

ΤΡΙΤΗ ΑΓΓΛΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ - ΠΡΩΤΗ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ DNA

ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ – ΜΙΑ ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Η τρίτη έκδοση αυτού του βιβλίου-ορόσημου παρουσιάζει τις πλέον σύγχρονες πληροφορίες του πεδίου της γονιδιοματικής. Πέραν του νομπελίστα James D. Watson και του Jan A. Witkowski, στη συγγραφική ομάδα της παρούσας έκδοσης συμπεριλήφθηκαν και οι Richard M. Myers και Amy A. Caudy, ώστε το τελικό αποτέλεσμα να είναι μία έγκυρη, εύληπτη και ελκυστική ανασκόπηση των πεδίων αιχμής της σύγχρονης επιστημονικής έρευνας. Οι συγγραφείς, βασιζόμενοι στην προσωπική τους ερευνητική εμπειρία και κατάρτιση, έχουν επιλέξει τα καταλληλότερα και πιο συναρπαστικά παραδείγματα από σύγχρονα ερευνητικά πεδία, όπως αυτό του RNAi, της επιγενετικής, της μελέτης των γονιδιωμάτων σε ευρεία κλίμακα, του καρκίνου, της γενετικής του ανθρώπου και των γενετικών αποτυπωμάτων. Παράλληλα, παρέχουν στον αναγνώστη τις βάσεις για την κατανόηση των θεμελιωδών αρχών της γενετικής και της γονιδιοματικής, παρουσιάζοντας επιλεγμένα παραδείγματα από τα τελευταία 100 χρόνια.

Η τρίτη έκδοση του *Ανασυνδυασμένου DNA*, γραμμένη από ειδικούς επιστήμονες, αποτελεί μία συνοπτική παρουσίαση του εντυπωσιακού ρόλου της γονιδιοματικής και της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA στο γίνεσθαι των σύγχρονων κοινωνιών. Πρόκειται ως εκ τούτου για ένα πολύτιμο σύγγραμμα για την εκπαίδευση τόσο προπτυχιακών φοιτητών όσων και επαγγελματιών, σε θέματα που αφορούν τη βιολογία, τη γενετική, τη γονιδιοματική, τη βιοχημεία, την κυτταρική και τη μοριακή βιολογία, τη γενετική μηχανική, τη βιοτεχνολογία και τη βιοπληροφορική. Το βιβλίο αυτό είναι επίσης κατάλληλο για γιατρούς, δικηγόρους, αλλά και για όποιον θέλει να γνωρίσει τα επιτεύγματα της πιο συναρπαστικής επιστήμης του 21ου αιώνα.

Απόσπασμα από κριτική της δεύτερης έκδοσης:

«Πρόκειται για μία άριστη πηγή αναφοράς για προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές των βιοεπιστημών ή της ιατρικής, αλλά και για κάθε άλλον που ενδιαφέρεται για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA».

AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS

Σχόλια για την τρίτη έκδοση:

«Αυτό το κείμενο ακολουθεί μία μοναδική προσέγγιση: παρουσιάζει τον τρόπο με τον οποίο αποκτήσαμε τις γνώσεις μας στη μοριακή βιολογία χωρίς να εμβαθύνει στις λεπτομέρειες των μοριακών μηχανισμών. Αντί να εξηγεί απλώς πώς λειτουργούν τα βιολογικά φαινόμενα, “προκαλεί” τους φοιτητές να τα κατανοήσουν μέσα από τα πειράματα που οδήγησαν στις διάφορες ανακαλύψεις».

REBECCA SPARKS-THISSEN, GRINNELL COLLEGE

«...όπως επισημάνθηκε από τις Εθνικές Ακαδημίες στο πλαίσιο της αναφοράς “BIO 2010”, ένα σημείο-κλειδί κατά την προπαρασκευή των νεαρών επιστημόνων του αύριο στις επιστημονικές πρακτικές είναι η εκπαίδευσή τους σε διεπιστημονικά θέματα και διεπιστημονικές ερευνητικές προσεγγίσεις. Το βιβλίο αυτό είναι γραμμένο με τέτοιο τρόπο, ώστε να προωθεί αυτόν το στόχο».

SHOUMITA DASGUPTA, BOSTON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE



W. H. Freeman
and Company



Cold Spring Harbor
Laboratory Press



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις



Watson
Caudy
Myers
Witkowski

ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ DNA

ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ
ΜΙΑ ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ



ΤΡΙΤΗ ΑΓΓΛΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ - ΠΡΩΤΗ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ DNA

ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ – ΜΙΑ ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

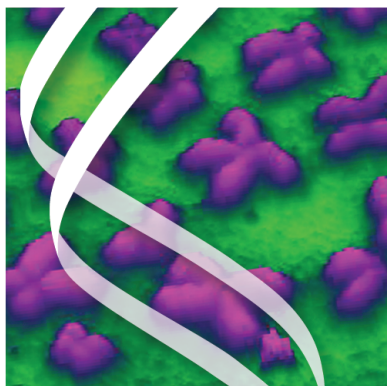


James D. Watson

Amy A. Caudy

Richard M. Myers

Jan A. Witkowski



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Βασικά εργαλεία της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA

Η αποκρυπτογράφηση του γενετικού κώδικα αποτέλεσε το επιστέγασμα της δεκαετούς έρευνας που ακολούθησε την ανακάλυψη της διπλής έλικας του DNA. Το σχετικό ερευνητικό πρόγραμμα είχε βασιστεί στο κεντρικό δόγμα της βιολογίας και μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1960 το είχε επιβεβαιώσει πειραματικά. Οι επιστήμονες είχαν καταδείξει ότι η αντιγραφή του DNA γίνεται με ημισυντηρητικό τρόπο, όπως υποδείκνυε η δομή της διπλής έλικας, και είχαν ανακαλύψει ένα ένζυμο το οποίο εκτελούσε τη σύνθεση του DNA. Είχαν επίσης επιβεβαιώσει πειραματικά ότι στο κεντρικό δόγμα συμμετείχε ένα μόριο RNA με ρόλο μεσάζοντα, το αγγελιαφόρο RNA (mRNA). Οι βιοχημικοί είχαν μελετήσει εκτενώς την πρωτεϊνοσύνθεση, είχαν απομονώσει πολλά από τα συστατικά που εμπλέκονταν σε αυτήν –mRNA, ενεργοποιημένα αμινοξέα, μεταφορικό RNA (tRNA) και ριβοσώματα– και είχαν προσδιορίσει τις λειτουργίες τους. Με την αποκρυπτογράφηση του γενετικού κώδικα ήταν πλέον θεωρητικά δυνατόν να κατανοηθεί η πληροφορία που περιείχε οποιοδήποτε μόριο DNA ή RNA. Είχε μόλις δημιουργηθεί ένας νέος επιστημονικός κλάδος, αυτός της μοριακής γενετικής.

Πολλοί από τους βιολόγους που είχαν λάβει μέρος στη γένεση της μοριακής γενετικής θεώρησαν πως ο νέος αυτός επιστημονικός κλάδος είχε πλέον εισέλθει σε μία περίοδο παγίωσης. Αισθάνονταν, φυσικά, ότι υπήρχε δυνατότητα για περαιτέρω ανάπτυξη, εκτιμούσαν ωστόσο πως αυτή θα γινόταν με τη συσσώρευση γνώσης στο πλαίσιο των βασικών αρχών που είχαν ήδη καθορισθεί, καθώς θα επιλύονταν οι λεπτομέρειες

των παλαιών προβλημάτων και οι βιοχημικοί θα ανέλυαν λεπτομερέστερα τις διαδικασίες που εμπλέκονται σε αυτά. Φαινόταν όμως μάλλον απίθανο να σημειωθεί περαιτέρω πρόοδος μέσω της αναθεώρησης ή/και της συμπλήρωσης των βασικών εννοιών της μοριακής γενετικής. Εκείνη την περίοδο, τη δεκαετία του 1960, η μοριακή γενετική βασιζόταν σχεδόν αποκλειστικά στη μελέτη βακτηρίων και φάγων. Νέα βήματα προόδου θα μπορούσαν να σημειωθούν μελετώντας τη λειτουργία των γονιδίων ανώτερων οργανισμών, αλλά ακόμα δεν ήταν διαθέσιμα τα κατάλληλα πειραματικά μέσα και έτσι κάτι τέτοιο φαινόταν τόσο μακρινό όσο ένα ταξίδι στη Σελήνη. Για να αξιοποιήσουν λοιπόν το χρόνο τους μέχρι την ανάπτυξη κατάλληλων πειραματικών εργαλείων, αρκετοί από τους διακεκριμένους επιστήμονες που συνέβαλαν καθοριστικά στην απόκτηση των πρώτων γνώσεων σχετικά με την αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας στο DNA εγκατέλειψαν τη μοριακή γενετική και ξεκίνησαν μια νέα σταδιοδρομία στο χώρο της νευροβιολογίας. Αυτό που δεν μπορούσαν να προβλέψουν ήταν η ταχύτατη ανάπτυξη, μέσα στην επόμενη δεκαετία, των ενζυμολογικών και των χημικών τεχνικών. Από τις τεχνικές αυτές προέκυψε η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, στην οποία περιλαμβάνεται πλέον κάθε τεχνική χειρισμού του DNA ή του RNA.

Οι τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA είναι ιδιαίτερα ισχυρές, καθώς μας παρέχουν τα εργαλεία για τη μελέτη της γενετικής οποιουδήποτε οργανισμού και για την απομόνωση του DNA οποιουδήποτε σχεδόν γονιδίου. Μπορούμε να απομονώσουμε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, να το *κλωνοποιήσουμε*, προκειμένου να παραγάγουμε πολλαπλά αντίγραφα του, και να το αλληλουχίσουμε, προκειμένου να «διαβάσουμε» τη γενετική πληροφορία που περιέχει. Μπορούμε επίσης να αναλύσουμε τη λειτουργία του γονιδίου αυτού με *μεταλλαξιγένεση in vitro*, κατά την οποία προκαλούμε ειδικές τροποποιήσεις (μεταλλαγές) στην πληροφορία του και ακολούθως το επανεισαγάγουμε στον οργανισμό, για να προσδιορίσουμε τις συνέπειες αυτών των μεταλλαγών. Κατά τα τέλη της δεκαετίας του 1970 έγινε εμφανές ότι τα εργαλεία αυτά αποτελούσαν τον ταχύτερο και ασφαλέστερο τρόπο μελέτης των

μοριακών μηχανισμών, μιας σειράς δηλαδή διαδικασιών, όπως είναι η κυτταρική διαίρεση και η ανάπτυξη, που μέχρι τότε φαινόταν αδύνατον να κατανοηθούν. Έτσι, επιστήμονες σχεδόν από κάθε κλάδο της βιολογίας έσπευσαν να τα χρησιμοποιήσουν. Ακολούθησε μια περίοδος επιστημονικού ενθουσιασμού και επιστημονικών επιτευγμάτων, που δύσκολα συγκρίνεται με οποιαδήποτε άλλη στον τομέα της βιολογικής έρευνας.

Σε αυτό και στα δύο επόμενα κεφάλαια θα παρουσιάσουμε ορισμένες από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία. Στο παρόν κεφάλαιο θα εξετάσουμε τα βασικά εργαλεία του ανασυνδυασμένου DNA: τα ένζυμα που κόβουν, ενώνουν και συνθέτουν DNA, την ηλεκτροφόρηση, την αλληλούχιση και τη χημική σύνθεση DNA, την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και την υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων. Στο Κεφάλαιο 5 θα δούμε τι μας έχουν διδάξει οι τεχνικές απομόνωσης γονιδίων σχετικά με τη δομή του γονιδιώματος, ενώ στο Κεφάλαιο 6 θα μελετήσουμε τις τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη μελέτη της λειτουργίας των αλληλουχιών DNA *in vivo*.

Τα ένζυμα περιορισμού κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες

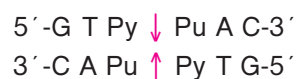
Οι βιοχημικοί είχαν καταφέρει να αξιοποιήσουν τις *πρωτεάσες*, και συγκεκριμένα ορισμένα από τα ένζυμα αυτά που έχουν την ιδιότητα να κόβουν τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε *συγκεκριμένες* θέσεις, για να προσδιορίσουν την αλληλουχία των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιούσαν διαφορετικές πρωτεάσες που κόβουν σε διαφορετικές ειδικές θέσεις, ώστε να προκύπτουν από μία πρωτεΐνη μικρά τμήματα (πεπτίδια), χαρακτηριστικά για κάθε πρωτεάση, των οποίων η αμινοξική αλληλουχία ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί. Στη συνέχεια, καθόριζαν τη σειρά που είχαν τα πεπτίδια αυτά στην πρωτεΐνη, εντοπίζοντας τις περιοχές αλληλεπικάλυψης ανάμεσα στις αμινοξικές αλληλουχίες πεπτιδίων που είχαν προκύψει από διαφορετικές πρωτεάσες. Έτσι, επιτυγχανόταν ο προσδιορισμός της αλληλουχίας της πρωτεΐνης.

Δυστυχώς για τους πρώτους βιοχημικούς που ασχολήθηκαν με τα νουκλεϊκά οξέα, όλες οι μέχρι τότε γνωστές νουκλεάσες, δηλαδή τα ένζυμα που διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς των νουκλεϊκών οξέων, ελάχιστα βασίζονταν στην αλληλουχία των στόχων τους. Η άποψη που κυριαρχούσε ήταν ότι, σε αντίθεση με τις πρωτεάσες, δε θα ανακαλύπτονταν ποτέ νουκλεάσες με μεγάλη εξειδίκευση και επομένως η απομόνωση διακριτών (συγκεκριμένων) τμημάτων DNA, ακόμη και από απλά μόρια όπως το ιικό DNA, θα ήταν αδύνατη. Αυτή η άποψη άρχισε να αμφισβητείται εξαιτίας ορισμένων παρατηρήσεων, οι πρώτες από τις οποίες έγιναν το 1953. Διαπιστώθηκε πως, όταν μόρια DNA από ένα στέλεχος *Escherichia coli* (π.χ. το στέλεχος B) εισάγονταν σε ένα διαφορετικό στέλεχος *E. coli* (π.χ. το στέλεχος C), ακολουθούσε σχεδόν πάντα κατάτμηση του εξωγενούς DNA σε μικρότερα τμήματα. Σε σπάνιες περιπτώσεις το μόριο DNA που εισαγόταν στο κύτταρο υφίστατο κάποιου είδους τροποποίηση που του επέτρεπε να παραμείνει ακέραιο και να αντιγραφεί στο νέο βακτηριακό στέλεχος. Γρήγορα έγινε αντιληπτό πως το φαινόμενο αυτό παρουσίαζε μεγάλη ομοιότητα με το φαινόμενο του περιορισμού του πολλαπλασιασμού βακτηριοφάγων σε ορισμένα βακτηριακά στελέχη, το οποίο είναι γνωστό ως περιορισμός οφειλόμενος στον ξενιστή (host restriction). Σε πειράματα μεταφοράς του φάγου από ένα βακτηριακό στέλεχος σε άλλο, σχεδόν πάντα το ιικό DNA καταστρεφόταν από τα βακτηριακά ένζυμα. Σε σπάνιες όμως περιπτώσεις μπορούσε να διαφύγει, οπότε ο φάγος πολλαπλασιαζόταν επιτυχώς στο στέλεχος περιορισμού, στο νέο δηλαδή στέλεχος. Όταν συνέβαινε αυτό, οι απόγονοί του ήταν πλέον σε θέση να μολύνουν αποτελεσματικά το νέο βακτηριακό στέλεχος. Με άλλα λόγια, το DNA τους δεν καταστρεφόταν μετά την είσοδό του στα βακτήρια του νέου στελέχους και επομένως ο πολλαπλασιασμός τους δεν περιοριζόταν. Ήταν λοιπόν σαφές ότι το βακτηριακό DNA θα έπρεπε με κάποιον τρόπο να τροποποιείται, ώστε να μην καταστρέφεται από τα ίδια του τα ένζυμα, και ότι ορισμένες φορές αντίστοιχες τροποποιήσεις συνέβαιναν και στο DNA του φάγου.

Το 1966 η χημική ανάλυση μορίων DNA που είχαν υποστεί αυτού του είδους την τροποποίηση

αποκάλυψε την ύπαρξη μεθυλιωμένων βάσεων που δεν υπήρχαν στο μη τροποποιημένο DNA. Το φαινόμενο αυτό δεν οφείλεται στην εισαγωγή μεθυλιωμένων νουκλεοτιδίων στις αλυσίδες του DNA κατά την αντιγραφή του. Οι μεθυλιωμένες βάσεις προκύπτουν ύστερα από την προσθήκη μεθυλομάδων σε αλυσίδες DNA που έχουν μόλις συντεθεί. Κατά τη δεκαετία του 1960 οι Stuart Linn και Werner Arber, οι οποίοι εργάζονταν στη Γενεύη, βρήκαν σε εκχυλίσματα κυττάρων του στελέχους B της *E. coli* ένα ειδικό ένζυμο τροποποίησης, το οποίο κατέλυε τη μεθυλίωση συγκεκριμένων αλληλουχιών του αμεθυλιώτου DNA, και μία νουκλεάση περιορισμού, η οποία κατέλυε τη διάσπαση του DNA, εφόσον οι αλληλουχίες αυτές δεν ήταν μεθυλιωμένες. Τα επόμενα χρόνια ανακαλύφθηκαν και άλλες νουκλεάσες περιορισμού, καθώς και οι αντίστοιχες τροποποιητικές μεθυλάσες, γεγονός που υποδήλωνε ότι ίσως υπήρχαν πολλές νουκλεάσες ειδικής θέσης. Όμως κανένα από τα πρώτα ένζυμα περιορισμού που ανακαλύφθηκαν στην *E. coli* δεν ανταποκρίθηκε στις προσδοκίες που γέννησε. Παρόλο που τα ένζυμα αναγνώριζαν συγκεκριμένες μη μεθυλιωμένες αλληλουχίες προκειμένου να προσδεθούν στο DNA, όλα τους έκοβαν το μόριο σε τυχαίες θέσεις που απείχαν πολύ από τις περιοχές στις οποίες προσδένονταν.

Η πρώτη νουκλεάση περιορισμού που έκοβε το DNA σε μία συγκεκριμένη θέση ανακαλύφθηκε το 1970 από το Hamilton Smith στο Πανεπιστήμιο Johns Hopkins, μετά την τυχαία ανακάλυψη ότι το βακτήριο *Haemophilus influenzae* αποικοδομεί γρήγορα το εξωγενές DNA φάγων. Αυτή η αποικοδομητική δραστηριότητα παρατηρήθηκε στη συνέχεια σε εκχυλίσματα ελεύθερα κυττάρων και αποδείχθηκε ότι οφείλεται σε μία νέα νουκλεάση περιορισμού. Ο Thomas Kelly και ο Hamilton Smith ανακάλυψαν ότι η HindIII, όπως ονομάζεται το ένζυμο αυτό, προσδένεται στην ακόλουθη αλληλουχία, στην οποία τα βέλη δείχνουν τις ακριβείς θέσεις κοπής σε κάθε κλώνο του DNA, ενώ με «Py» και «Pu» συμβολίζονται τα κατάλοιπα πυριμιδίνης και πουρίνης αντίστοιχα:



Από τότε έχουν απομονωθεί ένζυμα περιορισμού που κόβουν συγκεκριμένες αλληλουχίες από αρκετές εκατοντάδες βακτηριακά στελέχη και έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 150 διαφορετικές ειδικές θέσεις αναγνώρισης (Πίνακας 4.1). Σχεδόν όλα τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν *παλίνδρομες θέσεις*, δηλαδή θέσεις στις οποίες η αλληλουχία στον κάθε κλώνο είναι η ίδια όταν διαβάζεται στην κατεύθυνση 5' προς 3'. Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα περισσότερα ένζυμα περιορισμού λειτουργούν ως διμερή, αποτελούμενα από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες που εφαρμόζουν στο DNA με τέτοιο τρόπο, ώστε ο άξονας της αμφίπλευρης συμμετρίας τους να συμπίπτει με αυτόν της αλληλουχίας αναγνώρισης. Το ένζυμο κινείται κατά μήκος του DNA και, όταν φτάσει στην αλληλουχία-στόχο, κόβει τους δύο κλώνους.

Τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ ζευγών βάσεων. Μία συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης μεγέθους 4 bp συναντάται κατά μέσο όρο κάθε 256 bp. Έτσι, ένα ένζυμο που κόβει μία αλληλουχία τεσσάρων βάσεων παράγει πολύ περισσότερα και πολύ μικρότερα τμήματα DNA απ' ό,τι ένα ένζυμο που κόβει μία αλληλουχία 8 bp, η οποία συναντάται κατά μέσο όρο κάθε 65.536 bp. Ωστόσο, η πρόβλεψη του μεγέθους των τμημάτων DNA που θα προκύψουν από την πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού περιπλέκεται από πολλούς παράγοντες. Ένας παράγοντας που επηρεάζει τη συχνότητα με την οποία κόβεται το DNA είναι η σύνθεση της αλληλουχίας του. Ας πάρουμε ως παράδειγμα το ένζυμο NotI, το οποίο αναγνωρίζει μία αλληλουχία οκτώ βάσεων που περιέχει δύο δινοουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης (τα οποία συντομογρα-

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1: Ορισμένα ένζυμα περιορισμού και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν

Μικροοργανισμός	Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης	Σημειώσεις
<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeIII	5' ... G G C C ... 3' 3' ... C C G G ... 5'	1
<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI	5' ... T C G A ... 3' 3' ... A G C T ... 5'	2
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	HhaI	5' ... G C G C ... 3' 3' ... C G C G ... 5'	3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DdeI	5' ... C T N A G ... 3' 3' ... G A N T C ... 5'	4
<i>Moraxella bovis</i>	MboII	5' ... G A A G A (N) ₈ ... 3' 3' ... C T T C T (N) ₇ ... 5'	5
<i>Escherichia coli</i>	EcoRV	5' ... G A T C ... 3' 3' ... C T A G ... 5'	1
	EcoRI	5' ... G A A T T C ... 3' 3' ... C T T A A G ... 5'	2
<i>Providencia stuarti</i>	PstI	5' ... C T G C A G ... 3' 3' ... G A C G T C ... 5'	3
<i>Microcoleus</i>	MstII	5' ... C C T N A G G ... 3' 3' ... G G A N T C C ... 5'	4
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	NotI	5' ... G C G G C C G C ... 3' 3' ... C G C C G G C G ... 5'	6

Σημειώσεις

1. Το ένζυμο δημιουργεί λεία άκρα.
2. Τα άκρα των μονόκλωνων τμημάτων είναι 5'.
3. Τα άκρα των μονόκλωνων τμημάτων είναι 3'.
4. Το ζεύγος βάσεων N μπορεί να είναι οποιοδήποτε.
5. Το ένζυμο δεν κόβει μέσα στην αλληλουχία αναγνώρισης αλλά σε οποιαδήποτε τυχαία αλληλουχία βρίσκεται οκτώ νουκλεοτίδια δεξιά από τη θέση αναγνώρισης στον άνω κλώνο και επτά νουκλεοτίδια στον κάτω κλώνο.
6. Η NotI κόβει το DNA των θηλαστικών πολύ σπάνια.

φούνται συνήθως ως CpG). Αυτή η δινουκλεοτιδική αλληλουχία συναντάται πολύ σπανιότερα στα γονιδιώματα των σπονδυλωτών απ' ό,τι θα ήταν στατιστικά αναμενόμενο (σε συχνότητα που αντιστοιχεί περίπου στο 20% της αναμενόμενης) και έτσι η NotI κόβει πολύ πιο σπάνια απ' ό,τι θα αναμενόταν. Επίσης, η κυτοσίνη συχνά υφίσταται μεθυλίωση και, καθώς η NotI δεν μπορεί να κόψει μεθυλιωμένες θέσεις CpG, τα τμήματα που προκύπτουν είναι ακόμη λιγότερα και μεγαλύτερα. Επιπλέον, οι θέσεις CpG δεν είναι κατανεμμένες τυχαία στο γονιδίωμα, αλλά τείνουν να συγκεντρώνονται στις 5' περιοχές των γονιδίων. Η NotI κόβει το γονιδίωμα των σπονδυλωτών σε τμήματα με μέγεθος που γενικά κυμαίνεται μεταξύ 1 εκατομμυρίου και 1,5 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων και όχι 65.536 ζεύγη βάσεων, όπως θα αναμενόταν από ένα ένζυμο που αναγνωρίζει αλληλουχίες 8 bp. Ένζυμα όπως η NotI, τα οποία παράγουν πολύ μεγάλα τμήματα DNA, έχουν αποδειχθεί πολύτιμα για τη φυσική χαρτογράφηση του DNA των θηλαστικών.

Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων

Τόσο οι πρωτεΐνες όσο και τα νουκλεϊκά οξέα (για παράδειγμα, τα τμήματά τους που παράγονται από τα ένζυμα περιορισμού) είναι δυνατόν να αναλυθούν μέσω *ηλεκτροφόρησης*. Μόρια πρωτεϊνών ή/και νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό φορτίο τους, το μέγεθος και το σχήμα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας μάλιστα τις βιολογικές τους ιδιότητες. Οι Arne Tiselius και Theodor Svedberg, το 1926, ανέπτυξαν τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης κινούμενου μετώπου (*moving boundary electrophoresis*). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν ανθεκτικά υλικά, συνήθως χάρτινα φίλτρα και πηκτώματα που αποτελούνταν από πολυμερή όπως η αгарόζη ή η πολυακρυλαμίδα.

