφρασης κ.α. Εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια που περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια από τη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA στόχου, χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία μεταλλάξεων.

3. Κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) σε συγκέντρωση 0.2 mM το καθένα, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα εισαγωγής λανθασμένου νουκλεοτιδίου. Η εισαγωγή λανθασμένων νουκλεοτιδίων είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του κάθε νουκλεοτιδίου στην αντίδραση. Έτσι, σε συγκέντρωση 1 mM για κάθε νουκλεοτίδιο η συχνότητα λάθους είναι περίπου 1.66 x 10⁻⁴ πολυμερισμένα νουκλεοτίδια ανά κύκλο, ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση (0.2 mM) το λάθος ελαττώνεται σημαντικά και γίνεται μικρότερο από 5 x

10^{-5} . Έλλειψη ισορροπίας στο μείγμα των dNTPs μειώνει επίσης την πιστότητα της Taq πολυμεράσης.

4. Κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος $MgCl_2$. Η παρουσία ιόντων Mg^{+2} είναι απαραίτητη για τη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg^{+2} σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση. Η συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων Mg^{+2} εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των ενώσεων που δεσμεύουν το ιόν μεταξύ των οποίων είναι τα dNTPs, το EDTA και φωσφορικά ιόντα. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις Mg^{+2} είναι 1.5-2.0 mM, ενώ υψηλή συγκέντρωση (>4 mM) αυξάνει τη συχνότητα του πολυμερισμού λάθους νουκλεοτιδίων αλλά και την ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων (Harris & Jones, 1997),.

5. Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) της Taq πολυμεράσης, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης, τα οποία παρέχονται από την παρουσία Tris-HCl και NaCl ή KCl, αντίστοιχα. Η αντίδραση χρειάζεται μονοθενή ιόντα K^+ ή Na^+ σε συγκέντρωση 25-50 mM, ενώ το Tris-HCl βρίσκεται σε συγκέντρωση 10-50 mM με pH μεταξύ 8.3 και 8.8 σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης, όπου οι θερμοκρασίες φθάνουν έως τους $94^{\circ}C$, το pH κυμαίνεται μεταξύ 6.8 και 7.8. Τέλος, στο ρυθμιστικό διάλυμα περιέχονται επίσης σταθεροποιητές ενζύμου, όπως ζελατίνη ή ορολευκωματίνη (bovine serum albumin-BSA) και μη ιονικά απορρυπαντικά (Tween 20 και Triton X-100).

6. Τον στόχο (μήτρα) DNA, η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του. Στις βέλτιστες συνθήκες, η τεχνική PCR μπορεί θεωρητικά να ενισχύσει την αλληλουχία στόχο από ένα μόνο αντίγραφο DNA. Παρόλα αυτά σε μία τυπική αντίδραση η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το μέγεθος του γονιδιώματος του υπό μελέτη οργανισμού και αντιστοιχεί σε αρκετές χιλιάδες αντίγραφα στόχου. Για παράδειγμα, περίπου 3×10^5 μοριακοί στόχοι μιας μοναδικής αλληλουχίας αντιστοιχούν σε ποσότητα 1 μg γονιδιωματικού DNA θηλαστικού (το απλοειδές

γονιδίωμα του ανθρώπου έχει βάρος 3 pg), 10 ng DNA ζυμομύκητα, 1 ng βακτηριακού DNA από *E. coli* και 1 pg πλασμιδιακού DNA. Συνήθως, η ποσότητα του DNA που χρειάζεται για την αντίδραση κυμαίνεται από 0.1 pg έως 1 ng όταν πρόκειται για πλασμιδιακό DNA, ενώ όταν ο στόχος είναι γονιδιωματικό DNA θηλαστικού η ποσότητα κυμαίνεται από 5 έως 100 ng. Εάν η ποσότητα του DNA είναι μεγάλη (>1000 ng), υπάρχει πιθανότητα να δημιουργηθούν προϊόντα που δεν αντιστοιχούν στον επιθυμητό στόχο DNA. Επίσης, το DNA πρέπει **α.** να μην είναι κατεστραμμένο (degraded) στην περιοχή του στόχου, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να ενισχυθεί αυτή η περιοχή και **β.** να είναι υψηλής καθαρότητας χωρίς φαινόλες, πολυσακχαρίτες, απορρυπαντικά, EDTA ή άλλα χημικά που μπορεί να έχουν ανασταλτική δράση

ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ

Κάθε κύκλος πολυμερισμού αποτελείται από τα εξής βήματα:

1. Την αποδιάταξη του DNA στόχου (μήτρα). Ολική αποδιάταξη του DNA στόχου πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία $94^{\circ}C$ για 30 δευτερόλεπτα. Σε περιπτώσεις όμως υποστρώματος DNA πλούσιου σε G+C απαιτείται υψηλότερη θερμοκρασία. Παρόλο που η υψηλή θερμοκρασία αποτελεί απαραίτητο βήμα για την αποδιάταξη, χρειάζεται προσοχή ώστε να μη διαρκεί περισσότερο του αναγκαίου γιατί τότε ελαττώνεται η ενεργότητα του ενζύμου.

2. Την υβριδοποίηση των ειδικών εκκινητών στον αποδιαταγμένο DNA στόχο. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση ρυθμίζεται περίπου $5^{\circ}C$ χαμηλότερα από το υπολογιζόμενο σημείο τήξης (T_m). Θερμοκρασίες μεταξύ $55^{\circ}C$ και $65^{\circ}C$ δίνουν συνήθως τα καλύτερα αποτελέσματα. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία της υβριδοποίησης, αυξάνεται η ειδικότητα του τελικού προϊόντος λόγω του ότι περιορίζεται η υβριδοποίηση των εκκινητών στις περιοχές του DNA με τη μέγιστη συμπληρωματικότητα.

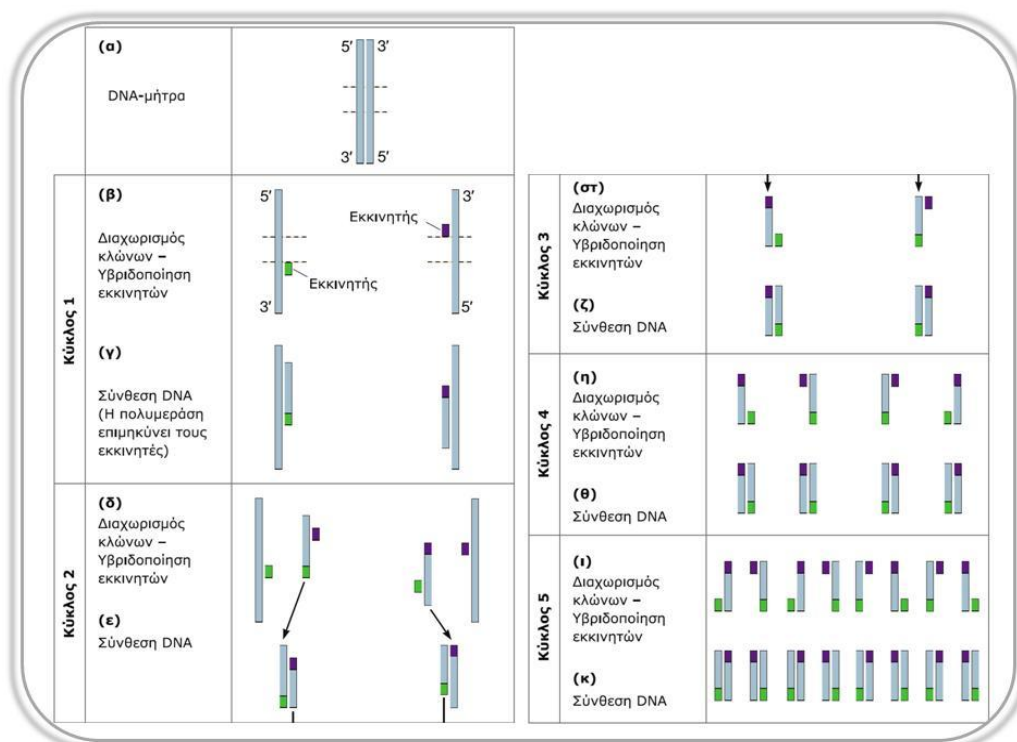
3. Τη σύνθεση (επιμήκυνση) από κάθε εκκινητή μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος για την επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C, στην οποία η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο ανάλογα με το pH, τη συγκέντρωση ιόντων, το ρυθμιστικό διάλυμα και το είδος του υποστρώματος DNA. Διάρκεια επιμήκυνσης 1 λεπτού στους 72°C είναι αρκετή για προϊόντα τελικού μήκους 2000 νουκλεοτιδίων. Διάρκεια επιμήκυνσης μεγαλύτερη του ενός λεπτού είναι χρήσιμη σε αρχικούς κύκλους πολυμερισμού αν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μικρή, ή στα τελικά στάδια όταν η συγκέντρωση του προϊόντος υπερτερεί της συγκέντρωσης του ενζύμου.

