# ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Παρουσίαση 4

*Μπράλιου Γεωργία*

# Παρουσίαση 4

## ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

a. Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων
b. **Περιοριστικά ένζυμα (ενδονουκλεάσες)**
c. Δημιουργία ανασυνδυασμένων τμημάτων
d. **Συμπληρωματικό DNA (cDNA)**
e. Κλωνοποίηση γονιδίου
f. Γονιδιωματικές βιβλιοθήκες
g. Μοριακός υβριδισμός
h. Αποτύπωση κατά **Southern & Northern**
i. **Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR**
j. Προσδιορισμός αλληλουχίας DNA

# α. Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων

- Χρήσιμες για περιπτώσεις στις οποίες τα κύτταρα δεν μπορούν να μελετηθούν στα πλαίσια του οργανισμού
- Τεχνικές απομόνωσης
- Τεχνικές καλλιέργειας

# Δυσκολίες στην καλλιέργεια

- Τα περισσότερα είδη ανθρώπινων κυττάρων, αν καλλιεργηθούν εμφανίζουν κάποιες από τις ιδιότητες τους (μυϊκά-> ίνες, νευρικά-> νευράξονες, συνδετικού ιστού-> κολλαγόνο, κλπ)
- Παρ' όλα αυτά, οι καλλιέργειες δεν διατηρούνται για πολλές γενιές (25-40)

# Συνέχεια…

- Στα περισσότερα κύτταρα δεν εκφράζεται το γονίδιο της τελομεράσης
- Σε διαδοχικές διαιρέσεις τα άκρα των χρωμοσωμάτων δεν αναπαράγονται με ακρίβεια
- Μετά από κάποιους κύκλους διαιρέσεων χάνονται κρίσιμες περιοχές και τα κύτταρα πεθαίνουν

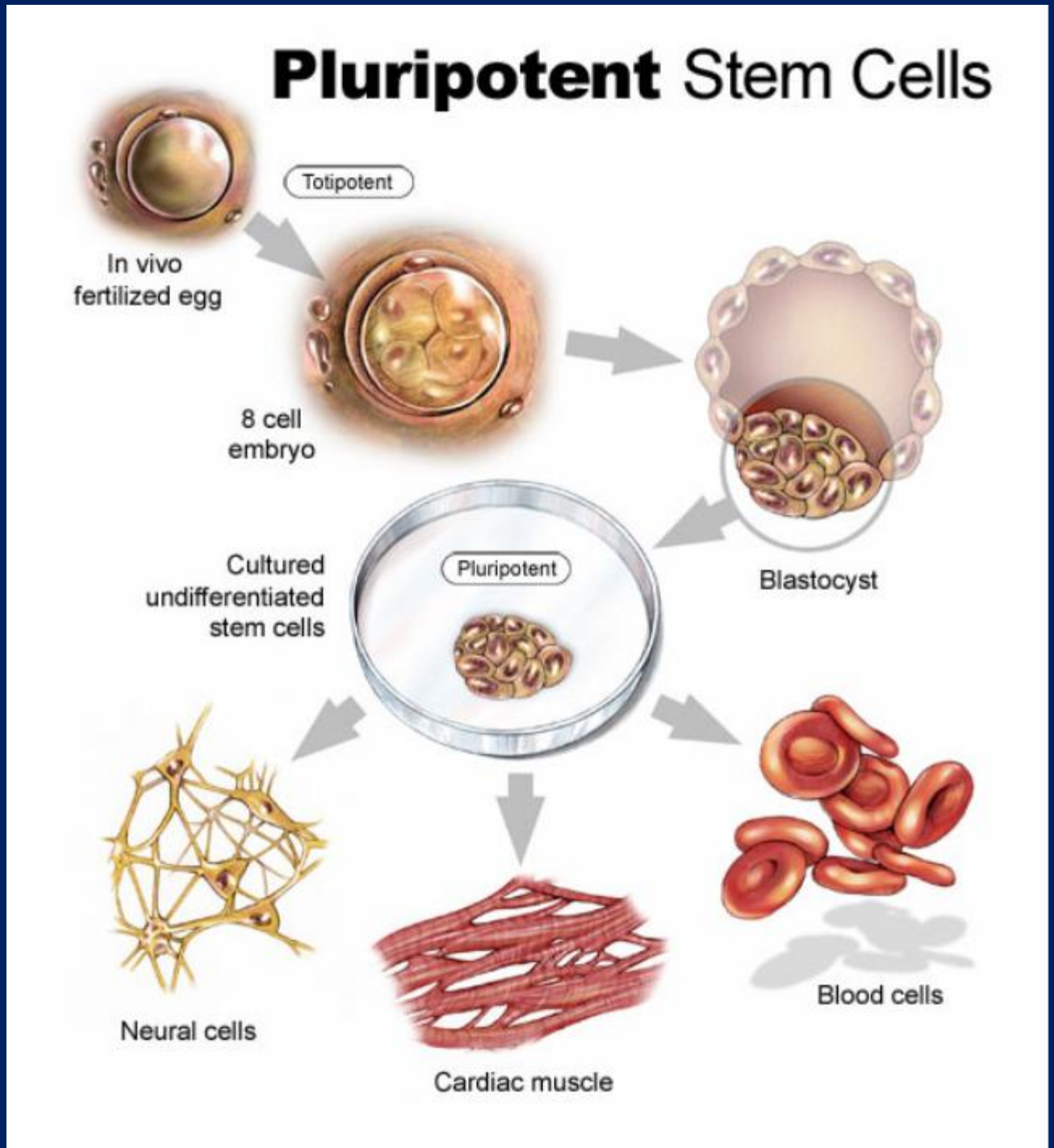
# Ποια είναι η λύση?

- Να βρεθεί τρόπος να φτιαχτούν κυτταρικές σειρές με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά οι οποίες να μπορούν να διαιρούνται επ' άπειρον (να έχουν τελομεράση)
- Τα κύτταρα αυτά λέγονται «αθανατοποιημένα» και μπορεί να προέρχονται από **καρκινικές σειρές** ή από αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα

**Κυτταρικές σειρές ανθρώπινων εμβρυικών αρχέγονων στελεχιαίων κυτταρων**

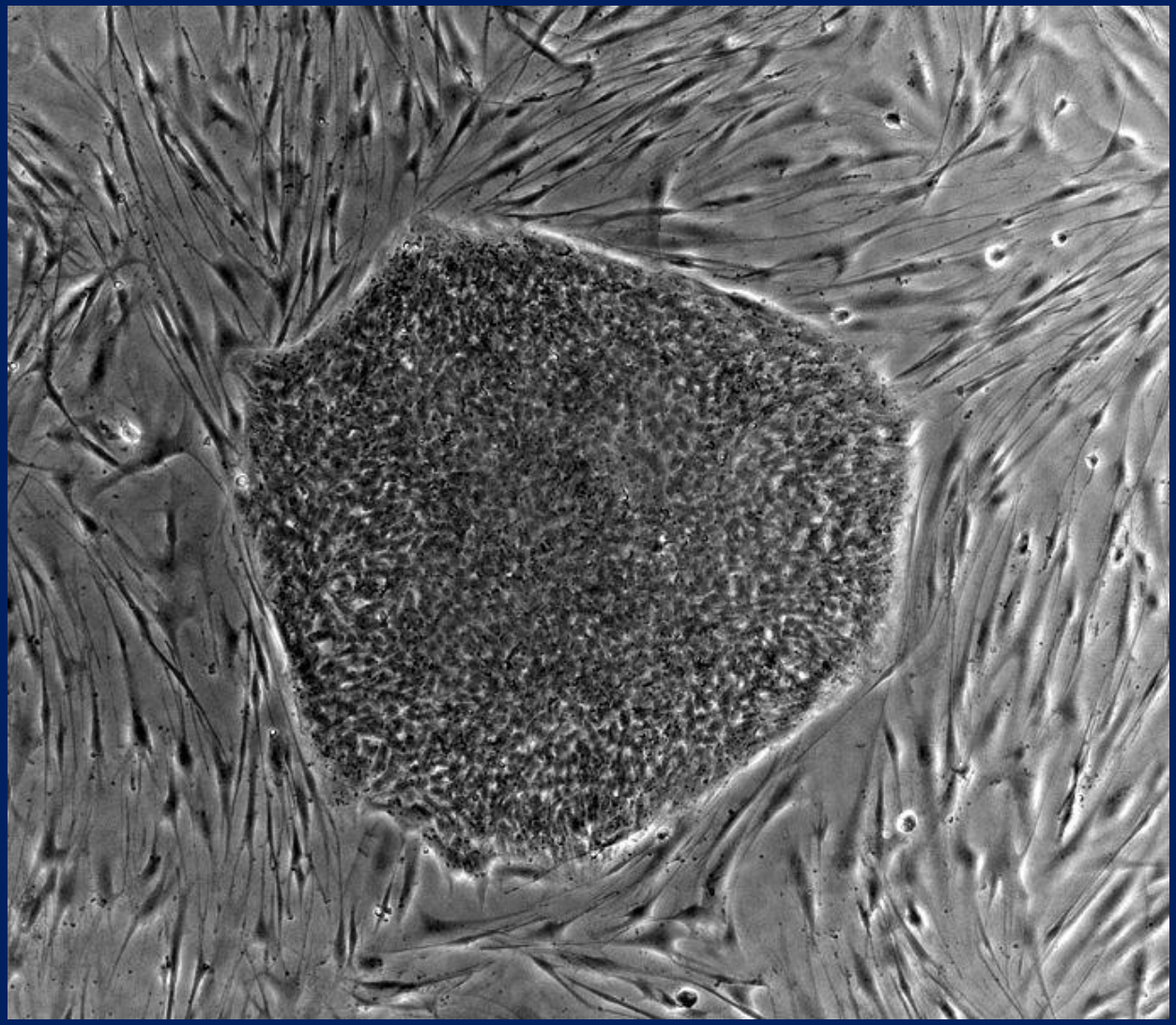
*Embryonic stem cell lines,*

***ES cells***



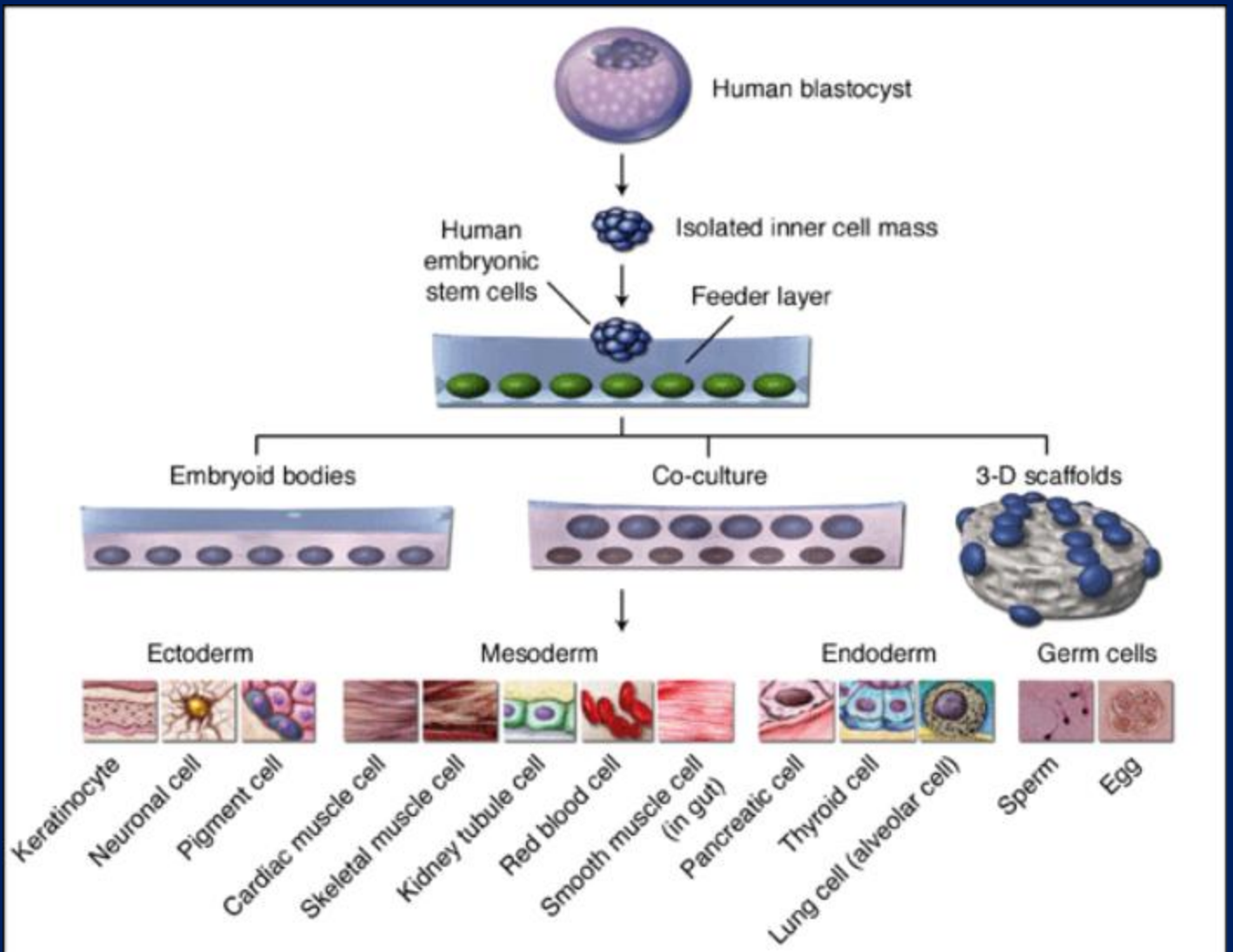
# Embryonic Stem Cell Lines

- Συλλέγονται από καλλιέργεια πρώιμων εμβρυϊκών κυττάρων
- Διαιρούνται συνέχεια
- Είναι αδιαφοροποίητα
- Με κατάλληλες συνθήκες μπορούν να διαφοροποιηθούν και να αποδώσουν κύτταρα από οποιονδήποτε ιστό



