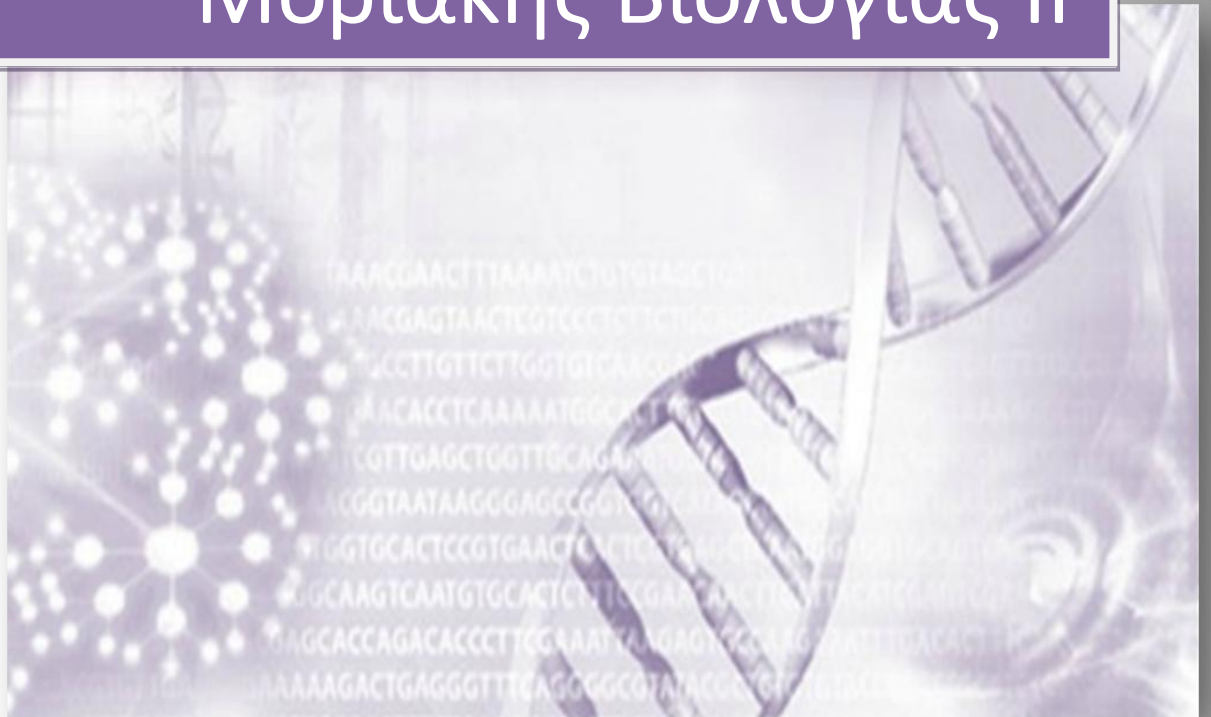


Εργαστηριακός οδηγός Μοριακής Βιολογίας II



**ΤΣΟΥΜΑΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ
ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΣΤΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

2014

Αναθεωρημένη έκδοση του εργαστηριακού οδηγού «ΦΥΛΛΑΔΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ II, Ε. Κακάνη, Α. Αυγουστίνος & Κ. Μαθιόπουλος, για τους φοιτητές του πέμπτου εξαμήνου του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας».

Περιεχόμενα	
ΑΣΚΗΣΗ 1	2
ΑΣΚΗΣΗ 2i	6
ΑΣΚΗΣΗ 2ii	9
ΑΣΚΗΣΗ 3	14
ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	17
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	23
ΑΣΚΗΣΕΙΣ	24

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

ΣΤΥΠΩΜΑ ΚΟΥΚΙΔΑΣ



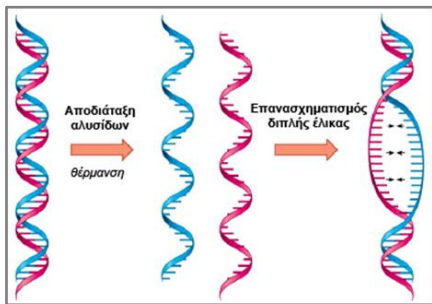
Η υβριδοποίηση κατά Southern αποτέλεσε για πολλές δεκαετίες μια δυναμική τεχνική της Μοριακής Βιολογίας. Χάρη στην εφαρμογή της μεθόδου αυτής επιτεύχθηκε η δημιουργία λεπτομερών χαρτών περιορισμού σε πολύπλοκα γονιδιώματα, επιτρέποντας την ανίχνευση συγκεκριμένων τμημάτων DNA μεταξύ εκατομμυρίων άλλων που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της πέψης με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκε ο καθορισμός της διευθέτησης των γονιδίων κατά μήκος των χρωμοσωμάτων και ο προσδιορισμός των γονιδιακών συστοιχιών. Η χρησιμότητα της μεθόδου επιβεβαιώθηκε και την περίπτωση εντοπισμού ομόλογων γονιδίων μεταξύ διαφορετικών οργανισμών και της μελέτης της εξελικτικής συντήρησης των γονιδίων αυτών. Παραλλαγή της μεθόδου με δυνατότητα ημι-ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων αποτελεί το στύπωμα κουκίδας. Στην αρχή της τεχνικής αυτής βασίστηκε η ανάπτυξη του συστήματος των μικροσυστοιχιών.

ΑΣΚΗΣΗ 1

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



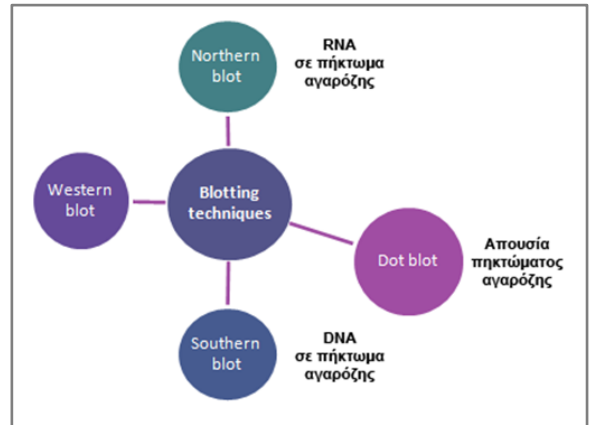
Το δίκλωνο DNA μπορεί να αποδιαταχθεί σε μονόκλωνες αλυσίδες αν διασπαστούν οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις συμπληρωματικές αλυσίδες. Ο επανασηματισμός της δίκλωνης έλικας μεταξύ δύο μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων μπορεί να επιτευχθεί *in vitro*. Στην ικανότητα αυτή της ανασυγκρότησης δίκλωνων μορίων νουκλεϊνικών οξέων, φαινόμενο που ονομάζεται **υβριδοποίηση**, βασίζεται ο εντοπισμός συγκεκριμένων τμημάτων DNA και RNA μορίων.



Εικόνα 1-1 Φαινόμενο υβριδοποίησης μονόκλωνων αλυσίδων DNA

Η υβριδοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υδατικό διάλυμα ή μετά από μεταφορά του DNA σε σταθερό υπόστρωμα μεμβράνης. Στη συνέχεια τα νουκλεϊνικά οξέα που θα σταθεροποιηθούν στη μεμβράνη μπορούν να ταυτοποιηθούν με τεχνικές στυπώματος (blotting techniques) χρησιμοποιώντας έναν σημασμένο ανιχνευτή. Το 1975 περιγράφηκε για πρώτη φορά η τεχνική ανίχνευσης αλληλουχιών μετά από διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, γνωστή πλέον ως υβριδοποίηση κατά Southern (ή ανάλυση στυπώματος κατά Southern, **Southern blotting**). Η μέθοδος τροποποιήθηκε περαιτέρω για την ανίχνευση συγκεκριμένων τμημάτων RNA (Northern blotting) αλλά και πρωτεϊνών (Western blotting). Επιπλέον, μόρια νουκλεϊνικών οξέων είναι δυνατόν να προσδεθούν σε μεμβράνη χωρίς να έχει προηγηθεί

ηλεκτροφόρηση, διαδικασία που αποκαλείται στύπωμα κουκίδας (**dot blot**).



Εικόνα 1-2 Μέθοδοι ανάλυσης στυπώματων

Η διαδικασία υβριδοποίησης κατά Southern εμπερικλείει γενικά τις εξής φάσεις:

- 1 • Πέψη του DNA
- 2 • Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης
- 3 • Μεταφορά του DNA σε νάυλον μεμβράνη & σταθεροποίησή του
- 4 • Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή
- 5 • Ανίχνευση σήματος



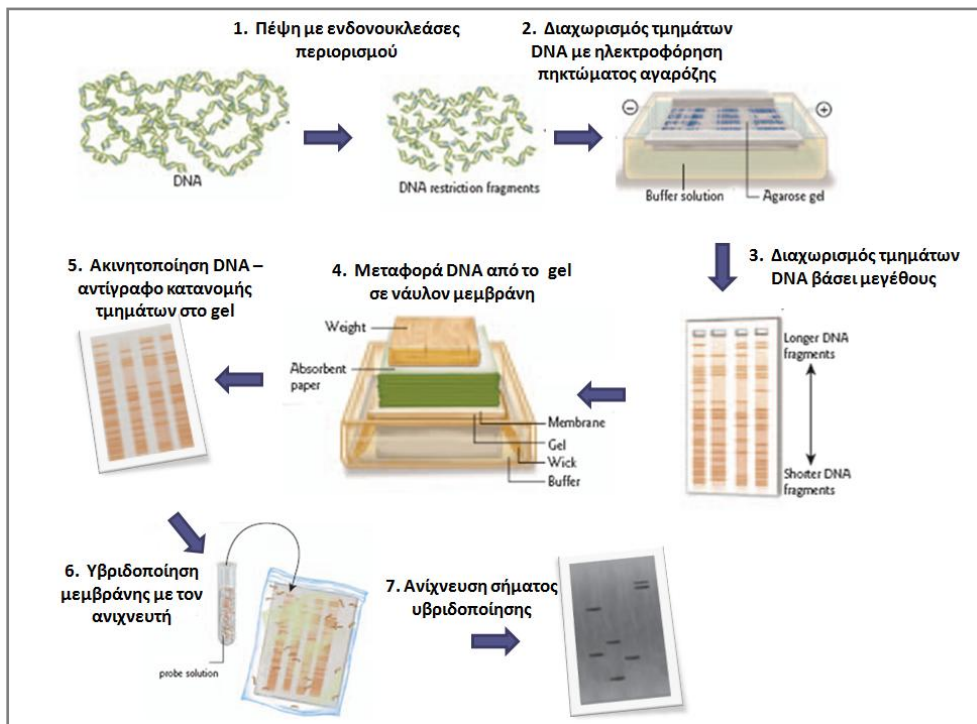
Τα πρώτα στάδια κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δημιουργίας στυπώματος νουκλεϊνικών οξέων αφορούν την απομόνωση των επιθυμητών μορίων και την προετοιμασία τους για την περαιτέρω ανάλυση. Για παράδειγμα, πριν την ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης το DNA πέπτεται με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Στην περίπτωση ανάλυσης μορίων RNA ή μονόκλωνων DNA, το πήκτωμα πρέπει να εξασφαλίζει συνθήκες

αποδιάταξης ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες σχηματισμού δευτεροταγών δομών.

