

ΑΣΚΗΣΕΙΣ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ II

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΜΙΝΤΖΑΣ & ΚΩΝ/ΝΟΣ ΦΛΥΤΖΑΝΗΣ

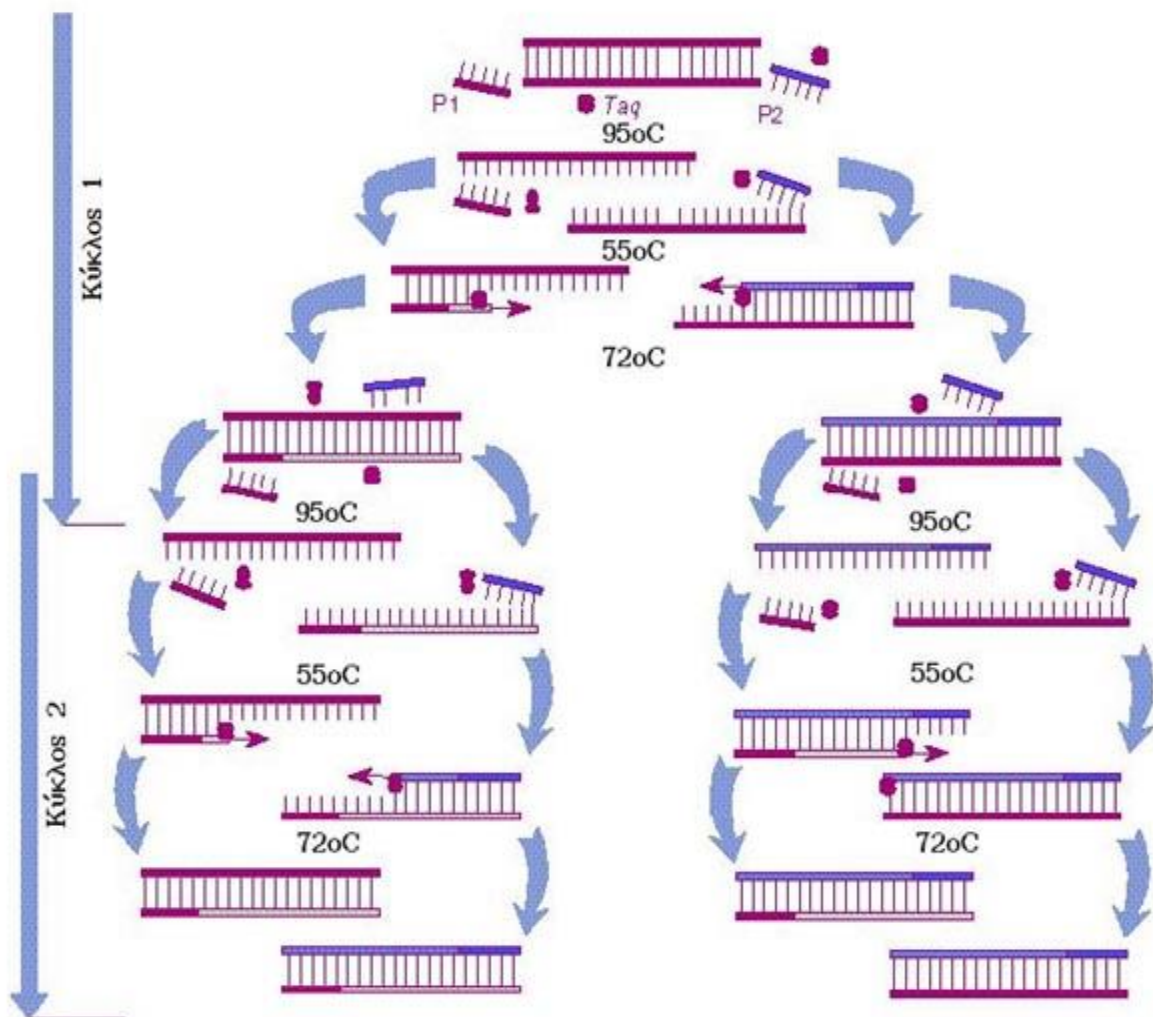
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου
και Ανάπτυξης

ΠΑΤΡΑ 2002

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ

(PCR)



Η τεχνική PCR χρησιμοποιείται σήμερα από βιολόγους και άλλους ερευνητές για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που έχουν σαν βάση τον ειδικό πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA. Ο σκοπός αυτής της άσκησης είναι η αναγνώριση μιας ειδικής αλληλουχίας DNA που αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο, σε διαφορετικά παρασκευάσματα DNA.

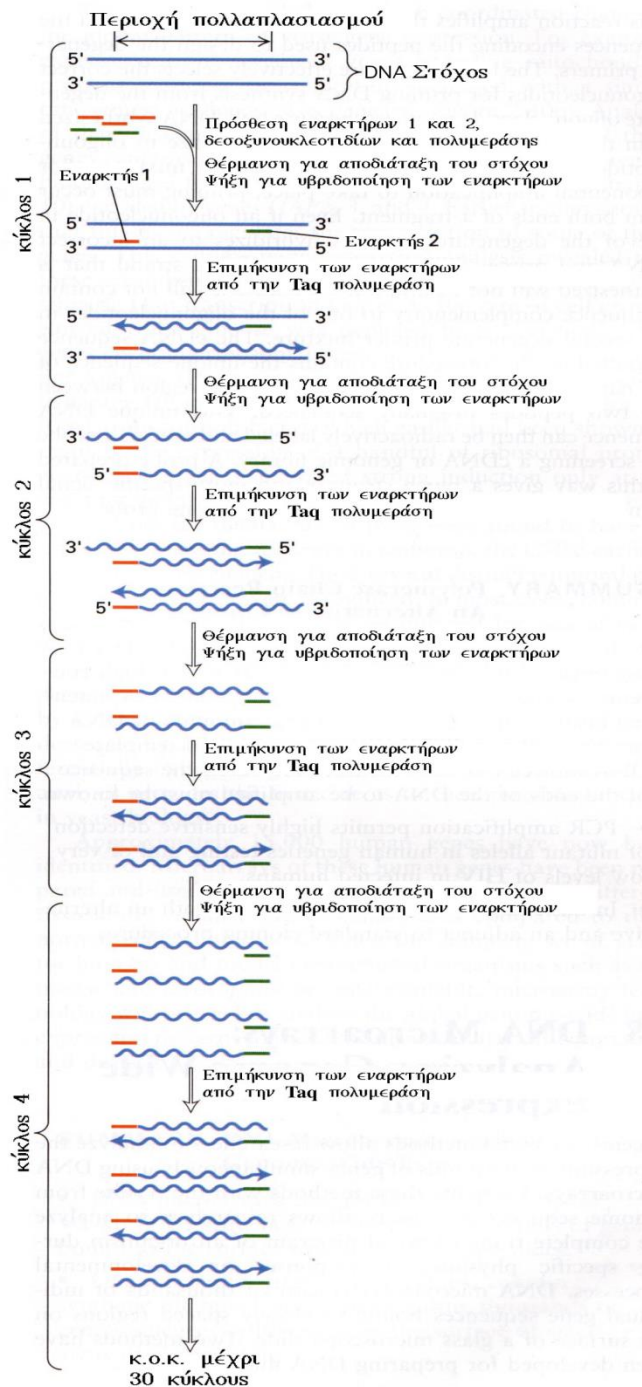
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η τεχνική PCR είναι ένα σημαντικό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας με σπουδαιότητα για την έρευνα εφάμιλλη των περιοριστικών ενζύμων και της υβριδοποίησης του DNA σε μεμβράνες. Το PCR είναι τόσο ευαίσθητη τεχνική που μπορεί να πολλαπλασιάσει μια αλληλουχία από ένα μόνο μόριο DNA. Ο πολλαπλασιασμός μοναδικών γονιδίων μέσα από πολύπλοκες γονιδιωματικές αλληλουχίες είναι σήμερα πια ρουτίνα. Η αναγνώριση των ειδικά πολλαπλασιασμένων αλληλουχιών DNA γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπου το DNA εμφανίζεται σε μία ζώνη. Το PCR χρησιμοποιείται ακόμα για τη γρήγορη ταυτοποίηση και εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κλωνοποιημένου DNA κατευθείαν από αποικίες βακτηρίων ή πλάκες βακτηριοφάγων. Με την ανακάλυψη DNA πολυμερασών που έχουν μεγάλη θερμοσταθερότητα και την αυτοματοποίηση της τεχνικής PCR έγινε δυνατή η ανάπτυξη πολλών διαφορετικών ερευνητικών εφαρμογών όπως: ο πολλαπλασιασμός ειδικών αλληλουχιών από μείγματα RNA και η κλωνοποίησή τους σε cDNA, ο ποσοτικός προσδιορισμός ειδικών mRNA σε ολικά RNA παρασκευάσματα, η παραγωγή μονόκλωνου DNA με ασύμμετρο PCR, η *in vitro* μετάλλαξη γονιδίων, η ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων, η μελέτη εξελικτικών σχέσεων διαφόρων οργανισμών, η ανίχνευση ειδικών μεταγράφων σε ιστούς (*in situ* PCR), κ.ά.

Εκτός των ερευνητικών εφαρμογών, πληθώρα άλλων διαγνωστικών εφαρμογών βασίζονται σε αυτή τη τεχνική όπως: η αναγνώριση ιών και βακτηρίων, 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, κ.ά.

Σχήμα 1: Διαγραμματική απεικόνιση μιας αντίδρασης PCR



Ένα δείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεόξυριβονουκλεοτίδια, τα δύο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια και την ειδική DNA πολυμεράση. Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95°C για να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως ψύχεται στους 55-65°C για να υβριδοποιηθούν τα εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72°C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν (σχήμα 2). Η αντίδραση είναι εκθετική. Ένα μόριο DNA δίνει μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης 2^{30} (περίπου 10^9) μόρια DNA. Εάν η περιοχή του DNA που πολλαπλασιάζεται έχει μέγεθος 1kb, τότε η ποσότητα του προϊόντος θα είναι περίπου 1ng.

Η ενζυμική αντίδραση

Η σημαντικότερη βελτίωση στην ανάπτυξη της τεχνικής PCR έγινε με την ανακάλυψη DNA πολυμερασών που είναι θερμοσταθερές (αντέχουν επαναλαμβανόμενη θέρμανση σε 94°C-95°C) και έτσι δεν χρειάζεται η προσθήκη νέου ενζύμου μετά από κάθε κύκλο πολυμερισμού. Οι πολυμεράσες αυτές απομονώνονται από θερμοφιλα βακτήρια όπως το είδος *Thermus aquaticus* (Taq), ή από αρχαιοβακτήρια που επίσης ζουν σε υψηλές θερμοκρασίες (90°C).

Η Taq πολυμεράση έχει μοριακό βάρος 94-kDa και βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού 75°C-80°C και ταχύτητα σύνθεσης 150 νουκλεοτιδίων/μόριο ενζύμου το δευτερόλεπτο. Ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου σε υψηλές θερμοκρασίες δίνεται από τον παρακάτω πίνακα:

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

Η Taq πολυμεράση δεν περιέχει 3'→5' δράση εξωνουκλεάσης και έτσι στο τελικό προϊόν παραμένουν νουκλεοτίδια που έχουν εισαχθεί λανθασμένα. Η εισαγωγή λάθος νουκλεοτιδίων είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του κάθε νουκλεοτιδίου στην αντίδραση. Έτσι, σε συγκέντρωση 1mM για κάθε νουκλεοτίδιο η συχνότητα λάθους είναι περίπου $1,66 \times 10^{-4}$ ανά κύκλο. Σε μικρότερη συγκέντρωση (0.2mM) νουκλεοτιδίων, το λάθος ελαττώνεται σημαντικά και γίνεται μικρότερο από 5×10^{-5} . Ένας άλλος παράγων που αυξάνει τη συχνότητα του πολυμερισμού λάθος νουκλεοτιδίων είναι η υψηλή συγκέντρωση ιόντων Mg^{++} . Υψηλή συγκέντρωση ιόντων Mg^{++} (10mM) και νουκλεοτιδίων (4-6mM) αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες της Taq πολυμεράσης. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις ιόντων Mg^{++} είναι 1.5-2mM και νουκλεοτιδίων 50-100μM. Η αντίδραση χρειάζεται επίσης μονοσθενή ιόντα K^+ σε συγκέντρωση 25-50mM. Το pH της αντίδρασης πρέπει να είναι 8.3 στους 20°C και η συγκέντρωση του ενζύμου 1-2.5 μονάδες.

