



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



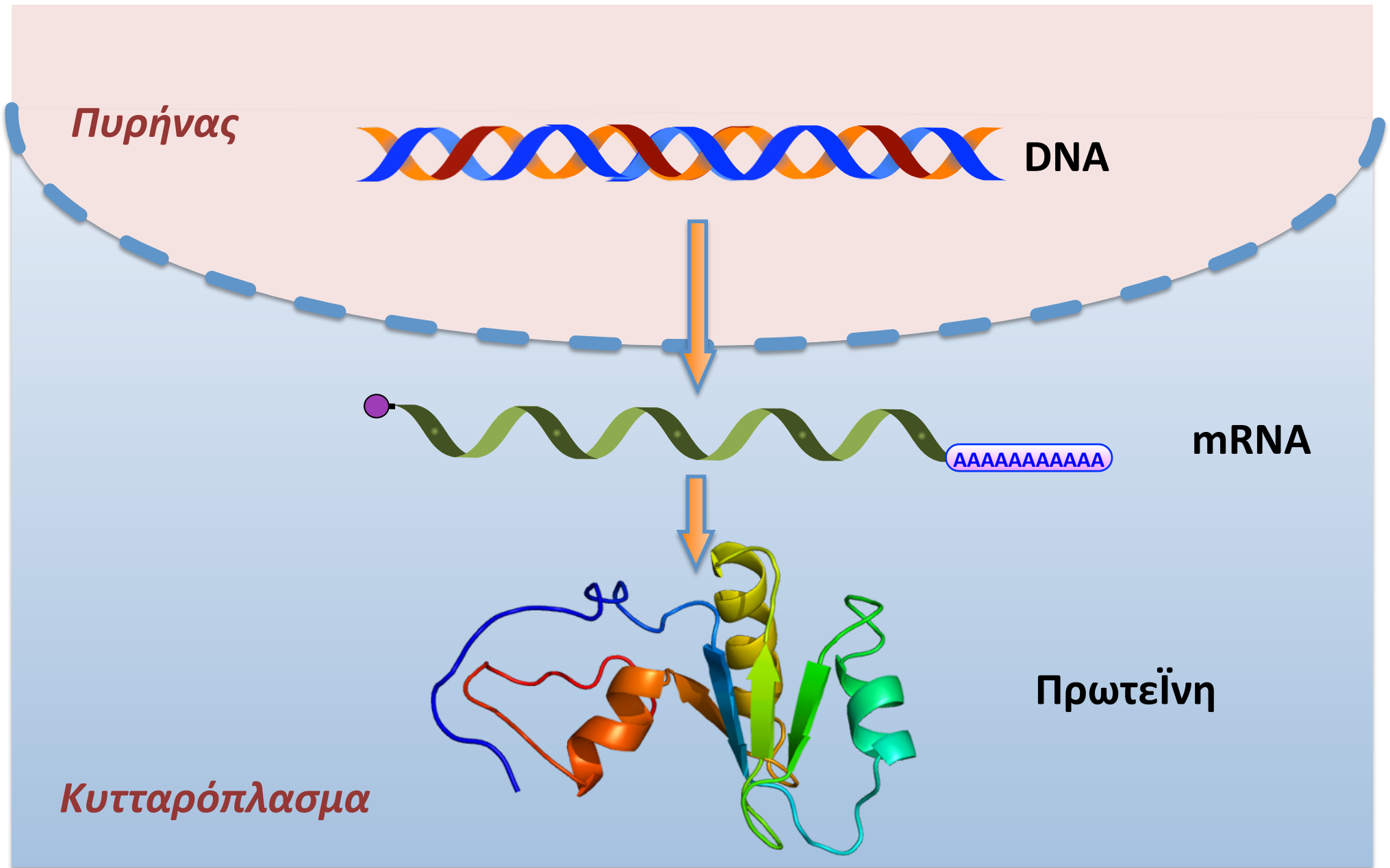
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ  
ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ

# Τεχνικές ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών - ΣΤΥΠΩΜΑΤΑ



Νικόλαος Μπαλατσός

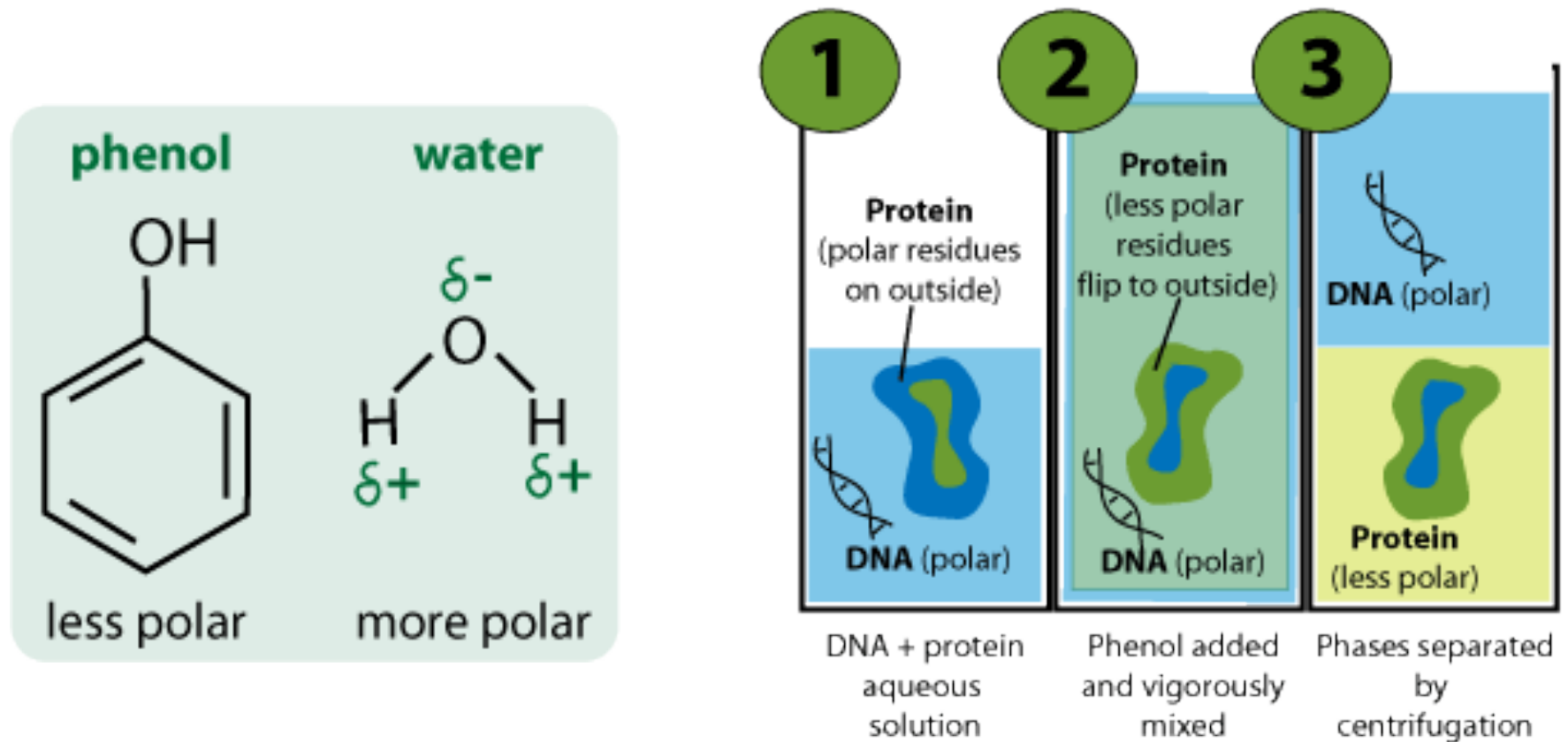
# Το κεντρικό δόγμα



- Ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών DNA
- Μελέτες γονιδιακής έκφρασης (mRNA)
- Παραγωγή πρωτεϊνών
- Συσχέτιση με ασθένειες
- Βιοτεχνολογικές εφαρμογές
- ...



# Διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων – πρωτεϊνών



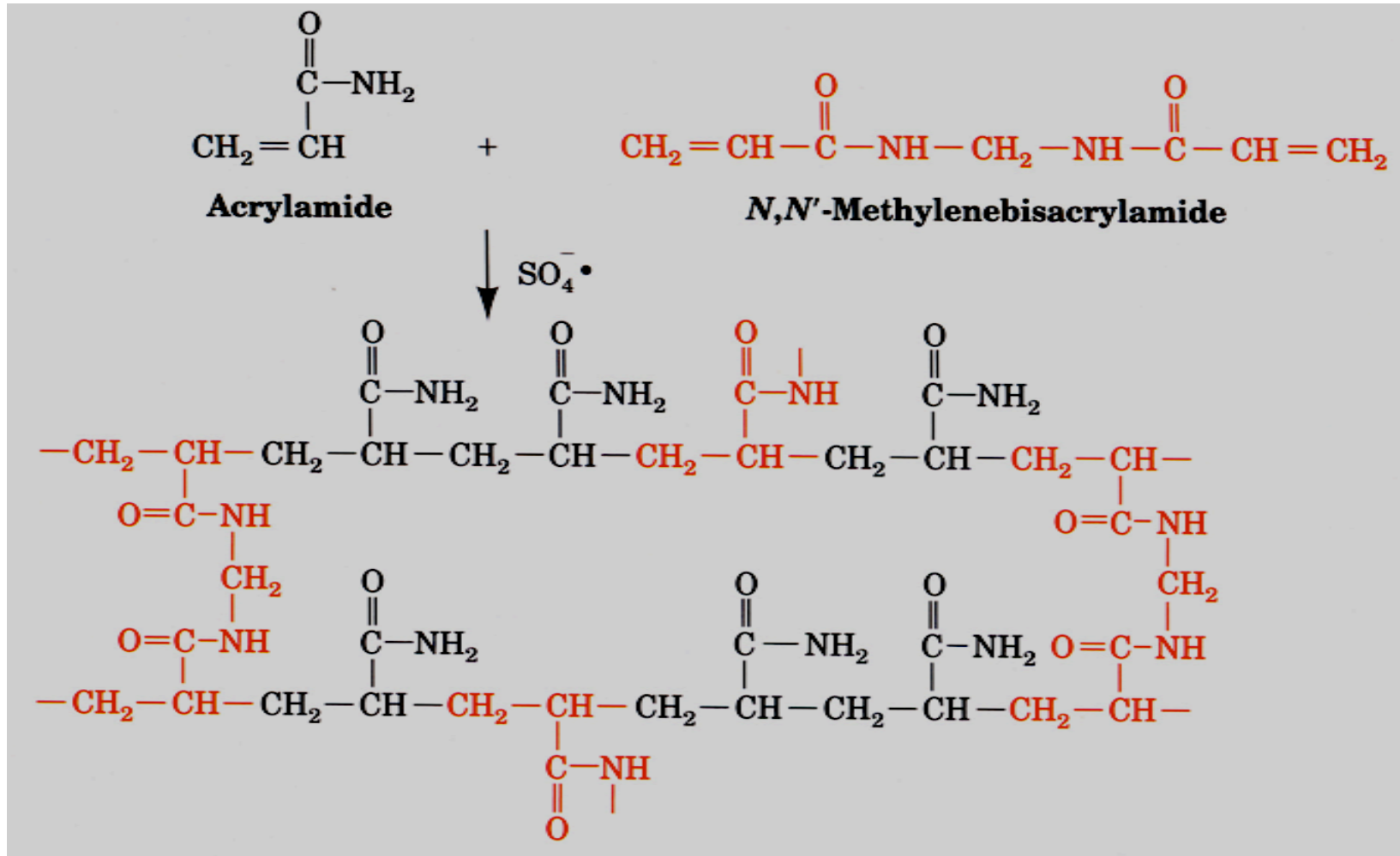
DNA, 260, 280nm

$260/280 = 1.8$ , καθαρό δείγμα

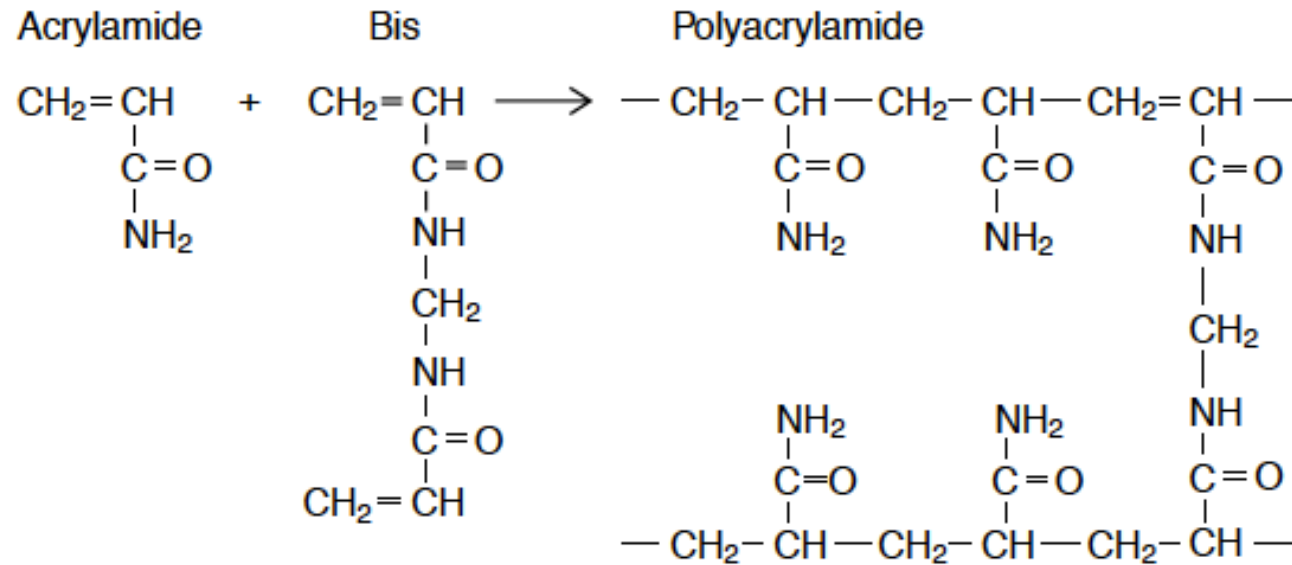
$260/280 < 1.8$ , πρόσμιξη πρωτεϊνών

Πρωτεΐνη, 280nm (αρωματικά αα)

# Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου



# Μέγεθος πόρων



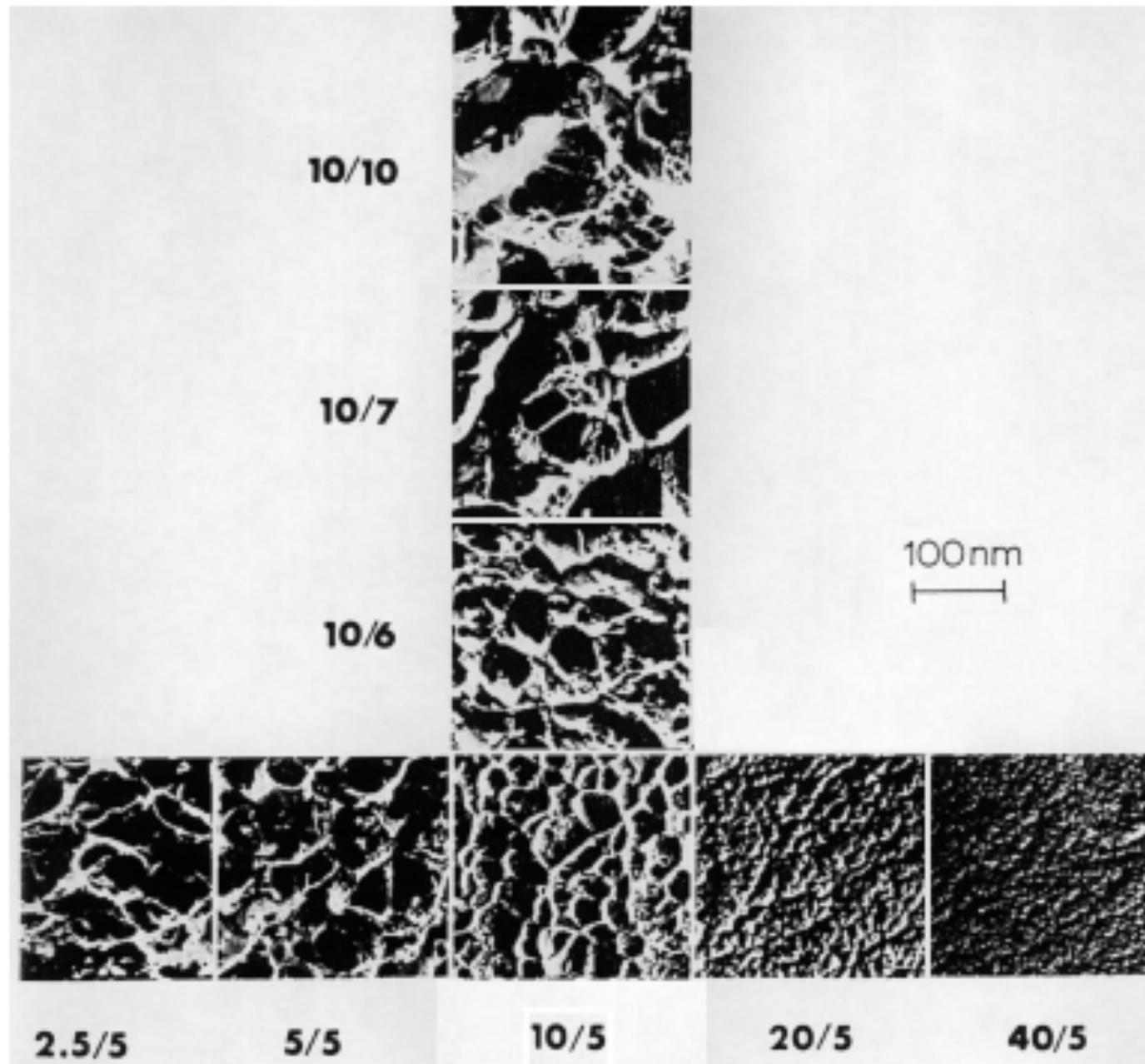
$$\%T = \frac{\text{g acrylamide} + \text{g cross-linker}}{\text{Total volume, ml}} \times 100$$

$$\%C = \frac{\text{g cross-linker}}{\text{g acrylamide} + \text{g cross-linker}} \times 100$$

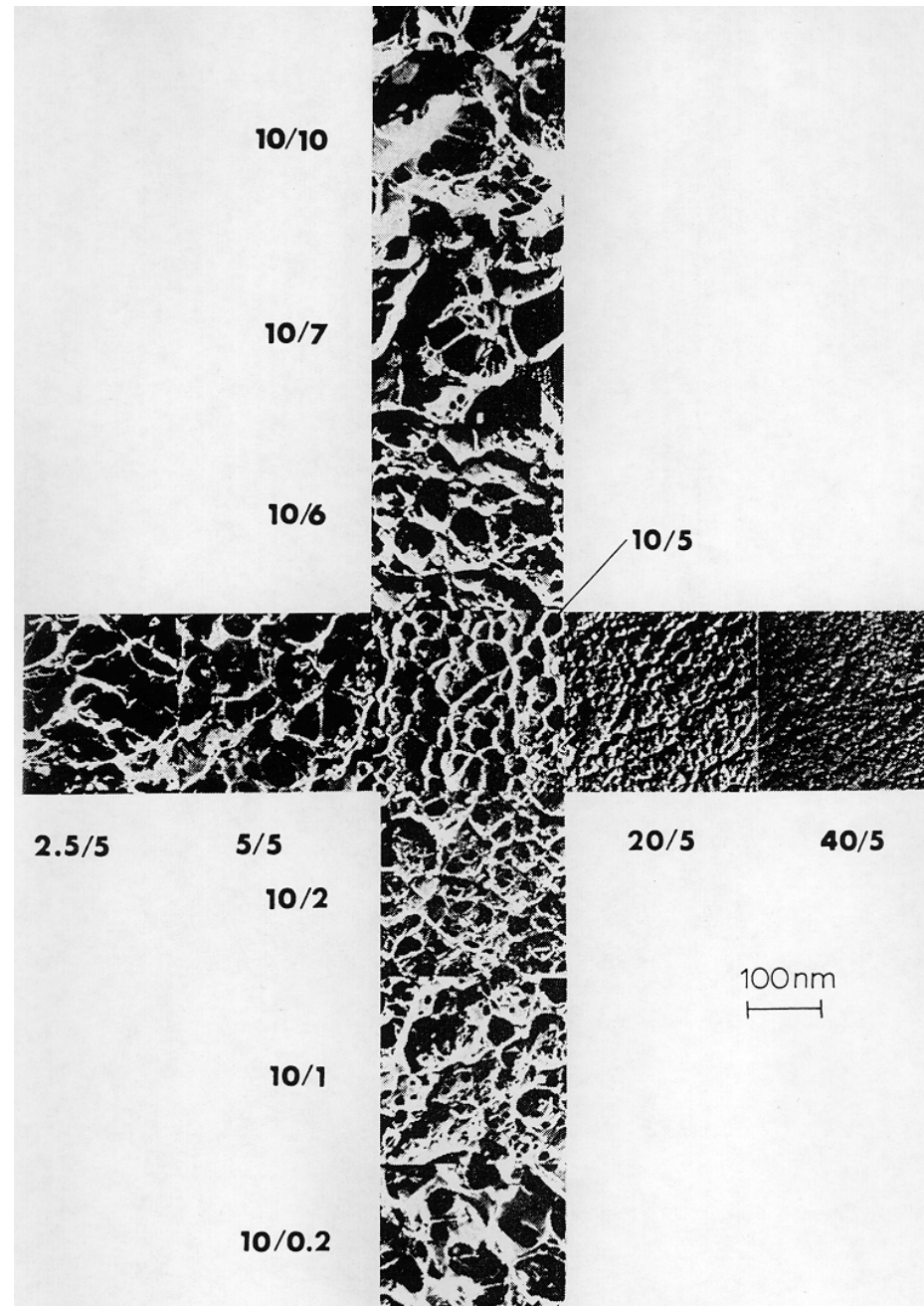
%T, total monomer concentration (in g/100 ml), and  
%C, weight percentage of crosslinker



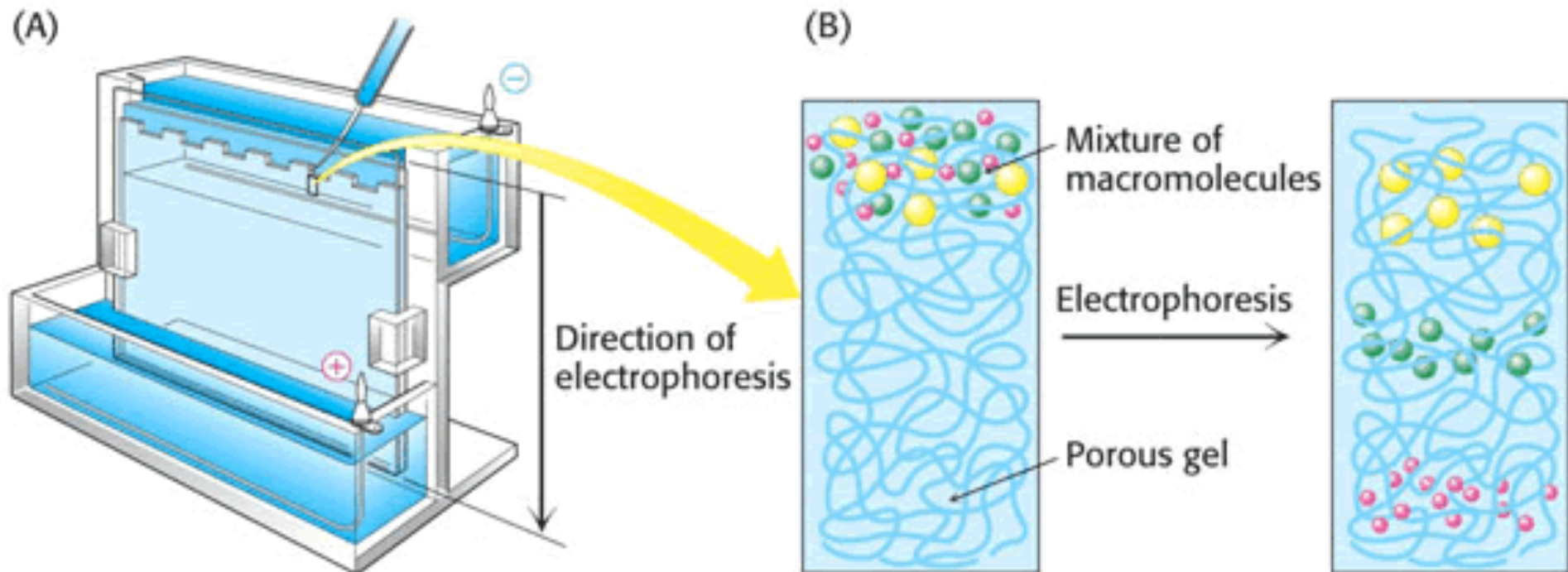
# Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και μέγεθος πόρων



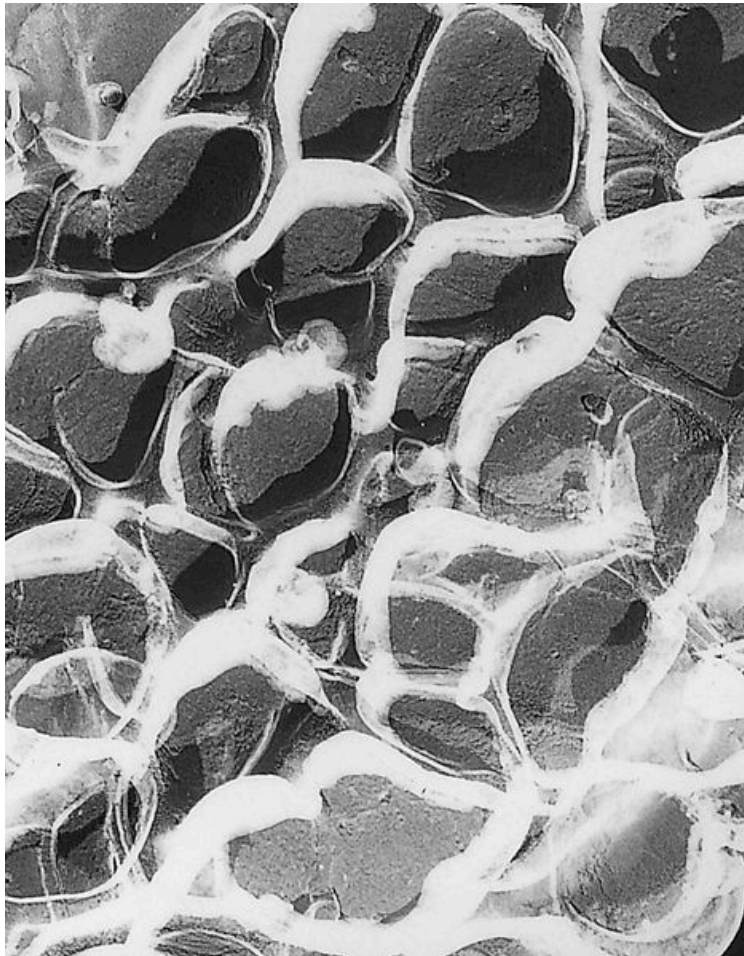
# Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και μέγεθος πόρων



# Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μέγεθος πόρων και κίνηση μακρομορίων

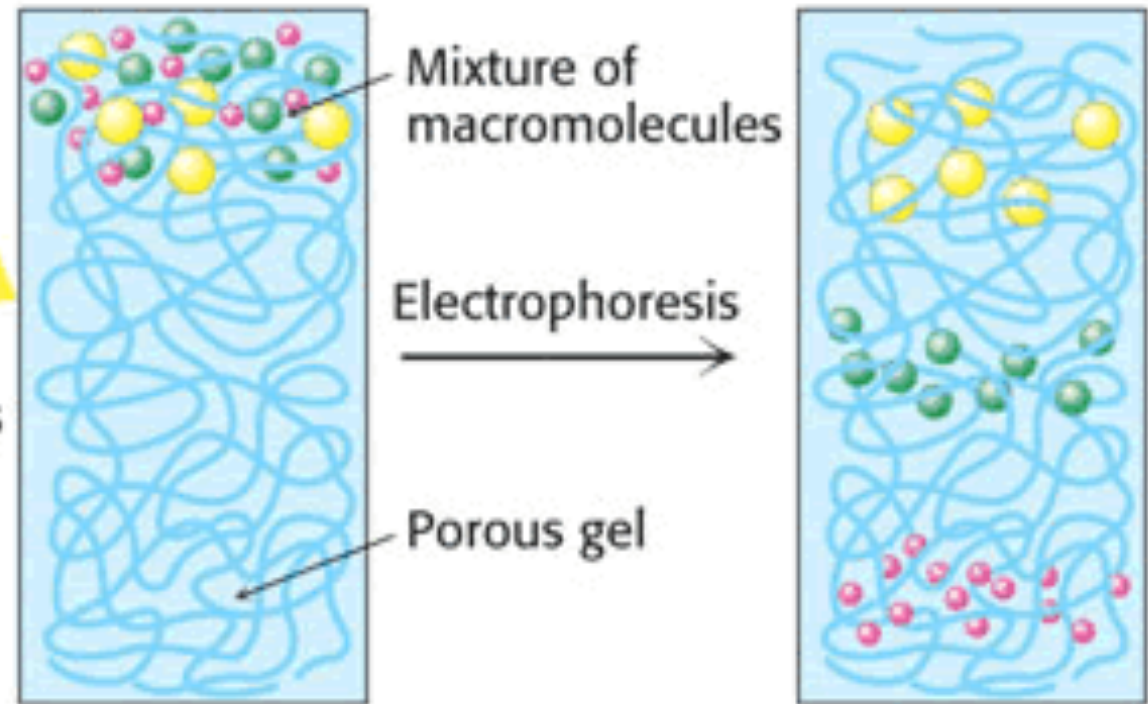


# Μέγεθος πόρων και μετακίνηση πρωτεϊνών



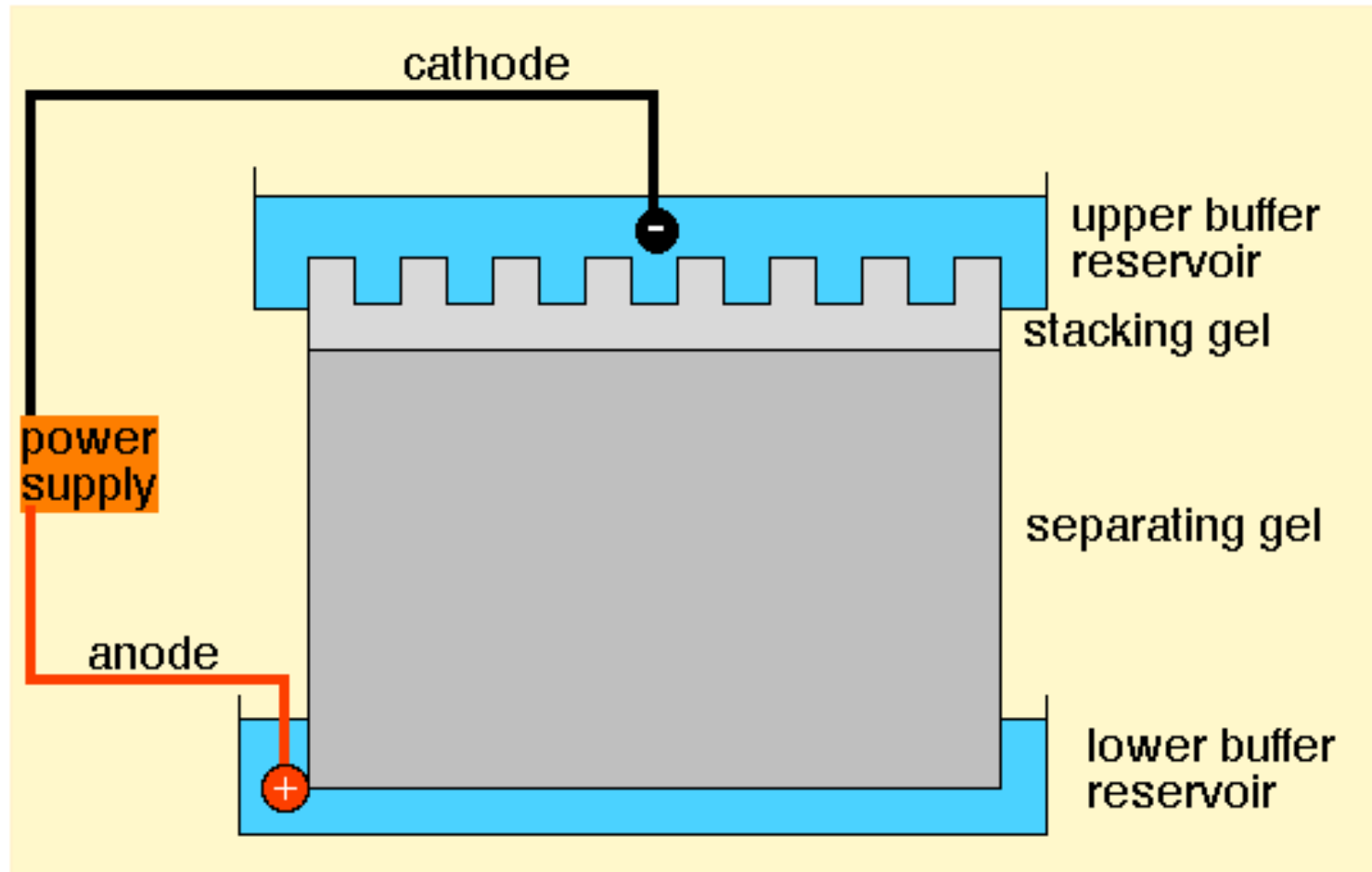
Transmission-Electron Microscopic image of a polyacrylamide gel. A polyacrylamide gel is a labyrinth of tunnels, the pore size is determined by the total amount of monomer present (%T) and the amount of cross-linker (%C).

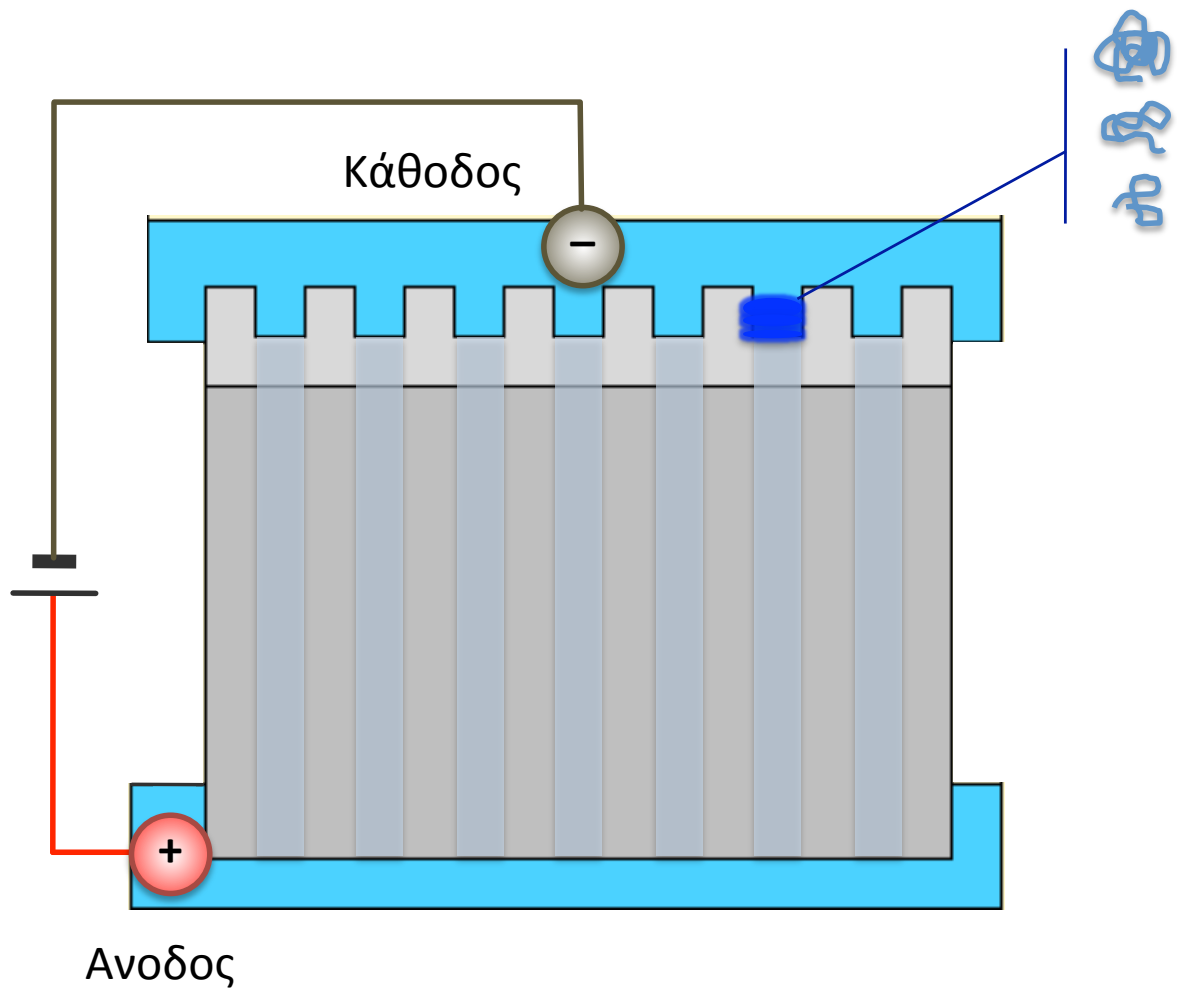
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:TEM\\_image\\_of\\_a\\_polyacrylamide\\_gel.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:TEM_image_of_a_polyacrylamide_gel.jpg)

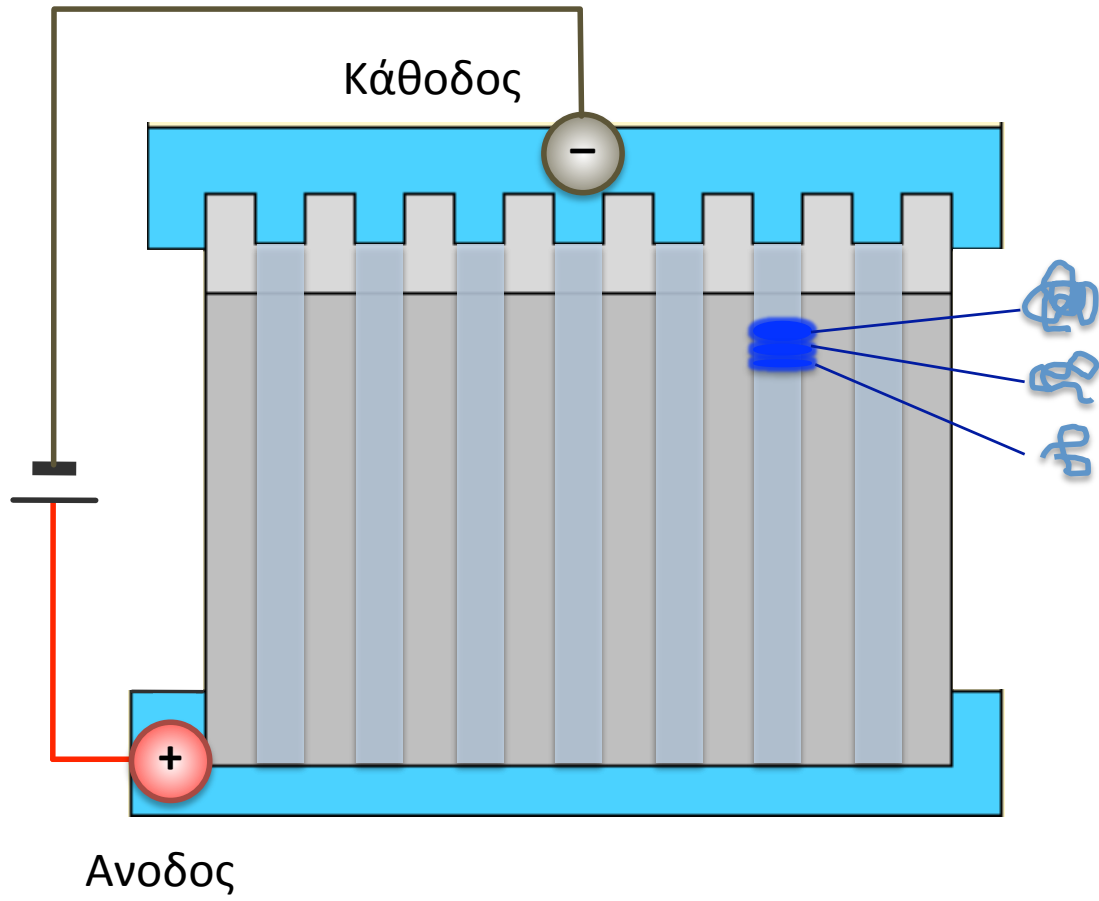


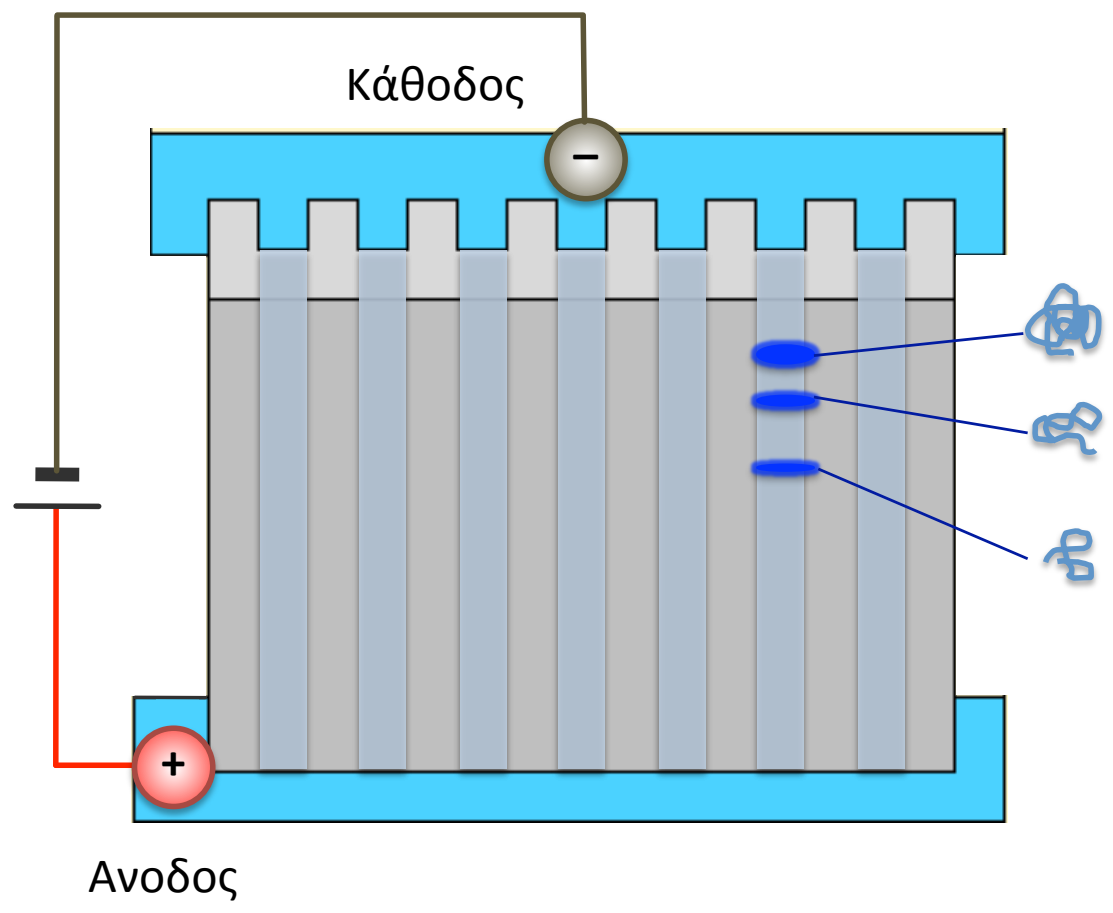
<http://oregonstate.edu/instruction/bb450/fall12/lecture/proteincharacterizationoutline.html>

# Ηλεκτροφόρηση και διαχωρισμός μακρομορίων

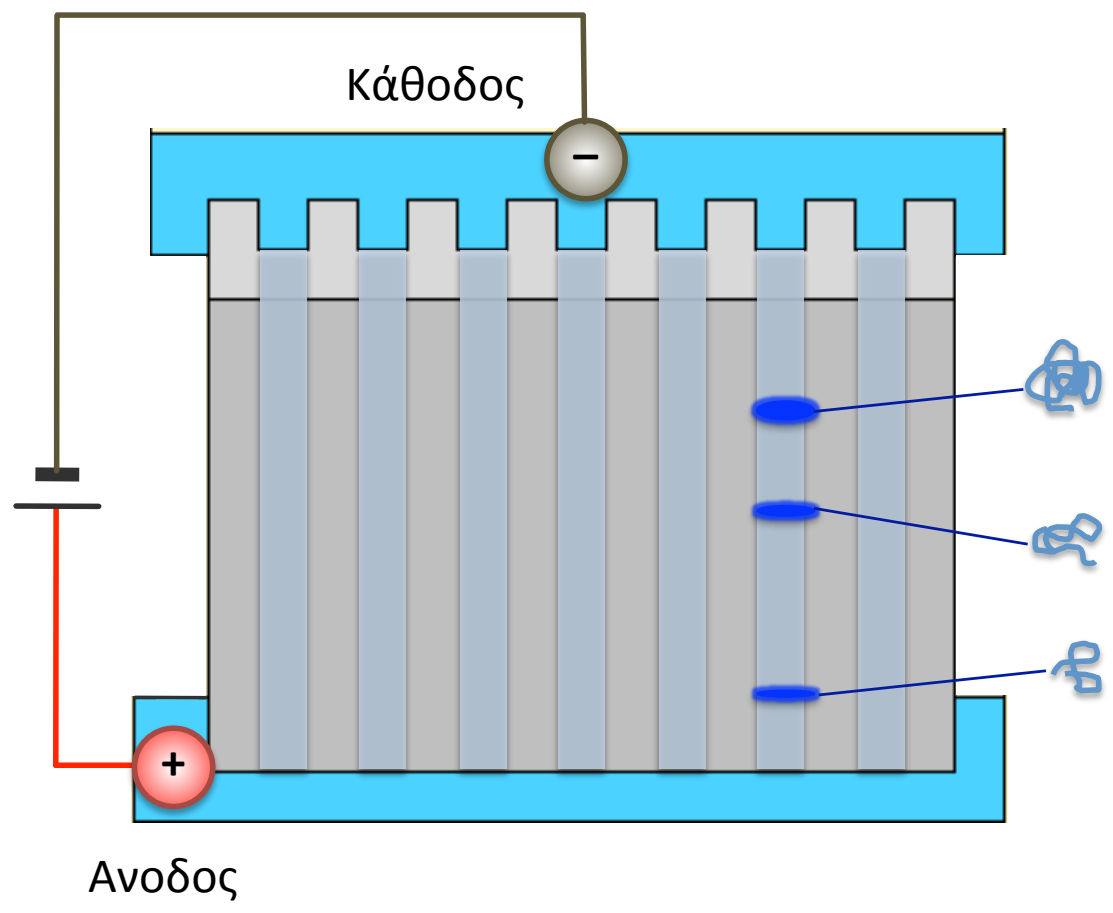




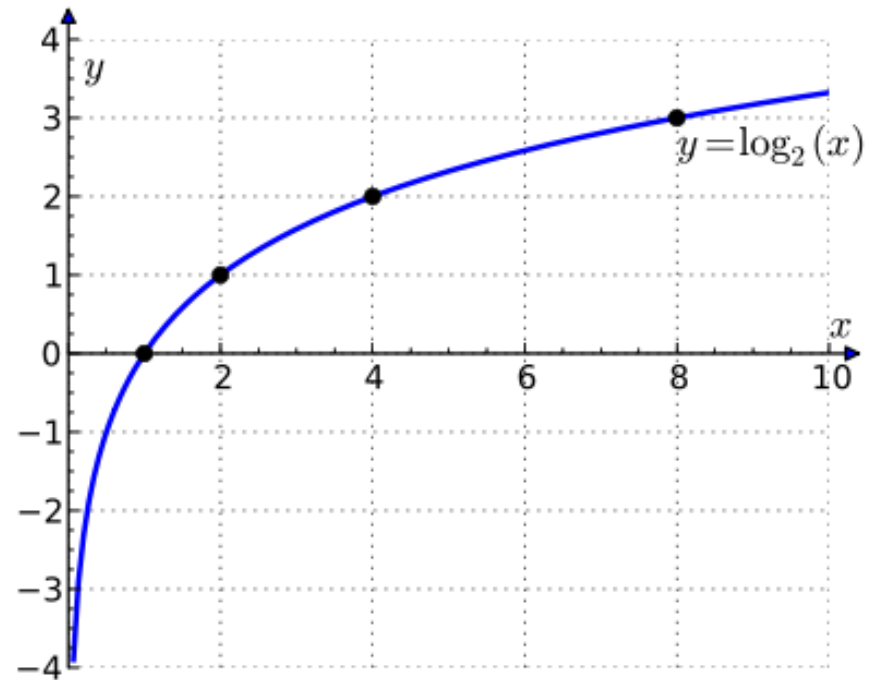
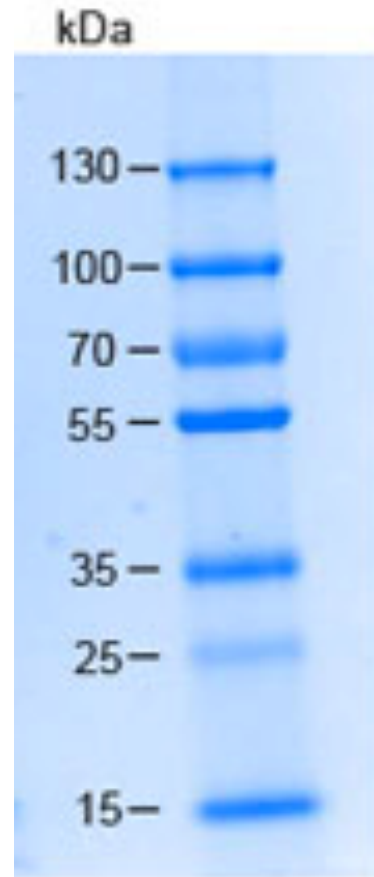
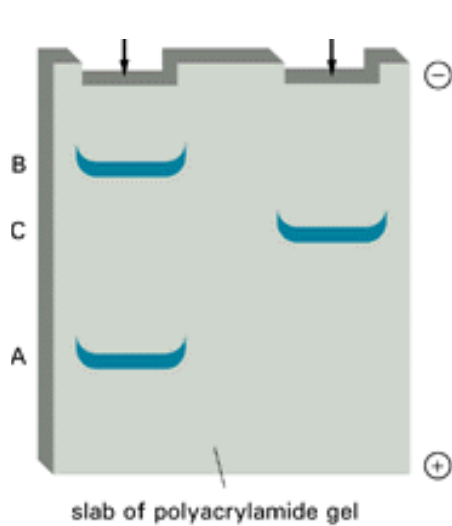








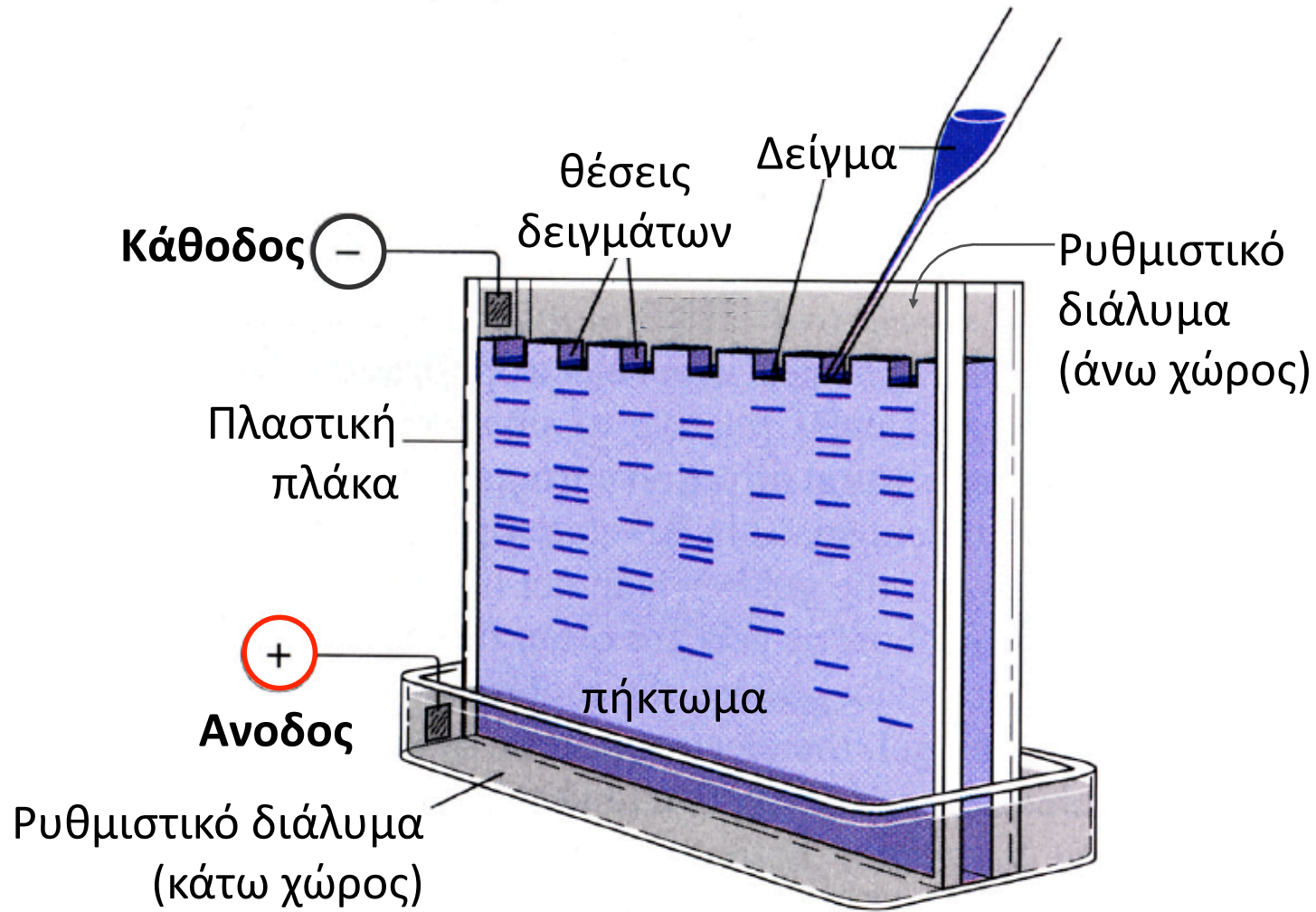
# Κίνηση μακρομορίων και λογάριθμοι



**L**OGARITHMS, (from *λογος ratio*, and *αριθμος number*), the indices of the ratios of numbers to one another; being a series of numbers in arithmetical progression, corresponding to others in geometrical progression; by means of which, arithmetical calculations can be made with much more ease and expedition than otherwise.

