

BIOSENSORS

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΦΥΣΙΚΗ ΙΔΙΟΤΗΤΑ
Οπτικές μέθοδοι	
Φλογοφωτομετρία	εκπεμπόμενη ακτινοβολία
Φθορισμομετρία α. ακτινών χ	εκπεμπόμενη ακτινοβολία
β. υπεριώδους	εκπεμπόμενη ακτινοβολία
γ. ορατού	εκπεμπόμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία απορρόφησης υπεριώδους	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία απορρόφησης ορατού	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία απορρόφησης υπέρυθρου	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία υπέρυθρης απορρόφησης	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοσκοπία Raman	σκεδαζόμενη ακτινοβολία
Θολωσιμετρία	σκεδαζόμενη ακτινοβολία
Νεφελομετρία	σκεδαζόμενη ακτινοβολία
Πολωσιμετρία	στροφή επιπέδου πολωμένου φωτός
Διαθλασιμετρία	δείκτης διάθλασης
Ηλεκτρικές μέθοδοι	
Ποτενσιομετρία	δυναμικό
Κουλομετρία	ποσότητα ηλεκτρισμού
Πολαρογραφία	ένταση ρεύματος
Αμπερομετρία	ένταση ρεύματος
Αγωγιμομετρία	αγωγιμότητα
Διάφορες άλλες μέθοδοι	
Φασματοσκοπία μαζών	λόγος μάζας προς σθένος προϊόντων θραύσης
Ραδιοχημικές μέθοδοι	
Ραδιοχημική	εκπεμπόμενη ακτινοβολία α, β, γ

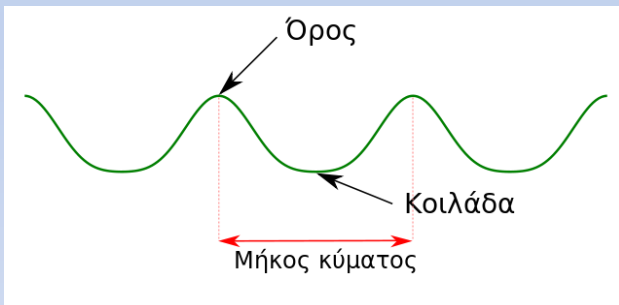
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ (UV-Vis)

Το φως είναι κύμα και σωματίδιο.

Εγκάρσιο κύμα με ταχύτητα στο κενό ίση με $c = 3 \times 10^8$ m/s,

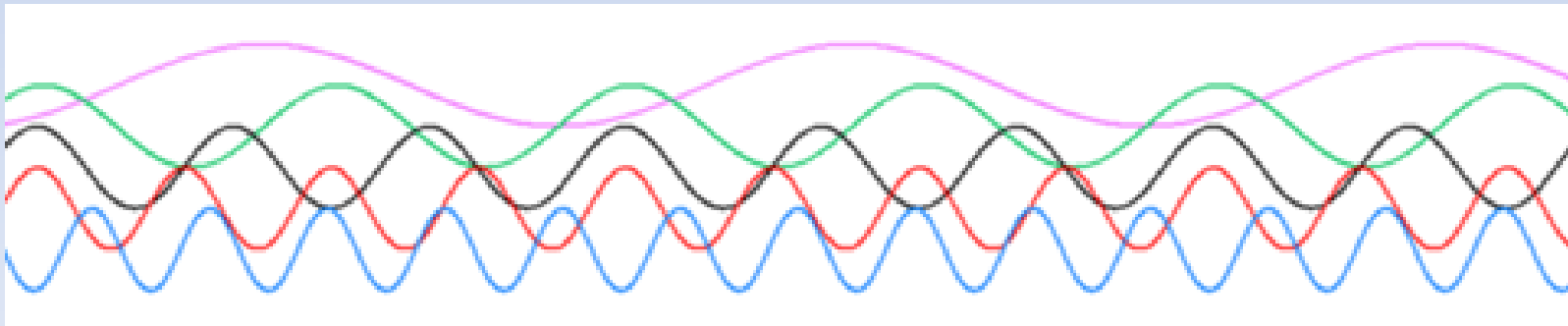
και με τη σχέση $c = \lambda \cdot \nu$

όπου λ = μήκος κύματος, και ν = συχνότητα του κύματος.

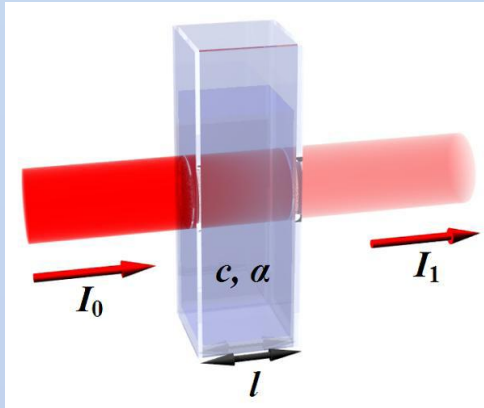


A. Εγκάρσιο κύμα.

B. Πέντε εγκάρσια κύματα που έχουν την ίδια ταχύτητα. Όπου είναι μεγάλο το μήκος κύματος είναι μικρή η συχνότητα και αντίστροφα. Πηγή: Wikipedia, όροι κύμα, συχνότητα, πρόσβαση στις 25/03/2014.



Απορρόφηση διαλύματος μέσω κυψελίδας



το ανοιχτό μπλε διάλυμα μέσα στη κυψελίδα απορροφά κόκκινο φως, έτσι ώστε η ένταση $I_0 > I_1$, πράγμα που σημαίνει ότι το διάλυμα έχει απορροφήσει μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

Ορίζουμε ως **απορροφητικότητα, A** , ενός διαλύματος σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος

$$A = \log I_0/I_1 \quad (1)$$

Η οποία σύμφωνα με τον νόμο των Lambert-Beer ισούται με

$$\mathbf{A = \epsilon c l} \quad (2)$$

όπου: I_0 = η ένταση της ακτινοβολίας που προσπίπτει στο διάλυμα

I_1 = η ένταση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το διάλυμα

ϵ = συντελεστής γραμμομοριακής απόσβεσης (σταθερά χαρακτηριστική της ουσίας, του μήκους κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε και των συνθηκών της μέτρησης, όπως διαλύτης, pH, κ.λ.π.) σε μονάδες $M^{-1}cm^{-1}$

c = η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα, σε moles/L, M.

l = το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα στο διάλυμα (δηλ. το εσωτερικό πάχος της κυψελίδας στην οποία βρίσκεται το διάλυμα), το οποίο στο 99,9 % των περιπτώσεων ισούται με 1 cm.

Αν στην εξίσωση (2) $A = \epsilon c l$

θέσουμε $c = 1 \text{ M}$, και $l = 1 \text{ cm}$,

τότε $\epsilon = A$, όταν η ουσία είναι σε συγκέντρωση 1 M .

- Επειδή οι τιμές του ϵ για τις περισσότερες ουσίες είναι από 1000 έως $10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,

- Επειδή τα φασματοφωτόμετρα δίνουν αξιόπιστες μετρήσεις απορροφητικότητας μέχρι την τιμή του **1,00** ή το πολύ 2,00,

Για να έχουμε αξιόπιστες τιμές απορροφητικότητας θα πρέπει οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις να κυμαίνονται από χαμηλά επίπεδα mM (10^{-3} M) μέχρι πολύ χαμηλά επίπεδα μM (10^{-6} M).

Ο Νόμος των Beer-Lambert ισχύει για αυστηρά μονοχρωματική ακτινοβολία.

<https://www.youtube.com/watch?v=pxC6F7bK8CU>

<https://www.youtube.com/watch?v=Rem9KkolKBI>

<https://www.youtube.com/watch?v=b04OhT4UBzU>

Κατασκευή διαγράμματος με τη χρήση του Microsoft Excel

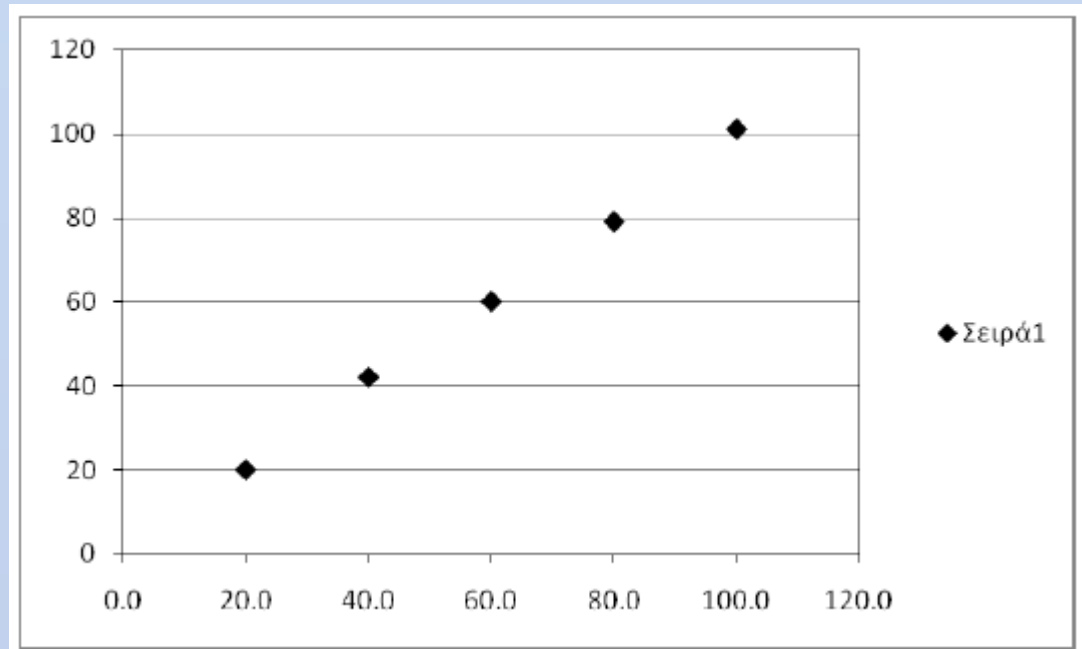
1ο Στάδιο: Τοποθέτηση σημείων στο διάγραμμα και έλεγχος για την ύπαρξη σημείων που αποκλίνουν της γραμμικότητας.

Παράδειγμα:

Κατά τον φλογωφωτομετρικό προσδιορισμό του Ca σε νερό μετρήθηκαν τα εξής πρότυπα που έδωσαν τις παρακάτω εντάσεις εκπεμπόμενης ακτινοβολίας:

[Ca] mg/L	P (Ένταση εκπεμπόμενης ακτινοβολίας)
20	20
40	42
60	60
80	79
100	101

Κατασκευή διαγράμματος σε xl

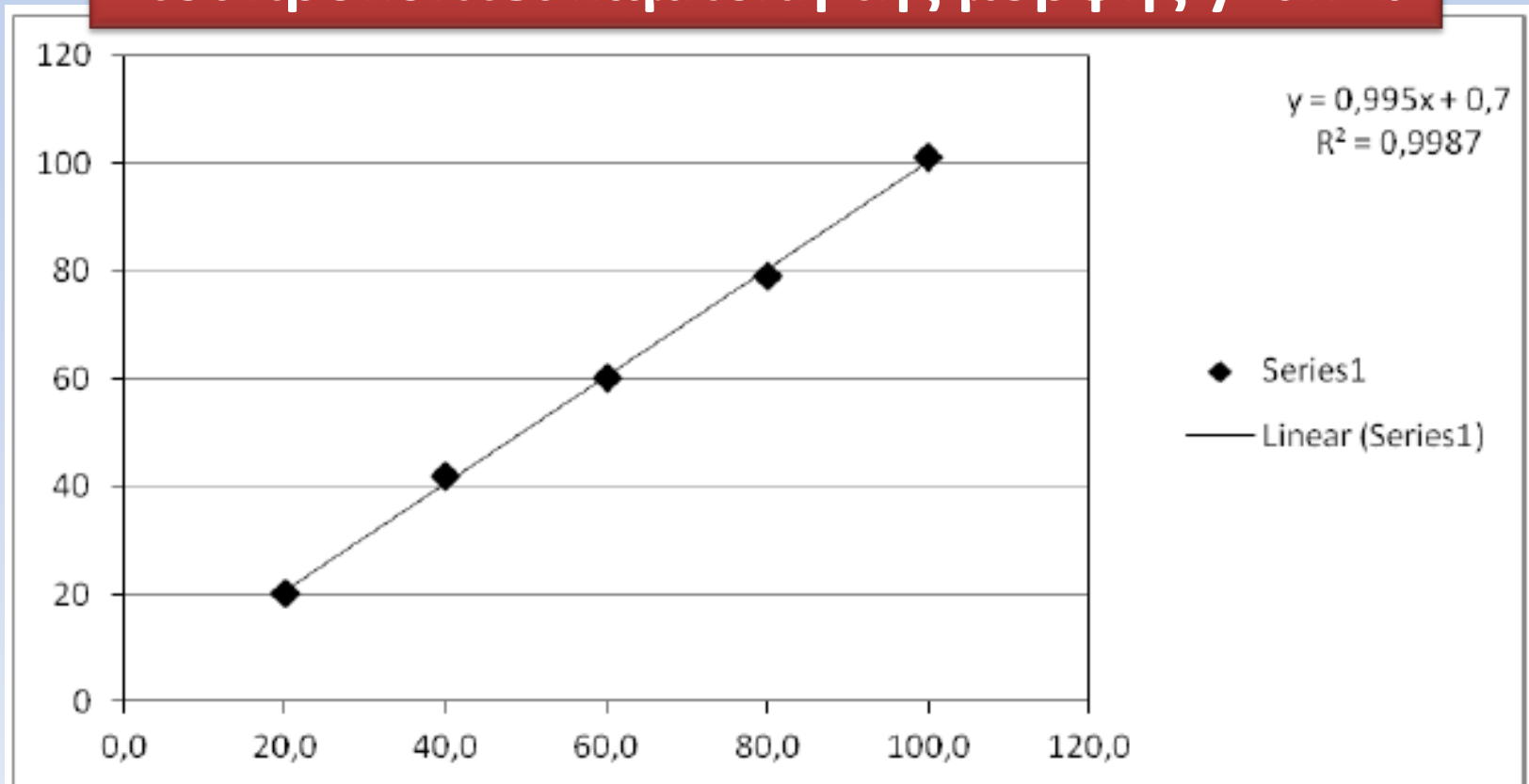


Οπτικός έλεγχος για την ύπαρξη τιμών που αποκλίνουν της γραμμικότητας. Οι τιμές θα πρέπει να είναι τυχαία κατανεμημένες και να μην αποκλίνουν σημαντικά από τη γραμμή τάσης.

2ο Στάδιο: Προσθήκη γραμμής τάσης / μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων

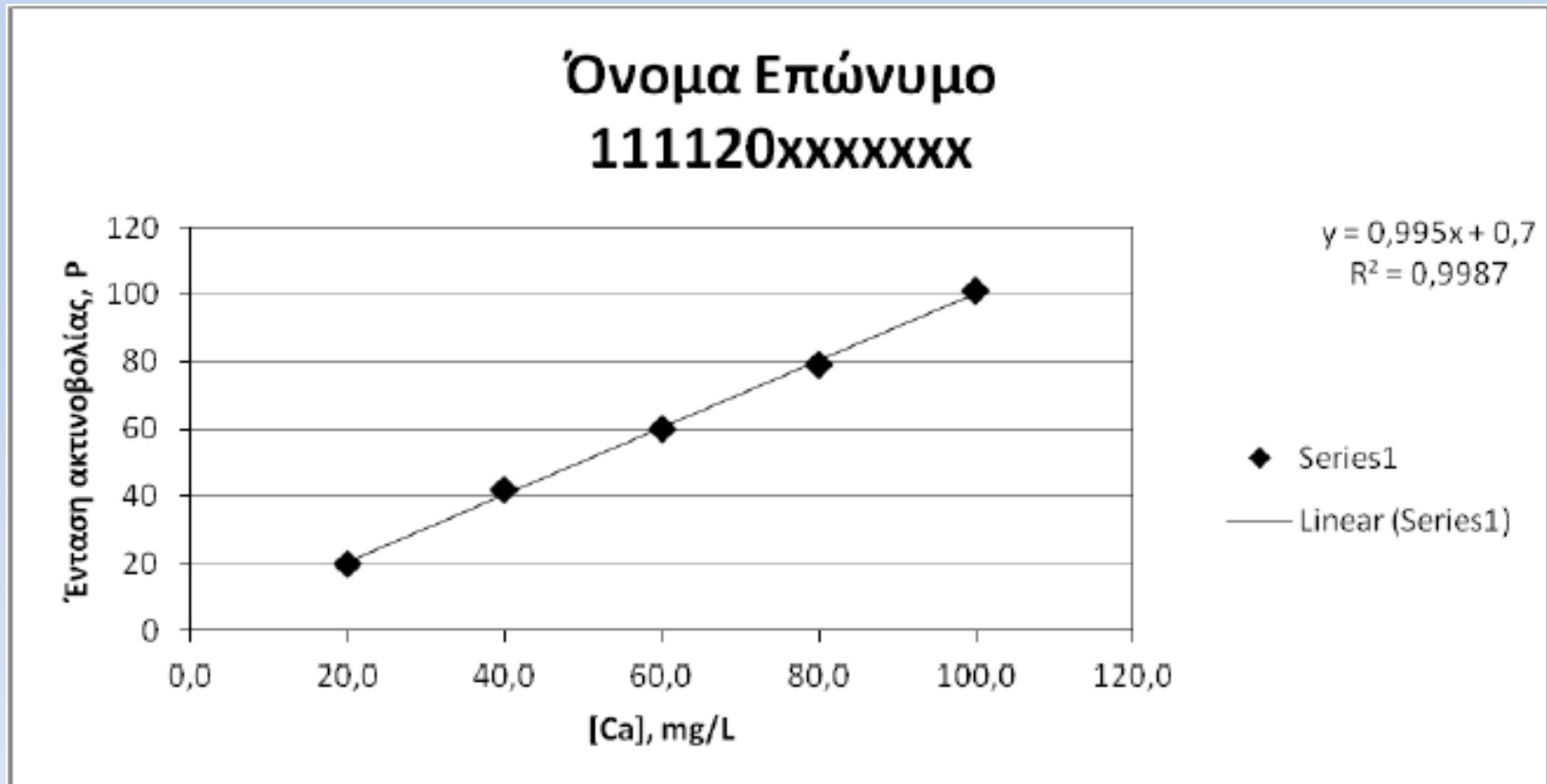
Κάνοντας δεξί κλικ στα σημεία και επιλέγοντας «Προσθήκη γραμμής τάσης...» και στη συνέχεια με κλικ στις επιλογές «Προβολή εξίσωσης στο γράφημα» και «Εμφάνιση της τιμής R-τετράγωνο στο γράφημα».

Έτσι προκύπτει καμπύλη της μορφής $y=ax+b$



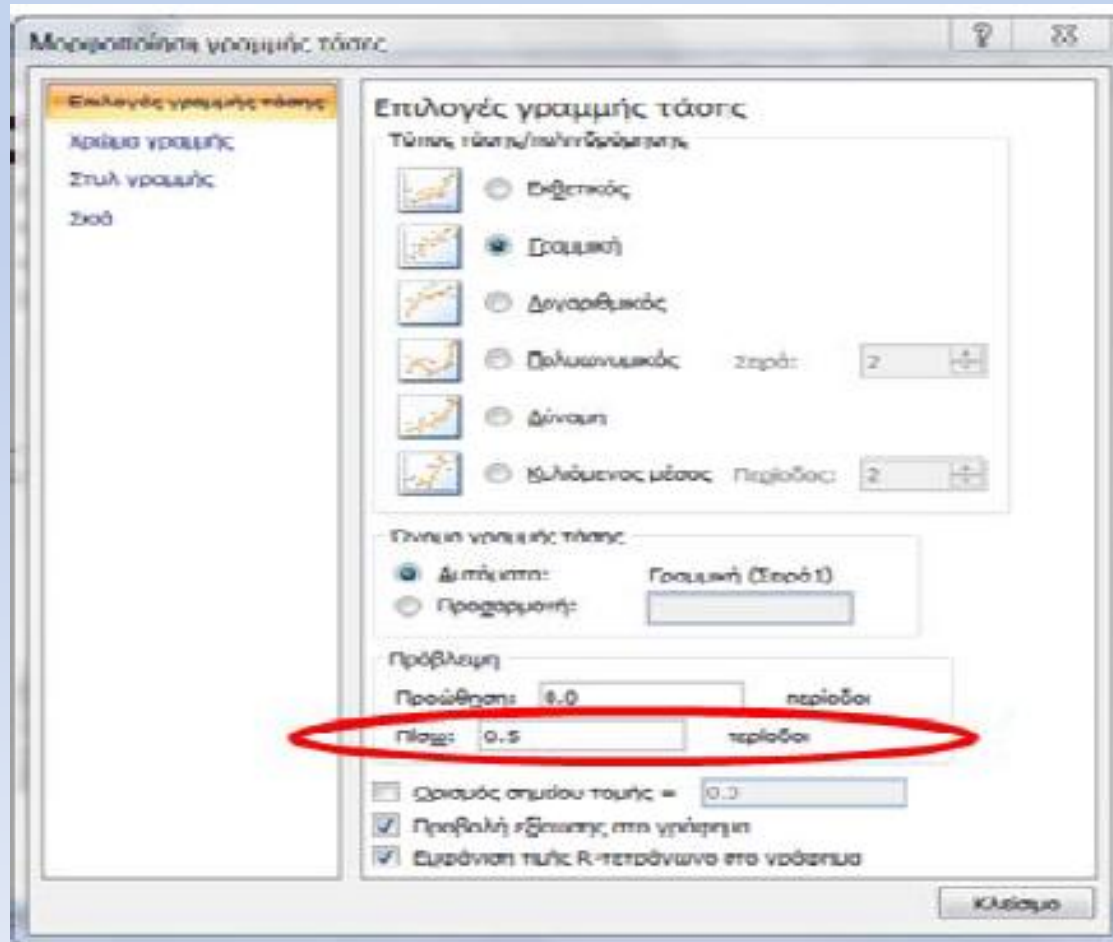
3ο Στάδιο: Μορφοποίηση του γραφήματος

Στο τέλος προστίθενται οι τίτλοι στους άξονες (Σήμα, μονάδες & Συγκέντρωση, μονάδες)

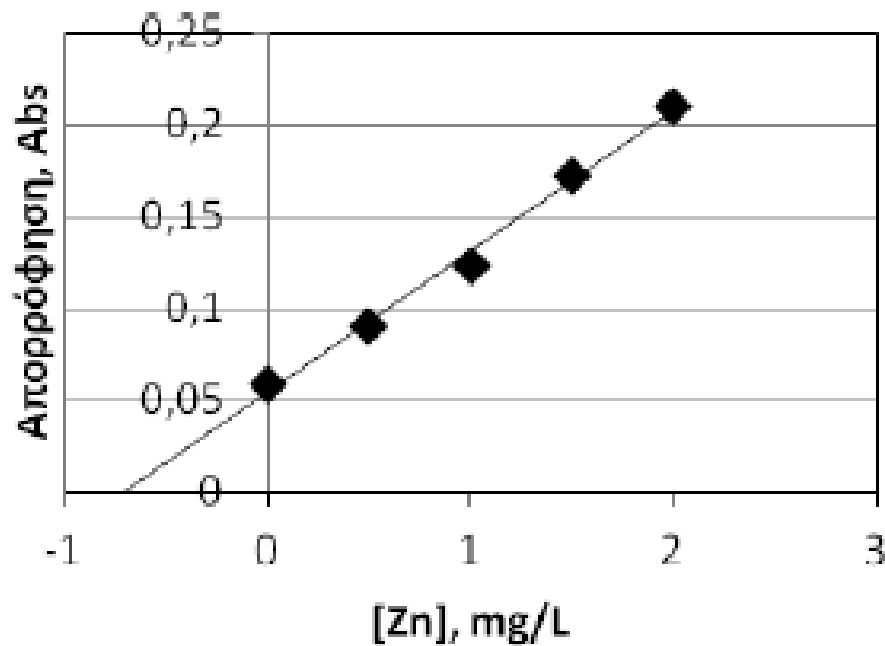


4ο Στάδιο: Προέκταση της γραμμής τάσης

Υπάρχουν περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν τα α και β , οπότε απαιτείται προέκταση της γραμμής τάσης στο σημείο που τέμνει τον άξονα x . Για να γίνει αυτό θα πρέπει επιλεγεί η γραμμή τάσης και δεξί κλικ. Επιλογή «**Μορφοποίηση γραμμής τάσης**» όπου επιλέγονται πόσες μονάδες πρέπει να πάει πίσω η γραμμή τάσης.