Υβριδοποίηση των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων

Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για υβριδοποίηση των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων (primers) εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση ρυθμίζεται περίπου στους 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m). Θερμοκρασίες μεταξύ 55°C και 65°C δίνουν συνήθως τα καλύτερα αποτελέσματα. Με μια συγκέντρωση ολιγονουκλεοτιδίων γύρω στα 0.2μM, η υβριδοποίηση θα χρειαστεί μόνο μερικά δευτερόλεπτα. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία της υβριδοποίησης, αυξάνεται η ειδικότητα του τελικού προϊόντος μια και έτσι περιορίζεται η υβριδοποίηση των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων στις περιοχές του DNA με τη μέγιστη συμπληρωματικότητα.

Επέκταση των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων (πολυμερισμός)

Ο χρόνος για την επέκταση εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, η επέκταση γίνεται στους 72°C. Σε αυτή τη θερμοκρασία 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 επέκτασης 1 λεπτού στους 72⁰C είναι αρκετή για προϊόντα τελικού μήκους 2000 νουκλεοτιδίων. Διάρκεια επέκτασης 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.

Θερμοκρασία και χρόνος αποδιάταξης

Για να πετύχει η αντίδραση PCR είναι πολύ σημαντικό να γίνεται ολική αποδιάταξη του DNA στόχου και του προϊόντος σε κάθε κύκλο. Συνήθως, 95⁰C για 30 δευτερόλεπτα είναι αρκετό. Σε μερικές περιπτώσεις όμως, ιδίως για υπόστρωμα DNA πλούσιου σε G+C, χρειάζεται υψηλότερη θερμοκρασία. Παρόλο που η υψηλή θερμοκρασία είναι τελείως απαραίτητο βήμα για την αποδιάταξη, χρειάζεται προσοχή ώστε να μη διαρκεί περισσότερο του αναγκαίου γιατί τότε ελαττώνεται η ενεργότητα του ενζύμου.

Αριθμός κύκλων

Αν όλοι οι άλλοι παράγοντες είναι ρυθμισμένοι στο άριστο δυνατό, ο αριθμός κύκλων της αντίδρασης εξαρτάται κυρίως από την αρχική συγκέντρωση του DNA στόχου. Ένα κοινό λάθος είναι η διεξαγωγή πολύ περισσότερων κύκλων από όσους χρειάζονται. Παραπάνω κύκλοι της αντίδρασης PCR αυξάνουν τον αριθμό 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 TCR
3×10^5	25-30
15×10^4	30-35
1×10^3	35-40
50	40-45

Εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια

Η συγκέντρωση των ολιγονουκλεοτιδίων καθορίζεται συνήθως μεταξύ 0.1-0.5μM. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν λανθασμένη έναρξη και την παραγωγή μεγάλης ποσότητας μη ειδικών προϊόντων. Επίσης η μεγάλη συγκέντρωση ολιγονουκλεοτιδίων οδηγεί στη δημιουργία διμερών (primer-dimer) που χρησιμοποιούνται επίσης σαν DNA στόχος, ελαττώνοντας έτσι την σύνθεση ειδικών προϊόντων. Μερικοί απλοί κανόνες βοηθούν στο σχεδιασμό των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων. Συνήθως το μήκος τους είναι 17-28 νουκλεοτίδια με 50-60% περιεκτικότητα στα νουκλεοτίδια G και C. Οι θερμοκρασίες τήξεως των δύο ολιγονουκλεοτιδίων πρέπει να είναι παρόμοιες, γι' αυτό χρησιμοποιείται ο εξής κατά προσέγγιση υπολογισμός: 2°C για κάθε A ή T και 4°C για κάθε G ή C. Με αυτόν τον υπολογισμό είναι επιθυμητό η θερμοκρασία τήξεως των ολιγονουκλεοτιδίων να βρίσκεται μεταξύ 55°C και 80°C. Τα 3' άκρα των ολιγονουκλεοτιδίων δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικά, ώστε να αποφεύγεται η χρησιμοποίησή τους ως υπόστρωμα και συνεπώς η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων (primer-dimer). Επίσης πρέπει να αποφεύγεται κατά τον σχεδιασμό τους, οι συνεχόμενες αλληλουχίες (περισσότερα από 3 νουκλεοτίδια) C ή G στα 3' άκρα τους γιατί μπορεί να χρησιμεύουν για λανθασμένη έναρξη σε περιοχές DNA που είναι πλούσιες σε G+C. Είναι επίσης σημαντικό η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων να μη φέρει παλίνδρομες περιοχές.

Ειδικά εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια σχεδιάζονται για διάφορες περιπτώσεις PCR, όπως με καθορισμένα νουκλεοτίδια στα άκρα (που δεν έχουν ομολογία με το υπόστρωμα DNA) και τα οποία χρησιμοποιούνται για την πρόσθεση

αλληλουχιών, που αναγνωρίζονται από ένζυμα περιορισμού, στα άκρα του τελικού προϊόντος. Με αυτό το τρόπο διευκολύνεται η κλωνοποίηση του προϊόντος. Επιπρόσθετα νουκλεοτίδια στα άκρα εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων 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. Ολιγονουκλεοτίδια που σχεδιάζονται με βάση συντηρημένες αλληλουχίες ομόλογων γονιδίων ή με βάση τις αλληλουχίες αμινοξέων μιας πρωτεΐνης, χρησιμοποιούνται για την απομόνωση καινούργιων γονιδίων.

Μια τυπική αντίδραση PCR

Παρακάτω δίνονται οι συνθήκες και τα συστατικά μιας αντίδρασης PCR, που είναι κατάλληλη για τις περισσότερες περιπτώσεις. Είναι καλό, θεωρώντας κανείς μια τέτοια αντίδραση σαν αφετηρία, να αλλάζει τις συνθήκες, ανάλογα με την ειδική περίπτωση ώστε να πετύχει άριστη απόδοση.

1. Σε ένα πλαστικό σωληνάκι των 0.5ml προσθέτονται τα απαραίτητα συστατικά για μια αντίδραση 0.1ml που περιέχει:
Υπόστρωμα DNA (10^5 - 10^6 μόρια στόχου)
20 pmol από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο
20 mM Tris-HCl (pH: 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, 0.05% Tween-20
100 µg/ml BSA (αλβουμίνη ελεύθερη νουκλεασών)
50 µM από το κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (A,C,G,T)
2 μονάδες Taq πολυμεράση
2. Στο δείγμα προσθέτονται 75µl λαδιού για να εμποδιστεί η εξάτμιση και το σωληνάκι τοποθετείται στο μηχάνημα PCR. Η αντίδραση υποβάλλεται σε 25-35 κύκλους, ο καθένας από τους οποίους έχει τις παρακάτω θερμοκρασίες και χρονική διάρκεια:
Αποδιάταξη: 95°C για 20"

Υβριδοποίηση εναρκτηρών: 55⁰C για 30"

Πολυμερισμός (επέκταση): 72⁰C για 60"

3. Οι κύκλοι τελειώνουν με μια τελική επέκταση στους 72⁰C για 5 λεπτά και η αντίδραση σταματά με την προσθήκη EDTA έως 10mM ή με τοποθέτηση στους 4⁰C.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός αυτής της άσκησης είναι ο πολλαπλασιασμός (επέκταση) μιας περιοχής από το γονίδιο του υποδοχέα της εκδυσόνης της μεσογειακής μύγας, *Ceratitits capitata*. Η περιοχή αυτή του γονιδίου περιλαμβάνει αλληλουχίες από δύο εξώνια συνολικού μεγέθους 320 bp και ένα εσώνιο μεγέθους 280 bp. Σαν υποστρώματα θα χρησιμοποιηθούν α) ολικό γονιδιωματικό DNA της μεσογειακής μύγας και β) ένας cDNA πλασμιδιακός κλώνος του υποδοχέα της εκδυσόνης.

Χημικά

HCl, NaOH, EDTA, Tris-HCl, MgCl₂, KCl, Tween-20, αλβουμίνη βωβός (BSA) αγαρόζη, βορικό οξύ, σακχαρόζη, μπλε της βρωμοφαινόλης, βρωμιούχο εθίδιο (EtBr), DNA μάρτυρες μεγέθους, μπλε της βρωμοφαινόλης (χρωστική).

Διαλύματα

- Διάλυμα 1:** 10x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (54 gr Tris base, 27 gr βορικό οξύ, 20 ml 0,5 M EDTA και H₂O έως ο τελικός όγκος να γίνει 1000 ml).
- Διάλυμα 2:** EtBr (10mg/ml σε H₂O).
- Διάλυμα 3:** Διάλυμα γονιδιωματικού DNA της Μεσογειακής μύγας (0.1mg/ml)
- Διάλυμα 4:** Διάλυμα cDNA του υποδοχέα της εκδυσόνης της Μεσογειακής μύγας (0.1mg/ml)
- Διάλυμα 5:** 5x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου TaqI (100ml Tris-HCl pH, 8.3, 7.5mM MgCl₂, 125mM KCl, 0.25% Tween-20, 0.5mg/ml BSA).

- Διάλυμα 6:** 5x διάλυμα νουκλεοτιδίων (0.5mM dATP, 0.5mM dCTP, 0.5mM dGTP και 0.5mM dTTP).
- Διάλυμα 7:** 5x διάλυμα εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων.
- Διάλυμα 8:** Ένζυμο TaqI (1000 μονάδες/ml).
- Διάλυμα 9:** Διάλυμα δείγματος (4 gr σακχαροζη, 0,025 gr μπλε της βρωμοφαινόλης και 10 ml H₂O).
- Διάλυμα 10:** 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (900 ml H₂O και 100 διάλυμα 1)

Πρωτόκολλα

Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης

- 1) Ζυγίζουμε 1,3 gr αγαρόζη.
- 2) Εναιωρούμε την αγαρόζη σε 90 ml H₂O, σε κωνική φιάλη, και θερμένουμε το εναιώρημα στους 100°C.
- 3) Προσθέτουμε 10 ml **διαλύματος 1** και αφήνουμε το διάλυμα να κρυώσει έως ~50°C.
- 4) Προσθέτουμε 10 ml **διαλύματος 2** και αναμιγνύουμε καλά με περιστροφικές κινήσεις.
- 5) Μεταφέρουμε το διάλυμα της αγαρόζης στη μήτρα (καλούπι) της συσκευής ηλεκτροφόρησης και ακολούθως τοποθετούμε το χτενάκι σύμφωνα με τις υποδείξεις των υπευθύνων.

Αφήνουμε το πήκτωμα να πήξει για 30 λεπτά. Στο διάστημα αυτό προετοιμάζουμε την αντίδραση PCR.

Σε σωληνάκι 0.5 ml προσθέτουμε με τη σειρά τα παρακάτω:

- 2 ml **διαλύματος 3** ή **4**
- 20 ml **διαλύματος 5**
- 20 ml **διαλύματος 6**
- 20 ml **διαλύματος 7**
- 2 ml **διαλύματος 8**
- 36 ml H₂O

Αναμιγνύουμε τα διαλύματα με την πιπέτα, ρυθμίζουμε το μηχάνημα PCR σύμφωνα με τις υποδείξεις των υπευθύνων και ξεκινάμε την αντίδραση.

Έως ότου τελειώσει η αντίδραση PCR, προχωράμε στην ανάλυση των δειγμάτων της προηγούμενης ομάδας.

