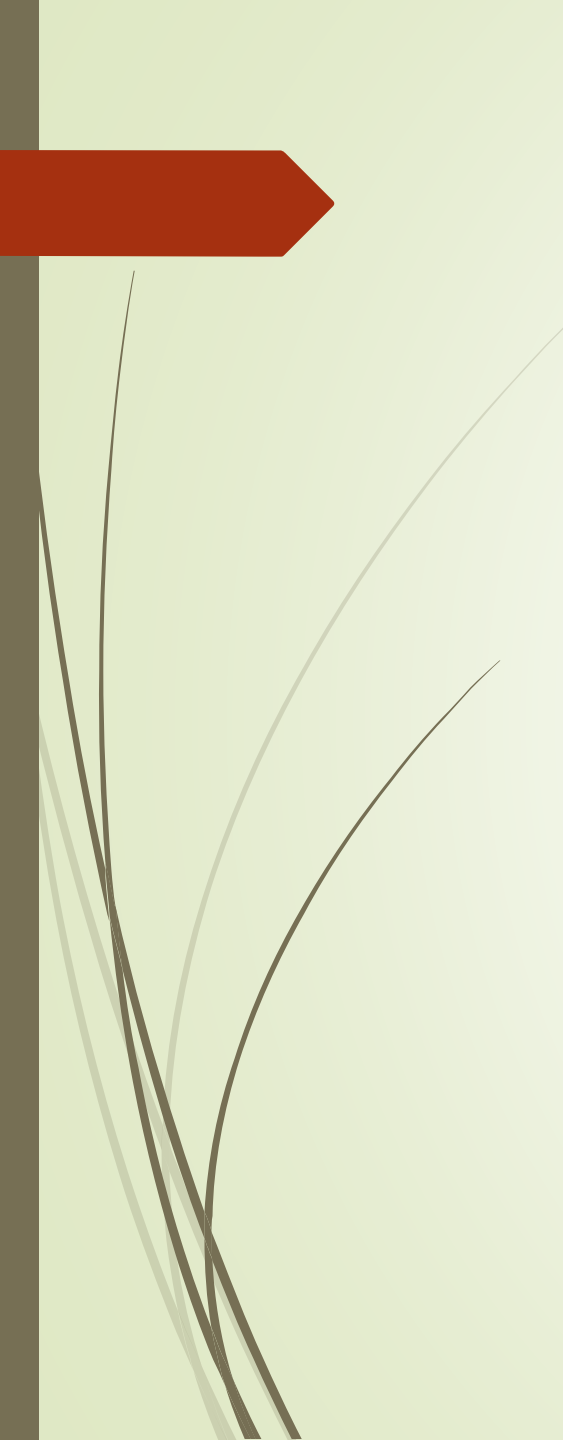




# ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

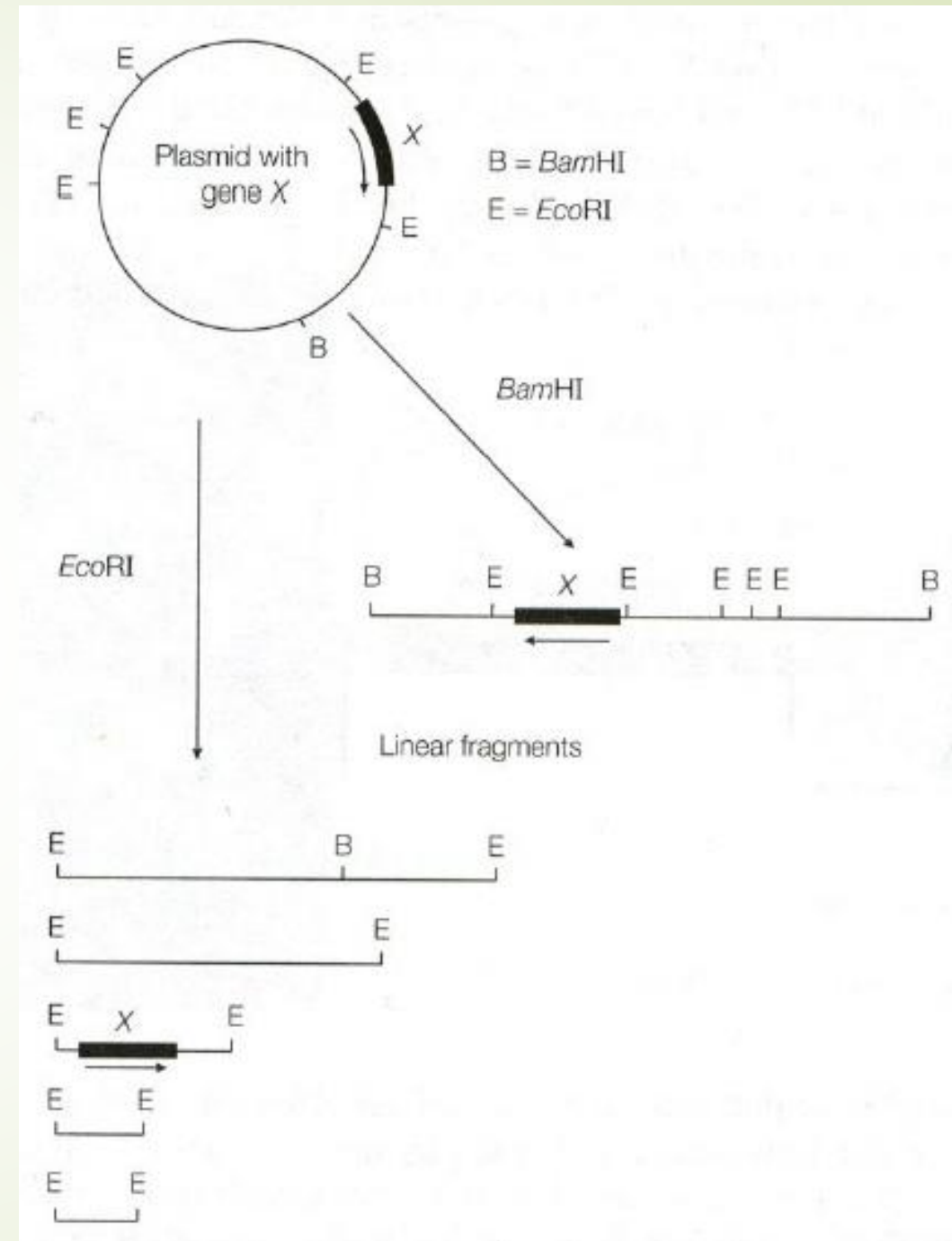
Φροντιστήριο 3<sup>ο</sup>

- 
- ✓ Ένζυμα επεξεργασίας του DNA
  - ✓ Αλυσιδωτή αντίδραση πολύμεράσης
  - ✓ Κλωνοποίηση DNA – Χάρτης περιορισμού

