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»

Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΕΣΠΑ 2007-2013
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Department of Biochemistry and Biotechnology
University of Thessaly
Laboratory of Molecular Biology and Genomics

Τεχνικές ανάλυσης DNA

Κώστας Ματθιόπουλος

1. Ένζυμα περιορισμού
2. Χάρτες DNA
3. Φορείς κλωνοποίησης
4. Αρχές κλωνοποίησης
5. Βιβλιοθήκες γενετικού υλικού: cDNA και γονιδιωματικού DNA
6. Αλληλούχηση DNA
7. Η αντίδραση PCR

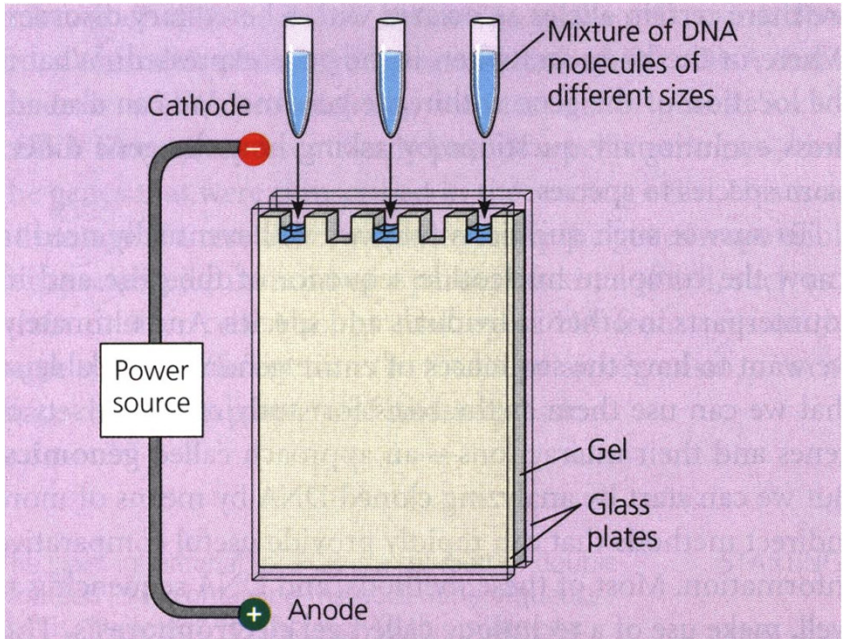
1. Ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες

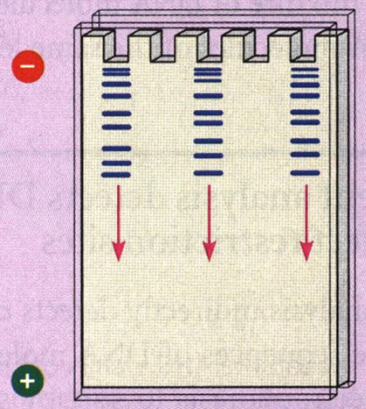
Ορισμένα ένζυμα περιορισμού και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν.

Μικροοργανισμός	Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης	Σημειώσεις
Haemophilus aegyptius	HaeIII	5′ . . . G G|C C. . . 3′ 3′ . . . C C|G G. . . 5′	1
Thermus aquaticus	TaqI	5′ . . . T|C G A . . . 3′ 3′ . . . A G C|T . . . 5′	2
Haemophilus haemolyticus	HhaI	5′ . . . G C G|C . . . 3′ 3′ . . . C|G C G . . . 5′	3
Desulfovibrio desulfuricans	DdeI	5′ . . . C|T *N* A G . . . 3′ 3′ . . . G A *N* T|C . . . 5′	4
Moraxella bovis	MboII	5′ . . . G A A G A $(N)_8$| . . . 3′ 3′ . . . C T T C T $(N)_7$| . . . 5′	5
Escherichia coli	EcoRV	5′ . . . G A T|A T C . . . 3′ 3′ . . . C T A|T A G . . . 5′	1
	EcoRI	5′ . . . G|A A T T C . . . 3′ 3′ . . . C T T A A|G . . . 5′	2
Providencia stuarti	PstI	5′ . . . C T G C A|G . . . 3′ 3′ . . . G A|C G T C . . . 5′	3
Microcoleus	MstII	5′ . . . C C|T *N* A G G . . . 3′ 3′ . . . G G A *N* T|C C . . . 5′	4
Nocardia otitidiscaviarum	NotI	5′ . . . G C|G G C C G C . . . 3′ 3′ . . . C G C C G G|C G . . . 5′	6

