ΑΚΡΩΣ ΑΠΟΡΡΗΤΟ
Περιορισμένη Πρόσβαση
σε εξουσιοδοτημένους
αξιωματικούς
C.S.I. Βρυξέλλες

ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ

DNA

C.S.I. BRUSSELS SUPERVISORS:

LUC LEYNS

ROBERT FINSY

MARIJKE HENDRICKX

C.S.I. Brussels **SPECIAL ASSISTANTS:**

TIM SIERENS

ANJA VAN GEERT

AMAIA MARCILLA

DIANE SORGELOOS

Αποστολή Ι: Τμήμα Εξιχνίαση Εγκλημάτων (Crime Investigation Scene – CSI) – Αποτύπωμα DNA .

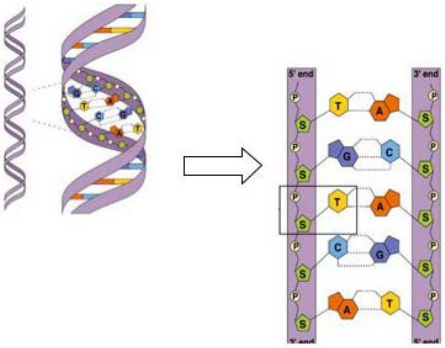
Απαραίτητες γνώσεις:

Η Δομή του DNA

Τα χαρακτηριστικά όλων των ζωντανών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, καθορίζονται κυρίως από την πληροφορία που περιέχεται στο DNA, το οποίο κληρονομούν από τους γονείς τους. Η μοριακή δομή του DNA μπορεί να αναπαρασταθεί σαν ένα φερμουάρ του οποίου κάθε δόντι αντιστοιχεί σε ένα από τα τέσσερα γράμματα (A, C, G, ή T), με τέτοιο τρόπο ώστε δύο αντικριστά δόντια (ένα από κάθε πλευρά) να σχηματίζουν ένα από τα ζευγάρια: A-T ή G-C (= ένα ζευγάρι βάσεων). Τα γράμματα A, C, G, και T αντιστοιχούν στην αδενίνη, την κυτοσίνη, την γουανίνη και την θυμίνη, τις βασικές δομικές μονάδες του DNA.
Η πληροφορία που περιέχεται στο DNA προσδιορίζεται κυρίως από την αλληλουχία των γραμμάτων κατά μήκος του φερμουάρ. Τα χαρακτηριστικά ενός ανθρώπου είναι σε μεγάλο βαθμό αποτέλεσμα της πληροφορίας που περιέχεται στο κώδικα του DNA.
Οι ζωντανοί οργανισμοί που είναι διαφορετικοί ή έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, έχουν επίσης διαφορετικές αλληλουχίες βάσεων στο DNA τους. Όσο πιο μεγάλη είναι η ποικιλία των οργανισμών, τόσο μεγάλη είναι και η ποικιλία στις αλληλουχίες βάσεων του DNA.

Η διπλή έλικα του DNA μπορεί να αναπαρασταθεί ως εξής:

(Α΄ Αλυσίδα) 5′CCACTCATATTTTCTTCAATGTCAA3′
(Συμπληρωματική Αλυσίδα)3′GGTGAGTATAAAAGAAGTTACAGTT5′



Τμήμα Εξιχνίασης Εγκλημάτων ΕΜΠΙΣΤΕΥΤΙΚΟ

Αποτύπωμα DNA (Ταυτοποίηση DNA)

Όπως τα δακτυλικά αποτυπώματα, που χρησιμοποιούνται από την Αστυνομία από τη δεκαετία του 1930, κάθε άτομο διαθέτει ένα μοναδικό αποτύπωμα DNA. Σε αντίθεση με τα δακτυλικά αποτυπώματα που βρίσκονται μόνο στις άκρες των δακτύλων και μπορούν να αλλάξουν μόνο με χειρουργική επέμβαση, το αποτύπωμα DNA είναι το ίδιο για κάθε κύτταρο, ιστό και όργανο του ανθρώπου. Το DNA δεν μπορεί να αλλάξει με οποιαδήποτε γνωστή διαδικασία. Συμπερασματικά, το αποτύπωμα DNA έγινε πολύ γρήγορα η κύρια μέθοδος ταυτοποίησης για τους ανθρώπους. Η μέθοδος αποτυπώματος DNA είναι ένας πολύ γρήγορος τρόπος για να συγκρίνει, κανείς, τις αλληλουχίες βάσεων από δύο ζωντανούς οργανισμούς.