Προαιρετικά, μετά την ηλεκτροφόρηση μπορεί να ακολουθήσει ένα στάδιο αποπουρίνωσης (depurination) ιδιαίτερα αν πρόκειται να αναλυθούν μεγάλου μεγέθους τμήματα DNA. Κατά την αποπουρίνωση το πήκτωμα επώαζεται σε αραιό διάλυμα HCl, ώστε κατά την κατεργασία του σε αυτές τις όξινες συνθήκες να απομακρυνθούν

τυχαίες βάσεις πουρινών και να δημιουργηθούν τυχαίες θραύσεις στο DNA, διευκολύνοντας έτσι τη μεταφορά του στη μεμβράνη.

Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται μετά από κατεργασία του πηκτώματος σε διάλυμα NaOH. Ακολούθως οι αλκαλικές συνθήκες εξουδετερώνονται μετά από επώαση σε κατάλληλο διάλυμα και το αποδιαταγμένο πλέον DNA μπορεί να μεταφερθεί αποτελεσματικά σε μεμβράνη.



Εικόνα 1-3 Αναλυτική πορεία διαδικασίας υβριδοποίησης κατά Southern

Μεταφορά σε νάυλον μεμβράνη

Κατά τη διαδικασία αυτή ουσιαστικά αναφερόμαστε στη **μεταφορά και ακινητοποίηση** του αποδιαταγμένου μονόκλωνου DNA από το πήκτωμα αгарόζης σε κατάλληλο στερεό υπόστρωμα (μεμβράνη) που τοποθετείται στην επιφάνειά του. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται στη μεμβράνη ένα αντίγραφο της κατανομής που εμφάνιζαν τα μόρια του DNA στο πήκτωμα. Τέσσερις μέθοδοι έχουν περιγραφεί για τη μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων σε υποστρώματα μεμβρανών. Η αρχική προσέγγιση που εφάρμοσε ο Southern βασίζεται στην **τριχοειδή μεταφορά** και αποτελεί την πλέον εύχρηστη μέθοδο, με

μειονέκτημα ωστόσο τη μεγάλη χρονική διάρκεια που απαιτείται για την ολοκλήρωσή της. Εναλλακτικά μπορεί να πραγματοποιηθεί σε κατάλληλη συσκευή είτε ηλεκτροφορητική μεταφορά (χωρίς ωστόσο να χρησιμοποιείται ευρέως), είτε μεταφορά με χρήση πίεσης ή κενού. Η τελευταία είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη λόγω της σύντομης διάρκειας μεταφοράς.

Σχετικά με τους διαθέσιμους τύπους υποστρωμάτων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, νάυλον ουδέτερη μεμβράνη και νάυλον θετικά φορτισμένη μεμβράνη. Οι νάυλον μεμβράνες είναι πιο ανθεκτικές συγκριτικά με εκείνες της νιτροκυτταρίνης και

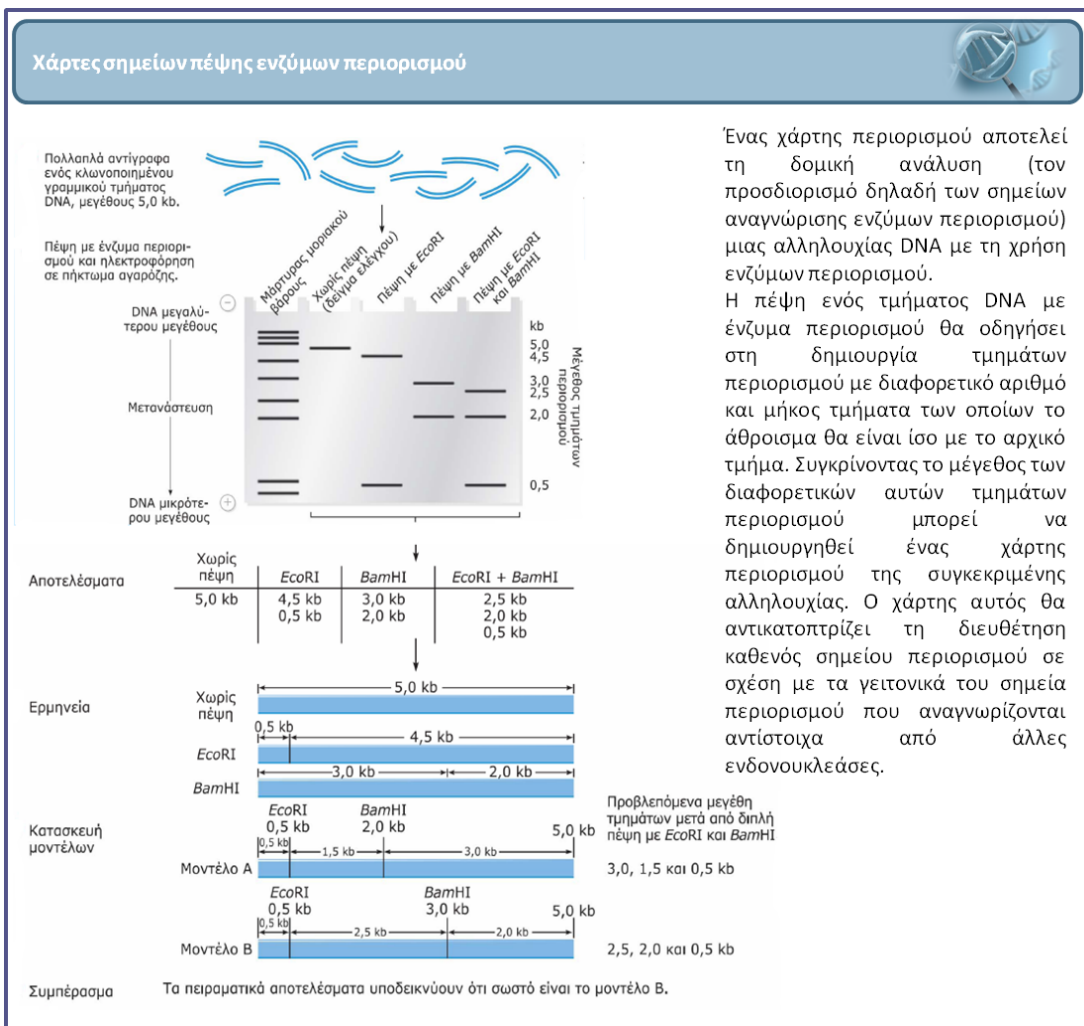
μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν έως και 10 φορές. Επίσης η ειδική κατηγορία των θετικά φορτισμένων μεμβρανών, εξασφαλίζουν την αποτελεσματικότερη μεταφορά του αρνητικά φορτισμένου DNA λόγω των ιονικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Ο ρυθμός μεταφοράς του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογος με μέγεθος των τμημάτων DNA, το πάχος του πηκτώματος και τη συγκέντρωση της αγαρόζης του πηκτώματος.

Με τον όρο **ακινητοποίηση** αναφερόμαστε στη σταθεροποίηση των μονόκλωνων πλέον νουκλεϊνικών οξέων στη μεμβράνη μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, ώστε να αποτραπεί η απώλεια των μορίων-στόχων κατά τα επόμενα στάδια της διαδικασίας υβριδοποίησης. Η ακινητοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με έκθεση σε UV ακτινοβολία συγκεκριμένης έντασης είτε με ξήρανση σε υψηλή θερμοκρασία (80°C). Τα ακινητοποιημένα μονόκλινα νουκλεϊνικά οξέα στη συνέχεια θα αποτελέσουν τους “στόχους” σε

πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση των κατάλληλων κατά περίπτωση ανιχνευτών, για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών.



Στην παρούσα άσκηση θα εφαρμοστεί η μέθοδος της τριχοειδούς μεταφοράς. Με κατάλληλους χειρισμούς δημιουργείται ροή ενός ρυθμιστικού διαλύματος (διάλυμα μεταφοράς) με κατεύθυνση από μια υψηλού υδατικού δυναμικού περιοχή προς μια χαμηλού δυναμικού περιοχή. Λόγω τριχοειδών φαινομένων, κατά την πορεία του αυτή το διάλυμα μεταφοράς κινείται μέσα στο πήκτωμα και τη μεμβράνη που βρίσκεται στην επιφάνειά του, συμπαρασύροντας παράλληλα και το μονόκλωνο DNA, το οποίο δεσμεύεται στη θετικά φορτισμένη νάυλον μεμβράνη. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς για τη σταθεροποίηση των νουκλεϊνικών οξέων θα ακολουθήσει ξήρανση σε υψηλή θερμοκρασία.



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 διευθέτηση καθενός σημείου περιορισμού σε σχέση με τα γειτονικά του σημεία περιορισμού που αναγνωρίζονται αντίστοιχα από άλλες ενδονουκλεάσες.

Σκοπός

Η παρούσα άσκηση περιλαμβάνει την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και τη μεταφορά τους σε νάυλον μεμβράνη, ώστε να ακολουθήσει υβριδοποίηση με κατάλληλο ανιχνευτή. Πριν τη μεταφορά στη μεμβράνη, το πήκτωμα θα φωτογραφηθεί, ώστε να μπορεί να είναι εφικτή η ταυτοποίηση των τμημάτων που θα υβριδοποιηθούν βάσει του σήματος της υβριδοποίησης στη μεμβράνη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**Υλικά**

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

**Μεθοδολογία****Χρόνος**

- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αгарόζης 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.
- Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο και επωάζεται σε διάλυμα αποδιάταξης σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. 15 min
- Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 2.
- Προστίθεται διάλυμα εξουδετέρωσης και το πήκτωμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. 20 min
- Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
- 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. 5 min
- 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.
- 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.
- Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς του DNA, 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. 16-18 hours
- Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί το DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί. 2 hours



Ο χειρισμός των μεμβρανών πρέπει να γίνεται με γάντια και με ειδικές λαβίδες τύπου Millipore με πεπλατυσμένα άκρα.

