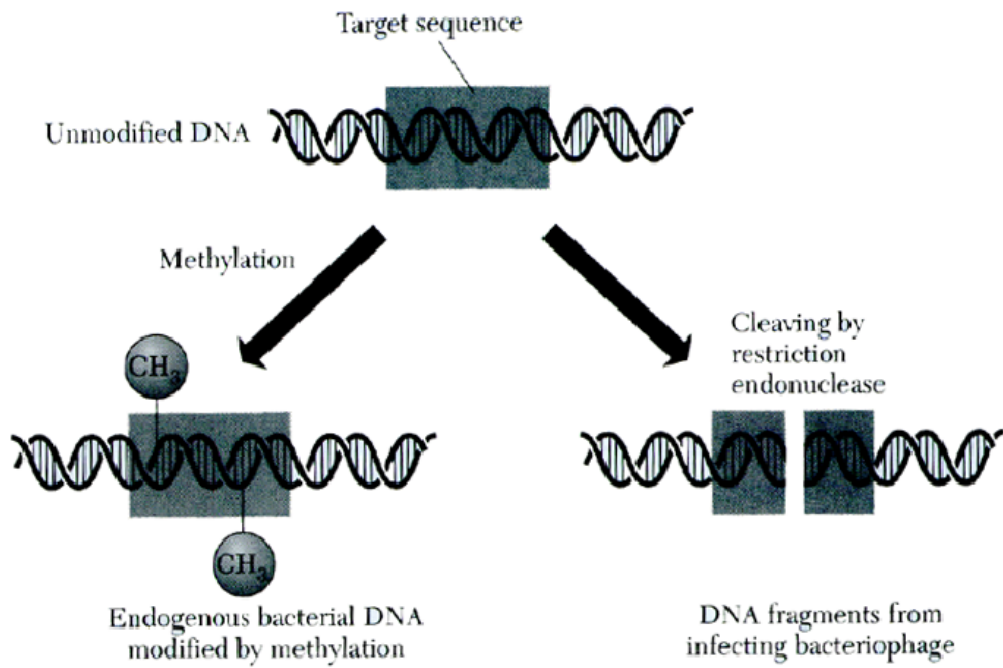


Πείραμα 7^ο : Μελέτη της δράσης συγκεκριμένων περιοριστικών ενζύμων σε λ DNA – Στοιχεία θεωρίας

1. ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Πολλά είδη ενζύμων τροποποιούν τα νουκλεϊκά οξέα. Μια συγκεκριμένη κατηγορία αποτελούν οι νουκλεάσες οι οποίες δρουν καταλύοντας την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών που αποτελούν τη “ραχοκοκαλιά” των νουκλεϊκών οξέων. Ορισμένες νουκλεάσες δρουν μόνο πάνω στο DNA ενώ άλλες μόνο στο RNA. Κάποιες απ’ αυτές δρουν μόνο στα ελεύθερα άκρα του DNA (εξωνουκλεάσες) ενώ άλλες δρουν στο εσωτερικό της αλυσίδας και ονομάζονται ενδονουκλεάσες. Μια συγκεκριμένη κατηγορία ενδονουκλεασών, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, κατέχουν κεντρικό ρόλο στην τεχνολογία του ανασυνδιασμένου DNA.

Δεν είναι υπερβολικό να πούμε ότι το σύνολο της έρευνας στον τομέα της μοριακής βιολογίας στηρίζεται στην απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών από διάφορα βακτήρια. Τα βακτήρια συχνά δέχονται επίθεση από ιούς (που ονομάζονται βακτηριοφάγοι). Κατά τη διάρκεια ερευνών πάνω στα βακτήρια και τους φάγους που τα προσβάλλουν, έγινε φανερό ότι βακτηριοφάγοι που αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε κάποιο είδος βακτηριδίων συχνά αναπτύσσονται ελάχιστα σε κάποιο άλλο. Με άλλα λόγια η ανάπτυξή τους **περιοριζόταν**. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε σε διαφορές που υπήρχαν στο DNA των βακτηρίων και των ιών και συγκεκριμένα στην ύπαρξη μεθυλιωμένων βάσεων σε συγκεκριμένες θέσεις του βακτηριακού DNA. Τα βακτήρια αυτά διέθεταν ένα τύπο ενζύμου που έκοβε το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες εκτός κι αν αυτές ήταν μεθυλιωμένες. Επομένως αν κάποιος ξένος οργανισμός εισβάλλει στο βακτήριο (μη μεθυλιωμένο DNA) δέχεται επίθεση από τα περιοριστικά ένζυμα του βακτηρίου χωρίς φυσικά να κινδυνεύει το DNA του βακτηρίου (μεθυλιωμένο DNA). Η Εικόνα 1 δείχνει σχηματικά το μηχανισμό αυτό.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Δράση περιοριστικών ενδονουκλεασών σε κανονικό και μεθυλιωμένο DNA

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες και οι θέσεις περιορισμού τους