Ηλεκτροφόρηση

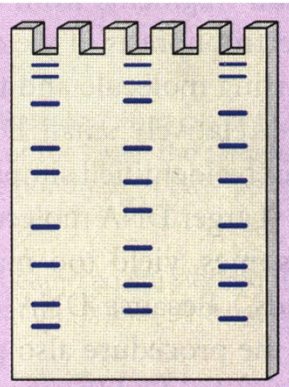


❶ Three samples, each containing a mixture of DNA molecules, are placed in wells near one end of a thin slab of a polymeric gel. The gel is supported by glass plates and bathed in an aqueous solution. Electrodes are attached to both ends, and voltage is applied.



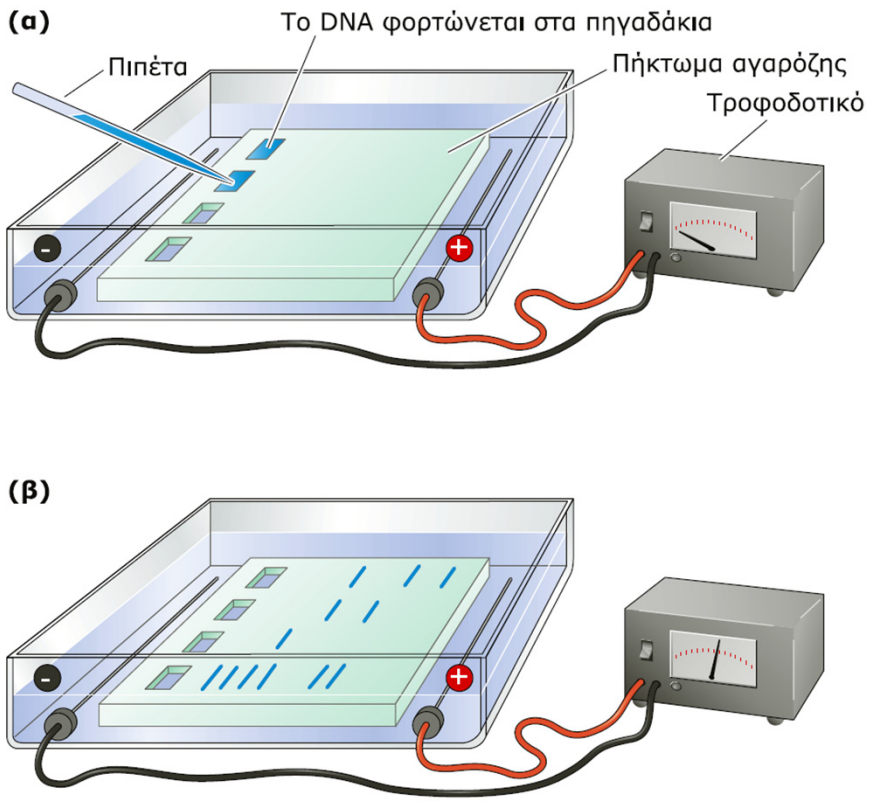
❷ The DNA molecules, which are negatively charged, migrate toward the positive electrode, the anode. A molecule's rate of movement is determined mostly by its length; longer molecules travel more slowly through the gel.

