

## **Πείραμα 6<sup>ο</sup> : Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από βακτήρια-Στοιχεία θεωρίας**

### I. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ DNA

Το DNA σε όλες τις μορφές ζωής είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από νουκλεοτίδια που έχουν τέσσερις βάσεις: αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, και κυτοσίνη. Τα νουκλεοτίδια είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με 3'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Η ποσοτική αναλογία των βάσεων όπως και η ακολουθία τους διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Το DNA αποτελείται από δύο συμπληρωματικές αλυσίδες οι οποίες συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, σχηματίζοντας μια διπλή έλικα.

Αν και το DNA έχει απομονωθεί από το 1869, η συμμετοχή του στην μεταφορά γενετικών πληροφοριών ανακαλύφθηκε το 1940. Μια αποφασιστική ανακάλυψη στην έρευνα του DNA ήταν η τρισδιάστατη δομή του από τους Watson και Crick το 1953. Η διπλή έλικα που προτάθηκε από τους Watson και Crick έχει βρεθεί ότι είναι η κύρια δομική μορφή του DNA. Άλλες ανακαλύψεις που βοήθησαν στην κατανόηση του ρόλου του DNA, ήταν μέθοδοι ανάλυσης της ακολουθίας των βάσεων του, έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης, διάσπασή του από ειδικές νουκλεάσες και η μέθοδος ανασυνδυασμένου DNA. Το DNA σε προκαρυωτικά κύτταρα είναι ένα κυκλικό μόριο που αποτελείται από διπλή έλικα και έχει μοριακό βάρος τουλάχιστον  $2 \times 10^9$  Da. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν περισσότερα του ενός χρωμοσώματα και πολύ μεγαλύτερο DNA.

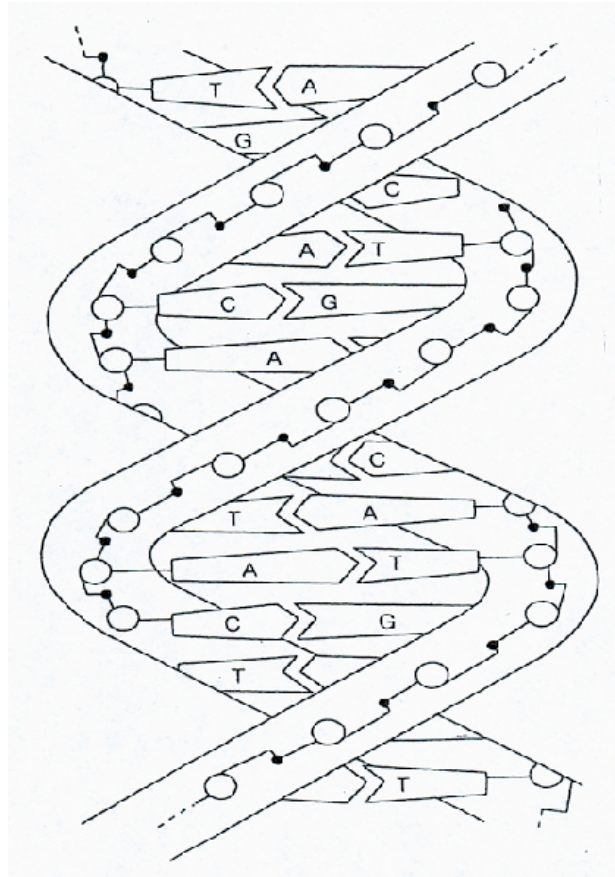
### II. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Το πείραμα αυτό αποτελεί μια εισαγωγή στα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου του DNA και τις δυνάμεις που καθορίζουν τις συμπληρωματικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο αλυσίδων του.