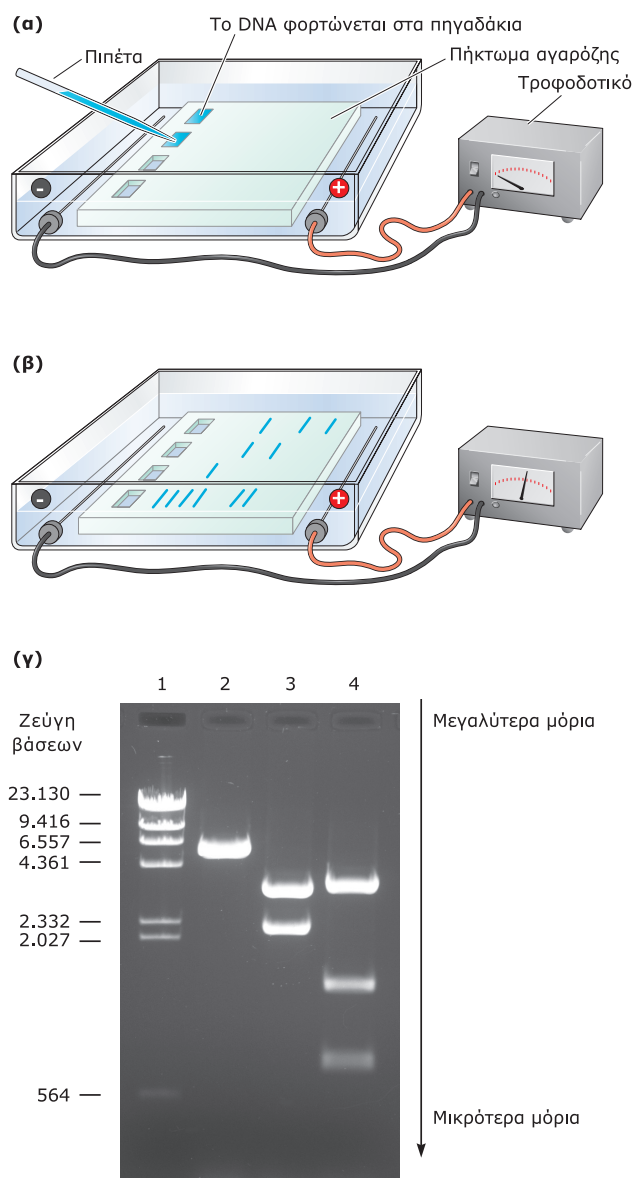
Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα τμήματα του DNA μέσα σε ένα πήκτωμα είναι συνάρτηση του μήκους τους, του φορτίου τους και του σχήματός τους. Τα μικρά τμήματα γενικά κινούνται γρη-

γορότερα από τα μεγάλα (Εικ. 4.1). Χρησιμοποιούνται διαφορετικά υλικά, ανάλογα με τα απόλυτα μεγέθη των τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν και τις σχετικές διαφορές μεγέθους μεταξύ τους. Τα τμήματα DNA με μέγεθος από 100 ζεύγη βάσεων έως αρκετές χιλιάδες ζεύγη βάσεων είναι δυνατόν να διαχωριστούν αποτελεσματικά σε ένα πήκτωμα με συγκέντρωση αгарόζης 1%, εφόσον το μέγεθος των τμημάτων αυτών διαφέρει κατά λίγες εκατοντάδες ζεύγη βάσεων. Όταν είναι απαραίτητο να διαχωριστούν μεταξύ τους μικρά τμήματα (δεκάδων έως εκατοντάδων ζευγών βάσεων) που διαφέρουν ακόμα και κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο (π.χ. κατά την αλληλούχηση του DNA), είναι απαραίτητη η χρήση πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης.

Αρχικά, κατά τη χρήση της ηλεκτροφόρησης για την ανάλυση τμημάτων ιικού DNA που παράγονταν από ένζυμα περιορισμού, το ιικό DNA σμαινόνταν πρώτα με ραδιενέργεια και στη συνέχεια τα τμήματα ανιχνεύονταν με αυτοραδιογραφία. Ένα ιδιαίτερα σημαντικό βήμα προόδου σημειώθηκε, όταν οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν χρωστικές που προσδένονταν στο DNA, όπως το βρομιούχο αιθίδιο, και με τον τρόπο αυτό να επιτύχουν τη χρώση των τμημάτων του ενόσω αυτά βρίσκονταν στο πήκτωμα. Εκθέτοντας το πήκτωμα σε UV, τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μία σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους. Είναι δυνατόν να παρατηρηθούν ζώνες που περιέχουν ακόμη και 0,005 μg DNA. Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι τα μόρια του DNA που μετακινούνται μέσα στα πηκτώματα αυτά διατηρούνται άθικτα και είναι δυνατόν να ανακτηθούν (εκλουστούν) και κατόπιν να χρησιμοποιηθούν σε επόμενα πειράματα.

Τα ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία χαρτών DNA

Όταν χρησιμοποιούνται ένζυμα περιορισμού τα οποία αναγνωρίζουν διαφορετικές αλληλουχίες-



ΕΙΚΟΝΑ 4.1: Διαχωρισμός μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα.

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA κινείται μέσα σε ένα πορώδες πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. (α) Παρασκευάζεται ένα πήκτωμα αγαρόζης (σε μορφή λεπτής πλάκας) με μικρά πηγαδάκια και εμβαπτίζεται σε ένα διάλυμα με κατάλληλες συγκεντρώσεις αλάτων. Τα δείγματα τοποθετούνται (φορτώνονται) στα πηγαδάκια με μία πιπέτα. Στα δείγματα προστίθεται μικρή ποσότητα ενός διαλύματος βαρύτερου από το νερό που περιέχει μία χρωστική (συνήθως μπλε). Έτσι, αφενός καθίστανται ορατά, γεγονός που διευκολύνει την τοποθέτησή τους (τη φόρτωσή τους) στο πήκτωμα, και αφετέρου γίνονται βαρύτερα, ώστε να καθιζάνουν στα πηγαδάκια. (β) Με τη βοήθεια κατάλληλου τροφοδοτικού δημιουργείται ένα ηλεκτρικό πεδίο, οπότε τα μόρια DNA (που είναι αρνητικά φορτισμένα) μετακινούνται προς το θετικό πόλο. Τα μικρά μόρια κινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα. Άλλοι παράγοντες, όπως το φορτίο και το σχήμα, επηρεάζουν επίσης την κίνηση των μορίων μέσα στο πήκτωμα. Καθώς μετακινούνται, τα διαφορετικά μόρια DNA σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές (ανάλογα με το μέγεθός τους) περιοχές του πηκτώματος. (γ) Αν στο πήκτωμα προστεθεί βρομιούχο αιθίδιο, οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Το βρομιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια και φθορίζει όταν διεγείρεται με UV. Στο πήκτωμα της εικόνας έχει γίνει πέψη του πλασμιδίου pCDNA3.1 με EcoRI (στήλη 2), SalI (στήλη 3) και NcoI (στήλη 4). Η στήλη 1 περιέχει DNA του φάγου λ κομμένο με HindIII. Τα τμήματα του DNA του φάγου λ που προκύπτουν από την πέψη με την HindIII έχουν γνωστό μέγεθος, οπότε από τη σύγκριση με αυτά καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός των μεγεθών των τμημάτων που προκύπτουν από τις πέψεις του πλασμιδίου.

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 σειρά με την οποία τα τμήματα αυτά συναντώνται στο άκοπο μόριο. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να σχεδιαστεί ένας *χάρτης περιορισμού* του μορίου, ο οποίος απεικονίζει τις θέσεις στις οποίες κόβουν τα διάφορα ένζυμα. Ο πρώτος χάρτης αυτού του είδους δημιουργήθηκε το 1971 από τον Daniel Nathans, συνάδελφο του Hamilton Smith στο Johns Hopkins. Ο Nathans χρησιμοποίησε το ένζυμο HindII, για να κόψει το κυκλικό DNA του ιού SV40 (οι ειδικοί αποκαλούν τη διαδικασία «πέψη») σε 11 συγκεκριμένα τμήματα. Μετρώντας τα μεγέθη των τμημάτων που παράγονταν μετά από πλήρη πέψη του DNA, καθώς και τα μεγέθη των αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων ενδιάμεσου μεγέθους που προέκυπταν μετά από χρήση HindII για σύντομο χρονικό διάστημα (γεγονός που οδηγούσε σε μερική μόνο πέψη του DNA, υπό την έννοια ότι το ένζυμο δεν έκοβε όλα τα μόρια του DNA σε όλες τις θέσεις αναγνώρισης), ο Nathans προσδιόρισε στο κυκλικό DNA τις θέσεις στις οποίες δρα το ένζυμο περιορισμού. Χάρη σε αυτή την πληροφορία κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός περιοχών βιολογι-

κής σημασίας πάνω στο κυκλικό DNA του ιού. Για παράδειγμα, ο Nathans, πραγματοποιώντας σύντομη ραδιενεργή σήμανση αντιγραφόμενου ιικού DNA και ακολούθως πέψη του με HindII, απέδειξε ότι η αντιγραφή του DNA του SV40 ξεκινά πάντα από ένα συγκεκριμένο τμήμα περιορισμού της HindII και προχωρά αμφίδρομα γύρω από το κυκλικό μόριο. Όπως βλέπουμε, τα ένζυμα περιορισμού αποτελούν ένα σημαντικότερο εργαλείο για τους μοριακούς βιολόγους, καθώς τους 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 με συγκεκριμένες αλληλουχίες, όπως είναι το στύπωμα κατά Southern (βλ. Εικ. 4.11).

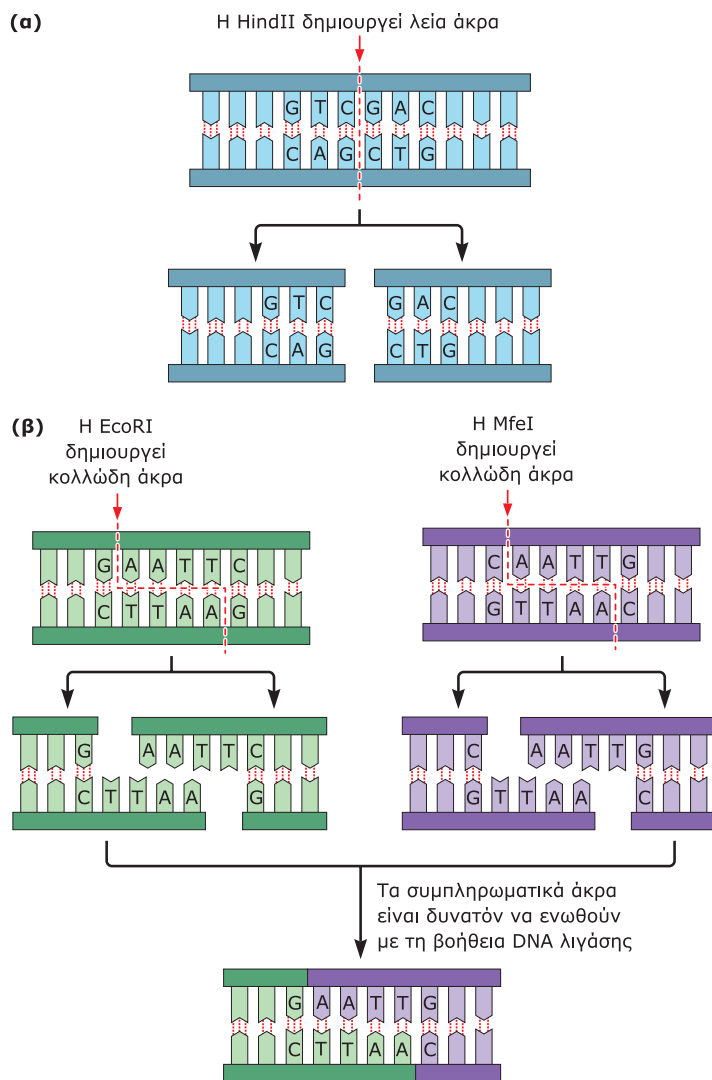
Η DNA λιγάση ενώνει τα άκρα τμημάτων DNA που παράγονται από τα ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού σε συνδυασμό με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αποτελούν ένα εύχρηστο μέσο καθαρισμού συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Αποτελούν όμως και ένα εργαλείο για τον ανασυνδυασμό τμημάτων DNA, λόγω του τρόπου με τον οποίο κόβουν το δίκλωνο DNA. Ορισμένα ένζυμα περιορισμού, όπως η HindII, κόβουν το DNA στο κέντρο της θέσης αναγνώρισης, παράγοντας τμήματα με λεία άκρα. Στα τμήματα αυτά οι βάσεις είναι πλήρως ζευγαρωμένες μέχρι τα άκρα τους (Εικ. 4.2α). Άλλα ένζυμα περιορισμού κόβουν ασύμμετρα τους δύο κλώνους του DNA, δημιουργώντας συμπληρωματικές μονόκλωνες «ουρές» μικρού μήκους στα άκρα κάθε τμήματος. Η αλληλουχία αναγνώρισης της EcoRI είναι η GAATTC και από την κοπή της προκύπτει μία ουρά μήκους τεσσάρων βάσεων, η AATT (Εικ. 4.2β). 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 CAATTG και κόβοντάς την παράγει την ίδια ουρά AATT που προκύπτει και από την EcoRI (Εικ. 4.2β).

Οι συμπληρωματικές μονόκλωνες ουρές έχουν την τάση να ενώνονται μεταξύ τους και γι' αυτό συχνά αποκαλούνται *συνεκτικά* ή *κολλώδη άκρα*. Για παράδειγμα, τα γραμμικά μόρια που παράγει η EcoRI κόβοντας το κυκλικό DNA του SV40 είναι δυνατόν να ξαναπάρουν προσωρινά κυκλική μορφή, λόγω ζευγαρώματος ανάμεσα στις βάσεις των ουρών τους. Ζευγάρωμα βάσεων γίνεται μόνο ανάμεσα σε συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων. Έτσι, τα συνεκτικά άκρα AATT που παράγει η EcoRI δε ζευγαρώνουν, για παράδειγμα, με τα άκρα AGCT που παράγει η 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 χρειαζόταν ήταν να βρεθεί ένας τρόπος να μονιμοποιηθούν οι συνδέσεις ανάμεσα σε τέτοιου είδους άκρα.

Ένζυμα που ενώνουν τμήματα DNA μεταξύ τους είχαν ήδη ανακαλυφθεί από το 1967. Πρόκειται για τις *DNA λιγάσες*, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση και στην αντιγραφή του DNA: τα τμήματα Okazaki που δημιουργούνται στον καθυστερημένο κλώνο (lagging strand) ενώνονται μεταξύ τους από μία λιγάση. Χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού και τις λιγάσες, οι επιστήμονες είχαν πλέον τα εργαλεία που τους ήταν απαραίτητα για να κόβουν το DNA και να κολλάνε μεταξύ τους τα διάφορα τμήματά του σε συνδυασμούς που αυτοί θα επέλεγαν. Αυτού του είδους τα πειράματα έγιναν για πρώτη φορά στο Πανεπιστήμιο Stanford το 1972, από τους Janet Mertz και Ronald Davis, οι οποίοι, χρησιμοποιώντας την EcoRI σε συνδυασμό με την DNA λιγάση, ανέπτυξαν μία γενική μέθοδο *in vitro* γενετικού ανασυνδυασμού σε συγκεκριμένες θέσεις.

Έτσι, μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1970 οι επιστήμονες είχαν στη διάθεσή τους τεχνικές για το χειρισμό και την απομόνωση γονιδίων και είχαν αρχίσει να καταστρώνουν σχέδια για την κλωνοποίησή τους. Ήδη όμως καθώς ετοιμάζονταν τα πρώτα σχέδια για τη διεξαγωγή πειραμάτων κλωνοποίησης γονιδίων, άρχισαν να εκφράζονται ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια αυτών των πειραμάτων.



ΕΙΚΟΝΑ 4.2: Τα ένζυμα περιορισμού παράγουν είτε λεία άκρα είτε κολλώδη άκρα.

(α) Το ένζυμο περιορισμού HindII κόβει το DNA στο κέντρο της θέσης αναγνώρισής του, αφήνοντας λεία άκρα. Αυτά τα λεία άκρα είναι δυνατόν να ενωθούν με τα λεία άκρα που θα προκύψουν από οποιαδήποτε άλλη διαδικασία. (β) Τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και MfeI δημιουργούν ασυμπτωτικές, συμμετρικές εγχοπές στο DNA, εκατέρωθεν της θέσης στην οποία προσδένονται, δημιουργώντας έτσι κολλώδη άκρα. Ένα κολλώδες άκρο που προκύπτει από πέψη με EcoRI μπορεί να προσκολληθεί με δεσμούς υδρογόνου σε οποιοδήποτε άλλο κολλώδες άκρο έχει δημιουργηθεί με κοπή από EcoRI ή σε οποιοδήποτε άλλο άκρο συμπληρωματικής αλληλουχίας έχει προκύψει με άλλες μεθόδους. Για παράδειγμα, το ένζυμο περιορισμού MfeI παράγει όμοια προεξέχοντα άκρα με την EcoRI, παρόλο που οι θέσεις που αναγνωρίζουν είναι διαφορετικές. Τα κολλώδη άκρα που προκύπτουν από τη δράση του MfeI είναι δυνατόν να ενωθούν με αυτά που παράγει η EcoRI, αν και στη συνέχεια το προϊόν αυτής της ένωσης δε θα είναι δυνατόν να κοπεί ξανά με κάποιο από τα δύο αυτά ένζυμα, καθώς η αλληλουχία που θα προκύψει δε θα αναγνωρίζεται από κανένα από αυτά.

Οι επιστήμονες εκφράζουν ανησυχίες σχετικά με τους κινδύνους της κλωνοποίησης γονιδίων

Αυτές οι πρώτες ανησυχίες –που προηγήθηκαν της κλωνοποίησης οποιουδήποτε γονιδίου– επικεντρώθηκαν στην κλωνοποίηση των γονιδιωμάτων ογκοϊών DNA και στην αντιγραφή των ανασυνδυασμένων μορίων σε βακτηριακά κύτταρα όπως η *E. coli*. Το ερώτημα ήταν: Θα μπορούσε η *E. coli*, ένας οργανισμός που βρίσκεται φυσιολογικά στον εντερικό σωλήνα όλων των ανθρώπων, να λειτουργήσει ως φορέας για τη μετάδοση των ογκογόνων γονιδίων των ογκοϊών στον άνθρωπο; Το 1972 διαπιστώθηκε ότι στο DNA ποντικού, και πιθανότατα ορισμένων ανθρώπων, φιλοξενείται στη μορφή DNA

το γονιδίωμα ογκοϊών RNA, σε μια λανθάνουσα κατάσταση που ονομάζεται προϊός. Επομένως, πολλά από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που θα κατασκεύαζαν οι επιστήμονες αναζητώντας συγκεκριμένα γονίδια του ποντικού ή του ανθρώπου θα μπορούσαν να περιέχουν DNA προϊόν που ίσως θα ήταν σε θέση να προκαλέσει καρκίνο στον άνθρωπο. Αν ήταν έτσι, θα έπρεπε να θεωρηθούν ως ενδυνάμει επικίνδυνα όλα τα πειράματα γενετικής μηχανικής που έκαναν χρήση DNA σπονδυλωτών; Οι γνώμες γύρω από το θέμα ήταν διχασμένες. Αυτό ήταν αναμενόμενο, δεδομένου ότι δεν υπήρχαν ακόμη όλα τα στοιχεία που θα επέτρεπαν τη λογική εκτίμηση των πιθανών κινδύνων. Παρ' όλα αυτά, η άποψη που επικρατούσε ομόφωνα σχεδόν ήταν ότι οι ερευνητές δε θα πρέπει να έχουν απεριόρι-

στη ελευθερία στη διεξαγωγή πειραμάτων που θα μπορούσαν να έχουν στρατιωτικές εφαρμογές.

Όπως βλέπουμε, οι πρώτες συζητήσεις σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA έγιναν πριν από τη διεξαγωγή των σχετικών πειραμάτων. Εντούτοις, η ανακοίνωση των πρώτων επιτυχών πειραμάτων κλωνοποίησης δεν άφησε πολλά περιθώρια για σκέψεις και προβληματισμούς, καθώς κατέστη σαφές ότι για την ανακάλυψη της μοριακής βάσης της γενετικής ήταν απαραίτητη η χρήση τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA. Το ερώτημα ήταν αν οι επιστήμονες θα έπρεπε να προχωρήσουν, όσο γινόταν πιο γρήγορα, τις έρευνές τους ή αν θα έπρεπε να προσπαθήσουν να επινοήσουν πρώτα μεθόδους που θα μετρίαζαν τις ανησυχίες σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους αυτών των πειραμάτων. Τον Ιούλιο του 1974 δημοσιεύτηκε στο περιοδικό *Science* μία επιστολή που προέτρεπε όσους επιστήμονες σκόπευαν να πραγματοποιήσουν πειράματα ανασυνδυασμένου DNA να αναβάλουν τα σχέδιά τους μέχρι να εκτιμηθούν καλύτερα οι κίνδυνοι που παραμόνευαν. Έτσι, το Φεβρουάριο του 1975 περισσότεροι από 100 μοριακοί βιολόγοι διεθνούς κύρους συγκεντρώθηκαν στο Συνεδριακό Κέντρο Asilomar, κοντά στο Monterey της California, προκειμένου να εκτιμήσουν την κατάσταση. Απουσία επαρκών στοιχείων σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους, κρίθηκε σχεδόν ομόφωνα ότι ήταν σκόπιμο να τεθούν ορισμένοι περιορισμοί στην κλωνοποίηση του DNA.

Στη συνέχεια, οι «συστάσεις του Asilomar» μελετήθηκαν από μία ειδική επιτροπή που ορίστηκε από τα Εθνικά Ιδρύματα Υγείας των ΗΠΑ (NIH, *National Institutes of Health*). Οι προτάσεις της επιτροπής ουσιαστικά απέκλειαν τη χρήση τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA για τη μελέτη γονιδίων ογκοϊών και αξίωναν τη χρήση γενετικά τροποποιημένων βακτηριών που δε θα μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν εκτός του εργαστηρίου (δηλαδή στη φύση). Οι συστάσεις αυτές κωδικοποιήθηκαν με τη μορφή επίσημων νομικών ρυθμίσεων και τέθηκαν σε εφαρμογή τον Ιούλιο του 1976. Ανάλογες ρυθμίσεις με αυτές των Ηνωμένων Πολιτειών ίσχυαν και στην Ευρώπη μέσω οδηγιών που θέσπισαν αντίστοιχοι φορείς.

Ένα αξιοσημείωτο στοιχείο των έντονων συζητήσεων σχετικά με την ασφάλεια του ανασυνδυασμένου DNA ήταν η πρωτοφανής συμμετοχή σε αυτές «μη ειδικών», δηλαδή ατόμων που δεν ανήκαν στην επιστημονική κοινότητα, όπως έγινε, για παράδειγμα, στο Cambridge της Massachusetts. Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα τον ορισμό στη Συμβουλευτική Επιτροπή για το Ανασυνδυασμένο DNA (*Recombinant DNA Advisory Committee*) ατόμων που δεν ήταν ειδικοί, τα οποία κατόπιν, με την ιδιότητα πλέον του μέλους της επιτροπής, αναμείχθηκαν στις επίσημες συζητήσεις σχετικά με τον αντίκτυπο της γενετικής στην κοινωνία. Η πιο χαρακτηριστική περίπτωση συμμετοχής «μη ειδικών» αποτελεί το Ερευνητικό Πρόγραμμα Ηθικών, Νομικών και Κοινωνικών Ζητημάτων (ELSI, *Ethical, Legal and Social Issues Research Program*), του Προγράμματος του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Κεφάλαιο 11).

Πολλοί επιστήμονες θεώρησαν ότι οι ρυθμίσεις των Εθνικών Ιδρυμάτων Υγείας ήταν υπερβολικά αυστηρές και ότι σε ορισμένες περιπτώσεις στηρίζονταν σε λανθασμένες επιστημονικά βάσεις. Με την πραγματοποίηση περισσότερων πειραμάτων και τη συλλογή περισσότερων δεδομένων γινόταν όλο και πιο ξεκάθαρο ότι οι πραγματικοί κίνδυνοι που εγκυμονούσαν τα πειράματα ανασυνδυασμένου DNA ήταν ελάχιστοι. Συζητήσεις που έγιναν σε όλη τη διάρκεια του 1978 οδήγησαν σε νέους, λιγότερο αυστηρούς κανονισμούς, οι οποίοι εφαρμόστηκαν τον Ιανουάριο του 1979 και επέτρεπαν την κλωνοποίηση ιικών ογκογονιδίων.

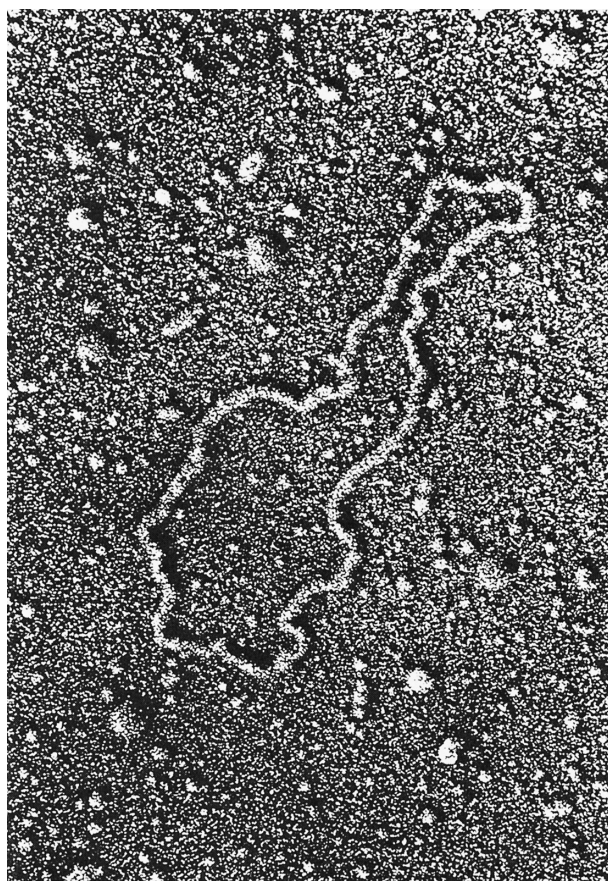
Πλασμίδια και ιοί χρησιμοποιούνται ως φορείς αλληλουχιών DNA

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. Ο προφανής τρόπος για να γίνει κάτι τέτοιο ήταν η χρήση βακτηρίων για την αντιγραφή του γονιδίου, ακόμη και αν αυτό δεν προερχόταν από βακτήρια. Προκειμένου

να επιτευχθεί 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*) και αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του βακτηρίου-ξενιστή. Τα πλασμίδια παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά ως εξωχρωμοσωμικό γενετικό υλικό, δηλαδή ως μόρια DNA που δε 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 χρωμοσωμικό DNA δεν είναι τυχαίο. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά προϋποθέτει σχετικά μεγάλες ποσότητες 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.

Στα πρώτα πειράματα κλωνοποίησης που έγιναν, ο Stanley Cohen, ο Herbert Boyer και οι συνεργάτες τους στο Stanford και στο Πανεπιστήμιο της California στο San Francisco χρησιμοποίησαν δύο πλασμίδια από την *E. coli*: τα pSC101 (Εικ. 4.3) και pSC102. Το pSC101 επιλέχθηκε ως φορέας, επειδή φέρει μόνο μία θέση αναγνώρισης από την EcoRI η οποία προσφέρεται να δεχτεί τμήματα DNA που έχουν κοπεί με EcoRI (ή κάποιο άλλο ένζυμο που δημιουργεί τα ίδια μονόκλωνα άκρα) και επειδή παρέχει τη δυνατότητα θετικής επιλογής του με χρήση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη, καθώς φέρει ένα γο-

νίδιο ανθεκτικότητας σε αυτό. Το πλασμίδιο pSC102, που φέρει τρεις θέσεις αναγνώρισης από την EcoRI, περιέχει ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στη φαρμακευτική ουσία καναμυκίνη. Αυτό ήταν και το γονίδιο που επρόκειτο να κλωνοποιηθεί στο pSC101. Τα δύο πλασμίδια αναμείχθηκαν και κόπηκαν με EcoRI. Τα γραμμικά τμήματα DNA που προέκυψαν αφέθηκαν να συνδεθούν μεταξύ τους. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε DNA λιγάση για τη σταθεροποίηση των συνδέσεων και ακολούθησε η εισαγωγή των ανασυνδυασμένων μορίων DNA σε βακτήρια τα οποία επιστρώθηκαν σε μέσο που περιείχε τόσο τετρακυκλίνη όσο και καναμυκίνη. Όσα από αυτά επιβίωσαν και αναπτύχθηκαν ήταν ανθεκτικά και στα δύο αντιβιοτικά, διότι περιείχαν ανασυνδυασμένα πλασμίδια που έφεραν το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, το οποίο προερ-



ΕΙΚΟΝΑ 4.3: Φωτογραφία του πλασμιδίου pSC101 στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Το πλασμίδιο pSC101 είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA μεγέθους 9.263 ζευγών βάσεων και έχει μήκος περίπου 1,3 μm .