Ο πρώτος κύκλος οδηγεί στο σχηματισμό δύο νέων αλυσίδων απροσδιορίστου μήκους που, μαζί με τις πατρικές αλυσίδες, συμμετέχουν στους επόμενους κύκλους πολυμερισμού. Τέτοια προϊόντα συσσωρεύονται αριθμητικά σε κάθε επόμενο κύκλο. Αντίθετα, από το δεύτερο κύκλο και μετά συντίθενται και αλυσίδες με καθορισμένο μήκος (ίσο με την απόσταση ανάμεσα στα 5' άκρα των δύο εκκινητών)

οι οποίες συμμετέχουν ως μήτρα στους επόμενους κύκλους. Τα προϊόντα αυτά συσσωρεύονται εκθετικά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου τμήματος DNA. Με τον τρόπο αυτό μετά την ολοκλήρωση n κύκλων η αρχική αλληλουχία έχει πολλαπλασιαστεί 2^n φορές.

Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης εξαρτάται κυρίως από την αρχική συγκέντρωση του DNA στόχου. Ένα κοινό λάθος είναι η διεξαγωγή πολύ περισσότερων κύκλων από όσους χρειάζονται με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο αριθμός των μη ειδικών προϊόντων. Λιγότεροι κύκλοι βέβαια παράγουν μικρότερη ποσότητα ειδικού προϊόντος. Ο παρακάτω πίνακας δίνει μια αρχική οδηγία της συνάρτησης του αναγκαίου αριθμού κύκλων με τον αριθμό αρχικών μορίων DNA στόχου.

Αριθμός μορίων DNA στόχου	Αριθμός κύκλων PCR
3×10^5	25-30
15×10^4	30-35
1×10^3	35-40
50	40-45



Εικόνα 1: Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων DNA κατά την PCR

F

**ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ DNA ΜΕ
ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ**

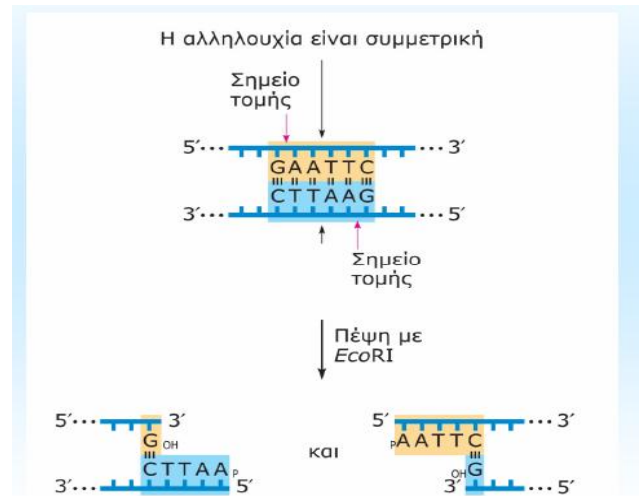
* Το κεφάλαιο F προέρχεται από την Άσκηση 7 του εργαστηριακού οδηγού της Μοριακής Βιολογίας I

Η ανάπτυξη της σύγχρονης Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής ξεκίνησε με την ανακάλυψη των ενζύμων περιορισμού. Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και τέμνουν κατά τρόπο καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο το δίκλωνο DNA. Λόγω του επαναλήψιμου τρόπου πέψης, τα ένζυμα αυτά επιτρέπουν α) τη χαρτογράφηση των αλληλουχιών DNA, β) την πέψη (τεμαχισμό) μιας αλληλουχίας DNA σε μικρά τμήματα τα οποία είναι δυνατόν να μελετηθούν χωριστά και γ) την επανασύνδεση των τμημάτων αυτών είτε για την επανασυγκρότηση της αρχικής αλληλουχίας είτε για τη δημιουργία νέων ανασυνδυασμένων αλληλουχιών.