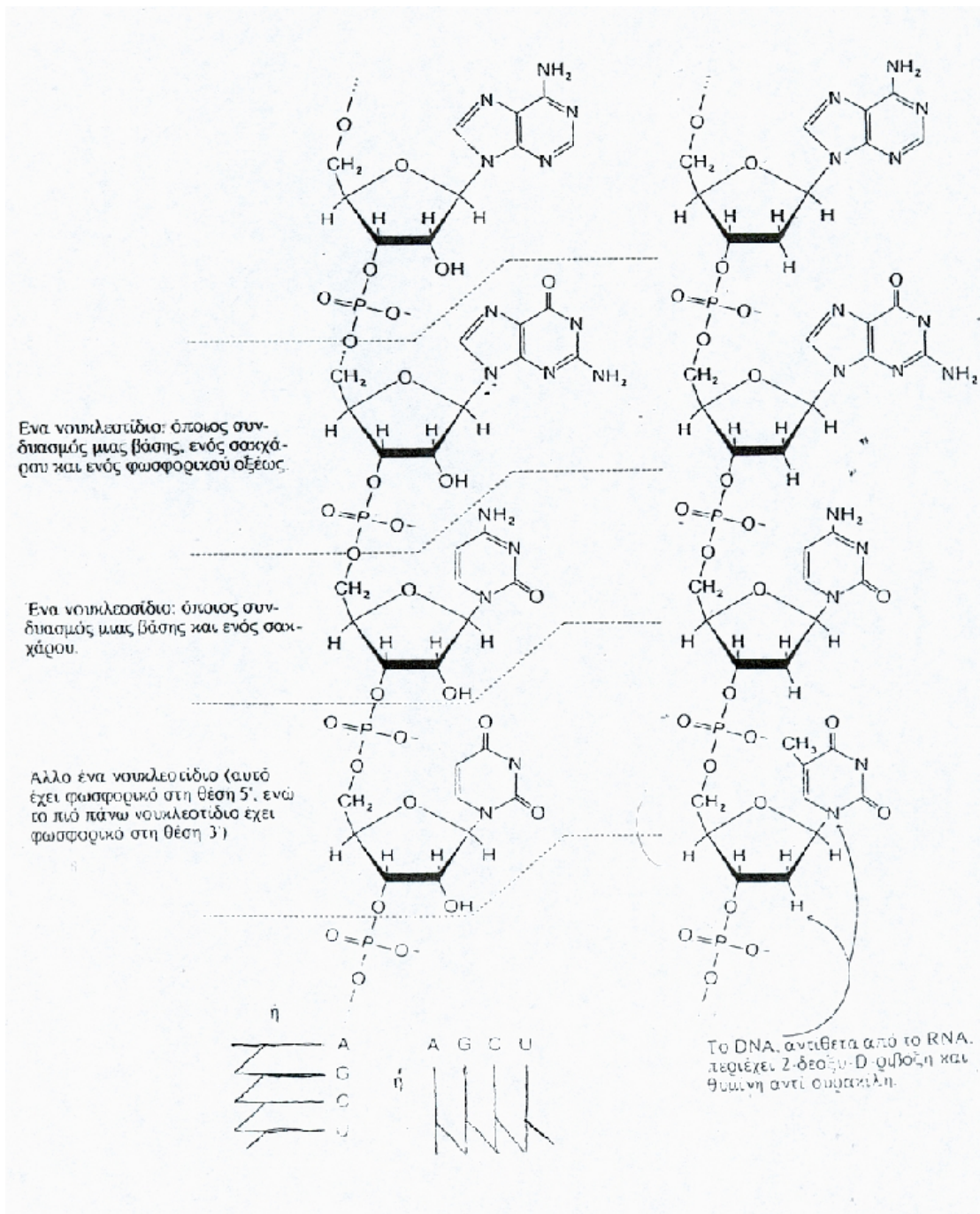
Λόγω του ότι το χρωμοσωμικό DNA έχει μεγάλο μέγεθος και είναι αρκετά εύθραυστο, η απομόνωση του είναι πολύ δύσκολη σε ανέπαφη και μη κατεστραμμένη μορφή. Αν και υπάρχουν πολλές μεθοδολογίες για την απομόνωση του DNA σε ενεργή μορφή, καμία δεν μπορεί να εγγυηθεί ότι το DNA θα παραμείνει ακέραιο. Το απομονωμένο DNA πρέπει να είναι σταθερό, να έχει υψηλό μοριακό βάρος και να είναι σχετικά καθαρό από προσμίξεις RNA και πρωτεϊνών. Η μέθοδος του ακόλουθου πειράματος παρέχει τη δυνατότητα απομόνωσης του DNA από μικροοργανισμούς σε

μα σταθερή, βιολογικά ενεργή μορφή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αρκετούς οργανισμούς.

Η ανάπτυξη μιας μεθόδου απομόνωσης του DNA απαιτεί γνώσεις της χημικής συμπεριφοράς του όπως και των κυτταρικών συνθηκών. Στις εικόνες 1 και 2 φαίνονται αρκετοί από τους χημικούς δεσμούς στο μόριο του DNA, που είναι επιρρεπείς σε 'σπάσιμο' κατά τη διαδικασία εκχύλισης του μορίου.



