



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΘΗΝΑ 2024



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΘΗΝΑ 2024

Η νέα έκδοση των Εργαστηριακών Ασκήσεων Μοριακής Βιολογίας επιμελήθηκε από την Δρ. Ελευθερία-Λάρα Κραββαρίτη (Ε.ΔΙ.Π.).
Αποτελεί αναθεωρημένη και εμπλουτισμένη έκδοση του εργαστηριακού οδηγού Μοριακής Βιολογίας των Ομότιμων Καθηγητών Ρ. Λεκανίδου και Γ. Ροδάκη και της αφυπηρετήσασας Αναπλ. Καθηγήτριας Σ. Τσιτήλου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Απομόνωση ολικού DNA από ζωικό ιστό και ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο της διφαινυλαμίνης.
2. Απομόνωση ολικού RNA από ζωικό ιστό και ποσοτικός προσδιορισμός του.
3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).
4. Μετασχηματισμός βακτηρίων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια.
5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.
6. Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης.
7. Τιτλοδότηση εναιωρήματος βακτηριοφάγων λ (φαγικής βιβλιοθήκης).
8. Χαρτογράφηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

1α. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA από ζωϊκό ιστό

Θεωρητικό μέρος

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

Κοινά (και απαραίτητα) στάδια στη διαδικασία απομόνωσης DNA είναι:

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

Στην άσκηση αυτή θα απομονωθεί χρωμοσωμικό DNA από συκώτι μοσχαριού. Το χρωμοσωμικό DNA μπορεί γενικά να χρησιμοποιηθεί σε μια ποικιλία πειραμάτων Μοριακής Βιολογίας (π.χ. ανάλυση Southern, κατασκευή χρωμοσωμικών βιβλιοθηκών, εύρεση καμπύλης τήξης, PCR κλπ.).

Η αρχή της μεθόδου που θα ακολουθήσουμε είναι η εξής:

Παρασκευάζεται εκχύλισμα συκωτιού, ομογενοποιώντας τον ιστό κάτω από συνθήκες όπου ελευθερώνεται το DNA από τις νουκλεοπρωτεΐνες. Στη συνέχεια, επειδή το DNA είναι αδιάλυτο στην αιθανόλη και διαλυτό σε διαλύματα αλάτων (ενώ οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται σε διαλύματα μεγάλης περιεκτικότητας σε NaCl), μπορούμε, κάνοντας μια σειρά διαδοχικών καταβυθίσεων με αλκοόλη και εκχυλίσεων με διαλύματα αλάτων, να πάρουμε καθαρό DNA.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής εργασίας πρέπει να τηρούνται ορισμένες συνθήκες για να αποφύγουμε μεγάλες αλλαγές στην τριτοταγή δομή του DNA. Στο DNA μπορεί να προκληθούν δομικές αλλαγές από διάφορους παράγοντες, όπως:

1. Θραύση φωσφοδιεστερικών δεσμών από επίδραση νουκλεολυτικών ενζύμων (π.χ., DNase)
2. Θραύση των N-γλυκοζιδικών δεσμών μεταξύ δεοξυριβόζης και πουρινών με την επίδραση οξέος ($\text{pH} < 2$). Η αντίδραση αυτή ονομάζεται «**αποπουρίνωση**» (**depurination**) του DNA και το καθιστά ευάλωτο για θραύση σε υψηλή θερμοκρασία (π.χ., $>90^\circ\text{C}$) παρουσία άλλων χημικών παραγόντων (π.χ., βλέπε αντίδραση Maxam).
3. Καταστροφή των υδρογονικών δεσμών, που κρατούν μαζί τις δύο αλυσίδες του DNA, με αποτέλεσμα την αποδιάταξη ή την αποσύνδεση των αλυσίδων:

α) από επίδραση βάσης (pH > 10)

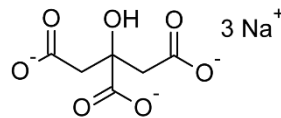
β) από επίδραση οξέος (pH < 3)

γ) από επίδραση θερμότητας και σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση άλατος στο διάλυμα, αλλά και αποδιατακτικών παραγόντων που μειώνουν την ιονική ισχύ (π.χ., θερμοκρασία > 80°C σε 0.01 N NaCl, ενώ >90°C σε 1.0 N NaCl, ή και ~50°C παρουσία φορمامιδίου)

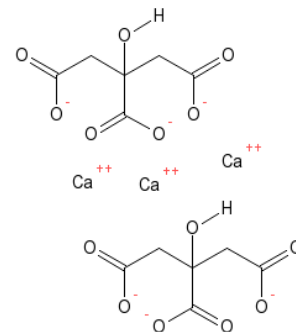
δ) από μείωση της ιονικής ισχύος. Η θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA εξαρτάται από την ιονική ισχύ. Π.χ., σε απεσταγμένο νερό η θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA είναι μικρότερη των 25°C.

4. Θραύση της διπλής έλικας σε μικρότερα κομμάτια με την επίδραση μηχανικών αιτίων. Σημειώνεται ότι λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ένα μακρομοριακό DNA «διπλώνει» σε σφιχτές τυχαίες δομές, οι οποίες δημιουργούν ισχυρότατες δυνάμεις θραύσης ακόμη και ομοιοπολικών δεσμών (όπως οι φωσφοδιεστερικοί). Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η απομόνωση DNA με οποιαδήποτε μέθοδο δεν οδηγεί ποτέ σε απομόνωση DNA ολόκληρων χρωμοσωμάτων).

Έτσι, κατά τη διαδικασία απομόνωσης DNA αποφεύγονται οι ακραίες τιμές pH, η υψηλή θερμοκρασία και η χαμηλή ιονική ισχύς. Αν και το συκώτι περιέχει ενεργή δεοξυριβονουκλεάση (DNase), όπως και οι περισσότεροι φυτικοί και ζωικοί ιστοί, η δράση του ενζύμου παρεμποδίζεται κατά την πειραματική διαδικασία από την παρουσία χηλικού παράγοντα (κιτρικό ιόν). Επειδή η DNase για να δράσει χρειάζεται ένα δισθενές κατιόν, το κιτρικό παρεμποδίζει αποτελεσματικά τη δράση του ενζύμου γιατί δεσμεύει Ca^{+2} και Mg^{+2} . Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την απομόνωση το DNA σπάει σε μικρότερα κομμάτια (κυρίως κατά την ομογενοποίηση), αλλά αυτό δεν αλλάζει την πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή του μορίου και δεν έχει μεγάλη σημασία σε αυτό το πείραμα.



Κιτρικό ιόν



Πειραματικό μέρος

- Υλικά:
- Συκώτι
 - Ρυθμιστικό διάλυμα (0.14 M NaCl - 0.01 M NaCitrate, pH 7.3)
 - Διάλυμα άλατος 2,6 M NaCl
 - Απόλυτη αιθανόλη (98%)
 - Διάλυμα T.E. (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA)
 - Ομογενοποιητής
 - Φυγόκεντρος, σωλήνες φυγοκέντρου, γυάλινη ράβδος, ποτήρια ζέσεως

Πειραματική διαδικασία:

1. Ζυγίζουμε 30-40 γραμμάρια παγωμένο συκώτι. Βάζουμε το συκώτι στο δοχείο του ομογενοποιητή και προσθέτουμε 300 ml παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος και ομογενοποιούμε. Το δοχείο του ομογενοποιητή θα βρίσκεται μέσα σε ένα άλλο ανοιχτό δοχείο γεμάτο νερό και κομμάτια πάγου.
2. Γεμίζουμε το σωλήνα φυγοκέντρου με 10 ml ομογενοποίηση. Ισοζυγίζουμε ανά δύο τους σωλήνες προσθέτοντας αν χρειαστεί **ρυθμιστικό διάλυμα** και φυγοκεντρούμε στις 6000 στροφές/λεπτό (rpm) (που αντιστοιχούν σε περίπου 5000 g) για 15 min.

Στο ρυθμιστικό διάλυμα NaCl μικρής ιονικής ισχύος (0.14 M NaCl - 0.01 M NaCitrate, pH 7.3) τα σύμπλοκα DNA-πρωτεΐνης (DNP) δεν είναι διαλυτά ενώ τα σύμπλοκα RNA-πρωτεΐνης (RNP) είναι. Έτσι, με τη φυγοκέντρωση μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα DNPs (στο ίζημα) από τα RNPs (στο υπερκείμενο).

3. Μεταφέρουμε προσεκτικά το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα και το διατηρούμε στον πάγο. Το ίζημα που παραμένει μέσα στο σωλήνα, το αναδιαλύουμε πολύ καλά ρίχνοντας **10 ml ρυθμιστικό διάλυμα**. Στη συνέχεια, αφού ισοζυγίσουμε τους σωλήνες (με ρυθμιστικό διάλυμα) επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρωση όπως στο βήμα 2.
4. Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα σε **10 ml διαλύματος 2.6 M NaCl**. Φυγοκεντρούμε ξανά όπως προηγουμένως, αφού ισοζυγίσουμε τους σωλήνες με διάλυμα 2.6 M NaCl.

Σε αυτή τη συγκέντρωση NaCl οι δεοξυριβονουκλεοπρωτεΐνες (DNP's) είναι διαλυτές. Επιπλέον, εφόσον αναδιαλυθεί τελείως το ίζημα, το NaCl σπάει τους ηλεκτροστατικούς δεσμούς μεταξύ πρωτεΐνης και DNA, με αποτέλεσμα να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες.

5. **Συλλέγουμε το υπερκείμενο (στο οποίο βρίσκεται το DNA)** σε ένα ποτήρι ζέσεως. Προσθέτουμε προσεκτικά **δύο όγκους αιθανόλης (98%)** προσπαθώντας να μην αναμιχθούν οι φάσεις. Στη **μεσόφαση** θα παρατηρήσουμε τη δημιουργία ενός άσπρου ιζήματος. Τότε αρχίζουμε να

περιστρέφουμε τη γυάλινη ράβδο και καθώς η αιθανόλη θα αναμιγνύεται με την υδατική φάση, το ίζημα θα τυλίγεται γύρω από τη ράβδο.

Στο στάδιο αυτό γίνεται κατακρήμνιση του DNA (βλέπε Σημειώσεις). Στην επιφάνεια επαφής των δύο φάσεων τα μακρομόρια του DNA, που στο υδατικό διάλυμα είναι διαλυτά, σταδιακά αφυδατώνονται από την παρουσία περίσσειας αιθανόλης και σχηματίζουν συσσωματώματα λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Με την περιστροφή της γυάλινης ράβδου, όλο και περισσότερα μόρια DNA προστίθενται στα συσσωματώματα δημιουργώντας ένα άσπρο ινώδες ίζημα. Μέσα στο υδατικό διάλυμα όμως, εκτός από DNA, υπάρχουν ακόμα μόρια RNA και πρωτεϊνών τα οποία επίσης κατακρημνίζονται παρουσία 70% αιθανόλης. Αν αφήναμε τις δύο φάσεις να αναμιχθούν από την αρχή, τότε τα μόρια αυτά θα συμπαρασύρονταν από τα συμπλέγματα του DNA στο ίζημα. Με την δημιουργία δύο φάσεων και την παραλαβή του DNA από τη μεσόφαση αποφεύγονται σε σημαντικό βαθμό αυτές οι προσμίξεις καθώς τα περισσότερα μόρια RNA και πρωτεϊνών δεν προλαβαίνουν να κατακρημνιστούν και να εγκλωβιστούν στο ίζημα του DNA.

6. Αφήνουμε τη ράβδο με το ίζημα στον αέρα για λίγο ώστε να στεγνώσει η αιθανόλη και στη συνέχεια μεταφέρουμε σε σωλήνα που περιέχει 1 ml διαλύματος TE για να διαλυθεί.
7. Ο σωλήνας που περιέχει το DNA φυλάσσεται στους 4° C. Μέρος αυτού θα χρησιμοποιηθεί για ποσοτικό προσδιορισμό.

Σημειώσεις

Για την απομόνωση του DNA με αυτή την τεχνική γίνεται χρήση του **ινώδους χαρακτήρα του DNA**. Οι εκχυλίσσεις με άλατα και οι ποσότητες αλκοόλης που χρησιμοποιούνται είναι κατά κάποιο τρόπο επιλεκτικές για DNA και όχι για RNA, αλλά είναι η **νηματοειδής μορφή** του DNA κατά την καταβύθιση με αλκοόλη και το ακόλουθο περιτύλιγμα του DNA στη ράβδο, που βεβαιώνει ένα σχετικά καθαρό DNA χωρίς RNA. Για τον πλήρη πάντως καθαρισμό του DNA από το RNA μπορούμε μετά την απομόνωση και αναδιάλυσή του να επώασουμε με **ριβονουκλεάση (RNase)**, ελεύθερη από προσμίξεις DNase, και στη συνέχεια να καθαρίσουμε το δείγμα από το ένζυμο και τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που τυχόν έχουν παραμείνει με **εκχυλίσσεις με φαινόλη** (βλ. άσκηση 2).

Κατακρήμνιση DNA-RNA

Η αιθανόλη είναι ένας πολικός διαλύτης με μικρότερη διηλεκτρική σταθερά από το H₂O. Σε υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατι, τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA και του RNA καθώς και τα ιόντα του άλατος καλύπτονται από τα δίπολα μόρια του νερού και παραμένουν διαλυτά. Σε διάλυμα αιθανόλης ~70% (που δημιουργείται με την προσθήκη 2,5 όγκων απόλυτης αιθανόλης) το DNA/RNA δεν είναι διαλυτό και παρουσία άλατος σχηματίζει ίζημα. Αυτό συμβαίνει γιατί η αιθανόλη λειτουργεί ως **παράγοντας**

αφυδάτωσης, και λόγω της μείωσης της διηλεκτρικής σταθεράς τα μονοσθενή κατιόντα που υπάρχουν στο διάλυμα έλκονται πιο ισχυρά από τα αρνητικά φορτισμένα μόρια των νουκλεϊκών οξέων. Έτσι, τα αρνητικά φορτία εξουδετερώνονται, γεγονός που επιτρέπει τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η απαλλαγή των νουκλεϊκών οξέων από τα μόρια του H₂O έχει ως αποτέλεσμα να πλησιάσουν και να ενωθούν μεταξύ τους είτε διαφορετικά μόρια είτε διαφορετικές περιοχές του ίδιου μορίου νουκλεϊκού οξέος και να σχηματιστούν έτσι μεγαλομοριακά συμπλέγματα λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

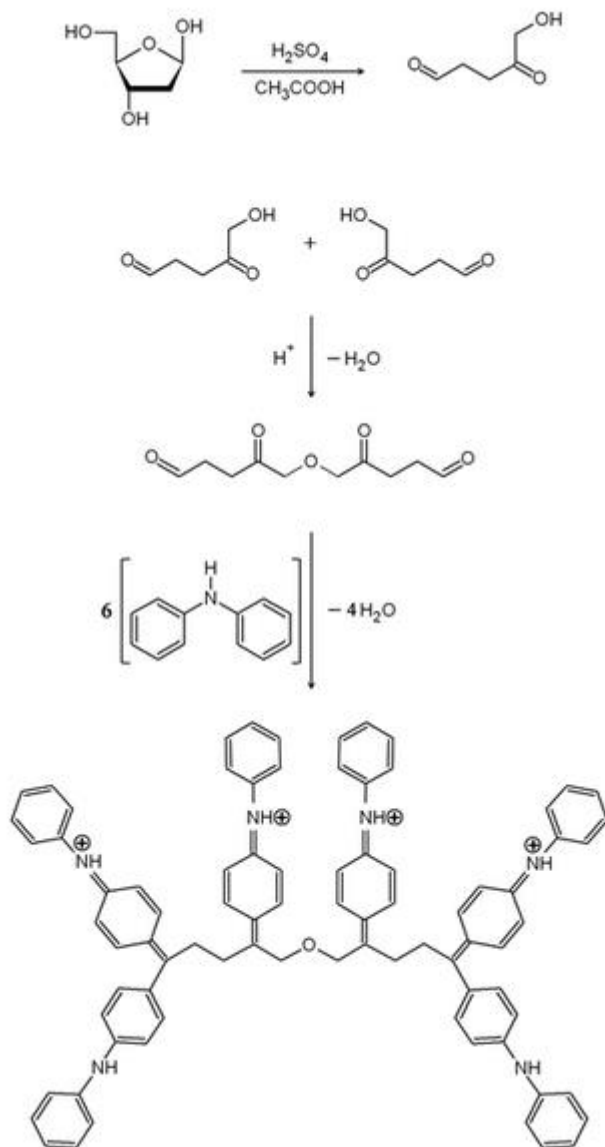
Ο σχηματισμός μεγαλομοριακών συμπλεγμάτων έχει καθοριστική σημασία για την κατακρήμνιση ενός νουκλεϊκού οξέως και την από κει και πέρα ποσοτική παραλαβή του. Αν η ποσότητα του νουκλεϊκού οξέως είναι μεγάλη (π.χ., 10 mg/ml) τότε ο σχηματισμός ίζηματος είναι ορατός, λόγω της ινώδους υφής του, και μπορεί να παραληφθεί με γυάλινη ράβδο, περιστρέφοντάς την απλώς γύρω από το ινώδες ίζημα. Όμως, αν η ποσότητα του νουκλεϊκού οξέος (DNA ή RNA) είναι μικρή (π.χ., 1 μg/ml) τότε απαιτούνται (α) παραμονή του σωλήνα σε χαμηλή θερμοκρασία για κάποιο χρονικό διάστημα, ώστε να δοθεί η δυνατότητα σχηματισμού μεγαλομοριακών συμπλεγμάτων, και (β) φυγοκέντρηση, γιατί τα σχηματιζόμενα συμπλέγματα καταβυθίζονται (ταχύτερα) προς τον πυθμένα του σωλήνα (όπου σχηματίζουν «ίζημα») λόγω της επιτάχυνσης της βαρύτητας (g) που ασκείται σ' αυτά. Τέλος, αν η ποσότητα του DNA (ή του RNA) είναι ιδιαίτερα μικρή (π.χ. 1 ng/ml) τότε απαιτείται προσθήκη «φορέα» (carrier), όπως ονομάζεται, δηλαδή μιας ποσότητας ενός νουκλεϊκού οξέος, το οποίο όντας σε σχετικά μεγαλύτερη συγκέντρωση, σχηματίζει μεγαλομοριακά συμπλέγματα «συμπαρασύροντας», κατά κάποιον τρόπο, κατά το σχηματισμό τους και τα μόρια DNA ή RNA που μας ενδιαφέρουν. Προφανώς, σ' αυτές τις περιπτώσεις λαμβάνεται μέριμνα σχετικά με το είδος του νουκλεϊκού οξέος που θα προστεθεί ως «φορέας» έτσι ώστε να μην επηρεάσει την από κει και πέρα ανάλυση του δείγματος.