χόταν από το pSC101, και το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, το οποίο προερχόταν από το pSC102 και είχε μεταφερθεί στο pSC101.

Παρόλο που στο αρχικό πείραμα των Cohen-Boyer και τα δύο DNA προέρχονταν από πλασμίδια, ήταν σαφές ότι όλα τα είδη εξωγενούς DNA από μικρόβια και –το πιο σημαντικό– από ανώτερα φυτά και ζώα ήταν δυνατόν να κλωνοποιηθούν σε αυτά τα πλασμίδια. Για παράδειγμα, το χρωμόσωμα της *E. coli*, που αποτελείται από 4 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων, περιέχει περίπου 500 θέσεις αναγνώρισης της EcoRI. Με τυχαία ένθεση μεμονωμένων τμημάτων που έχουν προκύψει από κοπή με EcoRI στο πλασμίδιο pSC101, θα ήταν δυνατόν να κλωνοποιηθούν όλα τα γονίδια της *E. coli*.

Τα πλασμίδια τροποποιήθηκαν, ώστε να είναι ακόμη πιο 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 φέρουν πολλές εναλλακτικές θέσεις περιορισμού για κλωνοποίηση, έχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε διαφορετικά αντιβιοτικά και υπάρχουν 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 (Εικ. 4.4).

Η επιτυχής χρήση των πλασμιδίων ενθάρρυνε τους επιστήμονες, οι οποίοι στράφηκαν στη φύση αναζητώντας άλλους φορείς κατάλληλους για κλωνοποίηση σε βακτήρια. Οι βακτηριοφάγοι ήταν μία προφανής επιλογή. Οι μεταγωγοί βακτηριοφάγοι (transducing bacteriophages) μεταφέρουν τμήματα βακτηριακών χρωμοσωμάτων από το ένα βακτηριακό κύτταρο στο άλλο. Οι μεταγωγοί φάγοι ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του βακτηρίου-ξενιστή «αναμένοντας» τις κατάλληλες συνθήκες για να αποσπαστούν από αυτό. Αν η εκτομή τους από το βακτηριακό γονιδίωμα δε γίνει με ακρίβεια, ο φάγος ενδέχεται να πάρει μαζί του ένα τμήμα του βακτηριακού γονιδιώματος. Μεταγωγικά γεγονότα αυτού του είδους είχαν χρησιμοποιηθεί επί μακρόν για τη

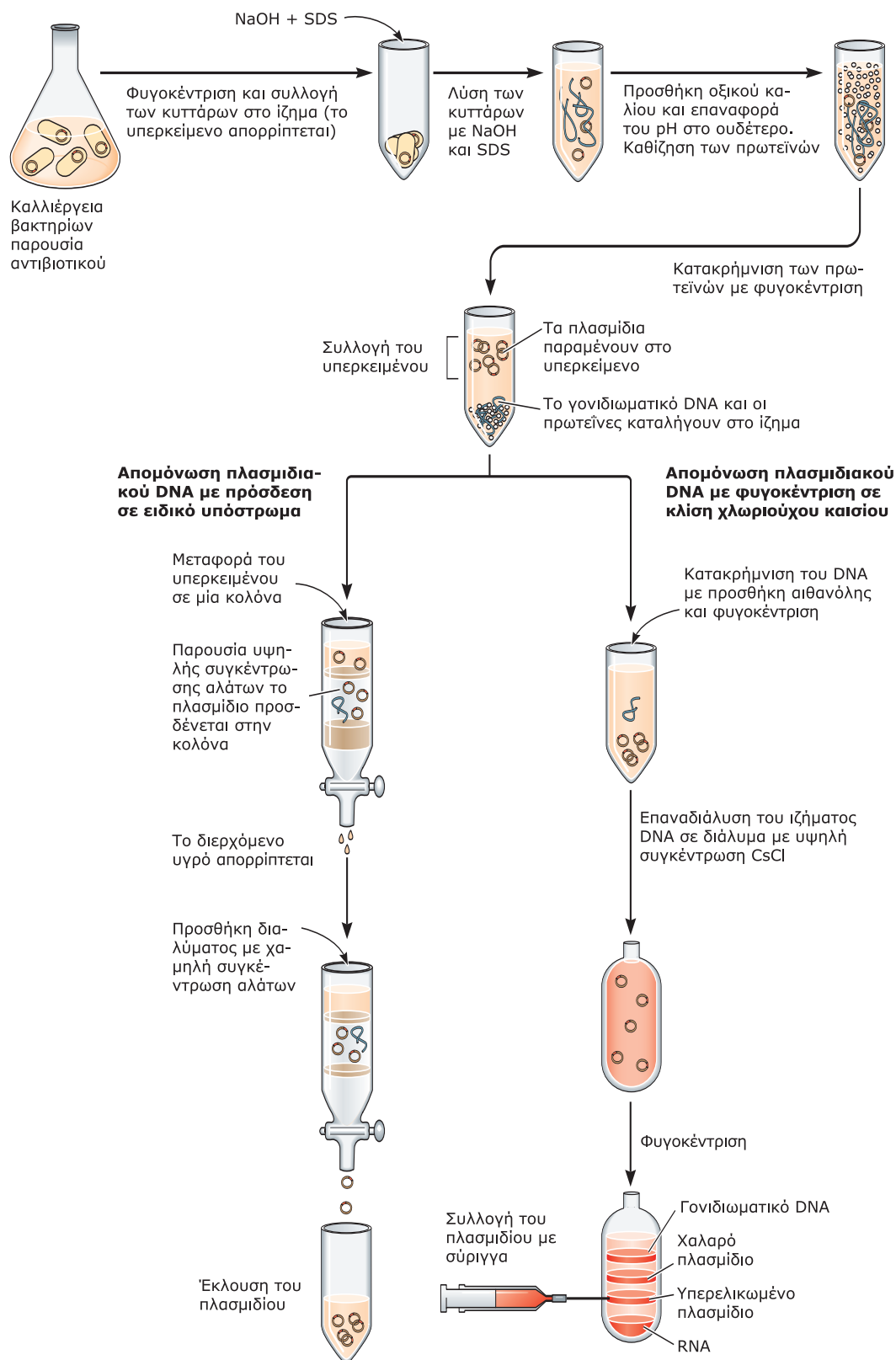
λεπτομερή χαρτογράφηση των βακτηριακών γονιδίων. Ο βακτηριοφάγος λ, αφού τροποποιήθηκε με μεθόδους *in vitro* ανασυνδυασμού, υιοθετήθηκε γρήγορα ως γενικός φορέας κλωνοποίησης. Στους βακτηριοφάγους είναι δυνατόν να κλωνοποιηθούν πολύ μεγαλύτερα τμήματα DNA απ' ό,τι στα πλασμίδια, παρόλο που υπάρχει ένα ανώτατο όριο πάνω από το οποίο δεν είναι δυνατή η συσκευασία του DNA στο πρωτεϊνικό περίβλημα του φάγου. Το μέγιστο μέγεθος DNA που είναι δυνατόν να κλωνοποιηθεί στο φάγο λ είναι περίπου 25 kb. Όπως συνέβη και με τα πλασμίδια, σταδιακά με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής δημιουργήθηκαν πιο προηγμένοι φάγοι-φορείς, για παράδειγμα οι λgt και λZAP. 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 250-1.000 kb αντίστοιχα (Πίνακας 4.2). Τέτοιοι φορείς στους οποίους είναι δυνατόν να κλωνοποιηθούν μεγάλα τμήματα DNA εξετάζονται στο Κεφάλαιο 11.

Η κλωνοποίηση περιλαμβάνει πέντε βασικά βήματα

Η βασική διαδικασία κλωνοποίησης του DNA περιλαμβάνει πέντε βήματα, τα οποία εδώ περιγράφονται συνοπτικά για την περίπτωση των πλασμιδιακών φορέων (Εικ. 4.5). Στις ενότητες που ακολουθούν θα εξετάσουμε λεπτομερέστερα καθένα από αυτά τα 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 και το οποίο παράγεται με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.

Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει τη δημιουργία τμημάτων DNA με μέγεθος και άκρα κατάλληλα για εισαγωγή στον αντίστοιχο φορέα, ο οποίος φέρει ένα



ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2: Χωρητικότητα κοινών φορέων κλωνοποίησης

Φορέας	Μέγεθος ένθεσης (kb)
Πλασμίδια	< 10
Φάγοι	< 23
Κοσμίδια	30-46
Τεχνητά χρωμοσώματα του φάγου P1 (PAC)	130-150
Τεχνητά χρωμοσώματα βακτηρίων (BAC)	< 300
Τεχνητά χρωμοσώματα ζυμομύκητα (YAC)	200-2.000

ή περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Τέτοια τμήματα παρασκευάζονται από χρωμοσωμικό DNA, με χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού, ή από mRNA, με αντίστροφη μεταγραφή και περαιτέρω χειρισμούς που συνήθως περιλαμβάνουν τη χρήση μιας ή περισσότερων ενδονουκλεασών περιορισμού.

Το τρίτο βήμα αφορά την ένθεση του DNA στο φορέα (ο οποίος και πάλι με τη χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού θα πρέπει να φέρει τα κατάλληλα άκρα). Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση DNA λιγάσης, η οποία καταλύει την ομοιοπολική σύνδεση του υπό κλωνοποίηση τμήματος DNA με το φορέα.

Κατά το τέταρτο βήμα, οι φορείς στους οποίους έχει γίνει η ένθεση τμημάτων DNA εισάγονται σε έναν 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 κατεξοχήν βήμα της κλωνοποίησης. Ένα τέτοιο σύνολο κλωνοποιημένων τμημάτων DNA τα οποία πολλαπλασιάζονται μέσα σε βακτήρια ονομάζεται *βιβλιοθήκη*.

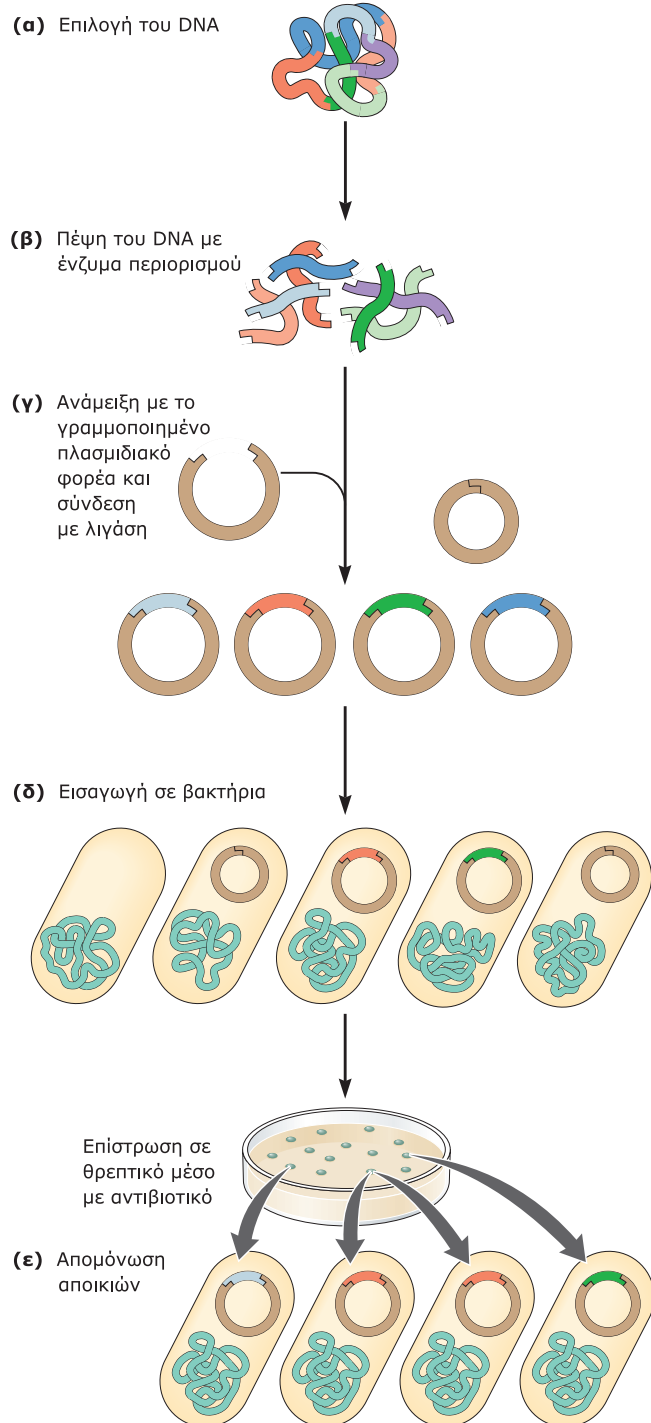
Μια βιβλιοθήκη λοιπόν είναι ένα σύνολο κλώνων που περιέχουν σε τμήματα το γονιδίωμα ενός οργανισμού ή τα cDNA που αντιστοιχούν στα γονίδια του, χωρίς όμως να μπορούμε να γνωρίζουμε εκ των προτέρων ποιος κλώνος περιέχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία. Έτσι, το πέμπτο βήμα είναι ο προσδιορισμός των αποικιών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

Η επιλογή του σωστού αρχικού υλικού είναι απαραίτητη για την κλωνοποίηση

Η πρώτη απόφαση που πρέπει να ληφθεί είναι αν θα χρησιμοποιηθεί χρωμοσωμικό DNA ή cDNA για την κλωνοποίηση ενός γονιδίου. Η επιλογή

ΕΙΚΟΝΑ 4.4: Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από *Escherichia coli*.

Στην εικόνα φαίνονται βακτήρια που περιέχουν κάποιο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο το οποίο φέρει ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό. Τα βακτήρια αυτά αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό, ώστε να γίνει επιλογή όσων βακτηρίων φέρουν το πλασμίδιο. Τα περισσότερα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία είναι πλασμίδια *πολλαπλών αντιγράφων* (δηλαδή υπάρχουν πολλά αντίγραφα τους στο κύτταρο). Το θρεπτικό μέσο υφίσταται φυγοκέντρωση, προκειμένου να καθιζάνουν τα κύτταρα της *E. coli*. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται καυστικό νάτριο και το απορρυπαντικό SDS, ώστε να προκληθεί λύση των βακτηρίων και απελευθέρωση των πλασμιδίων. Στη συνέχεια, προστίθεται οξικό κάλιο και έτσι σχηματίζεται ένα αδιάλυτο σύμπλεγμα που περιέχει το γονιδιωματικό DNA της *E. coli* και πολλές πρωτεΐνες. Το σύμπλεγμα αυτό κατακρημνίζεται με φυγοκέντρωση και συλλέγεται το υπερκείμενο, στο οποίο παραμένουν τα μικρά μόρια του πλασμιδιακού DNA και το RNA της *E. coli*. Για τον περαιτέρω καθαρισμό του πλασμιδίου χρησιμοποιούνται δύο βασικές τεχνικές. Η πρώτη έγκειται στη φυγοκέντρωση σε πυκνό διάλυμα χλωριούχου καισίου. Σε υψηλές στροφές δημιουργείται μια διαβάθμιση (κλίση) πυκνότητας χλωριούχου καισίου στην οποία τα διάφορα νουκλεϊκά οξέα «ισορροπούν» σε συγκεκριμένες θέσεις, ανάλογα με την πυκνότητά τους. Το πλασμιδιακό DNA μπορεί να είναι υπερελικωμένο, δηλαδή να εμφανίζει έντονη περιέλιξη, ή να έχει υιοθετήσει μία «χαλαρή» διαμόρφωση, σε περίπτωση που έχει δημιουργηθεί κάποια εγχοπή (ρήξη φωσφοδιεστερικού δεσμού) σε έναν από τους κλώνους του. Η δεύτερη τεχνική είναι η χρωματογραφία σε μία ρητίνη η οποία, σε ρυθμιστικά διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση άλατος, προσδένει εκλεκτικά το DNA. Η χρωματογραφική στήλη στην οποία δεσμεύεται το πλασμιδιακό DNA ξεπλένεται πολλές φορές και ακολούθως τα πλασμίδια εκλύονται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης άλατος.



ΕΙΚΟΝΑ 4.5: Τα πέντε βασικά βήματα της κλωνοποίησης DNA σε πλασμίδιο.

(α) Επιλέγεται το DNA που περιέχει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. (β) Χρησιμοποιείται ένα ένζυμο περιορισμού για την πέψη του DNA σε τμήματα με μέγεθος κατάλληλο για ένθεση σε ένα φορέα που έχει κοπεί με το ίδιο ένζυμο περιορισμού. (γ) Τα τμήματα του DNA αναμειγνύονται με τα μόρια των φορέων και γίνεται χρήση DNA λιγάσης, ώστε να ενωθούν ομοιοπολικά μεταξύ τους. (δ) Τα ανασυνδυασμένα μόρια εισάγονται σε βακτήρια, τα οποία επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει ένα αντιβιοτικό. Το αντιβιοτικό σκοτώνει όσα βακτήρια δεν έχουν προσλάβει το πλασμίδιο (το οποίο φέρει ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό). Τα βακτήρια επιστρώνονται σε σχετικά χαμηλή πυκνότητα, ούτως ώστε από κάθε βακτηριακό κύτταρο να προκύπτει μία διακριτή αποικία που να φέρει ένα πλασμίδιο. (ε) Τέλος, επιλέγονται από τη βιβλιοθήκη οι ολιγάριθμοι κλώνοι που περιέχουν το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.

εξαρτάται από το συγκεκριμένο πρόβλημα 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. Δε θα ήταν καλή ιδέα να προσπαθήσουμε να κλωνοποιήσουμε γονίδια του ανθρώπινου χρωμοσώματος Υ χρησιμοποιώντας ως δείγμα DNA από θηλυκό άτομο.

Το mRNA που θα χρησιμεύσει 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 της ανάπτυξης. Το πρώτο ευκα-

ρυωτικό 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.

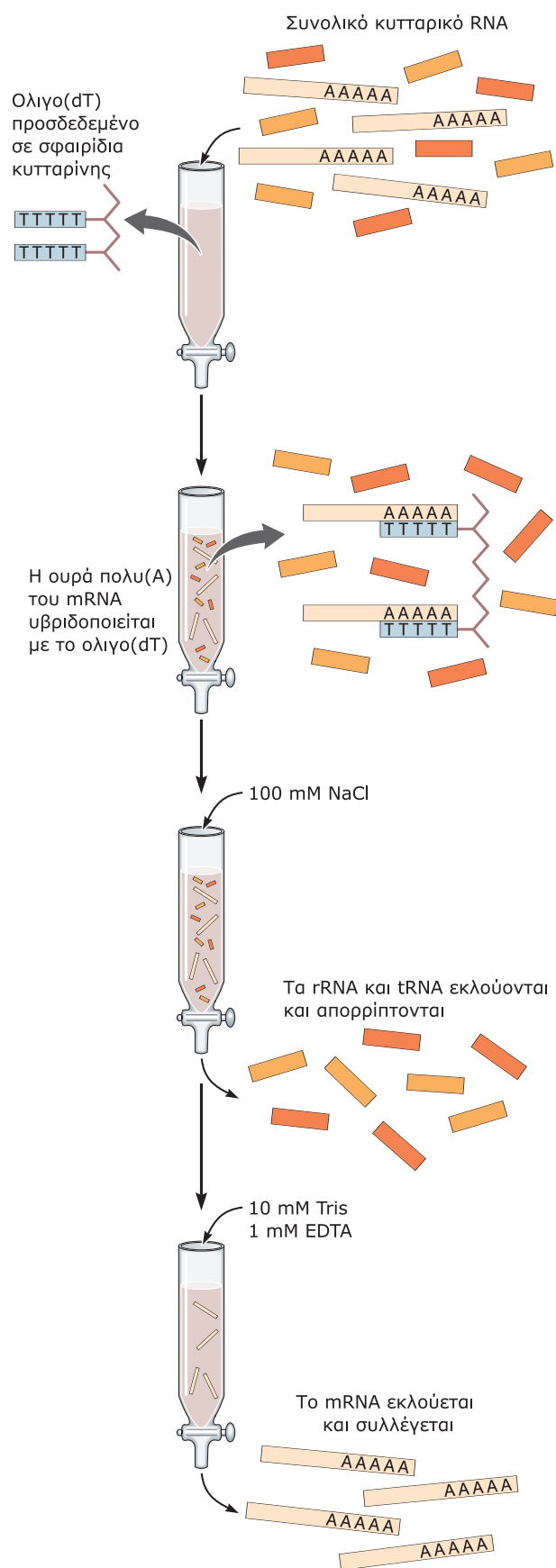
Η σχετική αφθονία των mRNA των διαφόρων γονιδίων επηρεάζει το σχετικό αριθμό αντιγράφων κάθε cDNA στη βιβλιοθήκη. Η βιβλιοθήκη θα περιέχει πολύ περισσότερα cDNA από ένα mRNA που έχει μεγάλη αφθονία παρά από ένα σπάνιο mRNA που συναντάται στα κύτταρα σε πολύ μικρό αριθμό αντιγράφων. Θα υπάρχουν λοιπόν 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. Έχουν επίσης αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την *κανονικοποίηση* των βιβλιοθηκών cDNA, οι οποίες μειώνουν το ποσοστό των κλώνων που αντιστοιχούν σε mRNA υψηλής αφθονίας. Ιδανικά, στις κανονικοποιημένες βιβλιοθήκες τα cDNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται στον κυτταρικό τύπο από τον οποίο προέρχονται βρίσκονται στην ίδια αναλογία, ανεξάρτητα από τη σχετική τους αφθονία στα κύτταρα.

Το mRNA μετατρέπεται σε cDNA μέσω ενζυμικών αντιδράσεων

Το πρώτο βήμα για την κατασκευή μιας βιβλιοθήκης cDNA είναι η απομόνωση του συνολικού κυτταρικού RNA. Κατόπιν, από το συνολικό κυτταρικό RNA απομονώνεται ένα κλάσμα του που περιέχει κυρίως mRNA. Όπως θα περιγράψουμε λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 5, σχεδόν όλα τα μόρια mRNA των ευκαρυωτικών οργανισμών φέρουν στο 3' άκρο τους μία αλληλουχία επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδικών καταλοίπων που περιέχουν αδενίνη, η οποία ονομάζεται *ουρά πολυ(Α)*. Η ουρά αυτή είναι σημαντική για τη λειτουργία του mRNA, προσφέρει όμως

και έναν ιδιαίτερα βολικό τρόπο απομόνωσης mRNA από το συνολικό RNA. Συνήθως, μόνο το ~1-2% του κυτταρικού RNA είναι mRNA, ενώ το υπόλοιπο περιλαμβάνει το ριβοσωμικό RNA και τα tRNA, τα οποία δεν φέρουν ουρές πολυ(Α) (Εικ. 4.6). Η επιλογή βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων που αποτελούνται αποκλειστικά από δεοξυθυμιδίνη (ολιγο(dT)) και τα οποία προσδένονται σε ένα στερεό υλικό, όπως είναι τα σφαιρίδια κυτταρίνης. Τα σφαιρίδια αυτά συσκευάζονται σε μικρές στήλες. Όταν ένα παρασκεύασμα συνολικού κυτταρικού RNA περάσει μέσα από μία τέτοια στήλη, οι ουρές πολυ(Α) των μορίων του mRNA δεσμεύονται από τα ολιγο(dT). Έτσι, το mRNA παγιδεύεται και συγκρατείται στα σφαιρίδια, ενώ το υπόλοιπο RNA περνάει από τη στήλη. Στη συνέχεια, τα δεσμευμένα mRNA εκλύονται από τη στήλη και συλλέγονται.

Οι ουρές πολυ(Α) των μορίων mRNA χρησιμοποιούνται και στο επόμενο βήμα της κλωνοποίησης cDNA: την παρασκευή ενός DNA-αντιγράφου του RNA (Εικ. 4.7). Ολιγονουκλεοτίδια μικρού μήκους τα οποία περιέχουν 12-20 κατάλοιπα δεοξυθυμιδίνης (ολιγο(dT)) αναμειγνύονται με το καθαρισμένο mRNA και υβριδοποιούνται με τις ουρές πολυ(Α), λειτουργώντας ως εκκινητές για την αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο αυτό, το οποίο έχει απομονωθεί από ορισμένους ογκοκύτταρους RNA (βλ. Κεφάλαιο 5), 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. Η χρήση ολιγο(dT) ως εκκινητών έχει ένα μειονέκτημα: επειδή η αντίστροφη μεταγραφάση ξεκινά αναγκαστικά από το 3' άκρο του mRNA, ενδέχεται να μη φτάσει μέχρι το 5' άκρο του μορίου. Αυτό το πρόβλημα εμφανίζεται πρωτίστως στα mRNA που έχουν πολύ μεγάλο μήκος. Για να αντιμετωπιστεί η δυσκολία αυτή, χρησιμοποιείται εναλλακτικά μία δεύτερη μέθοδος, που ονομάζεται *σύνθεση cDNA με τυχαίους εκκινητές*. Συντίθενται πολλά ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα μήκους 6-10 νουκλεοτιδίων με τυχαίες αλληλουχίες και χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για τη σύνθεση του cDNA. Με αυτό τον τρόπο η εκκίνηση της

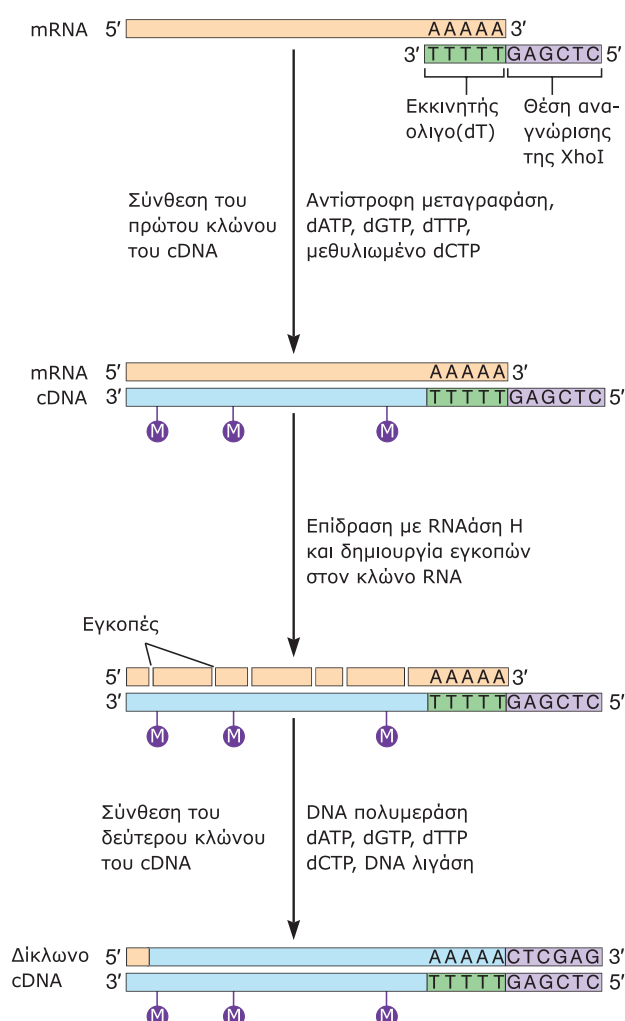


αντίστροφης μεταγραφής γίνεται από πολλές θέσεις και όχι μόνο από το 3' άκρο. Οι αλληλουχίες που βρίσκονται κοντά στο 5' άκρο των mRNA μεγάλου μήκους κλωνοποιούνται πολύ πιο εύκολα με τη χρήση αυτής της μεθόδου. Και πάλι το προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής είναι ένα υβρίδιο RNA-DNA. Στη συνέχεια, τα υβριδικά μόρια RNA-DNA πρέπει να μετατραπούν σε δίκλωνα 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 κλώνο του RNA σε πολλά σημεία. Έτσι προκύπτουν τμήματα RNA που παραμένουν υβριδοποιημένα με τον πρώτο κλώνο του cDNA και χρησιμεύουν ως εκκινήτες 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 (nicks). Οι εγκοπές αυτές κλείνουν με το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών χάρη στη δράση της DNA λιγάσης. Έτσι ολοκληρώνεται ο σχηματισμός του δίκλωνου μορίου cDNA.