**ΕΙΚΟΝΑ 1.** Η διπλή έλικα του DNA



**ΕΙΚΟΝΑ 2.** Πρωτοταγείς δομές των RNA και DNA

### III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA

#### 1. pH

- (α) Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων είναι σταθεροί σε pH 4-10.
- (β) Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί του DNA είναι σταθεροί σε pH 3-12.
- (γ) Ο *N*-γλυκοζιτικός δεσμός των πουρινών (αδενίνη και γουανίνη) υδρολύεται σε pH χαμηλότερο από 3.

#### 2. Θερμοκρασία

- (α) Τα περισσότερα DNA αποδιατάσσονται (δημιουργία μονόκλωνων αλυσίδων) σε θερμοκρασίες μεταξύ 80-90°C.
- (β) Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί του DNA και οι *N*-γλυκοζιτικοί δεσμοί είναι σταθεροί σε θερμοκρασίες πάνω από τους 100 °C.

#### 3. Ιοντική ισχύς

- (α) Το DNA είναι πιο διαλυτό και σταθερό σε διαλύματα αλάτων. Συγκεντρώσεις άλατος χαμηλότερες των 100mM εξασθενούν τους δεσμούς υδρογόνου των συμπληρωματικών αλυσίδων.

#### Συνθήκες του κυττάρου

- (α) Για να εξαχθεί το DNA από το κύτταρο, το τοίχωμα του κυττάρου πρέπει να διασπαστεί. Η ευκολία με την οποία διασπάται το κυτταρικό τοίχωμα διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Σε μερικές περιπτώσεις η χρήση υπερήχων είναι απαραίτητη ενώ σε άλλες μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ενζυματική υδρόλυση.
- (β) Η παρουσία ενζύμων που βρίσκονται στο κύτταρο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του DNA, αλλά η αποικοδόμηση προέρχεται κυρίως από τις δεοξυριβονουκλεάσες, οι οποίες διασπούν τον φωσφοδιεστερικό δεσμό.
- (γ) Το φυσικό DNA βρίσκεται στα ευκαριωτικά κύτταρα με τη μορφή συμπλόκων DNA-πρωτεϊνών (ιστόνες). Οι πρωτεΐνες πρέπει να απομακρυνθούν κατά την απομόνωση του DNA.

### Μηχανική καταστροφή του DNA

- (α) Κατά την απομόνωση του DNA δεν είναι πάντοτε δυνατόν να εφαρμοστούν ήπιες διαδικασίες. Άλεσμα, κούνημα, ανάδευση μπορούν να προκαλέσουν κόψιμο του DNA. Η διαδικασία αυτή συνήθως δεν αλλάζει τη δευτεροταγή δομή του DNA, αλλά μειώνει το μήκος του.

### IV. ΓΕΝΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

Βήμα 1<sup>ο</sup>: Σπάσιμο της κυτταρικής μεμβράνης και εισαγωγή του DNA σε ένα μέσο στο οποίο είναι σταθερό, διαλυτό και προστατεύεται από την αποικοδόμηση.

Η διάσπαση του βακτηριακού τοιχώματος στο πείραμα αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση ενός ενζύμου, της λυσοζύμης. Η λυσοζύμη καταλύει την υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών του κυτταρικού τοιχώματος με αποτέλεσμα το σπάσιμο της κυτταρικής μεμβράνης και την απελευθέρωση του DNA και των άλλων κυτταρικών παραγόντων. Το μέσο για τη διάλυση του DNA είναι ένα αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει EDTA. Επειδή το DNA είναι ιονικό, είναι πιο σταθερό και διαλυτό σε διαλύματα αλάτων παρά σε απεσταγμένο νερό. Το EDTA αναστέλλει διάφορες δεοξυριβονουκλεάσες οι οποίες χρειάζονται  $Mg^{2+}$  και  $Mn^{2+}$ . Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και κιτρικό, αλλά δεν είναι αποτελεσματικό αντιδραστήριο για τη δέσμευση ιόντων  $Mn^{2+}$ . Το ήπιο αλκαλικό pH (8,0) δρα ως μειωτής των ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ του DNA και των βασικών ιστονών όπως και των πολυκατιοντικών αμινών (σπερμίνη, σπερμιδίνη). Το σχετικά υψηλό pH τείνει να μειώσει την ενεργότητα των νουκλεασών και να αποδιατάξει άλλες πρωτεΐνες.

Βήμα 2<sup>ο</sup>: Απομάκρυνση των πρωτεϊνών που είναι προσδεμένες στο DNA.