Όνομα Επώνυμο 111120xxxxxxxx



$$y = 0,0768x + 0,0542$$
$$R^2 = 0,9939$$

- ◆ Series1
- Linear (Series1)

Ποσοτικός Προσδιορισμός άγνωστης ποσότητας γνωστής ουσίας

Ποσοτικός προσδιορισμός με Πρότυπο Διάλυμα

Έστω ότι το πρότυπο διάλυμα Δπ έχει συγκέντρωση C_{π} και η απορρόφησή του είναι ίση με A_{π} .

Η απορρόφηση του άγνωστου διαλύματος Δx συγκέντρωσης C_x έστω ότι είναι ίση με A_x .

Με εφαρμογή του νόμου των Lambert-Beer για τα δύο διαλύματα, έχουμε:

Άγνωστο Διάλυμα: $A_x = k l C_x$ (Εξίσωση 1.2)

Πρότυπο Διάλυμα: $A_{\pi} = k l C_{\pi}$ (Εξίσωση 1.3)

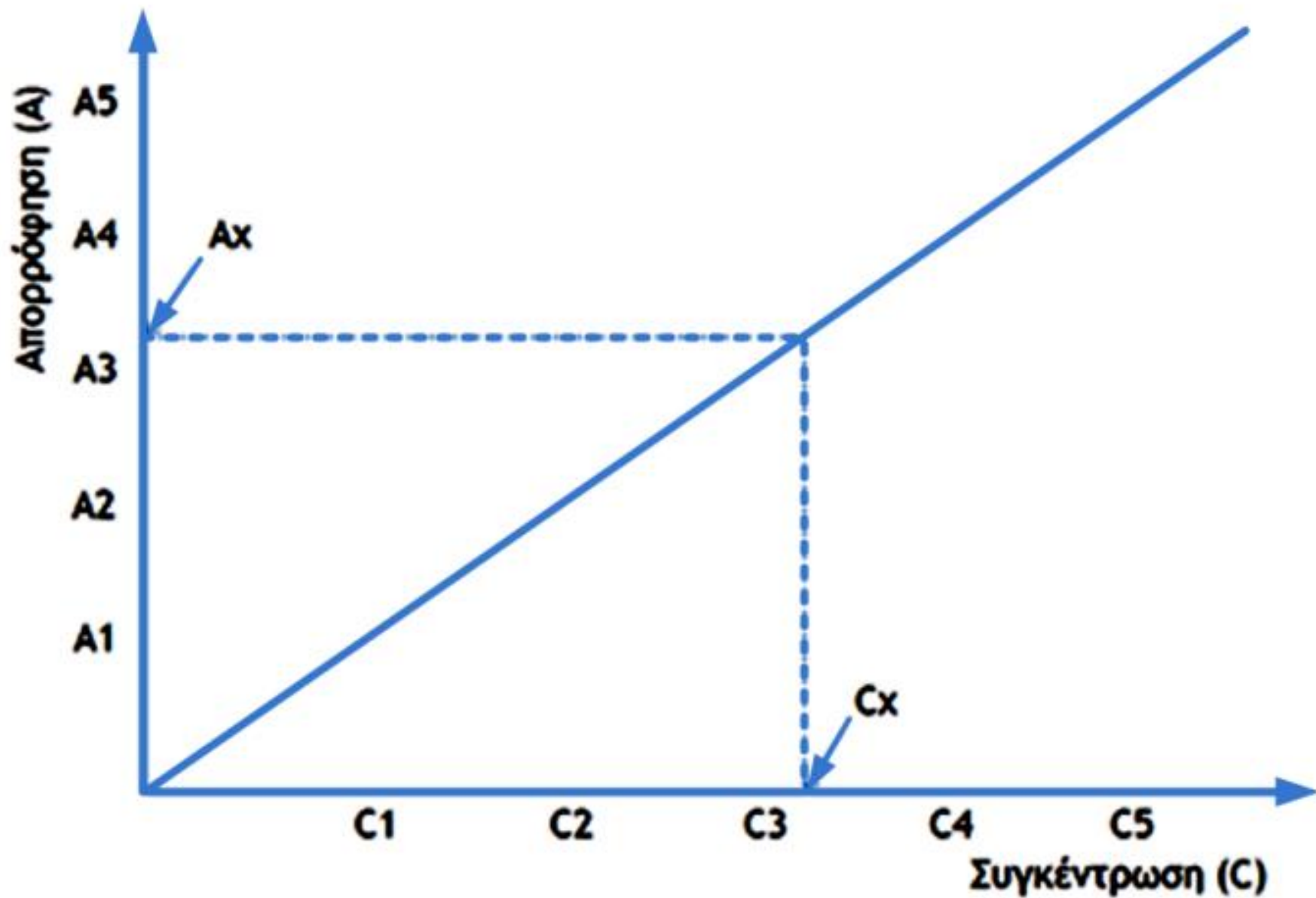
Με διαίρεση κατά μέλη έχουμε: $A_x / A_{\pi} = C_x / C_{\pi}$

Λύνοντας ως προς C_x έχουμε: $C_x = (A_x / A_{\pi}) C_{\pi}$ (Εξίσωση 1.4)

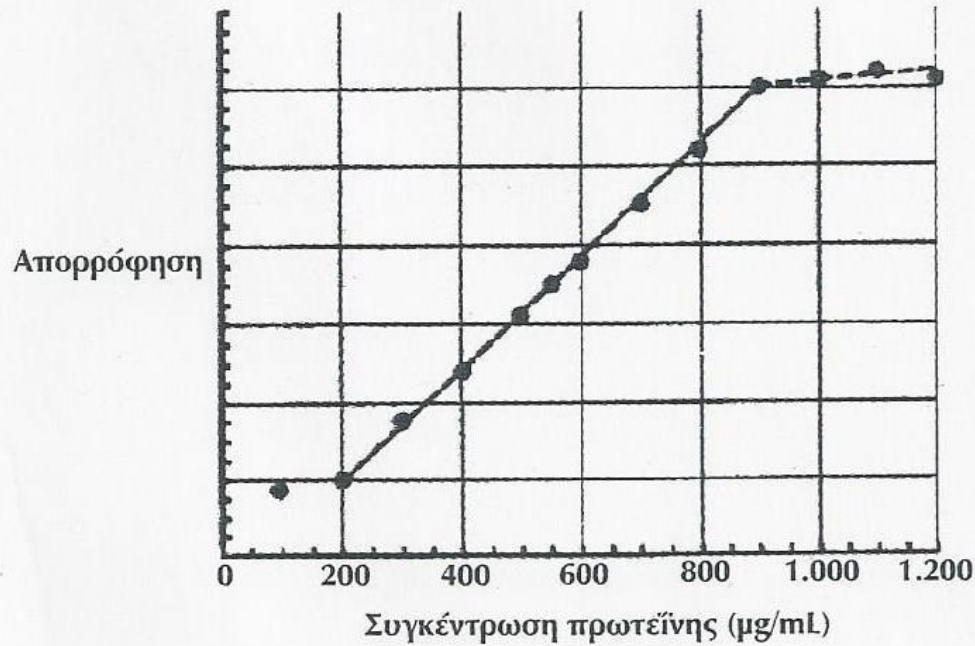
Ο ποσοτικός προσδιορισμός με κατασκευή Πρότυπης Καμπύλης Χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα της ουσίας που θέλουμε να αναλύσουμε.

Με φωτομέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων λαμβάνουμε τις απορροφήσεις τους (A_i).

Με γραφική παράσταση, σε σύστημα ορθογώνιων αξόνων, των ζευγών (A_i , C_i) κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4 Πρότυπη καμπύλη.



Εικόνα 3. Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΕΙΝΑΙ ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΣΕ ΕΝΑ ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΟΜΕΝΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΑΛΛΑ ΜΗ ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΣΕ ΥΨΗΛΕΣ Ή ΣΕ ΠΟΛΥ ΧΑΜΗΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ.

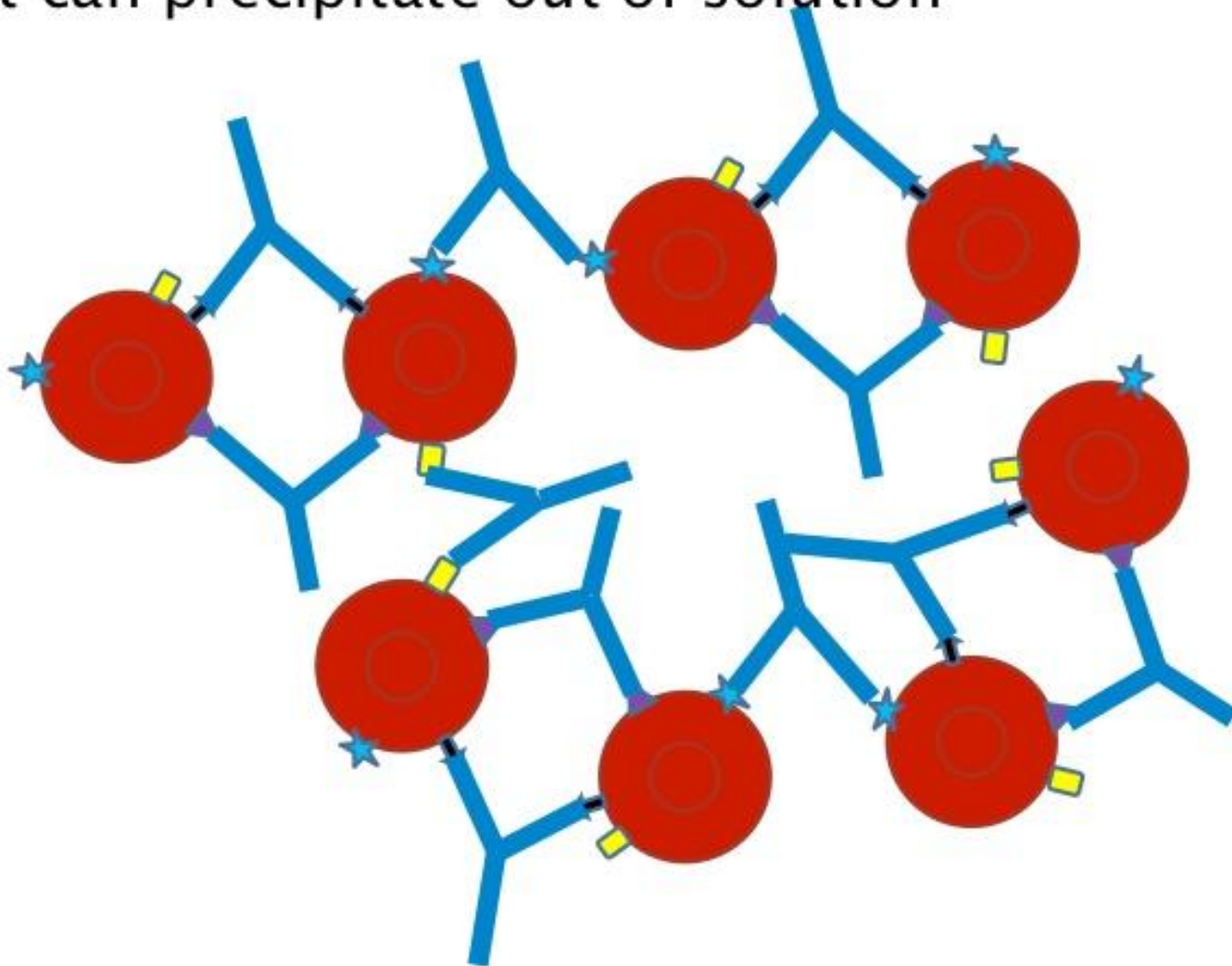
ΑΝΟΣΟΧΗΜΕΙΑ

Antigen (Ag)



Antibodies
(Ab)

Precipitin reaction: Ab binds soluble Ag to form aggregation of Ab-Ag complex (immune complex) that can precipitate out of solution



ΑΝΟΣΟΧΗΜΕΙΑ

- ❖ Προσδιορισμοί που στηρίζονται στην αντίδραση αντιγόνου (Ag) - αντισώματος (Ab), ισχυρή αλλά αναστρέψιμη
- ❖ Χρήση Ag ή Ab σημασμένου με «ανιχνευτές»:
 - ❖ Ένζυμα, horseradish peroxidase, αλκαλική φωσφατάση, β-γαλακτοσιδάση, ουρεάση
 - ❖ Ραδιοϊσότοπα
 - ❖ Φθορίζουσες χρωστικές
- ❖ Μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα
- ❖ Προσδιορίζονται ουσίες μικρού μοριακού βάρους, π.χ. Ορμόνες, φάρμακα (αντιγόνο) και αντισώματα

ΒΗΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- ❖ Τοποθέτηση υποστρώματος στην πλάκα
- ❖ Προσθήκη δείγματος
- ❖ Προσθήκη ανιχνευτή σημασμένου
- ❖ Προσθήκη χρωμογόνου (EIA, ELISA)
- ❖ Ανίχνευση ακτινοβολίας

ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

```
graph TD; A[ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ] --> B[ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΡΧΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ]; A --> C[ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΤΕΛΙΚΟΥ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ];
```

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΡΧΙΚΗΣ
ΦΑΣΗΣ

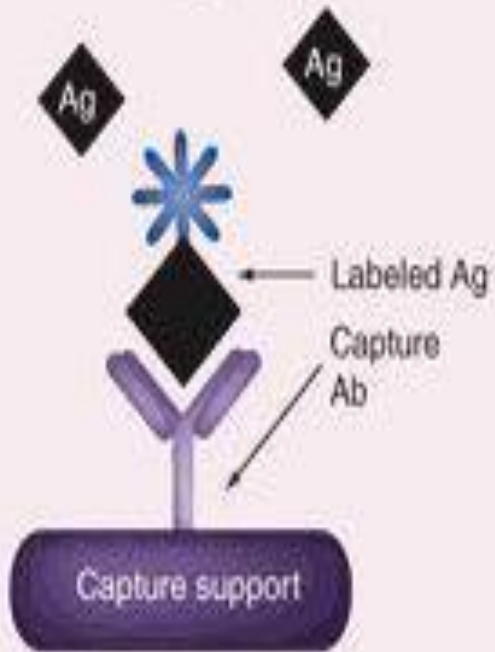
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΤΕΛΙΚΟΥ
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ

A. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΡΧΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ

- ❖ Ανταγωνιστικές μέθοδοι (χρήση σημασμένου Ag) - αποτέλεσμα αντιστρόφως ανάλογο της C
 - ❖ Ραδιοανοσοχημικές (RIA)
 - ❖ Ενζυμοανοσοχημικές (EIA)
 - ❖ Ανοσοχημειοφωταύγεια (CHIA)
 - ❖ Ανοσοφθορισμομετρικές (FIA)

©

Competitive binding assay



- ❖ IRMA
- ❖ ELISA
- ❖ ICHMA

- ❖ RIA
- ❖ EIA
- ❖ CHIA
- ❖ FIA

Ⓐ

Immunometric assay



ΤΕΧΝΙΚΕΣ ELISA

(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

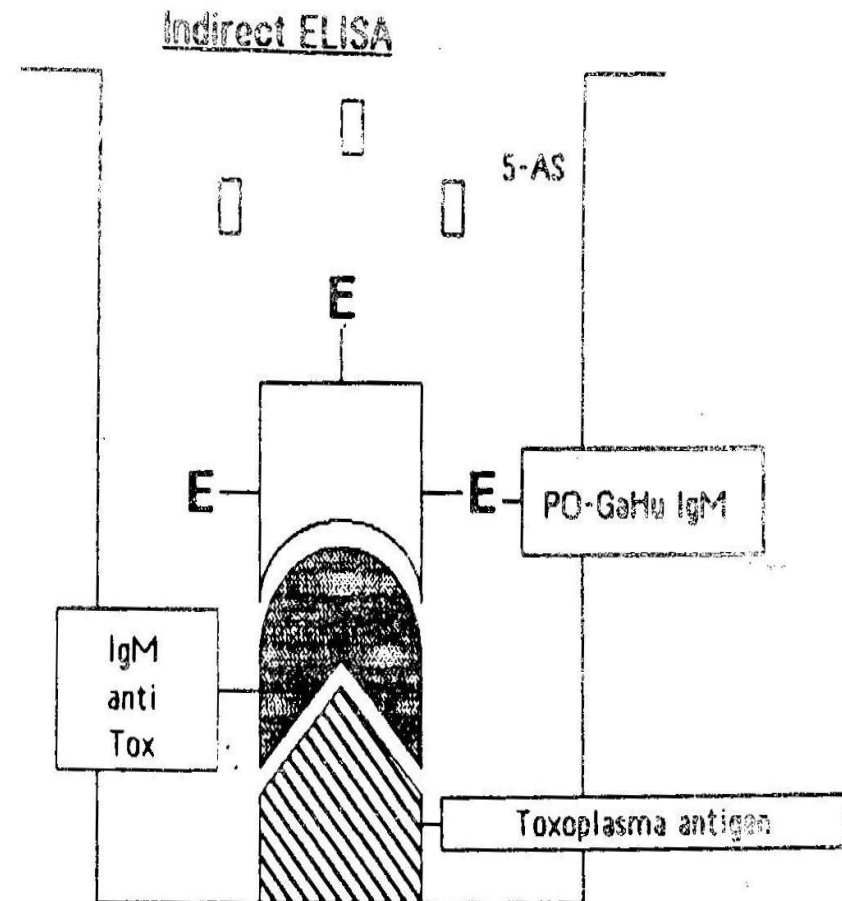
- ❖ Ομοιογενείς τεχνικές ELISA:
 - Γίνονται σε ένα χρόνο
 - **Ανίχνευση φαρμάκων**, π.χ. διγοξίνη, γενταμυκίνη (**ΜΙΚΡΩΝ** μορίων)
- ❖ Ετερογενείς τεχνικές ELISA
 - Απαιτείται διαχωρισμός αντιδρώντων - μη αντιδρώντων (πλυσίματα), **ΛΙΓΟΤΕΡΟ ΤΑΧΕΙΕΣ**
 - Ανίχνευση Ag ή Ab και πρωτεϊνών ορού σε λοιμώδη νοσήματα (**ΜΙΚΡΑ & ΜΕΓΑΛΑ** μόρια).

ELISA ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

- ❖ Ανταγωνιστική ELISA
 - Συνδεδεμένα με E Abs ανταγωνίζονται τα Abs του δείγματος
 - Δεν διαχωρίζει τάξεις ανοσοσφαιρινών
- ❖ Έμμεση ELISA
- ❖ Δεσμευτική (capture) ELISA

ΕΜΜΕΣΗ (SANDWICH) ELISA

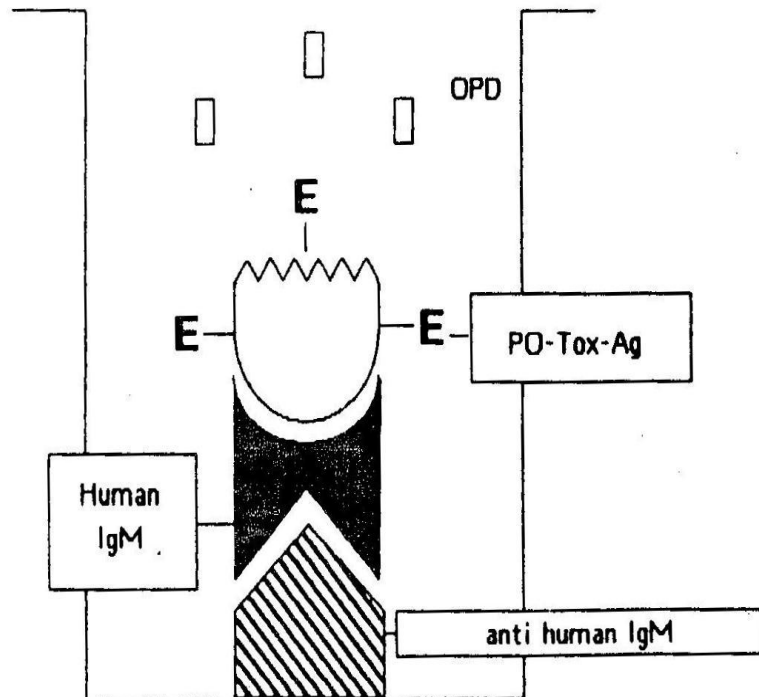
- ❖ Ag + Ab ορού + αντιανθρώπιος γ-σφαιρίνη συνδεδεμένης με E
- ❖ Ορολογική διάγνωση λοιμωδών νοσημάτων
- ❖ Διαχωρίζει τάξεις ανοσοσφαιρινών
 - Ψευδώς αρνητικά, αποτελέσματα για IgM και IgA λόγω ανταγωνισμού από IgG
 - Ψευδώς θετικά, λόγω ρευματοειδούς παράγοντα



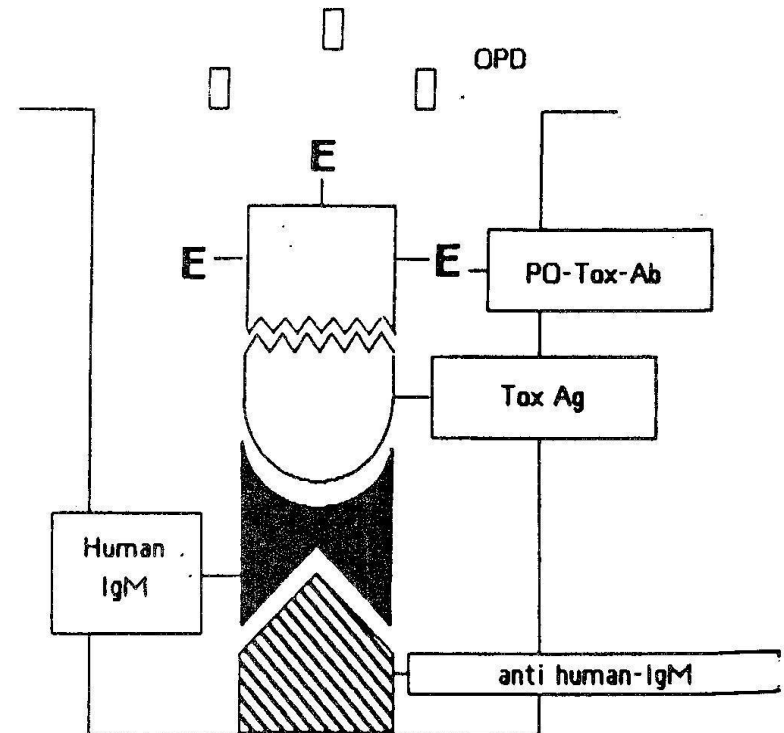
ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ (CAPTURE) ELISA ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

