


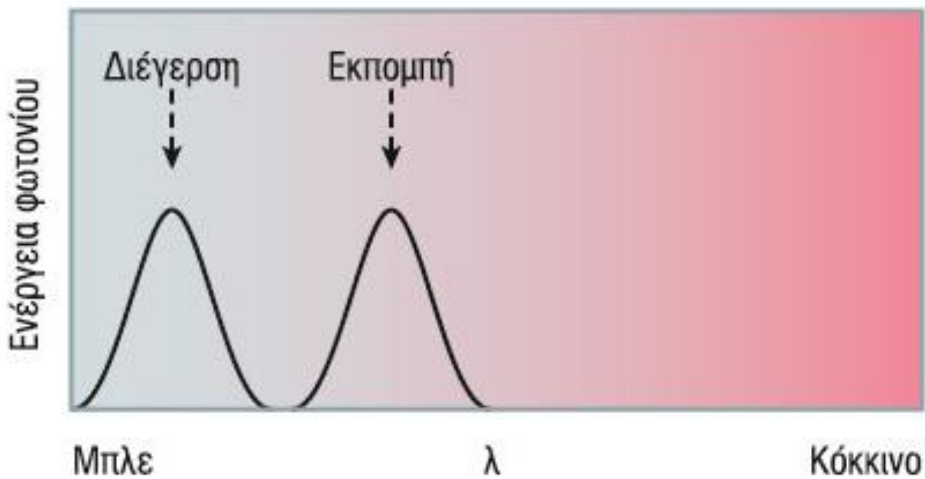


ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

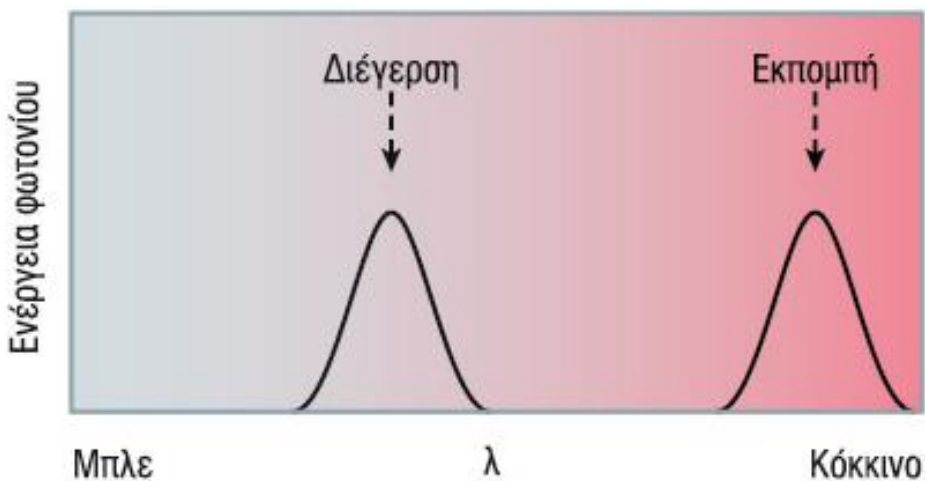
Μάθημα 4^ο

- 
- ✓ PCR
 - ✓ Real Time PCR-FRET & εφαρμογές τους
 - ✓ Single cell sequencing
 - ✓ Blots: Southern, Northern, western, Southwestern, Northwestern
 - ✓ Μικροσυστοιχίες- MicroArrays
 - ✓ RNA-seq
 - ✓ Array-CGH
 - ✓ Διαγονιδιακά ποντίκια- Transgenic mice

FRET PCR

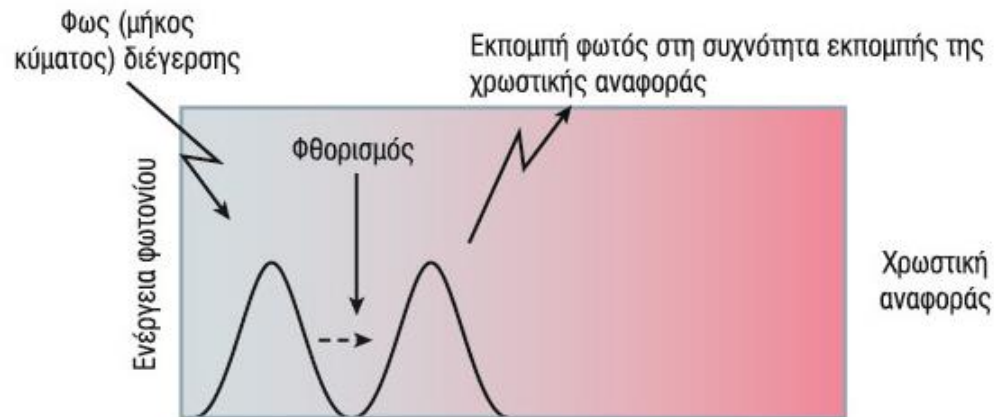


Φθορισμοφόρο 1
"αναφοράς"

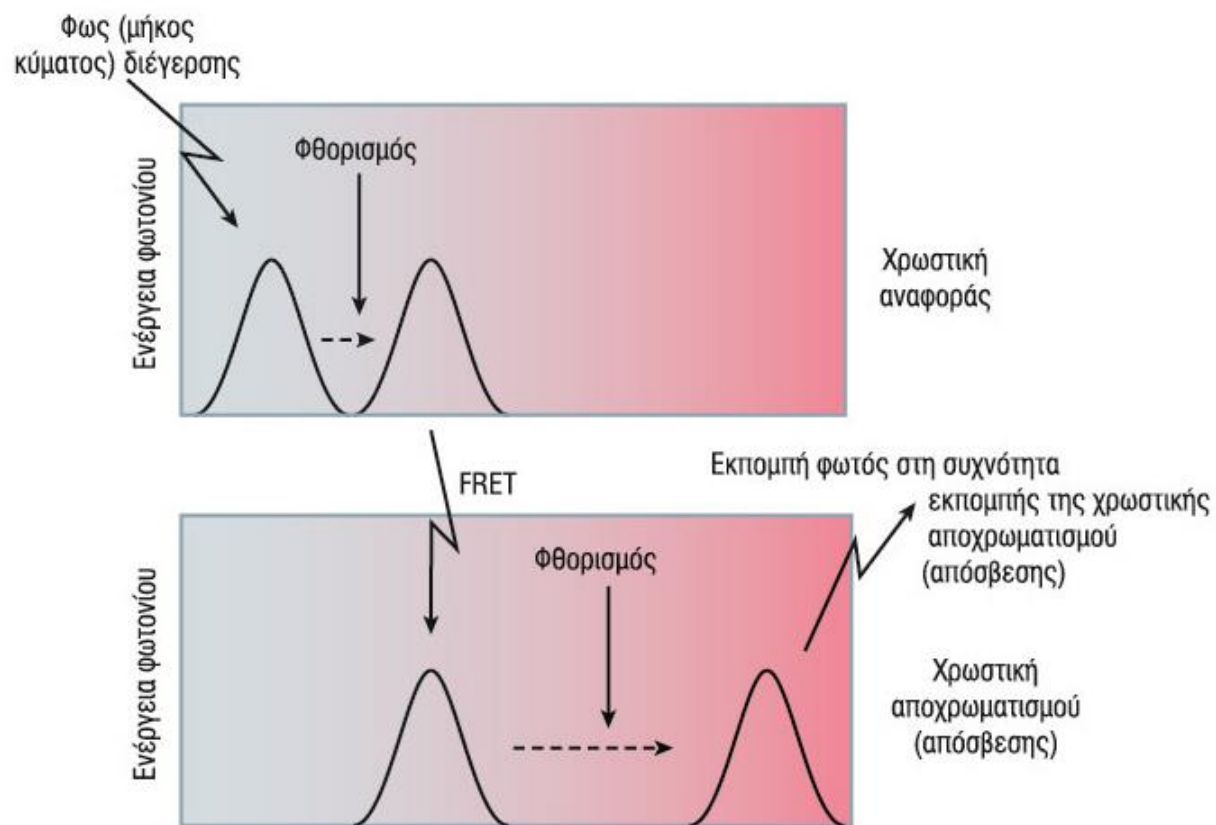


Φθορισμοφόρο 2
"αποχρωματισμού (απόσβεσης)"

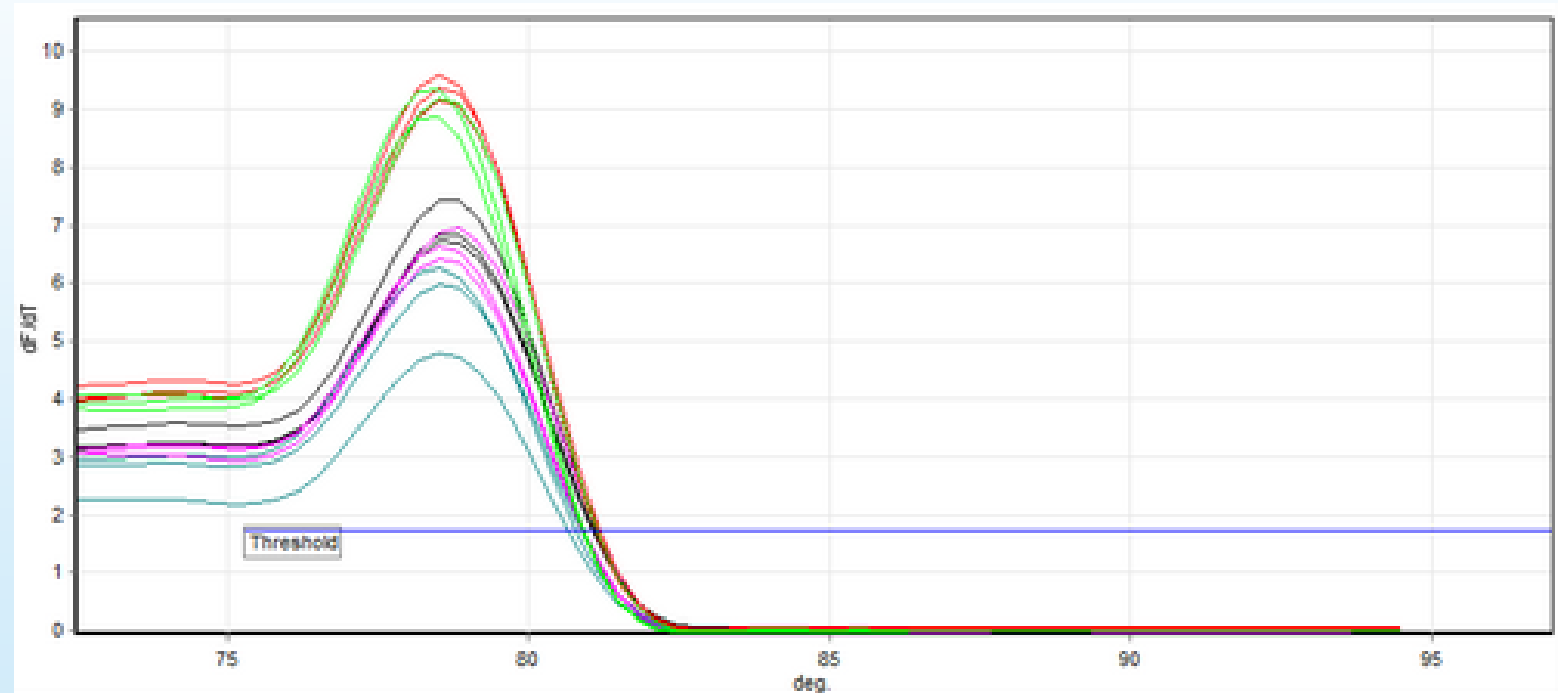
(β) Όταν οι χρωστικές αναφοράς και αποχρωματισμού (απόσβεσης) δεν είναι σε κοντινή απόσταση