Τα απορρυπαντικά χρησιμοποιούνται στο στάδιο αυτό για να διαλυτοποιήσουν την εσωτερική μεμβράνη του κυττάρου και για τη διάσπαση των ιοντικών δυνάμεων μεταξύ των θετικά φορτισμένων πρωτεϊνών και του αρνητικά φορτισμένου σκελετού του DNA.

Το SDS, ένα ανιοντικό απορρυπαντικό, προσδένεται στις πρωτεΐνες και τους δίνει έναν ανιοντικό χαρακτήρα. Επίσης το SDS λειτουργεί ως αποδιατακτικό για τις δεοξυριβονουκλεάσες και άλλες πρωτεΐνες. Το αλκαλικό pH μειώνει τον βασικό χαρακτήρα των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την πιο εύκολη απομάκρυνση τους από το DNA. Η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με υψηλές

συγκεντρώσεις άλατος που μειώνουν τις ιοντικές αλληλεπιδράσεις του DNA με τις πρωτεΐνες.

### Βήμα 3<sup>ο</sup>: Διαχωρισμός του DNA από άλλες κυτταρικές ουσίες.

Πριν κατακρημνισθεί το DNA ως ίζημα, πρέπει να έχουν απομακρυνθεί όλες οι πρωτεΐνες από το διάλυμα. Αυτό επιτυγχάνεται με κατεργασία του δείγματος με διάλυμα χλωροφορμίου/ισοάμυλο αλκοόλης και στη συνέχεια με φυγοκέντρηση. Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης τρεις στοιβάδες είναι ορατές. Η υδατική (επάνω), η οργανική (κάτω) και η ενδιάμεση που αποτελείται από τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες. Το χλωροφόρμιο επιφέρει αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ η ισοάμυλο αλκοόλη μειώνει την δημιουργία αφρών στο διάλυμα και σταθεροποιεί την ενδιάμεση φάση μεταξύ της υδατικής και της οργανικής όπου συγκεντρώνονται οι πρωτεΐνες. Η επάνω υδατική φάση η οποία περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα απομονώνεται και το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη αιθανόλης. Λόγω της ιοντικής φύσης, το DNA γίνεται αδιάλυτο εάν το υδατικό μέσο γίνει λιγότερο πολικό με την προσθήκη οργανικού διαλύτη. Το DNA σχηματίζει ένα ινώδες ίζημα που μπορεί να συλλεχθεί περιτυλίγοντάς το σε μια γυάλινη ράβδο. Το ίζημα εκτός από DNA περιέχει και RNA και πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες μπορούν να απομακρυνθούν με επαναδιάλυση του DNA σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα και επανάληψη της διαδικασίας με το χλωροφόρμιο και την ισοάμυλο αλκοόλη, μέχρι που στην ενδιάμεση φάση δεν θα υπάρχουν αποδιαταγμένες πρωτεΐνες.

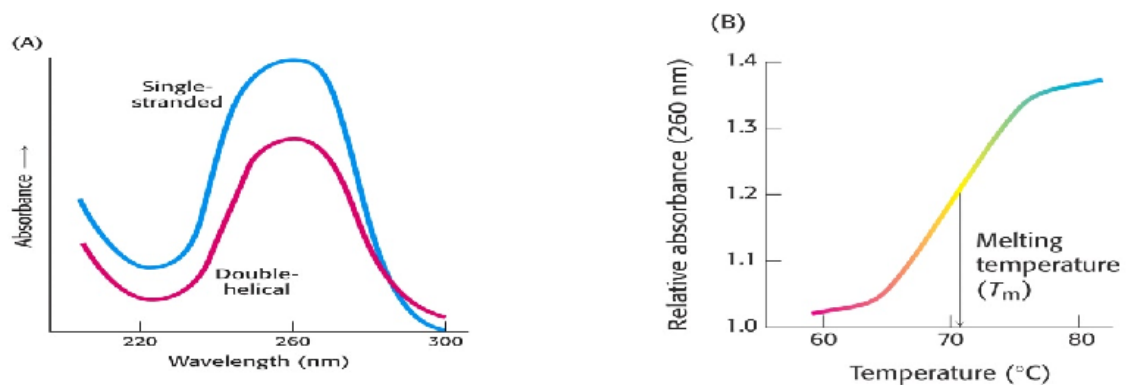
Παρόλο που το RNA δεν κατακρημνίζεται όπως το DNA, αποτελεί μια πρόσμιξη. Αυτό αποικοδομείται με την επίδραση ριβονουκλεάσης μετά το πρώτο ή το δεύτερο βήμα απομάκρυνσης των πρωτεϊνών. Εναλλακτικά το DNA μπορεί να κατακρημνισθεί με ισοπροπανόλη ενώ το RNA παραμένει στο διάλυμα. Η αφαίρεση του RNA μερικές φορές κάνει δυνατή την αποδιάταξη περισσότερων πρωτεϊνών όταν χρησιμοποιείται το χλωροφόρμιο και η ισοάμυλο αλκοόλη. Όταν το DNA πρέπει να είναι πολύ καθαρό τα βήματα της απομάκρυνσης των πρωτεϊνών και του χλωροφορμίου/ισοάμυλοαλκοόλης πρέπει να επαναληφθούν πολλές φορές. Έχει βρεθεί ότι πάνω από 50% του κυτταρικού DNA μπορεί να απομονωθεί με αυτήν την μεθοδολογία με μέση απόδοση 1-2 mg DNA ανά γραμμάριο κυττάρου. Το μοριακό βάρος του DNA είναι της τάξης των  $10 \times 10^6$  Da.