ΕΙΚΟΝΑ 4.6: Απομόνωση πολυ(A) mRNA.

Τα μόρια mRNA των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών φέρουν μία ουρά πολυ(A), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό του mRNA από το συνολικό RNA του κυττάρου. Το συνολικό RNA περνά μέσα από μία στήλη που αποτελείται από ένα αδρανές υλικό, συχνά κυτταρίνη ή αгарόζη, στο οποίο έχουν προσκολληθεί ολιγο(dT) (ολιγονουκλεοτίδια που αποτελούνται αποκλειστικά από δεοξυθυμιδίνη). Οι ουρές πολυ(A) υβριδοποιούνται με τα ολιγο(dT), με αποτέλεσμα το mRNA να συγκρατείται στη στήλη ενώ το υπόλοιπο RNA να διέρχεται από αυτή. Ύστερα από εκτενή πλύση της στήλης, προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίχνη οποιουδήποτε στοιχείου πλην του mRNA, γίνεται έκλυση του mRNA με ένα ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος. Σε συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος τα υβρίδια πολυ(A)-ολιγο(dT) διαχωρίζονται και το καθαρισμένο mRNA αποκολλάται από τη στήλη και συλλέγεται.



ΕΙΚΟΝΑ 4.7: Σύνθεση cDNA.

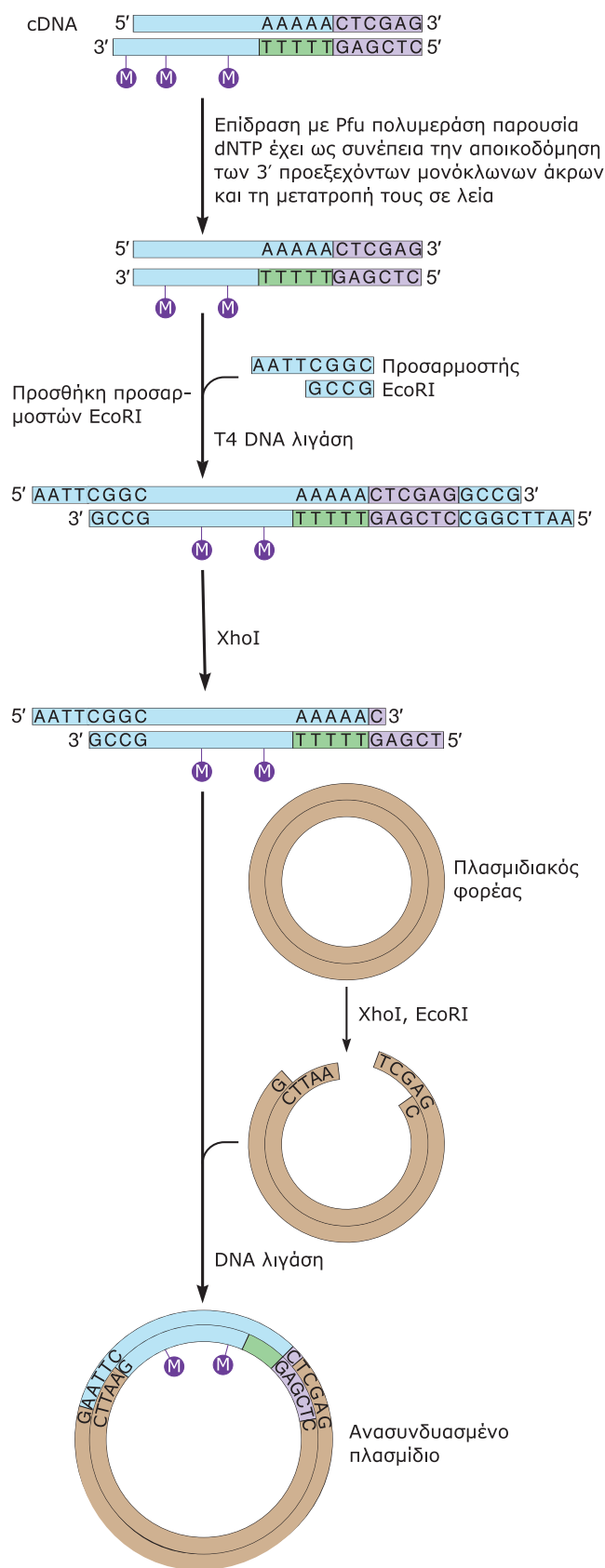
Το mRNA επωάζεται με ολιγο(dT), το οποίο υβριδοποιείται με τις ουρές πολυ(A) και λειτουργεί ως εκκινητής από τον οποίο μπορεί να αρχίσει τη σύνθεση DNA ή αντίστροφη μεταγραφάση. Σε περίπτωση που το cDNA πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή βιβλιοθήκης, τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να περιέχουν μία θέση περιορισμού, όπως η XhoI, προκειμένου να δημιουργηθούν στη συνέχεια κολλώδη άκρα για τη σύνδεση με το φορέα. Στο mRNA προστίθενται, εκτός από το ολιγο(dT), αντίστροφη μεταγραφάση και τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, μεταξύ των οποίων μεθυλιωμένη τριφωσφορική δεοξυκυτοσίνη αντί της μη μεθυλιωμένης τριφωσφορικής δεοξυκυτοσίνης που περιέχουν συνήθως τα κύτταρα. Έτσι συντίθενται μόρια cDNA πάνω στα mRNA-μήτρες. Κατόπιν, οι κλώνοι RNA πρέπει να καταστραφούν και να αντικατασταθούν από DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η RNAάση H, η οποία δημιουργεί εγκοπές στο RNA. Από το ελεύθερο 3' υδροξύλιο των εγκοπών αυτών ξεκινά τον πολυμερισμό δεοξυνουκλεοτιδίων η πολυμεράση της *E. coli*, η οποία με τη δράση εξωνουκλεάσης 5' προς 3' που διαθέτει, παράλληλα με τη σύνθεση DNA, απομακρύνει τα τμήματα RNA που βρίσκονται μπροστά της. Αυτό το βήμα σύνθεσης DNA πραγματοποιείται με τη χρήση μη μεθυλιωμένης δεοξυκυτοσίνης, ώστε να εξασφαλιστεί πως η θέση XhoI που βρίσκεται στα άκρα των cDNA θα παραμείνει αμεθυλιωτή. Τελικά, τα περισσότερα τμήματα RNA αντικαθίστανται από DNA. Με τη χρήση DNA λιγάσης εξαλείφονται οι τυχόν εγκοπές που έχουν απομείνει και ολοκληρώνεται ο σχηματισμός του δίκλωνου cDNA. Αν στη συνέχεια πέψουμε το cDNA με XhoI, θα κοπεί μόνο η ακραία θέση αναγνώρισης της XhoI (αυτή που εισήχθη από τον εκκινητή κατά τη σύνθεση του πρώτου κλώνου) και όχι τυχόν άλλες εσωτερικές θέσεις, καθώς αυτές θα φέρουν μεθυλιωμένη δεοξυκυτοσίνη στον ένα κλώνο του cDNA.

Τα μόρια cDNA συνδέονται με το DNA του φορέα για τη δημιουργία μιας βιβλιοθήκης κλώνων

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 DNA λιγάσης. Οι σύγχρονοι πλασμιδιακοί φορείς έχουν τροποποιηθεί εκτενώς, ώστε να διαθέτουν διάφορα στοιχεία που διευκολύνουν τη διαδικασία της κλωνοποίησης, για παράδειγμα περιοχές οι οποίες ονομάζονται *πολυσυνδέτες*. Οι *πολυσυνδέτες* φέρουν 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 του εξωγενούς DNA. Για την κατασκευή βιβλιοθηκών προστίθενται συνήθως τεχνητές θέσεις ενζύμων περιορισμού στα άκρα των cDNA. Οι θέσεις περιορισμού περιέχονται σε ολιγονουκλεοτίδια μήκους 8-12 bp, τα οποία συντίθενται χημικά και ονομάζονται *συνδετικά τμήματα* ή *προσαρμοστές*. Οι προσαρμοστές αυτοί συνδέονται στα άκρα του δίκλωνου cDNA με την DNA λιγάση, με αποτέλεσμα αυτό να αποκτά μονόκλιωνα κολλώδη άκρα (Εικ. 4.8).

Το cDNA, το οποίο πλέον φέρει κολλώδη άκρα, συνδέεται με ένα φορέα που έχει κοπεί με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και ενώνονται μεταξύ



τους με τη βοήθεια λιγάσης. Τα ανασυνδυασμένα μόρια είναι πλέον έτοιμα να εισαχθούν στα βακτηριακά κύτταρα με τη χρήση κάποιας μεθόδου κατάλληλης για τον αντίστοιχο τύπο φορέα. Τα πλάσμιδια εισάγονται με πολλές διαφορετικές διαδικασίες μετασχηματισμού (οι οποίες περιγράφονται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 6), ενώ οι φορείς του φάγου λυσσκειάζονται αρχικά *in vitro*, ώστε να σχηματίσουν μολυσματικά ιικά σωμάτια, ικανά να μολύνουν βακτήρια και να πολλαπλασιαστούν μέσα σε αυτά. Παρόλο που οι πλάσμιδιακοί 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

ΕΙΚΟΝΑ 4.8: Προσανατολισμένη κλωνοποίηση του δίκλωνου cDNA σε πλάσμιδιακό φορέα.

Η πολυμεράση Pfu έχει δράση εξωνουκλεάσης με κατεύθυνση 3' προς 5' και δράση πολυμεράσης με κατεύθυνση 5' προς 3'. Παρουσία δεοξυνουκλεοτιδίων η δράση εξωνουκλεάσης με κατεύθυνση 3' προς 5' αποικοδομεί μονόκλιωνα 3' άκρα και σταματά μόλις συναντήσει δίκλιωνα DNA, οπότε επικρατεί η δράση της πολυμεράσης. Χάρη στις δύο αυτές δράσεις η Pfu μετατρέπει και τους δύο τύπους προεξέχοντων άκρων σε λείους: συμπληρώνει προεξέχοντα 5' άκρα και αποικοδομεί προεξέχοντα 3' άκρα. Έτσι, επιδρώντας με Pfu, τα άκρα του δίκλωνου cDNA μετατρέπονται σε λεία. Στη συνέχεια, με τη χρήση DNA λιγάσης προσαρτώνται στα άκρα του δίκλωνου cDNA ολιγονουκλεοτίδια που ονομάζονται προσαρμοστές και φέρουν τα μονόκλιωνα άκρα της EcoRI. Προκειμένου να δράσει η λιγάση, θα πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη 5' φωσφορική ομάδα. Καθώς τα δύο ολιγονουκλεοτίδια του προσαρμοστή δεν είναι φωσφορυλιωμένα, μπορεί να προσαρτηθεί μόνο ένας προσαρμοστής σε κάθε άκρο του cDNA. Το cDNA πέπτει κατάπιν με XhoI. Επειδή για τη σύνθεση του πρώτου κλώνου του cDNA χρησιμοποιήθηκαν μεθυλιωμένες κυτοσίνες, η μόνη θέση XhoI που μπορεί να κοπεί είναι αυτή που βρίσκεται στον εκκινητή της αντίστροφης μεταγραφάσης, ο οποίος υβριδοποιήθηκε στο 3' άκρο του αρχικού mRNA. Το τελικό προϊόν είναι ένα μόριο cDNA με ένα κολλώδες άκρο EcoRI στη μία πλευρά του και ένα κολλώδες άκρο XhoI στην άλλη. Ακολούθως, ο φορέας DNA πέπτει με XhoI και EcoRI. Ο φορέας και τα cDNA έχουν πλέον συμβατά άκρα και ενώνονται ομοιοπολικά με DNA λιγάση. Το αποτέλεσμα είναι ένας πληθυσμός κυκλικών μορίων στα οποία το cDNA έχει κλωνοποιηθεί με συγκεκριμένη φορά, με το άκρο που αντιστοιχεί στο 5' του mRNA στη θέση EcoRI και το άκρο που αντιστοιχεί στο 3' του mRNA στη θέση XhoI.

κλώνων*. Επίσης, για τεχνικούς λόγους οι πλάκες μπορούν να σαρωθούν σε μεγαλύτερη πυκνότητα από τις βακτηριακές αποικίες, γεγονός που διευκολύνει τη διαδικασία.

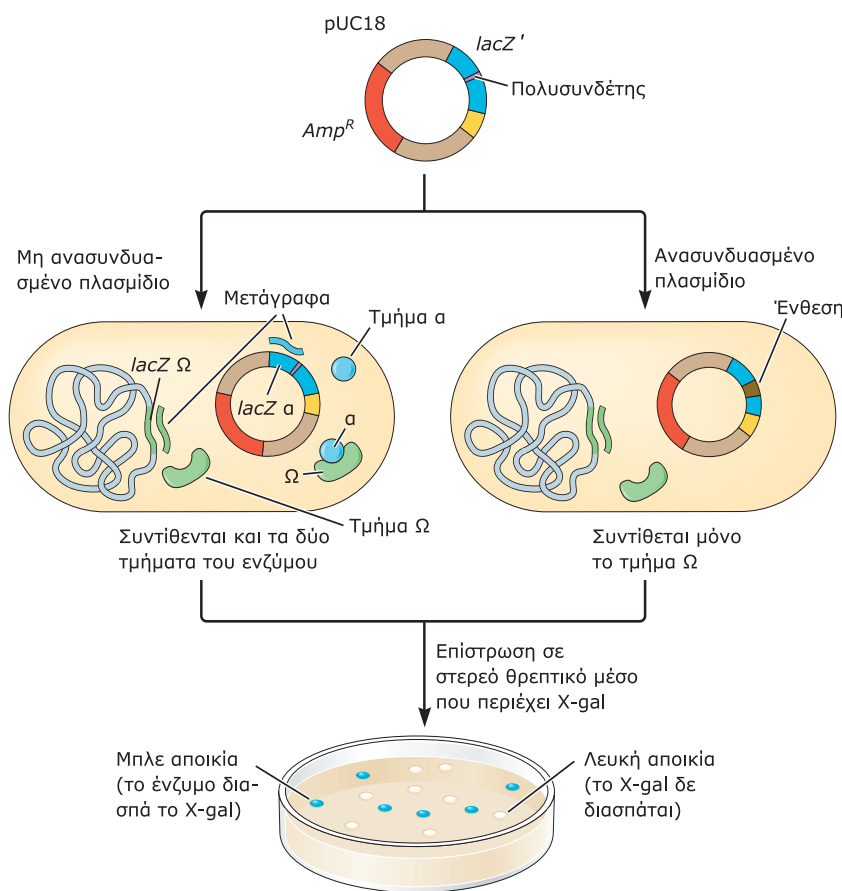
Πώς όμως μπορεί ο πειραματιστής να είναι βέβαιος ότι η διαδικασία της κλωνοποίησης έχει μέχρι το σημείο αυτό οδηγήσει στη δημιουργία κλώνων που φέρουν ανασυνδυασμένο DNA; Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια απλή μεθοδολογία, η οποία βασίζεται στο γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης του οπερονίου *lac* (Κεφάλαιο 3) και επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ ανασυνδυασμένων και μη ανασυνδυασμένων κλώνων, ανάλογα με το χρώμα που έχουν οι αποικίες (αν πρόκειται για βιβλιοθήκη πλασμιδίων) ή οι πλάκες (αν πρόκειται για βιβλιοθήκη φάγων). Το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση 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-γαλακτοζιδάσης και ονομάζεται *lacZ'*. Ένας τέτοιος φορέας μπορεί να μεταφερθεί σε κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος, στο χρωμόσωμα του οποίου κωδικοποιείται ένα μεταλλαγμένο γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης, 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 (Εικ. 4.9). 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 τα οποία εκφράζονται σε ένα συγκεκριμένο ιστό και μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για την παραγωγή και τη μελέτη των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Πρέπει όμως να σημειωθεί πως τα mRNA αντιπροσωπεύουν μόνο ένα μικρό μέρος του γονιδιώματος ενός οργανισμού. Για να μελετηθεί ολόκληρο το γονιδίωμα (μεγάλο μέρος του οποίου δεν εκφράζεται με τη μορφή mRNA), είναι απαραίτητη η δημιουργία μιας βιβλιοθήκης που περιέχει όλα τα τμήματα του γονιδιώματος. Αυτό μπορεί να γίνει με τεχνικές παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω για τη δημιουργία βιβλιοθηκών cDNA (και μάλιστα απλούστερες, καθώς ξεκινάμε από δίκλωνο DNA και δε χρειάζεται να συνθέσουμε cDNA). Έναν περιορισμό που παρουσιάζουν οι πλασμιδιακοί 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 BAC και τα YAC, είναι πιο κατάλληλοι για την κλωνοποίηση του γονιδιώματος. Οι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες έχουν χρησιμοποιηθεί επί μακρόν για τη μελέτη συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδιώματος, ενώ, όπως θα δούμε στο Κεφάλαιο 11, η δημιουργία βιβλιοθηκών υψηλής ποιότητας είναι απαραίτητη για την αλληλούχισή του.

*Σ.τ.Ε.: Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι διαδικασίες εισαγωγής των ανασυνδυασμένων φάγων στα βακτήρια είναι αποτελεσματικότερες από τις διαδικασίες εισαγωγής των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.



ΕΙΚΟΝΑ 4.9: Διάκριση μεταξύ μπλε και λευκών αποικιών για τον εντοπισμό ανασυνδυασμένων φορέων.

Το γονίδιο *lacZ* της *Escherichia coli* κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση. Όταν βακτήρια που παράγουν τη β-γαλακτοζιδάση αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία X-gal, η διάσπαση του X-gal από το ένζυμο παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος. Σε πολλούς σύγχρονους φορείς ο πολυσυνδέτης βρίσκεται μέσα σε ένα μικρό κομμάτι του γονιδίου *lacZ* μήκους 150 νουκλεοτιδίων (το *lacZ'*), το οποίο παράγει ένα τμήμα του ενζύμου μήκους 50 αμινοξέων που ονομάζεται α. Ο πολυσυνδέτης δε διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο του *lacZ'*. Το στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό φέρει ένα μεταλλαγμένο γονίδιο *lacZ*, το οποίο παράγει ένα άλλο τμήμα του ενζύμου που ονομάζεται Ω. Όταν το τμήμα α συνδυαστεί με το τμήμα Ω, σχηματίζεται ενεργό ένζυμο. Έτσι, η έκφραση του τμήματος α από ένα πλασμίδιο σε στέλεχος *E. coli* που εκφράζει το τμήμα Ω οδηγεί σε σχηματισμό ενεργής β-γαλακτοζιδάσης και οι αποικίες που αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό μέσο

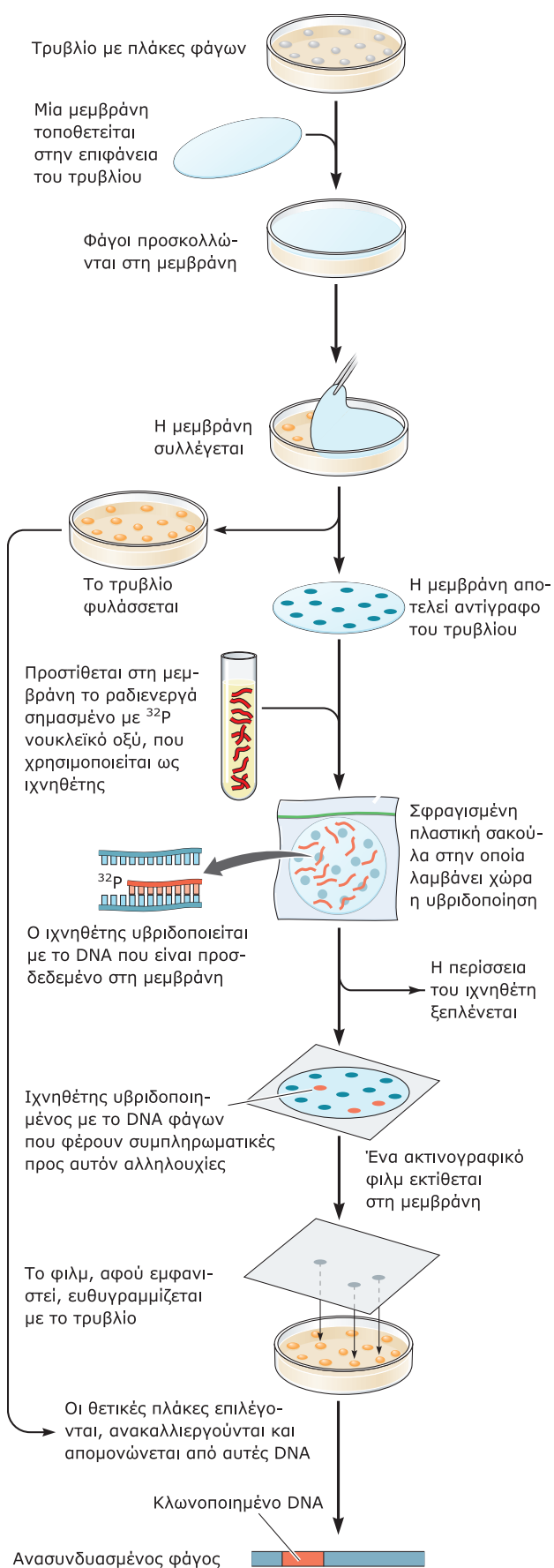
που περιέχει X-gal έχουν μπλε χρώμα. Αντιθέτως, αν έχει γίνει ένθεση cDNA στον πολυσυνδέτη, το τμήμα α δεν μπορεί να συντεθεί, δεν παράγεται λειτουργική β-γαλακτοζιδάση και οι αποικίες είναι άχρωμες (λευκές). Οι μπλε και οι λευκές αποικίες (ή πλάκες στην περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί ως φορέας φάγος) διακρίνονται εύκολα, καθιστώντας απλή και άμεση την αναγνώριση των ανασυνδυασμένων κλώνων.

Ιχνηθέτες νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό κλώνων που φέρουν την επιθυμητή αλληλουχία DNA

Το αποτέλεσμα της επίστρωσης μιας βιβλιοθήκης κλώνων είναι εκατοντάδες χιλιάδες έως ένα εκατομμύριο πλάκες φάγων ή βακτηριακές αποικίες (στην περίπτωση των πλασμιδιακών φορέων), κατανεμημένες σε ένα σύνολο τρυβλίων με θρεπτικό μέσο. Αφού γίνει η επίστρωση της βιβλιοθήκης, ένα μέρος κάθε πλάκας ή αποικίας μεταφέρεται σε μεμβράνες από νιτροκυτταρίνη ή νάιλον (Εικ. 4.10) με τρόπο τέτοιο, ώστε το πρότυπο της διάταξης των κλώνων στα αρχικά τρυβλία να διατηρείται στη μεμβράνη. Έτσι ουσιαστικά παρασκευάζεται σε μεμβρά-

νες ένα αντίγραφο της βιβλιοθήκης. Η σάρωση γίνεται επωάζοντας τις μεμβράνες με έναν ιχνηθέτη νουκλεϊκού οξέος, με σκοπό την ανίχνευση των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν, ή με ένα αντίσωμα ικανό να ανιχνεύσει την εκφραζόμενη πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

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 δε 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 εντοπι-

ΕΙΚΟΝΑ 4.10: Σάρωση μιας βιβλιοθήκης για τον εντοπισμό του επιθυμητού κλώνου με ιχνηθέτη νουκλεϊκό οξύ.

Κατά τη σάρωση βιβλιοθηκών, μερικές εκατοντάδες χιλιάδες φάγοι επιστρώνονται μαζί με τα βακτήρια-ξενιστές τους σε 10-20 μεγάλα τρυβλία που φέρουν κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Έτσι σχηματίζεται ένα στρώμα βακτηρίων που ονομάζεται βακτηριακή χλόη (bacterial lawn), μέσα στο οποίο διακρίνονται διανυγείς νησίδες, οι οποίες αντιστοιχούν σε περιοχές όπου οι φάγοι έχουν λύσει τα βακτήρια. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται πλάκες του φάγου (phage plaques). Όταν οι πλάκες αναπτυχθούν, τοποθετούνται προσεκτικά στην επιφάνεια των τρυβλίων κατάλληλης μεμβράνης. Ένας μεγάλος αριθμός φάγων από κάθε πλάκα προσκολλάται στη μεμβράνη, δημιουργώντας σε αυτή ένα ακριβές αντίγραφο της διάταξης των πλακών που υπάρχουν στο τρυβλίο. Ακολουθεί επεξεργασία των φίλτρων, ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες των φάγων, να αποδιαταχθεί το DNA τους και να προσκολληθεί στην επιφάνεια της μεμβράνης. Η μεμβράνη επωάζεται στη συνέχεια σε ένα διάλυμα που περιέχει σε αποδιαταγμένη μορφή ένα ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη DNA, του οποίου η αλληλουχία είναι συμπληρωματική προς μία αλληλουχία του γονιδίου που αναζητάμε. Αυτή η αντίδραση υβριδοποίησης συχνά πραγματοποιείται σε μία σφραγισμένη πλαστική σακούλα. Η επώαση διαρκεί μερικές ώρες και μετά οι μεμβράνες ξεπλένονται προσεκτικά, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του ιχνηθέτη (όση ποσότητα δηλαδή του ιχνηθέτη δεν έχει δεσμευτεί στις συμπληρωματικές προς αυτόν αλληλουχίες DNA της βιβλιοθήκης). Ο ιχνηθέτης που υβριδοποιήθηκε επιτυχώς εντοπίζεται με έκθεση των φίλτρων σε φιλμ ακτινογραφίας (η διαδικασία αυτή ονομάζεται αυτοραδιογραφία). Οι θέσεις πρόσδεσης του ανιχνευτή γίνονται ορατές στο φιλμ ύστερα από την εμφάνισή του, ως χαρακτηριστικές μαύρες κουκκίδες. Ευθυγραμμίζοντας το φιλμ με το αρχικό τρυβλίο, εντοπίζονται οι πλάκες που φέρουν συμπληρωματικές αλληλουχίες με τον ιχνηθέτη και έτσι επιλέγεται ο επιθυμητός κλώνος.