1β. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΔΙΦΑΙΝΥΛΑΜΙΝΗΣ

Θεωρητικό μέρος

Το DNA, κάτω από όξινες συνθήκες, σχηματίζει με το αντιδραστήριο της διφαινυλαμίνης ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος με μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm. Η μέθοδος αυτή δεν είναι ειδική για DNA αλλά για τις 2-δεοξυπεντόζες, γενικώς.

Η αρχή της μεθόδου έχει ως εξής: Το DNA θερμαίνεται μέχρι βρασμού κάτω από ισχυρά όξινες συνθήκες με αποτέλεσμα να υποστεί αποπουρίνωση και να απελευθερωθούν οι δεοξυριβόζες από τις πουρίνες. Στη συνέχεια, το σάκχαρο αφυδατώνεται και αντιδρά ισχυρά με την διφαινυλαμίνη σχηματίζοντας το σύμπλοκο μπλε χρώματος σύμφωνα με το μηχανισμό που παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Αντίδραση διφαινυλαμίνης με το σάκχαρο 2-δεοξυριβόζη

Πειραματικό μέρος

Υλικά:

- Αντιδραστήριο διφαινυλαμίνης (πρέπει να είναι φρέσκο, παρασκευάζεται από τους υπεύθυνους της άσκησης): 2 g διφαινυλαμίνης διαλύονται σε 100 ml πυκνό οξικό οξύ και εν συνεχεία προστίθενται στο διάλυμα 4 ml πυκνόθειικό οξύ.
- Πρότυπο διάλυμα DNA 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Διάλυμα T.E. (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA)

Πειραματική διαδικασία:

α) Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Ετοιμάστε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες σύμφωνα με τον επόμενο πίνακα. Αναμίξτε καλά το περιεχόμενό τους και τοποθετήστε τους στους 95° C για 10 min. Αφού κρυώσουν μετρήστε την απορρόφηση στα 595 nm.

Οι σωλήνες 1-5 θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή **πρότυπης καμπύλης**. Υπολογίστε τη συγκέντρωση DNA σε κάθε σωλήνα με βάση την αραίωση που έχετε κάνει και φτιάξτε ένα διάγραμμα τοποθετώντας τις συγκεντρώσεις στον άξονα των x και τις αντίστοιχες απορροφήσεις στον άξονα των y.

Σωλήνας	Πρότυπο διάλυμα DNA (200μg/ml) (ml)	H ₂ O (ml)	Διφαινυλαμίνη (ml)	Συγκέντρωση DNA (μg/ml)	A595
Blank	-	1	2		
1	0,2	0,8	2		
2	0,4	0,6	2		
3	0,6	0,4	2		
4	0,8	0,2	2		
5	1,0	-	2		

β) Ποσοτικοποίηση δείγματος DNA

- Κάντε μια αραίωση του διαλύματος DNA που απομονώσατε σε νερό, σύμφωνα με τις υποδείξεις του υπεύθυνου της άσκησης.
- Μεταφέρετε 0,4 ml του αραιωμένου δείγματος σε νέο σωλήνα και προσθέστε 0,8 ml αντιδραστηρίου διφαινυλαμίνης (στον απαγωγό). Επιάστε στους 95° C για 10 min και στη συνέχεια αφήστε το δείγμα να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετρήστε την απορρόφηση του αραιωμένου δείγματος στα 595 nm, χρησιμοποιώντας ως τυφλό νερό που έχει επεξεργαστεί με τον ίδιο τρόπο.
- Προσδιορίστε τη συγκέντρωση του DNA που απομονώσατε, χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη.

2α. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA από ζωϊκό ιστό

Θεωρητικό μέρος

Το RNA, όπως και το DNA, είναι από τα πιο σημαντικά πληροφοριακά μόρια. Αποτελεί πρώτη ύλη σε μια σειρά βασικών πειραμάτων όπως ανάλυση Northern, κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης, *in vitro* μετάφραση, RT-PCR κλπ.. Για όλα τα παραπάνω πειράματα απαιτείται RNA υψηλής ποιότητας. Καθώς όμως το RNA είναι από τη φύση του ευαίσθητο μόριο η απομόνωσή του πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή και κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες.



Υπάρχουν πολλές μέθοδοι απομόνωσης του RNA. Ανεξάρτητα πάντως από τη μέθοδο που χρησιμοποιεί κανείς, πριν προχωρήσει στην απομόνωση θα πρέπει να έχει αποφασίσει τι είδους RNA χρειάζεται. Αν μεν χρειάζεται ολικό RNA, τότε πρέπει να γίνει ομογενοποίηση ολόκληρων κυττάρων και απομόνωση του RNA από το ομογενοποίημα. Αν όμως απαιτείται κάποιος ειδικός τύπος RNA (π.χ. πυρηνικό, ριβοσωμικό κλπ.) πρέπει πρώτα να γίνει κλασμάτωση του κυττάρου με διαφορεική φυγοκέντρηση κι έπειτα απομόνωση του RNA από το ειδικό κλάσμα.

Το RNA, όπως και το DNA, βρίσκεται πάντα συνδεδεμένο με πρωτεΐνες στο κύτταρο, από τις οποίες πρέπει να απαλλαγεί προκειμένου να απομονωθεί σε καθαρή μορφή. Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα νουκλεϊκά οξέα μπορεί να επιτευχθεί με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων ή/και **απορρυπαντικών** τα οποία αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες (αναστέλλοντας συγχρόνως και τη δράση των νουκλεασών). Παρουσία απορρυπαντικών όπως το **SDS** (Sodium Dodecyl Sulphate) διασπώνται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί που συγκρατούν τα σύμπλοκα νουκλεϊκού οξέος-πρωτεΐνης και στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μπορούν να αφαιρεθούν με τη μέθοδο της **εκχύλισης με φαινόλη**. Η φαινόλη είναι ένας οργανικός διαλύτης που αλληλεπιδρά με τις υδρόφοβες περιοχές των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών και τις διαλυτοποιεί. Αντίθετα, το DNA και το RNA έχοντας πολύ λιγότερες υδρόφοβες ομάδες, δεν διαλύονται στη φαινόλη. Η ανάμειξη φαινόλης (διαλυτοποιημένης και κορεσμένης σε H₂O 8%) με ένα υδατικό διάλυμα δημιουργεί δύο φάσεις, την υδατική στο πάνω μέρος και τη φαινολική στο κάτω (όπως ξεχωρίζει το λάδι από το νερό) λόγω της διαφοράς στο ειδικό βάρος (ε.β. φαινόλης 1,07). Υπάρχει περίπτωση, όμως, το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται το δείγμα μας να έχει μεγάλη αλατότητα (>0,5 M) ή να περιέχει σουκρόζη (>10%), οπότε ο διαχωρισμός να μην είναι καλός ή οι φάσεις να ανατραπούν. Προς αποφυγή αυτού του φαινομένου, συχνά χρησιμοποιούμε αντί για σκέτη φαινόλη, μίγμα **φαινόλης-χλωροφορμίου** (1:1) το οποίο αυξάνει το ειδικό βάρος της οργανικής φάσης (ε.β. χλωροφορμίου 1,47) εξασφαλίζοντας καλό διαχωρισμό των φάσεων.

Πρακτικά, μετά την προσθήκη φαινόλης ή μίγματος φαινόλης-χλωροφορμίου (συνήθως ίσου όγκου) σε υδατικό διάλυμα DNA-RNA-πρωτεϊνών, ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex, με σκοπό την όσο το δυνατό καλύτερη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών στην οργανική φάση) και

μετά το δείγμα φυγοκεντρείται για το σχηματισμό των δύο φάσεων (υδατικής, πάνω και οργανικής, κάτω). Συχνά, η ποσότητα των πρωτεϊνών είναι αρκετά μεγάλη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μεσόφασης, δηλαδή μιας ζώνης μεταξύ των δύο φάσεων. Η μεσόφαση δημιουργείται γιατί τα μεν υδρόφιλα αμινοξέα των πρωτεϊνών προσανατολίζονται (έχουν επαφή) προς την υδατική φάση, ενώ τα υδρόφοβα αμινοξέα απομακρύνονται από αυτήν διατηρώντας συνάφεια και επαφή με την οργανική φάση (φαινόλη). Κατά κανόνα, αν με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου διαπιστωθεί παρουσία μεσόφασης, παραλαμβάνεται η υδατική φάση (δηλ. αυτή που περιέχει το DNA ή/και το RNA) και η διαδικασία εκχύλισης με μίγμα φαινόλης-χλωροφορμίου επαναλαμβάνεται.

Να σημειωθεί εδώ ότι η συμπεριφορά του DNA εξαρτάται από το pH της φαινόλης. Αν η φαινόλη έχει εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα σε pH 7-8, τότε οι φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων έχουν αρνητικό φορτίο οπότε και παραμένουν στην υδατική φάση. Σε όξινο pH οι περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά κομμάτια DNA οδηγούνται στην οργανική φάση, ενώ μεγάλα κομμάτια DNA και κάποιες πρωτεΐνες μένουν στην μεσόφαση. Αυτό συμβαίνει διότι τα ιόντα υδρογόνου (H⁺) εξουδετερώνουν το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων του DNA, αλλά όχι του RNA, καθιστώντας το DNA ουδέτερο μόριο που καταλήγει τελικά στην μεσόφαση. Αυτός είναι ο λόγος που κατά την απομόνωση RNA προτιμάται η όξινη φαινόλη.

<u>Εκχύλιση με φαινόλη (pH 7-8)-χλωροφόρμιο</u>	<u>Εκχύλιση με TRIzol</u>
 <ul style="list-style-type: none"> ➤ υδατική φάση (DNA ή/και RNA) ➤ μεσόφαση (πρωτεΐνες) ➤ οργανική φάση (πρωτεΐνες, λιπίδια) 	 <ul style="list-style-type: none"> ➤ υδατική φάση (RNA) ➤ μεσόφαση (DNA) ➤ οργανική φάση (πρωτεΐνες, λιπίδια)

Εναλλακτικά επομένως, για την απομόνωση ολικού RNA σε ένα στάδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί το **αντιδραστήριο TRIzol™**, το οποίο είναι ένα **μίγμα θειοκυανικής γουανιδίνης και όξινης φαινόλης**. Η θειοκυανική γουανιδίνη είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας. Ομογενοποίηση του ιστού στο μίγμα αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη λύση των κυττάρων, την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και το διαχωρισμό τους από το DNA και το RNA. Ακολουθεί προσθήκη χλωροφορμίου και φυγοκέντρηση, οπότε το μίγμα διαχωρίζεται σε 3 φάσεις με την ανώτερη διαυγή υδατική φάση να περιέχει το RNA, την κατώτερη οργανική να περιέχει κυρίως τις πρωτεΐνες, ενώ στη μεσόφαση παραμένει κυρίως το DNA. Έτσι, από το ίδιο δείγμα μπορεί θεωρητικά να απομονώσει κανείς και τα τρία συστατικά (DNA, RNA και πρωτεΐνες). Στη συνέχεια, για την απομόνωση του RNA, παραλαμβάνεται η υδατική φάση και γίνεται κατακρήμνιση του RNA με **ισοπροπανόλη**.

Η **ισοπροπανόλη** είναι λιγότερο πολική αλκοόλη σε σχέση με την αιθανόλη και έχει μικρότερη διηλεκτρική σταθερά, με αποτέλεσμα να είναι πιο αποτελεσματική στην κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων. Έτσι, απαιτείται ο μισός όγκος σε σχέση με την αιθανόλη για να επιτευχθεί η αφυδάτωση και συσσωμάτωση των μορίων νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιείται όταν ο

όγκος του δείγματος προς κατακρήμνιση είναι μεγάλος, αλλά έχει το μειονέκτημα ότι προκαλεί συνκατακρήμνιση πολλών αλάτων, οπότε απαιτείται καλό ξέπλυμα του ιζήματος στη συνέχεια με 70% αιθανόλη.

Στην άσκηση θα γίνει απομόνωση ολικού RNA από ιστό με τη μέθοδο TRIZOL.

Πειραματικό μέρος (Μέθοδος TRIZOL)

- Υλικά:
- Αντιδραστήριο TRIZOL
 - Χλωροφόρμιο
 - Ισοπροπανόλη
 - 75% αιθανόλη
 - Ρυθμιστικό διάλυμα TE

Πειραματική Διαδικασία

1. 700-1000 mg ιστού ομογενοποιούνται σε 15 ml αντιδραστηρίου TRIZOL με ομογενοποιητή dounce, από τον υπεύθυνο της άσκησης.
2. Στη συνέχεια κάθε ομάδα παίρνει 1 ml από το ομογενοποίημα σε σωληνάκι τύπου erpendorf και αφήνει το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
3. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 10000 στροφές για 5 λεπτά (*απομάκρυνση αδιάλυτων μεμβρανών και επιδερμίδας*).
4. Μεταφορά του υπερκλειμένου σε καθαρό σωληνάκι τύπου erpendorf και προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου (βρίσκεται στον απαγωγό). (ΠΡΟΣΟΧΗ: να κλείσετε καλά το καπάκι!)
5. Έντονη ανάδευση (vortex) για 15 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12000 στροφές για 15 λεπτά [*διαχωρισμός υδατικής φάσης (πάνω)-οργανικής φάσης (κάτω), καθαρισμός του RNA από πρωτεΐνες και DNA*].
7. Μεταφορά της πάνω υδατικής φάσης (400 μl) σε καθαρό σωληνάκι τύπου erpendorf και προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης.
8. Ανάδευση (αναποδογουρίζοντας το σωληνάκι 5-6 φορές) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά (*κατακρήμνιση του RNA*).
9. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12000 στροφές για 10 λεπτά (*συγκέντρωση του ιζήματος RNA στον πάτο του erpendorf*).
10. Απομάκρυνση του υπερκλειμένου και προσθήκη 1 ml 75% αιθανόλης. Ανάδευση αναποδογουρίζοντας το σωληνάκι 1-2 φορές (*ξέπλυμα του ιζήματος από άλατα*).
11. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12000 στροφές για 5 λεπτά.
12. Επανάληψη των βημάτων 10 και 11.
13. Απομάκρυνση του υπερκλειμένου και στέγνωμα του ιζήματος στον αέρα για 4-5 λεπτά.
14. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μl ρυθμιστικό διάλυμα TE.

2β. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA

Η ποσότητα ή η συγκέντρωση του RNA (όπως και του DNA) σε ένα διάλυμα μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομετρία. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν υπεριώδες φως με μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm. Οι μονάδες απορρόφησης (A_{260}) μπορούν να μετατραπούν σε συγκέντρωση με βάση κάποιες μέσες σταθερές απορροφητικότητας που έχουν υπολογιστεί. Παρόλο που διαφορετικά τμήματα DNA ή RNA (με διαφορετική σύσταση ή στερεοδιάταξη) μπορεί να έχουν ελαφρώς διαφορετικές σταθερές απορροφητικότητας, έχουν διεθνώς καθοριστεί οι ακόλουθοι συντελεστές μετατροπής της A_{260} σε συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων:

Νουκλεϊκό οξύ	A_{260}	Συγκέντρωση
Για δείγμα καθαρού δίκλωνου DNA:	1	50 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Για δείγμα καθαρού RNA:	1	40 $\mu\text{g} / \text{ml}$

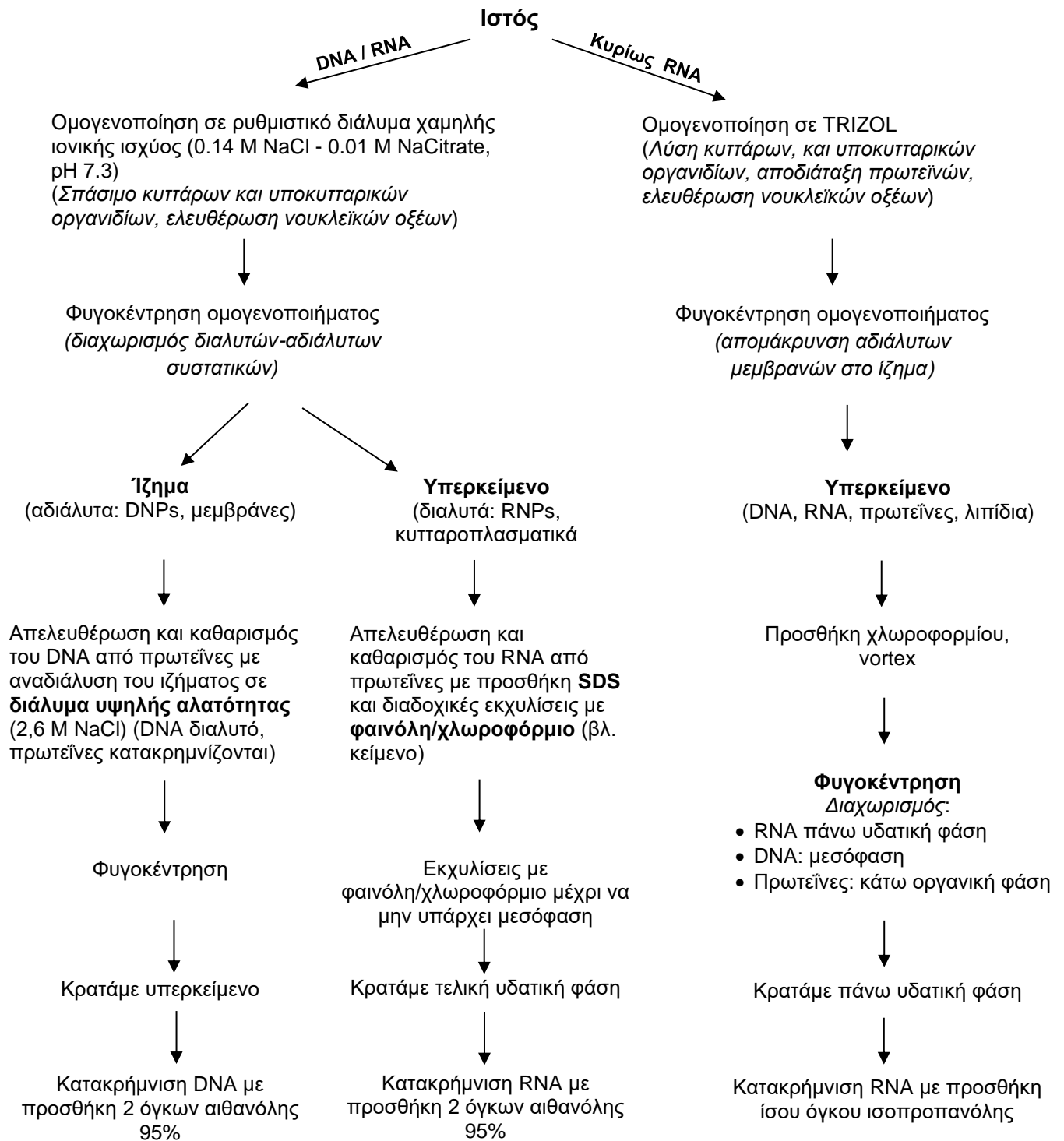
Για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος πρέπει η συγκέντρωση του δείγματος να κυμαίνεται από 5 έως 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Αν το δείγμα είναι πιο πυκνό πρέπει να αραιωθεί, ενώ αν είναι πιο αραιό πρέπει να χρησιμοποιηθεί άλλη μέθοδος.