## V. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA-ΥΠΕΡΧΡΩΜΙΚΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ

### Γενικά για το υπερχρωμικό φαινόμενο

Το DNA λόγω των αρωματικών βάσεων, αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη και θυμίνη απορροφά στο υπεριώδες. Αυτό παρέχει την δυνατότητα σε κάποιον να ελέγχει την δομή του DNA, διότι δομικές αλλαγές, όπως το ξεδίπλωμα της διπλής έλικας επηρεάζουν την απορρόφηση. Επίσης η ίδια μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της καθαρότητας του DNA. Το μέγιστο απορρόφησης παρατηρείται στα 260nm. Οι πρωτεΐνες, ο μεγαλύτερος παράγοντας μόλυνσης του DNA, απορροφούν στα 280nm. Η σχέση της απορρόφησης στα  $A_{260}/A_{280}$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί η καθαρότητα του DNA. Τιμές κοντά στο 1.9 είναι χαρακτηριστικές για καθαρό DNA. Όσο μειώνεται η τιμή αυτή τόσο περισσότερη πρωτεΐνη υπάρχει με το DNA.

Εάν το DNA έχει επεξεργασθεί με αποδιατακτικά αντιδραστήρια (υψηλή θερμοκρασία, βασικό περιβάλλον, οργανικοί διαλύτες) η απορρόφηση του αλλάζει (Εικόνα 3). Θέρμανση από τους 25 έως τους 80 °C έχει μικρή επίδραση στην απορρόφηση. Με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται μια απότομη αύξηση στην απορρόφηση. Η αύξηση είναι της τάξης του 40% και παρατηρείται σε μια πολύ μικρή περιοχή της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο μέσο από κάθε αύξηση της απορρόφησης,  $T_m$ , ονομάζεται θερμοκρασία τήξης του DNA. Κάθε είδος DNA έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό του.



**ΕΙΚΟΝΑ 3.** Καμπύλη θερμικής αποδιάταξης του DNA

Η αιτία της αύξησης της απορρόφησης (υπερχρωμικό φαινόμενο), οφείλεται στην δημιουργία μονόκλωνων αλυσίδων DNA όταν η διπλή έλικα έχει ξεδιπλωθεί. Το DNA υπάρχει σαν μια διπλή έλικα που συγκρατείται με δεσμούς υδρογόνου. Υδρόφοβες και π-π αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων ενισχύουν τη διπλή έλικα. Ουσίες που καταστρέφουν αυτές τις δυνάμεις επιφέρουν ξεδίπλωμα του DNA. Σε μία τυχαία δομή κουλούρας οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων έχουν μειωθεί στο ελάχιστο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του συντονισμού των αρωματικών δακτυλίων με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης.

Έχουν βρεθεί αρκετά αντιδραστήρια που αποδιατάσσουν το DNA. Αν και η θερμοκρασία είναι ο παράγοντας που έχει ερευνηθεί περισσότερο, υπάρχουν και αρκετές χημικές ενώσεις, όπως οργανικοί διαλύτες, ουρία, άλατα, αλκάλια που είναι γνωστό ότι μπορούν να μετατρέψουν το DNA σε μια τυχαία δομή κουλούρας. Συμπληρωματικά, η δράση δεοξυριβονουκλεασών (ενζύμων που υδρολύουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς) μπορεί να παρακολουθηθεί μετρώντας την αλλαγή της απορρόφησης στα 260nm.