Human Embryonic Stem Cell Colony

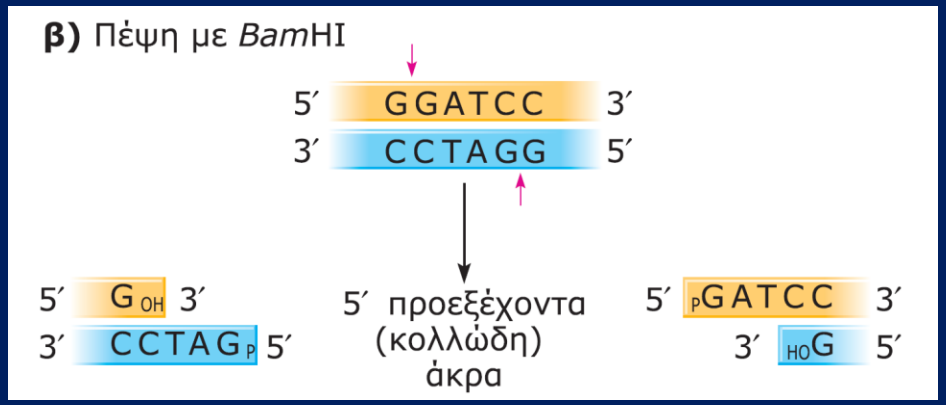
Stainier Lab

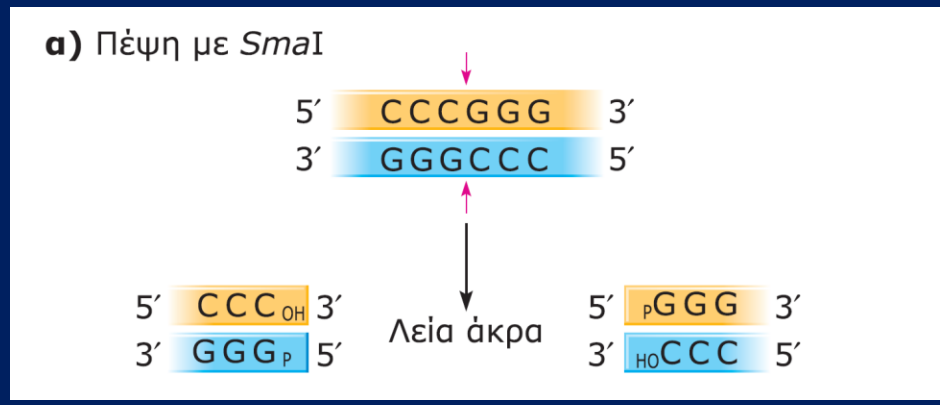


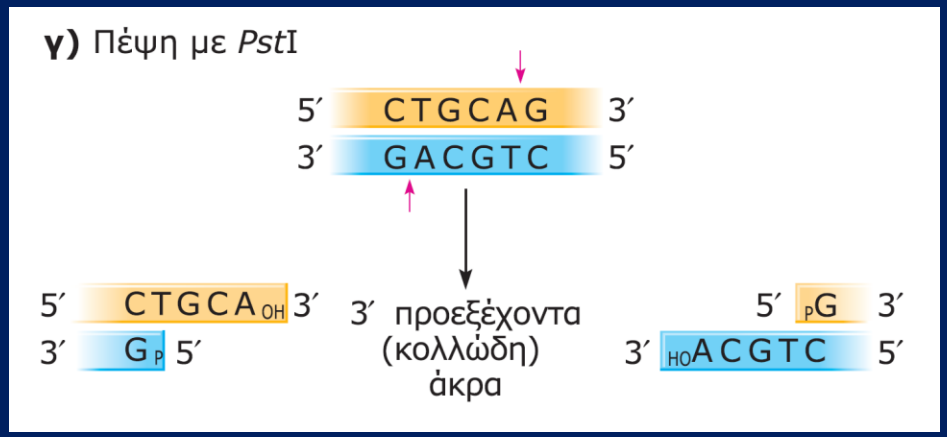

Derivation of a human embryonic stem cell line, and differentiation strategies

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2005 Cambridge University Press

# β. Περιοριστικά ένζυμα (ενδονουκλεάσες)



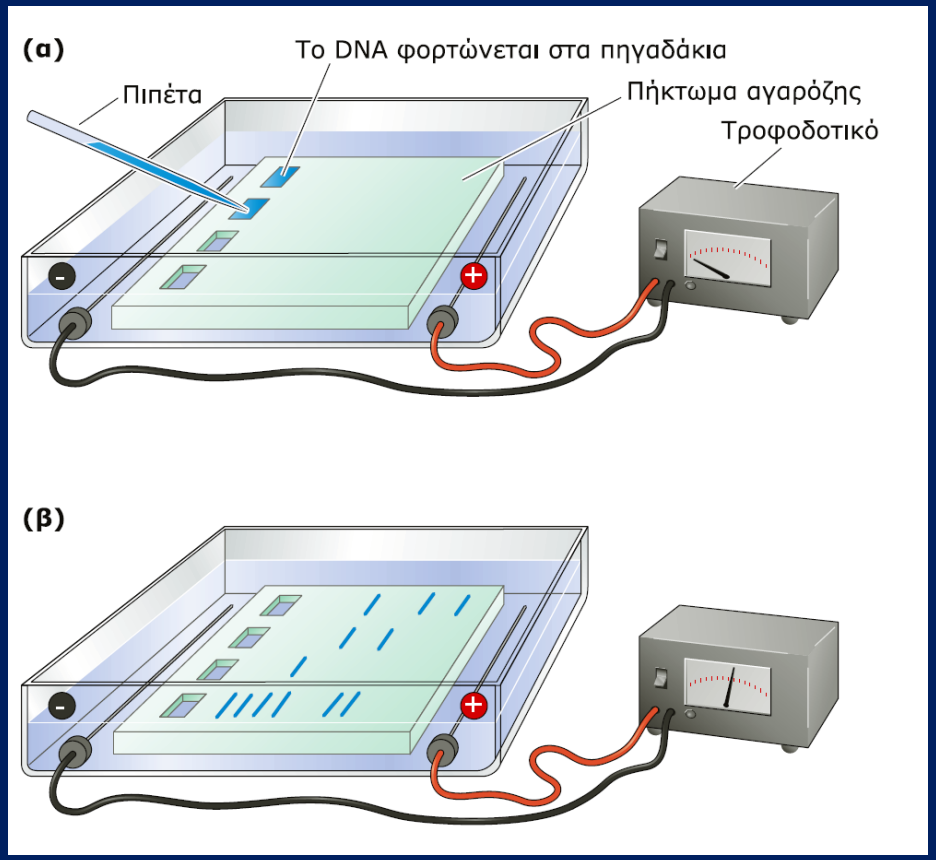



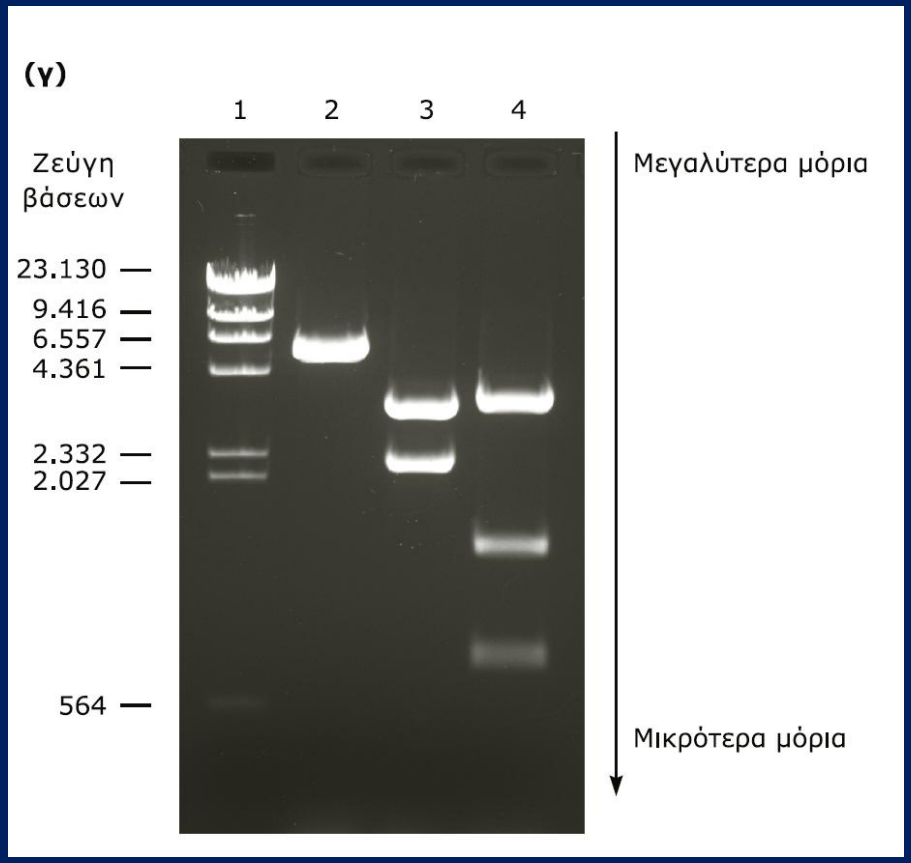



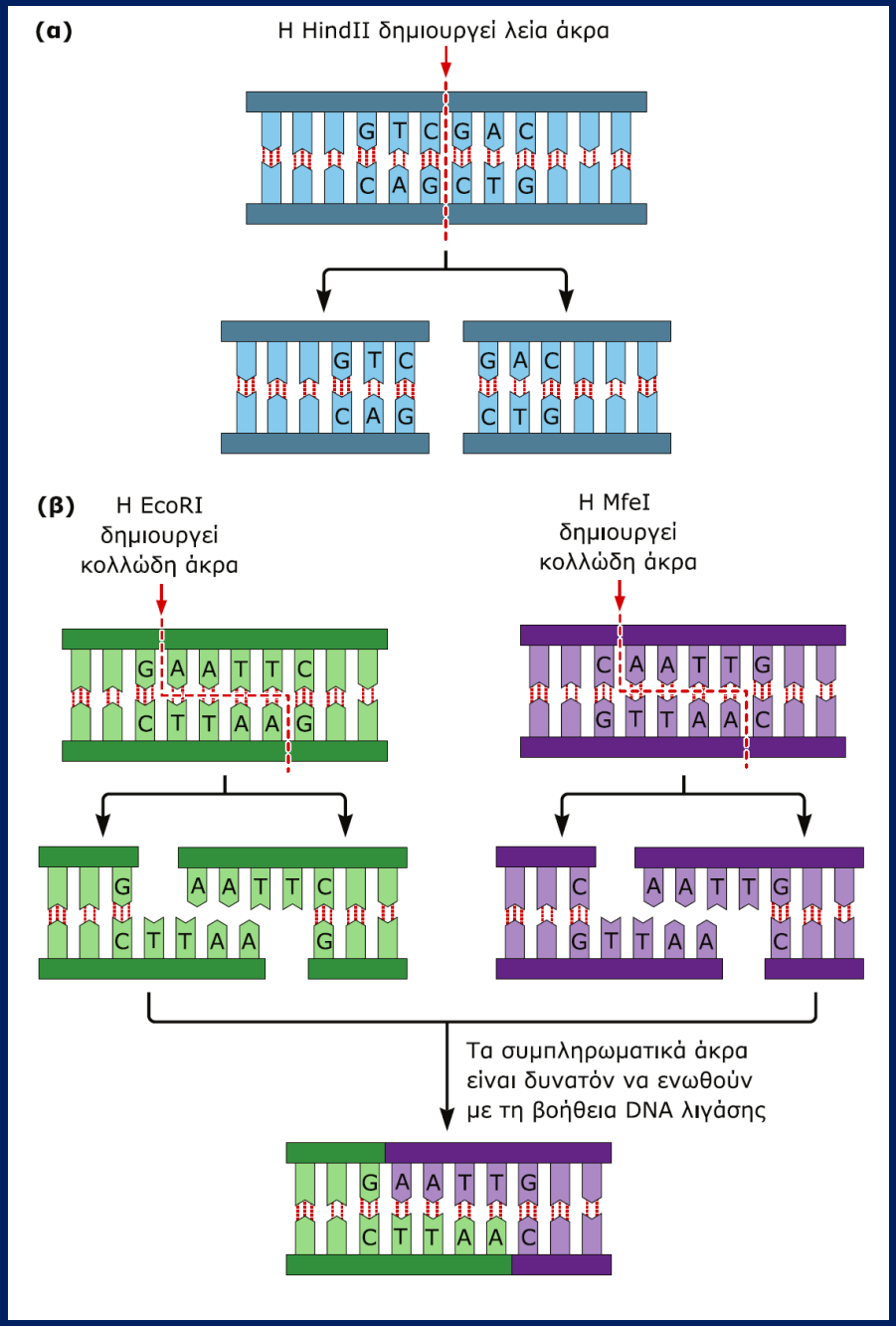
# ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1: Ορισμένα ένζυμα περιορισμού και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν.

| Μικροοργανισμός | Ένζυμο | Αλληλουχία αναγνώρισης | Σημειώσεις |
|---|---|---|---|
| *Haemophilus aegyptius* | HaeIII | 5′ . . . G G\|C C. . . 3′<br>3′ . . . C C\|G G. . . 5′ | 1 |
| *Thermus aquaticus* | TaqI | 5′ . . . T\|C G A . . . 3′<br>3′ . . . A G C\|T . . . 5′ | 2 |
| *Haemophilus haemolyticus* | HhaI | 5′ . . . G C G\|C . . . 3′<br>3′ . . . C\|G C G . . . 5′ | 3 |
| *Desulfovibrio desulfuricans* | DdeI | 5′ . . . C\|T *N* A G . . . 3′<br>3′ . . . G A *N* T\|C . . . 5′ | 4 |
| *Moraxella bovis* | MboII | 5′ . . . G A A G A $(N)_8$\| . . . 3′<br>3′ . . . C T T C T $(N)_7$\| . . . 5′ | 5 |
| *Escherichia coli* | EcoRV | 5′ . . . G A T\|A T C . . . 3′<br>3′ . . . C T A\|T A G . . . 5′ | 1 |
| | EcoRI | 5′ . . . G\|A A T T C . . . 3′<br>3′ . . . C T T A A\|G . . . 5′ | 2 |
| *Providencia stuarti* | PstI | 5′ . . . C T G C A\|G . . . 3′<br>3′ . . . G A\|C G T C . . . 5′ | 3 |
| *Microcoleus* | MstII | 5′ . . . C C\|T *N* A G G . . . 3′<br>3′ . . . G G A *N* T\|C C . . . 5′ | 4 |
| *Nocardia otitidiscaviarum* | NotI | 5′ . . . G C\|G G C C G C . . . 3′<br>3′ . . . C G C C G G\|C G . . . 5′ | 6 |

