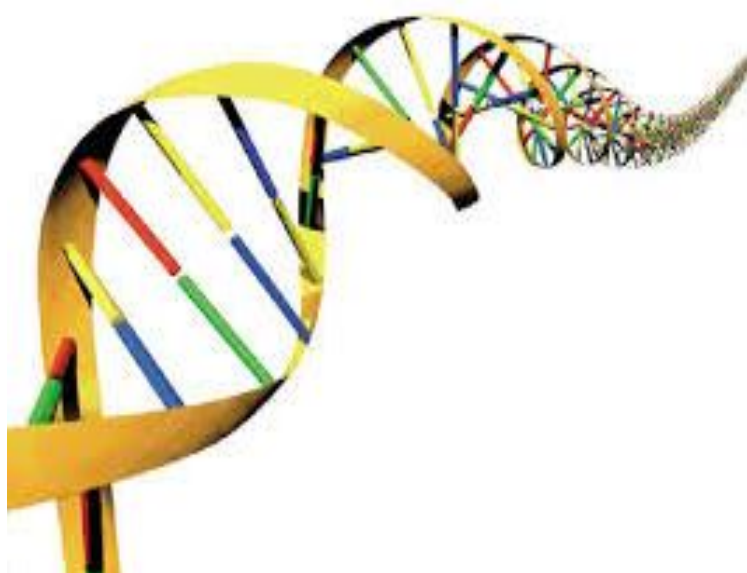


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΓΙΩΡΓΟΣ ΤΣΙΑΜΗΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

2020

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ε.ΔΙ.Π. ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ : Εύα Διονυσοπούλου

Εργαστηριακοί Συνεργάτες: Ηλίας Ασημάκης

Μαρία Λανάρα

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ :

Α.Μ. :

ΟΜΑΔΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ :

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Άσκηση 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Άσκηση 2 : ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Άσκηση 3 : ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Άσκηση 4 : ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Άσκηση 5 : ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Άσκηση 6 : ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Άσκηση 7: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

ΦΟΡΜΑ ΣΥΓΓΡΑΦΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ		
1. Εξώφυλλο	Τίτλος άσκησης – Στοιχεία φοιτητή – Αριθμός ομάδας	
2. Εισαγωγή	Θεωρία πάνω στην οποία στηρίζεται η εργαστηριακή άσκηση – Στόχοι εργαστηριακής άσκησης	(2/10)
3. Πειράματα	Αναλυτική περιγραφή των πραγματοποιηθέντων πειραμάτων	(2/10)
4. Αποτελέσματα – Συζήτηση	Αποτελέσματα των μετρήσεων (τιμές, διαγράμματα κτλ.) – Επεξήγηση τυχόν αποκλίσεων του αναμενόμενου – Συμπεράσματα που εξάγονται από την συγκεκριμένη άσκηση – Απαντήσεις σε ερωτήσεις	(6/10)
5. Βιβλιογραφία	Πηγές που χρησιμοποιήθηκαν	
		(10/10)

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 1

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕΓΑΛΟΜΟΡΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟ ΙΣΤΟ

Εισαγωγή

Το γενετικό υλικό των περισσότερων οργανισμών είναι το DNA (εξαιρέση αποτελούν οι RNA ιοί). Η γενετική πληροφορία είναι οργανωμένη σε γονίδια. Η απομόνωση του DNA αποτελεί το πρώτο βήμα για μελέτες γενετικής ποικιλότητας καθώς και για την κλωνοποίηση και το μοριακό χαρακτηρισμό γονιδίων. Είναι γνωστό ότι το DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών οργανώνεται μέσα στον πυρήνα, μαζί με διάφορες πρωτεΐνες, σε χρωμοσώματα. Η απομόνωση καθαρού DNA απαιτεί συνεπώς την απομάκρυνση του από πρωτεϊνικές ή/και άλλες προσμίξεις. Το βιολογικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση DNA είναι φύλλα του φυτού Αραβίδοψη, *Arabidopsis thaliana*, το γονιδίωμα του οποίου έχει μέγεθος περίπου 10^8 bp. Η μέθοδος που θα ακολουθηθεί αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου του Dellaporta et al. 1983, που χρησιμοποιείται για την απομόνωση γενωμικού DNA από φυτά Αραβίδοψης.

Η διαδικασία απομόνωσης φυτικού DNA θα πρέπει να ακολουθήσει τα παρακάτω βήματα:

1. Τα κυτταρικά τοιχώματα θα πρέπει να διασπαστούν για να απελευθερώσουν τα εσωτερικά συστατικά του κυττάρου. Αυτό συνήθως πραγματοποιείται με την ομογενοποίηση του ιστού με υγρό άζωτο χρησιμοποιώντας ένα ιγδίο και έμβολο.

2. Η κυτταρική μεμβράνη θα πρέπει να διασπαστεί έτσι ώστε το DNA να απελευθερωθεί. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση ενός απορρυπαντικού, συνήθως δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (SDS) ή βρωμιούχου άλατος του δεκαέξυλο-τριμεθυλο-αμμωνίου (CTAB). Σ' αυτό το στάδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το ένζυμο της πρωτεϊνάσης K για την απομάκρυνση πρωτεϊνών.

3. Το DNA θα πρέπει να προστατευθεί από ενδονουκλεάσες. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται απορρυπαντικά και αιθυλενοδιαμινο-τετρα-οξικό οξύ (EDTA). Επίσης στο εκχύλισμα του ιστού προστίθεται και φαινόλη ή/και χλωροφόρμιο για την αποδιάταξη και απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το DNA.

4. Οι πολυσακχαρίτες μπορούν να απομακρυνθούν με τη χρησιμοποίηση διαβαθμισμένης συγκέντρωσης χλωριούχου κεσίου, αν και καλής ποιότητας DNA (κατάλληλο για περιοριστικές

πέψεις και κλωνοποιήσεις) μπορεί να αποκτηθεί και χωρίς την χρησιμοποίηση χλωριούχου κεσίου.

5. Με λίγη προσοχή DNA υψηλού μοριακού βάρους (50-100Kb) μπορεί να αποκτηθεί. Γι' αυτό το λόγο δουλέψτε προσεκτικά και γρήγορα στα πρώτα στάδια όπου οι ενδονουκλεάσες είναι άφθονες και μπορούν να δράσουν.

Η μέθοδος που θα ακολουθηθεί στο σημερινό εργαστήριο στηρίζεται στο μη-ιονικό απορρυπαντικό CTAB (βρωμιούχου άλατος του δεκαέξυλο-τριμεθυλο-αμμωνίου) για την απελευθέρωση των πυρήνων και την εκχύλιση του DNA. Το CTAB συμμετέχει στη διάσπαση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών, την αποδιάταξη της χρωματίνης και των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την προστασία του DNA από τη δράση των νουκλεασών. Επίσης, σημαντικό ρόλο στην προστασία του DNA έχει το αιθυλενοδιαμινο-τετρα-οξικό οξύ (EDTA) το οποίο δεσμεύει τα δυσθενή ιόντα (Ca^{2+} , Mg^{2+}) τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Η προσθήκη polyvinylpyrrolidone δημιουργεί συμπλέγματα με φαινόλες και αλκαλοειδή και υποβοηθάει στην απομάκρυνση τους από τα φυτικά δείγματα. Το χλωροφόρμιο συμβάλλει στο διαχωρισμό των λιπιδίων από τα νουκλεϊκά οξέα τα οποία παραμένουν στην υδατική φάση. Στη συνέχεια, προσθήκη αιθανόλης παρουσία μεταφορικού RNA (t-RNA) ή/και γλυκογόνου έχει σαν αποτέλεσμα την καθίζηση των νουκλεϊκών οξέων.

Πειραματικό μέρος

Όργανα - Υλικά

- Ομογενοποιητής-γουδάκια (pestles)
- Αυτόματες μικροπιπέττες ακριβείας
- Σωληνάκια erpendorf
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Ακροφύσια (tips) διαφόρων ποσοτήτων
- Υδατόλουτρο 65°C
- Υδατόλουτρο 37°C
- Γάντια

Διαλύματα

- Διάλυμα 2 x CTAB buffer:
2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl,
- Χλωροφόρμιο
- Αιθανόλη απόλυτη
- Αιθανόλη 70%
- Ριβονουκλεάση (RNAse)

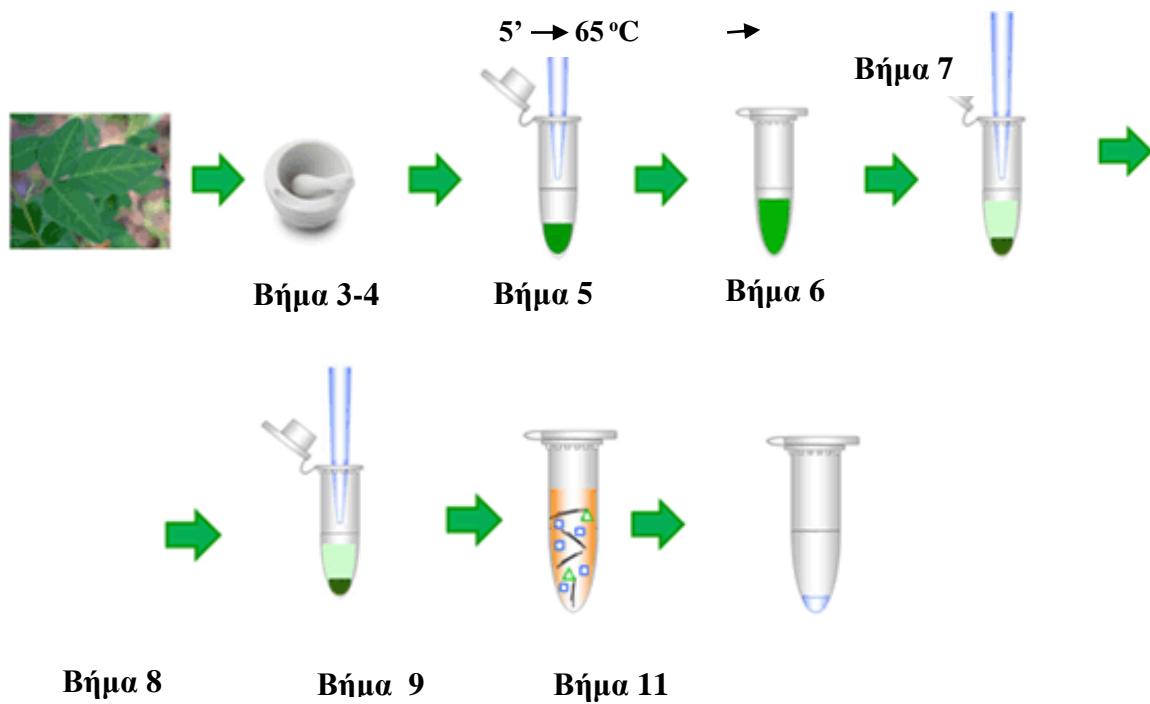
Πειραματική Διαδικασία

A. Απομόνωση μεγαλομοριακού DNA

Προσοχή: Γάντια απαιτούνται καθ' όλη τη διάρκεια της άσκησης γιατί η φαινόλη είναι τοξική ουσία.