Enzyme*	Recognition and Cleavage Site
<i>Bam</i> HI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' - \text{GCATCC} - 3' \\ 3' - \text{CCTAGG} - 5' \\ \uparrow \end{array}$
<i>Eco</i> RI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' - \text{GAATTC} - 3' \\ 3' - \text{CTTAAG} - 5' \\ \uparrow \end{array}$
<i>Hae</i> III	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' - \text{GGCC} - 3' \\ 3' - \text{CCGG} - 5' \\ \uparrow \end{array}$
<i>Hind</i> III	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' - \text{AAGCTT} - 3' \\ 3' - \text{TTCGAA} - 5' \\ \uparrow \end{array}$
<i>Hpa</i> II	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' - \text{CCGG} - 3' \\ 3' - \text{GGCC} - 5' \\ \uparrow \end{array}$
<i>Not</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' - \text{GCGGCCGC} - 3' \\ 3' - \text{CGCCGGCG} - 5' \\ \uparrow \end{array}$
<i>Pst</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' - \text{CTCCAG} - 3' \\ 3' - \text{GACGTC} - 5' \\ \uparrow \end{array}$

Arrows indicate the phosphodiester bonds cleaved by the restriction endonucleases.

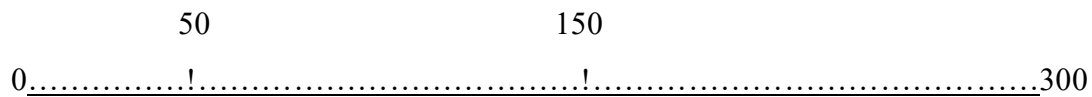
*The name of the restriction endonuclease consists of a three-letter abbreviation of the bacterial species from which it is derived— for example, *Eco* for *Escherichia coli*.

Ο Πίνακας 1 δείχνει μερικές γνωστές ενδονουκλεάσες και την αλληλουχία του DNA την οποία αναγνωρίζουν. Τα βέλη δείχνουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που κόβονται από το ένζυμο. Τα περιοριστικά ένζυμα συμβολίζονται συνήθως με τρία γράμματα τα οποία είναι συντομογραφία του ονόματος του βακτηρίου από το οποίο προέρχονται – για παράδειγμα, *Eco* από το *Escherichia coli*. Προσέξτε επίσης

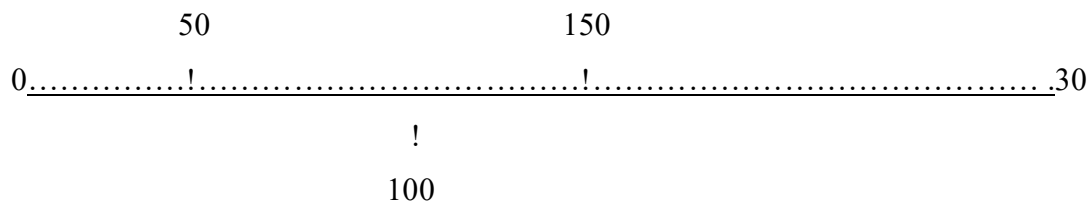
ότι κάποια ένζυμα όπως το Hae III, κόβουν κατά πλάτος τις δυο αλυσίδες του DNA με αποτέλεσμα το κομμένο DNA να έχει “ίσια” άκρα. Τα περισσότερα περιοριστικά ένζυμα όμως κόβουν τις αλυσίδες του DNA σε διαφορετικές θέσεις με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ‘συμπληρωματικά’ άκρα.

II. ΧΑΡΤΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

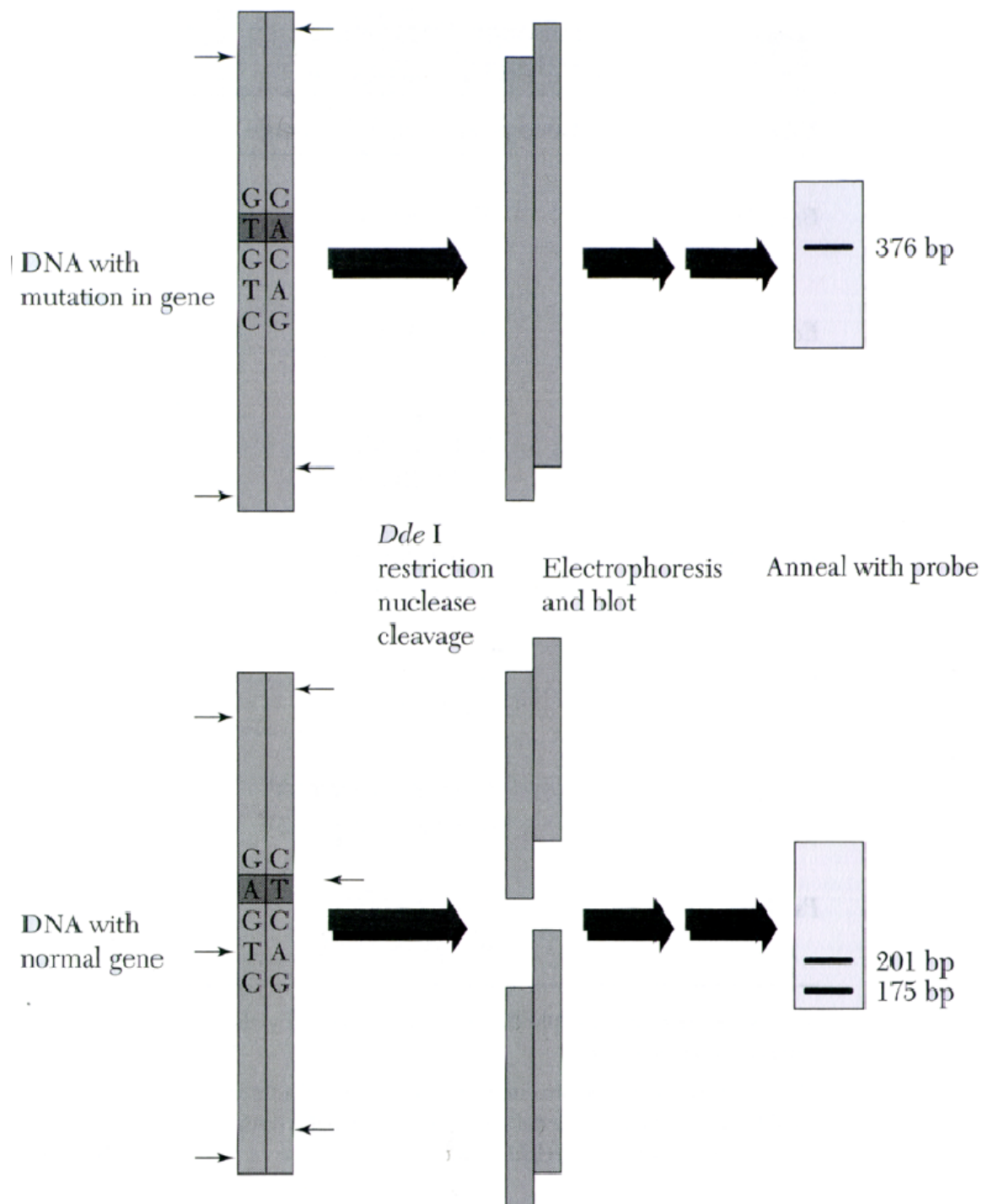
Ένας χάρτης περιοριστικών ενζύμων απεικονίζει ένα κομμάτι DNA στο οποίο σημειώνονται ακριβώς οι θέσεις που κόβουν τα περιοριστικά ένζυμα που μας ενδιαφέρουν. Η αρίθμηση του DNA εξαρτάται από τον αριθμό των βάσεων του συγκεκριμένου τμήματος, το ένα άκρο ορίζεται αυθαίρετα ως σημείο 0 ενώ στο άλλο σημειώνεται ο συνολικός αριθμός των βάσεων που περιλαμβάνονται στο κομμάτι. Αναλογικά, σκεφτείτε ένα χάρακα μήκους 300mm που έχει εγκοπή ανά ένα χιλιοστό. Εάν πάρουμε ένα μαχαίρι και κόψουμε το χάρακα στα σημεία 50mm και 150mm, τότε το μαχαίρι θα είναι το ανάλογο ενός περιοριστικού ενζύμου και τα σημεία 50mm και 150mm το ανάλογο των θέσεων περιορισμού. Ένας τέτοιος χάρτης περιορισμού θα έμοιαζε κάπως έτσι:



Εάν, στη συνέχεια, κόψουμε το χάρακα με ένα ψαλίδι στα 100mm, το ψαλίδι θα είναι το ανάλογο ενός δευτέρου περιοριστικού ενζύμου. Εάν θελήσουμε να σχεδιάσουμε το χάρτη περιορισμού και για τα δυο ένζυμα, θα φαίνεται περίπου έτσι:



Ο σχεδιασμός χαρτών περιορισμού είναι μια από τις πιο χρήσιμες αλλά και ενδιαφέρουσες τεχνικές στη σύγχρονη μοριακή βιολογία. Αποτελεί τη βάση μιας παρόμοιας τεχνικής που είναι γνωστή ως **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**. Με χρήση της τεχνικής αυτής έχουμε τη δυνατότητα να διερευνήσουμε τη δομή των γονιδίων και ιδιαίτερα των μεταλλαγμένων μορφών τους (Εικόνα 2).



ΕΙΚΟΝΑ 2. Restriction Fragment Length Polymorphism στο γονίδιο της β-σφαιρίνης

III. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA

Πηκτή (gel) αγαρόζης

Η αγαρόζη είναι το μέσο που έχει επιλεγεί για το διαχωρισμό τμημάτων DNA που είναι μεγαλύτερα από 1000 ζευγάρια βάσεων (base pairs, bp). Όλα τα κομμάτια του DNA έχουν ομοιόμορφο σχήμα και λόγο φορτίου/μάζας οπότε ο

διαχωρισμός τους γίνεται βάσει του μοριακού βάρους ή του μεγέθους τους το οποίο μετρείται σε ζευγάρια βάσεων (ή ζευγάρια κιλοβάσεων).