(γ) Όταν οι χρωστικές αναφοράς και αποχρωματισμού (απόσβεσης) είναι σε κοντινή απόσταση



Melting curve produced at the end of real-time PCR



Εφαρμογές Real time PCR

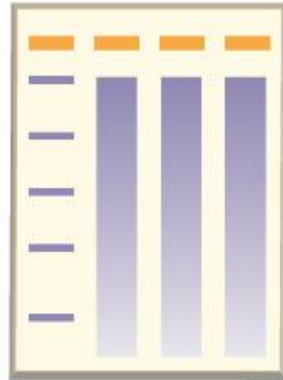
- ✓ Ιατρικές εφαρμογές & εγκληματολογία: Ανίχνευση βακτηριακών και ιογενών λοιμώξεων, επιλογή θεραπείας ή θεραπευτικής προσέγγισης.
- ✓ Γονιδιακή έκφραση: Μέτρηση των επιπέδων mRNA για την κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων.
- ✓ Ποσοτικοποίηση: Προσδιορισμός του ιικού φορτίου, ανάλυση λυμάτων για περιβαλλοντική επιτήρηση, κ.α.
- ✓ Ανίχνευση SNPs ARMS με PCR

Πλεονεκτήματα σε σχέση με τη συμβατική PCR

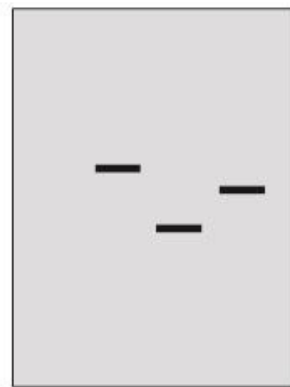
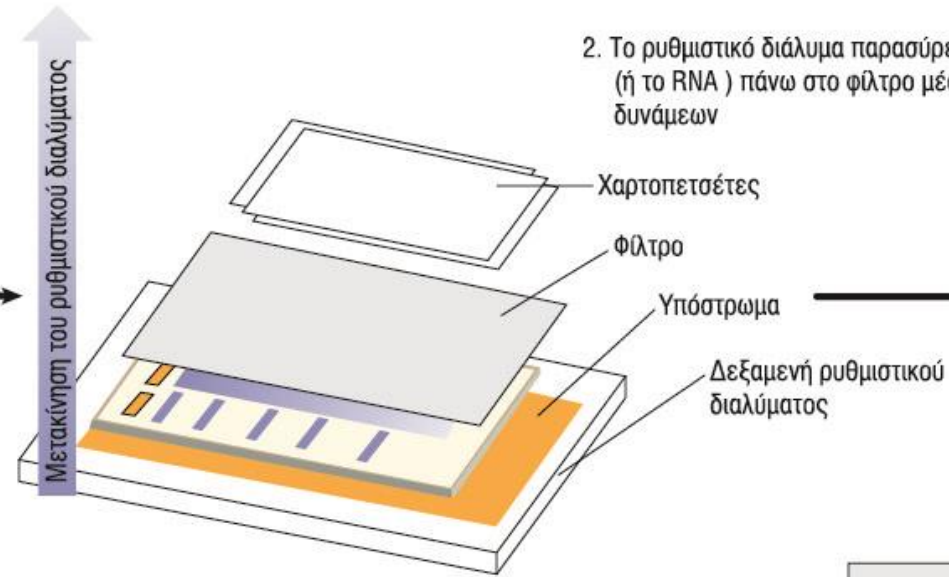
- ✓ Ανάλυση σε πραγματικό χρόνο: Δεν απαιτείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα μετά την PCR.
- ✓ Υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια: Επιτρέπει τόσο την ποσοτικοποίηση όσο και την ανίχνευση.
- ✓ Ταχύτητα και ασφάλεια: Η αυτοματοποιημένη ανίχνευση μειώνει τους κινδύνους μόλυνσης και εξοικονομεί χρόνο

Υβριδισμός DNA - Southern

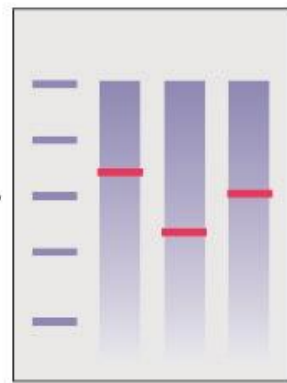
1. Το DNA εφαρμόζεται στην πηκτή και υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση



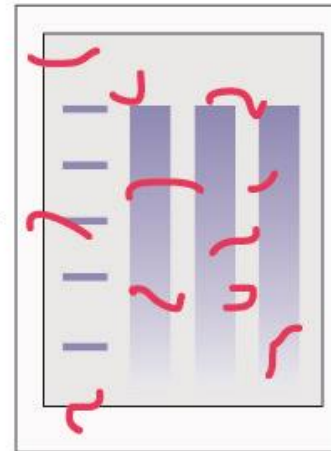
2. Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασύρει το DNA (ή το RNA) πάνω στο φίλτρο μέσω τριχοειδικών δυνάμεων



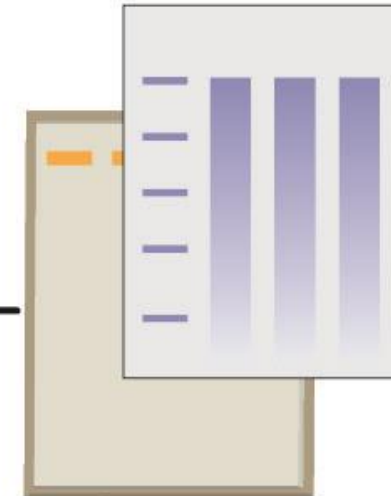
5. Ανάπτυξη (εκτύπωση) αυτοραδιογραφήματος



4. Ξέπλυμα του μη δεσμευμένου ιχνηθέτη και έκθεση σε φιλμ ακτίνων χ



3. Υβριδισμός με σημασμένο ιχνηθέτη επιθυμητής αλληλουχίας



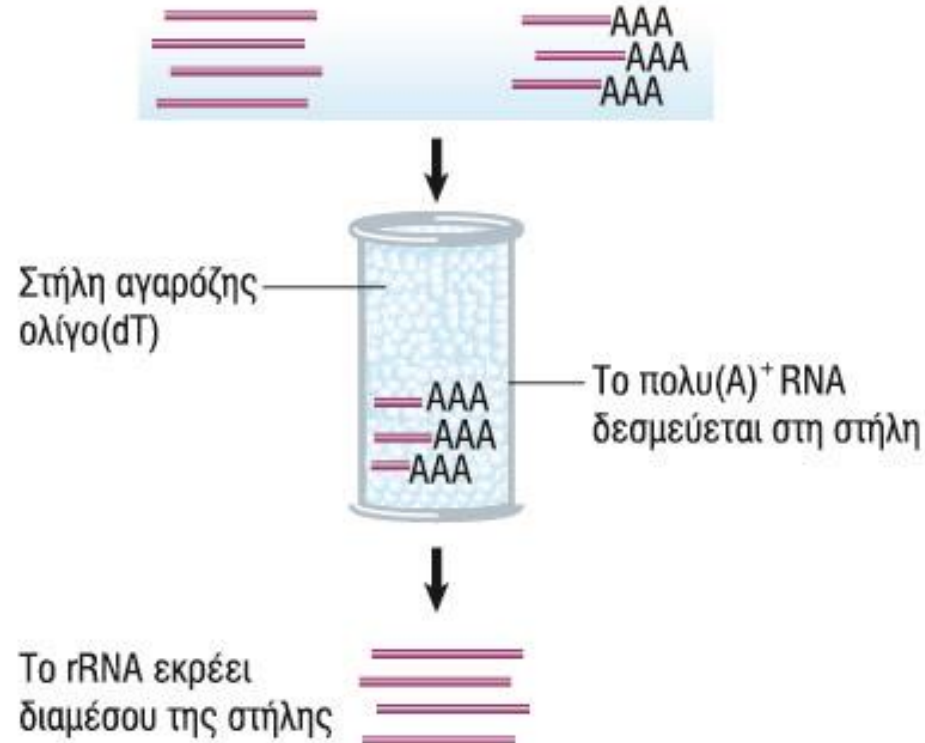
Υβριδισμός κατά Southern: πλεονεκτήματα

- ✓ Αυξημένη ευαισθησία
- ✓ Εξειδικευμένος εντοπισμός συγκεκριμένων αλληλουχιών ενδιαφέροντος
- ✓ Ποσοτική μέθοδος

Υβριδισμός RNA - Northern

Το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού RNA είναι rRNA που στερείται πολυ(A) ουράς

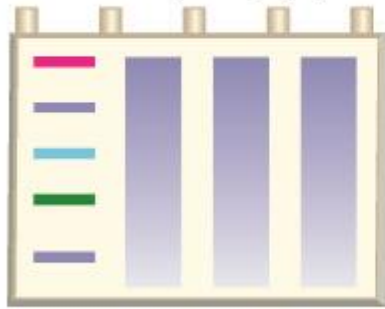
Το mRNA με πολυ(A) αποτελεί μικρή αναλογία του ολικού RNA



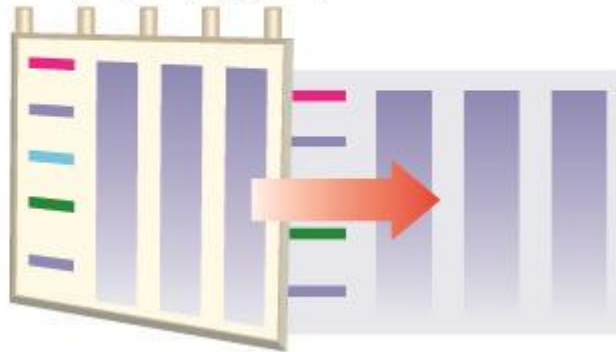
Εικόνα 2.22 Το Poly(A)⁺ RNA μπορεί να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα RNA με κλασμάτωση σε στήλη ολιγο(dT).