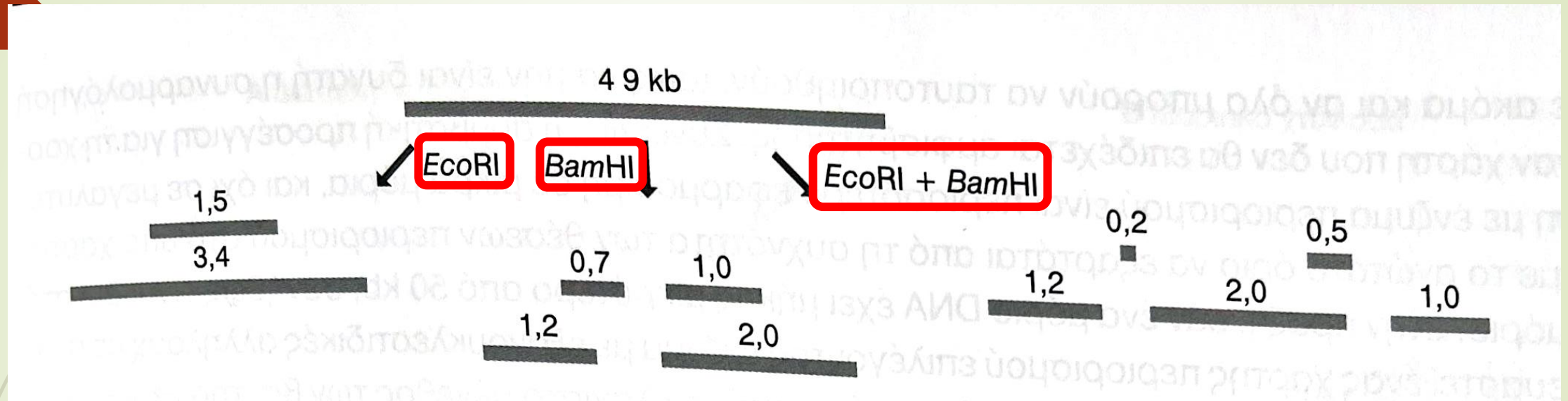
- ✓ Η αξία ενός γονιδιωματικού χάρτη
- ✓ Δείκτες γενετικής χαρτογράφησης-RFLPs, SSLPs, SNPs
- ✓ Γενετική Χαρτογράφηση: Φυσικός και Γενετικός χάρτης