- Σε 20 μl δείγματος προσθέτουμε 5 μl **διαλύματος 9** και αναμιγνύουμε.
- Γεμίζουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με **διάλυμα 10** και ακολούθως τοποθετούμε τη μήτρα με το πήκτωμα αγαρόζης σύμφωνα με τις υποδείξεις των υπευθύνων.
- Τοποθετούμε το δείγμα καθώς και ένα δείγμα που περιέχει τους DNA μάρτυρες στις υποδοχές που έχουν σχηματιστεί από το χτενάκι και τρέχουμε την ηλεκτροφόρηση για 1 ώρα σε σταθερή τάση 80 V.
- Παρατηρούμε το πήκτωμα στο εικονοσκόπιο υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογραφίζουμε ή σχεδιάζουμε το ηλεκτροφόρημα.
- Μετράμε τις αποστάσεις των ζωνών από τις υποδοχές (ηλεκτροφορητικές κινητικότητες). Κατασκευάζουμε διάγραμμα σε ημιλογαριθμικό χαρτί, τοποθετώντας τις τιμές των ηλεκτροφορητικών αποστάσεων στην κανονική κλίμακα και τις τιμές των μεγεθών των μαρτύρων στην λογαριθμική κλίμακα. Τα μεγέθη των μαρτύρων σε ζεύγη χιλιάδων βάσεων (kb) είναι 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, και έως 3 kb.
- Χαράζουμε την πρότυπη καμπύλη και προσδιορίζουμε το μέγεθος των προϊόντων PCR.

Παρατηρήσεις

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.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

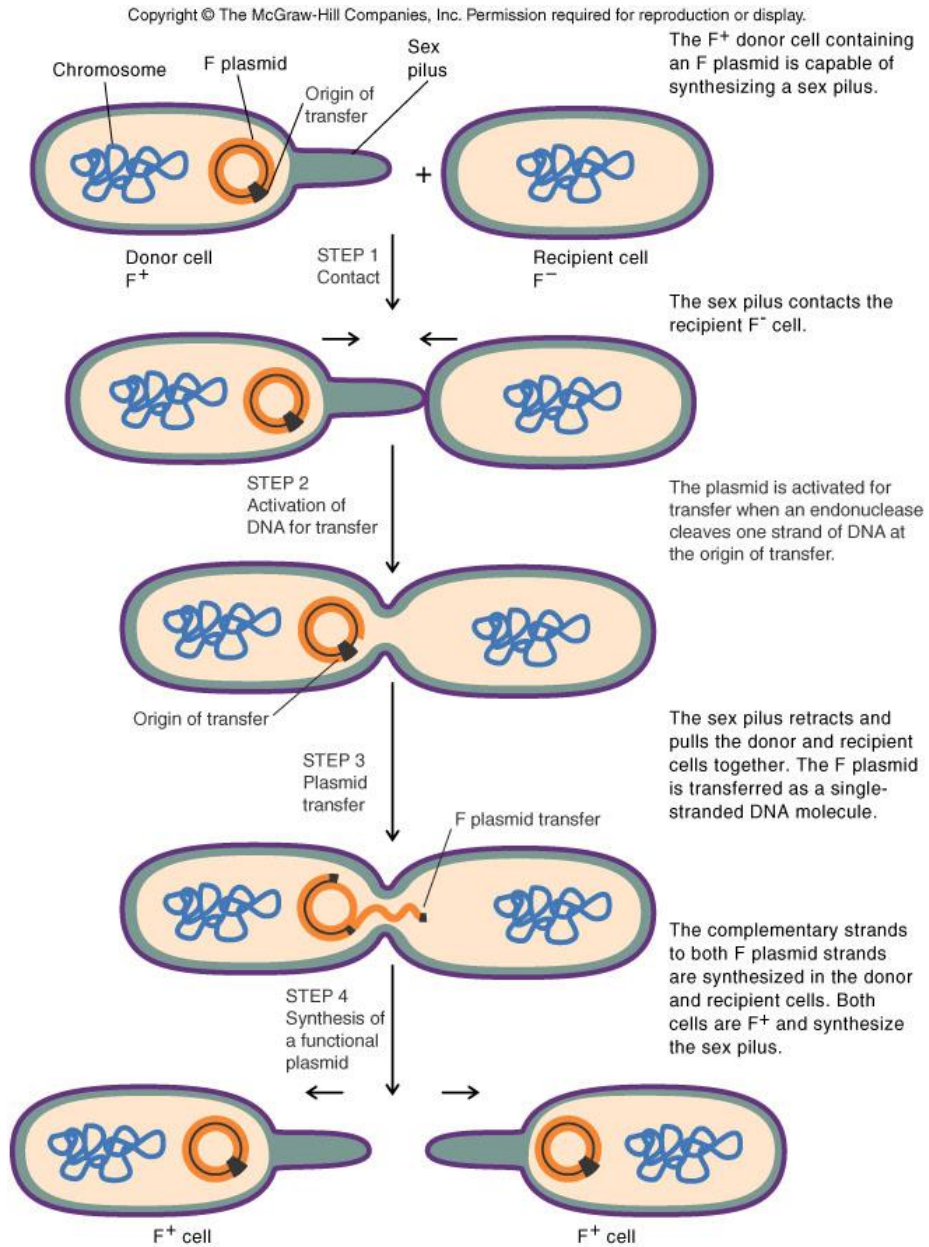
Η ανάπτυξη των τεχνικών εισαγωγής ανασυνδυασμένου DNA σε κοινούς εργαστηριακούς οργανισμούς, όπως το βακτήριο *E. coli*, επέτρεψε την επιτυχή πραγματοποίηση των τεχνικών κλωνοποίησης. Με την εισαγωγή τους στα βακτήρια, τα ανασυνδυασμένα μόρια DNA μπορούν να πολλαπλασιαστούν εύκολα και να απομονωθούν σε μεγάλες ποσότητες για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό τους. Η ανταλλαγή γενετικού 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 διαφορετικά αυξοτροφικά στελέχη ενός βακτηρίου (δηλαδή στελέχη που αδυνατούν να αναπτυχθούν σε απλό θρεπτικό υλικό) καλλιεργούνταν μαζί σε απλό θρεπτικό υλικό, βρέθηκε ότι μπορούσαν να παράγουν πρωτοτροφικά βακτήρια (δηλαδή βακτήρια που δεν απαιτούν κάποιο ειδικό παράγοντα για την ανάπτυξή τους) γεγονός που υποδηλώνει ότι είχε γίνει ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των κυττάρων των αυξοτροφικών στελεχών. Ο τρόπος της γενετικής αυτής ανταλλαγής λέγεται **σύζευξη** και χρειάζεται η φυσική επαφή μεταξύ των βακτηρίων (σχήμα 1). Αναφορικά με την σύζευξη καθορίζονται δύο φαινότυποι των βακτηριακών κυττάρων: F^+ , που δείχνει την ικανότητα του βακτηρίου να είναι δότης γενετικής πληροφορίας και F^- που είναι δέκτης. Η βακτηριακή σύζευξη έχει δύο συνέπειες, τη μεταφορά γενετικού υλικού από τον δότη στον δέκτη και τη μετατροπή του δέκτη από F^- σε F^+ φαινότυπο. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ύπαρξη του παράγοντα γονιμότητας F (fertility), ενός εξωχρωμοσωματικού στοιχείου που δύναται να κινητοποιείται και να μεταφέρεται από ένα βακτηριακό κύτταρο σε άλλο (σχήμα 1). Κατά τη διαδικασία αυτή, περιοχές του βακτηριακού χρωμοσώματος δύνανται επίσης να κινητοποιηθούν και να μεταφερθούν. Συμβάντα ανασυνδυασμού που γίνονται στον δέκτη, ενσωματώνουν το κινητοποιημένο DNA στο χρωμόσωμα και

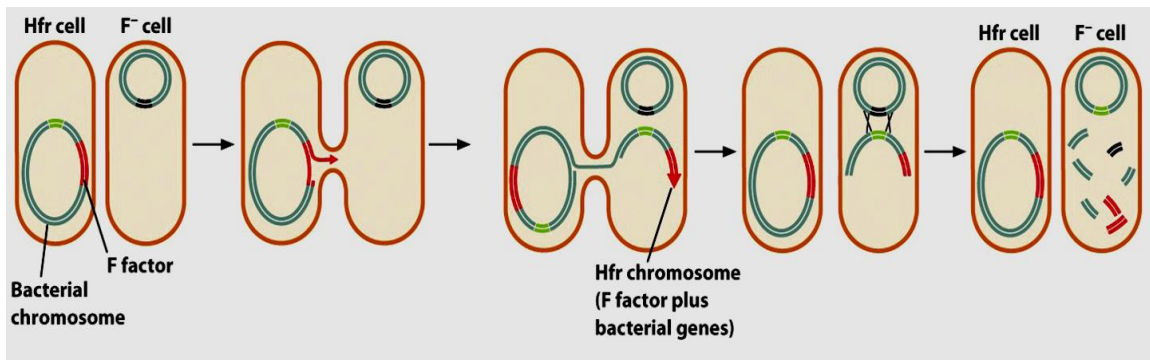
οδηγούν στη δημιουργία σταθερών ανασυνδυασμένων στελεχών. Η κινητοποίηση χρωμοσωματικών γονιδίων από τον παράγοντα F συμβαίνει σε χαμηλή συχνότητα και τυχαία.

Σχήμα 1. Σύζευξη βακτηρίων



Ο φαινότυπος Hfr απομονώθηκε με βάση την ιδιότητά του να προάγει υψηλή συχνότητα μεταφοράς και ανασυνδυασμού χρωμοσωματικού DNA. Τα Hfr στελέχη λειτουργούν μόνο σαν ικανοί δότες, όχι σαν δέκτες, αλλά ο φαινότυπος Hfr δεν μεταφέρεται σε αποδέκτη όπως γίνεται με τον παράγοντα F. Κάθε Hfr στέλεχος μεταφέρει στους δέκτες συγκεκριμένα γονίδια, ανάλογα με τη θέση του παράγοντα F στο χρωμόσωμα του Hfr στελέχους (σχήμα 2). Η ειδικότητα και η υψηλή συχνότητα της μεταφοράς γενετικού υλικού των Hfr στελεχών, τα κατέστησε πολύ χρήσιμα στη δημιουργία του χρωμοσωματικού γενετικού χάρτη του βακτηρίου *E. coli*.

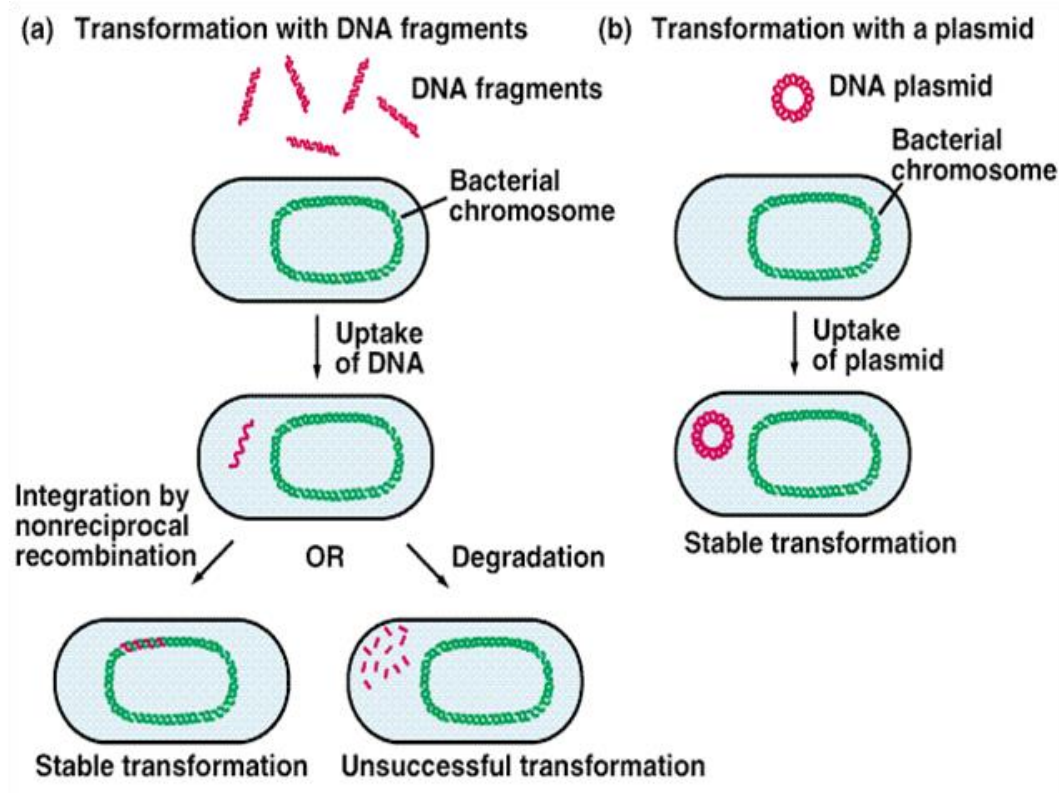
Σχήμα 2. Σύζευξη-Hfr στελέχη



Μετασχηματισμός

Μετασχηματισμός καλείται η κληρονομήσιμη αλλαγή στις ιδιότητες ενός βακτηριακού στελέχους που προέρχεται από την ενσωμάτωση εξωγενούς DNA. Η απελευθέρωση τμημάτων DNA που προκύπτουν από το θάνατο και τη λύση των 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 (σχήμα 3).