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

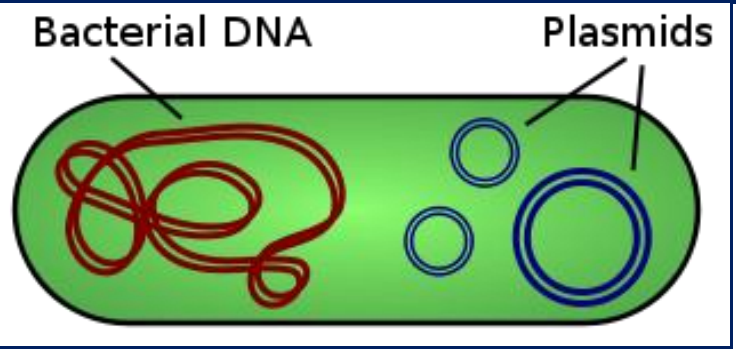


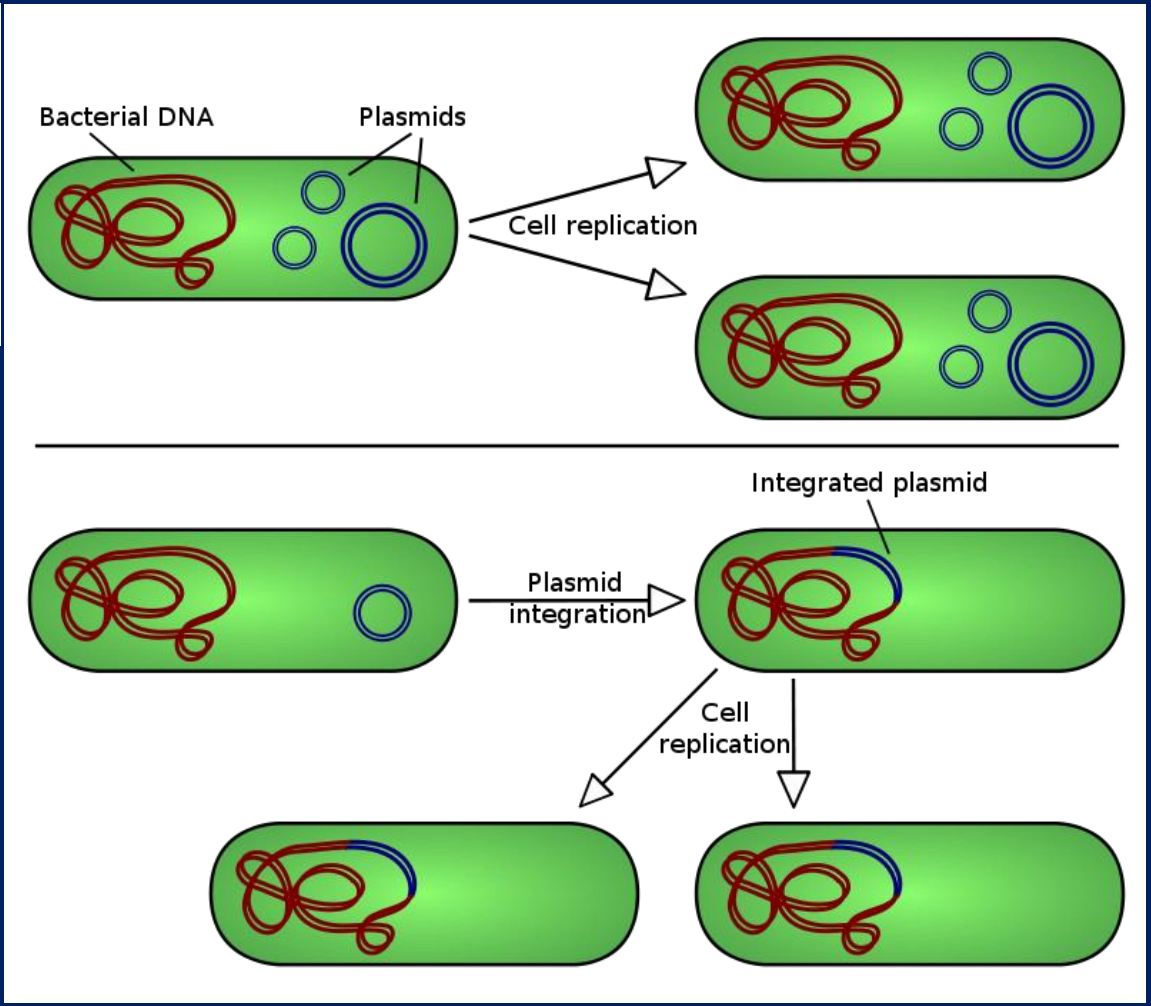



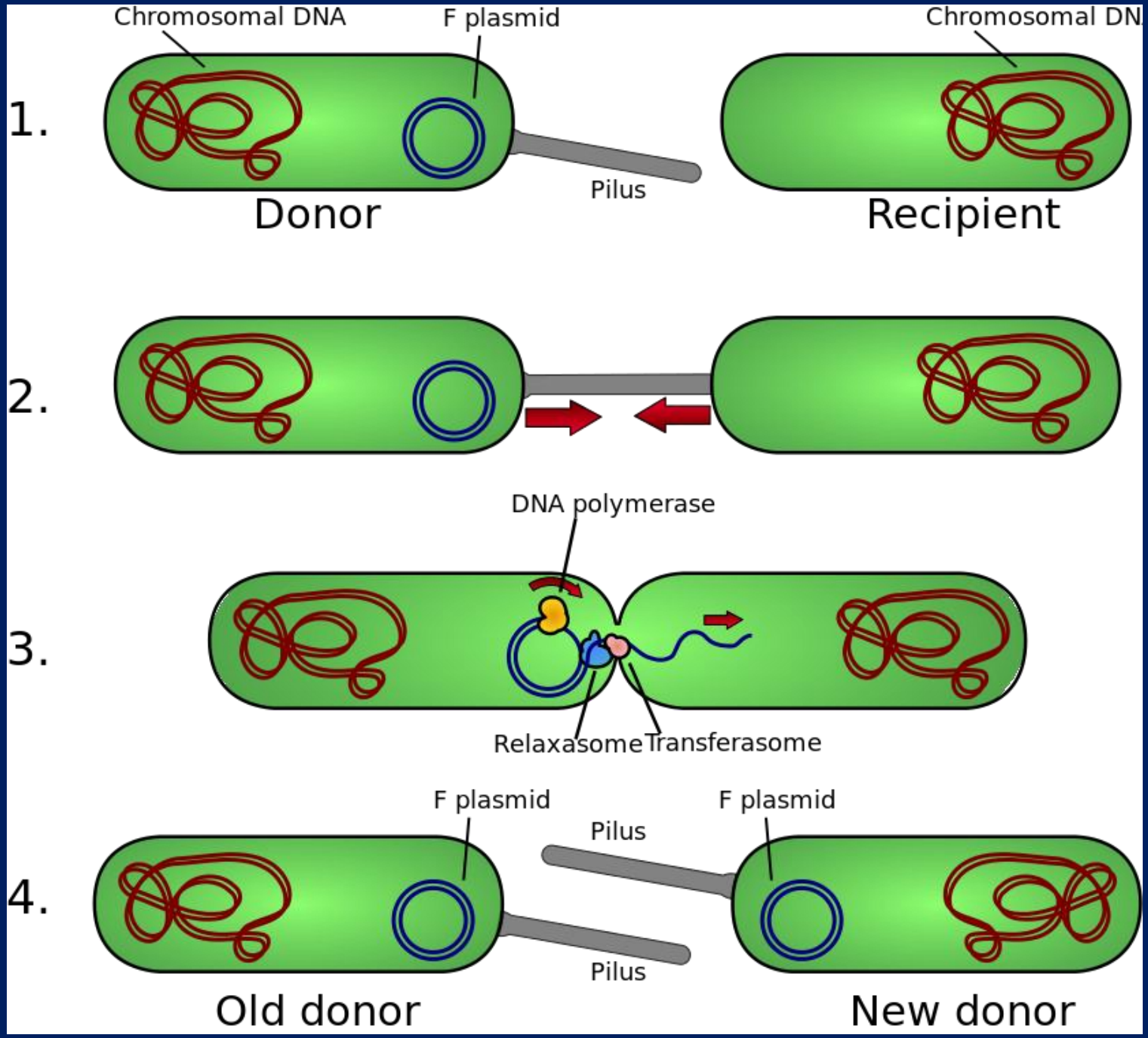


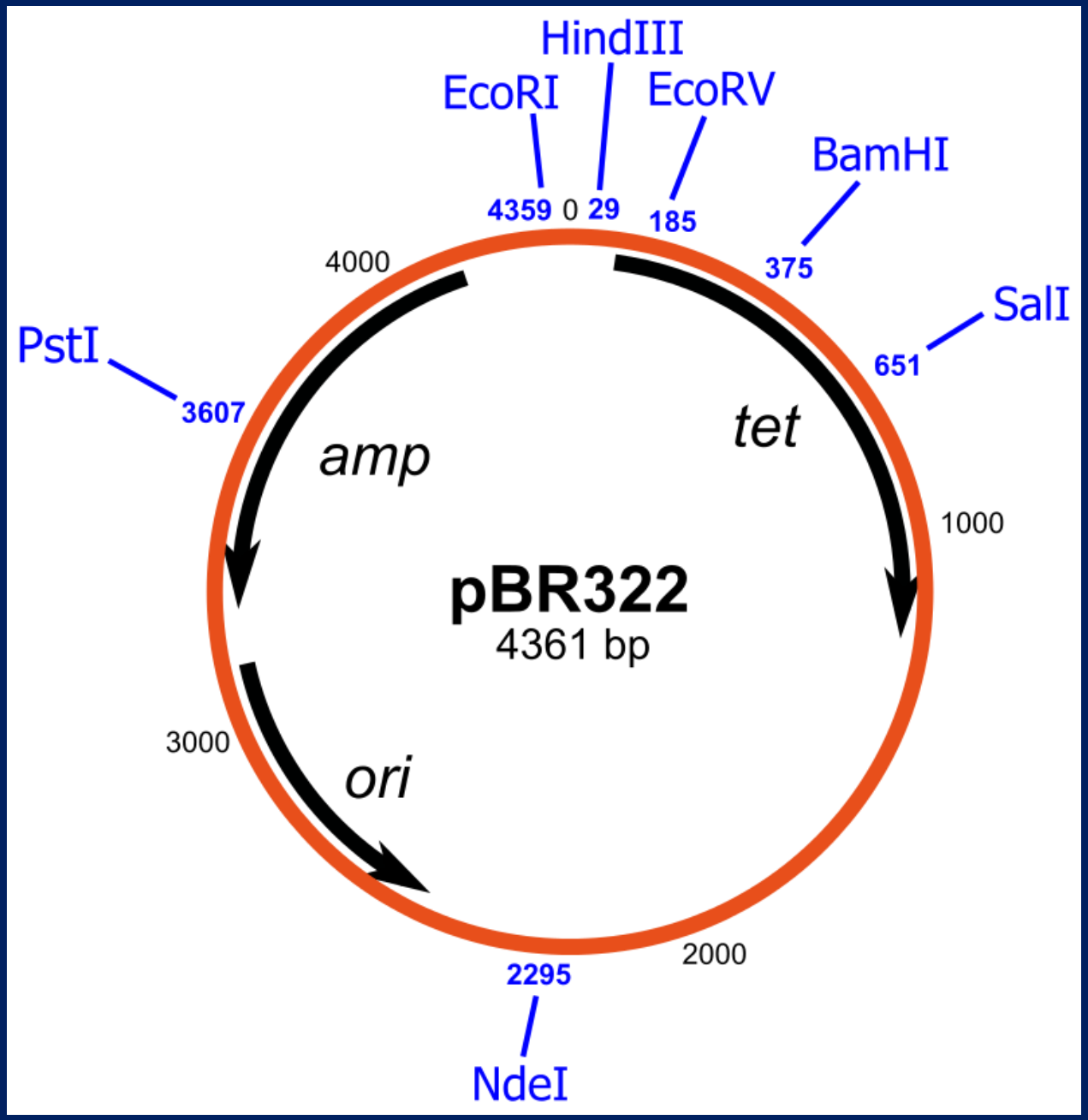

ΕΙΚΟΝΑ 4.2: Τα ένζυμα περιορισμού παράγουν είτε λεία άκρα είτε κολλώδη άκρα.