1. Συλλέγουμε το βιολογικό μας υλικό (ένα φύλλο για κάθε ομάδα). Στην περίπτωση που δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως, αποθηκεύονται στους -80°C , αφού πρώτα τα παγώσουμε σε υγρό άζωτο (-196°C).
2. Με την βοήθεια ενός λύχνου Bunsen πυρακτώνουμε την άκρη ενός ακροφυσίου και το τοποθετούμε αμέσως σε ένα σωλήνα erpendorf 1.5ml έτσι ώστε το ακροφύσιο να αποκτήσει το σχήμα του πυθμένα του σωλήνα.
3. Μετά τη συλλογή του βιολογικού υλικού το τοποθετούμε σε σωλήνα erpendorf 1.5ml και ομογενοποιούμε, χρησιμοποιώντας το ειδικά διαμορφωμένο ακροφύσιο από το προηγούμενο στάδιο, με μερικές δυνατές περιστροφές.
4. Προσθέτουμε στο ομογενοποίημα 200 μl 2xCTAB buffer και αναδεύουμε δυνατά με το ειδικό όργανο αναταράξεως (vortex).
5. Επωάζουμε το ομογενοποίημα για τουλάχιστον 5 λεπτά στους 65°C .
6. Προσθέτουμε ίσο όγκο 200 μl διάλυμα χλωροφορμίου και το αναδεύουμε δυνατά με το ειδικό όργανο αναταράξεως.
7. Φυγοκεντρούμε στις 16,000 στροφές/λεπτό (rpm) για 5 λεπτά.
8. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε ένα καθαρό σωλήνα erpendorf 1.5 ml, στο οποίο προσθέτουμε 600 μl παγωμένης αιθανόλης (περίπου τριπλάσιο όγκο). Αν η μεσόφαση (η περιοχή μεταξύ οργανικής και υδάτινης φάσης) έχει απομακρυνθεί πλήρως, τότε προχωρούμε στο στάδιο 8. Αν όχι, τότε επαναλαμβάνουμε τα στάδια 6-7.
9. Επωάζουμε για 20 λεπτά στους -20°C .
10. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 16,000 στροφές/λεπτό στους 4°C .
11. Το DNA θα πρέπει να εμφανιστεί με τη μορφή λευκού ιζήματος στον πυθμένα του σωλήνα.
12. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και «ξεπλένουμε» το DNA σε 200 μl 70% αιθανόλη.
13. Φυγοκεντρούμε στις 16,000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
14. Ξηραίνουμε το DNA στο ειδικό δοχείο κενού για 2-3 λεπτά και το διαλύουμε ανάλογα με την ποσότητά του σε:

- TE διάλυμα (περίπου 50-100 μ l), αν πρόκειται να αποθηκευτεί στους -30°C για μεγάλο χρονικό διάστημα
- Αποστειρωμένο νερό (περίπου 50-100 μ l) αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σύντομα για περαιτέρω ανάλυση



Εικόνα : Ενδεικτικό σχεδιάγραμμα πειραματικής διαδικασίας

B. Απομάκρυνση του RNA

1. Προσθέτουμε στο επαναδιαλυμένο DNA το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase) σε τελική συγκέντρωση 40 µg/ml.
2. Επωάζουμε το δείγμα μας στους 37°C για 30 λεπτά.
3. Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης και το αναδεύουμε κάνοντας αργές κινήσεις για να μη σπάσει το μεγαλομοριακό DNA.
4. Φυγοκεντρούμε το δείγμα μας στις 14,000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά.
5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε ίσο όγκο μίγματος 1:1 φαινόλης/χλωροφορμίου και το αναδεύουμε κάνοντας αργές κινήσεις.
6. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 4.
7. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου και το αναδεύουμε κάνοντας αργές κινήσεις.
8. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 6.
9. Συλλέγουμε το υπερκείμενο στο οποίο προσθέτουμε 0.4X όγκους 3M οξικό νάτριο (δηλαδή το 1/10 του όγκου του υπερκείμενου) και 2X όγκους παγωμένης απόλυτης αιθανόλης.
10. Αναμιγνύουμε με απαλή ανακίνηση. Το DNA θα πρέπει να εμφανιστεί με τη μορφή ινιδίων στη μεσόφαση.
11. Όταν οι φάσεις έχουν αναμιχθεί πλήρως, ψαρεύουμε το DNA, το «ξεπλένουμε» σε 70% αιθανόλη και το επαναδιαλύουμε σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (XX µl).
12. Αν το DNA έχει σπάσει σε μικρά κομμάτια, τότε δεν θα εμφανιστεί με τη μορφή ινιδίων στη μεσόφαση. Στην περίπτωση αυτή φυγοκεντρούμε το υλικό μας στη μέγιστη δυνατή ταχύτητα σε ψυχόμενη, κατά προτίμηση, φυγόκεντρο (4 °C). Το DNA εμφανίζεται ως ίζημα στον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρου.

Βιβλιογραφία

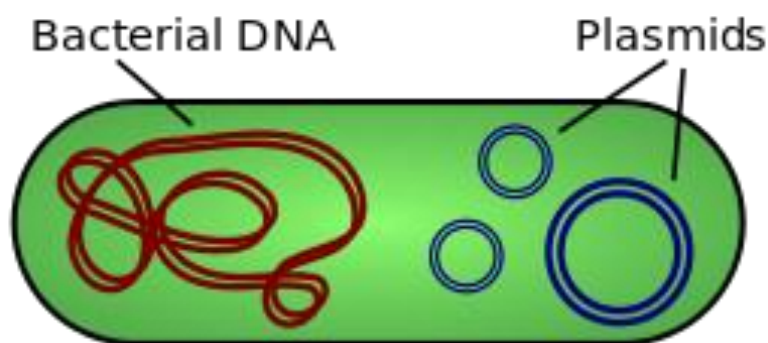
1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, USA.
2. Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook* (Protocol 47: Isolation of DNA from adult flies). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
3. Σκούρας, Ζ. (1993). Μόρια και γονίδια. Μια πρακτική προσέγγιση. Εκδόσεις Art of Text, Θεσσαλονίκη.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 2

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Εισαγωγή

Εκτός από το χρωμοσωμικό DNA, στα περισσότερα βακτήρια, αλλά και σε ορισμένα αρχαία και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, υπάρχουν εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία, τα πλασμίδια. Πρόκειται για δίκλινα κυκλικά μόρια DNA. Είναι συνήθως μικρότερα από το χρωμοσωμικό DNA, με το μέγεθός τους να κυμαίνεται μεταξύ 2 και αρκετών εκατοντάδων χιλιάδων βάσεων (kbp), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπερνά τις 2 εκατομμύρια βάσεις (Mbp). Μπορούν να αντιγράφονται συγχρόνως με το χρωμοσωμικό DNA ή και ανεξάρτητα από αυτό. Όσα πλασμίδια ανήκουν στην πρώτη κατηγορία, υπάρχουν συνήθως σε 1-2 αντίγραφα στο βακτηριακό κύτταρο ενώ όσα ανήκουν στην δεύτερη, σε περισσότερα αντίγραφα (10-30). Συνήθως τα μεγάλα πλασμίδια (>40 kbp) αντιγράφονται συγχρόνως με το χρωμοσωμικό DNA και υπάρχουν σε λίγα αντίγραφα μέσα στο βακτήριο ενώ τα μικρότερα πλασμίδια (<7,5 kbp) αντιγράφονται ανεξάρτητα και υπάρχουν σε πολλά αντίγραφα.

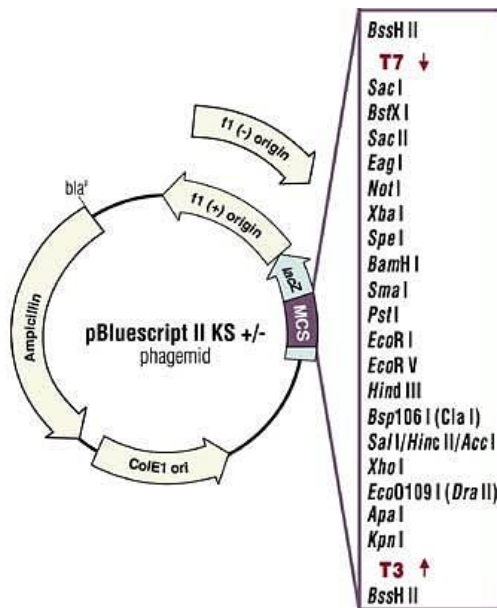
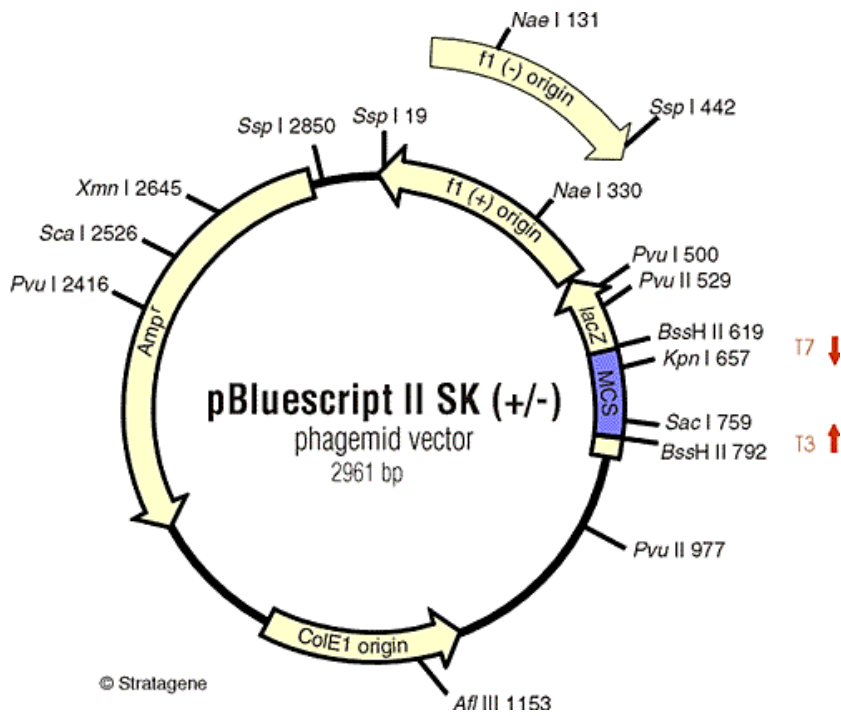