ΑΣΚΗΣΗ 2i

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN:

Υβριδοποίηση ανιχνευτή

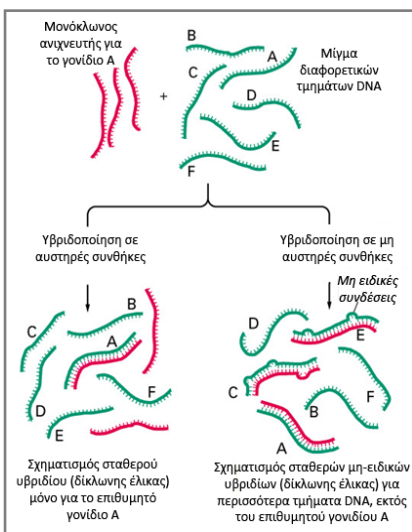


Εφόσον έχει μεταφερθεί το DNA στη μεμβράνη, ακολουθεί η διαδικασία της υβριδοποίησης με δυο διακριτά στάδια.

Αρχικά, λαμβάνει χώρα το **στάδιο της προϋβριδοποίησης** με σκοπό να αποκλειστεί η υπόλοιπη ελεύθερη επιφάνεια της μεμβράνης (όπου δηλαδή δεν έχει μεταφερθεί DNA από το πήκτωμα) ώστε να μην υπάρχουν διαθέσιμες μη-ειδικές θέσεις δέσμευσης του ανιχνευτή. Στο στάδιο αυτό η μεμβράνη επώάζεται σε διάλυμα προϋβριδοποίησης, του οποίου η σύσταση εξασφαλίζει την παρεμπόδιση της μη-ειδικής σύνδεσης του ανιχνευτή. Συγκεκριμένα, αποτελείται από i) μη-ειδικό αποδιαταγμένο DNA σπέρματος σολωμού (ssDNA, salmon sperm DNA), ii) το απορρυπαντικό SDS και iii) το αντιδραστήριο Denhardt's (Denhardt's reagent). Το τελευταίο περιέχει ως παράγοντες παρεμπόδισης μεγαλομοριακά πολυμερή, όπως η φικόλη (ficoll) και το PVP (Polyvinylpyrrolidone), καθώς και τη μη ειδική πρωτεΐνη BSA (Bovine Serum Albumin).

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται η **υβριδοποίηση**, οπότε και η μεμβράνη επώάζεται με τον κατάλληλο μονόκλωνο σημασμένο ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής είναι συμπληρωματικός προς τις αλληλουχίες που αναζητάμε, με αποτέλεσμα να υβριδοποιείται με τα μόρια-στόχους του DNA που έχουν ακινητοποιηθεί στη μεμβράνη. Διακρίνονται δύο τύποι ανιχνευτών, οι ομόλογοι και οι ετερόλογοι. Ομόλογος χαρακτηρίζεται εκείνος ο ανιχνευτής που εμφανίζει υψηλή ομολογία (συμπληρωματικότητα) με την αλληλουχία-στόχο και συνήθως προέρχεται από τον ίδιο οργανισμό. Αντίθετα ετερόλογος είναι ο ανιχνευτής που παρουσιάζει υψηλή μεν ομοιότητα με την αλληλουχία-στόχο, αλλά δεν είναι συμπληρωματικός της 100%. Στην περίπτωση αυτή συμπεριλαμβάνονται ανιχνευτές που απομονώνονται από διαφορετικούς, αλλά ωστόσο συγγενικούς οργανισμούς.

Κατά τη διάρκεια της υβριδοποίησης επιτυγχάνεται ο σχηματισμός των υβριδίων μεταξύ



- Θερμοκρασία**
 - Η θέρμανση του DNA αποσταθεροποιεί τους δεσμούς υδρογόνου και συνεπώς αύξηση της θερμοκρασίας της υβριδοποίησης καθιστά πιο δύσκολη τη δέσμευση του ανιχνευτή στο τμήμα-στόχο, απαιτώντας έτσι υψηλό βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ τους.
- Ιοντική ισχύς**
 - Κατά την υβριδοποίηση μεταξύ τμημάτων DNA δημιουργούνται ηλεκτροστατικές απωθήσεις εξαιτίας του αρνητικού φορτίου των φωσφορικών ομάδων. Παρουσία μονοσθενών κατιόντων εξουδετερώνονται αυτού του είδους οι απωθήσεις και η προσθήκη αλάτων (Na⁺) επάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ ανιχνευτή και DNA-στόχου.
- Μέγεθος & ομολογία ανιχνευτή**
 - Το μέγεθος του ανιχνευτή και η ομολογία του με την επιθυμητή αλληλουχία καθορίζουν το συνολικό βαθμό των σχηματιζόμενων υδρογονικών δεσμών του υβριδίου. Καθοριστικές αρνητικές συνέπειες στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου μπορεί να έχει η χρήση μικρού μήκους ανιχνευτών.
- % GC**
 - Η σταθερότητα του υβριδίου επηρεάζεται από το ποσοστό των βάσεων GC, εφόσον τα ζεύγη των συγκεκριμένων βάσεων σχηματίζουν 3 δεσμούς υδρογόνου σε αντίθεση με τα ζεύγη AT (2 δεσμοί H).

των νουκλεοτιδικών αλυσίδων του ανιχνευτή και του DNA-στόχου. Το ποσοστό σχηματισμού αυτών των υβριδίων αλλά και η σταθερότητα των υδρογονικών δεσμών μεταξύ των δύο αλυσίδων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, οι οποίοι καθορίζουν τελικά τις αυστηρές ή μη συνθήκες διεξαγωγής της υβριδοποίησης (Εικ. 2-2). Υπό βέλτιστες συνθήκες, η ευαισθησία της μεθόδου είναι ιδιαίτερα υψηλή, επιτρέποντας την ανίχνευση μορίων DNA πολύ μικρής συγκέντρωσης της τάξης του femto (~100 fg) όταν χρησιμοποιείται βιοτυνιλιωμένος ανιχνευτής.

Η αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (Tm) της συγκεκριμένης αλληλουχίας, δηλαδή τη θερμοκρασία εκείνη στην οποία το 50% μιας αλληλουχίας βρίσκεται σε

μονόκλωνη μορφή σε αντίθεση με το υπόλοιπο ποσοστό που έχει σχηματίσει δίκλωνη έλικα. Το Tm είναι χαρακτηριστικό της σταθερότητας κάθε δίκλωνου DNA μορίου και καθορίζεται από τους παράγοντες που επηρεάζουν την υβριδοποίηση του DNA (την αναλογία των βάσεων GC, τη συγκέντρωση άλατος και το μέγεθος του ανιχνευτή) και συνδέονται μεταξύ τους σύμφωνα 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 του υβριδίου. Η άριστη θερμοκρασία υβριδοποίησης στην περίπτωση DNA:DNA υβριδοποίησης είναι 25°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία Tm (θερμοκρασία τήξης) του υβριδίου.

Σήμανση του ανιχνευτή

- Τρεις είναι οι κύριες κατηγορίες ανιχνευτών: κλωνοποιημένα τμήματα γονιδίων, προϊόντα PCR ενίσχυσης και συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια.
- Και στις τρεις περιπτώσεις ενσωματώνονται στον DNA ή RNA ανιχνευτή δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) ή ριβονουκλεοτιδίων (NTPs) αντίστοιχα, συζευγμένα με μόρια σήμανσης ραδιενεργά (³²P, ³⁵S, ³H) ή μη ραδιενεργά [βιοτίνη (Bio), διγοξιγενίνη (DIG)].
- Κατά τη διαδικασία της σήμανσης πραγματοποιείται η προσθήκη των σημασμένων νουκλεοτιδίων είτε κατά την παραγωγή των ανιχνευτών [μέθοδος τυχαίων εκκινητών (A), PCR σήμανση (B)], είτε αφού ολοκληρωθεί η παραγωγή τους (σήμανση στο 5' ή 3' άκρο του ανιχνευτή).

A. Σήμανση με τυχαίους εκκινητές

Σήμανση με τυχαίους εκκινητές

- ✓ Αρχικά αποδιατάσσεται η αλληλουχία που πρόκειται να σημανθεί με βρασμό στους 100°C το δίκλωνο τμήμα.
- ✓ Στη συνέχεια κάθε αλυσίδα αναδιατάσσεται βαθμιαία στους 37°C με τη βοήθεια τυχαίων εκκινητών (random primers) & αναμιγνύεται με τυχαία ολιγονουκλεοτίδια (εξαμερή ή δεκαμερή), την Klebow υπομονάδα της DNA πολυμεράσης και δεοξυνουκλεοτίδια, παρουσία αλάτων και ρυθμιστικού διαλύματος που ευνοούν τη λειτουργία της πολυμεράσης.
- ✓ Στις συνθήκες αυτές, τα ολιγονουκλεοτίδια λειτουργούν ως εκκινητές 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 μόριο σήμανσης, τότε και η νέα αλυσίδα που θα δημιουργηθεί θα είναι σημασμένη.

⚠ Η μέθοδος βασίζεται στην πολυμεριστική δράση του ενζυμικού κλάσματος Klebow της DNA πολυμεράσης I (Klebow fragment - μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης I), το οποίο δεν έχει την 5' → 3' εξωνουκλεοτική δράση του ολοενζύμου, ενώ διατηρεί τη δράση της 5' → 3' πολυμεράσης και της 3' → 5' εξωνουκλεάσης.