Τα κομμάτια του DNA που μελετάμε διαχωρίζονται στην πηκτή αгарόζης και συγκρίνονται με ένα πρότυπο δείγμα (marker). Αυτό είναι προφανές. Οι δυσκολίες αρχίζουν όταν πρέπει να ερμηνεύσουμε την ύπαρξη του κομματιού με το συγκεκριμένο μοριακό βάρος. Επιστρέφοντας στο παράδειγμα με το χάρακα, εάν τον κόψουμε με μαχαίρι στις θέσεις 50mm και 150mm, θα πάρουμε κομμάτια μήκους 50mm, 100mm, και 150mm. ΜΗΝ ΠΡΟΧΩΡΗΣΕΤΕ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΑΝ ΔΕΝ ΤΟ ΚΑΤΑΛΑΒΕΤΕ ΑΥΤΟ!

Εάν υπήρχε δυνατότητα να διαχωρίσουμε τα κομμάτια σε μια πηκτή, τότε θα διαπιστώναμε ότι το μικρότερο κομμάτι (50mm) θα είχε διανύσει τη μεγαλύτερη απόσταση ενώ το μεγαλύτερο (150mm) θα είχε μετακινηθεί λιγότερο από το σημείο που φορτώθηκε. Κάπου στη μέση της απόστασης των δυο θα βρίσκεται το τρίτο κομμάτι (100mm). Εάν φορτώναμε στην πηκτή τα κομμάτια του χάρακα που είχαμε κόψει με ψαλίδι τότε θα βλέπαμε δυο μπάντες, μια που θα αντιστοιχούσε στα 100mm και μια δεύτερη που θα αντιστοιχούσε στα 200mm.

Για τη δημιουργία ενός ολοκληρωμένου χάρτη περιορισμού συχνά πρέπει να γίνει πέψη του DNA με παραπάνω από ένα περιοριστικά ένζυμα ταυτόχρονα. Αυτό λέγεται διπλή πέψη. Κόβοντας το DNA πρώτα με ένα ένζυμο, μετά με ένα δεύτερο, και στη συνέχεια και με τα δυο παίρνουμε πολύτιμες πληροφορίες για τις θέσεις περιορισμού των ενζύμων. Επιστρέφοντας πάλι στο παράδειγμα με το χάρακα, εάν τον κόψουμε ταυτόχρονα με ψαλίδι και μαχαίρι θα βλέπαμε στην πηκτή κομμάτια μεγέθους 50mm και 150mm. Όπως θα πρέπει να διαπιστώσετε και μόνοι σας, στη θέση 50mm αντιστοιχούν παραπάνω από ένα κομμάτια που όμως λόγω μεγέθους εμφανίζονται ως μια μπάντα.

Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται το υποθετικό gel που θα παίρναμε εάν κόβαμε το χάρακα με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Σ' αυτού του τύπου τα πειράματα ξέρουμε συνήθως τις θέσεις περιορισμού του ενός ενζύμου και προσπαθούμε να τοποθετήσουμε τις θέσεις του δεύτερου. Αυτό είναι εφικτό, βλέποντας πώς κόβει το κάθε ένζυμο χωριστά και στη συνέχεια και τα δυο μαζί, το ίδιο κομμάτι DNA.