Τα ένζυμα περιορισμού απομονώνονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια, στα οποία ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να παρέχουν προστασία έναντι της εισβολής βακτηριοφάγων. Τα ένζυμα αυτά πέπτουν το ξένο DNA, ενώ το DNA των βακτηρίων προστατεύεται λόγω της μεθυλίωσης που υφίσταται από τα ίδια τα ένζυμα περιορισμού ή από ειδικές μεθυλάσες που παράγονται σε συνδυασμό με τα ένζυμα περιορισμού. Τα ένζυμα περιορισμού διακρίνονται σε τρεις τύπους. Τα ένζυμα τύπου I αναγνωρίζουν την αλληλουχία και τέμνουν το DNA σε απόσταση 1000 έως 5000 νουκλεοτιδίων, τα ένζυμα τύπου II αναγνωρίζουν την αλληλουχία και τέμνουν το DNA εσωτερικά της αλληλουχίας αυτής, ενώ τα ένζυμα τύπου III αναγνωρίζουν την αλληλουχία και τέμνουν το DNA σε απόσταση 20 περίπου νουκλεοτιδίων. Στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται μόνο ένζυμα περιορισμού τύπου II.

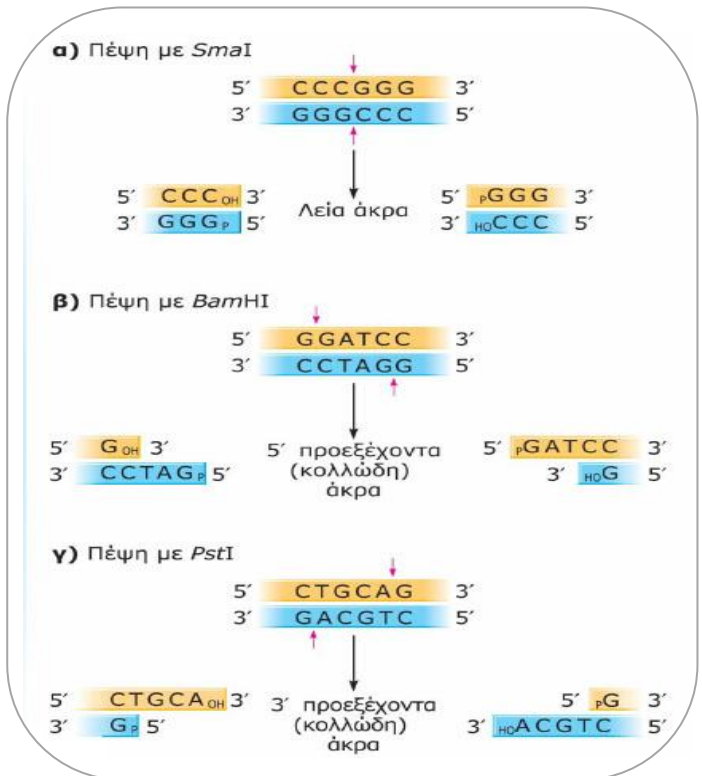
Η δράση τους εστιάζεται στην αναγνώριση ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της

περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Θέση περιορισμού συμμετρική ως προς τον άξονα που περνά από το μέσο της. Στην εικόνα φαίνεται η θέση αναγνώρισης της *EcoRI*. Η αλληλουχία είναι παλίνδρομη: είναι ίδια και στις δύο αλυσίδες του DNA όταν διαβάζεται στην ίδια κατεύθυνση (στο παράδειγμα αυτό είναι 5' GAATTC 3')

