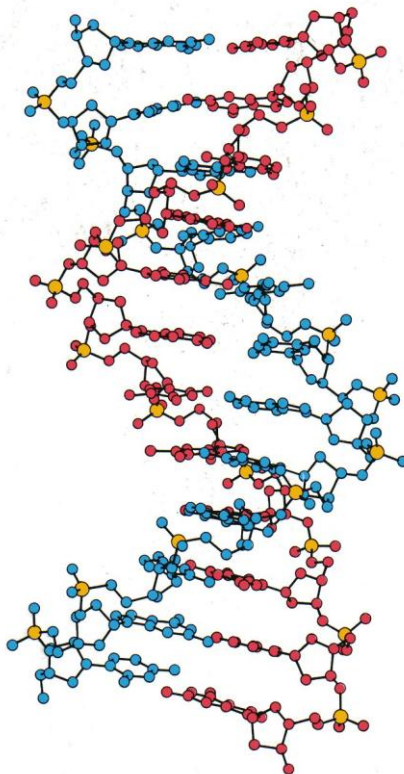




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΠΑΤΡΩΝ  
UNIVERSITY OF PATRAS

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ Ι

Π. ΚΑΤΣΩΡΗΣ  
Σ. ΤΣΑΚΑΣ

ΠΑΤΡΑ 2020

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Ι αποτελείται από **τρεις εργαστηριακές ασκήσεις** που συνιστούν **μία ενότητα** με το γενικό τίτλο **“Χαρτογράφηση πλασμιδίου με ένζυμα περιορισμού”** και **μία “άσκηση Βιοπληροφορικής με θέμα “Σύγκριση πεπτιδικών και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών”**. Το τελικό αποτέλεσμα της πρώτης ενότητας είναι να βρεθούν οι θέσεις αναγνώρισης δύο ενζύμων περιορισμού πάνω σε ένα πλασμίδιο και της δεύτερης να βρεθούν οι αλληλουχίες δύο πεπτιδικών και δύο νουκλεοτιδικών αλυσίδων και να συγκριθούν μεταξύ τους, ώστε να βρεθούν οι διαφορές τους και ο βαθμός ομολογίας τους.

Συνοπτικά, οι ασκήσεις έχουν ως εξής:

**Άσκηση 1.** Απομόνωση πλασμιδίου

**Άσκηση 2.** Πέψη του πλασμιδίου από ένζυμα περιορισμού

**Άσκηση 3.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης

**Άσκηση 4.** Σύγκριση πεπτιδικών και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Για τη διεξαγωγή των ασκήσεων **οι φοιτητές πρέπει να είναι εξοικειωμένοι με τους όρους** προκαρυωτικός οργανισμός, βακτήριο, αμινοξέα, πρωτεΐνες, DNA, πλασμίδιο, νουκλεοτίδιο, φωσφοδιεστερικός δεσμός, πεπτιδικός δεσμός, δεσμοί υδρογόνου, ένζυμο περιορισμού, αλληλουχία αναγνώρισης, ρυθμιστικό διάλυμα, φασματοφωτομετρία, υπερελίκωση, και ηλεκτροφόρηση οι οποίοι είναι γνωστοί από το μάθημα Βιολογία Κυττάρου Ι, από τη Βιοχημεία καθώς και τη Μοριακή Βιολογία Ι.

### Παρατηρήσεις

Όλοι οι εκπαιδευόμενοι πρέπει να φορούν **εργαστηριακή ποδιά** κατά τη διάρκεια των ασκήσεων.

Για τη διεξαγωγή των ασκήσεων θεωρείται δεδομένη η **γνώση της ύλης** του φυλλαδίου της αντίστοιχης άσκησης.

Σε κάθε άσκηση μπορεί να γίνει **γραπτή εξέταση** 10 λεπτών πάνω στην πορεία της άσκησης.

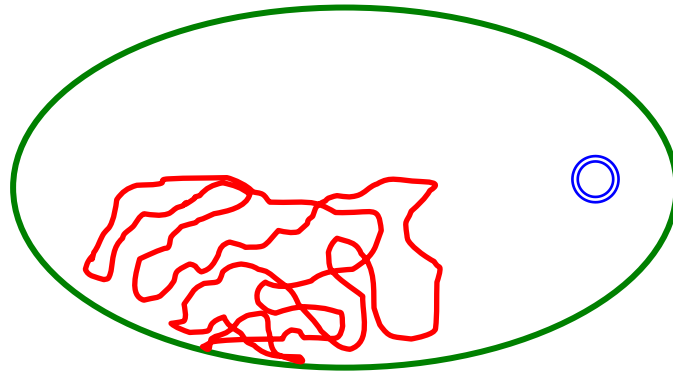
Η **παρουσία** είναι **υποχρεωτική** για όλες τις ασκήσεις.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΣΚΗΣΗ 1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ	
Απομόνωση DNA . . . . .	7
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA . . . . .	8
Πειραματικό μέρος. . . . .	11
ΑΣΚΗΣΗ 2. ΠΕΨΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ	
Ένζυμα περιορισμού . . . . .	15
Πειραματικό μέρος. . . . .	17
ΑΣΚΗΣΗ 3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΕΨΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ	
Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA . . . . .	21
Κατασκευή χάρτη περιορισμού . . . . .	22
Πειραματικό μέρος. . . . .	24
ΑΣΚΗΣΗ 4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	
Βιοπληροφορική . . . . .	29
Γενικά . . . . .	29
Εφαρμογές . . . . .	30
Πειραματικό μέρος . . . . .	32
ΠΑΡΑΔΟΤΕΑ . . . . .	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ . . . . .	41





## **ΑΣΚΗΣΗ 1**

### **ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ**

ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ



## **ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA**

Η απομόνωση μιας άθικτης δομής ευκαρυωτικού χρωμοσωματικού DNA είναι πολύ δύσκολη λόγω του μεγάλου μεγέθους και της εύθραυστης φύσης του. Διάφορες μέθοδοι απομόνωσης αναπτύχθηκαν για να δώσουν DNA σε μια βιολογικώς ενεργή μορφή, αλλά αυτό δεν σημαίνει ότι είναι εντελώς άθικτο. Αυτές οι μέθοδοι δίνουν DNA το οποίο είναι σταθερό, υψηλού μοριακού βάρους και σχετικά καθαρό, αναφορικά με RNA και πρωτεΐνες.

Ο σχεδιασμός μίας διαδικασίας απομόνωσης DNA απαιτεί πολύ καλή γνώση της χημικής σταθερότητας του DNA, όπως επίσης και της κατάστασής του στο κυτταρικό περιβάλλον. Οι πειραματικές παράμετροι οι οποίες θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψη, καθώς και οι επιδράσεις τους στη δομή του άθικτου DNA είναι οι εξής :

### **pH.**

- α) Οι υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων είναι σταθεροί μεταξύ pH 4 και 10.
- β) Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί στο σκελετό του DNA είναι σταθεροί μεταξύ pH 3 και 12.
- γ) Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί των πουρινικών βάσεων (A, G) υδρολύονται σε τιμές pH < 3.

### **Θερμοκρασία**

- α) Υπάρχει σημαντική διακύμανση της θερμικής σταθερότητας των υδρογονικών δεσμών στη διπλή έλικα, αλλά τα περισσότερα DNA αρχίζουν να τήκονται στην περιοχή των 80-90 °C.
- β) Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί είναι σταθεροί μέχρι τους 100 °C.

### **Ιοντική ισχύς**

Το DNA είναι περισσότερο σταθερό και διαλυτό σε διαλύματα αλάτων. Συγκεντρώσεις άλατος μικρότερες των 50 mM εξασθενούν τους υδρογονοδεσμούς μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων.



## **Κυτταρικές συνθήκες**

α) Πριν ελευθερωθεί το DNA, το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου πρέπει να λυθεί. Η ευκολία με την οποία θραύεται το κυτταρικό τοίχωμα διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτείται παρατεταμένη σύνθλιψη ή κατεργασία με υπερήχους, ενώ σε άλλες περιπτώσεις απαιτείται ενζυμική υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος.

β) Διάφορα ένζυμα που υπάρχουν στο κύτταρο μπορεί να συμβάλλουν στην αποικοδόμηση του DNA, αλλά η μεγαλύτερη καταστροφή γίνεται από τις δεοξυριβονουκλεάσες. Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών.

γ) Όσον αφορά το DNA των ευκαριωτικών κυττάρων, αυτό βρίσκεται ως σύμπλοκο με ειδικές βασικές πρωτεΐνες που λέγονται ιστόνες και πρέπει να απομακρυνθούν από το DNA κατά τη διαδικασία της εκχύλισης του.

## **Μηχανική καταπόνηση του DNA**

Κατά τη διαδικασία της απομόνωσης θα πρέπει πάντα να γίνονται ήπιοι χειρισμοί. Η ανακίνηση, η ανάδευση καθώς και διάφορες άλλες διαδικασίες μπορεί να προκαλέσουν σπάσιμο των αλυσίδων του DNA. Οι διαδικασίες αυτές συνήθως δεν αλλοιώνουν τη δευτεροταγή δομή του DNA, αλλά μειώνουν το μήκος των μορίων (λόγω θραύσης).