❖ Ανίχνευση μιας τάξης (M ή A) ανοσοσφαιρινών

Antibody capture ELISA



Antibody capture ELISA



ELISA ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ

❖ Ανταγωνιστική ELISA

- Ανίχνευση αφυλατοξίνης στον ορό

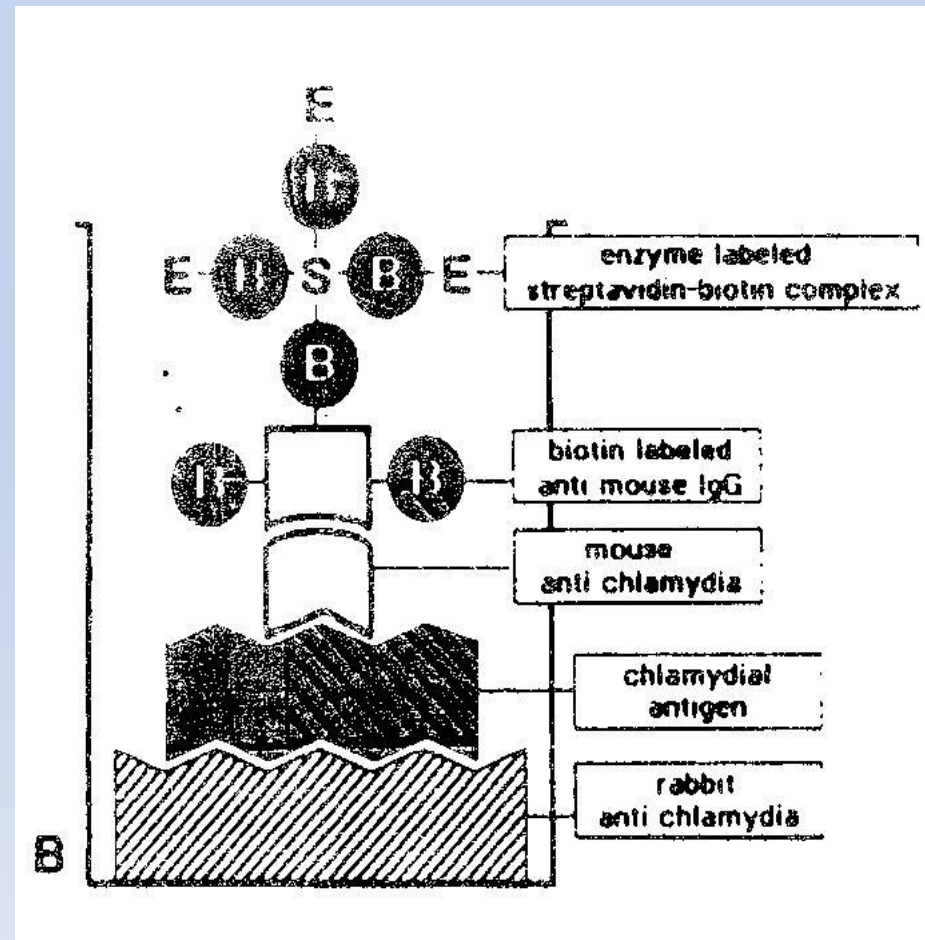
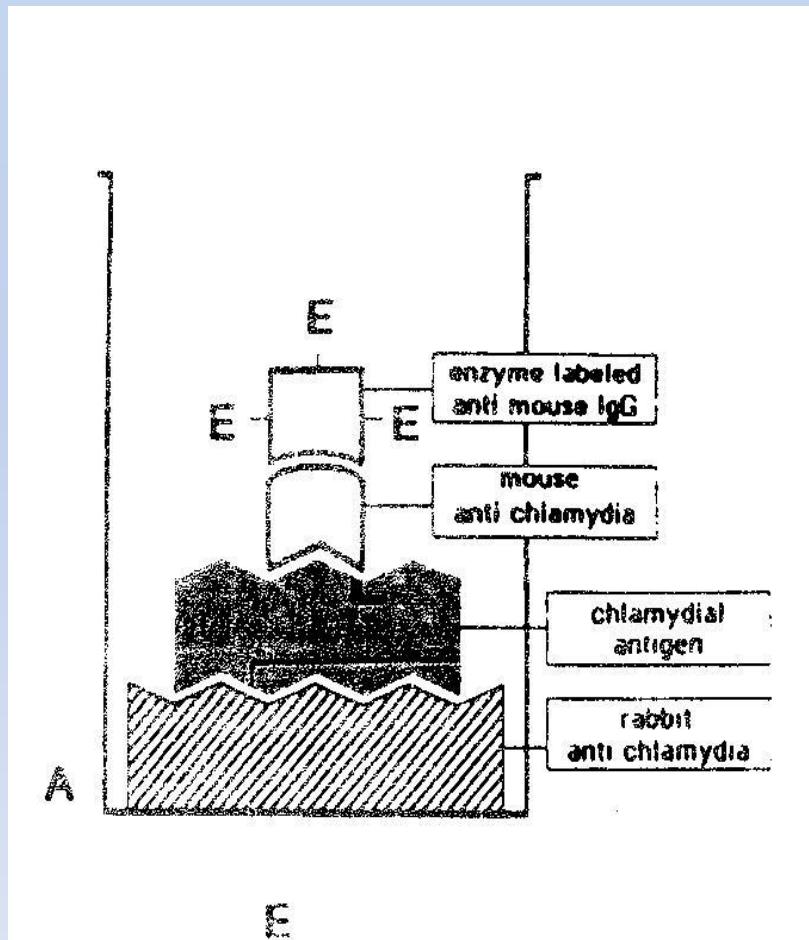
❖ Dot-spot ELISA

- Τοποθέτηση κηλίδας δείγματος πάνω σε ταινία νιτροκυτταρίνης
- Προσθήκη συνδεδεμένου με E Ab ή μη συνδεδεμένου με αντι-Ab με E
- Ανίχνευση αντισωμάτων σε μικρές ποσότητες, π.χ. έναντι του Τρεπονήματος του ωχρού

❖ Δεσμευτική (Capture) ELISA

- Χλαμύδιο του τραχώματος και Giardia Lamblia στα κόπρανα

ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ (CAPTURE) ELISA ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ (διπλού Sandwich)



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

- ❖ Μικροβιολογία
- ❖ Ιολογία
- ❖ Σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα
- ❖ Μυκητολογία
- ❖ Παρασιτολογία
- ❖ Αυτοάνοσα νοσήματα
- ❖ Καρκίνος
- ❖ Ορμόνες
- ❖ Αλλεργίες
- ❖ Αιματολογία

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

- ❖ Ανίχνευση αντιδιφθεριτικής τοξίνης
- ❖ Βρουκέλλες
- ❖ Λεγεωνέλλες
- ❖ *Campylobacter jejuni*
 - IgG, IgM
 - Εντεροτοξίνη
- ❖ Δονάκιο της χολέρας

ΙΟΛΟΓΙΑ

- ❖ Απλού Έρπητα
- ❖ Ανεμευλογιάς
- ❖ CMV
- ❖ Epstein Barr
- ❖ Γρίπης
- ❖ Ερυθράς, Ιλαράς, Παρωτίτιδας
- ❖ Παραϊνφλουέντζας
- ❖ Εντεροϊούς
- ❖ Αδενοϊούς
- ❖ Rota
- ❖ Ηπατίτιδας

ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΩΣ ΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

- Ναϊσσέρια γονορροϊκή
- Ιό Απλού Έρπητα
- Χλαμύδιο τραχώματος
(δεσμευτική Ag ELISA)
- AIDS (screening)

ΠΑΡΑΣΙΤΩΣΕΙΣ

- ❖ IgG: Έμμεση ELISA
- ❖ IgM: Δεσμευτική αντισώματος ELISA

ΜΥΚΗΤΙΑΣΕΙΣ

Επικουρικά στις εν τω
βάθει μυκητιάσεις από

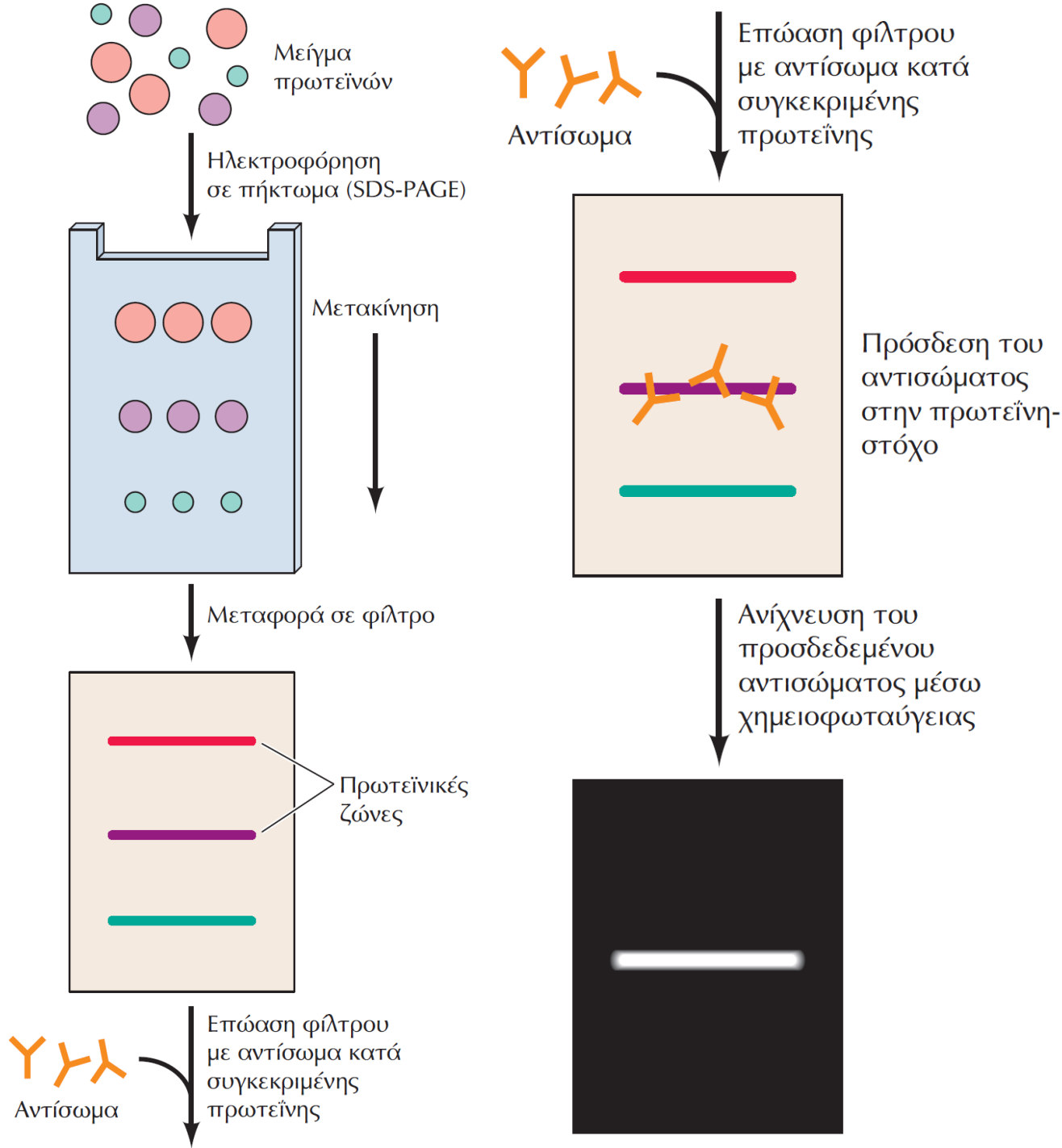
- Ασπέργιλλο
- Κρυπτόκοκκο
- Candida

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ELISA

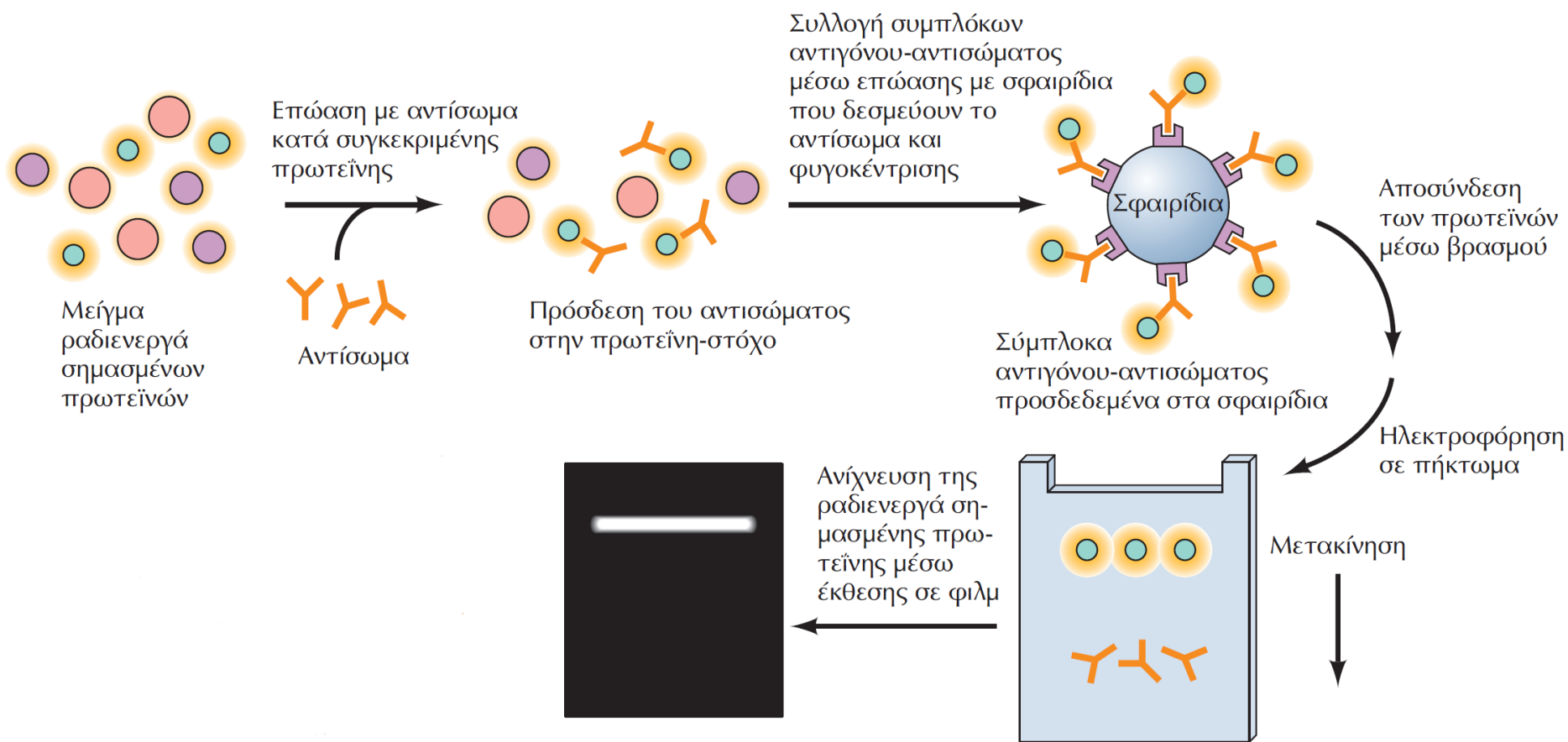
- ❖ Ευαίσθητη
- ❖ Μπορεί να αυτοματοποιηθεί
- ❖ Δεν απαιτεί τόσο εξειδικευμένο προσωπικό
- ❖ Δίνει αντικειμενικά αποτελέσματα
- ❖ Δίνει ποσοτικές και όχι ημιποσοτικές μετρήσεις
- ❖ Μπορούν να ανιχνευτούν και τάξεις των ανοσοσφαιρινών
- ❖ Ευελιξία
- ❖ Προσδιορισμό ουσιών από μίγματα (με δεσμευτική ELISA)

Ανοσοχημικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

- Οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένες
- Κινούνται σε ηλεκτρικό πεδίο ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (αν είναι αποδιαταγμένες)
- Η κίνηση σε ηλεκτρικό πεδίο συμβαίνει σε gel πολυακρυλαμιδίου (PAGE)
- Μετα το τέλος της ηλεκτροφόρησης μπορούν οι πρωτεΐνες να μεταφερθούν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Αν επώασουμε τη νιτροκυτταρίνη με αντίσωμα (Ab) που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη, τότε την προσδιορίζουμε **Ανοσοχημικά**

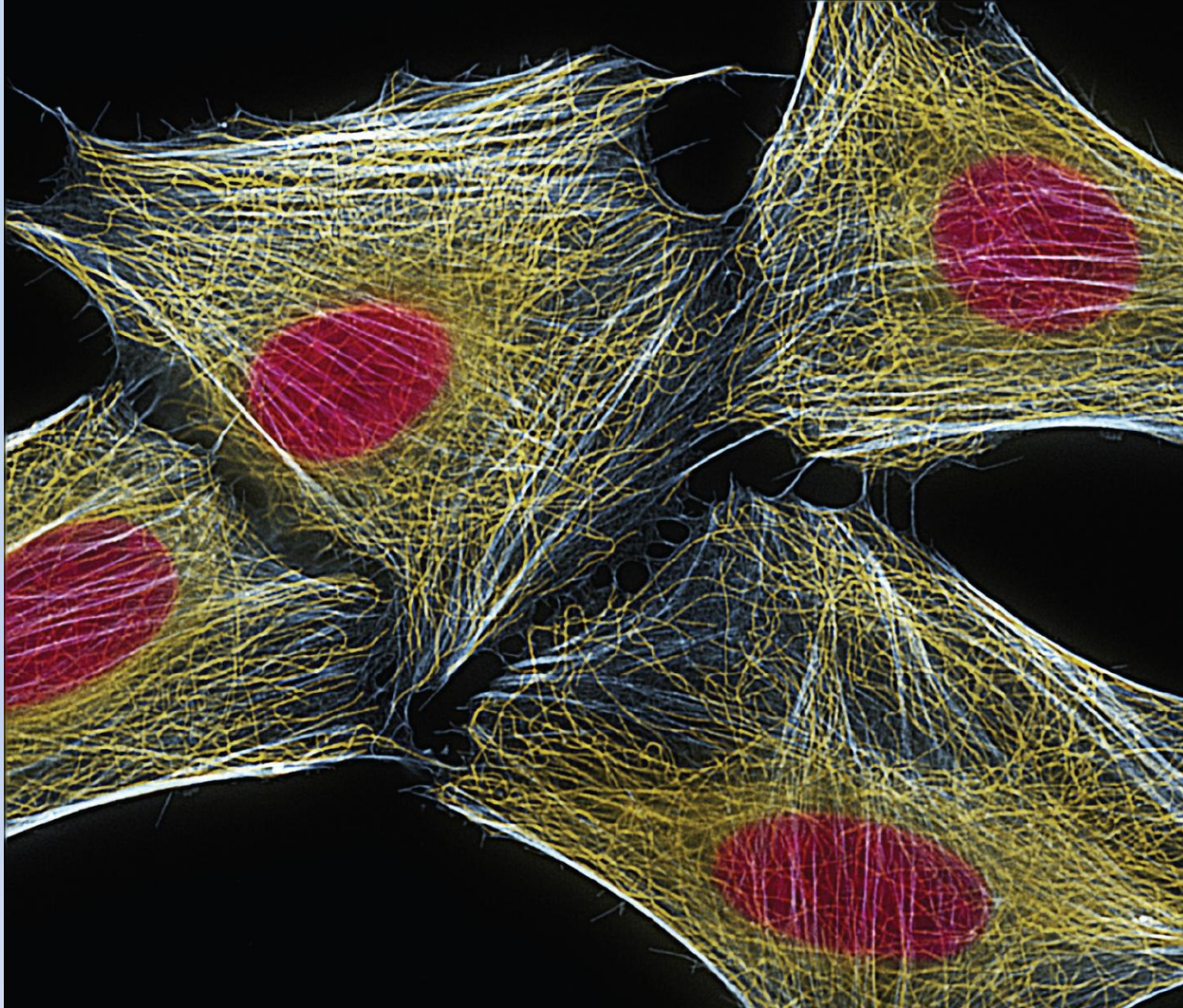


ΕΙΚΟΝΑ 4.29 Στύπωμα τύπου western. Οι πρωτεΐνες, αφού διαχωριστούν ανάλογα με το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), μεταφέρονται από το πήκτωμα σε ένα φίλτρο. Κατόπιν, το φίλτρο επωάζεται με αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε. Τα μόρια του αντισώματος που προσδένονται στο φίλτρο είναι δυνατόν να εντοπιστούν στη συνέχεια με ποικίλες μεθόδους, για παράδειγμα με τη βοήθεια ενός δεύτερου αντισώματος που προσδένεται στο πρώτο και φέρει μια χημική ομάδα η οποία ανιχνεύεται με χημειοφωταύγεια.



ΕΙΚΟΝΑ 4.30 Ανοσοκατακρήμνιση.

Ραδιενεργά σημασμένες πρωτεΐνες επωάζονται με ένα αντίσωμα, το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη-στόχο του (το αντιγόνο). Τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος προσκολλώνται σε σφαιρίδια που δεσμεύουν το αντίσωμα και συλλέγονται με φυγοκέντρωση. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια υποβάλλονται σε βρασμό, προκειμένου να διασπαστούν τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος, και οι πρωτεΐνες αναλύονται με SDS-PAGE. Η ανοσοκατακρημνισμένη ραδιενεργή πρωτεΐνη ανιχνεύεται με έκθεση σε φιλμ.



ΕΙΚΟΝΑ 4.31 Ανοσοφθορισμός.

Παρουσιάζονται κύτταρα ανθρώπου που έχουν υποβληθεί σε χρώση με φθορίζοντα αντισώματα κατά της ακτίνης (μπλε) και κατά της τουμπουλίνης (κίτρινο). Οι πυρήνες έχουν χρωματιστεί με μια κόκκινη φθορίζουσα χρωστική. (Από τη δημοσίευση του Dr. Torsten Wittmann/Photo Researchers, Inc.)