*Encyclopædia Britannica, 1797*

# Ηλεκτροφόρηση



## Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4

by

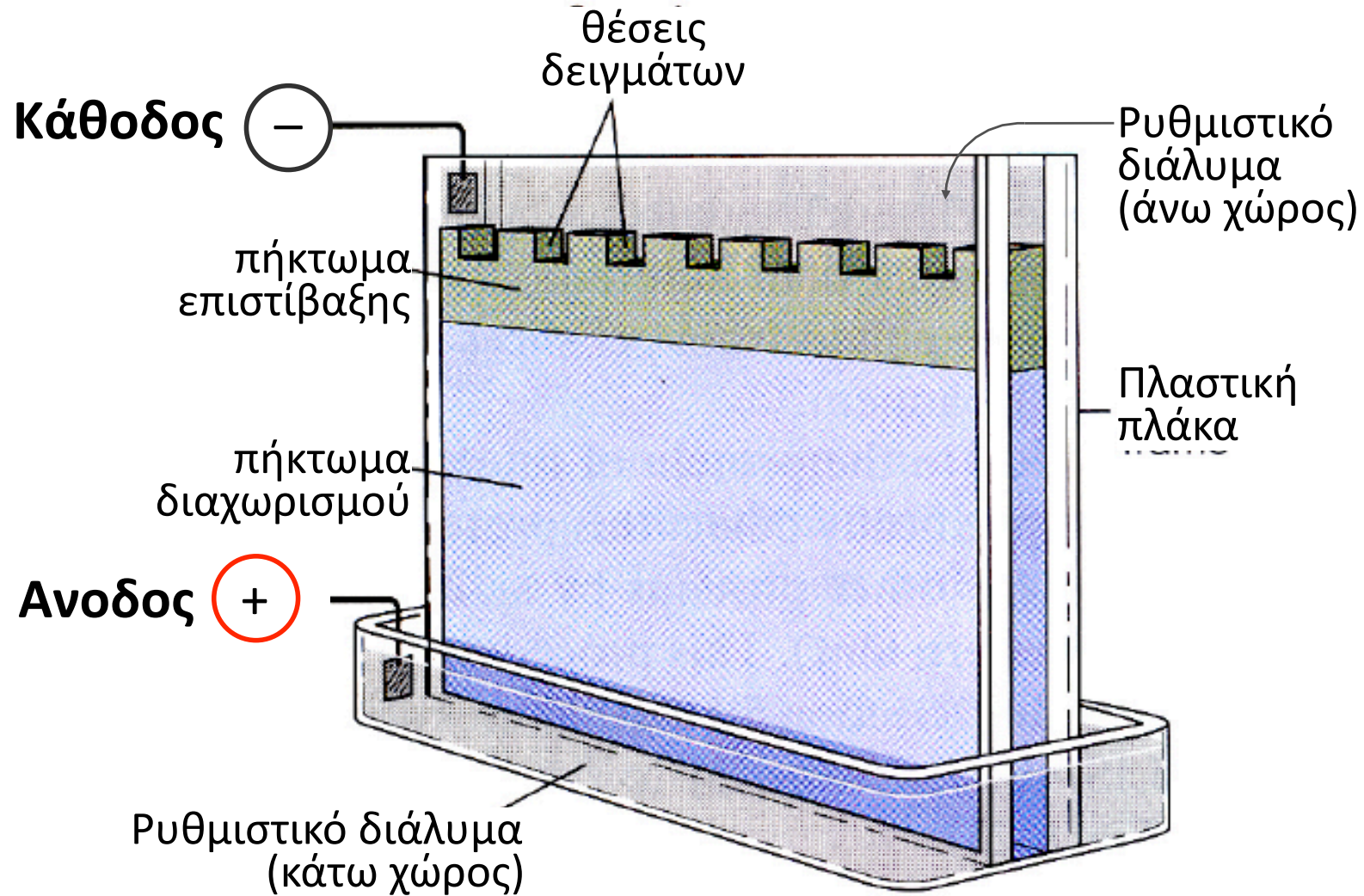
U. K. LAEMMLI

MRC Laboratory of Molecular Biology,  
Hills Road, Cambridge

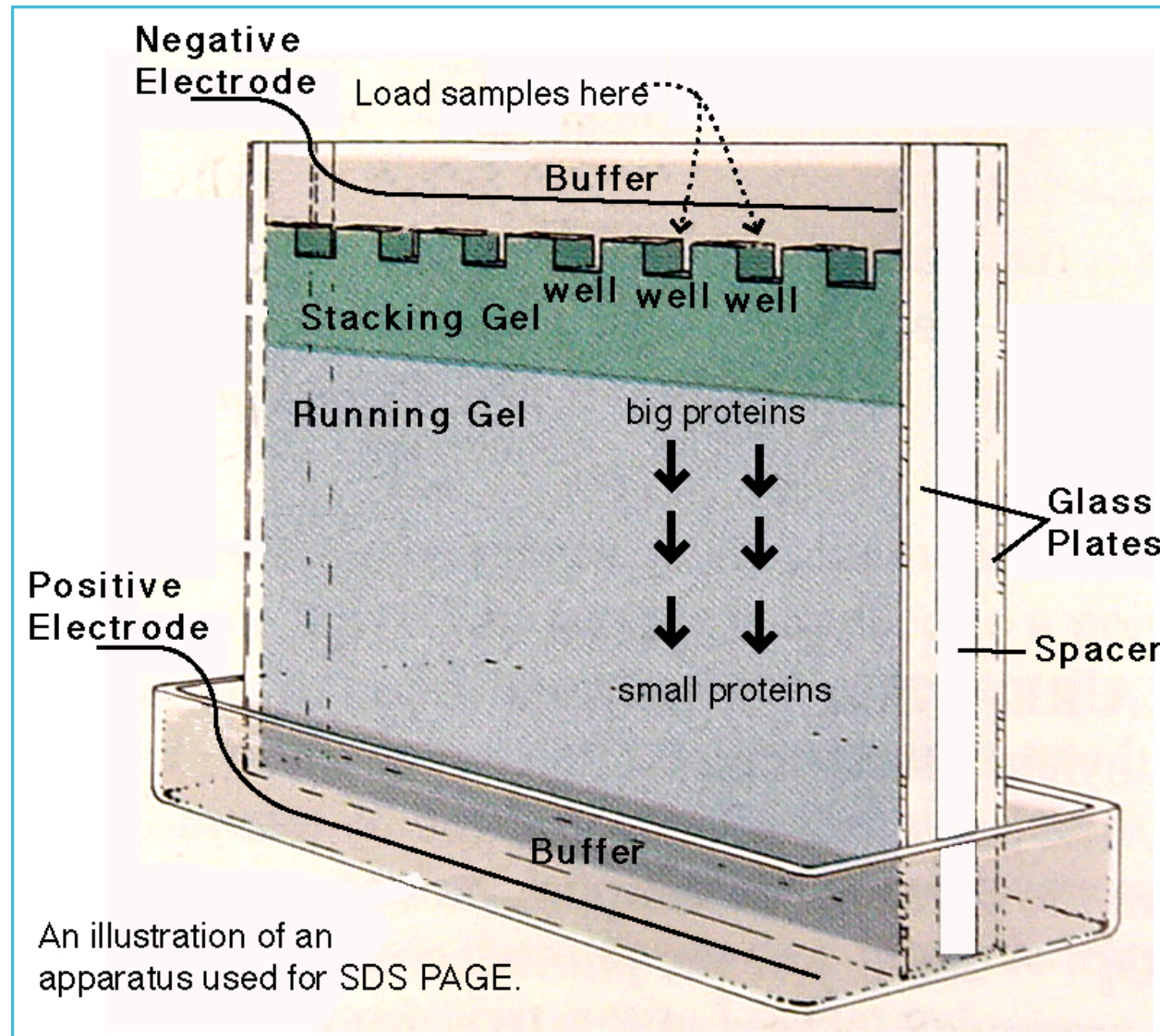
Using an improved method of gel electrophoresis, many hitherto unknown proteins have been found in bacteriophage T4 and some of these have been identified with specific gene products. Four major components of the head are cleaved during the process of assembly, apparently after the precursor proteins have assembled into some large intermediate structure.

NATURE VOL. 227 AUGUST 15 1970

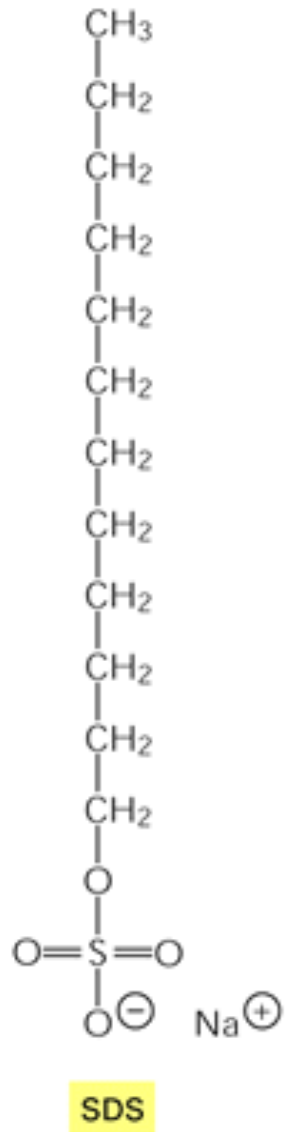
# Ασυνεχής ηλεκτροφόρηση



# Ηλεκτροφόρηση σε δύο φάσεις

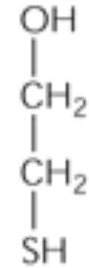


# Αποδιάταξη και φόρτιση μακρομορίων



↓ Η μερκαπτοαιθανόλη αποδιάτασσει την πρωτεΐνη

**β-mercaptoethanol**



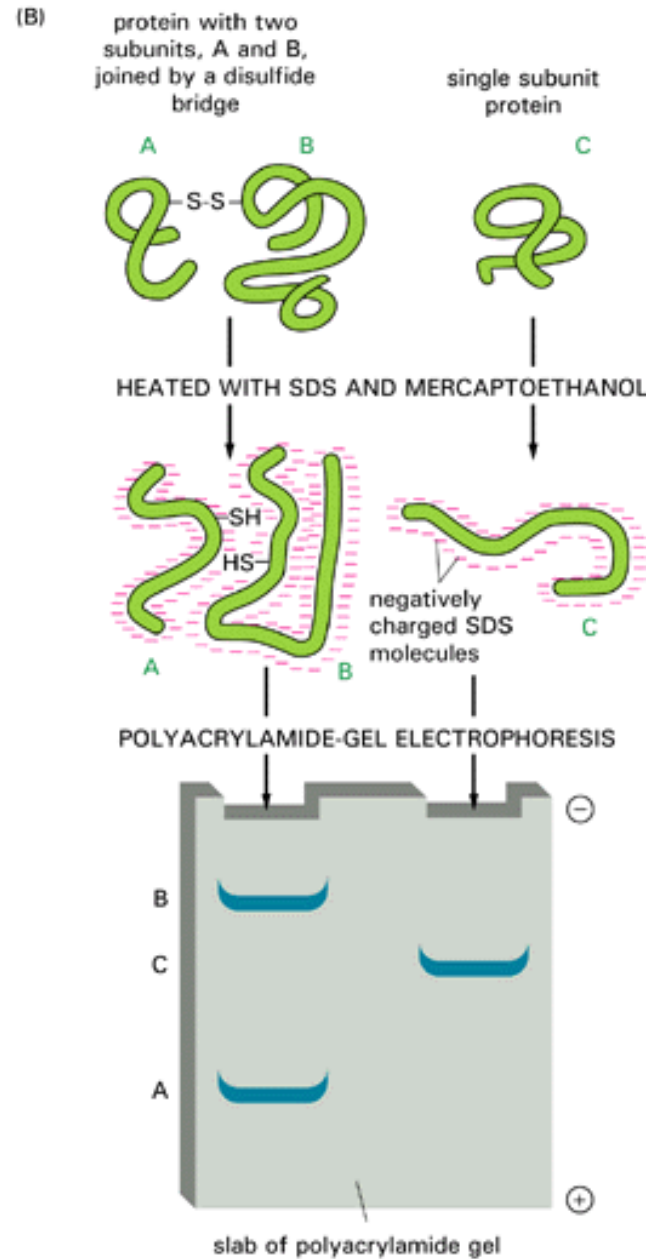
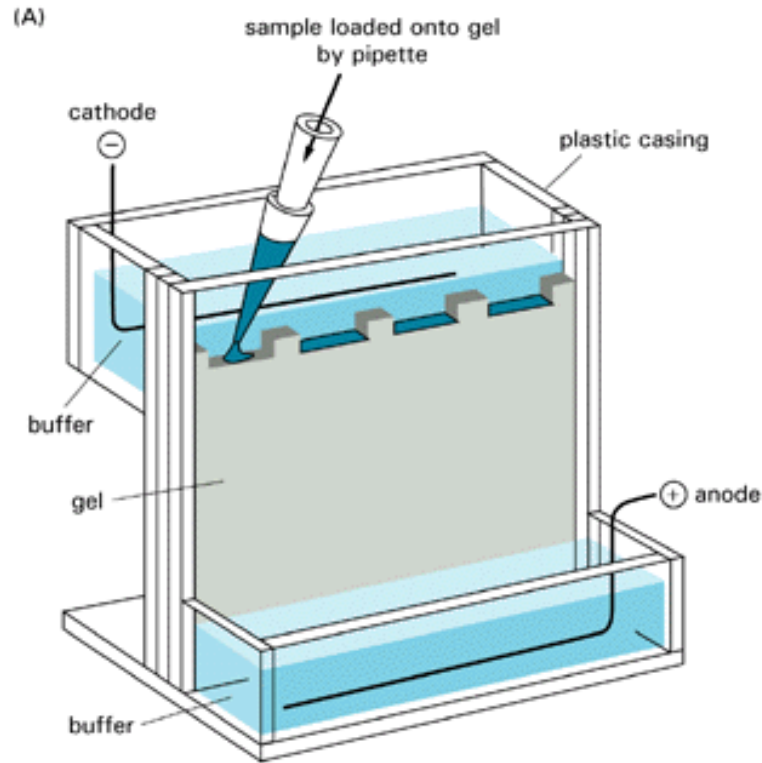
↓ Το SDS προσδένεται στοιχειομετρικά στην πρωτεΐνη



Τα μικρά μόρια κινούνται γρηγορότερα στο πήκτωμα

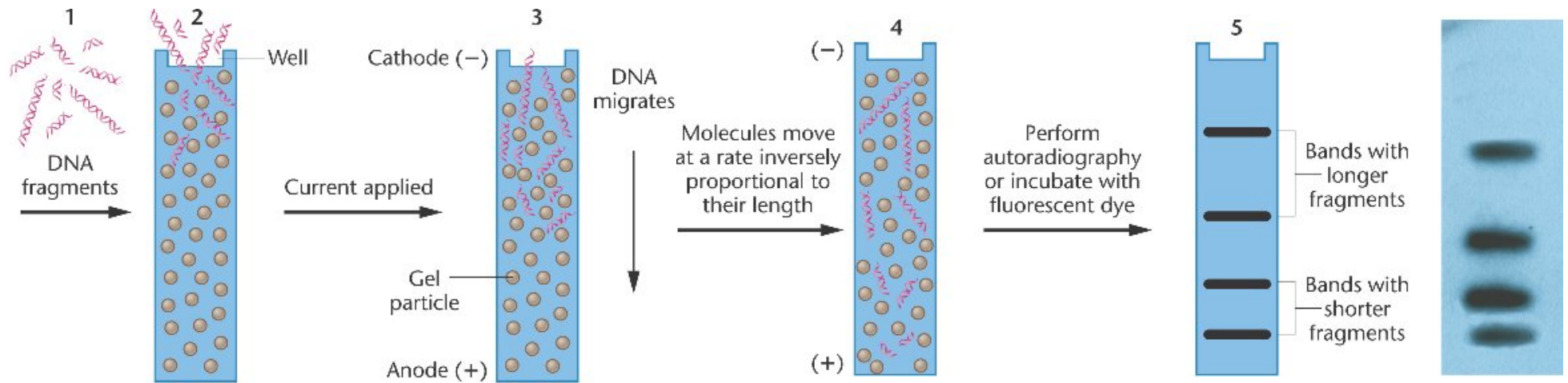
Τα μεγάλα μόρια κινούνται βραδύτερα στο πήκτωμα

# Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες

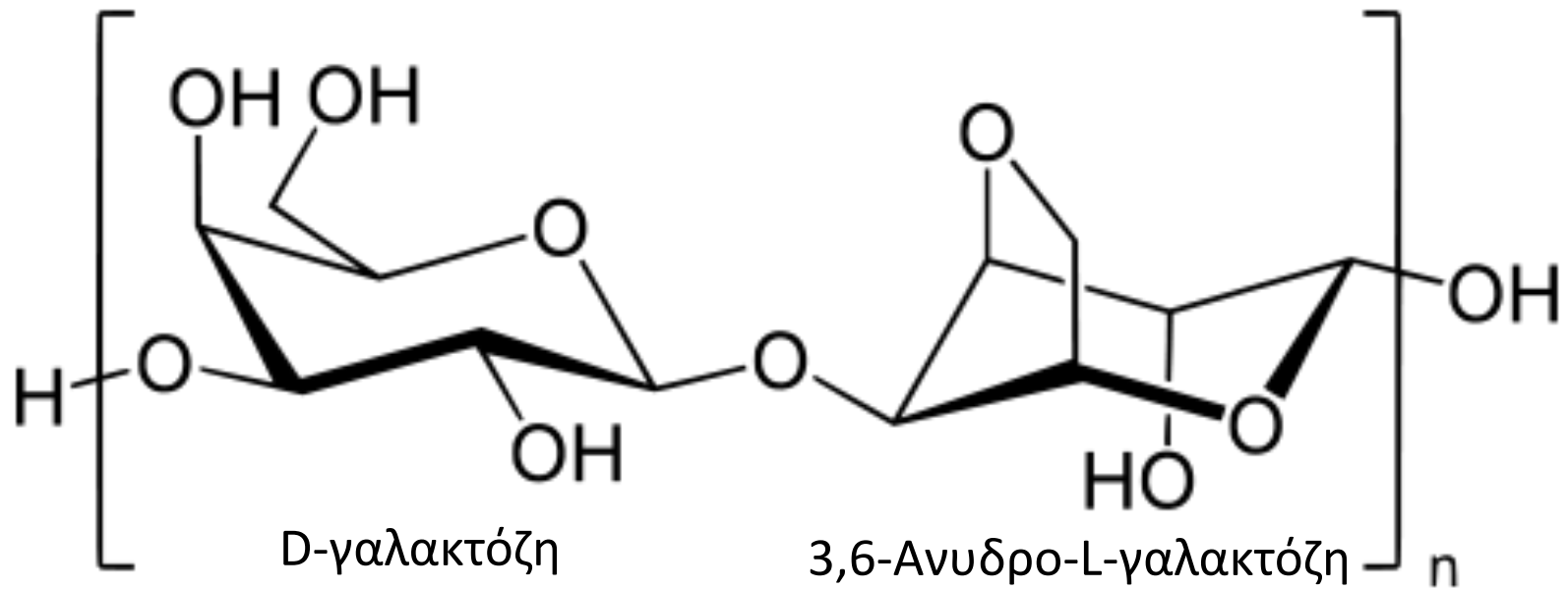




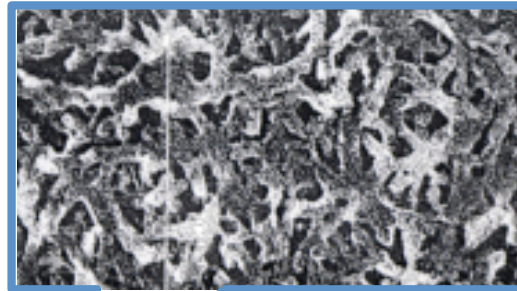
# Ηλεκτροφόρηση DNA και μεγάλων μακρομορίων, >200kDa



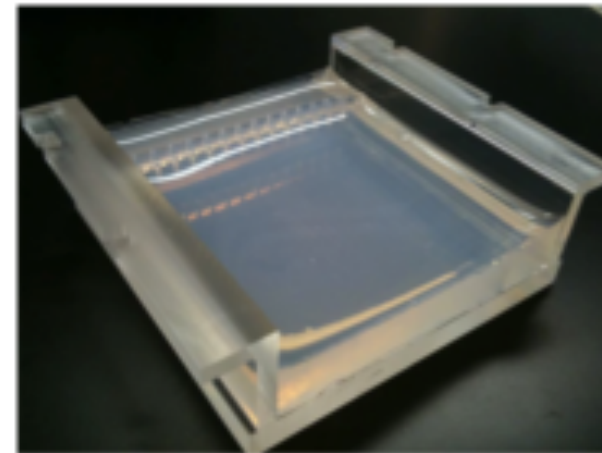
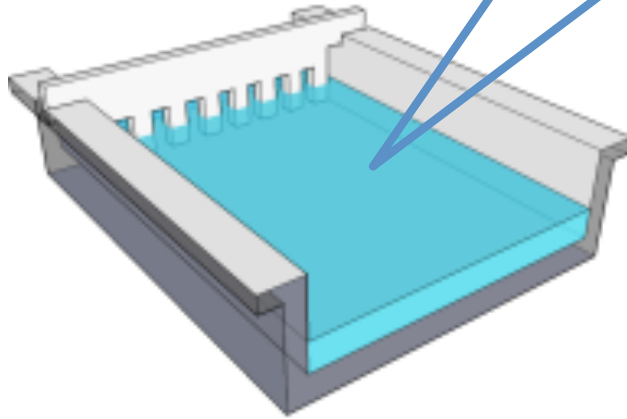
# Πολυμερές αγαρόζης



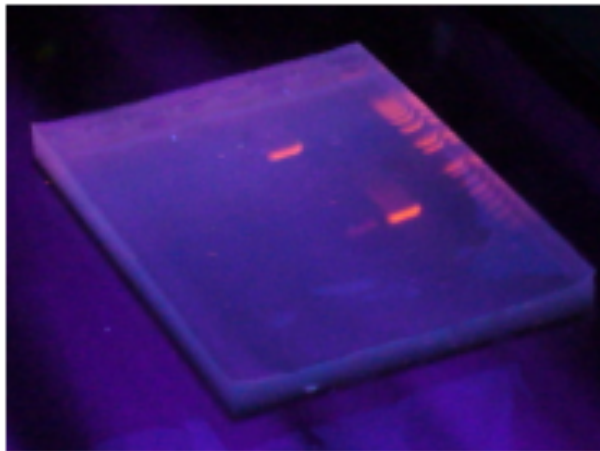
# Πήκτωμα αγαρόζης



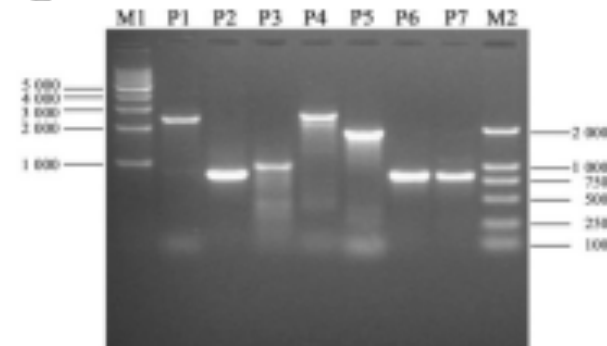
Α



Γ



Δ



# Πήκτωμα αγαρόζης

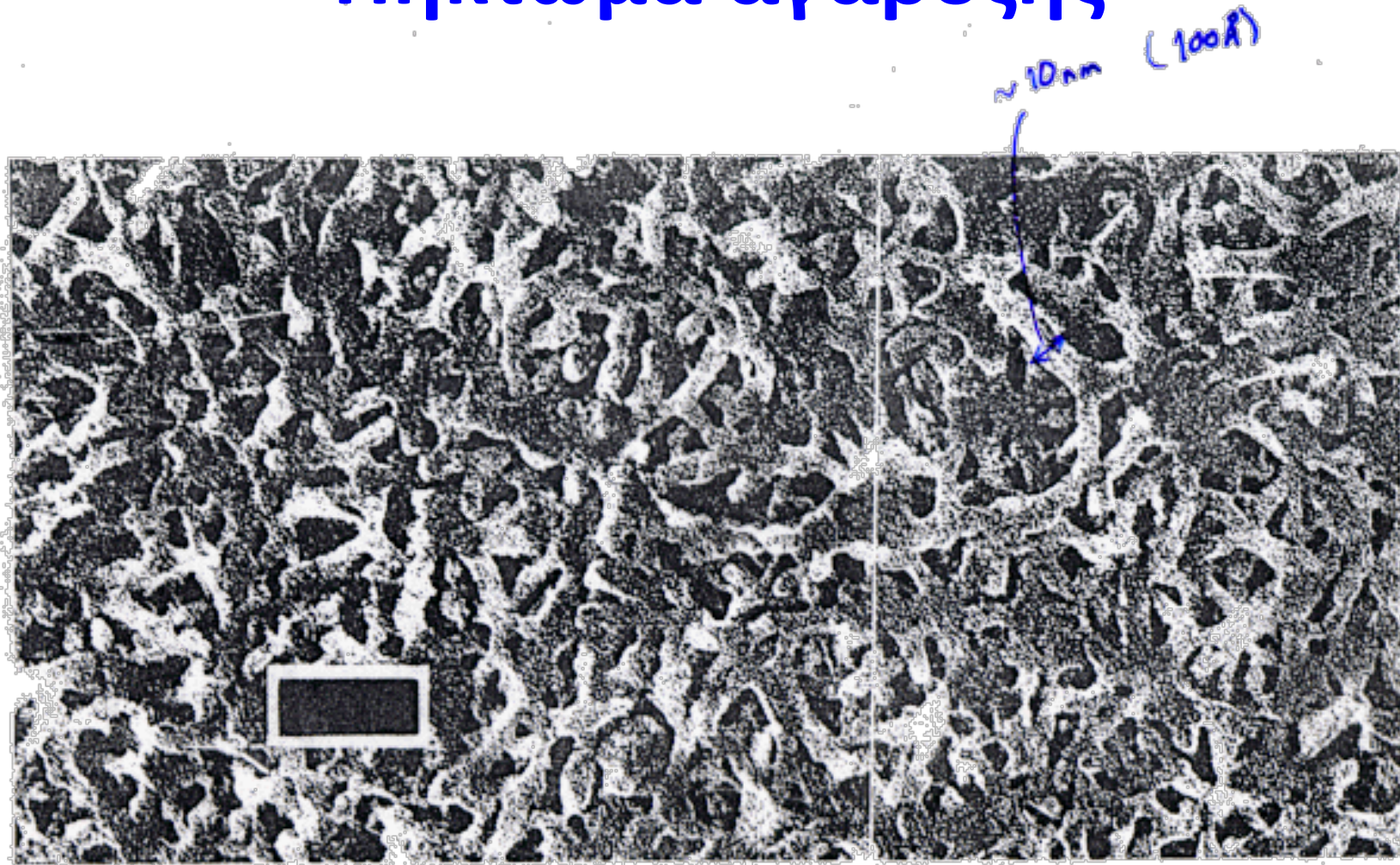
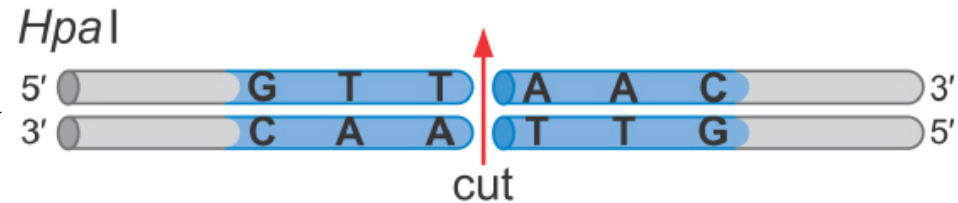


Figure 8.10 Electron micrograph of a portion of a 2% agarose gel,  $1\ \mu\text{m} \times 0.5\ \mu\text{m}$  overall: small black rectangle is  $1000\ \text{\AA} \times 500\ \text{\AA}$ . Individual gel fibers are about  $100\ \text{\AA}$  wide. Courtesy of Sue Whytock and John Finch.

