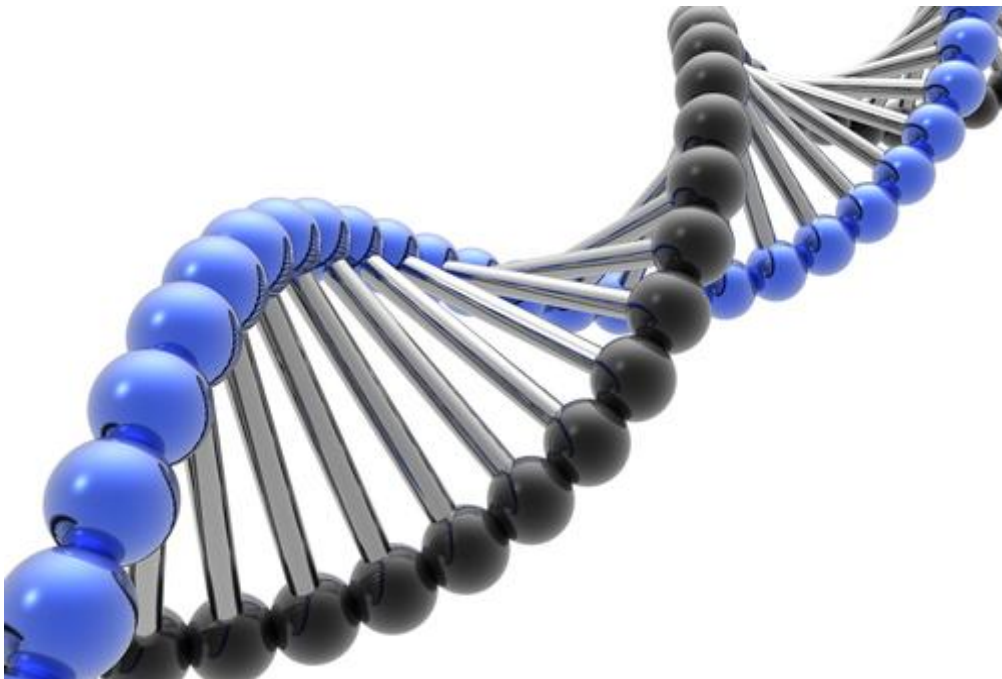




**ΦΥΛΛΑΔΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ
ΑΣΚΗΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ**

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ Ι

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



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



**ΦΥΛΛΑΔΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ
ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ**

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ Ι

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

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

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.

Άσκηση 1

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

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 μεταλλαξιγένεση, 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:

Η Taq πολυμεράση έχει μοριακό βάρος 94-kDa,

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

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 παλίνδρομες 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 1.66×10^{-4} πολυμερισμένα νουκλεοτίδια ανά κύκλο, ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση (0.2 mM) το λάθος ελαττώνεται σημαντικά και γίνεται μικρότερο από 5×10^{-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 μονοσθενή 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°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°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°C χαμηλότερα από το υπολογιζόμενο σημείο τήξης (T_m). Θερμοκρασίες μεταξύ 55°C και 65°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

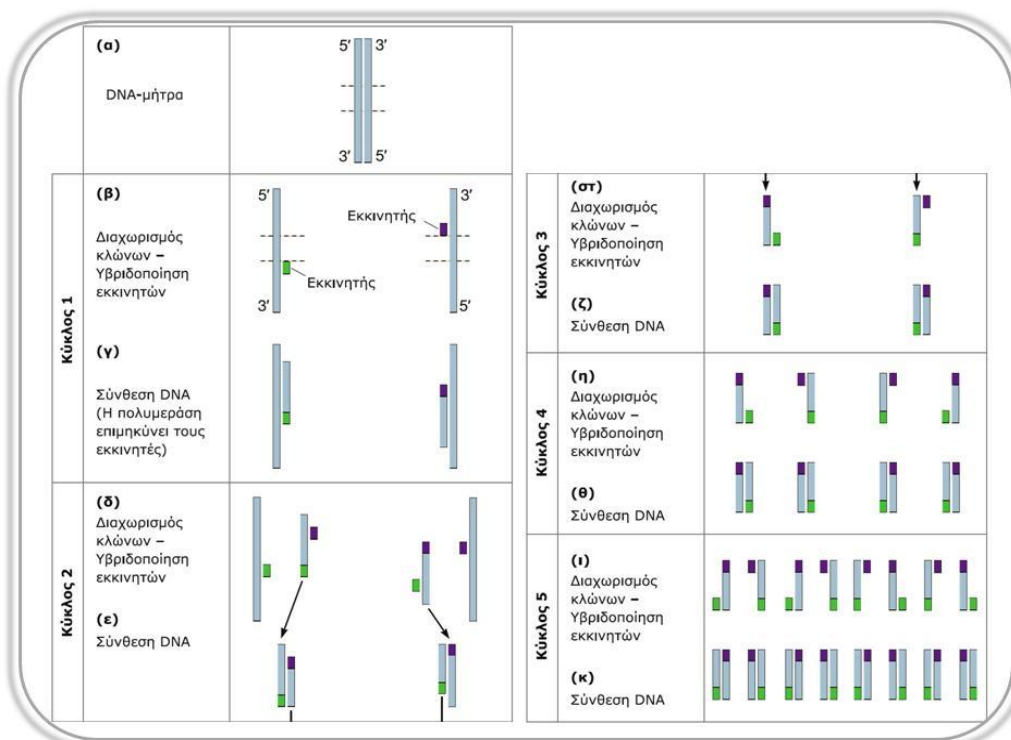
επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C, στην οποία η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο ανάλογα με το pH, τη συγκέντρωση ιόντων, το ρυθμιστικό 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 απροσδιοριστού 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

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός αυτής της άσκησης είναι ο πολλαπλασιασμός (ενίσχυση) τμήματος του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του εντόμου *Bactrocera oleae* (ο γνωστός δάκος της ελιάς). Συγκεκριμένα θα ενισχυθεί η περιοχή του γονιδίου που αντιστοιχεί στα εξόνια 3 – 5. Ως μήτρα DNA θα χρησιμοποιηθεί: α) ολικό γονιδιωματικό DNA του εντόμου, με αναμενόμενο μέγεθος της ενισχυόμενης αλληλουχίας 1654 bp και β) cDNA πλασμιδιακός κλώνος του γονιδίου, με αναμενόμενο μέγεθος της ενισχυόμενης αλληλουχίας 874 bp.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

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

Αντιδραστήρια	Αντίδραση 1			Αντίδραση 2		
	Ποσότητες	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητες	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
(1) Γονιδιωματικό DNA		20 ng/μl				
(2) Πλασμιδιακός κλώνος cDNA					1 ng/μl	
Ρυθμιστικό διάλυμα		10X	1X		10X	1X
dNTPs		10 mM	0.8 mM		10 mM	0.8 mM
MgCl ₂		50 mM	1.5 mM		50 mM	1.5 mM
Εκκινητής εμπρόσθιος P1		10 μM	0.4 μM		10 μM	0.4 μM
Εκκινητής ανάστροφος P2		10 μM	0.4 μM		10 μM	0.4 μM
Taq DNA πολυμεράση		5 u/μl	1 unit		5 u/μl	1 unit
H ₂ O						
Τελικός όγκος	20 μl			20 μl		

Οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν είναι:

- **P1:** BoAChE-Ex3-F: TATTTTCCCGGTTTCTCTGGC
- **P2:** BoAChE-Ex5-R: CGTCTCTGACATTTCCCATC.

2. Παλιότερα, στο κάθε δείγμα προσθέτονταν μl λαδιού για να εμποδιστεί η εξάτμιση, σήμερα οι συσκευές PCR (θερμοκυκλοποιητής) έχουν θερμαινόμενα καπάκια και αυτό αποφεύγεται. Τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή.

3. Ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίζεται να εκτελέσει το παρακάτω πρόγραμμα:

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	94°C	2 - 4 min	
Αποδιάταξη DNA στόχου	94°C	30 sec	} 30 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών	48°C	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	90 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	7 min	
Συντήρηση	4°C		

Σημειώσεις

- ✓ Σαν μία μονάδα ενζύμου ορίζεται το ποσόν του ενζύμου που απαιτείται για τον πολυμερισμό 10 nmoles νουκλεοτιδίων σε 30 λεπτά στους 70°C και σε όγκο αντίδρασης 50 μl.

Άσκηση 2

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

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 υπερελέκωσης 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.

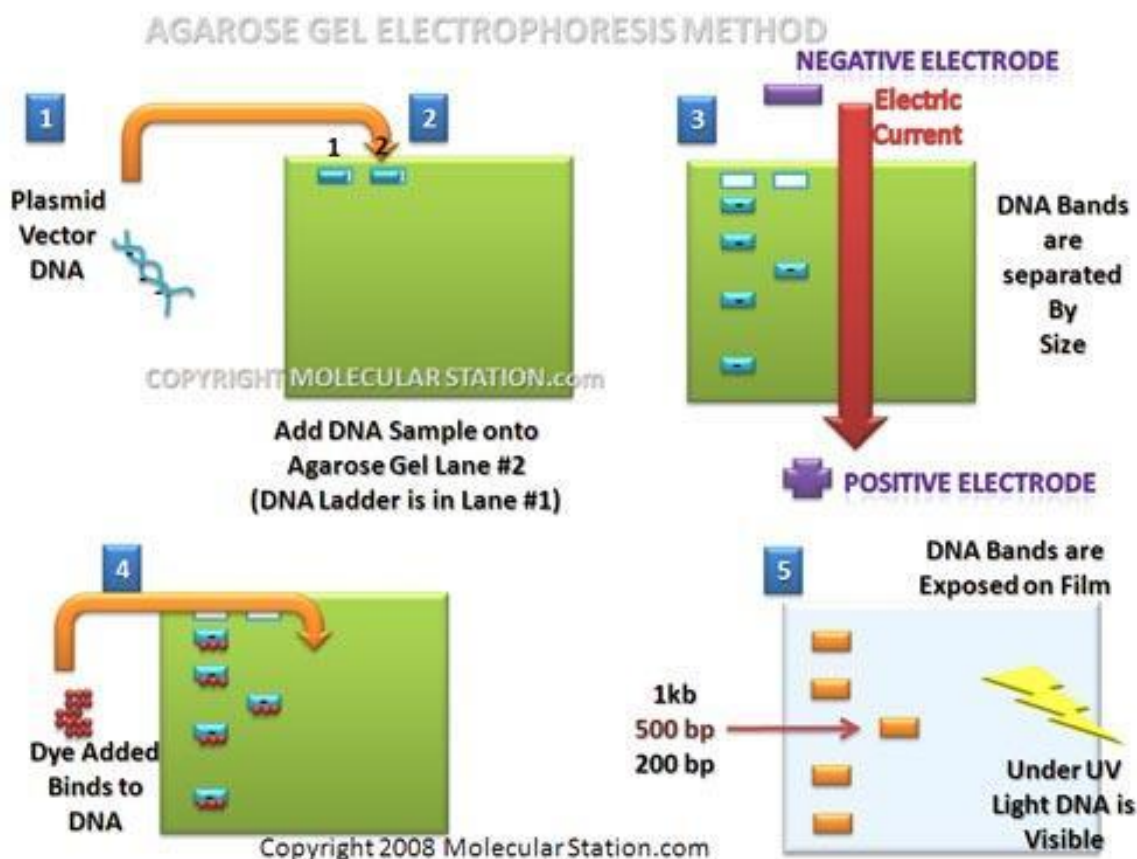
Χρωστική φόρτωσης (gel loading)

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

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Ο σκοπός της σημερινής άσκησης είναι να ηλεκτροφορήσετε τα προϊόντα PCR της Άσκησης 1, ώστε αφενός να διαπιστωθεί αν ενισχύθηκε η αναμενόμενη αλληλουχία και αφετέρου η αλληλουχία αυτή να απομονωθεί από το πήκτωμα και στη συνέχεια να καθαριστεί (Άσκηση 3).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Μεθοδολογία – Συσκευή

Από τότε που εισήχθη η μέθοδος έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τύποι συσκευών. Τώρα πάντως χρησιμοποιούνται κυρίως οριζόντια και όχι κάθετα πήκτωμα. Αυτά παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα:

- Μπορούν εύκολα να χρησιμοποιούν χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης.
- Μπορεί εύκολα να παρασκευαστεί πήκτωμα των διαστάσεων που εκάστοτε θέλουμε.
- Είναι πολύ εύκολη και γρήγορη η κατασκευή και χρησιμοποίηση των πηκτωμάτων.
- Η συσκευή δύσκολα φθείρεται και είναι φθηνή.

Στο σημερινό εργαστήριο το ρυθμιστικό διάλυμα που θα χρησιμοποιήσουμε είναι το 0.5X TBE (45 mM Tris-βορικό, 1mM EDTA).

Παρασκευή 1% πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση

1. Σε κωνική φιάλη προσθέτουμε τις επιθυμητές ποσότητες σκόνης αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος. Για τη δημιουργία 100 ml πηκτώματος, αναμιγνύουμε 10 ml stock διαλύματος 5X TBE σε 90 ml απιονισμένο νερό και προσθέτουμε 1 g αγαρόζης.
2. Θερμαίνουμε ανακινώντας μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη (χρειάζεται να βράσει). Στη συνέχεια αφήνουμε να κατεβεί η θερμοκρασία περίπου στους 50°C (κωνική ανεκτή στην παρειά) ώστε το ζεστό διάλυμα να μην επηρεάσει την πλαστική βάση (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 0.5 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 (μήτρα πολυμερισμού) όπου θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα. Προηγούμενα έχουμε τοποθετήσει με κάθετη διευθέτηση “χτενάκια” ώστε να προκύψουν οι ειδικές θέσεις “πηγαδάκια” φόρτωσης των δειγμάτων.
5. Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα 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. Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προσθέτουμε χρωστική που περιέχει 5-10% γλυκερόλη και 0.025% μπλε της βρωμοφαινόλης και/ή κυανούν της ξυλόλης. Η ποσότητα που μπορούμε να φορτώσουμε εξαρτάται από το μέγεθος των δοντιών της χτένας, στην περίπτωση μας γύρω στα 15 μl. Πρέπει να φροντίσουμε η συγκέντρωση του DNA να είναι μικρή ώστε ο διαχωρισμός να είναι καλός.

7. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών του DNA στο πήκτωμα παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα ηλεκτροφορείται το κατάλληλο πρότυπο μεγεθών DNA
8. Κατά την ηλεκτροφόρηση μπορούμε να παρακολουθούμε τον διαχωρισμό των ζωνών του DNA με λάμπα υπεριώδους φωτός (πρέπει να φοράμε ειδικά ή κοινά απορροφητικά γυαλιά στα μάτια).
9. Χρησιμοποιώντας υπεριώδες φως μπορούμε να φωτογραφίσουμε το πήκτωμα μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης.
10. Με ξυράφι και πολύ προσεκτικά, ώστε να μην τραυματίσουμε τη συσκευή υπεριώδους φωτισμού, απομονώνουμε το κομμάτι του πηκτώματος που περιέχει τη ζώνη DNA που μας ενδιαφέρει και την τοποθετούμε σε σωληνάκι τύπου Eppendorf του 1.5ml.
11. Το DNA διατηρείται στους 4oC μέχρι την επόμενη άσκηση.

Σημειώσεις

- ✓ Το DNA κινείται γρηγορότερα σε υψηλές θερμοκρασίες (West, 1987). Μάλιστα, σε υψηλή θερμοκρασία το DNA δεν κινείται με ευθύ μέτωπο, αλλά δημιουργεί “χαμόγελα” (smiling effect). Επιπλέον, υψηλή συγκέντρωση άλατος στο δείγμα μειώνει το πλάτος της ζώνης (narrow)
- ✓ Πολύ υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν τη διάχυση του DNA μειώνοντας την ανάλυση. Στα οριζόντια πηκτώματα η θερμοκρασία είναι αρκετή υψηλή λόγω της επικάλυψης ολόκληρου του πηκτώματος με το ρυθμιστικό διάλυμα γι αυτό το λόγο και παρουσιάζουν μικρότερη ανάλυση από τα κάθετα πηκτώματα. Βελτίωση της ανάλυσης επιτυγχάνεται με την ψύξη του ρυθμιστικού διαλύματος.
- ✓ Σε περιπτώσεις όπου η πολικότητα δεν είναι γνωστή, είναι εύκολο να προσδιοριστεί η άνοδος από την κάθοδο από τη δύο φορές μεγαλύτερη παραγωγή φυσαλίδων στην κάθοδο (γιατί;).