B. PCR σήμανση

Σκοπός

Σκοπός της άσκησης είναι η υβριδοποίηση του πλασμιδιακού DNA από τις αντιδράσεις πέψεις που μεταφέραμε σε μεμβράνη στη προηγούμενη άσκηση (Άσκηση 1) με ανιχνευτή περιοχή του γονιδιακού τόπου (από όπου απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν τα τμήματα αυτά) που έχει ήδη σημανθεί με 11-bio-dUTP με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών (random priming). Οι ομόλογοι ανιχνευτές (PROBE A & PROBE B) υβριδοποιούνται στα ακραία τμήματα δύο διαδοχικών τμημάτων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι δεκανουκλεοτίδια.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**Υλικά**

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

**Μεθοδολογία****Χρόνος**➤ **Προϋβριδοποίηση**

- | | | |
|---|--|---------|
| 1 | Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα υβριδοποίησης, ο οποίος περιέχει ποσότητα διαλύματος υβριδοποίησης ανάλογα με το εμβαδό της.
<input checked="" type="checkbox"/> Εμβαδό x 0.2ml = ml διαλύματος υβριδοποίησης. | |
| 2 | Αποδιάταξη με θέρμανση στους 100°C ποσότητας DNA από σπέρμα σολομού (ssDNA) και προσθήκη του στο διάλυμα υβριδοποίησης (σε συγκέντρωση 100 μg/ml διαλύματος υβριδοποίησης). | 10 min |
| 3 | Ο σωλήνας τοποθετείται σε θάλαμο υβριδοποίησης και επωάζεται περιστρεφόμενος στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή. | 2 hours |

➤ **Υβριδοποίηση**

- | | | |
|---|---|-------------|
| 4 | Το διάλυμα προϋβριδοποίησης αποχύνεται και προστίθεται νέο διάλυμα προϋβριδοποίησης (10 ml/100 cm ²) και ο ανιχνευτής (100-200 ng/ml διαλύματος), ο οποίος έχει θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί. | 20 min |
| 5 | Ο σωλήνας μεταφέρεται σε θάλαμο υβριδοποίησης και η διαδικασία της υβριδοποίησης πραγματοποιείται στην ίδια θερμοκρασία με την προϋβριδοποίηση. | 16-18 hours |

ΑΣΚΗΣΗ 2ii

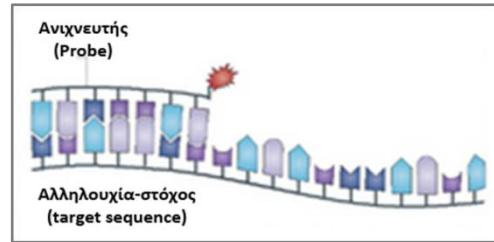
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

Υβριδοποίηση του ανιχνευτή

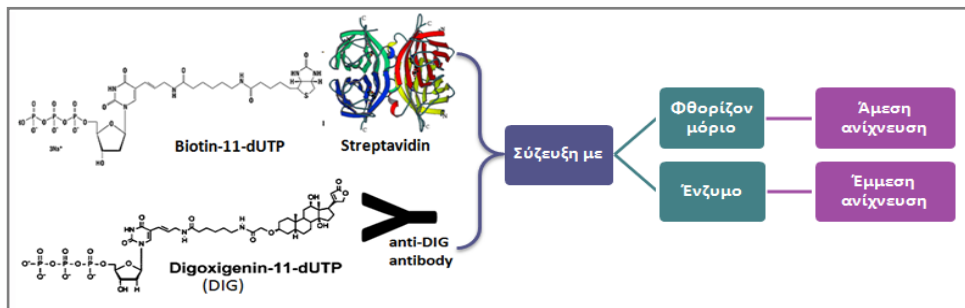


Αφού ολοκληρωθεί η υβριδοποίηση, η περίσσεια του ανιχνευτή που δεν υβριδοποιήθηκε απομακρύνεται και ακολουθεί η **διαδικασία εμφάνισης σήματος**, δηλαδή του εντοπισμού των θέσεων δέσμευσης του ανιχνευτή. Ανάλογα με τη σήμανση του ανιχνευτή επιλέγεται και το κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης. Στην περίπτωση των μη ραδιοεργών ανιχνευτών, η ανίχνευση μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση ειδικού αντισώματος προς το μόριο σήμανσης είτε άμεσα αν αυτό είναι συζευγμένο με φθορίζουσα ουσία (ανοσοφθορίζουσα μέθοδος), είτε έμμεσα αν το αντίσωμα είναι συζευγμένο με ένζυμο που θα καταλύσει ακολούθως μια χρωμογόνο αντίδραση (ανοσοχημική ενζυμική μέθοδος). Για τους βιοτυνιλιωμένους ανιχνευτές, ακολουθείται η ανοσοχημική μέθοδος η οποία βασίζεται στην υψηλή συγγένεια (δηλ. την ικανότητα ισχυρής σύνδεσης) της βιοτίνης με το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης. Το συζευγμένο στην στρεπταβιδίνη ένζυμο αλκαλική φωσφατάση καταλύει μία χρωμογόνο αντίδραση παρουσία του

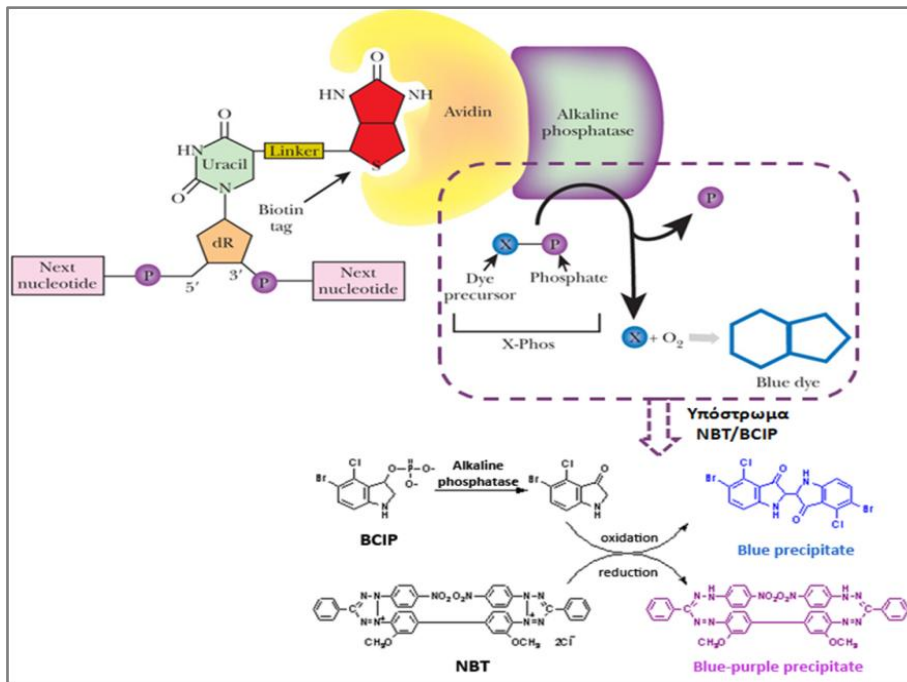


Εικόνα 2ii-1 Ανιχνευτής υβριδοποιημένος στην αλληλουχία-στόχο.

υποστρώματος BCIP (X-phosphate: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt) και του NBT. Συγκεκριμένα η αλκαλική φωσφατάση καταλύει την αποφωσφορυλίωση του BCIP, το οποίο οξειδώνεται σχηματίζοντας ένα διμερές (5-bromo-4-που αντιδρά αυθόρμητα με το O₂ δημιουργώντας τελικά ένα αδιάλυτο ίζημα ερυθροκυανής χρώσης. Παράλληλα, το επίσης χρωμογόνο NBT ανάγεται λειτουργώντας ως δέκτης ηλεκτρονίων αντί του O₂, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ιζήματος. Το ίζημα αυτό αποτελεί το σήμα της υβριδοποίησης και η έντασή του είναι ανάλογη της δραστηριότητας του ανιχνευτή και αντιστρόφως ανάλογη του μήκους.



Εικόνα 2ii-2 Σύστημα ενζυμικής ανίχνευσης σήματος βιοτυνιλιωμένων ανιχνευτών



Εικόνα 2ii-3 Σύστημα ανίχνευσης σήματος μη ραδιενεργών ανιχνευτών



Η διαδικασία συνίσταται σε τρία διακριτά στάδια όπως περιγράφονται στα βήματα του πειραματικού μέρους:

- 1-5 • Απομάκρυνση περίσσειας ανιχνευτή με διαδοχικές πλύσεις
- 7-9 • Πρόσδεση συμπλόκου στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης
- 10-13 • Ανίχνευση σήματος

Αρχικά απομακρύνεται η περίσσεια 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. Αυτό επιτυγχάνεται με διαδοχικές πλύσεις της

μεμβράνης σε διαλύματα που περιέχουν άλατα (SSC) σε προοδευτικά μειούμενες συγκεντρώσεις και την κατάλληλη ποσότητα του απορρυπαντικού SDS. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η πρόσδεση της στρεπταβιδίνης, η οποία προστίθεται σε διάλυμα που περιέχει αποβουτυρωμένο γάλα. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος λειτουργούν παρεμποδιστικά, ώστε να μειωθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του αντισώματος και με τον τρόπο αυτό να εξασφαλιστεί η αποκλειστική πρόσδεσή του με τη βιοτίνη. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος, σε περιβάλλον που δεν εκτίθεται σε φως.

Σκοπός

Η παρούσα άσκηση περιλαμβάνει την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και τη μεταφορά τους σε νάυλον μεμβράνη, ώστε να ακολουθήσει υβριδοποίηση με κατάλληλο ανιχνευτή. Πριν τη μεταφορά στη μεμβράνη, το πήκτωμα θα φωτογραφηθεί, ώστε να μπορεί να είναι εφικτή η ταυτοποίηση των τμημάτων που θα υβριδοποιηθούν βάσει του σήματος της υβριδοποίησης στη μεμβράνη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**Υλικά**

Διάλυμα Πλύσης 1	Διάλυμα Πλύσης 2	Διάλυμα A	Διάλυμα B	Blocking solution	Διάλυμα C
2xSSC, 0.1%SDS	0,2xSSC, 0.1%SDS	100mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.5	Διάλυμα A, 1% Blocking solution	stock 10%: 10gr αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη σε 100ml Διαλύματος A	100mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl ₂ , pH 9.5

**Μεθοδολογία****Χρόνος****➤ 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. | 5 min |
| 3 | Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα. | |
| 4 | Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα πλύσης B υπό ανάδευση στη θερμοκρασία όπου πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση. | 15 min |
| 5 | Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4. | |

➤ Εμφάνιση σήματος

- | | | |
|----|---|--------|
| 6 | Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα A για 1 λεπτό και στη συνέχεια επωάζεται σε διάλυμα B υπό ανάδευση. | 25 min |
| 7 | Το διάλυμα B απορρίπτεται και προστίθεται νέο διάλυμα B, στο οποίο έχουν προστεθεί 5 μl συμπλόκου στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης ανά 10 ml διαλύματος, και επωάζεται υπό ανάδευση. | 25 min |
| 8 | Η μεμβράνη ξεπλένεται σε διαλυμα A. | 10 min |
| 9 | Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 8. | |
| 10 | Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα C . | 2 min |
| 11 | Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο με κάλυψη της μεμβράνης με πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος C, το οποίο περιέχει 50 μl NBT και 37.5 μl BCIP ανά 10 ml διαλύματος | |
| 12 | Η εμφάνιση διακόπτεται με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με dH ₂ O. | |



Ο χειρισμός των μεμβρανών πρέπει να γίνεται με γάντια και με ειδικές λαβίδες τύπου Millipore με πεπλατυσμένα άκρα.