## **ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΜΙΚΡΟΜΕΘΟΔΟ (MINI - PREP)**

Η δυνατότητα απομόνωσης **πλασμιδιακού DNA** είναι πολύ σημαντική τόσο στην έρευνα του ανασυνδυασμένου DNA, όσο και σε άλλες εφαρμογές της Μοριακής Βιολογίας. Ο καθαρισμός πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα είναι μια χρονοβόρα διαδικασία που δίνει μεν υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακό DNA, απαιτεί όμως και μεγάλες ποσότητες υλικών. Ωστόσο πολλές από τις μεθόδους της Γενετικής Μηχανικής όπου χρησιμοποιούνται τα πλασμίδια, δεν απαιτούν το πλασμιδιακό DNA να είναι υψηλής καθαρότητας. Για παράδειγμα, όταν σαρώνεται ένας μεγάλος αριθμός κλώνων, είναι πιο σημαντικό να απομονωθούν γρήγορα μικρές ποσότητες μέτρια καθαρών πλασμιδίων, παρά να σπαταλιέται χρόνος για να απομονωθεί υψηλής καθαρότητας DNA. Γι αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν μέθοδοι με

τις οποίες απομονώνονται, αρκετά γρήγορα, μέτριας καθαρότητας πλασμίδια. Επειδή χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες βακτηριακών κυττάρων και τελικά απομονώνονται και μικρά ποσά πλασμιδίων, οι μέθοδοι αυτές αναφέρονται ως **μικροπαρασκευαστικές**. Παρ' όλη τη μικρή ποσότητα κυττάρων που χρησιμοποιούνται η απόδοση σε ό,τι αφορά τα πλασμίδια είναι εντυπωσιακή - συνήθως σε ένα εύρος μεταξύ 1 και 5  $\mu\text{g}$ .

Στις μεθόδους καθαρισμού των πλασμιδίων, το πλασμιδιακό DNA εμπλουτίζεται εκλεκτικά έναντι τον χρωμοσωματικού DNA το οποίο υπάρχει στα κύτταρα σε μεγαλύτερες ποσότητες. Από τις μεθόδους αυτές, οι δύο πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες είναι της **αλκαλικής λύσης** (Bibmoïn και Doly 1979) και του **βρασμού** (Holmes και Quigley 1981). Και οι δύο μέθοδοι περιλαμβάνουν μια διαδικασία καθίζησης των υπολειμμάτων των κυττάρων και των πρωτεϊνών τους, ενώ παράλληλα χρησιμοποιούν τα πλεονεκτήματα των φυσικών ιδιοτήτων των πλασμιδίων για το διαχωρισμό τους από το χρωμοσωματικό DNA. Κάθε μια από αυτές τις μεθόδους μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε 1-2 ώρες. Το **πλασμιδιακό DNA** που προκύπτει είναι σχετικά καθαρό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πειράματα με ένζυμα περιορισμού, σε μετασχηματισμούς ακόμα και στον προσδιορισμό αλληλουχίας DNA (DNA sequencing).

Και στις δύο διαδικασίες, τα κύτταρα καθαίνουν μετά από φυγοκέντρηση και το ίζημα επαναιωρείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Στο **πρωτόκολλο της αλκαλικής λύσης**, τα κύτταρα λύνονται με τη χρήση διαλύματος **SDS και NaOH**. Το SDS και το NaOH εκτός του ότι λύνουν τα κύτταρα, αυξάνουν τη διαλυτότητα και μετουσιώνουν διάφορα κυτταρικά συστατικά, ενώ το υψηλό pH των διαλυμάτων προκαλεί αποικοδόμηση του RNA. Επίσης, οι αλκαλικές συνθήκες επιδρούν και στη δομή του DNA, αποδιατάσσοντας το. Επειδή το χρωμοσωματικό DNA είναι πολύ μεγάλο σε μέγεθος, όταν λύνονται τα κύτταρα, σπάει, ενώ το μικρού μεγέθους πλασμιδιακό DNA παραμένει ανέπαφο. Επίσης, όταν τα πλασμίδια αποδιατάσσονται οι δύο κλώνοι παραμένουν συνδεδεμένοι (όπως οι κρίκοι μιας αλυσίδας). Γι' αυτό και όταν το ομογενοποίημα εξουδετερωθεί με **οξικό κάλιο**, οι υδρογονοδεσμοί επανασχηματίζονται. Επειδή λοιπόν οι συμπληρωματικοί DNA κλώνοι του κάθε πλασμιδίου βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους, λόγω της σύνδεσής τους, οι βάσεις θα ζευγαρώσουν πολύ γρήγορα και θα σχηματίσουν πάλι ένα ολοκληρωμένο και πλήρες δίκλωνο πλασμίδιο. Οι χρωμοσωματικοί όμως κλώνοι δεν βρίσκονται κοντά στους συμπληρωματικούς τους και για αυτό όταν το

διάλυμα εξουδετερωθεί, δεν θα ζευγαρώσουν σ' ολόκληρο το μήκος του, αλλά κατά τμήματα, με αποτέλεσμα να σχηματισθεί ένα αρκετά περιελιγμένο "κουβάρι" DNA. Η μεγάλη συγκέντρωση άλατος (εξ αιτίας της προσθήκης του οξικού καλίου) προκαλεί τη δημιουργία ιζήματος αποτελούμενο από SDS και πρωτεΐνες, το οποίο κατακρημνίζεται. Αυτό το πλέγμα **SDS-πρωτεϊνών** παγιδεύει το **χρωμοσωματικό DNA** και έτσι απομακρύνεται με τη φυγοκέντρηση. Τα πλασμίδια (καθώς και το RNA) που βρίσκονται στο υπερκείμενο κατακρημνίζονται κατόπιν με αλκοόλη και τέλος, επαναδιαλυτοποιούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA.

Η αλκαλική λύση αποδίδει καλά όχι μόνο στο βακτήριο *E. coli* αλλά και σε μια μεγάλη ποικιλία διαφόρων βακτηρίων καθώς επίσης και σε ευρύ φάσμα μεγέθους πλασμιδίων. Η **μέθοδος του βρασμού είναι ακόμα ταχύτερη**, αλλά δείχνει να αποδίδει καλύτερα με την *E. coli* παρά με άλλους οργανισμούς, όπου δεν παρατηρείται αποτελεσματική λύση των κυττάρων. Επίσης, με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης απομονώνονται ευκολότερα μεγάλου μεγέθους πλασμίδια απ' ότι με τη μέθοδο του βρασμού. Ωστόσο, επειδή οι περισσότερες μελέτες ανασυνδυασμού γίνονται στο βακτήριο *E. coli*, η μέθοδος του βρασμού έχει ευρύτερη χρήση λόγω της ταχύτητάς της. Στη μέθοδο του βρασμού, όπως και σ' αυτήν της αλκαλικής λύσης, το πλασμιδιακό DNA εμπλουτίζεται εξ αιτίας της επιλεκτικής απομάκρυνσης των πρωτεϊνών και του χρωμοσωματικού DNA. Επιπλέον, στη μέθοδο του βρασμού τα κύτταρα λύνονται με τη χρήση λυσοζύμης, υψηλής θερμοκρασίας και ενός απορρυπαντικού. Το απορρυπαντικό Triton X-100 διασπά τις μεμβράνες και τις πρωτεΐνες και αδρανοποιεί τις νουκλεάσες σε πολύ μικρότερο βαθμό απ' ότι το SDS στην αλκαλική λύση. Ωστόσο οι νουκλεάσες αδρανοποιούνται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας. Τα κύτταρα λύνονται με βρασμό για μικρό χρονικό διάστημα, γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη σχεδόν ταυτόχρονη λύση του κυττάρου και τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών. Η θερμοκρασία αποδιατάσσει το DNA και εφόσον τα πλασμίδια δεν σπάνε, οι κλώνοι παραμένουν αλληλοσυνδεδεμένοι. Όταν το διάλυμα κρυώσει, τα συνδεδεμένα πλασμίδια επαναδιατάσσονται (σύνδεση συμπληρωματικών κλώνων) σχηματίζοντας άθικτα πλασμίδια. Το χρωμοσωματικό DNA το οποίο σπάει κατά τη λύση, αποδιατάσσεται μη αντιστρεπτά, σχηματίζοντας ένα αδιάλυτο πήκτωμα το οποίο παγιδεύεται στα συσσωματώματα των πρωτεϊνών, τα οποία καθιζάνουν κατά τη φυγοκέντρηση. Το πλασμιδιακό DNA παραμένει στο διάλυμα και μπορεί να

κατακρημνιστεί με χρήση αιθανόλης και στη συνέχεια να επαναδιαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα.