Σχήμα 3: Φυσικός μετασχηματισμός

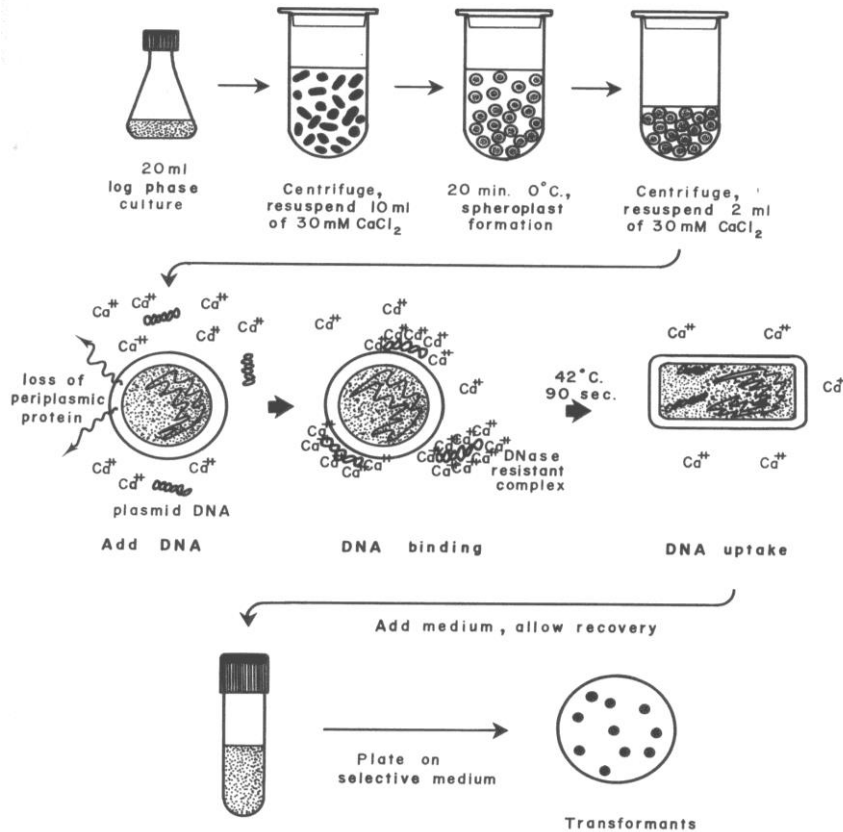


Τα βακτήρια αυτά είναι σε θέση να προσδέσουν νουκλεϊκά οξέα σε μορφή που είναι ανθεκτική στη δράση νουκλεασών. Σε διάφορα στελέχη βακτηρίων έχουν βρεθεί πρωτεΐνες που προσδέουν στο DNA και που η λειτουργία τους είναι αναγκαία για την αρχική φάση του μετασχηματισμού. Μετά την πρόσληψή του από ένα βακτηριακό 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 το βακτήριο αυτό δεν κατέχει τον φυσικό μηχανισμό του μετασχηματισμού. Αργότερα βρέθηκε ότι η ικανότητα για ενσωμάτωση DNA, μπορούσε να επαχθεί τεχνητά με την έκθεση των κυττάρων *E.coli* σε χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) πριν την προσθήκη DNA όπως φαίνεται στο σχήμα 4. Η εργαστηριακή πορεία έχει ως εξής: 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). Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται δεκτικά και μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία μικρότερη των -70°C . Όταν προστεθεί DNA στο εναιώρημα των δεκτικών κυττάρων σχηματίζονται μεγαλομοριακά σύμπλοκα DNA, μέσω σχηματισμού φωσφορικού υδροξυλίου του ασβεστίου, που είναι ανθεκτικά στη δράση DNAσών. Τα σύμπλοκα αυτά κολλάνε στην επιφάνεια των σφαιροπλαστών. Με μία σύντομη έκθεση του μείγματος σε υψηλή θερμοκρασία (42°C), τα βακτηριακά κύτταρα ενσωματώνουν τα σύμπλοκα DNA. Μετά από ορισμένες ώρες καλλιέργειας σε πλούσιο θρεπτικό υλικό για να αναλάβουν οι σφαιροπλάστες και να εκφραστούν τα μεταβιβασμένα γονίδια, τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιλέγονται και απομονώνονται με στρώση σε τρυβλία που φέρουν επιλεκτικό θρεπτικό υλικό (αντιβιοτικά). Με μικρές αλλαγές το βασικό αυτό πρωτόκολλο χρησιμοποιείται για μια πληθώρα βακτηρίων που δεν μετασχηματίζονται φυσικά.

Σχήμα 4: Τεχνητός μετασχηματισμός



Ένας άλλος τεχνητός τρόπος εισαγωγής εξωγενούς DNA σε βακτηριακά κύτταρα κάνει χρήση της ικανότητας των βακτηριοφάγων να κάνουν ένεση του DNA τους στα βακτήρια. Παρασκευάζονται άδειες κεφαλές βακτηριοφάγων λ, γεμίζονται με εξωγενές DNA και μετατρέπονται σε λειτουργικές κεφαλές, που μπορούν να μεταφέρουν το DNA με μεγάλη αποτελεσματικότητα στα βακτήρια δέκτες χρησιμοποιώντας τις ειδικές θέσεις υποδοχής στο τοίχωμά τους. Εκτός από τους φορείς που αναπτύχθηκαν βασισμένοι στο βακτηριοφάγο λ, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται και για τη μεταφορά ανασυνδυασμένου DNA με κοσμιδιακούς φορείς που είναι σε θέση να μεταφέρουν στα βακτήρια μεγαλύτερα τμήματα εξωγενούς DNA.

Η εισαγωγή του DNA στα βακτηριακά κύτταρα είναι ένα στοιχείο που επηρεάζει τη συνολική αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού. Ένα δεύτερο σημαντικό στοιχείο είναι η ανθεκτικότητα του DNA αφού εισέλθει 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 ξενιστή βακτηρίου κόβουν 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 κόψει το μη τροποποιημένο C-600 DNA όταν εισαχθεί στο κύτταρο και κατά συνέπεια θα ελαττωθεί σημαντικά η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού. Αντιθέτως, 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 τον 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 (r^-) και στο σύστημα τροποποίησης (m^-). Η χρησιμοποίηση στελεχών με τον φαινότυπο (r^-) προφυλάσσει από την πέψη 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 όταν DNA από αυτό το στέλεχος χρησιμοποιείται για να μετασχηματίσει ένα στέλεχος (r^+m^+) το οποίο δεν είναι ελαττωματικό στο σύστημα 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 $r_k^+m_k^+$.

Εκτός των ανωτέρω, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού είναι: 1) η αποτελεσματική δημιουργία σφαιροπλαστών, 2) η ζωτικότητα των κυττάρων μετά από την επεξεργασία με $CaCl_2$, 3) ο χρόνος και οι συνθήκες αποθήκευσης των δεκτικών κυττάρων, 4) η συγκέντρωση, δομή και καθαρότητα του DNA.

Ανασυνδυσμένο DNA

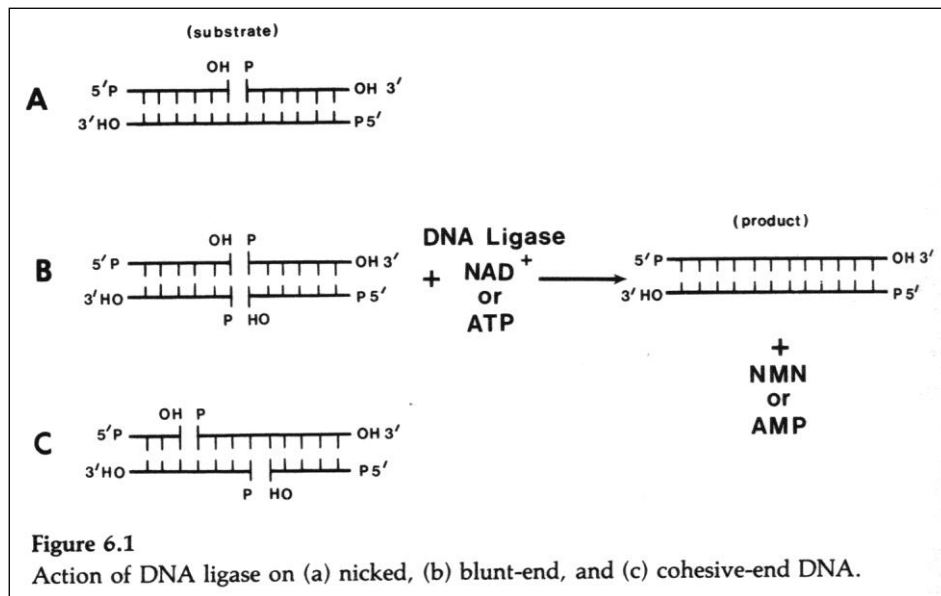
Η κατασκευή ανασυνδυσμένου DNA εξαρτάται από την ικανότητα διόρθωσης ρηγμάτων στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Αυτή η διαδικασία επιτελείται εν ζωή (*in vivo*) αλλά και στον δοκιμαστικό σωλήνα (*in vitro*) από το ένζυμο DNA λιγάση. Αυτό το ένζυμο καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 3'-OH και του 5'-P άκρων δύο διπλανών νουκλεοτιδίων επιδιορθώνοντας έτσι την συνέχεια μιας σπασμένης αλυσίδας DNA. Επειδή η DNA λιγάση έχει την ικανότητα να διορθώνει ρήγματα σε μία ή και στις δύο αλυσίδες DNA, το ένζυμο αυτό εκτός από τη σημασία του στον ανασυνδυασμό, την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA, παίζει πρωταρχικό ρόλο στην τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA.

DNA λιγάσες από *E.coli* και T4 βακτηριοφάγο

DNA λιγάσες έχουν απομονωθεί από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς και τους ιούς τους. Όλες οι DNA λιγάσες καταλύουν τις αντιδράσεις που φαίνονται στο σχήμα 5. Η DNA λιγάση από *E.coli* (74.000 daltons) φτιάχνει ένα σύμπλοκο ενζύμου-αδενυλίου χρησιμοποιώντας NAD^+ πριν από τον σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Η DNA λιγάση από τον

βακτηριοφάγο T4 χρησιμοποιεί ATP για το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-αδενυλίου. Και στις δύο περιπτώσεις, το αδενύλιο μεταφέρεται στο 5'-P άκρο της υπό διόρθωση σπασμένης αλυσίδας με σχηματισμό του παραγώγου Ad-P-P-DNA. Ο περαιτέρω σχηματισμός του φωσφοδιεστερικού δεσμού με το 3'-OH άκρο του DNA προχωράει στη συνέχεια με την απελευθέρωση NMN ή AMP. Η DNA λιγάση από *E.coli* δεν έχει την ικανότητα να συνδέει τμήματα DNA με τυφλά άκρα.