Το αποτύπωμα DNA, χρησιμοποιεί τμήματα DNA που εμφανίζουν ποικιλομορφία (που έχει προκληθεί από μεταλλάξεις) στην αλληλουχία των βάσεων των νουκλεοτιδίων από άτομο σε άτομο. Όταν αυτά τα τμήματα του DNA κόβονται σε κομμάτια, χρησιμοποιώντας περιοριστικά ένζυμα (περιοριστικές ενδονουκλεάσες), παράγονται τμήματα DNA διαφορετικού μήκους. Αν το DNA ενός ατόμου έχει μεταλλάξεις σε θέσεις αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα, το DNA δεν θα κοπεί σε αυτές τις θέσεις και τα τμήματα που θα προκύψουν θα είναι διαφορετικού μήκους από αυτά που θα προκύψουν κόβοντας, με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα, ένα DNA διαφορετικού ατόμου (που δεν έχει μεταλλάξεις).
Όταν τα τμήματα DNA ενός ατόμου διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, προκύπτει ένας μοναδικός συνδυασμός ζωνών (bands). Οι ζώνες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση ενός ατόμου.

Τεχνική υποστήριξη της διαδικασίας του αποτυπώματος DNA

1: Δομή του DNA.

Μέση σχετική μοριακή μάζα (μοριακό βάρος) ενός νουκλεοτιδίου: 330 Daltons
1pmol από 1 KB βάσεων (1 KB -Kilobases =1000 ζεύγη βάσεων (BP - base pairs)) ενός τμήματος DNA (δίκλωνο): 0,66μg
$N_A = 6{,}02 \times 10^{23}\ mol^{-1}$

2: Κόβοντας το DNA.

Ειδικά ένζυμα που ονομάζονται περιοριστικά, χρησιμοποιούνται για να κόψουν το DNA σε συγκεκριμένες περιοχές (θέσεις) του μορίου. Ένα περιοριστικό ένζυμο αναγνωρίζει και κόβει το DNA μόνο σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων.
Εάν αυτή η αλληλουχία νουκλοετιδίων υπάρχει 3 φορές σε ένα γραμμικό μόριο DNA, τότε τα τμήματα που προκύπτουν από τη δράση του περιοριστικού ενζύμου στο μόριο αυτό, θα είναι 4, καθένα από τα οποία θα έχει συγκεκριμένο (ορισμένο) μήκος. Τα περισσότερα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν παλίνδρομες αλληλουχίες. Παλίνδρομη αλληλουχία συνήθως ονομάζουμε την αλληλουχία γραμμάτων μιας λέξης που διαβάζεται το ίδιο και από αριστερά προς τα δεξιά και από δεξιά προς τα αριστερά (παράδειγμα: το όνομα Leon Noel). Στο μόριο του DNA μια παλίνδρομη αλληλουχία έχει ένα διαφορετικό νόημα γιατί το DNA είναι ένα δίκλωνο μόριο. Για παράδειγμα η θέση αναγνώρισης από ένα περιοριστικό ένζυμο που ονομάζεται *EcoR1* είναι η παλίνδρομη αλληλουχία:
5'GAATTC3'
3'CTTAAG5'
Η αλληλουχία του ενός κλώνου (της μιας αλυσίδας) είναι ίδια με την αλληλουχία του «αντίστροφου συμπληρωματικού κλώνου». Αυτό σημαίνει ότι η αλληλουχία του συμπληρωματικού κλώνου αν διαβαστεί ανάποδα είναι ίδια, με την αλληλουχία του αρχικού κλώνου.