Τα **απομονωμένα πλασμίδια** που προκύπτουν μετά από εφαρμογή των μικρομεθόδων περιέχουν σημαντικά ποσά RNA. Με την αλκαλική λύση το διάλυμα των πλασμιδίων περιέχει μικρότερη ποσότητα RNA απ' ό,τι στην περίπτωση του βρασμού, διότι σε αλκαλικές συνθήκες το RNA καταστρέφεται. Το RNA δεν επιδρά στο μετασχηματισμό των βακτηρίων από τα πλασμίδια, Ωστόσο, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, οι ζώνες του RNA που μεταναστεύουν στο κάτω μέρος του πηκτώματος μπορεί να εκληφθούν ως ζώνες DNA και να προκαλέσουν λανθασμένες ερμηνείες των αποτελεσμάτων. Έτσι, εάν τα κομμάτια του DNA που μας ενδιαφέρουν είναι μικρότερα των 2kb τότε το RNA πρέπει να απομακρυνθεί πριν την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το RNA μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί πέπτοντας το δείγμα με RNAάση.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **Υλικά**

Ρυθμιζόμενη πιπέτα 20-200 μl

Ρυθμιζόμενη πιπέτα 100-1.000 μl

Πιπέτες Pasteur

Μικροφυγόκεντρος

Καλλιέργεια *E. coli*

### **Αντιδραστήρια**

Διάλυμα TE (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM EDTA)

TE - γλυκόζη (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM EDTA, 50mM γλυκόζη)

Διάλυμα αλκαλικής λύσης SDS – NaOH (1% SDS, 0,2 N NaOH)

Οξικό κάλιο (3 M pH 4,8)

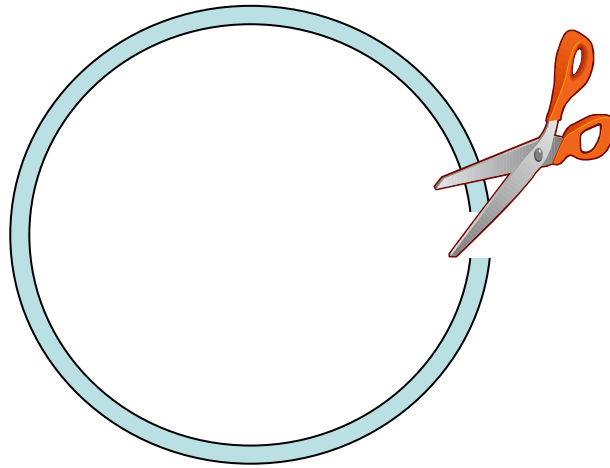
Ισοπροπανόλη

Αιθανόλη απόλυτη

### **Απομόνωση πλασμιδίου με αλκαλική λύση – Πορεία**

Μεταφέρετε σε 4 σωληνάκια από 1,5 ml κορεσμένης καλλιέργειας *E. Coli*

- Φυγοκεντρήστε για 1 min σε 14.000 g, θερμοκρασία δωματίου
- Απομακρύνετε τα υπερκείμενα και προσθέστε 250 μl dH<sub>2</sub>O
- Επαναιωρήστε και αναμείξτε τα βακτήρια σε ένα σωληνάκι
- Φυγοκεντρήστε για 1 min σε 14.000 g, θερμοκρασία δωματίου
- Αδειάστε το υπερκείμενο
- Αιωρήστε τα κύτταρα σε 200 μl TE-γλυκόζη
- Προσθέστε 400 μl διάλυμα λύσης και αναμείξτε ήπια
- Προσθέστε 200 μl διάλυμα οξικού καλίου
- Φυγοκεντρήστε για 5 min σε 14.000 g, θερμοκρασία δωματίου
- Μεταφέρετε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι
- Προσθέστε 500 μl ισοπροπανόλη
- Φυγοκεντρήστε για 10 min σε 14.000 g, θερμοκρασία δωματίου
- Αφαιρέστε το υπερκείμενο και πλύντε το ίζημα με 500μl αιθανόλη 75%



## **ΑΣΚΗΣΗ 2**

# **ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ**

ΠΕΨΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ



## ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

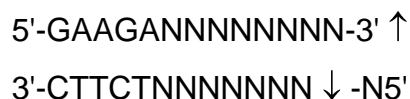
### Ένζυμα περιορισμού

Είναι γνωστό ότι τα **ένζυμα περιορισμού** τύπου II δημιουργούν δίκλωνες εγκοπές στο DNA. Εν τούτοις οι εγκοπές αυτές δεν γίνονται απ' όλα τα ένζυμα με τον ίδιο τρόπο. Γενικά, υπάρχουν τρεις τρόποι πέψης μέσα στην αλληλουχία αναγνώρισης:

- (1) στο κέντρο ή στον άξονα συμμετρίας της αλληλουχίας, οπότε προκύπτουν κομμάτια με τυφλά άκρα, όπως πέπτει το ένζυμο *Hae III*
- (2) εκατέρωθεν του κέντρου, οπότε δημιουργούνται κομμάτια με συμπληρωματικά (συνεκτικά) άκρα και με προεξέχον το 5'-φωσφορικό άκρο, όπως το *EcoR I*
- (3) εκατέρωθεν του κέντρου οπότε δημιουργούνται κομμάτια με συμπληρωματικά άκρα και με προεξέχον το 3'-OH άκρο, όπως το *Pst I*.

(1)	(2)	(3)
-CG3' ↑ 5'CC-	-G3' ↑ 5'AATTC-	-CTGCA3' ↑ 5'G-
-GC5' ↓ 3'GG-	-CTTAA5' ↓ 3'G-	-G5' ↓ 3'ACGTC-
( <i>Hae III</i> )	( <i>EcoR I</i> )	( <i>Pst I</i> )

Ορισμένα ένζυμα περιορισμού, τύπου II, έχουν ασυνήθιστα πρότυπα αναγνώρισης και πέψης. Για παράδειγμα το *Mbo II* αναγνωρίζει την αλληλουχία GAAGA (σημειώστε την έλλειψη της δυαδικής συμμετρίας) και πέπτει μεταξύ του 8<sup>ου</sup> και 9<sup>ου</sup> νουκλεοτιδίου προς τα δεξιά, αφήνοντας μια προέκταση μίας βάσης στο 3' άκρο :



Τα διαφορετικά σημεία πέψης μέσα στις αλληλουχίες αναγνώρισης μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο στο χειρισμό των τμημάτων DNA. Για παράδειγμα, ένα προεξέχον 5'-φωσφορικό είναι ευκολότερο να σημανθεί με  $\gamma^{32}\text{P-ATP}$  μέσω μιας DNA κινάσης, από ένα 3' προεξέχον άκρο. Αντίθετα το προεξέχον 3' άκρο είναι το προτιμητέο υπόστρωμα για μια N-τελική μεταφοράση που χρησιμοποιείται για να συνδέσει πολυνουκλεοτιδικές ουρές σε ένα κομμάτι DNA. Με παρόμοιο τρόπο η *E.*



*coli* DNA πολυμεράση I μπορεί να μετατρέψει ένα συνεκτικό άκρο σε τυφλό, μόνον όταν υπάρχει διαθέσιμο υπολειπόμενο 3'-OH άκρο. Επειδή η έναρξη της σύνθεσης του DNA απαιτεί ένα 3'-OH πρωταρχικό μόριο (primer), το προεξέχον 3'-OH, όπως αυτό που προκύπτει από την πέψη με *Psi I*, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τη DNA πολυμεράση.

Πρέπει να τονισθεί ότι οι αλληλουχίες αναγνώρισης για τα ένζυμα τύπου II καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας ειδικές συνθήκες πέψης. Μερικές φορές, όταν αυτές οι συνθήκες αλλάζουν, η εξειδίκευση του ενζύμου μπορεί να μειωθεί και έτσι να αναγνωριστούν και να πεφθούν προσθετές θέσεις. Για παράδειγμα, το ένζυμο περιορισμού *EcoR I*, αναγνωρίζει κανονικά την αλληλουχία GAATTC αλλά κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης άλατος (50 mM), υψηλού pH (>8) και παρουσία γλυκερόλης, προκύπτει μία νέα ενζυμική ενεργότητα η *EcoR I\** (*EcoR I* ενεργότητας αστέρος, star activity). Το *EcoR I\** αναγνωρίζει θέσεις που διαφέρουν σε μία νουκλεοτιδική θέση από την αρχική αλληλουχία. Κάθε υποκατάσταση μπορεί να συμβεί σε καθεμία από τις έξι θέσεις με εξαίρεση τις T → A ή A → T αλλαγές στο κεντρικό τετρανουκλεοτίδιο. Επειδή οι *EcoR I\** θέσεις έχουν παρόμοια εξανουκλεοτιδική αλληλουχία με αυτά της *EcoR I* θέσης (π.χ. GAATTA, AAATTC), η εμφάνιση των πιθανών θέσεων πέψης είναι 15 φορές πιο συχνή από τις *EcoR I* θέσεις. Παράλληλα με το *EcoR I\** μια παρόμοια ενεργότητα αστέρος έχει βρεθεί για το *BamH I\**. Ορισμένα ένζυμα δείχνουν τη βέλτιστη ενεργότητα μόνο κάτω από σχετικά ειδικές συνθήκες αντίδρασης, ενώ αλλαγή στο pH ή στις ιοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεάσουν δραστικά την ενεργότητα του ενζύμου. Γι αυτό, είναι σημαντικό να επιμένουμε στις συνθήκες αντίδρασης που προτείνονται από την προμηθεύτρια εταιρία για το ειδικό ένζυμο περιορισμού.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Υλικά