Η μέτρηση της απορρόφησης (A_{260}) δεν μπορεί να διακρίνει DNA από RNA, μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της καθαρότητας του δείγματος από άλλες ουσίες, όπως πρωτεΐνες. Για το σκοπό αυτό υπολογίζουμε το λόγο των απορροφήσεων στα 260 nm και στα 280 nm (A_{260}/A_{280}). Ένα καθαρό διάλυμα DNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$ ενώ ένα καθαρό διάλυμα RNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} \sim 2$. Τιμές μικρότερες από 1,8 υποδεικνύουν προσμίξεις από πρωτεΐνες (ή φαινολικές ενώσεις).

Πειραματική διαδικασία:

- Μεταφέρετε 10 μl από το δείγμα RNA που απομονώσατε σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος TE. Ανακατέψτε καλά και μετρήστε την απορρόφηση στα 260 και στα 280 nm, μεταφέροντας το αραιωμένο δείγμα σε κυψελίδα χαλαζία (σύμφωνα με τις υποδείξεις του υπευθύνου της άσκησης). Ως τυφλό θα χρησιμοποιηθεί διάλυμα TE.
- Υπολογίστε τη συγκέντρωση του αρχικού σας δείγματος και το λόγο A_{260}/A_{280} .

Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) - γενικό πλάνο



3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Θεωρητικό μέρος

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μια γρήγορη και εύκολη διαδικασία που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Αν και η αρχή της μεθόδου είχε περιγραφεί από τις αρχές της δεκαετίας του 1970, η ανακάλυψη των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών και η αυτοματοποίηση της μεθόδου από τον Kary Mullis (Nobel χημείας 1993), οδήγησαν στην εδραίωση της PCR ως ένα από τα πλέον χρήσιμα εργαλεία στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας. Τα πεδία εφαρμογών της PCR διευρύνονται συνεχώς καθώς νέες τεχνολογίες αναπτύσσονται, που δίνουν τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης και συμβάλλουν στην βελτίωση της ευαισθησίας, της ακρίβειας και της ειδικότητας της μεθόδου. Ενδεικτικά, η PCR σήμερα χρησιμοποιείται για: απομόνωση και κλωνοποίηση γονιδίων ή άλλων περιοχών του γονιδιώματος, φυλογενετική ανάλυση, μελέτη της έκφρασης γονιδίων, ανίχνευση μεταλλαγών που σχετίζονται με κληρονομικές ασθένειες ή καρκινογένεση (προγεννητικό έλεγχο), ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών ή ιών, κ.α.

Η μέθοδος βασίζεται σε συνεχείς κύκλους πολυμερισμού του DNA με τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης και δύο ειδικών μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών), τα οποία καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα πολλαπλασιαστεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά πρέπει να είναι αντιπαράλληλης κατεύθυνσης και καθένα συμπληρωματικό προς τη μια αλυσίδα του υπό μελέτη DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού απαιτεί την παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg^{2+} .

Κάθε κύκλος πολυμερισμού αποτελείται από τα εξής βήματα: (α) **αποδιάταξη** του DNA-μήτρα (template), (β) **αναδιάταξη** (σύνδεση, annealing) των αλυσίδων του DNA με τα αντίστοιχα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (primers), (γ) **επιμήκυνση** (σύνθεση) από κάθε εκκινητή μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο πρώτος κύκλος οδηγεί στον σχηματισμό δύο νέων αλυσίδων απροσδιόριστου μήκους που, μαζί με τις μητρικές 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 επίσης συμμετέχουν ως μήτρα στους επόμενους κύκλους. Τα προϊόντα αυτά συσσωρεύονται εκθετικά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οδηγώντας έτσι σε πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου τμήματος DNA. Γενικά, 25-40 κύκλοι είναι αρκετοί για τη σύνθεση 0,1-1 μg DNA μιας μοναδικής αλληλουχίας (single copy) από 50 ng ολικού γονιδιωματικού DNA.

Για την PCR χρησιμοποιείται μια ειδική πολυμεράση, η Taq DNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988) και επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα αναδιάταξης και επιμήκυνσης. Η χρησιμοποίηση αυτού του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα αυτοματοποίησης της διαδικασίας και τη βελτίωση της απόδοσης της αντίδρασης τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά.

Γενικά, η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται από πολλές παραμέτρους όπως καθαρότητα και υψηλή ποιότητα των αντιδραστηρίων και της μήτρας-DNA, σχετική ποσότητα των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών και της μήτρας-DNA, συγκέντρωση $MgCl_2$, αποφυγή δημιουργίας διμερών μεταξύ των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών, αλλά και σωστή επιλογή χρόνου και θερμοκρασίας στα βήματα κάθε κύκλου της PCR. Για κάθε νέο ζευγάρι εκκινητών και μήτρας-DNA απαιτείται εκ νέου έλεγχος όλων των παραμέτρων προκειμένου να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες για τη μέγιστη απόδοση της αντίδρασης.

Συστατικά και συνθήκες της αντίδρασης:

DNA-μήτρα: οποιοδήποτε DNA (ολικό χρωμοσωμικό, μιτοχονδριακό, βακτηριακό, πλασμιδιακό) από οποιοδήποτε ιστό ή οργανισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα. Βασική προϋπόθεση να είναι όσο το δυνατόν πιο ακέραιο και καθαρό (απαλλαγμένο από προσμίξεις που μπορεί να αναστείλουν τη δράση του ενζύμου όπως απορρυπαντικά, EDTA, ίχνη φαινόλης). Η ποσότητα που χρησιμοποιείται εξαρτάται από την πολυπλοκότητα του DNA (δηλαδή το βαθμό αντιπροσώπευσης της αλληλουχίας στόχου στο συνολικό) και από το είδος της αντίδρασης (συμβατική ή ποσοτική PCR). Η ποσότητα του DNA προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm ($1 OD_{260} = 50 \mu g/ml$) και η καθαρότητά του ελέγχεται από το λόγο OD_{260}/OD_{280} που πρέπει να κυμαίνεται από 1.8-2.0). Επίσης, ως μήτρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί cDNA (DNA που έχει προκύψει με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA) αν θέλουμε να μελετήσουμε την έκφραση γονιδίων.

Ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές: για κάθε αντίδραση σχεδιάζονται δύο ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές, μήκους 18-30 βάσεων. Οι εκκινητές πρέπει να βρίσκονται σε συμπληρωματικές αλυσίδες στα άκρα της περιοχής DNA που θέλουμε να απομονώσουμε και με κατεύθυνση προς το εσωτερικό της. Κατά το σχεδιασμό κάθε ζεύγους πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε οι εκκινητές να έχουν παραπλήσιο σημείο τήξης και αλληλουχία που να μην επιτρέπει τη δημιουργία δομών και τη συμπληρωματικότητα μεταξύ τους. Το σημείο τήξης (T_m) του κάθε εκκινητή μπορεί να προσδιοριστεί εμπειρικά από τον βασικό τύπο $T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T)$ για ολιγονουκλεοτίδια μέχρι 14 nt, ενώ για μεγαλύτερα (14-20 nt) χρησιμοποιείται ο τύπος $T_m = 64.9 + 41*(G+C-16.4)/(A+T+G+C)$ όπου G, C, A και T ο αριθμός των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων που περιέχονται στον εκκινητή. Για μεγαλύτερη ακρίβεια, όμως, στον

υπολογισμό του T_m απαιτούνται πολύπλοκοι θερμοδυναμικοί τύποι που παρέχονται διαδικτυακά. Το T_m έχει σημασία για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας αναδιάταξης της αντίδρασης. Κάθε εκκινητής χρησιμοποιείται, συνήθως, σε ποσότητα 25 pmoles ανά 50 μ l αντίδρασης (0,5 μ M).

Δεοξυριβονουκλεοτίδια: Χρησιμοποιείται μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) σε τελική συγκέντρωση 200 μ M το καθένα.

Συγκέντρωση $MgCl_2$: η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} επηρεάζει την ειδικότητα και απόδοση της αντίδρασης και είναι διαφορετική για κάθε συνδυασμό μήτρας-DNA και εκκινητών. Το Mg^{2+} βοηθά την αναδιάταξη των εκκινητών με τις αλυσίδες της μήτρας-DNA και σταθεροποιεί την πρόσδεση της DNA πολυμεράσης στο σύμπλοκο της αντιγραφής. Χαμηλή συγκέντρωση Mg^{2+} αυξάνει την ειδικότητα (αυστηρό κριτήριο) αλλά μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια του προϊόντος, λόγω αποτυχίας αναδιάταξης των εκκινητών με τη μήτρα, ενώ υψηλή συγκέντρωση Mg^{2+} αυξάνει την απόδοση αλλά μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή μη επιθυμητών προϊόντων, λόγω μη ειδικής αναδιάταξης (χαμηλό κριτήριο). Συνήθως χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις 0,5-5 mM, αλλά η άριστη συγκέντρωση προσδιορίζεται ξεχωριστά για κάθε περίπτωση με δοκιμαστικές αντιδράσεις.

DNA-πολυμεράση: Κατά κανόνα χρησιμοποιείται το ένζυμο Taq DNA polymerase, που παρέχεται από διάφορες εταιρίες, σε τελική συγκέντρωση 0.5-5 units ανά αντίδραση. Η θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι 72°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα: Ανάλογα με το είδος της πολυμεράσης, από την εταιρία παραγωγής του ενζύμου, παρέχεται και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκέντρωση δεκαπλάσια (10X) της απαιτούμενης για την αντίδραση. Η συνήθης σύσταση του 10X διαλύματος είναι 100 mM Tris-HCl pH 9 (25°C), 500 mM KCl και 1% μη ιονικό απορρυπαντικό Triton X-100.

Κύκλοι της αντίδρασης: κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει (α) αποδιάταξη στους 94-96°C για 30-60 sec, (β) αναδιάταξη σε θερμοκρασία λίγο χαμηλότερη του T_m των εκκινητών (κατά 2-6°C) για 30-60 sec, (γ) επιμήκυνση στους 72°C για 30-90 sec, ανάλογα με το μήκος της αλληλουχίας που πολλαπλασιάζεται. Κάθε κύκλος επαναλαμβάνεται 20-40 φορές ανάλογα με την ποσότητα του DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Πριν από την έναρξη των κύκλων γίνεται αποδιάταξη στους 94-96°C για 5 λεπτά, ενώ, στο τέλος γίνεται επιμήκυνση στους 72°C για 5 min.

Τα παραπάνω συστατικά αναμιγνύονται σε σωλήνα τύπου eppendorf του 0,5 ml και τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή PCR. Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα προϊόντα ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (βλ. αντίστοιχη άσκηση).

Πειραματικό μέρος

Σκοπός της άσκησης είναι ο προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης $MgCl_2$ για τον πολλαπλασιασμό με PCR ενός τμήματος του μιτοχονδριακού DNA του δίθυρου μαλακίου *Mytilus galloprovincialis*. Το τμήμα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί αντιστοιχεί στην κύρια ρυθμιστική περιοχή (CR) αντιγραφής και μεταγραφής του mtDNA. Ως μήτρα θα χρησιμοποιηθεί DNA απομονωμένο από μύδια και ως εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια CR-F (forward primer, πρόσθιος εκκινητής) και CR-R (reverse primer, ανάστροφος εκκινητής).

CR-F: 5'-CCCTAGAGGCGTAGAAGCCTC-3' (21 nt)

CR-R: 5'-CTCTGAGAAATGCTTATCAGCTG-3' (23 nt)

Το συνολικό προϊόν που αναμένεται κατά την PCR έχει μήκος 763 bp. Η αλληλουχία του καθώς και η θέση των εκκινητών φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, όπου παρουσιάζεται μέρος της αλληλουχίας του mtDNA που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα.



* Καθώς η πρωτοδιάταξη του mtDNA του μυδιού είναι γνωστή, ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με βάση την αλληλουχία της περιοχής που μας ενδιαφέρει. Για την επιλογή του βέλτιστου ζεύγους εκκινητών έπρεπε να ληφθούν υπόψη οι παράμετροι που αναφέρονται στο θεωρητικό μέρος, οι οποίες ελέγχθηκαν και με τη βοήθεια προγραμμάτων, όπως θα δούμε στο εργαστήριο.

Αντιδράσεις PCR

Θα γίνουν έξι αντιδράσεις PCR με έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις $MgCl_2$, ενώ όλα τα άλλα συστατικά καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης θα είναι *ίδια (δείγματα 1-6). Επιπλέον, θα γίνει και μια αντίδραση χωρίς DNA-μήτρα, ως δείγμα αρνητικού ελέγχου για κάθε ομάδα.

- ❖ Κανονικά, τα κοινά συστατικά όλων των αντιδράσεων αναμιγνύονται σε ένα κοινό διάλυμα (*master mix*) το οποίο μετά μοιράζεται σε κάθε δείγμα, ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα μέτρησης μικρών όγκων. Όμως, για εκπαιδευτικούς και πρακτικούς λόγους, στην συγκεκριμένη άσκηση κάθε ομάδα θα ετοιμάσει ένα διαφορετικό δείγμα.

Όλες οι αντιδράσεις θα έχουν τελικό όγκο **50 μ l**. Κάθε αντίδραση πρέπει να περιέχει τα συστατικά που φαίνονται στον πίνακα και βρίσκονται στον πάγκο σας μέσα σε πάγο.

1. Με βάση τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που σας δίνονται, υπολογίστε τις ποσότητες που θα χρειαστείτε από το καθένα, για να έχετε την απαιτούμενη τελική συγκέντρωση στην αντίδραση των 50 μ l.
2. Στη συνέχεια, σε σωλήνα τύπου erpendorf 0,5 ml, προσθέστε τα συστατικά με τη σειρά που αναγράφονται στον πίνακα, χρησιμοποιώντας αυτόματη πιπέτα και αποστειρωμένα ακροφύσια. Ετοιμάστε ένα σωληνάκι για το δείγμα με το DNA (Δ) και ένα με το H_2O (τυφλό, T).