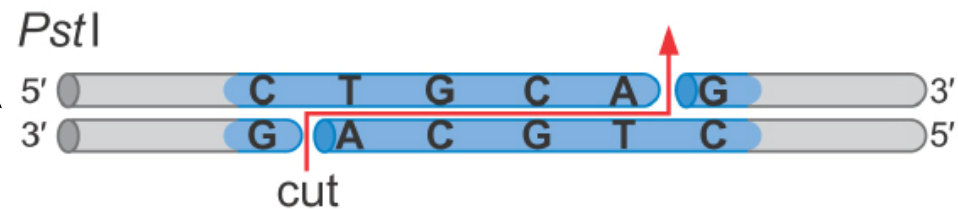
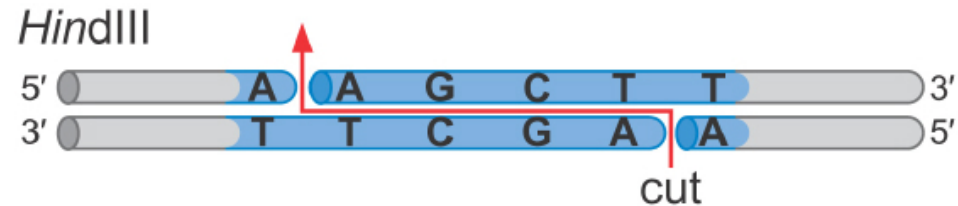
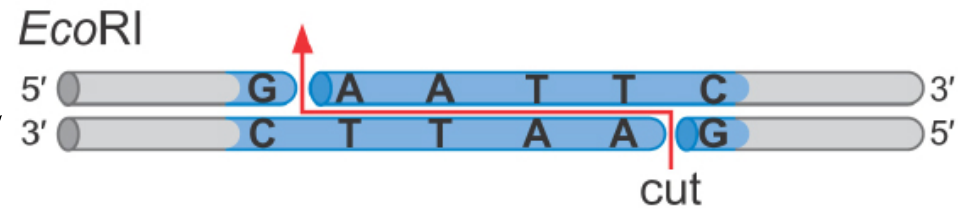
# Ενδονουκλεάσες περιορισμού

## Restriction enzymes

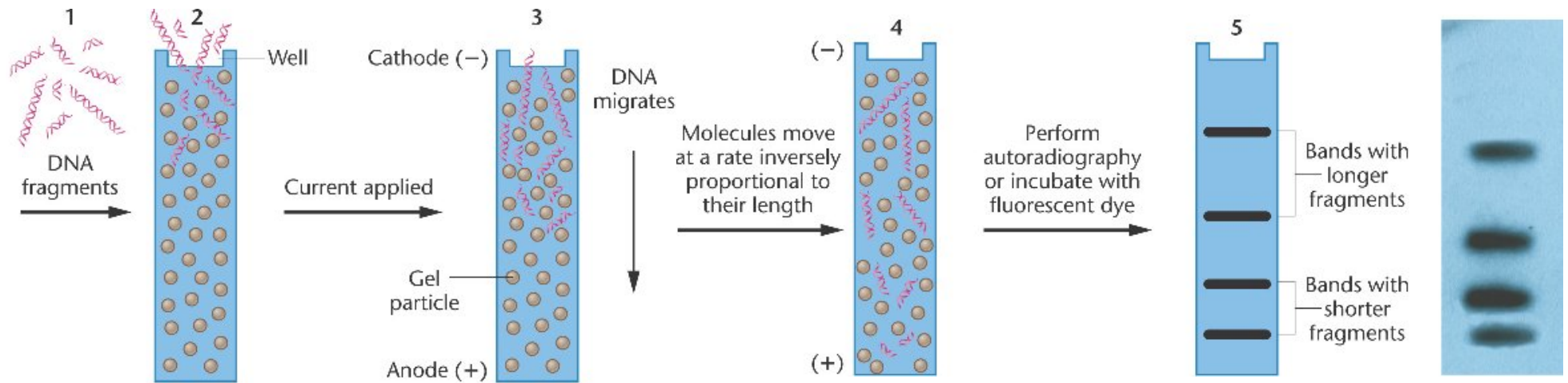
Τυφλά άκρα  
(blunt ends)

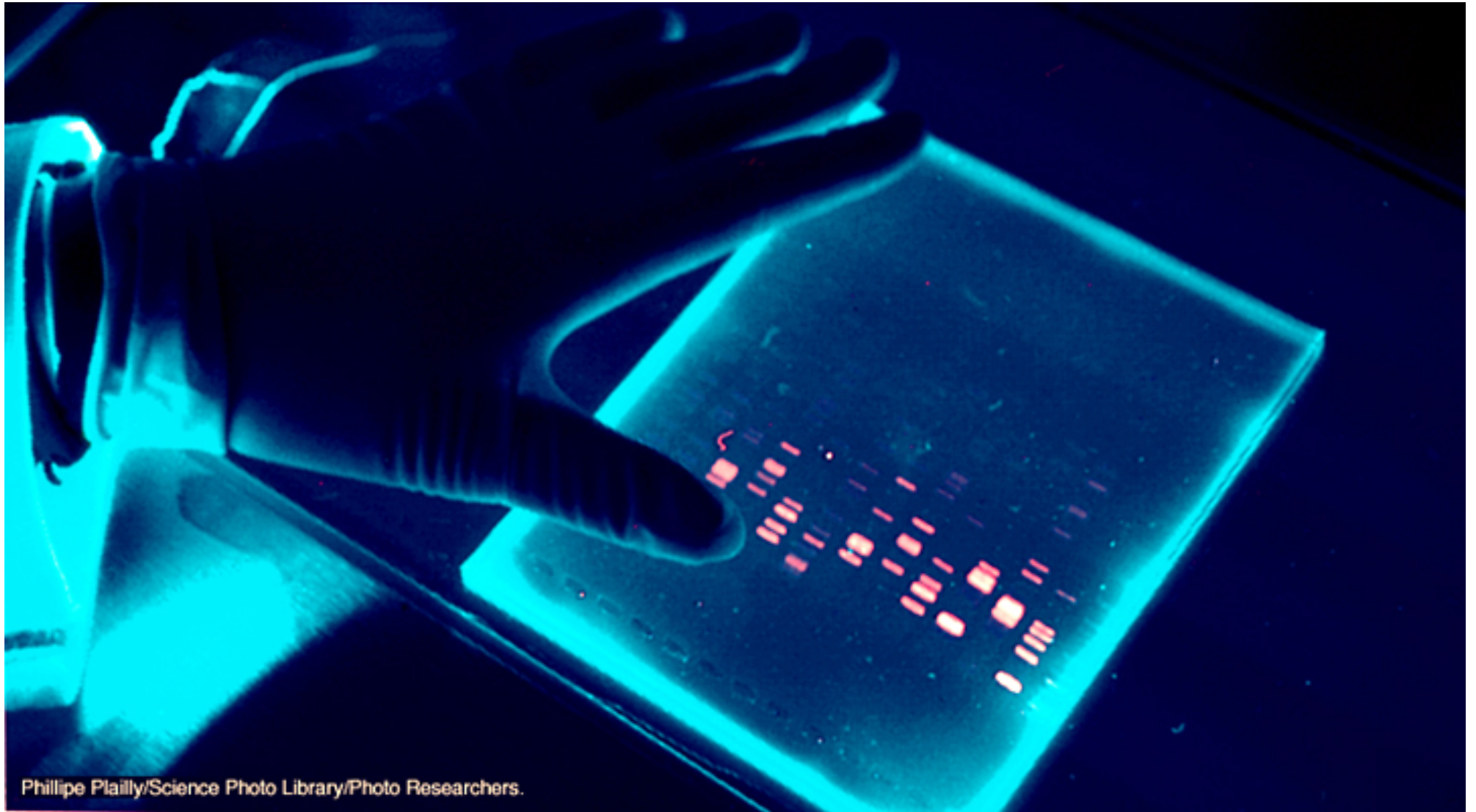


Κολλώδη άκρα  
(sticky ends)



# Ηλεκτροφόρηση DNA και μεγάλων μακρομορίων, >200kDa





Phillipe Plailly/Science Photo Library/Photo Researchers.

# Blotting και στυπώματα

- Η ανάγκη μελέτης της θέσης ειδικών αλληλουχιών στο γονιδίωμα ή του πρότυπου έκφρασης ενός γονιδίου δημιούργησε την ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων για ανίχνευση αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων



# Blotting και στυπώματα

- Η πρώτη τεχνική επινοήθηκε και αναπτύχθηκε το 1975 από τον E. M. Southern και αφορά στη μελέτη αλληλουχιών DNA. Βασίζεται στη μεταφορά τμημάτων DNA σε μεμβράνες και φέρει το όνομά του: *ανάλυση κατά Southern, ή στύπωμα Southern, ή Southern blotting.*
- Ακολούθησε η ανάλυση αλληλουχιών RNA. Κατά «γεωγραφική» αναλογία και εν είδει λογοπαιγνίου, η τεχνική ονομάστηκε *ανάλυση κατά northern, ή στύπωμα northern, ή northern blotting.*
- Τέλος, η ανάλυση πρωτεϊνών με μεταφορά από πηκτώματα σε μεμβράνες, ονομάστηκε *ανάλυση κατά western, στύπωμα western, ή western blotting.*

# Blotting και στυπώματα

- Αφότου διαχωριστούν τα νουκλεϊκά οξέα από τις πρωτεΐνες, μπορούν να αναλυθούν, και τα μεν και οι δε, σε ειδικά πηκτώματα (αγαρόζης, πολυακρυλαμιδίου).
- Κατόπιν μεταφέρονται με διάφορους τρόπους από τα πηκτώματα σε ειδικές μεμβράνες προκειμένου να **μονιμοποιηθούν/ακίνητοποιηθούν** (immobilization). Η μονιμοποίηση εξυπηρετεί στο να παρέχει μια σταθερή βάση (συνήθως μεμβράνη) για περαιτέρω ανάλυση.
- Με τη διαδικασία αυτή της **μεταφοράς** (transfer) και **αποτύπωσης** (blotting) σε μεμβράνες δημιουργούνται τα **στυπώματα**.



**RNA**

**N**



**W**

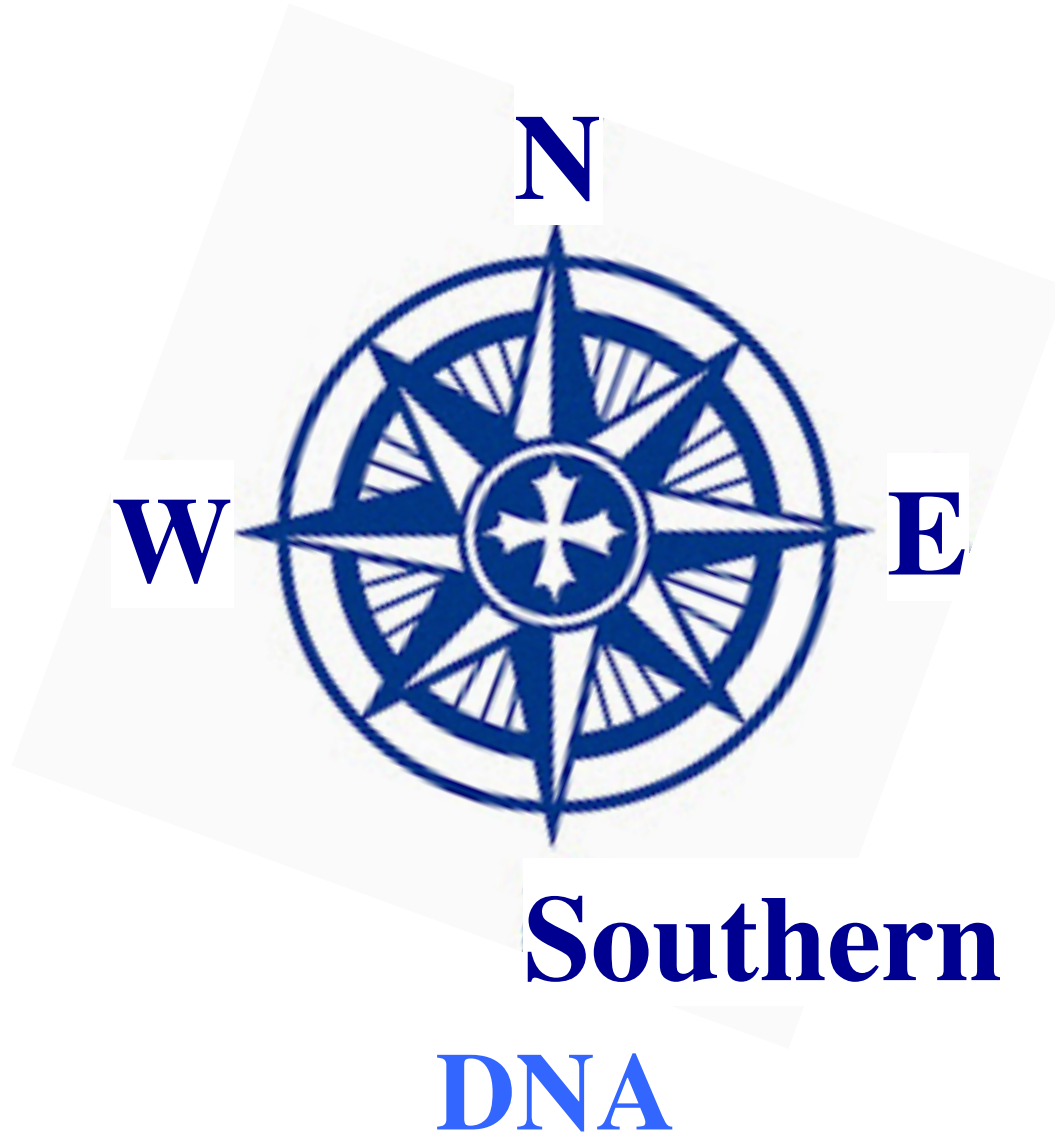


**E**

**S**

**DNA**





# Ανάλυση κατά Southern



**Edwin M. Southern**

University of Edinburgh (1967)

University of Oxford (1985)



**Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments  
Separated by Gel Electrophoresis**

E. M. SOUTHERN

*J. Of Mol. Biol.* (1975) **98**, 503-517

# DNA και πήκτωμα αγαρόζης

“smear” of  
digested DNA



Agarose gel

- Το γενομικό DNA είναι πολύ μεγάλο για να διέλθει σε ένα πήκτωμα αγαρόζης.

# Διαχωρισμός δείγματος – Ανάλυση κατά Southern

“smear” DNA  
που έχει υποστεί πέψη



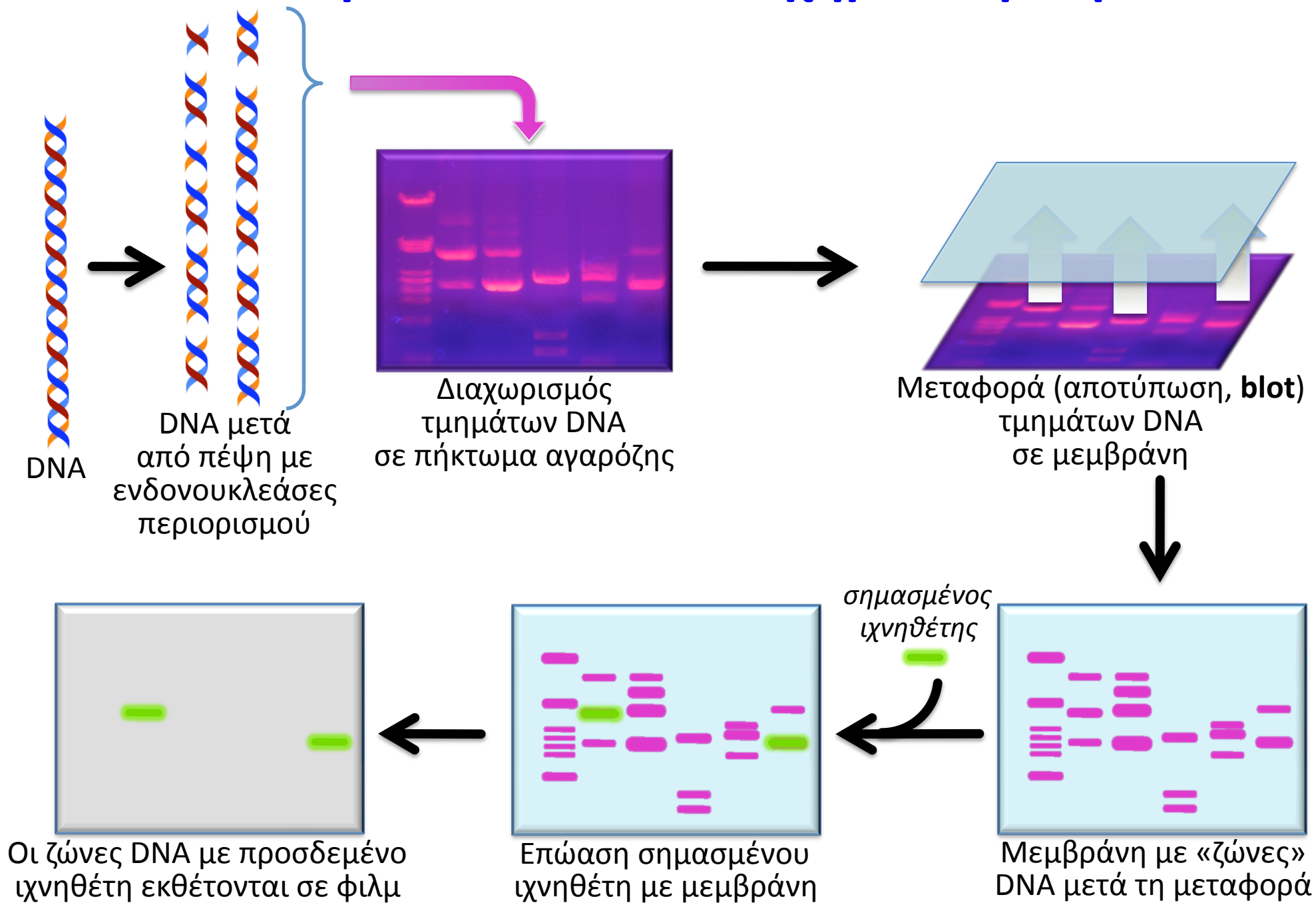
Agarose gel

- Το γενομικό DNA είναι πολύ μεγάλο για να εισέλθει σε ένα πήκτωμα αγαρόζης
- Χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού για να κοπεί σε μικρότερα κομμάτια (δημιουργεί ειδικές κατατομές αλληλουχίων – αυτές αλλάζουν παρουσία μεταλλάξεων)
- Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται: 1X TAE ή 0.5X TBE

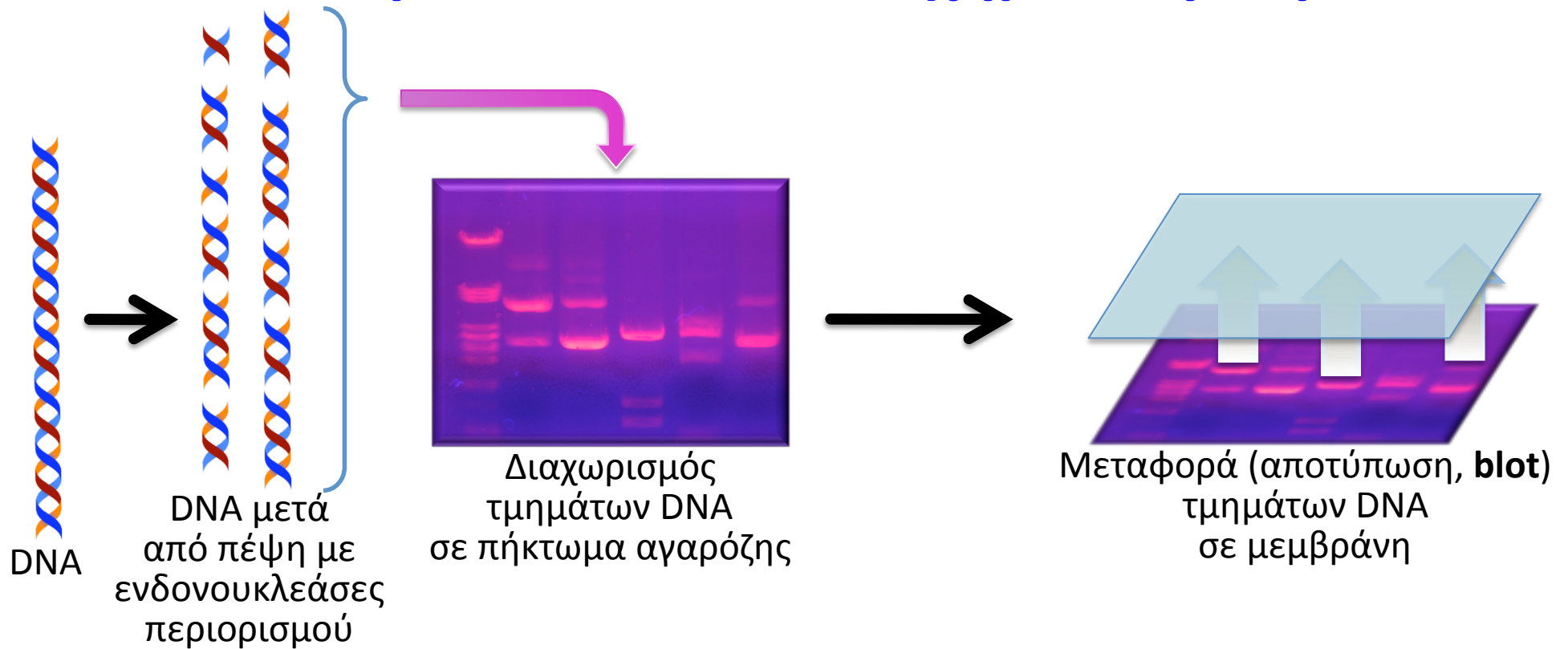
TAE: Tris-Acetate-EDTA; TBE: Tris Borate EDTA



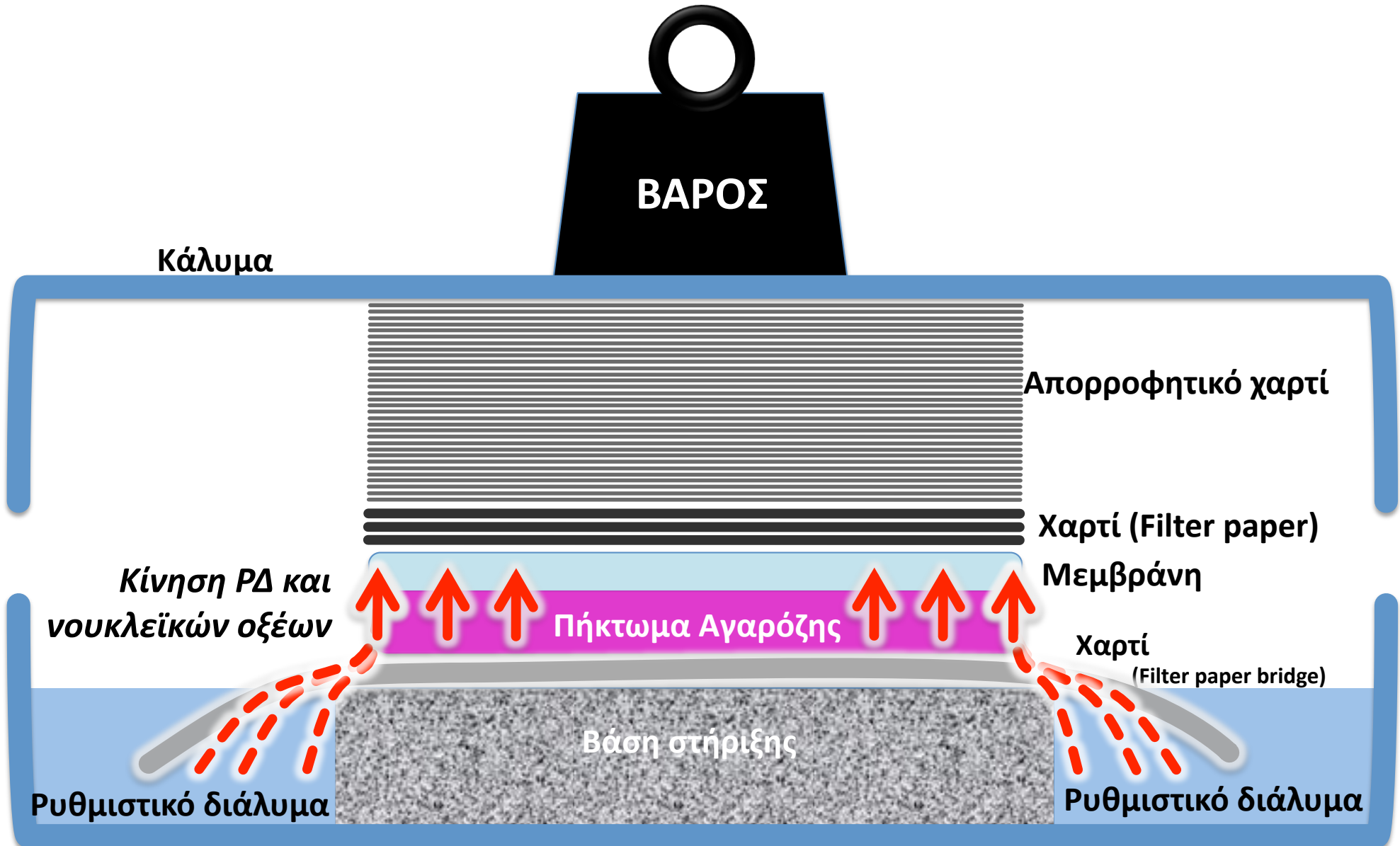
# Ανάλυση κατά Southern: σχηματική πορεία