Ρυθμιζόμενη πιπέτα 10-100 μl

Ρυθμιζόμενη πιπέτα 100-1.000 μl

Υδατόλουτρο 37°C

Φωτόμετρο υπεριώδους

Κυβέτα χαλαζία

### Αντιδραστήρια

Διάλυμα επώασης

Διάλυμα με ένζυμο περιορισμού E1

Διάλυμα με ένζυμο περιορισμού E2

Απομονωμένα πλασμίδια

### Πέψη με ένζυμο περιορισμού – Πορεία

- Όλα τα διαλύματα βρίσκονται σε πάγο
- Ετοιμάστε τρία σωληνάκια με τις ενδείξεις 1, 2, 3 και βάλτε τα σε πάγο.
- Προσθέστε σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα

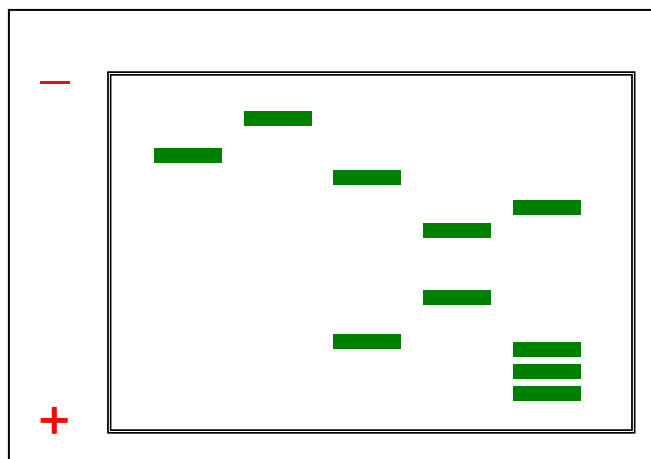
	dH <sub>2</sub> O	Πλασμίδιο	Ρυθμιστικό	E1	E2
1	30	10	5	5	-
2	30	10	5	-	5
3	70	10	10	5	5

- Κλείστε τα καπάκια και μεταφέρετε τα σωληνάκια σε υδατόλουτρο 37°C
- Επώαση για 30-45 min
- Μεταφέρετε τα δείγματα στην κατάψυξη -20 °C

### Φωτομέτρηση διαλύματος απομονωμένων πλασμιδίων – Πορεία

- Σε σωληνάκι με 1 ml H<sub>2</sub>O προσθέτουμε 5 μl διάλυμα με πλασμιδιακό DNA
- Με τη χρήση κυβέτας χαλαζία φωτομετρούμε και καταγράφουμε OD στα 260 και 280 nm





## **ΑΣΚΗΣΗ 3**

### **ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA**

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΕΨΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ



## ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Στην αρχή της δεκαετίας του 1970 βρέθηκε ότι το **μήκος** και η **καθαρότητα** των μορίων **DNA** μπορούν να καθοριστούν επακριβώς με τις ίδιες μεθόδους **ηλεκτροφόρησης** σε πηκτώματα, που είχαν αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμες για την ανάλυση των πρωτεϊνών. Η διαδικασία είναι στην πραγματικότητα πιο απλή από αυτή για τις πρωτεΐνες. Κάθε νουκλεοτίδιο, σ' ένα μόριο νουκλεϊκού οξέος, έχει ήδη ένα μόνο αρνητικό φορτίο. Συνεπώς, δεν χρειάζεται να προστεθεί το αρνητικά φορτισμένο SDS (που απαιτείται στην περίπτωση των πρωτεϊνών, ώστε αυτές να μετακινούνται ομοιόμορφα προς το θετικό ηλεκτρόδιο).

Τα **νουκλεϊκά οξέα** σε διάλυμα γενικά έχουν **αρνητικό φορτίο** γιατί οι φωσφορικές ομάδες τους είναι ιοντισμένες, έτσι μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Παρ' όλα αυτά, τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων που αποτελούνται από μεγάλες αλυσίδες (κλώνους) έχουν σχεδόν ίδιο λόγο **φορτίο/μάζα**, ανεξάρτητα του μήκους τους, γιατί κάθε νουκλεοτίδιο συμβάλλει με το ίδιο περίπου φορτίο και μάζα. Παρά τις δυσκολίες αυτές, ο **ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων DNA** με βάση το **μήκος της αλυσίδας** τους έχει γίνει εκπληκτικά αξιόπιστος. Τα μόρια υποβάλλονται σε **ηλεκτροφόρηση πηκτώματος**. Το μέγεθος των πόρων σε τέτοια πηκτώματα περιορίζει το ρυθμό μετακίνησης των μορίων μέσα από αυτά. Τα νουκλεϊκά οξέα με τους ίδιους λόγους φορτίο/μάζα διαχωρίζονται με βάση το μήκος τους, με τα μεγαλύτερα να μετακινούνται πιο αργά. Τα πηκτώματα που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων είναι είτε πολυακρυλαμιδίου, είτε αγαρόζης. Ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με μικρούς πόρους χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μονόκλωνου DNA. Στην περιοχή μεγέθους 10 έως 500 νουκλεοτίδια, μόρια DNA που διαφέρουν στο μέγεθος κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους. Ένα πήκτωμα αγαρόζης με μετρίου μεγέθους πόρους χρησιμοποιείται κυρίως για περιοχές μεγέθους 300 έως 10.000 ζεύγη νουκλεοτιδίων, όπως τμήματα DNA που προέρχονται από πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού.

### Περιοχές διαχωρισμού DNA με πήκτωμα αγαρόζης

(Αγαρόζη % w/v)	Περιοχή (Kb)
0,3	5-50
0,5	2-25
0,7	0,8-10
1,2	0,4-5
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Οι ζώνες του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου δεν φαίνονται παρά μόνο αν το DNA είναι σημασμένο ή βαμμένο με κάποιο τρόπο. Μια ευαίσθητη μέθοδος χρώσης του DNA είναι η έκθεσή του στο αντιδραστήριο **βρωμιούχο αιθίδιο**. Το σύμπλοκο **DNA - βρωμιούχο αιθίδιο** φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως.

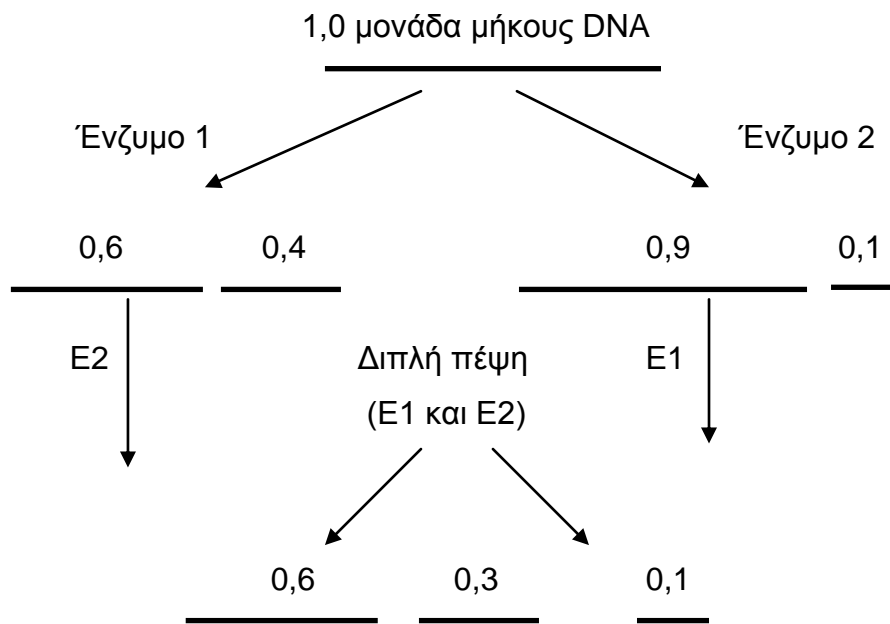
### **Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα**

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα γίνεται με απόχυση ενός υγρού που περιέχει είτε λιωμένη αγαρόζη είτε υγρό πολυακρυλαμίδιο σ' ένα ορθογώνιο πλαίσιο ή ανάμεσα σε δύο παράλληλα κομμάτια γυαλιού με διάκενο 1-2 mm. Καθώς το πήκτωμα στερεοποιείται, σχηματίζει ένα δίκτυο πόρων, των οποίων το μέγεθος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης ή του ακρυλαμιδίου. Τα προς διαχωρισμό μόρια DNA (ή RNA) μόρια τοποθετούνται στο πήκτωμα προς τον αρνητικό πόλο (κάθοδος) του κυκλώματος και εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Η μετακίνηση του DNA εξαρτάται από τα φορτία των φωσφορικών ομάδων. Σε ουδέτερο pH τα νουκλεϊκά οξέα έχουν ένα αρνητικό φορτίο ανά φωσφορική ομάδα.

### **ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΧΑΡΤΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RESTRICTION MAPPING).**

Η πέψη ενός δείγματος καθαρού DNA με δύο ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού μπορεί να δείξει τη διάταξη των θέσεων περιορισμού επάνω στο DNA (Σχήμα 1). Επίσης, αρκετές θέσεις μπορεί να εντοπισθούν με μερική πέψη με ένα μόνο ένζυμο, ενός δείγματος DNA που φέρει σημασμένα άκρα. Με αυτούς τους

τρόπους είναι δυνατόν να κατασκευαστεί ένας χάρτης που να δείχνει τη διάταξη των θέσεων περιορισμού σε οποιαδήποτε περιοχή του DNA. Μια σημαντική εφαρμογή των ενζύμων περιορισμού είναι η χρήση τους για την απομάκρυνση του ενός μόνο άκρου ενός δείγματος DNA το οποίο έχει σημειωθεί στα άκρα. Το μοναδικό αυτό σημασμένο άκρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σημείο αναφοράς για τη μέτρηση αποστάσεων.