# 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;

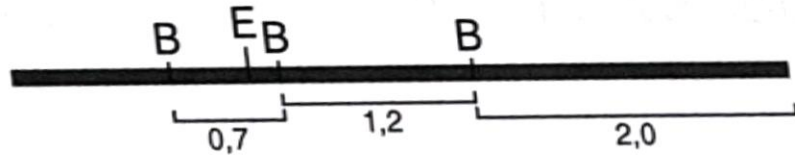


# Χάρτης περιορισμού (2)

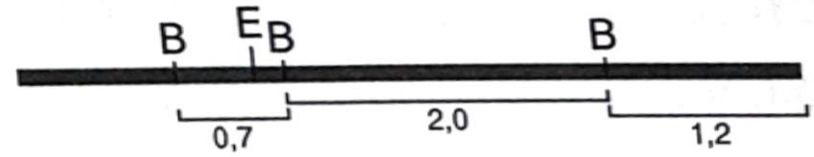


# Χάρτης περιορισμού (2)

ΧΑΡΤΗΣ I

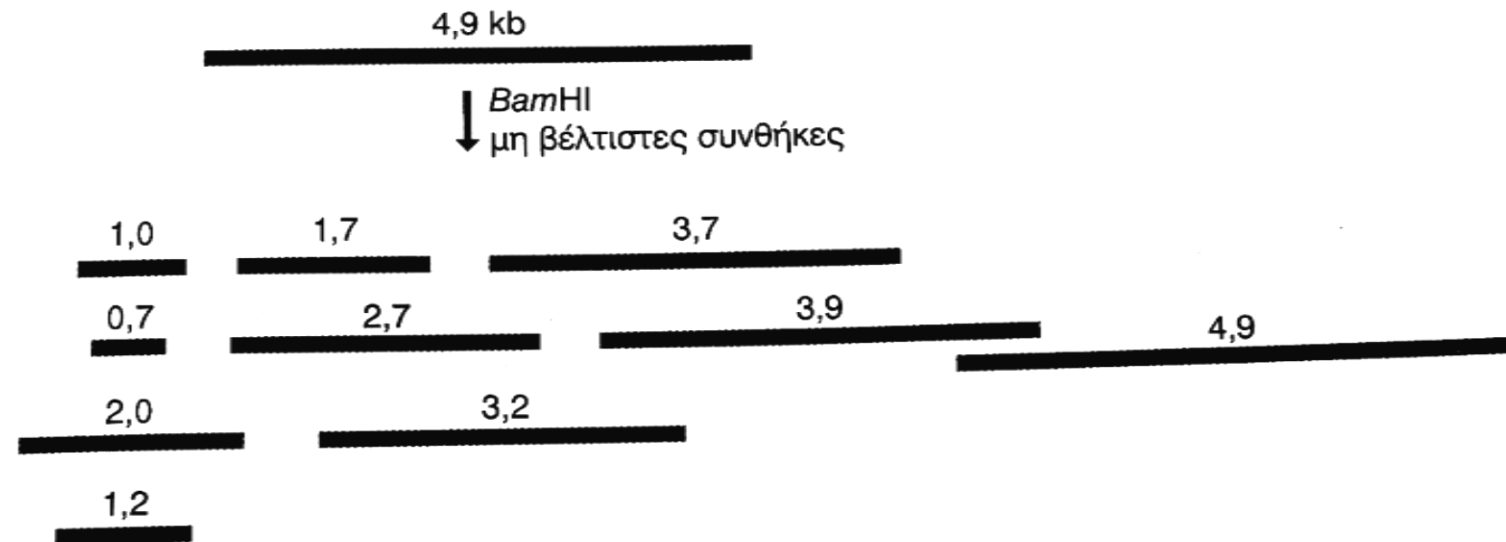


ΧΑΡΤΗΣ II



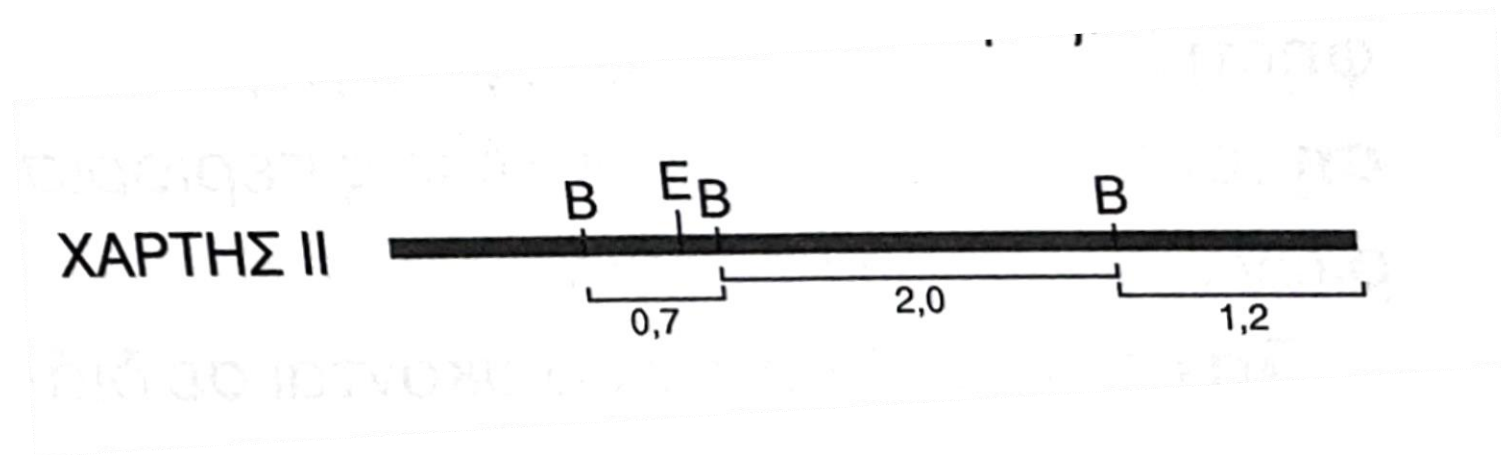
# Μερική πέψη με BamHI

- 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)





Σχεδιάστε τους κατάλληλους εκκινητές  
για PCR για την ακόλουθη αλληλουχία



>MSN4 Chr 11 from323228 to325120

5' .....**ATGCTAGTCTTCGGACC**TAATAGTAGTTTCGTTTCGTCACGCAAACAAGAAACAAGAAGATTCGTCTATAATGAACGAGCC  
AAACGGATTGATGGACCCGGTATTGAGCACAACCAACGTTTCTGCTACTTCTTCTAATGACAATTCTGCGAACAATAGCA  
TATCTTCGCCGGAATATACTTTGGTCAATTCTCAATGGATTCTCCGCATAGAACGGACGCCACTAATACTCCAATTTTA  
ACAGCGACAACATAACGACTGCTAATAATAGTTTAAATGAATTTAAAGGATACCGCCAGTTTAGCTACCAACTGGAAGTG  
GAAAAATTCCAATAACGCACAGTTCGTGAATGACGGTGAGAAACAAGCAGTAATGCTAATGGTAAGAAAAATGGTGGTG  
ATAAGATATATAGTTCAGTAGCCACCCCTCAAGCTTTAAATGACGAATTGAAAACTTGGAGCAACTAGAAAAGGTATTT  
TCTCCAATGAATCCTATCAATGACAGTCATTTTAAATGAAAATATAGAATTATCGCCACACCAACATGCAACTTCTCCCAA  
GACAAACCTTCTTGAGGCAGAACCTTCAATATATTCCAATTTGTTTCTAGATGCTAGGTTACCAAACAACGCCAACAGTA  
CAACAGGATTGAACGACAATGATTATAATCTAGACGATACCAATAATGATAATACTAATAGCATGCAATCAATCTTAGAG  
GATTTTGTATCTTCAGAAGAAGCATTGAAGTTCATGCCGGACGCTGGTCGCGACGCAAGAAGATACAGCGAGGTGGTTAC  
CTCTTCCTTTCTTCTATGACGGATTCTAGAAATTCGATCTCTCATTTCGATAGAGTTTTGGAATCTCAATCACAAAATA  
GTAGCAACAGTAAACCCACTCAACAAATTATCCCTGAAGGTACTGCCACTACTGAGAGGCGTGGATCAACCATTTACCT  
ACTACCCTATAAACAACCTCTAATCCAACTTCAAATTTAGATCATGACGTTTCTCAAGCTCTGAGCGGTTATAGTAT  
GGATTTTTCTAAGGACTCTGGTATAACAAAGCCAAAAGCATTTCCTCTTCTTTAAATCGCATCTCCCATAGCAGTAGCA  
CCACAAGGCAACAGCGTGCCTCTTTGCCCTTAATTCATGATATTGAATCTTTTGCAAATGATTCGGTGATGGCAAATCCT  
CTGTCTGATTCCGCATCATTCTTTTCAGAAGAAAATGAAGACGATGCTTTTGGTGCGCTAAATTACAATAGCTTAGATGC  
AACCACAATGTCGGCATTTCGACAATAACGTAGACCCCTTCAACATTCCTCAAGTCATCTCCGGCTCAGGATCAACAGTTTA  
TCAAACCCTCTATGATGTTGTCGGATAATGCCTCTGCTGCCGCTAAATTGGCGACTTCTGGTGTTGATAATATCACACCT  
ACACCAGCTTTCCAAAGAAGAAGCTATGATATCTCGATGAACTCTTCGTTCAAATACTTCTACTAGTCAAGCTCACCA  
TGCAGCTCAACATCATCAACAACAACCTACTAAACAGGCAACGGTAAGCCCAAACAAGAAGAAGAAAGTCGTCGAAGTG  
TTACTTTAAGTCCAACCTATTTCTCATAACAACAACAATGGTAAGGTTTCTGTCCAACCTCGGAAAAGGAAATCTATTACT  
ACCATGACCCCAACAACCTACGATAAAAATAAACCTTTCAAGTGTAAAGACTGTGAGAAGGCATTCAGACGCAGTGAGCA  
CTTGAAGAAGGCATATAAGATCCGTTTCAATCAACGGAACGCCCTTTTGCTTGTATGTTCTGTGAGAAAAAATTCAGTAGAA  
GTGACAATTTATCACAAACATCTAAAAACTCACAAAA**GCACGGTGATTTTGAGA**.....3'