Άσκηση 3

ΑΝΑΚΤΗΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τμήματα DNA που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μπορούν να απομονωθούν και να καθαριστούν από το πήκτωμα, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις πέψης, κλωνοποίησης, αλληλούχισης κτλ.

Κατά το παρελθόν αναπτύχθηκαν αρκετές μέθοδοι για την ανάκτηση DNA από πηκτώματα αγαρόζης, όμως υπήρχαν διάφοροι περιορισμοί. Μεταξύ αυτών είναι:

- *Η παρουσία στο πήκτωμα αναστολέων ενζυμικών αντιδράσεων.* Ειδικά πιο παλιά, τα περισσότερα είδη αγαρόζης περιείχαν διάφορους πολυσακχαρίτες, οι οποίοι εξάγονταν μαζί με το DNA και αποτελούσαν πιθανούς αναστολείς των επόμενων βημάτων της κλωνοποίησης. Η βελτίωση της καθαρότητας των διαφόρων τύπων αγαρόζης έχει μειώσει αρκετά την πιθανότητα ανάκτησης DNA όχι αρκετά καθαρό.
- *Μειωμένη απόδοση στην επανάκτηση μεγαλομοριακών τμημάτων DNA.* Οι περισσότερες μέθοδοι είναι αρκετά αποτελεσματικές όταν το DNA που μας ενδιαφέρει είναι μικρότερο από 5 kb (απόδοση >50%), όμως η απόδοση μειώνεται προοδευτικά όσο αυξάνεται το μέγεθος του DNA που θέλουμε να απομονώσουμε.
- *Μειωμένη απόδοση για μικρές ποσότητες DNA.* Όσο μικρότερη είναι η ποσότητα του DNA, τόσο μειώνεται η απόδοση του καθαρισμού. Μάλιστα, στις περιπτώσεις όπου η ποσότητα του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει είναι λιγότερη από 500 ng, η απώλεια μεγαλώνει τόσο πολύ που δεν έχει νόημα να γίνει προσπάθεια απομόνωσης.
- *Δυσκολία στην ταυτόχρονη επανάκτηση πολλών δειγμάτων.* Πολλές από τις τεχνικές είναι χρονοβόρες και δεν επιτρέπουν τον ταυτόχρονο χειρισμό πολλών δειγμάτων.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τρεις από τις πιο αξιόπιστες τεχνικές που χρησιμοποιούνταν, ιδιαίτερα πριν την ανάπτυξη των kit αντιδράσεων διαφόρων εταιριών:

- *Ηλεκτροφόρηση DNA σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης.* Τα τμήματα του DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ακολούθως χαράσσεται μια τομή στο πήκτωμα, ακριβώς μπροστά από τη ζώνη που μας ενδιαφέρει και εκεί εισάγεται η μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Η ηλεκτροφόρηση συνεχίζεται και το DNA δεσμεύεται πάνω στη μεμβράνη. Στη συνέχεια η μεμβράνη απομακρύνεται και εκπλένεται από διάφορες προσμίξεις με διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος και ακολούθως το DNA απελευθερώνεται με διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος.
- *Ηλεκτρο-έκλυση σε σακουλάκια διάλυσης.* Αυτή η μέθοδος είναι αποδοτική για μεγάλο εύρος μεγέθους DNA τμημάτων, όμως είναι αρκετά δύσκολη. Μετά την ηλεκτροφόρηση, με νυστέρι απομονώνεται το τμήμα του πηκτώματος αγαρόζης που περιέχει το κομμάτι DNA που μας ενδιαφέρει και τοποθετείται μέσα σε σακουλάκι διάλυσης μαζί με διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Το σακουλάκι ηλεκτροφορείται και το DNA μεταφέρεται στα τοιχώματα. Αντιστρέφοντας το πεδίο, το DNA απελευθερώνεται στο διάλυμα.
- *Χρησιμοποίηση αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης.* Έχουν παρασκευαστεί πλέον τύποι αγαρόζης που στερεοποιούνται στους 30°C και λιώνουν στους 65°C (πολύ χαμηλότερα από το σημείο τήξης των περισσότερων δίκλωνων μορίων DNA). Μετά την ηλεκτροφόρηση, με νυστέρι απομονώνεται το τμήμα του πηκτώματος αγαρόζης που περιέχει το κομμάτι DNA που μας ενδιαφέρει και τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf. Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl και EDTA και το μίγμα θερμαίνεται στους 65°C για να λιώσει το πήκτωμα. Ακολούθως το DNA καθαρίζεται με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρημνίζεται με αιθανόλη.

Όσον αφορά στα kit αντιδράσεων που έχουν παρασκευαστεί από εταιρίες, αυτά περιλαμβάνουν τα εξής τρία βήματα: την τήξη του πηκτώματος σε διάλυμα που περιέχει συνήθως ισοθειο-κυανική γουανιδίνη, τη σύνδεση του DNA σε μεμβράνη (πυρητίου) παρουσία χαστροπικών αλάτων και τέλος την έκλυση του DNA σε ddH₂O.

Στην παρούσα άσκηση θα χρησιμοποιήσουμε ένα απλό πρωτόκολλο, με σχετικά χαμηλή απόδοση. Το τμήμα του πηκτώματος που έχει απομονωθεί τοποθετείται σε στήλη από υαλοβάμβακα και το DNA εκλούεται με διάλυμα TE (Tris-EDTA) με τη βοήθεια φυγοκέντρησης. Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Η εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο είναι ο πλέον συνηθισμένος τρόπος για την απομάκρυνση πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων, διότι η απομάκρυνση των πρωτεϊνών είναι πολύ πιο αποδοτική όταν χρησιμοποιούνται δύο οργανικοί διαλύτες αντί για έναν. Η φαινόλη αποδιατάσσει και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες μαζί με τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ το χλωροφόρμιο διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική φάση. Συγχρόνως απομακρύνει τα τυχόν εναπομείναντα υπολείμματα φαινόλης από το διάλυμα. Τα νουκλεϊκά οξέα συγκεντρώνονται στην υδατική φάση, η οποία, μετά από φυγοκέντρηση, σχηματίζει την άνω φάση λόγω της μικρότερης πυκνότητάς της. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στο χειρισμό του δείγματος διότι η φαινόλη είναι τοξική και δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το δέρμα. Η μη ολοκληρωτική από-μάκρυνσή της από το διάλυμα αναστέλλει τη δράση διαφόρων ενζύμων που θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια.

- Η κατακρήμνιση με αιθανόλη ή ισοπροπανόλη χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων ή για την απομάκρυνση αλάτων, ενζύμων, ολιγονουκλεοτιδίων και άλλων προσμίξεων από το υδατικό διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων. Η τεχνική είναι αρκετά γρήγορη και αποδοτική. Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιούνται παράγοντες οι οποίοι μειώνουν τη διαλυτότητα των μορίων των νουκλεϊκών οξέων όπως η χαμηλή θερμοκρασία. Πιο παλιά πιστευόταν ότι χρειάζονται πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (π.χ. -20 ή -70°C), όμως έχει αποδειχτεί ότι η κατακρήμνιση και σε 0°C είναι το ίδιο αποδοτική,
- η παρουσία αιθανόλης, η οποία αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα από τα νουκλεϊκά οξέα και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα, όπως τα Na⁺, τα

οποία συνδέονται σε αυτές. Με τον τρόπο αυτό μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών καταλοίπων (αφυδατικό μέσο). Απαιτούνται 2.0 – 2.5 όγκοι (V) αιθανόλης για έναν όγκο διαλύματος DNA. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ισοπροπανόλη, οπότε απαιτείται μικρότερος όγκος (1:1),

- η παρουσία κατιόντων, τα οποία αυξάνουν την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά διαφορετικά άλατα, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις το κάθε ένα. Η επιλογή έχει να κάνει με την προτίμηση του καθενός, αν και υπάρχουν συγκεκριμένες περιπτώσεις που οδηγούν στην επιλογή συγκεκριμένου άλατος. Για παράδειγμα, 2-2.5 M οξικό νάτριο είναι πολύ αποτελεσματικό για τη μείωση της συγκατακρήμνισης των dNTPs, 0.8 M χλωριούχο λίθιο χρησιμοποιείται κυρίως για την κατακρήμνιση του RNA, 0.2 M χλωριούχο νάτριο είναι προτιμητέο αν το διάλυμα περιέχει και SDS, ενώ 0.3 M οξικό νάτριο χρησιμοποιείται στις περισσότερες κατακρήμνισεις ρουτίνας.

Η κατακρήμνιση μικρής ποσότητας νουκλεϊκών οξέων μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη φορέων συγκατακρήμνισης (όπως γλυκογόνο, tRNA ζύμης, γραμμικό πολυακρυλαμίδιο). Οι φορείς αυτοί είναι αδιάλυτοι σε διαλύματα αιθανόλης και κατά τη φυγοκέντρηση δημιουργούν ίζημα το οποίο παγιδεύει τα νουκλεϊκά οξέα.

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Ο σκοπός της σημερινής άσκησης είναι η ανάκτηση των PCR προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης που απομονώσατε στην Άσκηση 2, ώστε να ακολουθήσει η κλωνοποίησή τους.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ανάκτηση και καθαρισμός DNA (PCR προϊόντων) από πήκτωμα αγαρόζης

1. Τρυπάμε με βελόνα τον πάτο από σωληνάκι PCR των 0.5 ml και τοποθετούμε υαλοβάμβακα (αυτή θα είναι η στήλη καθαρισμού).
2. Ξεπλένουμε τη στήλη με 100 μl TE και φυγοκεντρούμε για 1 min σε 12000 rpm. Το TE περιέχει 10 mM Tris-HCl pH 8.0 και 1 mM EDTA.
3. Τοποθετούμε το τμήμα του πηκτώματος από την προηγούμενη άσκηση μέσα στο σωληνάκι PCR, εισάγουμε το σωληνάκι PCR σε σωληνάκι τύπου erpendorf του 1.5 ml και φυγοκεντρούμε για 2 min σε 12000 rpm.
4. Ξεπλένουμε με 100 μl TE και φυγοκεντρούμε για 1 min σε 12000 rpm.
5. Στο διάλυμα που έχουμε συλλέξει, προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης.
6. Αναδεύουμε ελαφρά και φυγοκεντρούμε για 5 min σε 12000 rpm.
7. Συλλέγουμε την υδατική φάση (υπερκείμενο) σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου.
8. Αναδεύουμε ελαφρά και φυγοκεντρούμε για 5 min σε 12000 rpm.
9. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.
10. Προσθέτουμε 0.3 M οξικό νάτριο (CH_3COONa) και 2.5 V απόλυτης αιθανόλης (100%).
11. Αναδεύουμε ισχυρά και επωάζουμε στον πάγο για 15 min.
12. Φυγοκεντρούμε σε 12000 rpm για 10 min και αποχύνουμε το υπερκείμενο. Το DNA πρέπει να έχει σχηματίσει ίζημα στον πάτο του σωληνάκι.
13. Ξεπλένουμε με αιθανόλη 70% και φυγοκεντρούμε για 2 min σε 12000 rpm.
14. Αφήνουμε το ίζημα να ξηραθεί τελείως (overnight-O/N).
15. Την επόμενη μέρα επαναδιαλύουμε σε 30 μl dH_2O .

Σημειώσεις

- ✓ Η κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων μικρού μεγέθους (<100 nt) μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη MgCl_2 σε τελική συγκέντρωση 0.01 M.
- ✓ Εάν η φαινόλη δεν είναι εξισορροπημένη σε pH 7.8-8.0 τα νουκλεϊκά οξέα τείνουν να συγκεντρώνονται στην οργανική φάση. Υπό όξινες συνθήκες η εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο προκαλεί τη συγκέντρωση του RNA στην υδατική φάση, ενώ του DNA και των πρωτεϊνών στη οργανική.
- ✓ Η ανάμειξη της οργανικής και υδατικής φάσης πραγματοποιείται με ισχυρή ανάδευση (vortex) όταν απομονώνονται μόρια DNA μικρού μεγέθους (<10 kb) και με ήπια ανακίνηση όταν απομονώνονται μόρια DNA μέτριου μεγέθους (10-30 kb). Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί το μεγαλο-μοριακό DNA (>30 kb) όπου η ανάμειξη των δύο φάσεων πραγματοποιείται με περιστροφή σε 20 rpm, ώστε αυτό να μην τμηματοποιηθεί (degraded).

Άσκηση 4

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

A. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΓΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ (LIGATION)

Τι είναι η κλωνοποίηση

Ένα γονιδίωμα μπορεί να περιέχει από λίγα μέχρι δεκάδες χιλιάδες γονίδια. Το ευκαρυωτικό μάλιστα γονιδίωμα περιέχει εκτός από γονίδια και περιοχές που δεν περιέχουν καμία πληροφορία. Αν λοιπόν θέλουμε να μελετήσουμε ένα γονίδιο ή οποιαδήποτε άλλη συγκεκριμένη αλληλουχία είναι αναγκαίο να την απομονώσουμε από την πληθώρα των αλληλουχιών που την περιβάλλουν, στη συνέχεια να την εισαγάγουμε σε έναν «εύχρηστο» φορέα, ώστε να μπορέσουμε να την αναπαράγουμε με σκοπό τη χρησιμοποίησή της σε διάφορες πειραματικές διαδικασίες. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μοριακή κλωνοποίηση.

Ένζυμα περιορισμού και πλασμιδιακή κλωνοποίηση

Την επανάσταση στην κλωνοποίηση γονιδίων έφερε η ανακάλυψη των ενζύμων περιορισμού. Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες “ψαλίδια” που αναγνωρίζουν ειδικά μια βραχεία αλληλουχία νουκλεοτιδίων (στην οποία προσδένονται) και στη συνέχεια τέμνουν το δίκλωνο DNA (συνήθως στη θέση-στόχο ή, μερικές φορές σε μια γειτονική θέση, ανάλογα με τον τύπο τους). Το αποτέλεσμα της δράσης τους είναι η παραγωγή δύο σημείων κοπής, ένα σε κάθε μια από τις αλυσίδες της διπλής έλικας. Το ένζυμο περιορισμού επιτυγχάνει την κοπή του DNA χωρίς καταστροφή των βάσεων του DNA με αποτέλεσμα οι διασπασθέντες φωσφοδιεστερικοί δεσμοί να μπορούν να αποκατασταθούν. Καθώς μάλιστα τα ένζυμα περιορισμού συχνά όταν τέμνουν το DNA αφήνουν προεξέχοντα άκρα πάνω στη διπλή έλικα, έγινε δυνατή η σύνδεση τμημάτων DNA με συμπληρωματικά άκρα από άλλα ένζυμα γνωστά ως λιγάσες DNA. Παράλληλα, η διαπίστωση ότι η

ανθεκτικότητα ορισμένων βακτηρίων σε αντιβιοτικά οφείλεται στην ύπαρξη (και έκφραση) γονιδίων ανθεκτικότητας που βρίσκονται όχι στο χρωμοσωμικό DNA των βακτηρίων αλλά σε κάποια άλλα ημι-αυτόνομα κυκλικά μόρια DNA που βρίσκονται μέσα στο βακτηριακό κύτταρο, μετέτρεψε την κλωνοποίηση σε μία τεχνική ρουτίνας. Τα μόρια αυτά ονομάστηκαν πλασμίδια.