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση στην αντίδραση	Ποσότητα που απαιτείται για όγκο 50 μ l
H_2O			
PCR buffer	10x	1x	
dNTPs	2 mM	200 μ M	
$MgCl_2$	25 mM	0,5 mM - 1 mM – 1,5 mM – 2 mM – 2,5 mM – 3 mM	
Primer F	5 μ M	25 pmoles	
Primer R	5 μ M	25 pmoles	
Template DNA ng/ μ l	50 ng	
Taq pol	1 unit/ μ l	0,5 unit	

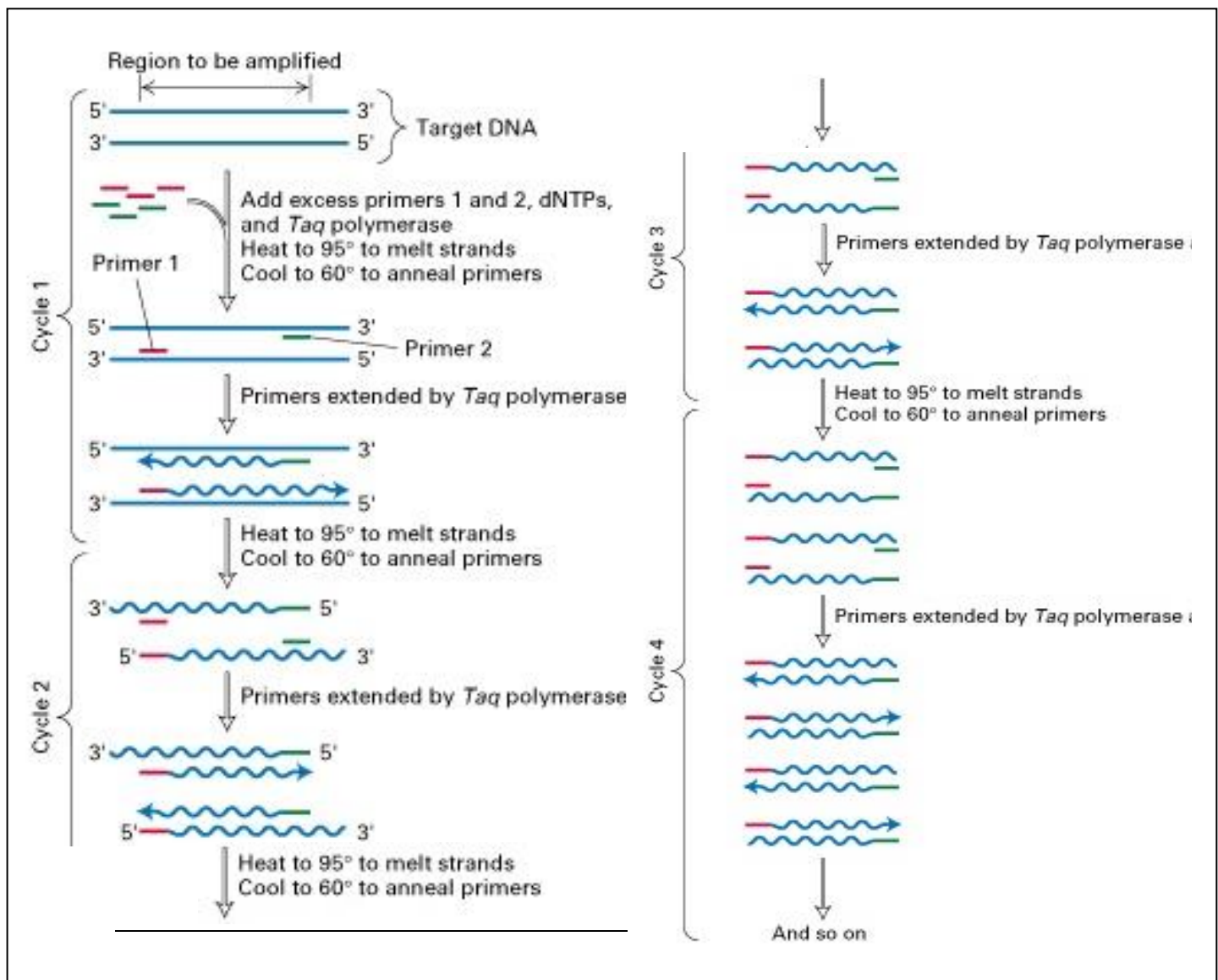
3. Κλείστε καλά τα σωληνάκια, αναδεύστε και κάντε μια στιγμιαία φυγοκέντρηση ώστε να συγκεντρωθεί όλο το δείγμα σας στον πυθμένα του σωλήνα.

4. Τοποθετήστε όλα τα δείγματα στη συσκευή PCR. Ο υπεύθυνος της άσκησης θα επιλέξει το πρόγραμμα με τις κατάλληλες συνθήκες:

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94	2 min
Αποδιάταξη	94	20 sec
Αναδιάταξη	56	30 sec
Επιμήκυνση	72	50 sec
Τελική επιμήκυνση	72	5 min

30 κύκλοι

Σχηματική παρουσίαση της PCR



4. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Θεωρητικό μέρος

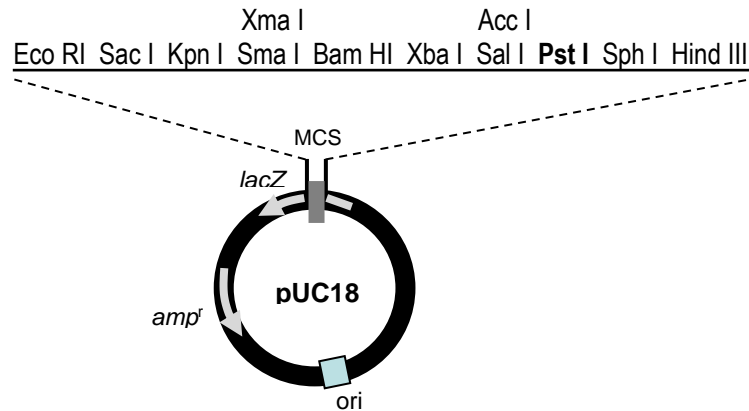
Κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης γίνεται εισαγωγή τμημάτων DNA από οποιαδήποτε πηγή σε φορείς κλωνοποίησης (cloning vectors, π.χ πλασμίδια, φάγοι, κοσμίδια, κλπ.). Το ξένο DNA συνδέεται τεχνητά (ligation) με το DNA του φορέα σε ειδικές θέσεις (π.χ. θέσεις περιοριστικών ενδονουκλεασών). Το ανασυνδυασμένο DNA εισάγεται σε κύτταρα βακτηρίων με μια διαδικασία που ονομάζεται **μετασχηματισμός** (transformation).

Οι μέθοδοι βακτηριακού μετασχηματισμού που χρησιμοποιούνται σήμερα, στηρίζονται στην κατεργασία βακτηριακών κυττάρων με παγωμένα διαλύματα CaCl_2 (ή και άλλων δισθενών κατιόντων) ώστε να γίνουν **δεκτικά** (competent) στην πρόσληψη του ξένου DNA. Δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός της πρόσληψης. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι διάφοροι παράγοντες (συνδυασμός δισθενών κατιόντων, DMSO, αναγωγικοί παράγοντες, κλπ.) βελτιώνουν την απόδοση του μετασχηματισμού, χωρίς να έχει εξακριβωθεί ο τρόπος δράσης του καθενός. Μια καλή απόδοση μετασχηματισμού υπολογίζεται σε 5×10^7 ως 1×10^8 μετασχηματισμένες αποικίες ανά μικρογραμμάριο υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA.

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθεί, χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής το στέλεχος K 12, κυτταρική σειρά DH5α, του βακτηρίου *E. coli* και ως φορέας κλωνοποίησης το πλασμίδιο pUC18, το οποίο φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Η είσοδος του πλασμιδίου δημιουργεί μετασχηματισμένα βακτήρια, με ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.

Στη μοναδική θέση PstI του πλασμιδίου έχει εισαχθεί ένα τμήμα ξένου DNA μήκους 6.8 kb. Η θέση PstI βρίσκεται στον πολυσύνδεσμο (polylinker) (βλ. άσκηση χαρτογράφησης πλασμιδιακού DNA), ο οποίος είναι ενσωματωμένος, στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης, μέσα στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*). Παρουσία X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) στο θρεπτικό μέσο, το προϊόν του γονιδίου *lacZ* συμβάλλει στην εμφάνιση χαρακτηριστικού μπλε χρώματος στις βακτηριακές αποικίες. Η είσοδος του ξένου DNA διακόπτει το γονίδιο *lacZ* και εμποδίζει την έκφρασή του, με αποτέλεσμα οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο να μην εμφανίζουν μπλε χρώμα αλλά λευκό.

Με βάση τα παραπάνω, αναπτύσσοντας τα βακτήρια σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αμπικιλίνη και X-gal, μπορούμε να επιλέξουμε: (α) Τα μετασχηματισμένα βακτήρια, και (β) όσα από αυτά περιέχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.



Σχήμα 1: Πλασμίδιο-φορέας pUC18. **Multiple Cloning Site (MCS):** πολυσύνδεσμος, **lacZ:** γονίδιο β-γαλακτοσιδάσης, **amp^r:** γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, **ori:** σημείο έναρξης της αντιγραφής.

Πειραματικό μέρος

Υλικά:

- Θρεπτικό μέσο LB (Luria broth - ανά λίτρο 10 g Tryptone, 5 g Yeast extract, 10 g NaCl και το pH ρυθμίζεται στο 7.5 με NaOH)
- 0.1 M CaCl₂
- Τρυβλία LB-άγαρ (θρεπτικό μέσο LB - 1,5% w/v άγαρ) με αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/ml.
- Βακτηριακή καλλιέργεια κυττάρων DH5α
- Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

ΠΡΟΣΟΧΗ:

- Η χρήση βακτηριακών κυττάρων (ειδικά εφόσον περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια) διέπεται από τους **κανόνες ασφαλείας “P1”** σύμφωνα με τους 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. Εμβολιάζουμε 100 ml LB με 0.5 ml από μία φρέσκια καλλιέργεια του επιθυμητού στελέχους. Επωάζουμε στους 37°C για 1.5-2 ώρες έως ότου η οπτική πυκνότητα (O.D) της νέας καλλιέργειας να έχει τιμή 0.3-0.4 (δηλαδή τα κύτταρα να βρίσκονται στη **λογαριθμική φάση**).

2. Μοιράζουμε από 5 ml σε αποστειρωμένους σωλήνες (των 10ml) και φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm, στους 4° C για 10 min.
3. Αδειάζουμε το υπερκείμενο στο απολυμαντικό. Στο ίζημα προσθέτουμε 1 ml αποστειρωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl₂ και επαναδιαλύουμε ήπια.
4. Φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm, στους 4° C για 5 min.
5. Αδειάζουμε το υπερκείμενο στο απολυμαντικό. Στο ίζημα προσθέτουμε 200 μl αποστειρωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl₂. Διατηρούμε τα δεκτικά κύτταρα στον πάγο.
6. Στα 200 μl δεκτικά κύτταρα, προσθέτουμε 1-200 ng DNA σε μέγιστο τελικό όγκο 10 μl. Επωάζουμε 25 min στον πάγο.
7. Επωάζουμε 2 min στους 42° C (**θερμικό σοκ**) και αμέσως τα βάζουμε στον πάγο.
8. Προσθέτουμε 1 ml LB και επωάζουμε για 45 min στους 37° C.
9. Φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 3 min. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο στο απολυμαντικό και αναδυσάλουμε το ίζημα σε 100 μl LB.
10. Επιστρώνουμε τα βακτήρια σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB-άγαρ που περιέχει αμπικιλίνη και X-gal. Επωάζουμε στους 37° C για 16 ώρες περίπου.
11. Την επόμενη μέρα ελέγχουμε τα τρυβλία για την εμφάνιση μπλε και άσπρων αποικιών. Αποθηκεύουμε τα τρυβλία στους 4° C.

Από τα τρυβλία αυτά θα επιλέξουμε μονές άσπρες αποικίες για να ελέγξουμε αν περιέχουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, όπως περιγράφεται στις επόμενες ασκήσεις.

5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Εισαγωγή

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA είναι μια σχεδόν καθημερινή πειραματική διαδικασία σε εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας καθώς γίνεται προκειμένου:

- Να ανιχνεύσουμε ανασυνδυασμένα πλασμίδια από έναν πληθυσμό βακτηριακών αποικιών μετά από μετασχηματισμό
- Να απομονώσουμε DNA από πλασμίδια-φορείς που θα χρησιμοποιηθούν για ανασυνδυασμό και μετασχηματισμό (transformation) βακτηριακού ξενιστή
- Να μελετήσουμε το DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες
- Να προσδιορίσουμε την πρωτοδιάταξη ενός κλωνοποιημένου τμήματος DNA

Τα βασικά στάδια της διαδικασίας απομόνωσης πλασμιδιακού DNA είναι:

- λύση των βακτηριακών κυττάρων που φέρουν τα πλασμίδια
- διαχωρισμός του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά
- κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με αιθανόλη

Παρουσιάζεται εδώ μια απλή και γρήγορη μέθοδος απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, με **αλκαλική λύση**.

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση αλκαλικού διαλύματος NaOH και SDS προκειμένου να γίνει λύση των βακτηριακών κυττάρων και αποδιάταξη τόσο του χρωμοσωμικού DNA (και των πρωτεϊνών που το συνοδεύουν) όσο και του πλασμιδιακού DNA. Εξουδετέρωση του διαλύματος με οξικό κάλιο επιτρέπει την αναδιάταξη των δύο αλυσίδων του κυκλικού πλασμιδιακού DNA (που έχουν παραμείνει ενωμένες μεταξύ τους) αλλά όχι και των μακριών αλυσίδων του χρωμοσωμικού DNA που σχηματίζουν ένα αδιάλυτο ίζημα μαζί με τις πρωτεΐνες και τα υπόλοιπα βακτηριακά υπολείμματα. Έτσι, η πλειονότητα του πλασμιδιακού DNA (και του βακτηριακού RNA) παραμένει διαλυτή και μπορεί να παραληφθεί μετά από φυγοκέντρηση από το υπερκείμενο. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη (βλέπε Άσκηση 2), κατακρήμνιση με αιθανόλη και αναδιάλυση στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Στο στάδιο αυτό το πλασμιδιακό DNA (που αποτελεί το 1-2% του ολικού ποσού απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων) είναι αρκετά καθαρό από πρωτεΐνες, απορρυπαντικά και EDTA ώστε να μπορεί να κοπεί με ένζυμα περιορισμού. Το RNA, που αποτελεί το 98-99% του δείγματος, δεν εμποδίζει την πέψη του πλασμιδιακού DNA από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ούτε εμποδίζει να δούμε ζώνες 1 kb ή μεγαλύτερες σε πηκτώματα αγαρόζης 0.8% και ζώνες 0.6 kb ή μεγαλύτερες σε πηκτώματα αγαρόζης 1.2% (βλ. άσκηση 6). Αν μας ενδιαφέρει να εντοπίσουμε κομμάτια DNA μικρότερου μεγέθους, θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε RNάση.

Πειραματικό μέρος

Στο πείραμα θα χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. coli*, στέλεχος K12, κυτταρική σειρά DH5α, που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pUC18*, το οποίο περιέχει ένα τμήμα ξένου DNA μήκους 6.8 kb.

1. Από τα τρυβλία που πήρατε με την άσκηση του μετασχηματισμού επιλέξτε μια μονή, άσπρη αποικία και εμβολιάστε 2 ml θρεπτικού μέσου LB στο οποίο έχει προστεθεί 100 µg/ml αμπικιλίνη. Ακολουθεί επώαση στους 37° C, για 16 ώρες περίπου, υπό ανακίνηση.

Το πλασμίδιο pUC18 περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Έτσι, η παρουσία του αντιβιοτικού στο θρεπτικό μέσο απαγορεύει την ανάπτυξη βακτηρίων που δεν περιέχουν το πλασμίδιο.

2. Την επόμενη μέρα μεταφέρετε σε σωλήνα φυγοκέντρου τύπου erpendorf 1.5 ml κορεσμένης βακτηριακής καλλιέργειας.
3. Φυγοκεντρήστε σε μικροφυγόκεντρο erpendorf 3 min. Με πιπέτα Pasteur αφαιρέστε το υπερκείμενο (όσο γίνεται περισσότερο) και κρατείστε το βακτηριακό ίζημα σε πάγο.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Το υπερκείμενο περιέχει μικρό αριθμό βακτηρίων και σύμφωνα με τους κανόνες ασφαλείας "P1" απαγορεύεται να πεταχτεί ως έχει. Γι' αυτό μεταφέρετέ το σε δοχείο που περιέχει απολυμαντικό διάλυμα και μετά βάλτε και την πιπέτα σε αντίστοιχο δοχείο.

4. Αναδιαλύστε το ίζημα σε **100 µl παγωμένου διαλύματος GET** (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris.HCl pH 8.0). Η αναδιάλυση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια vortex (για 1 min περίπου). Αφήστε το σωλήνα με το αναδιαλυμένο ίζημα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.

Το EDTA δεσμεύει δισθενή κατιόντα από την κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα να την αποσταθεροποιεί. Επίσης, αναστέλλει τη δράση των νουκλεασών. Η γλυκόζη διατηρεί το διάλυμα ισότονο με τα κύτταρα ώστε να μη συμβεί απότομη ρήξη αυτών.

5. Προσθέστε **200 µl από πρόσφατα παρασκευασμένο αλκαλικό διάλυμα** (0.2 N NaOH, 1% SDS). Κλείστε το καπάκι του σωλήνα σφιχτά και ανακατέψτε το περιεχόμενο αναποδογυρίζοντας το σωλήνα 5 φορές. **ΠΡΟΣΟΧΗ: όχι vortex.** Αφήστε το σωλήνα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.

Πραγματοποιείται λύση της κυτταρικής μεμβράνης και χαλάρωμα του κυτταρικού τοιχώματος οπότε απελευθερώνονται και τα πλασμίδια. Το NaOH αποδιατάσσει το DNA.

6. Προσθέστε **150 µl παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου pH 4.8**. Κλείστε το καπάκι και ανακατέψτε το περιεχόμενο αναποδογυρίζοντας το σωλήνα 5 φορές. Βάλτε το σωλήνα σε πάγο για 5 min.

Εξουδετέρωση του διαλύματος. Το κυκλικό πλασμιδιακό DNA αναδιατάσσεται και παραμένει διαλυτό, αντίθετα από το χρωμοσωμικό που σχηματίζει ένα αδιάλυτο ίζημα. Το SDS παρουσία KAc κατακρημνίζεται (σχηματίζει αδιάλυτο KDS).

7. Φυγοκεντρήστε για 5 min. Μεταφέρετε με καθαρή πιπέτα Pasteur το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα.

Με τη φυγοκέντρηση το χρωμοσωμικό DNA, το KDS και τα βακτηριακά υπολείμματα πέφτουν στο ίζημα ενώ το πλασμιδιακό DNA παραμένει στο υπερκείμενο.

8. Προσθέστε 0.5 ml διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου 1:1. Vortex για 10 sec. Φυγοκεντρείστε για 2 min. Μεταφέρετε το υπερκείμενο (υδατική φάση, περίπου 300 ml με μηχανική πιπέτα) σε καθαρό σωλήνα προσέχοντας να μην πάρετε καθόλου μεσόφαση ή οργανική φάση.

Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων από πρωτεΐνες και λιπίδια (βλ. άσκηση 2-RNA).

9. Προσθέστε 1 ml απόλυτη αιθανόλη (98%) (2 όγκους), ανακατέψτε αναποδογυρίζοντας το σωλήνα 5-6 φορές και τοποθετείστε τον στον πάγο για 2-3 min.