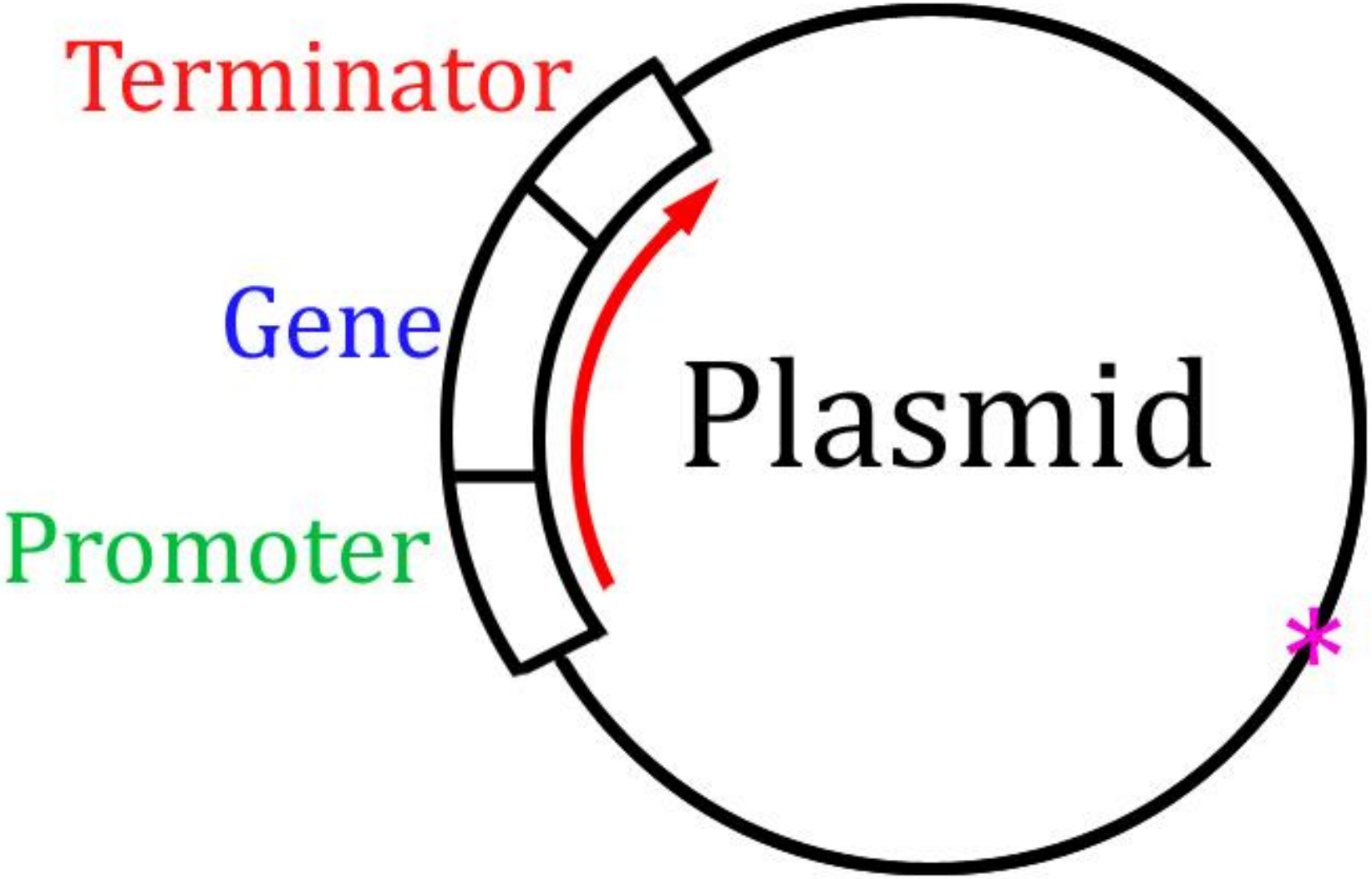
# c. Δημιουργία ανασυνδυασμένων τμημάτων και φορείς κλωνοποίησης



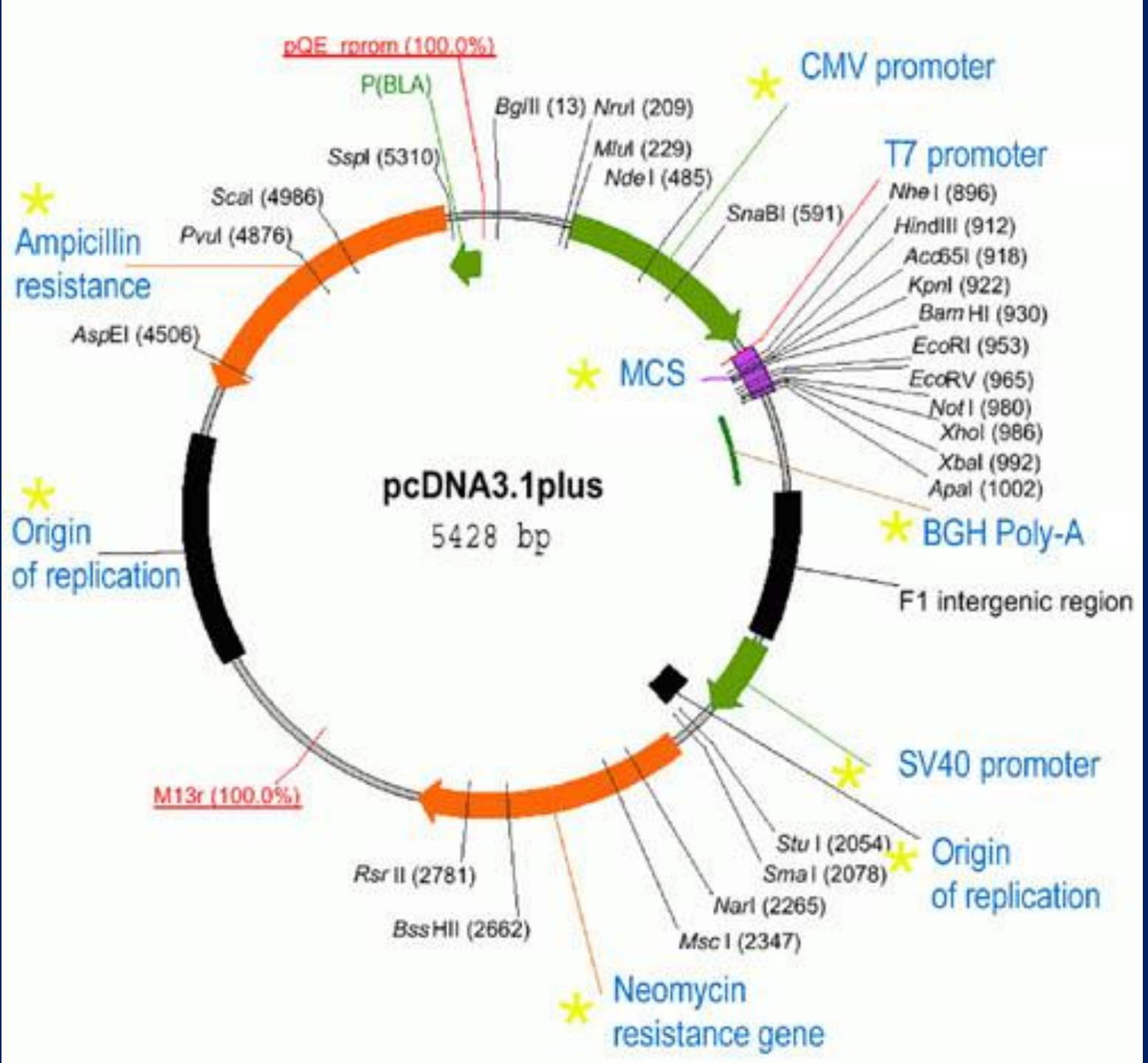




1.
Chromosomal DNA
F plasmid
Chromosomal DN
Pilus
Donor
Recipient
2.
3.
DNA polymerase
Relaxasome
Transferasome
4.
F plasmid
Pilus
F plasmid
Pilus
Old donor
New donor

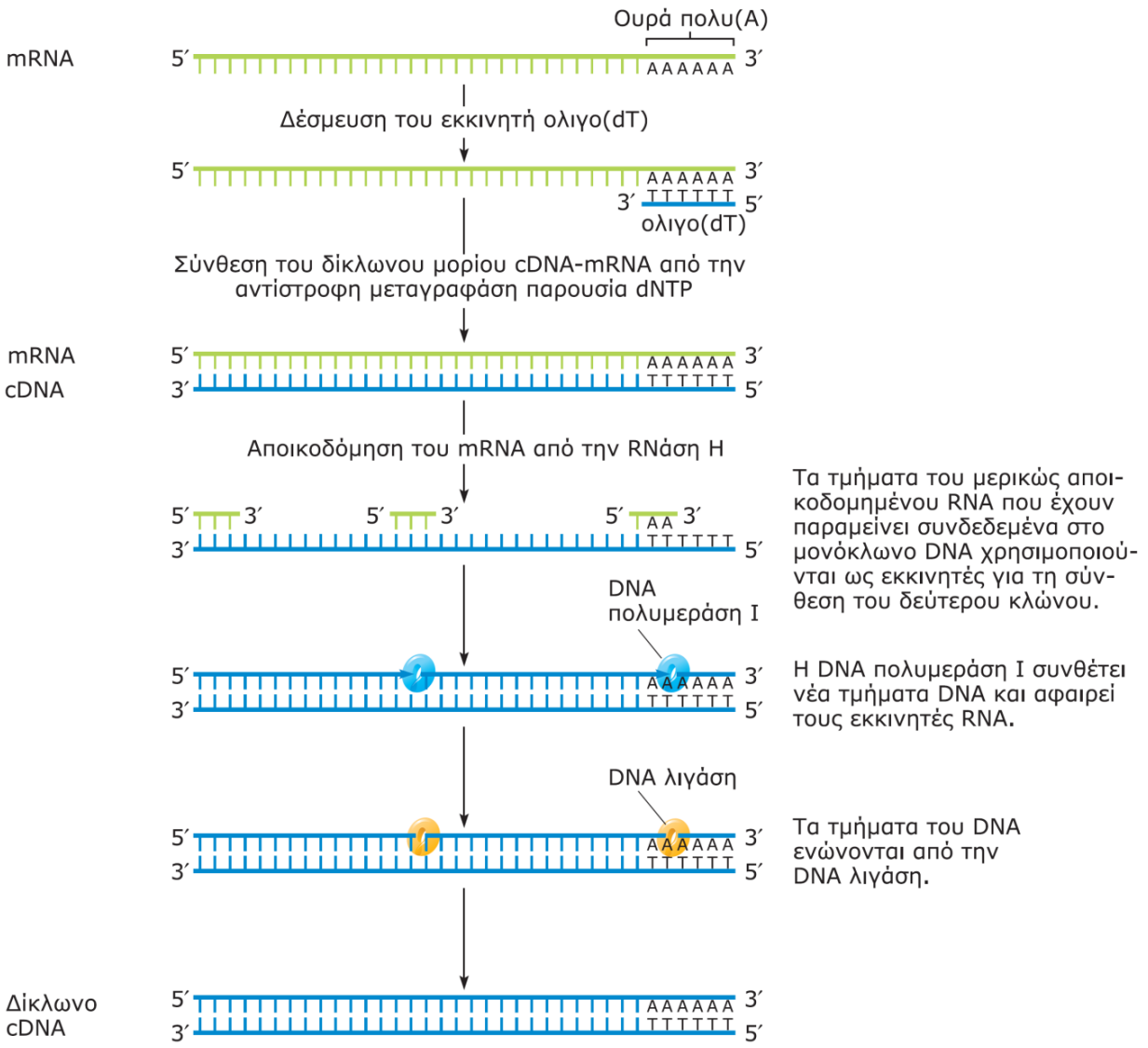

HindIII
EcoRI
EcoRV
BamHI
4359
0
29
185
375
4000
SalI
PstI
651
3607
tet
amp
1000
pBR322
4361 bp
3000
ori
2000
2295
NdeI




*other possible genes, such as ampicillin resistance ($amp^r$)


pQE rorom (100.0%)
P(BLA)
BglII (13)
NruI (209)
MluI (229)
NdeI (485)
SspI (5310)
ScaI (4986)
PvuI (4876)
AspEI (4506)
CMV promoter
T7 promoter
SnaBI (591)
NheI (896)
HindIII (912)
Acc65I (918)
KpnI (922)
BamHI (930)
EcoRI (953)
EcoRV (965)
NotI (980)
XhoI (986)
XbaI (992)
ApaI (1002)
Ampicillin resistance
MCS
pcDNA3.1plus
5428 bp
Origin of replication
BGH Poly-A
F1 intergenic region
SV40 promoter
M13r (100.0%)
Origin of replication
StuI (2054)
SmaI (2078)
NarI (2265)
MscI (2347)
RsrII (2781)
BssHII (2662)
Neomycin resistance gene

# d. Συμπληρωματικό DNA (cDNA)

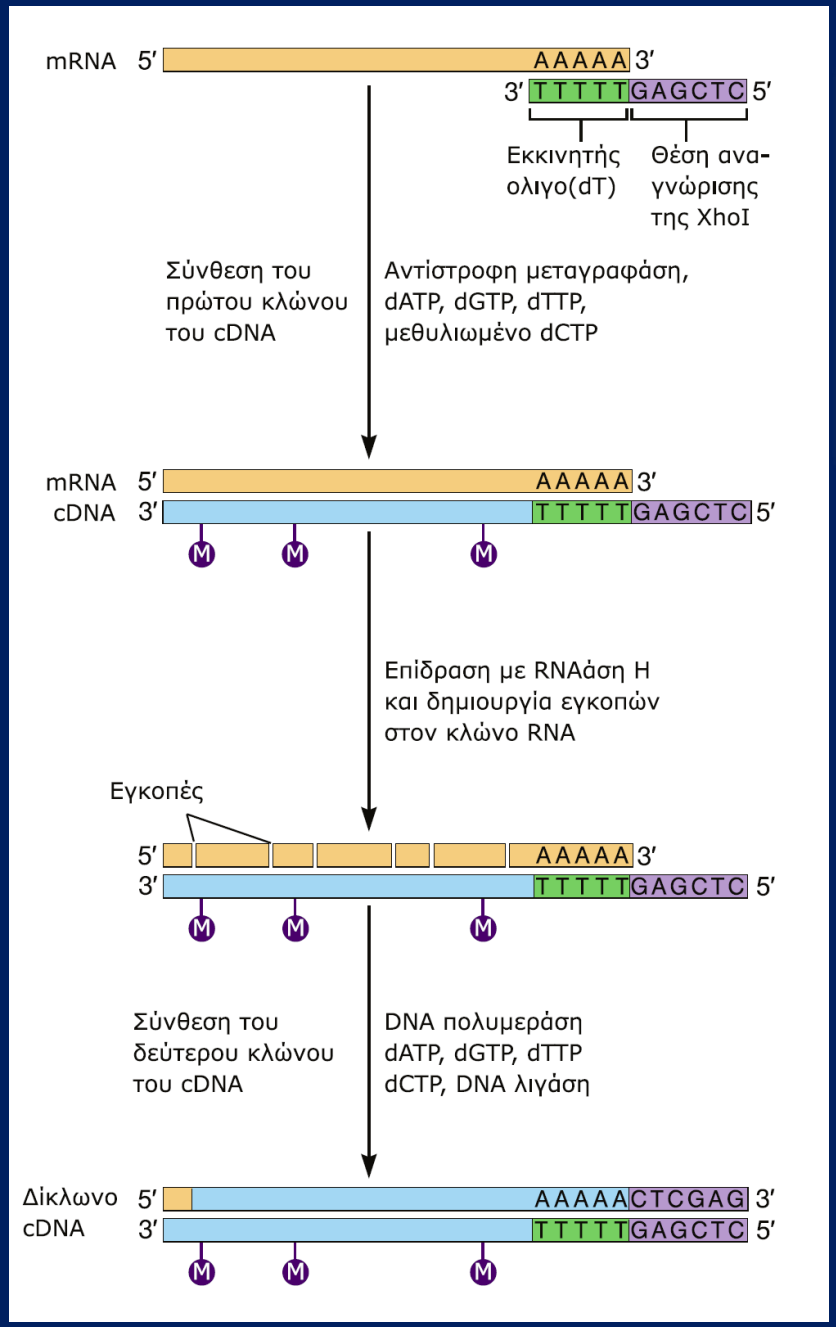



Τα τμήματα του μερικώς αποικοδομημένου RNA που έχουν παραμείνει συνδεδεμένα στο μονόκλωνο DNA χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για τη σύνθεση του δεύτερου κλώνου.