#### Υπολογισμός της αναλογίας των βάσεων

Η σταθερότητα της διπλής έλικας εξαρτάται από την αναλογία των βάσεων που αποτελούν το DNA. Υψηλό ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης (GC) έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη σταθερότητα της διπλής έλικας και υψηλότερη θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) (γιατί σχηματίζονται τρεις δεσμοί υδρογόνου μεταξύ τους, σε αντίθεση το ζευγάρι AT που έχει μόνο δύο δεσμούς υδρογόνου). Η παρακάτω εξίσωση συνδυάζει τη θερμοκρασία τήξης με το ποσοστό GC του DNA:

$$\%GC = 2,44 (T_m - 69,3)$$

Η εξίσωση αυτή ισχύει για ποσοστά GC 30-70%.

#### Καθαρότητα του DNA

Όσο πιο καθαρό είναι το DNA τόσο πιο μεγάλη είναι η αύξηση της υπερχρωμικότητας. Πολύ καθαρό DNA παρουσιάζει μια αύξηση στην απορρόφηση κατά 40% όταν υποστεί θερμική αποδιάταξη. Τιμές μικρότερες από αυτή δείχνουν ότι το DNA δεν είναι καθαρό. Αυτό μπορεί να σημαίνει επίσης ότι το DNA έχει ήδη υποστεί μερική αποδιάταξη ή ότι περιέχει ουσίες οι οποίες απορροφούν στο



υπεριώδες. Επίσης το σχήμα της καμπύλης της θερμικής αποδιάταξης είναι μια ένδειξη για την καθαρότητα του DNA. Σε μη καθαρό ή αποδιαταγμένο DNA το υπερχρωμικό φαινόμενο εμφανίζεται για ένα πλατύ εύρος θερμοκρασίας.

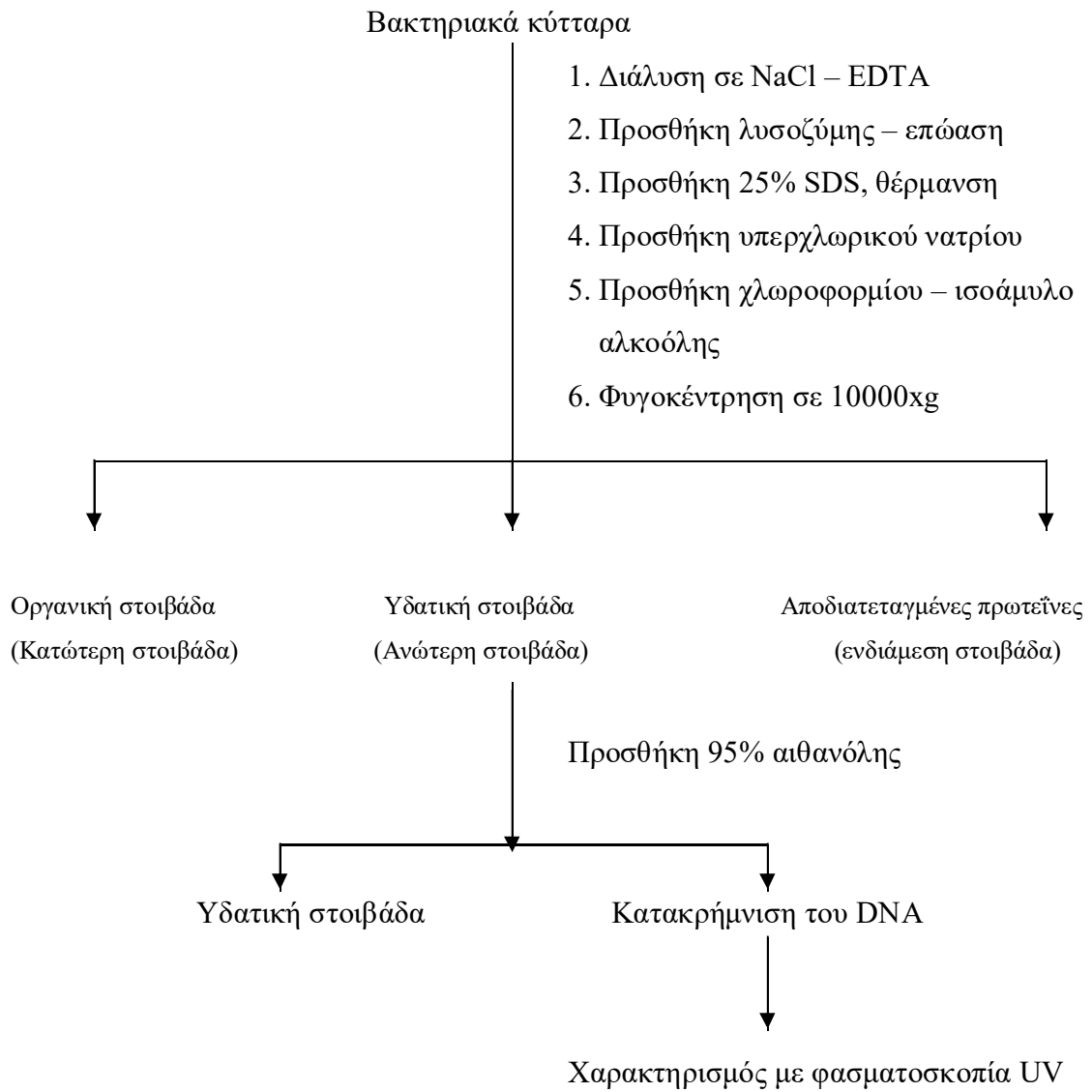
## **Πείραμα 6<sup>ο</sup> : Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από βακτήρια**