Κατακρήμνιση πλασμιδιακού DNA (και RNA) (βλ. άσκηση 1). Εδώ το μέγεθος των μορίων και η αναμενόμενη ποσότητα DNA-RNA (από 1,5 ml καλλιέργεια) δεν επιτρέπει συνήθως το σχηματισμό ορατού ιζήματος. Έτσι, για την παραλαβή του ιζήματος απαιτείται φυγοκέντρηση.

10. Φυγοκεντρήστε για 5 min. Με πιπέτα Pasteur αφαιρέστε προσεκτικά το υπερκείμενο και πετάξτε το σε νεροχύτη.
11. Στο ίζημα προσθέστε 0.5 ml 70% αιθανόλη, κάντε vortex για μερικά δευτερόλεπτα και επαναλάβετε τη διαδικασία του βήματος 10.
12. Στεγνώστε το ίζημα στον αέρα για 10 min. Αναδιαλύστε το στεγνό ίζημα σε 20 ml TE (10 mM Tris.HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).
13. Αν θέλουμε να απομακρύνουμε το RNA, προσθέτουμε 1 ml RNάση (10 mg/ml) ελεύθερη DNάσης και για να δράσει αφήνουμε το σωλήνα σε υδατόλουτρο 37° C για 1 ώρα. Ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος από το ένζυμο με εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και εκ νέου κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη.

6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Εισαγωγή

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό κομματιών DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα κομματιών DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές, όπως π.χ. με φυγοκέντρηση σε κλίσεις πυκνότητας. Επιπλέον, η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα: οι ζώνες του DNA χρωματίζονται με μικρή συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου (φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA). Μπορούμε έτσι να δούμε με υπεριώδες φως ακόμα και 1 ng DNA.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους:

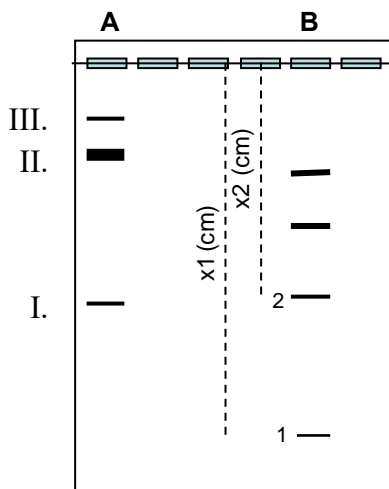
α) Το μέγεθος του DNA. Γραμμικά δίκλινα DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του log του Μορ. Βάρους. (βλ. Σχήμα 1, Β)

β) Τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.

<u>% αγαρόζης στο πήκτωμα</u>	<u>Καλός διαχωρισμός γραμμικών DNA (kb)</u>
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.8	7-0.5
0.9	6-0.4
1.2	4-0.2
2.0	3-0.1

γ) Τη στερεοδιάταξη του DNA. Τα κυκλικά μόρια DNA υφίσταται συνήθως σε 3 μορφές: **κλειστή κυκλική υπερελικωμένη** (μορφή I), η **ανοιχτή κυκλική** (μορφή II) και **γραμμική** (μορφή III). Παρόλο που και οι τρεις έχουν το ίδιο μοριακό βάρος η κινητικότητά τους διαφέρει. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και το βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I του DNA. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η μορφή I κινείται γρηγορότερα από τη μορφή III (βλ. Σχήμα 1, Α). 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, αφαιρούνται 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 & III μειώνονται με διαφορετικό ρυθμό η κάθε μια, 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 ως 0.5 $\mu\text{g/ml}$.



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση πηκτώματος αгарόζης όπου έχουν ηλεκτροφορηθεί: (A) κυκλικό πλασμιδιακό DNA (B) γραμμικά μόρια DNA διαφορετικού μοριακού βάρους ($X1 > X2$, $MB1 < MB2$)

δ) Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση (volts), που σημαίνει μικρό ρεύμα, η κινητικότητα γραμμικών κομματιών DNA είναι ανάλογη με τα volts που χρησιμοποιούνται. Όμως, αν αυξήσουμε την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (αύξηση των volts), η κινητικότητα κομματιών DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή για κάθε κομμάτι DNA. Για το λόγο αυτό, μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αгарόζης καθώς αυξάνονται τα volts που χρησιμοποιούνται. Πηκτώματα αгарόζης που ηλεκτροφορούνται εντελώς βυθισμένα στο ρυθμιστικό διάλυμα είναι φυσικό να ανέχονται πολύ περισσότερο ρεύμα από αντίστοιχα που ηλεκτροφορούνται χωρίς να είναι βυθισμένα. Στα τελευταία, η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου επιτυγχάνεται με γέφυρες διηθητικού χαρτιού που ενώνουν την κάθε άκρη του πηκτώματος με τα αντίστοιχα δοχεία ηλεκτροδίων ανόδου και καθόδου κι επομένως το ρεύμα διέρχεται αποκλειστικά από το πήκτωμα. Σε αυτή την περίπτωση και για πάχος πηκτώματος 5-6 mm εφαρμόζεται τάση περίπου 5 V/cm μήκους πηκτώματος.

Σημείωση: Σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης, η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του DNA δεν επηρεάζεται αισθητά ούτε από το ποσοστό των διαφορετικών βάσεων σε κάθε τμήμα DNA ούτε από τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η ηλεκτροφόρηση (μεταξύ 4° και 30° C).

Ρυθμιστικά διαλύματα

Χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν Tris-Βορικό οξύ-EDTA ή Tris-οξικό οξύ-EDTA ή Tris-φωσφορικό οξύ-EDTA, σε συγκέντρωση 50-100 mM και pH περίπου 8.0. Συνήθως τα παρασκευάζουμε σε πενταπλάσια (5X) ή δεκαπλάσια (10X) συγκέντρωση και τα διατηρούμε σε θερμοκρασία δωματίου.

Η ρυθμιστική ικανότητα του Tris-οξικού-EDTA είναι μάλλον χαμηλή και γι' αυτό είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται το Tris-φωσφορικό-EDTA ή το Tris-βορικό-EDTA (TBE) που δίνουν εξίσου καλό διαχωρισμό κι έχουν υψηλή ρυθμιστική ικανότητα. Στην άσκηση θα χρησιμοποιηθεί TBE (100 mM Tris, 85 mM βορικό οξύ, 1 mM EDTA).

Παρασκευή 1% πηκτώματος (μεσαίου μεγέθους-midi gel) και ηλεκτροφόρηση

1. Σε κωνική φιάλη προσθέτουμε 1 g σκόνης αγαρόζης και 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος.
2. Θερμαίνουμε ανακινώντας έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη (χρειάζεται να βράσει).
3. Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml. ΠΡΟΣΟΧΗ: Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξογόνο και δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το δέρμα μας.
4. Συναρμολογούμε την συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετούμε κάθετα στην κατάλληλη θέση τη "χτένα" που θα δημιουργήσει θήκες για τη φόρτωση του δείγματος όταν πήξει η αγαρόζη.
5. Ρίχνουμε προσεκτικά το ζεστό διάλυμα της αγαρόζης στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
6. Όταν πήξει εντελώς η αγαρόζη, αφαιρούμε προσεκτικά τη χτένα και μπορούμε να αρχίσουμε την ηλεκτροφόρηση.
7. Βυθίζουμε το πήκτωμα στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα.
8. Στα δείγματα που είναι διαλυμένα σε TE ή σε H₂O, προσθέτουμε 5-10% γλυκερόλη και 0.025% μπλε της βρωμοφαινόλης και/ή κυανούν της ξυλόλης (τα

- συστατικά αυτά βρίσκονται σε ένα διάλυμα φόρτωσης – 6X loading buffer). Σε κάθε θέση μπορούμε να φορτώσουμε μέχρι και 20 μl δείγματος με μικροπιπέτα. Πρέπει να φροντίσουμε η συγκέντρωση του DNA να είναι μικρή ώστε ο διαχωρισμός να είναι καλός.
9. 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).
 10. Χρησιμοποιώντας υπεριώδες φως μπορούμε να φωτογραφήσουμε το πήκτωμα μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

7. ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ λ (ΦΑΓΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ).

Θεωρητικό μέρος

Ένας από τους σημαντικότερους και ευρέως χρησιμοποιούμενους φορείς κλωνοποίησης για τη δημιουργία DNA (χρωμοσωμικών ή cDNA) βιβλιοθηκών είναι ο βακτηριοφάγος λ. Πρόκειται για έναν DNA ιό που προσβάλλει βακτήρια *E. coli* και το γονιδίωμά του είναι ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA μήκους περίπου 50 kb, με συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα μήκους 12 bp. Κάθε σωματίδιο φάγου αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, που περικλείει το μόριο DNA και μια ουρά επίσης πρωτεϊνικής φύσεως. Με την ουρά ο φάγος προσκολλάται στην επιφάνεια του βακτηριακού ξενιστή και απελευθερώνει το DNA του στο εσωτερικό του κυττάρου. Μετά την είσοδο στον ξενιστή το ιικό DNA κυκλοποιείται και χρησιμοποιεί τους μηχανισμούς του βακτηρίου προκειμένου να μεταγράψει τα γονίδιά του και να πολλαπλασιαστεί. Δύο μονοπάτια μπορεί να ακολουθηθούν μετά τη μόλυνση:

Λυτικός κύκλος: Το DNA του φάγου αντιγράφεται για να παραγάγει πολλά αντίτυπα του γονιδιώματός του και να εκφράσει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του καψιδίου και της ουράς. Οι νέοι βακτηριοφάγοι συσκευάζονται, εντός του κυττάρου-ξενιστή, σε μολυσματικά ιικά σωματίδια, το βακτηριακό κύτταρο λύεται και οι φάγοι απελευθερώνονται για να επιμολύνουν νέα βακτήρια.

Λυσιγονικός κύκλος: Το DNA του φάγου ενσωματώνεται στο βακτηριακό γονιδίωμα και δεν εκφράζονται τα γονίδια των πρωτεΐνων του καψιδίου και της ουράς. Σε αυτή την κατάσταση ο φάγος ονομάζεται «προφάγος» και αναπαράγεται παθητικά μαζί με το βακτηριακό «χρωμόσωμα» κατά την κυτταρική διαίρεση. Η φάση λυσιγονίας μπορεί να διατηρηθεί σταθερά για πολλές γενεές, αλλά μπορεί και να μεταστραφεί στον λυτικό κύκλο υπό κατάλληλες συνθήκες.

Η χρησιμοποίηση του βακτηριοφάγου λ ως φορέα κλωνοποίησης έγινε εφικτή μετά τη δεκαετία του 1970 όπου υπήρξε μεγάλη πρόοδος τόσο στις γενετικές μελέτες του βακτηριοφάγου και των ξενιστών του όσο και στις μεθόδους μεταλλαξιγένεσης και χειρισμού του DNA. Σήμερα υπάρχουν πάρα πολλοί γενετικά τροποποιημένοι βακτηριοφάγοι και αντίστοιχες βακτηριακές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές τους, που ευνοούν τον λυτικό κύκλο και επιτρέπουν την κλωνοποίηση ή κλωνοποίηση και έκφραση μεγάλων τμημάτων DNA. Η βασική χρήση τους είναι στην κατασκευή χρωμοσωμικών ή cDNA βιβλιοθηκών. Έτσι, ανάλογα με τις επιθυμητές θέσεις για περιοριστικές ενδονουκλεάσες, το μέγεθος του τμήματος DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και το αν αυτό απαιτείται να εκφραστεί ή όχι, επιλέγεται το κατάλληλο σύστημα βακτηριοφάγου λ-κυτταρικής σειράς *E. coli*.

Μια βιβλιοθήκη αποτελείται από εκατομμύρια φαγικά σωμάτια τα οποία περιέχουν το DNA του φάγου ανασυνδυασμένο με τμήματα του γονιδιώματος (στην περίπτωση της χρωμοσωμικής βιβλιοθήκης) ή με μόρια cDNA (στην περίπτωση της cDNA βιβλιοθήκης). Τα φαγικά αυτά σωμάτια βρίσκονται ως εναιώρημα σε διάλυμα. Ο αριθμός των σωματιδίων φάγου στο εναιώρημα ονομάζεται «**τίτλος**» της βιβλιοθήκης και η διαδικασία προσδιορισμού του αριθμού αυτού «**τιτλοδότηση**».

Η τιτλοδότηση του εναιωρήματος γίνεται με τη μέθοδο της μέτρησης πλακών σε τρυβλία ως εξής: Μια ποσότητα εναιωρήματος φάγων αναμιγνύεται με βακτήρια τα οποία έχουν αναπτύχθει παρουσία μαλτόζης στο θρεπτικό μέσο και έχουν επεξεργαστεί με ιόντα μαγνησίου (**plating cells**).

Η μαλτόζη επάγει την έκφραση του βακτηριακού γονιδίου λ mb που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του σακχάρου. Ο βακτηριοφάγος λ προσδένεται στους υποδοχείς της μαλτόζης που βρίσκονται στην επιφάνεια του βακτηρίου, προκειμένου να εισάγει το DNA του στο κύτταρο και αυτή η διαδικασία διευκολύνεται από τα ιόντα μαγνησίου.

Το μείγμα επωάζεται για λίγο στους 37°C όπου αναμένεται ένα ποσοστό των βακτηρίων να επιμολυνθεί από τους φάγους. Στη συνέχεια το μείγμα αναμιγνύεται με θρεπτικό υλικό μαλακού άγαρ (top agar) και εκχύνεται σε τρυβλίο με στερεό υπόστρωμα θρεπτικού υλικού (bottom agar), όπου επωάζεται για περίπου 16 ώρες. Κατά το διάστημα αυτό αναπτύσσονται τα βακτήρια που δεν έχουν επιμολυνθεί αλλά παράγονται και νέοι φάγοι από τα επιμολυσμένα βακτήρια. Καθώς λύονται τα επιμολυσμένα βακτήρια οι φάγοι που εκλύονται επιμολύνουν τα βακτηριακά κύτταρα που βρίσκονται σε άμεση γεινίαση και έτσι μετά από πολλούς κύκλους βακτηριακής αύξησης και ιικής επιμόλυνσης δημιουργείται πάνω στο τρυβλίο ένα «φιλμ» βακτηρίων με στρογγυλές διαυγείς περιοχές (σαν τρύπες), που ονομάζονται **πλάκες** και οφείλονται στη λύση των βακτηρίων από τους φάγους. Κάθε πλάκα προέρχεται από την αρχική επιμόλυνση ενός βακτηριακού κυττάρου από ένα φάγο. Έτσι, μετρώντας τον αριθμό των πλακών μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των φαγικών σωματιδίων που υπήρχαν στο αρχικό εναιώρημα, δηλαδή τον **τίτλο**. Ο τίτλος μετριέται σε «μονάδες παραγωγής πλακών», pfu (plaque forming units) που βρίσκονται σε 1 ml, δηλαδή **pfu/ml**.

Για να είναι η μέτρηση εφικτή και ακριβής πρέπει πλάκες να είναι διακριτές και ο αριθμός τους στο τρυβλίο να είναι μετρήσιμος (μερικές δεκάδες). Συνήθως μια βιβλιοθήκη περιέχει εκατομμύρια φάγους, οπότε για να υπολογιστεί ο τίτλος της πρέπει να γίνει μια σειρά αραιώσεων του αρχικού εναιωρήματος και από την αραιώση που θα δώσει μερικές δεκάδες πλάκες στο τρυβλίο, με την παραπάνω μέθοδο, θα υπολογιστεί ο τίτλος του αρχικού δείγματος.

Πειραματικό μέρος

ΠΡΟΣΟΧΗ:

- Η χρήση εργαστηριακών βακτηριακών στελεχών και βακτηριοφάγων διέπεται από τους **κανόνες ασφαλείας “P1”** σύμφωνα με τους 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**.

- Υλικά:
- Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB (Luria broth - ανά λίτρο: 10 g Tryptone, 5 g Yeast extract, 10 g NaCl και το pH ρυθμίζεται στο 7.5 με NaOH)
 - 20% μαλτόζη
 - 10 mM MgSO₄
 - Διάλυμα SM (50 mM Tris pH 7,5, 8 mM MgSO₄, 0,1 M NaCl, ζελατίνη 0,01% w/v)
 - Κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος *E. coli* (LE392)
 - Τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB - bottom agar (θρεπτικό μέσο LB - 1,5% w/v άγαρ)
 - Θρεπτικό υλικό LB – top agar (θρεπτικό μέσο LB – 0,7% w/v άγαρ)
 - Εναιώρημα φάγων βιβλιοθήκης αγνώστου τίτλου

Πειραματική Διαδικασία:

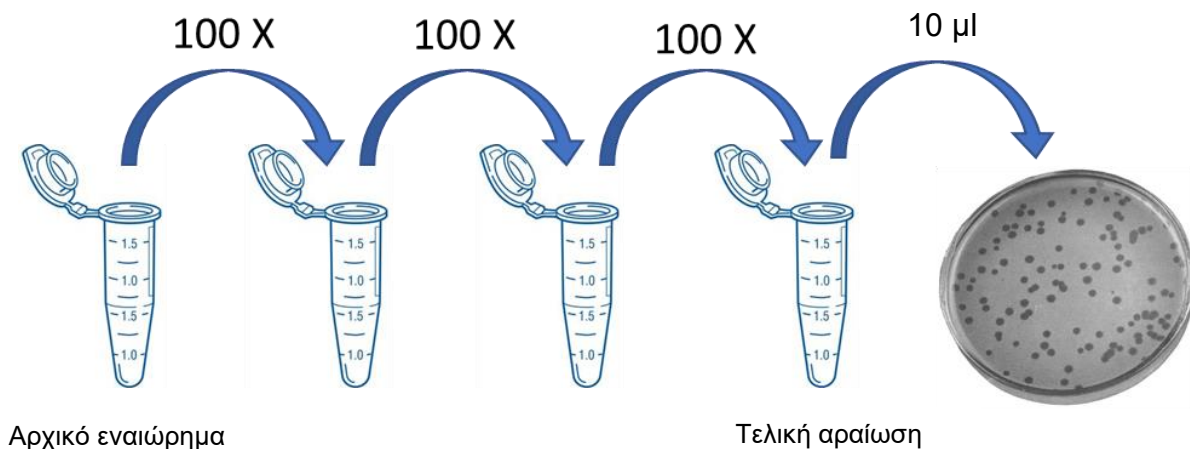
A. Παρασκευή plating cells

1. Εμβολιάζουμε 50 ml LB, που περιέχει 1 ml 20% μαλτόζη, με 0.5 ml από μία φρέσκια καλλιέργεια του επιθυμητού βακτηριακού στελέχους. Επωάζουμε στους 37°C για 1.5-2 ώρες έως ότου η οπτική πυκνότητα (O.D) της νέας καλλιέργειας να έχει τιμή 0.4 (δηλαδή τα κύτταρα να βρίσκονται στη *λογαριθμική φάση*).
2. Μοιράζουμε από 2 ml σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm, στους 4°C για 10 min.
3. Αδειάζουμε το υπερκείμενο στο απολυμαντικό. Στο ίζημα προσθέτουμε 1 ml αποστειρωμένου διαλύματος 10 mM MgSO₄ και επαναδιαλύουμε ήπια. Διατηρούμε τα κύτταρα στον πάγο. *Αυτά είναι plating cells.*

B. Τιτλοδότηση

1. Κάνουμε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων της βιβλιοθήκης σε διάλυμα SM χρησιμοποιώντας σωληνάκια τύπου errendorf, σύμφωνα με τις υποδείξεις του υπευθύνου της άσκησης.

