



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ
ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ

Βιοχημεία - Αρχές Βιοτεχνολογίας

Εργαστηριακές ασκήσεις

Γεώργιος Παπαδόπουλος, Καθηγητής Τμ. Τεχνολόγων Γεωπόνων Τ.Ε.

Άδειες Χρήσης

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons. Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα. Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο ΤΕΙ Ηπείρου**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.



Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



7^η Άσκηση: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΣΠΕΡΜΑ ΣΙΤΑΡΙΟΥ.

Βασιλική Καραγιάννη, Παρασκευή Μητλιάγκα, Αγγελική Ζαρλαχά, Γεώργιος Κ. Παπαδόπουλος

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (*deoxyribonucleic acid*, DNA), αποδείχθηκε με τα πρωτοποριακά πειράματα των Avery, McLeod και MacCarthy, ότι είναι η χημική ουσία εκείνη που περιέχει τις κληρονομούμενες πληροφορίες (δηλ. τη κληρονομικότητα) για κάθε οργανισμό. Τα συγκεκριμένα πειράματα αφορούσαν ένα απλό μικροοργανισμό (τον στρεπτόκοκκο) αλλά σταδιακά επεκτάθηκαν με πιο έμμεσους τρόπους και στους μύκητες αλλά και στα ανώτερα ζώα και φυτά, όπου δείχτηκε ότι τα χρωμοσώματα (γνωστοί φορείς της κληρονομικότητας) αποτελούνται από DNA και πρωτεΐνες (ο ρόλος των πρωτεϊνών είναι μόνο στηρικτικός, όπως θα φανεί).

Η πιο πάνω ανακάλυψη εντυπωσίασε κάποιους και πολεμήθηκε από κάποιους άλλους. Ένας από τους πρώτους ήταν ο Αυστριακός καταγωγής βιοχημικός Erwin Chargaff (από το 1934 μέλος του Τμήματος Βιοχημείας του Παν/μίου Κολούμπια), που έκλεισε όσο πιο γρήγορα μπορούσε όλες τις άλλες έρευνές του για να ασχοληθεί αποκλειστικά με τη βιοχημεία του DNA. Μέσα σε 6 χρόνια έφτασε στα εξής εκπληκτικά συμπεράσματα:

1. Ο λόγος g DNA/g ιστού είναι σταθερός σε έναν οργανισμό, και μπορεί να ποικίλλει από έναν οργανισμό σε άλλον.
2. Σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς η κατανομή των τεσσάρων αζωτούχων βάσεων του DNA (αδενίνη (A), κυτοσίνη (C), γουανίνη (G) και θυμίνη (T)), ποικίλλει.
3. Όμως, αυτή η ποικιλία ακολουθεί πάντα τις εξής ισοδυναμίες,

$$A + G = T + C,$$

ανεξάρτητα από τον οργανισμό ή τον ιστό από τον οποίο απομονώνεται το DNA.

4. Σε κάθε οργανισμό, $A + T =$ σταθερό, και χαρακτηριστικό για τον συγκεκριμένο οργανισμό.
5. Πιο ακριβείς μελέτες έδειξαν ότι

$$A = T \quad \text{και} \quad G = C$$

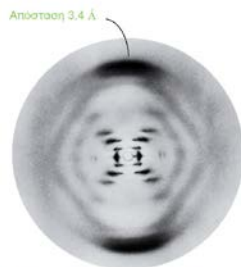
σε κάθε οργανισμό και κάθε ιστό οργανισμού.