Στο πείραμα αυτό θα μελετηθεί η διαδικασία απομόνωσης του DNA, η οποία μπορεί να εφαρμοσθεί στους περισσότερους μικροοργανισμούς. Ένα σχηματικό διάγραμμα της διαδικασίας απομόνωσης παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.

Με τη διαδικασία αυτή, το DNA συνήθως απομονώνεται σε καλές αποδόσεις (περίπου 50%). Μετά την απομόνωση θα ακολουθήσει μελέτη με φασματοσκοπία υπεριώδους (υπολογισμός του λόγου  $A_{260}/A_{280}$  και της % αύξησης της  $A_{260}$  λόγω υπερχρωμικού φαινομένου) για να υπολογίσουμε την καθαρότητα του DNA.

### ***ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ***

- Βακτηριακά κύτταρα ~3gr
- Αλατούχο EDTA, 0,15 M NaCl που περιέχει 0,1 M EDTA, pH = 8,0
- SDS 25% σε νερό
- Διάλυμα λυσοζύμης 10mg/ml σε νερό
- Υπερχλωρικό νάτριο 5M
- Χλωροφόρμιο-ισοαμυλοαλκοόλη 24:1
- 95% αιθανόλη
- Αλατούχο - κιτρικό, 0,15 M NaCl που περιέχει 0,015 M κιτρικό, pH = 7,0
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis
- Κυψελίδες χαλαζία
- Φυγόκεντρος
- Μαγνητικός αναδευτήρας και υδατόλουτρο



**ΕΙΚΟΝΑ 4:** Σχηματικό διάγραμμα απομόνωσης DNA

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

### **A. Απομόνωση του DNA**

- Σε μια κωνική φιάλη (100ml ή μεγαλύτερη) τοποθετούνται 3gr κύτταρα και 25ml αλατούχο διάλυμα EDTA.
- Προστίθεται 1ml από το διάλυμα λυσοζύμης και το διάλυμα αφήνεται στους 37 °C για 30-45 λεπτά.
- Για την ολική διάσπαση του κυττάρου προστίθενται 2ml SDS και το διάλυμα τοποθετείται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60 °C. Για την αποφυγή δημιουργίας αφρών πραγματοποιείται ήπια ανάδευση. Το διάλυμα γίνεται παχύρευστο και θολό γεγονός που οφείλεται στην έξοδο των νουκλεϊκών οξέων από το κύτταρο.
- Μετά την περίοδο θέρμανσης το διάλυμα αφήνεται να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.
- Προστίθενται 9ml από το διάλυμα υπερχλωρικού νατρίου το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στο διάλυμα στο 1M.
- Στη συνέχεια αναδεύεται ήπια και προστίθεται διάλυμα χλωροφορμίου/ισοαμυλοαλκοόλης (24:1), ίσου όγκου με τον όγκο του διαλύματος.
- Το διάλυμα ανακινείται σε κωνική φιάλη 250ml για 20-30 λεπτά και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 10000g. Τρεις φάσεις εμφανίζονται: κάτω η οργανική, στη μέση οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες και επάνω η υδατική.
- Η υδατική φάση, μεταφέρεται προσεκτικά σε ένα ποτήρι ζέσεως (250ml).
- Το DNA κατακρημνίζεται με την προσεκτική προσθήκη δύο όγκων 95% παγωμένης αιθανόλης αφήνοντας την να κυλά από τα τοιχώματα στο διάλυμα με μία πιπέτα. Οι δύο φάσεις ανακατεύονται με κυκλικές κινήσεις της γυάλινης ράβδου και το ινώδες DNA περιτυλίγεται σε αυτήν.
- Το περιτυλιγμένο DNA πιέζεται στα τοιχώματα για την απομάκρυνση του διαλύτη. Σε περίπτωση που δεν είναι ορατές ίνες DNA, το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 2000-3000 στροφές/λεπτό. Εάν είναι απαραίτητο στο απομονωμένο DNA μπορεί να ξαναγίνει όλη η διαδικασία.
- Το απομονωμένο DNA διαλύεται σε 5-10 ml αλατούχο διάλυμα κιτρικού.
- Επειδή το DNA είναι δυσδιάλυτο το διάλυμα συνήθως ομογενοποιείται.