στεί ο επιθυμητός κλώνος, παρ' ότι η αλληλουχία του ιχνηθέτη δεν είναι 100% συμπληρωματική με την αλληλουχία του στόχου του. Ο ιχνηθέτης είναι σημασμένος με ραδιενέργεια. 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. Στη συνέχεια, οι κλώνοι αυτοί (φάγοι ή βακτήρια) επιλέγονται και καλλιεργούνται με σκοπό την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων του κλωνοποιημένου DNA για περαιτέρω μελέτη του.

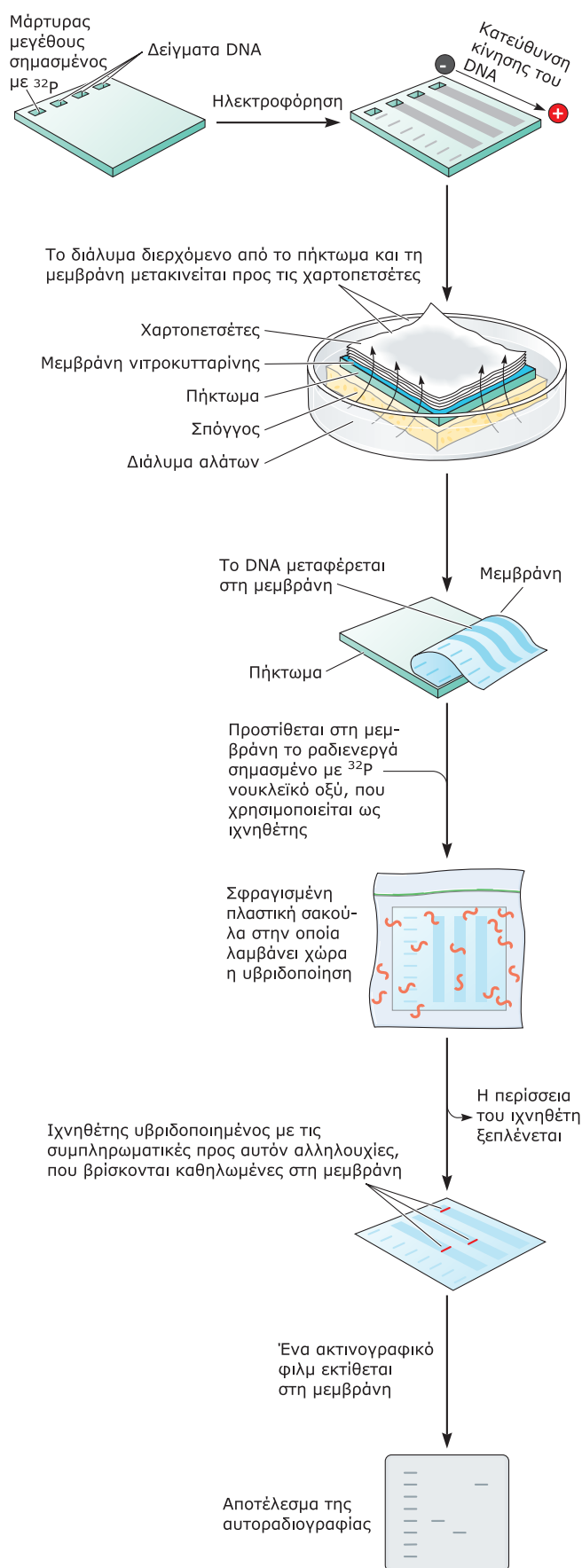
Οι μέθοδοι στυπώματος κατά Southern και τύπου Northern επιτρέπουν τη μελέτη του DNA και του RNA αντίστοιχα μέσω υβριδοποίησης

Αφού κλωνοποιήσουμε το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει, είναι σκόπιμο να μελετήσουμε τη θέση του στο γονιδίωμα, καθώς και το πρότυπο της έκφρασής του στον οργανισμό. Το 1975 ο Ed Southern συνδύασε την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με την υβριδοποίηση, επινοώντας ένα ιδιαίτερα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση αλληλουχιών, τη λεγόμενη διαδικασία *στυπώματος κατά Southern* (Εικ. 4.11). Κατά τη μέθοδο αυτή, το γονιδιωματικό DNA κόβεται με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού και τα τμήματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε αλκαλικό διάλυμα, ώστε τα μόρια του DNA να αποδιαταχθούν. Στη συνέχεια, τοποθετείται ένα κατάλληλο υπόστρωμα (ένα φίλτρο νιτροκυτταρίνης ή μία νάιλον μεμβράνη) πάνω στο πήκτωμα. Με κατάλληλους χειρισμούς δημιουργείται ροή ενός ρυθμιστικού διαλύματος με κατεύθυνση από το πήκτωμα προς το υπόστρωμα, ώστε το DNA να μεταφερθεί σε αυτό και να προκύψει στην επιφάνειά του ένα αντίγραφο της κατανομής που

εμφάνιζαν τα μόρια του DNA στο πήκτωμα. Ακολούθως, ένας σημασμένος ιχνηθέτης νουκλεϊκού οξέος, συμπληρωματικός προς τις αλληλουχίες που αναζητάμε, υβριδοποιείται με τα μόρια του DNA που έχουν προσδεθεί στο υπόστρωμα. Η περίσσεια του ιχνηθέτη που δεν υβριδοποιήθηκε απομακρύνεται και το υπόστρωμα εκτίθεται σε ακτινογραφικό φιλμ. Μετά την εμφάνιση του φιλμ διακρίνεται σε αυτό ένα πρότυπο μαύρων ζωνών, οι οποίες υποδεικνύουν τα τμήματα του DNA που φέρουν συμπληρωματικές αλληλουχίες προς τον ιχνηθέτη. Τα μεγέθη των τμημάτων υπολογίζονται μετά από σύγκριση με τμήματα γνωστού μεγέθους που έχουν ηλεκτροφορηθεί στο ίδιο πήκτωμα. Η παραπάνω τεχνική ονομάζεται *αυτοραδιογραφία*.

Χάρη στο στύπωμα κατά Southern επιτεύχθηκε η παραγωγή λεπτομερών χαρτών περιορισμού σε πολύπλοκα γονιδιώματα και κατέστη δυνατό να ανιχνευτούν συγκεκριμένα τμήματα ανάμεσα στα εκατομμύρια άλλα που παράγει η πέψη με ένζυμα περιορισμού. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό πολύ μεγάλων μορίων DNA, για να κατασκευαστούν χάρτες περιορισμού που καλύπτουν αποστάσεις εκατοντάδων κιλοβάσεων. Έτσι μπορεί να προσδιοριστεί ο τρόπος με τον οποίο είναι παρατεταγμένα τα γονίδια κατά μήκος των χρωμοσωμάτων και να αποκαλυφθούν οι συστοιχίες που σχηματίζουν οι ομάδες γονιδίων με παρεμφερείς λειτουργίες. Το στύπωμα κατά Southern έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της παρουσίας ενός γονιδίου σε διάφορα είδη. Στα λεγόμενα «στυπώματα βιοποικιλότητας» («*zoo blots*») χρησιμοποιείται ως ιχνηθέτης κάποιο γονίδιο ενός είδους και ως στόχος τμήματα περιορισμού γονιδιακού DNA από διάφορα είδη οργανισμών. Ο βαθμός της εξελικτικής συντήρησης ενός γονιδίου μπορεί να εξαχθεί από το εύρος των γονιδιωματικών DNA με τα οποία υβριδοποιείται ο ιχνηθέτης.

Η αντίστοιχη τεχνική για την ανάλυση RNA ονομάζεται *στύπωμα τύπου Northern*. Αντί για DNA, ένα δείγμα RNA ηλεκτροφορείται, μεταφέρεται σε στερεό υπόστρωμα και υβριδοποιείται με ένα σημασμένο ιχνηθέτη. Το στύπωμα τύπου Northern χρησιμοποιείται όταν θέλουμε να προσδιορίσουμε ποιοι



ιστοί ή κυτταρικοί τύποι μεταγράφουν ένα συγκεκριμένο γονίδιο, σε ποια στάδια της ανάπτυξης ενεργοποιούνται μεταγραφικά τα διάφορα γονίδια και ποιοι είναι οι παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή τους. Έχοντας πλέον στη διάθεσή μας εκτενείς πληροφορίες σχετικά με την αλληλουχία των διαφόρων γονιδιωμάτων, είμαστε σε θέση να πραγματοποιήσουμε και το αντίστροφο πείραμα, με μια μεθοδολογία που βασίζεται στις λεγόμενες μι-

ΕΙΚΟΝΑ 4.11: Στύπωμα κατά Southern: ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα, στύπωμα και υβριδοποίηση.

DNA που έχει κοπεί με ένζυμα περιορισμού ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αгарόζης, όπου γίνεται διαχωρισμός των τμημάτων του με βάση το μέγεθός τους. Στη συνέχεια, το πήκτωμα υφίσταται ειδική κατεργασία, προκειμένου το DNA μέσα σε αυτό να αποδιαταχθεί. Ακολούθως, το DNA μεταφέρεται από το πήκτωμα σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ώστε να δημιουργηθεί στη μεμβράνη ένα ακριβές αντίγραφο της κατανομής των τμημάτων του DNA στο πήκτωμα. Αυτό γίνεται συνήθως τοποθετώντας το πήκτωμα πάνω σε ένα σφουγγάρι που βρίσκεται μέσα σε ένα δίσκο με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, τη μεμβράνη πάνω στο πήκτωμα και μία στοιβία από χαρτοπετσέτες πάνω από τη μεμβράνη. Οι χαρτοπετσέτες λειτουργούν ως απορροφητικό μέσο, προκαλώντας τη μεταφορά του διαλύματος προς αυτές διαμέσου του πηκτώματος και της μεμβράνης. Τα τμήματα του DNA μεταφέρονται με αυτό τον τρόπο από το πήκτωμα στο φίλτρο, όπου προσκολλώνται. Η παραπάνω διάταξη διατηρείται για αρκετές ώρες. Κατόπιν, το φίλτρο αφαιρείται και υβριδοποιείται με έναν αποδιαταγμένο και ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη DNA. Ο ιχνηθέτης υβριδοποιείται ειδικά στο τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει, ακόμη και αν αυτό αντιστοιχεί σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των νουκλεϊκών οξέων που έχουν προσκολληθεί στο φίλτρο, με αποτέλεσμα η μέθοδος να είναι ιδιαίτερα επιλεκτική. Η περίσσεια του ιχνηθέτη που δεν έχει υβριδοποιηθεί ξεπλένεται και ένα φιλμ ακτινογραφίας εκτίθεται στο φίλτρο. Όταν το φιλμ εμφανιστεί, η θέση κάθε τμήματος DNA που είναι συμπληρωματικό προς τον ιχνηθέτη εμφανίζεται με τη μορφή μαύρης ζώνης πάνω σε αυτό. Η παραπάνω διαδικασία ονομάζεται στύπωμα κατά Southern. Μία παρόμοια διαδικασία, που ονομάζεται στύπωμα τύπου Northern, αφορά την ηλεκτροφόρηση και μεταφορά σε μεμβράνη RNA αντί για DNA. Επίσης, μία ανάλογη διαδικασία, που ονομάζεται στύπωμα τύπου Western, αφορά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων (συνήθως σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης και όχι σε πήκτωμα αгарόζης) και την περαιτέρω μεταφορά τους σε μεμβράνη. Στο στύπωμα τύπου Western, η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει εντοπίζεται ανάμεσα στις υπόλοιπες πρωτεΐνες ενός δείγματος, χρησιμοποιώντας ως ιχνηθέτη ένα ειδικό γι' αυτήν αντίσωμα, κατάλληλα σημειωμένο.

κροσυστοιχίες. Για την κατασκευή μιας μικροσυστοιχίας, σε μία γυάλινη επιφάνεια ακινητοποιούνται στη σειρά η μία δίπλα στην άλλη αρκετές εκατοντάδες έως εκατοντάδες χιλιάδες γνωστές αλληλουχίες DNA (αντίστοιχες με τους ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται στο στύπωμα κατά Southern ή στο στύπωμα τύπου Northern) και υβριδοποιούνται με σημασμένο DNA ή RNA. Στο Κεφάλαιο 13 θα περιγράψουμε με περισσότερες λεπτομέρειες αυτή την ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο, η οποία αναπτύχθηκε πρόσφατα.

Παρόλο που οι βασικές αρχές των στυπωμάτων κατά Southern και τύπου Northern έχουν παραμείνει οι ίδιες, η μέθοδος ανίχνευσης τμημάτων DNA και RNA στα πηκτώματα έχει αλλάξει σημαντικά. Για την καταγραφή των θέσεων ραδιοσημασμένων ιχνηθετών οι ερευνητές χρησιμοποιούν πλέον συχνά, αντί για ακτινογραφικό φιλμ, επιφάνειες από ένα ειδικό υλικό που περιέχει κρυστάλλους οι οποίοι αποκρίνονται στην εκπομπή ραδιενέργειας. Στη συνέχεια, το υλικό αυτό τοποθετείται σε μια κατάλληλη συσκευή που ονομάζεται φωσφοροαπεικονιστής (phosphorimager), στην οποία οι κρύσταλλοι διεγείρονται με λέιζερ, γεγονός που έχει ως συνέπεια όσοι από αυτούς είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε ραδιενεργή ακτινοβολία να εκπέμπουν φως. Το εκπεμπόμενο φως καταγράφεται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ταχύτερη από τη χρήση φιλμ ακτινογραφίας και πολύ πιο ευαίσθητη. Επιπλέον, η ποσοτικοποίηση είναι πολύ πιο ακριβής, διότι η απόκριση του φωσφοροαπεικονιστή είναι γραμμική σε μεγάλο μέρος του φάσματος εκπομπής ραδιενεργής ακτινοβολίας. Εναλλακτικά, οι ιχνηθέτες μπορεί να σημανθούν και χωρίς τη χρήση ραδιενέργειας. Υπάρχουν έμμεσες μέθοδοι, κατά τις οποίες ενσωματώνονται σε έναν ιχνηθέτη νουκλεοτίδια που φέρουν συνδεδεμένο ένα μικρό μόριο όπως η βιοτίνη. Κατόπιν, τα μόρια βιοτίνης ανιχνεύονται με τη χρήση ενός ειδικού γι' αυτά αντισώματος, που φέρει προσδεδεμένο το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Η υδρόλυση ενός κατάλληλου υποστρώματος από την αλκαλική φωσφατάση συνοδεύεται από εκπομπή φωτός. Υπάρχουν όμως και άμεσες μη ραδιενεργές μέθοδοι, κατά τις οποίες ο ιχνηθέτης σημαίνεται με χρωστικές που φθορίζουν μετά από διέγερση με λέιζερ.

Υβριδοποίηση ανάλογη με αυτή των στυπωμάτων κατά Southern και τύπου Northern μπορεί να γίνει και απευθείας σε κύτταρα με μία διαδικασία που ονομάζεται υβριδοποίηση φθορισμού *in situ* (FISH, *Fluorescence in situ hybridization*, βλ. Κεφάλαιο 14). Κατά τη μέθοδο FISH, ιχνηθέτες σημασμένοι με φθορίζουσες ουσίες χρησιμοποιούνται για την απευθείας υβριδοποίηση σε κατάλληλα προπαρασκευασμένα κύτταρα, προκειμένου να προσδιοριστεί σε αυτά η τοποθεσία μιας αλληλουχίας DNA ή RNA.

Εκτός από το Νότο και το Βορρά (Southern και Northern), χρησιμοποιήθηκε ένα ακόμη σημείο του ορίζοντα από τους επιστήμονες. Στο *στύπωμα τύπου Western* διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σύνθετα μείγματα πρωτεϊνών, συνήθως σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης, και στη συνέχεια μεταφέρονται σε φίλτρα από νιτροκυτταρίνη ή PVDF (polyvinylidene fluoride, πολυβινυλιδενικό φθορίδιο). Η ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στα φίλτρα γίνεται με σημασμένα αντισώματα.

Μέθοδοι αλληλούχισης του DNA

Παρόλο που μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1970 ήταν δυνατή η απομόνωση γονιδίων και η παραγωγή τους σε πολλαπλά αντίγραφα προκειμένου να αναλυθούν, δεν υπήρχε τρόπος να διαβαστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία του κλωνοποιημένου DNA. Στην πραγματικότητα, οι πρώτες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες είχαν προσδιοριστεί κατά τη δεκαετία του 1960, αλλά αφορούσαν τα σχετικά μικρά μόρια tRNA, το μήκος των οποίων ήταν μόνο 75-80 νουκλεοτίδια. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 ο Frederick Sanger έστρεψε την προσοχή του από την αλληλούχιση πρωτεϊνών στην ανάπτυξη γρήγορων και απλών μεθόδων για την αλληλούχιση μεγαλύτερων μορίων RNA. Δημιουργήθηκε έτσι ένας έμμεσος τρόπος προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, χρησιμοποιώντας αρχικά RNA πολυμεράση για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας RNA και αλληλουχίζοντας στη συνέχεια αυτό το RNA. Η επανάσταση στις διαδικασίες εύρεσης της αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων ήρθε λίγα χρόνια αργότερα, με την ανάπτυξη μεθόδων που επέτρεπαν την άμεση αλληλού-

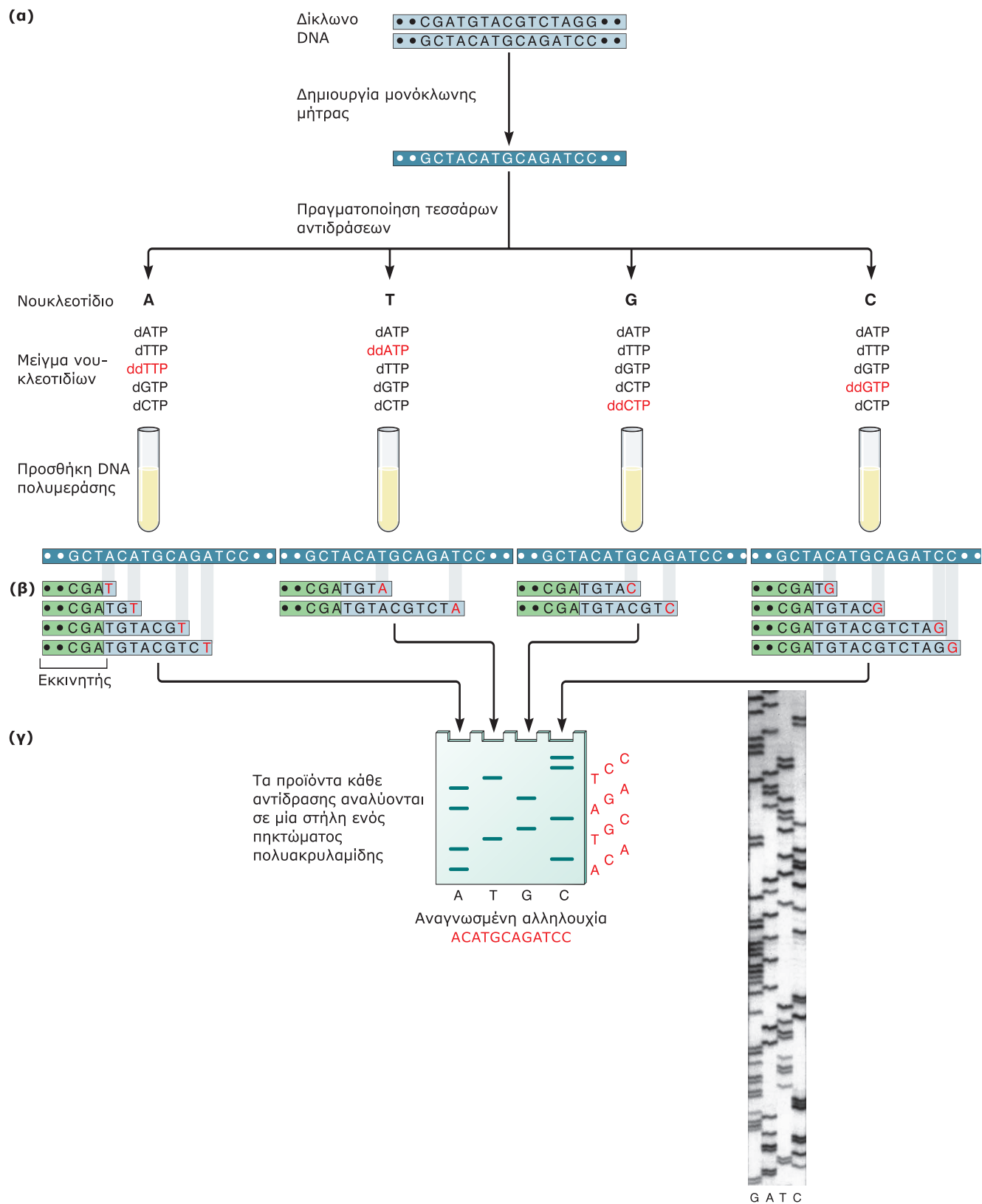
χιση τμημάτων DNA μήκους μεταξύ 100 και 500 νουκλεοτιδίων. Η πρώτη από αυτές, η λεγόμενη μέθοδος *συν-πλην* (plus-minus method), αναπτύχθηκε από το Sanger το 1975 και, σε συνδυασμό με τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (μία ακόμη καινοτομία του Sanger), επέτρεψε το γρήγορο προσδιορισμό μεγάλου μέρους της αλληλουχίας του γονιδιώματος (μεγέθους 5.386 bp) του μικρού φάγου φX174 (Κεφάλαιο 10). Δύο χρόνια αργότερα, οι Allan Maxam και Walter Gilbert στο Harvard και ο Sanger με τους συνεργάτες του στο Cambridge της Αγγλίας συνέβαλαν σημαντικά στην ανάπτυξη νέων μεθόδων πολύ πιο εύχρηστων και αποτελεσματικών από τη μέθοδο *συν-πλην*.

Η μέθοδος των Maxam και Gilbert βασίζεται στη χημική αποικοδόμηση των αλυσίδων DNA. Κατά τη μέθοδο αυτή, τα μόρια DNA σημαίνονται στο ένα τους άκρο και κατόπιν χωρίζονται σε τέσσερα επιμέρους δείγματα. Κάθε δείγμα υπόκειται σε διαφορετική χημική επεξεργασία, που οδηγεί στην παραγωγή όλων των πιθανών τμημάτων DNA που τελειώνουν σε G (στο πρώτο δείγμα), σε C (στο δεύτερο δείγμα), σε A ή σε G (στο τρίτο δείγμα) και σε C ή σε T (στο τέταρτο δείγμα). Μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω επεξεργασίας τα τμήματα DNA διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανιχνεύονται μέσω αυτοραδιογραφίας. Με συνδυασμό των δεδομένων από όλα τα δείγματα προκύπτει η πλήρης αλληλουχία. Αν, για παράδειγμα, στο πρώτο δείγμα διαπιστωθεί με την αυτοραδιογραφία η παρουσία τμημάτων μήκους πέντε, δέκα και δώδεκα νουκλεοτιδίων, συνεπάγεται πως το πέμπτο, το δέκατο και το δωδέκατο νουκλεοτίδιο στην αλληλουχία είναι G. Η αλληλουχία των 5.243 ζευγών βάσεων του ιού SV40 και των 4.362 ζευγών βάσεων του μικρού πλασμιδίου pBR322 προσδιορίστηκαν γρήγορα με τη χρήση αυτής της μεθόδου από τον Greg Sutcliffe στο εργαστήριο του Gilbert.

Όμως η μέθοδος που έχει γίνει πλέον η πάγια τεχνική για την αλληλούχιση του DNA είναι η δεύτερη που επινόησε ο Sanger και περιλαμβάνει τη χρήση τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTP), τα οποία προκαλούν τερματισμό της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA (Εικ. 4.12). Αυτά

τα ddNTP 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 δε διαθέτουν την 3'-OH ομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού. Αν κατά την *in vitro* αντιγραφή ενός μορίου προστεθεί στο μείγμα της αντίδρασης μία μικρή ποσότητα ενός συγκεκριμένου ddNTP (ας πούμε του ddATP) μαζί με τα τέσσερα dNTP 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. Για την εύρεση της αλληλουχίας ενός μορίου πραγματοποιούνται τέσσερις αντιδράσεις, η καθεμία με διαφορετικό ddNTP. 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.

Το επόμενο σημαντικό βήμα προόδου σε ό,τι αφορά την αλληλούχιση του DNA σημειώθηκε όταν οι Michael Hunkapiller και Leroy Hood ανέπτυξαν μία μέθοδο σήμανσης κάθε ddNTP με χρωστική διαφορετικού χρώματος. Με αυτή τη μέθοδο μπορούσε να πραγματοποιηθεί μία μόνο αντίδραση παρουσία μικρών ποσοτήτων και των τεσσάρων ddNTP, καθώς ήταν δυνατή η διάκριση των τμημάτων που τελειώναν σε καθένα από τα τέσσερα ddNTP. Αργότερα κατασκευάστηκαν μηχανήματα ημιαυτόματης αλληλούχισης 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, για παράδειγμα, ρομπότ για την παρασκευή των δειγμάτων και των αντιδράσεων. Ακολούθησε η κατασκευή πλήρως αυτοματοποιημένων συσκευών αλληλούχισης που βασίζονταν στη χρήση τριχοειδών σωληναρίων αντί του κλασικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης για την ανάλυση των αντιδράσεων. Έτσι μπόρεσε να γίνει αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ανώτερων οργανισμών. Μέχρι το τέλος



του 2006 είχε προσδιοριστεί η αλληλουχία του γονιδιώματος περισσότερων από 1.000 ιών και 300 οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων του ανθρώπου, του ποντικού και του αρουραίου. Στα Κεφάλαια 10, 11 και 12 παρουσιάζονται πολύ περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τις στρατηγικές και τις τεχνολογίες που μας επέτρεψαν να πραγματοποιήσουμε άθλους που θεωρούνταν αδύνατοι μόλις πριν από μερικά χρόνια.

Χημική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων

Η άμεση διαθεσιμότητα ολιγονουκλεοτιδίων καθορισμένης αλληλουχίας είναι ιδιαίτερα σημαντική για πολλές τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA. Κατά τη δεκαετία του 1970 επινοήθηκαν μέθοδοι σύνδεσης νουκλεοτιδίων και η πρώτη αυτή φάση οδήγησε στη σύνθεση ενός πλήρους tRNA αλανίνης στο εργαστήριο του H. Gobind Khorana το 1972.

Η εμφάνιση γρήγορων και εύχρηστων μεθόδων σύνθεσης καθορισμένης αλληλουχίας ολιγονουκλεοτιδίων μέτρου μήκους βασίστηκε σε τρεις τεχνικές καινοτομίες. Η πρώτη ήταν ανάλογη της μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων και βασιζόταν στην πρόσ-

δεση της αυξανόμενης νουκλεοτιδικής αλυσίδας σε ένα στερεό υλικό. Οι πολυμεράσες στα κύτταρα συνθέτουν DNA και RNA με κατεύθυνση 5' προς 3', ενώ η *in vitro* σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων γίνεται συνήθως αντίστροφα, με κατεύθυνση 3' προς 5'. Για το λόγο αυτό, το 3' υδροξύλιο της πρώτης βάσης προσδένεται στο στερεό υλικό. Έτσι μένει μόνο το ένα άκρο του αναπτυσσόμενου μορίου ελεύθερο για την πραγματοποίηση αντιδράσεων. Ακολουθούν διαδοχικοί γύροι προσθήκης συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο. Μετά την ολοκλήρωση κάθε γύρου προσθήκης ενός νουκλεοτιδίου πρέπει να απομακρυνθεί η ποσότητα αυτού που δεν ενσωματώθηκε στην αλυσίδα, πριν προστεθεί το επόμενο. Η διαδικασία απομάκρυνσης της περίσσειας νουκλεοτιδίων στο τέλος κάθε αντίδρασης διευκολύνεται ιδιαίτερα από το γεγονός πως η αυξανόμενη αλυσίδα συγκρατείται στο στερεό υλικό.