# Ανάλυση κατά Southern: σχηματική πορεία

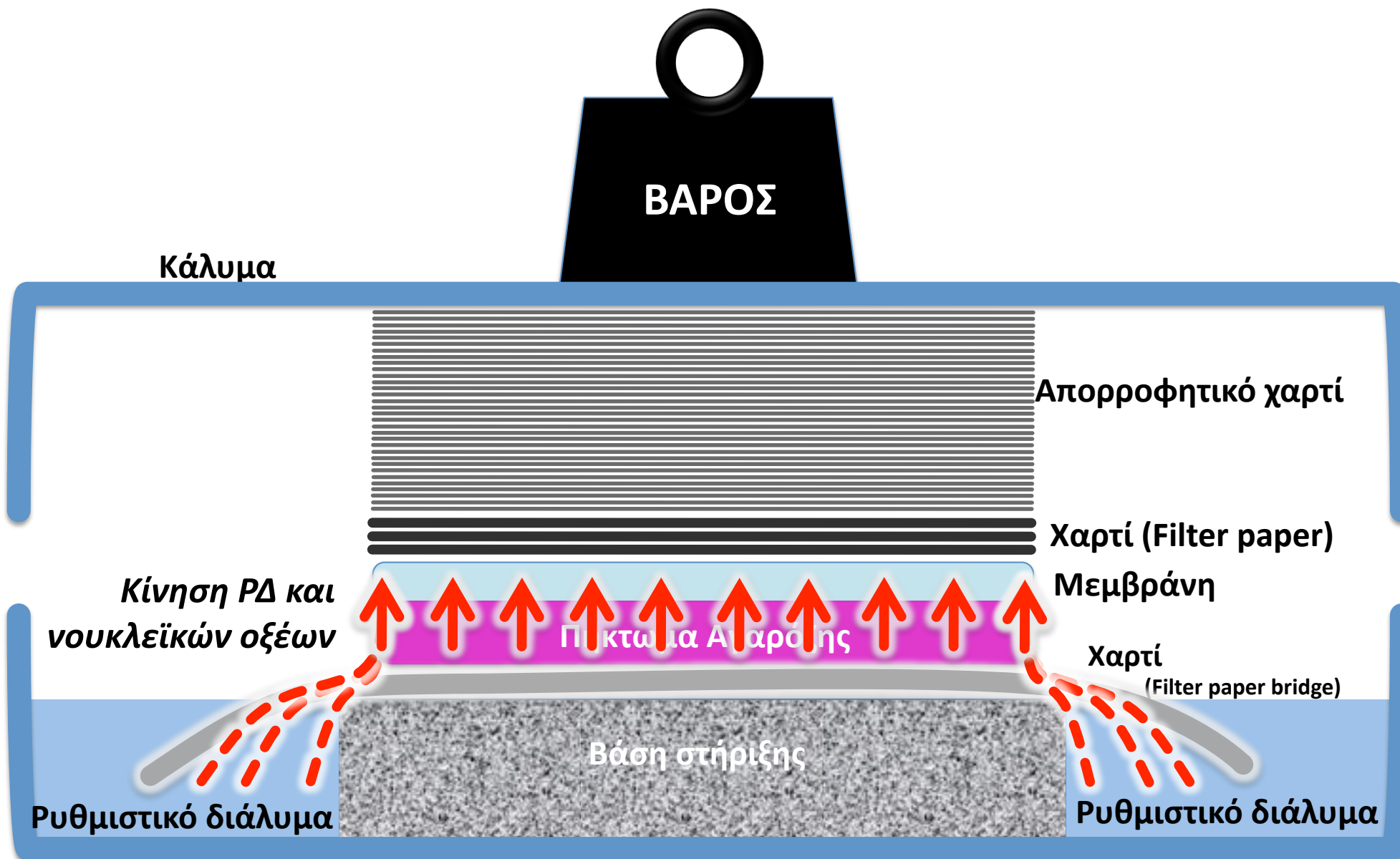


# Μεταφορά σε μεμβράνη



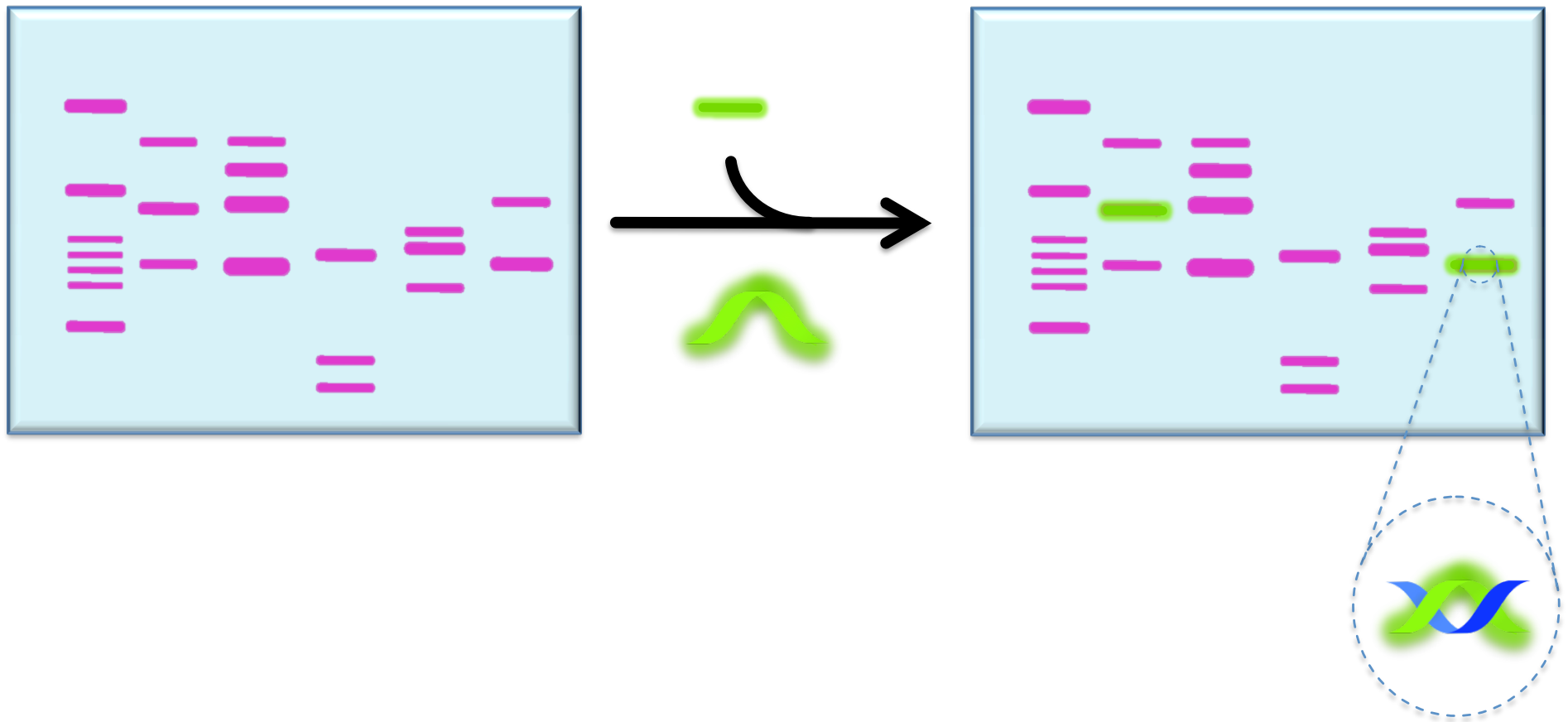
Buffer: **SSC**, Saline-Sodium Citrate

# Μεταφορά σε μεμβράνη



Buffer: **SSC**, Saline-Sodium Citrate

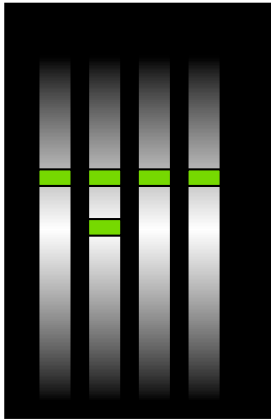
# Ανάλυση κατά Southern: η επώαση με ιχνηθέτη



# Υβριδισμός DNA για ταυτοποίηση ειδικών (specific) μορίων DNA

- Υβριδισμός:  
η αλληλεπίδραση βάσει συμπληρωματικότητας  
μονόκλωνων πολυνουκλεοτικδίων από δύο  
διαφορετικές πηγές

# Υβριδισμός



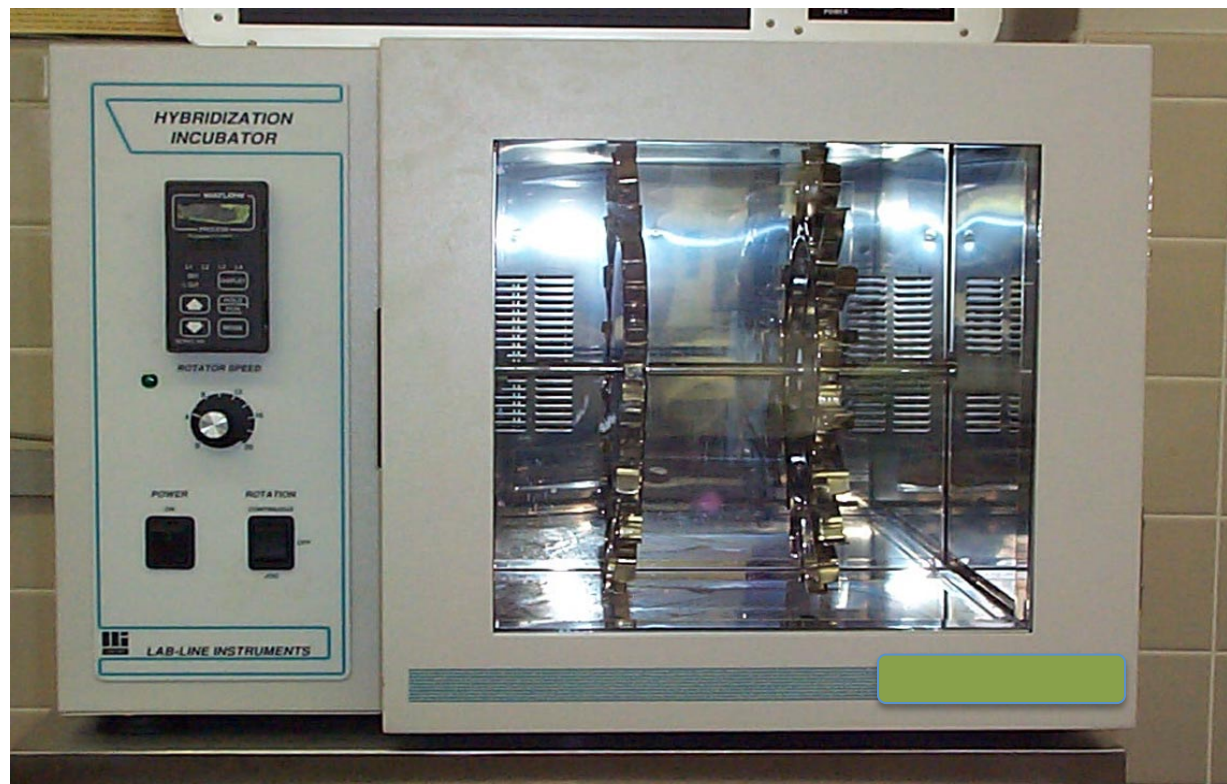
Hybridize probe  
to membrane

## Important points

Hybridization conditions

- **Prehybridization**
  - The blot is mostly empty space – your probe will easily bind to this empty space – NOT GOOD!
  - Prehybridization fills this empty space with non-specific nucleic acid – usually salmon sperm DNA (if you're studying salmon or a related fish, you will need to find another blocking agent!)
  - Usually 1 hour at the hybridization temperature is sufficient
  - Hybridization usually goes overnight
  - Usually done in a hybridization oven
- **What's in the hybridization solution?**
  - **Formamide** – displaces water; “opens” nucleic acid
  - **Denhardt's** reagent – blocking solution (BSA, PVP, Ficoll)
  - **Dextran sulfate** – artificially increases probe concentration
  - **SDS** – alleviates hydrophobic interaction – 2 nucleic acids can stick together simply through hydrophobic interactions
- **Hybridization solutions can be purchased – much easier and more cost effective than making all this stuff yourself!**

# Κλίβανος υβριδισμού





# Υβριδισμός

## Stringency

- High stringency – Probe won't bind anything
- Low stringency – Probe binds everything
- Things that affect stringency:
  - Salt (NaCl) concentration (lower = high stringency)
  - Formamide concentration (higher = high stringency)
  - Temperature of incubation (higher = high stringency)
- Finding the correct stringency conditions can vary from probe to probe
- Using a commercially available hyb solution, a good place to start is:
  - 68° for an RNA:RNA hybridizations
  - 50° for DNA:RNA hybridizations
  - 42° for DNA:DNA hybridizations
- Post hybridization washes
  - Gets rid of excess unbound probe
  - Contains low salt and high detergent

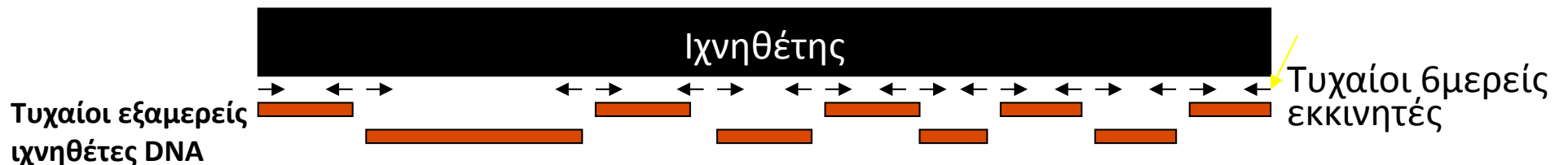
# Ιχνηθέτης, probe

- Ενα ειδικό τμήμα DNA ή RNA που μπορεί να **υβριδίζει** με το προς ανάλυση δείγμα DNA ή RNA.
- Προέλευση ιχνηθέτη  
    προϊόν σύνθεσης PCR,  
    κλωνοποίηση γενομικού DNA ή cDNA, καθώς και RNA.
- Ο ιχνηθέτης πρέπει να σημανθεί πριν τον υβριδισμό με:
  - ραδιενεργό  $^{32}\text{P}$
  - μη ραδιενεργή βιοτίνη, διγοξυγενίνη, φθορίζουσα χρώση
- Πρέπει να είναι μονόκλωνος κατά τον υβριδισμό

# Σύνθεση ιχνηθετών

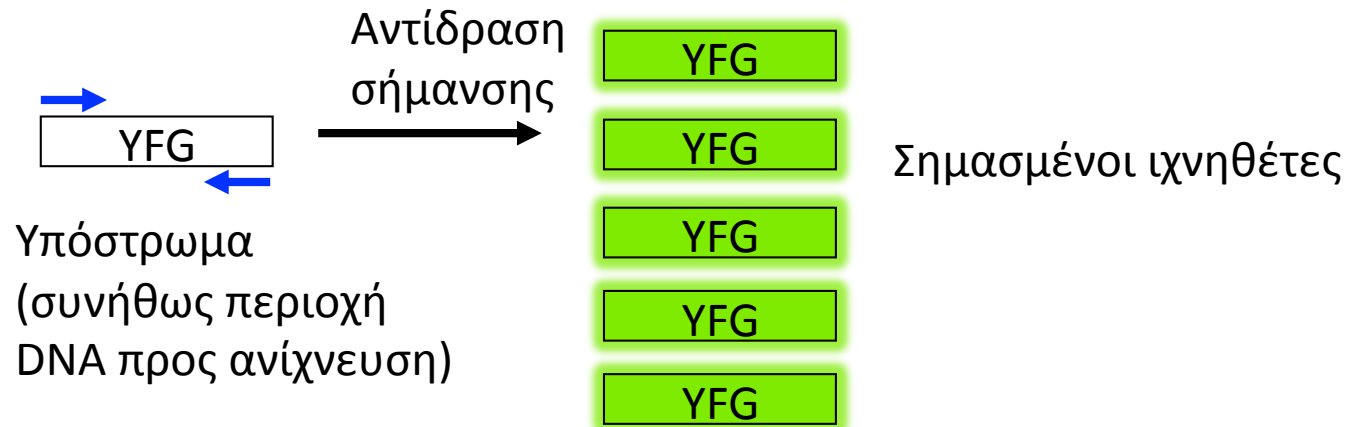
- Κοινές μέθοδοι σήμανσης
  - Nick translation
  - Σήμανση μέσω PCR
  - Τυχαία σήμανση 6μερών – η πιο εύκολη και ευρέως χρησιμοποιούμενη
  - Η καθαρότητα του ιχνηθέτη εξαρτάται από αυτή του εκμαγείου

***Καθαρό εκμαγείο = καθαρός ιχνηθέτης = καθαρά αποτελέσματα!***



# Σύνθεση ιχνηθέτη

- Ο ιχνηθέτης είναι ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA που είναι κατάλληλα σημασμένη ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί.



Εκκινητές

YFG, your favorite gene (η αλληλουχία του DNA που μας ενδιαφέρει)

# Μέθοδοι σήμανσης

- Σύνθεση νέου DNA παρουσία σημασμένων πρόδρομων συστατικών
- Προσθήκη σήμανσης στα άκρα ενός μορίου DNA.

# Δύο μέθοδοι σήμανσης

- Ραδιενεργός σήμανση
  - $^{32}\text{P}$
- Μη ραδιενεργή
  - Digoxigenin
  - Biotin

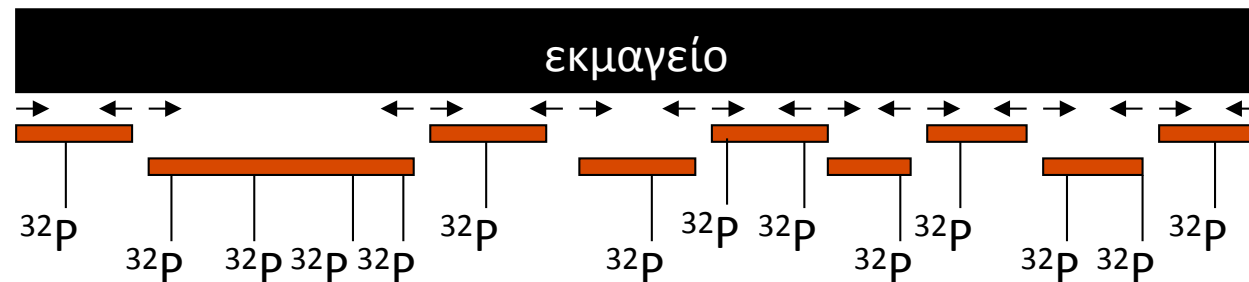
# Μέθοδοι σήμανσης

- **Ραδιενεργός σήμανση**

- $^{32}\text{P}$

- Μια φωσφορική ομάδα στα περισσότερα dCTPs είναι σημασμένη με ραδιενέργεια ( $^{32}\text{P}$ )
    - Τα ραδιενεργά β-σωμάτια ανιχνεύονται με ένα φιλμ ακτίνων X
    - Πλεονεκτήματα
      - Ευαισθησία
      - Ευκολία σήμανσης
    - Μειονεκτήματα
      - Πολλά μέτρα ασφαλείας/Lots of safety precautions required
      - Ασταθή μόρια
      - Απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι ανίχνευσης
      - Κόστος

Τυχαίοι διμερείς  
ιχνηθέντες που  
αναγνωρίζουν το  
ΥFG (από εκμαγείο)

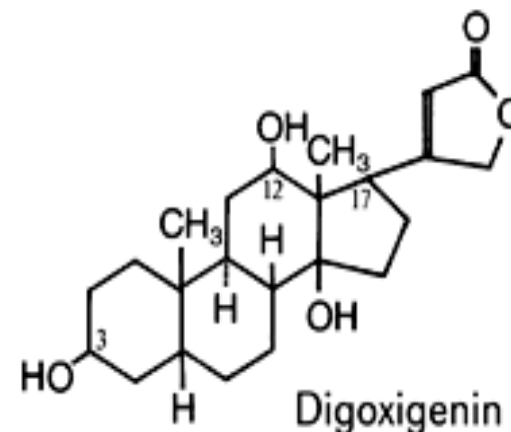


# Μέθοδοι σήμανσης

- **Μη ραδιενεργός σήμανση**

- Διγοξυγενίνη (Digoxigenin, DIG)

- Η DIG συνδέεται χημικά στο dUTP – Ενσωματώνεται στα τμήματα που ενισχύονται από τα τυχαία δμερή
- Χρήση αντισώματος για να ανιχνευθεί η DIG μετά τον υβριδισμό (όπως θα δούμε και στην ανάλυση κατά “Western”)



## Πλεονεκτήματα

Ασφάλεια

Μικροί χρόνοι ανίχνευσης –συνήθως δευτερόλεπτα έως λεπτά

Σταθερότητα – Ο ιχνηθέτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μήνες

Κόστος – Μακροπρόθεσμα, πολύ οικονομικός

## Μειονεκτήματα

Χαμηλότερη ευαισθησία

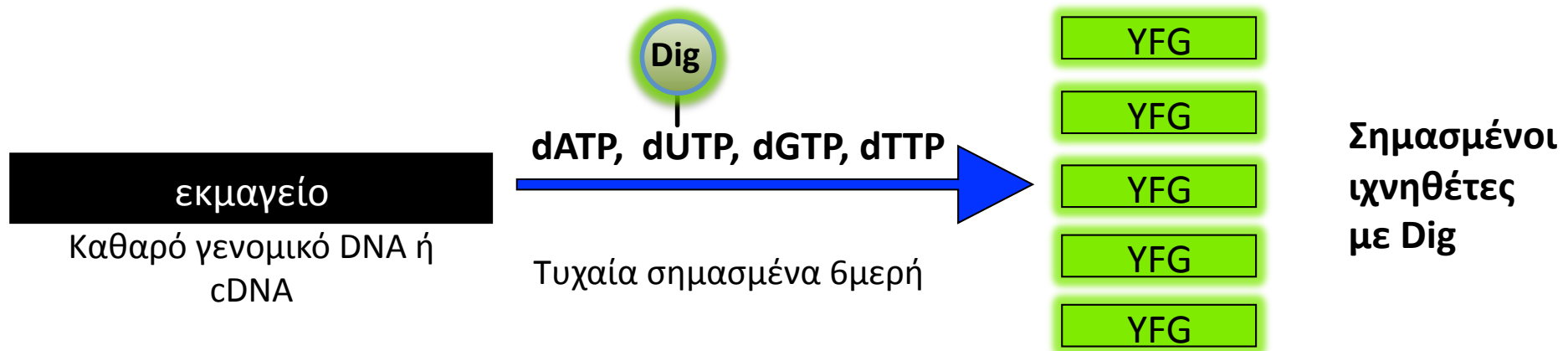
Η ανίχνευση απαιτεί επιπλέον βήματα

Πρέπει να απομακρυνθεί ο ιχνηθέτης για επανάληψη της διαδικασίας



# Αντίδραση σήμανσης

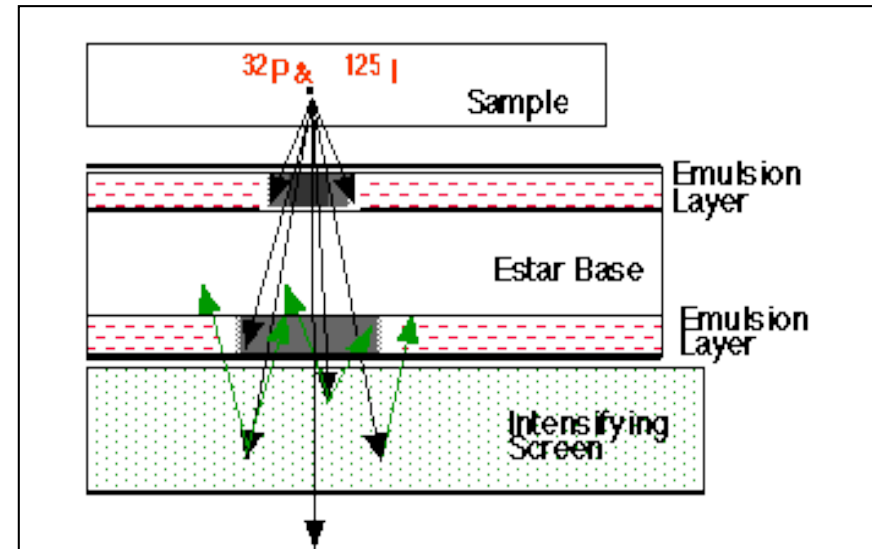
- Η μέθοδος σύνθεσης σημασμένων ιχνηθετών με  $^{32}\text{P}$  και Dig είναι ίδια



- Καθαρισμός σημασμένων ιχνηθετών από μη ενσωματωμένα μόρια μέσω κατακρίμνησης ή στήλης καθαρισμού
- Ποσοτικοποίηση ποσοστού σήμανσης
  - Απαραίτητη ώστε να μην προστεθεί ούτε μεγάλη ούτε μικρή ποσότητα «σήμανσης»...
- $^{32}\text{P}$  –ιχνηθέτης: - 1-5 ng/ml
- Dig –ιχνηθέτης: 20-50 ng/ml