Western blot

1. Πρωτεΐνη εφαρμόζεται σε πηκτή SDS και ηλεκτροφορεύεται



2. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη





3. Επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα



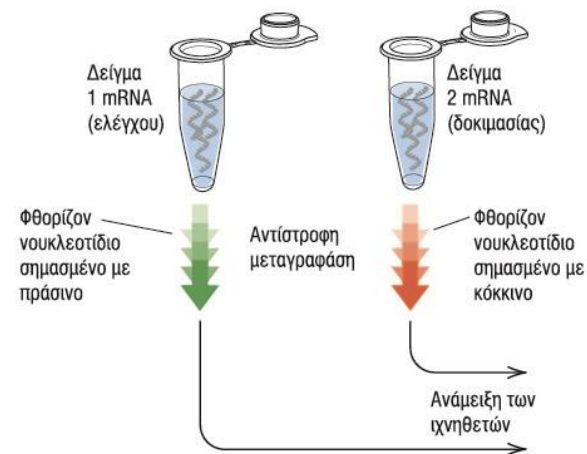
5. Ανίχνευση δευτερογενούς αντισώματος (με την προσθήκη υποστρώματος για το ένζυμο)



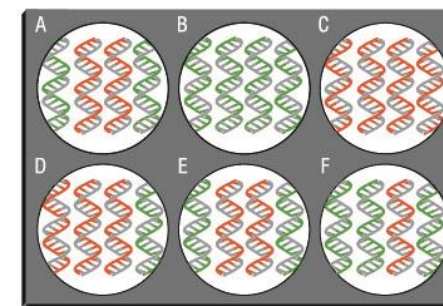
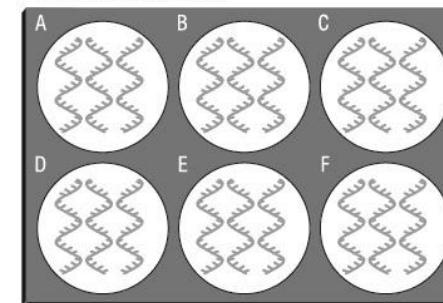
- 
- 
- ✓ Αποτύπωση Southwestern
 - ✓ Αποτύπωση Northwestern

Μικροσυστοιχίες DNA

- ✓ Το ερευνητικό δείγμα είναι στο διάλυμα
- ✓ Το γνωστό δείγμα – ακινητοποιημένο

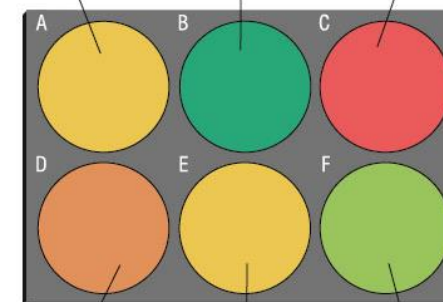


DNA μικροσυστοιχία (τσιπ)



Σάρωση με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού

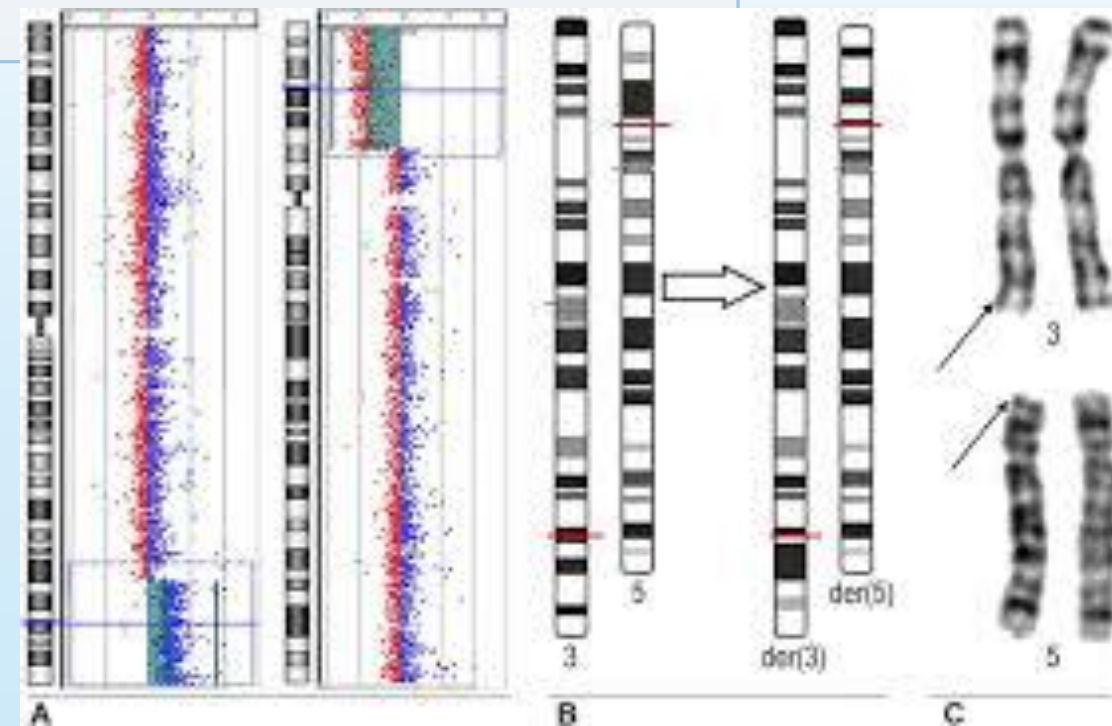
Το γονίδιο A εκφράζεται εξίσου στα δείγματα 1 και 2
Το γονίδιο B υποεκφράζεται κατά πολύ στο δείγμα 2
Το γονίδιο C είναι υψηλά υπερεκφραζόμενο στο δείγμα 2



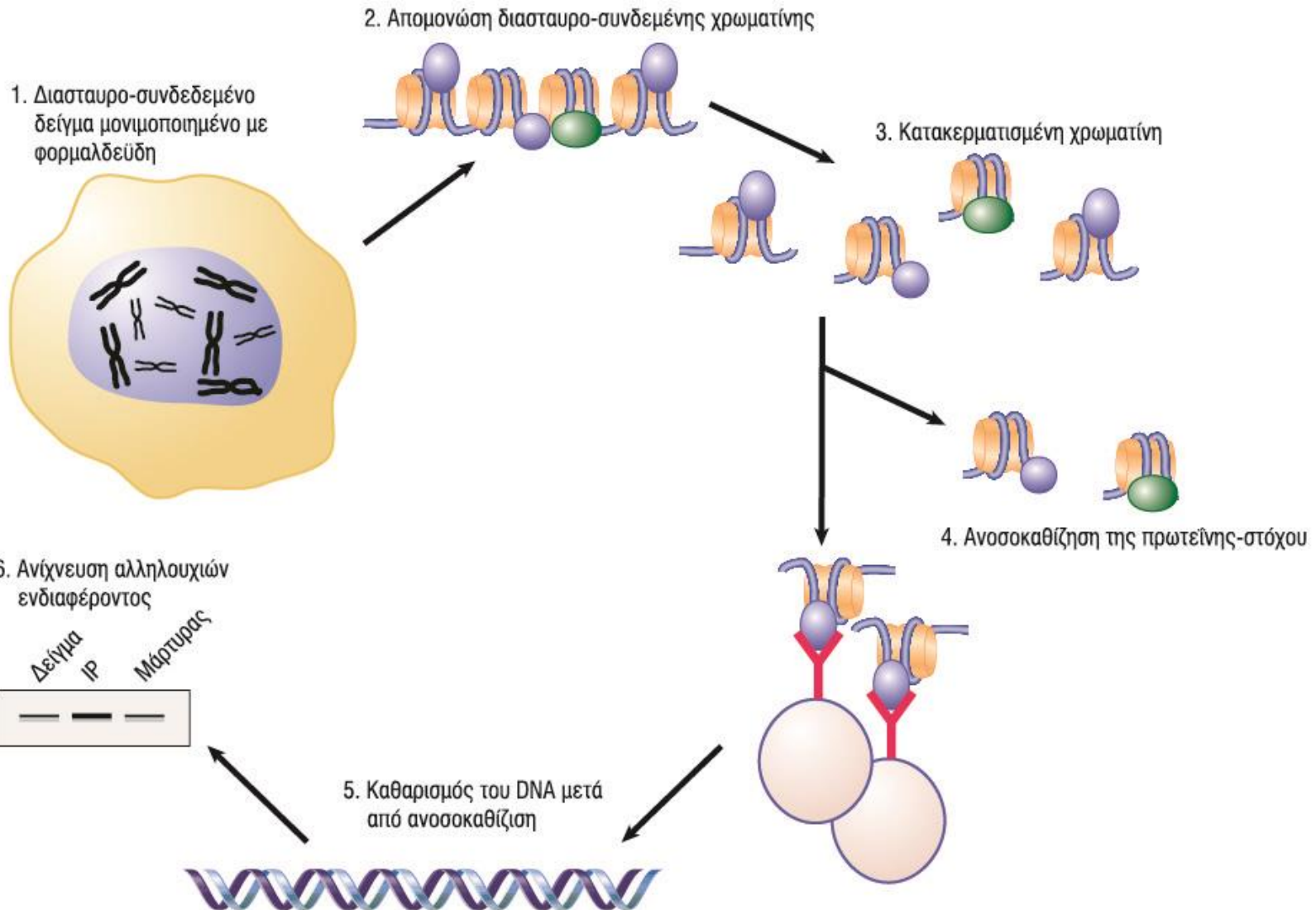
Το γονίδιο D υπερεκφράζεται μέτρια στο δείγμα 2
Το γονίδιο E εκφράζεται στο ίδιο επίπεδο στα δείγματα 1 και 2
Το γονίδιο F υποεκφράζεται μέτρια στο δείγμα 2