Κάθε πλασμίδιο περιέχει στην αλληλουχία του, πληροφορίες που ρυθμίζουν τον διπλασιασμό του και το διαχωρισμό του στα νέα βακτήρια που προκύπτουν μετά την κυτταρική διαίρεση. Σε ορισμένες περιπτώσεις περιέχουν γονίδια και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες που ελέγχουν την μεταφορά τους από ένα βακτήριο σε ένα άλλο. Μπορούν να περιέχουν γονίδια που σχετίζονται με την παθογόνο δράση των βακτηρίων, όπως για παράδειγμα αυτά που εμπλέκονται στην παραγωγή βακτηριακών τοξινών (π.χ. η τοξίνη που προκαλεί τέτανο, του *Clostridium tetani*) ή πρωτεϊνών που διευκολύνουν την προσκόλληση του βακτηρίου σε ένα

κύτταρο-ξενιστή. Επίσης, μπορούν να περιέχουν ένα ή περισσότερα γονίδια που παράγουν πρωτεϊνικά προϊόντα τα οποία προστατεύουν τα βακτήρια από τη δράση αντιβιοτικών ή και τοξινών.

Λόγω των παραπάνω χαρακτηριστικών τους, τα πλασμίδια αποτελούν χρήσιμο εργαλείο στις διάφορες τεχνικές κλωνοποίησης που χρησιμοποιούνται στα πειράματα γενετικής μηχανικής. Σε αυτή την περίπτωση όμως, τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται έχουν υποστεί γενετικές τροποποιήσεις στην αλληλουχία τους, που τους προσδίδουν χρήσιμες ιδιότητες που φυσιολογικά δεν είχαν. Τα συνθετικά πλασμίδια είναι συνήθως μικρά σε μέγεθος (2-10 kbp), φέρουν αλληλουχίες που ελέγχουν τον διπλασιασμό τους ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό DNA και περιέχουν ένα ή περισσότερα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Εκτός όμως από αυτά τα στοιχεία, έχουν και μια περιοχή που περιλαμβάνει θέσεις αναγνώρισης για διάφορες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Για την κάθε ενδονουκλεάση, υπάρχει μόνο μία θέση περιορισμού σε ολόκληρο το πλασμίδιο. Τέλος μπορούν να περιέχουν και γονίδια που μπορούν να δώσουν μια διαφορετική φαινοτυπική αντίδραση στα βακτήρια (π.χ. μπλε ή λευκές βακτηριακές αποικίες).

Έχουν σχεδιαστεί και κατασκευαστεί πολλά διαφορετικά συνθετικά πλασμίδια που χρησιμοποιούνται σε πειράματα κλωνοποίησης, ένα από αυτά είναι το pBluescript. Έχει αρκετά μικρό μέγεθος, περίπου 3.0 kbp, αντιγράφεται ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό DNA ενώ περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά – στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη – και ένα γονίδιο που σχετίζεται με την παραγωγή του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Η δράση της β-γαλακτοσιδάσης σχετίζεται με την εμφάνιση μπλε ή άσπρων βακτηριακών αποικιών.



Εικόνα 1. Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pBluescript (Πηγή: Stratagene). Η θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS) περιέχει τις αλληλουχίες αναγνώρισης πολλών διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων, για την διευκόλυνση των κλωνοποιήσεων. Το πλασμίδιο περιέχει γονίδιο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη, καθώς και το γονίδιο *lacZ* το οποίο κωδικεύει την παραγωγή του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση.

Η διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από βακτήρια περιλαμβάνει αρχικά την αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος και τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στη συνέχεια γίνεται αναστολή των νουκλεασών για την προστασία του DNA από τη δράση τους. Ακολουθεί κατακρήμιση του μερικώς αποδιαταγμένου χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών μέσω φυγοκέντρησης και απομάκρυνσής τους. Τελικά τα πλασμίδια, μαζί με το RNA, παραλαμβάνονται με κατακρήμιση με τη βοήθεια διαλύματος ισοπροπανόλης και διαλυτοποιούνται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Πειραματικό μέρος

Όργανα - Υλικά

- Καλλιέργεια E. coli
- Αυτόματες μικροπιπέττες ακριβείας (20-200 μ l , 100-1000 μ l)
- Σωληνάκια erpendorf
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Ακροφύσια (tips) διαφόρων ποσοτήτων
- Υδατόλουτρο 65°C
- Υδατόλουτρο 37°C
- Γάντια

Διαλύματα

- Διάλυμα I: T.E. pH 8.0
- Διάλυμα II: 0.2 N NaOH (freshly diluted from a 10 N stock) , 1% SDS
- Διάλυμα III: 5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml , H₂O 28.5 ml
- Φαινόλη: Χλωροφόρμιο
- Χλωροφόρμιο
- Αιθανόλη απόλυτη
- Αιθανόλη 70%
- Ριβονουκλεάση (RNAse)

Πειραματική Διαδικασία

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Προσοχή: Γάντια απαιτούνται καθ' όλη τη διάρκεια της άσκησης γιατί η φαινόλη είναι τοξική ουσία.

1. Τοποθετούμε 1.5ml βακτηριακής καλλιέργειας σε σωληνάριο Eppendorf και πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση 12,000g για 1 min.
2. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με πιπέτα.
3. Προσθέτουμε 100 μl Διάλυμα I και αναδεύουμε δυνατά με το ειδικό όργανο ανάδευσης (vortex), μέχρι να πετύχουμε πλήρη επαναδιάλυση.
4. Προσθέτουμε 200 μl Διάλυμα II. Κλείνουμε το σωληνάριο και αναδεύουμε πέντε φορές με το χέρι (δεν χρησιμοποιούμε vortex). Επωάζουμε στον πάγο για 5 λεπτά.
5. Προσθέτουμε 150 μl Διάλυμα III. Αναδεύουμε με το χέρι για 10-20 δευτερόλεπτα. Επωάζουμε στον πάγο για 5-15 λεπτά.
6. Πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση 12,000g για 10 λεπτά. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε φρέσκο σωληνάριο.
7. Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης : χλωροφορμίου. Αναδεύουμε με τη χρησιμοποίηση της συσκευής vortex και πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση 12,000g για 10 λεπτά.
8. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε φρέσκο σωληνάριο Eppendorf και προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου. Αναδεύουμε με τη συσκευή vortex και πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση 12,000g για 10 λεπτά.
9. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε ένα καθαρό σωλήνα eppendorf 1.5 ml, στον οποίο προσθέτουμε 700μl παγωμένης αιθανόλης (περίπου διπλάσιο όγκο). Επωάζουμε στους 4°C για 30 λεπτά.
10. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 16,000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
11. Το DNA θα πρέπει να εμφανιστεί με τη μορφή λευκού ιζήματος στον πυθμένα του σωλήνα.
12. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και «ξεπλένουμε» το DNA σε 200μl 70% αιθανόλη.
13. Φυγοκεντρούμε στις 16,000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
14. Ξηραίνουμε το DNA στο ειδικό δοχείο κενού για 2-3 λεπτά και το διαλύουμε ανάλογα με την ποσότητά του σε:
 - (α) TE διάλυμα (περίπου 50-100 μl), αν πρόκειται να αποθηκευτεί στους -30°C για μεγάλο χρονικό διάστημα

(β) Αποστειρωμένο νερό (περίπου 50-100 μl) αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σύντομα για περαιτέρω ανάλυση

Βιβλιογραφία

1. Andreou L.V. (2013). Isolation of Plasmid DNA from Bacteria. *Methods in Enzymology*, Vol. 529. Elsevier Inc. pp. 135-142.
2. Holmes D. S., Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114, 193–197.
3. Holmes R.K., Jobling M.G. (1996). “Medical Microbiology”. University of Texas Medical Branch at Galveston. Galveston, Texas. ISBN-10: 0-9631172-1-1.
4. Singer M., Berg P. (1991). “Genes and Genomes”. University Science Books. Mill Valley, California. ISBN 0-632-02879-3.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 3

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DNA

Ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA)

Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτίμηση του ποσού του DNA ή RNA. Αν το δείγμα είναι καθαρό (δηλαδή χωρίς σημαντικά ποσά μολύνσεων από πρωτεΐνες, φαινόλη, αγαρόζη ή άλλων νουκλεϊκών οξέων), τότε προτιμάται η φασματοφωτομετρική μέθοδος που στηρίζεται στη μέτρηση της UV ακτινοβολίας που απορροφάται από τις βάσεις. Για την ποσοτικοποίηση του DNA ή RNA, λαμβάνονται μετρήσεις στα 260nm και 280nm. Η μέτρηση στα 260nm επιτρέπει την εκτίμηση της συγκέντρωσης του νουκλεϊκού οξέος.

O.A. (260nm) = 1 ισούται με 50μg/ml για dsDNA, 40μg/ml για ssDNA και RNA, 20μg/ml για ολιγονουκλεοτίδια. Ο λόγος O.A. (260nm)/ O.A. (280nm) επιτρέπει την εκτίμηση για την καθαρότητα του νουκλεϊκού οξέος. Για καθαρό DNA ο λόγος πρέπει να είναι 1.8 ενώ για το RNA 2.0. Αν υπάρχει μόλυνση από πρωτεΐνη ή φαινόλη, οι παραπάνω λόγοι θα είναι σημαντικά μικρότεροι και δεν θα είναι δυνατή η ακριβής ποσοτικοποίηση του νουκλεϊκού οξέος. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση που το δείγμα μας είναι αρκετά αραιωμένο (<250ng/ml). Στις δύο αυτές περιπτώσεις προτιμάται η εκτίμηση της συγκέντρωσης με τη μέθοδο του βρωμιούχου αιθιδίου που θα μελετηθεί σε επόμενη εργαστηριακή άσκηση.