Σχήμα 5: Αντίδραση σύνδεσης



Ο βακτηριοφάγος T4 κωδικοποιεί τη δική του DNA λιγάση. Το ένζυμο αυτό (60.000 daltons) χρειάζεται ATP σαν πηγή ενέργειας και αντίθετα από την *E. coli* DNA λιγάση, έχει την ιδιαίτερη ικανότητα να συνδέει τμήματα DNA που έχουν τυφλά άκρα (Σχήμα 5B). Η παραγωγή του ενζύμου T4 DNA λιγάση γίνεται σήμερα σε πολύ καθαρή μορφή και μεγάλες ποσότητες με κλωνοποίηση του γονιδίου 30 που το κωδικοποιεί. Για το λόγο αυτό αλλά και κυρίως για την ιδιότητα του ενζύμου αυτού να συνδέει τυφλά άκρα, η T4 DNA λιγάση επιλέγεται για την σύνδεση τμημάτων DNA *in vitro*.

***In vitro* και *in vivo* σύνδεση τμημάτων DNA**

Η κατασκευή ενός ανασυνδυσασμένου πλασμιδίου, στην πιο απλή της μορφή, συμπεριλαμβάνει μία διμοριακή αντίδραση στην οποία το ένα άκρο ενός γραμμικού πλασμιδιακού φορέα συνδέεται στο ένα άκρο του DNA στόχου με DNA λιγάση για το σχηματισμό μιας γραμμικής DNA χίμαιρας, που ακολουθείται από κυκλοποίηση με την πρόσδεση των δύο εναπομείναντων άκρων. Αυτό επιτυγχάνεται με δύο τρόπους: είτε *in vivo* μέσα στο βακτηριακό κύτταρο, είτε *in vitro* πριν από τον μετασχηματισμό των βακτηρίων. Όταν χρησιμοποιείται ο μηχανισμός του βακτηρίου για τη σύνδεση, τα μόρια του DNA πρέπει να έχουν προεξέχουσα συμπληρωματική αλληλουχία στα άκρα έτσι ώστε να μπορούν να ενωθούν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση ενζύμων περιορισμού που αφήνουν συμπληρωματικές μονόκλωνες αλληλουχίες στα άκρα του DNA που πέπτουν, ή με τη χρησιμοποίηση ενός άλλου ενζύμου (τελική τρανσφεράση) που προσθέτει νουκλεοτίδια στα άκρα, φτιάχνοντας πολυνουκλεοτιδικές ουρές. Με την επιλογή συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων οι ουρές αυτές γίνονται συμπληρωματικές, μπορούν να ενωθούν και να επιδιορθωθούν μέσα στα βακτηριακά κύτταρα παράγοντας έτσι τα επιθυμητά ανασυνδυσασμένα μόρια. Αν και η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν, έχει πολλή χαμηλή απόδοση και οδηγεί συχνά σε αλλαγές και αφαιρέσεις νουκλεοτιδίων από τα άκρα.

Η χρησιμοποίηση της DNA λιγάσης στη *in vitro* σύνδεση μορίων DNA πριν τον μετασχηματισμό έχει πολλά πλεονεκτήματα στη κατασκευή ανασυνδυσασμένου DNA. Η *in vitro* σύνδεση του DNA ελαττώνει σημαντικά την έκθεση των άκρων σε νουκλεοτιδική αποικοδόμηση μέσα στα κύτταρα και έτσι αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού. Η σύνδεση *in vitro* συμπληρωματικών άκρων που προέρχονται από πέψη με περιοριστικά ένζυμα, διατηρεί τη θέση περιορισμού και έτσι διευκολύνει στην απομόνωση και στην αναγνώριση των κλωνοποιημένων τμημάτων. Τέλος, οι συνθήκες της αντίδρασης της λιγάσης *in vitro* μπορούν να επιλεγθούν κατά τρόπο ώστε να ευνοείται είτε η κατασκευή κυκλικών μορίων είτε γραμμικών πολυμερών που αποτελούνται από διαφορετικά μόρια συνδεδεμένα το ένα με το άλλο.

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 ή τυφλά), η σχετική συγκέντρωση των άκρων DNA και η συγκέντρωση και το μοριακό βάρος των κομματιών DNA. Όταν τα προεξέχοντα άκρα έχουν παραχθεί από ένζυμα περιορισμού, όπως *EcoR I*, *Hind III*, *Pst I* και είναι συμπληρωματικά, τα συμπληρωματικά αυτά άκρα περιλαμβάνουν ένα μικρό αριθμό νουκλεοτιδίων. Η θερμοκρασία που καταστρέφει τους υδρογονικούς δεσμούς μεταξύ αυτών των άκρων είναι πολύ χαμηλή. Για το ολιγονουκλεοτίδιο AATT που παράγεται από το ένζυμο *EcoR I*, 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 τη ταχύτητα και τη φύση της αντίδρασης σύνδεσης είναι η αποτελεσματική συγκέντρωση (j) των δύο άκρων ενός τμήματος DNA και η ολική συγκέντρωση (i) άκρων που βρίσκονται στην αντίδραση. Κάτω από καθορισμένες συνθήκες, η τιμή j είναι σταθερή για ένα συγκεκριμένο τύπο μορίου DNA. Αν και ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση DNA, η τιμή j εξαρτάται από το μήκος του DNA, δηλαδή το μοριακό βάρος. Η εγγύτητα των δύο άκρων μιας τυχαίας DNA έλικας επηρεάζεται από τη διαμόρφωση του μορίου που είναι συνάρτηση της ιονικής ισχύος του διαλύματος. Περίσσεια εξουδετερωτικών ιόντων Na^+ , προκαλούν σταθεροποίηση και ακαμψία της έλικας DNA και έτσι ελαττώνουν την αποτελεσματική συγκέντρωση (j) του ενός άκρου του μορίου DNA ως προς το άλλο. Μια και η αντίδραση σύνδεσης

γίνεται σε σταθερές συνθήκες ώστε να είναι άριστη η δράση της λιγάσης, οι ιοντικές επιδράσεις στη τιμή j αγνοούνται στις αντιδράσεις σύνδεσης.

Με βάση μελέτες του γραμμικού DNA του βακτηριοφάγου λ , η τιμή j σε αριθμό άκρων/ml για οποιοδήποτε DNA (x) μπορεί να υπολογιστεί σε σχέση με την τιμή j του λ DNA (j_λ)

$$j_x = j_\lambda \left(\frac{MW_\lambda}{MW_x} \right)^{3/2}$$

όπου: $j_\lambda = 3.6 \times 10^{11}$ άκρα/ml

$MW_\lambda = 30.8 \times 10^6$ daltons

MW_x = είναι το μοριακό βάρος του DNA προς σύνδεση

Αν τα προεξέχοντα άκρα ενός μορίου DNA είναι συμπληρωματικά, η ολική συγκέντρωση (i) σε αριθμό άκρων/ml δίνεται από τη σχέση:

$$i = 2N_0M \times 10^{-3}$$

όπου: N_0 = αριθμός Avogadro, $6,022 \times 10^{23}$ μόρια/mole

M = η συγκέντρωση του DNA σε moles

Όταν η τιμή j η οποία περιγράφει την αποτελεσματική συγκέντρωση του ενός άκρου ενός μορίου ως προς το άλλο, είναι ίση με την τιμή i , την ολική συγκέντρωση των άκρων, η πιθανότητα τα δύο άκρα του ίδιου μορίου να ενωθούν είναι ίδια με την πιθανότητα ένωσης δύο άκρων που ανήκουν σε διαφορετικά μόρια. Αν η τιμή j είναι μεγαλύτερη της τιμής i , τότε ευνοείται η παραγωγή κυκλικών μορίων. Αν η τιμή i είναι μεγαλύτερη της j , ευνοείται η παραγωγή γραμμικών πολυμερών μορίων κατά την αντίδραση σύνδεσης.

Ο λόγος j/i για ένα μόριο DNA γνωστού μοριακού βάρους υπολογίζεται από τη σχέση:

$$j/i = \frac{j_\lambda (MW_\lambda / MW_x)^{3/2}}{2N_0M \times 10^{-3}}$$

Χρησιμοποιώντας τις ανάλογες τιμές για J_λ , MW_λ , N_0 και μετατρέποντας M (τη συγκέντρωση DNA σε moles) σε g/L [DNA] η σχέση απλοποιείται ως εξής:

$$j/i = \frac{51.1}{[DNA](MW)^{1/2}}$$

Για παράδειγμα, όταν στην αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήσουμε ένα τμήμα DNA με προεξέχοντα συμπληρωματικά άκρα μοριακού βάρους 4×10^6 daltons σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{g/ml}$, ο λόγος $j/i = 5$, που σημαίνει ότι οι συνθήκες ευνοούν το σχηματισμό κυκλικών μονομερών. Όταν το ίδιο τμήμα DNA χρησιμοποιηθεί σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$, ο λόγος $j/i = 0.5$ που σημαίνει ότι θα ευνοηθεί ο σχηματισμός γραμμικών πολυμερών. Αν και θεωρητικά το σημείο μετατροπής από κυκλοποίηση σε πολυμερισμό των τμημάτων DNA που συνδέονται συμβαίνει όταν ο λόγος $j/i = 1$, πειραματικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι η μετατροπή αυτή συμβαίνει στην πραγματικότητα όταν ο λόγος $j/i = 2-3$.

Η αντίδραση σύνδεσης δεν γίνεται ακαριαία αλλά είναι μια προοδευτική σειρά από αντιδράσεις, όπου κάθε μία αλλάζει το λόγο j/i για τα υπόλοιπα τμήματα DNA που δεν έχουν συνδεθεί. Για παράδειγμα, αν τμήματα DNA μοριακού βάρους 1×10^6 daltons συνδέονται σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$ ($j/i = 1$), οι αρχικές συνθήκες ευνοούν την παραγωγή πολυμερών. Όταν όμως 50% των άκρων στην αντίδραση συνδεθούν σε πολυμερείς μορφές, η τιμή i ελαττώνεται κατά 2 περίπου φορές και έτσι ο λόγος j/i για τα υπόλοιπα ασύνδετα μόρια αυξάνει στη τιμή 2. Όταν 80% των άκρων έχουν συνδεθεί, ο λόγος j/i για τα υπόλοιπα μόρια αυξάνεται στο 5. Έτσι λοιπόν όσο η αντίδραση προχωρεί ο λόγος j/i αυξάνεται και ευνοείται ο σχηματισμός κυκλικών μορίων.

Αν και ο λόγος j/i εφαρμόζεται για τη σύνδεση μορίων DNA που έχουν το ίδιο μέγεθος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για να καθοριστούν οι συνθήκες αντίδρασης για τη σύνδεση τμημάτων DNA που έχουν διαφορετικό μέγεθος. Για παράδειγμα, αν θέλουμε να συνδέσουμε τμήματα DNA που προέρχονται από πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού με μοριακό βάρος 5×10^6 daltons, με ίση ποσότητα γραμμικού πλασμιδιακού DNA με μοριακό βάρος 2.7×10^6 daltons, μια ικανοποιητική προσέγγιση μπορεί να γίνει με τον μέσο όρο των μοριακών βαρών, δηλαδή $3,8 \times 10^6$ daltons. Έτσι για να ευνοηθεί ο σχηματισμός γραμμικών πολυμερών επιλέγεται ο λόγος $j/i = 0.5$ που επιτυγχάνεται με ρύθμιση της ολικής συγκέντρωσης των τμημάτων DNA στα 50 $\mu\text{g/ml}$.

