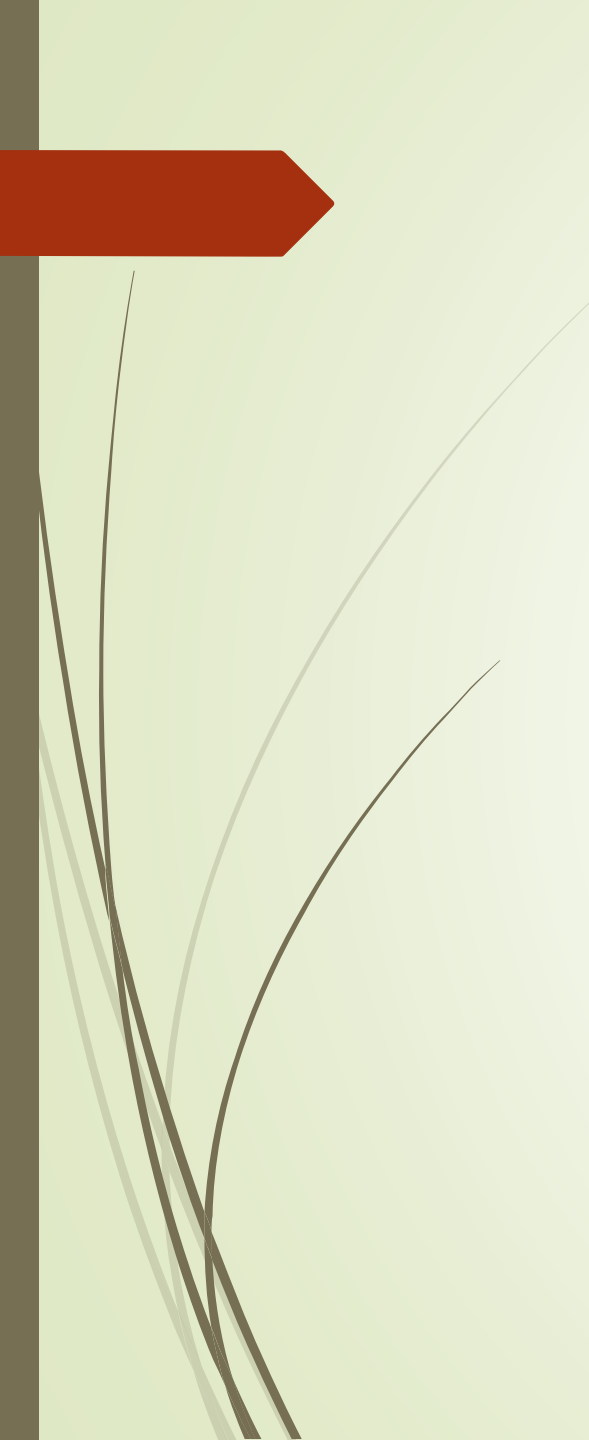


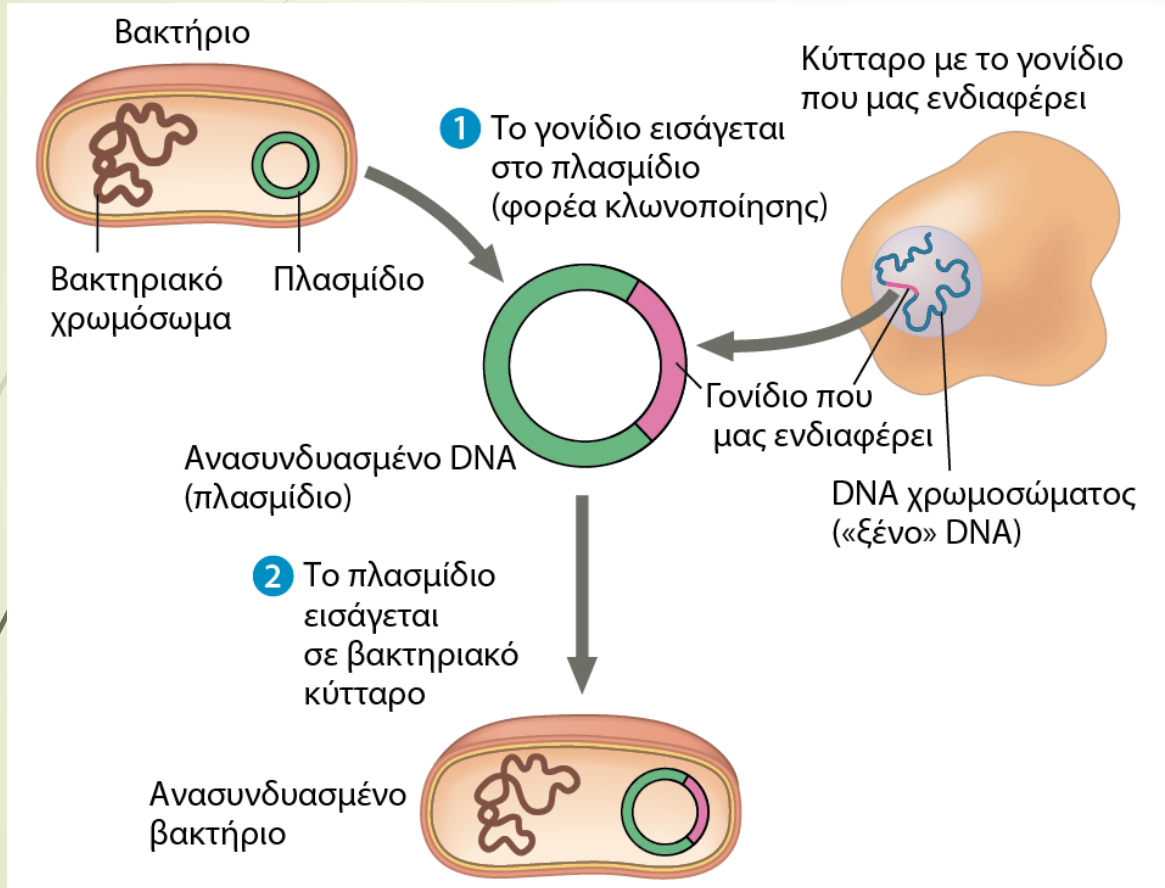


ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Φροντιστήριο 2^ο

- 
- ✓ Ένζυμα επεξεργασίας του DNA
 - ✓ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
 - ✓ Κλωνοποίηση DNA

Στάδια κλωνοποίησης ενός γονιδίου και χρήσεις του



3 Καλλιέργεια κυττάρου-ξενιστή για τον σχηματισμό κλώνου κυττάρων με το «κλωνοποιημένο» γονίδιο που μας ενδιαφέρει

