



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
επένδυση στην ποιότητα της γνώσης  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

## **ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ**

**Σύγχρονες τεχνικές ανάλυσης** ορίζεται ως ο επιστημονικός κλάδος, που αναπτύσσει και εφαρμόζει μεθόδους, όργανα και στρατηγικές, για να δώσει πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση και τη φύση υλικών στο χώρο και το χρόνο.

Στην κλασική ανάλυση, ο μοναδικός στόχος είναι ο προσδιορισμός της ποιοτικής ή και ποσοτικής σύστασης μιας ουσίας (καθορισμένης ή μίγματος). Σήμερα, οι τεχνικές χημικής ανάλυσης καλύπτουν ένα ευρύτερο φάσμα εφαρμογών. Αφενός μεν προσφέρουν τις υπηρεσίες τους σε διάφορους κλάδους, όπως είναι η Ιατρική, η Τεχνολογία ή ακόμα οι Κοινωνικές Επιστήμες, αφετέρου αποτελούν αυτόνομο επιστημονικό κλάδο της Χημείας που συσχετίζεται με τη Φυσική και την Επιστήμη των Πληροφοριών.

Σκοπός των αναλυτικών τεχνικών είναι να δώσουν την αληθινή εικόνα της σύστασης της ύλης. Οι σημερινές ανάγκες έχουν επιβάλλει τη συγκρότηση διεθνών ή πανευρωπαϊκών οργανισμών ή εργαστηρίων, που έχουν επιφορτιστεί με τον καθορισμό προδιαγραφών, καθώς και τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο των διαφόρων υλικών.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ  
2007-2013  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

# Τεχνικές ανάλυσης DNA

Κώστας Ματθιόπουλος

Οι τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας μας παρέχουν τα εργαλεία για τη μελέτη της γενετικής οποιουδήποτε οργανισμού και για την απομόνωση του DNA οποιουδήποτε γονιδίου. Μπορούμε να απομονώσουμε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, να το κλωνοποιήσουμε, προκειμένου να παραγάγουμε πολλαπλά αντίγραφα του, και να προσδιορίσουμε την αλληλουχία του ώστε να «διαβάσουμε» τη γενετική πληροφορία που περιέχει. Μπορούμε ακόμα να αναλύσουμε τη λειτουργία του γονιδίου αυτού με μεταλλαξιγένεση *in vitro*, κατά την οποία προκαλούμε ειδικές τροποποιήσεις (μεταλλαγές) στην πληροφορία του και στη συνέχεια το επανεισαγάγουμε στον οργανισμό, για να προσδιορίσουμε τις συνέπειες αυτών των μεταλλαγών.

Στο μάθημα αυτό θα παρουσιαστούν ορισμένες από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα στη μοριακή βιολογία: ένζυμα που κόβουν, ενώνουν και συνθέτουν το DNA, την αλληλούχηση και τη χημική σύνθεση DNA, την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και την υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων.

## Τα ένζυμα περιορισμού (Δ3-8)<sup>1</sup>

Νουκλεάσες ονομάζονται τα ένζυμα που διασπών του φωσφοδιεστερικούς δεσμούς των νουκλεϊκών οξέων σε τυχαίες θέσεις, δηλαδή χωρίς καμιά ιδιαίτερη προτίμηση για την αλληλουχία του DNA. Τα ένζυμα αυτά ήταν γνωστά αρκετά πριν την ανακάλυψη της διπλής έλικας του DNA. Η ανακάλυψη ενζύμων τα οποία αναγνώριζαν και

έκοβαν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις ξεκίνησε τη δεκαετία του 1950, όταν διαπιστώθηκε ότι ορισμένοι βακτηριοφάγοι δεν μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν σε ορισμένα βακτηριακά στελέχη, τα οποία τους κατέστρεφαν το DNA. Από το εκχύλισμα κάποιου τέτοιου στελέχους της *Escherichia coli* ανακαλύφθηκε μια νουκλεάση περιορισμού, ένα ένζυμο που κατέλυε τη διάσπαση του DNA. Πώς όμως ένα κύτταρο που παρήγαγε μια τέτοια νουκλεάση περιορισμού απέφευγε την καταστροφή του δικού του DNA από τη νουκλεάση αυτή; Το τέχνασμα που χρησιμοποιούσε το κύτταρο ήταν η μεθυλίωση ορισμένων βάσεων του DNA του. Έτσι, οι νουκλεάση περιορισμού είχε την ικανότητα να κόβει εξωγενές DNA αφήνοντας ανέπαφο το DNA του κυττάρου από το οποίο προερχόταν. Ήταν δηλαδή ένα μηχανισμός άμυνας του κυττάρου απέναντι σε εισβολές φαγικού DNA.

Έκτοτε έχουν ανακαλυφθεί πολλά ένζυμα περιορισμού που αναγνωρίζουν και κόβουν συγκεκριμένες αλληλουχίες από αρκετές εκατοντάδες βακτηριακά στελέχη και έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 150 διαφορετικές ειδικές θέσεις αναγνώρισης (Διαφάνεια 5). Σχεδόν όλα τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν παλίνδρομες αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ ζευγών βάσεων. Εάν η πιθανότητα να υπάρχει ένα οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο σε μια συγκεκριμένη θέση είναι  $\frac{1}{4}$  (αφού είναι 4 τα πιθανά νουκλεοτίδια, A, G, C ή T), θεωρητικά το νουκλεοτίδιο αυτό θα συναντάται κάθε 4 βάσεις. Με την ίδια λογική, μια αλληλουχία τεσσάρων συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων θα συναντάται κατά μέσο όρο κάθε  $4^4=256$  βάσεις. Έτσι, ένα ένζυμο περιορισμού που αναγνωρίζει αυτά τα 4 νουκλεοτίδια θα κόβει το DNA κατά μέσο όρο κάθε 256 βάσεις, ενώ ένα ένζυμο που

<sup>1</sup> Τα νούμερα αυτά στο κείμενο αφορούν τις Διαφάνειες των παραδόσεων.

αναγνωρίζει 6 νουκλεοτίδια θα κόβει το DNA κατά μέσο όρο κάθε 4096 βάσεις.

### **Η χρήση των ενζύμων περιορισμού για τη δημιουργία χαρτών DNA (Δ 9-11)**

Τα τμήματα των νουκλεϊκών οξέων που παράγονται από τα ένζυμα περιορισμού μπορούν να αναλυθούν μέσω της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική που βασίζεται στο γεγονός ότι μόρια νουκλεϊκών οξέων (ή και πρωτεϊνών) τα οποία διαφέρουν ως προς το μέγεθος και το σχήμα κινούνται με διαφορετική ταχύτητα μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο<sup>2</sup>.