**Σχήμα 1.** Χαρτογράφηση των θέσεων πέψης δύο ενζύμων περιορισμού. α) Όταν το συγκεκριμένο τμήμα DNA πεφθεί χωριστά με κάθε ένα από αυτά τα δύο ένζυμα περιορισμού (1 και 2), τότε το DNA κόβεται μόνο μία φορά. Τα μήκη των κομματιών καθορίζονται ηλεκτροφορητικά. β) Για τον καθορισμό των σχετικών θέσεων πέψης πάνω στο DNA, πραγματοποιείται πέψη και με τα δύο ένζυμα συγχρόνως. Τα μήκη των τμημάτων καθορίζουν τις θέσεις περιορισμού για τα ένζυμα 1 και 2 σε σχέση με τα άκρα του DNA και επομένως και τη μεταξύ τους απόσταση.



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Υλικά

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

Τροφοδοτικού συνεχούς ρεύματος

Αναδευτήρας με θερμαντική πλάκα

Κωνική φιάλη

Μαγνητάκι ανάδευσης

Ζυγός

### Αντιδραστήρια

Αγαρόζη

Διάλυμα TAE (40 mM Tris-οξικό, pH 7,8 - 2 mM EDTA)

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TAE 0,5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο)

Διάλυμα δειγμάτων (50% v/v γλυκερόλη)

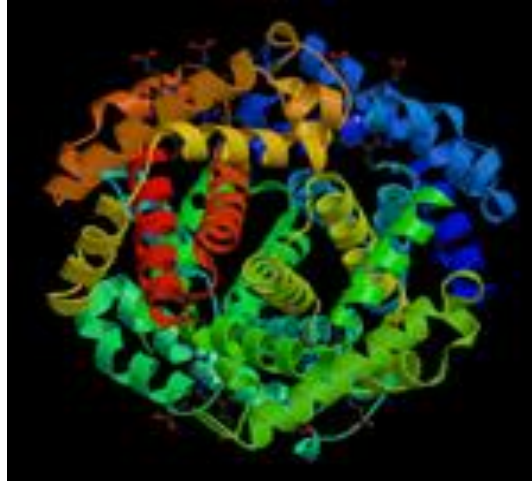
### Ηλεκτροφόρηση – Πορεία

- Ζυγίστε 0,5 gr αγαρόζη
- Προσθέστε σε μια κωνική φιάλη 50 ml διάλυμα TAE και ένα μαγνητάκι
- Τοποθετείστε τη φιάλη στη θερμαντική πλάκα ενός αναδευτήρα
- Ξεκινήστε ανάδευση και θέρμανση
- Προσθέστε την αγαρόζη
- Όταν το διάλυμα αρχίζει να βράζει και γίνει διαυγές απομακρύνετε τη φιάλη από τον αναδευτήρα και αφού ψυχθεί περίπου στους 40°C προσθέστε 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο.
- Χύστε την υγρή αγαρόζη στην πλάκα ηλεκτροφόρησης, σε ένα πάχος 2-4 mm.
- Τοποθετείστε το χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις εναπόθεσης (πηγαδάκια) των δειγμάτων.
- Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα (~ 30 min) αφαιρέστε το χτενάκι.
- Τοποθετείστε το πήκτωμα με τη βάση του στο δοχείο ηλεκτροφόρησης και προσθέστε διάλυμα ηλεκτροφόρησης μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα. Εξισορροπήστε για 30 min.
- Τοποθετείστε τα δείγματα μέσα στα πηγαδάκια, με τη βοήθεια πιπέτας.

- Συνδέστε το τροφοδοτικό και ηλεκτροφορέϊστε στα 30 V.
- Όταν το μέτωπο του μπλε της βρωμοφαινόλης φθάσει 0.5 cm από το απέναντι άκρο του πήκτωματος, κλείστε το τροφοδοτικό.
- Απομακρύνετε την πλάκα ηλεκτροφόρησης και τοποθετείστε το πήκτωμα σε προβολέα U.V.

**Η ακτινοβολία UV είναι επικίνδυνη και μπορεί να προκαλέσει εγκαύματα στα μάτια και στο δέρμα. Ποτέ μην κοιτάτε απ' ευθείας στο φως UV. Πάντα να φοράτε προστατευτικά γυαλιά ή παρατηρείτε το πήκτωμα μέσω ενός φίλτρου UV.**





## **ΑΣΚΗΣΗ 4**

### **ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ**

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ  
ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ



## ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ

Η λέξη "Βιοπληροφορική" σχετίζεται ετυμολογικά με τις λέξεις "πληροφορία" και "βίος" (=ζωή). Η **Βιοπληροφορική** είναι η εφαρμογή υπολογιστικών τεχνικών και μεθόδων στην προσπάθεια κατανόησης και οργάνωσης των δεδομένων και πληροφοριών που σχετίζονται με τα βιολογικά μακρομόρια. Ο όγκος των σημερινών δεδομένων που παράγονται στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας και πρέπει να αναλυθούν και να επεξεργαστούν, καθιστά απαραίτητη τη συνεργασία, σε πολλούς τομείς, με την επιστήμη της Πληροφορικής. Ο επιστημονικός χώρος της ένωσης αυτών των πεδίων ονομάζεται διεθνώς **Βιοπληροφορική** (bioinformatics). Η ανάλυση ακολουθιών του DNA, η μοριακή μοντελοποίηση βιολογικών μορίων, ο σχεδιασμός φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών, η πρόβλεψη των πρωτεϊνικών δομών, οι ταχύτερες μέθοδοι αποθήκευσης, διαχείρισης και ανάκτησης βιολογικών πληροφοριών είναι ορισμένοι από τους τομείς ενδιαφέροντος στην επιστήμη της Βιοπληροφορικής.

## ΓΕΝΙΚΑ

Η Βιοπληροφορική είναι η επιστήμη η οποία παρέχει τα εργαλεία και τις μεθόδους τα οποία υποστηρίζουν την ανάγκη για την εκμετάλλευση υπολογιστικής ισχύος και την εξαγωγή γνώσης από βιολογικά δεδομένα. Η έρευνα σε αυτήν την περιοχή περιλαμβάνει την ανάλυση γενετικής/γονιδιωματικής πληροφορίας, με στόχο την πρόβλεψη, ή τον ακριβή καθορισμό βιολογικών λειτουργιών. Για το σκοπό αυτό, συνδυάζονται πολλές επιστήμες από διαφορετικές περιοχές, όπως Γονιδιωματική, Πληροφορική, Φαρμακευτική, Μοριακή Βιολογία, Στατιστική, Φυλογενετική κλπ.

Τα βασικά βήματα για να εφαρμοστεί η Βιοπληροφορική είναι αρχικά η αποδοτική οργάνωση των δεδομένων ώστε να είναι δυνατή:

- η αποθήκευση,
- η ανάκτηση και
- η ενημέρωσή τους

Κατά δεύτερον, να υπάρχουν τα κατάλληλα εργαλεία που να επιτρέπουν την ανάλυση των βιολογικών δεδομένων (για παράδειγμα, η ακολουθία μιας πρωτεΐνης, να μπορεί να συγκριθεί με ήδη ταυτοποιημένες ακολουθίες).

Ένας βασικός τομέας της Βιοπληροφορικής είναι η χρήση των υπολογιστών για την τέλεση πειραμάτων και την εξαγωγή αποτελεσμάτων από αυτά. Σήμερα, λόγω της ανάπτυξης της τεχνολογίας των γραφικών και επειδή υπάρχουν πανάκριβα μηχανήματα, κυρίως Μοριακής Βιολογίας, είναι δυνατή, η απεικόνιση των διαμορφώσεων της δομής των βιολογικών μορίων στην οθόνη του υπολογιστή. Τέτοια μηχανήματα είναι και αυτά με τα οποία έγινε η ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος και η αποκρυπτογράφηση του DNA. Η χαρτογράφηση του γονιδιώματος του ανθρώπου έχει συμβάλει ουσιαστικά στην προώθηση της βιολογικής μας αυτογνωσίας με σημαντικότερες εφαρμογές στο επίπεδο της υγείας, αλλά και στην κατανόηση της εξέλιξής μας.

## **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

Η αποκάλυψη ποικίλων γονιδιακών παραλλαγών, πολλές από τις οποίες εμπλέκονται στην εκδήλωση ασθενειών, σε συνδυασμό με την προσομοιωτική με Η/Υ μεθοδολογία, θα συμβάλλει στην εφαρμογή της προσωπικής – εξατομικευμένης ιατρικής καθώς και στην ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην αποτελεσματικότητα των φαρμάκων και των παρενεργειών τους (Computer-aided Drug Design).