Χρησιμοποιώντας, έτσι, τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού είναι δυνατό να κόψουμε το πλασμίδιο σε ένα ή και περισσότερα σημεία. Αν μάλιστα η θέση είναι μοναδική τότε το κυκλικό μόριο μετατρέπεται σε γραμμικό τμήμα DNA (linearised). Στη συνέχεια, το γραμμικό πια μόριο του πλασμιδίου μπορεί, με κατάλληλους χειρισμούς σύνδεσης, να ενωθεί με άλλο τμήμα DNA (π.χ. γονίδιο) και να δημιουργηθεί ένα νέο κυκλικό μόριο χίμαιρα. Το τροποποιημένο αυτό πλασμίδιο αν εισαχθεί σε βακτήρια, μπορεί να αναπαραχθεί (ανάλογα με το είδος του πλασμιδιακού φορέα) σε εκατοντάδες αντίγραφα σε κάθε κυτταρική διαίρεση των βακτηρίων. Έτσι, το γονίδιο και οι ιδιότητές του, μεταβιβάζονται στις επόμενες γενεές του βακτηρίου.

Τα μόρια DNA που συμμετέχουν στην κλωνοποίηση

Το κλειδί στην υπόθεση της κλωνοποίησης είναι η σύνδεση της αλληλουχίας DNA που μας ενδιαφέρει (μόριο στόχος) με ένα φορέα -μόριο DNA.

- Το μόριο στόχος, δηλαδή το τμήμα εκείνο του DNA που θέλουμε να μελετήσουμε, μπορεί να προέρχεται από:

1. Γονιδιωματικό DNA - δηλαδή από τις αλληλουχίες που υπάρχουν στα χρωμοσώματα τού υπό μελέτη οργανισμού και άρα αποτελούν την πιο άμεση πηγή DNA

2. cDNA – (συμπληρωματικό DNA), το οποίο στην πραγματικότητα αποτελεί τη δίκλωνη DNA εκδοχή ενός μορίου mRNA, το οποίο έχει απομονωθεί από τον οργανισμό δότη. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ένα μόριο mRNA χρησιμοποιείται σαν μήτρα και συντίθεται ένα μονόκλωνο μόριο DNA το οποίο χρησιμοποιείται σαν μήτρα για την σύνθεση

δίκλωνου μορίου DNA. Το cDNA χρησιμοποιείται ευρύτατα για την κλωνοποίηση γονιδίων ευκαρυωτικών κυττάρων σε προκαρυωτικά, ώστε να παραχθεί η πρωτεΐνη που αυτά κωδικοποιούν σε μεγάλες ποσότητες, καθώς τα mRNA είναι λιγότερο σταθερά από το DNA και δεν υπάρχουν τεχνικές για να τα αναπαράγουμε εύκολα στο εργαστήριο.

- Ο φορέας αποτελεί ένα μόριο DNA, το οποίο έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

1. Μπορεί να έχει αναπαραχθεί σε έναν ξενιστή (π.χ. βακτηριακό κύτταρο), χωρίς όμως να ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του.
2. Μπορεί να αντιγράφεται μετά την είσοδο του στον ξενιστή και να πολλαπλασιάζεται σε πολλά αντίγραφα.
3. Μπορεί να δίδει στον ξενιστή ιδιότητες που παρέχουν τη δυνατότητα στον ερευνητή να επιλέξει εκείνα τα κύτταρα που περιέχουν τον ανασυνδυασμένο φορέα ανάμεσα στις χιλιάδες που δεν τον περιέχουν (π.χ. ικανότητα σύνθεσης γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά).

Σήμερα έχουν κατασκευαστεί πλασμίδια που φέρουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά και είναι από τα πιο εύχρηστα μόρια DNA για κλωνοποίηση.

Πλασμίδιο

Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά, δίκλινα μόρια DNA που μπορούν να αναπτύσσονται ημι-αυτόνομα σε βακτήρια. Ένα τυπικό πλασμίδιο-φορέας κλωνοποίησης πρέπει να περιέχει:

- Μια περιοχή *ori* (origin of replication) για ανεξάρτητη έναρξη της αντιγραφής, ώστε να μπορεί να αντιγράφεται στο βακτηριακό κύτταρο ανεξάρτητα από το βακτηριακό χρωμόσωμα
- Ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ένα (ή και περισσότερα) αντιβιοτικά για δυνατότητα εργαστηριακής επιλογής (π.χ. Amp, Tet, Kan). (Bolivar et al., 1977; Bernard, 1995)
- Ένα γονίδιο αναφοράς, συνήθως το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, που επιτρέπει την ταυτοποίηση των βακτηρίων τα οποία έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (Άσκηση 5)
- Μια περιοχή πολυσυνδέτη. Η περιοχή αυτή περιέχει τις θέσεις αναγνώρισης πολλών ενζύμων περιορισμού ώστε να μπορεί να κατατηθεί και να ενσωματώσει ένα ξένο τμήμα DNA.

- Το μοριακό τους βάρος προτιμάται να είναι μικρό. Τα μικρού MB πλασμίδια έχουν μεγάλη ικανότητα μετασχηματισμού και το αντίστροφο.

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται στην κλωνοποίηση μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις ομάδες με βάση τα άκρα που παρουσιάζουν, δηλαδή συμπληρωματικά, τυφλά και άκρα θυμίνης (χρησιμοποιούνται στην κλωνοποίηση προϊόντων PCR).

Συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα

Η διαδικασία περιλαμβάνει κατάτμηση με την κατάλληλη ενδονουκλεάση περιορισμού σε συγκεκριμένη θέση του πολυσυνδέτη ώστε να δημιουργηθούν τα επιθυμητά άκρα και απομάκρυνση των ακραίων φωσφορικών ομάδων ώστε να αποτραπεί η επανακυκλοποίηση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου. Η αποφωσφορυλίωση του φορέα πραγματοποιείται με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, μια διμερή γλυκοπρωτεΐνη (CI- Calf Intestinal), η οποία καταλύει την αφαίρεση των φωσφορικών ομάδων από τα 5' άκρα του πλασμιδίου, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών με τα ελεύθερα 3' άκρα του και συνεπώς την επανακυκλοποίησή του (Seeburg et al., 1977; Ullrich et al., 1977).

Φορέας T- άκρων

Η διαδικασία περιλαμβάνει την κατάτμηση του πλασμιδίου με ενδονουκλεάση περιορισμού σε θέση του πολυσυνδέτη η οποία δημιουργεί τυφλά άκρα και την επώαση του γραμμοποιημένου φορέα με Ταq πολυμεράση παρουσία dTTPs, ώστε να προστεθούν στα 3' άκρα βάσεις θυμίνης (3'-T overhangs). Η μέθοδος εκμεταλλεύεται την ιδιότητα των κοινών Ταq DNA πολυμερασών (μη επιδιορθωτικού ελέγχου-non proofreading) να προσθέτει δεοξυαδενοσίνες στο 3' άκρο των δίκλωνων DNA μορίων (Aslanidis & de Jong, 1990) με αποτέλεσμα η υποκλωνοποίηση των προϊόντων PCR να πραγματοποιείται σε γραμμικό πλασμίδιο που έχει προεξέχοντα 3'-T άκρα.

Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA

Η κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στην πιο απλή της μορφή περιλαμβάνει μια διαμοριακή αντίδραση στην οποία το ένα άκρο ενός γραμμικού πλασμιδιακού φορέα συνδέεται με το ένα άκρο του ενθέματος με τη δράση DNA λιγάσης για το σχηματισμό μιας γραμμικής DNA χίμαιρας και ακολουθείται από κυκλοποίηση με την πρόσδεση των δύο εναπομεινάντων άκρων. Η σύνδεση πραγματοποιείται με το σχηματισμό τεσσάρων φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των 5' φωσφορικών καταλοίπων (5'-P) και των 3' υδροξυλομάδων (3'-OH) στην περίπτωση όπου ο φορέας δεν έχει υποστεί αποφωσφορυλίωση (διαφορετικά σχηματίζονται δύο δεσμοί). Ο σχηματισμός των δεσμών αυτών *in vitro* καταλύεται από τα ένζυμα: α. DNA λιγάση της *E. coli* και β. DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 με ταυτόχρονη υδρόλυση ενός μορίου NAD και ενός μορίου ATP, αντίστοιχα. Η T4 DNA λιγάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιείται κυρίως διότι έχει την ικανότητα να καταλύει τη σύνδεση άκρων όλων των ειδών (τυφλά, προεξέχοντα 3' ή 5') (Sgaramella & Khorana, 1972; Sgaramella & Ehrlich, 1978) σε αντίθεση με την λιγάση της *E. coli* που καταλύει τη σύνδεση μόνο τυφλών άκρων.

Παράμετροι που επηρεάζουν την αντίδραση σύνδεσης

Η αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA επηρεάζεται από μια σειρά παραμέτρων όπως: η θερμοκρασία, η συγκέντρωση ιόντων, το είδος των άκρων του DNA (συμπληρωματικά-κολλώδη ή τυφλά), η σχετική συγκέντρωση των άκρων DNA και η συγκέντρωση και το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA. Όταν τα προεξέχοντα άκρα έχουν παραχθεί από ένζυμα περιορισμού, όπως *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* και είναι συμπληρωματικά, τα συμπληρωματικά αυτά άκρα αφορούν μόνο μερικά νουκλεοτίδια. Η θερμοκρασία που καταστρέφει τους υδρογονικούς δεσμούς μεταξύ αυτών των άκρων είναι πολύ χαμηλή. Για το ολιγονουκλεοτίδιο AATT που παράγεται από το ένζυμο *EcoRI*, η θερμοκρασία στην οποία 50% των άκρων βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή (T_m) είναι μόλις 5°C. Αν και οι τιμές T_m

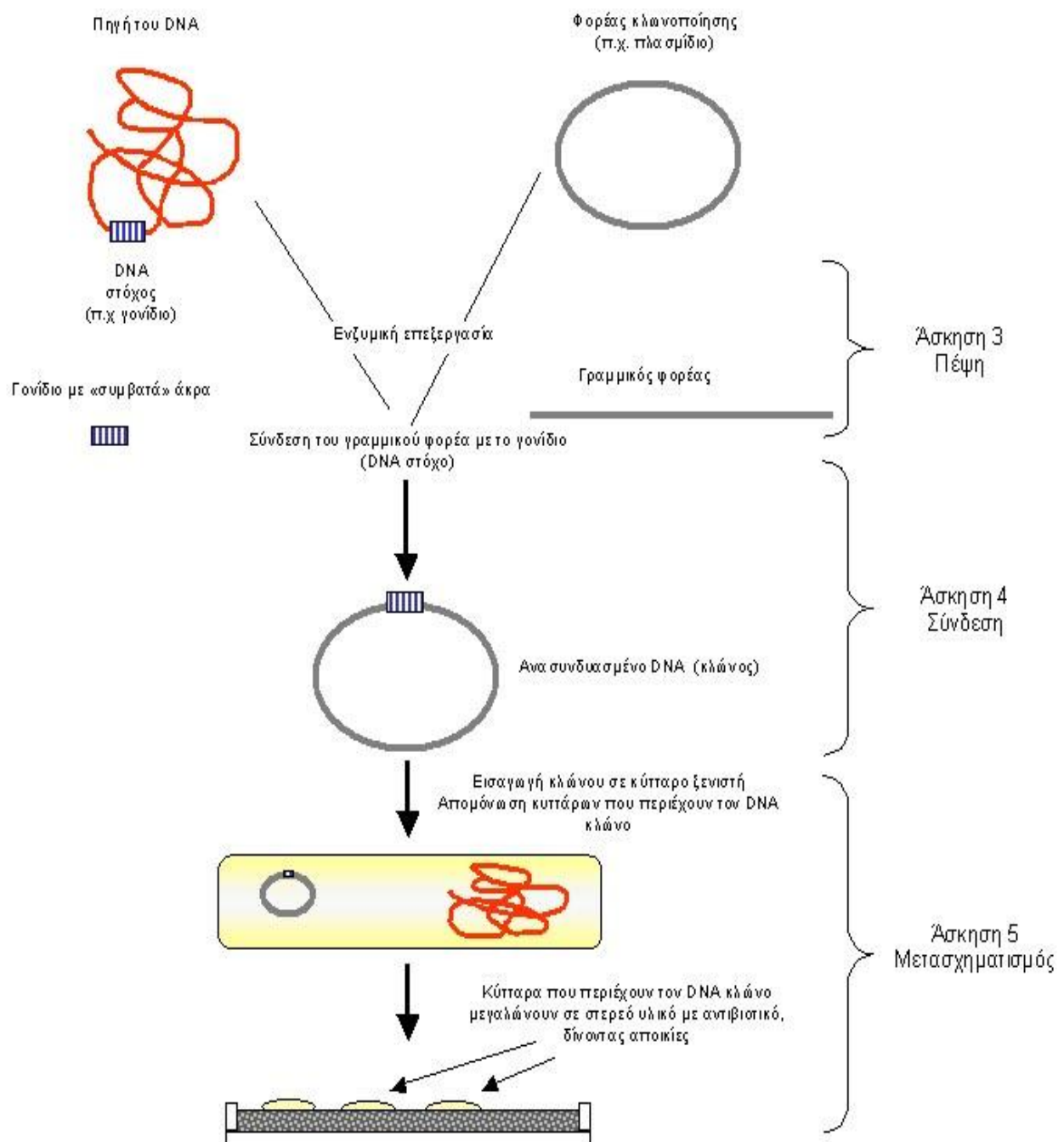
αλλάζουν με το μήκος και τη νουκλεοτιδική σύσταση των μονόκλωνων άκρων, οι τιμές T_m για τα περισσότερα άκρα που παράγονται από ένζυμα περιορισμού κυμαίνονται κάτω από τους 15°C. Η άριστη όμως θερμοκρασία για τη δράση της DNA λιγάσης είναι 37°C. Για να επιτευχθεί λοιπόν η σύνδεση τέτοιων άκρων, χρησιμοποιείται ένας συμβιβασμός μεταξύ του άριστου T_m και της άριστης θερμοκρασίας δράσης της λιγάσης που καθορίζεται στους 15°C.

Δύο άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την ταχύτητα και τη φύση της αντίδρασης σύνδεσης είναι η αποτελεσματική συγκέντρωση των δύο άκρων μιας τυχαίας έλικας DNA και η ολική συγκέντρωση άκρων που βρίσκονται στην αντίδραση. Σε μία αντίδραση σύνδεσης, ο μοριακός λόγος DNA/πλασμιδίου (δηλαδή ο λόγος των ενθεμάτων DNA προς τα μόρια του πλασμιδίου) θα πρέπει να είναι 1:1 έως 3:1. Η ποσότητα του DNA που κλωνοποιείται υπολογίζεται από τον τύπο: $ng\ DNA = ng\ \text{πλασμιδίου} \times a \times b$, όπου a ο μοριακός λόγος DNA/πλασμιδίου και b ο λόγος μεγέθους DNA/πλασμιδίου.

Παράδειγμα

Πόσο DNA θα προσθέσουμε (σε ng) από ένα ένθεμα 500 bp σε 100 ng ενός φορέα 3.0 kb σε μια αντίδραση σύνδεσης εάν επιθυμώ μοριακό λόγο ενθέματος/φορέα 3:1; Τι ποσότητες (σε μl) θα βάλετε στην αντίδραση;

(Μετά από εμπειρική ποσοτικοποίηση των ποσοτήτων DNA που θα χρησιμοποιήσουμε, αφού έχουμε τρέξει 1 μl από κάθε δείγμα σε πήκτωμα αγαρόζης, ξέρουμε ότι έχουμε 200 ng/μl DNA φορέα και 100 ng/μl DNA ενθέματος).