Όταν χρησιμοποιούνται ένζυμα περιορισμού τα οποία αναγνωρίζουν διαφορετικές αλληλουχίες-στόχους, προκύπτουν από το ίδιο μόριο DNA διαφορετικού μεγέθους τμήματα περιορισμού χαρακτηριστικά για το κάθε ένζυμο. Αν πραγματοποιηθούν αντιδράσεις τόσο με μεμονωμένα ένζυμα περιορισμού όσο και με συνδυασμούς ενζύμων περιορισμού και στη συνέχεια μέσω ηλεκτροφόρησης προσδιοριστούν τα μήκη των τμημάτων που προκύπτουν, είναι δυνατόν να βρεθεί η ακριβής θέση αναγνώρισης των ενζύμων αυτών πάνω στο άκοπο μόριο DNA. Η απεικόνιση των θέσεων αυτών αποτελεί το χάρτη περιορισμού του μορίου DNA ως προς τα εν λόγω ένζυμα.

Τα ένζυμα περιορισμού αποτελούν ένα σημαντικότατο εργαλείο για τους μοριακούς βιολόγους, καθώς επιτρέπουν να κόβουν με προβλέψιμο τρόπο ένα συγκεκριμένο μόριο DNA και να αναλύουν τη δομή και τις ιδιότητές του με μεγάλη λεπτομέρεια. Το εργαλείο αυτό γίνεται ιδιαίτερα ισχυρό, όταν συνδυάζεται με τεχνικές που εντοπίζουν τμήματα DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, όπως είναι το στύπωμα κατά Southern που θα κουβεντιάσουμε πιο κάτω.

### **Η DNA λιγάση**

<sup>2</sup> Το θέμα αυτό θα αναλυθεί διεξοδικότερα σε επόμενο μάθημα.

Τα ένζυμα περιορισμού αποτελούν επίσης ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τον ανασυνδυασμό τμημάτων DNA, λόγω του τρόπου με τον οποίον κόβουν το δίκλωνο DNA. Ορισμένα ένζυμα περιορισμού, όπως το *HindII*, κόβουν το DNA στο κέντρο της θέσης αναγνώρισης, παράγοντας τμήματα με λεία (τυφλά) άκρα. Στα τμήματα αυτά οι βάσεις είναι πλήρως ζευγαρωμένες μέχρι τα άκρα τους. Άλλα ένζυμα περιορισμού κόβουν ασύμμετρα τους δύο κλώνους του DNA, δημιουργώντας συμπληρωματικές μονόκλωνες «ουρές» μικρού μήκους στα άκρα κάθε τμήματος. Η αλληλουχία αναγνώρισης του *EcoRI* είναι η GAATTC και από την κοπή της προκύπτει μια ουρά μήκους τεσσάρων βάσεων, η AATT (Διαφάνεια 13). Οι μονόκλωνες αλληλουχίες των ουρών που αφήνουν διαφορετικά ένζυμα περιορισμού είναι δυνατόν να είναι ίδιες ακόμη και αν οι θέσεις αναγνώρισης είναι διαφορετικές. Το ένζυμο *MfeI* αναγνωρίζει την αλληλουχία CAATG και κόβοντάς την παράγει την ίδια ουρά AATT που προκύπτει και από την πέψη με *EcoRI* (Διαφάνεια 13).

Οι συμπληρωματικές μονόκλωνες ουρές έχουν την τάση να ενώνονται μεταξύ τους και γι αυτό συχνά αποκαλούνται συνεκτικά ή κολλώδη άκρα. Ζευγάρωμα βάσεων γίνεται μόνο ανάμεσα σε συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων. Έτσι, τα κολλώδη άκρα AATT που παράγει το *EcoRI* δεν ζευγαρώνουν, για παράδειγμα, με τα άκρα AGCT που παράγει το *HindIII*. Αν όμως δύο τμήματα DNA έχουν συμπληρωματικά άκρα, ανεξάρτητα από τον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται, μπορούν να συνδεθούν προσωρινά με ζευγάρωμα μεταξύ των βάσεων στις μονόκλωνες ουρές τους. Αυτό που χρειάζεται είναι ένας τρόπος μονιμοποίησης των συνδέσεων ανάμεσα σε τέτοιου είδους άκρα.

Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τις DNA λιγάσες, ένζυμα που φυσιολογικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση και στην αντιγραφή του DNA: τα τμήματα Okazaki που δημιουργούνται στον καθυστερημένο κλώνο (lagging strand) ενώνονται μεταξύ τους από μια λιγάση. Έτσι, τα ένζυμα περιορισμού και οι λιγάσες ήταν τα απαραίτητα εργαλεία των μοριακών βιολόγων για το κόψιμο και την επανασυγκόλληση διαφόρων τμημάτων

DNA σε συνδυασμούς κατά το δοκούν. Στα ίδια αυτά εργαλεία βασίζεται και η απομόνωση και κλωνοποίηση των γονιδίων.

### **Φορείς κλωνοποίησης αλληλουχιών DNA (Δ14-26)**

Στόχος της κλωνοποίησης δεν είναι μόνο η απομόνωση ενός συγκεκριμένου γονιδίου αλλά και η παραγωγή του σε μεγάλες ποσότητες (σε πολλαπλά αντίγραφα), γεγονός που καθιστά δυνατή την πραγματοποίηση μιας σειράς περαιτέρω χειρισμών, οι οποίοι αποσκοπούν στη μελέτη του. Το προφανές υπόστρωμα για κάτι τέτοιο ήταν τα βακτήρια, ακόμη κι αν το DNA θέλαμε να πολλαπλασιάσουμε δεν προερχόταν από βακτήρια. Προκειμένου να γίνει κάτι τέτοιο, το γονίδιο πρέπει να συνδεθεί με αλληλουχίες DNA που φέρουν τα κατάλληλα ρυθμιστικά στοιχεία, ώστε να καταστεί δυνατή η αντιγραφή του υβριδικού μορίου στα βακτήρια. Ευτυχώς τα βακτήρια διαθέτουν πλασμίδια, τα οποία έχουν τις κατάλληλες ιδιότητες για να λειτουργήσουν ως φορείς για την κλωνοποίηση τμημάτων εξωγενούς DNA σε αυτά.

Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά μόρια DNA, μήκους μόλις λίγων χιλιάδων ζευγών βάσεων. Σε κάθε βακτηριακό κύτταρο μπορεί να υπάρχουν από ένα έως αρκετές εκατοντάδες πλασμίδια (ο αριθμός τους ονομάζεται αριθμός αντιγράφων: copy number) και αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του βακτηρίου-ξενιστή. Τα πλασμίδια παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά ως εξωχρωμοσωματικό γενετικό υλικό, δηλαδή ως μόρια DNA που δεν συνδέονται με το βακτηριακό χρωμόσωμα και τα οποία φέρουν γονίδια που προσδίδουν στα βακτήρια ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά όπως η τετρακυκλίνη ή η καναμυκίνη. Το γεγονός ότι αυτά τα γονίδια βρίσκονταν σε πλασμίδια και όχι στο χρωμοσωματικό DNA δεν είναι τυχαίο. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά προϋποθέτει την παραγωγή σχετικά μεγάλων ποσοτήτων ενζύμων που τα καταστρέφουν. Επειδή όμως τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα βρίσκονται σε πλασμίδια, υπάρχουν σε πολύ περισσότερα αντίγραφα απ' ό,τι αν βρίσκονταν στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Τα πλασμίδια, λόγω του μικρού τους μεγέθους (που καθιστά ευκολότερο το

χειρισμό τους) και της παρουσίας σε αυτά γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (χάρη στα οποία μπορεί να γίνει επιλογή των βακτηρίων που περιέχουν πλασμίδια), είναι ιδανικοί φορείς κλωνοποίησης.