<https://www.youtube.com/watch?v=GJJGN0dhP8w>

<https://www.youtube.com/watch?v=JcN0EkcHrKk>

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

<https://www.youtube.com/watch?v=bNm9I7jV0MY>

<https://www.youtube.com/watch?v=eaETFkXtNRA>

<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/western-blot-transfer-methods.html>

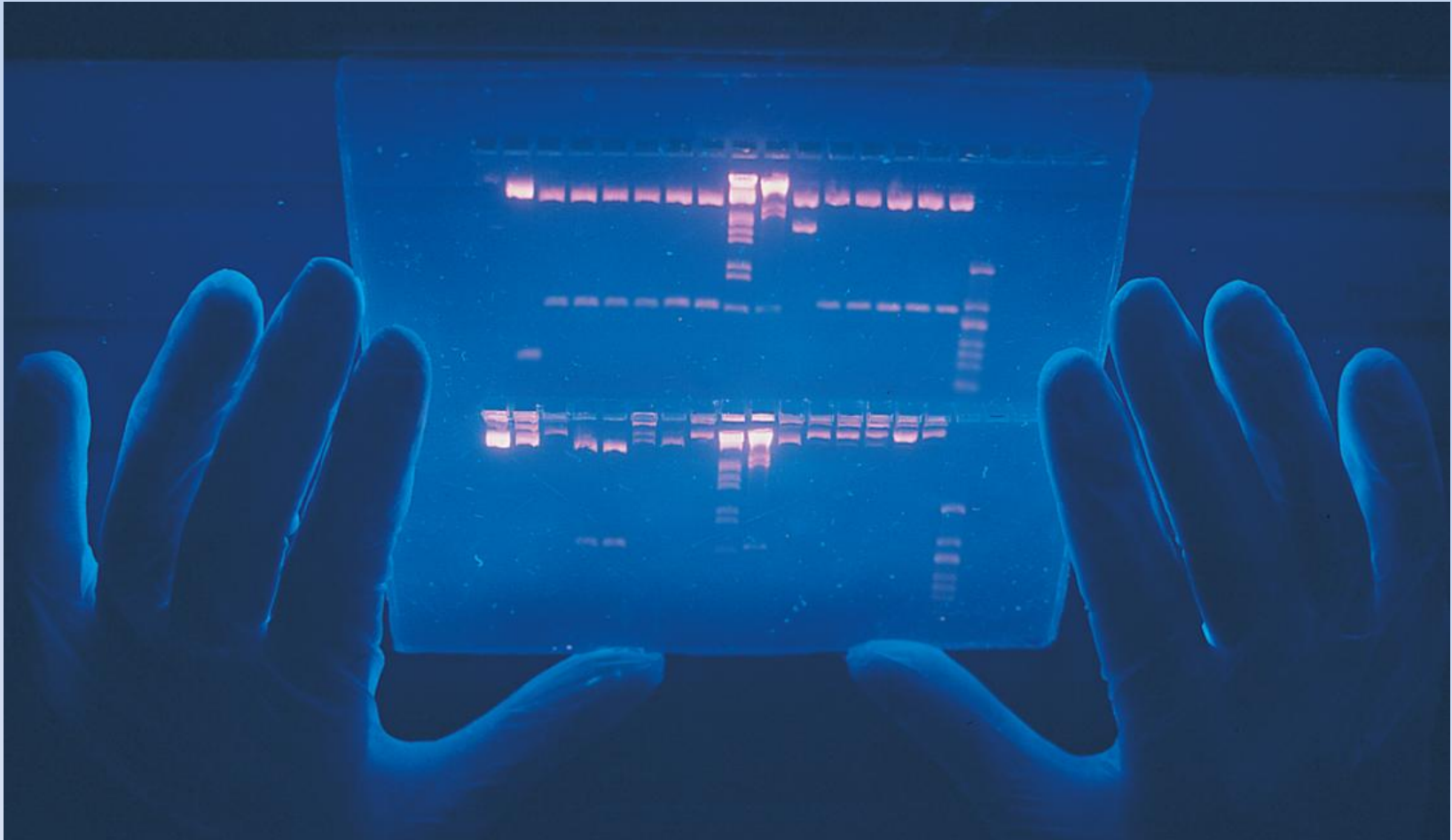
<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html>

<https://www.youtube.com/watch?v=mwzExNys12Y>

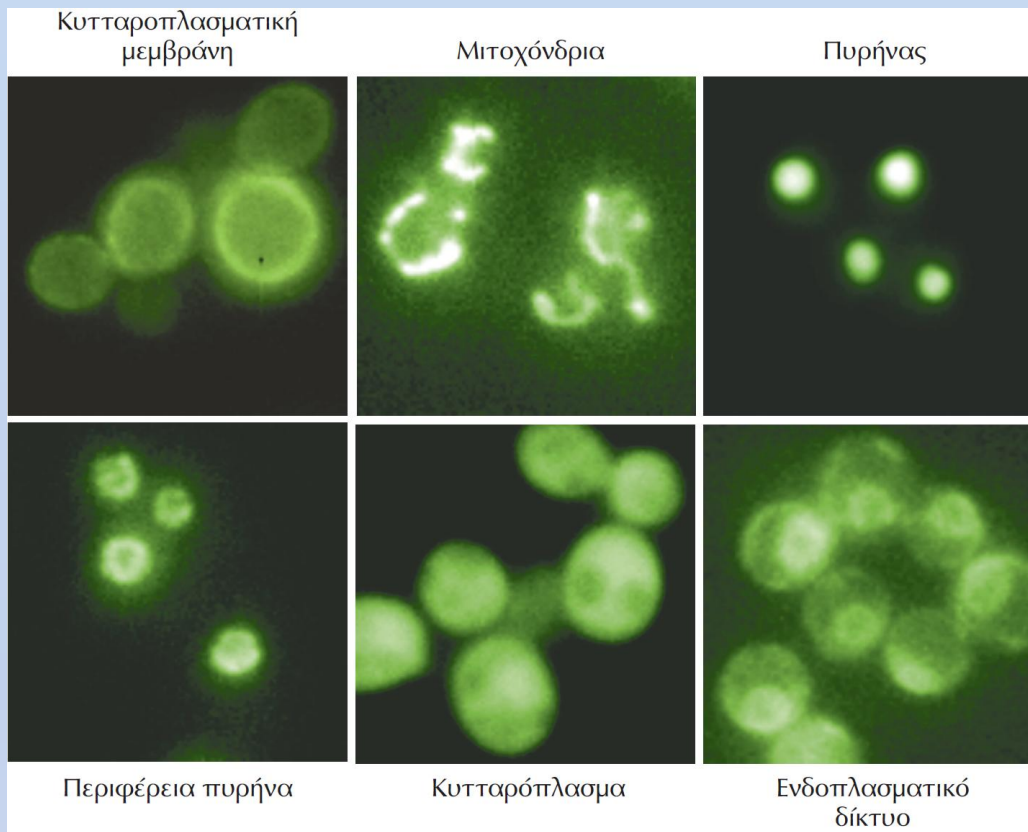
Ανίχνευση DNA

Τεχνολογία Ανασυνδυασμένου DNA

Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA ή ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ



Πήκτωμα αγαρόζης, στο οποίο έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόριση τμήματα DNA, ενώ εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

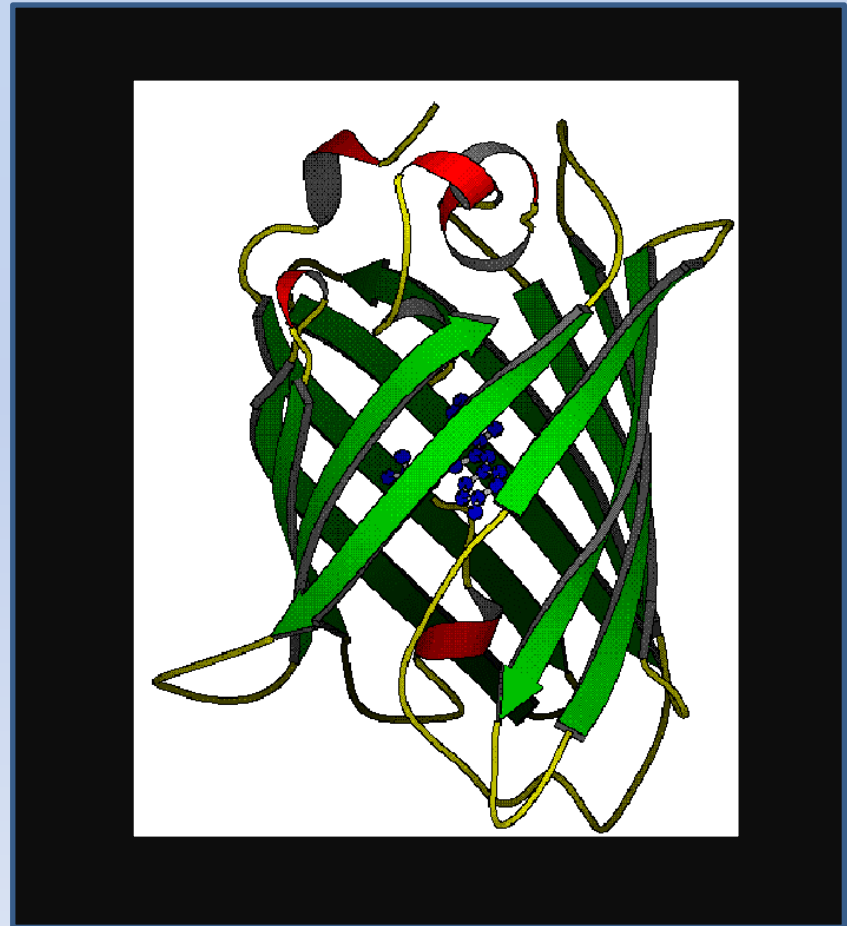
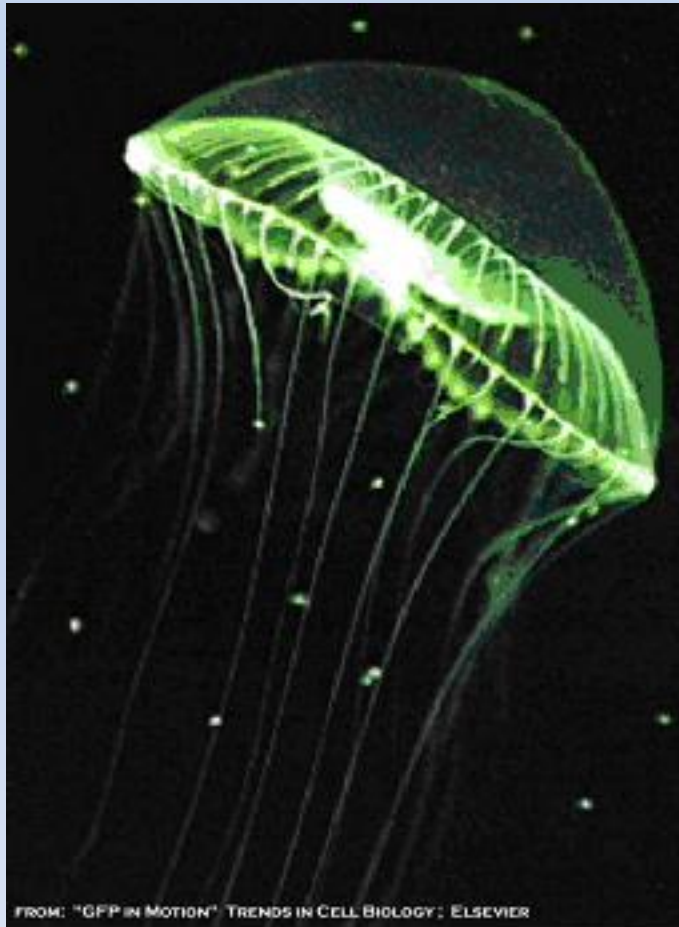


ΕΙΚΟΝΑ 2.32 Υποκυτταρική εντόπιση πρωτεϊνών του σακχαρομύκητα.

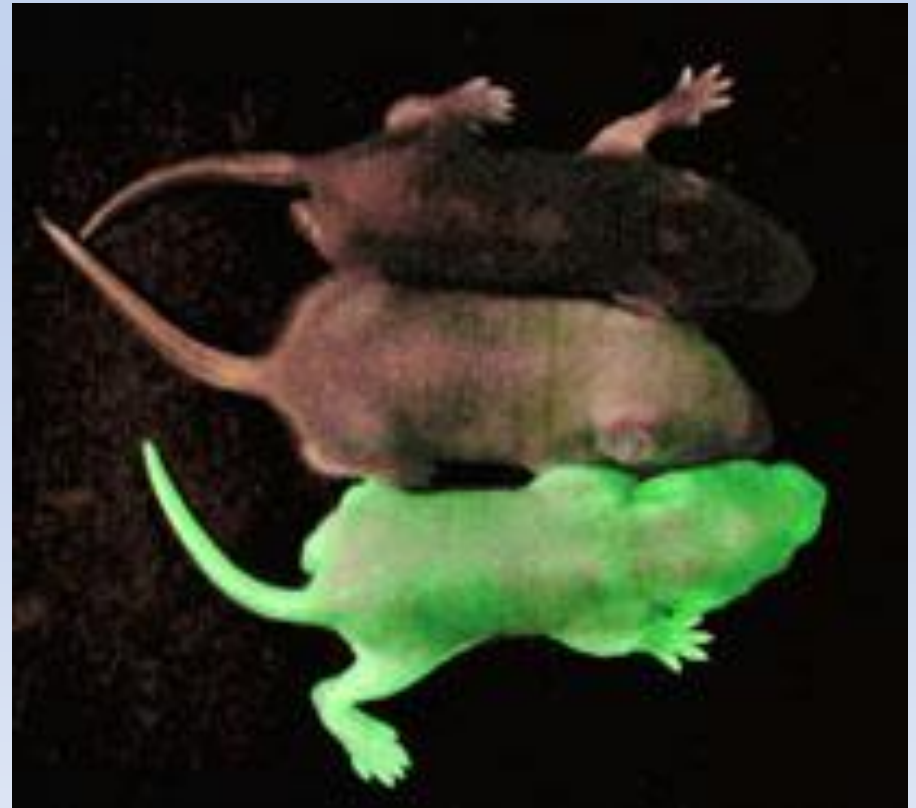
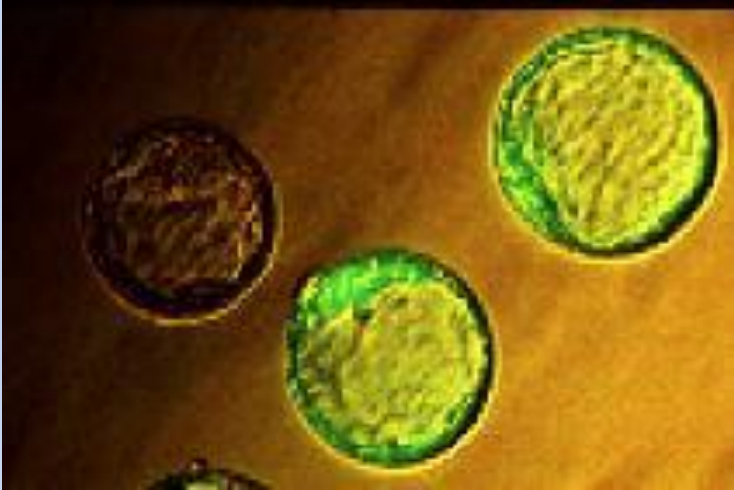
Οι κωδικές περιοχές (cDNA) περισσότερων από 4.000 γονιδίων του σακχαρομύκητα εκφράστηκαν σε μεταφραστική σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) σε κύτταρα στελεχών σακχαρομύκητα. Η υποκυτταρική θέση κάθε πρωτεΐνης προσδιορίστηκε στη συνέχεια με μικροσκοπία φθορισμού. Στις φωτογραφίες απεικονίζεται η υποκυτταρική εντόπιση αντιπροσωπευτικών πρωτεϊνών. (Από τη δημοσίευση των W.-K. Huh, J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissmann και E. K. O'Shea. 2003. *Nature* 425: 686. Οι φωτογραφίες είναι ευγενική προσφορά του James Falvo.)

pGlo – Gfp

Green fluorescent protein



GFP and mice



Five Breakthroughs You Might Have Missed



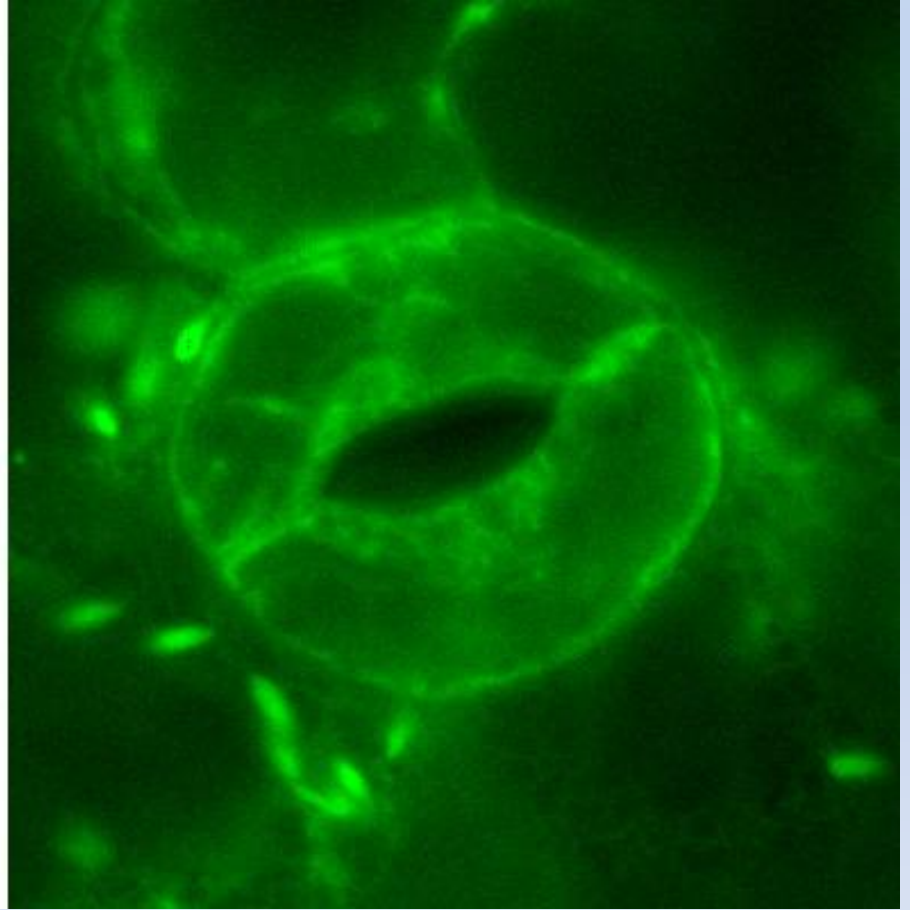
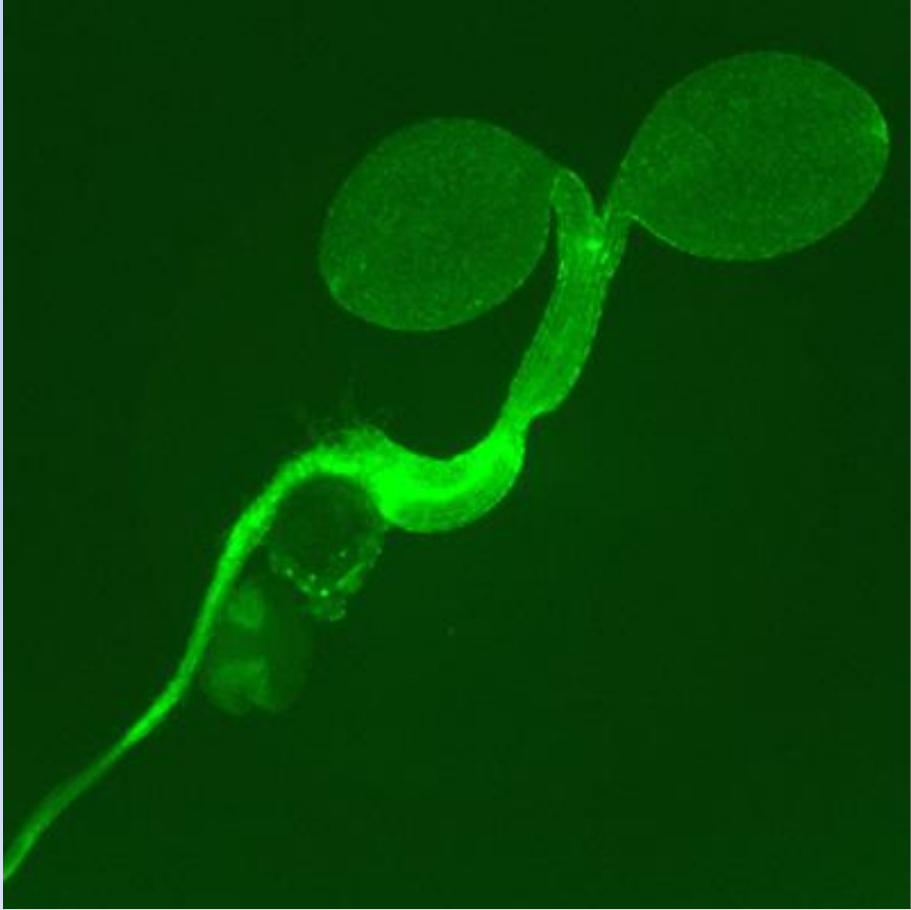
▶ MICE EXPRESSING GFP

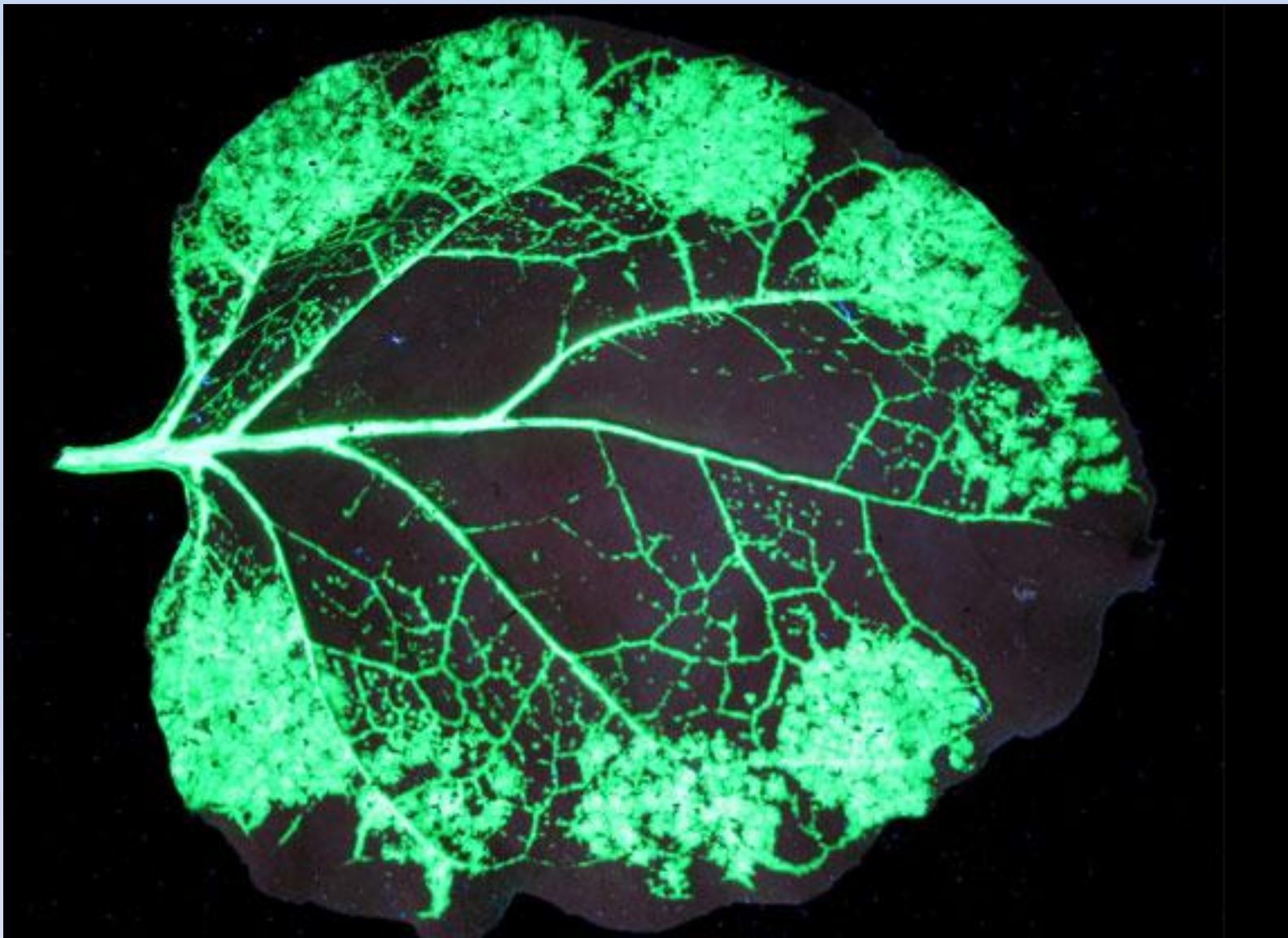
Gfp and Land Mines

- Neal Stewart at the University of North Carolina is developing plants that can detect **land mines**
- Plants could be ideal biosensors for land mines as seeds would be spread widely and evenly in a suspect field
- The gene that can announce the presence of land mines is *gfp*
- The gene will be expressed in the presence of a land mine



Green Fluorescent Protein and Plants





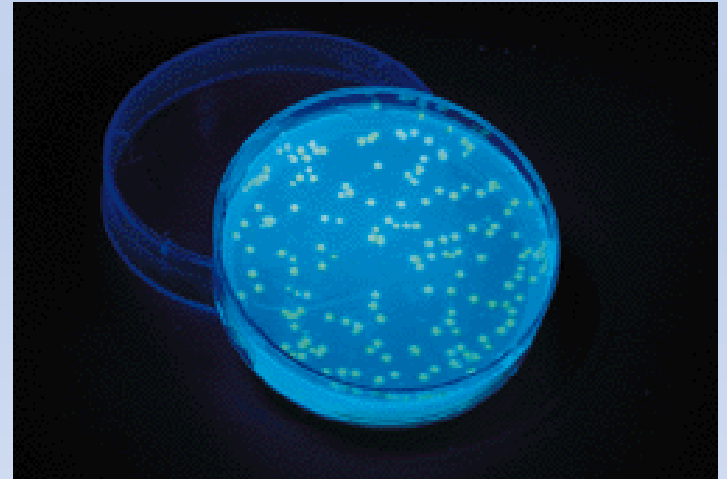
Glo fish

- Fluorescent zebra fish were specially bred to help detect environmental pollutants. By adding a natural fluorescence gene to the fish, scientists are able to quickly and easily determine when our waterways are contaminated