1. Τοποθετήστε σε ένα erpendorf σωλήνα 1.5ml 10μl από το DNA σας και αμέσως μετά προσθέστε 990μl απεσταγμένου νερού (επομένως έχετε μια διάλυση 1/100). Ανακινήστε καλά.
2. Γεμίστε δύο UV κιουβέτες με 1ml νερό και μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο στα 260nm.
3. Απομακρύνετε το νερό και τοποθετήστε το δείγμα σας με την αραιώση 1/100. Διαβάστε την απορρόφηση στα 260nm.
4. Επαναλάβετε την ίδια διαδικασία στα 280nm. Υπολογίστε την ποσότητα DNA που έχετε χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$\mu\text{g/ml} = A_{260} \times \text{αραιώση} \times 50$$

Βιβλιογραφία

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, USA.
2. Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook* (Protocol 47: Isolation of DNA from adult flies). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
3. Σκούρας, Ζ. (1993). Μόρια και γονίδια. Μια πρακτική προσέγγιση. Εκδόσεις Art of Text, Θεσσαλονίκη.
4. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών (1998). Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιολογίας Κυττάρου. Πάτρα.
5. Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Reprtr* 1: 19–21.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 4

ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Εισαγωγή

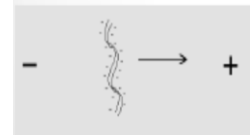
Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν και πέπτουν (κόβουν) ένα δίκλωνο μόριο DNA σε ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Τα ένζυμα αυτά λειτουργούν στα προκαρυωτικά κύτταρα ως συστήματα «περιορισμού – τροποποίησης» (restriction – modification systems) τα οποία κόβουν κάθε ξένο DNA που θα εισέλθει μέσα στο βακτηριακό κύτταρο (π.χ. ένας βακτηριοφάγος). Το DNA του βακτηρίου προστατεύεται με τη μεθυλίωση των δικών του θέσεων αναγνώρισης. Τα περισσότερα ένζυμα περιορισμού κόβουν το DNA σε μία συγκεκριμένη θέση της αλληλουχίας αναγνώρισης η οποία συνήθως είναι μήκους 4-6 νουκλεοτιδίων. Πολλά ένζυμα κόβουν το DNA δημιουργώντας δύο συμπληρωματικά άκρα (sticky ends) ενώ άλλα δημιουργούν τυφλά άκρα (blunt ends). Επίσης υπάρχουν ένζυμα περιορισμού τα οποία δεν απαιτούν ειδικά νουκλεοτίδια σε όλο το μήκος της θέσης αναγνώρισης. Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η συχνότητα με την οποία ένα ένζυμο περιορισμού θα κόψει το DNA εξαρτάται τόσο από το μήκος της θέσης αναγνώρισης όσο και από τον αριθμό των ειδικών νουκλεοτιδίων κάθε θέσης αναγνώρισης. Τα ένζυμα περιορισμού αποτελούν το εργαλείο-κλειδί στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA καθώς επιτρέπουν την πέψη και την επανασυγκόλληση του DNA με απόλυτα ελεγχόμενο τρόπο. Σημαντικό παράγοντα για τη βέλτιστη πέψη του DNA παίζουν: α) η ποιότητα του ενζύμου, β) η ποσότητα του ενζύμου, γ) η καθαρότητα του DNA, δ) το ρυθμιστικό διάλυμα πέψης και ε) η θερμοκρασία.

Η πέψη φυτικού DNA συχνά απαιτείται για μελέτες γενετικής ποικιλότητας, για για κλωνοποίηση καθώς και για υβριδισμό κατά Southern. Η μέθοδος που ακολουθείται είναι παρόμοια με αυτή που χρησιμοποιείται για το πλασμιδιακό DNA εκτός του ότι απαιτούνται μεγαλύτερες ποσότητες ενζύμου ή μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επώασης, για να επιτύχουμε πλήρη πέψη.

Η ποσότητα του DNA που απαιτείται για πέψη σε ένα υβριδισμό κατά Southern εξαρτάται από το μέγεθος του γονιδιώματος και τον τύπο του ανιχνευτή (probe) που θα χρησιμοποιήσουμε. Για την ανίχνευση ενός και μόνο γονιδίου απαιτείται η πέψη 1μg DNA από *Arabidopsis thaliana*, ενώ για το γονιδίωμα του σιταριού απαιτείται η πέψη 8-10μg DNA.

Τα τμήματα του DNA που δημιουργούνται μετά από μία πέψη με ένζυμα περιορισμού μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη όταν λιώνει και μετά ψύχεται, σχηματίζει ένα πήκτωμα μέσω δεσμών υδρογόνου.

Τα τμήματα του DNA θα κινηθούν μέσω της πηκτής υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, όπου τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA θα κινηθούν προς την άνοδο.



Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA σε πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από 4 παράγοντες:

α) Το μέγεθος των μορίων DNA. Τα δίκλινα γραμμικά μόρια DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του (\log_{10}) του μοριακού τους μεγέθους.

β) Τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει το μέγεθος των πόρων μέσω των οποίων κινούνται τα μόρια του DNA. Έτσι, ένα μόριο DNA δεδομένου μοριακού μεγέθους θα κινηθεί με διαφορετική ταχύτητα σε πηκτές διαφορετικών συγκεντρώσεων. Παραδείγματος χάριν, σε ένα πήκτωμα 0.8% αγαρόζης μπορούν να αναλυθούν τμήματα DNA μεγέθους 0.5 – 10 kb.

γ) Τη διαμόρφωση των μορίων DNA. Υπερελιγμένα κυκλικά και γραμμικά μόρια DNA του ίδιου μοριακού μεγέθους κινούνται με διαφορετικούς ρυθμούς στο ίδιο πήκτωμα αγαρόζης.

δ) Την τάση του ηλεκτρικού πεδίου. Σε χαμηλές τάσεις, ο ρυθμός μετανάστευσης των γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος με την εφαρμοζόμενη τάση.

Τα τμήματα του DNA μπορούν να εντοπιστούν στο πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας τη φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των γειτονικών βάσεων του DNA (μονόκλωνου ή δίκλωνου). Η έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία έχει σαν αποτέλεσμα τη διέγερση της χρωστικής, λόγω της ακτινοβολία που απορροφάτε από το DNA (260nm) καθώς και από την ίδια τη δεσμευμένη χρωστική (300-360nm), και την εκπομπή ακτινοβολίας στα 590nm (κίτρινο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος). Ο προσδιορισμός του μεγέθους ενός αγνώστου τμήματος DNA προκύπτει από τη σύγκριση της ηλεκτροφορητικής του κινητικότητας με εκείνη τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους. Κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης θραύσματα DNA κινούνται στη πηκτή αγαρόζης με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του \log_{10} του μοριακού τους βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το μοριακό βάρος εκφράζεται σε αριθμό βάσεων (bp). Χρησιμοποιώντας ένα χάρακα σε μια φωτογραφία της πηκτής μετράτε σε χιλιοστά (mm) την απόσταση που έχει διανύσει ένα θραύσμα/τα DNA γνωστού μοριακού μεγέθους από το κέντρο

της υποδοχής («πηγαδάκι») όπου φορτώσατε το δείγμα σας, και δημιουργείται μια γραφική παράσταση σε ημιλογαριθμικό χαρτί.

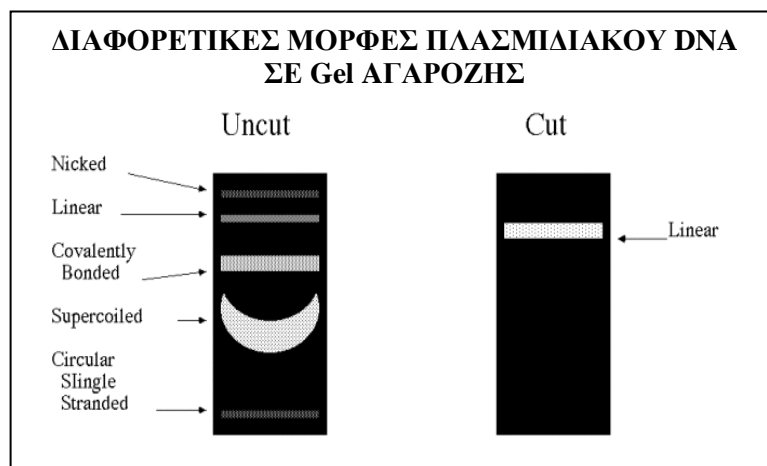
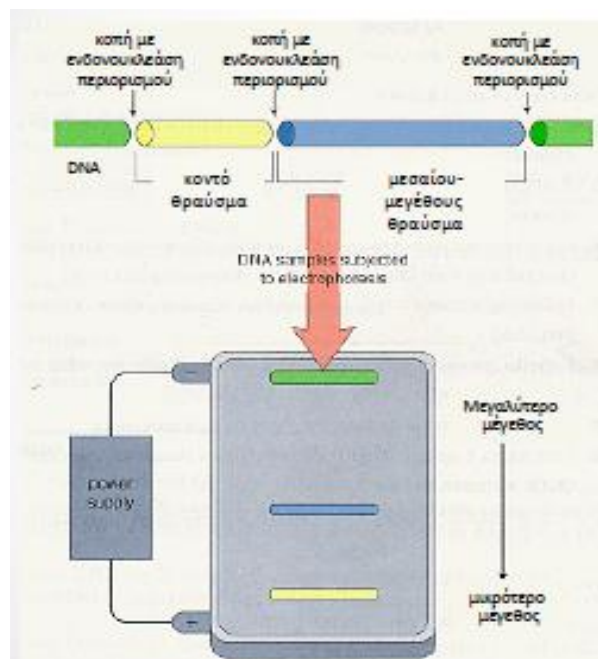
Πιο συγκεκριμένα θα πρέπει:

A) να μετρήσετε την ηλεκτροφορητική απόσταση κάθε ζώνης από την αντίστοιχη υποδοχή.