Παλίνδρομες ονομάζονται οι αλληλουχίες, οι οποίες είναι όμοιες στις δύο αλυσίδες του DNA, όταν διαβάζονται από το 5' προς το 3' άκρο. Με τον τρόπο αυτό, και ανάλογα με την αλληλουχία που αναγνωρίζουν, δημιουργούνται τμήματα DNA με τυφλά ή προεξέχοντα μονόκλωνα άκρα (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Παραδείγματα του τρόπου με τον οποίο τα ένζυμα περιορισμού πέπτουν το DNA. (α) Η *SmaI* δημιουργεί λεία (τυφλά) άκρα. (β) Η *BamHI* δημιουργεί προεξέχοντα 5' μονόκλωνα (κολλώδη) άκρα. (γ) Η *PstI* δημιουργεί προεξέχοντα 3' μονόκλωνα (κολλώδη) άκρα.

Τα περισσότερα ένζυμα περιορισμού αφήνουν 5' μονόκλινα άκρα ενώ υπάρχουν και άλλα που δημιουργούν 3' μονόκλινα άκρα ή άλλα που κόβουν ακριβώς στην ίδια θέση στο δίκλινο DNA δημιουργώντας τυφλά άκρα. Δεδομένου ότι το DNA αποτελείται από επαναλήψεις τεσσάρων διαφορετικών νουκλεοτιδίων (dAMP, dTMP, dGMP και dCMP), η πιθανότητα μια αλληλουχία DNA να παρουσιάζει θέσεις για ένζυμα περιορισμού που αναγνωρίζουν τετρανουκλεοτίδια είναι $(1/4)^4$, δηλαδή μια πιθανή θέση κάθε 256 νουκλεοτίδια κατά μέσον όρο, η πιθανότητα για ένζυμα που αναγνωρίζουν εξανουκλεοτίδια είναι $(1/4)^6$, δηλαδή μια πιθανή θέση κάθε 4096 νουκλεοτίδια κατά μέσον όρο, ενώ η πιθανότητα για ένζυμα που αναγνωρίζουν αλληλουχία 8 νουκλεοτιδίων είναι $(1/4)^8$, δηλαδή μία πιθανή θέση κάθε 65.476 νουκλεοτίδια κατά μέσον όρο (Εικόνα 3). Βέβαια, ο ακριβέστερος υπολογισμός του μέσου μεγέθους που παράγονται από τη δράση των

	Αριθμός bp στη θέση περιορισμού	
	περιορισμού	Συχνότητα εμφάνισης
Frequent cutters	4	$(1/4)^4 = 1$ ανά 256 bp
	5	$(1/4)^5 = 1$ ανά 1.024 bp
Rare cutters	6	$(1/4)^6 = 1$ ανά 4.096 bp
	8	$(1/4)^8 = 1$ ανά 65.476 bp
	n	$(1/4)^n$

Εικόνα 3: Συχνότητα εμφάνισης θέσεων περιορισμού σε DNA στην αλληλουχία του οποίου οι τέσσερις βάσεις αντιπροσωπεύονται εξίσου.

ενζύμων περιορισμού εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε GC του DNA στόχου και της αλληλουχίας αναγνώρισης του ενζύμου.

Χαρακτηριστικά ορισμένων ενζύμων περιορισμού		Οργανισμός από τον οποίο προέρχεται το ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης και θέση κοπής*
Όνομασία ενζύμου			
Ένζυμα με αλληλουχία αναγνώρισης 6 bp	<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↓G-5'
	<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigi</i>	↓AGATCT TCTAG↓A
	<i>Eco</i> RI	<i>E. coli</i> RY13	G↓AATTC CTTAA↓G
Ένζυμα με αλληλουχία αναγνώρισης 4 bp	<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegypticus</i>	G↓G↑CC CC↓GG
	<i>Hha</i> I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	G↓C↑G↑C C↓G↑C↑G
	<i>Hpa</i> II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	↓C↑C↑G↑C G↓G↑C↑C
	<i>Sau</i> 3A	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	↓G↑A↑T↑C C↑T↑A↑G↑↑
Ένζυμο με αλληλουχία αναγνώρισης 8 bp	<i>Not</i> I	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	G↓C↑G↑G↑C↑C↑G↑C C↑G↑C↑C↑G↑G↑C↑G
Ένζυμο με μη συμμετρική αλληλουχία αναγνώρισης	<i>Bst</i> XI	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	C↓C↓A↓N↓N↓N↓N↓N↓T↓G↓G G↓G↓T↓N↓N↓N↓N↓N↓A↓C↓C