Ένας άλλος μεγάλος τομέας της Βιοπληροφορικής είναι οι βάσεις δεδομένων. Με την αποκωδικοποίηση του DNA και των πρωτεϊνών του ανθρώπου αλλά και πάρα πολλών άλλων οργανισμών δημιουργήθηκαν μεγάλες βάσεις δεδομένων για την καταγραφή τους. Χαρακτηριστικός είναι ο αριθμός των βάσεων που είναι καταχωρημένες στις τρεις μεγάλες βάσεις δεδομένων που αφορούν το DNA (Genbank, EMBL, DDBJ) ο οποίος ξεπερνάει αυτήν την στιγμή τα 20 τρισεκατομμύρια! Άμεση βέβαια είναι η ανάγκη για εργαλεία-λογισμικά πληροφορικής τα οποία θα χειριστούν και ταξινομήσουν την πληροφορία αυτή και ταυτόχρονα θα εξάγουν περισσότερα συμπεράσματα.

Ένας άλλος τομέας της Βιοπληροφορικής είναι η Δομική Βιολογία ή αλλιώς η παρουσίαση των δομών διάφορων βιολογικών μακρομορίων. Να διευκρινίσουμε ότι η γνώση της δομής στο χώρο των μακρομορίων αυτών είναι αυτή που θα δώσει την απάντηση σε πάρα πολλές ασθένειες καθώς οι περισσότερες οφείλονται σε προβληματική λειτουργία των πρωτεϊνών που σχετίζονται με αυτές. Η

Βιοπληροφορική ασχολείται τόσο με την απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής που έχει προκύψει από πειραματικά δεδομένα όσο και με την πρόβλεψή της με διάφορους αλγόριθμους που έχει υποτεθεί ότι ισχύουν για τις δομές των πρωτεϊνών. Στην περίπτωση των τρισδιάστατων δομών χρειάζονται εξαιρετικά ισχυροί ηλεκτρονικοί υπολογιστές και είναι ένας τομέας που οδηγεί τους κατασκευαστές των υπολογιστών σε όλο και πιο νέες και πιο δυνατές τεχνολογίες.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, μπορούμε να πούμε πως οι εφαρμογές της Βιοπληροφορικής συνοψίζονται στην ανεύρεση της λειτουργίας των πρωτεϊνών, ομαδοποίηση πρωτεϊνών σε λειτουργικές ομάδες, ανεύρεση αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών μεταξύ τους και κατανόηση της πολυπλοκότητας των βιολογικών συστημάτων, στη σύγκριση του γονιδιώματος διαφόρων ειδών, και στην εύρεση των εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών μεταξύ τους, στην απόκτηση γνώσης για το ρόλο των μη κωδικοποιημένων περιοχών του DNA στη μορφολογία και έκφραση των γονιδίων, στην προσπάθεια αντιμετώπισης διαφόρων ασθενειών με την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών μέτρων και θεραπευτικών μεθόδων, στην παραγωγή πιο αποτελεσματικών φαρμακευτικών προϊόντων με όλο και περισσότερες εφαρμογές τα επόμενα έτη στην Βιολογία και στην Ιατρική.

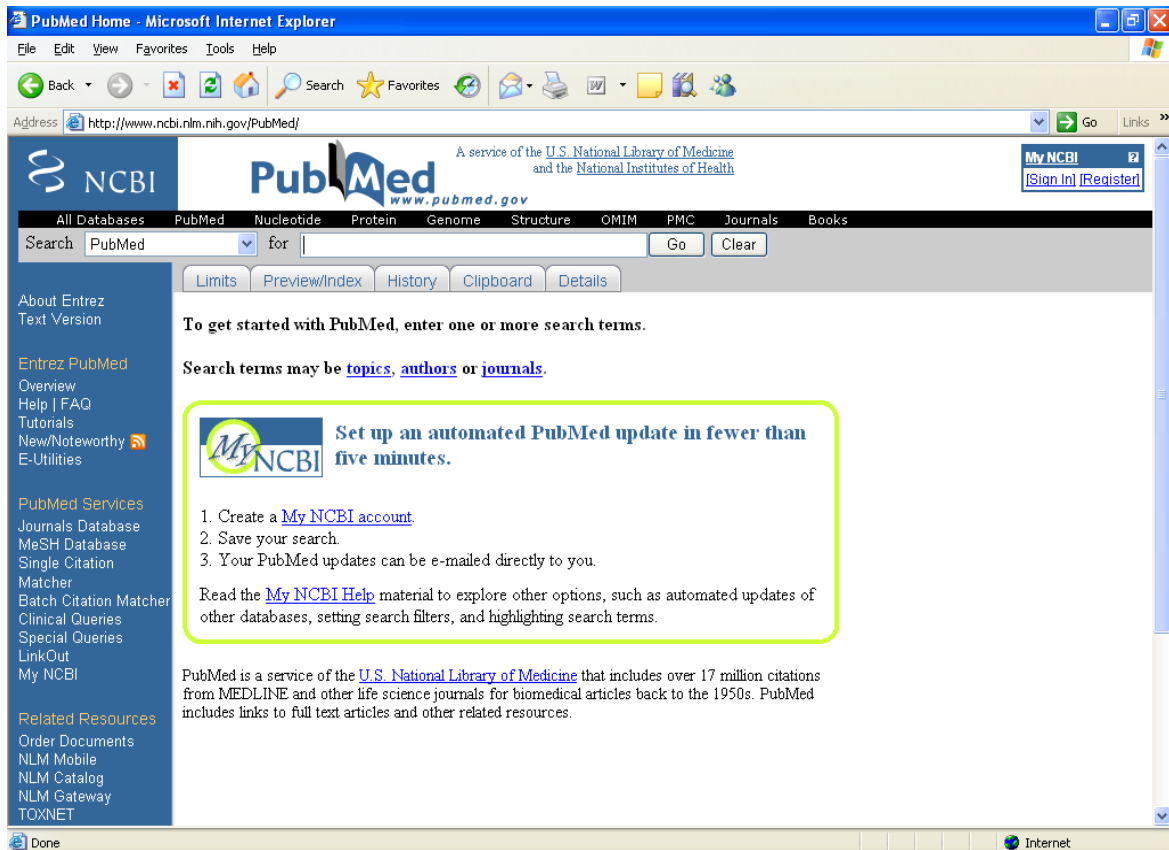
Οι μελλοντικές επιδιώξεις εστιάζονται στο υπάρχον έλλειμμα υπολογιστικής ισχύος που δεν καλύπτει τη βιολογική πολυπλοκότητα. Γι' αυτό «επιστρατεύεται» η Βιοχημεία για το σχεδιασμό βιοχημικών δικτύων και η Φυσικοχημεία για την καλύτερη κατανόηση των μικρών διαστάσεων του κυττάρου και των οργανιδίων του.



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων της β αλυσίδας της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης

Στην άσκηση αυτή θα χρησιμοποιηθεί ο δικτυακός τόπος (site) της Εθνικής Βιβλιοθήκης της Ιατρικής και των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Ο τόπος αυτός περιέχει όλα τα εργαλεία για την αναζήτηση διαφόρων πρωτότυπων εργασιών που έχουν δημοσιευτεί σε έγκυρα επιστημονικά περιοδικά, που αφορούν τον τομέα υγείας (PubMed) (Βιολογία, Ιατρική, Φαρμακευτική, Χημεία), από όλο τον κόσμο, καθώς και κατάλληλο λογισμικό για την εύρεση των διαφόρων αλληλουχιών και τη σύγκριση μεταξύ τους.



Για την εύρεση μιας αμινοξικής αλληλουχίας, το πρώτο βήμα είναι η επιλογή του πεδίου 'protein' στη θέση αναζήτησης (**Search**). Στην άσκηση πρέπει να βρεθούν οι αμινοξικές αλληλουχίες των β αλυσίδων της φυσιολογικής (Hb A) και της

δρεπανοκυτταρικής (Hb S) αιμοσφαιρίνης και στη συνέχεια να συγκριθούν για να βρεθούν οι διαφορές και ο βαθμός ομολογίας τους.

Το επόμενο βήμα για την εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων της β αλυσίδας της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης είναι να γράψουμε τη λέξη 'Hb A' στη γραμμή αναζήτησης.

The screenshot shows a Microsoft Internet Explorer browser window displaying the NCBI Entrez Protein search results for 'Hb A'. The address bar shows the URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez. The search bar contains 'Protein' and 'Hb A'. The results are displayed in a table with 5 items shown. The first item is 'hemoglobin, Hb [Paramecium caudatum]' with accession number AAB24268. The second item is 'hb [Mus musculus]' with accession number CAA57288. The third item is 'DNA-binding protein HU 1 (DNA-binding protein II; HB) [Campylobacter concisus 13826]' with accession number YP\_001466788. The fourth item is 'hydrolase B, serine esterase, HB=mitochondrial carboxylesterase (N-terminal) (EC 3.1.1.1) [rats, liver, Peptide Partial, 30 aa]' with accession number AAB32670. The fifth item is 'hemoglobin alpha chain Hb-A [Homo sapiens] blood Peptide 141 aa' with accession number AAB23120. The search results show a total of 3364 items, with 157 in Bacteria, 279 RefSeq, and 2662 Related Structures. The page is on page 1 of 169.