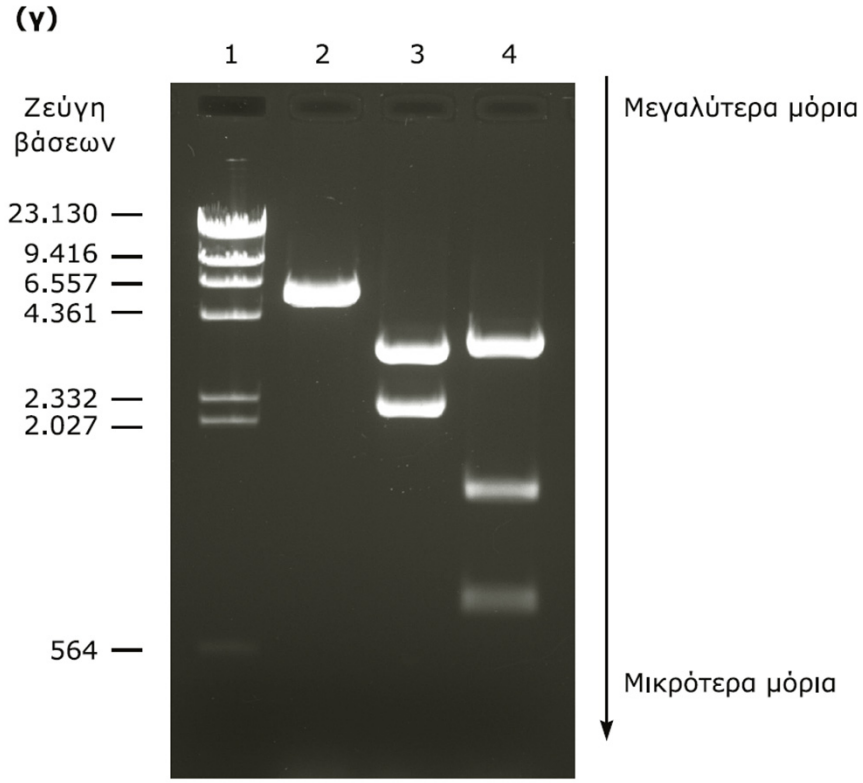
FIGURE 20.8 Gel electrophoresis of macromolecules. Gel electrophoresis separates macromolecules on the basis of their rate of movement through a gel in an electric field. For DNA, the migration rate—how far a molecule travels while the current is on—is inversely proportional to molecular size. Nucleic acids carry negative charges (on phosphate groups) proportional to their lengths, but the thicket of polymer fibers in the gel impedes longer fragments more than it does shorter ones.

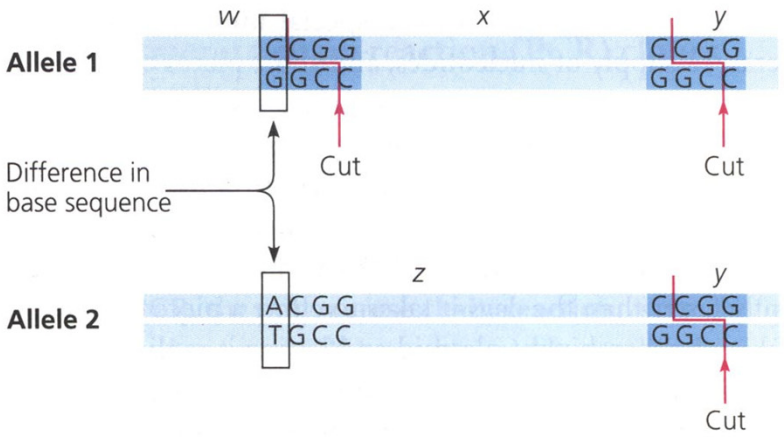


❸ When the current is turned off, the DNA molecules in each sample are arrayed in bands along a "lane," according to their size. The shortest molecules, having traveled the farthest, are in bands at the bottom of the gel.

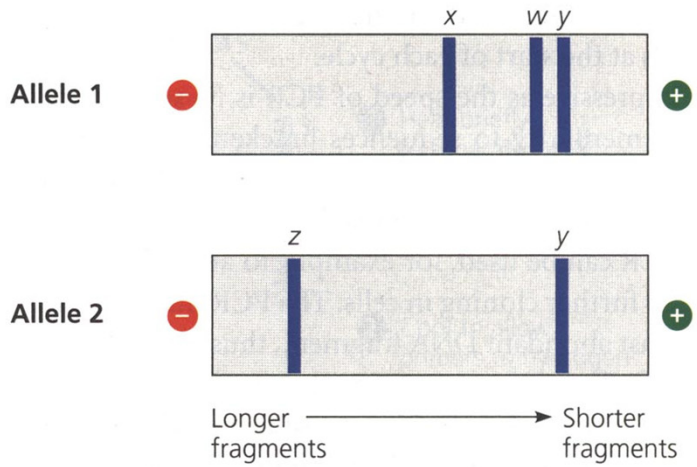
Διαχωρισμός μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα.