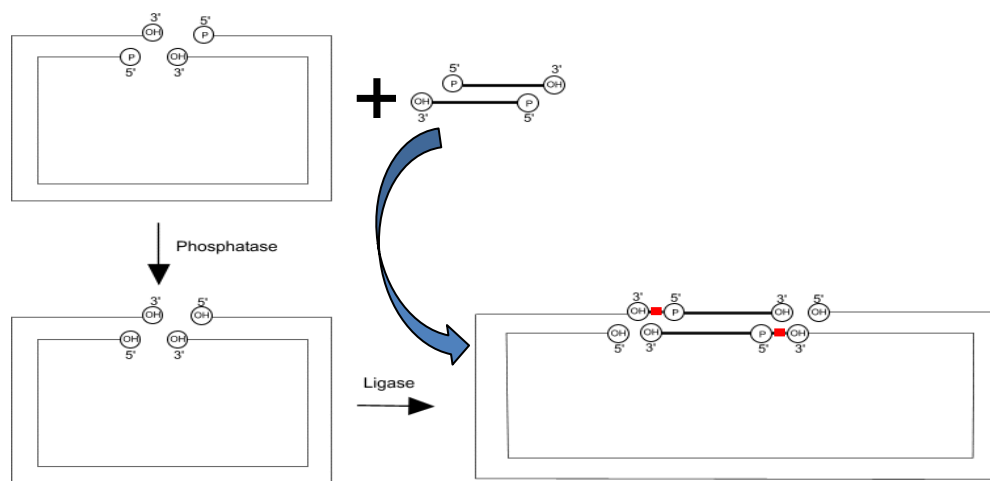
Όταν γίνεται σύνδεση ενός μείγματος τμημάτων DNA είναι δυνατόν να προσδιοριστεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης αλλάζοντας την αναλογία των

κομματιών. Για παράδειγμα, ας υποθέσουμε ότι συνδέουμε κομμάτια μοριακού βάρους 2×10^6 daltons με κομμάτια 1×10^6 daltons για τη δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου μορίου. Αν η αντίδραση σύνδεσης γίνει σε συγκέντρωση DNA $40 \mu\text{g/ml}$, ο λόγος $j/i=1$ και οι συνθήκες ευνοούν το σχηματισμό γραμμικών πολυμερών στα οποία συγκαταλέγονται και μόρια προερχόμενα από τη σύνδεση των δύο διαφορετικών κομματιών. Αν όμως τα μεγάλα κομμάτια (2×10^6 daltons) βρίσκονται σε δεκαπλάσια συγκέντρωση από τα μικρά (1×10^6 daltons), ο σχηματισμός διμερών που αποτελείται μόνο από δύο μικρά κομμάτια θα γίνει με $1/10$ της συχνότητας απ' αυτήν που θα γίνει ο σχηματισμός διμερών που αποτελείται από τα δύο διαφορετικά κομμάτια. Με αυτό τον τρόπο ευνοείται ο σχηματισμός πολυμερών από μεγάλα κομμάτια αλλά και υβριδίων, ενώ ελαχιστοποιείται ο σχηματισμός πολυμερών από τα μικρά κομμάτια.

Για την κατασκευή βιβλιοθηκών DNA είναι επιθυμητός ο σχηματισμός ανασυνδυασμένων μορίων και όχι επανακυκλοποίηση των γραμμικών μορίων του πλασμιδιακού φορέα, έτσι ώστε όλα τα τμήματα του DNA να αντιπροσωπεύονται στον πληθυσμό των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων της βιβλιοθήκης. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με τη δημιουργία διαφορετικών μονόκλωνων άκρων, πέπτοντας το DNA και τον πλασμιδιακό φορέα με δύο ένζυμα περιορισμού, είτε με αποφωσφωριλύωση του πλασμιδιακού φορέα, με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Οι αλκαλικές φωσφατάσες μετατρέπουν το 5' φωσφορικό άκρο ενός τμήματος DNA σε 5'-OH. Μια και η DNA λιγάση χρειάζεται 5'-P, τα προεξέχοντα συμπληρωματικά άκρα μπορούν να ενωθούν αλλά δεν μπορούν να συνδεθούν από τη λιγάση. Έτσι, με τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης μπορεί να αποτραπεί η κυκλοποίηση γραμμικού πλασμιδιακού φορέα από τη λιγάση. Με αυτό τον τρόπο τα μόρια ενός πλασμιδιακού φορέα δεν μπορούν να συνδεθούν το ένα με το άλλο και να σχηματίσουν είτε κυκλικά μονομερή είτε γραμμικά πολυμερή. Όταν όμως προστεθούν τα τμήματα του DNA στόχου κομμένα με το ίδιο ένζυμο περιορισμού στον πλασμιδιακό φορέα που έχει τροποποιηθεί με αλκαλική φωσφατάση, τα συμπληρωματικά άκρα θα ενωθούν και η DNA λιγάση θα τα συνδέσει χρησιμοποιώντας τα δύο 5'-P του DNA στόχου αφήνοντας μια εγκοπή στην άλλη αλυσίδα (σχήμα 6). Το DNA αυτό

μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων, τα οποία επισκευάζουν τις εγκοπές *in vivo* καταλήγοντας έτσι σε λειτουργικά ανασυνδυσασμένα πλασμίδια. Όταν χρησιμοποιείται η αλκαλική φωσφατάση για αριστοποίηση του σχηματισμού ανασυνδυσασμένου DNA, τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με λόγο $j/i=1$ και δύο φορές παραπάνω DNA φορέα σε σχέση με τον DNA στόχο.

Σχήμα 6 Χρήση της αλκαλικής φωσφατάσης



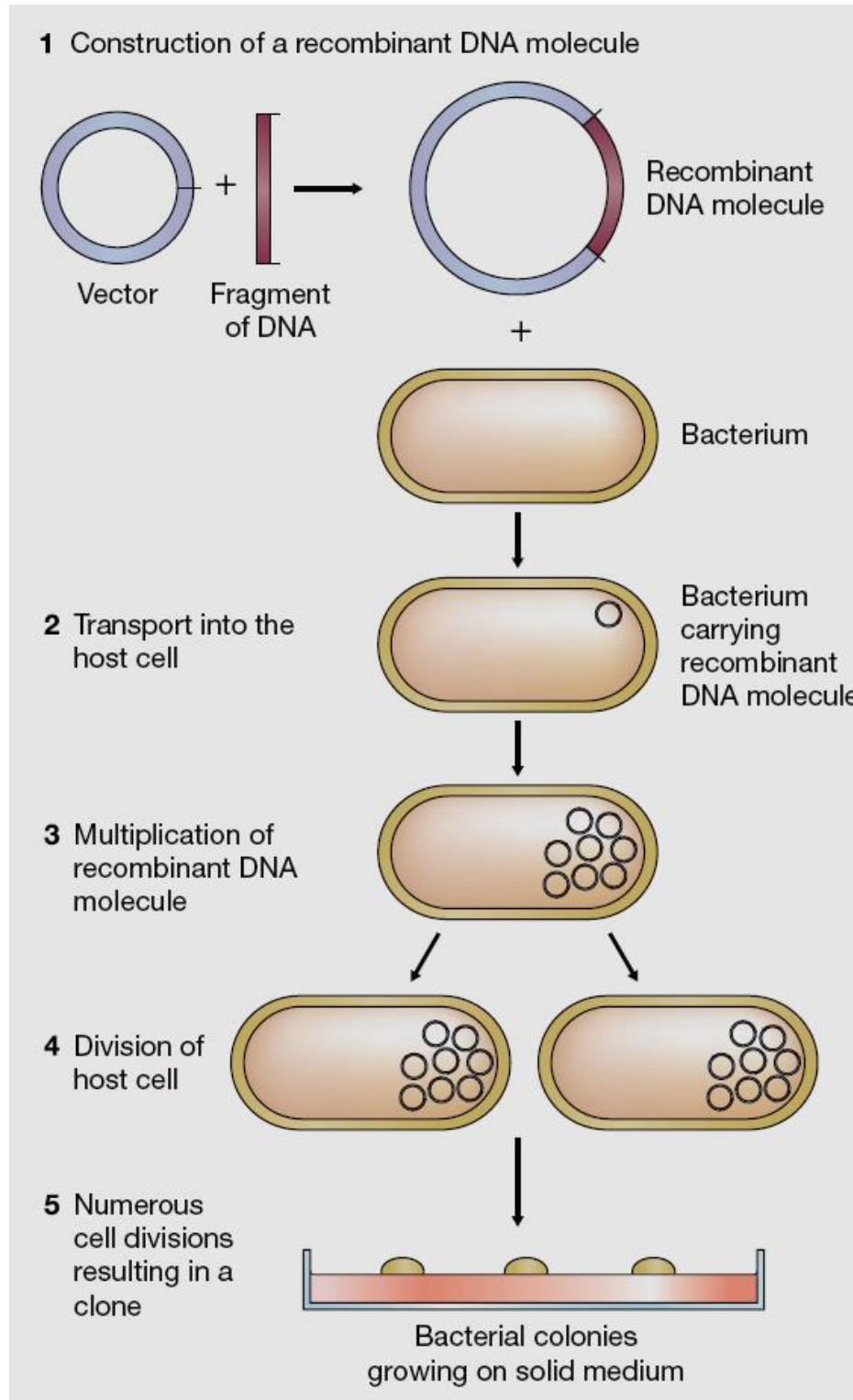
Σύνδρομο τυφλών άκρων DNA

Η αντίδραση την οποία καταλύει η T4 DNA λιγάση είναι ίδια και για προεξέχοντα συμπληρωματικά άκρα και για τυφλά άκρα DNA. Παρόλα αυτά η έλλειψη προεξέχοντων συμπληρωματικών άκρων κάνει την αντίδραση πιο σύνθετη και σημαντικά πιο αργή. Συνδέσεις προεξέχοντων συμπληρωματικών άκρων, οι οποίες είναι βασικά επισκευή ρηγμάτων στις αλυσίδες DNA, γίνονται περίπου 100 φορές πιο γρήγορα από ότι συνδέσεις τυφλών άκρων. 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. Επίσης είναι πιθανόν ότι η σύνδεση τυφλών άκρων DNA χρειάζεται τουλάχιστον δύο μόρια λιγάσης, ένα να κρατάει τα δύο άκρα αντιμέτωπα και ένα για να καταλύσει το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού

δεσμού. Για να επιτευχθεί λοιπόν ρυθμός σύνδεσης παρόμοιος με μια αντίδραση συμπληρωματικών άκρων, χρειάζεται 10-30 φορές περισσότερη T4 DNA λιγάση για τη σύνδεση τυφλών άκρων. Για να αυξηθεί ο αριθμός των αντιμέτωπων άκρων, αυξάνεται ο συνολικός αριθμός άκρων στην αντίδραση και χρησιμοποιείται λόγος j/i μικρότερος του 0,5. Η θερμοκρασία της αντίδρασης τυφλών άκρων δεν επηρεάζεται από τη σταθερότητα των υβριδίων που φτιάχνονται από προεξέχοντα συμπληρωματικά άκρα και έτσι ρυθμίζεται ανάλογα με το T_m του μικρότερου τμήματος DNA, αλλά βέβαια όχι μεγαλύτερη των 37°C. Το τελευταίο χαρακτηριστικό που ξεχωρίζει τους δύο τύπους αντιδράσεων σύνδεσης, είναι η αντιστρεπτή καταστολή συνδέσεων τυφλών άκρων παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ATP. Η τελική συγκέντρωση 0,5 mM ATP είναι άριστη για σύνδεση τυφλών και συμπληρωματικών άκρων. Συγκεντρώσεις όμως υψηλότερες από 2,5 mM ATP καταστέλλουν ειδικά την ικανότητα της T4 DNA λιγάσης να συνδέει τυφλά άκρα. Είναι σημαντικό λοιπόν να χρησιμοποιείται χαμηλή συγκέντρωση ATP στην αντίδραση, εκτός κι αν είναι επιθυμητό να κατασταλούν ειδικά οι συνδέσεις τυφλών άκρων.

Στο σχήμα 7, φαίνονται τα βασικά βήματα που απαιτούνται για την κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα.