Παρατηρούμε ότι ο αριθμός των αποτελεσμάτων αναζήτησης είναι 3.364. Για να μειώσουμε τον αριθμό αυτό διαλέγουμε και προσθέτουμε νέες λέξεις ή φράσεις κλειδιά που σαφώς συγκεκριμενοποιούν αυτό που αναζητάμε, όπως η φράση 'beta chain' (β αλυσίδα). Μπορούμε επίσης αφού αναφερόμαστε στον άνθρωπο να προσθέσουμε και τη λέξη 'human'. Οι λέξεις αυτές δεν έχουν μια ορισμένη σειρά που πρέπει να γραφτούν και ούτε είναι και οι μοναδικές. Αντί της λέξης 'human' θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η φράση 'homo sapiens' με παρόμοια ή και ίδια αποτελέσματα.

- Δοκιμάστε και τους δύο τρόπους ή ακόμα και κάποιο άλλο δικό σας.
- Παρατηρείστε τη μείωση του αριθμού των αποτελεσμάτων.

Τώρα πια είναι σχετικά εύκολο να επιλέξουμε μέσα από 84, την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει και αυτή είναι η αλληλουχία που περιγράφεται ως **'hemoglobin subunit beta (Hemoglobin beta chain (Beta -globin) HBB\_HUMAN'** με κωδικό **P68871**.

Κάντε 'κλικ' στο αποτέλεσμα για να δείτε συνολικά την πρωτοταγή δομή της β αλυσίδας της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης.

### Εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων της β αλυσίδας της δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης

Ακολουθώντας ανάλογη διαδικασία για την εύρεση της αμινοξικής αλληλουχίας της β αλυσίδας της δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης καταλήγουμε στην αλληλουχία που περιγράφεται ως **'hemoglobin beta chain variant Hb S-Wake [Homo sapiens]'** με κωδικό **'AAN11320'**.

- Κάντε 'κλικ' στο αποτέλεσμα για να δείτε συνολικά την πρωτοταγή δομή της β αλυσίδας της δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης.

The screenshot shows a Microsoft Internet Explorer browser window displaying the NCBI Entrez Protein search results for 'Hb S, human, beta chain'. The search results are as follows:

Item	Accession	Protein Name	Organism
1	P68871	Hemoglobin subunit beta (Hemoglobin beta chain) (Beta-globin) [Contains: LVV-hemorphin-7]	Homo sapiens
2	P69891	Hemoglobin subunit gamma-1 (Hemoglobin gamma-1 chain) (Gamma-1-globin) (Hemoglobin gamma-A chain) (Hb F A gamma)	Homo sapiens
3	P52655	Transcription initiation factor IIA subunit 1 (General transcription factor IIA1) (TFIIA-42) (TFIIA)	Homo sapiens
4	AAN11320	hemoglobin beta chain variant Hb S-Wake	Homo sapiens
5	P69905	Hemoglobin subunit beta (Hemoglobin beta chain) (Beta-globin)	Homo sapiens

## Σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων των 2 β αλυσίδων

Ανακεφαλαιώνοντας, στο σημείο αυτό, έχουμε επιτύχει τον ένα από τους δύο στόχους, να βρούμε τις αμινοξικές αλληλουχίες των δύο β αλυσίδων. Το δεύτερο βήμα είναι να συγκρίνουμε τις αλληλουχίες αυτές. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι απαραίτητο να έχουμε όλη την πρωτοταγή δομή των αλυσίδων, αλλά μας αρκούν οι χαρακτηριστικοί κωδικοί τους.

Για να λειτουργήσουμε το κατάλληλο λογισμικό σύγκρισης, μεταβαίνουμε στην αρχική σελίδα του PubMed, όπου στο κάτω μέρος δεξιά βρίσκουμε την ομάδα **'Related resources'** και επιλέγουμε **'BLAST'**. Αυτό είναι το πρόγραμμα που θα χρησιμοποιήσουμε για να συγκρίνουμε τα δύο πεπτίδια και να βρούμε τις διαφορές και την ομολογία μεταξύ τους. Η εντολή για τη σύγκριση βρίσκεται στην τελευταία γραμμή της οθόνης **'Align two sequences using BLAST'** (Ευθυγραμμιστε-συγκρίνετε δύο αλληλουχίες χρησιμοποιώντας το λογισμικό BLAST).

PubMed Home - Microsoft Internet Explorer

Address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

NCBI **PubMed** A service of the U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health [My NCBI](#) [\[Sign In\]](#) [\[Register\]](#)

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure OMIM PMC Journals Books

Search PubMed for

Limits Preview/Index History Clipboard Details

About Entrez Text Version

Entrez PubMed Overview Help | FAQ Tutorials New/Noteworthy E-Utilities

PubMed Services Journals Database MeSH Database Single Citation Matcher Batch Citation Matcher Clinical Queries Special Queries LinkOut My NCBI

Related Resources Order Documents NLM Mobile NLM Catalog NLM Gateway TOXNET

To get started with PubMed, enter one or more search terms.

Search terms may be [topics](#), [authors](#) or [journals](#).

**My NCBI** Set up an automated PubMed update in fewer than five minutes.

1. Create a [My NCBI account](#).
2. Save your search.
3. Your PubMed updates can be e-mailed directly to you.

Read the [My NCBI Help](#) material to explore other options, such as automated updates of other databases, setting search filters, and highlighting search terms.

PubMed is a service of the U.S. National Library of Medicine that includes over 17 million citations from MEDLINE and other life science journals for biomedical articles back to the 1950s. PubMed includes links to full text articles and other related resources.

Done Internet

Protein Home - Microsoft Internet Explorer

Address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&tool=toolbar>

NCBI **Entrez Protein** [My NCBI](#) [\[Sign In\]](#) [\[Register\]](#)

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy Books

Search Protein for

Limits Preview/Index History Clipboard Details

About Entrez

Entrez Protein Help | FAQ

Entrez Tools

Check sequence revision history

LinkOut

My NCBI

Related resources BLAST

Reference sequence project

Search for Genes

Clusters of orthologous groups

Protein reviews on the web

The protein entries in the Entrez search and retrieval system have been compiled from a variety of sources, including SwissProt, PIR, PRF, PDB, and translations from annotated coding regions in GenBank and RefSeq.

**Human Genome**

Explore [human genome resources](#) or browse the human genome sequence using the [Map Viewer](#).

**Additional protein information**

In addition to Protein sequences, other protein-related information is available via Entrez. Search the [Structure](#) database by choosing, "Structure" from the Entrez pull down menu, [Conserved Domains Database](#) (CDD) by choosing, "Domains", and [3D Domains](#) by choosing, the "3D Domains" option.

**Retrieve taxonomy information**

The Entrez protein database is cross-linked to the [Entrez taxonomy database](#). This allows you to find taxonomy information for the species from which a protein sequence was derived. First, look up a protein in Entrez. A "Taxonomy" link appears to the right of each entry that is linked to the Entrez taxonomy database. To view all non-redundant taxonomy links for a search result, select "Taxonomy Links" from the drop-down menu above the search

Done Internet

BLAST: Basic Local Alignment and Search Tool - Microsoft Internet Explorer

Address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/BLAST Home

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. [more...](#)

[Learn more](#) about how to use the new BLAST design

**BLAST Assembled Genomes**

Choose a species genome to search, or [list all genomic BLAST databases](#).

- [Human](#)
- [Mouse](#)
- [Rat](#)
- [Arabidopsis thaliana](#)
- [Oryza sativa](#)
- [Bos taurus](#)
- [Danio rerio](#)
- [Drosophila melanogaster](#)
- [Gallus gallus](#)
- [Pan troglodytes](#)
- [Microbes](#)
- [Apis mellifera](#)

**Basic BLAST**

Choose a BLAST program to run.

- [nucleotide blast](#) Search a **nucleotide** database using a **nucleotide** query  
*Algorithms: blastn, megablast, discontinuous megablast*
- [protein blast](#) Search **protein** database using a **protein** query  
*Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast*
- [blastx](#) Search **protein** database using a **translated nucleotide** query
- [tblastn](#) Search **translated nucleotide** database using a **protein** query

News

**New Gene Info in BLAST Results**

BLAST results now contain information from the NCBI gene database. These can be found under the definition lines of the alignments where applicable. The information includes gene database IDs, gene name and the gene entry title as well as the organism associated with the matching gene entry. A link will take you to the main record for the gene. Also represented is an indication of how many PubMed records are directly associated with the gene entry as a measure of how much literature is available. 2007-11-28 07:00:00

[More BLAST news...](#)

Tip of the Day

Integrating web PSI-BLAST with command line PSI-

BLAST: Basic Local Alignment and Search Tool - Microsoft Internet Explorer

Address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

- [nucleotide blast](#) Search a **nucleotide** database using a **nucleotide** query  
*Algorithms: blastn, megablast, discontinuous megablast*
- [protein blast](#) Search **protein** database using a **protein** query  
*Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast*
- [blastx](#) Search **protein** database using a **translated nucleotide** query
- [tblastn](#) Search **translated nucleotide** database using a **protein** query
- [tblastx](#) Search **translated nucleotide** database using a **translated nucleotide** query

**Specialized BLAST**

Choose a type of specialized search (or database name in parentheses.)