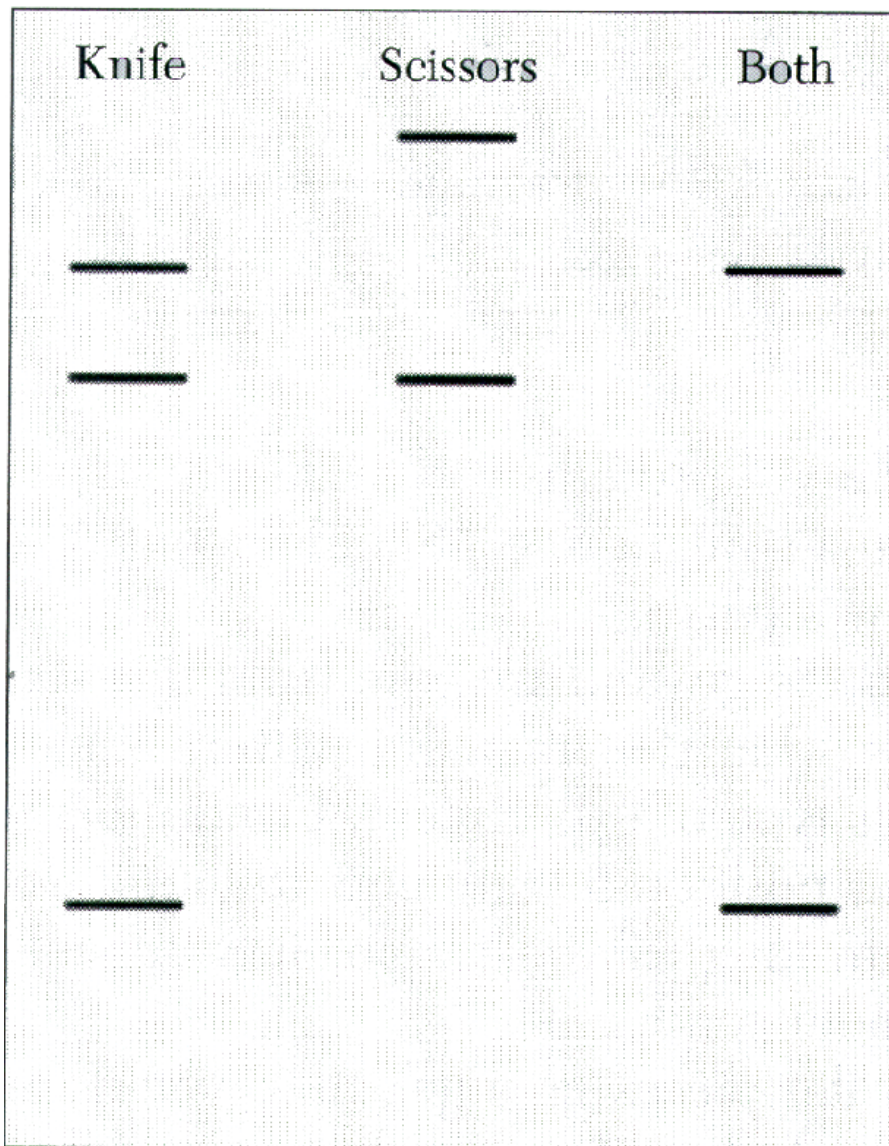
Βάψιμο των τμημάτων του DNA στην πηκτή αгарόζης

Για να δούμε την θέση των κομματιών του DNA πάνω στο gel της αгарόζης προσθέτουμε το αντιδραστήριο βρωμιούχο αιθίδιο είτε στο gel είτε στο διάλυμα της

ηλεκτροφόρησης. Το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώνεται στο DNA και δίνει ένα έντονο πορτοκαλί χρώμα όταν εκτεθεί σε φως UV.

Ένα σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί το γεγονός ότι το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ένα ισχυρό καρκινογόνο και γι' αυτό απαιτεί πολύ προσεκτικό χειρισμό από τον χρήστη.

Η εξέλιξη της ηλεκτροφόρησης ελέγχεται με την προσθήκη χρωστικών στα δείγματα του DNA. Σε μια πηκτή αгарόζης 1%, το μπλε της βρωμοφαινόλης μετακινείται μαζί με τα κομμάτια μεγέθους ~200 bp ενώ η xylene cyanol με τα κομμάτια μεγέθους ~3000 bp.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Η υποθετική ανάλυση σε πηκτή αгарόζης των κομματιών που προκύπτουν στο πείραμα με το χάρακα

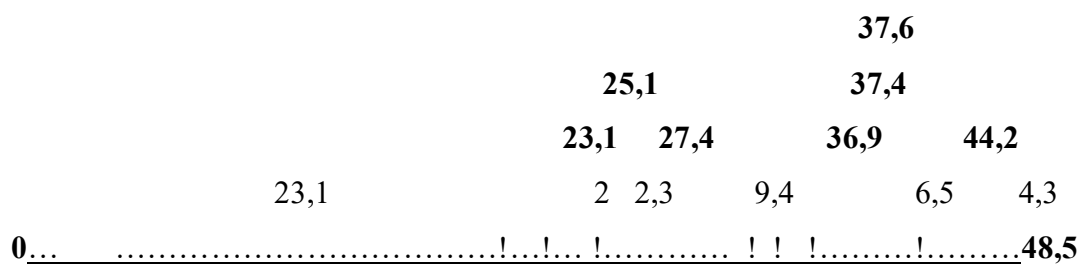
IV. DNA ΑΠΟ ΦΑΓΟ λ

Ο βακτηριοφάγος λ είναι ένας ιός που προσβάλλει το E. Coli και ένας από τους περισσότερο μελετημένους φάγους. Το DNA του έχει μέγεθος 48,502 bp και περιλαμβάνει θέσεις περιορισμού για πολλές ενδονουκλεάσες. Το περιοριστικό ένζυμο HindIII κόβει το λ DNA επτά φορές στις θέσεις που φαίνονται στον Πίνακα 2:

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Πέψη του λ DNA από το HindIII

Θέσεις περιορισμού από το σημείο 0	Μεγέθη κομματιών του DNA μετρώντας από το σημείο 0 ή το τελευταίο κόψιμο
23,130	23,1
25,157	2,0
27,479	2,3
36,895	9,4
37,459	0,564
37,584	0,125
44,141	6,5
48,502 (τέλος, όχι θέση περιορισμού)	4,3

Ένας χάρτης περιορισμού που δείχνει τις θέσεις περιορισμού του HindIII στο λ DNA είναι περίπου έτσι:



Όταν γίνει πέψη του λ DNA με HindIII, η διάταξη των μπαντών στην πηκτική αгарόζης είναι αυτή που φαίνεται στην Εικόνα 4 (αριστερά). Πρόκειται για ένα πολύ συνηθισμένο πρότυπο δείκτη (marker) DNA που συνήθως αγοράζουμε έτοιμο από τις εταιρείες που διαθέτουν περιοριστικά ένζυμα.