# Η μέθοδος της τυχαίας προσπέλασης-Shotgun Method

Η μέθοδος της τυχαίας προσπέλασης χρησιμοποιείται για τη συναρμολόγηση αλληλουχιών:

- ✓ Το DNA σπάει σε μικρά θραύσματα
- ✓ Το DNA Αλληλουχείται
- ✓ Η αλληλουχία συναρμολογείται μέσω των επικαλύψεων των επιμέρους θραυσμάτων

DNA



500 bp



Θραύσματα



Αλληλουχίες



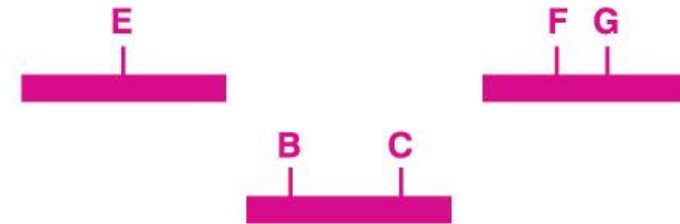
Αλληλεπικάλυψη

Χρήση γονιδιωματικού χάρτη για την υποβοήθηση συναρμολόγησης αλληλουχίας σε περιπτώσεις χασμάτων (1)

Θραύσματα DNA

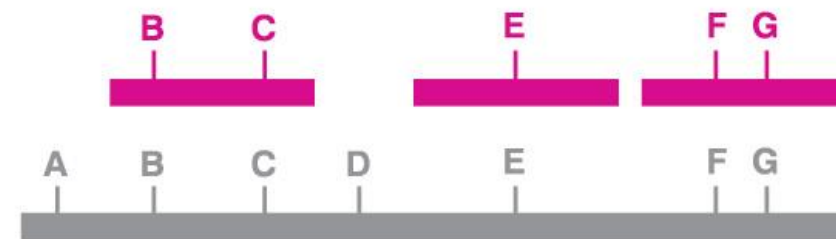


Αλληλούχηση τυχαίας προσπέλασης



Μη συνδεδεμένα τμήματα γονιδιωματικής αλληλουχίας

Ταυτοποίηση θέσεων στο γονιδιωματικό χάρτη



Θέσεις χαρτογραφημένων χαρακτηριστικών της αλληλουχίας

Χρήση γονιδιωματικού χάρτη  
για την υποβοήθηση  
συναρμολόγησης αλληλουχίας  
σε περιπτώσεις  
επαναλαμβανόμενου DNA (2)