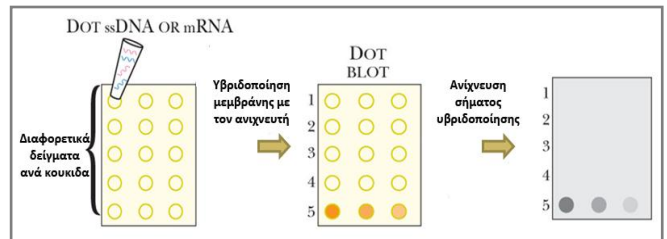
ΑΣΚΗΣΗ 3

ΣΤΥΠΩΜΑΤΑ ΚΟΥΚΙΔΑΣ (DOT BLOT)

Έλεγχος διαφορικής έκφρασης



Το **στύπωμα κουκκίδας (dot blot)** είναι μια απλοποιημένη διαδικασία που επιτρέπει τον γρήγορο εντοπισμό και την ημι-ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) και πρωτεϊνών σε άγνωστα δείγματα (Εικόνα 1). Τα DNA, RNA και protein blots αποτελούν μια απλοποίηση των Southern, Northern και Western blots, δεδομένου ότι δεν απαιτείται προηγουμένως διαχωρισμός των τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα και μεταφορά σε μεμβράνη. Αντιθέτως, το προς ανάλυση δείγμα εναποτίθεται ως σταγόνα και ακινητοποιείται απευθείας στη μεμβράνη. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της υβριδοποίησης (συνήθως) και η εμφάνιση του σήματος, το οποίο πλέον εμφανίζεται ως κουκκίδα. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής συγκριτικά με την υβριδοποίηση κατά Southern είναι α) η ταχύτητα και το μικρότερο κόστος, λόγω της



Εικόνα 3-4-1 Πορεία διαδικασίας δημιουργίας στυπώματος κουκκίδας

αποφυγής κατασκευής πηκτώματος, ηλεκτροφόρησης και μεταφοράς σε μεμβράνη και β) η δυνατότητα της ταυτόχρονης ανάλυσης πολλών διαφορετικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας διαφορετικούς ανιχνευτές. Το τελευταίο επιτυγχάνεται τοποθετώντας πολλές διαδοχικές κουκκίδες σε ένα σχετικά μικρό κομμάτι μεμβράνης, ενώ παράλληλα η μεμβράνη μπορεί να τεμαχιστεί σε πολλά μικρότερα κομμάτια. Ωστόσο, σημαντικό μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι δεν

Ανάστροφο Northern dot blot

Με τη διαδικασία αυτή ελέγχουμε την διαφορική έκφραση γονιδίων που μας ενδιαφέρουν:

από διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο, διαφορετικό ιστό και διαφορετικό οργανισμό.

Εδώ ως κουκκίδα ακινητοποιείται το προς εξέταση RNA (είτε ως RNA, ολικό ή μόνο αυτό που μας ενδιαφέρει, είτε ως cDNA, μετά την μετατροπή του ώστε να είναι πιο σταθερό).

Ανίχνευση SNPs με τη χρήση ανιχνευτών ειδικών για συγκεκριμένα αλληλόμορφα (Allele Specific Oligonucleotides)

Η τεχνική αυτή προϋποθέτει το σχεδιασμό ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία είναι συμπληρωματικά για πιθανούς πολυμορφισμούς μιας βάσης που μας ενδιαφέρουν. Το υπό μελέτη PCR προϊόν ακινητοποιείται στη μεμβράνη ως κουκκίδα και υβριδίζεται με τους κατάλληλους ανιχνευτές.

Αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο για μεταλλάξεις που σχετίζονται με ασθένειες ή για την ανίχνευση DNA ενός συγκεκριμένου οργανισμού σε άγνωστο δείγμα (π.χ. για ανίχνευση μολύνσεων σε τρόφιμα ή νερά).

Dot blot DNA-DNA hybridization

Με τη μέθοδο αυτή ακινητοποιούμε το DNA (π.χ. το PCR προϊόν ενός συγκεκριμένου γονιδίου) από διάφορους οργανισμούς που μας ενδιαφέρουν και παράλληλα χρησιμοποιούμε ένα ή μερικά από αυτά ως ανιχνευτές (ανάλογα με το ερώτημα).

Όσο πιο απομακρυσμένοι εξελικτικά είναι οι οργανισμοί, τόσο πιο πολλές αλλαγές θα έχουν συσσωρευτεί στο γενετικό τους υλικό, συνεπώς τόσο πιο ασθενές θα είναι το σήμα της υβριδοποίησης.

Εικόνα 3-2 Εφαρμογές στυπώματος κουκκίδας.

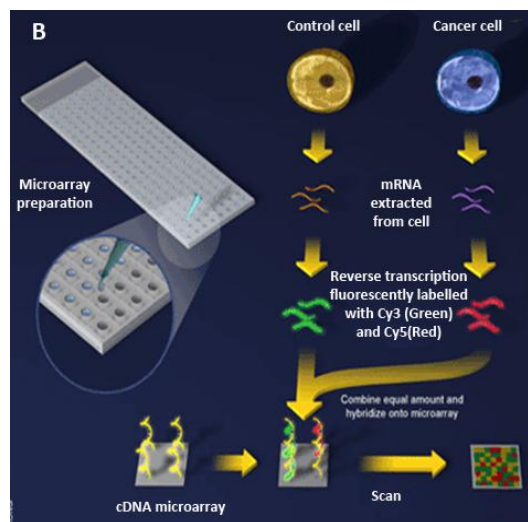
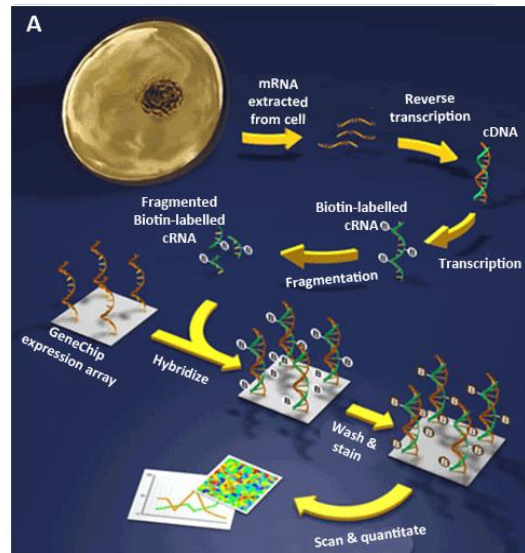
παρέχονται πληροφορίες για το τμήμα DNA που στο οποίο υβριδοποιείται ο ανιχνευτής, ως προς το μέγεθός του, αλλά και την ύπαρξη πολλαπλών τμημάτων DNA που μπορεί να έχουν υβριδοποιηθεί με τον ανιχνευτή και συνεισφέρουν επίσης στο σήμα της υβριδοποίησης. Στην περίπτωση των RNA dot blots μπορούν να προσδιοριστούν άμεσα οι ιστοί ή κυτταρικοί τύποι που μεταγράφουν ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή και τα στάδια ανάπτυξης κατά τα οποία ενεργοποιούνται διάφορα γονίδια. Αξίζει τέλος να

σημειωθεί ότι τα στυπώματα κουκκίδας αποτέλεσαν τους προπομπούς των μικροσυστοιχιών, που επιτρέπουν την ανάλυση δεκάδων χιλιάδων κουκκίδων ταυτόχρονα. Μεταξύ των εφαρμογών της τεχνικής αυτής περιλαμβάνονται το Ανάστροφο Northern dot blot, η ανίχνευση SNPs με τη χρήση ανιχνευτών ειδικών για συγκεκριμένα αλληλόμορφα (Allele Specific Oligonucleotides) καθώς και η DNA-DNA Dot blot υβριδοποίηση.

Μικροσυστοιχίες DNA

Οι μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays ή Gene Chips) βασίζονται στην ανάστροφη μεθοδολογία από αυτή του dot blot. Αποτελούνται από εκατοντάδες ή χιλιάδες γνωστές αλληλουχίες νουκλεϊνικών οξέων (cDNA κλώνους ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια), αντίστοιχες με τους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην υβριδοποίηση κατά Southern, ακινητοποιημένες με γεωμετρική σειρά σε στερεό υπόστρωμα (π.χ. γυάλινη επιφάνεια) (A). Αυτές οι συστοιχίες μπορούν ακολούθως να χρησιμοποιηθούν για τη σύγκριση των προφίλ έκφρασης των γονιδίων δύο ή περισσότερων δειγμάτων.

- ✓ Το ολικό mRNA που απομονώνεται από δύο δείγματα (π.χ. φυσιολογικά & καρκινικά κύτταρα), μετατρέπεται σε cDNA χρησιμοποιώντας σημασμένα νουκλεοτίδια (B).
- ✓ Αν κατά τη σήμανση έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικής χρώσης φθορίζοντα μόρια για κάθε cDNA, τότε τα δύο δείγματα μπορούν να αναμειχθούν και να υβριδοποιηθούν στην ίδια συστοιχία.
- ✓ Κάθε ένα από αυτά τα σημασμένα cDNA λειτουργώντας ως “ανιχνευτής” υβριδοποιείται σε ξεχωριστές συστοιχίες, που ωστόσο φέρουν ακινητοποιημένες τις ίδιες αλληλουχίες.
- ✓ Η ένταση του σήματος υβριδοποίησης κάθε ανιχνευτή (και συνεπώς η συγκέντρωσή του) σε κάθε ακινητοποιημένη αλληλουχία (spot) είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του μεταγράφου (mRNA) στο αρχικό δείγμα από το οποίο προήλθε, αντανακλώντας τη διαφορική γονιδιακή έκφραση μεταξύ των δύο διαφορετικών κυτταρικών τύπων.



Σκοπός – Πείραμα Α**➤ Ανάστροφο Northern dot blot**

Για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης θα χρησιμοποιηθούν τρία γονίδια του δάκου της ελιάς και θα ελεγχθεί η ύπαρξη μεταγράφων τους στα αναπτυξιακά στάδια του αυγού, της προνύμφης, του βομβυκίου και του νέου ενηλίκου. Τα δύο από τα γονίδια περιμένουμε να εκφράζονται διαφορεικά στα διάφορα στάδια (γονίδια 1 και 2), ενώ υπάρχει και ένα γονίδιο αναφοράς (γονίδιο 3 - ακτίνη), το οποίο θα πρέπει να εκφράζεται εξίσου στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: Α**Μεθοδολογία****Χρόνος**

- | | | |
|---|--|--------|
| 1 | Απομόνωση RNA από τα υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια και ποσοτικοποίηση (έχει ήδη γίνει). | |
| 2 | Απόθεση 2μl απομονωμένου RNA από κάθε δείγμα με τη μορφή σταγόνας σε νάυλον μεμβράνη. Τα δείγματα τοποθετούνται σε σειρά κατά μήκος μιας λωρίδας μεμβράνης, καταλαμβάνοντας περίπου 1 cm ² το καθένα. | |
| 3 | Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80° C για τη σταθεροποίηση του νουκλεϊκού οξέος | 30 min |
| 4 | Ακολουθεί προϋβριδοποίηση & υβριδοποίηση με τον επιθυμητό βιοτυνιλωμένο ανιχνευτή και ανίχνευση του σήματος, όπως περιγράφηκε στην Άσκηση 2i-2ii. | |

Πίνακας 1: Σειρά και θέσεις εναπόθεσης των δειγμάτων των πειραμάτων Α (RNA) & Β (PCR).