Γονίδιο που μας ενδιαφέρει

Πρωτεΐνη που εκφράζεται από το γονίδιο που μας ενδιαφέρει

Αντίγραφα γονιδίου

Ανάκτηση πρωτεΐνης

4 Βασική έρευνα και διάφορες εφαρμογές

Εισαγωγή σε φυτά ενός γονιδίου ανθεκτικότητας στα παράσιτα

Θεραπεία καθυστερημένης ανάπτυξης με αυξητική ορμόνη του ανθρώπου

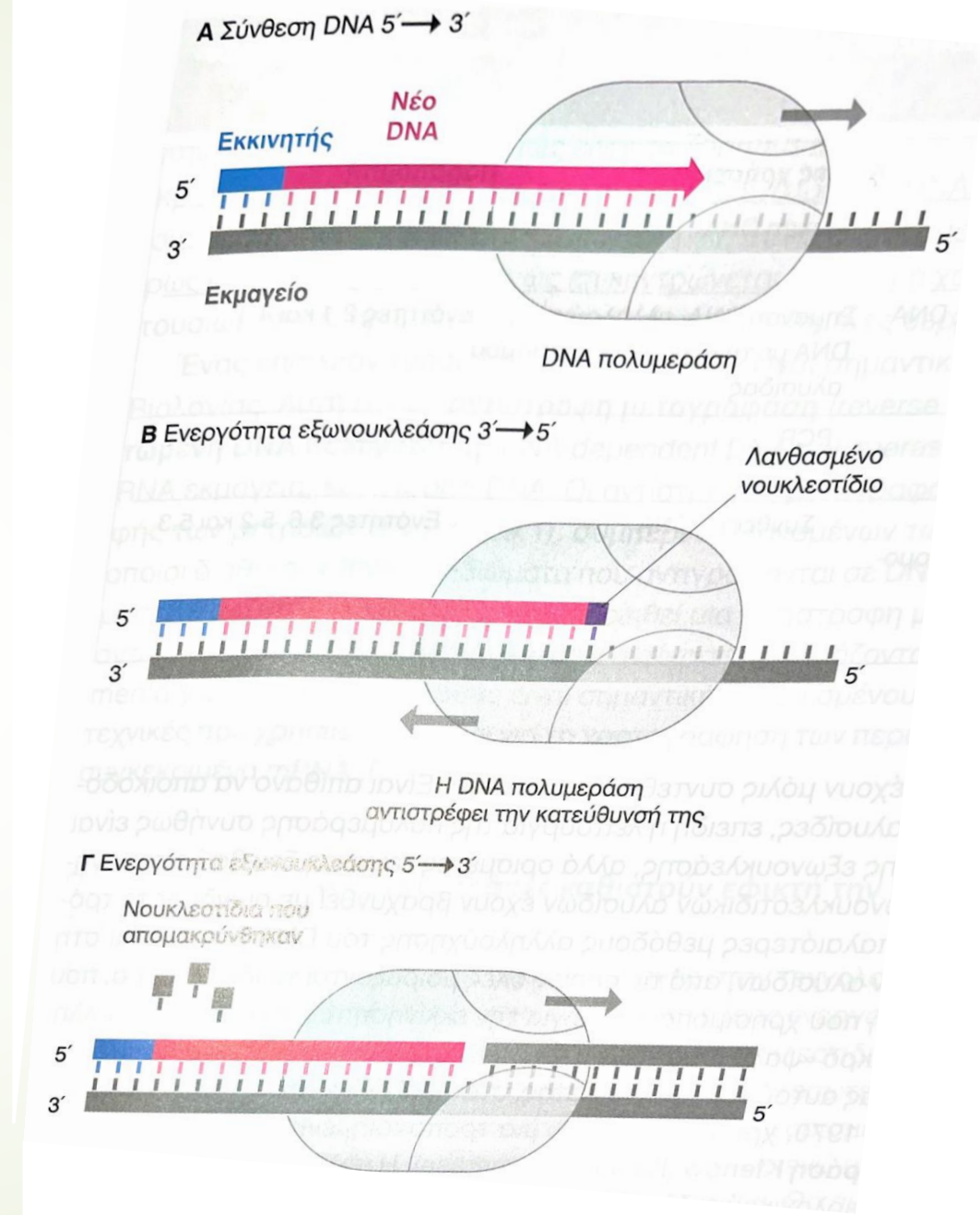
Χρήση γονιδίου για την τροποποίηση βακτηρίων ώστε να καθαρίζουν τοξικά απόβλητα

Θεραπεία, κατόπιν εμφράγματος του μυοκαρδίου, με πρωτεΐνη που διαλύει τους θρόμβους

Ένζυμα για την επεξεργασία του DNA

- ▶ **DNA πολυμεράσες:** ένζυμα που συνθέτουν καινούριες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, συμπληρωματικές ως προς το υπάρχον εκμαγείο- DNA ή RNA
- ▶ **Νουκλεάσες:** ένζυμα που αποικοδομούν μόρια DNA μέσω θραύσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των νουκελοτιδίων
- ▶ **Λιγάσες:** ένζυμα που συνδέουν μόρια DNA μέσω σύνθεσης φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των νουκελοτιδίων που βρίσκονται στα άκρα δυο διαφορετικών μορίων ή στα δυο άκρα του ίδιου μορίου
- ▶ **Ένζυμα τροποποίησης άκρων:** ένζυμα που προκαλούν αλλαγές στα άκρα των μορίων DNA

DNA πολυμεράση:
ενεργότητα σύνθεσης DNA &
3' → 5' εξωνουκλεάσης &
5' → 3' εξωνουκλεάσης



Νουκλεάσες

- ▶ **Περιοριστικές ενδονουκλεάσες:** DNA ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες, προέρχονται από πολλές πηγές
- ▶ **Νουκλεάση S1:** ενδονουκλεάση ειδική για DNA & RNA *Aspergillus oryzae*
- ▶ **Δεοξυριβονουκλεάση I:** Ενδονουκλεάση ειδική για δίκλωνο DNA & RNA, από την *E. Coli*

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- **Τύπου I:** Το ένζυμο αναγνωρίζει μία θέση και κόβει τουλάχιστον 1000 bp μακριά από το σημείο.
- **Τύπου III:** το ένζυμο κόβει 24-26bp μακριά από τη θέση αναγνώρισης.
- **Τύπου IV:** το ένζυμο κόβει μεθυλιωμένο DNA χωρίς να αναγνωρίζει συγκεκριμένη αλληλουχία.
- **Τύπου II:** Τα συγκεκριμένα ένζυμα κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις οι οποίες έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (καρκινική ανάγνωση)