**A** Σφάλμα κατά τη συναρμολόγηση της αλληλουχίας, το οποίο προκλήθηκε λόγω της παρουσίας επαναλαμβανόμενου DNA

Δύο αντίγραφα μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας DNA

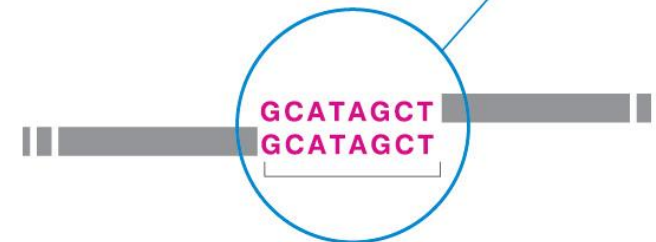
DNA



Θραύσματα



Συναρμολογημένη  
αλληλουχία



Εσφαλμένη  
αλληλεπικάλυψη

**B** Ο γονιδιωματικός χάρτης καθιστά εφικτή την αναγνώριση του σφάλματος

Σωστός γονιδιωματικός  
χάρτης



Χάρτης μετά από την εσφαλμένη  
συναρμολόγηση

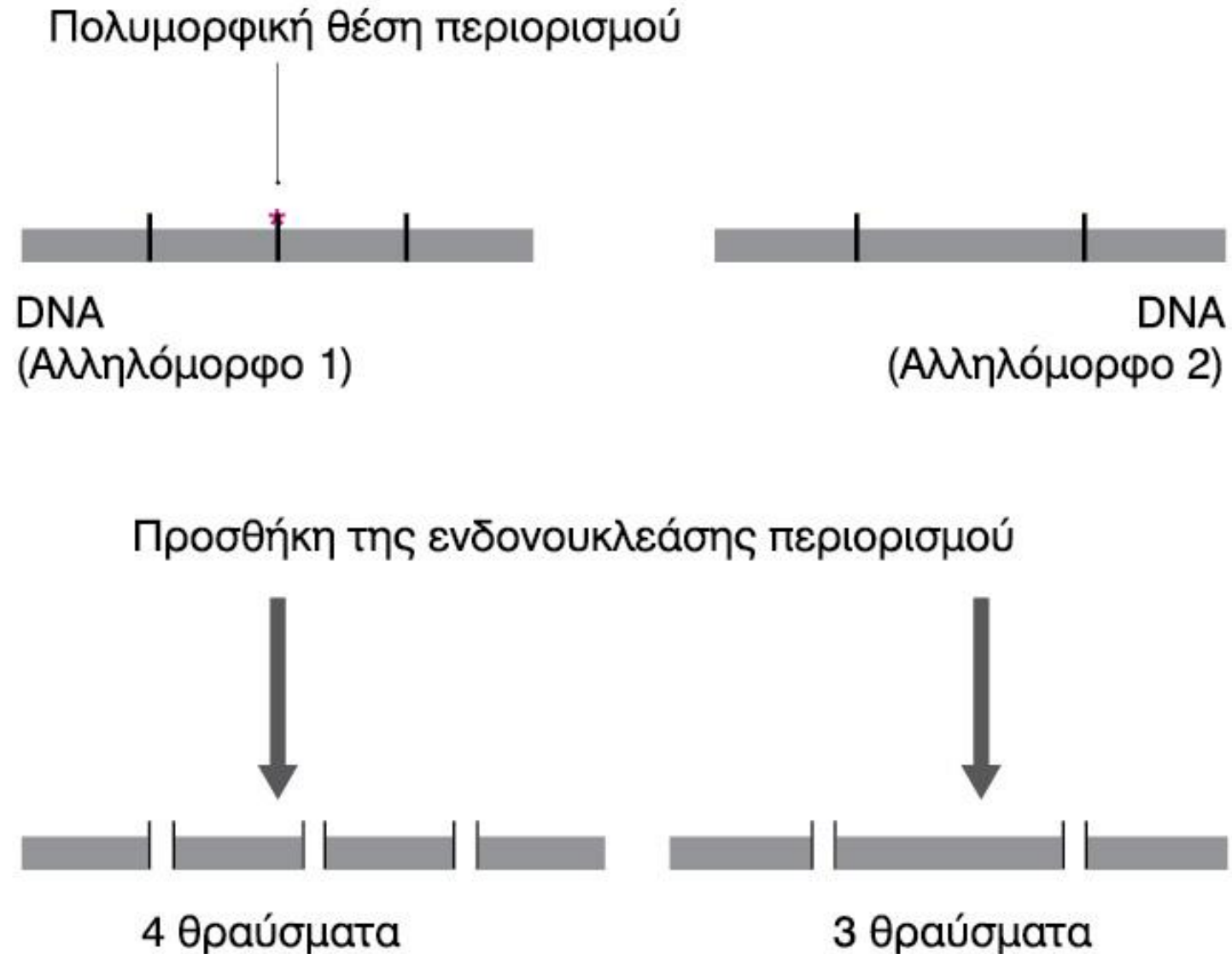


## Χρήση βιοχημικών δεικτών για τον *Saccharomyces cerevisiae*

Δείκτης	Φαινότυπος	Μέθοδος μέσω της οποίας ταυτοποιούνται τα κύτταρα που φέρουν τον δείκτη
<i>ADE2</i>	Απαιτεί την ύπαρξη αδενίνης	Αναπτύσσεται μόνο όταν υπάρχει αδενίνη στο θρεπτικό μέσο
<i>CAN1</i>	Ανθεκτικός στην καναβανίνη	Αναπτύσσεται παρουσία καναβανίνης
<i>CUP1</i>	Ανθεκτικός στον χαλκό	Αναπτύσσεται παρουσία χαλκού
<i>CYH1</i>	Ανθεκτικός στην κυκλοεξιμίδη	Αναπτύσσεται παρουσία κυκλοεξιμίδης
<i>LEU2</i>	Απαιτεί την ύπαρξη λευκίνης	Αναπτύσσεται μόνο όταν υπάρχει λευκίνη στο θρεπτικό μέσο
<i>SUC2</i>	Ικανό να επιτελεί ζύμωση σακχαρόζης	Αναπτύσσεται εάν η σακχαρόζη είναι ο μόνος υδατάνθρακας στο θρεπτικό μέσο
<i>URA3</i>	Απαιτεί την ύπαρξη ουρακίλης	Αναπτύσσεται μόνο όταν υπάρχει ουρακίλη στο θρεπτικό μέσο

# Πολυμορφισμοί τύπου μήκος θραύσματος – RFLPs ως DNA markers

Restriction fragment length polymorphisms: μια θέση αναγνώρισης από ένζυμο περιορισμού υπάρχει στο ένα αλληλόμορφο και απουσιάζει από το άλλο.



## Πολυμορφισμοί τύπου μήκος θραύσματος – RFLPs ως DNA markers

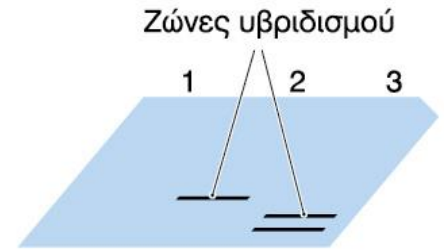
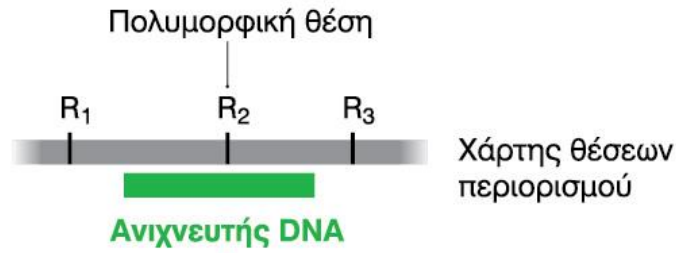
- ✓ Σε μικρού μήκους μόρια DNA ή πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση μπορεί να διακρίνει τα δυο διαφορετικά αλληλόμορφο ενός RFLP (πέψη → ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης).
- ✓ Σε μεγάλου μήκους γονιδιώματα η πέψη με ένα ένζυμο που αναγνωρίζει 6 βάσεις πχ *EcoRI* , θα αναμένεται να κόβει κάθε  $4^6=4.096$  και άρα θα προέκυπταν 750.000 τμήματα DNA, τα οποία σε πήκτωμα αγαρόζης δεν θα ήταν διακριτά πάρα μόνο με **Southern blot**.