Πείραμα	Ανιχνευτής	Θέση εναπόθεσης (spot position)			
		1 Egg	2 Larva	3 Pupa	4 Adult
Α. RNA	Gene 1				
	Gene 2				
	Gene 3				

Με 1-4, σημειώνονται τα 4 αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν. Σημειώστε τις θέσεις εναπόθεσης των δειγμάτων σας ανάλογα με το προς ανάλυση γονίδιο (gene 1-3).

Σκοπός – Πείραμα Β**➤ Δημιουργία PCR-σημασμένων dot blots**

Τα προς ανάλυση γονίδια του πειράματος Α ενισχύονται μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας ως μήτρα cDNA των τεσσάρων διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων που αναφέρθηκαν προηγουμένως (του αυγού, της προνύμφης, της νύμφης και του νεαρού ενήλικου εντόμου). Παράλληλα, μέσω της αντίδρασης ενσωματώθηκε το σημασμένο με βιοτίνη δεοξυ-νουκλεοτίδιο της ουρακίλης (biotin-dUTP). Τα προϊόντα PCR συλλέχθηκαν κατά τον 18^ο κύκλο της εκθετικής φάσης της αντίδρασης, ώστε να μην φτάσουν όλες οι αντιδράσεις στο στάδιο κορεσμού κατά το τέλος της εκθετικής φάσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: Β

	Μεθοδολογία	Χρόνος
1	Απομόνωση RNA από τα υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια, ποσοτικοποίηση και μετατροπή σε cDNA (έχει ήδη γίνει).	
2	Σήμανση μέσω PCR και συλλογή των προϊόντων στον 18 ^ο κύκλο (έχει ήδη γίνει).	
3	Απόθεση 2μl PCR προϊόντος από κάθε δείγμα με τη μορφή σταγόνας σε νάυλον μεμβράνη.	
4	Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80° C, για τη σταθεροποίηση του νουκλεϊκού οξέος.	30 min
5	Ακολουθεί απευθείας ανίχνευση του σήματος (χωρίς να προηγηθεί υβριδοποίηση) , όπως περιγράφηκε στην Άσκηση 2ii.	

Πίνακας 1: Σειρά και θέσεις εναπόθεσης των δειγμάτων των πειραμάτων Α (RNA) & Β (PCR).

Πείραμα	Αναχνευτής	Θέση εναπόθεσης (spot position)			
		1 Egg	2 Larva	3 Pupa	4 Adult
B. PCR	Gene 1				
	Gene 2				
	Gene 3				

Με 1-4, σημειώνονται τα 4 αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν. Σημειώστε τις θέσεις εναπόθεσης των δειγμάτων σας ανάλογα με το προς ανάλυση γονίδιο (gene 1-3).

Σκοπός – Πείραμα Γ

➤ **DNA-DNA dot blots**

Ενισχύουμε μέσω PCR το γονίδιο 18s rRNA του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*), καθώς και μερικών εντόμων πολύ ή λιγότερο συγγενικών με το έντομο αυτό. Το γονίδιο αυτό θεωρείται πολύ καλό εργαλείο για φυλογενετικές μελέτες. Τα PCR προϊόντα από τα διάφορα έντομα τοποθετούνται και ακινητοποιούνται στη μεμβράνη με τη μορφή σταγόνας και ως ανιχνευτής χρησιμοποιείται το σημασμένο PCR προϊόν του γονιδίου 18s rRNA του δάκου της ελιάς. Υπάρχουν τρεις σειρές διαθέσιμων PCR προϊόντων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 και κάθε ομάδα θα χρησιμοποιήσει μια από αυτές.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: Γ

	Μεθοδολογία	Χρόνος
1	Ενίσχυση μέσω PCR του γονιδίου 18s rRNA με μήτρα γονιδιωματικό DNA από τα έντομα του Πίνακα 2 και σήμανση μέσω PCR του 18s rRNA του δάκου της ελιάς (έχουν ήδη γίνει).	
2	Αποδιάταξη των PCR προϊόντων με θέρμανση στους 100°C, φυγοκέντρηση για 10 sec και διατήρηση στον πάγο.	10 min
3	Απόθεση 2μl PCR προϊόντος από κάθε δείγμα με τη μορφή σταγόνας σε νάυλον μεμβράνη.	
4	Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80° C, για τη σταθεροποίηση του νουκλεϊκού οξέος.	30 min
5	Ακολουθεί προϋβριδοποίηση & υβριδοποίηση με τον επιθυμητό βιοτυνιλωμένο ανιχνευτή και ανίχνευση του σήματος, όπως περιγράφηκε στην Άσκηση 2i-2ii.	

Πίνακας 2: Σειρές PCR προϊόντων του γονιδίου 18s rDNA από διαφορετικά έντομα

Πείραμα	Ανιχνευτής	Θέση εναπόθεσης (spot position)			
		1	2	3	4
DNA	18s rDNA	<i>Bo</i> (<i>Bactrocera oleae</i>)	<i>Bd</i> (<i>Bactrocera dorsalis</i>)	<i>Bt</i> (<i>Bactrocera tryoni</i>)	<i>Bc</i> (<i>Bactrocera cucurbitae</i>)
		<i>Bo</i> (<i>Bactrocera oleae</i>)	<i>Bd</i> (<i>Bactrocera dorsalis</i>)	<i>Cc</i> (<i>Ceratitis capitata</i>)	<i>Rh</i> (<i>Rhagoletis cerasi</i>)
		<i>Bo</i> (<i>Bactrocera oleae</i>)	<i>Cc</i> (<i>Ceratitis capitata</i>)	<i>Dm</i> (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>Ag</i> (<i>Anopheles gambiae</i>)

Με 1-4, σημειώνονται ανά σειρά οι θέσεις εναπόθεσης των δειγμάτων για κάθε οργανισμό που εξετάστηκε. Σημειώστε στον πίνακα τις θέσεις των δειγμάτων που αναλύσατε.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

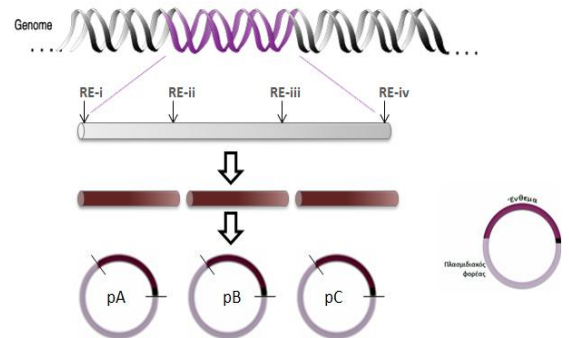
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

Ανάλυση αποτελεσμάτων

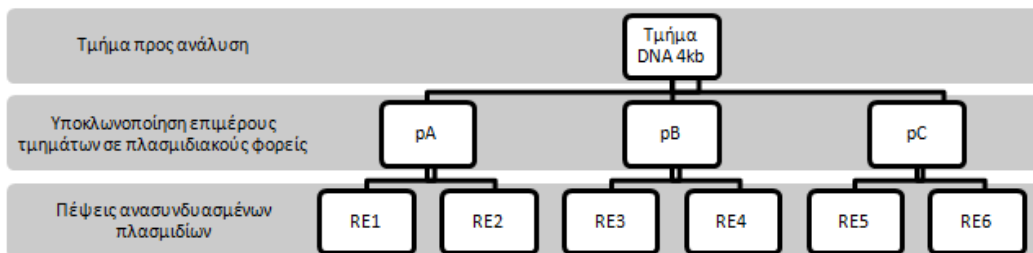
Χαρτογράφηση τμήματος DNA (~4 kb)



Το προς ανάλυση τμήμα DNA μεγέθους ~4 kb, υπέστη πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και τα τρία τμήματα που προέκυψαν, υποκλωνοποιήθηκαν σε τρία διαφορετικά πλασμίδια (plasmids: pA, pB, pC) (Εικ. 1). Για κάθε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις πέψεων (πχ. pA → RE1 & RE2). Τα προϊόντα των πέψεων στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης (Εικ. 2).



Εικόνα 6. Υποκλωνοποίηση τμήματος 4 kb



Οι θέσεις κλωνοποίησης των τριών αυτών ενθεμάτων, τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν & οι πέψεις που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Στοιχεία πλασμιδίων και ενθεμάτων.

Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο	Φορέας	Ένθεμα	Θέση κλωνοποίησης	Πέψεις
pA	pBluescript SK	? bp	EcoRI	RE1: XhoI RE2: PvuII
pB	pUC19	1350bp	EcoRI/HindIII	RE3: EcoRI/HindIII RE4: HaeIII
pC	pBluescript SK	? bp	HindIII	RE5: HincII RE6: HindIII



- ✓ Προσπαθήστε να βρείτε το μέγεθος του ενθέματος για κάθε πλασμίδιο¹, καθώς και τις πιθανές θέσεις κοπής για κάθε αντίδραση πέψης.
- ✓ Συμπληρώστε τα μεγέθη των τμημάτων που προέκυψαν² από τις πέψεις στον παρακάτω πίνακα και στη συνέχεια σημειώστε τις θέσεις κοπής των ενζύμων στον χάρτη κάθε ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.

	pA		pB				pC	
	XhoI	PvuII	EcoRI/HindIII	HaellI	HindIII	HincII		
1	3800 bp							
2	400 bp							

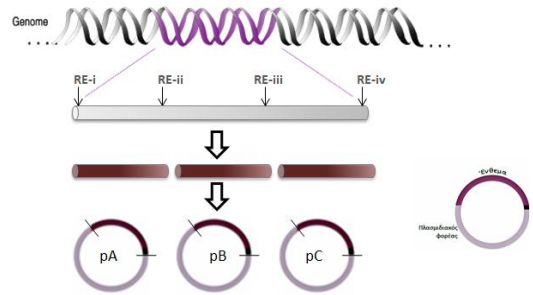


¹ Πληροφορίες για τα πλασμίδια-φορείς στο Παράρτημα.

² Αριθμήστε τις ζώνες της ηλεκτροφόρησης για κάθε πέψη με μειούμενη σειρά μεγέθους, αντιστοιχώντας δηλ. τον αριθμό 1 στη ζώνη με το μεγαλύτερο μέγεθος κ.ο.κ.