Μικροσυστοιχίες DNA- εφαρμογές

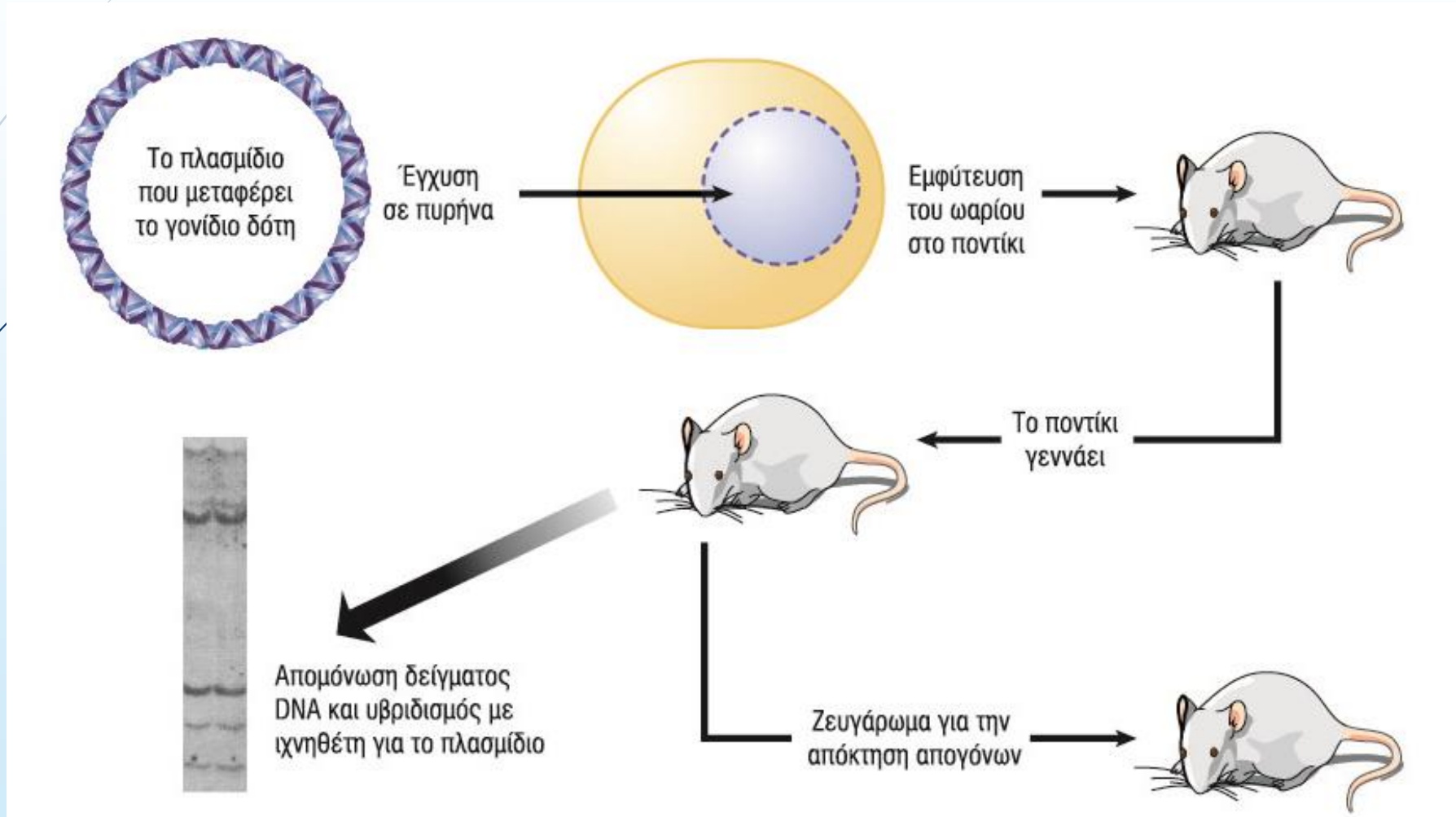
- ✓ Τυποποίηση γονιδιακής έκφρασης
- ✓ Ανάλυση Γονοτύπου
- ✓ Ανάλυση πολυμορφισμών-SNPs
- ✓ Συγκριτικός Γονιδωματικός Υβριδισμός μικροσυστοιχειών- Array CGH



Ανοσοκαθίζηση χρωματίνης-Chromatin IP



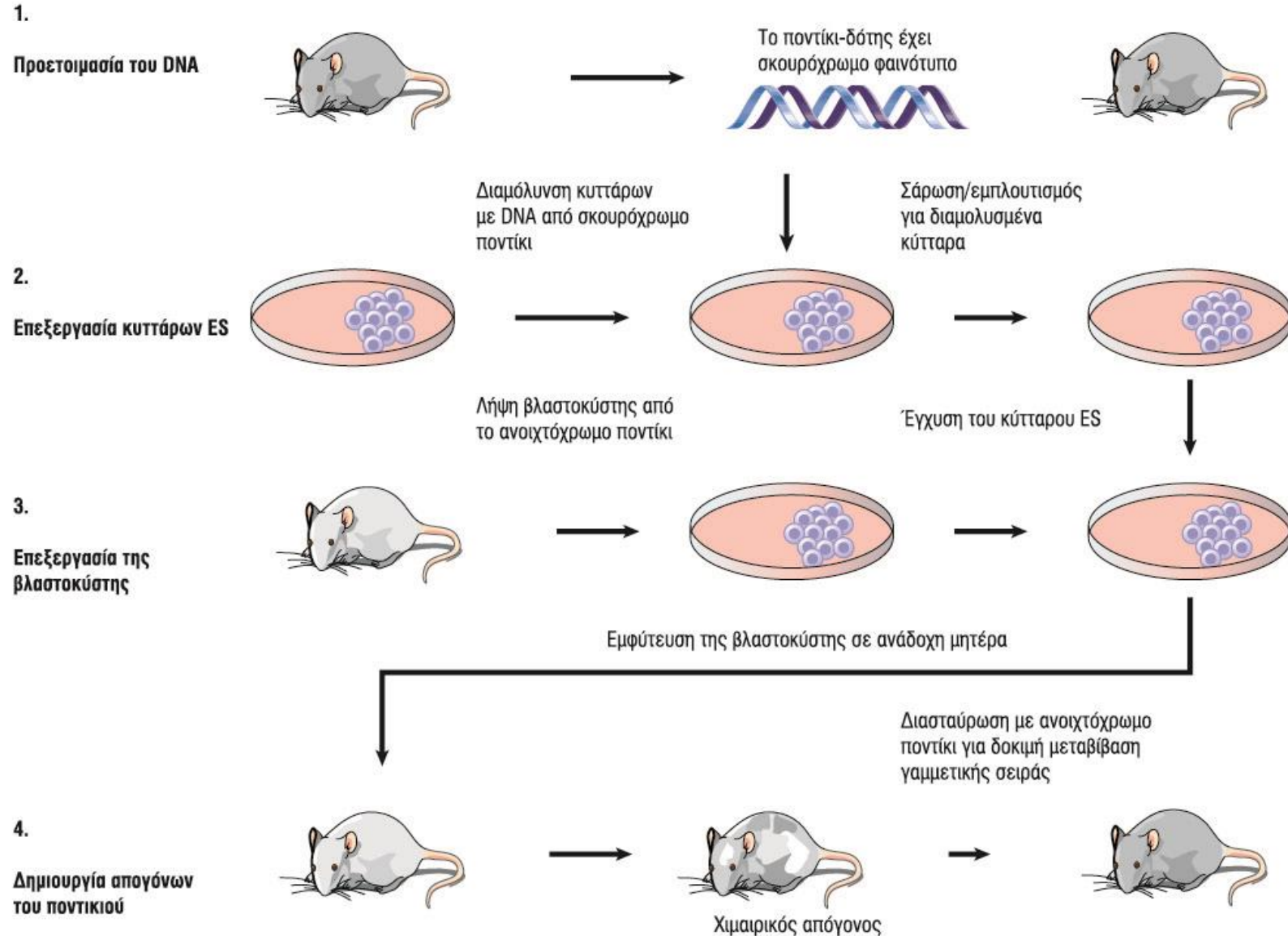
Διαμόλυνση κυττάρων (Transfection) – δημιουργία διαγονιδιακών ζώων



Διαγονιδιακά ζώα- Ορισμοί

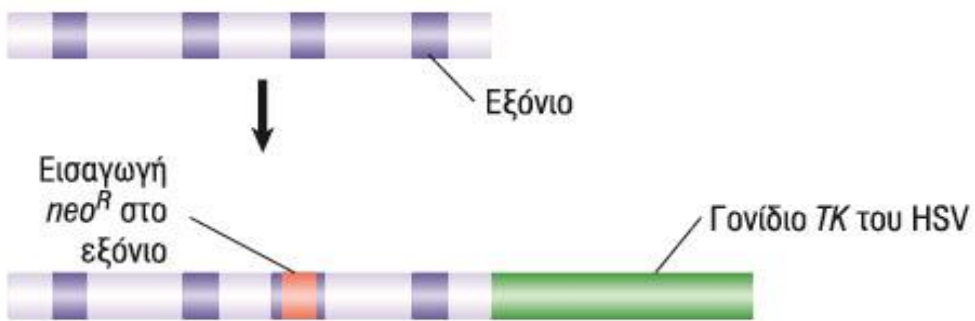
- ✓ **Knock out** (Εξάλειψη γονιδίου): Ο οργανισμός φέρει απενεργοποιημένο γονίδιο μέσω στοχευμένης μετάλλαξης
- ✓ **Knock in** (μερική Ανταλλαγή): Ο οργανισμός φέρει αλληλουχία γονιδίου που έχει αντικατασταθεί από άλλη
- ✓ **Knock down**: Ο οργανισμός φέρει γονίδιο με μειωμένη έκφραση- συνήθως προϊόν RNAi.