Τα φυσικά πλασμίδια που πρωτοανακαλύφθηκαν ήταν μεγάλα και δύσχρηστα. Σιγά σιγά τα πλασμίδια αυτά τροποποιήθηκαν, ώστε να είναι εύχρηστα και ευέλικτα. Ένα από τα πρώτα σχετικά παραδείγματα ήταν το pBR322, στοιχεία του οποίου χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία άλλων πλασμιδίων, όπως τα δημοφιλή pUC18 και pUC19. Τα πλασμίδια αυτά έχουν πολλές τροποποιήσεις ώστε να διευκολύνουν τη διαδικασία κλωνοποίησης. Για παράδειγμα, έχει εισαχθεί μια περιοχή που ονομάζεται πολυσυνδέτης, ο οποίος φέρει θέσεις αναγνώρισης διαφόρων ενζύμων περιορισμού, καθεμία από τις οποίες συναντάται μία μόνο φορά στην αλληλουχία του φορέα. Αυτές οι θέσεις χρησιμοποιούνται για τη γραμμοποίηση του πλασμιδίου, προκειμένου να ανασυνδυαστεί με την προσθήκη εξωγενούς DNA. Κατά δεύτερο λόγο, οι πλασμιδιακοί φορείς έχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε διαφορετικά αντιβιοτικά. Επίσης, οι νέοι φορείς μπορούν να αντιγραφούν στα κύτταρα σε πολύ υψηλότερο αριθμό αντιγράφων απ' ό,τι παλαιότεροι φορείς κλωνοποίησης. Όλα τα πλασμίδια προσφέρουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα: είναι εύκολο να επιτευχθεί ο καθαρισμός τους (η απομόνωσή τους) από την *E. coli*, δηλαδή να διαχωριστούν από τα υπόλοιπα συστατικά του βακτηρίου.

Η επιτυχής χρήση των πλασμιδίων ενθάρρυνε τους επιστήμονες ώστε να βρουν και άλλους κατάλληλους φορείς για κλωνοποίηση στα βακτήρια. Οι βακτηριοφάγοι ήταν μία προφανής επιλογή. Οι μεταγωγοί βακτηριοφάγοι (transducing phages) μεταφέρουν τμήματα βακτηριακών χρωμοσωμάτων από το ένα βακτηριακό κύτταρο στο άλλο. Οι μεταγωγοί φάγοι ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του βακτηρίου-ξενιστή έως ότου οι κατάλληλες συνθήκες τους οδηγούν στην μετακίνησή τους. Αν η εκτομή τους από το βακτηριακό γονιδίωμα δεν γίνει με ακρίβεια, ο φάγος ενδέχεται να πάρει μαζί του ένα τμήμα του

βακτηριακού γονιδιώματος. Ο βακτηριοφάγος λ, αφού τροποποιήθηκε με μεθόδους *in vitro* ανασυνδυασμού, υιοθετήθηκε γρήγορα ως γενικός φορέας κλωνοποίησης. Στους βακτηριοφάγους είναι δυνατόν να κλωνοποιηθούν πολύ μεγαλύτερα τμήματα DNA απ' ό,τι στα πλασμίδια, παρόλο που υπάρχει ένα ανώτατο όριο πάνω από το οποίο δεν είναι δυνατή η συσκευασία του DNA στο πρωτεϊνικό περίβλημα του φάγου. Το μέγιστο μέγεθος DNA που μπορεί να κλωνοποιηθεί στο φάγο λ είναι περίπου 25 kb (ενώ στα πλασμίδια γύρω στις 8-10 kb). Με την πάροδο του χρόνου αναπτύχθηκαν και άλλοι φορείς με πολύ μεγαλύτερη χωρητικότητα, όπως τα τεχνητά χρωμοσώματα βακτηρίων (BAC, Bacterial Artificial Chromosomes) και τα τεχνητά χρωμοσώματα ζυμομύκητα (YAC, Yeast Artificial Chromosomes), που μπορούν να χωρέσουν ενθέματα μεγέθους 100-500 kb και 250-100 kb αντίστοιχα (Δ-25).

#### **Τα πέντε βασικά βήματα της κλωνοποίησης (Δ 29)**

Η βασική διαδικασία κλωνοποίησης του DNA περιλαμβάνει πέντε βήματα. Το πρώτο βήμα αφορά την επιλογή του DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί. Αυτό μπορεί να είναι τμήμα γονιδιωματικού DNA ή το αποκαλούμενο συμπληρωματικό DNA (cDNA) κάποιου γονιδίου, δηλαδή ένα μόριο DNA που αποτελεί αντίγραφο ενός mRNA. Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει τη δημιουργία τμημάτων DNA με μέγεθος και άκρα κατάλληλα για εισαγωγή στον αντίστοιχο φορέα. Το τρίτο βήμα αφορά την ένθεση του DNA στο φορέα με τη χρήση λιγάσης. Κατά το τέταρτο βήμα, οι φορείς στους οποίους έχει γίνει η ένθεση τμημάτων DNA εισάγονται σε ένα πληθυσμό βακτηρίων. Το βήμα αυτό ονομάζεται μετασχηματισμός. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Εκεί αναπτύσσονται μόνο τα βακτήρια που περιέχουν πλασμίδια, τα οποία τους προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Από τη διαίρεση κάθε ανθεκτικού βακτηριακού κυττάρου προκύπτει μια αποικία βακτηρίων. Τα βακτήρια κάθε αποικίας έχουν προέλθει από ένα μόνο κύτταρο, το οποίο

περιέχει ένα μόνο μόριο ανασυνδυασμένου DNA. Αυτό είναι το κατεχοχόν βήμα της κλωνοποίησης. Ένα τέτοιο σύνολο κλωνοποιημένων τμημάτων DNA τα οποία πολλαπλασιάζονται μέσα σε βακτήρια ονομάζεται βιβλιοθήκη.

Μια βιβλιοθήκη, λοιπόν, είναι ένα σύνολο κλώνων που περιέχουν σε τμήματα το γονιδίωμα ενός οργανισμού ή τα cDNA που αντιστοιχούν στα γονιδιά του, χωρίς όμως να μπορούμε να γνωρίζουμε εκ των προτέρων ποιος κλώνος περιέχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία. Έτσι, το πέμπτο βήμα είναι ο προσδιορισμός των αποικιών που περιέχουν την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει.

#### **Η επιλογή του αρχικού υλικού**

Αρχικά θα πρέπει να διευκρινιστεί αν θα χρησιμοποιηθεί DNA ή cDNA για την κλωνοποίηση ενός γονιδίου. Η επιλογή είναι συνάρτηση του συγκεκριμένου προβλήματος που αντιμετωπίζουμε. Αν μας ενδιαφέρει η αμινοξική αλληλουχία μιας πρωτεΐνης, ο πιο άμεσος τρόπος για να αποκτήσουμε την πληροφορία αυτή είναι χρησιμοποιώντας τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός κλωνοποιημένου cDNA. Από την άλλη πλευρά, αν μας ενδιαφέρουν οι περιοχές του γονιδίου που ευθύνονται για τη ρύθμιση της έκφρασής του ή γενικά περιοχές που δεν περιέχονται στο mRNA, τότε δεν μπορούμε να αποκτήσουμε την πληροφορία αυτή παρά μόνο κλωνοποιώντας χρωμοσωμικό DNA.