Η DNA πολυμεράση I συνθέτει νέα τμήματα DNA και αφαιρεί τους εκκινητές RNA.

Τα τμήματα του DNA ενώνονται από την DNA λιγάση.

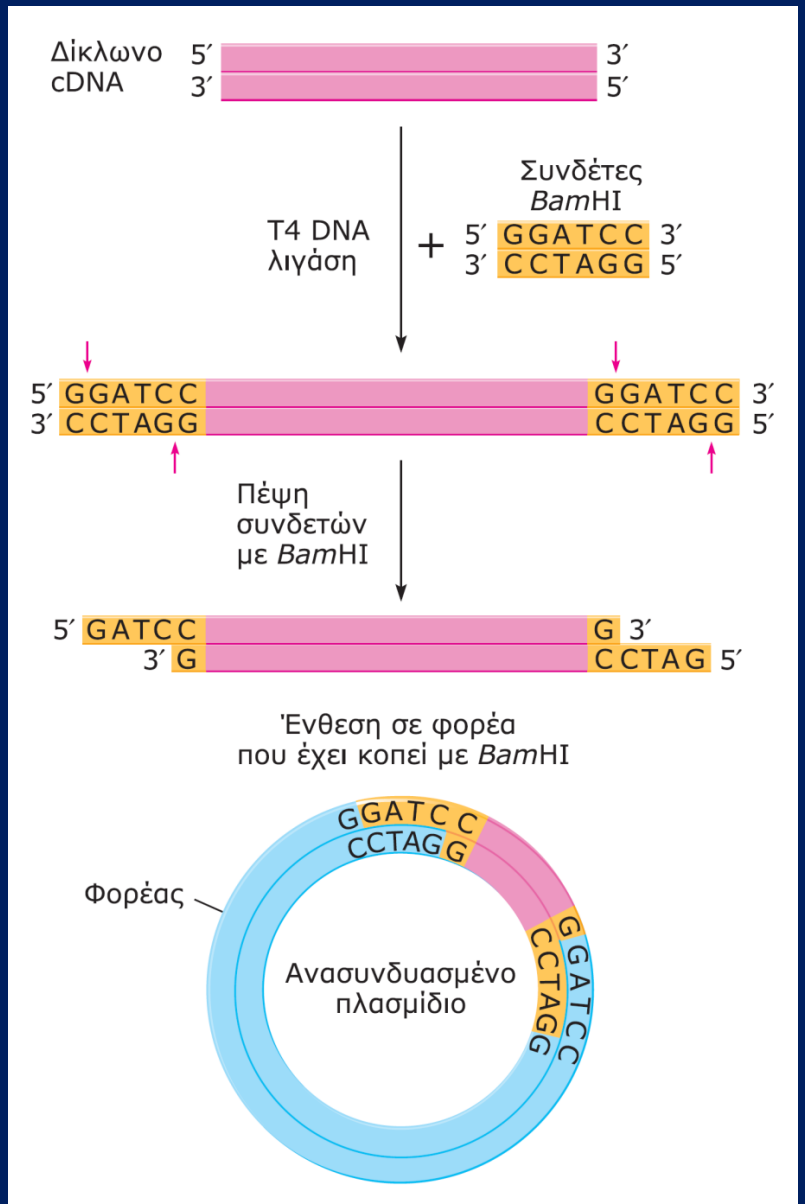
**Σύνθεση δίκλωνου cDNA από πολυαδενυλιωμένο mRNA με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης, της RNάσης H, της DNA πολυμεράσης I και της DNA λιγάσης.**



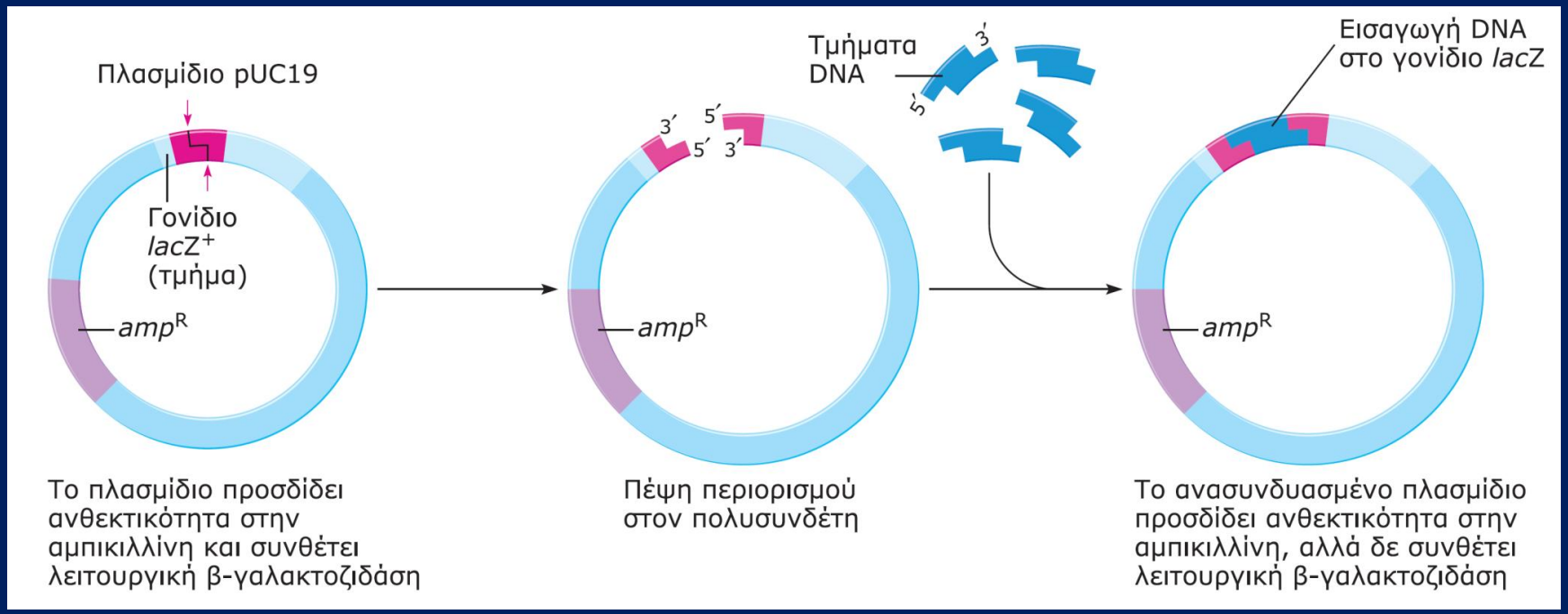

# Σύνθεση cDNA.

## Αρχή δημιουργίας cDNA βιβλιοθήκης

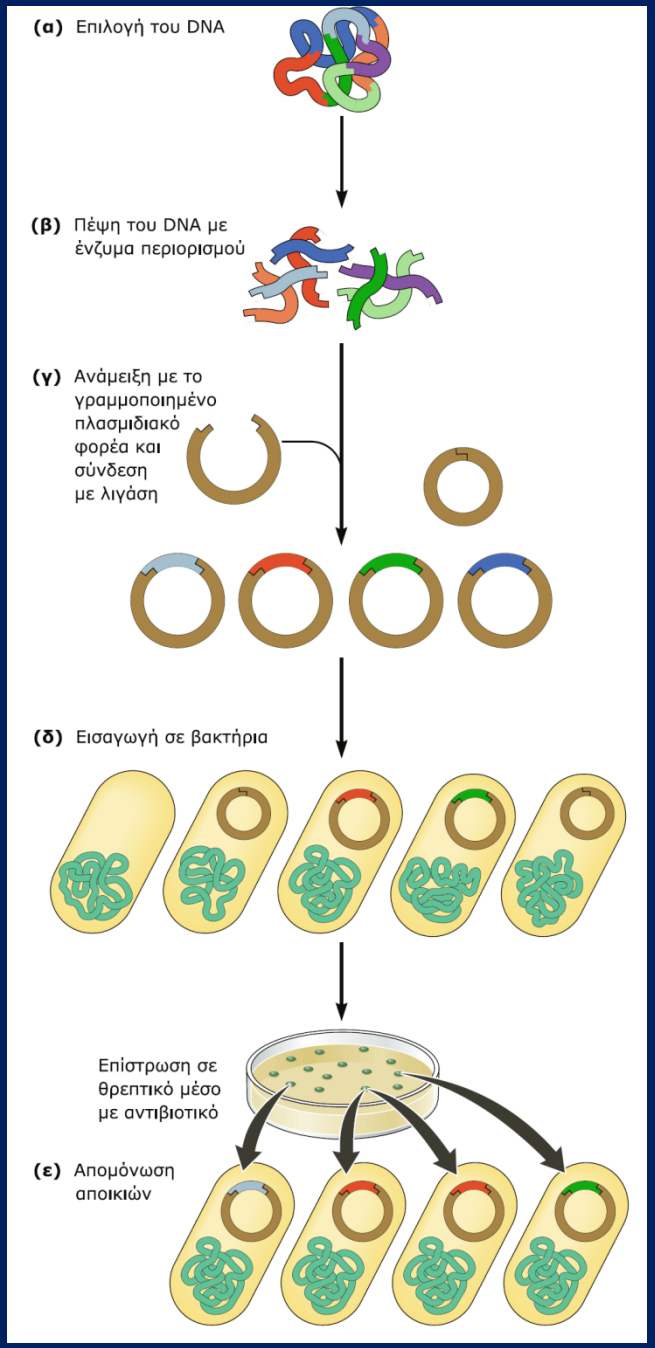
# e. Κλωνοποίηση γονιδίου




**Κλωνοποίηση cDNA με τη χρήση συνδετών *Bam*HI.**




Ο φορέας κλωνοποίησης μπορεί να είναι
Βακτηριακά πλασμίδια
Βακτηριοφάγοι
Ρετροϊοί
Τεχνητά χρωμοσώματα ζυμομύκητα (YACs)




# Τα πέντε βασικά βήματα της κλωνοποίησης DNA σε πλασμίδιο.

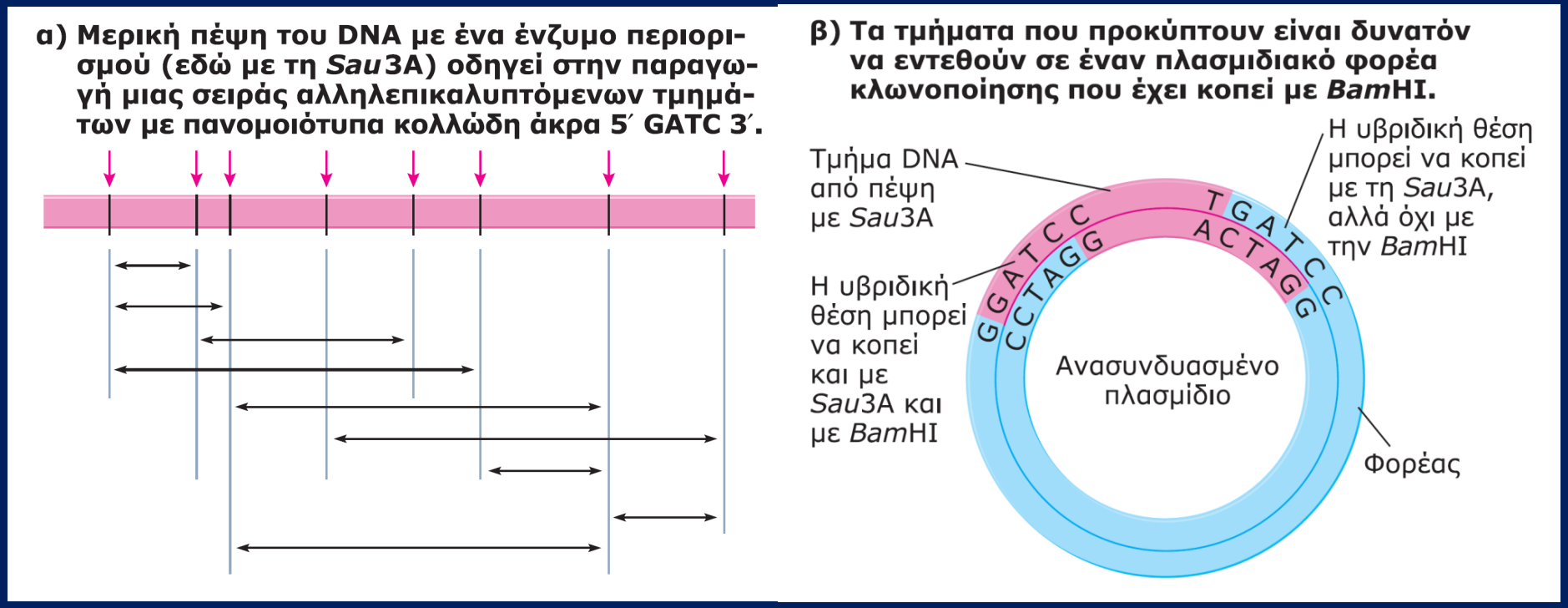
1. Επιλογή DNA
2. Δημιουργία τμημάτων DNA με κατάλληλο μήκος και κατάλληλα ακρα
3. Ένθεση του DNA στο φορέα κλωνοποίησης με χρήση DNA λιγάσης
4. Μετασχηματισμός, εισαγωγή πλασμιδίων-φορέων σε βακτήρια
5. Επίστρωση μετασχηματισμένων βακτηρίων σε στερεό θρεπτικό υλικό
6. Ανάπτυξη μόνο των βακτηρίων που φέρουν το πλασμίδιο-φορέα
7. Προσδιορισμός αποικιών που περιέχουν την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει

# ΠΙΝΑΚΑΣ 4.5: 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 |

A cosmid is a type of hybrid plasmid that contains a Lambda phage cos sequence. Cosmids' (cos sites + plasmid = cosmids) DNA sequences are originally from the lambda phage

# f. Γονιδιωματικές βιβλιοθήκες

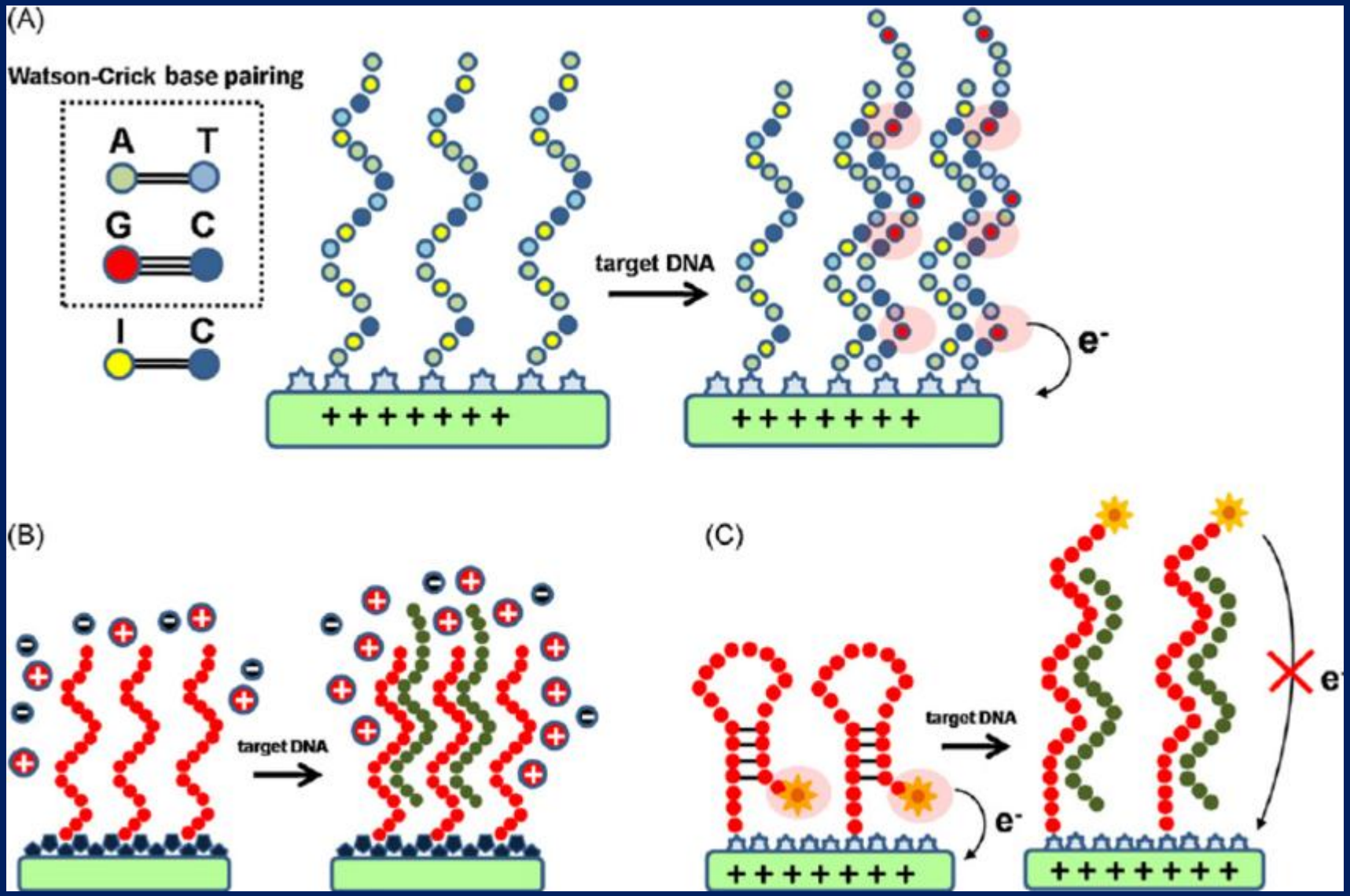



**Παραγωγή τμημάτων DNA κατάλληλου μεγέθους για την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, μέσω μερικής πέψης με ένζυμο περιορισμού.**

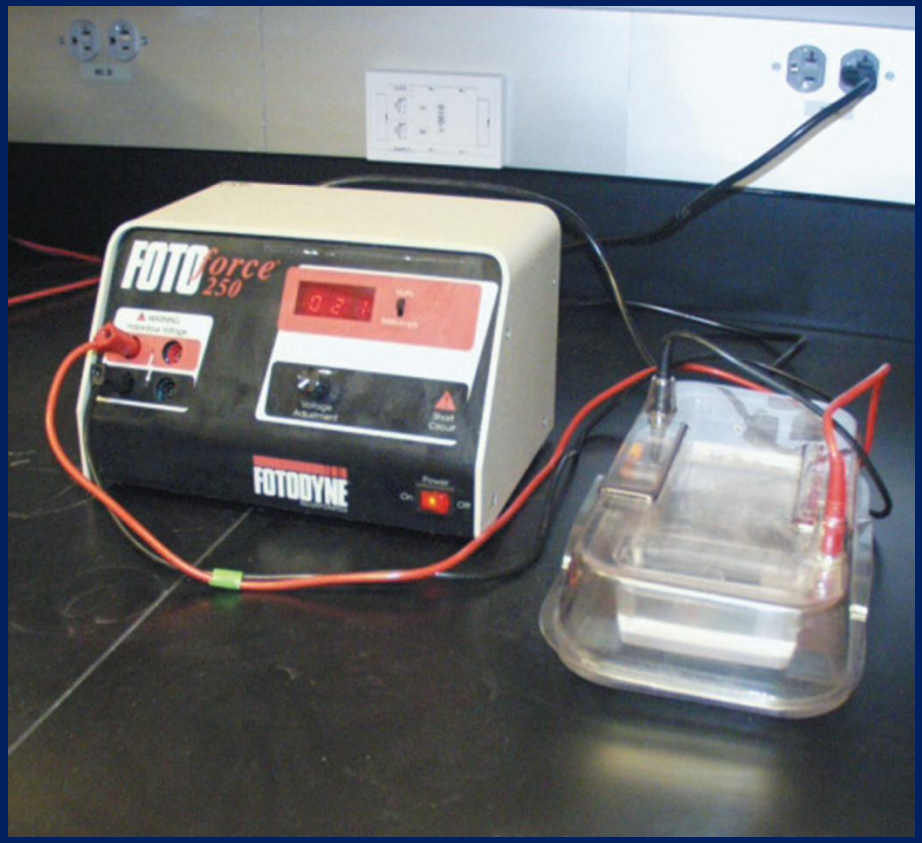
# g. Μοριακός υβριδισμός

- Υβριδισμός είναι η ικανότητα ενός μονόκλωνου DNA ή RNA να ενώνεται με μια συμπληρωματική μονόκλωνη αλληλουχία, ενώ δεν ενώνεται με μια άσχετη

- Ο ανιχνευτής DNA (probe) είναι συνήθως σημασμένος (με ραδιοϊσότοπο ή φθορίζουσα ουσία)

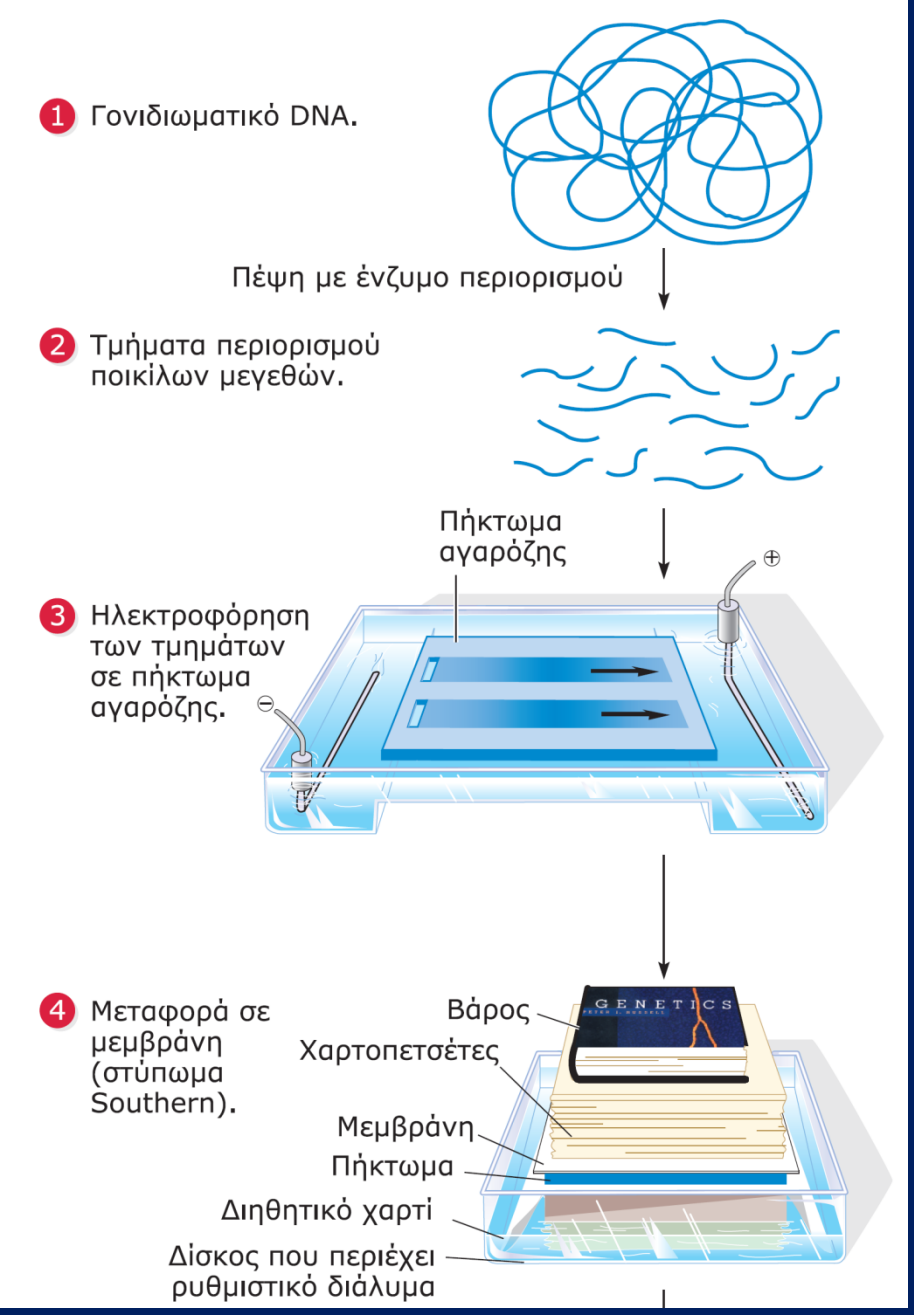

(A)
Watson-Crick base pairing
A
T
G
C
I
C
target DNA
e-
+++++++
+++++++
(B)
target DNA
(C)
target DNA
e-
+++++++
+++++++

# h. Αποτύπωση κατά Southern

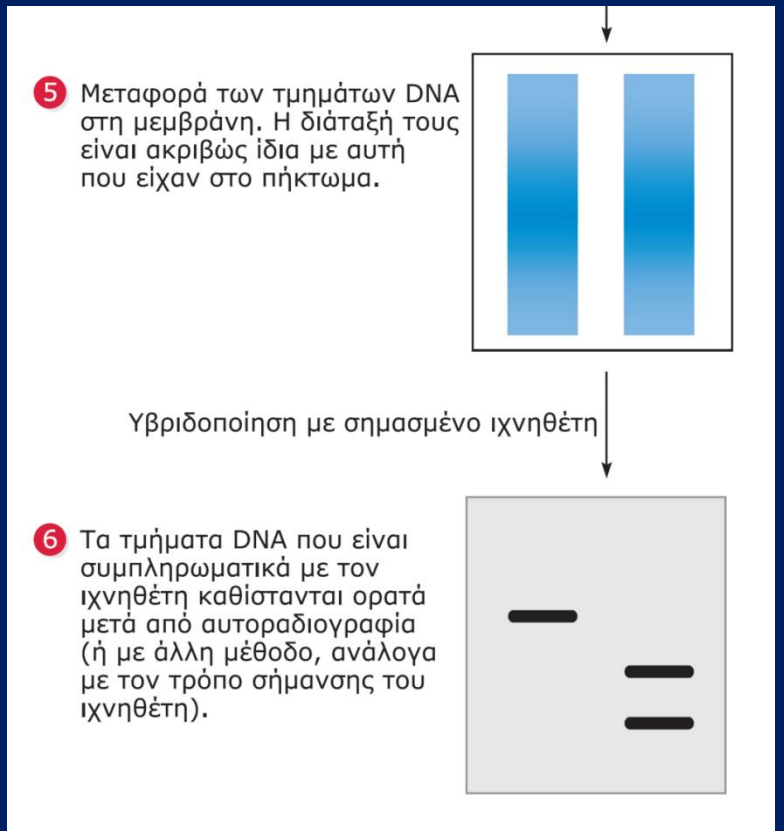



Ανάλυση κατά Southern **γονιδιωματικού DNA με σκοπό τον εντοπισμό αλληλουχιών** συμπληρωματικών προς ένα σημασμένο ιχνηθέτη (για παράδειγμα, ένα μόριο cDNA).

Συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτώματος αγαρόζης (δεξιά) και τροφοδοτικό (αριστερά).