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες: Παραδείγματα

Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης	Μορφή άκρων	Αλληλουχίες άκρων
<i>AluI</i>	5'-AGCT-3' 3'-TCGA-5'	«Τυφλά»	5'-AG CT-3' 3'-TC GA-5'
<i>Sau3AI</i>	5'-GATC-3' 3'-CTAG-5'	«Κολλώδη», 5'-προεξοχή	5'- GATC-3' 3'-CTAG -5'
<i>Hinfi</i>	5'-GANTC-3' 3'-CTNAG-5'	«Κολλώδη», 5'-προεξοχή	5'-G ANTC-3' 3'-CTNA G-5'
<i>BamHI</i>	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	«Κολλώδη», 5'-προεξοχή	5'-G GATCC-3' 3'-CCTAG G-5'
<i>BsrBI</i>	5'-CCGCTC-3' 3'-GGCGAG-5'	«Τυφλά»	5'- NNNCCGCTC-3' 3'- NNNGGCGAG-5'
<i>EcoRI</i>	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	«Κολλώδη», 5'-προεξοχή	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'
<i>PstI</i>	5'-CTGCAG-3' 3'-GACGTC-5'	«Κολλώδη», 3'-προεξοχή	5'-CTGCA G-3' 3'-G ACGTC-5'
<i>NotI</i>	5'-GCGGCCGC-3' 3'-CGCCGGCG-5'	«Κολλώδη», 5'-προεξοχή	5'-GC GGCCGC-3' 3'-CGCCGG CG-5'
<i>BglI</i>	5'-GCCNNNNNGGC-3' 3'-CGGNNNNNCCG-5'	«Κολλώδη», 3'-προεξοχή	5'-GCCNNNN NGGC-3' 3'-CGGN NNNNCCG-5'

Συντομογραφία: N, οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο.

Προσέξτε ότι οι περισσότερες αλληλουχίες αναγνώρισης, αλλά όχι όλες, διαθέτουν παλίνδρομη συμμετρία. Αυτό σημαίνει ότι όταν διαβαστούν με κατεύθυνση 5'→3', η αλληλουχία είναι η ίδια και στις δύο αλυσίδες.

% Αγαρόζη για την ανάλυση DNA

RESOLUTION OF LINEAR DNA ON AGAROSE GELS.

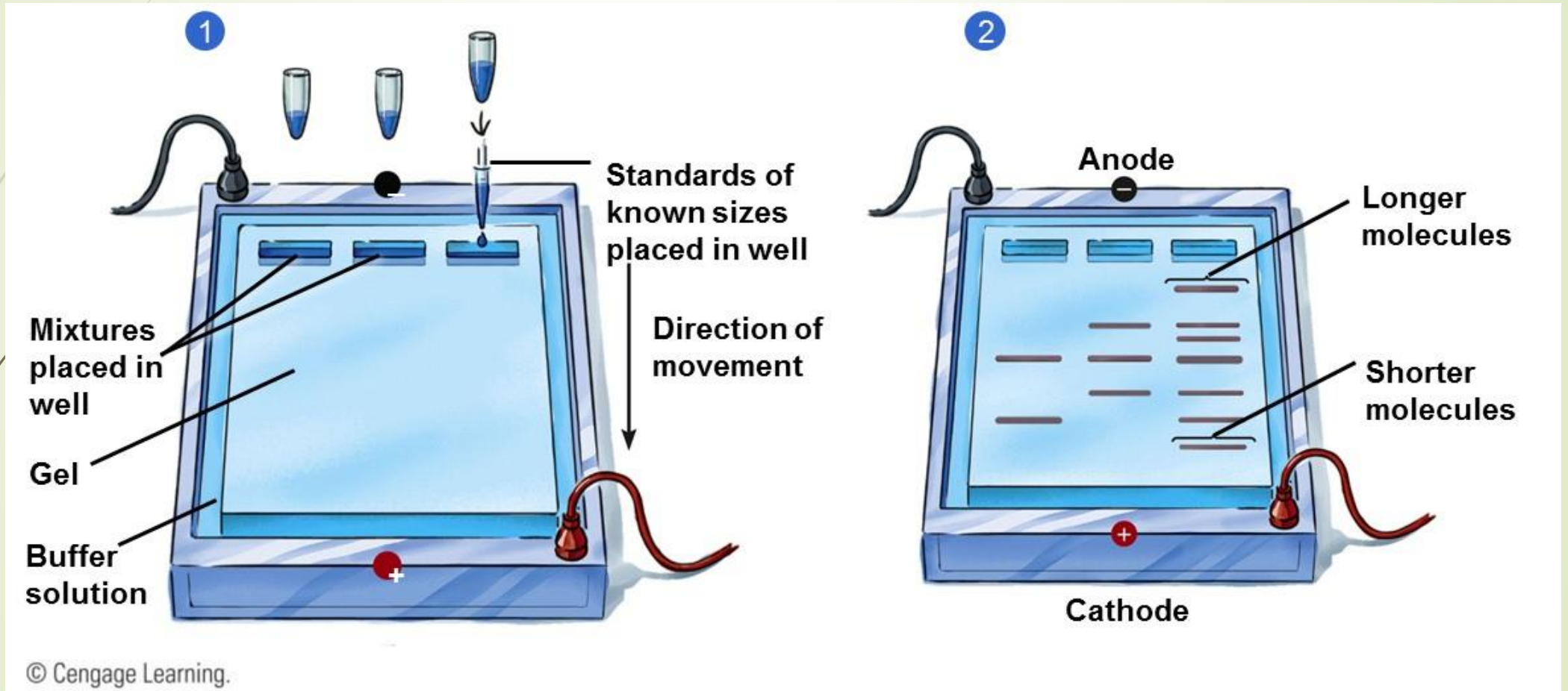
Recommended % Agarose Optimum Resolution for Linear DNA

0.5	1,000–30,000bp
0.7	800–12,000bp
1.0	500–10,000bp
1.2	400–7,000bp
1.5	200–3,000bp
2.0	50–2,000bp

Χρωστικές DNA

- ✓ Απαιτείται η χρήση χρωστικών που δεσμεύονται στο DNA για την εμφάνιση των ιχνών τους στο πήκτωμα.
- ✓ **Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr)**. Η πρώτη ένωση που χρησιμοποιήθηκε. Ισχυρή δέσμευση στο DNA αποδομείται δύσκολα. Ισχυρό μεταλλαξιγόνο. Αποφεύγεται η χρήση το για λόγους ασφαλείας.
- ✓ Συγχρονες χρωστικές: **GelRed, SYBR Green**. Αποδομούνται σχετικά γρήγορα, αλλά επειδή δεσμεύονται στο DNA καλό είναι να χρησιμοποιούνται με προσοχή.
- ✓ Τρόπος λειτουργίας Χρωστικών.
 - Όταν είναι δεσμευμένες στο DNA φθορίζουν στην περιοχή του ορατού όταν διεγερθούν με υπεριώδη ακτινοβολία.
 - Όταν είναι ελεύθερες χάνουν την ικανότητα φθορισμού.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