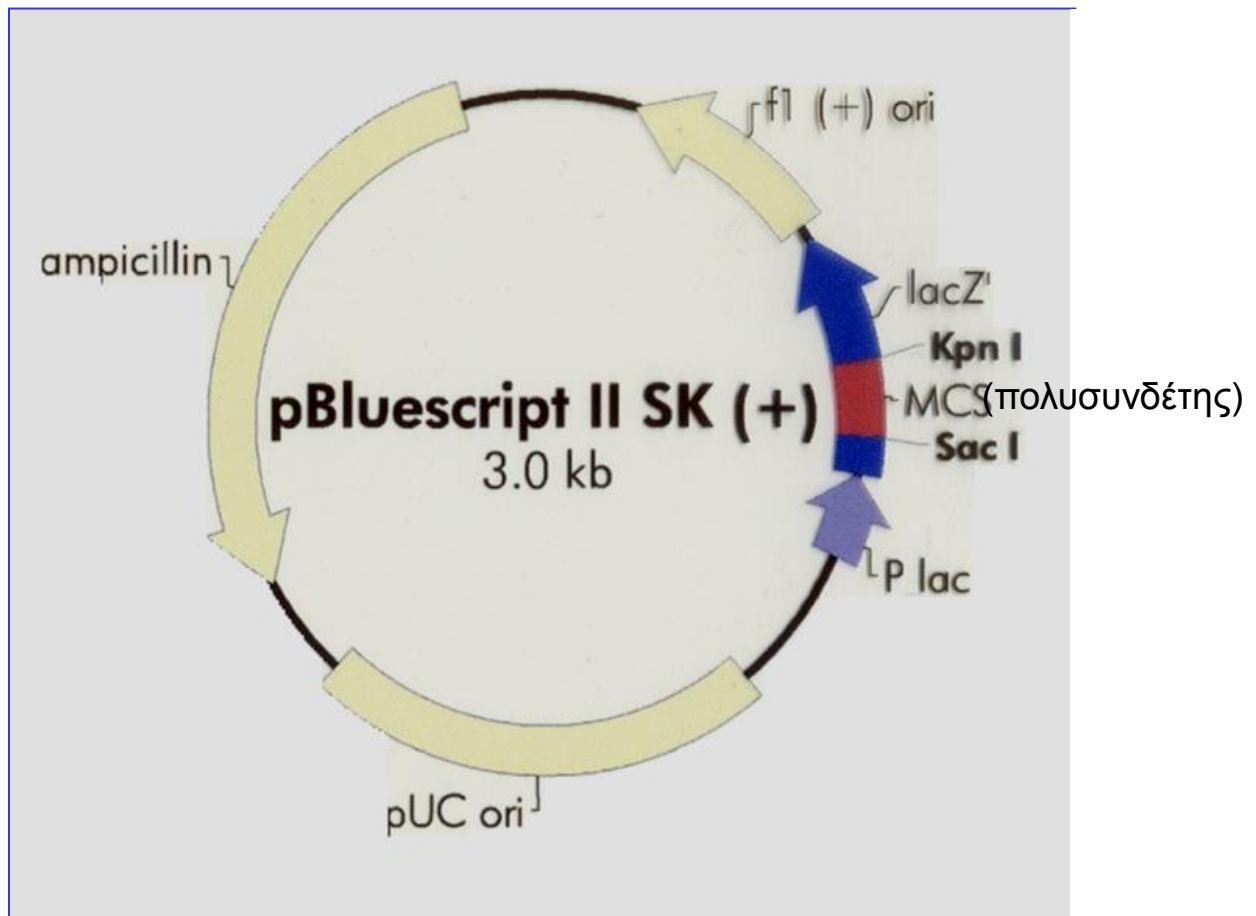
Σχήμα 7: Τα βασικά βήματα της κλωνοποίησης



Επιλογή

Για την διευκόλυνση της επιλογής των μετασχηματισμένων βακτηρίων που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιούνται τεχνικά πλασμίδια με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά όπως το pBS (Σχήμα 8).

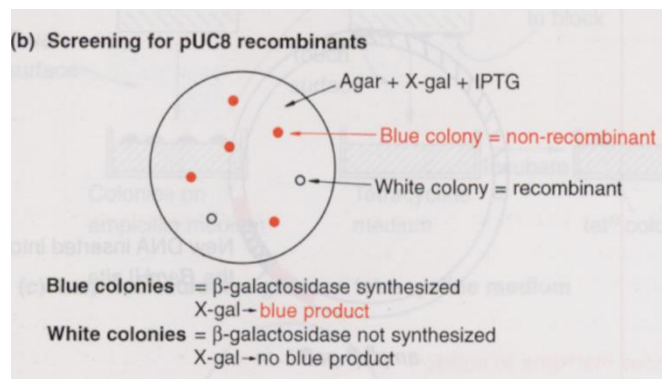
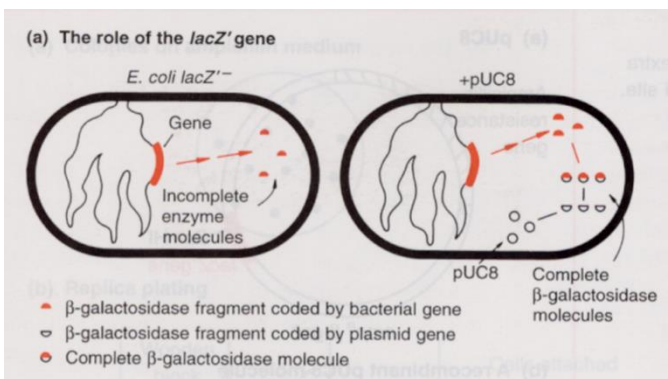
Σχήμα 8: Πλασμίδιο pBS



Το πλασμίδιο αυτό περιλαμβάνει έναν πολυσυνδέτη και τα γονίδια *ampR* και *lacZ*. Ο πολυσυνδέτης είναι μία αλληλουχία που περιλαμβάνει πολλές θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού και χρησιμεύει για την ένθεση ενός τμήματος DNA στο πλασμίδιο. Το γονίδιο *ampR* χρησιμεύει για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων. Το προϊόν του γονιδίου *ampR* είναι το ένζυμο β-

λακταμάση που προστατεύει το βακτηριακό κύτταρο από το αντιβιοτικό πενικιλίνη. Έτσι, μόνο τα μετασχηματισμένα βακτήρια που περιέχουν ανασυνδυασμένα ή μη-ανασυνδυασμένα πλασμίδια θα αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει πενικιλίνη. Το γονίδιο *lacZ* χρησιμεύει για την επιλογή των βακτηρίων που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Το προϊόν του γονιδίου *lacZ* (β -gal) αντιστοιχεί στην N-τελική περιοχή του ένζυμου β -γαλακτοζιδάση. Το πεπτίδιο αυτό συμπληρώνει τη μεταλλαγμένη β -γαλακτοζιδάση του βακτηρίου ($\Delta\beta$ -gal) με αποτέλεσμα να σχηματίζονται λειτουργικά μόρια β -γαλακτοζιδάσης στα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν πλασμίδια. Ο πολυσυνδέτης που βρίσκεται μέσα στη κωδική περιοχή του γονιδίου *lacZ* δεν εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου και κατά συνέπεια τα μετασχηματισμένα βακτήρια που περιέχουν το μη-ανασυνδυασμένο πλασμίδιο παράγουν λειτουργική β -γαλακτοζιδάση και βάφονται μπλε παρουσία του υποστρώματος X-gal. Αντίθετα τα μετασχηματισμένα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο δεν βάφονται παρουσία του υποστρώματος X-gal γιατί η ένθεση του τμήματος DNA στον πολυσυνδέτη καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου *lacZ* (Σχήμα 9).

Σχήμα 9: Επιλογή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

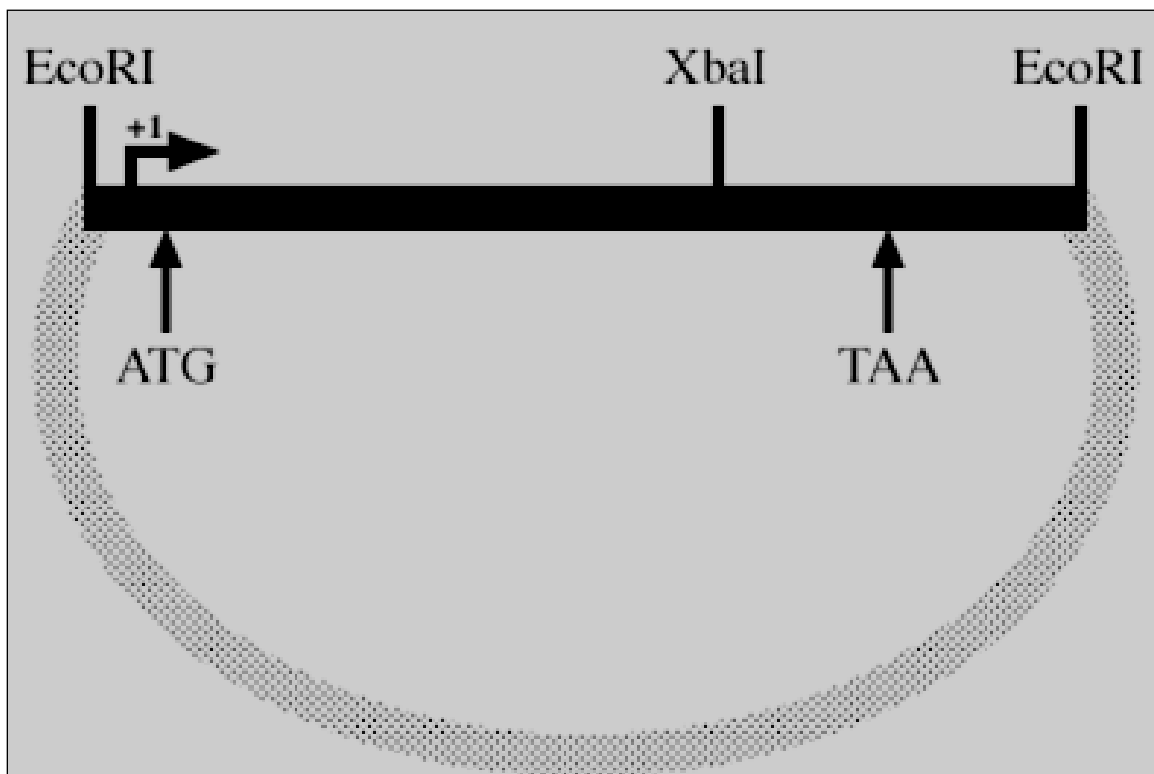


ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της άσκησης είναι η κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA που αντιστοιχεί στο 3' άκρο ενός θερμοεπαγόμενου γονιδίου (*hsp70*) του εντόμου *Ceratitis capitata*. Το γονίδιο αυτό έχει κλωνοποιηθεί στη θέση *EcoR* I του πλασμιδίου ρBS. Από τη κλωνοποίηση αυτή έχει προκύψει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ρHSP70 (Σχήμα 12).

Το γονίδιο απεικονίζεται με μαύρη γραμμή και έχει μέγεθος 2.8 kb, ενώ το πλασμίδιο απεικονίζεται με γκρι γραμμή και έχει μέγεθος 2.9 kb. Στο σχήμα αυτό φαίνονται η θέση έναρξης της μεταγραφής (+1), το κωδικό έναρξης της μετάφρασης (ATG), το κωδικό λήξης της μετάφρασης (TAA), και οι θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού *EcoR* I και *Xba* I.