ΕΙΚΟΝΑ 4. (αριστερό gel): Πέψη του λ DNA με HindIII. (δεξί gel): Πέψη του λ DNA με HindIII (μπάντες 1 και 4), ένα δεύτερο ένζυμο (μπάντα 3), και διπλή πέψη με τα παραπάνω ένζυμα (μπάντα 2)

Παράδειγμα

Εάν γίνει πέψη του λ DNA με HindIII και ένα ακόμα ένζυμο που κόβει μια φορά στη θέση 33,498 ποια θα είναι η εικόνα του DNA στην πηκτή αγαρόζης;

Κοιτάζοντας τον προηγούμενο χάρτη περιορισμού, διαπιστώνουμε ότι το δεύτερο ένζυμο “κόβει” μεταξύ δυο θέσεων περιορισμού του HindIII, συγκεκριμένα αυτές που δίνουν το κομμάτι 9,4-kb. Το 9,4-kb είναι η δεύτερη μπάντα στην πηκτή που φαίνεται στην εικόνα 4 (αριστερά). Εάν η πέψη γινόταν μόνο με το ένζυμο αυτό, το λ DNA θα κοβόταν σε δύο κομμάτια. Το ένα θα είχε μέγεθος 33,498 ζευγάρια βάσεων και λόγω του μεγάλου μεγέθους του θα φαινόταν κοντά στην αρχή της πηκτής. Το δεύτερο κομμάτι θα είχε μέγεθος $48,502 - 33,498 = 15,004$ ζευγάρια βάσεων και θα παρουσιαζόταν χαμηλότερα από την πρώτη μπάντα του HindIII (το κομμάτι 23,1 bp) αλλά ψηλότερα από το κομμάτι 9,4 kb. Εάν “τρέξουμε” σε gel το λ DNA έπειτα από τη διπλή πέψη θα διαπιστώσουμε ότι οι περισσότερες μπάντες (από την πέψη του HindIII) δεν έχουν επηρεαστεί προφανώς επειδή το δεύτερο ένζυμο δεν “κόβει” μέσα στις περιοχές τους. Η μόνη μπάντα που αλλάζει είναι αυτή των 9,4 kb. Επειδή κόβεται δεν εμφανίζεται στην πηκτή αλλά στη θέση της βλέπουμε δυο καινούργια

κομμάτια. Το πρώτο θα είναι $33,498 - 27,479 = 6,019$ bp ενώ το δεύτερο θα είναι $36,895 - 33,498 = 3,397$ bp. Το υποθετικό αυτό gel φαίνεται στην εικόνα 4 (δεξιά).

V. ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ENZYMΩΝ.

Τα περιοριστικά ένζυμα είναι ακριβώς βιοχημικά αντιδραστήρια και επιπλέον χάνουν γρήγορα την ενεργότητά τους σε θερμοκρασίες υψηλότερες από αυτές που απαιτούνται για τη φύλαξή τους (-20°C). Για κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση που διατίθεται στο εμπόριο έχουν βρεθεί οι βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης όσον αφορά το pH, το ρυθμιστικό διάλυμα και τη θερμοκρασία επώασης της αντίδρασης. Το εύρος της θερμοκρασίας επώασης και το βέλτιστο pH (37°C , 7,5-8) είναι πάνω-κάτω τα ίδια για τις περισσότερες ενδονουκλεάσες, δεν μπορούμε όμως να πούμε το ίδιο και για τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης. Τα πιο συνηθισμένα συστατικά των διαλυμάτων είναι: Tris, NaCl, MgCl_2 και β-μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη. Οι κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης είναι εξαιρετικά σημαντικές για την επίτευξη βέλτιστης ταχύτητας στην αντίδραση. Όμως είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον και το γεγονός ότι η αλλαγή στις συνθήκες αντίδρασης πολλές φορές αλλάζει τις θέσεις περιορισμού κάποιων ενζύμων. Παρόλο που τα περιοριστικά ένζυμα είναι εξαιρετικά ασταθή αντιδραστήρια, μπορεί να αποθηκευτούν για κάποιο χρονικό διάστημα στους -20°C , σε διάλυμα με 50% γλυκερόλη.