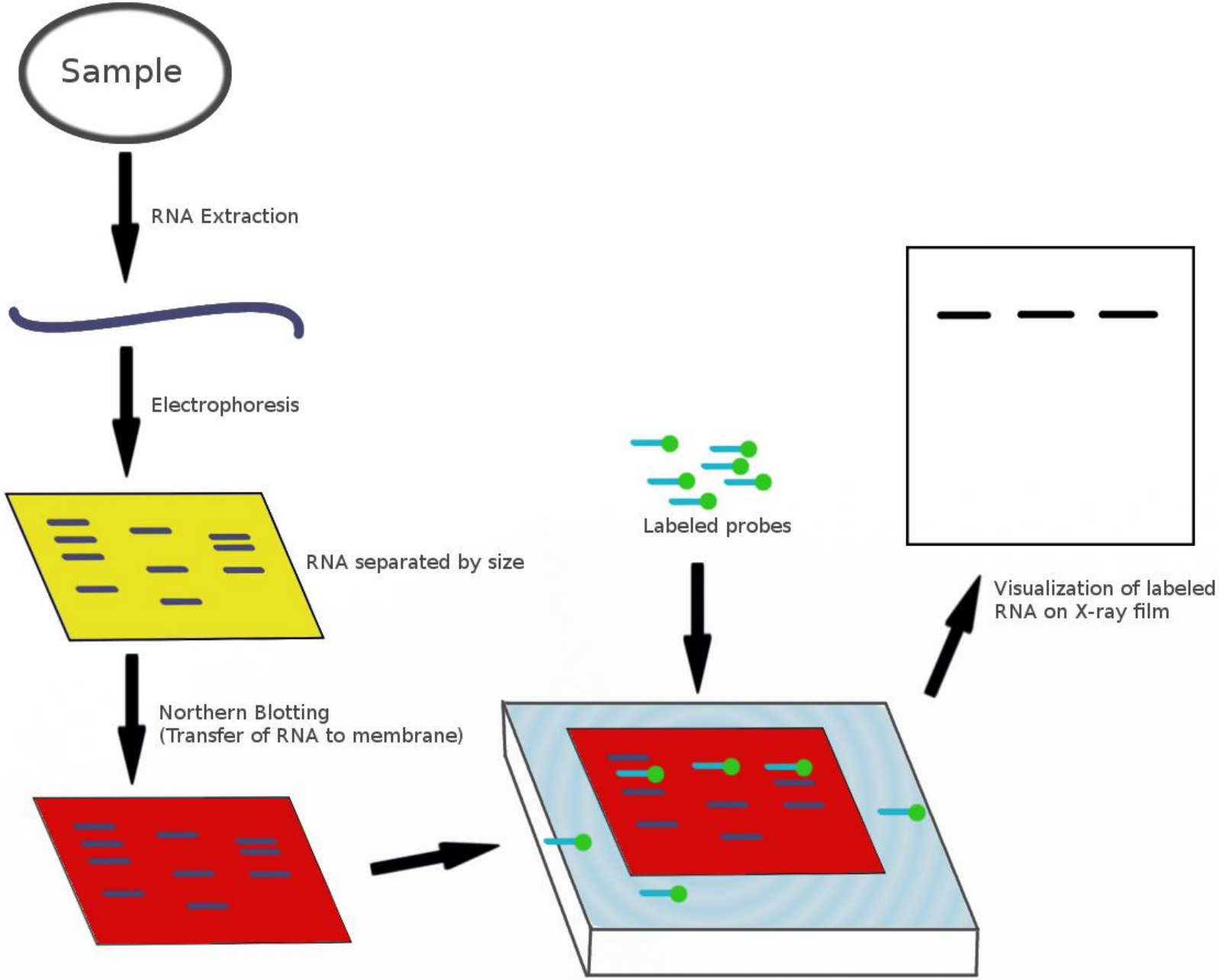



**Ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA με σκοπό τον εντοπισμό αλληλουχιών συμπληρωματικών προς ένα σημασμένο ιχνηθέτη (για παράδειγμα, ένα μόριο cDNA).**
Σε αυτό το θεωρητικό παράδειγμα, ο ιχνηθέτης υβριδοποιείται με τρία τμήματα DNA. Οι αντίστοιχες ζώνες καθίστανται ορατές μέσω αυτοραδιογραφίας ή χημειοφωταύγειας.

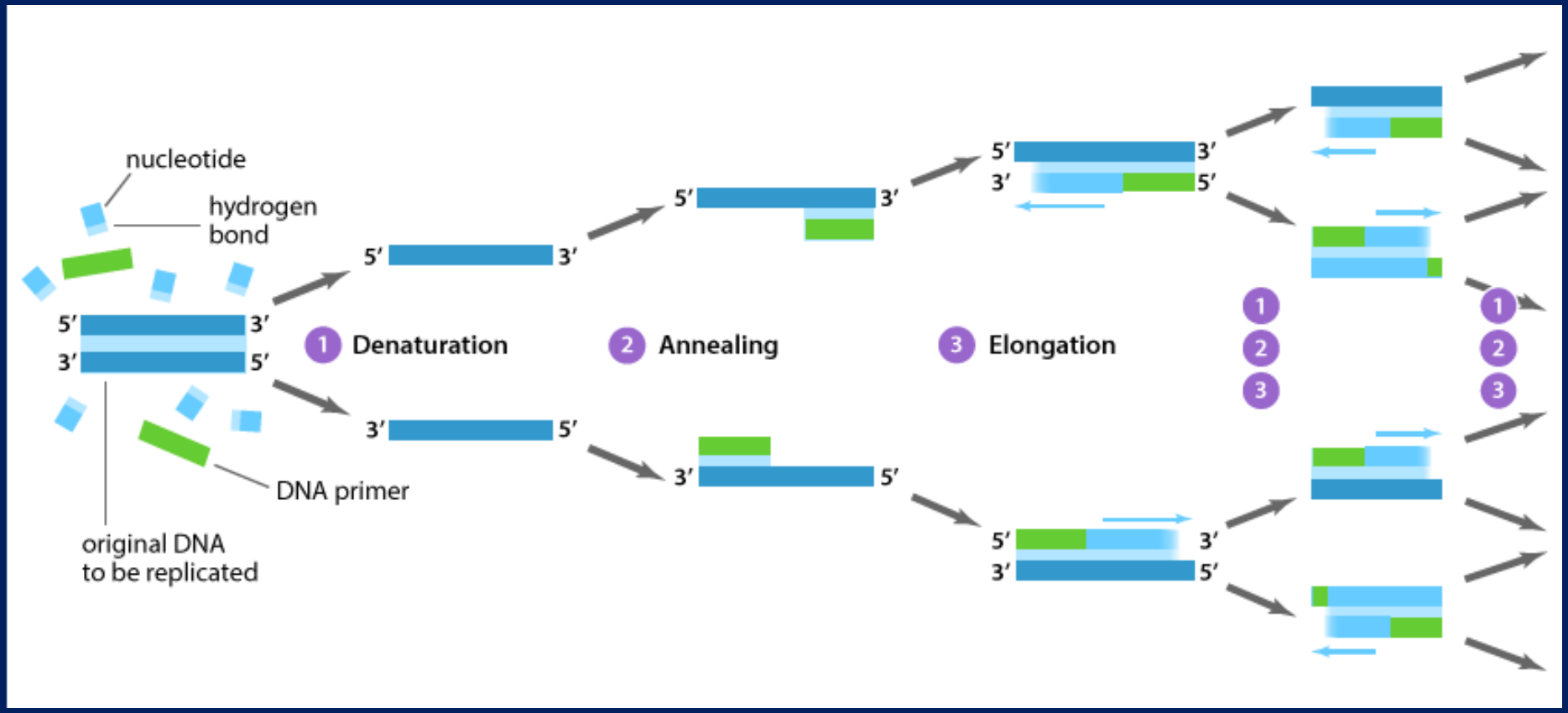


# h. Αποτύπωση κατά Northern

- Ταυτοποίηση mRNA
- Η θέση της ζώνης υποδηλώνει το μέγεθος
- Η ένταση της ζώνης υποδηλώνει την ποσότητα
- Ιστοειδικότητα στην έκφραση


Sample
RNA Extraction
Electrophoresis
RNA separated by size
Northern Blotting
(Transfer of RNA to membrane)
Labeled probes
Visualization of labeled
RNA on X-ray film

# i. Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

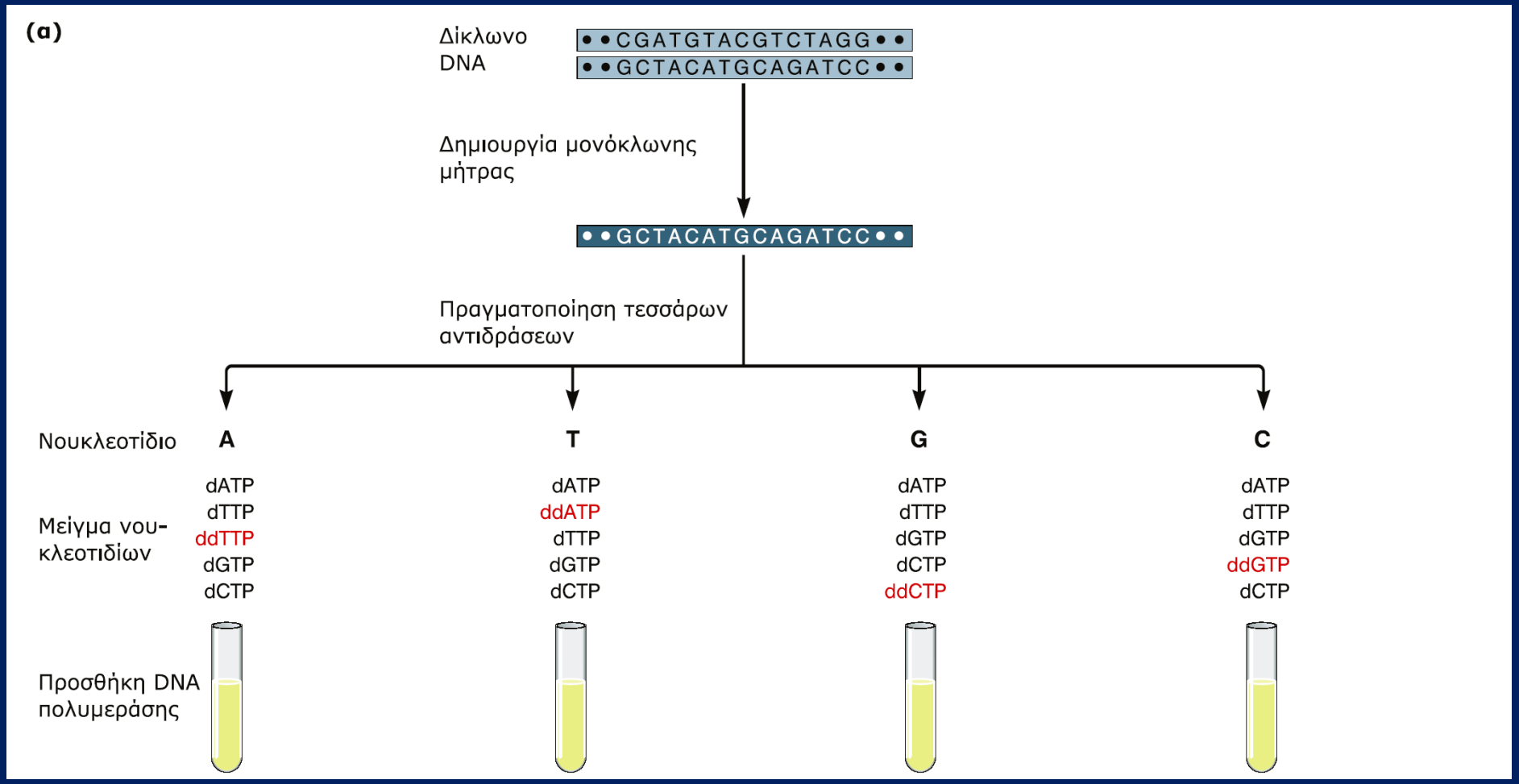



https://www.youtube.com/watch?v=2KoLnIwoZKU

# j. Προσδιορισμός αλληλουχίας DNA

Αυτοραδιογράφημα ενός πηκτώματος αλληλούχισης.

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

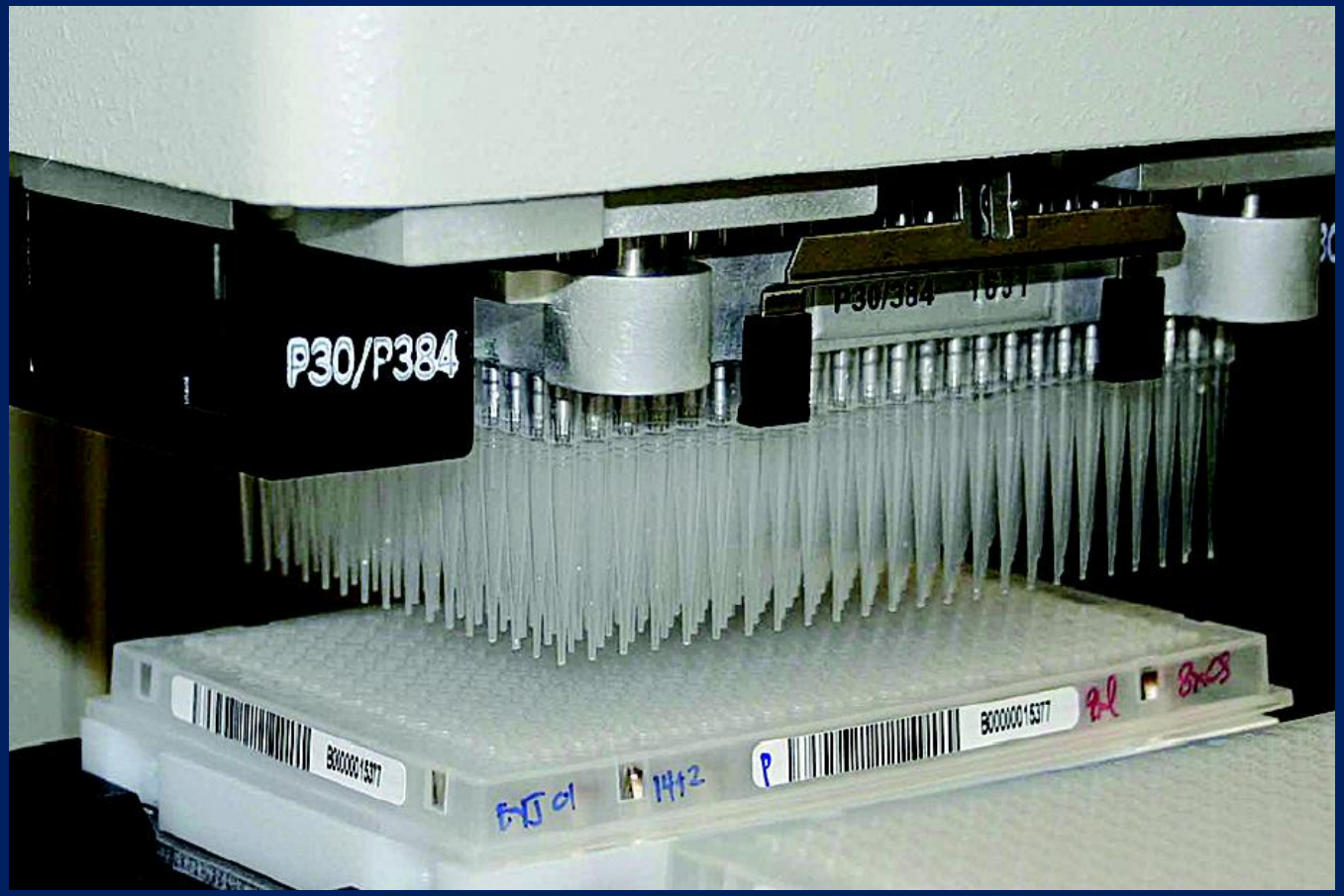


https://www.dnalc.org/view/15479-Sanger-method-of-DNA-sequencing-3D-animation-with-narration.html