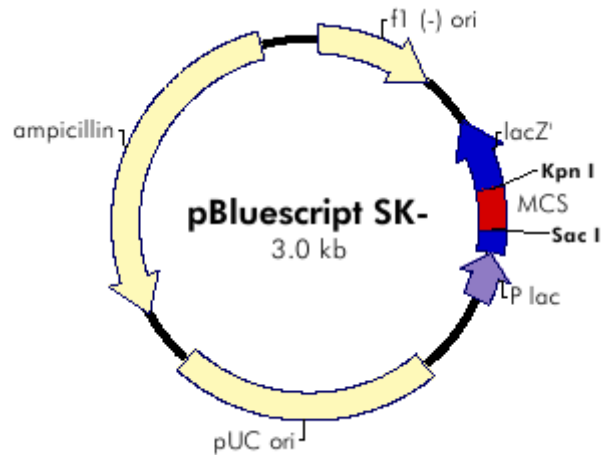
Βασικά στάδια στην κλωνοποίηση γονιδίων

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

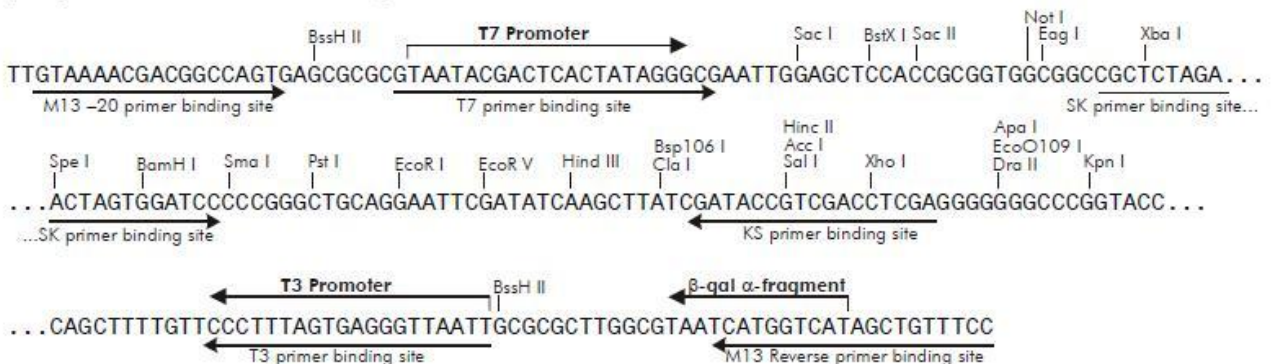
Σκοπός της άσκησης είναι η προετοιμασία των προϊόντων PCR της προηγούμενης άσκησης, ώστε να μπορούν να κλωνοποιηθούν σε κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης. Όπως προαναφέρθηκε, η Taq πολυμεράση έχει την ιδιότητα να προσθέτει μία αδενίνη στο τέλος της αντιγραφής, με αποτέλεσμα τα PCR προϊόντα να έχουν προεξέχοντα 3' άκρα. Εκμεταλλευόμενοι αυτή την ιδιότητα, δημιουργούμε έναν φορέα κλωνοποίησης, ξεκινώντας από τον κυκλικό φορέα *pBlueScript II*. Ο φορέας αυτός πέπτεται με την ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRV* και ακολουθεί μια αντίδραση τύπου PCR (με Taq πολυμεράση και dTTP), που σκοπό έχει να δημιουργήσει 3' προεξέχοντα άκρα θυμίνης (T). Έτσι, ο φορέας έχει πλέον συμπληρωματικά άκρα με κάθε PCR προϊόν και μπορεί να γίνει αντίδραση σύνδεσης μεταξύ κολλωδών άκρων από το ένζυμο DNA λιγάση (ο φορέας αυτός είναι έτοιμος, δεν θα τον φτιάξετε εσείς).

pBluescript II KS(+)

Ο φορέας αυτός χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη ποικιλία θέσεων αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού για την κλωνοποίηση των ενθεμάτων και την παρουσία των υποκινητών/εκκινητών T3 και T7 εκατέρωθεν της θέσης κλωνοποίησης. Γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για την κλωνοποίηση μορίων DNA με σκοπό είτε την ανάλυση του προτύπου τμηματοποίησης τους από ενδονουκλεάσες περιορισμού, είτε τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους σύστασης με εκκινητές T3 και T7, είτε την *in vitro* μεταγραφή τους από RNA πολυμεράσες που αναγνωρίζουν αυτούς τους υποκινητές. Επιπλέον, η θέση κλωνοποίησης βρίσκεται στην κωδική περιοχή του γονιδίου *LacZ*, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η επιλογή των ανασυνδυασμένων βακτηριακών αποικιών ανιχνεύοντας τη β-γαλακτοσιδάση (παρουσία X-gal) στις μη ανασυνδυασμένες αποικίες (όπως θα αναλύσουμε στην Άσκηση 5).



pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



Γραφική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pBluescript II KS(+). Ο φορέας φέρει πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης των ενθεμάτων (MCS) στην κωδική περιοχή του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (LacZ), υποκινητές/εκκινητές T3 και T7, θέσεις έναρξης της αντιγραφής (f1 και PUC), υποκινητή του γονιδίου *LacZ* και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (*Amp^R*), ως δείκτη επιλογής.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Ηλεκτροφορούμε 10μl από τα 20μl που έχουμε από κάθε αντίδραση PCR, προκειμένου να κάνουμε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Η πορεία είναι ίδια με της Άσκησης 2.

2. Αντίδραση σύνδεσης με τη χρήση T4 DNA λιγάσης

Υπολογίστε τις ποσότητες φορέα-ενθέματος που θα χρησιμοποιήσετε, αν θέλετε μοριακό λόγο 3:1, και ετοιμάστε τις αντιδράσεις 1 και 2.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Αντίδραση 1		Ποσότητες	Αντίδραση 2	
		Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση		Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
DNA φορέα		50 ng/μl	50 ng		50 ng/μl	50 ng
(1) PCR Γονιδιωματικού DNA					---	---
(2) PCR cDNA		---	---			
Ρυθμιστικό διάλυμα		10X	1X		10X	1X
T4 DNA λιγάση		5 u/μl	5 unit		5 u/μl	5 unit
H ₂ O						
Τελικός όγκος	10 μl			10 μl		

3. Επώαση στους 16°C για χρόνο περίπου 16 h.

4. Μετά το τέλος της επώασης, οι αντιδράσεις διατηρούνται στους -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για το μετασχηματισμό βακτηρίων (Άσκηση 5).

Σημειώσεις

- ✓ Η έλλειψη προεξεχόντων συμπληρωματικών άκρων κάνει την αντίδραση πιο σύνθετη και σημαντικά πιο αργή. Ένας λόγος γι αυτό είναι ότι τα τυφλά άκρα δεν ενώνονται πριν από τη σύνδεση και έτσι ο χρόνος που μεσολαβεί όταν βρεθούν αντιμέτωπα το 5'-P και το 3'-OH άκρα είναι εξαιρετικά μικρός. Για να επιτευχθεί ρυθμός σύνδεσης παρόμοιος με μια αντίδραση συμπληρωματικών άκρων, χρειάζεται 10-30 φορές περισσότερη T4 DNA λιγάση για τη σύνδεση τυφλών άκρων.

Άσκηση 5

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

B. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ (ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η ανάπτυξη των τεχνικών εισαγωγής ανασυνδυασμένου DNA σε κοινούς εργαστηριακούς οργανισμούς, όπως το βακτήριο *E. coli*, επέτρεψε την αποτελεσματική πραγματοποίηση των τεχνικών κλωνοποίησης. Χωρίς την εισαγωγή τους σε βακτήρια τα μόρια DNA που έχουν σχηματιστεί *in vitro* με DNA λιγάση, θα καταστρέφονταν μέσα σε λίγες ώρες. Βέβαια, αξ σημειωθεί ότι οι μικροοργανισμοί από τη φύση τους έχουν την ικανότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό. Η ανταλλαγή γενετικής πληροφορίας μεταξύ βακτηρίων γίνεται με σύζευξη, επαγωγή και μετασχηματισμό.

Σύζευξη

Οι πρώτες πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα του βακτηρίου *E. coli* να ανταλλάζει γενετικό υλικό παρουσιάστηκαν το 1946 από τους Lederberg και Tatum. Όταν δύο αυξότροφα στελέχη μεγάλωναν μαζί, βρέθηκε ότι μπορούσαν να παράγουν πρωτοτροφικά βακτήρια. Ο τρόπος της γενετικής αυτής ανταλλαγής λέγεται σύζευξη και χρειάζεται φυσική επαφή μεταξύ των βακτηρίων. Ως προς τη σύζευξη, καθορίζονται δύο φαινότυποι των βακτηριακών κυττάρων: F^+ , που έχει την ικανότητα να είναι δότης γενετικής πληροφορίας και F^- που είναι δέκτης. Η βακτηριακή σύζευξη έχει δύο συνέπειες, τη μεταφορά γενετικού υλικού από το δότη στο δέκτη και τη μετατροπή του δέκτη από F^- σε F^+ φαινότυπο. Η βάση του φαινομένου αυτού εξηγείται από την ύπαρξη του παράγοντα γονιμότητας F (fertility), ενός εξωχρωμοσωματικού στοιχείου που μπορεί να κινητοποιείται και να μεταφέρεται από ένα βακτηριακό στέλεχος σε άλλο. Στην πορεία, περιοχές του βακτηριακού χρωμοσώματος μπορούν επίσης να

κινητοποιηθούν και να μεταφερθούν. Πιθανοί ανασυνδυασμοί που γίνονται στο δέκτη έχουν σαν αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του κινητοποιημένου DNA στο χρωμόσωμα και οδηγούν στη δημιουργία σταθερών ανασυνδυασμένων στελεχών. Η κινητοποίηση χρωμοσωματικών γονιδίων από τον παράγοντα F συμβαίνει σε χαμηλή συχνότητα και τυχαία. Ο φαινότυπος Hfr απομονώθηκε με βάση την ιδιότητά του να προάγει υψηλή συχνότητα μεταβίβασης και ανασυνδυασμού χρωμοσωματικού DNA. Τα Hfr στελέχη λειτουργούν μόνο σαν ικανοί δότες, όχι σαν δέκτες, αλλά ο φαινότυπος Hfr δεν μεταφέρεται στο δέκτη όπως γίνεται με τον F^+ . Η φύση και η υψηλή συχνότητα της μεταφοράς γενετικού υλικού στα Hfr στελέχη, τα κατέστησε πολύ χρήσιμα στη δημιουργία του χρωμοσωματικού γενετικού χάρτη του βακτηρίου *E. coli*.

Επαγωγή

Παρόλο που διάφορες μορφές του παράγοντα γονιμότητας F παίρνουν μέρος στη μεταφορά χρωμοσωματικών γονιδίων μεταξύ βακτηρίων, η μεταφορά μπορεί να γίνει και από βακτηριοφάγους. Οι βακτηριοφάγοι είναι ικανοί για λυσιγονία, δηλαδή εισαγωγή του DNA τους στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Κατά τη διάρκεια επαγωγής του λυσιγονικού φάγου, συμβαίνουν ανασυνδυασμοί του DNA που μπορούν να παράγουν ένα κυκλικό μόριο που περιέχει κομμάτι του φάγου ενωμένο με χρωμοσωματικό DNA από την περιοχή στην οποία είχε εισαχθεί ο φάγος. Τα ελαττωματικά αυτά σωματίδια φάγων μπορούν να ελευθερωθούν από το μολυσμένο βακτήριο και να μολύνουν στη συνέχεια άλλα. Ακολουθώντας ξανά το λυσιγονικό κύκλο επιτυγχάνεται η εισαγωγή στα βακτήρια δέκτες, γονιδίων από τη χρωμοσωματική περιοχή της προηγούμενης λυσιγονικής θέσης. Ο τρόπος αυτός ανταλλαγής γενετικού υλικού λέγεται περιορισμένη επαγωγή.

Πολλοί βακτηριοφάγοι μπορούν να διεκπεραιώσουν μια λειτουργία που λέγεται γενική επαγωγή. Σε αυτή την πορεία κάθε χρωμοσωματική περιοχή έχει ίδιες πιθανότητες μεταφοράς στο βακτήριο δέκτη. Τα σωματίδια επαγωγής αποτελούνται από κομμάτια βακτηριακού DNA ενσωματωμένων σε κάψουλες φάγου από τις οποίες λείπει το DNA του φάγου. Μετά από λύση των

βακτηρίων και μόλυνση άλλων βακτηρίων από τους φάγους αυτούς, μερικά από τα βακτήρια του πληθυσμού θα περιέχουν το νέο βακτηριακό DNA. Μετά από ανασυνδυασμό και ενσωμάτωση του DNA αυτού προκύπτουν αλλαγές στο φαινότυπο του βακτηρίου δέκτη.

Μετασχηματισμός

Μετασχηματισμός καλείται η κληρονομήσιμη αλλαγή στις ιδιότητες ενός βακτηριακού στελέχους που προέρχεται από τη μεταφορά DNA ενός άλλου βακτηρίου. Η απελευθέρωση τμημάτων DNA που προκύπτει από λύση και θάνατο κυττάρων, προσφέρει μία φυσική πηγή γενετικού υλικού για ανασυνδυασμό κατά την αύξηση των μικροοργανισμών στο φυσικό τους περιβάλλον. Ο γενετικός αυτός μετασχηματισμός έχει παρατηρηθεί σε μια πληθώρα βακτηρίων, που κατά τη διάρκεια της αύξησης εισέρχονται σε ένα στάδιο ικανότητας στο οποίο δύνανται να προσλάβουν εξωγενές DNA.

Ικανά βακτηριακά κύτταρα είναι σε θέση να προσδέσουν νουκλεϊκά οξέα σε μορφή που είναι ανθεκτική στη δράση νουκλεασών. Σε διάφορα στελέχη βακτηρίων έχουν βρεθεί πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA και που η λειτουργία τους είναι αναγκαία για την αρχική φάση του μετασχηματισμού. Μετά την πρόσληψή του από ένα βακτηριακό κύτταρο, το DNA εισέρχεται σε μια περίοδο που λέγεται εκλειπτική φάση κατά την οποία παραμένει ανθεκτικό στη δράση νουκλεασών αλλά δεν εκφράζεται η γενετική του πληροφορία. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής γίνεται ανασυνδυασμός του DNA με ομόλογες αλληλουχίες στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Μετά την ολοκλήρωση του ανασυνδυασμού, η γενετική πληροφορία που βρίσκεται ενσωματωμένη στο βακτηριακό χρωμόσωμα μπορεί να εκφραστεί έχοντας σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση του λειτουργικού μετασχηματισμένου κυττάρου

Μέθοδοι μετασχηματισμού

Οι πρώτες προσπάθειες για μετασχηματισμό του βακτηρίου *E. coli* ήταν ανεπιτυχείς, υποδηλώνοντας ότι αυτό το βακτήριο δεν κατέχει το φυσικό μηχανισμό του μετασχηματισμού. Σύντομα όμως βρέθηκε ότι η ικανότητα εισαγωγής εξωγενούς DNA στο στέλεχος *E. coli* μπορούσε να επαχθεί τεχνητά. Το 1970 οι

Mandel και Higa έδειξαν ότι βακτήρια κατεργασμένα με παγωμένο διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) αν θερμανθούν για μικρό χρονικό διάστημα, μπορούν να μετασχηματιστούν με DNA βακτηριοφάγου λ, ενώ το 1982 η ερευνητική ομάδα του Neuman κατάφερε την εισαγωγή DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης.

Μετασχηματισμός με CaCl_2

Η εργαστηριακή πορεία έχει ως εξής: Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* που βρίσκονται στη φάση ανάπτυξης εκτίθενται σε υποτονικό διάλυμα CaCl_2 στους 0°C που έχει σαν συνέπεια τη διόγκωσή τους (σχηματισμός σφαιροπλαστών). DNA προστίθεται κατόπιν στο μείγμα μετασχηματισμού και σχηματίζει ένα σύμπλοκο φωσφορικού υδροξυλίου του ασβεστίου, που είναι ανθεκτικό στη δράση DNAσών. Το σύμπλοκο αυτό κολλάει στην επιφάνεια των σφαιροπλαστών. Με μία σύντομη έκθεση του μείγματος σε υψηλή θερμοκρασία 42°C (θερμικό σοκ), τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να ενσωματώσουν τα σύμπλοκα DNA. Μετά από ορισμένες ώρες καλλιέργειας σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και χαμηλές στροφές ώστε να "επουλωθούν" τα κύτταρα και να εκφράσουν το γονίδιο της ανθεκτικότητας, τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιλέγονται και απομονώνονται με επίστρωση σε τρυβλία που φέρουν επιλεκτικό θρεπτικό υλικό (αντιβιοτικά).