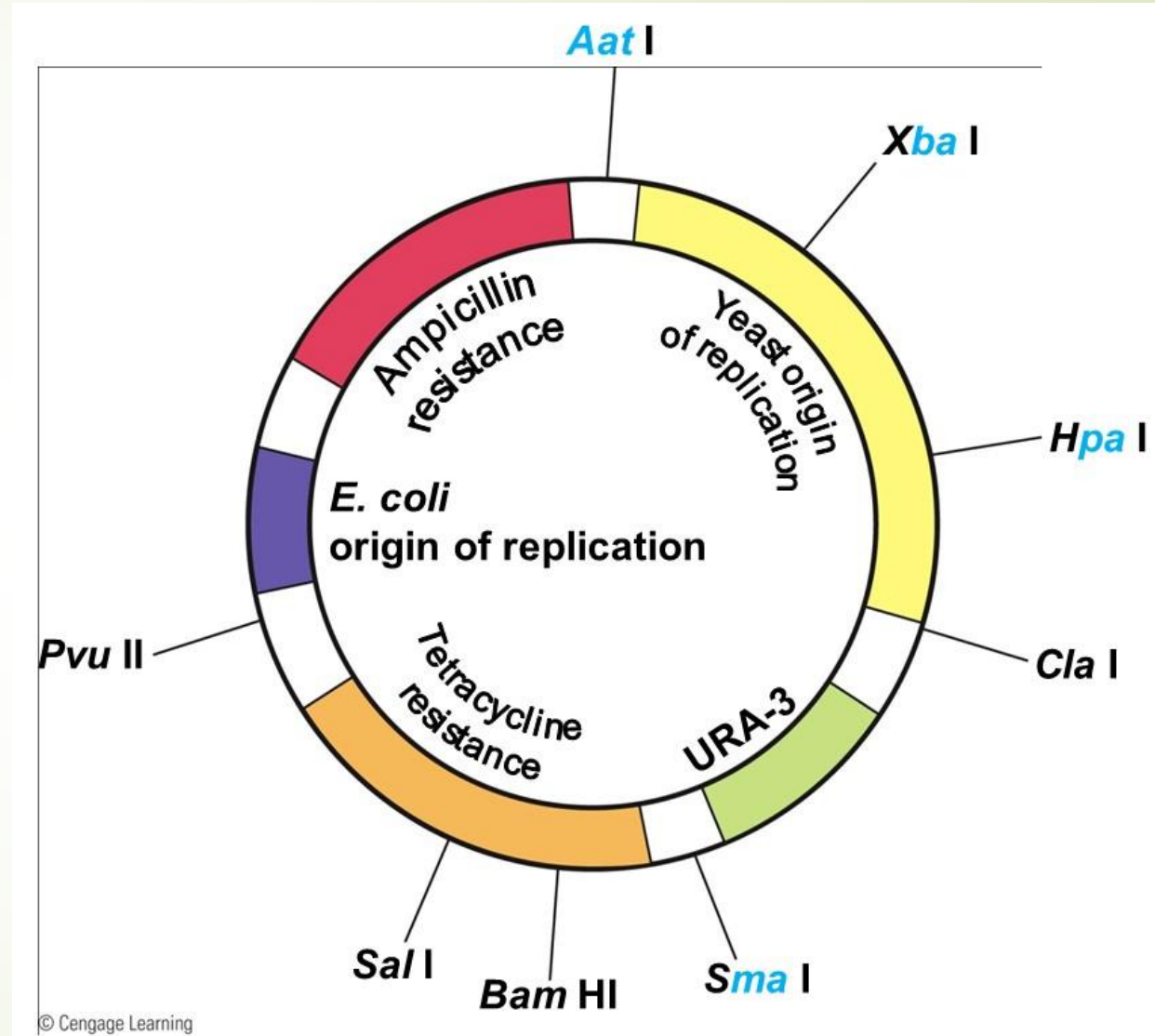


Πλασμίδια

✓ Τα πλασμίδια βοηθούν στην απομόνωση και ανάλυση του κλωνοποιημένου DNA. Έχουν:

1. Ένα σημείο έναρξης αντιγραφής
2. Μία ή περισσότερες θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες
3. Γονίδια που επιτρέπουν την κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί από ανασυνδυασμένα πλασμίδια, όπως ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

✓ Το ανασυνδυασμένο DNA μπορεί επίσης να εισαχθεί σε κύτταρα ευκαρυωτικών οργανισμών, χρησιμοποιώντας τροποποιημένους ιούς ως φορείς.



Πειραματικό μέρος

Γράψτε, βάσει του γενετικού κώδικα, την πρωτεΐνη

- Αναζήτηση κωδικονίου (τριπλέτα νουκλεοτιδίων) έναρξης (AUG) και (του πρώτου) κωδικωνίου λήξης (UGA, UAG ή UAA) στη νουκλεοτιδική αλληλουχία
- Αναζήτηση στο γενετικό κώδικα των αμινοξέων, που αντιστοιχούν σε κάθε κωδικόνιο (σημείωσή τους με τη σειρά, ώστε να σχηματιστεί η αλληλουχία της πεπτιδικής αλυσίδας)

1	5'	GCUGCAUCAG	AAGAGGCCAU	CAAGCACAUC	ACUGUCCUUC	UGCC <u>AUG</u> GCC	CUGUGGAUGC
61		GCCUCCUGCC	CCUGCUGGCG	CUGCUGGCCC	UCUGGGGACC	UGACCCAGCC	GCAGCCUUG
121		UGAACCAACA	CCUGUGCGGC	UCACACCUUG	UGGAAGCUCU	CUACCUAGUG	UGC GGGGAAC
181		GAGGCUUCUU	CUACACACCC	AAGACCCGCC	GGGAGGCAGA	GGACCUGCAG	GUGGGGCAGG
241		UGGAGCUGGG	CGGGGGCCCU	GGUGCAGGCA	GCCUGCAGCC	CUUGGCCCUUG	GAGGGGUCCC
301		UGCAGAAGCG	UGGCAUUGUG	GAACAAUGCU	GUACCAGCAU	CUGCUCCCUC	UACCAGCUGG
361		AGAACUACUG	CAACUAGACG	CAGCCCGCAG	GCAGCCCCCC	ACCCGCCGCC	UCCUGCACCG
421		AGAGAGAUGG	AAUAAAGCCC	UUGAACCAGC	3'		

Αλληλουχία βάσεων mRNA

- ✓ Αντικωδική-εκμαγείο αλυσίδα (template – antisense strand)
- ✓ Κωδική-νοηματική αλυσίδα (coding or sense strand)