Το ένζυμο *Afl*III, που θα χρησιμοποιήσετε για την ανάλυση, αναγνωρίζει την παλίνδρομη αλληλουχία:

```
5'ACRYGT3'
3'TGYRCA5'
```

Το R και το Y σημαίνουν ότι το ένζυμο αναγνωρίζει διάφορες βάσεις στη θέση αυτή: το R μπορεί να είναι είτε A είτε G, ενώ το Y μπορεί να είναι είτε C είτε T.

3: Διαχωρισμός και ταξινόμηση ως προς το μέγεθος των τμημάτων DNA: Ηλεκτροφόρηση σε ζελέ (gel).

Τα τμήματα DNA που λαμβάνονται μετά τη δράση των περιοριστικών ενζύμων μπορούν να διαχωριστούν με βάση το μέγεθός τους, μέσω μιας τεχνικής διαχωρισμού, που ονομάζεται ηλεκτροφόρηση. Τα τμήματα DNA κινούνται μέσα σε ένα ζελέ αγαρόζης που προέρχεται από φύκια (ζελατινοειδές προϊόν). Το ζελέ μπορεί να παρομοιαστεί με ένα μεγάλο κόσκινο του οποίου οι πόροι γίνονται ολοένα και μικρότεροι από την μία του άκρη (αρχή) μέχρι την άλλη (τέλος). Το ηλεκτρικό ρεύμα (η ηλεκτρική τάση) που εφαρμόζεται στο ζελέ, οδηγεί το τμήματα του DNA. Αυτό σημαίνει ότι τα μικρότερα τμήματα θα διανύσουν μεγαλύτερη απόσταση στο ζελέ από ότι τα μεγαλύτερα, τα οποία θα κολλήσουν σε συγκεκριμένη θέση στο ζελέ (κόσκινο) καθώς δεν θα μπορούν να κινηθούν πια μέσα από τους πόρους του.
Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, τα τμήματα DNA που διαχωρίστηκαν στο ζελέ μπορούν να γίνουν ορατά με τη χρήση μια φθορίζουσας χρωστικής, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA. Η χρωστική αυτή προστίθεται στο ζελέ πριν αυτό φτιαχτεί και χρησιμοποιηθεί, αλλά η παρουσία της γίνεται ορατή μόνο αν παρατηρήσει κανείς το ζελέ κάτω από UV (υπεριώδη) ακτινοβολία. Για το λόγο αυτό μετά το τελος της ηλεκτροφόρησης των διαφόρων δειγμάτων στο ζελέ, αυτό πρέπει να τοποθετηθεί σε μια τράπεζα έκθεσης UV (UV transilluminator) ώστε να γίνει εφικτή η παρατήρηση των διαφόρων τμημάτων DNA σαν ζώνες (bands) πάνω στο ζελέ. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να δημιουργηθεί ένα προφίλ διαχωρισμού ενός συγκεκριμένου δείγματος DNA.

Τμήμα Εξιχνιάσεων Εγκλημάτων Ελληνικής Αστυνομίας

Οργάνωση και χρονοδιάγραμμα της εργασίας.