Διαγονιδιακά ζώα από εμβρυικά βλαστικά κύτταρα- Embryonic Stem cells

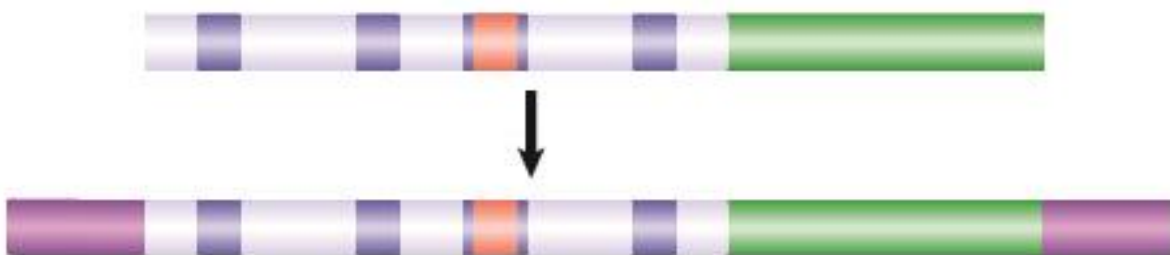


Δημιουργία διαγονιδίου με γονίδια επιλογής (neo^R & TK)

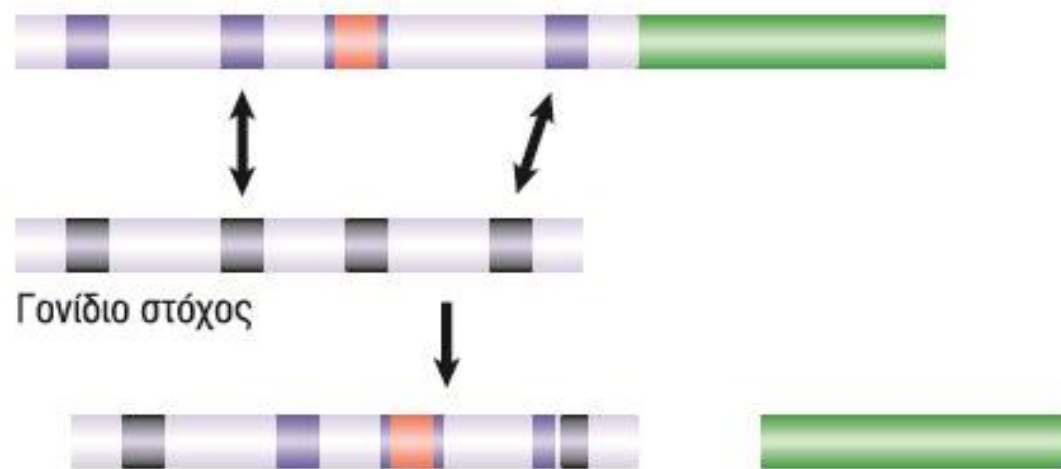
Το γονίδιο άγριου τύπου τροποποιείται για να δημιουργηθεί ο δότης



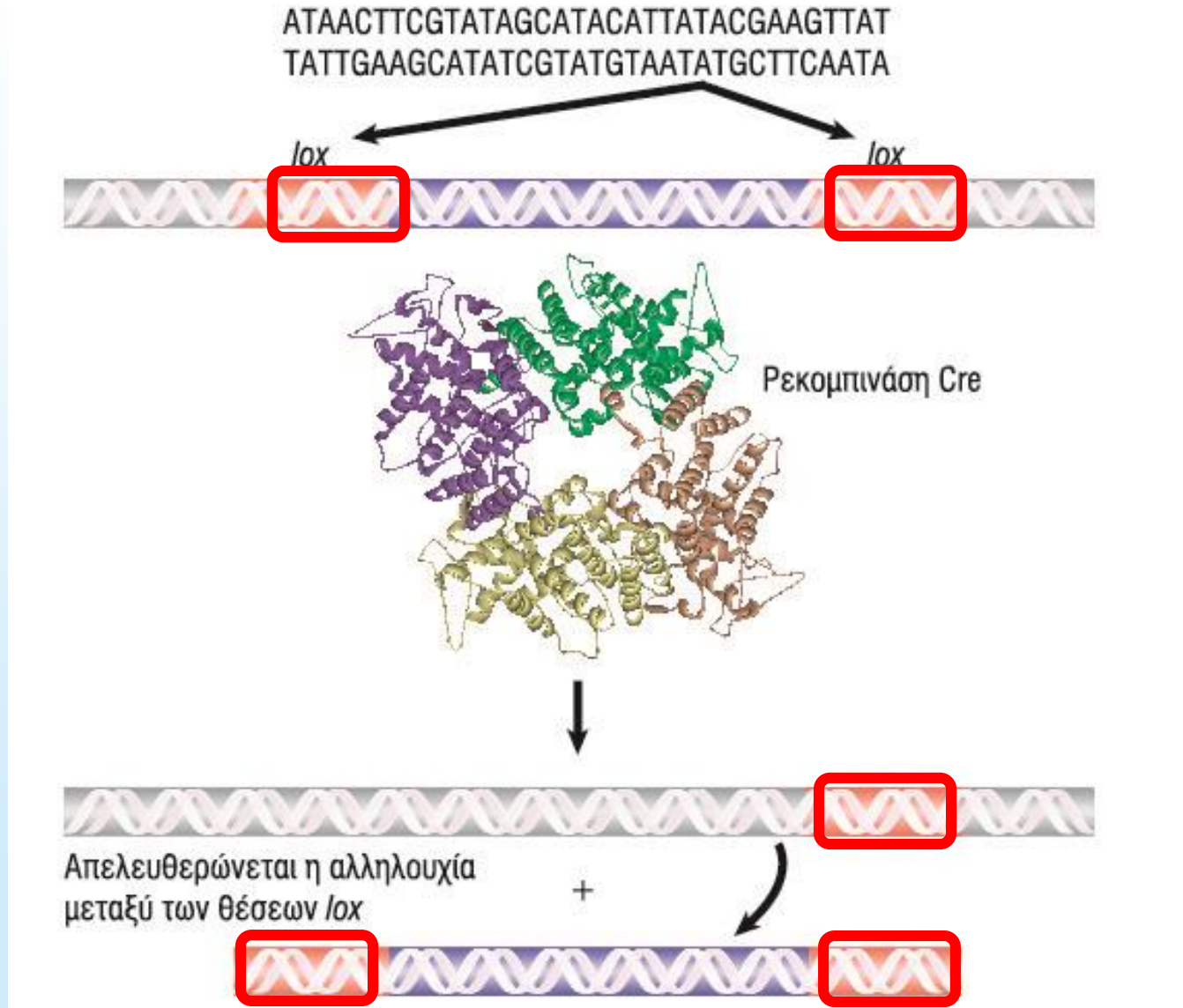
Ο μη ομόλογος ανασυνδυασμός εισάγει ολόκληρη τη μονάδα δότη σε τυχαία θέση



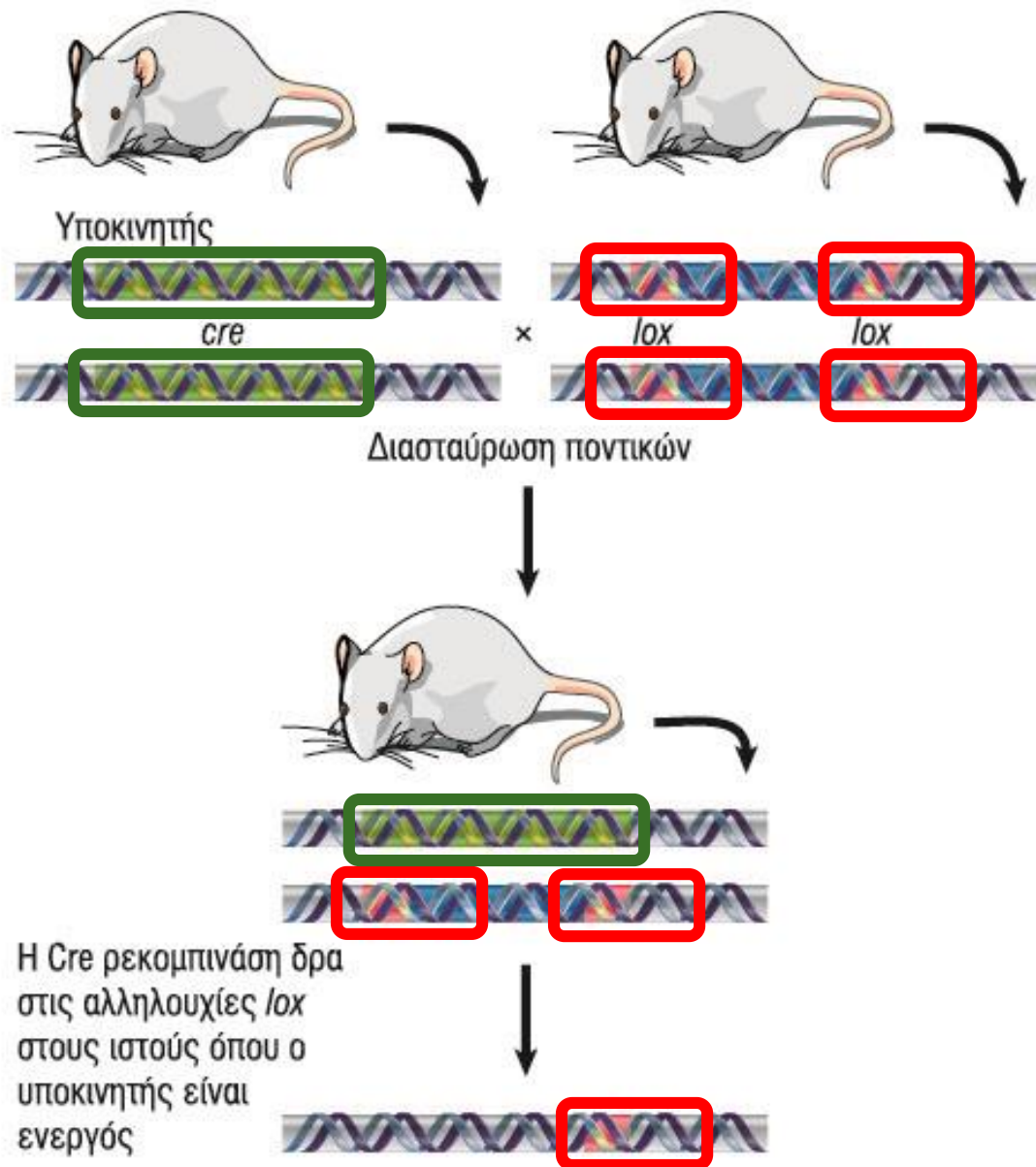
Ο ομόλογος ανασυνδυασμός εισάγει το neo^R στο στόχο και διαχωρίζει το γονίδιο TK