Το RNA είναι συμπληρωματικό με τη μια αλυσίδα του DNA

Το DNA αποτελείται από δύο αλυσίδες ζευγαρωμένους ανά βάση

Πάνω αλυσίδα

5' ATGCCGTTAGACCGTTAGCGGGACCTGAC

3' TACGGCAATCTGGCAATCGCCTGGACTG

Κάτω αλυσίδα

↓
Σύνθεση
του RNA

5' AUGCCGUUAGACCGUUAGCGGGACCUAGAC 3'

Το RNA έχει την ίδια αλληλουχία με την πάνω αλυσίδα του DNA
και είναι συμπληρωματικό με την κάτω αλυσίδα του DNA

Πειραματικό μέρος (2)

- α) Ποια μπορεί να είναι η μέγιστη T_m τιμή ενός κλάσματος DNA που έχει μέγεθος 500 bp;
- β) Ένα τμήμα DNA αποτελείται από 800 βάσεις και το T_m ακολουθίας ισούται με 94°C . Προσδιορίστε τη σύσταση της ακολουθίας.
- γ) Προσδιορίστε τον αριθμό των μορίων (N) που περιέχονται σε 20 ng ενός κλάσματος DNA μεγέθους 3 kb.
 - **Δίδονται:** ένα ζεύγος βάσεων έχει μοριακό βάρος (MB) 660 Da και αριθμός Avogadro $N_A = 6,022 \times 10^{23}$ μόρια/mol

Φυσικοχημικές ιδιότητες DNA

- Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA βασίζεται στο ότι τα νουκλεϊκά οξέα δημιουργούν δίκλινα μόρια, όπου οι συμπληρωματικές αντιπαράλληλες αλυσίδες συστοιχίζονται μέσω υδρογονοδεσμών (A-T & G-C με 2 ή 3 υδρογονοδεσμούς ανά ζεύγος, αντίστοιχα)
- **Θερμική τήξη DNA** λαμβάνει χώρα, όταν διασπώνται οι υδρογονοδεσμοί και από δίκλινο (ds) μόριο μετατρέπεται σε δύο μονόκλινα (ss); Αυτή η θερμοκρασία που το μισό DNA-δείγμα είναι ss και το άλλο σε ds μορφή λέγεται **θερμοκρασία τήξης** : $T_m = 64.9 + 41 * (\gamma G + z C - 16.4) / (w A + x T + \gamma G + z C)$
- Όσο αυξάνει το %GC ενός μορίου DNA, τόσο αυξάνεται η θερμοκρασία τήξης του, αφού οι περισσότεροι υδρογονοδεσμοί απαιτούν μεγαλύτερη ενέργεια, για τη διάσπασή τους
- Οι συμπληρωματικές μονόκλινες αλυσίδες νουκλεϊκών οξέων δύναται να ανασυστοιχηθούν και να σχηματιστεί δίκλινο νουκλεϊκό οξύ, όταν η θερμοκρασία είναι υπό της θερμοκρασίας τήξης

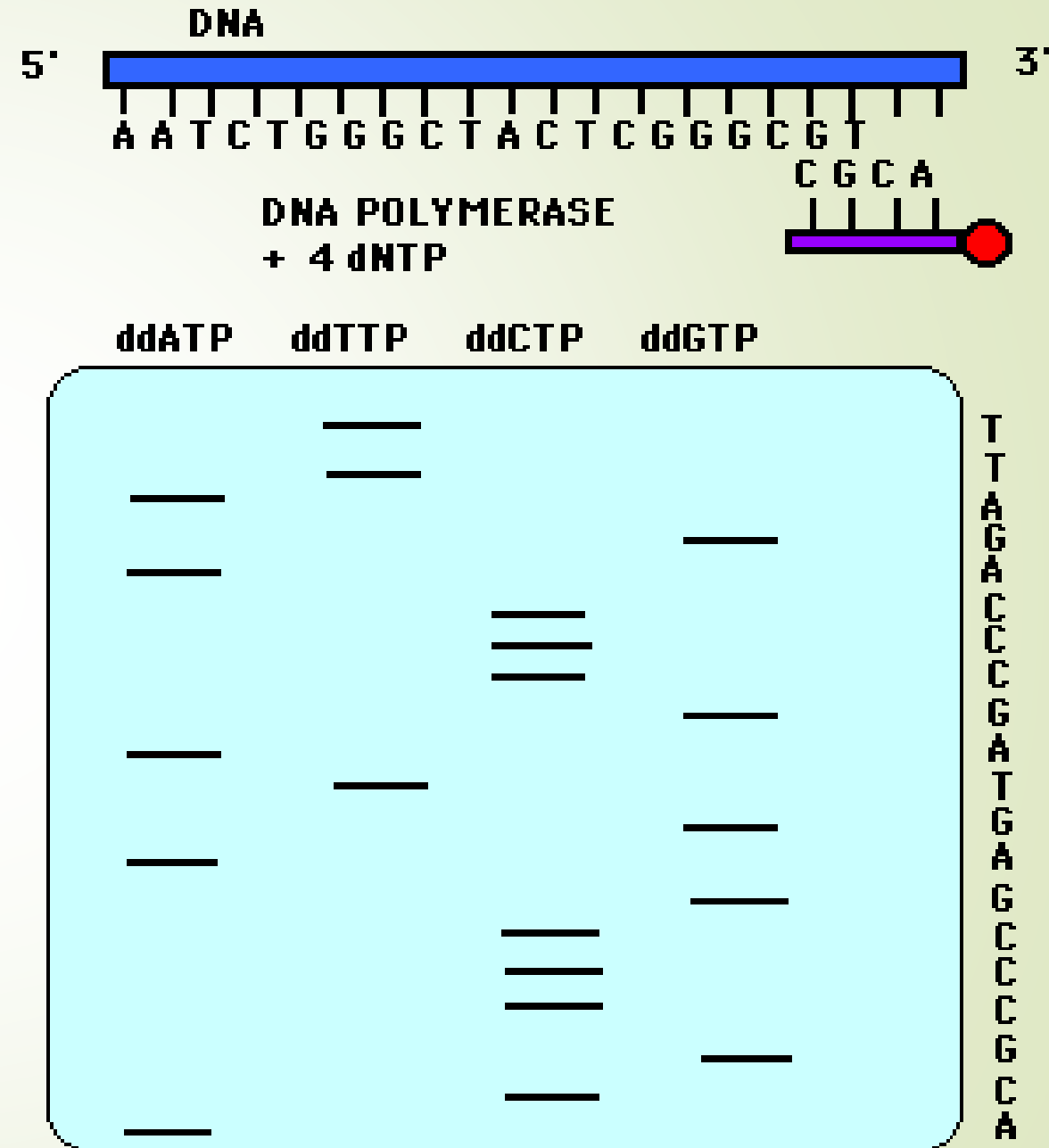
.....