Το 1953, η Rosalind Franklin και ο James Goslin, στο Κολλέγιο Birbeck του Παν/μίου του Λονδίνου μπόρεσαν να πάρουν πολλές φωτογραφίες περίθλασης ινών του DNA από ακτίνες Χ. Μέχρι να αναλύσει τα αποτελέσματά της η Franklin, υποχρεώθηκε να τα περιλάβει στην έκθεση αξιολόγησης του Κέντρου Βιοφυσικής, στο οποίο εργαζόταν. Ένας από τους εξωτερικούς αξιολογητές ήταν ο διευθυντής του Εργαστηρίου Cavendish του Παν/μίου Καίμπριτζ, ο

Νομπελίστας φυσικός, Sir William Lawrence Bragg. Ο Bragg έδειξε τα αποτελέσματα των Franklin και Goslin στους James Watson και Francis Crick, οι οποίοι προσπαθούσαν να προβλέψουν τη δομή του DNA, υπολογίζοντας ότι θα έπρεπε να ήταν ελικοειδής, όπως η δομή ορισμένων πρωτεϊνών (π.χ. α-κερατίνης, που βρέθηκε 2-3 χρόνια πριν από τον μέγιστο χημικό του 20ού αιώνα, τον Linus Pauling, του Caltech). Το κοφτερό μυαλό του φυσικού Crick συνειδητοποίησε αμέσως τι είχε μπροστά του, μόλις είδε τα πειραματικά αποτελέσματα των Franklin και Goslin (Εικόνα 1):

1. Μια δομή αντιπαράλληλης διπλής έλικας με πλήρη στροφή κάθε 34 Å, και απόσταση μεταξύ των ελίκων ίση με 20 Å.
2. Μια έντονη παρουσία δομικών στοιχείων κάθε 3,4 Å, που υπέθεσε, λόγω της μεγάλης ηλεκτρονικής πυκνότητας ότι πρέπει να οφειλόταν στις αζωτούχες βάσεις (τις οποίες μέχρι τότε το δίδυμο Watson-Crick δεν λάμβανε υπ' όψιν, διότι δεν μπορούσε να κατανοήσει τι ρόλο έπαιζαν, πράγμα που δεν είναι αφ' εαυτού κακό, αφού πολλές φορές είναι ο μόνος τρόπος να κατανοήσει κανείς μέρος, τουλάχιστον, της λύσης ενός προβλήματος).

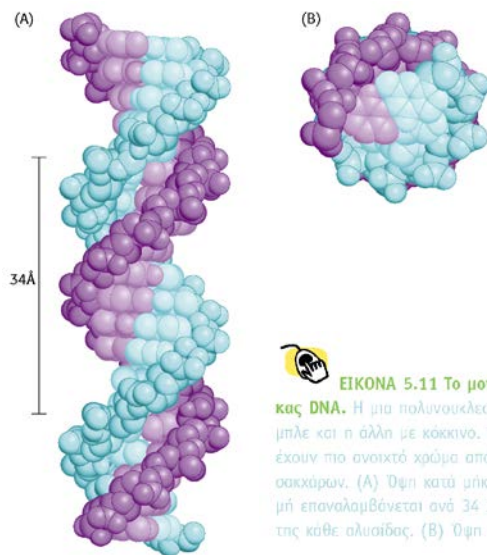
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, ΤΟΜΟΣ 1 – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ



ΕΙΚΟΝΑ 5.10 Φωτογραφία με περίθλαση ακτίνων X μιας ενυδατωμένης ίνας DNA. Το περίθλασμα σε ακτίνες X είναι χαρακτηριστικό για ελικοειδή δομή. Το έντονο τόξο στην μεσαία θέση οφείλεται από το σταθμάσμα ίσοβλικών διαγώνιων δόσεων που διακρίνεται σε απόσταση 3,4 Å μεταξύ τους. [Επιγενική προσαρμογή B. Maurice Wilkins.]

Εικόνα 1. Η κλασική φωτογραφία περίθλασης ιών ενυδατωμένου DNA, όμοια με αυτή που πήραν η Franklin και ο Goslin. Οι έντονες σκιάσεις που σχηματίζουν ένα νοητό X είναι συμβατές μόνο με μια δομή αντιπαράλληλης διπλής έλικας. Από Berg, Tymoczko, Stryer, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, 5^η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, κατόπιν άδειας.