B) να κατασκευάσετε γραφική παράσταση τοποθετώντας τις τιμές των ηλεκτροφορητικών αποστάσεων σε mm στην κανονική κλίμακα και τις τιμές (\log_{10}) των μοριακών μεγεθών των μαρτύρων στην ημιλογαριθμική κλίμακα. Για τα μεγέθη των μαρτύρων σε bp δείτε την εικόνα στο τέλος της σημερινής άσκησης.

Γ) Χαράζουμε την πρότυπη καμπύλη και προσδιορίζουμε το μέγεθος των αγνώστων τμημάτων DNA που προέκυψαν από την πέψη.

Επίσης, η κατά προσέγγιση εκτίμηση της ποσότητας/συγκέντρωσης ενός δείγματος DNA μπορεί να γίνει συγκρίνοντας τη «φωτεινότητα» της ζώνης του δείγματός μας με την αντίστοιχη δείγματος-μάρτυρα γνωστής συγκέντρωσης.



Πειραματικό μέρος

Όργανα - Υλικά

- Σιφόνια (πιπέτες) διαφόρων ποσοτήτων
- Σιφόνια Pasteur
- Αναρροφητής (πουάρ) για σιφόνια
- Ακροφύσια (tips) διαφόρων ποσοτήτων
- Σωληνάκια erpendorf
- Φυγόκεντρος
- Ζυγός
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA
- Τροφοδοτικό
- UV transilluminator
- Συσκευή φωτογράφισης
- Ογκομετρικοί κύλινδροι (100ml)
- Κωνικές φιάλες (100ml)
- Υδατόλουτρο 37°C
- Ημιλογαριθμικό χαρτί
- Γάντια

Διαλύματα - Χημικά

- DNA
- Ένζυμο περιορισμού *PvuII*
- 10X *PvuII* ρυθμιστικό διάλυμα
- Πάγο
- Αγαρόζη
- 50X διάλυμα TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH8)
- 6X διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων
- Διάλυμα βρωμιούχου εθιδίου (10mg/ml)

Πειραματική Διαδικασία

A. Πέψη DNA με ένζυμο περιορισμού

Οι αντιδράσεις συνήθως περιέχουν 0.2 – 1 µg DNA σε όγκο 20µl.

1. Πραγματοποιήστε τις αντιδράσεις περιορισμού σύμφωνα με την παρακάτω σειρά: Να χρησιμοποιείται ένα καινούργιο αποστειρωμένο ακροφύσιο για κάθε αντιδραστήριο και για κάθε σωλήνα eppendorf.

	Σωλήνας 1	Σωλήνας 2	Σωλήνας 3
Φυτικό DNA	5µl	-	-
Πλασμιδιακό DNA	-	5 µl	5 µl
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	2 µl	2 µl	2 µl
Ένζυμο <i>PvuII</i>	1 µl	1 µl	-
Αποστειρωμένο νερό	12 µl	12 µl	13 µl
Σύνολο	20 µl	20 µl	20 µl

2. Επωάζουμε σε υδατόλουτρο 37°C για 60 λεπτά.
3. Σταματάμε την αντίδραση με την προσθήκη 2 µl 0.5M EDTA pH8.
4. Αν το DNA πρόκειται να αναλυθεί αμέσως σε πήκτωμα αγαρόζης, τότε προσθέτουμε 6 µl διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων και αναμιγνύουμε.

Παρατηρήσεις

1. Προσέχουμε ώστε τα ένζυμα περιορισμού να μην είναι μολυσμένα με νουκλεάσες.
2. Τα ένζυμα περιορισμού είναι σταθερά όταν διατηρούνται στους -20 °C και σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 50% γλυκερόλη.

3. Αμέσως μετά την έξοδό του από τους -20°C , τοποθετούμε το ένζυμο στον πάγο. Παίρνουμε το ποσό που θέλουμε με αποστειρωμένο ακροφύσιο (tip) και αμέσως μεταφέρουμε το ένζυμο από τον πάγο στους -20°C .
4. Προσέχουμε ώστε η ποσότητα του ενζύμου να αποτελεί έως το 1/10 του συνολικού όγκου της αντίδρασης, διαφορετικά η ενζυμική δραστηριότητα αναστέλλεται από τη γλυκερόλη.
5. Ως μία (1) ενζυμική μονάδα (one unit) ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1 μg DNA του βακτηριοφάγου λ σε 1 ώρα στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και την κατάλληλη θερμοκρασία.
6. Η απαιτούμενη ποσότητα ενζύμου μιας αντίδρασης μπορεί να μειωθεί, αν επιμηκυνθεί ο απαιτούμενος χρόνος επώασης.
7. Όταν το DNA πρόκειται να κοπεί με δύο ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού, οι πέψεις μπορούν να γίνουν ταυτόχρονα αν τα δύο ένζυμα δουλεύουν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Αν όχι, τότε το ένζυμο που δουλεύει στο ρυθμιστικό διάλυμα της χαμηλότερης αλατότητας πρέπει να χρησιμοποιηθεί πρώτο. Η επώαση μπορεί να συνεχιστεί με την προσθήκη του κατάλληλου ποσού άλατος και του δεύτερου ενζύμου.
8. Αν ο όγκος της αντίδρασης είναι μεγάλος για να φορτωθεί στο πηγαδάκι ενός πηκτώματος αγαρόζης, τότε αφού σταματήσουμε την αντίδραση με την προσθήκη διαλύματος EDTA, προσθέτουμε το 1/10 του όγκου της αντίδρασης 3M οξικό νάτριο pH6 και 2 όγκους παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και κατακρημνίζουμε το DNA. Στη συνέχεια «ξηραίνουμε» το DNA και το επαναδιαλύουμε στον επιθυμητό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος TE.

Βιβλιογραφία

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, USA.
2. Becker, J.M., Caldwell, G.A. and Zachgo, E.A. (1996). Biotechnology: A Laboratory Course. Academic Press, London, United Kingdom.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 5

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

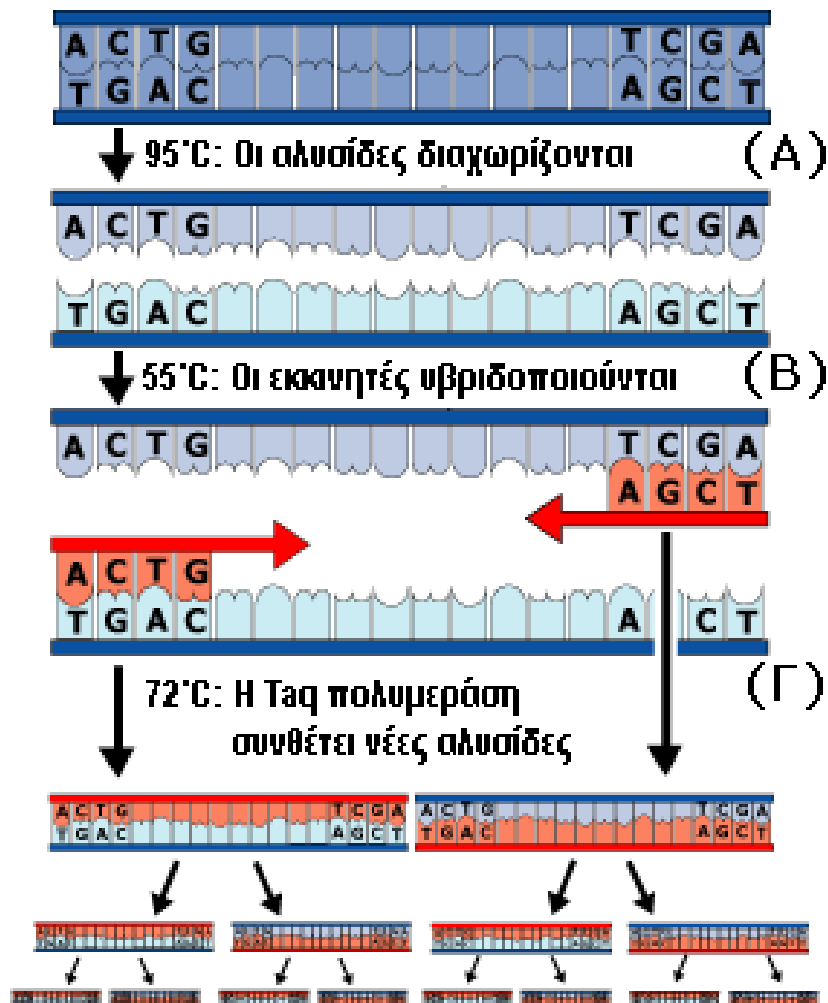
Εισαγωγή

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι μια πολύ χρήσιμη μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση, πολλαπλή αντιγραφή και κλωνοποίηση τμημάτων DNA από διαφορετικές πηγές. Οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές της τεχνικής αυτής περιλαμβάνουν βελτιώσεις ποικίλων μεθόδων της μοριακής βιολογίας (π.χ. κατασκευή ανιχνευτή, καθορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμήματος DNA, κατευθυνόμενη μεταλλάξιγένεση), στη διάγνωση γενετικών μεταλλάξεων, στην ανίχνευση παθογόνων καθώς και σε μελέτες γενετικής ποικιλότητας και γενετικής ταυτοποίησης ως μέθοδος διαπίστωσης μοριακών «αποτυπωμάτων».