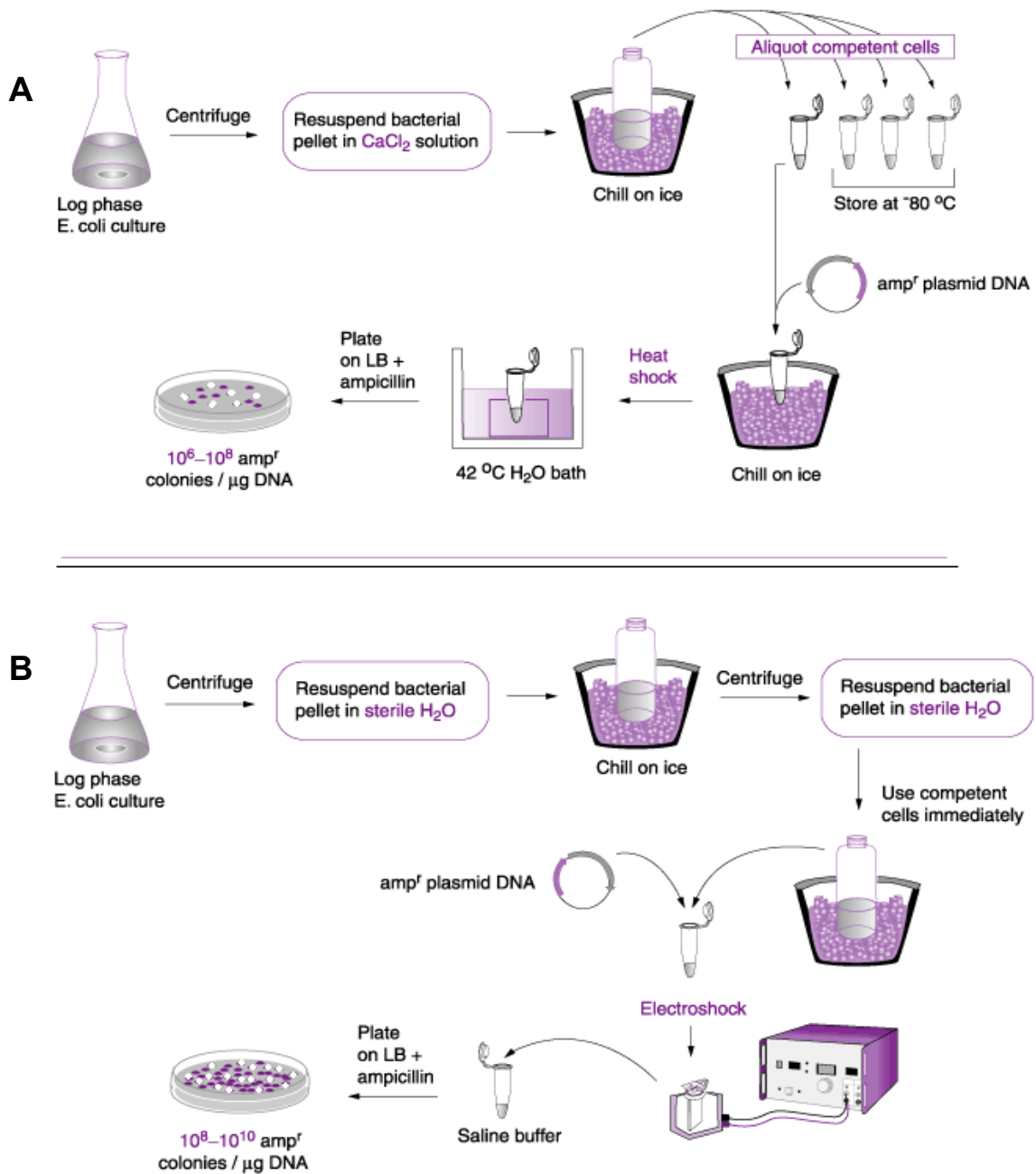
Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής εξαρτάται από: 1. την αποτελεσματική δημιουργία σφαιροπλαστών, 2. τη ζωτικότητα των κυττάρων μετά από την επεξεργασία με CaCl_2 , 3. το χρόνο και τις συνθήκες αποθήκευσης των δεκτικών κυττάρων, 4. τη συγκέντρωση, δομή και καθαρότητα του DNA. Η απόδοση της μεθόδου μπορεί να προσεγγίσει τις 5×10^7 αποικίες/μg πλασμιδιακού DNA υπερελικωμένης μορφής.

Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση

Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάπτυξη κυττάρων έως το μέσο της εκθετικής φάσης και διαδοχικές πλύσεις σε διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύος, ώστε να μειωθεί η ιονικής ισχύς του εναιωρήματος. Στη συνέχεια με εφαρμογή εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου προκαλείται αύξηση στην ηλεκτρική αγωγιμότητα και διαπερατότητα της

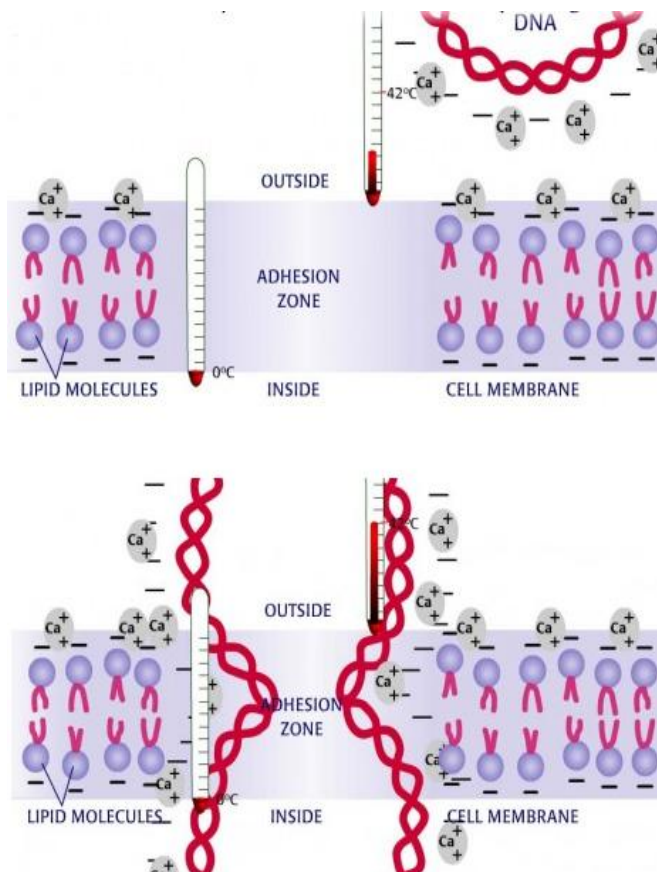
πλασματικής μεμβράνης, επιτρέποντας έτσι την είσοδο του DNA. Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν απαιτεί το σχηματισμό σφαιροπλάστων. Τα κύτταρα αναδιαλύονται σε διάλυμα γλυκερόλης 10% σε συγκέντρωση 3×10^{10} κύτταρα/ml και διατηρούνται σε θερμοκρασία -80°C . Η απόδοση κυμαίνεται από 10^9 έως 10^{10} αποικίες/μg DNA και εξαρτάται από παράγοντες όπως η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το μήκος του ηλεκτρικού παλμού και η συγκέντρωση του DNA (Dower et al., 1988).

Ο μηχανισμός εισαγωγής του DNA στο κύτταρο είτε με θερμικό σοκ είτε με ηλεκτροδιάρθρωση βασίζεται στη σχετικά ασθενή φύση των υδροφοβικών / υδροφιλικών αλληλεπιδράσεων της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας, αλλά και στην ικανότητά της να ανασυγκροτείται αυθόρμητα, μετά τη διαταραχή της. Στην περίπτωση του θερμικού σοκ η διαφορά θερμοκρασίας που δημιουργείται εσωτερικά και εξωτερικά της μεμβράνης του κυττάρου προκαλεί την απελευθέρωση λιπιδίων και πρωτεϊνών από την



Εικόνα 1: Μέθοδοι μετασχηματισμού. Α. Μετασχηματισμός με CaCl_2 **Β.** Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάρθρωση. Οι λευκές αποικίες και στις δύο περιπτώσεις αντιστοιχούν σε βακτήρια που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

εξωτερική μεμβράνη, ενώ στην ηλεκτροδιάρθρωση η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί αλλαγή στο δυναμικό της πλασματικής μεμβράνης, η οποία στη συνέχεια φορτίζεται. Και στις δύο περιπτώσεις προκαλείται τοπική αναδιάταξη των λιπιδίων με αποτέλεσμα τη δημιουργία υδρόφοβων πόρων που σταδιακά μετατρέπονται σε υδρόφιλους. Μέσα από τους υδρόφιλους αυτούς πόρους μπορούν να περάσουν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA που βρίσκονται στο διάλυμα που περιβάλλει τα κύτταρα. Καθώς συμβαίνει αυτή η μετακίνηση, η μεμβράνη αποφορτίζεται και οι πόροι αρχίζουν να κλείνουν, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας (Panja et al., 2008).



Εικόνα 2: Εισαγωγή εξωγενούς DNA με το μηχανισμό του θερμικού σοκ

Ένα σημαντικό στοιχείο είναι η δομή/μορφή του DNA που εισέρχεται στα κύτταρα. Έχει βρεθεί ότι το κυκλικό πλασμιδιακό DNA είναι 10-100 φορές πιο αποτελεσματικό από το γραμμικό DNA του ίδιου πλασμιδίου, για το μετασχηματισμό του βακτηρίου *E. coli*. Τα κυκλικά μόρια DNA είναι ανθεκτικά στη

δράση εξωνουκλεασών των βακτηρίων, ενώ τα γραμμικά μόρια υφίστανται αποικοδόμηση των ελεύθερων άκρων τους. Μετασχηματισμός με γραμμικά μόρια DNA συνεπάγεται, εκτός από την είσοδό τους στα κύτταρα, και τη μετατροπή τους σε κυκλικά ώστε να επιτευχθεί η αντιγραφή του πλασμιδίου. Η κυκλοποίηση αυτή εμποδίζεται από την αλλαγή των άκρων των γραμμικών μορίων. Γι' αυτό τον λόγο, επιτυχής κυκλοποίηση και αντιγραφή γραμμικού πλασμιδιακού DNA σε ένα βακτηριακό κύτταρο προσδιορίζεται από τον ανταγωνισμό μεταξύ της δράσης της DNA λιγάσης που φτιάχνει το κυκλικό μόριο και των εξωνουκλεασών που αποικοδομούν τα άκρα του μορίου.

Τα βακτήρια έχουν ένα σύστημα περιορισμού-τροποποίησης του DNA. Τα ένζυμα περιορισμού ενός βακτηρίου-ξενιστή πέπτουν DNA το οποίο δεν έχει τροποποιηθεί από το σύστημα τροποποίησης του ίδιου στελέχους. Αν π.χ. πλασμιδιακό DNA απομονωμένο από *E. coli* C-600 χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό *E. coli* K-12, το σύστημα περιορισμού του ξενιστή K-12 θα πέψει το μη τροποποιημένο C-600 DNA όταν εισαχθεί στο κύτταρο και κατά συνέπεια θα ελαττωθεί σημαντικά η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού. Αντίθετα, DNA απομονωμένο από ένα στέλεχος K-12 είναι ήδη τροποποιημένο από το σύστημα του ξενιστή και έτσι ο μετασχηματισμός ενός άλλου στελέχους *E. coli* K-12 με αυτό το DNA συμβαίνει με πολύ υψηλή αποτελεσματικότητα. Αν χρησιμοποιηθεί DNA ενός οργανισμού, άλλου από *E. coli*, για το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E. coli*, το DNA αυτό που δεν έχει καταλλήλως τροποποιηθεί, θα καταστραφεί από το σύστημα περιορισμού του ξενιστή. Για να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό, τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση και διατήρηση ανασυνδυασμένου DNA είναι ελαττωματικά στο σύστημα περιορισμού (*hsdR*⁻) και στο σύστημα τροποποίησης (*hsdM*⁻). Η χρησιμοποίηση στελεχών με τον φαινότυπο *hsdR*⁻ προφυλάσσει από τον περιορισμό το εισερχόμενο DNA και έτσι αυξάνει την αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού βακτηρίων με ετερόλογο DNA. Η παρουσία λειτουργικού συστήματος τροποποίησης σε ένα στέλεχος που είναι ελαττωματικό στο σύστημα περιορισμού (*r⁻m⁺*) δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού με DNA απομονωμένο από

τέτοιο στέλεχος σε άλλο στέλεχος που δεν έχει τον ίδιο φαινότυπο περιορισμού. Για παράδειγμα, πλασμιδιακό DNA απομονωμένο από στέλεχος *E. coli* $r_k^-m_k^+$ μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για το μετασχηματισμό ενός στελέχους με φαινότυπο $r_k^+m_k^+$.

Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων

Η επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων, αυτών δηλαδή που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη, πραγματοποιείται με την παρουσία του αντιβιοτικού που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο των τρυβλίων. Η επιλογή των βακτηρίων που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πραγματοποιείται με τον έλεγχο της α-συμπληρωματικότητας. Τα πλασμίδια-φορείς που χρησιμοποιούνται στην α-συμπληρωματικότητα φέρουν: 1. ένα τμήμα του DNA της *E. coli* που περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και την κωδική πληροφορία των πρώτων 146 αμινοξέων του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*) και 2. την αλληλουχία του πολυσυνδέτη (polylinker) ενσωματωμένη (στο ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης) στο γονίδιο *lacZ*. Ο πολυσυνδέτης δηλαδή δε διακόπτει το αναγνωστικό πλαίσιο αλλά απλώς προσθέτει κάποια αμινοξέα στο προϊόν του γονιδίου. Οι φορείς αυτοί χρησιμοποιούνται σε βακτηριάκα στελέχη τα οποία κωδικοποιούν το καρβοξυτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης. Με τον τρόπο αυτό ούτε οι φορείς ούτε τα κύτταρα μπορούν από μόνα τους να δώσουν μία ενεργή μορφή, μπορούν όμως να συνδυαστούν και να δώσουν μια ενζυμικά ενεργή πρωτεΐνη (Ullman et al., 1967). Τα *lac+* βακτήρια γίνονται εύκολα αντιληπτά λόγω της δημιουργίας μπλε αποικιών παρουσία του χρωμογόνου υποστρώματος X-gal (Horwitz et al., 1964). Συνεπώς, εάν το πλασμίδιο δεν έχει ανασυνδυαστεί, το γονίδιο *lacZ* εκφράζεται κανονικά και σε συνδυασμό με τα γονίδια βακτηρίου-ξενιστή επιτρέπει το μεταβολισμό της ουσίας X-gal και της δημιουργίας μπλε αποικιών. Αντίθετα, εάν το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *lacZ* διακόπτεται, το X-gal δεν μεταβολίζεται και ως αποτέλεσμα οι αποικίες που παράγονται έχουν χρώμα λευκό. Έτσι, παρουσία X-gal και IPTG, ο οποίος λειτουργεί ως επαγωγέας σε ορισμένα βακτηριακά στελέχη στο θρεπτικό μέσο των

τρυβλίων, οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο παρουσιάζουν λευκό χρώμα, ενώ αυτές που περιέχουν το κανονικό πλασμίδιο είναι, κατά κανόνα, μπλε.

Ο πλήρης έλεγχος των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιείται με απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, κατάτμηση με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού που διαχωρίζουν το κλωνοποιημένο DNA από τον φορέα του καθώς και με προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης του ενθέματος.

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η κατεργασία βακτηριακών κυττάρων του στελέχους DH5α της *E. coli* με CaCl_2 ώστε να καταστούν δεκτικά στην εισαγωγή μορίων DNA και στη συνέχεια ο μετασχηματισμός αυτών με το τροποποιημένο πλασμίδιο σας (το ετοιμάσατε στην προηγούμενη άσκηση), το οποίο φέρει γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη. Η είσοδος του πλασμιδίου δημιουργεί μετασχηματισμένα βακτήρια με ανθεκτικότητα και στα δύο αντιβιοτικά.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Hanahan & Meselson (1983). Η απόδοση του μετασχηματισμού εξαρτάται από την καθαρότητα των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στα διαλύματα, το στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων, την καθαρότητα του εξοπλισμού ώστε να αποφευχθεί η παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων και άλλων χημικών.