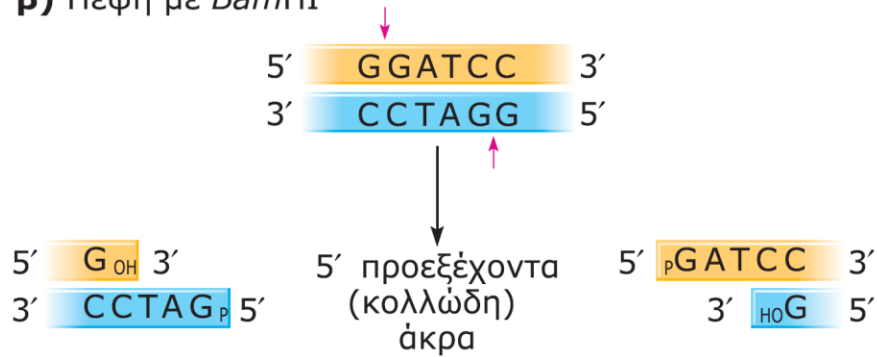
pGlo

- Transformation of *E. coli* with the pGlo plasmid
- Ori
- Gene for Gfp
- The plasmid contains the genes for the Arabinose promoter
- The plasmid contains the genes for ampicillin resistance
- If the bacterium uptakes the plasmid it should glow in response to long range uv light

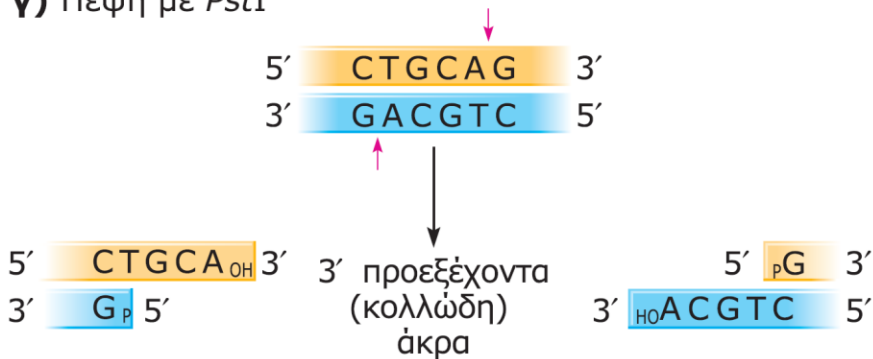


1. Περιοριστικά ένζυμα (ενδονουκλεάσες)

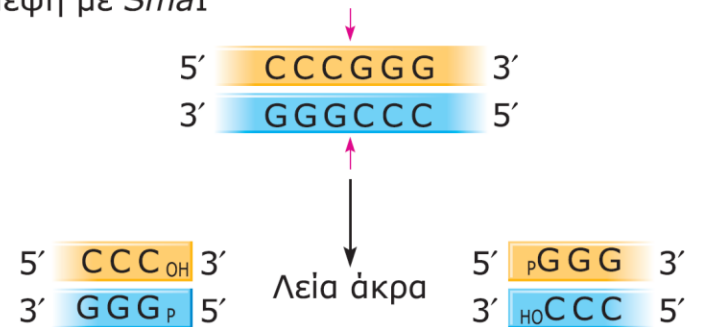
β) Πέψη με *Bam*HI



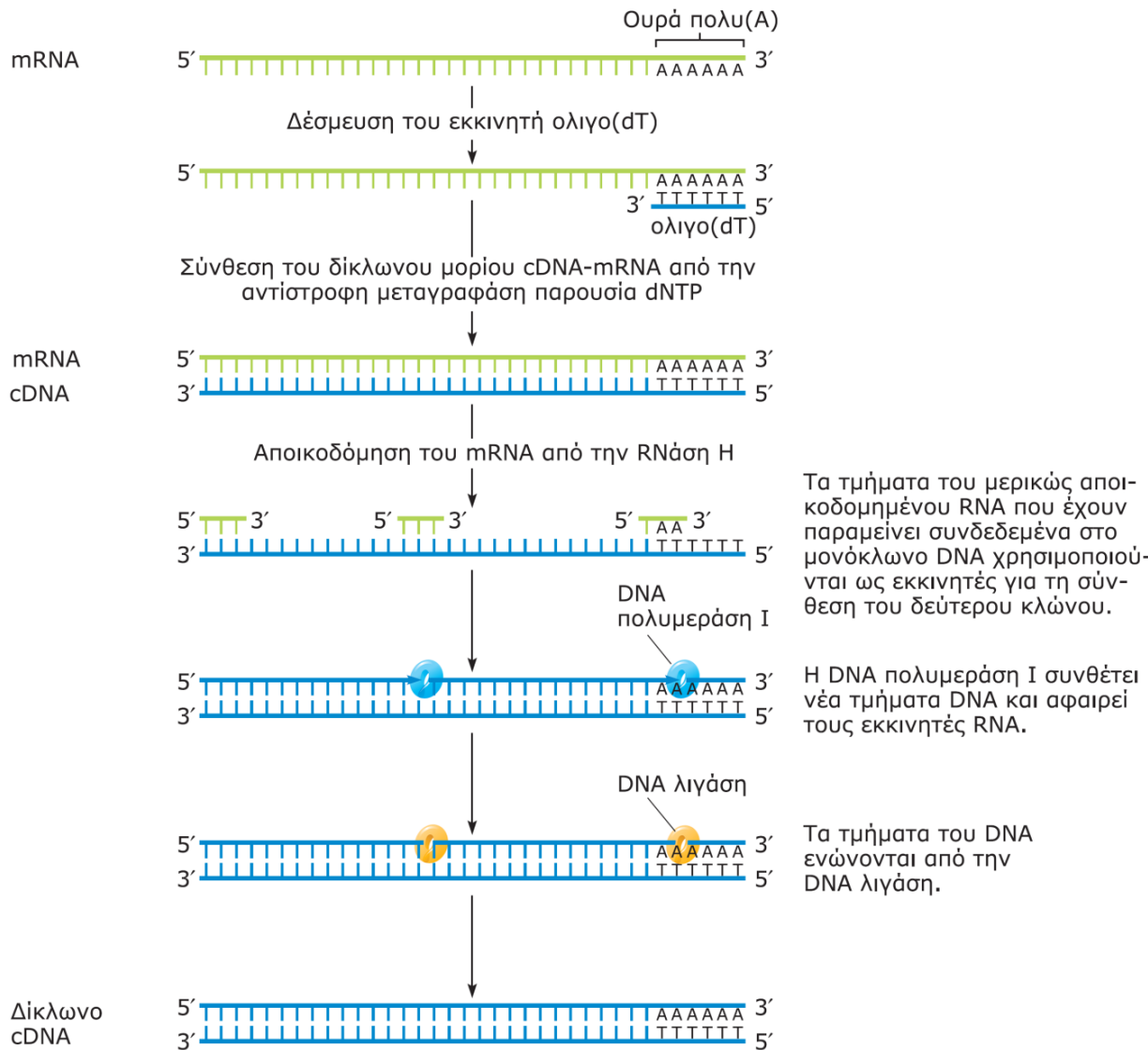
γ) Πέψη με *Pst*I



α) Πέψη με *Sma*I



2. Συμπληρωματικό DNA (cDNA)



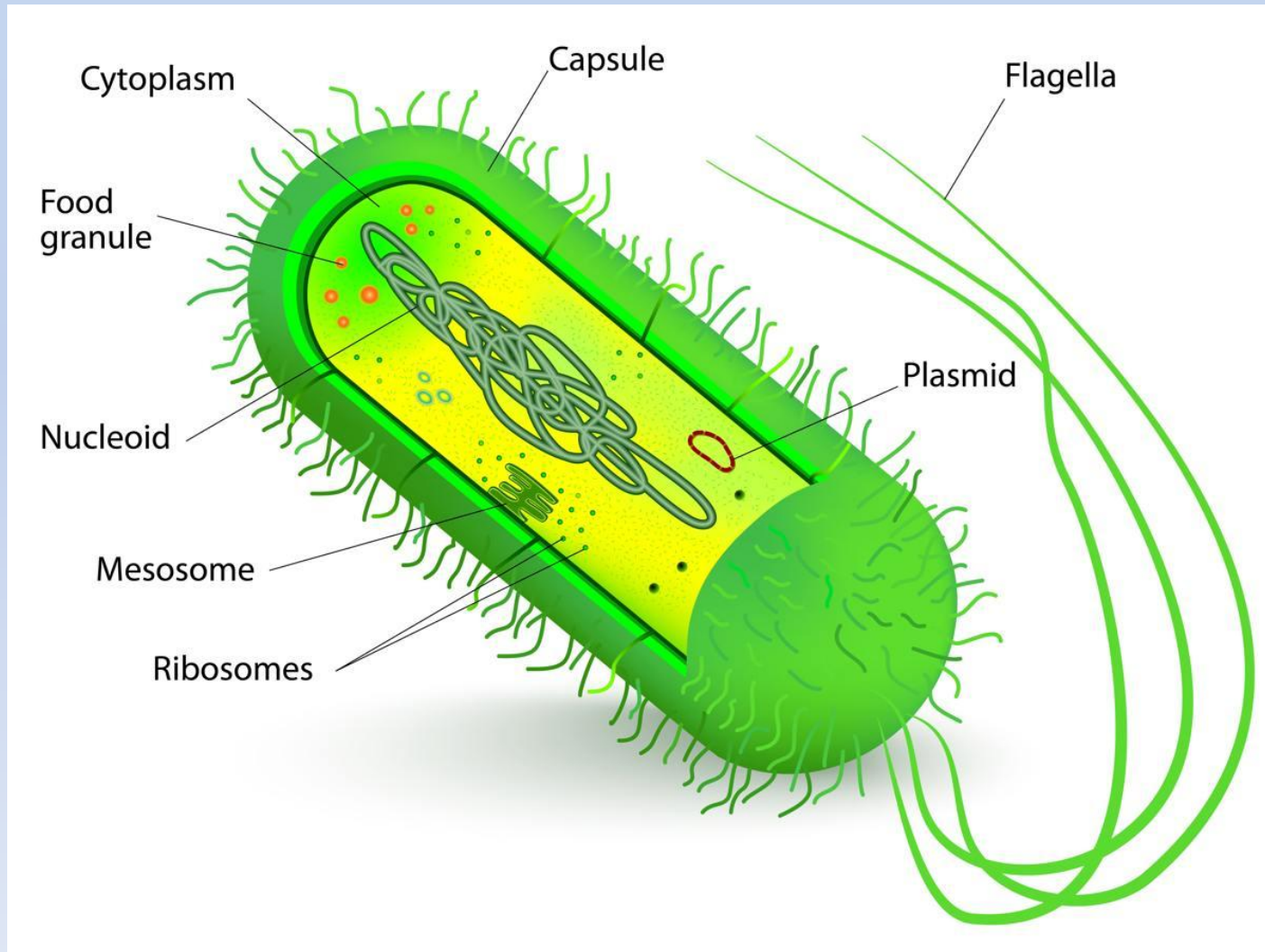
Σύνθεση δίκλωνου cDNA από πολυαδενυλιωμένο mRNA με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης, της RNάσης H, της DNA πολυμεράσης I και της DNA λιγάσης.

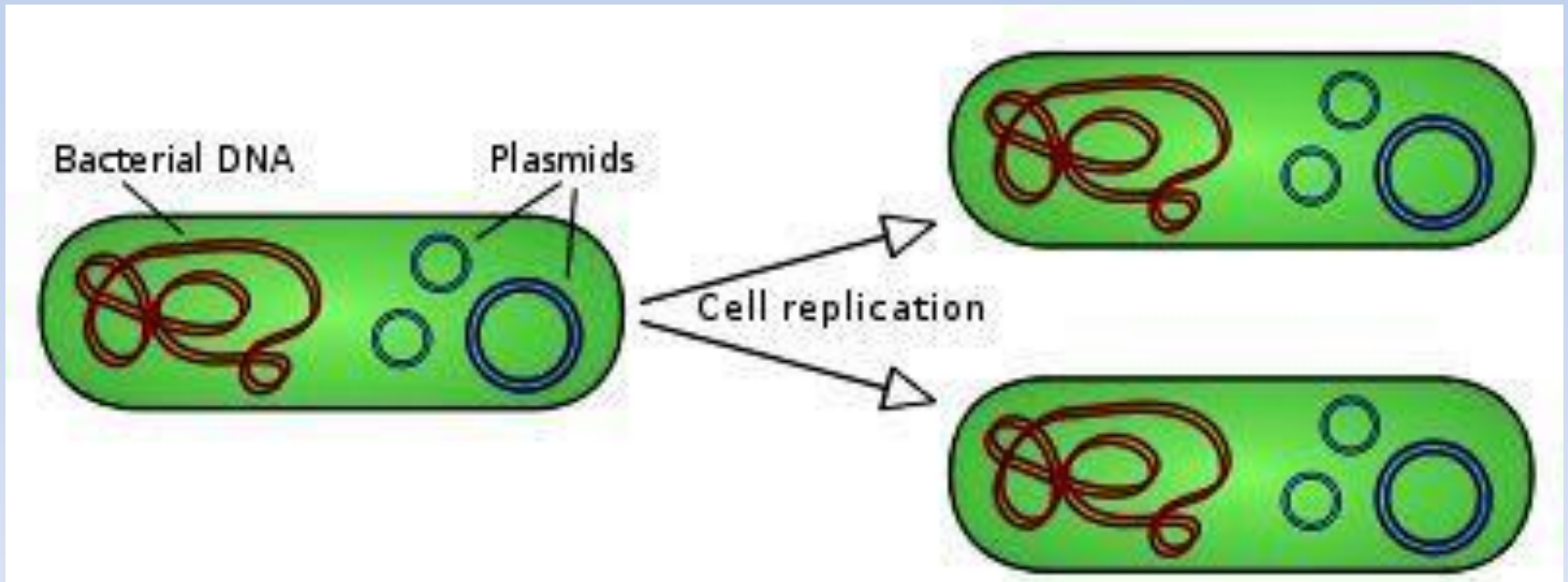
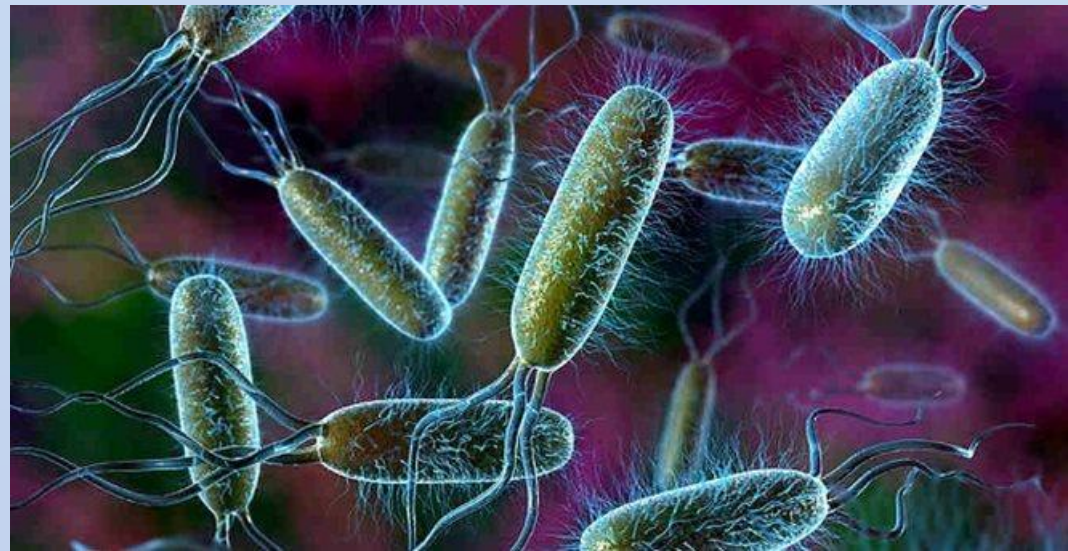
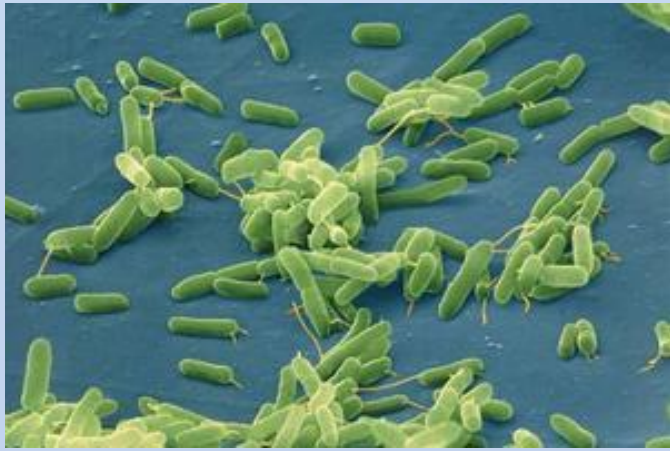
Τα τμήματα του μερικώς αποικοδομημένου RNA που έχουν παραμείνει συνδεδεμένα στο μονόκλωνο DNA χρησιμοποιούνται ως εκκινήτες για τη σύνθεση του δεύτερου κλώνου.

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

Τα τμήματα του DNA ενώνονται από την DNA λιγάση.

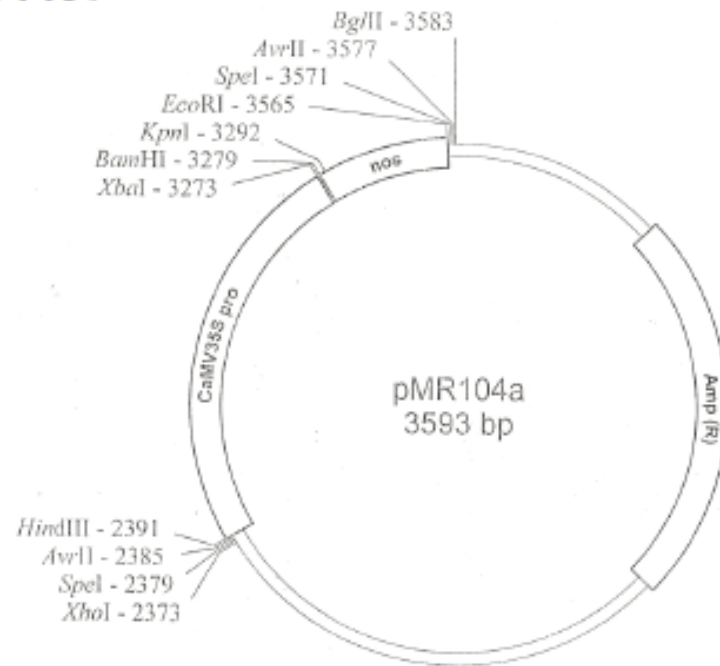
3. Βακτήριο ως εργαλείο γενετικής μηχανικής

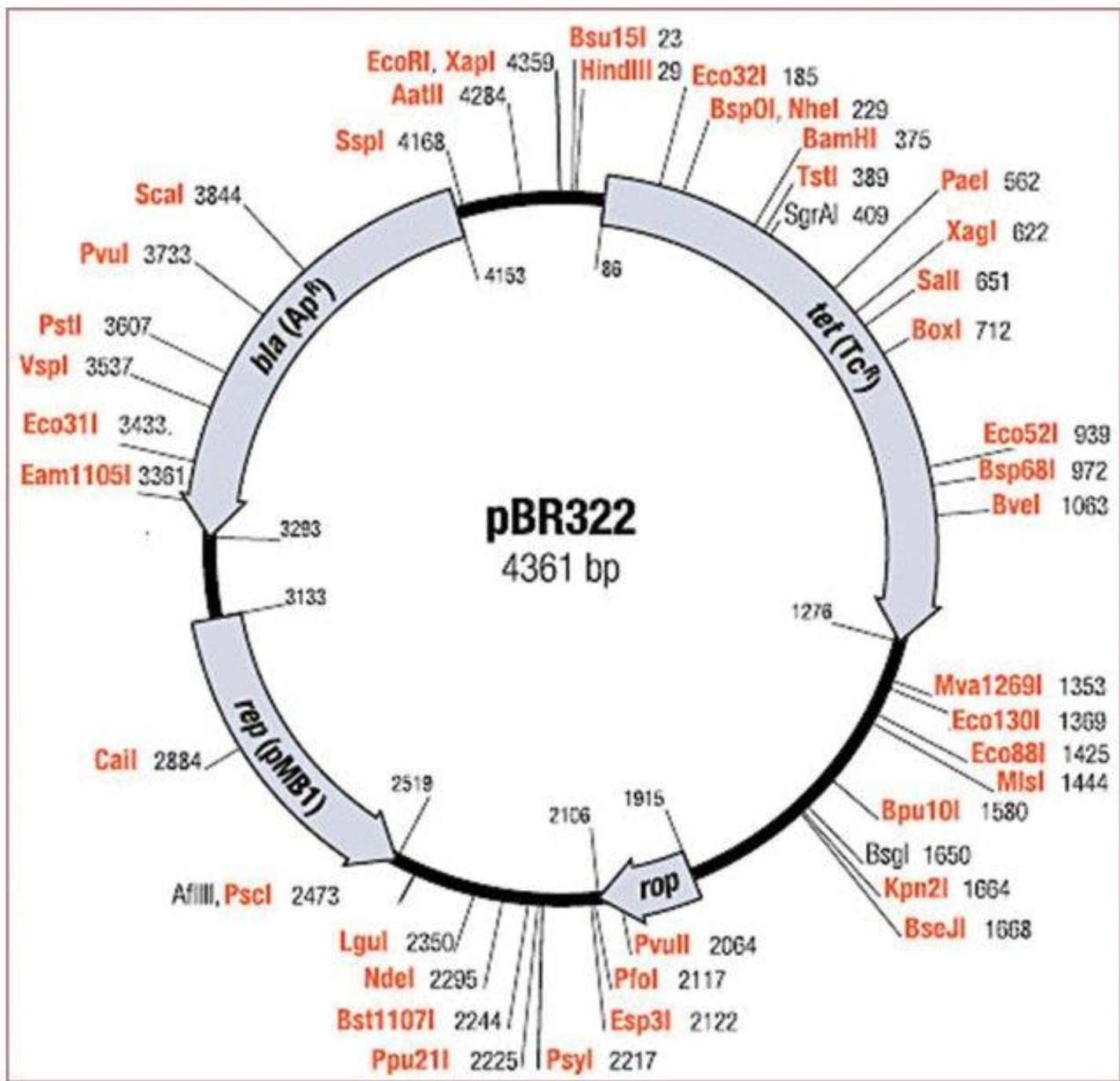


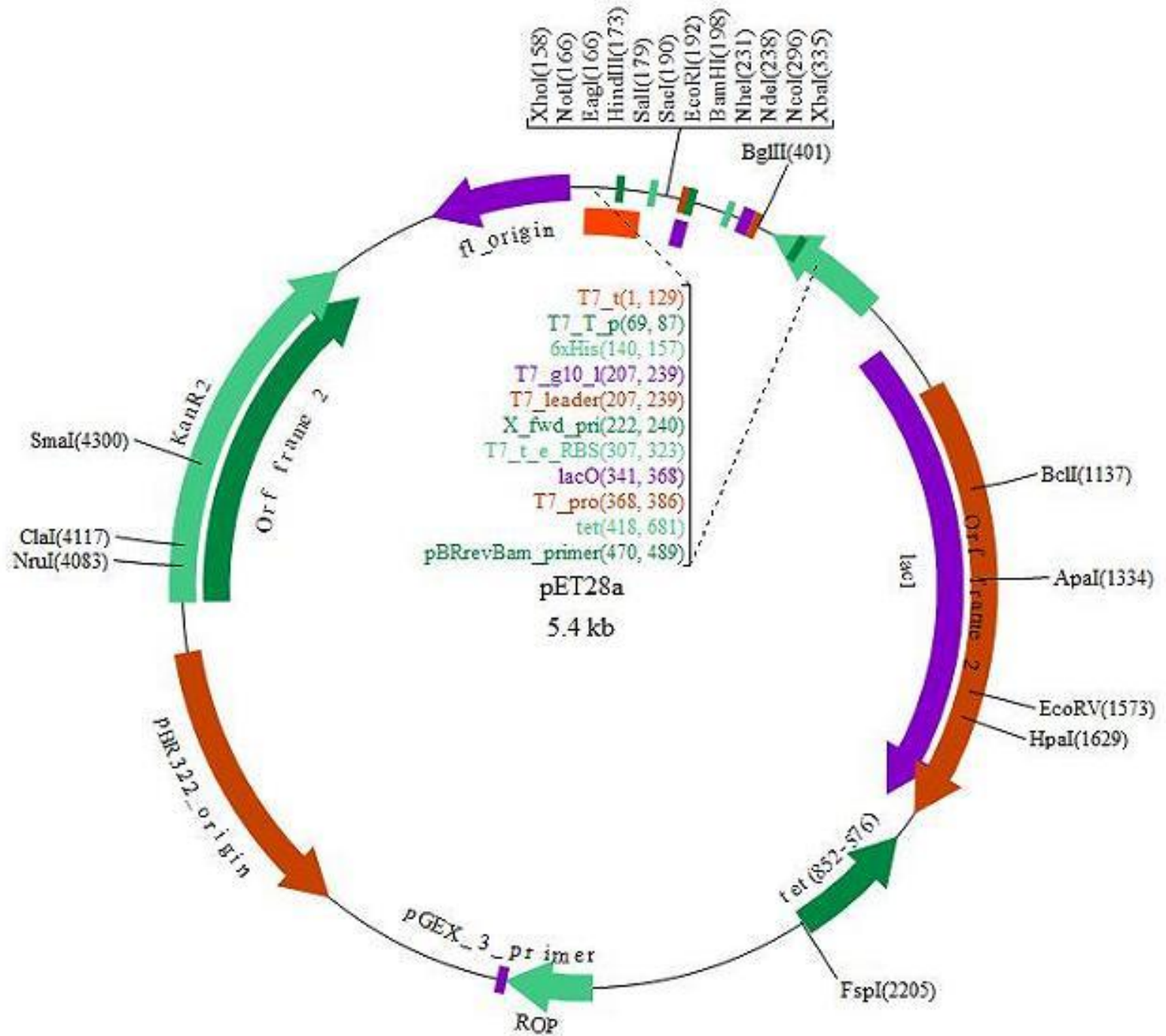


Plasmid

- Small circular DNA found in bacteria
- Extrachromosomal DNA because they are present in the bacterial cytoplasm in addition to bacterial chromosome
- Size: 1-4kb
- Self replicating