- Search [trace archives](#)
- Find [conserved domains](#) in your sequence (cds)
- Find sequences with similar [conserved domain architecture](#) (cdart)
- Search sequences that have [gene expression profiles](#) (GEO)
- Search [immunoglobulins](#) (IgBLAST)
- Search for [SNPs](#) (snp)
- Screen sequence for [vector contamination](#) (vecscreen)
- [Align](#) two sequences using BLAST (bl2seq)

is an indication of how many PubMed records are directly associated with the gene entry as a measure of how much literature is available. 2007-11-28 07:00:00

[More BLAST news...](#)

Tip of the Day

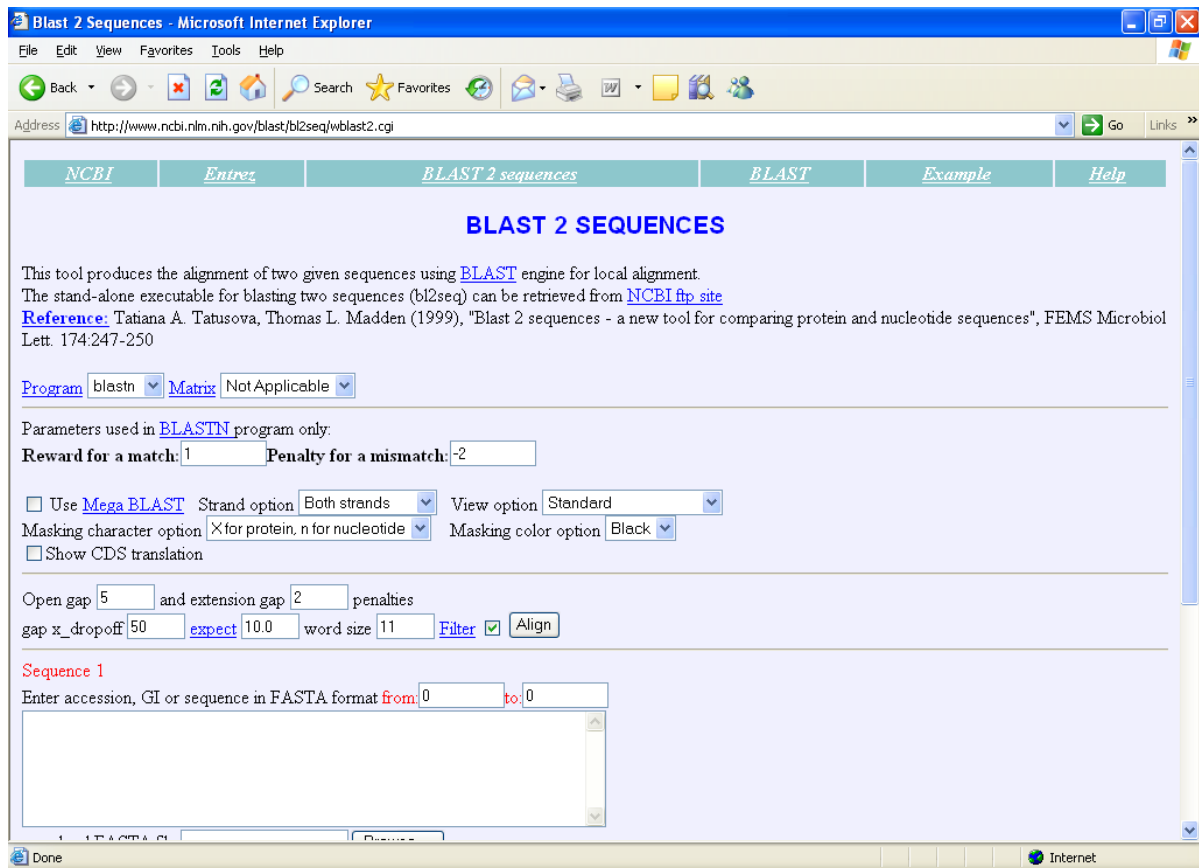
Integrating web PSI-BLAST with command line PSI-BLAST using the PssmWithParameters format

This format of the PSSM can be directly used with other stand-alone Blast software tools, in particular as an input checkpoint file for blastpgp. The actual matrix elements can be observed in the "scores" field in the PssmWithParameters structure, which is a one-dimensional representation of the matrix.

[More tips...](#)

Το πρόγραμμα **'BLAST 2 SEQUENCE'** έχει τη δυνατότητα να συγκρίνει οποιοσδήποτε αμινοξικές ή και νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

- Παρατηρείστε τα δύο πεδία όπου γίνεται η εισαγωγή των δύο αλληλουχιών
- Αναζητείστε και βρείτε τα προγράμματα blastn και blastp
- Αναζητείστε την εντολή **'Align'** (ευθυγράμμιση-σύγκριση)



Στο σημείο αυτό φτάνουμε στο τέλος της αναζήτησης. Επιλέγουμε το πρόγραμμα **'blastp'** και γράφουμε τον κωδικό της κάθε αλληλουχίας στα αντίστοιχα πεδία **'Sequence 1'** και **'Sequence 2'**.

- Δώστε τη εντολή **'Align'**
- Παρατηρείστε την οθόνη των αποτελεσμάτων
- Παρατηρείστε τη σύγκριση των δύο αλληλουχιών
- Βρείτε τη διαφορά των δύο β αλυσίδων
- Βρείτε την ομολογία των μορίων

Blast 2 Sequences - Microsoft Internet Explorer

File Edit View Favorites Tools Help

Address <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>

NCBI Entrez **BLAST 2 sequences** BLAST Example Help

## BLAST 2 SEQUENCES

This tool produces the alignment of two given sequences using [BLAST](#) engine for local alignment. The stand-alone executable for blasting two sequences (bl2seq) can be retrieved from [NCBI ftp site](#).  
**Reference:** Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250

Program  Matrix

Parameters used in [BLASTN](#) program only:  
 Reward for a match:  Penalty for a mismatch:

Use [Mega BLAST](#) Strand option  View option

Masking character option  Masking color option

Show CDS translation

Open gap  and extension gap  penalties  
 gap x\_dropoff  [expect](#)  word size   Filter

**Sequence 1**  
 Enter accession, GI or sequence in FASTA format from:  to:   
 P68871

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/full\\_options.html#blastn](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/full_options.html#blastn) Internet

Blast 2 Sequences - Microsoft Internet Explorer

File Edit View Favorites Tools Help

Address <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>

Use [Mega BLAST](#) Strand option  View option

Masking character option  Masking color option

Show CDS translation

Open gap  and extension gap  penalties  
 gap x\_dropoff  [expect](#)  word size   Filter

**Sequence 1**  
 Enter accession, GI or sequence in FASTA format from:  to:   
 P68871

or upload FASTA file

**Sequence 2**  
 Enter accession, GI or sequence in FASTA format from:  to:   
 AAN11320

or upload FASTA file

Comments and suggestions to [blast-help@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:blast-help@ncbi.nlm.nih.gov)

Internet



Blast Result - Microsoft Internet Explorer

Address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi?0>

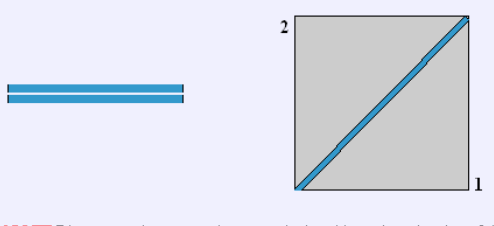
**BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTP 2.2.17 [Aug-26-2007]**

Matrix: BLOSUM62 gap open: 11 gap extension: 1  
 x\_dropoff: 0 expect: 10.0000 wordsize: 3 Filter  View option: Standard  
 Masking character option: X for protein, n for nucleotide Masking color option: Black  
 Show CDS translation

---

**Sequence 1:** [gi|56749856|Hemoglobin subunit beta \(Hemoglobin beta chain\) \(Beta-globin\) \[Contains: LVV-hemorphin-7\]](#)  
 Length = 147 (1 .. 147)

**Sequence 2:** [gi|23268449|hemoglobin beta chain variant Hb S-Wake \[Homo sapiens\]](#)  
 Length = 147 (1 .. 147)



**NOTE:** Bitscore and expect value are calculated based on the size of the nr database.

Score = 300 bits (768), Expect = 2e-80

Done Internet

Επαναλάβετε τη διαδικασία για να βρείτε και να συγκρίνεται τα mRNA που κωδικοποιούν τις β αλυσίδες της φυσιολογικής και της δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης.

## ΠΑΡΑΔΟΤΕΑ

Από τις τέσσερις ασκήσεις εξάγετε τα παρακάτω αποτελέσματα

1. Υπολογίστε την καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA που απομονώσατε
2. Υπολογίστε τη συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήσατε στην πέψη περιορισμού. Δεδομένο: 50 μg/ml διάλυμα DNA έχει  $OD_{260} = 1,000$
3. Με βάση την ηλεκτροφόρηση, κατασκευάστε το χάρτη περιορισμού του πλασμιδίου που απομονώσατε για τα δύο ένζυμα.
4. Εύρεση και σύγκριση πεπτιδικών και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που θα σας ζητηθούν.
5. Ετοιμάστε την αναφορά του Εργαστηρίου σύμφωνα με τις οδηγίες των διδασκόντων

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Genes VII (2001) B. Lewin

<http://mmlab.ceid.upatras.gr/Bioinformatics>

<http://issel.ee.auth.gr/el/bioinformatics>

<http://el.science.wikia.com/wiki>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>