Υλικά

Θρεπτικό μέσο LB (Luria broth): ανά λίτρο 10 g Tryptone, 5 g Yeast extract, 10g NaCl και το pH προσαρμόζεται στη τιμή 7.5 με προσθήκη NaOH.

0.1 M CaCl_2

Τρυβλία LB-agar με αμπικιλίνη (100 $\mu\text{g/ml}$)

Θρεπτικό μέσο SOC: είναι το ίδιο με το LB και περιέχει επιπλέον 250 mM KCl και 20 mM γλυκόζη

ΠΡΟΣΟΧΗ: Η χρήση βακτηριακών κυττάρων (ειδικά εφόσον περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια) διέπεται από τους κανόνες ασφαλείας P1 σύμφωνα με του οποίους απαγορεύεται να ελευθερωθούν ζώντα βακτήρια στο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό λαμβάνονται μέτρα αποφυγής μόλυνσεων. Οι καλλιέργειες, θρεπτικά υλικά, πιπέτες κλπ που θα χρησιμοποιηθούν μεταφέρονται σε δοχεία που περιέχουν απολυμαντικό. Όλα τα βήματα που ακολουθούν γίνονται υπό στείρες συνθήκες.

- 1) Καλλιεργούμε κύτταρα *E. coli* σε υγρό θρεπτικό υλικό (LB) και επωάζουμε σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανάδευση έως ότου η συγκέντρωση των κυττάρων να γίνει περίπου 10^8 κύτταρα/ml ($\text{OD}_{600}=0.4-0.6$).
- 2) Μεταφέρουμε από 5 ml της βακτηριακής καλλιέργειας σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου flask όγκου 15 ml και φυγοκεντρούμε σε 8000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C για 5 min.
- 3) Αποχύνουμε το υπερκείμενο στο απολυμαντικό δοχείο, προσθέτουμε στο ίζημα 1 ml αποστειρωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl_2 και επαναδιαλύουμε ήπια.
- 4) Φυγοκεντρούμε σε 4000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C για 5 min.
- 5) Αποχύνουμε το υπερκείμενο στο απολυμαντικό δοχείο, προσθέτουμε στο ίζημα 200 μl αποστειρωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl_2 και επαναδιαλύουμε ήπια. Διατηρούμε τα δεκτικά κύτταρα στον πάγο.
- 6) Στα 200 μl δεκτικά κύτταρα προσθέτουμε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (συνήθως η μισή ποσότητα της αντίδρασης σύνδεσης), η ποσότητα του οποίου δε μπορεί να υπερβαίνει περίπου το 5% του όγκου του κυττάρων και ακολουθεί επώαση σε πάγο για 5 min.
- 7) Επωάζουμε σε θερμοκρασία 42°C (θερμικό σοκ) για 90 sec και αμέσως τα τοποθετούμε στον πάγο (στο στάδιο αυτό τα πλασμίδια εισέρχονται μέσα στα κύτταρα).
- 8) Προσθέτουμε 700 μl SOC και επωάζουμε για 30 min στους 37°C, υπό χαμηλή ανάδευση (~170rpm) (στο στάδιο αυτό τα βακτήρια αναρρώνουν από το θερμικό στρες και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται).
- 9) Επιστρώνουμε 200 μl από τα βακτήρια σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB-άγαρ που περιέχει αμπικιλίνη, X-gal και IPTG. Επωάζουμε στους 37°C για 16 ώρες περίπου, μέχρι να εμφανιστούν οι αποικίες των βακτηρίων (στο στάδιο αυτό πολλαπλασιάζονται μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα).

- 10) Μετράμε τον αριθμό των λευκών και μπλε αποικιών που σχηματίστηκαν στο τρυβλίο. Οι λευκές αποικίες αντιστοιχούν σε βακτήρια που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

Σημειώσεις

- ✓ Μπορείτε με κάποιον τρόπο να δείτε εάν δούλεψε η αντίδραση σας πριν μετασχηματίστε τα βακτήρια;
- ✓ Η καλλιέργεια *E. coli* που χρησιμοποιούμε για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων πρέπει να βρίσκεται στο μέσον περίπου της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Στο σημείο αυτό η συγκέντρωση των κυττάρων είναι περίπου 10^8 κύτταρα/ml και η απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm (OD_{600}) είναι 0.5-0.6 μονάδες.
- ✓ Το στέλεχος που χρησιμοποιείται είναι το DH5α της *E. coli* ο γενότυπος του οποίου χαρακτηρίζεται από την έλλειψη $\Delta(lacZ)M15$ που εκφράζει το καρβοξυτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης, επιτρέποντας έτσι την εφαρμογή της α-συμπληρωματικότητας.
- ✓ Η απόδοση της αρχικής μεθόδου των Mandel & Higa (1970), η οποία κυμαίνεται από 10^5 έως 10^6 μετασχηματισμένες αποικίες/μg πλασμιδίου μπορεί να αυξηθεί από 100 έως 1000 φορές με έκθεση των βακτηριακών στελεχών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε δισθενή κατιόντα και κατεργασία με DMSO, αναγωγικούς παράγοντες και χλωριούχο εξαμινοκοβάλτιο (Kushner, 1978; Hanahan, 1983).

Άσκηση: Υπολογισμός απόδοσης μετασχηματισμού. Για να υπολογίσετε την απόδοση της διαδικασίας μετασχηματισμού των δεκτικών κυττάρων πρέπει να μετρήσετε τον αριθμό των άσπρων και μπλε αποικιών που μεγάλωσαν στο τρυβλίο σας και να το διαιρέσετε με τα μg του DNA με το οποίο μετασχηματίσατε τα κύτταρά σας (colony forming units per μg of DNA: cfu/μg). Θα πρέπει να έχετε δύο μετρήσεις, μια από τον μετασχηματισμό ελέγχου με γνωστή ποσότητα DNA (control transformation) και μια από τον πειραματικό σας μετασχηματισμό.

Άσκηση 6

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από βιολογικό υλικό απαιτεί τη λύση των κυττάρων, την απενεργοποίηση των κυτταρικών νουκλεασών και το διαχωρισμό του επιθυμητού νουκλεϊκού οξέος από τα κυτταρικά υπολείμματα. Η λύση των κυττάρων, η οποία πραγματοποιείται είτε με μηχανική διάρρηξη είτε με εφαρμογή χημικών ή ενζύμων, πρέπει να είναι αφενός ισχυρή ώστε να τμηματοποιήσει το βιολογικό υλικό και αφετέρου ήπια ώστε να διατηρηθεί ακέραιο το επιθυμητό νουκλεϊκό οξύ. Η απενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών νουκλεασών πραγματοποιείται με χρήση ισχυρών χαστροπικών αλάτων, ενώ η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων επιτυγχάνεται με φιλτράρισμα ή κατακρήμνιση.

Η πλήρης και αποτελεσματική απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει: α. την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων, β. τη λύση των κυττάρων και γ. την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Απαιτείται: α. την αποτελεσματική αποδιάταξη του κυτταρικού τοιχώματος, β. την τήρηση συνθηκών οι οποίες είτε αναστέλλουν είτε καταστρέφουν τα διάφορα αποικοδομητικά ένζυμα που απελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και γ. το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες.

Για αρκετά χρόνια, η κύρια μέθοδος απομόνωσης πλασμιδιακού DNA ήταν η υπερφυγοκέντρωση σε κλίση χλωριούχου καισίου, η οποία απομονώνει το πιο καθαρό και ακέραιο (υπερελικωμένη μορφή) DNA. Το μεγάλο κόστος, όμως, της μεθόδου και ο χρόνος που απαιτεί, οδήγησε στην ανάπτυξη νέων μεθόδων απομόνωσης. Σήμερα, οι δύο βασικότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA είναι η αλκαλική λύση (Alkali lysis) και η απομόνωση μέσω βρασμού (Boiling lysis), οι οποίες απομονώνουν DNA ικανοποιητικής καθαρότητας για τις περισσότερες μοριακές τεχνικές.

Αλκαλική λύση

Η διαδικασία συνίσταται στη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων, τη μερική καταστροφή και απομάκρυνση του κυτταρικού τοιχώματος, του αποδιαταγμένου χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών και, στη συνέχεια, τη συλλογή του πλασμιδιακού DNA ύστερα από κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Αρχικά τα βακτήρια συλλέγονται με φυγοκέντρωση ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (LB-amp). Ακολουθεί αναδιάλυση των κυττάρων σε διάλυμα, το οποίο περιέχει **Tris** για τη διατήρηση του pH, **EDTA** για την αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και την παρεμπόδιση της δράσης νουκλεασών και **γλυκόζης** για τη διατήρηση της οσμωτικότητας. Επόμενο στάδιο είναι η λύση των κυττάρων, η οποία πραγματοποιείται σε διάλυμα που περιέχει **SDS** (θειικό δωδεκύλιο) που διαλυτοποιεί τα φωσfolιπίδια και τα πρωτεϊνικά συστατικά της μεμβράνης και **NaOH**, το οποίο καταστρέφει τους δεσμούς H^+ και Van der Waals της δίκλωνης δομής του DNA και των πρωτεϊνών. Η εξουδετέρωση της αντίδρασης λύσης πραγματοποιείται με την προσθήκη **οξικού καλίου** και **οξικού οξέος**. Η υψηλή συγκέντρωση των αλάτων καθιστά το KDS αδιάλυτο και οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες, το χρωμοσωμικό DNA και τα υπολείμματα του κυττάρου κατακρημνίζονται σε σύμπλοκα αλάτων-απορρυπαντικών. Αντίθετα, το πλασμιδιακό DNA παραμένει διαλυτό στο υπερκείμενο και συλλέγεται ύστερα από κατακρήμνιση με αιθανόλη. Το πλασμιδιακό DNA απαλλάσσεται από το βακτηριακό RNA με αναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει RNάση Α (RNase A).

Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να απομονώσουμε πλασμιδιακό DNA αρκετό για διάφορες εφαρμογές (ηλεκτροφορήσεις, πέψη με ένζυμα περιορισμού) από πολύ μικρούς όγκους καλλιέργειας. Είναι μια μέθοδος κατάλληλη και πολύ εύχρηστη για τη γρήγορη ανίχνευση ανασυνδιασμένων πλασμιδίων από έναν πληθυσμό βακτηριακών αποικιών, αλλά και για την απομόνωση

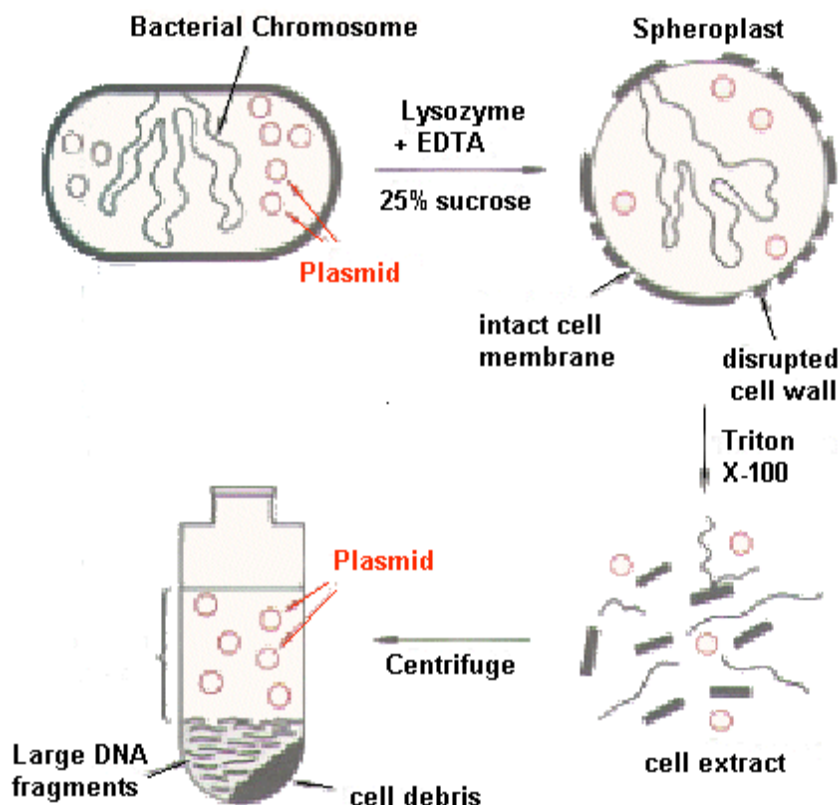
πλασμιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετασχηματισμό βακτηριακού ξενιστή.

Λύση με βρασμό

Η διαδικασία συνίσταται στη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων, την καταστροφή του κυτταρικού τους τοιχώματος και την αποδιάταξη του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών με προσθήκη EDTA, λυσοζύμης, απορρυπαντικών και εφαρμογή θέρμανσης. Το **EDTA** αποσταθεροποιεί την κυτταρική μεμβράνη και παρεμποδίζει τη δράση νουκλεασών, η **λυσοζύμη** αποικοδομεί το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηριών, τα **απορρυπαντικά** διαλυτοποιούν τη μεμβράνη ενώ ο **βρασμός** αποδιατάσσει το χρωμοσωμικό DNA. Τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση ενώ το πλασμιδιακό DNA που εντοπίζεται στο υπερκείμενο, μπορεί να συλληχθεί με κατακρήμνιση

με αιθανόλη.

Παρόλο που η μέθοδος αυτή είναι ταχύτερη από την αλκαλική λύση, δε ενδείκνυται όταν χρησιμοποιούμε πλασμιδιακό DNA από *E.coli* που εκφράζει την ενδονουκλεάση A, διότι δεν απενεργοποιείται πλήρως και το πλασμίδιο καθιζάνει κατά τη διάρκεια της επώασης παρουσία Mg^{2+} . Ο περιορισμός αυτός όμως μπορεί να αποφευχθεί αν παρεμβάλλουμε ακόμη ένα βήμα, στο οποίο πραγματοποιούμε εκχύλιση με φαινόλη / χλωροφόρμιο.



Εικόνα 1: Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA που εισάγατε σε βακτήρια *E. coli* (Άσκηση 5) με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Μετά την απομόνωσή του, το DNA θα χρησιμοποιηθεί για ανάλυση με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η καλλιέργεια των μετασχηματισμένων βακτηρίων πραγματοποιείται σε θρεπτικό μέσο LB στο οποίο έχουν προστεθεί 50 µg/ml αμπικιλίνης. Το πλασμίδιο *pBS* περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Έτσι, η παρουσία του αντιβιοτικού στο θρεπτικό μέσο απαγορεύει την ανάπτυξη βακτηρίων που δεν περιέχουν το πλασμίδιο. Το πρωτόκολλο που ακολουθεί αποτελεί τροποποίηση των μεθόδων των Birnboim & Doly (1979) και Ish-Horowicz & Burke (1981).