5. Αντίδραση συρραφής

- Συμπληρωματικά άκρα, Πλασμίδιο / Ένθεμα : 1:3
- Λεία άκρα, Πλασμίδιο / Ένθεμα : 1:6
- ..
- Έστω ότι έχετε 40ng ενθέματος μήκους 800bp με κολλώδη άκρα και θέλετε να το κλωνοποιήσετε σε φορέα 3kbp. Ποια θα είναι η αντίδραση συρραφής που θα κάνετε?

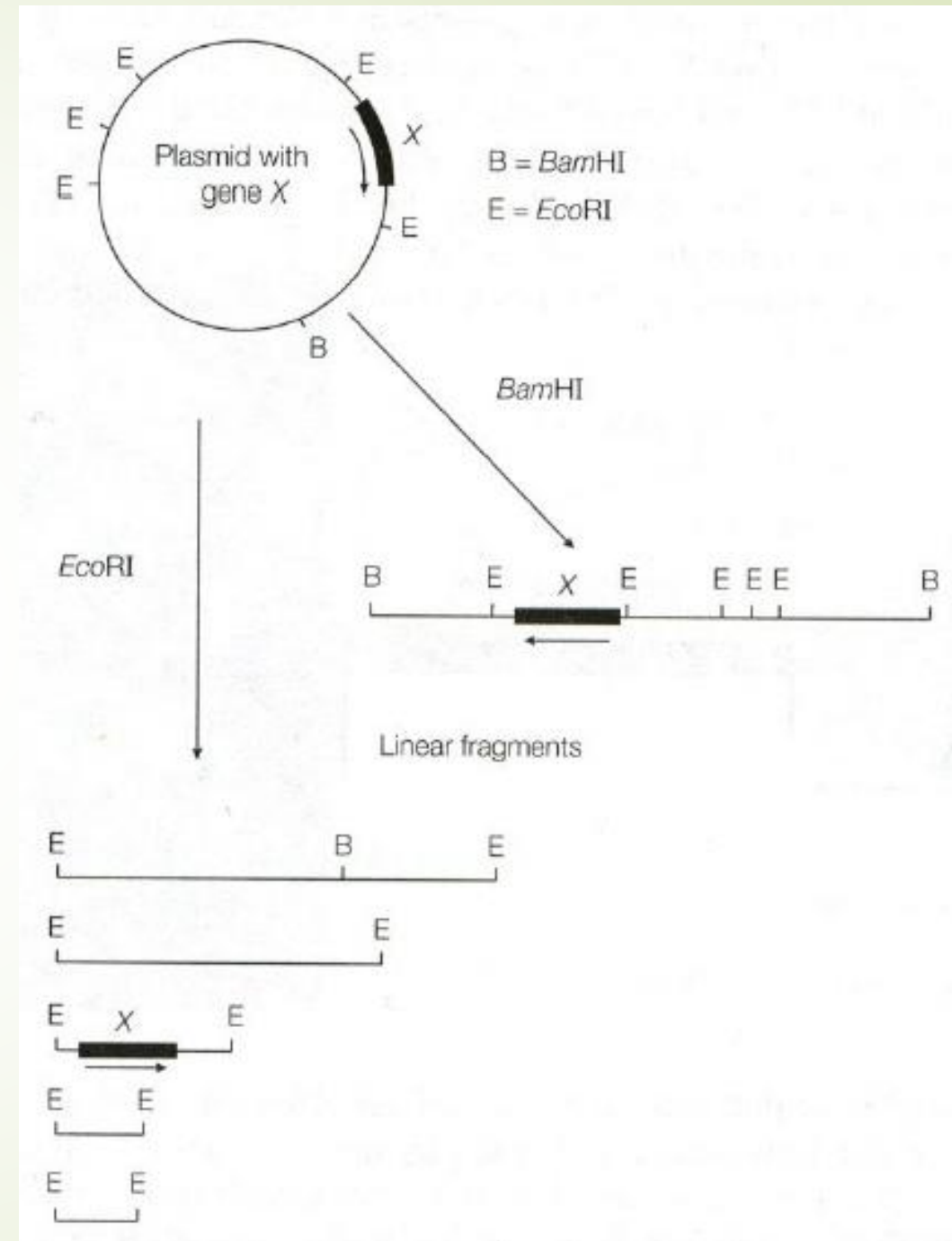
Πειραματικό μέρος (3)

- Να βρεθεί κατά την αλληλούχηση DNA με τη μέθοδο Sanger, η αλληλουχία της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA ($5' \rightarrow 3'$), καθώς και η αλληλουχία της αλυσίδας ($5' \rightarrow 3'$)
- Γίνεται προσδιορισμός της αλληλουχίας βάσεων με τη μέθοδο Sanger στο DNA: $5' \text{ GCATTACGAAC } 3'$. Να δοθούν οι ηλεκτροφορετικές ζώνες που αναμένεται να προκύψουν μετά τη σύνθεση DNA στα τέσσερα υποστρώματα.



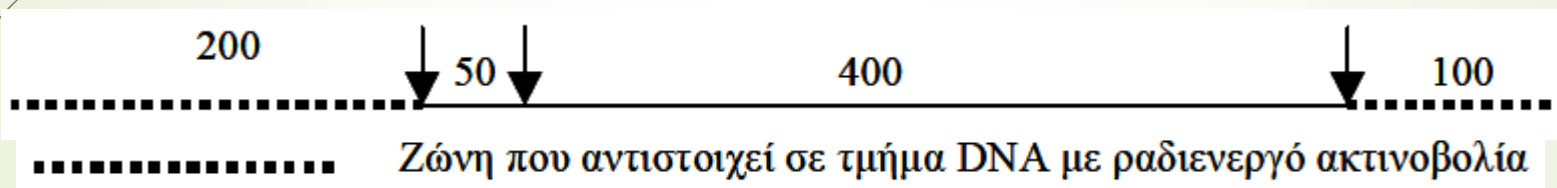
Χάρτης περιορισμού(1)

- ▶ Ένα πλασμίδιο έχει μία (01) θέση αναγνώρισης για τη *Bam*HI και άρα από την πέψη με τη συγκεκριμένη ενδονουκλεάση πόσα θραύσματα DNA προκύπτουν;
- ▶ Το ίδιο πλασμίδιο έχει και πέντε (05) θέσεις αναγνώρισης για την *Eco*RI, άρα από την πέψη με τη συγκεκριμένη ενδονουκλεάση πόσες ζώνες DNA προκύπτουν;
- ▶ Αν δεν είχαμε πλασμίδιο, αλλά γραμμικό τμήμα DNA, πόσα θραύσματα θα προέκυπταν μέσω της «διπλής πέψης» του;