### ***B. Έλεγχος καθαρότητας του DNA-Υπολογισμός $A_{260}:A_{280}$***

- Ένα μέρος από το παραπάνω διάλυμα μεταφέρεται σε μια κυψελίδα χαλαζία και μετριέται η απορρόφηση στα 260nm χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό ως αναφορά. Εάν η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη του 1 πραγματοποιείται αραιώση έτσι ώστε η απορρόφηση να είναι μεταξύ 0,5 και 1.
- Μετριέται και σημειώνεται η απορρόφηση του ίδιου διαλύματος στα 280nm.

### ***Γ. Αποδιάταξη και UV απορρόφηση του DNA-Υπερχρωμικό φαινόμενο***

- Παρασκευάζονται **3-4 ml** διαλύματος DNA σε αλατούχο ρυθμιστικό κιτρικού με συγκέντρωση 20μg/ml. Για το σκοπό αυτό μετριέται η απορρόφηση του διαλύματος στα 260nm και πρέπει να είναι περίπου 0,4 (θα χρειαστεί να κάνετε τις κατάλληλες αραιώσεις). Σημειώστε με ακρίβεια την τιμή της απορρόφησης (control) γιατί πρέπει να τη συγκρίνετε με την τιμή που θα μετρήσετε στη συνέχεια.
- Μεταφέρονται 3ml από το διάλυμα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα και τοποθετείται πώμα επάνω σε κάθε σωλήνα (parafilm και αλουμινόχαρτο από πάνω).
- Τοποθετήστε το δοκιμαστικό σωλήνα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 90 °C για 15 λεπτά.
- Μετά την επώαση, μετρήστε AMΕΣΑ την  $A_{260}$  στο διάλυμα του σωλήνα.
- Συγκρίνετε τις απορροφήσεις και δικαιολογήστε τα αποτελέσματά σας.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

G. Blackburn and M. Gait, **Nucleic Acids in Chemistry and Biology** (1991), Oxford University Press (New York). An excellent book on general aspects of nucleic acids.

R. Boyer, **Concepts in Biochemistry** (1999), Brooks/Cole (Pacific Grove, CA), pp.30-44: 280-310. Structure and function of DNA.

J. Day, **Biochem. Educ.** **25**, 41-43 (1997). Isolation of Nuclear, Chloroplast, and Mitochondrial DNA from Plants.

R. Garrett and C. Grisham, **Biochemistry**, 2<sup>nd</sup> ed (1999) W. B. Saunders (Orlando, FL), pp. 327-394. Structure and function of DNA.

A. Lehninger, D. Nelson, and M. Cox, **Principles of Biochemistry**, 3<sup>rd</sup> ed. (1999), Worth Publishers (New YORK), pp. 907-930. DNA structure and function.

J. Le Pecq and C. Paoletti, **J. Mol. Biol.** **27**,87 (1967). A Fluorescent Complex Between Ethidium Bromide and Nucleic Acids.

J. Marmur, in **Methods in Enzymology**, Vol. VI, S. Colowick and N. Kaplan, Editors (1963), Academic Press (New York), pp. 726-738. A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms.

C. Mathews, K. van Holde, and K. Ahern, **Biochemistry**, 3<sup>rd</sup> ed. (2000), Benjamin/Cummings (San Francisco), pp. 84-125. DNA structure and function.

L. Stryer, **Biochemistry**, 4<sup>th</sup> ed. (1995), W. H. Freeman (New York), pp. 75-144: 758-818. DNA structure and function.

D. Voet and J. Voet, **Biochemistry**, 2<sup>nd</sup> ed. (1995) John Wiley & Sons (New York), pp. 830-914. DNA structure and function.