Για να γίνει η απομόνωση, πρέπει η καλλιέργεια να είναι κορεσμένη, άρα πρέπει να ξεκινήσει από την προηγούμενη μέρα. Τι χρώμα αποικία θα διαλέξετε για να εμβολιάσετε το υλικό σας;

1. Βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB εμπλουτισμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό.
2. Σε σωληνάκι τύπου errendorf μεταφέρετε 1.5 ml κορεσμένη βακτηριακή καλλιέργεια και φυγοκεντρείτε σε 3.000 g για 3 λεπτά.
3. Απομακρύνετε το υπερκείμενο και τοποθετείστε το ίζημα (βακτήρια) σε πάγο. ΠΡΟΣΟΧΗ: Το υπερκείμενο περιέχει μικρό αριθμό βακτηρίων και σύμφωνα με τους κανόνες P1 απαγορεύεται να πεταχτεί ως έχει. Γι αυτό μεταφέρετέ το σε δοχείο που περιέχει απολυμαντικό διάλυμα.
4. Αναδιλύστε το ίζημα σε 100 µl παγωμένου διαλύματος I (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0). Η αναδιάλυση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια vortex (ισχυρή ανάδευση). Αφήστε το σωληνάκι errendorf με το αναδιαλυμένο ίζημα σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5 λεπτά.
5. Προσθέστε 200 µl από πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα II (0.2 N NaOH, 1% SDS). Κλείστε το καπάκι, ανακατέψτε το περιεχόμενο αναποδογυρίζοντας το σωληνάκι errendorf 5 φορές (ήπια ανάδευση) και τοποθετείστε το στον πάγο για 7-10 λεπτά. ΠΡΟΣΟΧΗ: όχι vortex
6. Προσθέστε 150 µl παγωμένου διαλύματος III (παρασκευάζεται με 60ml οξικού καλίου 5M, 11,5ml οξικού οξέος 100% και 28,5ml H₂O). Κλείστε το καπάκι, ανακατέψτε το περιεχόμενο με vortex για 3-4 δευτερόλεπτα κρατώντας το σωληνάκι errendorf ανάποδα και τοποθετείστε το σε πάγο για 8-10 λεπτά.
7. Φυγοκεντρείστε σε 12.000 g για 5 λεπτά. Μεταφέρετε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι errendorf.
8. Προσθέστε 1 ml αιθανόλη, κάντε vortex για μερικά δευτερόλεπτα και μετά αφήστε τον σωλήνα στον πάγο για 5 λεπτά.
9. Φυγοκεντρείστε σε 12.000 g για 5 λεπτά. Αφαιρέστε προσεκτικά το υπερκείμενο.
10. Στο ίζημα προσθέστε 0.5 ml 70% αιθανόλης, ανακατέψτε αναποδογυρίζοντας το σωλήνα 2-3 φορές και επαναλάβετε τη διαδικασία του βήματος 9.
11. Στεγνώστε το ίζημα σε ξηραντήρα κενού για 10 λεπτά ή στον αέρα για περισσότερη ώρα. Αναδιλύστε το στεγνό ίζημα σε 20 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Η αναδιάλυση υποβοηθείται με

παρατεταμένο vortexing. Μικρές σταγόνες υλικού που διασπείρονται στα εσωτερικά τοιχώματα του σωλήνα συγκεντρώνονται στο κάτω μέρος του σωλήνα με γρήγορη φυγοκέντρωση (5-10 sec).

12. Αν θέλουμε να διώξουμε το RNA, προσθέτουμε RNάση A σε συγκέντρωση 20 µg/ml και επωάζουμε σε 37°C για 1 ώρα, ώστε να δράσει το ένζυμο.

Σημειώσεις

- ✓ Η απόδοση της μεθόδου για πλασμίδια πολλαπλών αντιγράφων (high copy number) κυμαίνεται από 3 έως 5 µg DNA / 1 ml αρχικής καλλιέργειας.

Άσκηση 7

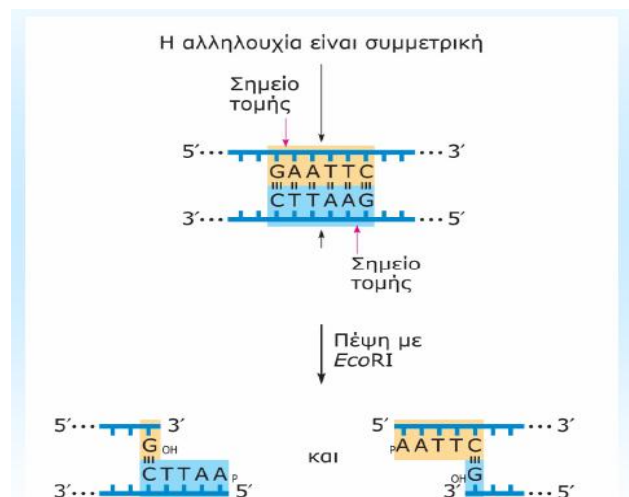
ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ DNA ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

ΠΕΨΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

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.

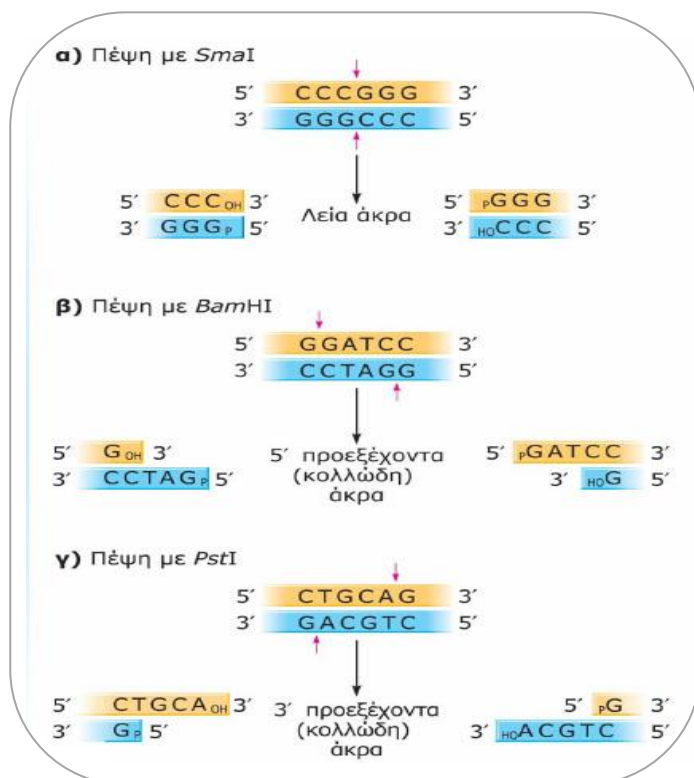
Η δράση τους εστιάζεται στην αναγνώριση ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της



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')

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

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



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.

τυφλά ή προεξέχοντα μονόκλωνα άκρα (Εικόνα 2).

Τα περισσότερα ένζυμα περιορισμού αφήνουν 5' μονόκλωνα άκρα ενώ υπάρχουν και άλλα που δημιουργούν 3' μονόκλωνα άκρα ή άλλα που κόβουν ακριβώς στην ίδια θέση στο δίκλωνο 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	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

	Όνομασία ενζύμου	Οργανισμός από τον οποίο προέρχεται το ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης και θέση κοπής*
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>	A [↓] GATCT 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 _↓ G [↓] G
	<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>	CCANNNNNN [↓] NTGG GGTNNNNNN _↓ ACC

*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 τους 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.

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η πέψη του πλασμιδιακού DNA που απομονώσατε στην προηγούμενη άσκηση ώστε να κατασκευάσετε ένα χάρτη περιορισμού για το κλωνοποιημένο ένθεμά σας. Θα πραγματοποιήσετε τρεις διαφορετικές αντιδράσεις πέψης με δύο διαφορετικά ένζυμα και το συνδυασμό αυτών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ως μονάδα ενεργότητας του ενζύμου (unit) ορίζεται συνήθως το ποσό ενζύμου (σε αντίδραση 20 μl) που απαιτείται για την κατάτμηση 1 μg DNA (μεγέθους 40 kb) σε μία ώρα στην απαιτούμενη θερμοκρασία. Γενικά, 1 μg DNA θέλει 2-3 U (μονάδες) ενζύμου περιορισμού σε 10-20 μl τελικού όγκου αντίδρασης και 1-2 h χρόνο πέψης. Η συγκέντρωση αλάτων και η θερμοκρασία που χρησιμοποιούνται κάθε φορά είναι ειδικές και αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων. Ο όγκος του ενζύμου περιορισμού που προστίθεται δεν πρέπει να ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, γιατί η γλυκερόλη που περιέχεται στο διάλυμα του ενζύμου μπορεί να επηρεάσει την αντίδραση.

Στην περίπτωση της ταυτόχρονης πέψης με δύο διαφορετικά ένζυμα πρέπει να δώσετε ιδιαίτερη προσοχή στο ρυθμιστικό διάλυμα που θα χρησιμοποιήσετε. Εάν η συγκέντρωση αλάτων και η θερμοκρασία είναι διαφορετική για τα δύο ένζυμα, θα πρέπει να πραγματοποιήσετε την αντίδραση με το ένα ένζυμο και στη συνέχεια με το δεύτερο.

Αντίδραση πέψης

1. Ετοιμάστε τις αντιδράσεις

Αντιδραστήρια	Αντίδραση 1			Αντίδραση 2			Αντίδραση 3		
		Αρχική C	Τελική C		Αρχική C	Τελική C		Αρχική C	Τελική C
Πλασμιδιακό DNA	5 μl			5 μl			5 μl		
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)		10X	1X		10X	1X		10X	1X
Ένζυμο 1		10 u/μl	2 unit		-	-		10 u/μl	2 unit
Ένζυμο 2		-	-		10 u/μl	2 unit		10 u/μl	2 unit
H ₂ O									
Τελικός όγκος	20 μl			20 μl			20 μl		

2. Επώαστε τις αντιδράσεις σας για 2 h στους 37°C.

3. Ακολούθως οι αντιδράσεις αποθηκεύονται στους -20°C.

Σημειώσεις

- ✓ Οι ενδονουκλεάσες διατηρούνται σε διάλυμα γλυκερόλης 50% και σε θερμοκρασία -20°C.
- ✓ Η ενεργότητα του ενζύμου μπορεί να μειωθεί σε συνθήκες υψηλού pH ή/και παρουσία οργανικών διαλυτών.
- ✓ Η ποσότητα του ενζύμου μπορεί να μειωθεί εάν αυξηθεί ο χρόνος επώασης της αντίδρασης.

Άσκηση 8

ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ DNA ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ένας χάρτης περιορισμού αποτελεί τη δομική ανάλυση (τον προσδιορισμό δηλαδή των σημείων αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού) μιας αλληλουχίας DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού. Η χαρτογράφηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού βασίζεται στο ότι το σημείο περιορισμού που δημιουργείται από μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση σε ένα τμήμα DNA εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο αυτό. Διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία πιθανών σημείων αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού σε ένα τμήμα DNA οδηγεί στη δημιουργία τμημάτων περιορισμού με διαφορετικό αριθμό και μήκος. Συγκρίνοντας το μέγεθος των διαφορετικών αυτών τμημάτων περιορισμού που παράγονται από μία αλληλουχία DNA μετά την επεξεργασία της με ένα συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων, 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.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών

Η καμπύλη κατασκευάζεται με βάση την κινητικότητα των ζωνών του μάρτυρα. Οι αποστάσεις τους (σε cm) από το σημείο εκκίνησης, τοποθετούνται στο γραμμικό άξονα των x, ενώ τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών (σε bp ή kb) στο λογαριθμικό άξονα των y.

Υπολογισμός μεγέθους ζωνών

Με βάση την πρότυπη καμπύλη προσδιορίζονται τα μεγέθη των ζωνών για κάθε αντίδραση. Το άθροισμα των μεγεθών πρέπει να είναι το ίδιο για όλες τις αντιδράσεις, εκτός αν υπάρχουν ζώνες με πολύ μικρό μέγεθος, και επομένως δεν διακρίνονται στο πήκτωμα,

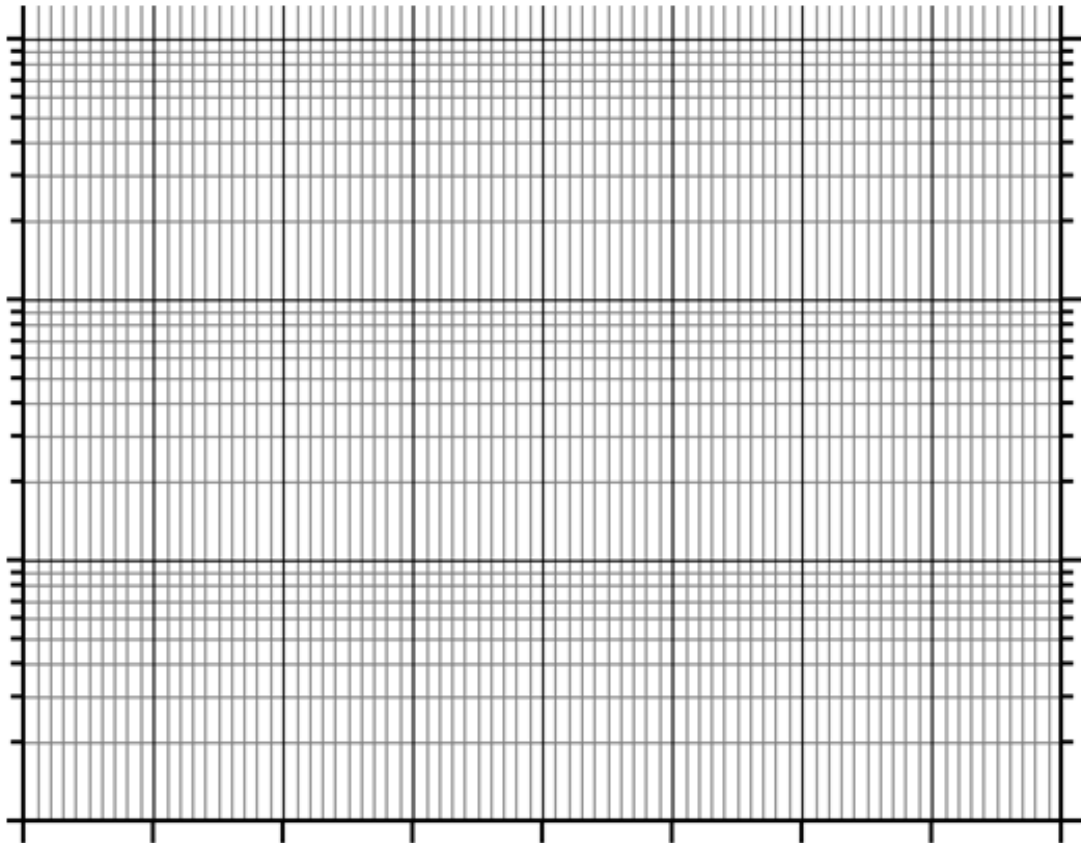
ή αν δύο ή περισσότερες ζώνες έχουν την ίδια κινητικότητα. Στη δεύτερη περίπτωση, οι διπλές ή τριπλές ζώνες διακρίνονται εύκολα, επειδή έχουν μεγαλύτερη ένταση. Επίσης, υπάρχει πρόβλημα λάθους στην εκτίμηση μεγάλων ζωνών (πχ πάνω από 7 kb) και γι αυτό ο κανόνας είναι να εκτιμάται το συνολικό μήκος του άγνωστου DNA σε συνδυασμό με την εξέλιξη της όλης διαδικασίας.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα επόμενα βήματα δεν μπορούν να περιγραφούν με σαφήνεια, αφού υπάρχει άπειρος αριθμός περιπτώσεων. Πάντως, η γενική τακτική είναι να τοποθετούνται σε τυχαία σειρά οι ζώνες από μια αντίδραση πέψης με ένα ένζυμο περιορισμού (διαλέγουμε κάποια που δίνει λίγες αλλά σαφείς ζώνες) και κατόπιν με βάση τα μεγέθη των ζωνών από διπλές πέψεις, προσπαθούμε να επιβεβαιώσουμε ή να απορρίψουμε την αρχική διευθέτηση. Έτσι προκύπτει ένας χάρτης ο οποίος περιέχει μερικές (αν όχι όλες) ακριβείς θέσεις για μια τουλάχιστον ενδονουκλεάση περιορισμού. Οι θέσεις αυτές αποτελούν το σημείο αναφοράς για την τοποθέτηση άλλων θέσεων, πάντα με βάση διπλές ή και τριπλές ακόμη αντιδράσεις πέψης. Πολλές φορές δημιουργείται η ανάγκη για πρόσθετες αντιδράσεις με νέες ενδονουκλεάσες και με νέους συνδυασμούς. Γι αυτό, η όλη διαδικασία μπορεί να διαρκέσει μερικές μέρες, χωρίς να υπάρχει εγγύηση ότι θα χαρτογραφηθούν όλες οι θέσεις των επιθυμητών ενζύμων.

Η διαδικασία της χαρτογράφησης μπορεί να γίνει ευκολότερα κατανοητή με το επόμενο παράδειγμα. Ας υποθέσουμε ότι στο πλασμίδιο pBluescript έχει κλωνοποιηθεί στη θέση *Bam*HI ένα DNA με άγνωστο μέγεθος και χάρτη. Το pBS έχει μέγεθος 2.7 kb (Εικόνα 1).