Η καθαρότητα του αρχικού δείγματος DNA είναι σημαντική, διότι αν υπάρχει πρόσμειξη με DNA από άλλους οργανισμούς, το DNA αυτό θα συμπεριληφθεί στη βιβλιοθήκη που θα προκύψει στο τέλος. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να γίνει, για παράδειγμα, αν τα φυτά που συλλέγονταν για εξαγωγή DNA έφεραν βακτήρια και μύκητες στην επιφάνεια των φύλλων ή των ριζών τους. Είναι επίσης σημαντικό να είμαστε σίγουροι ότι το δείγμα μας περιέχει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Δεν θα ήταν καλή ιδέα να προσπαθήσουμε να κλωνοποιήσουμε γονίδια του

ανθρώπινου χρωμοσώματος Y χρησιμοποιώντας ως δείγμα DNA από θηλυκό άτομο.

Το mRNA που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για τη σύνθεση cDNA θα πρέπει να παρασκευαστεί από κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Καθώς κάθε κυτταρικός τύπος εκφράζει μέρος μόνο των γονιδίων που περιέχουν τα χρωμοσώματά του, έχει ιδιαίτερη σημασία η σωστή επιλογή ιστού για τη λήψη του δείγματος. Αυτό μπορεί να μην είναι εύκολο, καθώς πολλά γονίδια εκφράζονται σε περιορισμένο μόνο αριθμό κυτταρικών τύπων, κάτω από ορισμένες μόνο συνθήκες ή σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης. Το πρώτο ευκαρυωτικό γονίδιο που κλωνοποιήθηκε ήταν το γονίδιο της β-σφαιρίνης του κουνελιού, επειδή υπήρχε εύκολα προσβάσιμη πηγή άφθονου mRNA της β-σφαιρίνης: τα δικτυοερυθροκύτταρα του αίματος. Το 50-90% του συνολικού mRNA στα κύτταρα αυτά είναι mRNA σφαιρινών. Ομοίως, χρησιμοποιήθηκαν παγκρεατικά κύτταρα ως πηγή mRNA για την κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου της ινσουλίνης.

Η σχετική αφθονία των mRNA των διαφόρων γονιδίων επηρεάζει το σχετικό αριθμό αντιγράφων κάθε cDNA στη βιβλιοθήκη. Η βιβλιοθήκη θα περιέχει πολύ περισσότερα cDNA από ένα mRNA που έχει μεγάλη αφθονία παρά από ένα σπάνιο mRNA που συναντάται στα κύτταρα σε πολύ μικρό αριθμό αντιγράφων. Θα υπάρχουν λοιπόν αναλογικά πολύ περισσότεροι κλώνοι του πρώτου παρά του δεύτερου και επομένως θα είναι δύσκολο να εντοπίσουμε τους κλώνους ενός σπάνιου μεταγράφου. Οι τεχνικές που έχουμε στη διάθεσή μας σήμερα έχουν βελτιωθεί και έτσι είμαστε σε θέση να κλωνοποιήσουμε cDNA από σπάνια mRNA.

### **Η μετατροπή του mRNA σε cDNA**

Το πρώτο βήμα για την κατασκευή μιας βιβλιοθήκης cDNA είναι η απομόνωση του συνολικού κυτταρικού RNA. Στη συνέχεια, από το συνολικό κυτταρικό RNA πρέπει να απομονωθεί ένα κλάσμα του που περιέχει κυρίως mRNA. Συνήθως, μόνο το ~1-2% του κυτταρικού RNA είναι

mRNA, ενώ το υπόλοιπο περιλαμβάνει ριβοσωμικό RNA (rRNA) και τα μεταφορικά RNA (tRNA). Πώς όμως διαχωρίζουμε το mRNA από τα υπόλοιπα; Αυτό είναι δυνατόν επειδή σχεδόν όλα τα μόρια mRNA των ευκαρυωτικών οργανισμών φέρουν στο 3'-άκρο τους μια αλληλουχία επαναλαμβανόμενων κατάλοιπων αδενίνης, δηλαδή μια ουρά πολυ-A. Η ουρά αυτή είναι σημαντική για τη σταθερότητα του mRNA, προσφέρει όμως και έναν ιδιαίτερα βολικό τρόπο απομόνωσης mRNA από συνολικό RNA. Έτσι, δημιουργούμε συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που αποτελούνται αποκλειστικά από δεοξυθυμιδίνη (oligo-dT) και τα οποία προσδένονται σε ένα στερεό υλικό, όπως είναι τα σφαιρίδια κυτταρίνης (Δ-31). Τα σφαιρίδια αυτά συσκευάζονται σε μικρές στήλες. Όταν ένα παρασκεύασμα συνολικού κυτταρικού RNA περάσει μέσα από μια τέτοια στήλη, οι ουρές poly-A των μορίων του mRNA δεσμεύονται από τα oligo-dT. Έτσι, το mRNA παγιδεύεται και συγκρατείται στα σφαιρίδια, ενώ το υπόλοιπο RNA περνάει από τη στήλη. Κατόπιν, τα δεσμευμένα mRNA εκλούνται από τη στήλη και συλλέγονται.

Οι ουρές poly-A των μορίων mRNA χρησιμοποιούνται και στο επόμενο βήμα της κλωνοποίησης cDNA: την παρασκευή ενός DNA-αντιγράφου του RNA (Δ-32). Ολιγονουκλεοτίδια μικρού μήκους τα οποία περιέχουν 12-20 κατάλοιπα δεοξυθυμιδίνης (oligo-dT) αναμειγνύονται με το καθαρισμένο mRNA και υβριδοποιούνται με τις ουρές poly-A, λειτουργώντας ως εκκινητές για την αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο αυτό, το οποίο έχει απομονωθεί από ορισμένους ογκοκύτταρους RNA, χρησιμοποιεί RNA ως μήτρα για τη σύνθεση ενός κλώνου DNA. Το όνομά του προέρχεται από την ικανότητά του να αντιστρέφει τη διαδικασία της μεταγραφής που φυσιολογικά λαμβάνει χώρα κατά τη γονιδιακή έκφραση. Το προϊόν της αντίδρασης είναι ένα υβρίδιο RNA-DNA. Στη συνέχεια, τα υβριδικά αυτά μόρια πρέπει να μετατραπούν σε δίκλιωνα μόρια DNA, ώστε να είναι δυνατόν να κλωνοποιηθούν σε κατάλληλους φορείς.