Η μέθοδος PCR βασίζεται αφενός στην ιδιότητα των δίκλωνων μορίων DNA να αποδιατάσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες και αφετέρου στο γεγονός ότι ειδικά σχεδιασμένα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά σε καθεμία από τις δύο αλυσίδες και ευρισκόμενα στα αντίθετα άκρα μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής περιοχής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήρια μόρια για την *in vitro* σύνθεση δίκλωνου DNA με τη χρήση μιας DNA πολυμεράσης. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, υβριδοποίησης των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (primer annealing) και πολυμερασικής δράσης (επιμήκυνση) έχουν ως αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της ποσότητας του DNA τμήματος που περιλαμβάνεται μεταξύ των δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Συγκεκριμένα, η μέθοδος PCR επιτρέπει την παραγωγή περισσότερων από 10^6 μορίων του συγκεκριμένου τμήματος DNA ξεκινώντας από λίγα μόνο μόρια. Η ευαισθησία αυτής της μεθόδου σημαίνει ότι το δείγμα μας (template DNA) δεν θα πρέπει να είναι μολυσμένο με κανένα άλλο «ξένο» μόριο DNA. Η ανακάλυψη και η απομόνωση μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq* polymerase) συνέβαλε σημαντικά στην ενζυμική κατάλυση του πολλαπλασιασμού του DNA καθώς το ένζυμο είναι σταθερό στις υψηλές θερμοκρασίες που είναι απαραίτητες για την αποδιάταξη του DNA. Το μοναδικό μειονέκτημα της *Taq* πολυμεράσης είναι ότι δεν διαθέτει «επιδιορθωτικές» λειτουργίες και για αυτό το λόγο τοποθετεί 2×10^{-4} νουκλεοτίδια λάθος ανά κύκλο. Μια πολυμεράση που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermococcus litoradis* βρέθηκε να διαθέτει «διορθωτικές» λειτουργίες (πραγματοποιεί 6 φορές λιγότερα λάθη από ότι η κοινή πολυμεράση). Στις εργαστηριακές μας ασκήσεις θα

χρησιμοποιήσουμε *Taq* πολυμεράση. Η αυτοματοποίηση της μεθόδου, με την κατασκευή συσκευών PCR, διευκόλυνε αποφασιστικά στην ευρεία χρήση της μεθόδου.

Η αυτοματοποίηση της μεθόδου, με την κατασκευή συσκευών PCR, διευκόλυνε αποφασιστικά στην ευρεία χρήση της μεθόδου.



Πειραματικό μέρος

Όργανα - Υλικά

- Σιφόνια (πιπέτες) διαφόρων ποσοτήτων
- Αναρροφητής (πουάρ) για σιφόνια
- Ακροφύσια (tips) διαφόρων ποσοτήτων
- Σωληνάκια erpendorf
- Συσκευή PCR
- Φυγόκεντρος
- Ζυγός
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA
- Τροφοδοτικό
- UV transilluminator
- Συσκευή φωτογράφισης
- Ογκομετρικοί κύλινδροι (100ml)
- Κωνικές φιάλες (100ml)
- Ημιλογαριθμικό χαρτί
- Γάντια

Διαλύματα - Χημικά

- DNA
- Αποστειρωμένο απιονισμένο H₂O
- 10X PCR ρυθμιστικό διάλυμα
- 25mM MgCl₂
- 2mM μείγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs mix)
- Εναρκτήριο ολιγονουκλεοτίδιο 1 (primer 1)
- Εναρκτήριο ολιγονουκλεοτίδιο 2 (primer 2)
- Taq DNA πολυμεράση
- Πάγο
- Αγαρόζη
- 50X διάλυμα TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH8)

- 6X διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml)

Πειραματική Διαδικασία

A. Πολλαπλή αντιγραφή του γονιδίου 16S rRNA από eDNA (environmental DNA)

1. Σε ένα σωληνάκι eppendorf του 1.5ml ετοιμάζουμε το γενικό μίγμα (master mix, n+1) για 4 αντιδράσεις PCR προσθέτοντας με τη σειρά:
 - α) 51 μl αποστειρωμένο απιονισμένο H₂O
 - β) 10 μl 10X PCR ρυθμιστικό διάλυμα
 - γ) 8 μl 25mM MgCl₂
 - δ) 5 μl 2.5mM dNTPs mix
 - ε) 0.5 μl ολιγονουκλεοτίδιο 1 (2μM)
 - ζ) 0.5 μl ολιγονουκλεοτίδιο 2 (2μM)
 - η) 1 μl *Taq* DNA πολυμεράση (1 unit)

2. Τοποθετήστε 19μl από το γενικό μίγμα (master mix) στους τέσσερις σωλήνες των 0.2ml. Ετοιμάστε τις αντιδράσεις σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

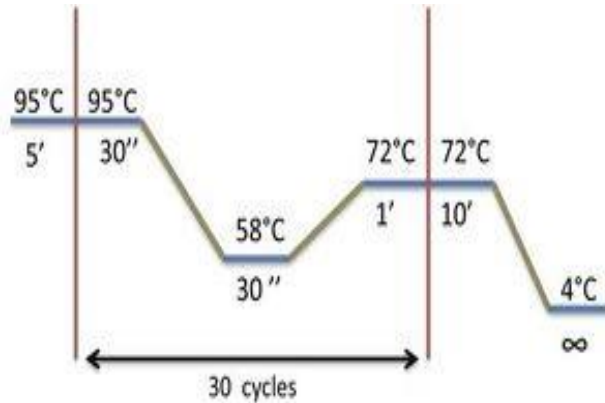
	Σωλήνας 1	Σωλήνας 2	Σωλήνας 3	Σωλήνας 4
eDNA1	1μl	-	-	-
eDNA2		1μl	-	-
Θετικός μάρτυρας	-		1μl	-
Αρνητικός μάρτυρας (αποστειρωμένο νερό)	-	-		1μl
Γενικό μίγμα (master mix)	19μl	19μl	19μl	19μl
Σύνολο	20μl	20μl	20μl	20μl

3. Προγραμματίζουμε τη συσκευή PCR να πραγματοποιήσει αρχικά ένα στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 94°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια 35 κύκλους με τις εξής παραμέτρους:
 - α) αποδιάταξη (denaturation): 94°C για 30 δευτερόλεπτα

β) υβριδοποίηση (annealing): 53°C για 30 δευτερόλεπτα

γ) επιμήκυνση (extension): 72°C για 2 λεπτά

Μετά την ολοκλήρωση των 35 κύκλων, ακολουθεί ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 10 λεπτά για τον πλήρη πολυμερισμό όλων των μορίων.



Παράδειγμα αντίδρασης PCR

4. Στη συνέχεια οι αντιδράσεις αναλύονται με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης ή αποθηκεύονται στους -20 °C.

Παρατηρήσεις

Η πιστότητα και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου PCR εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η συγκέντρωση της Taq DNA πολυμεράσης, των τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων, των ιόντων Mg^{2+} , του DNA και των ολιγονουκλεοτιδίων. Επίσης, η θερμοκρασία και η διάρκεια κάθε σταδίου ενός κύκλου καθώς και ο συνολικός αριθμός των κύκλων επηρεάζουν την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος και την εξειδίκευση της αντίδρασης. Ο όρος «αυστηρότητα» (strigency) αναφέρεται στη σπουδαιότητα της θερμοκρασίας και της αλατότητας στην υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων και ως εκ τούτου παίζουν σπουδαίο ρόλο για την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών για μια αντίδραση PCR. Συνθήκες «υψηλής αυστηρότητας» σημαίνει υψηλή θερμοκρασία και χαμηλή συγκέντρωση άλατος που οδηγεί σε μείωση της σταθερότητας των προϊόντων της DNA υβριδοποίησης ενώ συνθήκες «χαμηλής αυστηρότητας» σημαίνει χαμηλή θερμοκρασία και υψηλή συγκέντρωση άλατος που οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας των προϊόντων της DNA υβριδοποίησης. Μεταβάλλοντας λοιπόν τη συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} και τη θερμοκρασία υβριδοποίησης (annealing temperature) μπορούμε να αλλάζουμε την «αυστηρότητα» της αντίδρασης PCR μέχρι

να βρούμε τις βέλτιστες συνθήκες για ένα συγκεκριμένο ζευγάρι ολιγονουκλεοτιδίων και ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα DNA.

Η επιλογή των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας της μεθόδου PCR. Ο γενικός κανόνας είναι να σχεδιάζονται PCR primers μήκους 20 ολιγονουκλεοτιδίων και το περιεχόμενο τους σε GC να είναι μεταξύ 40 – 60%. Τα νουκλεοτίδια G και C πρέπει, κατά το δυνατόν, να είναι ομοιόμορφα καταναμημένα κατά μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου. Θα πρέπει επίσης να αποφεύγεται η παρουσία περισσοτέρων των 3 G ή C νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του ολιγονουκλεοτιδίου γιατί μπορούν να δημιουργηθούν μη ειδικές εναρκτήριες υβριδοποιήσεις (nonspecific priming).

Η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται συνήθως σε μια αντίδραση PCR είναι της τάξης των 10pg – 1ng πλασμιδιακού ή φαγικού DNA και 100ng – 1μg γενωμικού DNA. Μεγαλύτερες ποσότητες DNA συνήθως αυξάνουν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Όλες σχεδόν οι μέθοδοι απομόνωσης DNA είναι κατάλληλες για την παραγωγή template DNA για αντίδραση PCR. Ίχνη από ουσίες όπως φαινόλη, EDTA, proteinase K, είναι ισχυροί αναστολείς της ενζυμικής δραστηριότητας της Taq DNA πολυμεράσης, όμως κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη και επαναλαμβανόμενα ξεπλύματα με 70% αιθανόλη είναι αποτελεσματικοί τρόποι για την απομάκρυνση τέτοιων προσμίξεων.

Η συγκέντρωση του κάθε τριφωσφορικού δεσοξυριβονουκλεοτιδίου σε μια PCR αντίδραση είναι συνήθως 200μM. Είναι σημαντικό και τα τέσσερα τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) να βρίσκονται στην ίδια ακριβώς συγκέντρωση διαφορετικά θα έχουμε αύξηση των λαθών στη σύνθεση των PCR προϊόντων. Επίσης υψηλές συγκεντρώσεις της Taq DNA πολυμεράσης έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης μη ειδικών προϊόντων.

Γενικά, η μέθοδος PCR είναι μια εμπειρική τεχνική και συνήθως απαιτεί τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών της αντίδρασης για κάθε νέο ζεύγος εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων και DNA υποστρώματος.