Τα προϊόντα των πέψων που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση, μεταφέρθηκαν σε νάυλον μεμβράνες και υβριδοποιήθηκαν με τους βιοτινυλιωμένους ανιχνευτές PROBE A και PROBE B. Οι συγκεκριμένοι ανιχνευτές υβριδοποιούνται στα ακραία τμήματα δύο διαδοχικών τμημάτων, όπως αυτά προέκυψαν από την αρχική γονιδιωματική περιοχή του προς ανάλυση τμήματος (Εικ. 3).



Εικόνα 7. Περιοχές υβριδοποίησης των ανιχνευτών στον φυσικό χάρτη του αρχικού τμήματος DNA ~4 kb.



✓ Συμπληρώστε στον παρακάτω πίνακα τις αποστάσεις που εντοπίζονται τα σήματα υβριδοποίησης και ακολουθώς τα μεγέθη των τμημάτων στα οποία αντιστοιχούν (βάσει των ζωνών της ηλεκτροφόρησης).

- ✓ Τοποθετείστε στη σωστή σειρά τα ενθέματα A, B, C, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της υβριδοποίησης, ώστε να ανταποκρίνεται στην πραγματική διευθέτησή τους στο αρχικό τμήμα DNA ~4 kb (Εικ. 3).
- ✓ Σημειώστε τις θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού (κάθετες γραμμές) στο αρχικό τμήμα DNA ~4 kb (Εικ. 3).

	pA		pB		pC	
	XhoI	PvuII	EcoRI/HindIII	HaeIII	HindIII	HincII
Probe A	4,5cm	400 bp				
Probe B						

ΣΤΥΠΩΜΑΤΑ ΚΟΥΚΙΔΑΣ (DOT BLOT)
Ανάλυση αποτελεσμάτων

Έλεγχος διαφορικής έκφρασης



Για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης ελέγχθηκαν τρία γονίδια του δάκου της ελιάς ως προς την ύπαρξη μεταγράφων τους στα αναπτυξιακά στάδια του αυγού (egg), της προνύμφης (larva), του βομβυκίου (pupa) και του νέου ενηλίκου (adult), ακολουθώντας δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Στην πρώτη πραγματοποιήθηκε ανάστροφο Northern dot blot (Πείραμα Α) χρησιμοποιώντας βιοτινυλιωμένους ανιχνευτές για κάθε γονίδιο, ενώ στη δεύτερη δημιουργήθηκαν PCR-σημασμένα dot blots (Πείραμα Β).



Τα δύο από τα γονίδια παρουσιάζουν διαφορεική έκφραση στα διάφορα στάδια (genes 1 & 2), ενώ το γονίδιο αναφοράς (gene 3 - ακτίνη) εκφράζεται εξίσου στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

Γονίδιο	Χαρακτηρισμός
Gene 1	dorsal
Gene 2	Ecdysone-induced protein
Gene 3	actin



- ✓ Παρατηρείστε τη διαβάθμιση της έντασης σήματος, σημειώνοντας με το σύμβολο + το μικρότερο επίπεδο έντασης σήματος και με ++++ τη μεγαλύτερη παρατηρούμενη ένταση.
- ✓ Πιθανολογείστε το ρόλο των γονιδίων αυτών στην ανάπτυξη του εντόμου.

		Egg	Larva	Pupa	Adult
RNA	Gene 1				
	Gene 2				
	Gene 3				
PCR	Gene 1				
	Gene 2				
	Gene 3				

DNA-DNA dot blots

Το γονίδιο 18s rDNA ενισχύθηκε μέσω PCR στο δάκο της ελιάς (*Bactrocera oleae*), καθώς και σε έντομα περισσότερο ή λιγότερο συγγενικά με αυτόν. Ποσότητα από τα PCR προϊόντα τοποθετήθηκε σε νάυλον μεμβράνη και ακολούθησε υβριδοποίηση, χρησιμοποιώντας ως ετερόλογο ανιχνευτή τον βιοτινυλιωμένο ανιχνευτή του γονιδίου 18s rDNA του δάκου της ελιάς.



Η συντήρηση του γονιδίου εξετάζεται ανά σειρά σε επίπεδο γένους, οικογένειας και τάξης αντίστοιχα.

Σειρά	Ταξινόμηση
1	Bactrocera
2	Tephritidae
3	Diptera



✓ Παρατηρείστε τη διαβάθμιση της έντασης σήματος ανά οργανισμό³, σημειώνοντας με το σύμβολο + το μικρότερο επίπεδο έντασης σήματος και με ++++ τη μεγαλύτερη παρατηρούμενη ένταση.

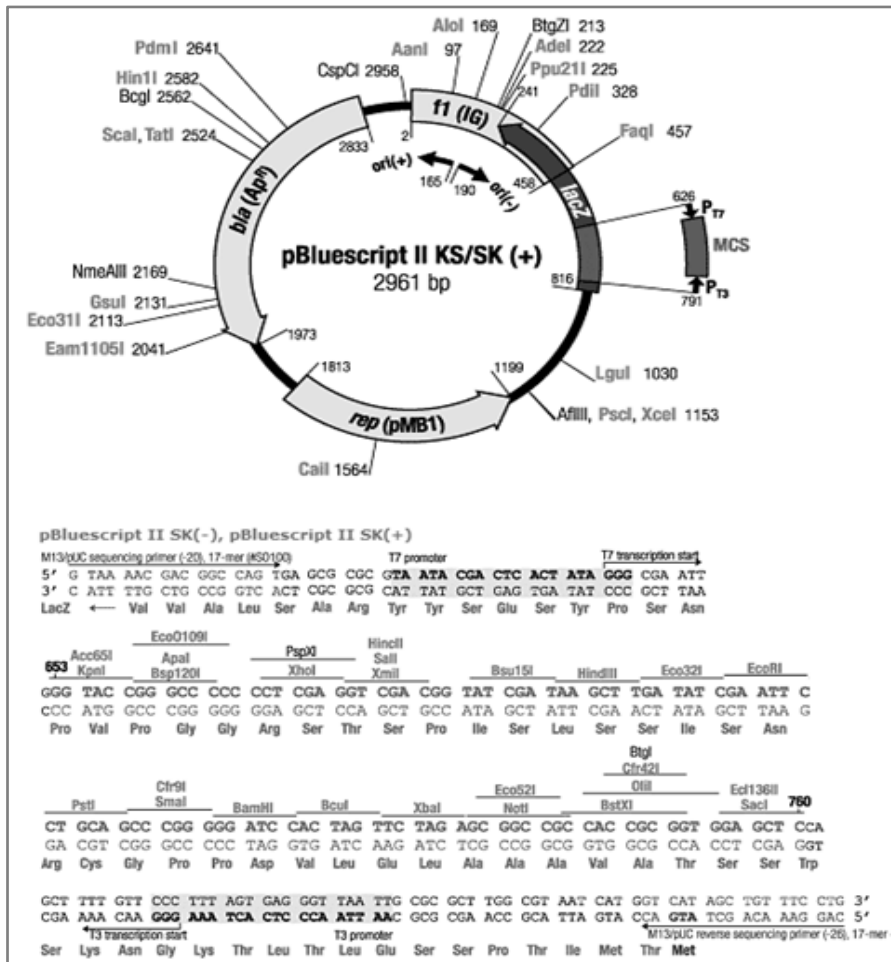
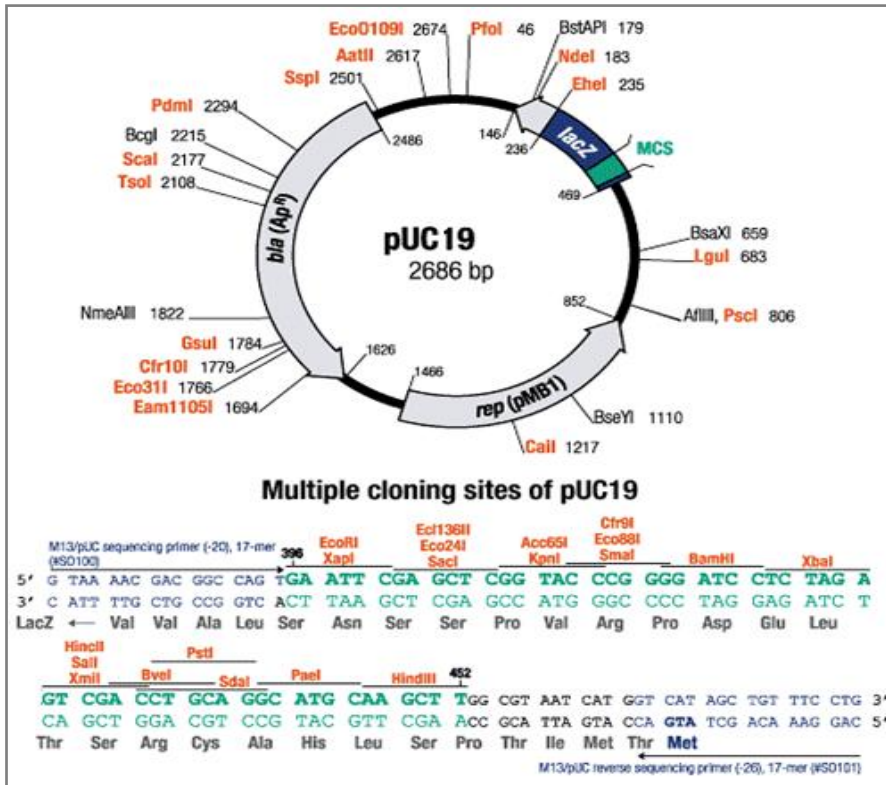
✓ Σχολιάστε το ρόλο του γονιδίου αυτού και την ομολογία του μεταξύ των υπό εξέταση οργανισμών, όπως και τη χρησιμότητά του σε μελέτες φυλογενετικών σχέσεων.