- Να φοράτε πάντα γάντια όταν δουλεύετε με ένζυμα.
- Βγάλτε το ένζυμο από τον καταψύκτη μόλις πριν το χρειαστείτε. Όταν είναι εκτός καταψύκτη πρέπει πάντα να βρίσκεται σε πάγο. ΠΟΤΕ μην αφήνετε περιοριστικά ένζυμα (ή ένζυμα γενικά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Λόγω του υψηλού κόστους των ενζύμων, η πέψη με ενδονουκλεάσες γίνεται σε μικροκλίμακα. Ένα τυπικό μίγμα αντίδρασης περιέχει 1 μg DNA και 1 unit ενζύμου στο ανάλογο ρυθμιστικό επώασης. Ως unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που αποικοδομεί 1 μg DNA λ φάγου σε 1 ώρα σε βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH (για το συγκεκριμένο ένζυμο). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι συνήθως μεταξύ 20 και 50 μl . Η επώαση γίνεται συνήθως για 1 ώρα στην κατάλληλη για το ένζυμο θερμοκρασία. Η αντίδραση σταματά είτε με προσθήκη διαλύματος EDTA, το οποίο δεσμεύει τα δισθενή μεταλλικά ιόντα που είναι απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών, είτε με μεταφορά του μίγματος της αντίδρασης στους 65°C οπότε το ένζυμο απενεργοποιείται.

Πείραμα 7^ο : Μελέτη της δράσης συγκεκριμένων περιοριστικών ενζύμων σε λ-DNA

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

A. Πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα

Αποστειρωμένο νερό

λ DNA 0,4 μg/μl

HindIII, 10U/μl

10X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης για το HindIII και το άγνωστο

Άγνωστο περιοριστικό ένζυμο MspI 10U/μl με το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης

Υδατόλουτρα σε θερμοκρασίες 37° C και 65° C

B. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

Συσκευή για οριζόντια ηλεκτροφόρηση

Αγαρόζη για ηλεκτροφόρηση (electrophoresis grade)

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TE

Βρωμιούχο αιθίδιο, 10 mg/ml

Δείκτης (marker) λ DNA/ HindIII 0,4 μg/μl

5X ρυθμιστικό για την προετοιμασία των δειγμάτων (gel loading buffer), 30% γλυκερόλη, 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης σε ρυθμιστικό 5X TE

10X ρυθμιστικό TE (0,1 M Tris, 0.01 M EDTA, pH 8,0)

Πηγή UV για την παρατήρηση των δειγμάτων μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα

- Κάθε ομάδα πρέπει να διαθέτει ένα δοχείο με πάγο. Τα δείγματά σας πρέπει ΠΑΝΤΑ να βρίσκονται σε πάγο εκτός από το χρονικό διάστημα που πρέπει να επωαστούν σε καθορισμένη θερμοκρασία.

- Θα σας δοθούν έτοιμα σε σωληνάκια erppendorf τα παρακάτω αντιδραστήρια:

* Ρυθμιστικά διαλύματα αντίδρασης για τα δυο περιοριστικά ένζυμα

* λDNA

* λDNA/HindIII marker

τα οποία επίσης πρέπει να βρίσκονται πάντα σε πάγο.

- Ετοιμάστε τρία σωληνάκια erpendorf για τις τρεις αντιδράσεις που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Προσθέστε όλα τα αντιδραστήρια εκτός από τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και MysI.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	1	2	3
10X ρυθμιστικό	3 μl	3μl	3μl
απιονισμένο νερό	21 μl	21μl	19μl
λDNA (0,4 μg/μl)	4 μl	4μl	4μl
HindIII	2 μl	-	2μl
Mys	-	2μl	2μl

- Φυγοκεντρίστε τα σωληνάκια για μερικά δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, απευθυνθείτε στον επιβλέποντα της άσκησης για την προσθήκη των περιοριστικών ενζύμων. Ανακατέψτε και φυγοκεντρίστε ξανά.

- Επώαστε τα σωληνάκια στους 37° C για 60 λεπτά.

- Όταν ολοκληρωθεί η επώαση προσθέστε σε κάθε σωληνάκι από 6 μl διάλυμα προετοιμασίας των δειγμάτων (gel loading buffer). **Στο στάδιο αυτό, ετοιμάστε ένα επιπλέον erpendorf με 2,5μl λDNA/HindIII marker, 27,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE και 6μl gel loading buffer.**

- Τοποθετήστε τα τέσσερα σωληνάκια στο υδατόλουτρο των 65° C για 10 λεπτά, φυγοκεντρίστε τα για μερικά δευτερόλεπτα και στη συνέχεια τοποθετήστε τα στο παγόλουτρο μέχρι να τα φορτώσετε στην πηκτική.

B. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

Πολλές εταιρείες κατασκευάζουν συσκευές για οριζόντια ηλεκτροφόρηση. Οδηγίες για τον χειρισμό των συγκεκριμένων συσκευών θα σας δοθούν από τον επιβλέποντα της άσκησης.