Vector

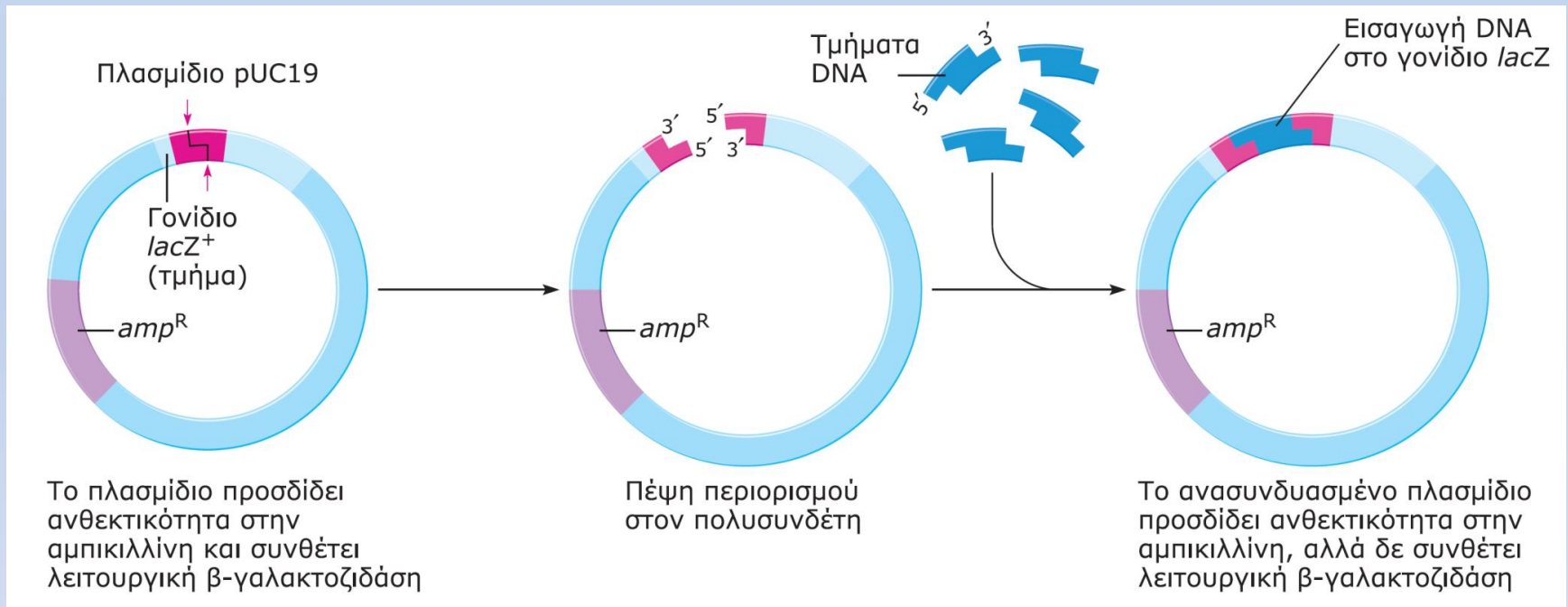
- A pieces of DNA that can accept, carry and replicate other pieces of DNA
- Characteristics of plasmid:
 - 1. Size: Small is easier to manipulate and separated from the chromosomal DNA of host bacteria
 - 2. Ori: The site for DNA replication that allow plasmids to replicate from the host cell's chromosome

What makes a good vectors?

- 1. Size: Small is easier to manipulate and separated from the chromosomal DNA of host bacteria
- 2. Ori: The site for DNA replication that allow plasmids to replicate from the host cell's chromosome
- The number of plasmids in the cell called copy number

- 3. MCS/Polylinker: A stretch of DNA with recognition sequences for many different common RE (pCAMBIA)
 - Provide great flexibility in the range of DNA fragments to be clone
 - Can choose to cut many RE depend on foreign DNA
- 4. Selectable marker genes
- Allow screening and identification of recombinant plasmid; AmpR, KanR, Lacz

4. Δημιουργία ανασυνδυασμένων τμημάτων και φορείς κλωνοποίησης

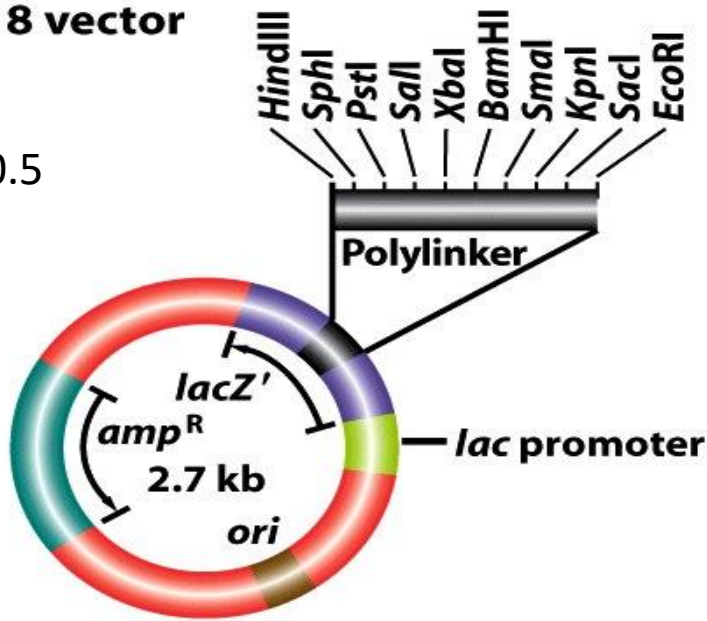


Ο φορέας κλωνοποίησης μπορεί να είναι

- Βακτηριακά πλασμίδια
- Βακτηριοφάγοι
- Ρετροϊοί
- Τεχνητά χρωμοσώματα ζυμομύκητα (YACs)

pUC18 vector

Fig 20.5

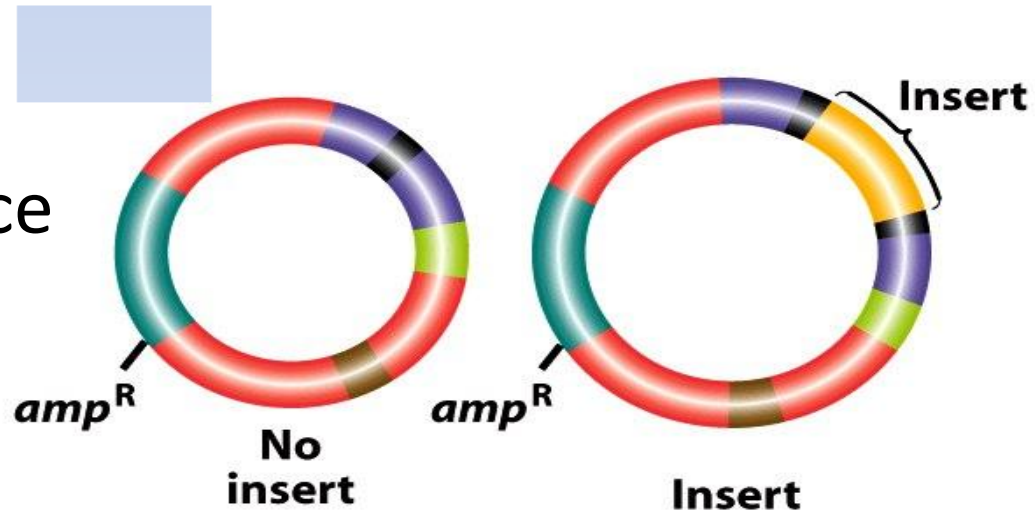


Resistance genes allow bacteria with the plasmid to be selected.

Cut foreign DNA and vector with *XbaI*.

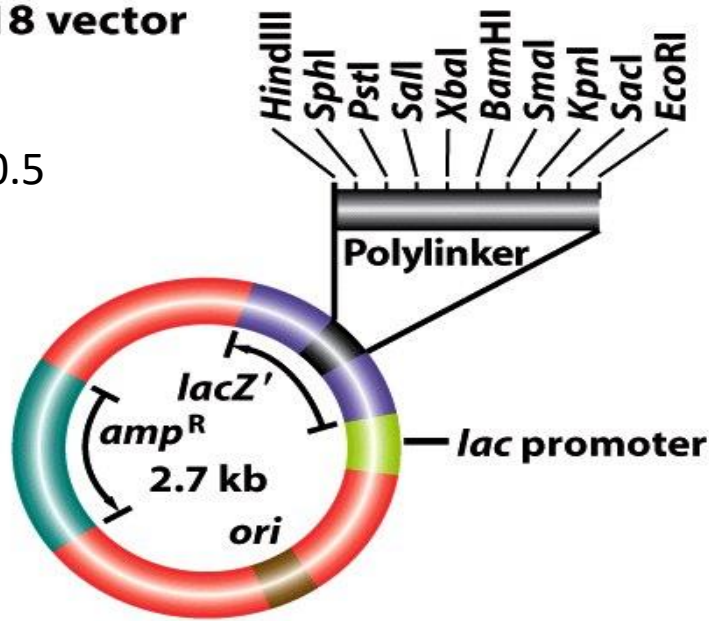
Transform bacteria.

Bacteria with the resistance gene will survive when grown in the presence of antibiotic



pUC18 vector

Fig 20.5



Cut foreign DNA and vector with *XbaI*.

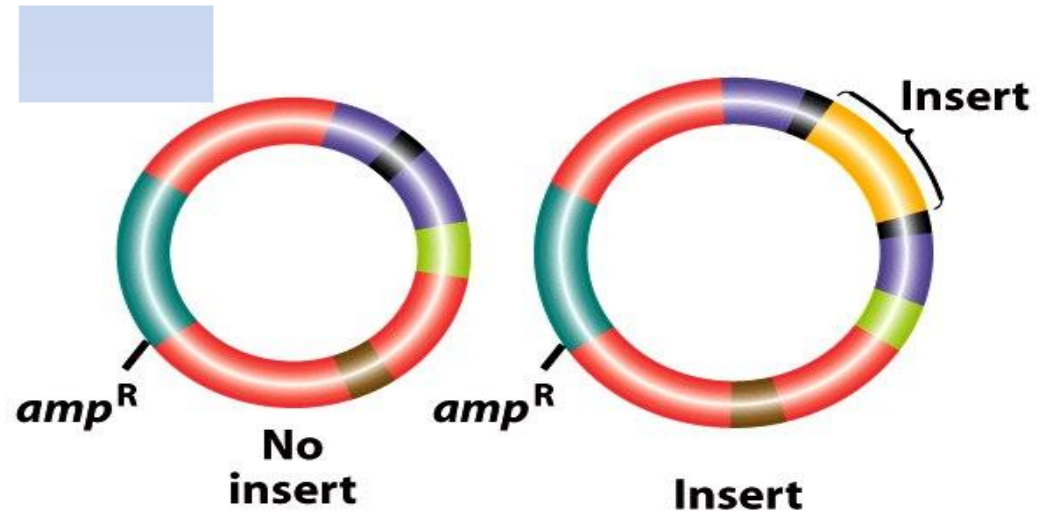
Transform bacteria.

Plate on ampicillin and X-Gal.

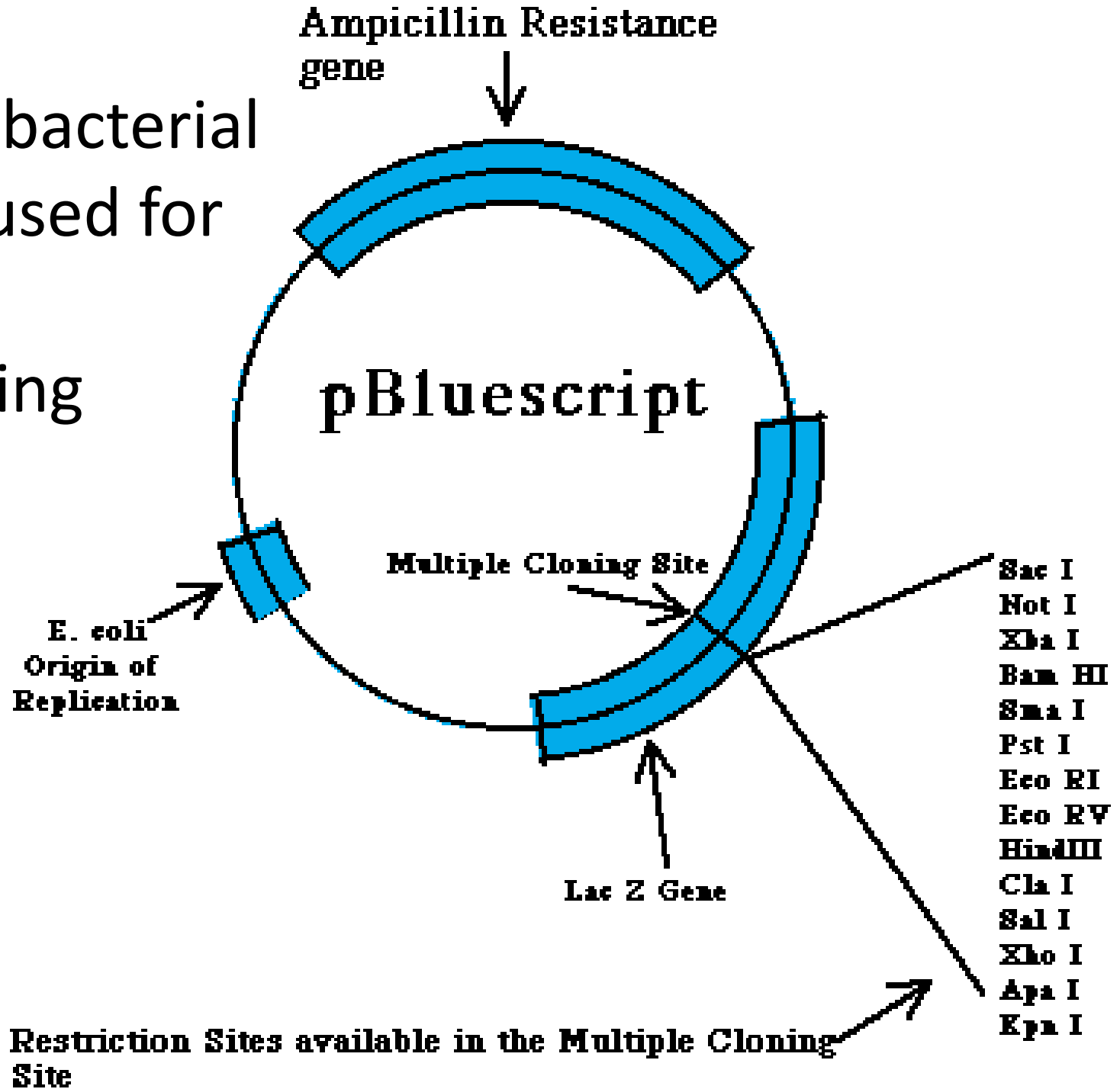
Blue

White

Is the insert present?
Plasmids with the MCS in the lacZ gene can be used for blue/white screening...

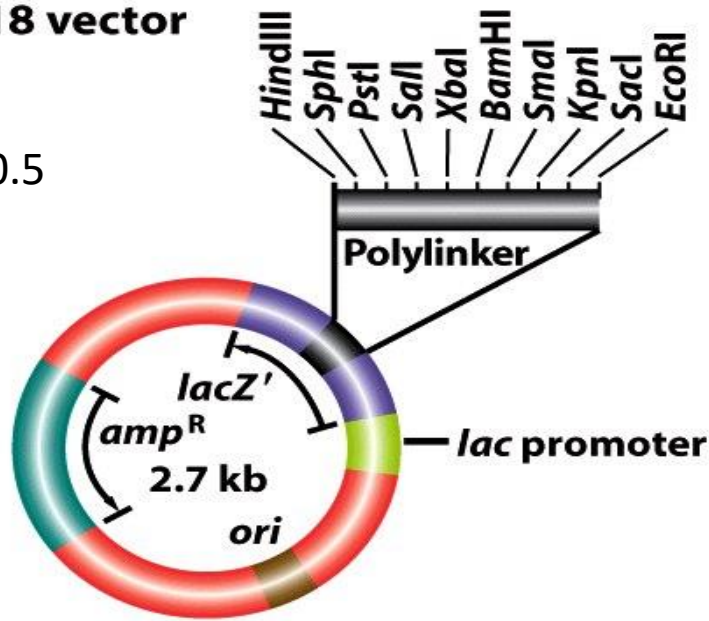


A typical bacterial plasmid used for genetic engineering



pUC18 vector

Fig 20.5



Intact lacZ makes a blue color when expressed and provided X-galactose

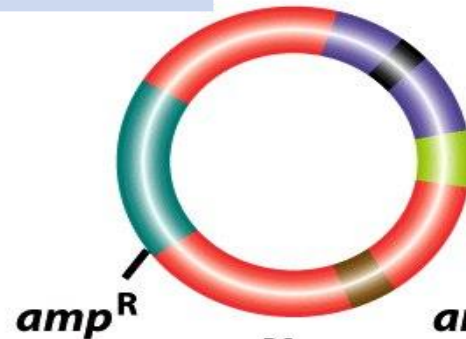
Cut foreign DNA and vector with *XbaI*.

Transform bacteria.

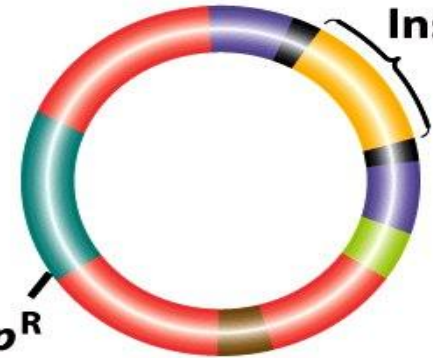
Plate on ampicillin and X-Gal.

Blue

White



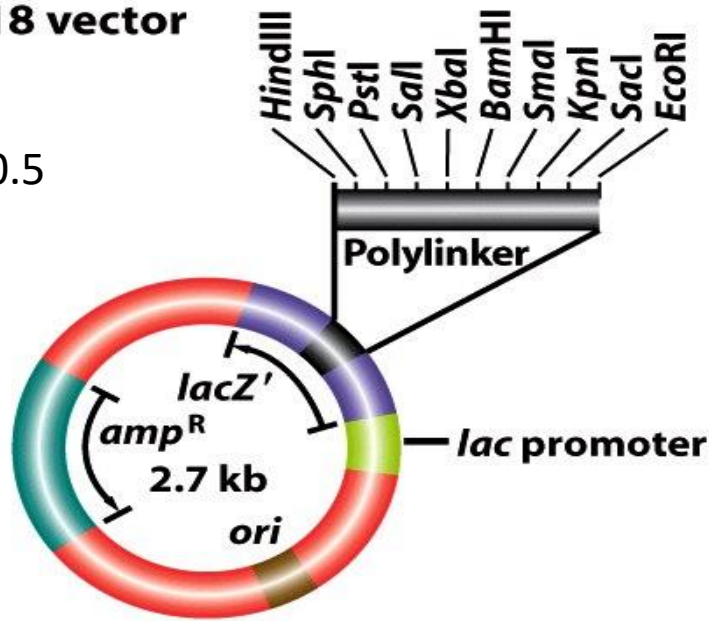
No insert



Insert

pUC18 vector

Fig 20.5



When the lacZ gene is disrupted, the bacteria appear white

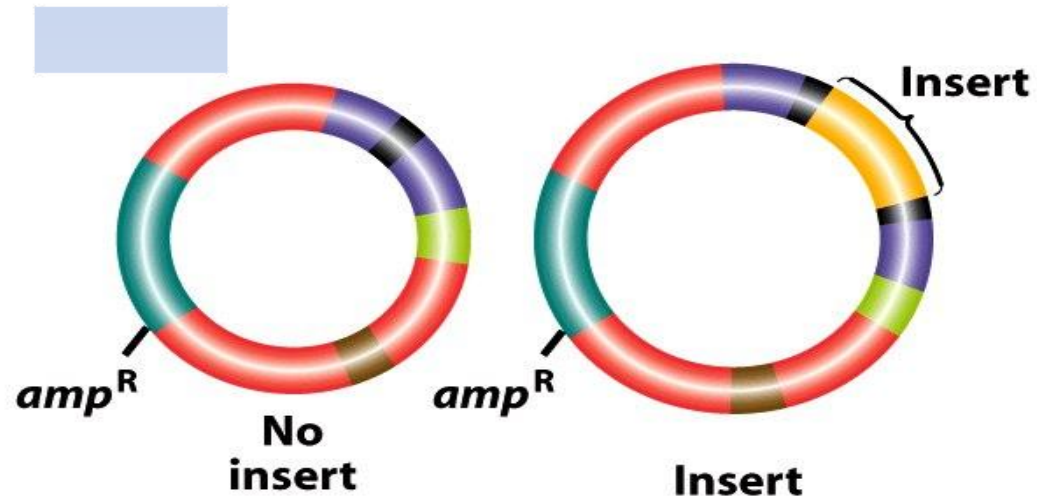
Cut foreign DNA and vector with *XbaI*.

Transform bacteria.

Plate on ampicillin and X-Gal.