2. Μεταφέρουμε 200 μl plating cells σε σωληνάκι τύπου erpendorf.
3. Μεταφέρουμε 10 μl από την τελική αραιώση στο ίδιο σωληνάκι με τα plating cells.
4. Επωάζουμε 20 λεπτά στους 37°C.
5. Παράλληλα ετοιμάζουμε για κάθε σωληνάκι ένα σωλήνα με 2,5 ml top agar και τον διατηρούμε στους 48-50°C.
6. Μεταφέρουμε το μίγμα φάγων-plating cells στο σωλήνα με το top agar, αναδεύουμε και αμέσως ρίχνουμε το περιεχόμενο σε προθερμασμένα τρυβλία με bottom agar.
7. Αφήνουμε 15-20 λεπτά τα τρυβλία σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει το top agar.
8. Αναστρέφουμε τα τρυβλία και επωάζουμε στους 37°C ο/n.
9. Την επόμενη μέρα μετράμε τον αριθμό των πλακών (έστω A rfu) ανά τρυβλίο. Αυτές έχουν προέλθει από 10 μl εναιωρήματος φάγων της τελικής αραιώσης η οποία έχει, επομένως, συγκέντρωση A rfu/10 μl ή $A \times 10^2$ rfu/ml. Υπολογίζουμε τον τίτλο των αρχικών δειγμάτων που μας δόθηκαν με βάση τις αραιώσεις που έχουν γίνει σε rfu/ml.



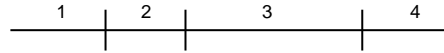
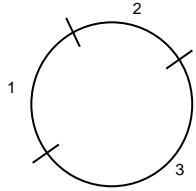
Τίτλος αρχικού εναιωρήματος (rfu/ml) = αρ. πλακών $\times 10^2 \times (10^2 \times 10^2 \times 10^2)$

8. ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Ο προσδιορισμός και η τοποθέτηση των θέσεων περιοριστικών ενδονουκλεασών σε ένα τμήμα DNA ονομάζεται χαρτογράφηση. Η δημιουργία του «χάρτη περιοριστικών ενδονουκλεασών», που αποτελεί ένα είδος ταυτότητας για κάθε DNA, είναι το πρώτο βήμα στον χαρακτηρισμό ενός άγνωστου DNA και αποτελεί προϋπόθεση για την περαιτέρω ανάλυση ή/και επεξεργασία του. Συνήθως για την χαρτογράφηση χρησιμοποιούνται περιοριστικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν 6 bp και είναι αρκετά κοινές, όπως αυτές που βρίσκονται στους πολυσυνδέσμους των πλασμιδίων-φορέων. Επίσης, η διαδικασία διευκολύνεται σημαντικά με την κλωνοποίηση του DNA σε έναν τέτοιο φορέα.

Η διαδικασία της χαρτογράφησης ακολουθεί τα εξής βήματα:

1. Πέψη του DNA με δύο ή περισσότερες ενδονουκλεάσες (μόνες τους και με συνδυασμούς).
2. Ηλεκτροφόρηση και φωτογράφιση του πήκτωματος. Στο ίδιο πήκτωμα ηλεκτροφορούνται και οι "markers", δηλαδή DNA μετά από πέψη που αναλύεται σε γνωστού μεγέθους ζώνες. Συνήθως χρησιμοποιείται DNA του φάγου λ μετά από πέψη με HindIII ή πλασμίδιο pMB9 μετά από πέψη με HaeIII.
3. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών σε ημιλογαριθμικό χαρτί. Η καμπύλη κατασκευάζεται με βάση την κινητικότητα των ζωνών του marker. 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) στον **λογαριθμικό** άξονα των y .
4. 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 (π.χ. 7 kb) και γι' αυτό ο κανόνας είναι να εκτιμάται το συνολικό μήκος του άγνωστου DNA σε συνδυασμό με την εξέλιξη της όλης διαδικασίας.
5. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε αν το DNA που χαρτογραφείται είναι κυκλικό ή γραμμικό. Για ένα **κυκλικό μόριο**, όσες ζώνες προκύπτουν από την πέψη (n), τόσες θέσεις υπάρχουν στο DNA (n), ενώ για ένα **γραμμικό μόριο**, από όσες ζώνες προκύπτουν (n), υπάρχει μία θέση λιγότερη στο DNA ($n-1$).



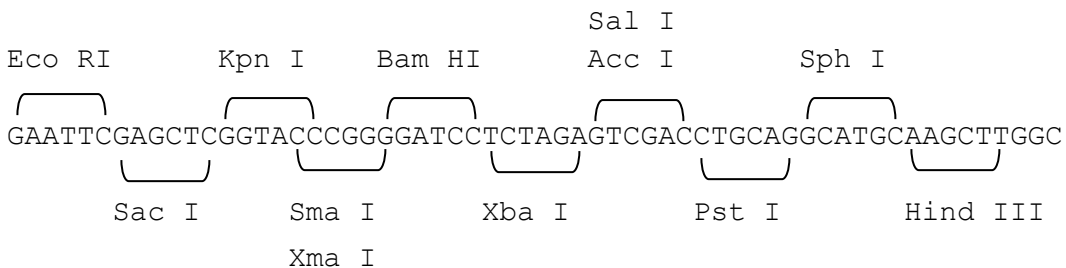
6. Τα επόμενα βήματα δεν μπορούν να περιγραφούν με σαφήνεια, αφού υπάρχει άπειρος αριθμός περιπτώσεων. Πάντως, η γενική τακτική είναι να τοποθετούνται σε τυχαία σειρά οι ζώνες από μια απλή αντίδραση (διαλέγουμε κάποια που δίνει λίγες, αλλά σαφείς ζώνες) και κατόπιν με βάση τα μεγέθη των ζωνών από διπλές αντιδράσεις, προσπαθούμε να επιβεβαιώσουμε ή να απορρίψουμε την αρχική διευθέτηση. Έτσι προκύπτει ένας χάρτης, ο οποίος περιέχει μερικές (αν όχι όλες) σίγουρες θέσεις για μια τουλάχιστον περιοριστική ενδονουκλεάση. Αυτές οι σίγουρες θέσεις, αποτελούν από δω και πέρα το σημείο αναφοράς για την τοποθέτηση άλλων θέσεων, πάντα με βάση διπλές ή και τριπλές ακόμη αντιδράσεις. Πολλές φορές δημιουργείται η ανάγκη για πρόσθετες αντιδράσεις με νέες ενδονουκλεάσες και με νέους συνδυασμούς. Γι' αυτό, η όλη διαδικασία μπορεί να διαρκέσει μερικές ημέρες, χωρίς όμως και πάλι να υπάρχει εγγύηση ότι θα χαρτογραφηθούν όλες οι θέσεις των επιθυμητών ενζύμων. Σε τέτοιες περιπτώσεις ακολουθείται άλλη τακτική, που δεν είναι αντικείμενο αυτής της άσκησης.

Η διαδικασία της χαρτογράφησης μπορεί να γίνει ευκολότερα κατανοητή με το επόμενο παράδειγμα:

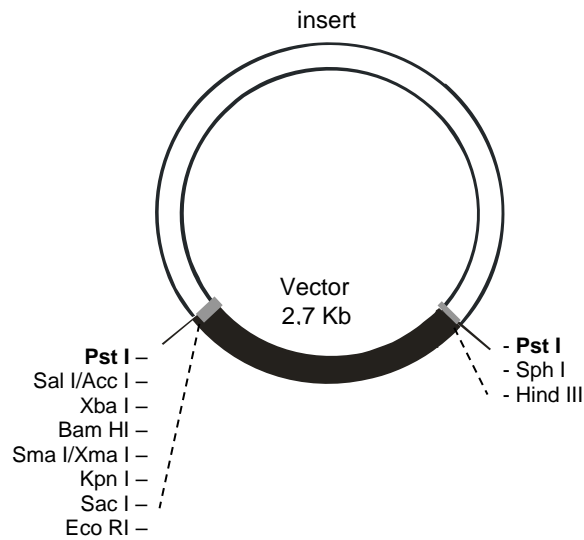
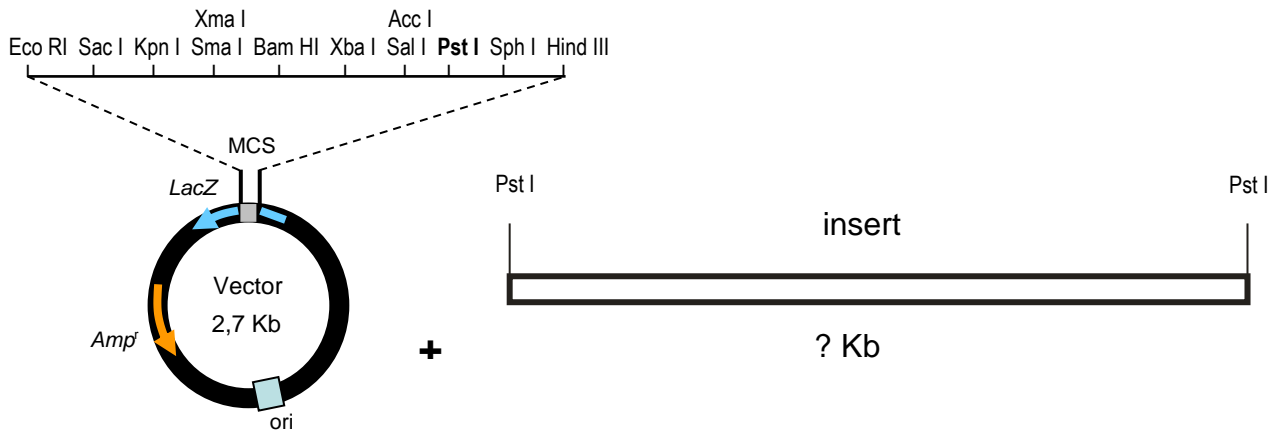
Στον πλασμιδιακό φορέα pUC18 (vector) έχει κλωνοποιηθεί στη θέση **Pst I** ένα DNA με άγνωστο μήκος και χάρτη (Βλ. Άσκηση μετασχηματισμού). Θέλουμε να χαρτογραφήσουμε το ενσωματωμένο DNA (insert) για τα ένζυμα **Eco RI** και **Hind III**.

A. Γνωστά στοιχεία:

➤ Το pUC18 έχει μήκος περίπου 2.7 kb και περιέχει τον πολυσύνδεσμο (polylinker) mp18, ο οποίος είναι μια αλληλουχία 60 bp και περιέχει 10 μοναδικές θέσεις για 12 περιοριστικές ενδονουκλεάσες:



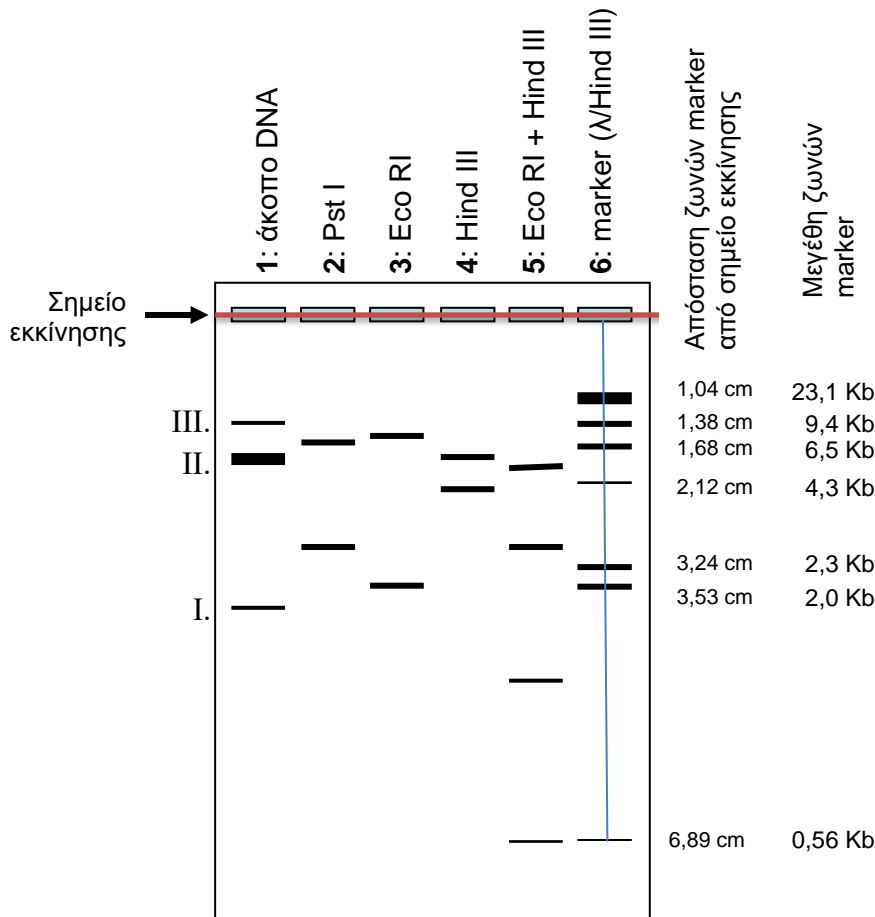
- Μετά την κλωνοποίηση γνωρίζουμε ποια από τα ένζυμα που κόβουν στον πολυσύνδεσμο βρίσκονται από τη μια και ποια από την άλλη πλευρά του insert. Έτσι, φτιάχνουμε ένα σχήμα (με όλα τα γνωστά στοιχεία) με βάση το οποίο θα ξεκινήσουμε τη χαρτογράφηση:



Μορφή ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.

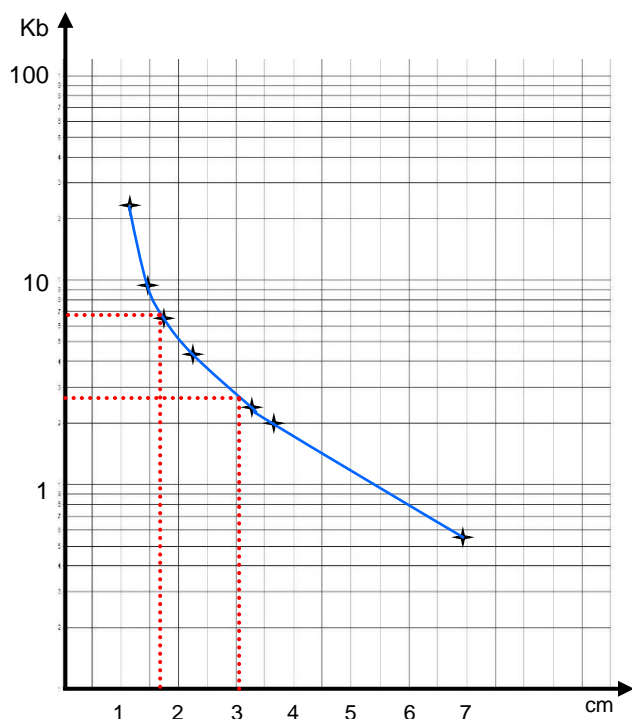
B. Διαδικασία χαρτογράφησης

- Πέψη του DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες Pst I, Eco RI, Hind III και διπλή πέψη με Eco RI/Hind III. (Η αντίδραση με την Pst I περιλαμβάνεται με σκοπό να αφαιρέσει το insert και να μας δώσει μια εκτίμηση του μεγέθους του).
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και φωτογράφιση (βλ. Σχήμα). Μαζί με τα δείγματα των πέψεων (διαδρομές 2-5) ηλεκτροφορείται ένας marker (διαδρομή 6) και λίγο άκοπτο DNA (διαδρομή 1). Η εικόνα των πέψεων στο πήκτωμα οφείλει να είναι διαφορετική από την εικόνα του άκοπτου DNA εκτός αν κάποιο δείγμα είναι άκοπτο.