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, ΤΟΜΟΣ 1 – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ



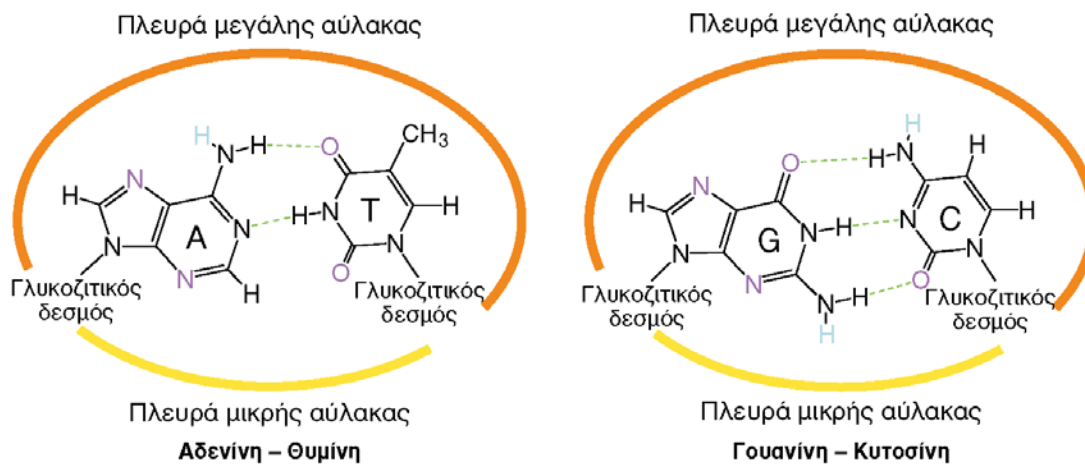
ΕΙΚΟΝΑ 5.11 Το μοντέλο Watson-Crick της διπλής έλικας DNA. Η μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα εμφανίζεται με χρώμα μπλε και η άλλη με κόκκινο. Οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης έχουν πιο ανοιχτό χρώμα από ό,τι ο κορμός των φωσφορικών και σακκάρων. (Α) Όψη κατά μήκος του άξονα της διπλής έλικας. Η δομή επαναλαμβάνεται ανά 34 Å που αντιστοιχεί σε 10 νουκλεοτίδια της κάθε αλυσίδας. (Β) Όψη εγκάρσια στον άξονα της διπλής έλικας.

Εικόνα 2. Από Berg, Tymoczko, Stryer, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, 5^η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, κατόπιν άδειας. Το κόκκινο του πρωτότυπου εδώ εμφανίζεται ως πορφυρό.

Στη συνέχεια, με κατασκευή μοριακών μοντέλων ο Watson έδειξε ότι τα ζεύγη A=T και G≡C σχημάτιζαν μεταξύ τους δεσμούς υδρογόνου (δύο και τρεις αντίστοιχα) και, (ώ του θαύματος) το άτομο άνθρακα στη κάθε βάση που ήταν συνδεδεμένο με την δεοξυριβόζη απείχε από το αντίστοιχο του της ζευγαρωμένης βάσης 20 Å (είπατε τίποτε;)! Βλ. Εικόνα 3.

Οπότε, οι Watson και Crick συνήγαγαν από τα εκπληκτικά πειραματικά ευρήματα των Franklin και Goslin ότι:

1. Η δομή του DNA, είναι μια διπλή αντιπαράλληλη έλικα η οποία αποτελείται από πολυ(φωσφοδεοξυριβοζιτικό) κορμό και μια αλληλουχία αζωτούχων βάσεων (αδενίνη (A), κυτοσίνη (C), γουανίνη (G) και θυμίνη (T)).
2. Οι βάσεις είναι συνδεδεμένες με δεοξυ-ριβόζη, και «βλέπουν» προς το εσωτερικό του κορμού, έτσι ώστε να ζευγαρώνουν οι βάσεις από τις δύο αλυσίδες πάντα ακολουθώντας τον κανόνα A=T και G≡C. Τα σύμβολα = και ≡ δηλώνουν τον σχηματισμό δύο και τριών δεσμών υδρογόνου στα αντίστοιχα ζεύγη βάσεων, όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες.