# Ανίχνευση

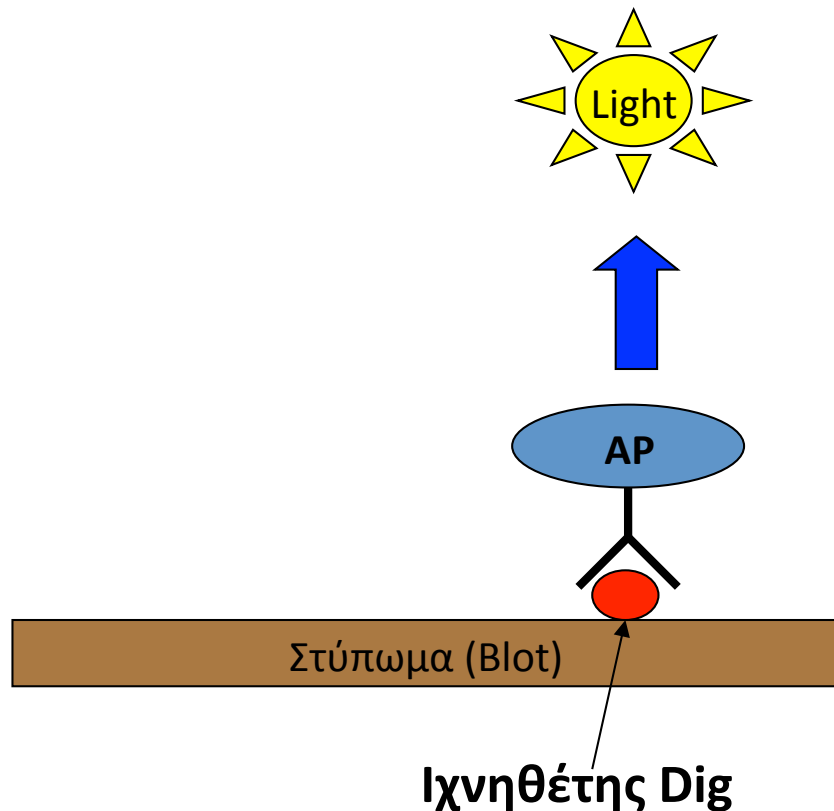
- $^{32}\text{P}$  ιχνηθέτης: έκθεση του στυπώματος (blot) σε φίλμ με μια ειδική επιφάνεια/οθόνη που ενισχύει το σήμα σε χαμηλή θερμοκρασία (συνήθως  $-80^{\circ}\text{C}$ )
- DIG-ιχνηθέτες απαιτούν μερικά παραπάνω βήματα για ανίχνευση



# Ανιχνεύοντας την DIG

Αντίσωμα έναντι της Dig συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (AP)

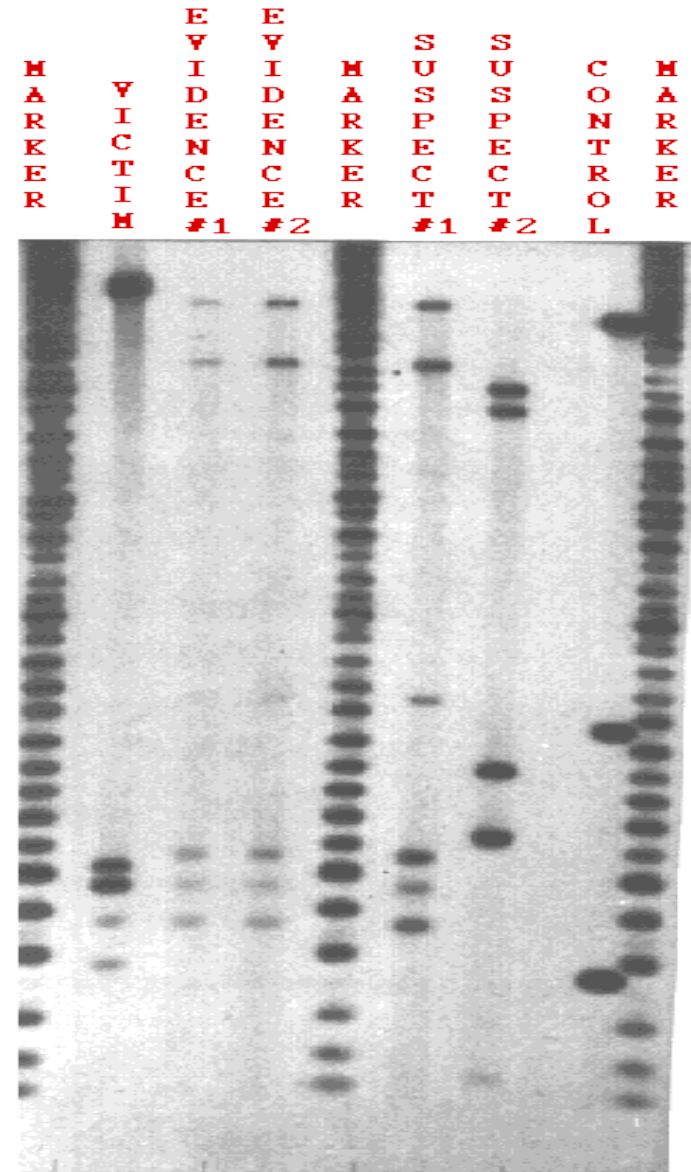
Πρόσδεση σε μεμβράνη Nylon



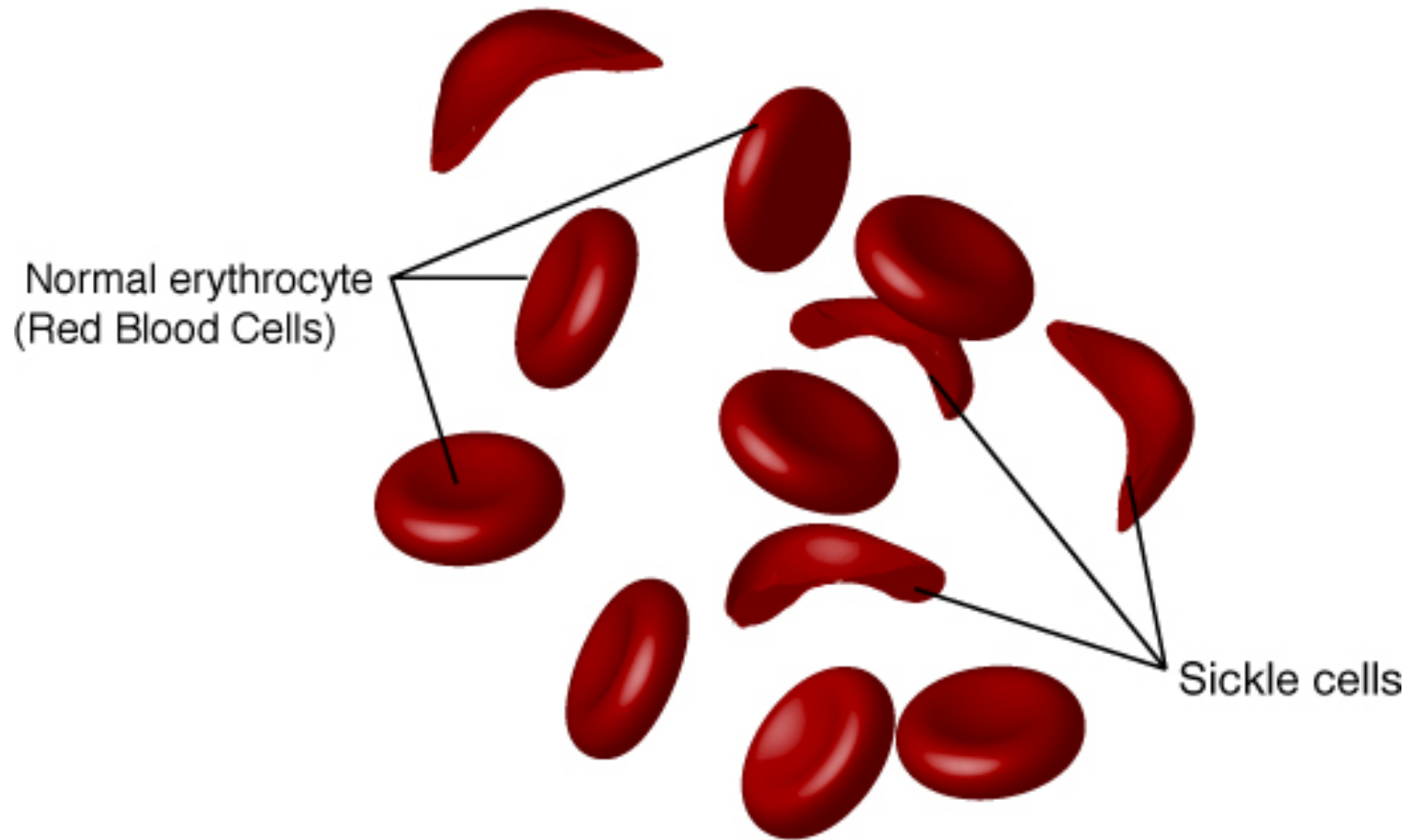
- Αρχικά γίνεται κάλυψη όλων των θέσεων πρόσδεσης με πρωτεΐνη (συνήθως BSA), ώστε να περιοριστεί η μη – ειδική σύνδεση (δηλαδή το αντίσωμα να «πιάσει» μόνο στο DIG, και όχι σε άλλες μη – ειδικές θέσεις – οι οποίες έχουν καλυφθεί από την BSA).
- Επώαση με αντίσωμα έναντι της DIG.
- Εκπλύσεις
- Η AP αποφωσφορυλιώνει το υπόστρωμά της (AMPPD), μια αντίδραση που εκλύει φως στα 477nm
- Το φως ανιχνεύεται από το φιλμ
- Η διαδικασία γίνεται σε ειδική κασέτα σε σκοτεινό θάλαμο

# Εφαρμογές των στυπωμάτων Southern

- Genotyping
  - Is your knockout really a knockout?
  - Genetic deficiency mapping
  - SNP mapping (DNA “fingerprinting”)
- Variations include FISH



# Δρεπανοκυτταρική αναιμία



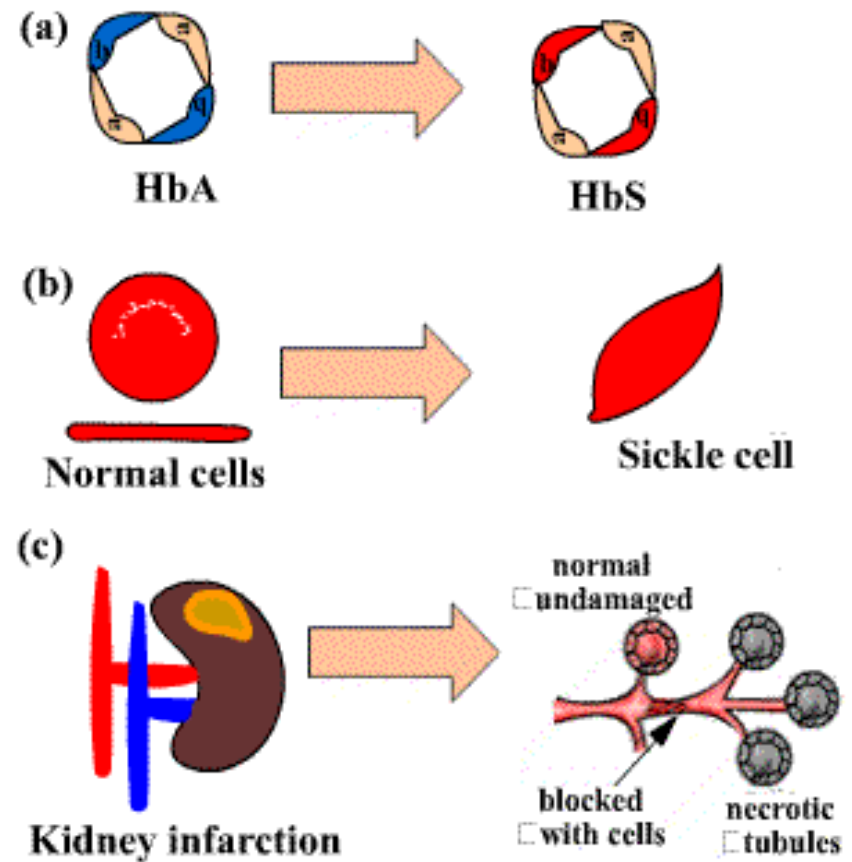
# Δρεπανοκυτταρική αναιμία

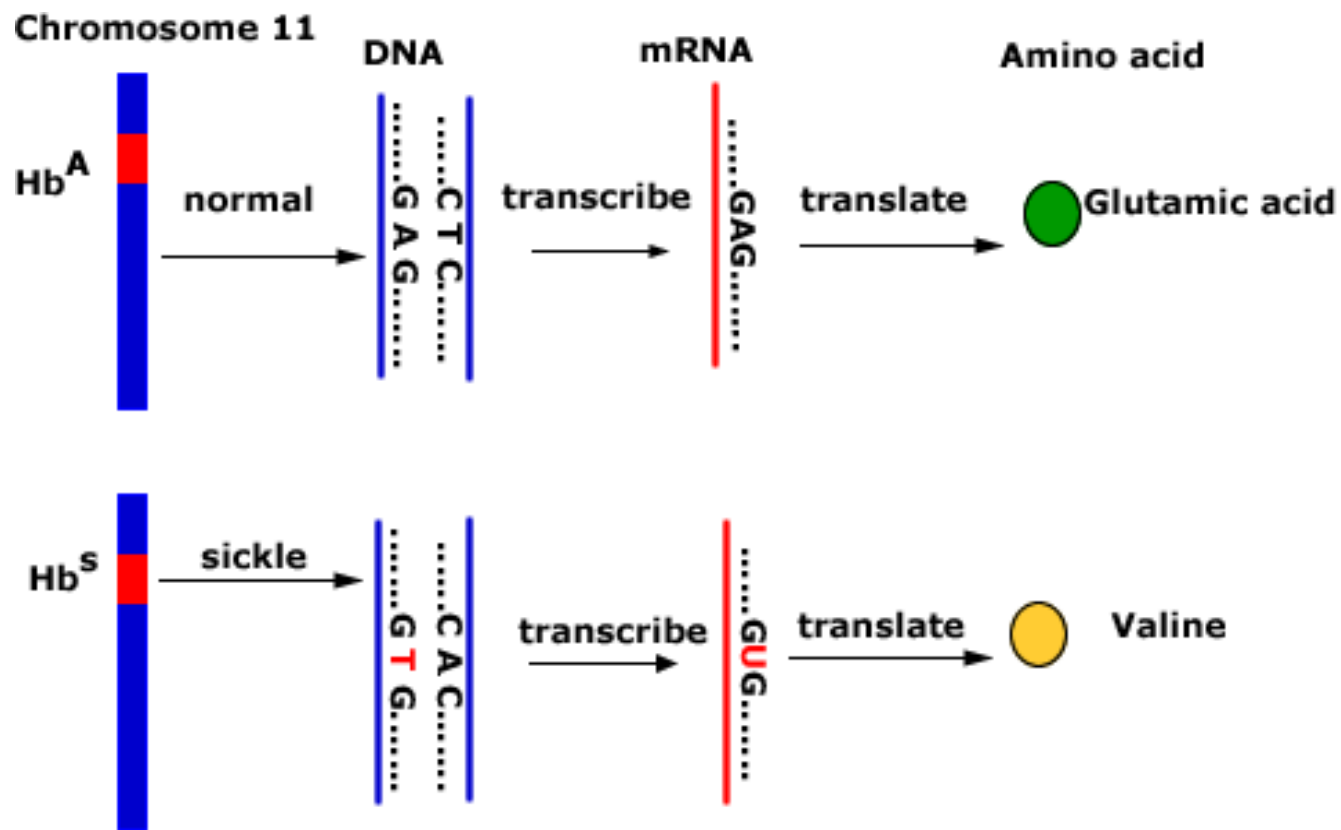


# Δρεπανοκυτταρική αναιμία

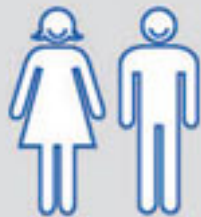
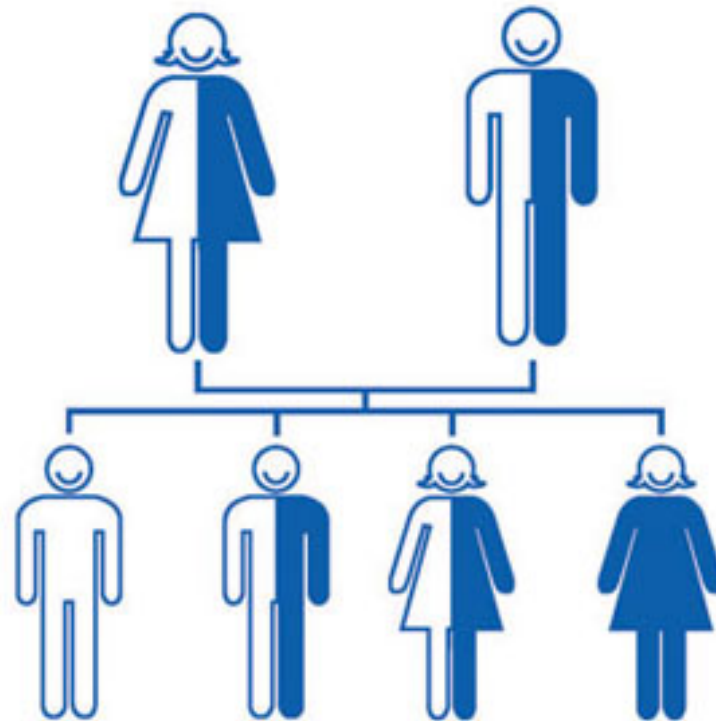


Photo: University of Michigan









Typical  
(No Blood Disorder)



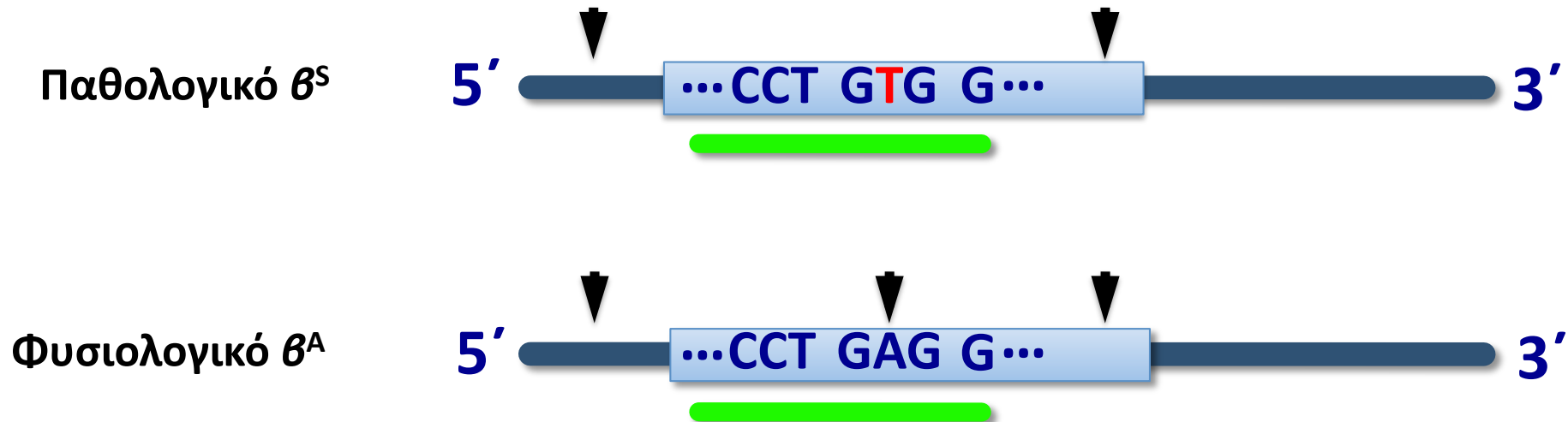
Sickle Cell Trait



Sickle Cell Disease

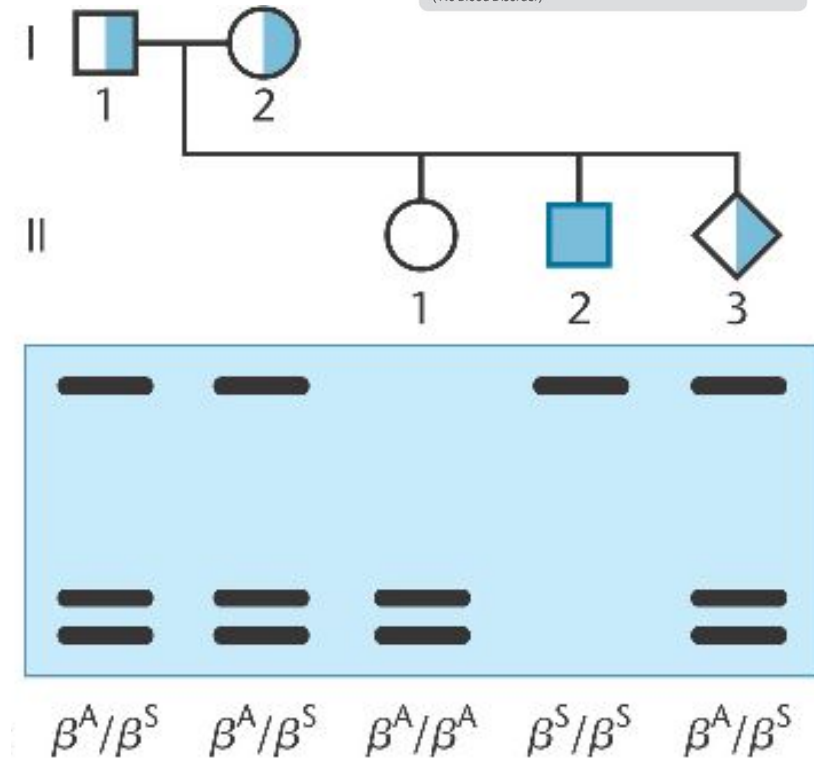
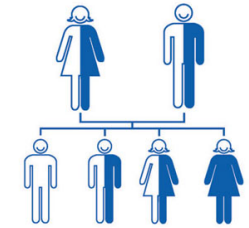
<http://www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/traits.html>

# Δρεπανοκυτταρική αναιμία το γονίδιο της β σφαιρίνης



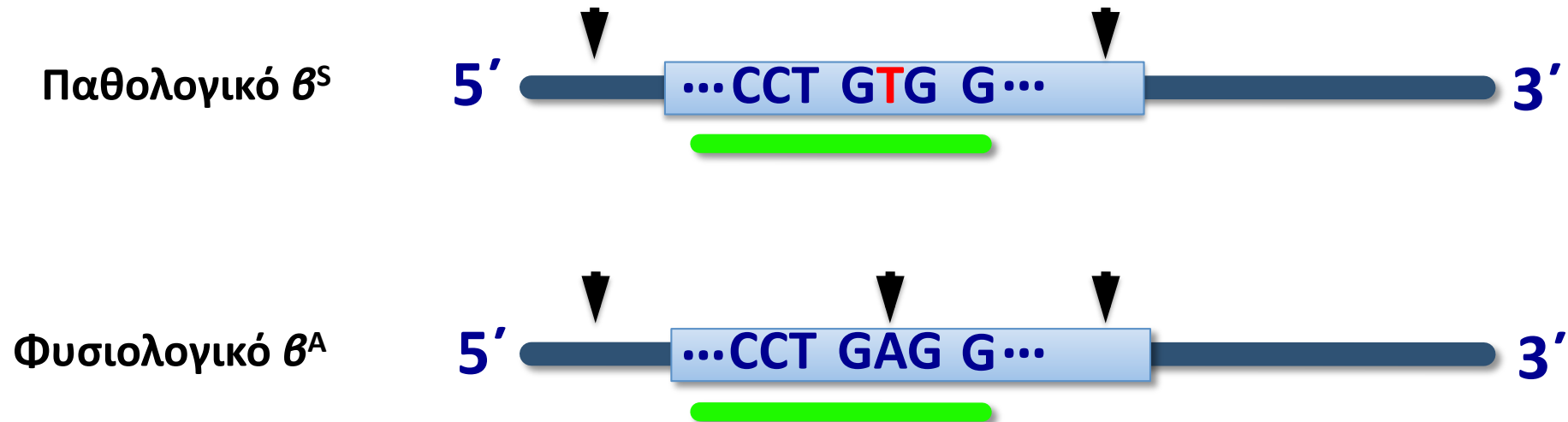
Θέση περιορισμού MstII    CCT NAG G...  
Θέση κοπής MstII        ▼  
Ιχνηθέτης                 

# Δρεπανοκυτταρική αναιμία το γονίδιο της β σφαιρίνης



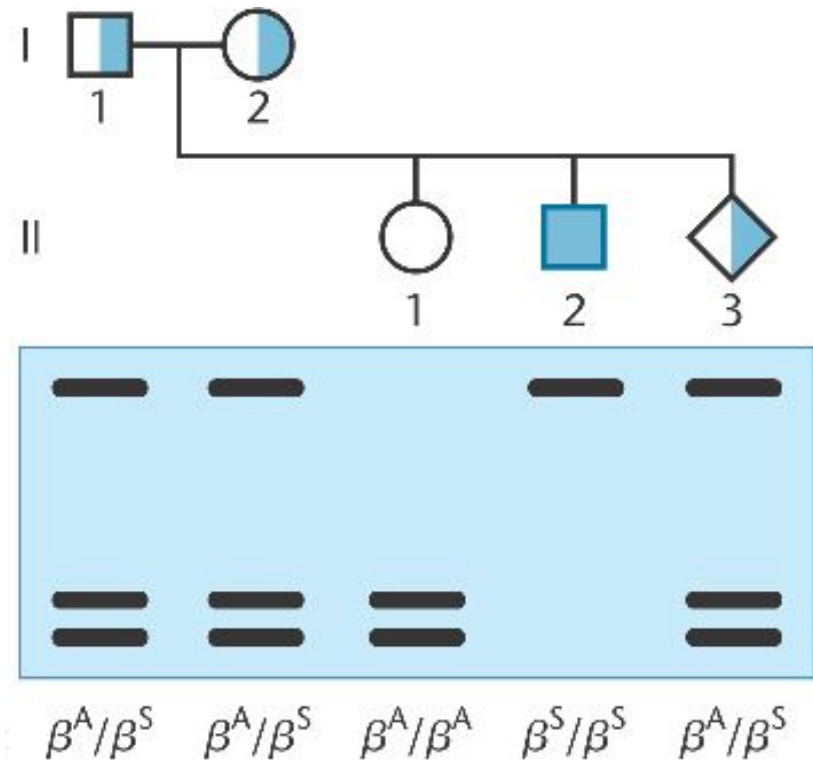
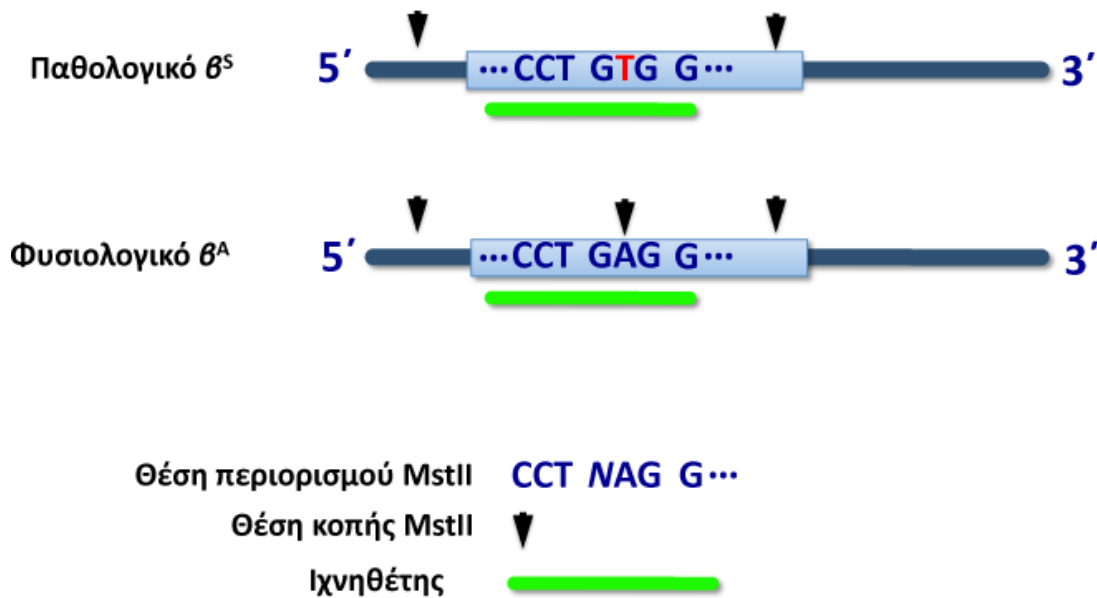
Θέση περιορισμού MstII   **CCT NAG G...**  
 Θέση κοπής MstII   ▼  
 Ιχνηθέτης   **—————**