- Πάνω στη φωτογραφία και με τη βοήθεια χάρακα, τραβάμε μια γραμμή στα πηγαδάκια που θεωρείται το σημείο εκκίνησης για όλα τα δείγματα και στη συνέχεια μετράμε κάθετα τις αποστάσεις των ζωνών του DNA για κάθε δείγμα (εκτός του άκοπτου DNA) από τη γραμμή αυτή.
- Με βάση την κινητικότητα των ζωνών του marker κατασκευάζουμε πρότυπη καμπύλη σε ημιλογαριθμικό χαρτί. (βλ. Πίνακα α)

- Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης υπολογίζουμε τα μεγέθη των ζωνών που προκύπτουν από κάθε πέψη (βλ. Πίνακα β)



α. λ/HindIII	
απόσταση σε cm	μέγεθος σε kb
1.04	23.1
1.38	9.4
1.68	6.5
2.12	4.3
3.24	2.3
3.53	2.0
6.89	0.56

β. πέψεις							
Pst I		Eco RI		Hind III		Eco RI / Hind III	
cm	Kb	cm	Kb	cm	Kb	cm	Kb
1.6	7,32	1.53	7,99	1.82	5,86	1.93	5,31
3.03	2,70	3.53	2,00	2.24	4,14	3.03	2,70
						4.78	1,46
						6.9	0,56
	10,02		9,99		10,00		10,03

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

- Τα ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε αναγνωρίζουν **μοναδικές** θέσεις στον **πολυσύνδεσμο** του πλασμιδίου-φορέα. Έτσι εκ των προτέρων γνωρίζουμε ότι θα κόβουν μια φορά στον πολυσύνδεσμο ενώ επιπλέον θέσεις θα είναι υποχρεωτικά εσωτερικές στο insert. Εξάιρεση αποτελεί η Pst I που είναι η θέση κλωνοποίησης και κόβει δύο φορές εκατέρωθεν του insert (γιατί μετά την κλωνοποίηση η θέση αυτή διπλασιάζεται).
- Το άθροισμα των ζωνών που προκύπτουν από κάθε πέψη θα πρέπει να συμπίπτει αφού αντιστοιχεί στο συνολικό μέγεθος του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Κάτι τέτοιο όμως δεν συμβαίνει παρά μόνο κατά προσέγγιση γιατί λόγω πειραματικού σφάλματος υπάρχει υπο- ή υπερεκτίμηση του μεγέθους των ζωνών. Γενικά όσο πιο πολλές ζώνες προκύπτουν από μια πέψη τόσο πιο ακριβής ο υπολογισμός.

- Με βάση τα αποτελέσματα κάθε πέψης τοποθετούμε τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών στο τμήμα DNA (χαρτογράφηση) ως εξής:

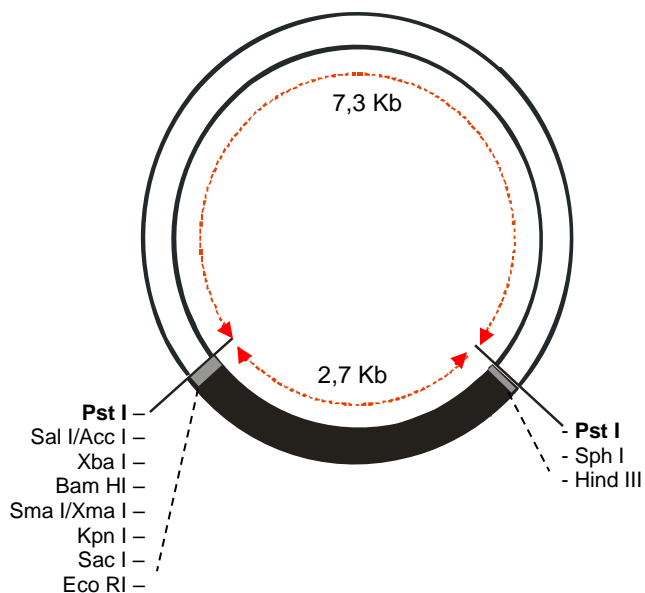
Pst I

Από την πέψη προκύπτουν 2 ζώνες άρα, εφόσον το DNA είναι κυκλικό, συνεπάγεται ότι υπάρχουν 2 θέσεις για την Pst I, άρα δεν υπάρχει εσωτερική στο insert και πρόκειται για τις δύο θέσεις εκατέρωθεν αυτού. Η ζώνη 2,70 Kb αντιπροσωπεύει το πλασμίδιο (περίπου 2,7 kb) κι έτσι η ζώνη 7,32 Kb το ένθεμα (insert).

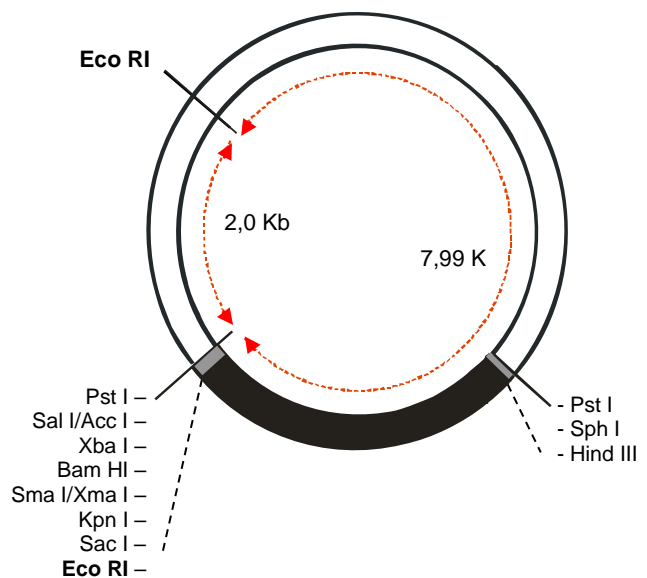
Eco RI

Από την πέψη προκύπτουν 2 ζώνες άρα υπάρχουν 2 θέσεις για την Eco RI. Η μια είναι στον πολυσύνδεσμο και η δεύτερη είναι εσωτερική σε απόσταση 2 Kb από την Eco RI του πολυσυνδέσμου. Η ζώνη των 7,99 Kb εμπεριέχει το πλασμίδιο (2,7 Kb).

Σχήμα 1: Pst I



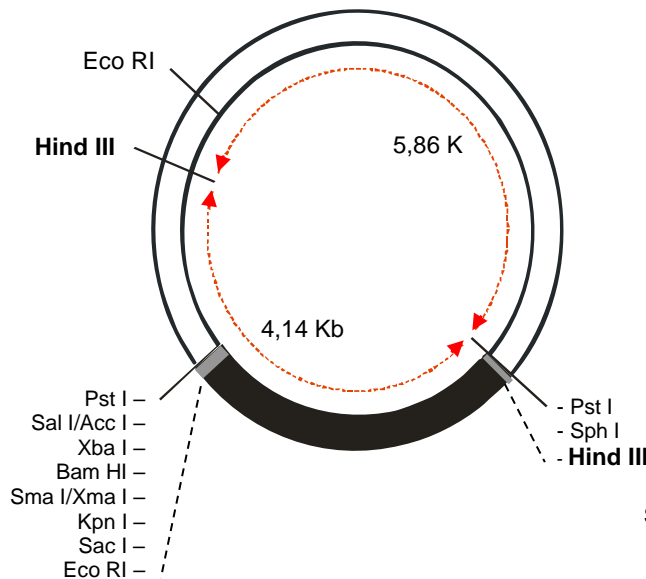
Σχήμα 2: Eco RI



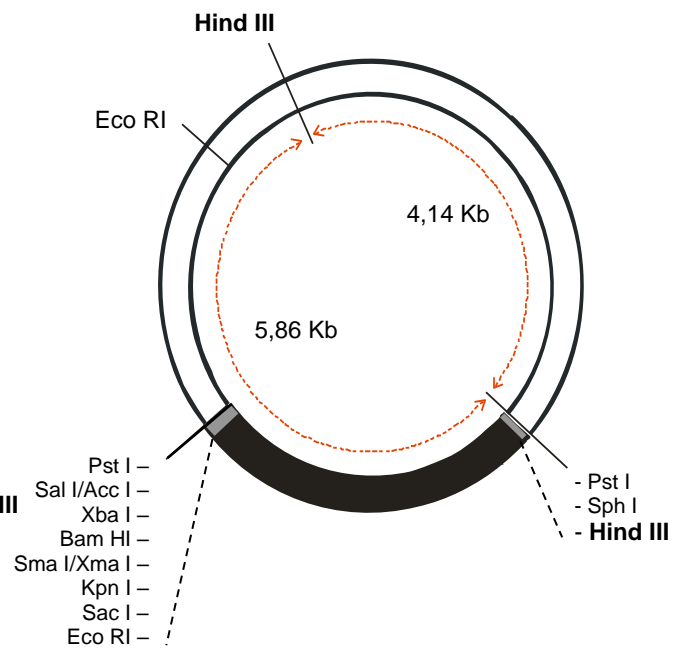
Hind III

Από την πέψη προκύπτουν 2 ζώνες άρα υπάρχουν 2 θέσεις για την Hind III. Η μια είναι στον πολυσύνδεσμο και η δεύτερη είναι εσωτερική. Δεδομένου ότι και οι δύο ζώνες είναι μεγαλύτερες από το μέγεθος του πλασμιδίου (2,7 Kb) έχουν και οι δύο τις ίδιες πιθανότητες να το εμπεριέχουν. Έτσι, έχουμε δύο πιθανές περιπτώσεις τοποθέτησης της εσωτερικής Hind III:

Σχήμα 3α : **Hind III A'** περίπτωση



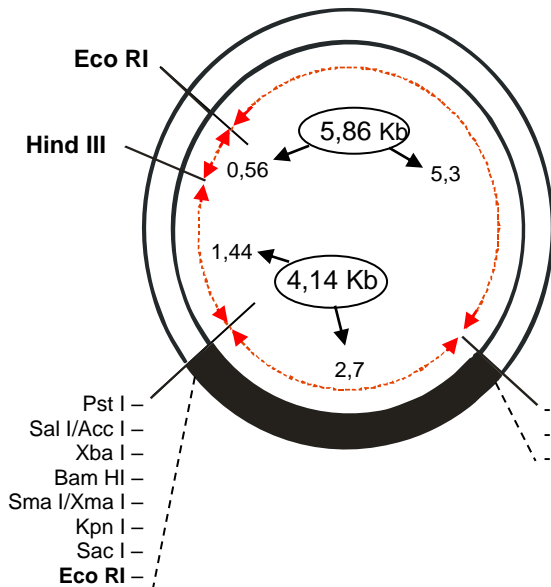
Σχήμα 3β : **Hind III B'** περίπτωση



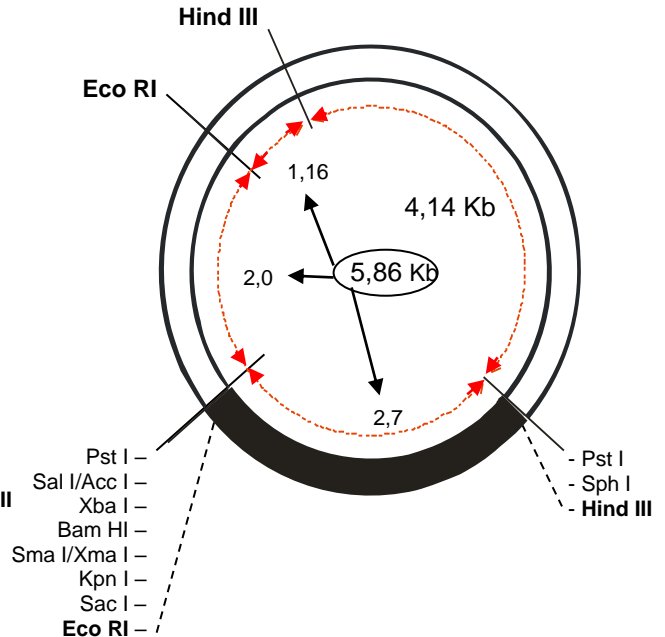
Eco RI / Hind III

Η επίλυση του προβλήματος των εναλλακτικών θέσεων για την Hind III, γίνεται με μια διπλή πέψη με Eco RI και Hind III. Αρχικά υπολογίζουμε θεωρητικά τα αναμενόμενα μεγέθη των ζωνών που περιμένουμε από την διπλή πέψη σε κάθε περίπτωση:

A' περίπτωση



B' περίπτωση



Στη συνέχεια, συγκρίνουμε τα πραγματικά αποτελέσματα με τα θεωρητικά και βλέπουμε ποια από τις δυο περιπτώσεις ισχύει. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα ισχύει η περίπτωση A'.

Θεωρητικά μεγέθη (Kb) A' περίπτωση	Θεωρητικά μεγέθη (Kb) B' περίπτωση	Πραγματικά μεγέθη (Kb)
5,3	4,14	5,31
2,7	2,7	2,7
1,44	2,0	1,46
0,56	1,16	0,56
10,00	9,90	10,03

* Οι μικρές διαφορές στα μεγέθη οφείλονται στο πειραματικό σφάλμα που προκύπτει κατά των υπολογισμό του μεγέθους των ζωνών από το πήκτωμα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

exon 1 <313..363
intron 364..1737
exon 2 1738..>2196

```

1 gaattccata ttgtctataa ttctaaaatt aatcattttt acaaccagcg aacttcaaaa
61 tagagaatgt ctaaagtaac tcatcaaatt caaaatataa aataaaatag aaattcaata
121 ataactgagg ctttagttct aaatcacata tctgtgttta cgtaattatt actgaaatta
181 cctaatgatt ttatataaag ggacatagtt tctagtttgt cacgtaatag agatagcggg
241 tggcaacaaa actatataaa aacagaaatt tggtagttga aagagtatac aagtatacct
301 cagtaaaaca acatggcagc caagattatt ctcttcttgt cgtatctgct tctcgcgggt
361 caggtgagta cttattttaa tgtaaataca ttaagatttt ttaattttctt atatgacgag
421 cccatgatcc tatatccaca tttcagcttt atatatatac ccattttggg atagtatact
481 catagatatg tctataataa tgttactggg aagggtcgatc tttgcccga cccaccttga
541 gatataagtt ctaaggtctc agtatagtta caacggcttg cacctcgtcg ccacaggggg
601 agccgacgcc gaagtgccac actgcagtgg ctgcaacgag gacacggcgg agcacacgct
661 cgcgtactgc cccgctttcg cggagcagcg ccgggtcctc gttgcaaaaa taggaccgga
721 cttgtcgcctt ccaaccgtcg tggctacgat gctcgacagc gacgagtcct ggcaggcgat
781 gctcgatttc tgcgagttca ccactctgca gaaggaggcg gcggaacggg agagggagag
841 ctcttcttcc ctctcggcgc cgtgcgcgcg cccgtcgagc cgggggtcgg aggagggcgt
901 ttgtccagct cgggccctta tgaggaggca gtctcttccc cctgggtgaag gtcacggggc
961 gacctgaggg tgcgcgcgat gctaccgtca ctttagcgcg ctggcaccag gaggacggga
1021 cgacgcggtg gcggctgcgg actgcaatgc ggtccgcatt ttcgtcggcg ctgtcatcgc
1081 cgaatatact gtggaagcgc aaccgcgctg gcggtgtatc gcgttccgan ccggcaggct
1141 ggttctggcc cagcggggta tcctggta caacggcgcg cgcctgggcg gtctgatagg
1201 gccgccgtac cgcggagacc gatgtcgttg gtcgtcgact atcgcctcga cggcccctcg
1261 gtcgggcata ctcgggggtg cgcgcgctgt ctggttgtag tgttgaccgc tggaaacccc
1321 catactctga ccgggttttg accccggacg gagatcggac gtcgggtgta agagtgcagg
1381 ggagtgcgtt agtgggtgga ccctagaatc cttgggcccg cggctcgtctc acaacaccat
1441 gcagatcggt gagtctcaca tacaccgcgc ccgcctctta tgcgcgggga cctcgtagga
1501 ggttcggccc agggcccga aaaaaaattg ttacaacggc tgtcccacc tttaaaccga
1561 aacgcattac tgcttcacgg ctgtactgta ttatacaaaa agcaatccaa caaaaacaaa
1621 acgttcgact taaaagtaca aggtgcggta attattagct aatacagata taggtttaa
1681 aaataaataa ataaataaat aaaagtgatt tttgtaaact aaaatactct cgtttagttc
1741 acagttggcc agtacatcgg ccgcgtgaac aatgggtgtg gatgcgggaa tctcaactac
1801 cgtggcctcg gttacaccgc tggctgtggt ctcactgctg ctagtctctc tgcagcctcc
1861 cacggaggag ggttattcgt cgtcacctcc tctgccacgc ctactggtct cggcatagct
1921 tccgagaaca gatacgaagg cgtgtcgtat gtgtgcggca agattccatt cctgggcacc
1981 gctgatgtcg caggcgagtt ccccactgcg ggcattgggt agatcaacta cagctgcggc
2041 gatggagcag tcgccattac cgtgaaggt ggtctcggct acgctggagg acttgactac
2101 actgggtggac tcggctacgc gactgaaggt ggctacggct taggctatgg agaatacgtt
2161 ggatgcgggt gtgggttcgg tgacgtctac ttgtagaaca tgataatgat gataaaataa
2221 acttataagt tcgaataaac tctggtaaac atgaaagtct ggtatttatt tccgagtaat
2281 tcccattttg caccagctta gtttattcgc atcgcaatac agtattttga gtgagggcct
2341 ttgtaagtgt ggcgttttca tgcggcctga agtcacatta agaaccttca catcacacia
2401 tcccattttt attggaanaac cgtcggagtg ccacggtttg taaagaatgt agtcattttg
2461 gtaattagga attc

```

(a)

Intron forward primer: 5'.....3'

Intron Reverse primer: 5'.....3'

Μήκος προϊόντος PCR:

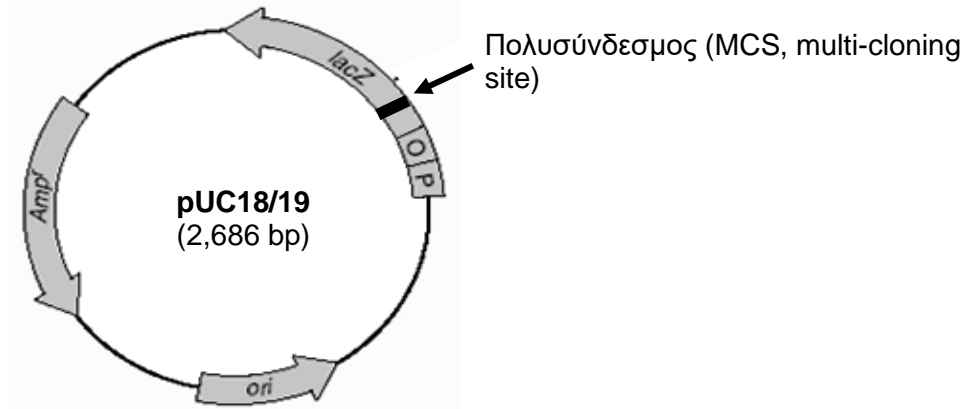
(b)