Ο συνηθέστερος τρόπος σύνθεσης δίκλωνου cDNA από ένα υβρίδιο mRNA-cDNA περιλαμβάνει τη



χρήση ενός ενζύμου που προέρχεται από την *E. coli*, της RNAάσης H. Η RNAάση H αναγνωρίζει υβριδικά μόρια RNA-DNA και κόβει τον κλώνου του RNA σε πολλά σημεία. Έτσι προκύπτουν τμήματα RNA που παραμένουν υβριδοποιημένα με τον πρώτο κλώνο του cDNA και χρησιμεύουν ως εκκινητές για την DNA πολυμεράση της *E. coli*, η οποία χρησιμοποιεί τον αρχικό κλώνο του cDNA ως μήτρα για τη σύνθεση του δεύτερου κλώνου. Με τον τρόπο αυτό τελικά το αρχικό mRNA μετατρέπεται σε δίκλωνο cDNA, με εξαίρεση ένα μικρό τμήμα του στο 5'-άκρο. Με την παραπάνω διαδικασία ο δεύτερος κλώνος του cDNA δεν είναι απόλυτα συνεχής, αλλά περιέχει εγκοπές. Οι εγκοπές αυτές κλείνουν με το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών χάρη στη δράση της DNA λιγάσης. Έτσι ολοκληρώνεται ο σχηματισμός του δίκλωνου μορίου cDNA.

#### **Τα cDNA μόρια συνδέονται με κατάλληλους φορείς για τη δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης**

Τα δίκλιωνα μόρια cDNA που προκύπτουν από τις παραπάνω διαδικασίες εισάγονται κατόπιν σε ένα φορέα πλασμιδιακό ή προερχόμενο από το φάγο λ με τη βοήθεια της λιγάσης. Για την κατασκευή βιβλιοθηκών προστίθενται συνήθως τεχνητές θέσεις ενζύμων περιορισμού στα άκρα των cDNA. Οι θέσεις περιορισμού περιέχονται σε συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 8-12 bp που ονομάζονται προσαρμοστές. Οι προσαρμοστές αυτοί συνδέονται στα άκρα του δίκλωνου cDNA με την DNA λιγάση, με αποτέλεσμα αυτό να αποκτά μονόκλιωνα κολλώδη άκρα (Εικόνα).

Το cDNA, το οποίο τώρα φέρει κολλώδη άκρα, συνδέεται με ένα φορέα που έχει κοπεί με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και ενώνονται μεταξύ τους με τη βοήθεια της λιγάσης (Δ34-35). Τα ανασυνδυασμένα μόρια είναι πλέον έτοιμα να εισαχθούν στα βακτηριακά κύτταρα με τη χρήση κάποιου μεθόδου κατάλληλης για τον αντίστοιχο τύπο φορέα. Τα πλασμίδια εισάγονται με πολλές διαφορετικές διαδικασίες μετασχηματισμού (Δ36-37), ενώ οι φορείς του φάγου λ συσκευάζονται αρχικά *in vitro*, ώστε να σχηματίσουν μολυσματικά

ικά σωματίδια, ικανά να μολύνουν βακτήρια και να πολλαπλασιαστούν μέσα σε αυτά. Παρόλο που οι πλασμιδιακοί φορείς προσφέρουν το πλεονέκτημα του εύκολου χειρισμού του κλωνοποιημένου DNA, οι βιβλιοθήκες cDNA που παρασκευάζονται σε φάγους, ξεκινώντας από μία δεδομένη ποσότητα mRNA, περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό κλώνων. Επίσης, για τεχνικούς λόγους, οι πλάκες που σχηματίζουν οι βακτηριοφάγοι μπορούν να σαρωθούν σε μεγαλύτερη πυκνότητα από τις βακτηριακές αποικίες, γεγονός που διευκολύνει τη διαδικασία.

Πώς όμως διακρίνουμε τους ανασυνδυασμένους κλώνους από τους μη ανασυνδυασμένους; Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια απλή μεθοδολογία που βασίζεται στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης του οπερονίου *lac* και επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ ανασυνδυασμένων και μη ανασυνδυασμένων κλώνων, ανάλογα με το χρώμα που έχουν οι βακτηριακές αποικίες ή οι φαγικές πλάκες (Δ38-39). Το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση υδρολύει τη χημική ουσία X-gal παράγοντας μία αδιάλυτη μπλε χρωστική. Σε πολλούς φορείς, η θέση κλωνοποίησης βρίσκεται μέσα σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί το αμινοτελικό άκρο της β-γαλακτοσιδάσης και ονομάζεται *lacZ'*. Ένας τέτοιος φορέας μπορεί να μεταφερθεί σε κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος, στο χρωμόσωμα του οποίου κωδικοποιείται ένα μεταλλαγμένο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, από το οποίο απουσιάζουν ορισμένες αλληλουχίες που κωδικοποιούν το αμινοτελικό της άκρο. Στην περίπτωση αυτή, οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες που παράγονται από το μεταλλαγμένο γονίδιο και το *lacZ* συνδυάζονται και προκύπτει το ενεργό ένζυμο. Έτσι, οι αποικίες ή οι πλάκες που περιέχουν φορείς στους οποίους δεν έχει γίνει ένθεση DNA, αποκτούν μπλε χρώμα, αν στο μέσο της καλλιέργειας προστεθεί X-gal. Αντιθέτως, οι βακτηριακές αποικίες ή οι πλάκες των φάγων που φέρουν ανασυνδυασμένους φορείς παραμένουν άχρωμες (λευκές), καθώς η ένθεση ενός τμήματος DNA στο *lacZ'* προκαλεί την αδρανοποίησή του. Επομένως, αυτή η επιλογή μπορεί, ανάλογα με το χρώμα των αποικιών ή των πλακών, να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί αν είναι υψηλή η συχνότητα των

ανασυνδυασμένων κλώνων στη βιβλιοθήκη. Οι ερευνητές εστιάζονται στις λευκές αποικίες ή πλάκες και αγνοούν τους μπλε κλώνους, καθώς αυτοί φέρουν μη ανασυνδυασμένο φορέα.

### **Οι βιβλιοθήκες γονιδιωματικού DNA αντιπροσωπεύουν την πλήρη αλληλουχία του DNA των οργανισμών**

Οι βιβλιοθήκες cDNA είναι χρήσιμες επειδή αποτελούν συλλογές κλώνων που αντιπροσωπεύουν τα γονίδια που εκφράζονται σε ένα συγκεκριμένο ιστό μια δεδομένη στιγμή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή και τη μελέτη των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Όπως προαναφέραμε, όμως, τα mRNA αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό μέρος του γονιδιώματος ενός οργανισμού. Για να μελετηθεί ολόκληρο το γονιδίωμα είναι απαραίτητη η δημιουργία μιας βιβλιοθήκης που περιέχει όλα τα τμήματα του γονιδιώματος. Αυτό μπορεί να γίνει με τεχνικές παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν πιο πάνω και μάλιστα απλούστερες αφού το αρχικό μας υλικό είναι δίκλωνο DNA και δεν χρειάζεται η σύνθεση cDNA (Δ33-35). Έναν περιορισμό που παρουσιάζουν οι πλασμιακοί φορείς και οι φορείς του φάγου λ είναι ότι δε χωράνε παρά μόνο μικρά τμήματα DNA. Αυτό δε σημαίνει μόνο ότι χρειάζονται πολλοί κλώνοι για να διασφαλιστεί η πλήρης κάλυψη του γονιδιωματικού DNA, αλλά και ότι πολλά μεγάλα γονίδια δεν μπορούν να χωρέσουν σε ένα μόνο κλώνο. Άλλοι φορείς με πολύ μεγαλύτερη χωρητικότητα, όπως τα BACs και τα YACs (που αναφέρθηκαν πιο πάνω) είναι πιο κατάλληλοι για την κλωνοποίηση του γονιδιώματος. Οι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες έχουν χρησιμοποιηθεί επί μακρόν για τη μελέτη συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδιώματος, ενώ η δημιουργία βιβλιοθηκών υψηλής ποιότητας είναι απαραίτητη για την αλληλούχησή του.