# Δρεπανοκυτταρική αναιμία το γονίδιο της β σφαιρίνης

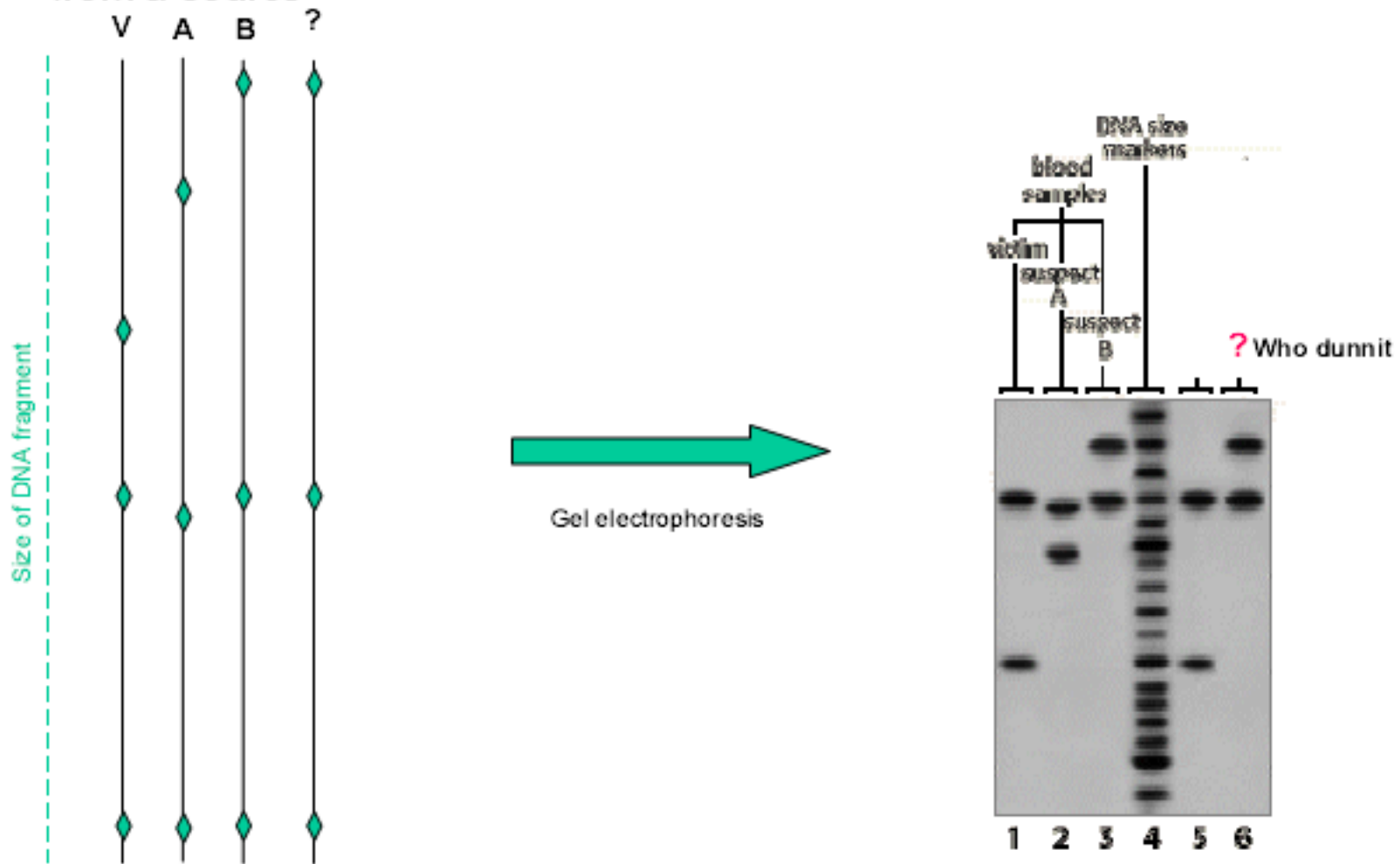


Θέση περιορισμού MstII    **CCT NAG G...**  
Θέση κοπής MstII        ▼  
Ιχνηθέτης                    

# Δρεπανοκυτταρική αναιμία το γονίδιο της β σφαιρίνης



# Restriction endonuclease and gel electrophoresis.....to identify DNA from a source



## Before Southern Blot

“Scientists knew that they could chop up DNA using restriction enzymes ... They could then separate the resulting pieces by loading the collection onto an agarose gel and applying an electric current. The pieces would migrate at different rates, depending on size ... For organisms with large genomes, however, this procedure generated a smear of DNA ... Finding a single piece of DNA that carried a specific sequence was hopeless...

Southern realized that he could accomplish his task by brute force: carving the gel into small horizontal slabs, washing the DNA out of each gel slice, attaching every portion to a separate filter, fishing for the particular DNA with a piece of matching, radioactively tagged RNA that would bind to it, and then measuring the amount of bound radioactivity. The tedium and labor involved in such a scheme spurred Southern to think of a better way. “

## Albert Lasker Award for Clinical Medical Research '05



“My big contribution to science was the discovery that blotting paper could be used to soak liquid out of jelly. I wouldn't be here today if others had not found clever applications for this simple discovery and I'm delighted to share this prestigious award with Alec Jeffreys who used the method to make the most important discovery that genes have a split structure - the, introns in eukaryotic genes, and he also developed his famous fingerprinting method from it. But there have been others and I get a little bit of credit for each application and as there have been many and colleagues have been generous in their acknowledgement, the credit has mounted up over the years. I hope that anyone who has used the method, learning of this award, will feel that they have earned a share in it. “

- Acceptance remarks by Edwin Southern



**RNA**

**N**

**W**

**E**

**S**

**DNA**



# Ανάλυση κατά Northern

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
Vol. 74, No. 12, pp. 5350-5354, December 1977  
Biochemistry

## **Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes**

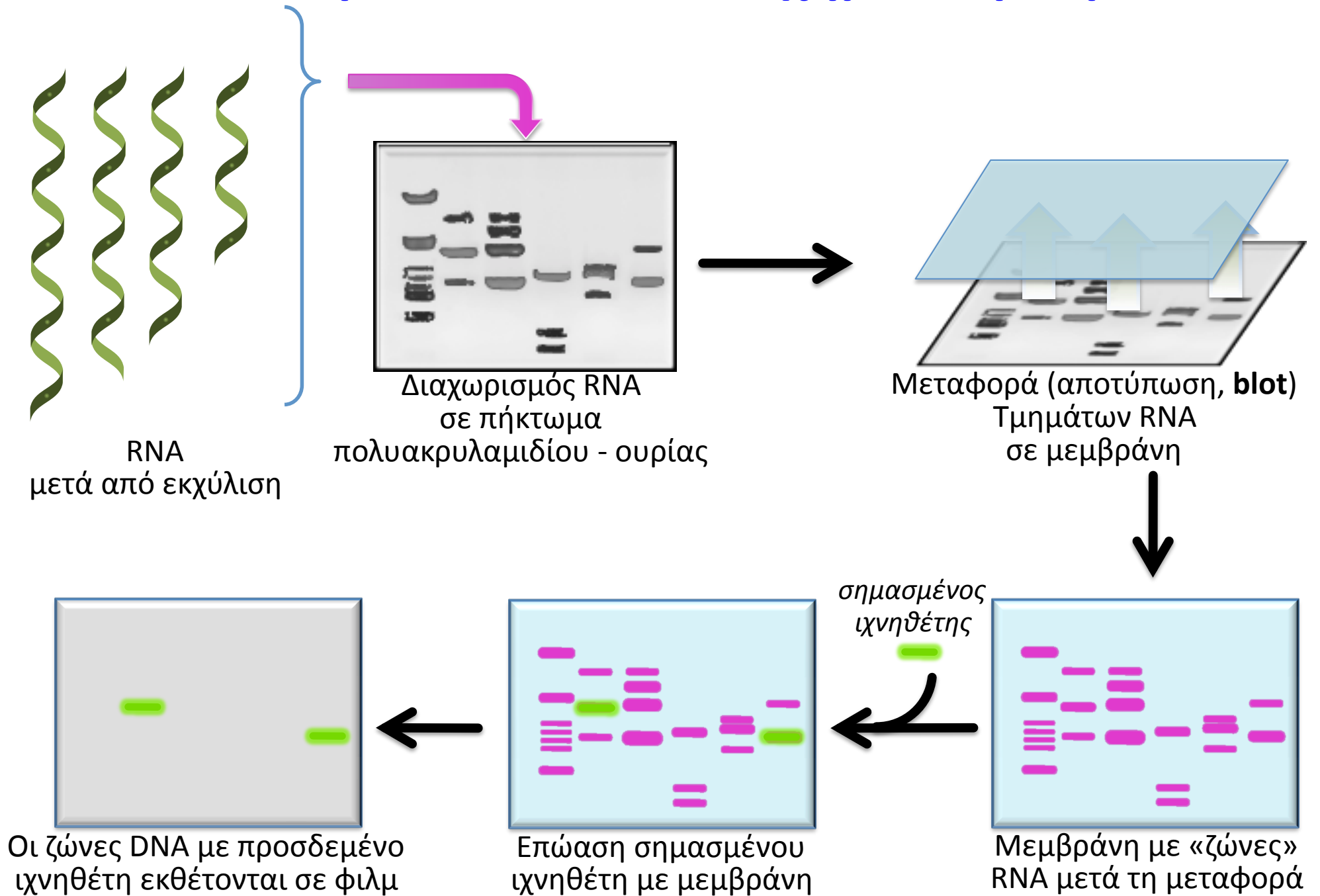
(single-stranded nucleic acids/methyl mercuric hydroxide-agarose gels/*Drosophila melanogaster* RNA/hybrid plasmids)

JAMES C. ALWINE\*, DAVID J. KEMP, AND GEORGE R. STARK

Department of Biochemistry, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305

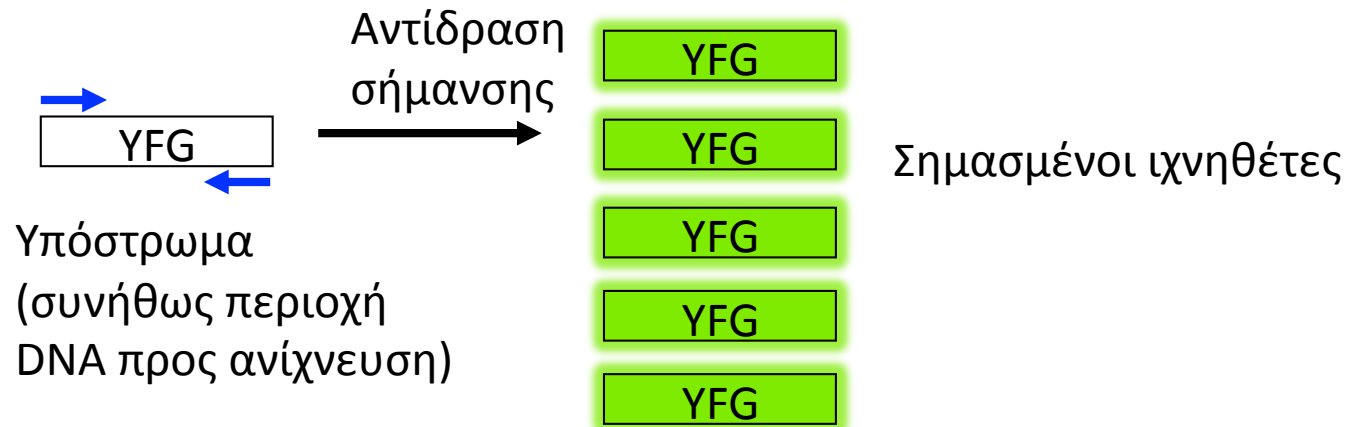
*Communicated by David S. Hogness, September 12, 1977*

# Ανάλυση κατά Northern: σχηματική πορεία



# Συνθέτοντας έναν ιχνηθέτη

- Ο ιχνηθέτης είναι ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA που είναι κατάλληλα σημασμένη ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί.



- Το εκμαγείο συνθέτεται με *PCR*
- Για αναλύσεις κατά *Southern*, το εκμαγείο πρέπει να γίνεται από γενομικό DNA, δηλ. να περιέχει ιντρόνια και εξόνια – Γιατί;
- Για αναλύσεις κατά *Northern*, το εκμαγείο πρέπει να συνθέτεται από cDNA, δηλ. μόνο εξόνια– Γιατί;

# Αλλά...

## PCR

## RT-PCR

1953	<b>Watson and Crick</b> propose the double-helix model for DNA structure based on x-ray results of <b>Franklin and Wilkins</b> .
1961	<b>Marmur and Doty</b> discover DNA renaturation, establishing the specificity and feasibility of nucleic acid hybridization reactions.
1962	<b>Arber</b> provides the first evidence for the existence of DNA restriction nucleases, leading to their purification and use in DNA sequence characterization by <b>Nathans and H. Smith</b> .
1966	<b>Nirenberg, Ochoa, and Khorana</b> elucidate the genetic code.
1972-1973	DNA cloning techniques are developed by the laboratories of <b>Boyer, Cohen, Berg,</b> and their colleagues at Stanford University and the University of California at San Francisco.
1975	<b>Southern</b> develops gel-transfer hybridization for the detection of specific DNA sequences.
1975-1977	<b>Sanger and Barrell</b> and <b>Maxam and Gilbert</b> develop rapid DNA-sequencing methods.
1982	<b>GenBank</b> , NIH's public genetic sequence database, is established at Los Alamos National Laboratory.
1985	<b>Mullis</b> and co-workers invent the polymerase chain reaction (PCR).

1869	<b>Miescher</b> first isolates DNA from white blood cells harvested from pus-soaked bandages obtained from a nearby hospital.
1944	<b>Avery</b> provides evidence that DNA, rather than protein, carries the genetic information during bacterial transformation.
1953	<b>Watson and Crick</b> propose the double-helix model for DNA structure based on x-ray results of <b>Franklin and Wilkins</b> .
1955	<b>Kornberg</b> discovers DNA polymerase, the enzyme now used to produce labeled DNA probes.
1961	<b>Marmur and Doty</b> discover DNA renaturation, establishing the specificity and feasibility of nucleic acid hybridization reactions.
1962	<b>Arber</b> provides the first evidence for the existence of DNA restriction nucleases, leading to their purification and use in DNA sequence characterization by <b>Nathans and H. Smith</b> .
1966	<b>Nirenberg, Ochoa,</b> and <b>Khorana</b> elucidate the genetic code.
1967	<b>Gellert</b> discovers DNA ligase, the enzyme used to join DNA fragments together.
1972-1973	DNA cloning techniques are developed by the laboratories of <b>Boyer, Cohen, Berg,</b> and their colleagues at Stanford University and the University of California at San Francisco.
1975	<b>Southern</b> develops gel-transfer hybridization for the detection of specific DNA sequences.
1975-1977	<b>Sanger and Barrell</b> and <b>Maxam and Gilbert</b> develop rapid DNA-sequencing methods.
1981-1982	<b>Palmiter and Brinster</b> produce transgenic mice; <b>Spradling and Rubin</b> produce transgenic fruit flies.
1982	<b>GenBank</b> , NIH's public genetic sequence database, is established at Los Alamos National Laboratory.
1985	<b>Mullis</b> and co-workers invent the polymerase chain reaction (PCR).

**RNA**

**N**

**PROTEIN**

**W**

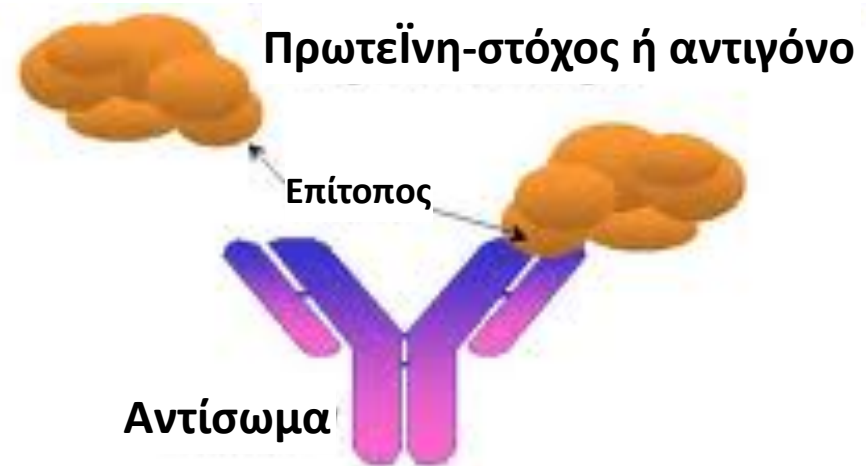
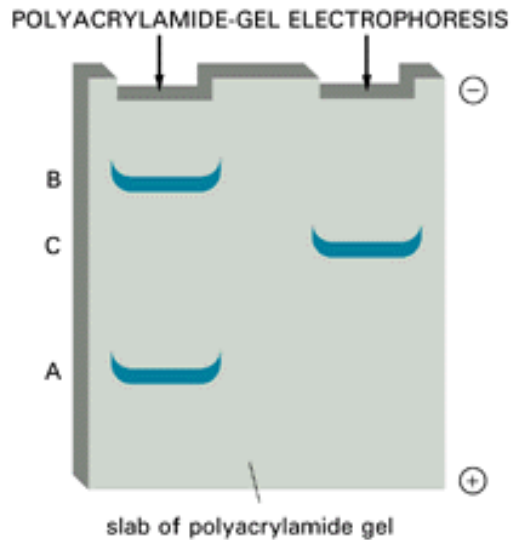


**E**

**S**

**DNA**

# Πως μπορεί να προσδιορισθεί μια πρωτεΐνη σε ένα μίγμα πρωτεϊνών;

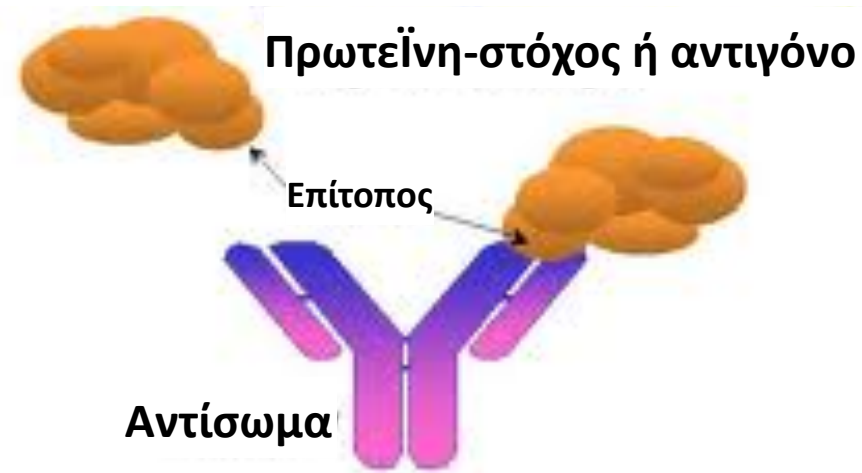


**Όμως, οι πρωτεΐνες είναι μέσα στο πύκτωμα**

**Αν όμως μεταφερθούν πάνω σε μια επιφάνεια (π.χ. μια μεμβράνη) θα μπορούσαν να ανιχνευθούν με ένα αντίσωμα**

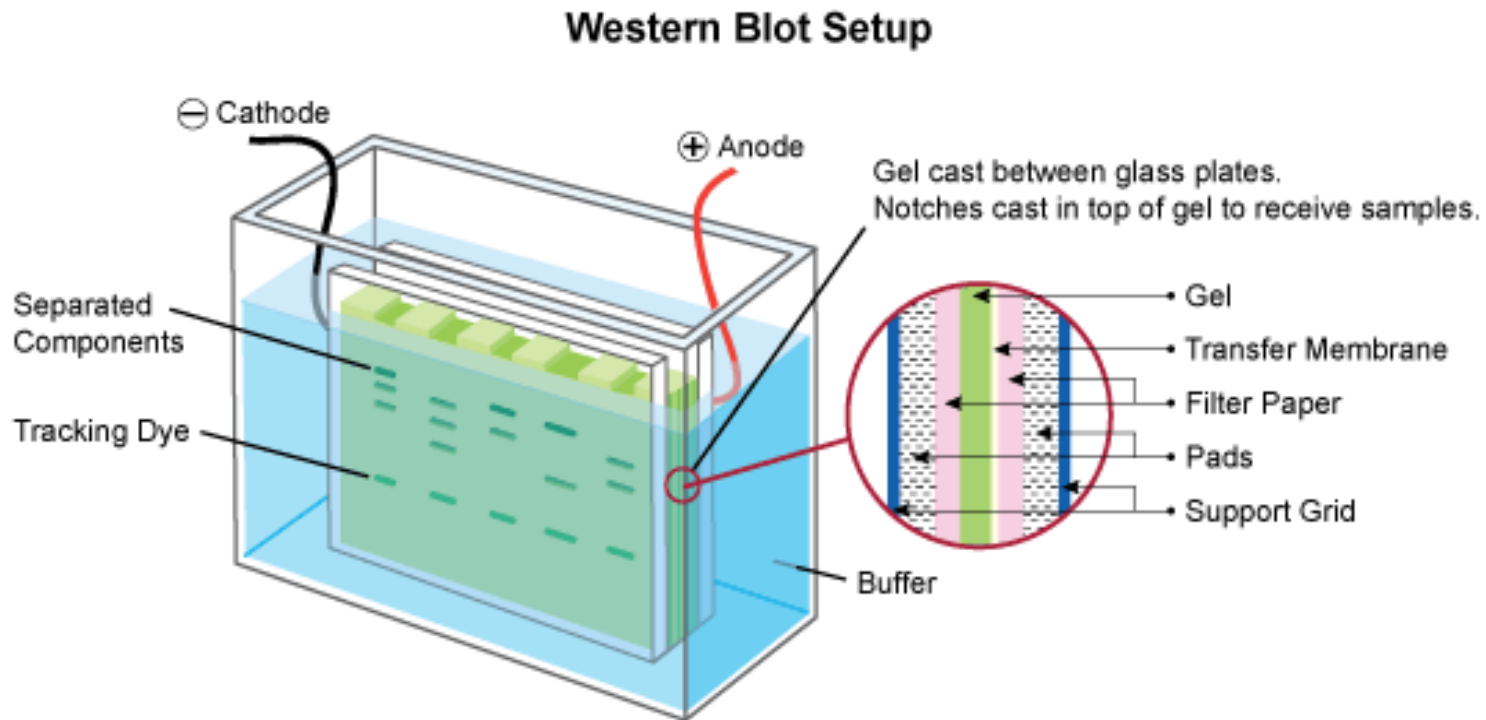


# Πως μπορεί να προσδιορισθεί μια πρωτεΐνη σε ένα μίγμα πρωτεϊνών;



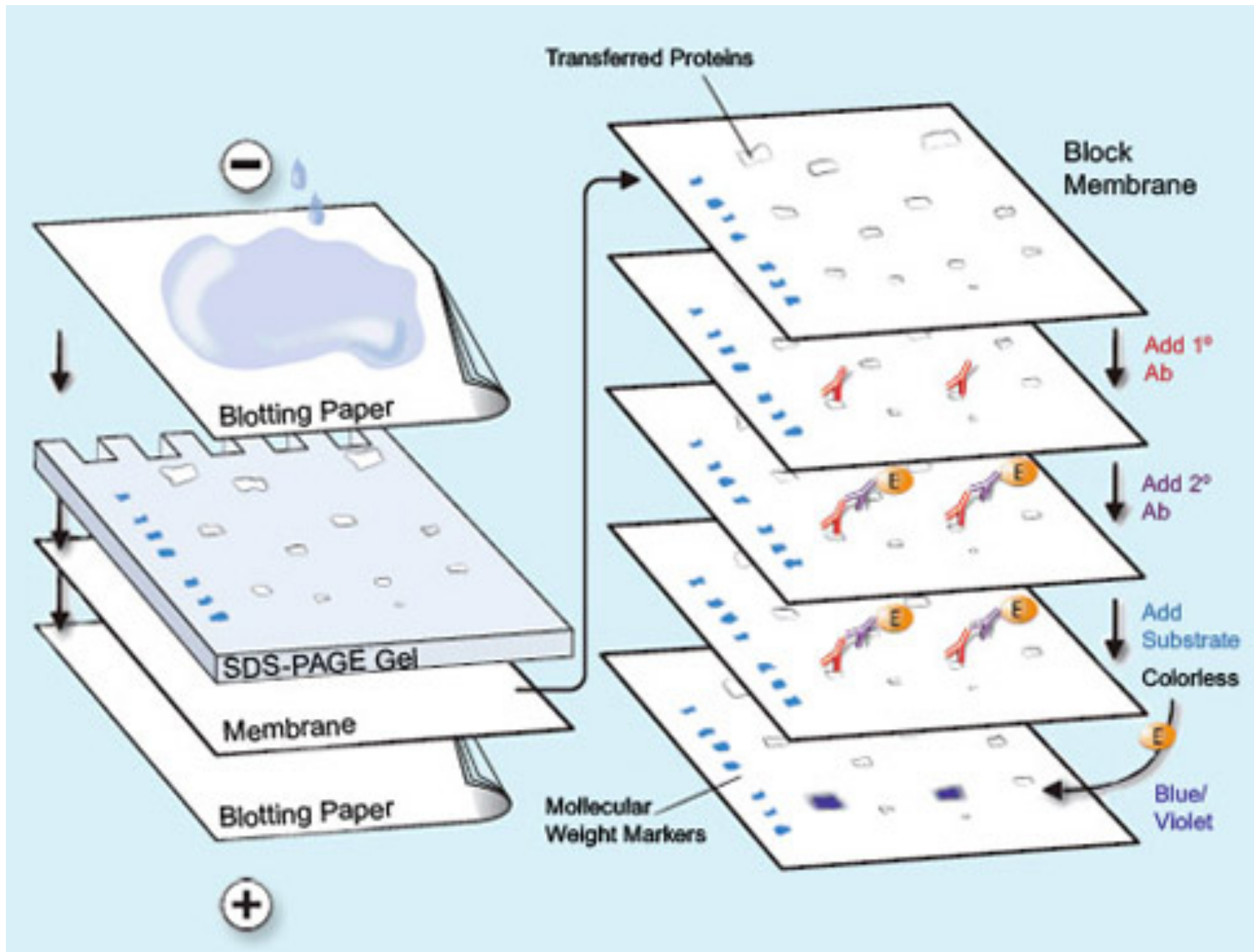
**Αν όμως οι πρωτεΐνες μεταφερθούν πάνω σε μια επιφάνεια  
(π.χ. μια μεμβράνη)  
θα μπορούσαν να ανιχνευθούν με ένα αντίσωμα**