Intron forward primer: 5'NNGAATTC.....3'

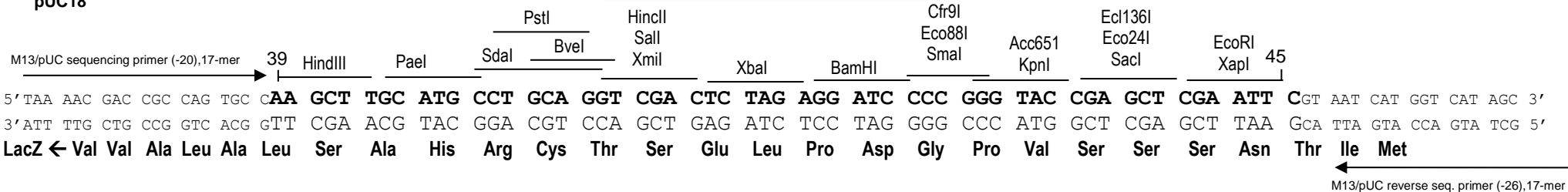
Intron Reverse primer: 5'NNGAATTC.....3'

Μήκος προϊόντος PCR:

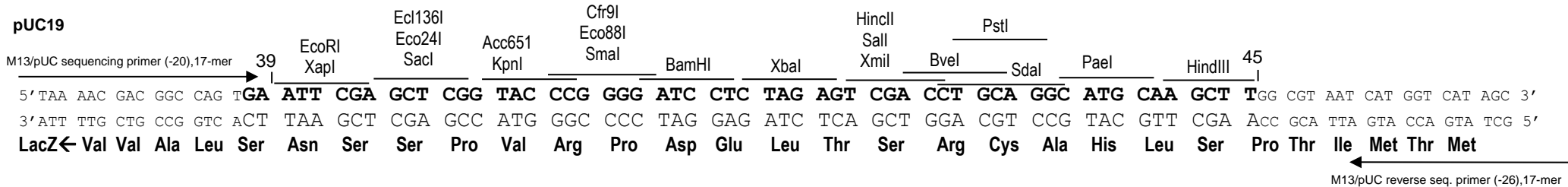
Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης (pUC18 και pUC19)



pUC18



pUC19

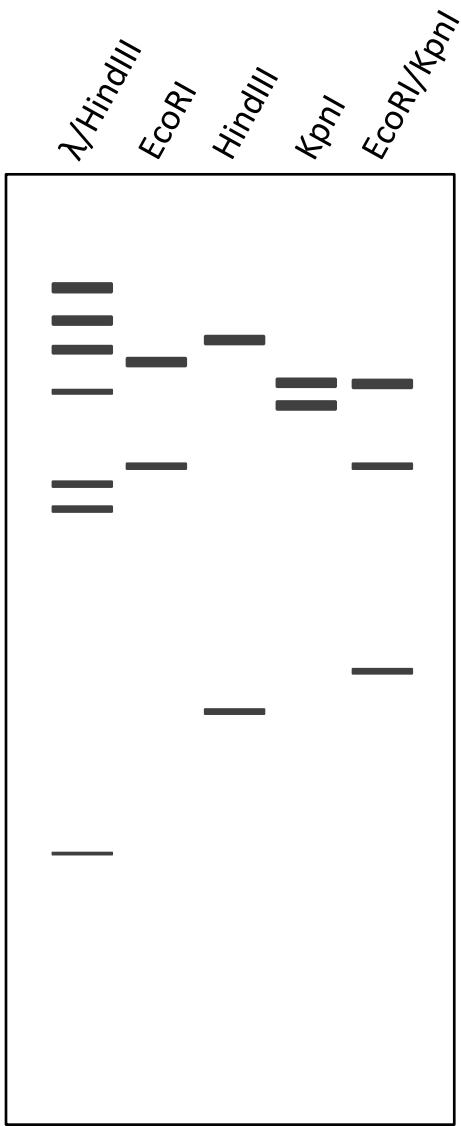


Amp^r : Γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.

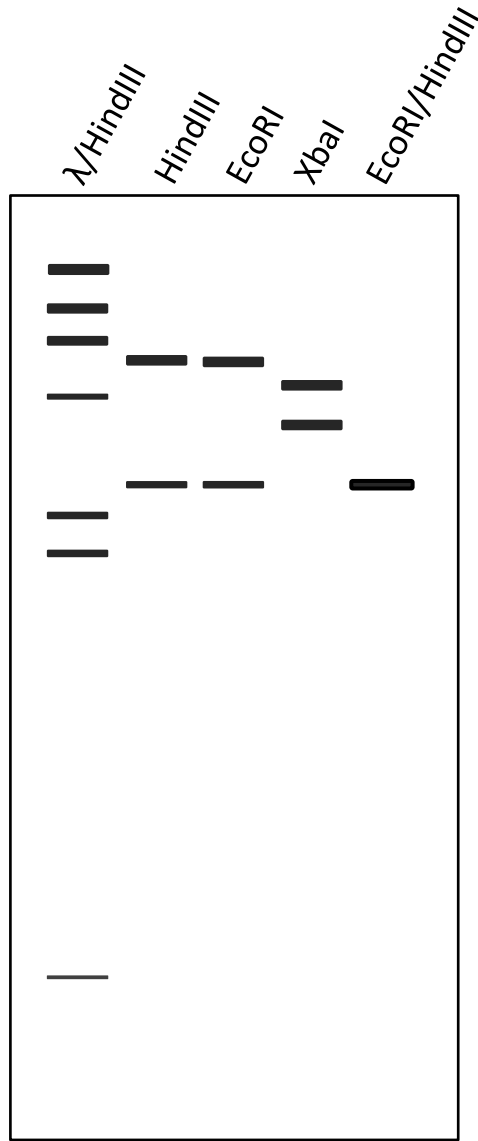
lacZ : Γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Το προϊόν του γονιδίου lacZ συμβάλλει στην εμφάνιση μπλε χρώματος στις βακτηριακές αποικίες όταν στο θρεπτικό μέσο υπάρχει η χημική ένωση X-gal.

ori: σημείο έναρξης της αντιγραφής του DNA (origin of replication)

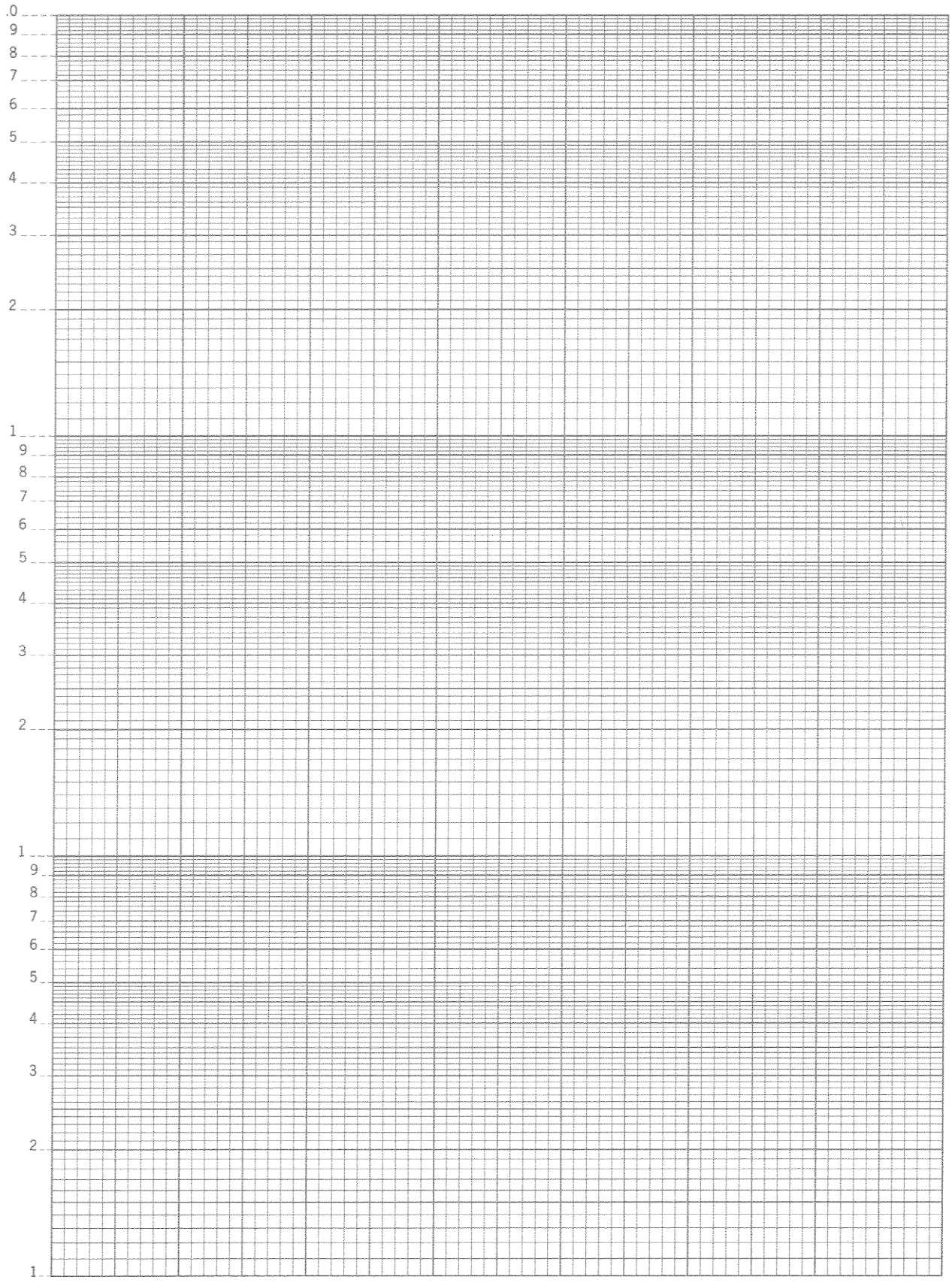
Πολυσύνδεσμος: αλληλουχία που περιέχει μοναδικές θέσεις για συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η οποία παρεμβάλλεται στο γονίδιο lacZ στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης.

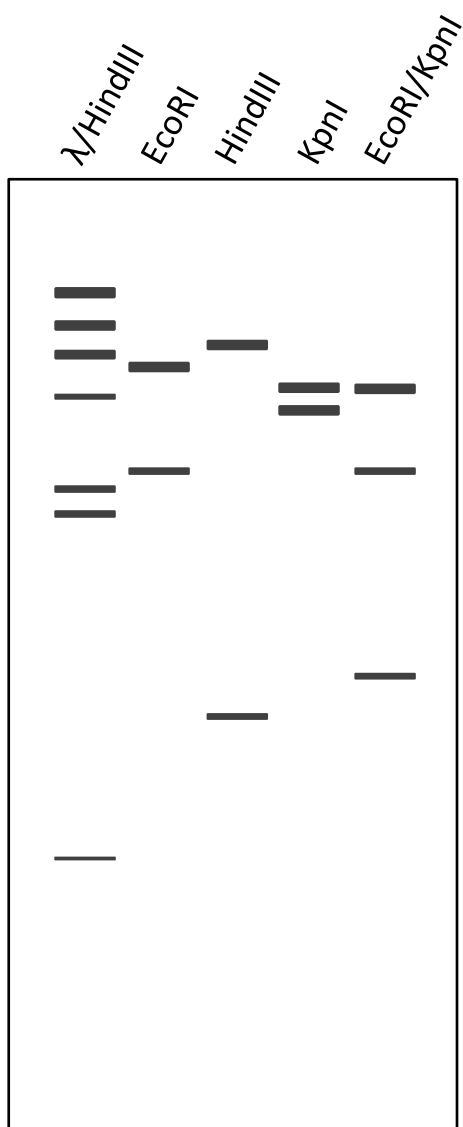


Vector: pUC18
Cloning site: EcoRI

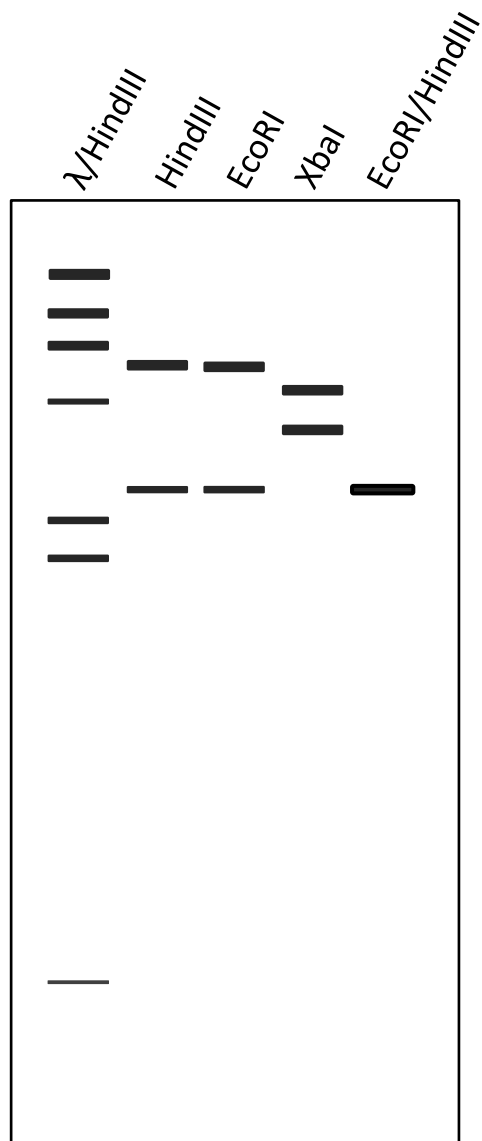


Vector: pUC18
Cloning site: HindIII

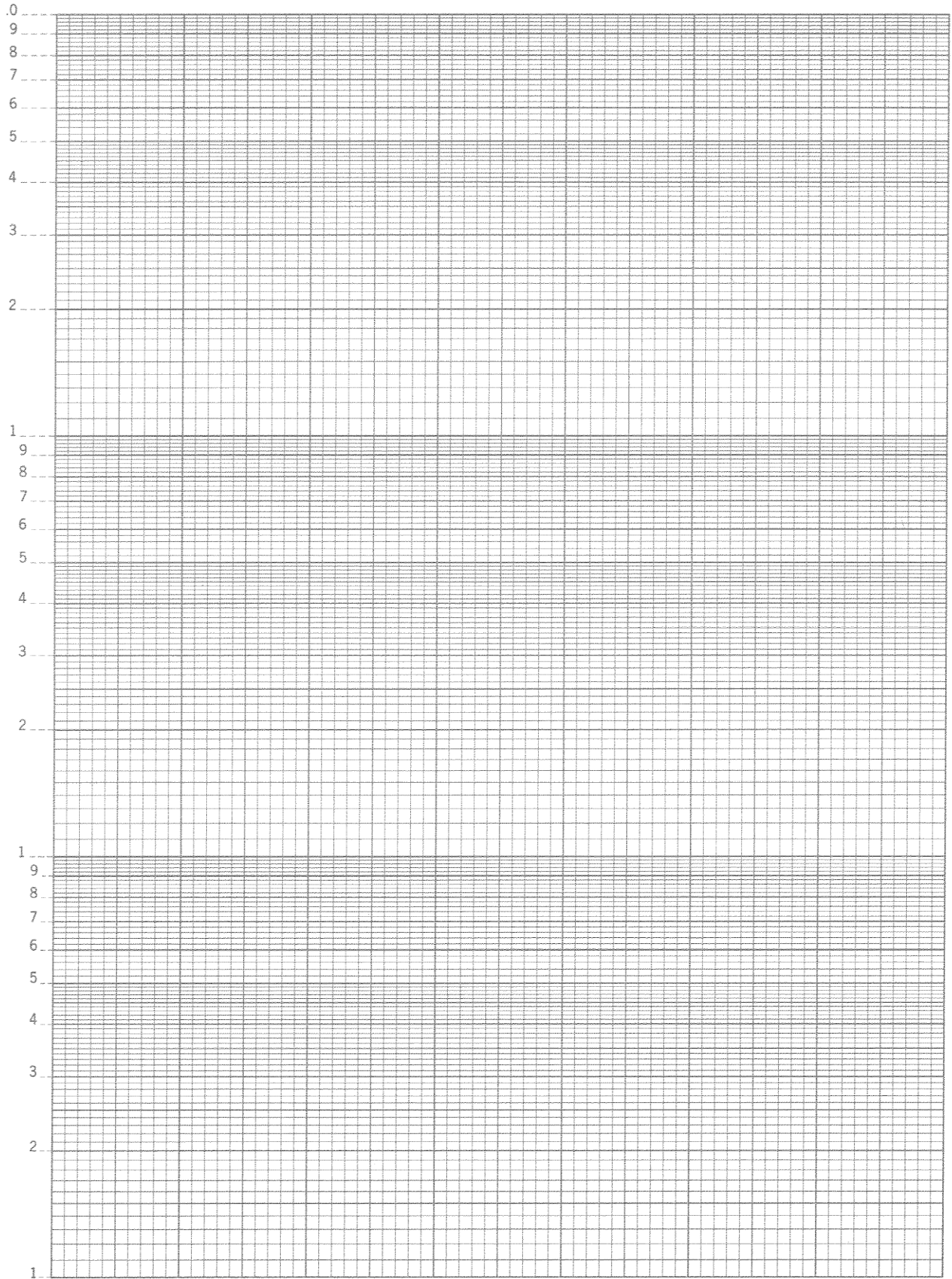




Vector: pUC18
Cloning site: EcoRI



Vector: pUC18
Cloning site: HindIII



Τυπώθηκε στο ΕΚΠΑ
Τμήμα Τυπογραφείου Πανεπιστημιούπολης
Τηλ. 210 7276439 - 41