Βιβλιογραφία

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, USA.
2. Becker, J.M., Caldwell, G.A. and Zachgo, E.A. (1996). Biotechnology: A Laboratory Course. Academic Press, London, United Kingdom.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 6

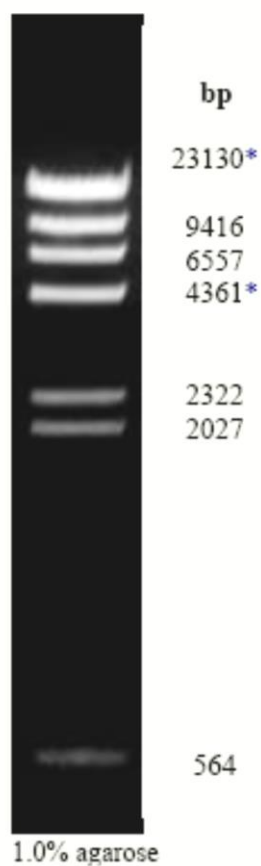
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

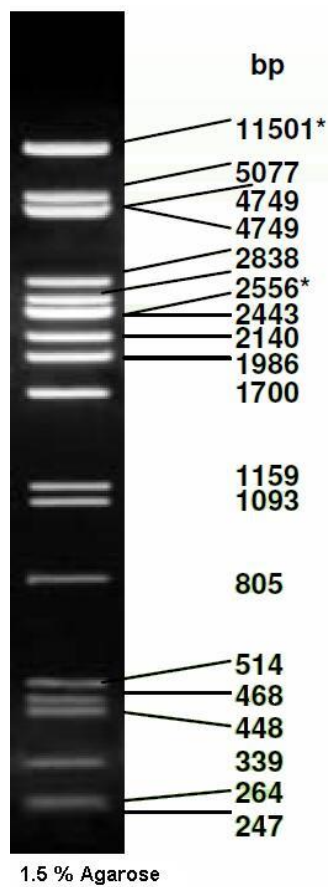
Προσοχή: Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξιγόνο και θα πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή.

1. Ζυγίζουμε 1g αγαρόζη.
2. Διαλύουμε την αγαρόζη σε 100ml διαλύματος 1XTAE σε κωνική φιάλη με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων ή σε λύχνο Bunsen.
3. Μεταφέρουμε την αγαρόζη σε ογκομετρικό κύλινδρο και προσθέτουμε H₂O μέχρι όγκου 100ml. Αφήνουμε το διάλυμα αγαρόζης να κρυώσει μέχρι θερμοκρασίας περίπου 50 °C.
4. Προσθέτουμε 5 μl διαλύματος βρωμιούχου εθιδίου και αναμιγνύουμε καλά.
5. Μεταφέρουμε το διάλυμα αγαρόζης στη μήτρα της συσκευής και αμέσως τοποθετούμε το κτενάκι.
6. Απομακρύνουμε τις φυσαλίδες με πιπέτα Pasteur και περιμένουμε περίπου 30 λεπτά για να πήξει το πήκτωμα.
7. Γεμίζουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με διάλυμα 1XTAE και τοποθετούμε τη μήτρα με το πήκτωμα.
8. Ετοιμάζουμε τα δείγματά μας προσθέτοντας τον κατάλληλο όγκο διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων (περίπου 6 μl σε τελικό όγκο 30 μl). Παράλληλα ετοιμάζουμε και ένα δείγμα που περιέχει τμήματα DNA γνωστού μοριακού μεγέθους.
9. Φορτώνουμε τα δείγματά μας (περίπου 20 μl) στις υποδοχές που έχουν σχηματιστεί από το κτενάκι και τρέχουμε την ηλεκτροφόρηση για 1 ώρα σε σταθερή τάση 80 volts.
10. Φορούμε κατάλληλα γυαλιά, παρατηρούμε το πήκτωμα σε U.V. και το φωτογραφίζουμε.
11. Μετρούμε την ηλεκτροφορητική απόσταση κάθε ζώνης από την αντίστοιχη υποδοχή.
12. Κατασκευάζουμε διάγραμμα τοποθετώντας τις τιμές των ηλεκτροφορητικών αποστάσεων στην κανονική κλίμακα και τις τιμές των μοριακών μεγεθών των μαρτύρων στην ημιλογαριθμική κλίμακα.
13. Χαράζουμε την πρότυπη καμπύλη και προσδιορίζουμε το μέγεθος των αγνώστων τμημάτων DNA που προέκυψαν από την πέψη.

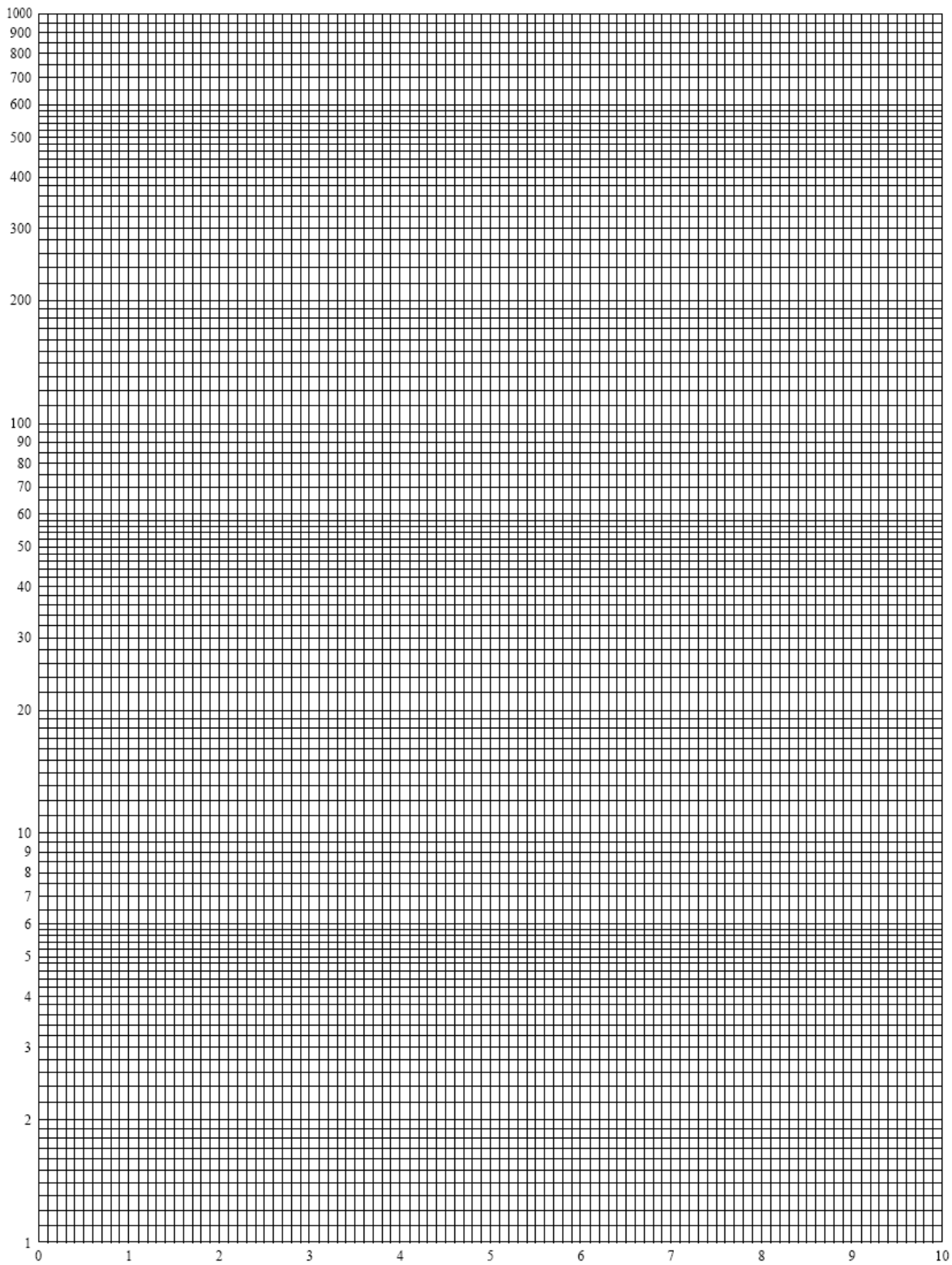
λHindIII



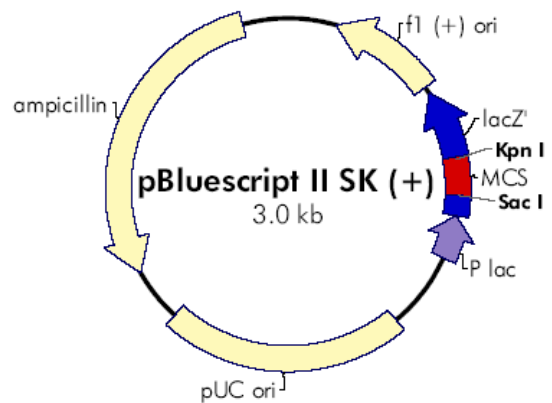
λPstI



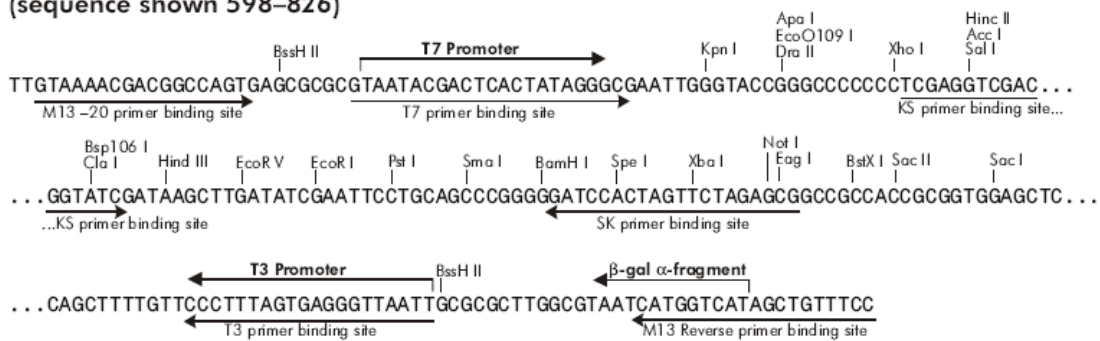
HindIII bp (μάρτυρας)	Απόσταση σε mm	Άγνωστα θραύσματα σε mm
23,130 bps		
9416		
6557		
4361		
2322		
2027		
564		
(125)		



f1 (+) origin 135–441
β-galactosidase α-fragment 460–816
multiple cloning site 653–760
lac promoter 817–938
pUC origin 1158–1825
ampicillin resistance (bla) ORF 1976–2833



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



Βιβλιογραφία

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, USA.
2. Becker, J.M., Caldwell, G.A. and Zachgo, E.A. (1996). Biotechnology: A Laboratory Course. Academic Press, London, United Kingdom.
3. Σκούρας, Ζ. (1993). Μόρια και γονίδια. Μια πρακτική προσέγγιση. Εκδόσεις Art of Text, Θεσσαλονίκη.
4. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών (1998). Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιολογίας Κυττάρου. Πάτρα.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 7

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ SANGER

Ο όρος ανάλυση της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing) χρησιμοποιείται για να περιγράψει την εργαστηριακή διεργασία με την οποία διαβάζεται η σειρά των τεσσάρων γραμμάτων του γενετικού αλφαβήτου (A, C, G, και T) κατά μήκος ενός κλώνου DNA. Συνεπώς η ανάλυση της αλληλουχίας ενός γονιδιώματος σημαίνει την ανάγνωση κάθε γράμματος του DNA ενός οργανισμού.