ΕΙΚΟΝΑ 27.7 Οι πλευρές της μεγάλης και της μικρής αύλακας. Επειδή οι δύο γλυκοζιτικοί δεσμοί δεν βρίσκονται ο ένας απέναντι από τον άλλον, κάθε ζεύγος βάσεων έχει μια μεγαλύτερη πλευρά η οποία ορίζει τη μεγάλη αύλακα, και μια μικρότερη πλευρά η οποία ορίζει τη μικρή αύλακα. Οι αύλακες περιέχουν δυνητικούς δότες (μπλε) και δέκτες (κόκκινο) δεσμών υδρογόνου.

Εικόνα 3. Το ζευγάρι των βάσεων στο DNA. Όπου αναγράφεται Γλυκοζιτικός δεσμός αφορά τον δεσμό N—C (N από τη βάση, C από τη δεοξυριβόζη του πολυ-φωσφο-σακχαριτικού κορμού). Για τη θέση της μικρής και μεγάλης αύλακας στο DNA, συμβουλευτείτε το σύγγραμμα Βιοχημείας που χρησιμοποιείτε. Από Berg, Tymoczko, Stryer, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, 5^η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, κατόπιν άδειας. Το κόκκινο των δοτών δεσμών υδρογόνου του πρωτότυπου εδώ εμφανίζεται ως πορφυρό.

Σε αυτό το εργαστήριο λοιπόν, θα απομονώσουμε DNA από σπέρμα (καρπό) σιταριού, και στη συνέχεια θα πιστοποιήσουμε ότι όντως αυτό έχουμε κάνει.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Αρχή της μεθόδου: Το DNA είναι παρόν σε όλα τα κύτταρα των ζωντανών οργανισμών. Το σπέρμα του σιταριού προέρχεται από τους σπόρους του σιταριού. Το «σπέρμα» είναι το έμβryo, το μέρος εκείνο του σπόρου που μπορεί να δημιουργήσει το νέο φυτό. Όταν οι σπόροι του σιταριού αλέθονται σε άσπρο αλεύρι, το σπέρμα και το πίτουρο απομακρύνονται, αφήνοντας μόνο το άμυλο.

Το DNA βρίσκεται μέσα στον πυρήνα του κυττάρου, ο οποίος περιβάλλεται από την πυρηνική μεμβράνη. Για να μπορέσει να εξαχθεί το DNA από το κύτταρο πρέπει να σπάσουν οι μεμβράνες που αποτελούνται από φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση ενός τασιενεργού (απορρυπαντικό) που μετακινεί τα λίπη και τις πρωτεΐνες, όπως ακριβώς λειτουργεί και κατά την απομάκρυνση των λεκέδων. Έτσι μπορεί να εξαχθεί το DNA από το κύτταρο. Η διαδικασία γίνεται στους 60°C. Σε αυτή την θερμοκρασία οι μεμβράνες μπορούν να διαλυθούν με τα λιπιδικά και τα λιπόφιλα πρωτεϊνικά συστατικά τους να σχηματίζουν μικύλλια με το δωδεκακυλο-θειικό νάτριο (SDS)· επίσης απενεργοποιούνται κάποια ένζυμα που μπορούν να κόψουν το DNA σε μικρότερα τμήματα και έτσι να το καταστήσουν μη ορατό. *Επειδή το DNA διαλύεται σε υδατικό διάλυμα ενώ καθίζει σε αλκοολικό διάλυμα, χρησιμοποιείται αλκοόλη για την καθίζηση του DNA.* Έτσι μπορεί να εμφανιστεί το DNA στην μεσόφαση νερού αλκοόλης.