Χρόνος (λεπτά)	**Ενέργειες**
0 – 30’	Διαβάστε τις οδηγίες και οργανώστε την ομάδά σας για αποτελεσματική εργασία. Προτείνουμε ένα μέλος της ομάδας να ασχοληθεί με τον χημικό έλεγχο των παρτίδων, ένα μέλος να αρχίσει τη διαδικασία αποτυπώματος DNA και το τρίτο μέλος θα μπορούσε να συντονίσει τις προσπάθειες και να αναλύσει τα αποτελέσματα.
30’- 45’	Εξασκηθείτε στη χρήση της μικροπιπέτας (μικροσιφώνιο). Χρησιμοποιήστε το πορτοκαλί διάλυμα για να πάρετε λίγα μικρολίτρα (μL) και να τα τοποθετήσετε στο πυθμένα ενός δοκιμαστικού σωλήνα μικρού όγκου (eppendorf tube). Επαναλάβατε μερικές φορές μέχρι να νιώσετε ικανοί να χειριστείτε μικρούς όγκους χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα και δοκιμάστε να προσθέσετε διαδοχικά λίγα μικρολίτρα στο πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα. Για παράδειγμα: μπορείτε να προσθέσετε διαδοχικά 4+3+2+1 μικρολίτρα στον ίδιο σωλήνα? Ελέγξτε αν ο τελικός όγκος είναι 10 μικρολίτρα. (συμβουλευτείτε τις εικονογραφημένες οδηγίες – visual guide)
45’-1h15	Πραγματοποιήστε τις αντιδράσεις περιορισμού (με τα περιοριστικά ένζυμα) στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Βλέπε το πρωτόκολλο 1.1.
1h15-2h	Τοποθετήστε τα επτά δείγματα σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C. Κατά τη διάρκεια αυτών των 45 λεπτών, το ένζυμο θα κόψει το DNA. Κατά τη διάρκεια της επώασης, μπορείτε να απλώσετε το ζελέ ηλεκτροφόρησης (Προσοχή! Χρησιμοποιήστε γάντια). Βλέπε πρωτόκολλο 1.2. (Συμβουλευτείτε τις εικονογραφημένες οδηγίες – visual guide). Εξασκηθείτε στο φόρτωμα του ζελέ εξάσκησης που σας δόθηκε (διαβάστε το πρωτόκολλο 1.3). Χρησιμοποιήστε το πορτοκαλί διάλυμα. Θα πρέπει να μπορείτε να φορτώσετε 10 μικρολίτρα σε μια θέση φόρτωσης (πηγαδάκι) του ζελέ (η πυκνότητα του διαλύματος έχει ρυθμιστεί έτσι ώστε να «κυλήσει» μέσα στη θέση φόρτωσης (πηγαδάκι), επομένως απλά αδειάστε αργά το περιεχόμενο της μικροπιπέτας στην κορυφή ή λίγο επάνω από τη θέση φόρτωσης). Σιγουρευτείτε ότι όλη η ποσότητα μπήκε στο θέση φόρτωσης χωρίς να έχουν δημιουργηθεί φυσαλίδες.
2h-2h30	Προετοιμάστε τα δείγματά σας και φορτώστε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Προσοχή! Χρησιμοποιήστε γάντια). Βλέπε Πρωτόκολλο 1.3 (συμβουλευτείτε τις εικονογραφημένες οδηγίες – visual guide)
2h30-3h00	«Τρέξτε» την ηλεκτρόφορηση στο ζελέ (αυτή η διαδικασία θα πραγματοποιηθεί για σας από ένα ειδικευμένο βοηθό της CSI). Όση ώρα τρέχει η ηλεκτροφόρηση έχετε το χρόνο να απαντήσετε στις ερωτήσεις.
3h00-3h15	Απομακρύνετε το ζελέ σας από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Προσοχή! Χρησιμοποιήστε γάντια) και τραβήξτε φωτογραφία του ζελέ σας (αυτή η διαδικασία θα πραγματοποιηθεί για σας από ένα ειδικευμένο βοηθό της CSI) Προσοχή! Φορέστε τα ειδικά γυαλιά για να παρατηρήσετε το ζελέ σας κάτω από UV ακτινοβολία.
3h30-4h	Αναλύστε τα αποτελέσματά σας και απαντήστε στις ερωτήσεις.

Τύπος εκπαιδευτικού υλικού

Πρωτόκολλο 1.1. Πραγματοποίηση των αντιδράσεων περιορισμού (με τα ένζυμα περιορισμού) του DNA

Για κάθε δείγμα DNA πρέπει να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση περιορισμού (με τα ένζυμα περιορισμού) με την **εξής σειρά:**

1) Νερό (x μικρολίτρα που πρέπει να υπολογιστούν έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10 μικρολίτρα)
2) Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) (πρέπει να αραιωθεί 5 φορές στον τελικό όγκο αντίδρασης)
3) DNA (χρησιμοποιήστε 2 μικρολίτρα, αλλά θυμηθείτε να υπολογίσετε αργότερα τη ακριβή συγκέντρωση)
4) Περιοριστικά ένζυμα (χρησιμοποιήστε 2 μικρολίτρα).