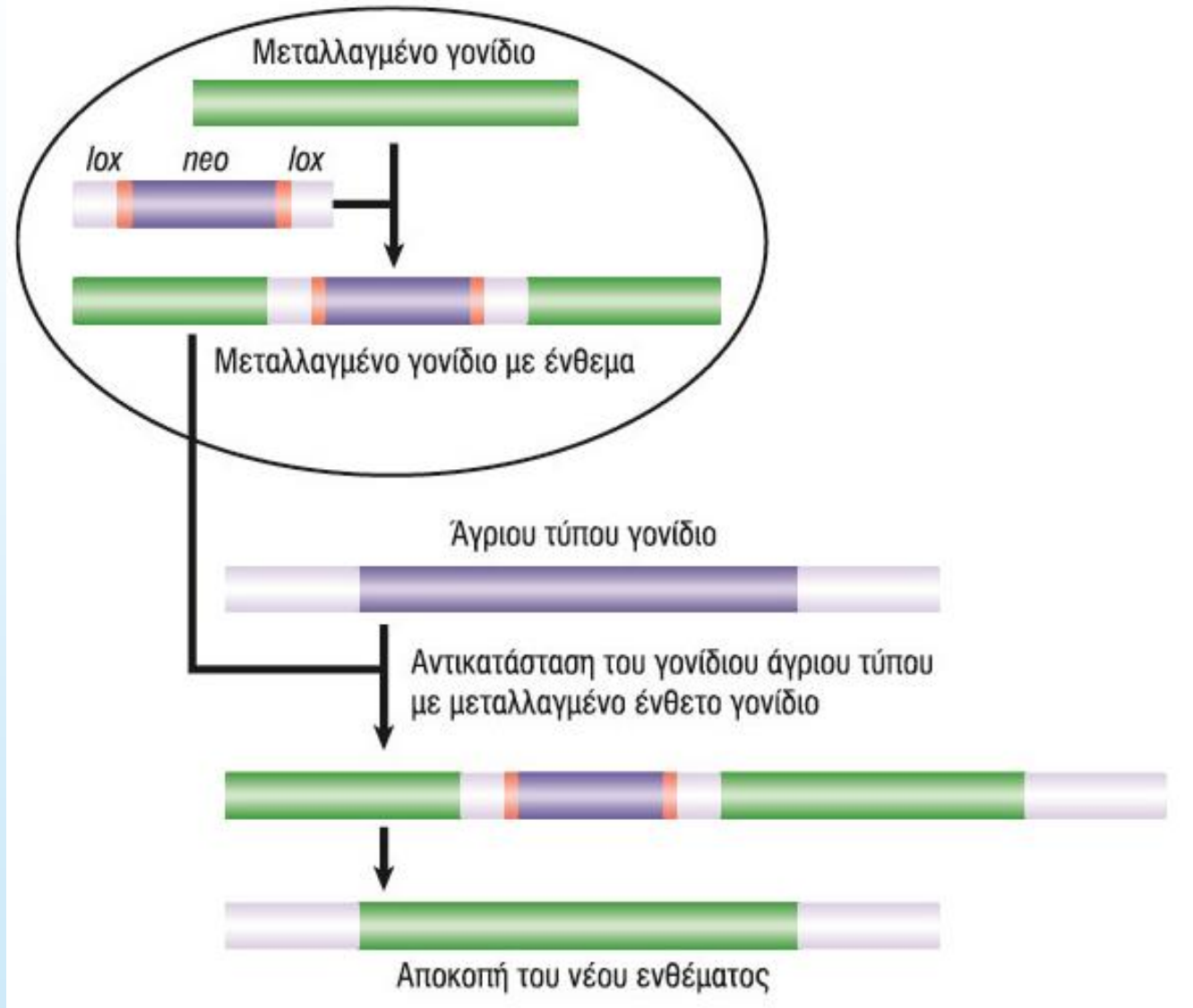
Το σύστημα γενετικού ανασυνδυασμού Cre-lox



Το *Knock out* ποντίκι Cre-lox



Το *Knock in* ποντίκι Cre-lox



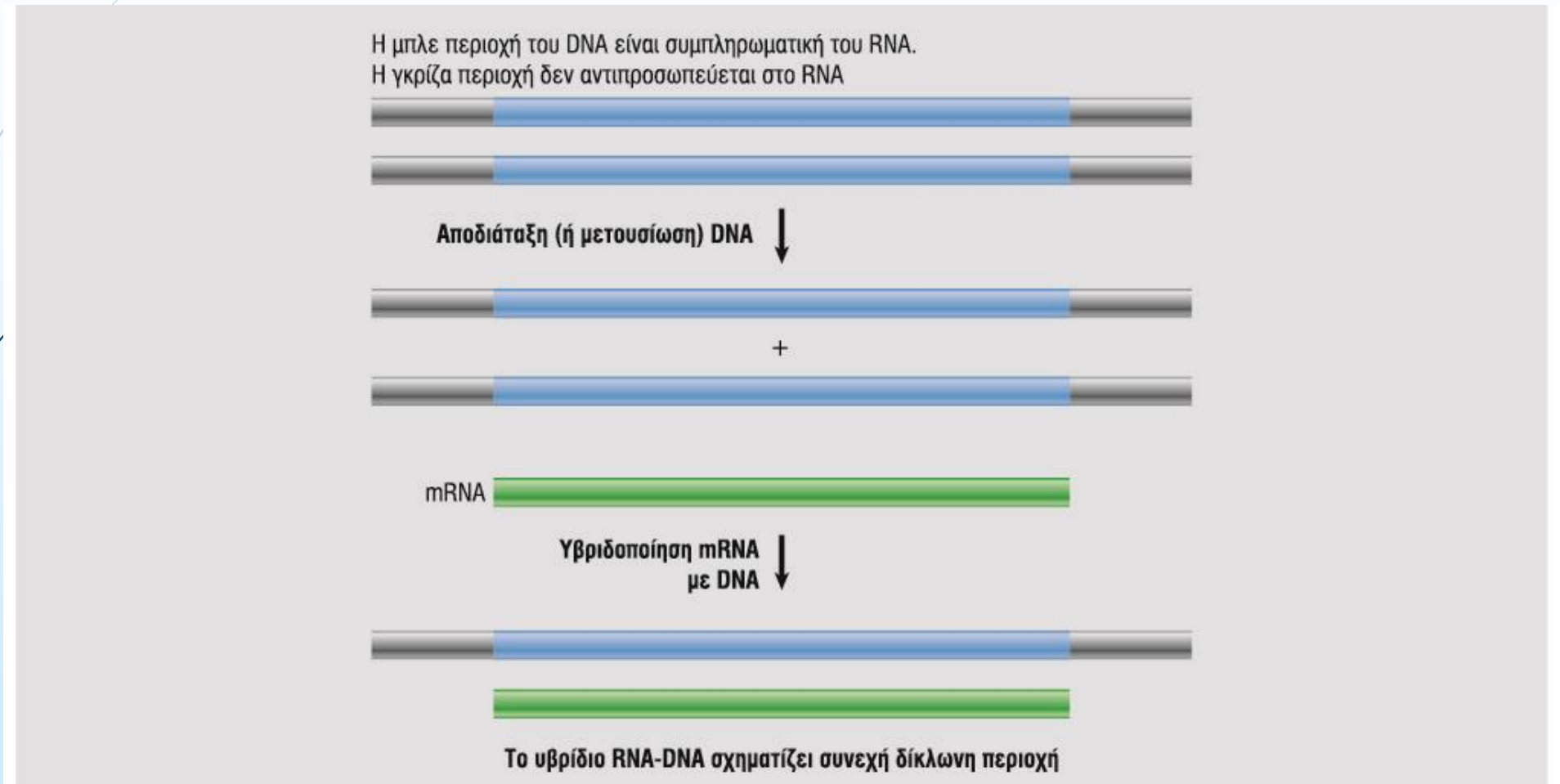
Νουκλεάσες που συμμετέχουν στη δημιουργία Διαγονιδιακών ζώων

1. Νουκλεάσες δακτυλίων ψευδαργύρων (Zinc finger nucleases) & επικράτεια ενδονουκλεάσης FokI → ZFN
2. Νουκλεάσες τελεστές που μοιάζουν με ενεργοποιητές μεταγραφής (Transcription activator like effector nucleases-TALENs)
3. Μεγανουκλεάσες-Meganucleases
4. Το σύστημα CRISPR cas- προκαρυωτικές μικρές παλίνδρομες τακτικώς κατανεμημένες σε συστάδες επαναλήψεις [Prokaryotic clustered regularly interspaced short palindromic repeats –CRISPR & CRISPR associated Cas nucleases]