Σχήμα 12: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ρBS-*hsp70*

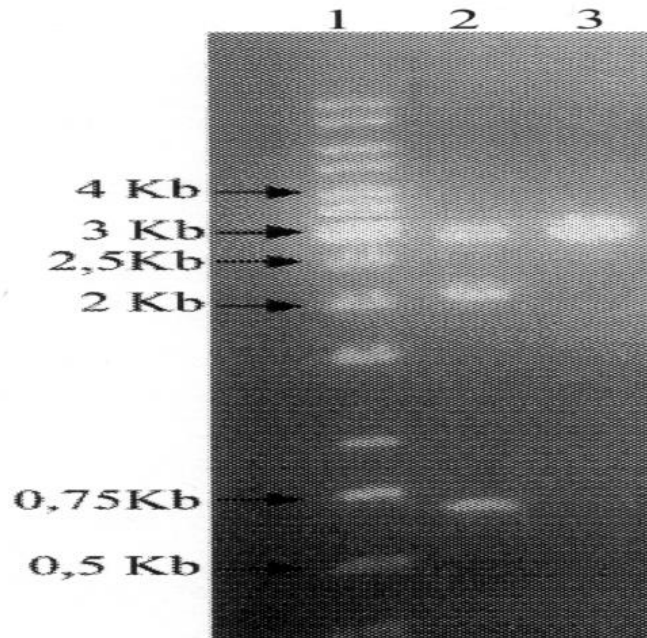


Το αντικείμενο της άσκησης είναι η κλωνοποίηση του τμήματος του *hsp70* γονιδίου που περιλαμβάνεται μεταξύ της *Xba* I θέσης και της δεξιάς *EcoR* I θέσης και έχει μέγεθος 0.7 kb. Για την κλωνοποίηση του τμήματος αυτού απαιτούνται τα παρακάτω πειράματα:

1. Διπλή πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pHSP70 με τα ένζυμα *EcoR* I και *Xba* I. Από την πέψη αυτή προκύπτουν τρία γραμμικά μόρια DNA με μεγέθη 2.9, 2,1 και 0.7 kb.
2. Ανάλυση των προϊόντων της πέψης σε 1% πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωση του 0.7 kb *EcoR* I/*Xba* I τμήματος DNA. Το τμήμα αυτό το ονομάζουμε DNAx.
3. Διπλή πέψη του πλασμιδίου pBS με τα ένζυμα *EcoR* I και *Xba* I, ανάλυση των προϊόντων της πέψης σε 1% πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωση του γραμμικού πλασμιδίου.
4. Σύνδεση του γραμμικού πλασμιδίου με το DNAx.
5. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E. coli* για μετασχηματισμό.
6. Μετασχηματισμός.
7. Χαρακτηρισμός ανασυνδυασμένων DNAx-κλώνων.

Τα πρώτα τρία πειράματα έχουν γίνει από τους υπεύθυνους του εργαστηρίου. Στην παρακάτω εικόνα 1, φαίνονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφορητική ανάλυση των πειραμάτων 1-3.

Εικόνα 1: Ηλεκτοφοριστική ανάλυση μαρτύρων DNA (1), προϊόντων διπλής πέψης του πλασμιδίου p $hsp70$ με τα ένζυμα EcoR I και Xba I (2) και προϊόντων διπλής πέψης του πλασμιδίου pBS με τα ένζυμα EcoR I και Xba I.



Η άσκηση θα ξεκινήσει από το πείραμα 4, με προετοιμασμένα διαλύματα γραμμικού πλασμιδίου pBS και DNAx και θα γίνει σε δύο τρίωρα. Στο πρώτο τρίωρο θα γίνουν τα πειράματα 4 και 5 και στο δεύτερο τρίωρο τα πειράματα 6 και 7.

Χημικά

Θρεπτικά υλικά (βακτοτροπίνη, εκχύλισμα μαγιάς), άγαρ, γλυκερόλη, γλυκόζη, αμπικιλίνη, NaCl, CaCl₂, MgCl₂, IPTG, X-gal

Διαλύματα

-**Διάλυμα Α:** Υδατικό διάλυμα γραμμικού πλασμιδίου pBS (30ng/μl)

-**Διάλυμα Β:** Υδατικό διάλυμα DNAx (10 ng/μl)

-**Διάλυμα Γ:** 5X Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (150mM Tris-HCl pH: 7.8, 50mM MgCl₂, 50mM DTT, 5mM ATP)

- Διάλυμα Δ:** T4 DNA λιγάση (0.25 u/ml)
- Διάλυμα LB:** Υγρό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας βακτηρίων
- Διάλυμα 0.1 M MgCl₂**
- Διάλυμα 0.1 M CaCl₂**
- Διάλυμα γλυκερόλης:** 14% γλυκερόλη σε 0.1 M CaCl₂
- Διάλυμα SOC:** Εμπλουτισμένο υγρό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας βακτηρίων (1% βακτοτρουπτόνη, 0.5% εκχύλισμα μαγιάς, 0.05% NaCl και γλυκόζη σε συγκέντρωση 20mM)
- Τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό:** (1% βακτοτρουπτόνη, 0.5% εκχύλισμα μαγιάς, 0.05% NaCl, 1% άγαρ, 50 μg/ml αμπικιλίνη, 0.1 mM IPTG, 40 μg/ml X-gal).

Πρωτόκολλο

Σύνδεση του γραμμικού πλασμιδίου με το DNAx

- 1) Σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου προσθέτουμε:
 - 3 μl διαλύματος A (90 ng γραμμικό πλασμίδιο, περίπου 3×10^{10} μόρια)
 - 3 μl διαλύματος B (30 ng DNAx, περίπου 3.5×10^{10} μόρια)
- 2) Αναμιγνύουμε τα διαλύματα και επωάζουμε το δείγμα στο υδατόλουτρο για 5 λεπτά στους 45 °C.
- 3) Μεταφέρουμε το δείγμα στον πάγκο και προσθέτουμε:
 - 2 μl διαλύματος Γ (5X ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης)
 - 2 μl διαλύματος Δ (T4 DNA λιγάση)
- 4) Αναμιγνύουμε τα διαλύματα και επωάζουμε το δείγμα για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- 5) Αποθηκεύουμε το δείγμα σύνδεσης στους -80°C .

Παρατηρήσεις

Σε μια αντίδραση σύνδεσης, ο μοριακός λόγος DNA/πλασμιδίου, δηλαδή ο λόγος των μορίων του DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε προς τα μόρια του πλασμιδίου θα πρέπει να είναι από 1:1 έως 3:1. Σε αντιδράσεις με μονόκλιωνα

συμπληρωματικά άκρα χρησιμοποιούμε περίπου 100 ng πλασμιδίου/10 μl αντίδρασης (περίπου 3×10^{10} μόρια) ενώ σε αντιδράσεις με τυφλά άκρα χρησιμοποιούμε τριπλάσια ποσότητα. Η ποσότητα του DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο: **ng DNA = ng πλασμιδίου $\times \alpha \times \beta$** , όπου α είναι ο μοριακός λόγος DNA/πλασμίδιο και β είναι ο λόγος μεγέθους DNA/πλασμιδίου.

Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E. coli* για μετασχηματισμό

- 1) Καλλιεργούμε κύτταρα *E. coli* σε υγρό θρεπτικό υλικό (LB) έως ότου η συγκέντρωση των κυττάρων να γίνει περίπου 10^8 κύτταρα/ml ($OD_{550}=0.5-0.6$).
- 2) Μεταφέρουμε 1 ml από την καλλιέργεια σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου.
- 3) Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά για να καθιζάνουν τα κύτταρα και πετάμε το υπερκείμενο διάλυμα.
- 4) Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 200 μl κρύου διαλύματος $MgCl_2$
- 5) Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά για να καθιζάνουν τα κύτταρα και πετάμε το υπερκείμενο διάλυμα.
- 6) Ενωιρούμε τα κύτταρα σε 200 μl κρύου διαλύματος $CaCl_2$ και κρατάμε το δείγμα στον πάγο για 30 λεπτά.
- 7) Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά για να καθιζάνουν τα κύτταρα και πετάμε το υπερκείμενο διάλυμα.
- 8) Ενωιρούμε τα κύτταρα ($\sim 10^8$) σε 50 μl κρύου διαλύματος γλυκερόλης και αποθηκεύουμε το δείγμα στους $-80^\circ C$.

Παρατηρήσεις

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 550 nm (OD_{550}) είναι 0.5-0.6 μονάδες.

Τα δεκτικά κύτταρα που παρασκευάζονται με την παραπάνω μέθοδο δίνουν ποσοστό μετασχηματισμού περίπου 0.001%. Δηλαδή αν 100 ng pBS (περίπου

3×10^{10} μόρια) αναμιχθούν με αντίστοιχο αριθμό δεκτικών κυττάρων, περιμένουμε να πάρουμε περίπου 3×10^5 μετασχηματισμένα βακτήρια.

Μετασχηματισμός και χαρακτηρισμός ανασυνδυασμένων DNA-κλώνων

- 1) Ξεπαγώνουμε δεκτικά κύτταρα *E.coli*, προσέχοντας ώστε η θερμοκρασία τους να μην ξεπεράσει του 4°C και τα κρατάμε σε πάγο.
- 2) Μεταφέρουμε 40 μl δεκτικά κύτταρα σε παγωμένο σωληνάκι μικροφυγοκέντρου και τα κρατάμε σε πάγο.
- 3) Προσθέτουμε 2 μl από το δείγμα σύνδεσης, αναμιγνύουμε απαλά και κρατάμε το δείγμα σε πάγο για 40 λεπτά. [Στο σημείο αυτό τα πλασμίδια συσσωματώνονται στην επιφάνεια των κυττάρων].
- 4) Επωάζουμε το δείγμα στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα. [Στο στάδιο αυτό τα πλασμίδια εισέρχονται μέσα στα κύτταρα].
- 5) Μεταφέρουμε το δείγμα για 2-3 λεπτά στον πάγο και ακολούθως προσθέτουμε 200 μl θρεπτικό υλικό (SOC).
- 6) Επωάζουμε το δείγμα στους 37°C για 1 ώρα. [Στο στάδιο αυτό τα βακτήρια αναρρώνουν από το θερμικό στρες και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται].
- 7) Επιστρώνουμε 200 μl από το δείγμα σε τρυβλίο που περιέχει στερεό θρεπτικό υλικό
- 8) Επωάζουμε το τρυβλίο, ανεστραμμένο στους 37°C για 10 ώρες σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας. [Στο στάδιο αυτό πολλαπλασιάζονται μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα].
- 9) Μετράμε τον αριθμό των άσπρων και μπλε αποικιών που σχηματίστηκαν στο τρυβλίο. Οι άσπρες αποικίες αντιστοιχούν σε βακτήρια που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια όπως αναφέρθηκε στη θεωρία.

Ερώτηση: Στο πείραμά σας περιμένετε περίπου 30 έως 300 μετασχηματισμένες αποικίες. Γιατί;

ΟΡΓΑΝΑ-ΥΛΙΚΑ

- Μετρητής pH
- Μικροφυγόκεντροι
- Ζυγός
- Υδατόλουτρα
- Μηχάνημα PCR
- Τροφοδοτικά σταθερής τάσης
- Συσκευές ηλεκτροφόρησης DNA
- Εικονοσκόπιο υπεριώδους ακτινοβολίας
- Θερμαντική πλάκα
- Ρυθμιζόμενα σιφώνια (πιπέτες) (2.20μl και 20-200μl)
- Υάλινα δοχεία διαλυμάτων των 100-1000ml
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100ml-1000ml
- Κωνικές φιάλες των 250ml
- Σωληνάκια των 0.5ml τύπου Eppendorf
- Βάσεις για σωληνάκια
- Σιφώνια (πιπέτες Pasteur) και ειδικά πουάρ
- Δοχεία πάγου
- Τρυβλία Petri

ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

1. Όλοι οι εκπαιδευόμενοι πρέπει να φορούν εργαστηριακή μπλούζα κατά την εκτέλεση της άσκησης.
2. Όλα τα διαλύματα πρέπει να μεταφέρονται με σιφώνια (πιπέτες). Δεν επιτρέπεται η αναρρόφηση με το στόμα.
3. Το μηχάνημα PCR ανεβάζει τη θερμοκρασία σε σημείο που προκαλεί εγκαύματα. Δεν το αγγίζουμε κατά τη λειτουργία.
4. Το βρωμιούχο εθίδιο 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.