Μπορείτε να χρησιμοποιήσετε μόνο μια μικροπιπέτα, αλλά θα πρέπει να την ξεπλένετε με νερό μετά από κάθε χρήση (αρκεί να αναρροφήσετε (πάρετε) 10 μικρολίτρα νερό και να τα αδειάσετε από την πιπέτα).
Αναμίξτε απαλά χρησιμοποιώντας την μικροπιπέτα (μην δημιουργήσετε φυσαλίδες).
Επωάστε τα δείγματά σας, τοποθετώντας τα στηρίγματα με τους σωλήνες στον επωαστικό κλίβανο στους 37° C.

ΣΥΜΒΟΥΛΕΣ:

- Τοποθετήστε το νερό που θα χρησιμοποιήσετε για το ξέπλυμα της μικροπιπέτας σε ένα ξεχωριστό σωλήνα, έτσι ώστε να μην μολύνετε το νερό που θα χρησιμοποιήσετε στις αντιδράσεις με τα περιοριστικά ένζυμα.
- Μην ξεχάσετε να κλείσετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες πριν τους επωάσετε.

Πρωτόκολο 1.2. Απλώνοντας το ζελέ ηλεκτροφόρησης (συμβουλευτείτε τις εικονογραφημένες οδηγίες – visual guide)

Προσοχή! Το ζελέ αγαρόζης και το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) περιέχουν μια πολύ μικρή ποσότητα μια μεταλλαξογόνου ουσίας (Ethidium bromide). Φορέστε γάντια όταν δουλέψετε με αυτά και σκουπίστε κάθε λεκέ ή σταγόνα.
Σε περίπτωση που πιτσιλίσετε, απευθυνθείτε αμέσως στον πλησιέστερο βοηθό CSI.

Πρέπει να απλώσετε περίπου 9 milliliters (mL) ζεστού διαλύματος αγαρόζης πάνω σε μία από τις γυάλινες πλάκες, όπου και θα στερεοποιηθεί. Για να το πετύχετε αυτό:

1) Τοποθετήστε την γυάλινη πλάκα σε μια επίπεδη επιφάνεια.
2) Εφαρμόστε το πλαστικό χτενάκι στα δύο κροκοδειλάκια (κλιπ) και τοποθετήστε το στην κορυφή της πλάκας, παράλληλα προς τη μικρότερη πλευρά της, περίπου 8-10 mm από την άκρη της. Το χτενάκι πρέπει να είναι κάθετο προς την μακριά πλευρά της γυάλινης πλάκας. Όλα τα 7 δόντια από το χτενάκι πρέπει να είναι πάνω από την γυάλινη πλάκα (να μην ακουμπάει σ' αυτήν). Αυτό θα επιτρέψει το σχηματισμό 7 θέσεων φόρτωσης (πηγαδάκια) στις οποίες θα φορτώσετε αργότερα τα δείγματά σας (DNA).
3) Εισάγετε τις τρεις μικρές κάρτες μεταξύ της γυάλινης πλάκας και στο χτενάκι για να δημιουργηθεί μια μικρή απόσταση.
4) Απομακρύνετε την κάρτα, αφήνοντας ανέπαφη τη διάταξη.
5) Φορέστε γάντια
6) Πάρτε το σωλήνα με την αγαρόζη από τον βοηθό CSI. Περιέχει περίπου 25 ml ζεστής λιωμένης αγαρόζης. Σημείωση: μην πάρετε την αγαρόζη νωρίς (πριν να είστε έτοιμοι) γιατί θα στερεοποιηθεί σε περίπου 5 λεπτά. Εάν πάρετε την αγαρόζη από το υδατόλουτρο, δεν μπορείτε πια να την επιστρέψετε.