<p>ΠΡΟΣΟΧΗ!: Μην αγγίζετε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης ή τα καλώδια κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Εφαρμόζεται υψηλή τάση που μπορεί να σας προκαλέσει θανατηφόρο ηλεκτροσόκ.</p>

Από την παραπάνω περιγραφή της δράσης του βρωμιούχου αιθιδίου θα διαπιστώσατε ότι είναι ισχυρό μεταλλαξιογόνο. Είναι **ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ** να φοράτε εργαστηριακή ποδιά, γυαλιά ασφαλείας και γάντια όταν δουλεύετε με διαλύματα ή πηκτές που περιέχουν βρωμιούχο αιθίδιο. Για τους ίδιους λόγους τα απόβλητα φυλάσσονται σε ειδικά δοχεία που θα σας υποδείξουν στο εργαστήριο.

Αποφύγετε την παρατεταμένη έκθεση στη λάμπα UV. Ποτέ μην κοιτάτε απευθείας την πηγή αν δεν φοράτε γυαλιά ασφαλείας και μην εκθέτετε τα χέρια ή το πρόσωπό σας ακάλυπτα (η ακτινοβολία είναι πολύ ισχυρότερη σε σχέση μ' αυτή που εφαρμόζετε στους θαλάμους μαυρίσματος!).

- Παρασκευάστε 1% διάλυμα αγαρόζης σε 1X TE διάλυμα. Ο όγκος του διαλύματος εξαρτάται από τις διαστάσεις της πηκτής που έχετε στη συγκεκριμένη συσκευή. Ακολουθήστε τις οδηγίες που θα σας δοθούν στο εργαστήριο.
- Βράστε το διάλυμα ή τοποθετήστε το στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
- Μόλις το διάλυμα κρυώσει και η θερμοκρασία του φτάσει γύρω στους 50° C προσθέστε τόση ποσότητα από το διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου ώστε να έχετε τελική συγκέντρωση 5 μg/ml.
- Αναδεύστε ελαφρά και ρίξτε το διάλυμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προσεκτικά ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες. Η πηκτή πρέπει να έχει πάχος περίπου 2-4 mm. Τοποθετήστε αμέσως τα ειδικά κτενάκια για να σχηματιστούν οι θέσεις που θα τοποθετήσετε τα δείγματά σας.
- Ο πολυμερισμός της πηκτής ολοκληρώνετε σε 40 λεπτά περίπου. Αν θέλετε, σκεπάστε τη συσκευή με μεμβράνη για να περιορίσετε την εξάτμιση κατά τη διάρκεια της πήξης (αυτό όμως θα καθυστερήσει σημαντικά τον πολυμερισμό). Μόλις το gel πήξει, αφαιρέστε προσεκτικά τα κτενάκια.
- Τοποθετήστε την πηκτή στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθέστε TE διάλυμα ηλεκτροφόρησης (+ 5μl/ml βρωμιούχο αιθίδιο) τόσο ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια της.
- Τοποθετήστε τα δείγματά σας στα πηγαδάκια, συνδέστε το τροφοδοτικό και ρυθμίστε την τάση στα 120V ή σύμφωνα με τις οδηγίες που θα σας δοθούν.

- Μόλις η χρωστική φτάσει στο κάτω άκρο της πηκτής, **σβήστε το τροφοδοτικό.**
- Τοποθετήστε την πηκτή σε ένα καθαρό πλαστικό δοχείο και παρατηρείστε την σε λάμπα UV. Οι μπάντες του DNA θα έχουν έντονο κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα.
- Φτιάξτε ένα σχεδιάγραμμα του gel στο οποίο θα φαίνεται με όσο το δυνατό μεγαλύτερη ακρίβεια η θέση κάθε μπάντας

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

J. N. Anderson, **A Laboratory Course in Molecular Biology**, Modern Biology, 1996.

F. Ausubel, R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith, and K. Struhl, **Short Protocols in Molecular Biology**, Wiley, 1992.

P. Berg and M. Singer, **Dealing with genes: The Language of Heredity**, University Science Books, 1992.

W. Bodmer and R. McKie, **The Book of Man: the Human Genome Project and the Quest to discover our Genetic Heritage**, Simon and Schuster, 1995.

R. F. Boyer, **Modern Experimental Biochemistry**, Addison-Wesley, 1993.

M. Campbell, **Biochemistry**, Saunders College Publishing, 1998.

R. L. Dwyer and G. F. Lata, **Experimental Biochemistry**, Oxford University Press, 1989.

W. A. Haseltine, (1997), **Sci. Am.** **276**(3), Discovering Genes for New Medicines.

A.L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox, **Principles of Biochemistry**, Worth, 1993.

E. Pennisi, (1996), **Science**, 273, Chemical Shackles for Genes?

L. Roberts, (1990), **Science**, 249, New Scissors for Cutting Chromosomes.

J. F. Robyt and B. J. White, **Biochemical Techniques**, Brooks Cole, 1990.

L. Stryer, **Biochemistry**, 3rd ed., Freeman, 1998.