Η δεύτερη καινοτομία είχε να κάνει με την ανάπτυξη βελτιωμένων χημικών μεθόδων για την παρεμπόδιση της συμμετοχής σε χημικές αντιδράσεις είτε του 5' είτε του 3' άκρου ενός νουκλεοτιδίου. Αυτό επιτυγχάνεται με την πρόσδεση κατάλληλων *παρεμποδιστικών ομάδων* (blocking groups) στο αντίστοιχο άκρο. Οι ομάδες αυτές είναι επιπλέον άτομα συνδεδεμένα με τις αντιδρώσες υδροξύλικές

ΕΙΚΟΝΑ 4.12: Η διαδικασία αλληλούχισης DNA με τη μέθοδο του Sanger, που βασίζεται στη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων.

Παρασκευάζονται 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTP) για καθεμία από τις τέσσερις βάσεις. Τα μόρια αυτά μπορούν να ενσωματωθούν από την DNA πολυμεράση σε ένα νεοσυντιθέμενο κλώνο DNA, διότι φέρουν την 5' τριφωσφορική ομάδα. Παρ' όλα αυτά, μετά την ενσωμάτωσή τους τα ddNTP δεν μπορούν να σχηματίσουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο dNTP που θα έρθει να προστεθεί και έτσι η αντιγραφή της συγκεκριμένης αλυσίδας DNA σταματά. (α) Στην αντίδραση αλληλούχισης με τη μέθοδο του Sanger συμμετέχει ο κλώνος DNA που πρόκειται να αλληλουχηθεί, ένα τμήμα DNA μικρού μήκους (ο εκκινητής), το οποίο είναι συμπληρωματικό προς την 3' περιοχή αυτού του κλώνου, τα τέσσερα φυσιολογικά dNTP και ένα συγκεκριμένο ddNTP (σε μία προσεκτικά προσδιορισμένη αναλογία σε σχέση με τα φυσιολογικά dNTP). Περιλαμβάνεται επίσης μία μικρή ποσότητα ενός ή περισσότερων ραδιοσημασμένων dNTP, για να είναι δυνατή η ανίχνευση των νεοσυντιθέμενων μορίων DNA με αυτοραδιογραφία. (β) Προστίθεται DNA πολυμεράση και ξεκινά ο πολυμερισμός από τον εκκινητή. Όταν σε μία αλυσίδα προστεθεί τυχαία ένα ddNTP, η αλυσίδα αυτή παύει να αυξάνεται. Αν έχει επιλεχθεί η σωστή αναλογία ddNTP:dNTP, θα προκύψουν πολλοί διαφορετικοί σημασμένοι κλώνοι, τα μήκη των οποίων θα εξαρτώνται από τη θέση στην οποία ενσωματώθηκε το ddNTP. (γ) Τα σημασμένα τμήματα που προκύπτουν ως προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με βάση το μήκος της αλληλουχίας τους σε ένα πήκτωμα ακρυλαμίδης και ακολουθεί αυτοραδιογραφία. Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των τμημάτων φανερώνει την αλληλουχία του DNA. Στις σύγχρονες μεθόδους αλληλούχισης τα προϊόντα εντοπίζονται συνήθως με ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπουν χρωστικές, οι οποίες είναι συζευγμένες με τα ddNTP. Με τη χρήση διαφορετικής χρωστικής για κάθε ddNTP, η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μία μόνο αντίδραση και η ανάλυση να γίνει σε μία μόνο στήλη του πηκτώματος.

και αμινικές ομάδες των νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή του συνθετικού τμήματος DNA και εμποδίζουν τις ανεπιθύμητες χημικές αντιδράσεις ανάμεσα στο νουκλεοτίδιο που προστίθεται και την αυξανόμενη ολιγονουκλεοτιδική αλυσίδα. Έτσι, αν πρόκειται, για παράδειγμα, να προστεθεί ένα νουκλεοτίδιο αδενίνης, κατά την αντίδραση της προσθήκης του εξασφαλίζεται πως δε θα προστεθεί πολλές διαδοχικές φορές, καθώς μετά την ενσωμάτωση του πρώτου στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα η ενσωμάτωση δεύτερου αποκλείεται λόγω της παρουσίας της παρεμποδιστικής ομάδας. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του επιθυμητού νουκλεοτιδίου, η περίσσεια αυτού απομακρύνεται και οι ομάδες αποκλεισμού αφαιρούνται, ώστε η αναπτυσσόμενη αλυσίδα να μπορεί να αντιδράσει με το επόμενο νουκλεοτίδιο.

Η τρίτη καινοτομία ήρθε με την ανάπτυξη ειδικών μηχανημάτων σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων που βασίζονται στη χρήση φωσφοραμιδίτη και στερεών υποστρωμάτων. Μέχρι τότε η σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων ήταν μία χρονοβόρα διαδικασία που περιοριζόταν στη σύνδεση λιγότερων από 20 νουκλεοτιδίων μεταξύ τους. Σήμερα πλήρως αυτοματοποιημένα μηχανήματα προγραμματίζονται να συνθέτουν ολιγονουκλεοτίδια μήκους μέχρι 100 βάσεων μέσα σε λίγες ώρες. Όμως υπάρχει ακόμα περιορισμός ως προς το μέγιστο μήκος των ολιγονουκλεοτιδίων που είναι δυνατόν να συντεθούν, καθώς όσο αυτό αυξάνεται, τόσο λιγότερα είναι τα ολιγονουκλεοτίδια πλήρους μήκους που παράγονται, επειδή η αποτελεσματικότητα των διαδοχικών αντιδράσεων προσθήκης νουκλεοτιδίων δε φτάνει το 100%.

Μπορεί να γίνει σύνθεση γονιδίων από ολιγονουκλεοτίδια

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια είναι απαραίτητα σε πολλές τεχνικές, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και για τη σύνθεση γονιδίων. Όπως είπαμε, επειδή η απόδοση κάθε βήματος της αντίδρασης σύνθεσής τους είναι χαμηλότερη του 100%, υπάρχουν όρια ως προς το μέγιστο μήκος που μπορούν να έχουν. Για τη σύνθεση ολόκληρων γονιδίων πρέπει να

«συρραφούν» μεταξύ τους πολλά διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια. Το πρώτο γονίδιο που συντέθηκε με τον τρόπο αυτό, το 1970, ήταν το γονίδιο ενός tRNA. Σύντομα ακολούθησε η σύνθεση γονιδίων που κωδικοποιούν μικρές πεπτιδικές ορμόνες, όπως αυτό της ανθρώπινης ορμόνης σωματοστατίνη, μήκους 42 bp, και τα γονίδια των δύο αλυσίδων του μορίου της ανθρώπινης ινσουλίνης, μήκους 63 και 90 bp. Την περίοδο εκείνη, που ο μετασχηματισμός βακτηρίων παρουσίαζε ακόμα πολλές δυσκολίες, η χημική σύνθεση επέτρεψε στους επιστήμονες την παραγωγή γονιδίων σε πολλαπλά αντίγραφα, χωρίς να απαιτείται να εισαχθούν σε βακτήρια. Αν και οι περιορισμοί που αφορούν την εισαγωγή εξωγενούς DNA σε βακτήρια ξεπεράστηκαν σύντομα, η χημική σύνθεση συνέχισε να είναι ένας πρακτικός, αν και κάπως ακριβός, τρόπος σύνθεσης γονιδίων. Μέχρι τη δεκαετία του 1980 είχαν αρχίσει να συντίθενται αρκετά μεγάλα γονίδια, όπως αυτό του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (1.610 bp). Η πρόοδος στον τομέα αυτό συνεχίστηκε και οδήγησε στη σύνθεση του πλήρους γονιδιώματος του ιού της πολιομυελίτιδας (7.440 bp) και του βακτηριοφάγου φX174 (5.386 bp).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πολλαπλασιάζει επιλεγμένες περιοχές ενός DNA-στόχου

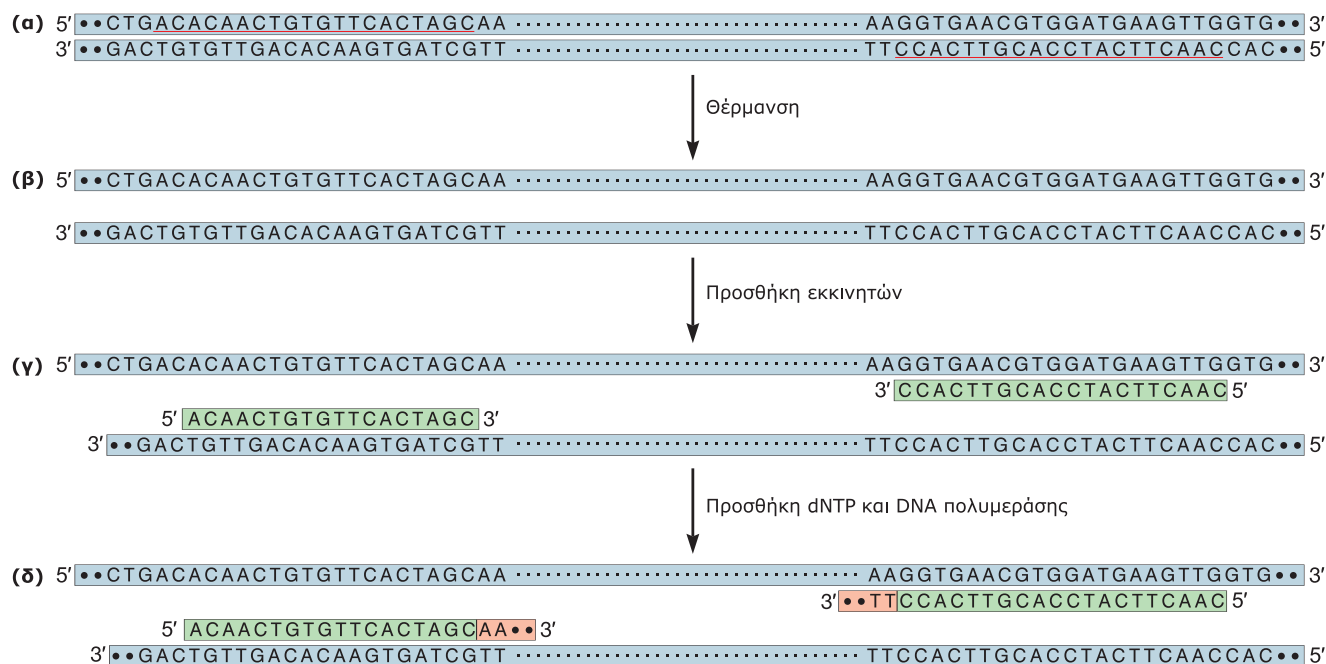
Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) επινοήθηκε από τον Kary Mullis στα μέσα της δεκαετίας του 1980 και, όπως η αλληλούχιση και η *in vitro* σύνθεση DNA, έφερε επανάσταση στη μοριακή γενετική. Στους νέους επιστήμονες φαίνεται ίσως ασύλληπτο το πώς γινόταν έρευνα πριν από το 1988, τη χρονιά που η τεχνική PCR έγινε ένα αξιόπιστο και εύχρηστο εργαλείο. Οι παραλλαγές και οι εφαρμογές της τεχνικής PCR είναι τόσο πολλές, που δεν μπορούμε να παρουσιάσουμε παρά μόνο ένα δείγμα τους στο κεφάλαιο αυτό. Εδώ θα μελετήσουμε τα βασικά γνωρίσματα της τεχνικής, ενώ στα κεφάλαια που θα ακολουθήσουν θα συναντήσουμε πολλές εφαρμογές της σε διάφορα πειράματα.

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. Έχουν λοιπόν επινοηθεί διάφορες διαδικασίες για τον εντοπισμό και την απομόνωσή τους, αλλά οι τεχνικές αυτές είναι τις περισσότερες φορές πολύπλοκες και χρονοβόρες. Με την PCR αυτό άλλαξε, καθώς μπορέσαμε να παραγάγουμε τεράστιες ποσότητες μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA χωρίς να χρειαστεί να καταφύγουμε σε κλωνοποίηση. Στην PCR χρησιμοποιείται 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.

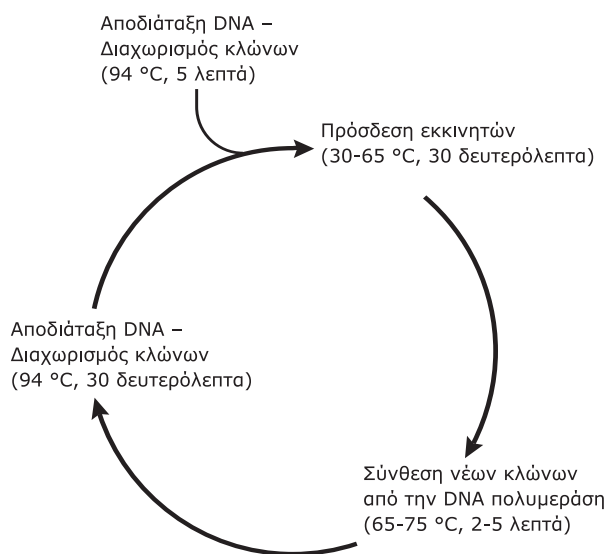
Το αρχικό υλικό για τη διεξαγωγή της PCR είναι ένα δείγμα DNA στο οποίο περιέχεται η αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η προετοιμασία που χρειάζεται να γίνει κατά την απομόνωση του DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως στόχος για την PCR είναι σχετικά εύκολη (με εξαίρεση κάποια ειδικά δείγματα). Δεν είναι απαραίτητο να απομονωθούν εκ των προτέρων οι αλληλουχίες που μας ενδιαφέρουν από το υπόλοιπο DNA. Μπορούμε μάλιστα να χρησιμοποιήσουμε άμεσα το DNA που απελευθερώνεται κατά τη διάρρηξη κυττάρων μέσω βρασμού ή με χρήση απορρυπαντικών, χωρίς να χρειάζεται να καταφύγουμε σε κάποιο από τα πιο πολύπλοκα πρωτόκολλα που μας επιτρέπουν να το απομονώσουμε σε καθαρή μορφή. Επειδή κατά την τεχνική της PCR γίνεται πολλαπλασιασμός του DNA, η αρχική ποσότητα DNA που χρειάζεται είναι πολύ μικρή: ακόμη και ένα μόνο μόριο DNA αρκεί. Είναι εντυπωσιακό ότι η PCR έχει εφαρμοστεί ακόμη και σε DNA απομονωμένο από δείγματα αίματος τα οποία είχαν ληφθεί από την πτέρνα νεογνών (με σκοπό τον έλεγχο ρουτίνας για τον εντοπισμό όσων πάσχουν από φαινυλκετονουρία) και διατηρήθηκαν αποθηκευμένα ως αποξηραμένες κηλίδες σε απορροφητικό χαρτί, σε DNA απομονωμένο από δείγματα βιοψίας εγκλεισμένα σε παραφίνη για πάνω από 40 χρόνια, αλλά και σε DNA απομονωμένο από το δόντι ενός παιδιού Νεάντερταλ ηλικίας 10 έως 11 ετών, το οποίο έζησε πριν από 100.000 χρόνια.

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 του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων μορίων. Καθώς το ένζυμο χρειάζεται ένα τμήμα δίκλωνου DNA ώστε να ξεκινήσει («εκκινήσει») 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 (Εικ. 4.13).

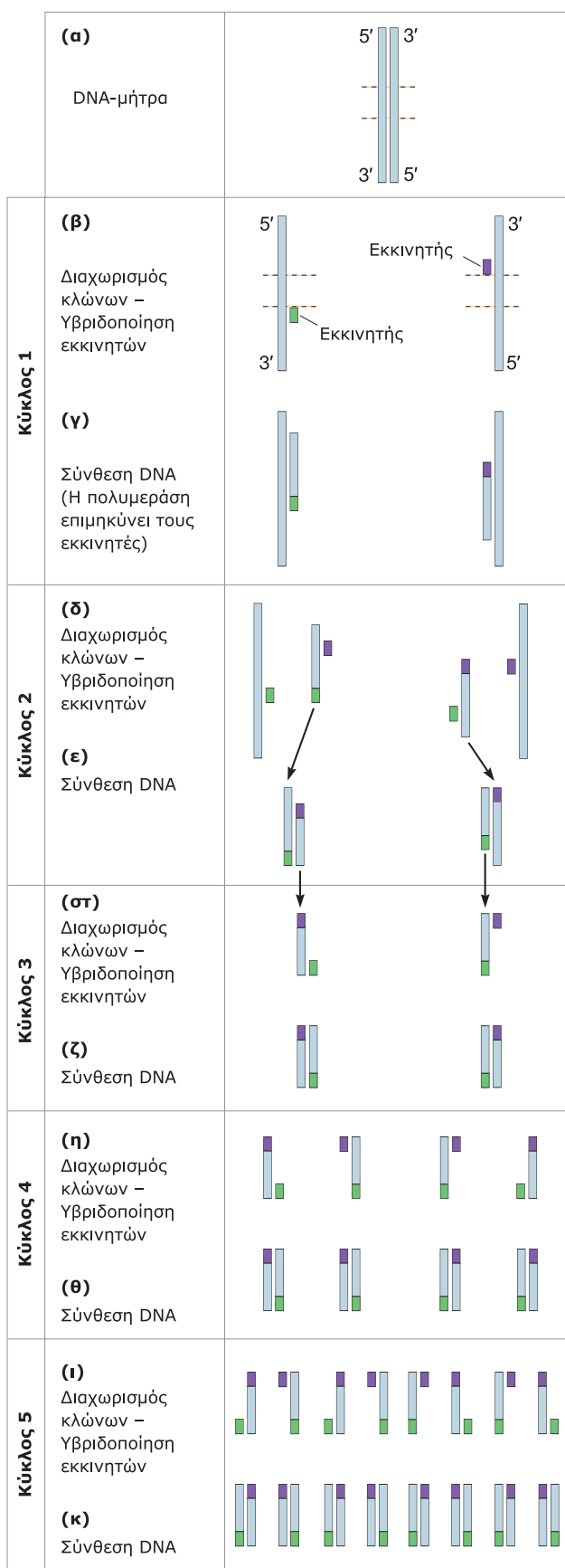
Οι εκκινητές επιλέγονται ούτως ώστε να υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Κάθε νέος κλώνος DNA που συντίθεται από τον ένα εκκινητή περιλαμβάνει τη θέση στην οποία υβριδοποιείται ο άλλος εκκινητής. Δημιουργούνται λοιπόν νέες θέσεις πρόσδεσης εκκινητών σε κάθε 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 (Εικ. 4.14 και 4.15), έτσι ώστε μετά από n κύκλους το μείγμα της αντίδρασης να περιέχει θεωρητικά έως 2^n δίκλωνα μόρια DNA τα οποία φέρουν αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές (Πίνακας 4.3). Στην πράξη, η τυπική απόδοση ανέρχεται στο 10-30% της θεωρητικά μέγιστης. Παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση είναι το μήκος και η αλληλουχία του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η DNA πολυμεράση συχνά δυσκολεύεται να αντιγράψει αλληλουχίες μεγάλου μήκους ή υψηλής περιεκτικότητας σε GC. Γενικά

**ΕΙΚΟΝΑ 4.13: Εκκινήτες της DNA πολυμεράσης.**

(α) Στο παράδειγμα αυτό απεικονίζεται ένα μικρό τμήμα DNA μήκους 110 bp από το γονίδιο της β-σφαιρίνης το οποίο πρόκειται να πολλαπλασιαστεί (παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των άκρων του ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλονται 60 νουκλεοτίδια). Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινήτες υβριδοποιούνται στις υπογραμμισμένες περιοχές μήκους 20 νουκλεοτιδίων. (β) Το DNA θερμαίνεται και οι κλώνοι διαχωρίζονται. (γ) Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινήτες (πράσινο χρώμα) υβριδοποιούνται ειδικά στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες, στο 3' άκρο κάθε κλώνου-στόχου. (δ) Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί τους εκκινήτες αυτούς για να ξεκινήσει με κατεύθυνση 5' προς 3' τη σύνθεση νέων κλώνων (ροζ χρώμα), συμπληρωματικών προς τις αλληλουχίες-στόχους.

**ΕΙΚΟΝΑ 4.14: Ο κύκλος της τεχνικής PCR.**

Το δείγμα DNA θερμαίνεται, ώστε να διαχωριστούν οι κλώνοι του DNA (αρχική αποδιάταξη), και κατόπιν το μείγμα της αντίδρασης διέρχεται από επανειλημμένους κύκλους υβριδοποίησης των εκκινήτων, σύνθεσης DNA και αποδιάταξης. Η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο.



πάντως, με την τεχνική PCR παράγονται τόσο πολλά αντίγραφα, που είναι εύκολο στη συνέχεια να τα δει κανείς σε ένα πήκτωμα αγαρόζης βαμμένο με βρομιούχο αιθίδιο.

Για τη βελτιστοποίηση της PCR είναι απαραίτητη η ρύθμιση πολλών παραμέτρων, όπως είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο, οι συγκεντρώσεις των αλάτων και η χρονική διάρκεια κάθε επιμέρους βήματος. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται και στην επιλογή των εκκινητών, καθώς αυτοί καθορίζουν από πού θα ξεκινήσει η σύνθεση των νέων κλώνων DNA. Η εξειδίκευση της πρόσδεσης ενός εκκινητή εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική του αλληλουχία και από το μήκος του. Ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18-24 νουκλεοτιδίων παρουσιάζουν συνήθως μεγάλη εξειδίκευση (προσδένονται δηλαδή με το DNA-

ΕΙΚΟΝΑ 4.15: Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων DNA κατά την PCR.

(α) Το αρχικό υλικό είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA. Η αλληλουχία-στόχος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί βρίσκεται ανάμεσα στις διακεκομμένες γραμμές. (β) Οι κλώνοι διαχωρίζονται με θέρμανση του μείγματος της αντίδρασης και στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται, ούτως ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις δύο θέσεις πρόσδεσης (μία σε κάθε κλώνο) που περιβάλλουν την περιοχή-στόχο. (γ) Η *Taq* πολυμεράση συνθέτει νέους κλώνους DNA, συμπληρωματικούς προς τη μήτρα, οι οποίοι εκτείνονται πέραν της θέσης πρόσδεσης του εκκινητή στον άλλο κλώνο και ποικίλλουν σε μήκος (ανάλογα με το σημείο στο οποίο η πολυμεράση θα τύχει να σταματήσει τη σύνθεση). (δ) Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά. Οι αρχικοί και οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι διαχωρίζονται. Αυτή τη φορά τέσσερις θέσεις πρόσδεσης για τους εκκινητές είναι διαθέσιμες, από μία σε κάθε αρχικό κλώνο και από μία σε κάθε νέο κλώνο DNA. (Για λόγους απλοποίησης τα μετέπειτα γεγονότα που αφορούν τους αρχικούς κλώνους παραλείπονται.) (ε) Η πολυμεράση *Taq* συνθέτει νέους συμπληρωματικούς κλώνους, όμως η επιμήκυνση αυτών των νέων αλυσίδων περιορίζεται ακριβώς στα όρια της αλληλουχίας-στόχου. Οι δύο νέες λοιπόν αλυσίδες που συντίθενται εκτείνονται μεταξύ των δύο εκκινητών. (στ) Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και οι εκκινητές υβριδοποιούνται στους κλώνους. (ζ) Η πολυμεράση *Taq* συνθέτει συμπληρωματικούς κλώνους και έτσι προκύπτουν δύο πανομοιότυπα δίκλιωνα τμήματα DNA με την αλληλουχία-στόχο. (η-κ) Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και ο αριθμός των τμημάτων-στόχων διπλασιάζεται σε κάθε επερχόμενο κύκλο της αντίδρασης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.3: Πολλαπλασιασμός μορίων κατά την αλυσι-
δωτή αντίδραση πολυμεράσης

Αριθμός κύκλου	Αριθμός δίκλωνων μορίων-στόχων
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1.024
13	2.048
14	4.096
15	8.192
16	16.384
17	32.768
18	65.536
19	131.072
20	262.144
21	524.288
22	1.048.576
23	2.097.152
24	4.194.304
25	8.388.608
26	16.777.216
27	33.554.432
28	67.108.864
29	134.217.728
30	268.435.456
31	536.870.912
32	1.073.741.824

στόχο αποκλειστικά σε μια μοναδική περιοχή με την οποία είναι συμπληρωματικά), εφόσον η υβριδοποίηση πραγματοποιείται κοντά στη θερμοκρασία τήξης τους (T_m)*. Είναι επίσης σημαντικό οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν να έχουν παραπλήσιες T_m , ώστε στην ίδια θερμοκρασία να υβριδοποιούνται αποτελεσματικά και οι δύο. Όσο αυξάνεται το μήκος του εκκινητή, τόσο αυξάνεται

και η πιθανότητα η συμπληρωματική του αλληλουχία να συναντάται μία μόνο φορά στο DNA-στόχο. Αυτό είναι ασφαλώς επιθυμητό, αλλά πρέπει να σημειωθεί πως, όταν αυξάνεται το μήκος των εκκινητών, αυξάνεται και η T_m τους. Αν η T_m αυξηθεί υπερβολικά, η θερμοκρασία που θα απαιτείται για την υβριδοποίηση θα είναι μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία στην οποία η πολυμεράση καταλύει τη σύνθεση των νέων αλυσίδων. Έτσι, όταν μετά την υβριδοποίηση των εκκινητών, προκειμένου να λειτουργήσει αποτελεσματικά η πολυμεράση, η θερμοκρασία της αντίδρασης πέσει κάτω από την T_m , ελλοχεύει ο κίνδυνος οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν και σε άλλες, τυχαίες θέσεις, με αποτέλεσμα εκτός από το επιθυμητό προϊόν να προκύψουν και άλλα παραπροϊόντα.

Οι θερμοσταθερές πολυμεράσες απλοποιούν και βελτιώνουν την PCR

Αφού αναγνωρίστηκαν οι τεράστιες δυνατότητες της τεχνικής PCR, ακολούθησαν πολλές βελτιώσεις. Αναμφίβολα, η πιο σημαντική από αυτές ήταν η χρήση DNA πολυμερασών από θερμοφιλά βακτήρια. Επειδή η DNA πολυμεράση της *E. coli* καταστρέφεται στις θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, ήταν απαραίτητο να προστίθεται εκ νέου ένζυμο σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Εντούτοις, για την DNA πολυμεράση του βακτηρίου *Thermus aquaticus*, το οποίο ζει μέσα στο νερό σε θερμοκρασία 75 °C, η βέλτιστη θερμοκρασία είναι οι 72 °C, ενώ είναι αρκετά σταθερή ακόμη και στους 94 °C. Το ένζυμο αυτό ονομάζεται πολυμεράση Taq και παραμένει ενεργό σε όλη τη διάρκεια των

*Σ.τ.Ε.: Η θερμοκρασία τήξης είναι αυτή στην οποία, στατιστικά, τα μισά μόρια του ολιγονουκλεοτιδίου-εκκινητή ζευγαρώνουν με την αλληλουχία-στόχο, ενώ τα άλλα μισά δε σταθεροποιούνται πάνω σε αυτή και παραμένουν ελεύθερα. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες το ποσοστό των μορίων του εκκινητή που σταθεροποιούνται στη συμπληρωματική αλληλουχία-στόχο μειώνεται και έτσι ενδέχεται να αποτύχει ο πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ο εκκινητής τείνει να υβριδοποιηθεί και σε άλλες, τυχαίες αλληλουχίες που δεν είναι πλήρως συμπληρωματικές με αυτόν, οπότε ενδέχεται εκτός από το επιθυμητό προϊόν να προκύψουν και άλλα παραπροϊόντα.