### **Η σάρωση των βιβλιοθηκών με ιχνηθέτες νουκλεϊκών οξέων (Δ42-43)**

Το αποτέλεσμα της επίστρωσης μια βιβλιοθήκης κλώνων είναι εκατοντάδες χιλιάδες έως ένα εκατομμύριο πλάκες φάγων ή βακτηριακές αποικίες, κατανεμημένες σε ένα σύνολο τρυβλίων με θρεπτικό μέσο. Πώς είναι δυνατόν να εντοπίσουμε τον επιθυμητό κλώνο ανάμεσα σε αυτές τις χιλιάδες πλάκες ή αποικίες; Δύο συνθήκες είναι απαραίτητες: αφενός η δυνατότητα δημιουργίας κατάλληλων αντιγράφων των τρυβλίων και αφετέρου η κατασκευή ενός ιχνηθέτη που θα μπορεί να μας υποδείξει τη θέση της επιθυμητής πλάκας ή αποικίας. Αφού, λοιπόν, γίνει η επίστρωση της βιβλιοθήκης, η απλή εναπόθεση μιας μεμβράνης νιτροκυτταρίνης ή νάιλον στο τρυβλίο θα μεταφέρει ένα μέρος κάθε πλάκας ή αποικίας στη μεμβράνη αυτή. Με τον τρόπο αυτό διατηρείται ταυτόχρονα και το πρότυπο της διάταξης των κλώνων στα αρχικά τρυβλία πάνω στη μεμβράνη. Έτσι ουσιαστικά παρασκευάζεται σε μεμβράνες ένα ακριβές αντίγραφο της βιβλιοθήκης. Η σάρωση γίνεται επωάζοντας τις μεμβράνες με έναν ιχνηθέτη νουκλεϊκού οξέος, με σκοπό την ανίχνευση των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν.

Η πιο άμεση μέθοδος σάρωσης είναι η υβριδοποίηση με νουκλεϊκά οξέα. Πρόκειται για έναν ιδιαίτερα ευαίσθητο τρόπο ανίχνευσης αλληλουχιών DNA, με τη βοήθεια σημασμένων μικρών τμημάτων DNA (ιχνηθέτες) τα οποία είναι συμπληρωματικά προς τις επιθυμητές αλληλουχίες. Η μέθοδος αυτή προϋποθέτει πως γνωρίζουμε τουλάχιστον κάποιο τμήμα των αλληλουχιών που αναζητάμε. Ορισμένες φορές μπορεί να έχει ήδη κλωνοποιηθεί ένα μέρος του γονιδίου και αυτό να χρησιμοποιηθεί για την αναζήτηση κλώνων που περιέχουν τις επιπλέον αλληλουχίες του. Άλλες φορές, το γονίδιο που μας ενδιαφέρει μπορεί να εντοπιστεί σε μια βιβλιοθήκη, αξιοποιώντας τη γνώση της αλληλουχίας ομόλογων προς αυτό γονιδίων, από τον ίδιο ή διαφορετικό οργανισμό. Σε τέτοιες περιπτώσεις, αν και δεν γνωρίζουμε με ακρίβεια την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει, μπορούμε και πάλι να χρησιμοποιήσουμε τη μέθοδο της υβριδοποίησης για τον εντοπισμό του επιθυμητού κλώνου. Εφόσον η υβριδοποίηση ανάμεσα στον ιχνηθέτη και τις ομόλογες γονιδιακές

αλληλουχίες-στόχους γίνει σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (π.χ. 42°C αντί για 65°C) και υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων, είναι δυνατόν να εντοπιστεί ο επιθυμητός κλώνος, παρότι η αλληλουχία του ιχνηθέτη δεν είναι πλήρως συμπληρωματική με την αλληλουχία του στόχου του. Ο ιχνηθέτης είναι συνήθως σημασμένος με ραδιενέργεια (Δ44-45). Μετά την υβριδοποίηση απομακρύνεται η περίσσεια του ιχνηθέτη και τα φίλτρα εκτίθενται σε ακτινογραφικά φιλμ. Όταν αυτά εμφανιστούν, τα σημεία των επιθυμητών κλώνων στα οποία προσκολλήθηκε ο ιχνηθέτης εμφανίζονται ως μαύρες κουκκίδες. Συγκρίνοντας κάθε φιλμ με το αντίστοιχο τρυβλίο, εντοπίζονται οι κλώνοι που περιέχουν την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει<sup>3</sup>. Στη συνέχεια, οι κλώνοι αυτοί (φάγοι ή βακτήρια) επιλέγονται και καλλιεργούνται με σκοπό την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων του κλωνοποιημένου DNA για περαιτέρω μελέτη του.

### **Μέθοδοι αλληλούχησης του DNA (Δ46-63)**

Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος αλληλούχησης του DNA είναι μια τεχνική που επινόησε ο Frederick Sanger στα τέλη της δεκαετίας του 1970 (Δ47-48). Η μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs), τα οποία προκαλούν τερματισμό της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA (Δ49-50). Αυτά τα ddNTPs ενσωματώνονται φυσιολογικά κατά την αντιγραφή σε μία αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA μέσω των 5' τριφωσφορικών ομάδων τους, αλλά δεν μπορούν να ενωθούν με το επόμενο τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP) που θα έρθει να προστεθεί στην αλυσίδα, επειδή δεν διαθέτουν την 3'-OH ομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού. Αν κατά την *in vitro* αντιγραφή ενός μορίου προστεθεί στο

<sup>3</sup> Παρότι η χρήση ραδιενεργών ιχνηθετών παρουσιάζει τη μεγαλύτερη, ίσως, ευαισθησία σε πειράματα υβριδοποιήσεων, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μη-ραδιενεργές μέθοδοι υβριδοποίησης. Οι μέθοδοι αυτές είτε οδηγούν σε μια χρωμογόνο αντίδραση (που ανιχνεύεται δια γυμνού οφθαλμού) είτε στην εκπομπή χημειοφωταύγειας (που ανιχνεύεται σε ακτινογραφικό φιλμ, όπως η ραδιενέργεια).