Υπάρχουν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις για την ανάλυση της αλληλουχίας του DNA από τις οποίες πιο δημοφιλής είναι η «μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας» (chain termination method). Η μέθοδος αυτή αξιοποιεί μια DNA πολυμεράση, δηλαδή μια πρωτεΐνη που παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην αντιγραφή των γενετικών πληροφοριών ενός κυττάρου. Για την ανάλυση της αλληλουχίας του DNA, η διεργασία της αντιγραφής αναπαράγεται στο εργαστήριο. Μαζί όμως με τα υλικά που απαιτούνται για την παρασκευή νέου DNA περιλαμβάνονται και τροποποιημένες μορφές των νουκλεοτιδίων, γνωστές ως «νουκλεοτίδια τερματισμού». Η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει νουκλεοτίδια τερματισμού στον νέο αυξανόμενο κλώνο του DNA, όμως μετά από ένα τέτοιο νουκλεοτίδιο δεν είναι δυνατή η προσθήκη άλλων νουκλεοτιδίων, οπότε η πορεία της πολυμεράσης διακόπτεται. Επειδή η προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου τερματισμού (αντί του φυσιολογικού) είναι τυχαία, τελικά παράγεται μια συλλογή ατελώς αντιγραμμένων κλασμάτων DNA που όλα αρχίζουν από το ίδιο σημείο, αλλά διαφέρουν σε μήκος κατά μια βάση ανάλογα με το πόσο προχώρησε η πολυμεράση προτού ενσωματώσει ένα νουκλεοτίδιο τερματισμού. Καθεμία από τις βάσεις τερματισμού μπορεί να σημειωθεί με μια χρωστική διαφορετικού χρώματος ώστε αργότερα να μπορούν να διακριθούν τα κλάσματα DNA.

Τα κλάσματα DNA διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος τους. Αυτό επιτυγχάνεται προωθώντας το DNA διαμέσου πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου ή με τη βοήθεια μικροσκοπικού τριχοειδούς με τη χρησιμοποίηση ειδικού πολυμερούς. Πραγματοποιείται στην ουσία ηλεκτροφόρηση σε πηκτή. Μετά από λίγες ώρες προκύπτει μια «σκάλα» από κλάσματα DNA απλωμένα πάνω στην πηκτή, με τα μικρότερα στο κάτω μέρος της πηκτής. Όσο προχωρούμε προς τα πάνω, κάθε κλάσμα είναι μεγαλύτερο από το προηγούμενο μόνο κατά μια βάση.

Κάθε κλάσμα έχει στο άκρο του ένα από τα τέσσερα νουκλεοτίδια τερματισμού σημασμένο με μια διαφορετική χρωστική. Καθώς τα κλάσματα μετακινούνται περνούν από μια ακτίνα λάσερ η οποία και διεγείρει τη χρωστική κάνοντάς την να εκπέμπει φθορισμό του συγκεκριμένου χρώματός της. Το φθορίζον σήμα «συλλαμβάνεται» από τους ανιχνευτές από τους ανιχνευτές και εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή. Έτσι το πρότυπο θυμίζει μια «σκάλα» από κόκκινες, κίτρινες και μπλε ζώνες. Ο υπολογιστής ερμηνεύει δύο πληροφορίες που παίρνει για κάθε ζώνη, τη θέση που υποδηλώνει το μήκος, και το χρώμα που υποδηλώνει τη βάση που βρίσκεται στο άκρο του συγκεκριμένου θραύσματος. Με βάση τα δεδομένα αυτά μετατρέπει τις πληροφορίες αυτές σε αλληλουχίες.

Σε κάθε αντίδραση ανάλυσης της αλληλουχίας μπορεί να διαβαστούν 500-800 βάσεις. Για να αναλυθεί το γονιδίωμα ενός οργανισμού θα πρέπει να κοπεί σε μικρά κομμάτια.

Η ανάλυση της αλληλουχίας ενός γονιδιώματος μοιάζει με την συναρμολόγηση ενός τεράστιου πάζλ. Πρώτα το γονιδίωμα κόβεται σε μικρά κομμάτια, κατόπιν αναλύεται η αλληλουχία των μικρών κομματιών και τέλος τα κομμάτια τοποθετούνται στη σωστή σειρά τους. Όπως προαναφέραμε αυτό το τελευταίο είναι εφικτό επειδή τα κομμάτια επικαλύπτονται μερικώς, επιτρέποντας σ' ένα κλάσμα να ταιριάζει επακριβώς με τον σωστό γείτονα του.

Υπάρχουν δύο βασικές προσεγγίσεις για την επίλυση του πάζλ της αλληλουχίας του γονιδιώματος. Η πρώτη είναι μια μέθοδος που βασίζεται σε χάρτες (map-based). Πρόκειται για ιεραρχική διεργασία, κατά την οποία το γονιδίωμα σπάει σε προοδευτικά μικρότερα κομμάτια. Καταρχήν καθορίζεται η αλληλουχία των μικρότερων τμημάτων και στη συνέχεια τα κομμάτια συναρμολογούνται σε προοδευτικά μεγαλύτερα τμήματα έως ότου συγκροτηθεί ολόκληρο το γονιδίωμα. Η πρώτη ομάδα μεγάλων τμημάτων χρησιμοποιείται για τον σχεδιασμό ενός φυσικού χάρτη που καθορίζει την προέλευση κάθε τμήματος στο γονιδίωμα και τη θέση του σε σχέση με όλα τα άλλα. Κάθε τμήμα κόβεται σε μικρά επικαλυπτόμενα κομμάτια που υποβάλλονται σε ανάλυση της αλληλουχίας τους. Μόλις καθοριστούν όλες οι αλληλουχίες οι επικαλύψεις χρησιμοποιούνται για την ανασύσταση της συνεχούς αλληλουχίας του μεγάλου τμήματος. Από την συναρμολόγηση των μεγάλων τμημάτων προκύπτει ολόκληρο το γονιδίωμα. Μια εναλλακτική στρατηγική είναι ο κατακερματισμός του γονιδιώματος και άμεση ανάλυση της αλληλουχίας των μικροσκοπικών κομματιών, παραλείποντας τον σχεδιασμό ενός φυσικού χάρτη. Προγράμματα ηλεκτρονικού υπολογιστή συναρμολογούν τα εκατομμύρια αναλυμένα κλάσματα σε συνεχείς αλληλουχίες και έτσι ανασυγκροτούν το πλήρες γονιδίωμα.

Πειραματικό μέρος

Όργανα — υλικά

- Πιπέτες των 20, 100 και 200 μl
- Αποστειρωμένο σωληνάκι erpendorf 0,5 ml
- Αποστειρωμένα ακροφύσια (tips) των 20, 200 και 1000 μl
- Γάντια
- Θερμοκυκλοποιητής
- Πάγος
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος

Διαλύματα

- Αντιδραστήριο αλληλούχισης
- Εκκινητής
- 0.5M EDTA
- Αποστειρωμένο απιονισμένο νερό
- 100% Αιθανόλη

Μετά τον καθαρισμό και την ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR, για κάθε κομμάτι DNA για το οποίο θέλουμε να προσδιορίσουμε τη νουκλεοτιδική του αλληλουχία ετοιμάζουμε την παρακάτω αντίδραση:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Terminator Ready Reaction mix	2 μl ήδη μέσα στο σωληνάριο
Εκκινητής	1 μl (3.2 μmole)
DNA	X μl (έως 5 μl)
SDW (νερό)	Y μl
Σύνολο	10 μl

Αμέσως μετά, φυγοκεντρούμε τα δείγματα μας για 5 δευτερόλεπτα και τα τοποθετούμε στο θερμοκυκλοποιητή. Προγραμματίζουμε τη συσκευή PCR ως εξής:

1. 96°C for 10λεπτά
2. 96°C for 10 δευτερόλεπτα
3. 50 °C for 20 δευτερόλεπτα
4. 60 °C for 4 λεπτά
5. go to step 2 for 40 times
6. 4°C for ever

Πριν τη τοποθέτηση των αντιδράσεων στο γενετικό αναλυτή θα πρέπει να απομακρυνθούν τα φθορίζοντα διδεοξυριβονουκλεοτίδια που δε χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

Η απομάκρυνση των διδεοξυριβονουκλεοτιδίων γίνεται με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

Απομάκρυνση διδεοξυριβονουκλεοτιδίων

1. Σε ένα σωληνάριο 1,5ml τοποθετήστε 5μl από 125mM EDTA, pH 8.0
2. Τοποθετήστε το περιεχόμενο της κάθε αντίδρασης στο παραπάνω σωληνάριο
3. Μετά την ανάμιξη φυγοκεντρήστε για 5 δευτερόλεπτα
4. Τοποθετήστε 60 μl 100% αιθανόλης σε κάθε σωληνάριο και μετά την ανάμιξη επώαστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5. Φυγοκεντρήστε για 20 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα και απομακρύνετε το υπερκείμενο με πιπέτα
6. Τοποθετήστε 250μl 70% αιθανόλης και φυγοκεντρήστε για 5 λεπτά
7. Απομακρύνετε το υπερκείμενο και τοποθετήστε τα σωληνάρια στους 37°C για 5 λεπτά.
8. Επαδιαλύστε σε 12μl HD-Formamide
9. Ανάδευση τουλάχιστον για 30 δευτερόλεπτα στο vortex
10. Αποδιατάξτε το DNA τοποθετώντας τις αντιδράσεις αρχικά για 5 λεπτά στους 95°C και στη συνέχεια στους 4°C(πάγος).
11. Έπειτα μεταφέρονται στο γενετικό αναλυτή (sequencer).

Βιβλιογραφία

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, USA.
2. Becker, J.M., Caldwell, G.A. and Zachgo, E.A. (1996). *Biotechnology: A Laboratory Course*. Academic Press, London, United Kingdom.