κύκλων του πολλαπλασιασμού. Η πολυμεράση Ταq 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 είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ταχεία διεξαγωγή προγραμμάτων αλληλούχισης γονιδιωμάτων, όπου εκτελούνται εκατομμύρια αντιδράσεων PCR χωρίς να παρεμβαίνει ανθρώπινο χέρι.

Η ιδιαίτερη ευαισθησία της PCR στις μολύνσεις μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα

Η πολλαπλασιαστική ισχύς της PCR συνοδεύεται δυστυχώς από το μειονέκτημα ότι ακόμη και η παραμικρή μόλυνση του αρχικού υλικού μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες. Το γεγονός αυτό αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα σε εφαρμογές της μεθόδου που έχουν μεγάλη βαρύτητα, όπως ο πολλαπλασιασμός DNA από δείγματα που έχουν ληφθεί για τη διαλεύκανση δικαστικών υποθέσεων, τα οποία σπάνια βρίσκονται στην άψογη κατάσταση που χαρακτηρίζει τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή DNA στο εργαστήριο (βλ. Κεφάλαιο 16).

Μία βασική διαδικασία ελέγχου είναι η εκτέλεση μιας PCR χωρίς DNA-μήτρα, για να διαπιστωθεί η τυχόν μόλυνση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται (π.χ. των εκκινητών, της πολυμεράσης κτλ.) με ανεπιθύμητο DNA. Μία πιθανή πηγή μόλυνσης είναι τα προϊόντα προηγούμενων αντιδράσεων πολλαπλασιασμού. Το μείγμα που προκύπτει μετά την ολοκλήρωση μιας αντίδρασης PCR συχνά περιέχει μέχρι και 10^{13} τμήματα-στόχους. Επομένως, και μια ελάχιστη ποσότητα από αυτό (που μπορεί να μεταφερθεί σε μια αντίδραση από τις πιπέτες, για παράδειγμα, που χρησιμοποιούνται κατά την επιτέλεσή της) ενδέχεται να γίνει αιτία εμφάνισης θετικού αποτελέσματος σε μια αντίδραση που θα έπρεπε να είναι αρνητική. Ένας απλός και ιδιαίτερα αποτελεσματικός τρόπος αποφυγής των μολύνσεων εί-

ναι ο φυσικός διαχωρισμός των χειρισμών πριν και μετά τον πολλαπλασιασμό. Αυτό επιτυγχάνεται όταν ο χώρος και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία των αντιδράσεων είναι διαφορετικός από αυτόν στον οποίο γίνεται ο χειρισμός των προϊόντων τους. Επίσης, συχνά οι χώροι και ο εξοπλισμός που προορίζονται για την προετοιμασία των αντιδράσεων εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία, προκειμένου τυχόν DNA που θα μπορούσε να αποτελέσει αιτία μόλυνσης να μην μπορεί να λειτουργήσει ως μήτρα για την PCR. Η υπεριώδης ακτινοβολία αφενός αποικοδομεί το DNA και αφετέρου δημιουργεί χημικές συνδέσεις ανάμεσα σε διαφορετικά σημεία μονόκλωνων αλυσίδων, οι οποίες εμποδίζουν την πολυμεράση να τις χρησιμοποιήσει ως μήτρα.

Στην περίπτωση μελετών ιδιαίτερης σημασίας ή για την αντιμετώπιση επίμονων μολύνσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν και πιο προηγμένες μέθοδοι. Μια έξυπνη μέθοδος βασίζεται στην ενσωμάτωση δεοξουρακίλης (dUTP) στη θέση της δεοξυθυμιδίνης στα προϊόντα PCR. Αυτό έχει ελάχιστη επίδραση στη διαδικασία του πολλαπλασιασμού ή στα χαρακτηριστικά των προϊόντων, με εξαίρεση το γεγονός ότι έχει ως συνέπεια να χάνονται πολλές θέσεις περιορισμού σε αυτά. Κατά την προετοιμασία μιας νέας αντίδρασης, συμπεριλαμβάνεται σε αυτήν το ένζυμο N-γλυκοζυλάση της ουρακίλης, το οποίο διασπά τυχόν υπολείμματα DNA από προηγούμενο πολλαπλασιασμό, καταστρέφοντας τα κατάλοιπα ουρακίλης. Στη νέα αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί dUTP, επειδή το ένζυμο αυτό απενεργοποιείται από την υψηλή θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η νέα PCR.

Η πιστότητα της σύνθεσης DNA εξαρτάται από την πολυμεράση

Η μόλυνση δεν είναι η μόνη πιθανή αιτία σφάλματος στην τεχνική PCR. Όπως όλες οι βιοχημικές διαδικασίες, έτσι και η αντιγραφή του DNA δεν είναι τέλεια. Ορισμένες φορές η DNA πολυμεράση προσθέτει λάθος νουκλεοτίδιο στην αυξανόμενη αλυσίδα του DNA. Η συχνότητα σφάλματος κατά την

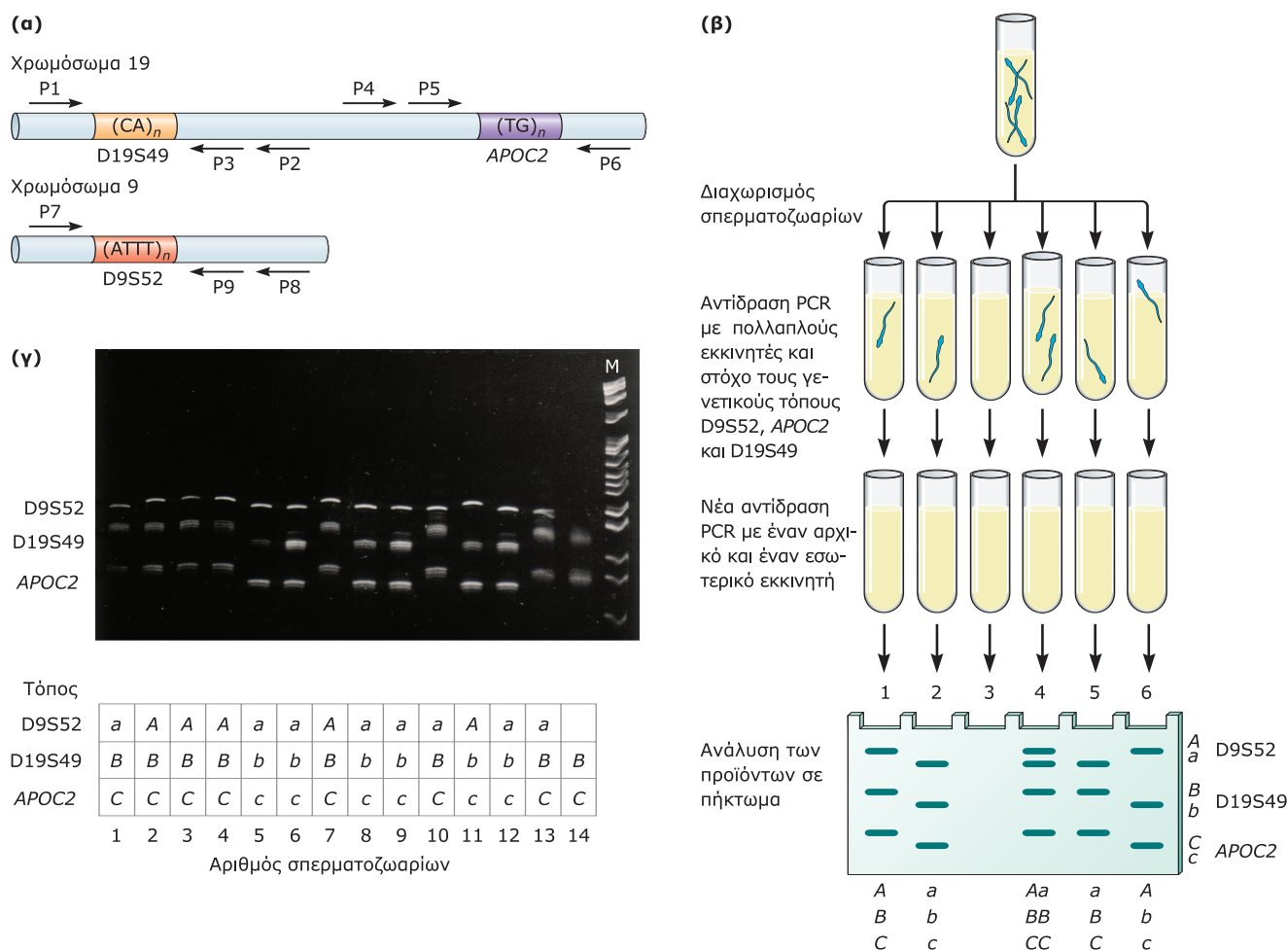
αντιγραφή του DNA στο κύτταρο είναι περίπου 1 για κάθε 10^9 νουκλεοτίδια. Στα κύτταρα επιτυγχάνεται τόσο υψηλός βαθμός ακρίβειας, επειδή με κατάλληλους μηχανισμούς αφαιρούνται τα νουκλεοτίδια που προστίθενται στην αλυσίδα του DNA, όταν αυτά δεν υβριδοποιούνται με τη μήτρα. *In vitro*, η πολυμεράση *Taq* δεν έχει αυτή την ικανότητα «διορθωτικού ελέγχου» και, στις θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις αλάτων όπου πραγματοποιείται η PCR, εισάγει ένα λάθος νουκλεοτίδιο περίπου ανά 2×10^4 . Το γεγονός αυτό δε δημιουργεί σοβαρό πρόβλημα στη μαζική ανάλυση των προϊόντων της PCR, διότι τα μόρια στα οποία έχουν προστεθεί λάθος νουκλεοτίδια αποτελούν ελάχιστο ποσοστό επί του συνολικού αριθμού των μορίων που συντέθηκαν. Ωστόσο, τα σφάλματα αυτά ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντικά προβλήματα στην περίπτωση που τα τμήματα DNA που προκύπτουν από την PCR πρόκειται να κλωνοποιηθούν και να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω. Καθώς κάθε κλώνος προέρχεται από ένα πολλαπλασιασμένο μόριο, αν τύχει να επιλεγεί για περαιτέρω μελέτη κάποιος κλώνος που περιέχει ένα ή περισσότερα λάθος νουκλεοτίδια, η παρουσία των μεταλλαγών αυτών μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα. Το πρόβλημα περιορίζεται αν χρησιμοποιηθεί μεγάλος αριθμός μορίων μήτρας, οπότε χρειάζονται λιγότεροι κύκλοι πολλαπλασιασμού και κατά συνέπεια μειώνεται η πιθανότητα λάθους. Ένας άλλος τρόπος περιορισμού της συχνότητας σφαλμάτων είναι η χρήση πολυμερασών που επιτελούν διορθωτικό έλεγχο (διαθέτουν εξωνουκλεοτιδική δράση με κατεύθυνση 3' προς 5'), όπως η πολυμεράση *Pfu* από το θεμόφυλο βακτήριο *Pyrococcus furiosus*. Η εξωνουκλεοτιδική δράση αφαιρεί τα λάθος νουκλεοτίδια, γεγονός που αυξάνει σημαντικά την ακρίβεια της διαδικασίας της αντιγραφής.

Η PCR πολλαπλασιάζει αλληλουχίες ξεκινώντας ακόμη και από ένα μόριο DNA

Μία από τις πιο αξιοσημείωτες εφαρμογές της PCR είναι η ανάλυση σύνδεσης με τη χρήση DNA

από σπερματοζωάρια. Στον άνθρωπο είναι δύσκολο να γίνει ανάλυση σύνδεσης, καθώς χρησιμοποιούνται οικογένειες με αριθμό απογόνων συχνά πολύ χαμηλότερο απ' ό,τι θα ήθελε να έχει στη διάθεσή του ο γενετιστής για να πραγματοποιήσει στατιστική ανάλυση. Εντούτοις, η εξέταση 1.000 σπερματοζωαρίων ισοδυναμεί με την εξέταση μιας οικογένειας με 1.000 παιδιά, επειδή κάθε σπερματοζωάριο έχει προκύψει από μειωτική διαίρεση. Η ανάλυση σύνδεσης μπορεί να γίνει επιλέγοντας ένα αρσενικό άτομο ετερόζυγο ως προς τους γενετικούς τόπους που πρόκειται να μελετηθούν και προσδιορίζοντας το ποσοστό των σπερματοζωαρίων του που παρουσιάζει ανασυνδυασμό ανάμεσα σε αυτούς τους γενετικούς τόπους. Το σπερματοζωάριο όμως είναι ένα απλοειδές κύτταρο, περιέχει μόνο ένα αντίγραφο κάθε χρωμοσώματος και κάθε χρωμόσωμα είναι ένα μόριο DNA. Για την ανάλυση σύνδεσης με τη χρήση σπερματοζωαρίων, η PCR θα πρέπει να λειτουργήσει αποδοτικά και αξιόπιστα σε ένα μείγμα αντίδρασης που περιέχει ως μήτρα μονάχα ένα μόριο DNA!

Στο παράδειγμα της Εικόνας 4.16 έγινε ανάλυση σε αλληλόμορφα τριών γενετικών τόπων, από τους οποίους οι δύο βρίσκονται στο χρωμόσωμα 19 (D19S49 και *APOC2*) και ο ένας στο χρωμόσωμα 9 (D9S52). Αυτοί οι γενετικοί τόποι περιέχουν μικροδορυφορικές επαναλήψεις, τμήματα δηλαδή DNA στα οποία μία μικρή αλληλουχία επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Στο γενετικό τόπο D19S49 υπάρχουν επαναλήψεις της αλληλουχίας CA, στον *APOC2* της TG και στον D9S52 της ATTT. Στα διαφορετικά αλληλόμορφα αυτών των γενετικών τόπων υπάρχει διαφορετικός αριθμός επαναλήψεων. Η ελάχιστη δυνατή διαφορά μεταξύ τους είναι μία επανάληψη, η οποία ισοδυναμεί με δύο νουκλεοτίδια στους γενετικούς τόπους *APOC2* και D19S49 και τέσσερα νουκλεοτίδια στον D9S52. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάλυση σύνδεσης, λήφθηκε σπέρμα από αρσενικά άτομα ετερόζυγα ως προς τους τρεις γενετικούς τόπους και απομονώθηκαν μεμονωμένα σπερματοζωάρια με τη χρήση φθορισμοενεργοποιούμενης κυτταρομετρίας ροής (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorter), η οποία χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό διαφο-

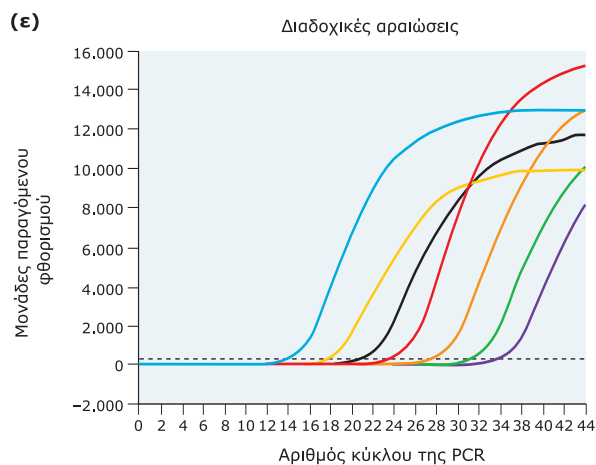
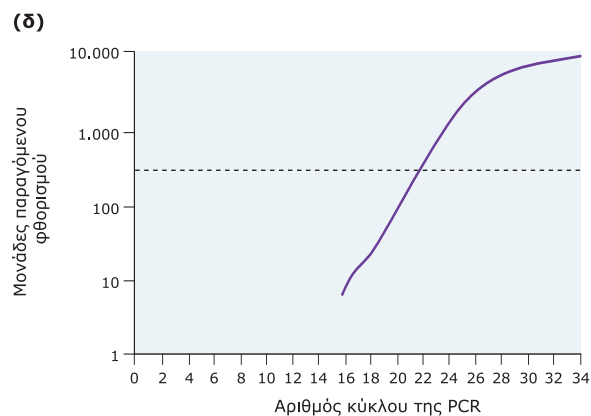
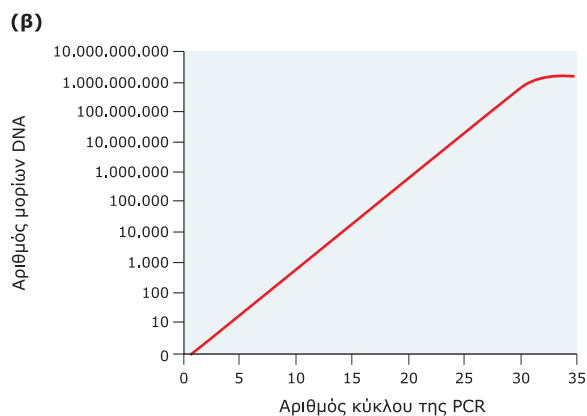
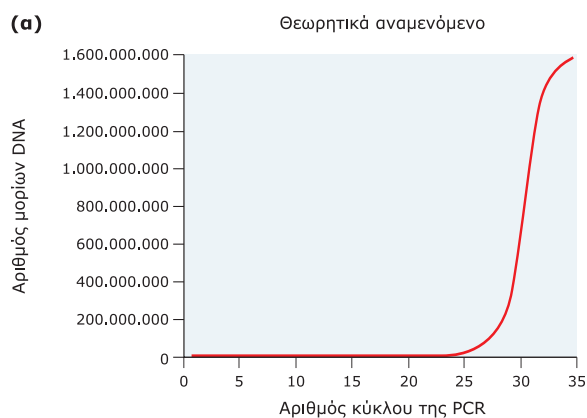


ΕΙΚΟΝΑ 4.16: Πολλαπλασιασμός μεμονωμένων μορίων DNA κατά την ανάλυση σύνδεσης με χρήση σπερματοζωαρίων.

(α) Χρησιμοποιήθηκαν τρεις πολυμορφικές περιοχές: οι γενετικοί τόποι D19S49 και APOC2, που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 19, και ο D9S52, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9. Οι πολυμορφισμοί προκύπτουν από διαφορές στον αριθμό των επαναλήψεων που φέρει κάθε γενετικός τόπος: της (CA) στον D19S49, της (TG) στον APOC2 και της (ATT) στον D9S52. Συντέθηκαν τρεις ειδικοί εκκινητές για κάθε γενετικό τόπο. (β) Λήφθηκε δείγμα σπέρματος από αρσενικό άτομο ετερόζυγο και για τους τρεις γενετικούς τόπους με γονότυπο (CA)₁₅/(CA)₂₁, (TG)₁₈/(TG)₂₂, (ATT)₁₂/(ATT)₁₃, όπου ο δείκτης δηλώνει τον αριθμό των επαναλήψεων. Μεμονωμένα σπερματοζωάρια μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου έγινε ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός των τριών γενετικών τόπων με τη χρήση των ζευγών εκκινητών P1/P2, P4/P6 και P7/P8. Λήφθηκαν δείγματα από κάθε αντίδραση και ο πολλαπλασιασμός επαναλήφθηκε, χρησιμοποιώντας σε κάθε περίπτωση έναν εκκινητή από το αρχικό ζεύγος και ένα νέο εκκινητή, που υβριδοποιούνταν στο εσωτερικό του προϊόντος της προηγούμενης αντίδρασης. Τα ζεύγη εκκινητών της δεύτερης αντίδρασης ήταν τα P1/P3, P5/P6 και P7/P9. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε ένα πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία βρομιούχου αιθιδίου. Σε κάθε στήλη αναμένονται τρεις ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούν στο DNA κάθε γενετικού τόπου που έχει πολλαπλασιαστεί. Ο πειραματιστής μπορεί, εξετάζοντας το πήκτωμα, να συμπεράνει τους απλότυπους κάθε σπερματοζωαρίου. Έτσι, το σπερματοζωάριο της στήλης 1 έχει απλότυπο ABC, ενώ αυτό της στήλης 2 έχει απλότυπο abc. Παρ' όλα αυτά, στη στήλη 3 δεν εμφανίζονται ζώνες, πιθανότατα επειδή το συγκεκριμένο δείγμα δεν περιείχε σπερματοζωάριο, ενώ στη στήλη 4 υπάρχουν δύο ζώνες που αντιστοιχούν και στα δύο αλληλόμορφα του γενετικού τόπου D9S52, κατά πάσα πιθανότητα επειδή το δείγμα περιείχε δύο σπερματοζωάρια (ένα ABC και ένα abc). (γ) Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενός πειράματος και η ερμηνεία τους. Στη στήλη 14 λείπει ένα από τα αναμενόμενα προϊόντα (αυτό του D9S52). Αυτού του είδους τα προβλήματα δεν είναι ασυνήθιστα σε αντιδράσεις PCR με πολλαπλούς εκκινητές. Από την ανάλυση των δεδομένων συνάγεται το συμπέρασμα ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ των γενετικών τόπων D19S49 και APOC2. Στην περίπτωση του αρσενικού ατόμου που εξετάστηκε, στο χρωμόσωμα 19 το αλληλόμορφο B του D19S49 είναι συνδεδεμένο με το αλληλόμορφο C του APOC2, ενώ το αλληλόμορφο b του D19S49 είναι συνδεδεμένο με το αλληλόμορφο c του APOC2. Δεν υπάρχει σύνδεση μεταξύ των αλληλομόρφων του D9S52 και των D19S49-APOC2, διότι βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα.

ρετικών τύπων λεμφοκυττάρων. Οι τρεις γενετικοί τόποι πολλαπλασιάστηκαν ταυτόχρονα σε μια αντίδραση PCR με πολλαπλούς εκκινητές (multiplex PCR reaction). Οι εκκινητές σε τέτοιου είδους αντιδράσεις πρέπει να σχεδιάζονται προσεκτικά, ώστε κάθε προϊόν PCR να έχει διαφορετικό μέγεθος και οι διαφορετικοί εκκινητές να μην υβριδοποιούνται μεταξύ τους. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε

πήκτωμα ακρυλαμίδης και προσδιορίστηκαν τα αλληλόμορφα που περιέχει το καθένα. Μετά από εξέταση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε, όπως αναμενόταν, ότι τα *APOC2* και *D19S49* είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους, ενώ το *D9S52* βρίσκεται σε διαφορετικό χρωμόσωμα. Για τον υπολογισμό της συχνότητας ανασυνδυασμού ανάμεσα στους δύο συνδεδεμένους γενετικούς τόπους απαιτείται στατιστι-



κή επεξεργασία των δεδομένων, καθώς πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφορες τεχνικές περιπλοκές. Για παράδειγμα, ο διαχωρισμός δεν είναι τέλειος και έτσι ορισμένα δείγματα μπορεί να περιέχουν περισσότερα από ένα σπερματοζωάρια, ενώ άλλα μπορεί να μην περιέχουν κανένα σπερματοζωάριο. Επίσης, ορισμένες φορές οι γενετικοί τόποι δεν πολλαπλασιάζονται επιτυχώς κατά την PCR. Η συχνότητα ανασυνδυασμού που υπολογίστηκε με βάση το πείραμα αυτό ήταν 0,083, νούμερο που συμφωνεί με την τιμή που προέκυψε από παρόμοιες αναλύσεις που έγιναν σε 40 οικογένειες. Αυτοί οι υπολογισμοί των γενετικών αποστάσεων γίνονται σε χρωμοσώματα *αρσενικών* ατόμων, γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία, δεδομένου ότι η συχνότητα ανασυνδυασμού των γονιδίων κατά τη μείωση διαφέρει μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων.

Η PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται για τη γρήγορη και ακριβή ποσοτικοποίηση RNA και DNA

Συχνά είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η ποσότητα ενός συγκεκριμένου μορίου DNA ή RNA σε ένα δείγμα. Αυτό μπορεί να γίνει μετρώντας την ένταση των ζωνών στα στυπώματα κατά Southern και τύπου Northern, αλλά οι παραπάνω μέθοδοι είναι σχετικά πολύπλοκες και δε διαθέτουν ιδιαίτερη ευαισθησία. Η τεχνική PCR είναι πολύ πιο απλή και ευέλικτη, ενώ παρέχει πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια.

Σε γενικές γραμμές, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων-στόχων στο αρχικό δείγμα, τόσο περισσότερα πολλαπλασιασμένα μόρια θα υπάρχουν σε κάθε βήμα της αντίδρασης. Μετρώντας την ποσό-

ΕΙΚΟΝΑ 4.17: Χρήση της PCR πραγματικού χρόνου για τη μέτρηση της ποσότητας των μορίων-στόχων που περιέχει ένα δείγμα.