Διαφορετικοί μέθοδοι  
 γονοτύπησης RFLP:  
 α) Southern blot  
 β) PCR → Πέψη →  
 ηλεκτροφόρηση →  
 παρατήρηση

**A Υβριδισμός κατά Southern**



Μεμβράνη νάυλον

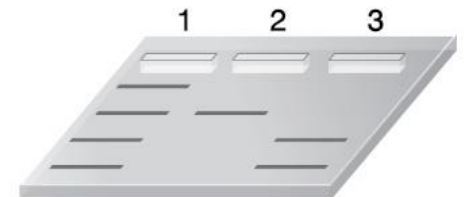
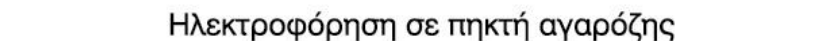
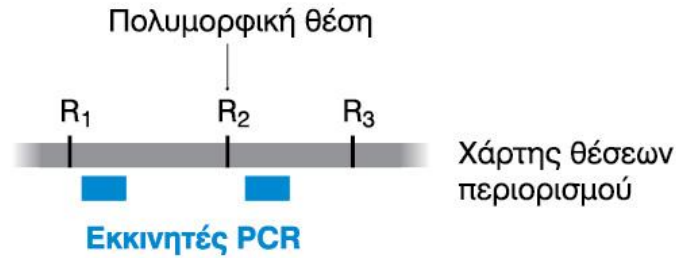


Αυτοραδιογραφία


**B PCR**



Πέψη μετά την PCR







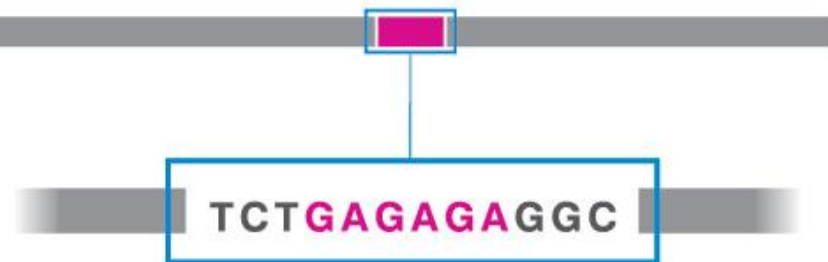
SSLPs: Συστοιχίες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό επαναλήψεων σε διαφορετικά αλληλόμορφα.

- ✓ Μινιδορυφόροι μήκους  $\leq 25\text{bp}$ : (minisatellites) μεταβλητοί αριθμοί διαδοχικών επαναλήψεων VNTR-variable number of tandem repeats.
- ✓ Μικροδορυφόροι μήκους  $\leq 13\text{bp}$  (microsatellites) ή αλλιώς βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις STRs short tandem repeats .

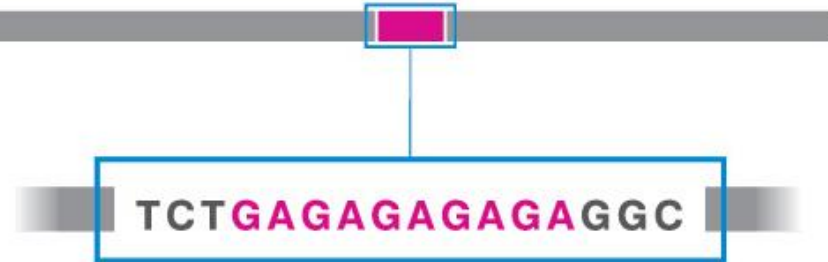
# Γονοτύπηση πολυμορφισμών τύπου SSLPs

## A Δύο παραλλαγές ενός SSLP

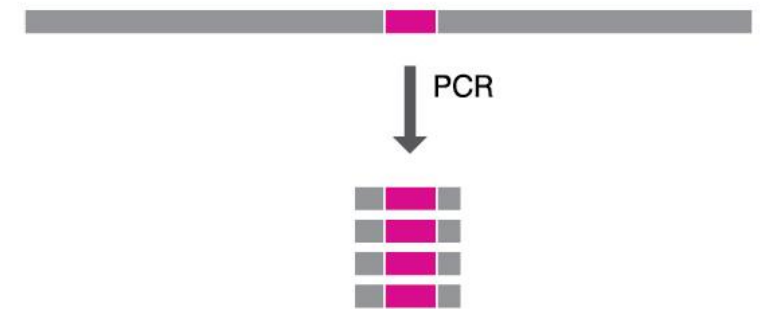
Αλληλό-μορφο 1



Αλληλό-μορφο 2

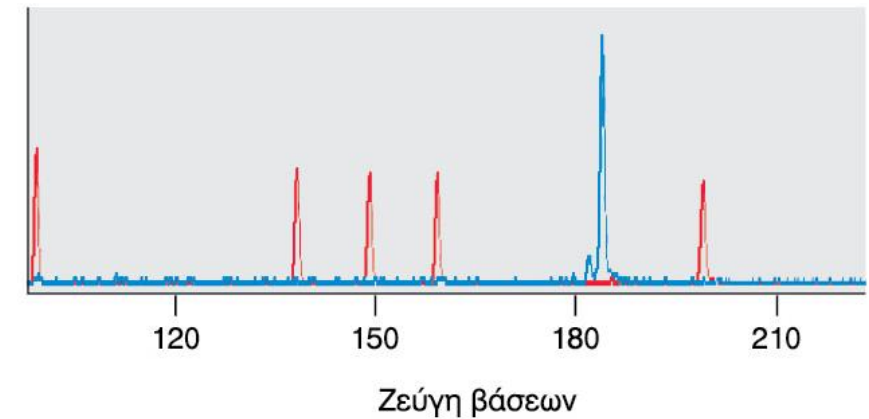
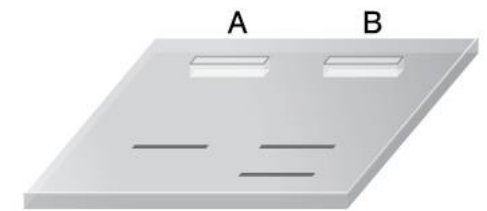


## B Αποτύπωση μιας STR μέσω PCR



Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης



# Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί SNPs – Single nucleotide polymorphisms

Αλληλόμορφο 1



... AGTCA**G**AAATC ...

... AGTCA**C**AAATC ...