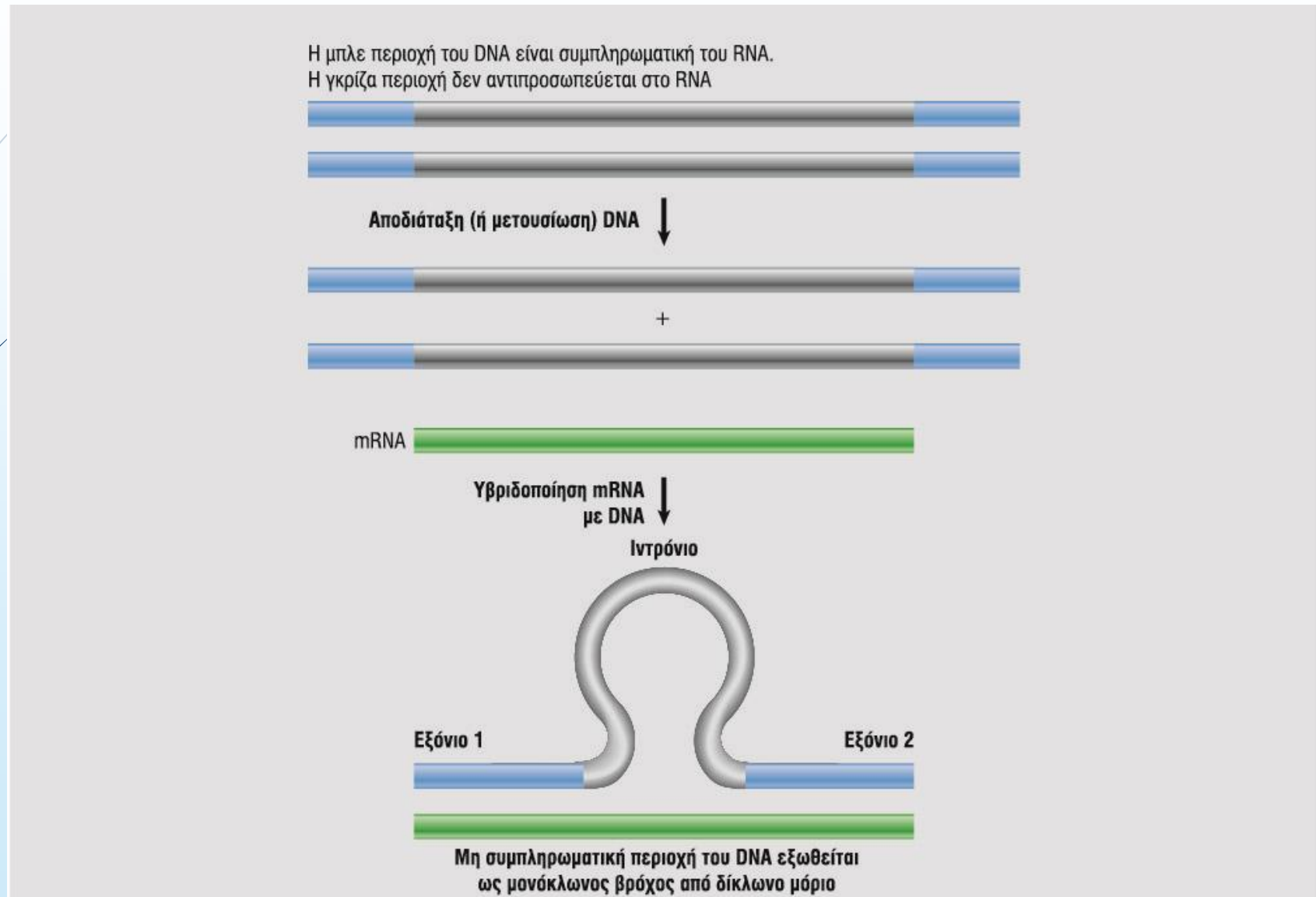


Το διακεκομμένο γονίδιο

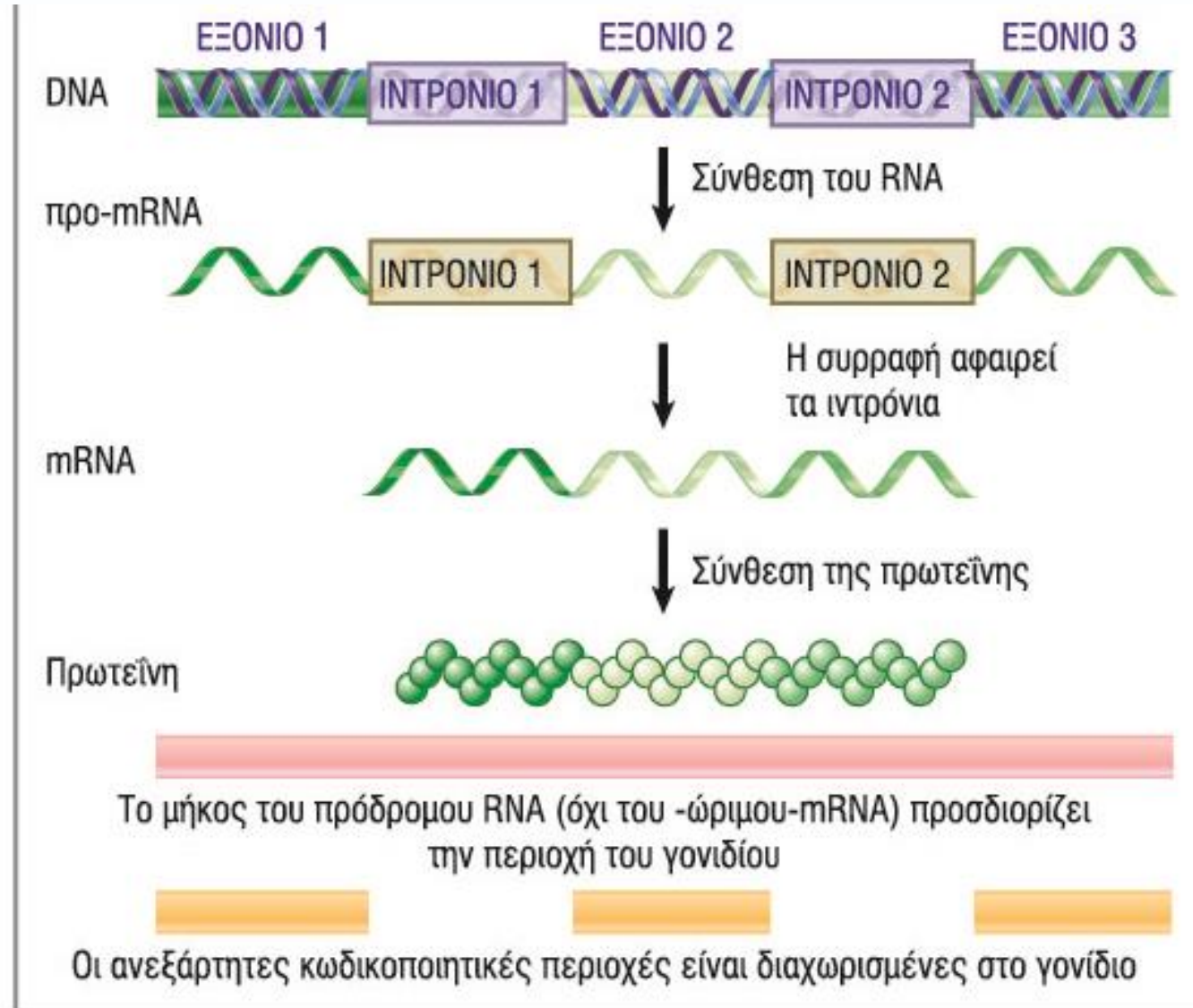
Υβριδισμός mRNA με μη διακεκομμένο γονίδιο