(α, β) Γραφικές παραστάσεις της θεωρητικής συσσώρευσης μορίων DNA κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR. Στη γραφική παράσταση α, η κλίμακα είναι γραμμική και το πρώτο τμήμα της καμπύλης (μέχρι τον κύκλο 25) σχεδόν εφάπτεται στον οριζόντιο άξονα, γιατί ο αριθμός των μορίων είναι πολύ μικρός σε σχέση με τους επόμενους κύκλους. Στη γραφική παράσταση β, η συσσώρευση των μορίων παριστάνεται σε λογαριθμική κλίμακα. Προκύπτει έτσι μία ευθεία γραφική παράσταση εξαιτίας της εκθετικής αύξησης. Και στις δύο περιπτώσεις οι καμπύλες δείχνουν ότι η ποσότητα του προϊόντος μετά τον κύκλο 32 φτάνει σε ένα ανώτατο επίπεδο. (γ, δ) Γραφικές παραστάσεις πειραματικών δεδομένων. Τα προϊόντα της PCR ανιχνεύτηκαν με τη βοήθεια της χρωστικής SYBR Green, μιας χρωστικής που προσδένεται στο DNA χωρίς κάποια προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα. Η ποσότητα του προϊόντος της PCR είναι τόσο χαμηλή κατά τους πρώτους κύκλους, που δεν μπορεί να προσδιοριστεί με βεβαιότητα, καθώς ο φθορισμός που παράγεται δεν υπερβαίνει αρκετά το χαμηλό ενδογενή φθορισμό (background fluorescence) των αντιδρώντων μορίων. Προσέξτε ότι η καλύτερη αντιστοιχία των πειραματικών δεδομένων με τη γραφική παράσταση (β), που αναπαριστά σε λογαριθμική κλίμακα το θεωρητικά αναμενόμενο ρυθμό συσσώρευσης των προϊόντων, σημειώνεται κατά τους κύκλους 18-24. Η περίοδος αυτή, στη διάρκεια της οποίας η αύξηση των προϊόντων της αντίδρασης είναι πραγματικά εκθετική, συνιστά το κατάλληλο διάστημα για να γίνει η σύγκριση ανάμεσα στην πειραματική και τη θεωρητική συγκέντρωση των μορίων που λειτουργούν ως μήτρα. Προσέξτε επίσης ότι το γραμμικό τμήμα της γραφικής παράστασης στο γ, μεταξύ των κύκλων 26-30, δεν είναι κατάλληλο χρονικό διάστημα για να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός! (ε) Οι γραφικές παραστάσεις με τα διαφορετικά χρώματα έχουν γίνει σε γραμμική κλίμακα και αντιστοιχούν σε αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου που πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικές ποσότητες του μορίου-στόχου. Συγκεκριμένα, με διαδοχικές αραιώσεις η αρχική ποσότητα του μορίου-στόχου κάθε φορά υποδεκαπλασιάζεται. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του μορίου-στόχου, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για να φτάσει η ποσότητα του προϊόντος σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Προσέξτε ιδιαίτερα ότι, όταν οι αντιδράσεις φτάσουν σε ένα ανώτατο επίπεδο, οι διαφορές στην ποσότητα των προϊόντων δεν αντιπροσωπεύουν πλέον τις αρχικές διαφορές στην ποσότητα του μορίου-στόχου. Η αντίδραση που αντιστοιχεί στην καμπύλη η οποία έχει σχεδιαστεί με ανοιχτό μπλε χρώμα περιέχει 1.000 φορές περισσότερα μόρια-στόχους απ' ό,τι η αντίδραση κόκκινου χρώματος. Παρ' όλα αυτά, παράγει λιγότερο τελικό προϊόν! Φαίνεται λοιπόν από τα παραπάνω η επίδραση που έχουν, κατά τα αρχικά στάδια της αντίδρασης, μικρές, τυχαίες πειραματικές αποκλίσεις από το θεωρητικά αναμενόμενο, οι οποίες πολλαπλασιάζονται κατά τα μετέπειτα στάδια, με αποτέλεσμα η τελική συμπεριφορά της αντίδρασης να μην είναι προβλέψιμη. Γίνεται επομένως αντιληπτό πόσο σημαντικό είναι να πραγματοποιηθεί η σύγκριση τη σωστή στιγμή.

τητα των τελικών προϊόντων της PCR σε ένα πήκτωμα, είναι δυνατόν να πάρουμε μια ιδέα σχετικά με την ποσότητα του μορίου-στόχου που υπήρχε στο μείγμα κατά την έναρξη της αντίδρασης. Αυτού του τύπου η προσέγγιση όμως δεν είναι αξιόπιστη. Αν οι ποσότητες των εκκινητών και των νουκλεοτιδίων είναι σχετικά χαμηλές ή αν γίνουν πάρα πολλοί κύκλοι PCR, οι εκκινητές και τα νουκλεοτίδια στην αντίδραση θα αρχίσουν να εξαντλούνται και η ποσότητα του προϊόντος σύντομα θα φτάσει σε ένα ανώτατο επίπεδο μετά από το οποίο δε θα μπορεί να γίνει περαιτέρω σύνθεση. Στο στάδιο αυτό, η ποσότητα του DNA που παρήχθη δεν αντανάκλα πλέον την ποσότητα του μορίου-στόχου που υπήρχε αρχικά. Μία πολύ καλύτερη στρατηγική είναι η χρήση ποσοτικοποιητικών μεθόδων PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR), που επιτρέπουν τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων, και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης PCR. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι στην αρχή, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η

εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις (Εικ. 4.17).

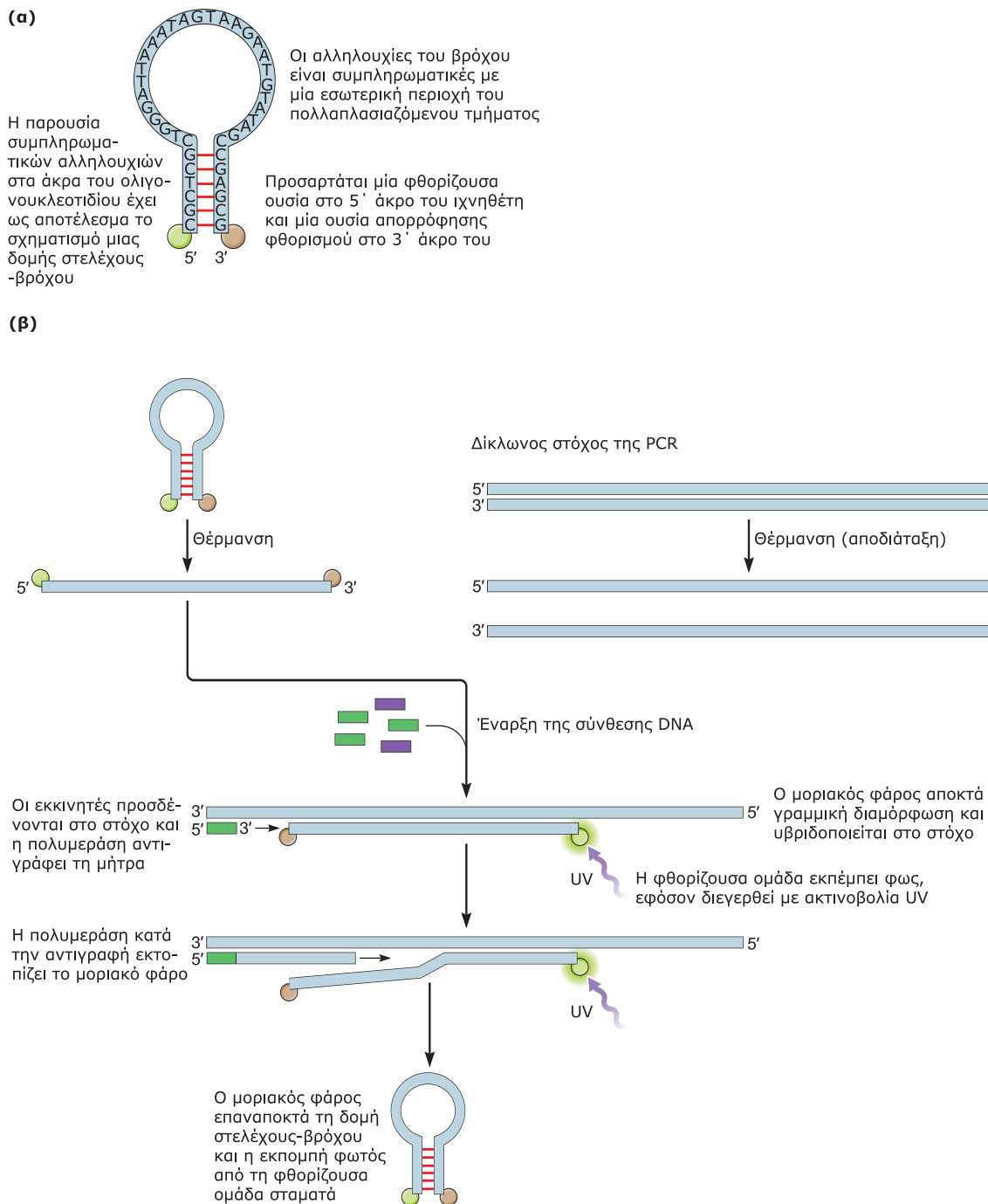
Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της ποσότητας του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ετικέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρομιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I. Και τα δύο εισχωρούν στις αύλακες του δίκλωνου DNA. Μία προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε πιο πρόσφατα κάνει χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών οι οποίοι υβριδοποιούνται με μία εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου. Ένας τύπος ιχνηθέτη ονομάζεται *μοριακός φάρος* (molecular beacon) και συνίσταται σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει μία φθορίζουσα ομάδα στο ένα άκρο και μία ομάδα απορρόφησης φθορισμού στο άλλο. Ο μοριακός φάρος είναι σχεδιασμένος έτσι ώστε να σχηματίζει μια δομή στελέχους-βρόχου (stem-loop structure) που φέρνει κοντά τη φθορίζουσα ομάδα και την ομάδα απορρόφησης φθορισμού. Όταν φωτίζεται με UV ενώ βρίσκεται σε αυτή τη διαμόρφωση, η ενέργεια που εκπέμπεται

ΕΙΚΟΝΑ 4.18: Μοριακοί φάροι για την PCR πραγματικού χρόνου.

(α) Ο μοριακός φάρος είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο μικρού μήκους (συνήθως 30-40 bp), που σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία υιοθετεί μια διαμόρφωση στελέχους-βρόχου. Η αλληλουχία του βρόχου είναι συμπληρωματική προς μία εσωτερική αλληλουχία του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο μοριακός φάρος φέρει μία φθορίζουσα χρωστική αναφοράς συνδεδεμένη στο νουκλεοτίδιο που βρίσκεται στο 5' άκρο του και μία ομάδα απορρόφησης φθορισμού στο νουκλεοτίδιο που βρίσκεται στο 3' άκρο. Μερικά ολιγονουκλεοτίδια στα δύο άκρα του (συνήθως έξι) είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους, ώστε ο μοριακός φάρος να αναδιπλώνεται σχηματίζοντας τη δομή στελέχους-βρόχου, η οποία φέρνει σε μικρή απόσταση μεταξύ τους τη φθορίζουσα χρωστική και την ομάδα απορρόφησης φθορισμού. Η γειτνίαση αυτή επιτρέπει τη μεταφορά ενέργειας από τη χρωστική αναφοράς στη χρωστική απορρόφησης και έτσι η δεύτερη απορροφά το φως που εκπέμπει η πρώτη όταν διεγείρεται με ακτινοβολία UV. (β) Όταν η αντίδραση της PCR θερμαίνεται για να διαχωριστούν οι κλώνοι του DNA-στόχου, αποδιατάσσεται και ο μοριακός φάρος, οπότε προκύπτει ένα γραμμικό μόριο. Μόλις η αντίδραση ψυχθεί, ώστε να επιτευχθεί η υβριδοποίηση των εκκινητών, όλοι οι κλώνοι-στόχοι υβριδοποιούνται με το μοριακό φάρο, ενώ η περίσσεια αυτού επαναποκτά τη διαμόρφωση στελέχους-βρόχου. Στα υβριδοποιημένα μόρια η φθορίζουσα χρωστική αναφοράς και η χρωστική απορρόφησης του φθορισμού βρίσκονται απομακρυσμένες η μία από την άλλη και έτσι τώρα η χρωστική αναφοράς εκπέμπει φως όταν ακτινοβολείται με ακτινοβολία UV. Επειδή η χρωστική αναφοράς εκπέμπει φως μόνο εφόσον είναι συνδεδεμένη στην αλληλουχία-στόχο, η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός είναι ανάλογη με τον αριθμό (την ποσότητα) των μορίων-στόχων της PCR. Ο μοριακός φάρος δεν επηρεάζει τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού, διότι εκτοπίζεται από το στόχο καθώς η DNA πολυμεράση κινείται κατά μήκος του κλώνου που χρησιμοποιείται ως μήτρα. Μετά την εκτόπισή του υιοθετεί ξανά τη διαμόρφωση στελέχους-βρόχου και καθίσταται διαθέσιμος για την επόμενη μέτρηση στον επόμενο κύκλο.

από την φθορίζουσα ομάδα απορροφάται από την ομάδα απορρόφησης φθορισμού με μια διαδικασία που ονομάζεται FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, μεταφορά ενέργειας μέσω αντανάκλασης φθορισμού) και έτσι δεν εκπέμπεται φως. Όταν όμως ο ιχνηθέτης θερμανθεί και υβριδοποιηθεί με την πολλαπλασιαζόμενη αλληλουχία του DNA, η

διαμόρφωσή του αλλάζει και η φθορίζουσα ομάδα απομακρύνεται από την ομάδα απορρόφησης φθορισμού, οπότε εκπέμπει φως όταν ακτινοβολείται (Εικ. 4.18). Ο αυξανόμενος φθορισμός, που μετρείται καθώς προχωρά η αντίδραση και αυξάνεται η ποσότητα του μορίου-στόχου, είναι ένα μέτρο της αύξησης του αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων μορίων.

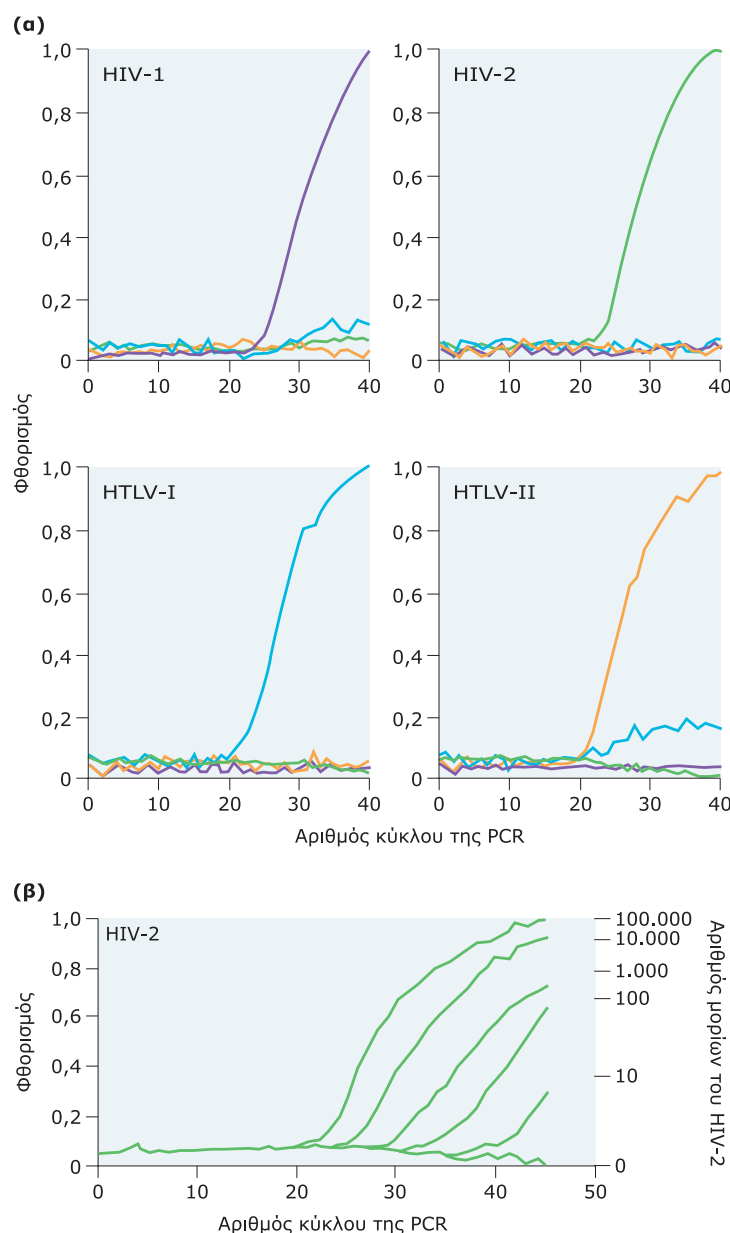


Η διεξαγωγή της αντίδρασης PCR με πολλούς εκκινητές έχει συνδυαστεί με την τεχνολογία των μοριακών φάρων, παρέχοντας ένα ιδιαίτερα ευαίσθητο μέσο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ρετροϊών στον άνθρωπο, όπως οι HIV-1, HIV-2, HTLV-I και HTLV-II. Χρησιμοποιώντας μοριακούς φάρους σημασμένους με διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν φως διαφορετικού μήκους κύματος, μπορεί να επιτευχθεί στο πλαίσιο μίας μόνο αντίδρασης η ταυτόχρονη παρακολούθηση πολλών προϊόντων της PCR, καθένα από τα οποία θα προέρχεται από ένα διαφορετικό ιό. Με

τον τρόπο αυτό ακόμη και δέκα μόλις μόρια ενός ιού μπορούν να ανιχνευτούν παρουσία 100.000 μορίων ενός άλλου ιού (Εικ. 4.19).

Το ανασυνδυασμένο DNA ενηλικιώνεται

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA έχει με το παραπάνω εκπληρώσει τις προσδοκίες που γέννησε. Τεχνικές που κάποτε ήταν δύσκολο να εφαρμοστούν και πραγματοποιούνταν σε λίγα μόνο



ΕΙΚΟΝΑ 4.19: Ανίχνευση διαφορετικών ανθρώπινων ρετροϊών.

Σχεδιάστηκαν εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου *gag* του HIV-1, του γονιδίου *env* του HIV-2, του γονιδίου *tax* του HTLV-1 και του γονιδίου *pol* του HTLV-2. Συντέθηκαν μοριακοί φάροι συμπληρωματικοί προς ορισμένες συντηρημένες εσωτερικές αλληλουχίες κάθε ιικής αλληλουχίας-στόχου και σε καθέναν από αυτούς προσαρτήθηκε μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική και η ίδια ομάδα απορρόφησης φθορισμού. (α) Και οι τέσσερις συνδυασμοί εκκινητών-μοριακών φάρων χρησιμοποιήθηκαν σε τέσσερις αντιδράσεις, σε καθεμία από τις οποίες υπήρχε DNA ενός μόνο ιού. Παρά την παρουσία όλων των συνδυασμών εκκινητών-μοριακών φάρων σε κάθε αντίδραση, η εξειδίκευση του συστήματος είναι εμφανής (για παράδειγμα, οι εκκινητές του HIV-1 –μοβ χρώμα– πολλαπλασιάζουν αποκλειστικά αλληλουχίες του HIV-1). (β) Η τεχνική αυτή μπορεί να ανιχνεύσει πολύ μικρές ποσότητες ενός ιού παρουσία μεγάλης ποσότητας ενός δεύτερου ιού. Στο πείραμα αυτό, η PCR περιείχε ένα σταθερό αριθμό μορίων HTLV-1 (συγκεκριμένα 100.000), ενώ ο αριθμός των μορίων HIV-2 μειωνόταν σταδιακά από 100.000 έως 10, υποδεκαπλασιαζόμενος με διαδοχικές αραιώσεις. Ο αριθμός των κύκλων PCR που χρειαζόνταν για να εντοπιστεί μετρούσιμο σήμα υπήρξε αντιστρόφως ανάλογος προς τον αρχικό αριθμό μορίων HIV-2. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ταυτόχρονο έλεγχο για τον εντοπισμό τεσσάρων ιών, ενώ χάρη στη μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητά της καθιστά δυνατό τον εντοπισμό ακόμη και δέκα μόλις μορίων HIV-2 παρουσία 100.000 μορίων HTLV-1.

εξειδικευμένα εργαστήρια έχουν σήμερα διαδοθεί με τη βοήθεια έντυπου και ηλεκτρονικού υλικού στο οποίο περιγράφονται λεπτομερώς. Έτσι, χρησιμοποιούνται πλέον ευρύτατα. Υπάρχουν επίσης πολλές εταιρείες που πουλάνε έτοιμα ένζυμα, ολιγονουκλεοτίδια και άλλα αντιδραστήρια, τα οποία παλαιότερα έπρεπε να παρασκευαστούν, μετά από επίπονες προσπάθειες, από όποιον ερευνητή επιθυ-

μούσε να τα χρησιμοποιήσει. Τα εργαλεία του ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιούνται καθημερινά σε ολόκληρο τον κόσμο και οι βιολόγοι τα έχουν αξιοποιήσει για να ανακαλύψουν πολλά από τα βασικά χαρακτηριστικά των γονιδίων και τον τρόπο λειτουργίας τους *in vivo*. Στο επόμενο κεφάλαιο θα δούμε πώς αυτά τα εργαλεία έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη κλωνοποιημένων γονιδίων.

Βιβλιογραφία

Ένζυμα και χάρτες περιορισμού

- Linn S. and Arber W. 1968. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. *In vitro* restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **59**: 1300–1306.
- Meselson M. and Yuan R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* **217**: 1110–1114.
- Kelly T.J., Jr., and H.O. Smith. 1970. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*, II. Base sequence of the recognition site. *J. Mol. Biol.* **51**: 393–409.
- Smith H.O. and Wilox K.W. 1970. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*, I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* **51**: 379–391.
- Danna K. and Nathans D. 1971. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**: 2913–2917.
- Sharp P.A., Sugden B., and Sambrook J. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Hemophilus parainfluenza* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**: 3055–3062.
- Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., and Macelis D. 2003. REBASE: Restriction enzymes and methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **31**: 418–420.

Αντιπαραθέσεις σχετικά με το ανασυνδυασμένο DNA

- Singer M. and Soll D. 1973. Guidelines for DNA hybrid molecules. *Science* **181**: 1174.
- Berg P., Baltimore D., Boyer H.W., Cohen S.N., Davis R.W., et al. 1974. Potential biohazards of recombinant DNA molecules. *Science* **185**: 303.
- Berg P., Baltimore D., Brenner S., Roblin R.O., and Singer M.F. 1975. Asilomar conference on recombinant DNA molecules. *Science* **188**: 991–994.
- Norman C. 1976. Genetic manipulation: Guidelines issued. *Nature* **262**: 2–4.
- Rogers M. 1976. *Biohazard*. Knopf, New York.
- Department of Health, Education, and Welfare. 1980. Guide-

lines for research involving recombinant DNA molecules. *Federal Register*, Tuesday, January 29.

- Watson J.D. and Tooze J. 1981. *The DNA Story*. W.H. Freeman, San Francisco. (Ένα βιβλίο με ντοκουμέντα γύρω από τις συζητήσεις για το ανασυνδυασμένο DNA.)
- Krimsky S. 1983. *Genetic Alchemy*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Zilinskas R.A. and Zimmerman B.K. 1986. *The Gene-splicing Wars: Reflections on the Recombinant DNA Controversy*. Macmillan, New York.

Πλασμίδια και ιοί που χρησιμοποιούνται ως φορείς

- Jackson D., Symons R., and Berg P. 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 2904–2909.
- Mertz J.E. and Davis R.W. 1972. Cleavage of DNA by RI restriction endonuclease generates cohesive ends. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 3370–3374.
- Cohen S., Chang A., Boyer H., and Helming R. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**: 3240–3244.
- Lobban P. and Kaiser A.D. 1973. Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **79**: 453–471.
- Bolivar F., Rodrigues R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., et al. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multi-purpose cloning system. *Gene* **2**: 95–113.
- Yanisch-Peron C., Vieira J., and Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103–119.
- Hohn B. and Murray K. 1977. Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 3259–3263.
- Blattner F.R., Williams B.G., Blechl A.E., Denniston-Thompson K., Faber H.E., et al. 1977. Charon phages: Safer de-

- rivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. *Science* **196**: 161–169.
- Huynh T.V., Young R.A., and Davis R.W. 1985. Constructing and screening cDNA libraries in Igt10 and Igt11. In *DNA Cloning: A Practical Approach* (ed. D.M. Glover), vol. 1, pp. 49–78. IRL Press, Oxford.
- Short J.M., Fernandez J.M., Sorge J.A., and Huse W.D. 1988. Lambda ZAP: A bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7583–7600.

Κλωνοποίηση

- Aviv H. and Leder P. 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 1408–1412.
- Maniatis T., Kee S.G., Efstratiadis A., and Kafatos F.C. 1976. Amplification and characterization of a β -globin gene synthesized in vitro. *Cell* **8**: 163–182.
- Okayama H. and Berg P. 1982. High-efficiency cloning of full length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 161–170.
- Soares M.B., Bonaldo M.D.F., Jelene P., Su L., Lawton L., and Efstratiadis A. 1994. Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 9228–9232.
- Carninci P., Shibata Y., Hayatsu N., Sugahara Y., Shibata K., et al. 2000. Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res.* **10**: 1617–1630.
- Grunstein M. and Hogness D.S. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**: 3961–3965.

Στύπωμα κατά Southern και στύπωμα τύπου Northern

- Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503–517.
- Southern E.M. 2000. Blotting at 25. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 585–588. (Ο ίδιος ο Southern περιγράφει πώς ανακάλυψε την τεχνική της ανάλυσης κατά Southern.)
- Alwine J.C., Kemp D.J., and Stark G.R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5350–5354.

Αλληλούχιση του DNA

- Sanger F. and Dowding M. 1996. *Selected Papers of Frederick Sanger*. World Scientific, Singapore. (Ανατύπωση 48 από τις πιο σημαντικές δημοσιεύσεις του Sanger με συναρπαστικά σχόλια από τον ίδιο.)
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. **74**: 5463–5467.

- Sanger F. and A.R. Coulson. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**: 444–448.
- Sanger F., Air G.M., Barrel B.G., Brown N.L., Coulson A.R., et al. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174. *Nature* **265**: 678–695.
- Maxam A.M. and Gilbert W. 1977. A new method of sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 560–564.
- Sutcliffe J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 77–90.
- Sutcliffe J.G. 1995. pBR322 and the advent of rapid DNA sequencing. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 87–90. (Μια προσωπική ιστορία για τις πρώτες εφαρμογές της αλληλούχισης του DNA.)

Σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων και κατασκευή γονιδίων

- Gait M.J. and Sheppard R.C. 1977. Rapid synthesis of oligodeoxy-ribonucleotides: A new solid-phase method. *Nucleic Acids Res.* **4**: 1135–1158.
- Beaucage S.L. and Caruthers M.H. 1981. Deoxynucleotide phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **22**: 1859–1862.
- Heyneker H.L., Shine J., Goodman H.M., Boyer H., Rosenberg J., et al. 1976. Synthetic *lac* operator is functional in vivo. *Nature* **263**: 748–752.
- Khorana H.G. 1979. Total synthesis of a gene. *Science* **203**: 614–625.
- Cello J., Pau A.V., and Wimmer E. 2002. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: Generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* **297**: 1016–1018.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

- Mullis K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* **262**: 56–65.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491.
- Mullis K. and Faloona F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **55**: 335–350.
- McCabe E.R.B., Huang S.-Z., Seltzer W.K., and Law M.L. 1987. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: Potential applications to newborn screening. *Hum. Genet.* **75**: 213–216.
- Higuchi R., von Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., and Erlich H.A. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature* **332**: 543–546.
- Krings M., Stone A., Schmitz R.W., Krainitzki H., Stoneking M., and Pääbo S. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* **90**: 19–30.
- Chien A., Edgar D.B., and Trela J.M. 1976. Deoxyribonu-cle-

- ic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**: 1550–1557.
- Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., and Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350–1354.
- Kwok S. and Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR (review). *Nature* **339**: 237–238.
- Longo M.C., Berringer M.S., and Hartley J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**: 125–128.
- Keohavong P. and Thilly W.G. 1989. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 9253–9257.
- Eckert K.A. and Kunkel T.A. 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3739–3744.
- Hubert R., Weber J.L., Schmitt K., Zhang L., and Arnheim N. 1992. A new source of polymorphic DNA markers for sperm typing: Analysis of microsatellite repeats in single cells. *Am. J. Hum. Genet.* **51**: 985–991.
- Vet J.A. and Marras S.A. 2005. Design and optimization of molecular beacon real-time polymerase chain reaction assays. *Methods Mol. Biol.* **288**: 273–290.
- Kramer R. and Tyagi S. 1996. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **14**: 303–308.
- Vet J.A.M., Majitha A.R., Marras S.A., Tyagi S., Dube S., Poiesz B.J., and Kramer F.R. 1999. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 6394–6399.