μίγμα της αντίδρασης μία μικρή ποσότητα ενός συγκεκριμένου ddNTPs (ας πούμε ddATP) μαζί με τα τέσσερα dNTPs που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση του DNA από την DNA πολυμεράση, θα προκύψουν πολλές διαφορετικές αλυσίδες που θα έχουν τερματιστεί ειδικά στο σημείο όπου θα έχει ενσωματωθεί σε αυτές ένα ddATP (Δ50-51). Για την εύρεση της αλληλουχίας ενός μορίου πραγματοποιούνται τέσσερις αντιδράσεις, η καθεμία με διαφορετικό ddNTP (Δ52-53). Οι αλυσίδες DNA που προκύπτουν από κάθε αντίδραση διαχωρίζονται μεταξύ τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανιχνεύονται μέσω αυτοραδιογραφίας, οπότε καθίσταται δυνατή η ανάγνωση της αλληλουχίας.

Η επόμενη εξέλιξη στην αλληλούχηση σημειώθηκε με την ανάπτυξη μιας μεθόδου σήμανσης κάθε ddNTP με χρωστική διαφορετικού χρώματος (Δ55-58). Με αυτή τη μέθοδο μπορούσε να πραγματοποιηθεί μία μόνο αντίδραση παρουσία μικρών ποσοτήτων και των τεσσάρων ddNTPs, καθώς ήταν δυνατή η διάκριση των τμημάτων που τελείωναν σε καθένα από τα τέσσερα ddNTP. Αργότερα κατασκευάστηκαν μηχανήματα ημιαυτόματης αλληλούχησης και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ενός τμήματος DNA έγινε τυπική διαδικασία σε κάθε εργαστήριο μοριακής βιολογίας. Η πρόοδος στον τομέα αυτό συνεχίστηκε με την ανάπτυξη ρομπότ για την παρασκευή των δειγμάτων και των αντιδράσεων (Δ59-62). Ακολούθησε η κατασκευή πλήρως αυτοματοποιημένων συσκευών αλληλούχησης που βασίζονταν στη χρήση τριχοειδών σωληναρίων αντί του κλασικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης για την ανάλυση των αντιδράσεων. Έτσι μπόρεσε να γίνει αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος ανώτερων οργανισμών. Μέχρι το τέλος του 2006 είχε προσδιοριστεί η αλληλουχία του γονιδιώματος περισσότερων από 1000 ιών και 300 οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, του ποντικού και του αρουραίου.

**Η μέθοδος πυρο-αλληλούχησης (pyrosequencing) χρησιμοποιείται για γρήγορη ανάλυση πολύ μικρών αλληλουχιών**

Η μέθοδος pyrosequencing δεν προϋποθέτει ηλεκτροφόρηση ή κάποια άλλη διαδικασία διαχωρισμού κλασμάτων και, επομένως, είναι πιο γρήγορη από την αλληλούχηση μέσω τερματισμού της αλυσίδας με τα ddNTPs. Παρότι παράγει μερικές μόνο δεκάδες ζεύγη βάσεων ανά πείραμα, είναι πολύ σημαντική τεχνική σε περιπτώσεις όπου πρέπει να παραχθούν πολλές μικρές αλληλουχίες όσο γίνεται πιο γρήγορα, π.χ. στην τυποποίηση πολυμορφισμών μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (SNPs).

Στη μέθοδο pyrosequencing, το εκμαγείο αντιγράφεται με άμεσο τρόπο, χωρίς προσθήκη ddNTPs. Καθώς συντίθεται ο νέος κλώνος, καταγράφεται η σειρά με την οποία ενσωματώνονται τα dNTPs: άρα η αλληλουχία μπορεί να διαβαστεί κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αλληλούχησης. Η προσθήκη ενός dNTP στο άκρο του αυξανόμενου κλώνου γίνεται αντιληπτή επειδή συνοδεύεται από απελευθέρωση ενός μορίου πυροφωσφορικού, που μπορεί να μετατραπεί σε μια λάμψη χημειοφωταύγειας από το ένζυμο σουλφουρυλάση (sulfurylase). Ασφαλώς, αν προστίθεντο ταυτόχρονα και τα τέσσερα dNTPs, τότε συνεχώς θα παρατηρούνταν φωτεινές λάμπες και δεν θα προέκυπταν χρήσιμες πληροφορίες για την αλληλουχία. Γι αυτό το λόγο, κάθε dNTP προστίθεται ξεχωριστά το ένα μετά το άλλο. Στο μείγμα της αντίδρασης συμπεριλαμβάνεται επίσης και το ένζυμο νουκλεοτιδάση έτσι ώστε αν στο πολυνουκλεοτίδιο δεν ενσωματωθεί ένα dNTP, τότε αυτό να αποδομηθεί άμεσα, προτού προστεθεί το επόμενο (Δ63). Με αυτή την προσέγγιση μπορεί να καταγραφεί η σειρά με την οποία ενσωματώνονται τα dNTPs στον αυξανόμενο κλώνο. Η τεχνική φαίνεται πολύπλοκη, αλλά απλώς βασίζεται στην επαναληπτική προσθήκη αντιδραστηρίων στο μείγμα της αντίδρασης που εύκολα μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Η ανίχνευση της χημειοφωταύγειας είναι πολύ ευαίσθητη: έτσι, κάθε αντίδραση μπορεί να διεξαχθεί σε πολύ μικρό όγκο, ακόμα και ενός picolitre (litre<sup>-12</sup>). Αυτό σημαίνει ότι σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα 6.4 cm<sup>2</sup> μπορεί να διεξάγονται ταυτόχρονα έως 1.6 εκατομμύρια αντιδράσεις, αποδίδοντας 25 εκατομμύρια νουκλεοτίδια μέσα σε τέσσερις μόνο

ώρες, ταχύτητα τουλάχιστον εκατονταπλάσια από την αντίστοιχη της μεθόδου τερματισμού αλυσίδας.

## Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) επινοήθηκε από τον Kary Mullis στα μέσα της δεκαετίας 1980 και, όπως η αλληλούχηση και η *in vitro* σύνθεση DNA, έφερε επανάσταση στη μοριακή γενετική. Στους νέους επιστήμονες φαίνεται ίσως ασύλληπτο το πώς γινόταν έρευνα πριν το 1988, τη χρονιά που η PCR έγινε ένα αξιόπιστο και εύχρηστο εργαλείο. Οι παραλλαγές και οι εφαρμογές της τεχνικής PCR είναι αστείρευτες, μερικές των οποίων θα αντιμετωπίσετε σε επόμενα μαθήματα. Εδώ θα ασχοληθούμε με τις βασικές αρχές της τεχνικής. Ας δούμε όμως πρώτα γιατί η αντίδραση αυτή ήταν τόσο επαναστατική.

Ένα μεγάλο πρόβλημα που παρουσιάζει η ανάλυση γονιδίων είναι ότι λόγω της σπανιότητάς τους μέσα στο γονιδίωμα καθίσταται δύσκολος ο εντοπισμός και η απομόνωσή τους. Το ανθρώπινο γονιδίωμα, για παράδειγμα, έχει περίπου 23,000 γονίδια. Οι διάφορες διαδικασίες που ήταν διαθέσιμες για τον εντοπισμό και την απομόνωση των γονιδίων πριν την ανακάλυψη της PCR ήταν πολύπλοκες και χρονοβόρες. Με την PCR αυτό άλλαξε, καθώς η αντίδραση αυτή δίνει τη δυνατότητα να παραγάγουμε τεράστιες ποσότητες μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA χωρίς να χρειαστεί να καταφύγουμε στην κλωνοποίηση. Στην PCR χρησιμοποιούμε μια DNA πολυμεράση για τη σύνθεση (τον πολλαπλασιασμό) μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές, οι οποίοι χρειάζονται για την έναρξη της σύνθεσης DNA.