Υποθέτουμε ότι θέλουμε να χαρτογραφήσουμε το παρεμβαλλόμενο DNA (ένθεμα-insert) για τα ένζυμα περιορισμού *Eco*RI και *Hind*III. Στη φωτογραφία του ηλεκτρόφωτου αραρόζης της Εικόνας 2 βλέπετε τα προφίλ των πέψεων με τα ένζυμα αυτά και τους συνδυασμούς τους.



Το επόμενο βήμα είναι η μέτρηση των αποστάσεων των ζωνών των υπολοίπων δειγμάτων και ο υπολογισμός του μεγέθους της κάθε μιας με βάση των καμπύλη.

Με βάση τα στοιχεία του Πίνακα και δεδομένου ότι το DNA είναι κυκλικό κατασκευάζουμε το χάρτη πέψης των περιοριστικών ενζύμων.

<u><i>ρBS</i></u>		<i>EcoRI</i>		<i>HindIII</i>		<i>EcoRI /HindIII</i>		<i>BamHI</i>		<i>EcoRI/ BamHI</i>	
cm	kb	cm	kb	cm	kb	cm	kb	cm	kb	cm	kb
Σύνολο		Σύνολο		Σύνολο		Σύνολο		Σύνολο		Σύνολο	

ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων πέψης της προηγούμενης άσκησης ώστε να κατασκευάσετε το χάρτη περιορισμού του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σας με βάση τον αριθμό και το μέγεθος των τμημάτων που θα προκύψουν από τις μονές και διπλές αντιδράσεις πέψης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ηλεκτροφόρηση και φωτογράφιση του πήκτωματος

1. Ηλεκτροφορέιστε με τη σειρά τη μονή και στη συνέχεια τη διπλή αντίδραση πέψης.
2. Παράλληλα ηλεκτροφορέιστε και ένα μάρτυρα μοριακού βάρους.
3. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης φωτογραφείστε το πήκτωμα.
4. Χαρτογραφείστε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σας.

Σημειώσεις

- ✓ Σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία ενός χάρτη είναι η πλήρης πέψη του τμήματος DNA που θέλουμε να αναλύσουμε με τα ένζυμα περιορισμού, ώστε προϊόντα μερικής πέψης να μην παρεμβαίνουν στην ανάλυση των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

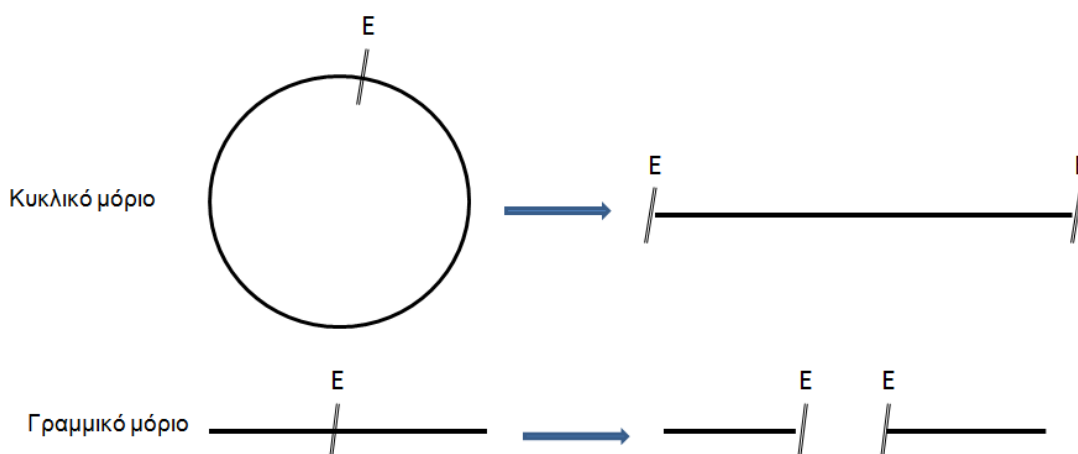
Α. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗΣ

Κλωνοποιήσατε ένα άγνωστο ένθεμα στη θέση *EcoRI* του φορέα κλωνοποίησης *pBS*. Προκειμένου να χαρτογραφήσετε το ένθεμα προχωρήσατε σε πέψεις τόσο του απλού, όσο και του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (construct), με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *BamHI*. Το *BamHI* κόβει τον φορέα πολύ κοντά στο *EcoRI* (τόσο ώστε να θεωρήσετε ότι κόβουν στην ίδια θέση). Τα αποτελέσματα των πέψεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

<i>pBS</i> / <i>EcoRI</i>	<i>pBS</i> / <i>BamHI</i>	<i>pBS</i> / <i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>	Construct/ <i>EcoRI</i>	Construct/ <i>BamHI</i>	Construct/ <i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>
3kb	3kb	3kb	3kb	4.3kb	3kb
			0.4kb	0.7kb	0.9kb
			1.6kb		0.7kb
					0.4kb

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

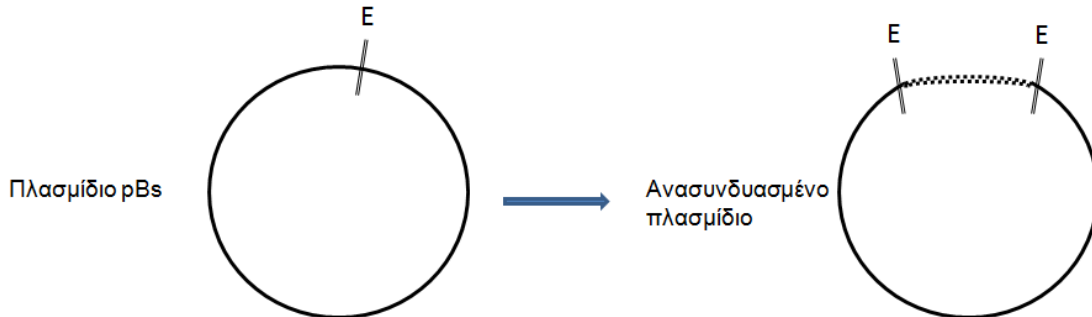
- Τι μέγεθος έχει το πλασμίδο? **3 kb**
- Τι μέγεθος έχει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο? **5 kb**
- Τι μέγεθος έχει το ένθεμα? **5-3=2 kb**
- Κάθε αντίδραση πέψης πρέπει να παρουσιάζει το ίδιο μέγεθος πλασμιδίου ή ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Το άθροισμα των ζωνών δηλαδή να είναι σταθερό σε κάθε αντίδραση πέψης.
- Πόσες φορές κόβει το *EcoRI* ή *BamHI* το πλασμίδιο? Αφού υπάρχει μία ζώνη και το πλασμίδιο είναι κυκλικό, τα δύο ένζυμα κόβουν μία φορά.



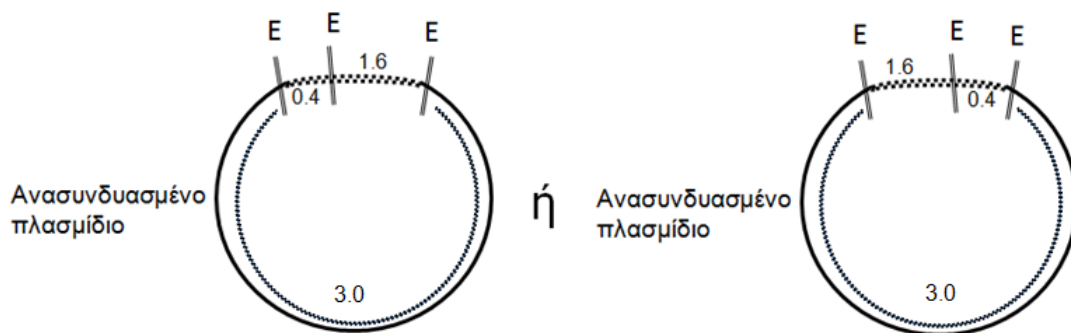
- Πόσες φορές κόβει το *EcoRI* ή *BamHI* το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο? Το *EcoRI* κόβει 3 φορές αφού υπάρχουν 3 ζώνες, ενώ το *BamHI* δύο φορές.
- Οι δύο επιπλέον ζώνες που παρουσιάζει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από το απλό πλασμίδιο στην περίπτωση του *EcoRI*, και η μία στην περίπτωση του *BamHI*, δηλώνουν ότι το ένζυμο κόβει δύο και μία φορά, αντίστοιχα, μέσα στο ένθεμα.

ΧΑΡΤΗΣ

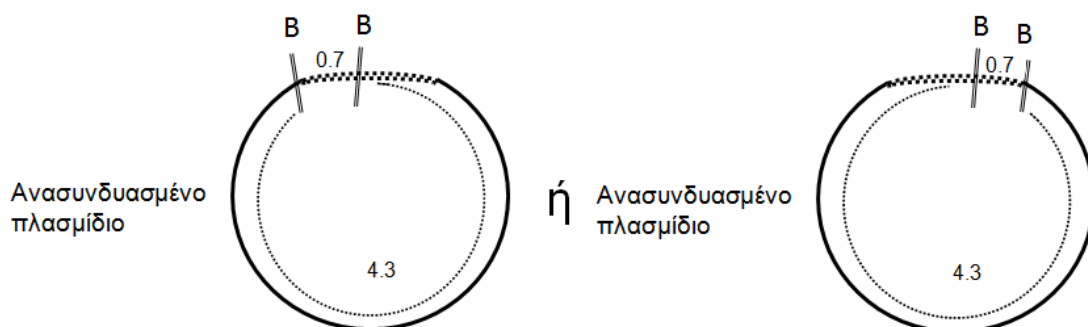
- Πρόταση κλειδί: **Κλωνοποιήσατε ένα άγνωστο ένθεμα στη θέση *EcoRI***. Επομένως ξέρετε πού να τοποθετήσετε το ένθεμα στον χάρτη. Το ένθεμα θα έχει άκρα *EcoRI*. Αυτό σημαίνει ότι εάν κόψετε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με *EcoRI* θα σας δώσει σίγουρα μία ζώνη που θα είναι ο φορέας και μία το ένθεμα (εάν φυσικά το ένζυμο δεν κόβει μέσα στο ένθεμα)



- Στην περίπτωση μας, ο πίνακας δείχνει ότι έχουμε τη ζώνη του φορέα (3 kb) και ότι το ένθεμα (2 kb) κόβεται σε δύο ζώνες, 0.4 kb και 1.6 kb. Επομένως υπάρχουν δύο περιπτώσεις.

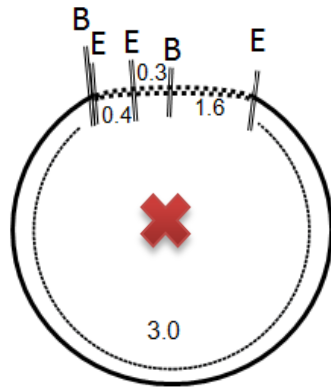


- Επόμενο βήμα η πέψη με *Bam*HI. Αφού από την αντίδραση πέψης προκύπτει μία ζώνη στο απλό πλασμίδιο και δύο στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, το *Bam*HI κόβει μία φορά το φορέα και μία το ένθεμα. Σύμφωνα με την εκφώνηση το *Bam*HI θεωρείται ότι κόβει στην ίδια θέση με το *EcoRI* κι έχουμε δύο ζώνες, 4.3 kb και 0.7 kb. Οι περιπτώσεις που προκύπτουν είναι οι εξής:



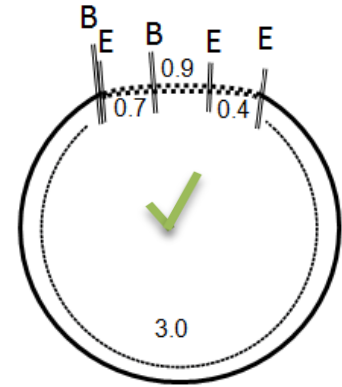
- Συνδυάζοντας τις περιπτώσεις των δύο ενζύμων σε ένα χάρτη επιλέγουμε την περίπτωση που συμφωνεί με τις ζώνες της διπλής πέψης του πίνακα.

Ανασυνδρασμένο
πλασμίδιο



ή

Ανασυνδρασμένο
πλασμίδιο

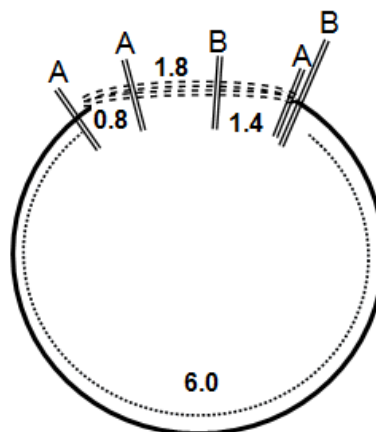


Παράδειγμα 2

Κλωνοποιήσατε ένα άγνωστο ένθεμα στη θέση *AluI* του φορέα κλωνοποίησης *pBS*. Προκειμένου να χαρτογραφήσετε το ένθεμα προχωρήσατε σε πέψεις τόσο του απλού, όσο και του ανασυνδρασμένου πλασμιδίου, με τα ένζυμα περιορισμού *AluI* και *BamHI*. Το *BamHI* κόβει τον φορέα πολύ κοντά στο *AluI* (τόσο ώστε να θεωρήσετε ότι κόβουν στην ίδια θέση). Τα αποτελέσματα των πέψεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

<i>pBS</i> / <i>AluI</i>	Construct/ <i>AluI</i>	<i>pBS</i> / <i>BamHI</i>	Construct/ <i>BamHI</i>	<i>pBS</i> / <i>AluI</i> / <i>BamHI</i>	Construct/ <i>AluI</i> / <i>BamHI</i>
6kb	6kb	6kb	8.6kb	6kb	6kb
	0.8kb		1.4kb		1.8kb
	3.2kb				1.4kb
					0.8kb

Ανασυνδρασμένο
πλασμίδιο



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aaij C., Borst P. (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* **269**: 192-200
- Aslanidis C., de Jong P.J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* **18**: 6069-6074
- Bernard P. (1995) New *ccdB* positive-selection cloning vectors with kanamycin or chloramphenicol selectable markers. *Gene* **162**: 159-160.
- Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bolivar F., Rodriguez R.L., Betlach M.C., Boyer H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of plasmid pMB9. *Gene* **2**: 75-93
- Coleman G., Miller A. (1942) Electrodialysis of sugar borates. *Proc Iowa Acad Sci* **49**: 257-261
- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. (1988) High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145
- Hanahan D., Meselson M. (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* **100**: 333-342
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- 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 lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* **14**: 1235-1244.
- Horwitz J.P., Chua J., Curby R.J., Tomson A.J., DaRooge M.A. et al. (1964) Substrates for cyrochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indonyl- β -D-glycopyranosides. *J Med Chem* **7**: 574-575
- Ish-Horowicz D., Burke J.F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9**: 2989-2998
- Kushner S.R. (1978) In "Genetic Engineering" (H.B. Boyer and S. Nicosia, Eds), pp 17-23, Elsevier, Amsterdam
- 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
- Mandel M., Higa A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162
- 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
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* **1**: 841-845
- Panja S., Aich P., Jana B., Basu T. (2008) How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? *Mol Membr Biol* **25**: 411-422
- 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
- Seeburg P., Shine J., Martial J.A., Baxter J.D., Goodman H.M. (1977) Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature* **270**: 486-494
- Sgaramella V., Khorana H.G. (1972) CXII. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer RNA from yeast. Enzymic joining of the chemically synthesized polydeoxynucleotides to form the DNA

duplex representing nucleotide sequence 1 to 20. *J Mol Biol* **72**: 427-444.

Sgaramella V., Ehrlich S.D. (1978) Use of T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. *Eur J Biochem* **86**: 531-537

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

Tatum E.L., Lederberg J. (1947) Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **53**: 673-684

Thorne H.V. (1966) Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology* **29**: 234-239

Ullman A., Jacob F., Monod J. (1967) Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structure gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **24**: 339-343

Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E. et al. (1977) Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* **196**: 1313-1319

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