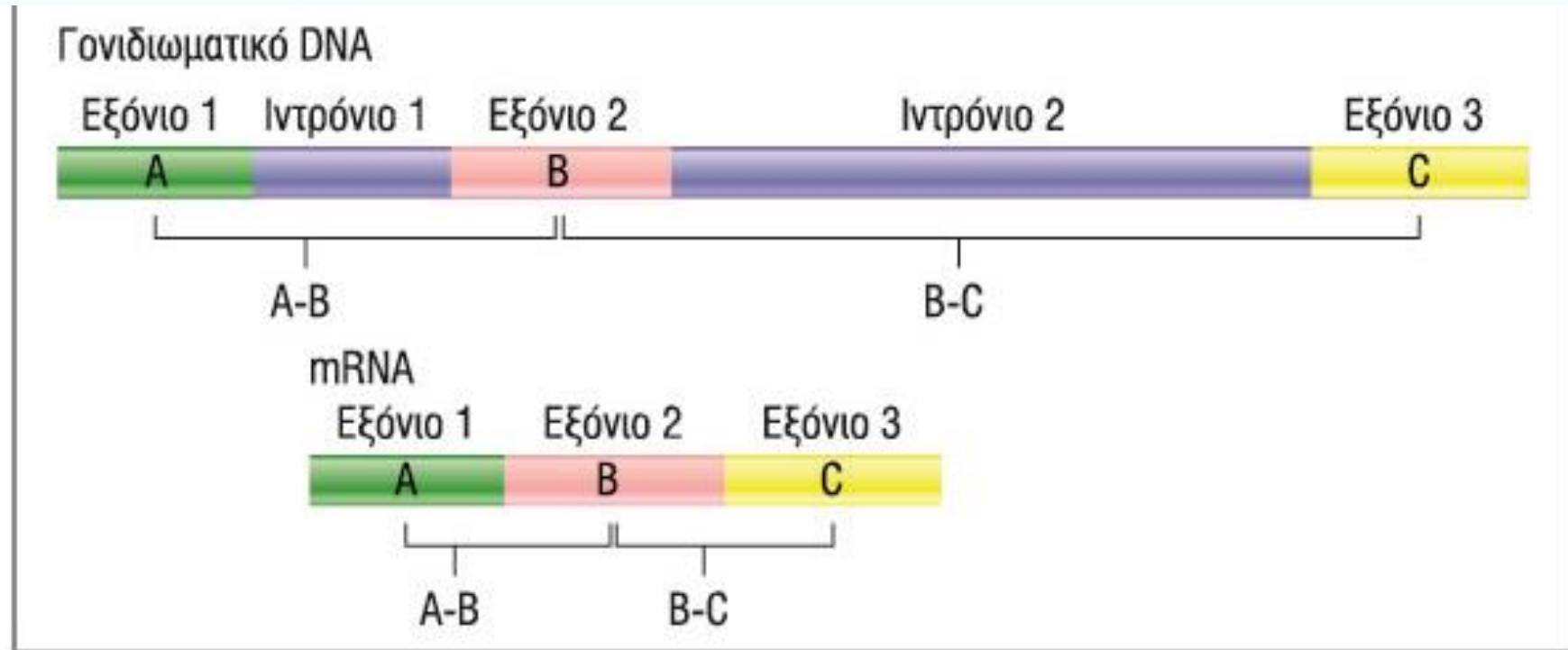
Υβριδισμός mRNA με διακεκομμένο γονίδιο



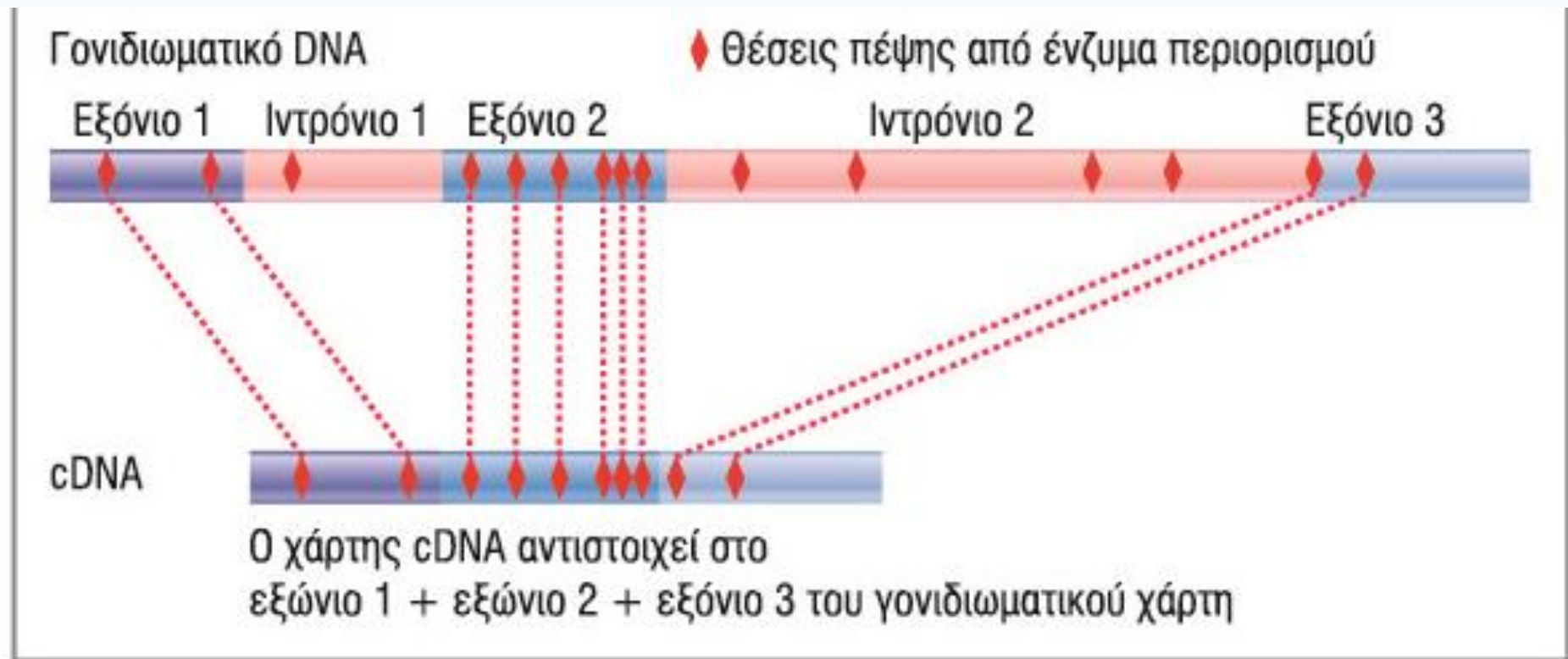
Τα ιντρόνια αφαιρούνται για να δημιουργηθεί το mRNA



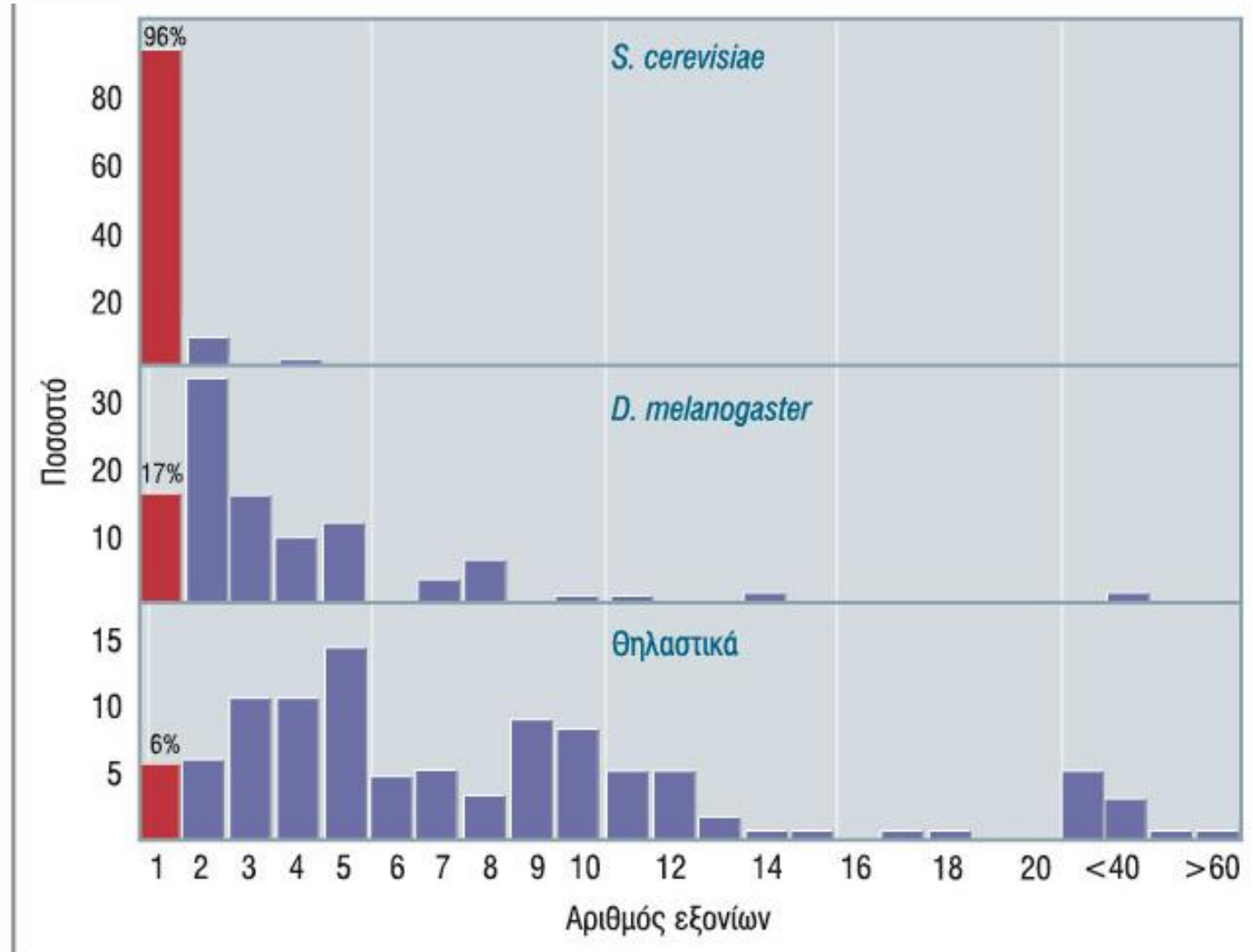
Η σειρά των εξονίων δεν αλλάζει στο DNA & RNA



Οι θέσεις που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες στα ιντρόνια λείπουν από το cDNA



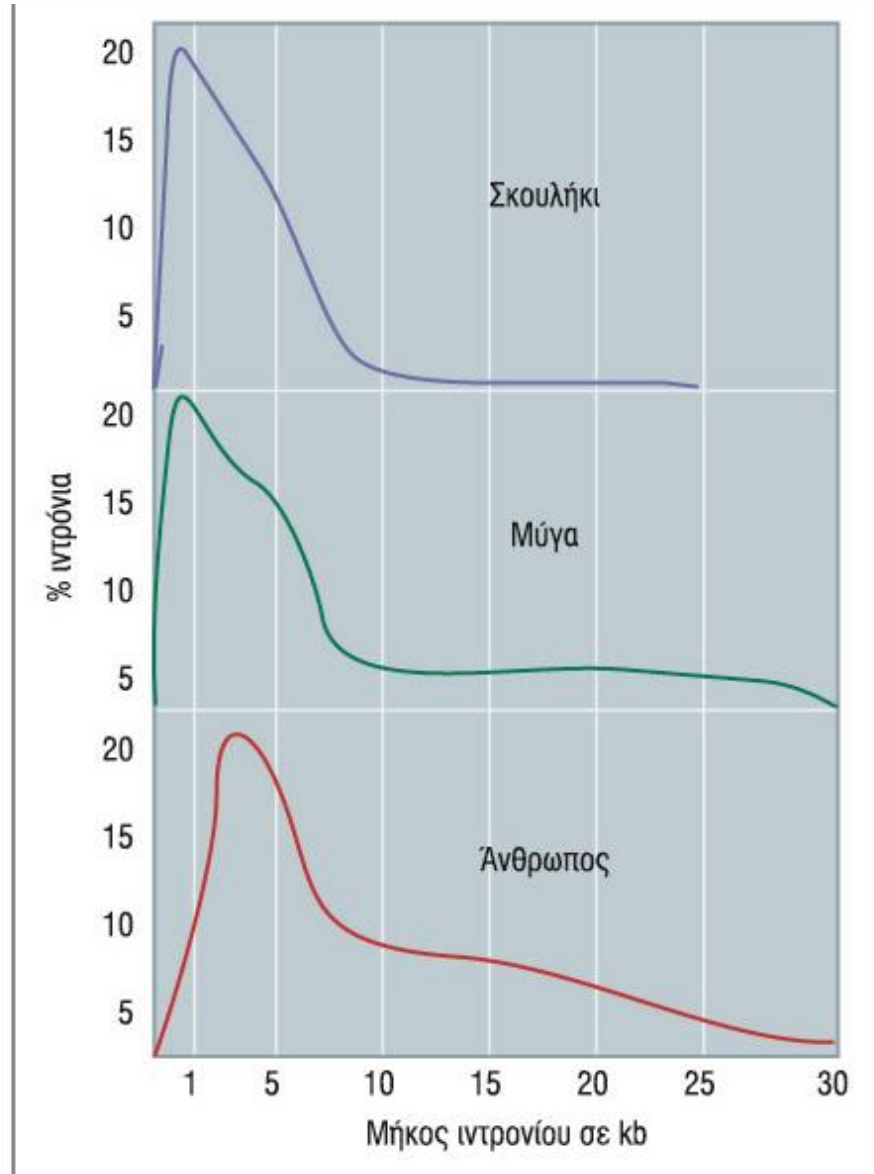
Τα διακεκομμένα γονίδια κυριαρχούν στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς



Ιντρόνια υπάρχουν σε:

- ✓ Γονίδια που κωδικοποιούν πολυπεπτίδια, ριβοσωμικό –rRNA ή μεταφορικό tRNA
- ✓ Μιτοχονδριακά γονίδια σε φυτά , μύκητες, πρῶτιστα και σε ένα μετάζωο
- ✓ Γονίδια χλωροπλάστη
- ✓ Γονίδια με ιντρόνια έχουν βρεθεί σε κάθε κατηγορία ευκαρυωτικών οργανισμών.

Τα έχουν μεγάλη διακύμανση μήκους



Όλα τα λειτουργικά γονίδια της αιμοσφαιρίνης έχουν διακεκομμένη δομή τριών εξονίων