2. Σκεύη - Όργανα

- α) γουδί και γουδοχέρι
- β) ποτήρι ζέσεως
- γ) σιφώνιο πλήρωσης
- δ) πιπέτα Pasteur
- ε) ογκομετρικός κύλινδρος
- στ) θερμόμετρο

3. Αντιδραστήρια

- α) κονιορτοποιημένο σιτάρι (όσο το δυνατόν σε πιο λεπτούς κόκκους, με γουδί και γουδοχέρι)
- β) διάλυμα απορρυπαντικού SDS 10%
- γ) αιθανόλη

4. Πορείαεργασίας

α) Κονιορτοποίηση σιταριού σε γουδί

β) Ζύγιση 1 g κονιορτοποιημένου σιταριού σε ποτήρι ζέσεως και προσθήκη 20 ml H₂O θερμοκρασίας 60-65 °C. Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος για 3 min.

γ) Προσθήκη 1 ml διαλύματος 10% SDS και το προκύπτον διάλυμα αναμιγνύεται ήπια για λίγο κάθε 1 min για 5 min. *Δεν πρέπει να σχηματιστεί αφρός.* Μετά τα 5 λεπτά απομακρύνεται με ένα σιφώνιο ή λίγο χαρτί ο αφρός που τυχόν έχει σχηματιστεί.

δ) Το ποτήρι τοποθετείται υπό γωνία και ακολουθεί προσεκτική προσθήκη 14 ml αλκοόλης στο τοίχωμα του ποτηριού. Θέλουμε να σχηματιστεί ένα στρώμα αλκοόλης στο πάνω μέρος του μίγματος νερού - σιταριού - απορρυπαντικού. Τα δύο στρώματα δεν πρέπει να αναμιχθούν. Το DNA θα εμφανιστεί στη μεσόφαση νερού-αλκοόλης. Συνεπώς είναι πολύ σημαντικό η αλκοόλη να προστεθεί αργά και προσεκτικά έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα στρώμα πάνω από το νερό. Το ποτήρι ζέσης με το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία για μερικά λεπτά. Το DNA αρχίζει να δημιουργεί ένα λευκό ινώδες ίζημα στα σημεία επαφής του νερού και της αλκοόλης. Μετά από 15 λεπτά το DNA θα επιπλέει στην πάνω επιφάνεια της αλκοόλης.

ε) Το DNA συλλέγεται με ένα σιφόνιο Pasteur και τοποθετείται σε ένα καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα. Εναλλακτικά με ένα μικροσιφόνιο με κομμένο το ρύγχος ώστε το εναιώρημα του απομονωμένου DNA να το διαπερνά εύκολα. Στη συνέχεια προστίθενται στον δοκιμαστικό σωλήνα 10 mL καθαρού απεσταγμένου νερού.

στ) Σε άλλους 4 δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούμε από 3 mL απεσταγμένου νερού και πραγματοποιούμε διαδοχικές αραιώσεις 1/4 βάζοντας στον πρώτο σωλήνα 1 mL από το αρχικό εναιώρημα DNA και εναιωρώντας καλά, στη συνέχεια μεταφέροντας 1 mL από τον πρώτο σωλήνα στον δεύτερο, επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία και μεταφέροντας 1 mL από τον δεύτερο σωλήνα στον τρίτο κ.ο.κ.