Blue

White

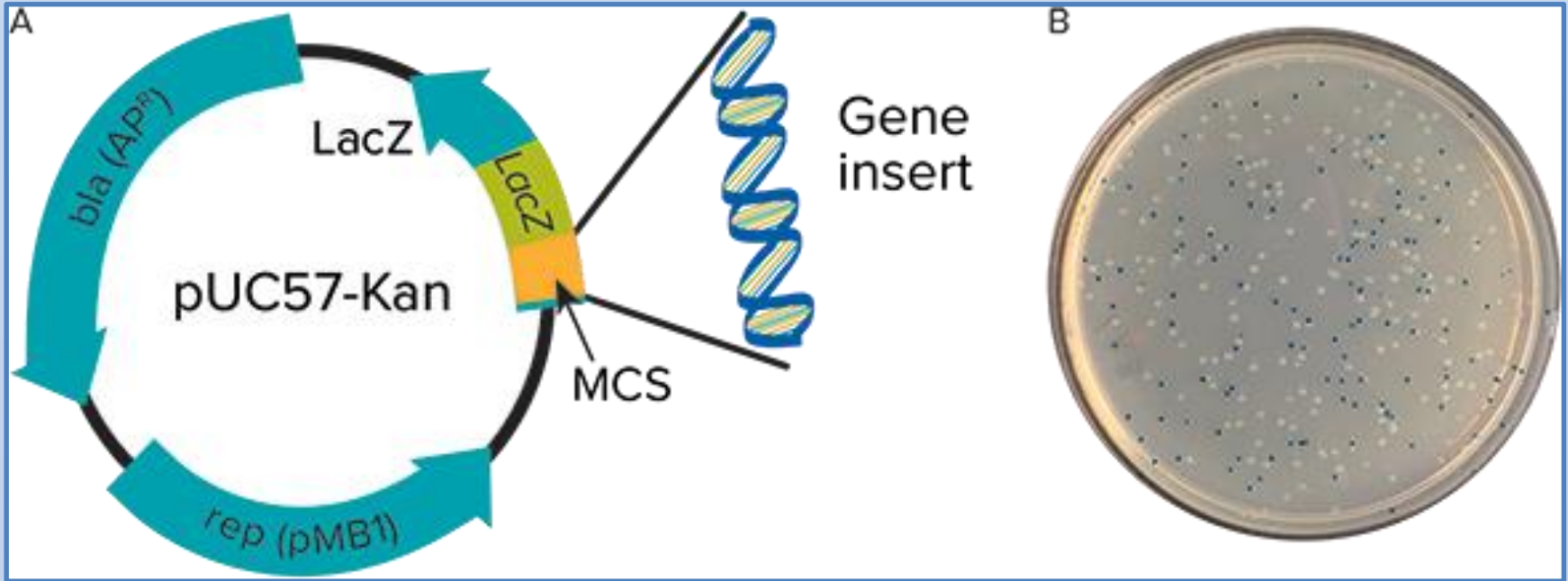


5. Blue white screening

- The competent cells are grown in the presence of X-gal
- Recombinant: white
while nonrecombinant is blue
- Less time and less labor intensive



- IPTG ; isopropyl β - D - 1 thiogalactopyranoside, inducer of the Lac operon
- The hydrolysis of colourless, X-gal by the β -galactosidase causes the characteristic blue colour in the colonies
- Its shows that the colonies contain vector without insert (non-transformed)



DNA recombinant Selection

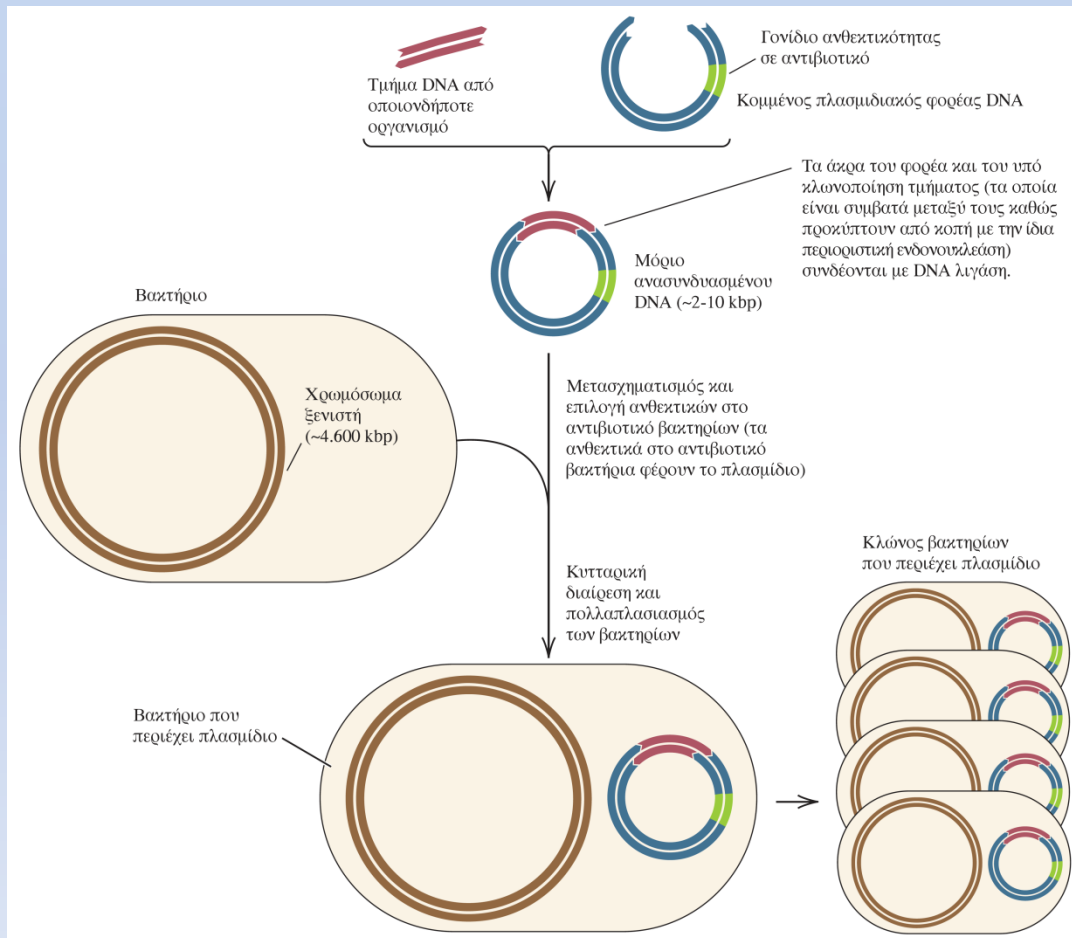
- 1. Screening for recombinant plasmid
- Use antibiotics
- Transformed cells will survive in media containing antibiotics
- Nontransformed: do not grow

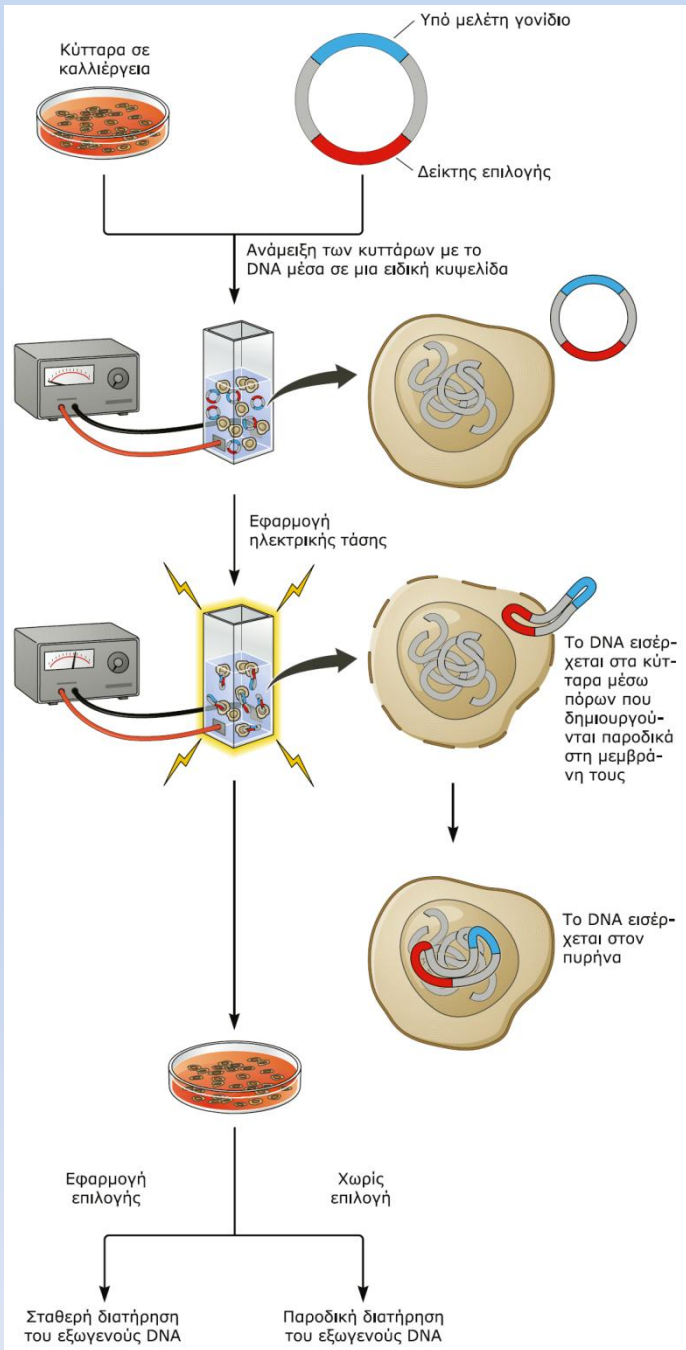
Διαμόλυνση κυττάρων

Παράδειγμα κλωνοποίησης

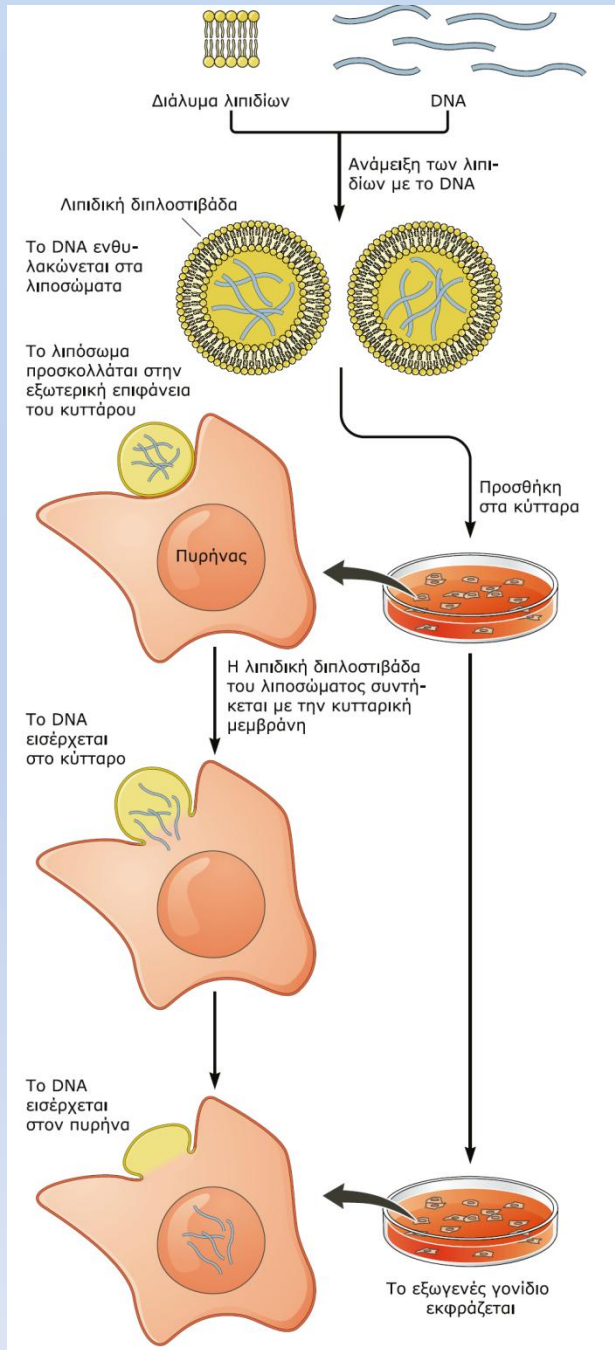
- Ένα περιοριστικό κομμάτι DNA που μπορεί να προέρχεται από οποιονδήποτε οργανισμό ενσωματώνεται σε κάποιον πλασμιδιακό φορέα που έχει κοπεί με το ίδιο ένζυμο.
- Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που σχηματίζεται χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό δεκτικών βακτηρίων.
- Μέσα στα βακτηριακά κύτταρα το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αντιγράφεται και μεταβιβάζεται στους απογόνους τους.

Το βακτηριακό χρωμόσωμα είναι περίπου 1.000 φορές μεγαλύτερο από το πλασμίδιο και δεν είναι σχεδιασμένο στην ίδια κλίμακα με αυτό.



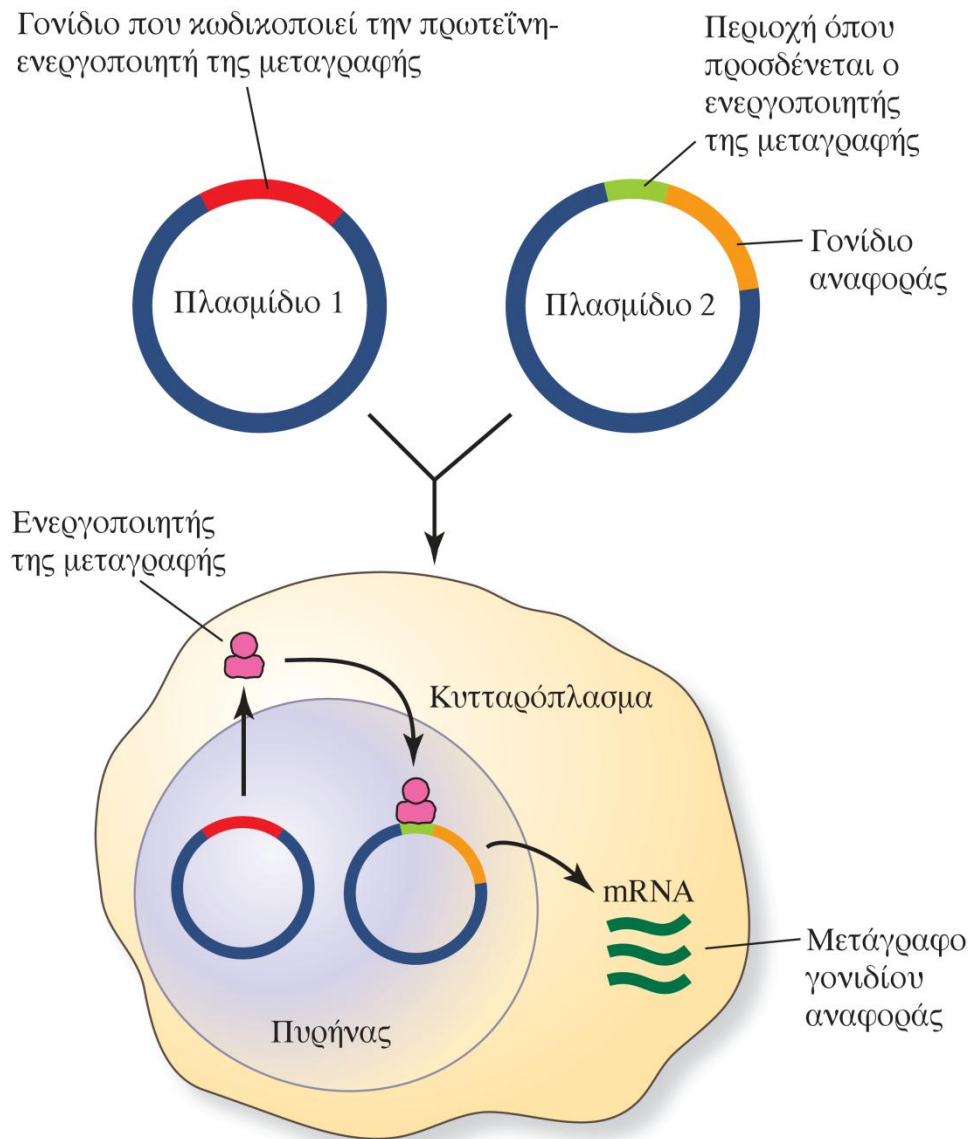


ΕΙΚΟΝΑ 6.8: Μεταφορά γονιδίων με ηλεκτροδιάτρηση.



ΕΙΚΟΝΑ 6.9: Διαμόλυνση με χρήση λιποσωμάτων.

ΕΙΚΟΝΑ 13.23 Πειραματική δοκιμασία προσδιορισμού της ικανότητας μιας πρωτεΐνης-ενεργοποιητή να επάγει τη μεταγραφή σε ένα κυτταρικό σύστημα



Στη συγκεκριμένη δοκιμασία χρειάζονται δύο πλασμίδια. Το πρώτο πλασμίδιο φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ενεργοποιητή και το δεύτερο φέρει ένα γονίδιο αναφοράς και μία θέση πρόσδεσης για την πρωτεΐνη-ενεργοποιητή. Αν ο ενεργοποιητής εκφράζεται μέσα στο κύτταρο και είναι ικανός να προσδεθεί στο ρυθμιστικό στοιχείο του δεύτερου πλασμιδίου, τότε θα προκαλέσει την επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς. Η μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς οδηγεί με τη σειρά της στη σύνθεση ενός mRNA, η μετάφραση του οποίου παράγει μια πρωτεΐνη αναφοράς που μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα, όπως είναι η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και η β-γαλακτοσιδάση.

Γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-
ενεργοποιητή της μεταγραφής