Χάρτης περιορισμού (2)

- Υποθετικό τμήμα DNA 750 bp με τα δυο 5' άκρα του να έχουν σημανθεί με ραδιενεργό φωσφόρο (^{32}P)
- Το DNA κόβεται με ένα περιοριστικό ένζυμο σε τρία σημεία και άρα στην πηκτή ηλεκτροφόρησης των τμημάτων θα προκύψουν 4 ζωνώσεις (200, 50, 400, 100 bp)

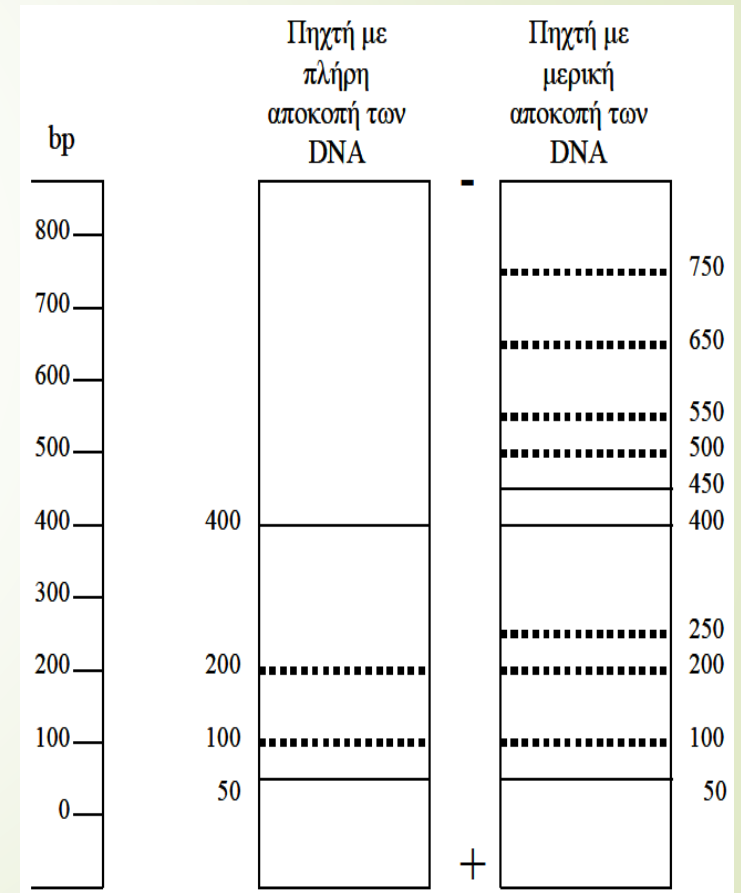


- Οι ζωνώσεις των 100 & 200 bp που ακτινοβολούν, προέρχονται από τα δύο άκρα του DNA; Άγνωστη όμως η θέση των τμημάτων 50 bp & 400 bp
- Η θέση των τμημάτων αυτών προσδιορίζεται με επανάληψη της διαδικασίας, όπου σε νέα τμήματα DNA σαν το αρχικό εφαρμόζεται το περιοριστικό ένζυμο μόνο για μικρό χρονικό διάστημα ή σε πιο χαμηλή θερμοκρασία, ώστε να επιβραδύνει την αντίδραση κοπής του DNA

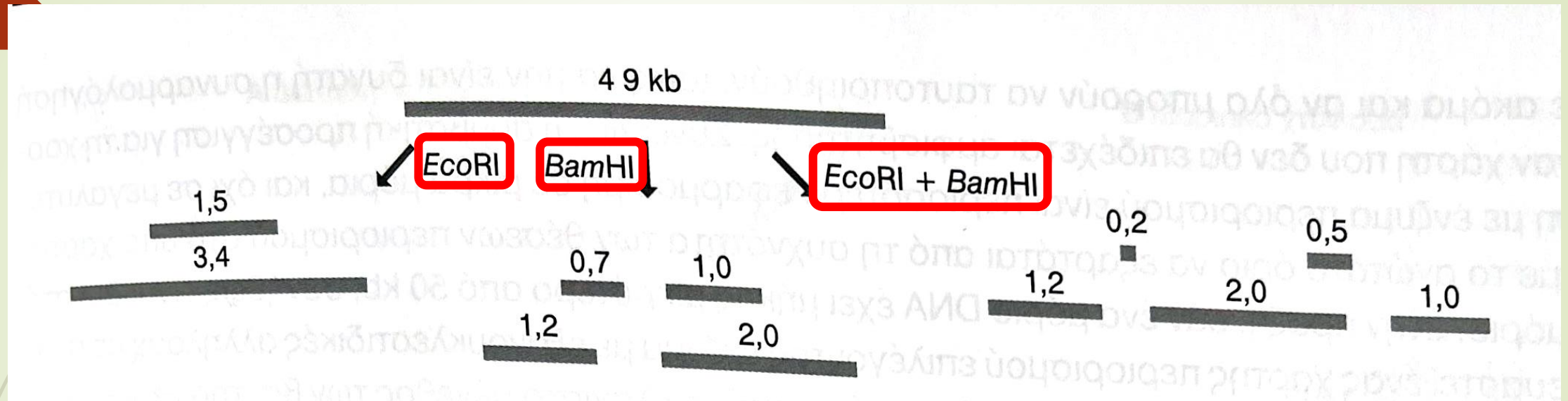
Χάρτης περιορισμού (3)

- ▶ Τώρα κάποια τμήματα DNA μπορεί να κοπούν και στα τρία σημεία, άλλα μόνο στο 1^ο σημείο, άλλα μόνο στο 2^ο, κ.ο.κ.
- ▶ Έτσι προκύπτουν διάφορα τμήματα (250 bp, 650 bp, 500 bp κ.λπ.), οπότε η ηλεκτροφόρηση των τμημάτων αυτών θα δώσει διάφορες ζωνώσεις
- ▶ Συμβολή στον προσδιορισμό των ενδιάμεσων τμημάτων (50 & 400 bp) στο πήκτωμα με μερική αποκοπή των τμημάτων DNA: με ραδιενεργό τμήμα των 250 bp (και όχι των 150 bp), σημαίνει ότι τα 50 bp είναι παρακείμενο αυτού με 200 bp, καθώς επίσης προκύπτει ραδιενεργό τμήμα των 500 (και όχι των 600 bp), άρα το τμήμα των 400 bp είναι παρακείμενο αυτού με 100 bp

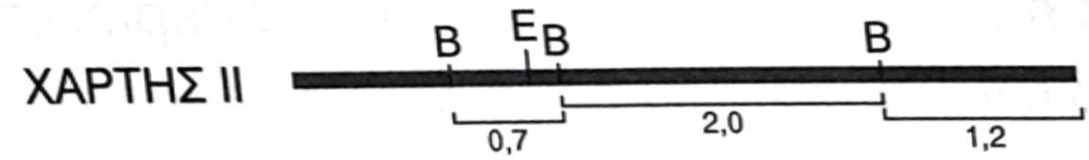
RFLP



Χάρτης περιορισμού (2)