https://www.youtube.com/watch?v=IcqamuB6aLI

https://www.youtube.com/watch?v=vK-HlMaitnE

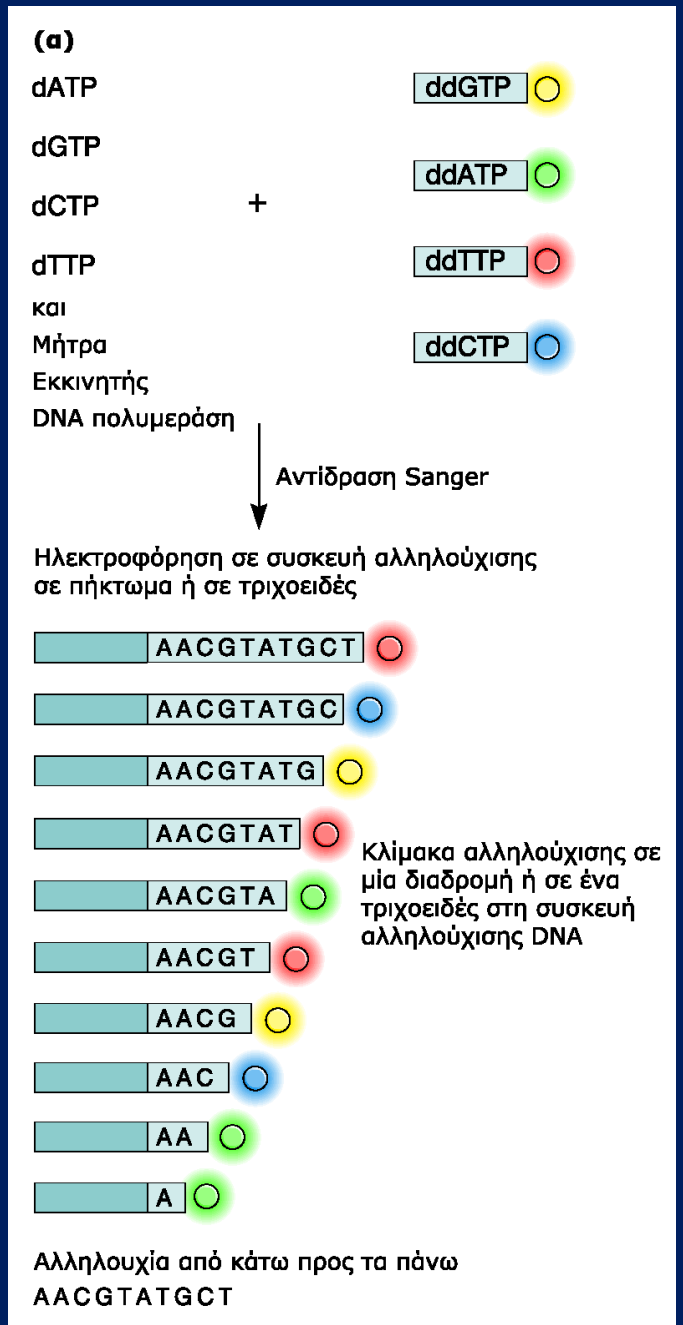
**ΕΙΚΟΝΑ 10.7: Η εισαγωγή ρομποτικών συσκευών αύξησε σημαντικά την παραγωγικότητα των προγραμμάτων αλληλούχισης γονιδιωμάτων.**



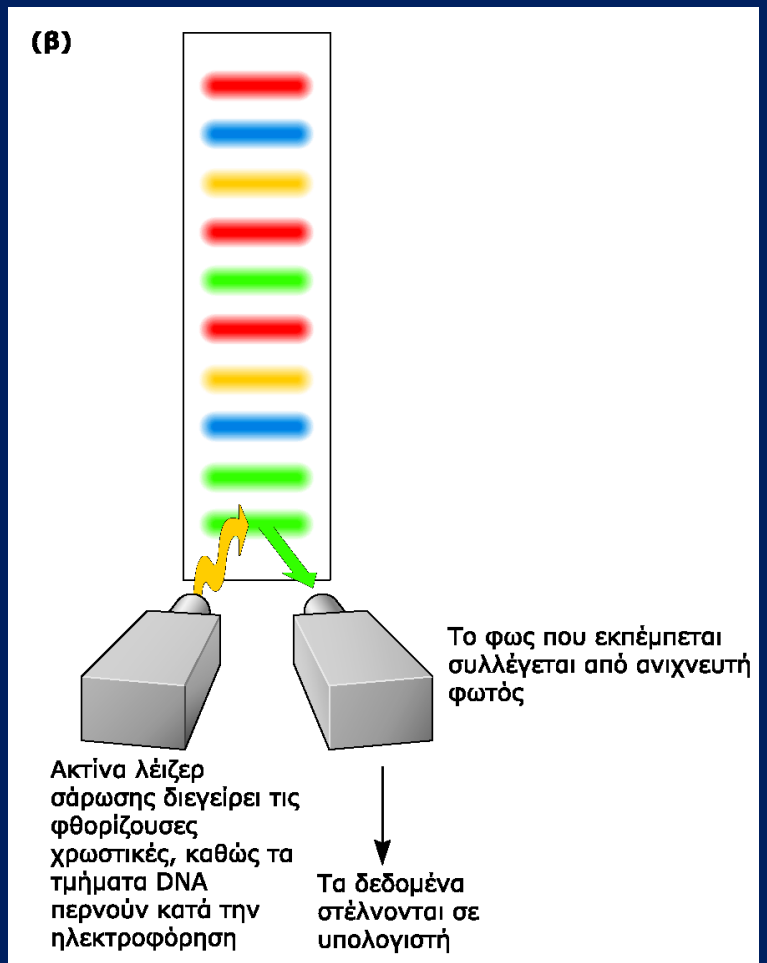
# Τεχνική Hunkapiller and Hood

- Κάθε διαφορετικό ddNTP έχει διαφορετικό χρώμα
- Γίνεται μια αντίδραση και με τα 4 ddNTPs
- Διαβάζεται με leizer
- Δυνατότητα αυτοματισμού
- Χρήση τριχοειδών σωληναρίων

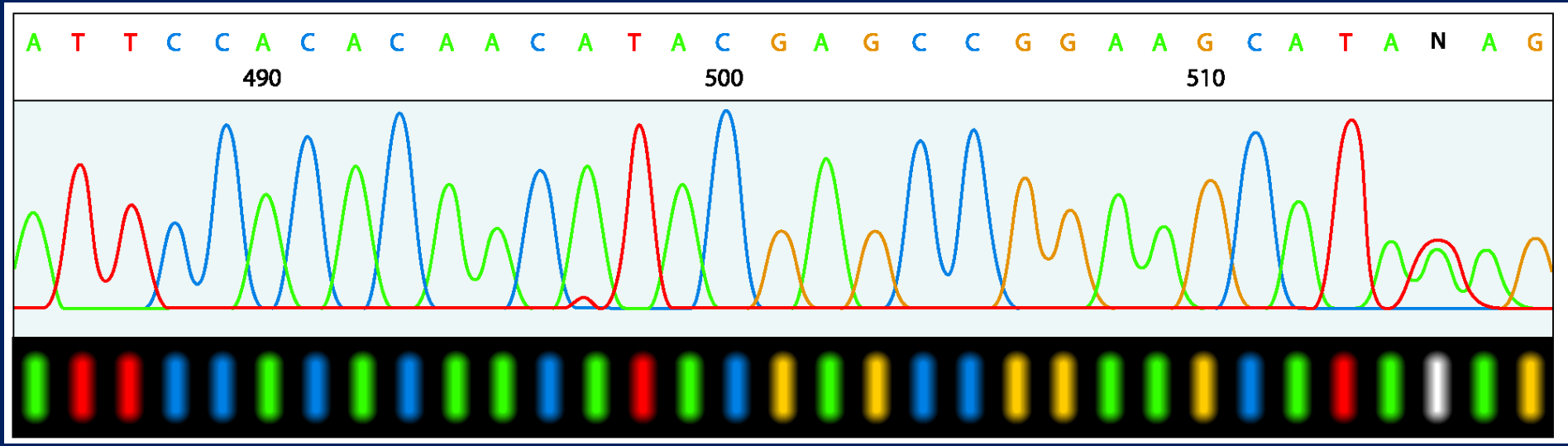
# Αυτοματοποιημένη αλληλούχιση.



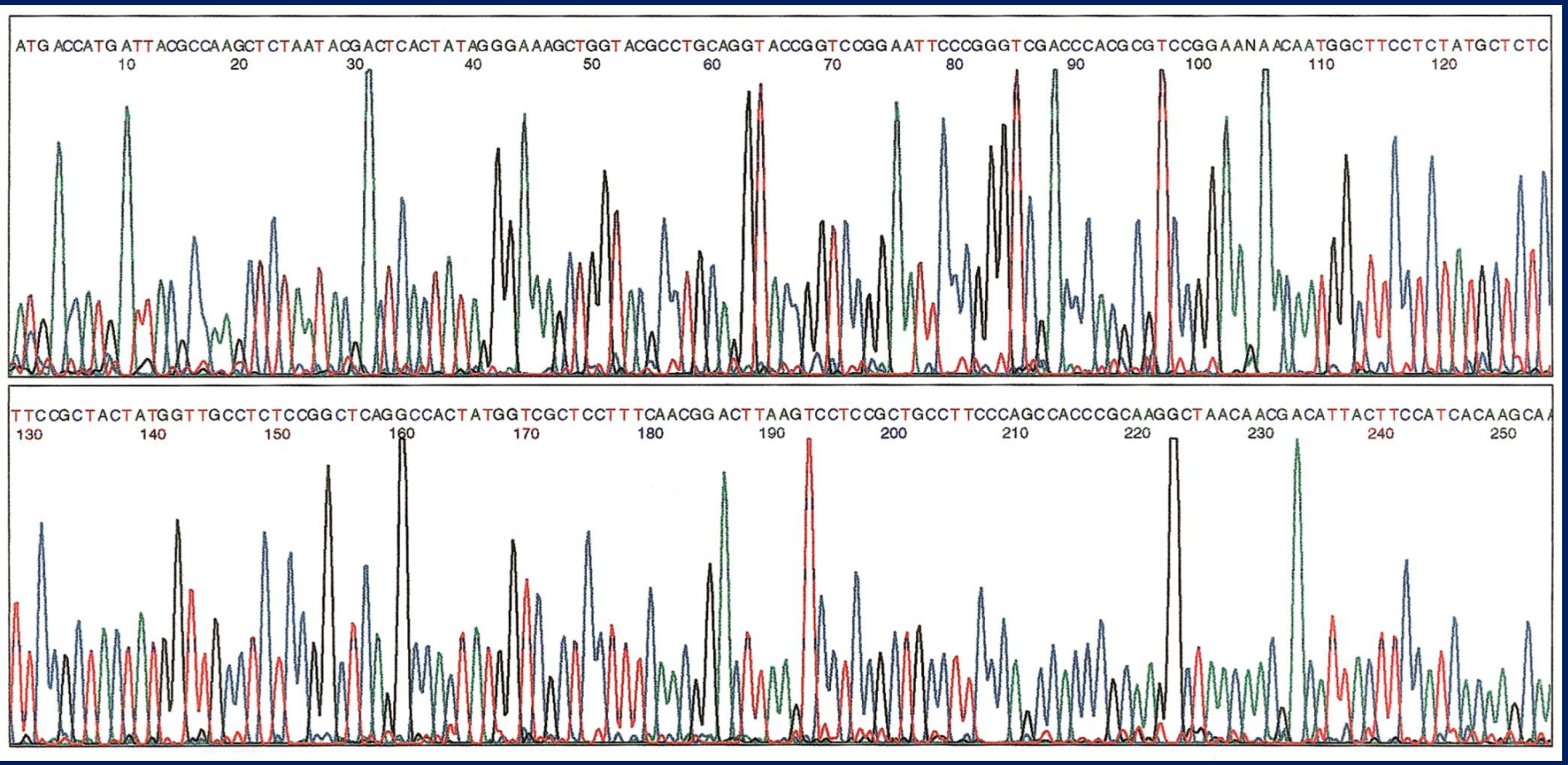

- Κάθε διαφορετικό ddNTP έχει διαφορετικό χρώμα
- Γίνεται μια αντίδραση και με τα 4 ddNTPs
- Διαβάζεται με leizer



ΕΙΚΟΝΑ 10.13: Το αρχείο γραφήματος εκπομπής περιέχει την απεικόνιση των αποτελεσμάτων μιας αντίδρασης αλληλούχισης όπως παράγονται από έναν αυτόματο αναλυτή.



Αποτελέσματα αυτοματοποιημένης αλληλούχισης με διδεοξυ-νουκλεοτίδια σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές.



τελος