Περιοχή όπου
προσδένεται ο
ενεργοποιητής
της μεταγραφής



Γονίδιο
αναφοράς

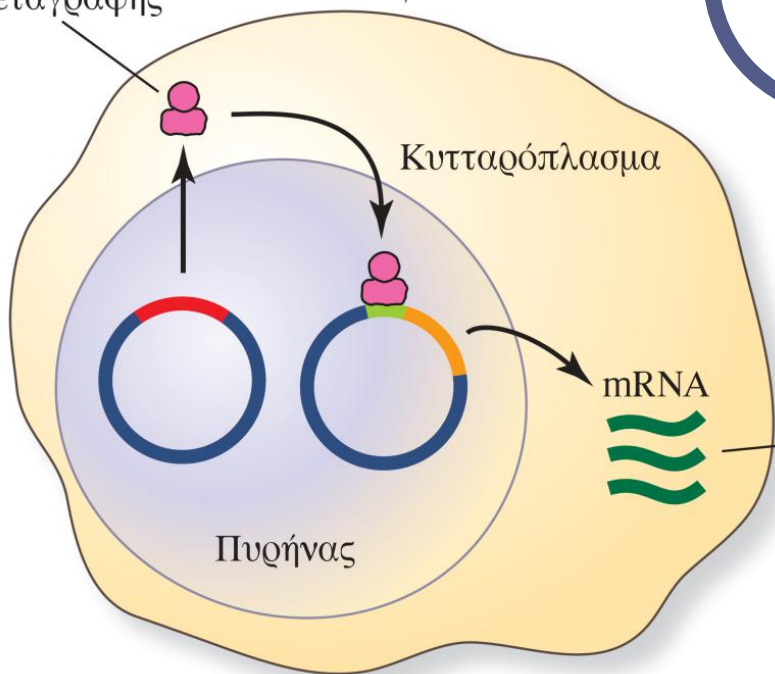
Ενεργοποιητής
της μεταγραφής

Universal promoter or enhancer



Γονίδιο αναφοράς για
έλεγχο απόδοσης
διαμόλυνσης

Κυτταρόπλασμα



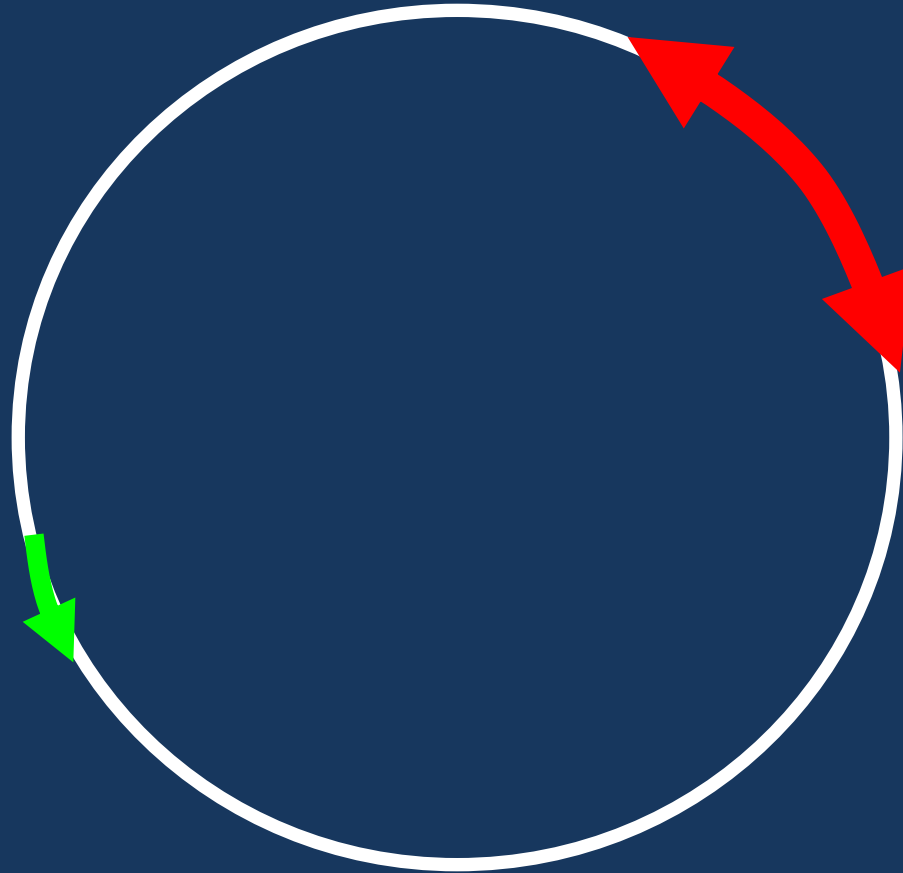
Πυρήνας

mRNA

Μετάγραφο
γονιδίου
αναφοράς

Ένα σχετικό δίπλωμα
ευρεσιτεχνίας

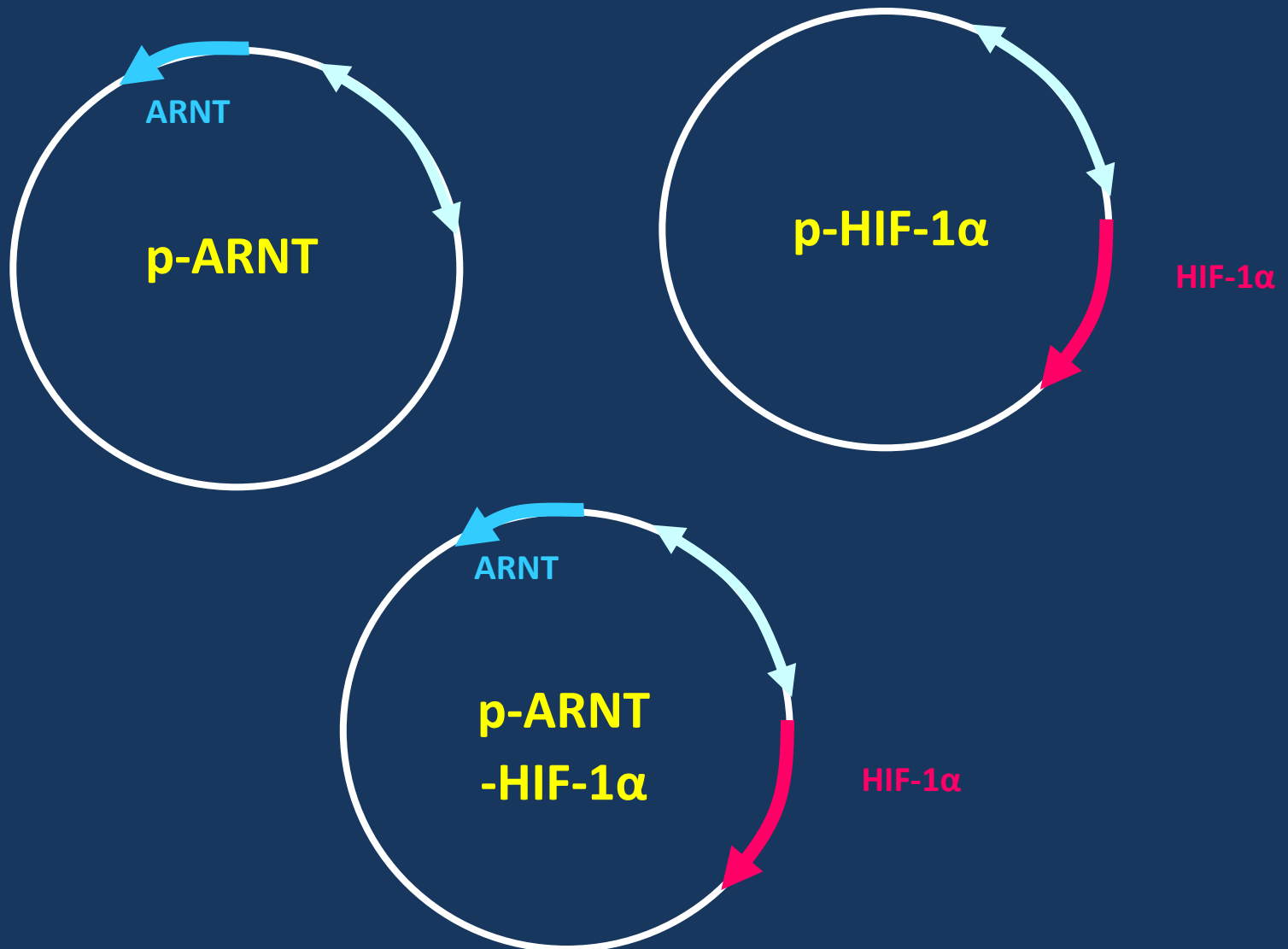
pBEVY-GL (5) vector



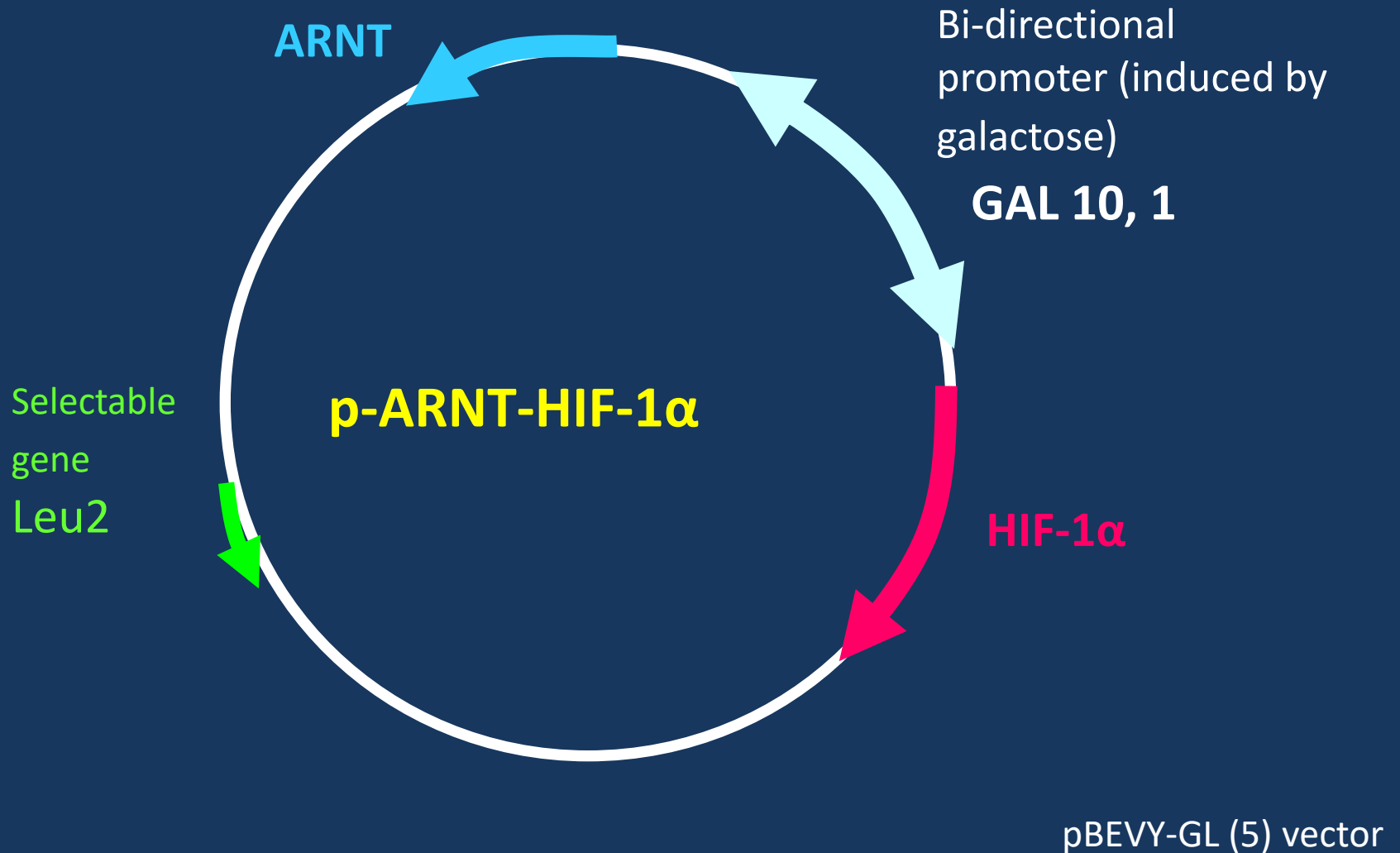
Bi-directional
promoter
(induced by
galactose)
GAL 10, 1

Selectable
gene
Leu2

HIF-1 α and ARNT are stably expressed in *S. cerevisiae*

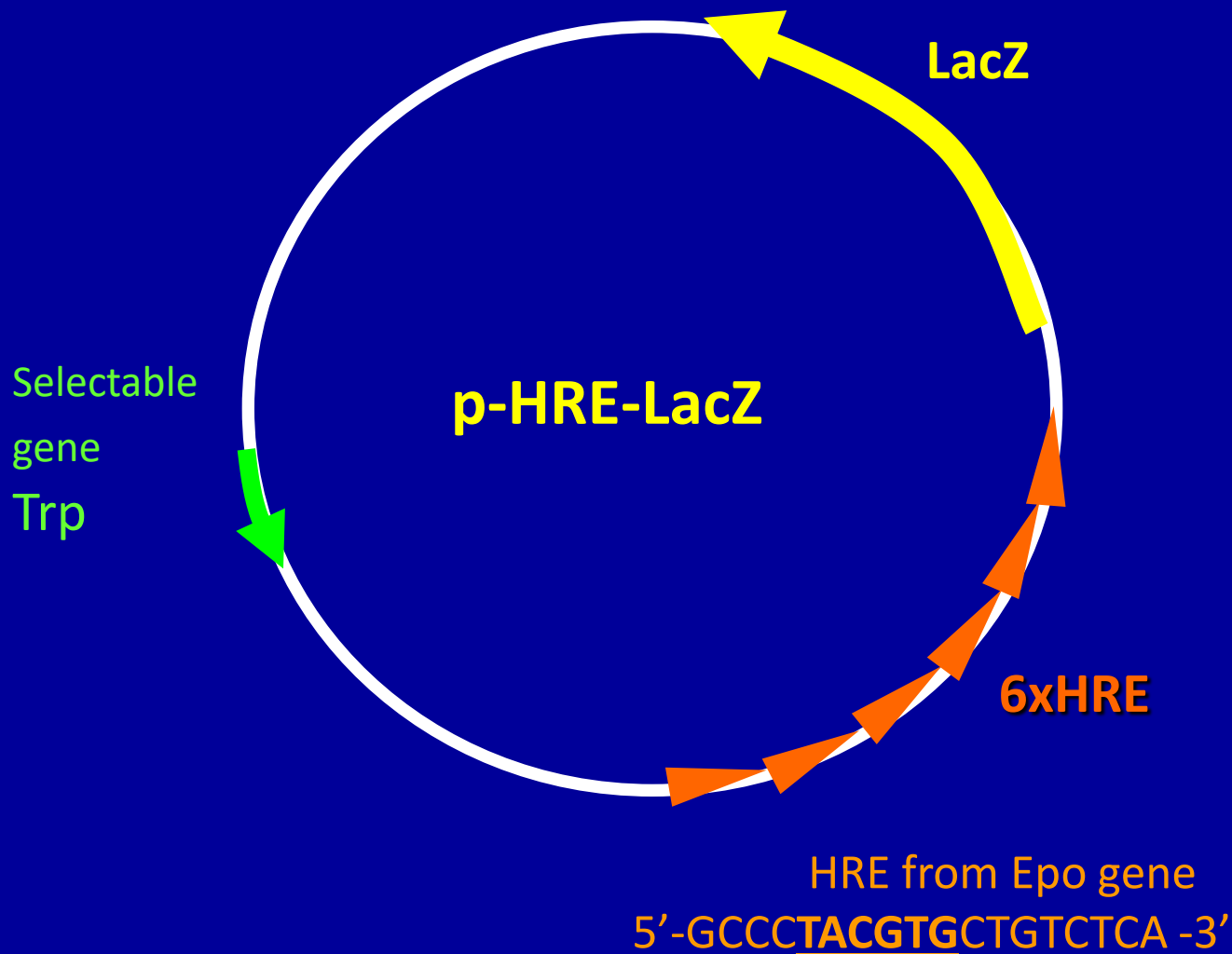


Expression plasmid for HIF-1 α and ARNT

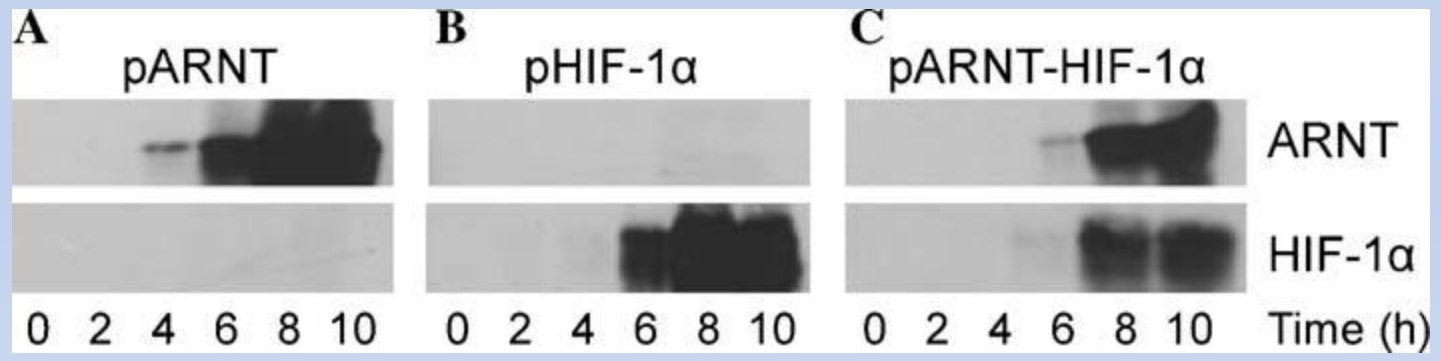


HIF-1 α and ARNT, the two subunits of HIF-1 are simultaneously expressed in yeast from the pBEVY-GL (5) vector. This vector grants the advantage of inducible (only after galactose addition to the culture medium) and stoichiometric expression of the two genes.

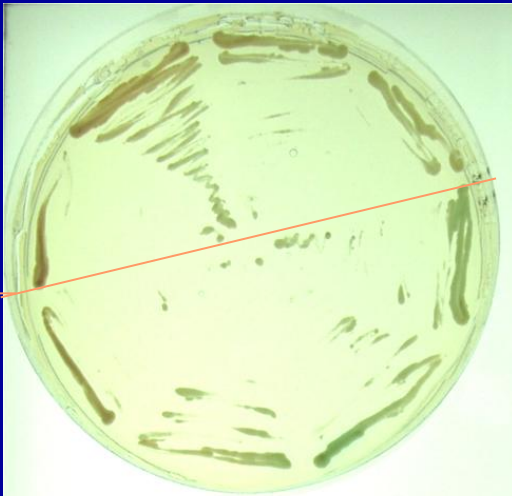
HRE dependent reporter plasmid



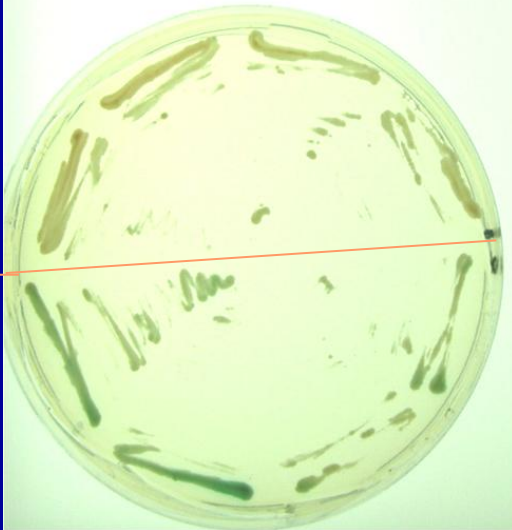
Six copies of the HRE from the erythropoietin gene were placed upstream of the *LacZ* gene in the pRW95-3 (5) vector.



**pBEVY-GL
pRW95-3**



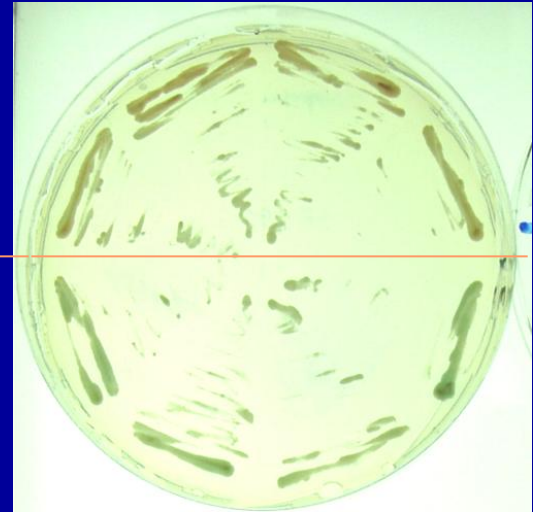
**pBEVY-GL
p-HRE-LacZ**



**p-ARNT
pRW95-3**

**p -ARNT
p-HRE-LacZ**

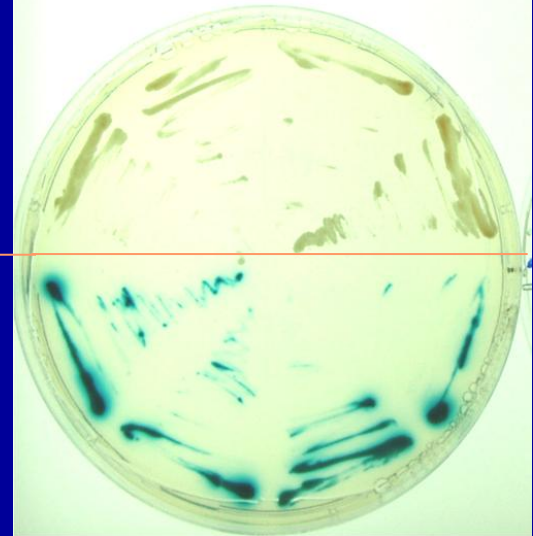
**p-HIF-1 α
pRW95-3**



**p-HIF-1 α
p-HRE-LacZ**

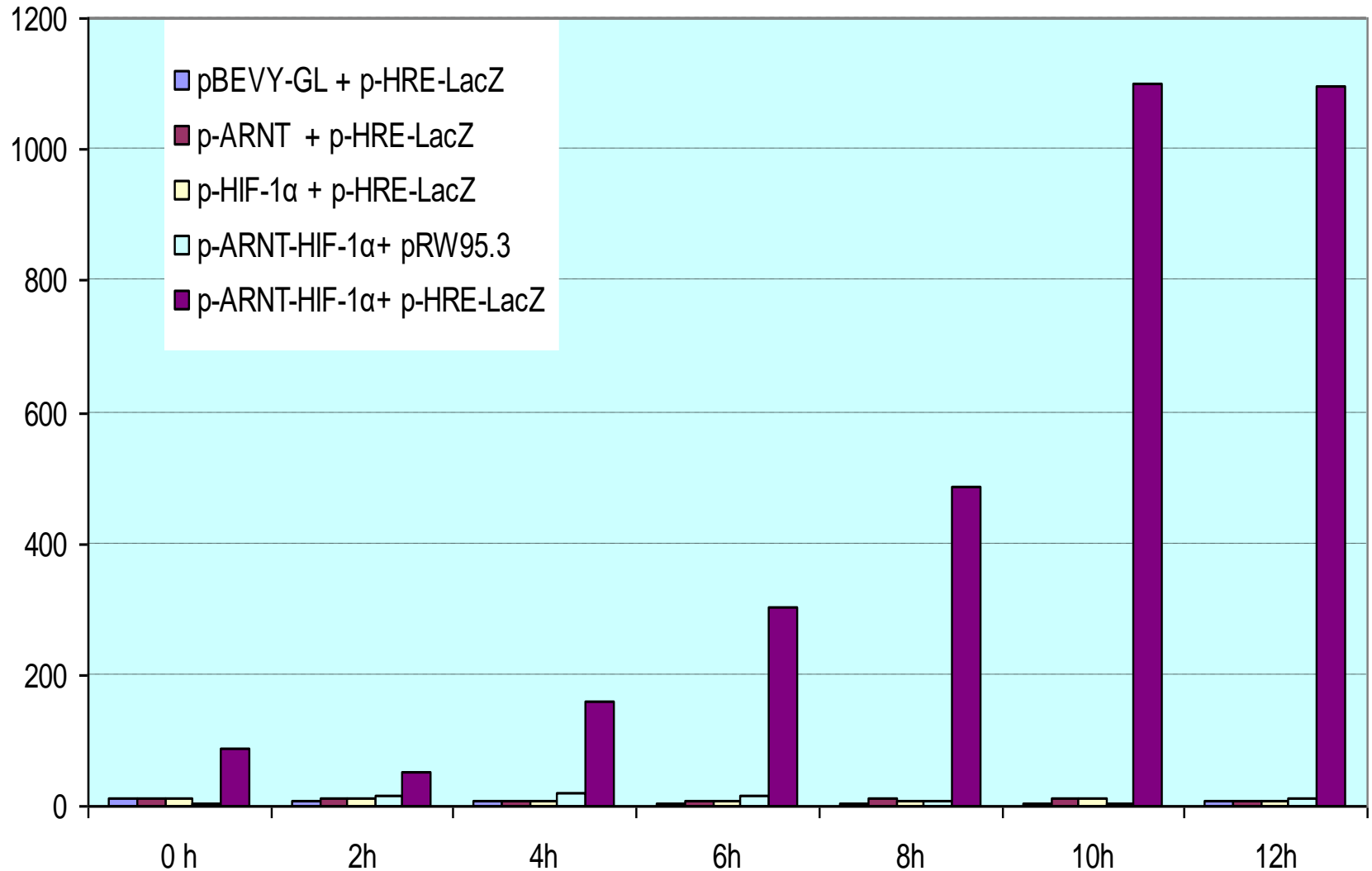
**p-ARNT-HIF-1 α
pRW95-3**

**p-ARNT-HIF-1 α
p-HRE-LacZ**



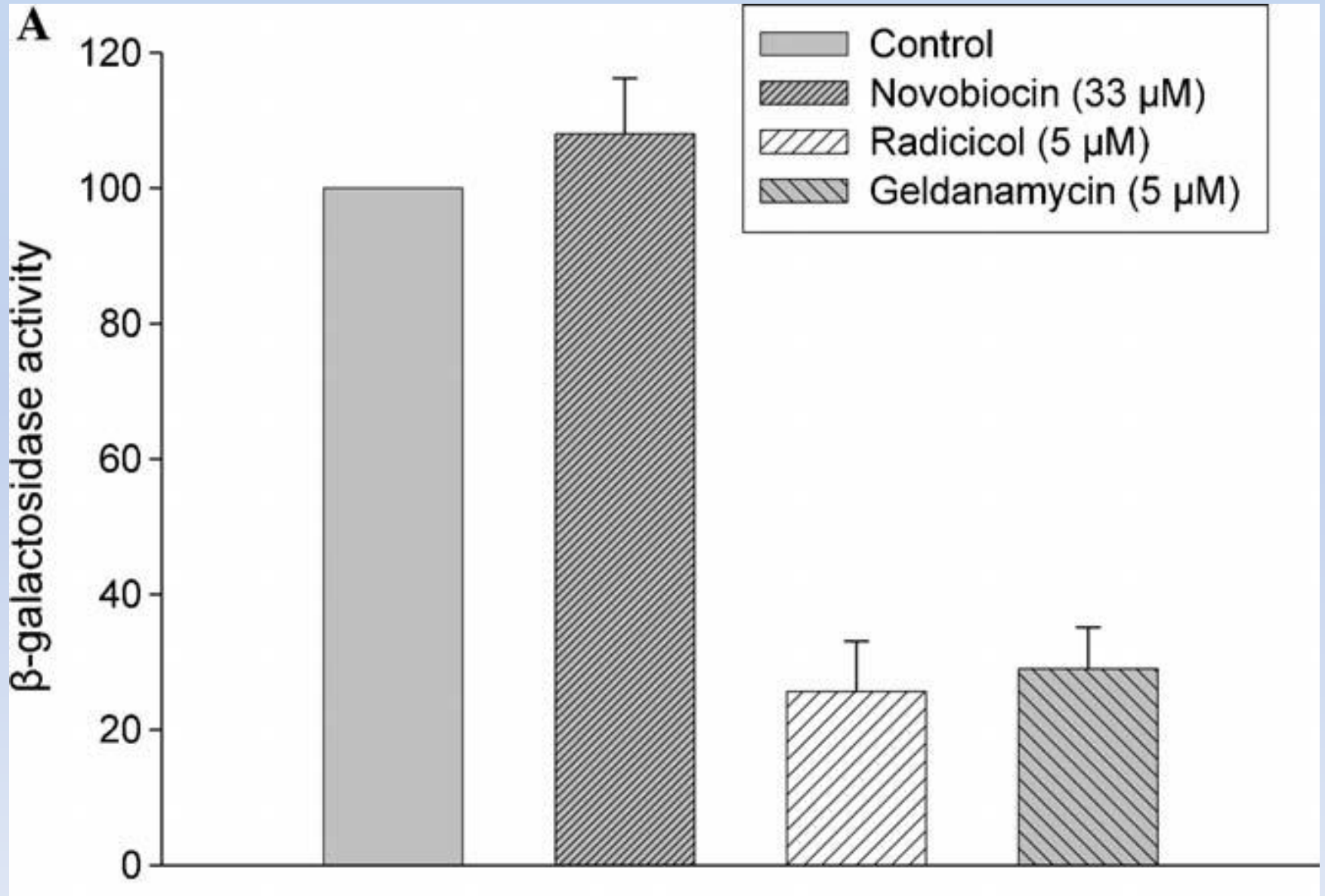
Only yeast cells that co-express HIF-1 α and ARNT and have the HRE-reporter plasmid are producing β -galactosidase as shown by hydrolysis of x-gal and formation of blue colonies.

Assessment of HIF-1 transcriptional activity in yeast



Yeast cells were transformed with various pBEVY-GL expression plasmids together with empty or HRE-containing reporter vectors (as indicated). Each transformant was cultured and aliquots were taken at the indicated time points after addition of galactose for analysis of LacZ activity. HIF-1 activity follows the same pattern as the expression of the two subunits HIF-1 α and ARNT

Drug assay



Analysis of b-galactosidase activity in the yeast strain W303-1a transformed with plasmids pARNT-HIF-1a and pHRE-LacZ, grown in raffinose-containing medium and induced by galactose for 10 h in the absence (control) or presence of 33 μ M novobiocin or 5 μ M radicicol or 5 μ M geldanamycin (as indicated). Results are shown as % of activity in relation to the control and are average of three independent experiments performed in triplicate (\pm SE).