Τμήμα Εξιχνίασης Εγκλημάτων Εμπιστευτικό

7) Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα Pasteur για να αναρροφήσετε την αγαρόζη από το σωλήνα και να την απλώσετε στην γυάλινη πλάκα. Η αγαρόζη δεν πρέπει να χυθεί από την πλάκα. Θα χρησιμοποιήσετε 9 ml αγαρόζης για ένα ζελέ. Για να έχετε επιτυχία, πρέπει να απλώσετε την αγαρόζη αργά με την πιπέτα, πολύ κοντά στην γυάλινη πλάκα, να κινείτε την πιπέτα καθώς απλώνετε την αγαρόζη. Μην δημιουργήσετε φυσαλίδες και προσέξτε να μην στάξουν «σταγόνες αγαρόζης» στην πλάκα. Ξεκινήστε δίπλα από το χτενάκι. (Η αγαρόζη πρέπει να δημιουργήσει ένα στρώμα ομοιόμορφου πάχους (εκτελέστε σχετικά γρήγορα). Μην φτιάξετε διαδοχικά στρώματα ζελέ, το ένα πάνω στο άλλο.
8) Αφήστε το ζελέ να στερεοποιηθεί. Θα χρειαστούν περίπου 10 λεπτά, ώστε το ζελέ αγαρόζης να γίνει ημιδιαφανές κι όχι διαφανές.
9) Πριν πάτε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, απομακρύνετε το χτενάκι τραβώντας το απλά προς τα πάνω.
10) Εάν μετακινήσετε το ζελέ σας (για να πάτε για ηλεκτροφόρηση): Αφήστε το πάνω στη γυάλινη πλάκα! (μην πέσει το ζελέ από την πλάκα)

Ένα ζελέ είναι αρκετό, αλλά έχετε προμηθευθεί με αρκετή αγαρόζη για ένα ακόμη ζελέ σε περίπτωση που έχετε προβλήματα με το πρώτο. Σημειώστε ωστόσο ότι αυτό θα στερεοποιηθεί μέσα στο σωλήνα.

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΕΠΙΛΟΓΕΣ:

- **Αν αντιμετωπίσετε πρόβλημα απλώνοντας το ζελέ μπορείτε να ζητήσετε από τους επιβλέποντες ένα έτοιμο ζελέ για να μπορέσετε να ολοκληρώσετε το πείραμα. Σημειώστε πάντως ότι αυτό θα σας κοστίσει 16,6 % των μονάδων!!!**
- **Σε περίπτωση που η αγαρόζη στερεοποιηθεί και θέλετε να προσπαθήσετε ακόμη μια φορά για να φτιάξετε το ζελέ, μπορείτε να ζητήσετε ένα νέο σωλήνα λιωμένου ζελέ. Αυτό θα σας κοστίσει 6,6 % των μονάδων.**

Εικονογραφημένες Οδηγίες - Visual guide: δέστε την ξεχωριστή σελίδα που βρίσκεται στο τραπέζι.

Εικόνα 1: Χρήση της μικροπιπέτας
Εικόνα 2-4: φτιάχνοντας το ζελέ ηλεκτροφόρησης
Εικόνα 5: φορτώνοντας το ζελέ.

Τμήμα Εξιχνίασης Εγκλημάτων ΕΜΠΙΣΤΕΥΤΙΚΟ

Πρωτόκολλο 1.3. Προετοιμασία δειγμάτων και φόρτωμα της ηλεκτροφόρησης σε ζελέ.

Μετά τα 45 λεπτά της επώασης, βγάλτε τα δείγματα από τον επωαστικό κλίβανο. Προσθέστε 1 μικρολίτρο του διαλύματος φόρτωσης του ζελέ (gel loading solution) σε κάθε δείγμα και ανακατέψτε καλά. Πηγαίνετε με τα δείγματα των αντιδράσεών σας και με το ζελέ σας που βρίσκεται πάνω στη γυάλινη πλάκα (γάντια!) στο τραπέζι ηλεκτροφόρησης και ζητήστε τη βοήθεια του βοηθού.

Ο βοηθός θα σας υποδείξει σε ποιο κουτί (συσκευή ηλεκτροφόρησης) να βάλετε το ζελέ σας. Τοποθετήστε το ζελέ σας, μαζί με τη γυάλινη πλάκα, κάθετα στα ηλεκτρόδια. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) θα πρέπει να φτάσει μερικά χιλιοστά πάνω από το ζελέ και τις θέσεις φόρτωσης (πηγαδάκια).