	1	2	3	4
	<i>Bo</i>	<i>Bd</i>	<i>Bt</i>	<i>Bc</i>
18s rDNA	<i>Bo</i>	<i>Bd</i>	<i>Cc</i>	<i>Rh</i>
	<i>Bo</i>	<i>Cc</i>	<i>Dm</i>	<i>Ag</i>

³ *Bo* (*Bactrocera oleae*), *Bd* (*Bactrocera dorsalis*), *Bt* (*Bactrocera tryoni*), *Bc* (*Bactrocera cucurbitae*), *Cc* (*Ceratitidis capitata*), *Rh* (*Rhagoletis cerasi*), *Dm* (*Drosophila melanogaster*), *Ag* (*Anopheles gambiae*)



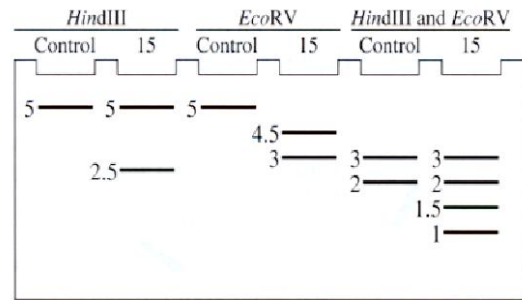
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΑΣΚΗΣΕΙΣ



1. Ένα κυκλικό βακτηριακό πλασμίδιο (pBP1) έχει μια μοναδική θέση αναγνώρισης για το ένζυμο *Hind*III στο μέσο ενός γονιδίου ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (*tet^R*). Γίνεται πέψη γενωμικού DNA φρουτόμυγας με το ένζυμο *Hind*III και δημιουργία βιβλιοθήκης στο φορέα pBP1. Η διαλογή της βιβλιοθήκης με συγκεκριμένο ανιχνευτή αποφέρει τον κλώνο 15 που περιέχει το γονίδιο της *Drosophila* που μας ενδιαφέρει. Ο κλώνος αυτός μελετάται με τα ένζυμα περιορισμού *Hind*III και *Eco*RV. Το διάγραμμα του πηκτώματος αναρρόζης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (το control ήταν ο πλασμιδιακός φορέας pBP1 χωρίς ένθεση). Στο σχήμα, δίπλα από τις ζώνες φαίνονται τα μεγέθη τους (σε κιλοβάσεις).



- α. Σχεδιάστε τους χάρτες πέψης του πλασμιδιακού φορέα pBP1 με και χωρίς την ένθεση, επισημαίνοντας, προσεγγιστικά, τη θέση του *tet^R* γονιδίου.
- β. Εάν το ίδιο *tet^R* γονίδιο κλωνοποιηθεί σε έναν πλήρως μη ομόλογο φορέα και χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής σε κατά Southern υβριδοποίηση αυτού του πηκτώματος, ποιες ζώνες περιμένετε να εμφανίσουν σήμα στη μεμβράνη;
- γ. Αν το ίδιο γονίδιο που μας ενδιαφέρει κλωνοποιηθεί από μια άλλη συγγενική της *Drosophila* μύγα σε έναν φορέα χωρίς ομολογία με τον pBP1 και αυτός ο κλώνος χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής στο ίδιο πηκτώμα, ποιες ζώνες περιμένετε να εμφανίσουν σήμα στη μεμβράνη;



2. Το πλασμίδιο pPlasmid είναι 3.4 kb σε μέγεθος και έχει δύο γονίδια, τα Gene1 και Gene2. Στο πλασμίδιο υπάρχουν μοναδικές θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα *Eco*RI, *Kpn*I, *Hind*III και *Sal*I. Η κλωνοποίηση στη θέση *Eco*RI οδηγεί στην απενεργοποίηση του γονιδίου Gene1, ενώ η κλωνοποίηση στη θέση *Kpn*I απενεργοποιεί το γονίδιο Gene2. Πέψεις με τα παρακάτω ένζυμα δίνουν τα αντίστοιχα θραύσματα.

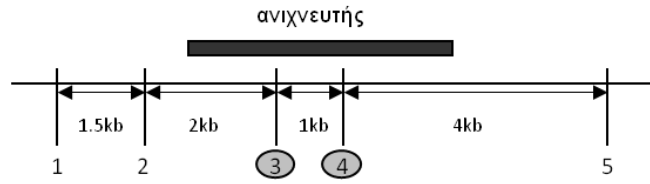
Ένζυμα	DNA θραύσματα (kb)
<i>Eco</i> RI, <i>Kpn</i> I	1.08, 2.32
<i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III	2.53, 0.87
<i>Eco</i> RI, <i>Sal</i> I	0.2, 3.2
<i>Eco</i> RI, <i>Kpn</i> I, <i>Hind</i> III	1.08, 1.45, 0.87
<i>Eco</i> RI, <i>Kpn</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Sal</i> I	0.2, 1.08, 1.45, 0.67

Σχεδιάστε έναν χάρτη του πλασμιδίου, δείχνοντας και τις θέσεις των περιοριστικών ενζύμων. Δώστε προσεγγιστικά τις θέσεις των γονιδίων Gene1 και Gene2.



3. Στο σχήμα φαίνεται ο φυσικός χάρτης μιας περιοχής DNA που χαρτογραφείτε με ανάλυση RFLP:

Οι κάθετες γραμμές που καταλήγουν σε έναν αριθμό αντιπροσωπεύουν θέσεις αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου PstI. Οι θέσεις 3 και 4 είναι πολυμοφικές, οι άλλες όχι. Επίσης δίνονται οι αποστάσεις ανάμεσα στα σημεία κοπής του PstI. Η οριζόντια γραμμή στο πάνω μέρος παριστάνει τον ανιχνευτή που χρησιμοποιείτε για την RFLP ανάλυση. Κάνετε πέψη διαφορετικών ατόμων με PstI, ηλεκτροφορείτε τα κομμάτια του DNA, μεταφέρετε σε μεμβράνη και υβριδοποιείτε με τον ανιχνευτή.



α. Κάντε ένα σχήμα του αποτελέσματος της υβριδοποίησης όταν έχετε χρησιμοποιήσει DNA από άτομα που είναι ομόζυγα για τους εξής απλοτύπους:

Απλότυπος	Θέση 3	Θέση 4
A	Παρούσα	Παρούσα
B	Παρούσα	Απούσα
Γ	Απούσα	Παρούσα
Δ	Απούσα	Απούσα

β. Τι επίδραση θα είχε στα αποτελέσματα της υβριδοποίησης μια μετάλλαξη που θα οδηγούσε στην εξαφάνιση της θέσης 1;



4. Το DNA του πλασμιδίου pBR607 είναι κυκλικό, δίκλωνο και έχει μέγεθος 2.6 kb. Το πλασμίδιο αυτό έχει δύο γονίδια που προσδίνουν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη (Tc^r) και στην αμπικιλίνη (Ap^r) στους ξενιστές του. Το DNA έχει μοναδικές θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα

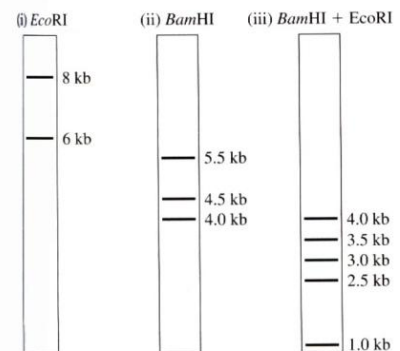
EcoRI, BamHI, HindIII, PstI και Sall. Η κλωνοποίηση στη θέση EcoRI δεν επηρεάζει την ανθεκτικότητα σε κανένα από τα δύο αντιβιοτικά. Η κλωνοποίηση στις θέσεις αναγνώρισης του BamHI, HindIII και Sall καταστρέφει την ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη. Η κλωνοποίηση στη θέση PstI καταστρέφει την ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Πέψεις με τους συνδυασμούς των ενζύμων που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα δίνουν τα αντίστοιχα θραύσματα.

Ένζυμα	DNA θραύσματα (kb)
EcoRI, PstI	0.46, 2.14
EcoRI, BamHI	0.2, 2.4
EcoRI, HindIII	0.05, 2.55
EcoRI, Sall	0.55, 2.05
EcoRI, BamHI, PstI	0.2, 0.46, 1.94

Σχεδιάστε ένα χάρτη των περιοριστικών αυτών ενζύμων του πλασμιδίου. Επίσης υποδείξτε προσεγγιστικά τις θέσεις των γονιδίων Tc^r και Ap^r.



5. Ένα τμήμα DNA ποντικού 8 kb με κολλώδη άκρα EcoRI περιέχει το γονίδιο M. Αυτό το τμήμα εισάγεται στη θέση EcoRI του πλασμιδιακού φορέα pBR322. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο υπόκειται σε τρεις διαφορετικές αντιδράσεις πέψης. Στο σχήμα φαίνεται το πρότυπο των ζωνών που εμφανίζονται μετά από την ηλεκτροφόρηση. Το πήκτωμα αυτό υβριδοποιείται κατά Southern αφενός με ανιχνευτή σημασμένο φορέα pBR322 και αφετέρου με ανιχνευτή σημασμένο γονίδιο M.





6. Έχετε απομονώσει ένα εξόνιο από το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης της μεσογειακής μύγας και θέλετε να το μελετήσετε. Για το σκοπό αυτό το κλωνοποιείτε στη θέση PstI ενός πλασμιδιακού φορέα και προσπαθείτε να το χαρτογραφήσετε μέσω πέσεων με τα ένζυμα περιορισμού PstI, XbaI και RsaI και ηλεκτροφόρησης των προϊόντων. Στον παρακάτω πίνακα σας δίνονται τα αποτελέσματα των πέσεων, σε kb.

	PstI	XbaI	RsaI	PstI/ XbaI	PstI/ RsaI	XbaI/ RsaI	X/P/R
Φορέας	5	5	5	4,5+0,5	3,5+1,5	3+2	-
Construct	5+3	5,2+2,8	5,3+2,7	-	-	-	-

α. Να κατασκευάσετε το χάρτη περιορισμού της συγκεκριμένης κατασκευής και να συμπληρώσετε τις πέψεις που λείπουν.

β. Η θέση αναγνώρισης PstI βρίσκεται στο κέντρο του γονιδίου της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, το οποίο έχει μέγεθος 2 kb. Αν πάρουμε αυτό το γονίδιο μόνο και το χρησιμοποιήσουμε ως ανιχνευτή, ποιες ζώνες θα δώσουν σήμα στις διπλές και την τριπλή πέψη;



7. Στη θέση RsaI ενός φορέα κλωνοποίησης έχετε κλωνοποιήσει ένα κομμάτι από τον υποδοχέα της εκδυσόνης. Έχετε φτιάξει έναν ανιχνευτή για κάποια περιοχή του γονιδίου αυτού, για τον οποίο ξέρετε ότι έχει μέγεθος 2,4 kb και ακριβώς στο κέντρο του μια θέση αναγνώρισης RsaI.

	RsaI	SmaI	HindIII	H/S	H/R	R/S	H/R/S
Απλός φορέας	6	6	6	4/2	5,5/0,5	4,5/1,5	;
Ανασυνδυασμένος φορέας	6/2	5,2/4,8	3,5/6,5	4/2,5/1,2/2,3	;	;	;

α. Να χαρτογραφήσετε τόσο τον απλό, όσο και τον ανασυνδυασμένο φορέα και να συμπληρώσετε τα αποτελέσματα των πέσεων που λείπουν.

β. Να δείξετε πάνω στο τελικό σας σχήμα ποια περιοχή αναγνωρίζει ο ανιχνευτής.

γ. Μετά από πέψη με S/H, ηλεκτροφόρηση, μεταφορά και υβριδοποίηση με τον συγκεκριμένο ανιχνευτή, ποιες ζώνες περιμένετε να σας δώσουν σήμα;