ζ) Μετράμε την απορροφητικότητα των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους στα 260 και στα 280 nm μέσω μιας κυψελίδας χαλαζία. **Προσοχή! Οι κυψελίδες χαλαζία είναι πολύ ακριβές! Μην σπάσουν!**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. John Clark, Robert Switzer. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ. Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992, 2^η εκτύπωση, 2001.
2. ΙΓ Γεωργιάτσου, Δ. Κυριακίδης, Τ. Γιουψάνης, κ.ά. Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας. Εκδόσεις Ζήτη. Θεσσαλονίκη, 2004.
3. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, 5^η έκδοση, Α τόμος, Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2004. Κεφ. 5 , Δομή των νουκλεϊκών οξέων DNA, RNA, Σχηματισμός της διπλής έλικας του DNA.
Βλέπε και διαδικτυακό τόπο του βιβλίου www.whfreeman.com/Berg7e/. Προσεχώς κυκλοφορεί η 7^η έκδοση.
4. Διαμαντίδη Γρ., ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, 3^η έκδοση, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 2007/2010.
5. Campbell NA, Reece JB. *Βιολογία*, τόμος Ι. 8^η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2010.
6. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/ribosomes-transcription-and-translation-14120660>. Δικτυακός τόπος του διάσημου περιοδικού Nature όπου πολύ απλοϊκά παρατίθενται μερικές από τις βασικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν το DNA και το RNA.
7. Δυστυχώς, δεν υπάρχει ακόμη στην Ελληνική βιβλιογραφία μια αξιόπιστη περιγραφή της ιστορίας της ανακάλυψης του DNA. Τα βιβλία των Watson, *Η διπλή έλικα*, και του Crick, *Η διπλή έλικα και εγώ* (και τα δύο από τις Εκδόσεις Κάτοπτρο) παρουσιάζουν τα γεγονότα από την οπτική γωνία των συγκεκριμένων

επιστημόνων-συγγραφέων. Οι επιστημονικές εξηγήσεις του Crick για τη διπλή έλικα είναι μοναδικές. Για τον Avery το καλύτερο βιβλίο είναι από τον μαθητή του Rene Dubos: *The professor, the institute and DNA*, Rockefeller University Press, 1979. Ο Chargaff περιγράφεται καλύτερα από τον εαυτό του στην αυτοβιογραφία του *Heraclitean Fire*, Paul & Co Pub Consortium; First Edition, New York, 1978. Πολύ καλό βιβλίο ιστορίας της επιστήμης είναι του Robert Olby, *The path to the double helix*, 1977. Από το 2012 σε έκδοση Dover. Την ακεραιότητα της επιστημονικής εργασίας της Rosalind Franklin υπερασπίστηκε ο επίσης βιοφυσικός, συνεργάτης της και κάτοχος βραβείου Νομπέλ Aaron Klug. Οι σχετικές εργασίες του είναι δυστυχώς μόνο στα Αγγλικά, και δεν έχουν μεταφραστεί.

Ερωτήσεις

- 1) Γιατί στο παραπάνω πείραμα η αλκοόλη προστίθεται αργά ;
- 2) Γιατί μετράμε την απορρόφηση του δείγματος DNA στα 280 nm και στα 260 nm; Τι σηματοδοτεί η απορρόφηση στο κάθε μήκος κύματος;
- 3) Για ποιο λόγο στο 4ζ. χρησιμοποιούμε κυψελίδα χαλαζία για τις μετρήσεις στα 260 και 280 nm, και όχι πλαστική ή γυάλινη κυψελίδα;
- 4) Γιατί στο 4γ. δεν θέλουμε να σχηματιστεί αφρός;

Περαιτέρω θέματα.

Κοιτάξτε το βιβλίο Βιολογίας που είχατε το προηγούμενο εξάμηνο για να βρείτε φωτογραφίες χρωμοσωμάτων και μοντέλα της δομής του DNA σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες (δηλ. νουκλεοσώματα), στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Συνειδητοποιείτε πόσο σφιχτά πακεταρισμένο είναι το DNA στον πυρήνα του κυττάρου. Καταλαβαίνετε τώρα γιατί σας ζητήσαμε να φέρετε μια κουβαρίστρα με κλωστή στο μάθημα; Ένας πολύ καλός τρόπος να κατανοήσετε το DNA ως διπλή έλικα είναι να το δείτε σε τριδιάστατη μοριακή απεικόνιση, π.χ. μέσω του προγράμματος DSViewerPro της Accelrys.