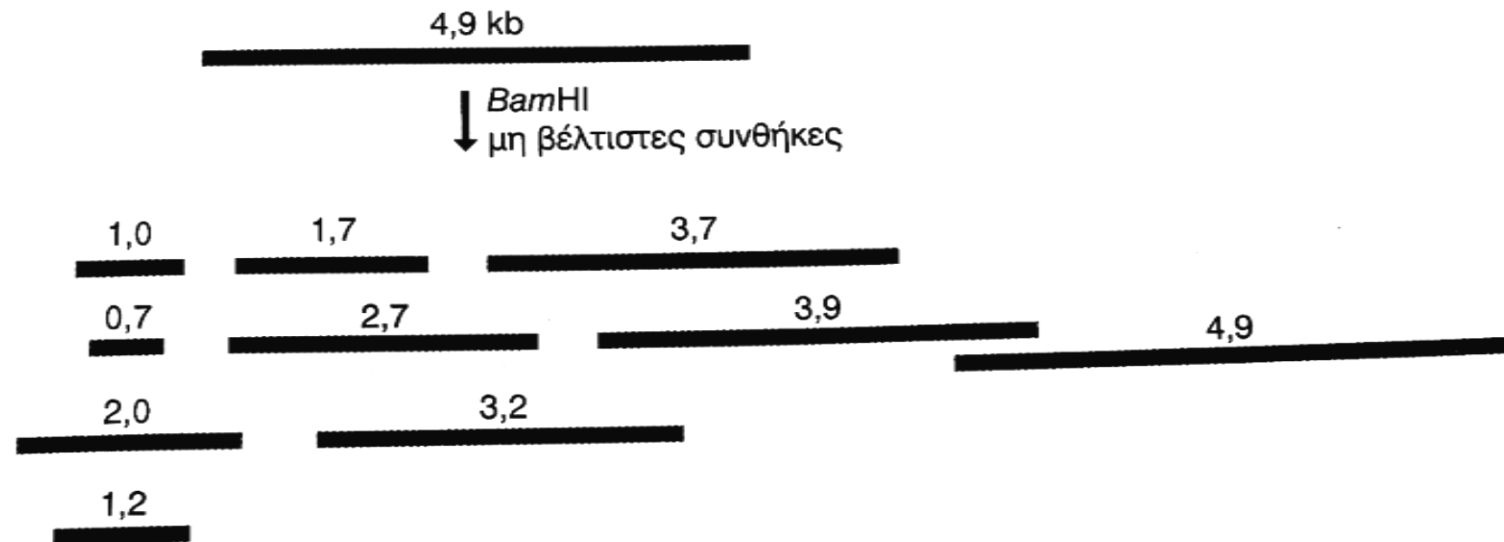


Χάρτης περιορισμού (2)



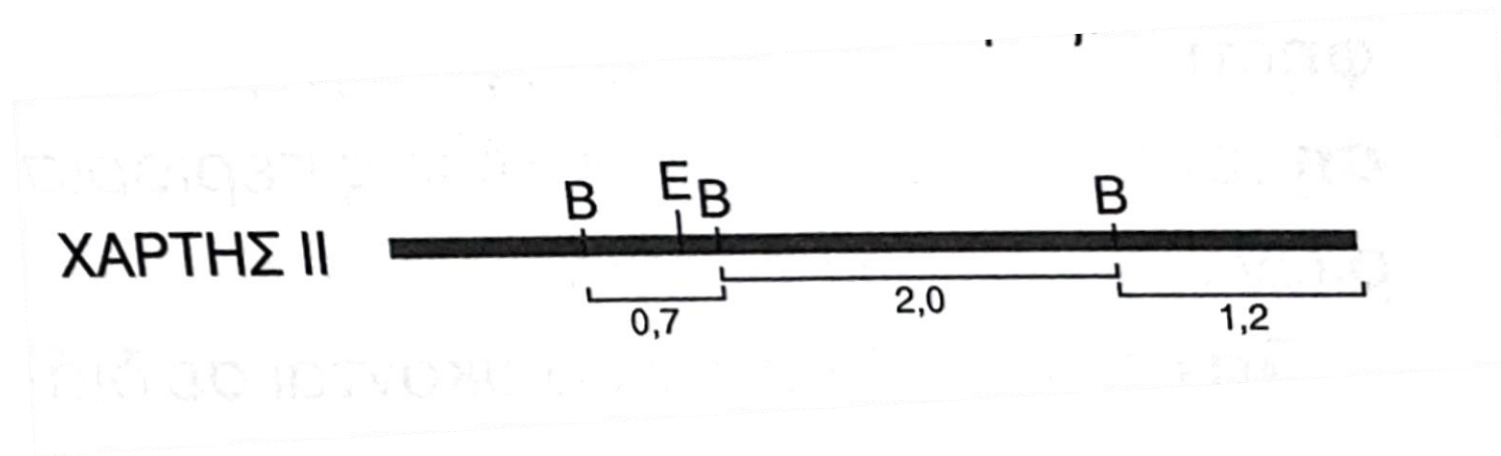
Μερική πέψη με BamHI

- Αν ο χάρτης I είναι σωστός τότε τα προϊόντα θα περιλαμβάνουν και τμήμα μεγέθους $1,2+0,7=1,9\text{kb}$
- Αν ο χάρτης II είναι σωστός τότε τα προϊόντα θα περιλαμβάνουν και τμήμα μεγέθους $2,0+0,7=2,7\text{kb}$



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ
Ο Χάρτης II
είναι σωστός

Χάρτης περιορισμού (2)



Ανθρώπινες Γονιδιωματικές βιβλιοθήκες με χρήση διαφορετικών τύπων φορέων κλωνοποίησης

Τύπος φορέα	Μέγεθος ενθέματος (kb)	Αριθμός κλώνων	
		P=95%	P=99%
Φορέας αντικατάστασης λ	18	516k	793k
Κοσμίδιο, Φοσμίδιο	40	232k	357k
P1	100	93k	143k
BAC, PAC	300	31k	47,5k

Όπως έχει οριστεί από την σχέση $N = [\ln(1 - P)] / \ln(1 - a/b)$

Όπου N ο αριθμός των απαιτούμενων κλώνων, P η πιθανότητα για οποιοδήποτε τμήμα του γονιδιώματος να υπάρχει στη βιβλιοθήκη, a είναι το μέσο μέγεθος των τμημάτων DNA που εισάγονται στον φορέα και b είναι το μέγεθος του γονιδιώματος.