*Σε αυτή τη στήλη παρουσιάζονται οι δύο αλυσίδες του DNA και οι θέσεις κοπής υποδεικνύονται με βέλη.
R = πουρίνη, Y = πυριμιδίνη, N = οποιαδήποτε βάση.

Η δράση του κάθε ενζύμου εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία επώασης και τη σύσταση του ρυθμιστικού του διαλύματος (Buffer). Τα περισσότερα ένζυμα δρουν συνήθως στους 37°C. Το ρυθμιστικό διάλυμα καθορίζει το pH και την ιοντική ισχύ του περιβάλλοντος, στο οποίο θα δράσει το ένζυμο. Το pH του διαλύματος διατηρείται σταθερό από την παρουσία Tris-HCl, ενώ η ιοντική ισχύς καθορίζεται κυρίως από ιόντα Mg^{+2} και Na^{+} που περιέχονται σε αυτό. Η ιοντική ισχύς του διαλύματος μπορεί να είναι υψηλή, μέση ή χαμηλή. Το ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να περιέχει επίσης σουλφιδρυλικούς παράγοντες όπως η β-μερκαπταιθανόλη και

διθειοθρεϊτόλη (DTT) (ισχυροί αναγωγικοί παράγοντες), οι οποίοι αποσκοπούν στην αναστολή της δράσης νουκλεασών που ενδεχομένως υπάρχουν καθώς επίσης και σταθεροποιητές ενζύμου, όπως η ορολευκωματίνη (bovine serum albumin-BSA) και μη ιοντικά απορρυπαντικά (Tween 20 και Triton X-100). Η ποσότητα του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί αποτελεί συνάρτηση της ενεργότητάς του και της ποσότητας και μεγέθους του προς κατάτμηση DNA.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aaij C., Borst P. (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* **269**: 192-200
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Ashburner M. (1989) *Drosophila. A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Rapp B.A. et al. (2002) GenBank *Nucleic Acids Res* **30**:17-20
- Bolton E.T., McCarthy B.J. (1962) A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **48**: 1390-1397
- Chomczynski P. (1992) Solubilization of formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Res* **20**: 3791-3792
- Church G.M., Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* **81**: 1991-1995
- Coleman G., Miller A. (1942) Electrodialysis of sugar borates. *Proc Iowa Acad Sci* **49**: 257-261
- Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13
- Harris S., Jones D.B. (1997) Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci* **54**: 166-173
- Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W. (1974) Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* **14**: 1235-1244
- Kramer J.A. (2001) OmigaTM: A PC-based sequence analysis tool. *Mol Biotech* **19**: 97-106
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245
- Li H., Cui X., Arnheim N. (1990) Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4580-4584
- Lichtenstein A.V., Moiseev V.L., Zaboikin M.M. (1990) A procedure for DNA and RNA transfer to membrane filters avoiding weight-induced flattening. *Anal Biochem* **191**: 187-191
- Mullis K.B., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G et al. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **51**: 263-273.
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350
- Olszewska E., Jones K. (1988) Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer. *Trends Genet* **4**: 92-94
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T. et al. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**: 3055-3063
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Stellwag E.J., Dahlberg A.E. (1980) Electrophoretic transfer of DNA, RNA and protein onto diazobenzoyloxymethyl (DBM) – paper. *Nucleic Acids Res* **8**: 299-317
- Thorne H.V. (1966) Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology* **29**: 234-239
- Trnovsky J. (1992) Semi-dry electroblotting of DNA and RNA from agarose and polyacrylamide gels. *Biotechniques* **13**: 800-804
- Wahl G.M., Stern M., Stark G.R. (1979) Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by

using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:
3683-3687

West R. (1987) The electrophoretic mobility of DNA in
agarose gel as a function of temperature. *Biopolymers*
26: 607-608