Φορτώστε τα δείγματα χρησιμοποιώντας την μικροπιπέτα. Πρέπει να φορτώσετε με την εξής σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: DNA από τη σκηνή του εγκλήματος και μετά το DNA από τους υπόπτους 1 έως 6.

Ενημερώστε το βοηθό για να ξεκινήσει την ηλεκτροφόρηση για σας.

Περιμένετε να ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, μέχρι δηλαδή η μπλε χρωστική να φτάσει στην άκρη του ζελέ, χωρίς όμως να τρέξει απ' έξω. Αυτό το στάδιο δεν θα διαρκέσει πάνω από 30 λεπτά.

Όταν τελειώσει αυτό το στάδιο, ενημερώστε το βοηθό για να συνεχίστε στο σταθμό UV.
Βγάλτε το ζελέ από τη γυάλινη πλάκα, τοποθετήστε το πάνω στη τράπεζα έκθεσης στην UV και φορέστε τα ειδικά γυαλιά. Μπορείτε να κοιτάξετε για λίγο το ζελέ. Ο βοηθός θα βγάλει μια φωτογραφία Polaroid και θα σας την δώσει. Πάρτε το ζελέ και τοποθετήστε το πίσω στη γυάλινη πλάκα (φέρτε τη πίσω στη θέση εργασίας σας και κρατήστε την εκεί για την περίπτωση που δεν πετύχει η φωτογράφηση).

Περιμένετε περίπου 1 λεπτό πριν «ανοίξετε» τη φωτογραφία.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Προσέξτε όταν φορτώνετε το ζελέ (που βρίσκεται πάνω στη γυάλινη πλάκα) στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Θα πρέπει να μοιρασθείτε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με μια άλλη ομάδα. Το δικό σας ζελέ θα είναι στο ένα άκρο της συσκευής και αυτό της άλλης ομάδας θα είναι στο άλλο άκρο. Εάν ενοχλήσετε (πειράξετε) το ζελέ της άλλης ομάδας και κινδυνέψει η δουλειά της, η ομάδα σας αυτόματα θα ακυρωθεί.

ΦΥΛΛΟ ΑΠΑΝΤΗΣΕΩΝ
ΟΜΑΔΑ:

Ε1: Στην αλληλουχία βάσεων που ακολουθεί: πόσες θέσεις αναγνώρισης (κοπής) από το ένζυμο *Afl*III μπορείτε να εντοπίσετε; Κυκλώστε τις θέσεις πάνω στην αλληλουχία βάσεων.
Α1: Αριθμός θέσεων αναγνώρισης = ___

5′GCAGAGAACATGTCGAAGCGGCTCCTCTGAATGTACACCCTGGGATGTACAGTCAGAAGGCGGC
TCGCCCGGCGCTGGAGGAGCGAGCTAAGAGCAGTGGGGACGCGTGTACAAGATCAAAGAGGAGCAC
TTAAGGGACACGTCGCAGACAGGGCAGCCACGCGTGAATTCTGCCGG3′

Q2: Στην παραπάνω αλληλουχία, πόσα διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα, εκτός του AflIII κόβουν την συγκεκριμένη αλληλουχία? Λάβετε υπόψη μόνο τα ένζυμα που αναγνωρίζουν παλίνδρομες αλληλουχίες που αποτελούνται από 6 – ζεύγη βάσεων. Υπογραμμίστε όλες τις θέσεις που βρήκατε.
Α2: Αριθμός θέσεων αναγνώρισης από άλλα ένζυμα = ___

Q3: Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, προς ποιο ηλεκτρόδιο μετακινείται το DNA; (κυκλώστε τη σωστή απάντηση (-εις))
Α3: + ηλεκτρόδιο Ή – ηλεκτρόδιο