# Μεταφορά σε μεμβράνη

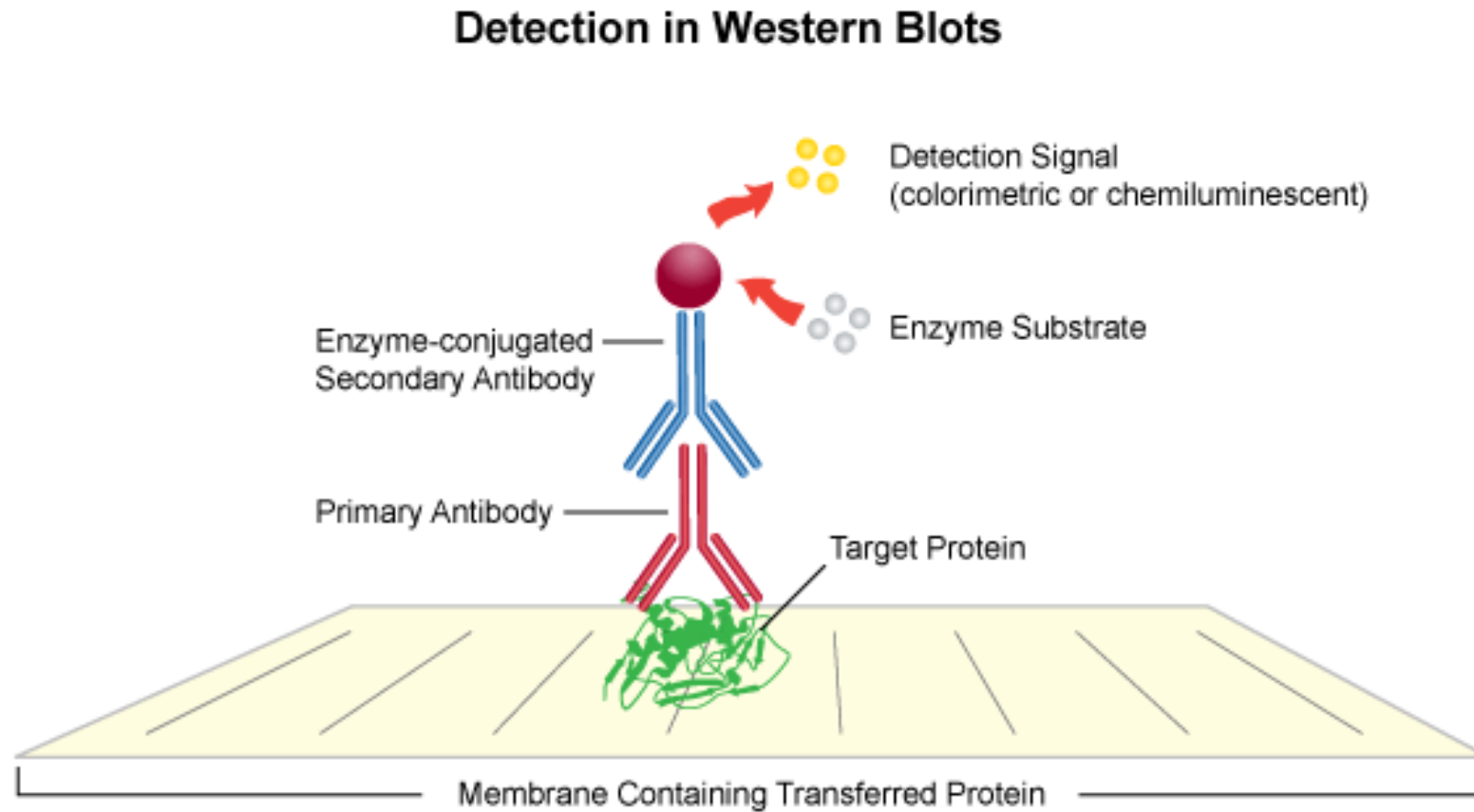


**Diagram 1:** Illustration of Western Blot Setup.

# Western blotting ή Ανοσοαποτύπωση: γενική πορεία

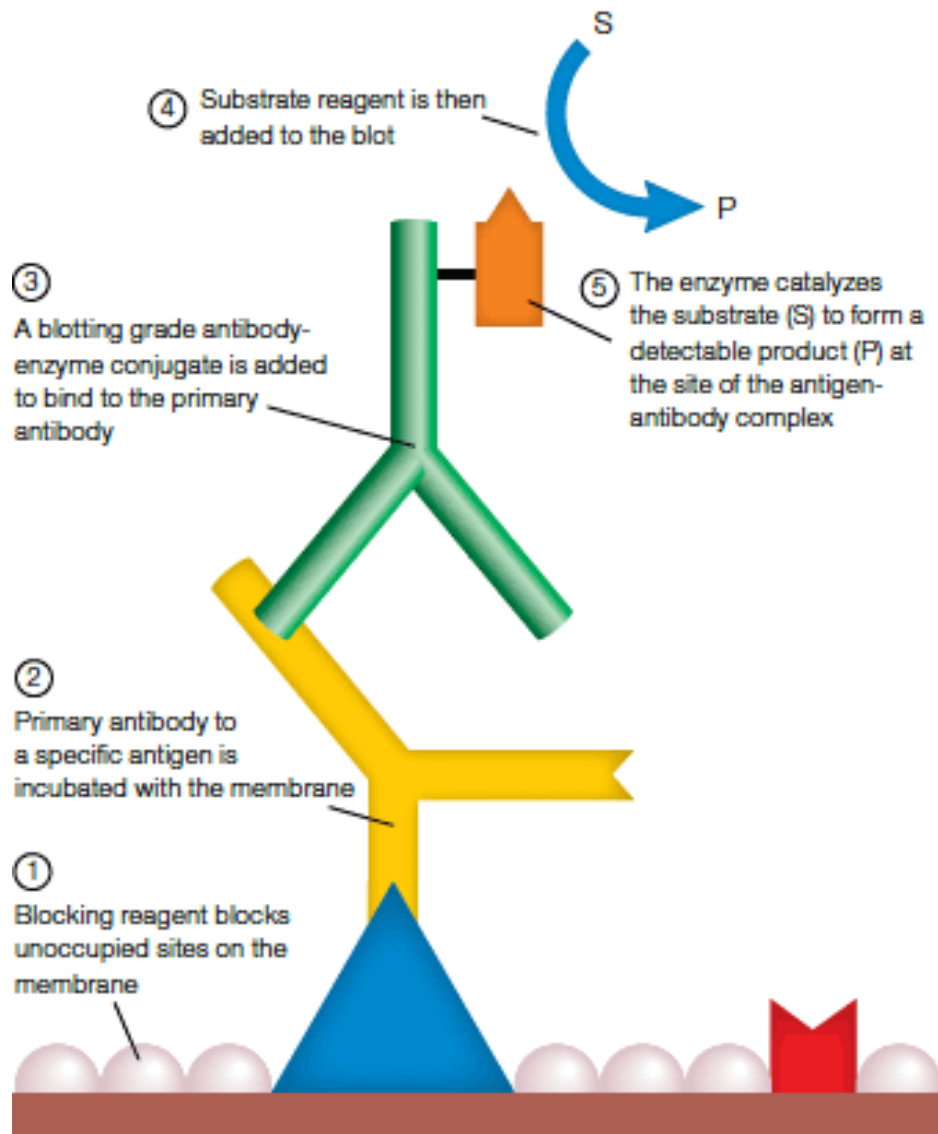


# Western blotting ή Ανοσοαποτύπωση: η ανίχνευση με αντίσωμα



**Diagram 2:** Illustration of detection in Western Blots.

# Western blotting ή Ανοσοαποτύπωση: η ανίχνευση με αντίσωμα



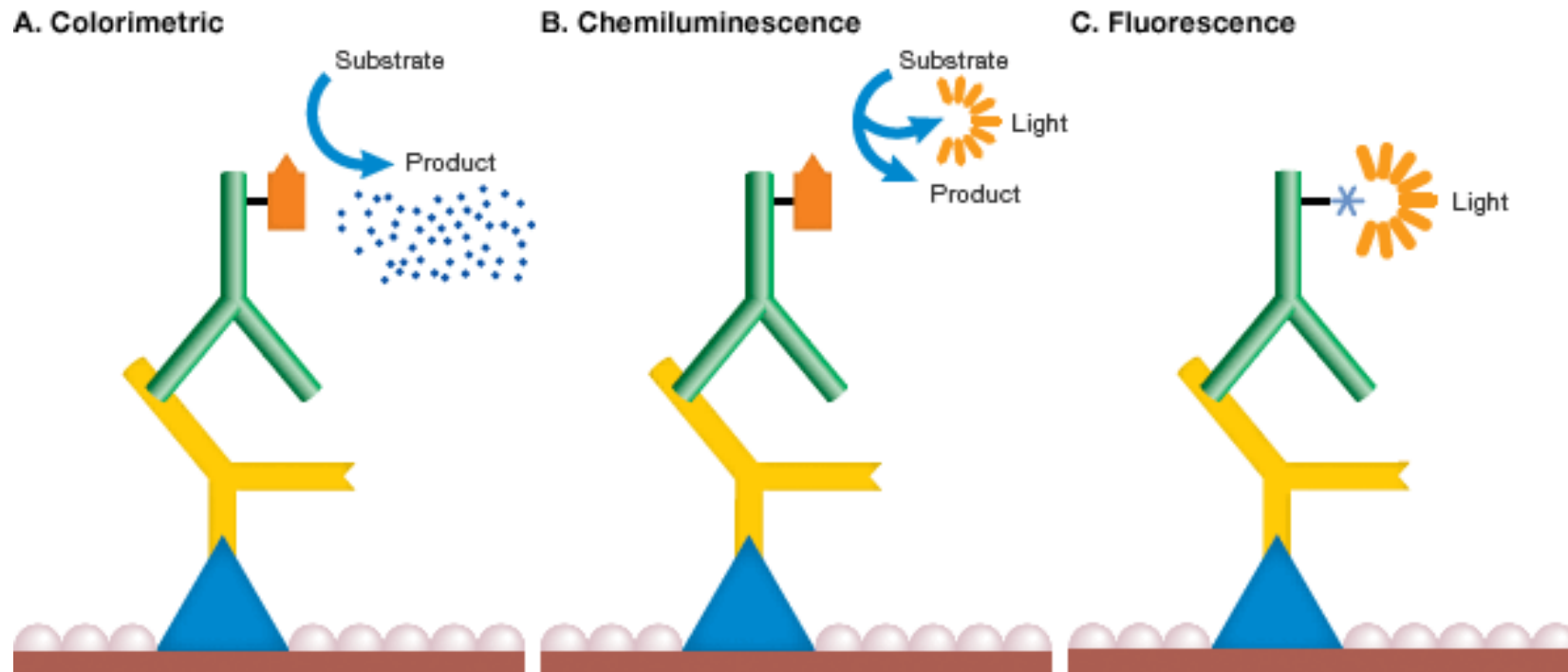
(1) Και εδώ, γίνεται αρχικά κάλυψη όλων των θέσεων πρόσδεσης με πρωτεΐνη (συνήθως BSA), ώστε να περιοριστεί η μη – ειδική σύνδεση (δηλαδή το αντίσωμα να «πιάσει» μόνο στην πρωτεΐνη-στόχο, και όχι σε άλλες μη – ειδικές θέσεις – οι οποίες έχουν καλυφθεί από την BSA).

(2) Πρόσδεση 1<sup>ου</sup> αντισώματος σε πρωτεΐνη-στόχο.

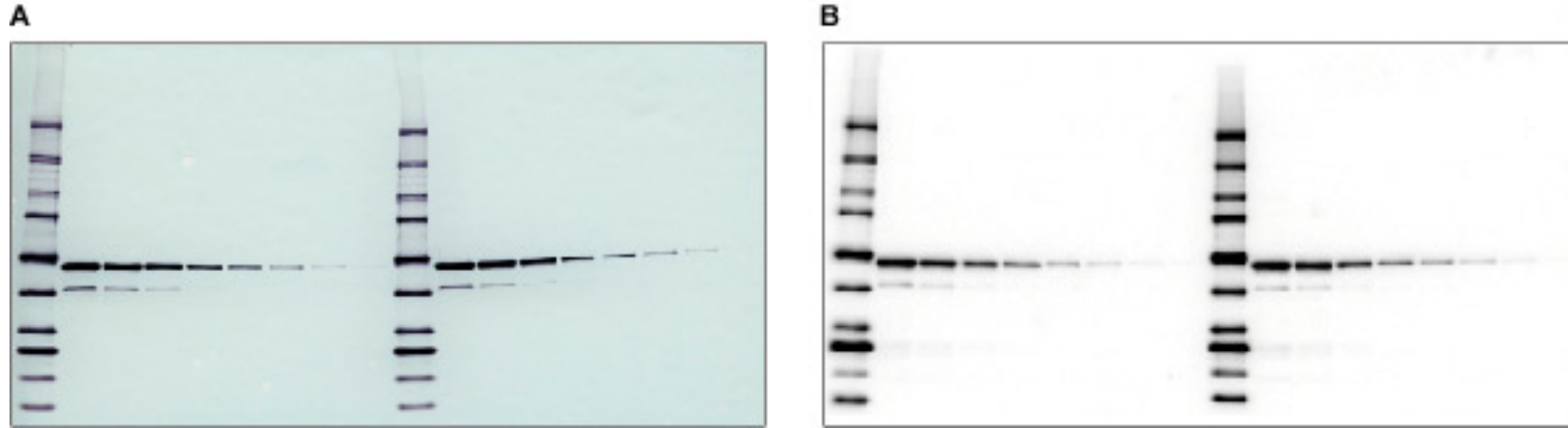
(3) Το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα προσδένεται από ένα 2<sup>ο</sup> αντίσωμα, το οποίο έχει αναπτυχθεί ώστε να αναγνωρίζει αντισώματα. Στο 2<sup>ο</sup> αντίσωμα, είναι συζευγμένο ένα ένζυμο (συνήθως αλκαλική φωσφατάση, ή υπεροξειδάση)

(4), (5) Προσθήκη υποστρώματος (S) και παραγωγή προϊόντος (P) που δίνει σήμα στην αντίδραση (π.χ. φως).  
Ετσι προσδιορίζεται η πρωτεΐνη - στόχος

# Μέθοδοι εμφάνισης αλληλεπίδρασης



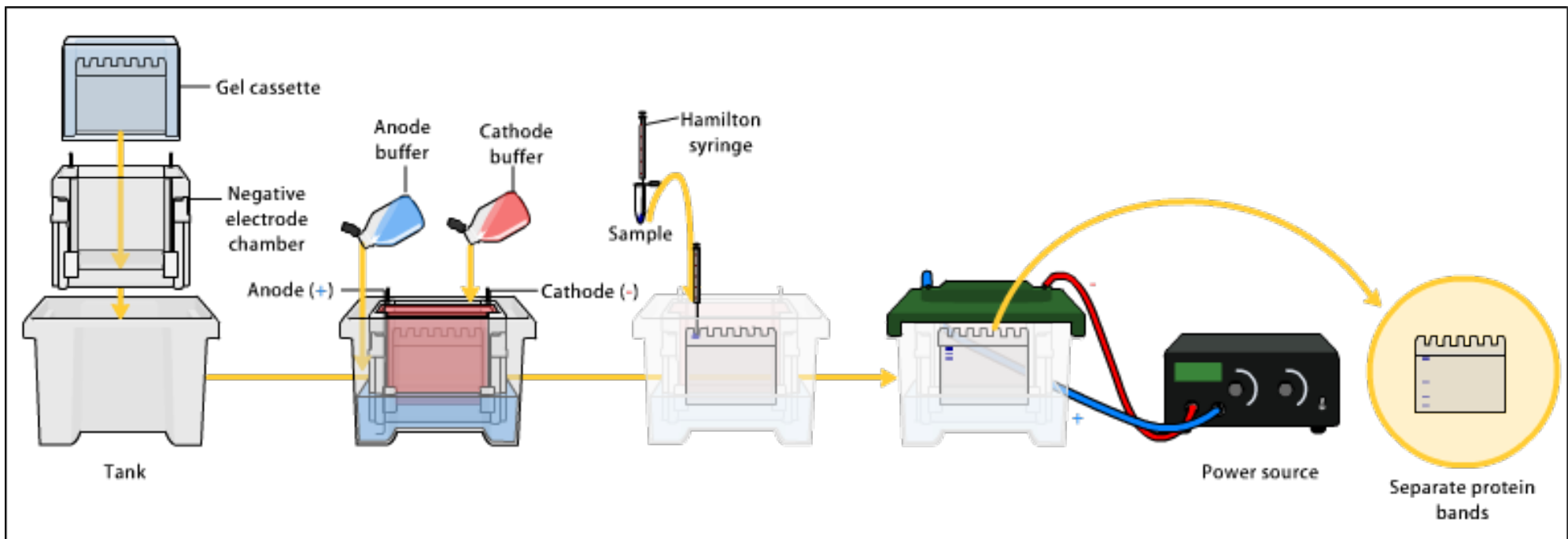
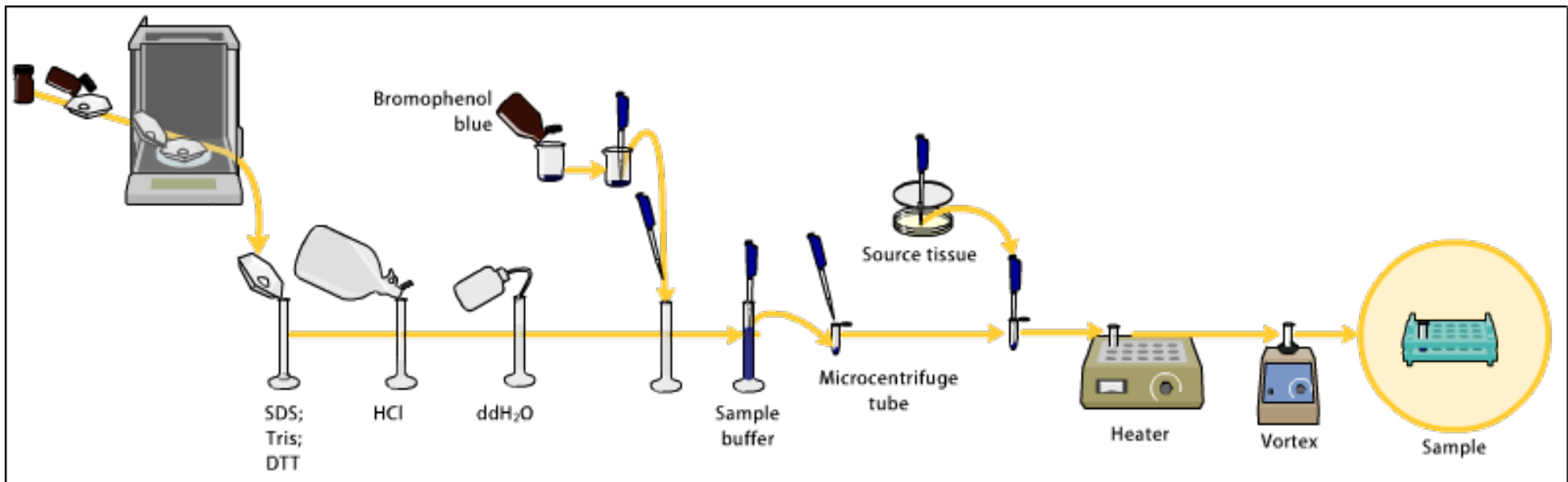
# Ανοσοαποτύπωμα



## Colorimetric and chemiluminescent blots.

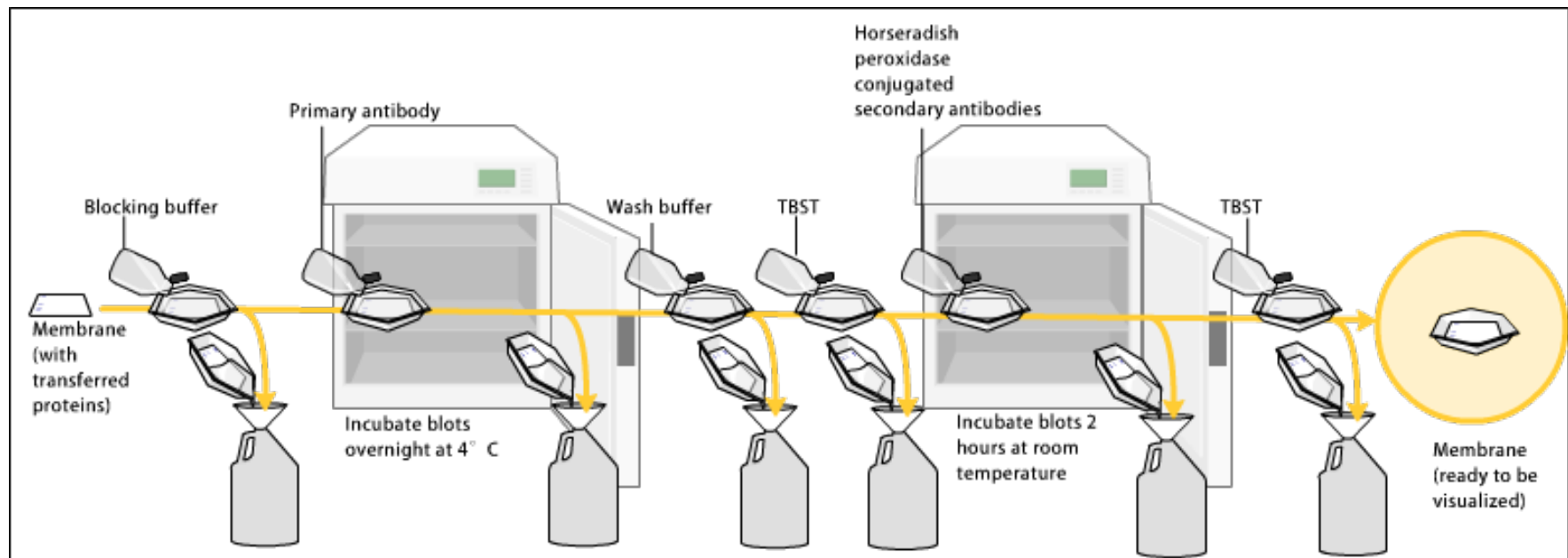
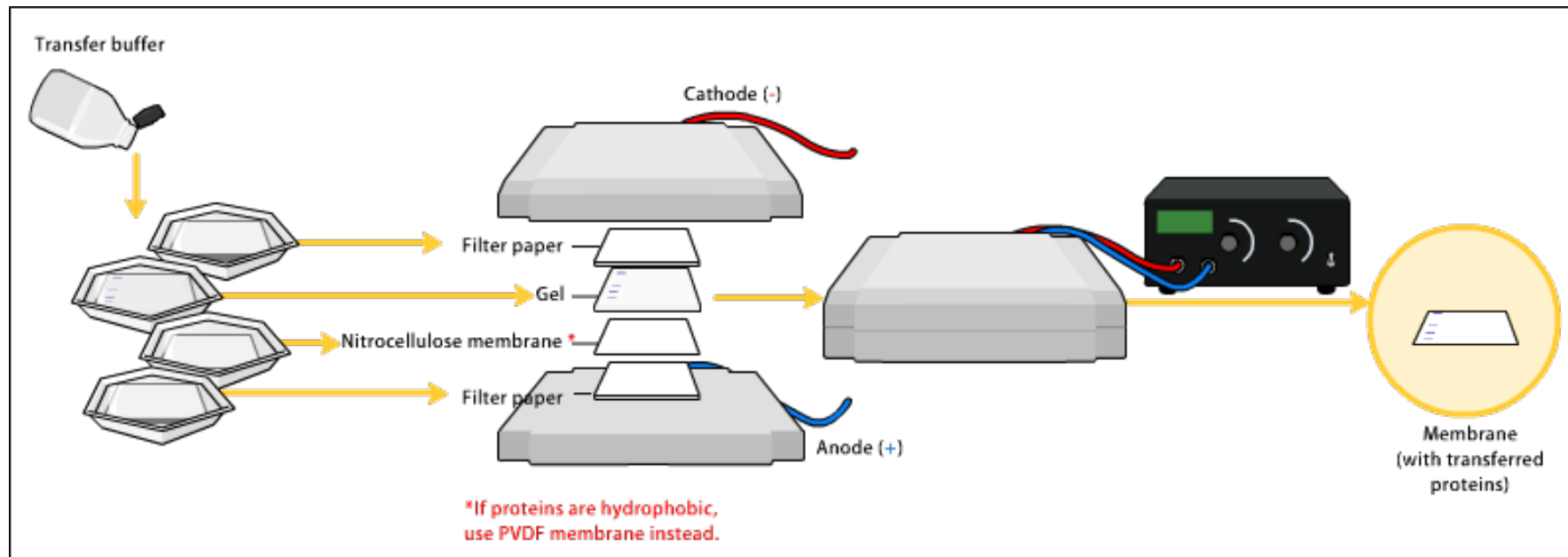
A dilution of a GST fusion protein was immunodetected using a monoclonal antibody specific to GST followed by **A**, an AP-conjugated secondary antibody and BCIP/NBT substrate for colorimetric detection, or **B**, an HRP-conjugated secondary antibody and Immun-Star™ WesternC™ chemiluminescent substrate for chemiluminescence detection.

# Western blotting ή Ανοσοαποτύπωση: η διαδικασία





# Western blotting ή Ανοσοαποτύπωση: η διαδικασία



# **Immunoblot and Enzyme-linked assay**

**Molecular Cell Biology, 4<sup>th</sup> Edition**