Το αρχικό υλικό για τη διεξαγωγή της PCR είναι ένα δείγμα DNA που περιέχει την αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η προετοιμασία που χρειάζεται να γίνει κατά την απομόνωση του DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως στόχος για την PCR

είναι σχετικά εύκολη. Δεν είναι απαραίτητο να απομονωθούν εκ των προτέρων οι αλληλουχίες που μας ενδιαφέρουν από το υπόλοιπο DNA. Επειδή η PCR πολλαπλασιάζει το DNA, η αρχική ποσότητα του DNA που χρειάζεται είναι πολύ μικρή. Ακόμη και ένα μόριο DNA αρκεί! Έτσι, η PCR μπορεί να γίνει ακόμη και σε DNA που απελευθερώνεται κατά τη διάρρηξη κυττάρων κατά το βρασμό ενός ποδιού μύγας ή μιας τρίχας, σε DNA απομονωμένο από το δόντι ενός παιδιού Νεάντερταλ που έζησε πριν από 100,000 χρόνια, ή από ένα μοναδικό σπερματοζώαριο ανθρώπου.

Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως μήτρα για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού νέου κλώνου. Για να προκύψει μονόκλωνο DNA, αρκεί η θέρμανση του δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία που πλησιάζει το σημείο βρασμού. Και οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων μορίων. Καθώς το ένζυμο χρειάζεται ένα τμήμα δίκλωνου DNA ώστε να ξεκινήσει τη σύνθεση, προσθέτουμε στην αντίδραση δύο ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές. Καθένας από αυτούς είναι συμπληρωματικός με μια περιοχή του ενός από τους κλώνους του DNA-στόχου, ώστε να υβριδοποιείται (δηλαδή να προσδένεται) σε αυτή. Επομένως, μπορούμε να καθορίσουμε τα σημεία έναρξης της σύνθεσης DNA *in vitro* προσθέτοντας στην αντίδραση εκκινητές που έχουν την κατάλληλη αλληλουχία, ώστε να υβριδοποιούνται με τη μήτρα σε συγκεκριμένες και επιθυμητές περιοχές (Δ65). Όπως γίνεται αντιληπτό, βασική προϋπόθεση για την αντίδραση PCR είναι η δυνατότητα σχεδιασμού των δύο εκκινητών, γεγονός που απαιτεί μια κάποια γνώση της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχύσουμε<sup>4</sup>.

Οι εκκινητές επιλέγονται ώστε να υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε (πολλαπλασιάσουμε). Κάθε νέος κλώνος DNA που συντίθεται από τον έναν εκκινητή

περιλαμβάνει τη θέση στην οποία υβριδοποιείται ο άλλος εκκινητής. Δημιουργούνται λοιπόν νέες θέσεις πρόσδεσης εκκινητών σε κάθε νέο κλώνο DNA που συντίθεται. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά, ώστε να διαχωριστούν οι κλώνοι, οι εκκινητές υβριδοποιούνται στις θέσεις πρόσδεσης που έγιναν προσβάσιμες λόγω της αποδιάταξης, και συντίθενται νέοι κλώνοι. Οι κύκλοι θέρμανσης, προσκόλλησης των εκκινητών στη μήτρα και επέκτασής τους με αποτέλεσμα τη σύνθεση νέων μορίων DNA επαναλαμβάνονται (Δ66-68), έτσι ώστε μετά από  $n$  κύκλους το μείγμα της αντίδρασης να περιέχει θεωρητικά έως  $2^n$  δίκλινα μόρια DNA τα οποία φέρουν αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές (Δ69).

Ένα βασικό πρόβλημα που αντιμετώπιζε η αντίδραση όταν πρωτοανακαλύφθηκε ήταν η σταθερότητα της DNA πολυμεράσης. Διότι ο κάθε κύκλος περιέχει ένα στάδιο αποδιάταξης των αλυσίδων σε υψηλή θερμοκρασία, γεγονός που κατέστρεφε και την DNA πολυμεράση, η οποία έπρεπε να προστεθεί σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η χρήση DNA πολυμερασών από θερμοφιλά βακτήρια έλυσε αυτό το πρόβλημα. Το βακτήριο *Thermus aquaticus* ζει μέσα στο νερό σε θερμοκρασία 75°C και η DNA πολυμεράση του έχει βέλτιστη θερμοκρασία τους 72°C, ενώ είναι αρκετά σταθερή και στους 94°C. Το ένζυμο αυτό ονομάζεται Taq και παραμένει ενεργό σε όλη τη διάρκεια των κύκλων ενίσχυσης. Η πολυμεράση Taq επέτρεψε την αυτοματοποίηση της PCR με τη χρήση θερμοκυκλοποιητών, μηχανημάτων σχεδιασμένων να εκτελούν τα βήματα των κύκλων της PCR στους επιθυμητούς χρόνους και θερμοκρασίες. Για την επεξεργασία πολύ μεγάλου αριθμού δειγμάτων η PCR πραγματοποιείται σήμερα με τη χρήση ρομπότ. Αυτός ο αυτοματισμός ήταν απαραίτητη προϋπόθεση για την ταχεία διεξαγωγή προγραμμάτων αλληλούχησης γονιδιωμάτων, όπου εκτελούνται εκατομμύρια αντιδράσεων PCR χωρίς να παρεμβαίνει ανθρώπινο χέρι.

<sup>4</sup> Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν δεν γνωρίζουμε την αλληλουχία του οργανισμού που θέλουμε να ενισχύσουμε, μπορούμε να σχεδιάσουμε ετερόλογους εκκινητές, δηλαδή εκκινητές που βασίζονται σε αλληλουχίες από συγγενικά είδη ή ομόλογων περιοχών.

## **Βιβλιογραφία**

Brown TA (2007). Γονιδιώματα – Σύγχρονες Ερευνητικές Προσεγγίσεις. Πρώτη Ελληνική Έκδοση (μετάφραση της 3<sup>ης</sup> αγγλικής έκδοσης), Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης (2010).

Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB (2008). Biology. Pearson International, Eight Edition.

Russel PJ (2009). i Genetics. Πρώτη Ελληνική Έκδοση (Μετάφραση της Πρώτης Αγγλικής Έκδοσης), Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα & Σία.

Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA (2007). Ανασυνδυασμένο DNA, Γονίδια και Γονιδιώματα – Μια συνοπτική παρουσίαση. Πρώτη Ελληνική Έκδοση (μετάφραση της 3<sup>ης</sup> αγγλικής έκδοσης), Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα & Σία (2007).

Κακάνη Ε, Αυγουστίνος Α, Μαθιόπουλος Κ (2013). Φυλλάδιο Εργαστηριακών Ασκήσεων του Μαθήματος Μοριακή Βιολογία ΙΙ. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.