Αλληλόμορφο 2



Εκτιμάται ότι υπάρχουν  $3-4 \cdot 10^8$  SNPs στον ανθρώπινο πληθυσμό συνολικά.

# Μέθοδοι γονοτύπησης των SNPs:

α) Υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίου με αταίριαστο ζεύγος βάσεων στο τέλος β) Δοκιμασία ολιγονουκλεοτιδίων- OLA oligonucleotide ligation assay, γ) ARMS PCR –Single nucleotide polymorphisms

**A** Υβριδισμός με ένα ολιγονουκλεοτίδιο που δημιουργεί αταίριαστο ζεύγος βάσεων στο τέλος

Πλήρως ζευγαρωμένο υβρίδιο

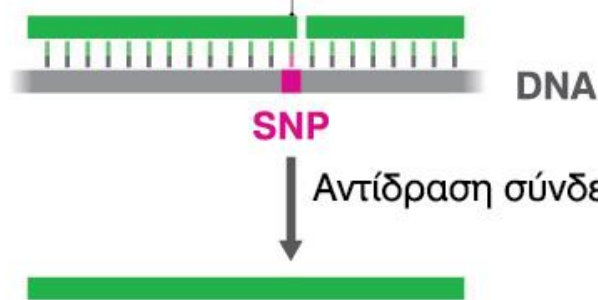


Υβρίδιο με μη ζευγαρωμένη ουρά

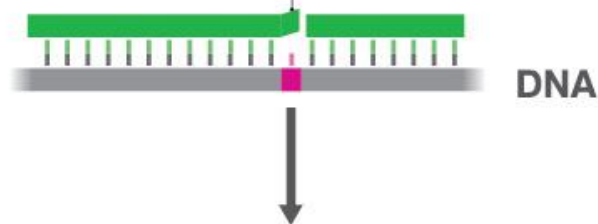


**B** Δοκιμασία σύνδεσης ολιγονουκλεοτιδίου

Απουσία αταίριαστου ζεύγους



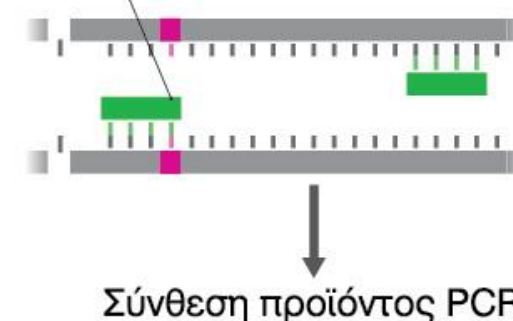
Αταίριαστο ζεύγος



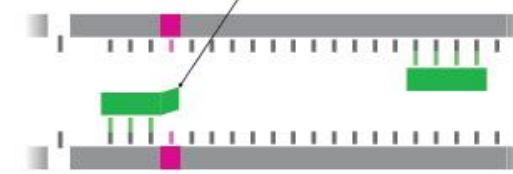
Δεν πραγματοποιείται αντίδραση σύνδεσης

**Γ** Τεστ ARMS

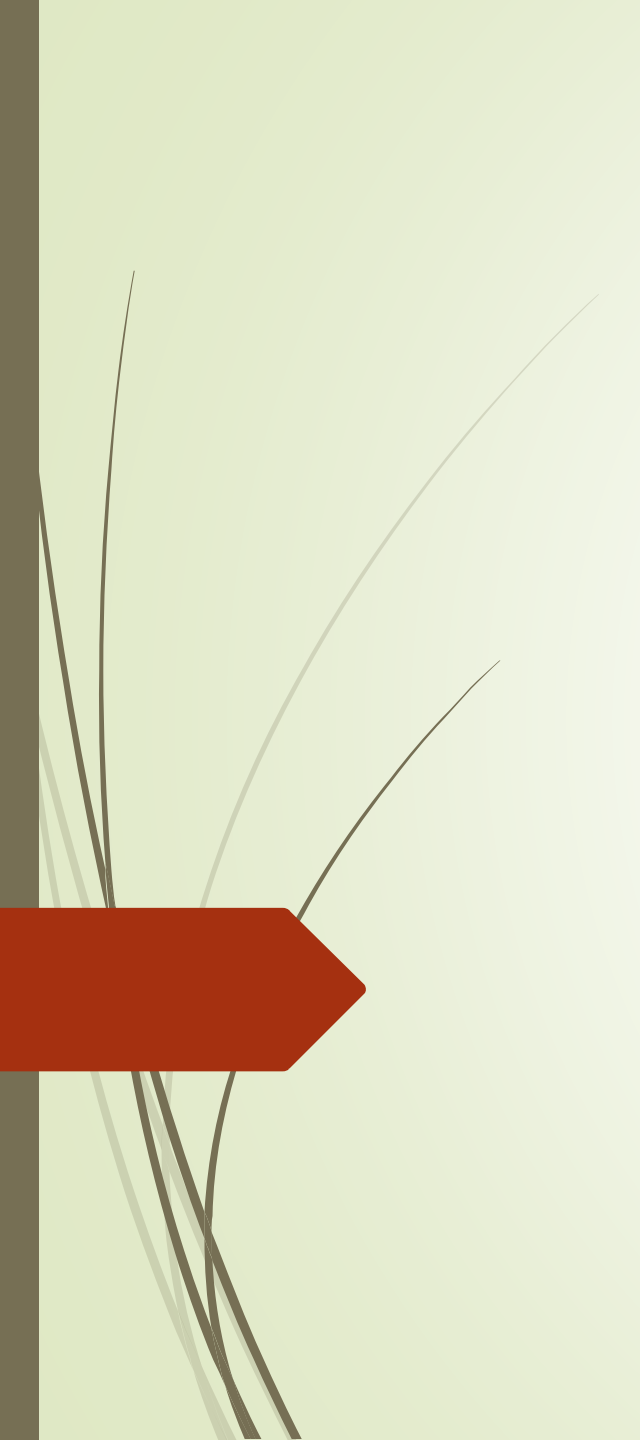
Απουσία αταίριαστου ζεύγους



Αταίριαστο ζεύγος

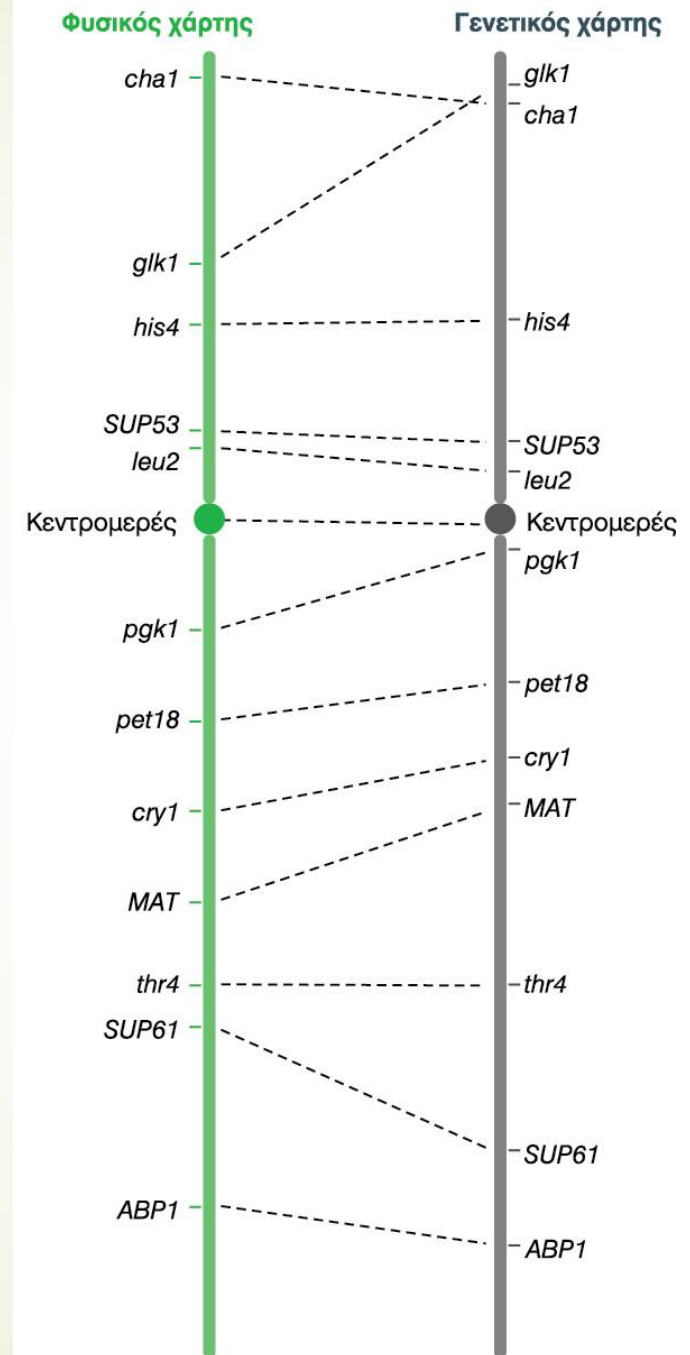


Δεν συντίθεται προϊόν PCR



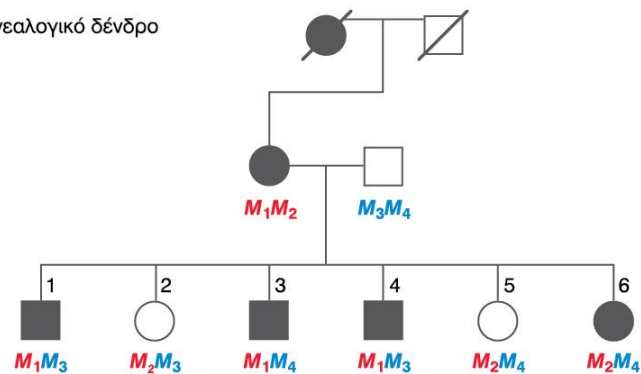
Γενετική Χαρτογράφηση:  
Φυσικός & Γενετικός χάρτης