Q4: Γιατί το DNA μετακινείται προς αυτό το ηλεκτρόδιο; (κυκλώστε τη σωστή απάντηση (-εις))
Α4: Είναι βάση
Είναι οξύ
Είναι ένα πολύπλοκο βιολογικό μόριο
Είναι θετικά φορτισμένο
Είναι αρνητικά φορτισμένο
Είναι λιπίδιο
Είναι ένα πολύ μεγάλου μήκους πολυμερές

Q5: Ποιος ήταν παρών στη σκηνή εγκλήματος (δολοφόνος); (κυκλώστε τη σωστή απάντηση (-εις))
Α5: Ο ύποπτος 1
Ο ύποπτος 2
Ο ύποπτος 3
Ο ύποπτος 4
Ο ύποπτος 5
Ο ύποπτος 6
Κανείς από αυτούς

ΤΜΗΜΑ ΕΞΙΧΝΙΑΣΗΣ ΕΓΚΛΗΜΑΤΩΝ

ΦΥΛΛΟ ΑΠΑΝΤΗΣΕΩΝ
ΟΜΑΔΑ:

Q6: Τοποθετήστε τη φωτογραφία του ζελέ σας μέσα στο πλαίσιο και σημειώστε των αριθμό των ζωνών (bands) που παρατηρείτε για κάθε δείγμα.

A6:

Δείγμα	Αριθμός Ζωνών
DNA Σκηνής Εγκλήματος	
Ύποπτος 1	
Ύποπτος 2	
Ύποπτος 3	
Ύποπτος 4	
Ύποπτος 5	
Ύποπτος 6	

Q7: Συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα προσδιορίζοντας τον αριθμό των μικρολίτρων που χρησιμοποιήσατε για να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις.
A7:

DNA	
Ρυθμιστικό Διάλυμα	
Νερό	
Ένζυμο	
Σύνολο	

Q8: Εξαιτίας του επείγοντος χαρακτήρα της αποστολής, δεν είχατε χρόνο να υπολογίσετε ακριβώς τη ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται στην αντίδραση. Παρακαλούμε υπολογίστε τώρα τα ακόλουθα:

A8: Συμπληρώστε τον πίνακα με την ποσότητα των μικρογραμμαρίων DNA που χρησιμοποιήσατε για τις διάφορες αντιδράσεις κατάτμησης των δειγμάτων DNA των υπόπτων, γνωρίζοντας ότι το μέσο μήκος 1 μορίου DNA ήταν 10 000 ζεύγη βάσεων και ότι οι συγκεντρώσεις των διαφόρων δειγμάτων είναι:

Δείγμα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Συγκέντρωση	500 ng/μl	$6,49 \times 10^{-8}$ M	$7,57 \times 10^{-2}$ pmole/μl	$6,01 \times 10^{-10}$ kg/μl	0,42 g/l	81,4 nM
Ποσότητα (μg)						

ΦΥΛΛΟ ΑΠΑΝΤΗΣΕΩΝ
ΟΜΑΔΑ:

Q9: Πόσα μόρια DNA ήταν παρόντα στην αντίδραση κατάτμησης, γνωρίζοντας ότι το DNA από τη σκηνή εγκλήματος είχε συγκέντρωση 0,5 μικρογραμμάρια ανά μικρολίτρο και ότι το μήκος ήταν 10 724 ζεύγη βάσεων

A9 = _____ μόρια DNA

Q10: Γνωρίζοντας ότι η συγκέντρωση του περιοριστικού ενζύμου AflIII που χρησιμοποιήσατε είναι 1,5 units ανά μικρολίτρο, όπου 1 unit αντιστοιχεί στην απαιτούμενη ποσότητα ενζύμου για να κοπεί μία φορά 1 μικρογραμμάριο DNA σε μία ώρα και ότι τοποθετήσατε 1,0 μικρογραμμάριο γραμμικού DNA από τη σκηνή εγκλήματος, ποιος είναι ο ελάχιστος αριθμός μικρολίτρων ενζύμου που θα χρησιμοποιούσατε για να σιγουρευτείτε ότι το DNA έχει κοπεί πλήρως;

A10 = _____ μικρολίτρα

Τμήμα Εξιχνίασης Εγκλημάτων
ΕΜΠΙΣΤΕΥΤΙΚΟ