# Γενετικός και φυσικός χάρτης του χρωμοσώματος II του *Saccharomyces cerevisiae*



# Παράδειγμα ανάλυσης γενετικού δέντρου στον άνθρωπο

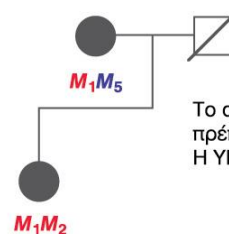
Α Γενεαλογικό δένδρο



Β Πιθανές ερμηνείες του γενεαλογικού δένδρου

	ΜΗΤΡΙΚΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ	
	Υπόθεση 1	Υπόθεση 2
	<i>Disease M<sub>1</sub></i>	<i>Healthy M<sub>1</sub></i>
	<i>Healthy M<sub>2</sub></i>	<i>Disease M<sub>2</sub></i>
Παιδί 1	<i>Disease M<sub>1</sub></i>	Ανασυνδυασμένο
Παιδί 2	<i>Healthy M<sub>2</sub></i>	Ανασυνδυασμένο
Παιδί 3	<i>Disease M<sub>1</sub></i>	Ανασυνδυασμένο
Παιδί 4	<i>Disease M<sub>1</sub></i>	Ανασυνδυασμένο
Παιδί 5	<i>Healthy M<sub>2</sub></i>	Ανασυνδυασμένο
Παιδί 6	<i>Disease M<sub>2</sub></i>	Γονεϊκό
Συχνότητα ανασυνδυασμού	1/6 = 16,7%	5/6 = 83,3%

Γ Επανεμφάνιση της γιαγιάς από την πλευρά της μητέρας



Το αλληλόμορφο της νόσου (*Disease*) πρέπει να είναι συνδεδεμένο με το *M<sub>1</sub>*. Η ΥΠΟΘΕΣΗ 1 ΕΙΝΑΙ ΣΩΣΤΗ.

**ΥΠΟΜΝΗΜΑ**

- Άτομο θηλικού γένους που δεν πάσχει
- Άτομο θηλικού γένους που πάσχει
- Άτομο αρσενικού γένους που δεν πάσχει
- Άτομο αρσενικού γένους που πάσχει
- ⊘ Άτομο που έχει πεθάνει