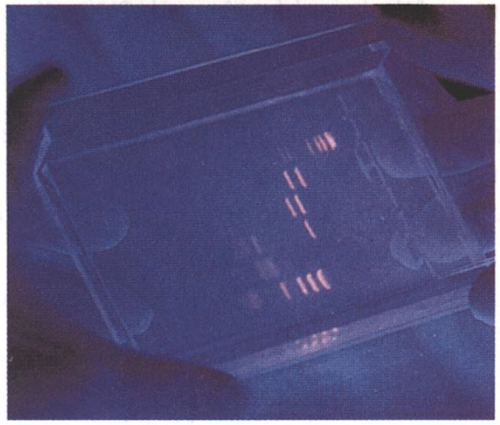




(a) DNA from two alleles. Two homologous segments of DNA that carry different alleles of a gene are depicted; only the relevant bases are shown. A single base-pair difference results in allele 2 having one less recognition sequence (restriction site) for a particular restriction enzyme. This enzyme cuts the DNA from allele 1 into three pieces (*w*, *x*, and *y*) but cuts the DNA from allele 2 into only two pieces (*z* and *y*).



(b) Electrophoresis of restriction fragments. Electrophoresis separates the restriction fragments formed from each allele. A clear difference between the two alleles is revealed by their band patterns on the gel. Allele 1 has three bands, corresponding to fragments *w*, *x*, and *y*; allele 2 has two bands, corresponding to *z* and *y*.

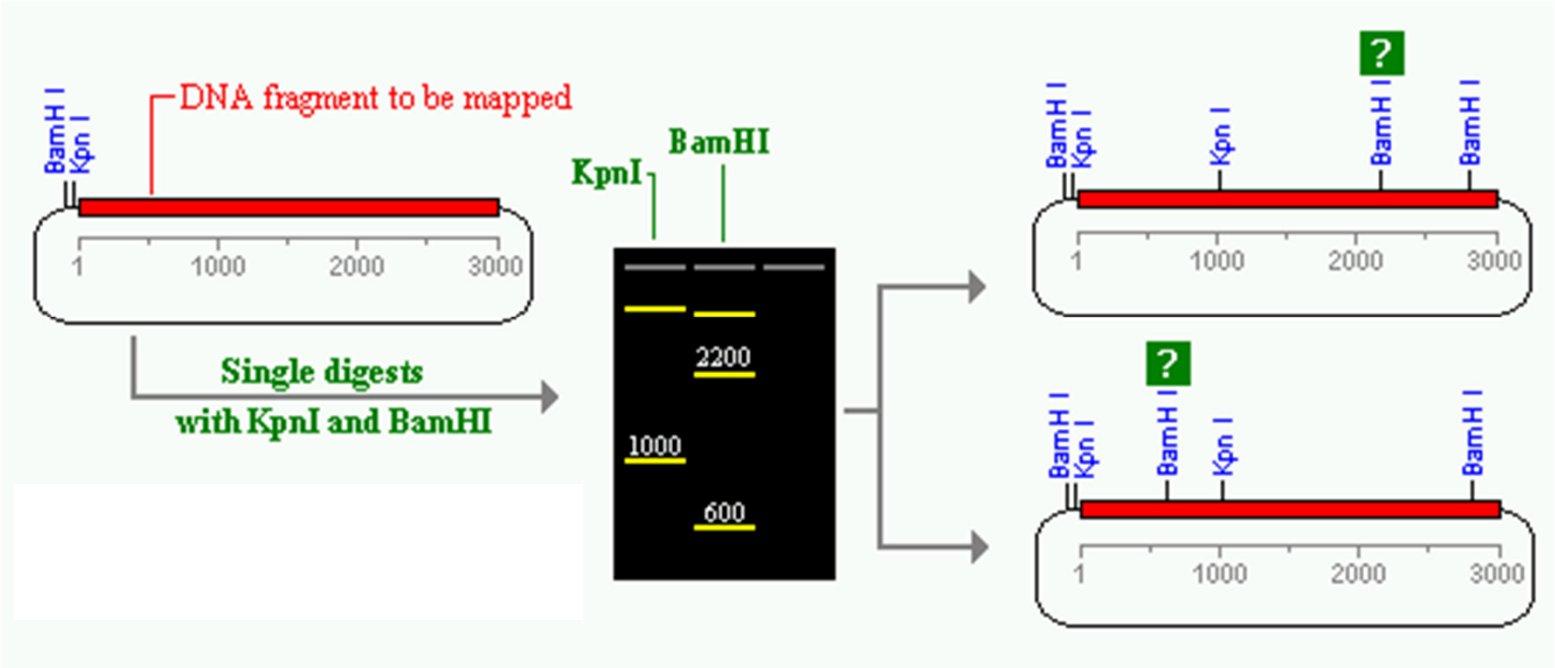


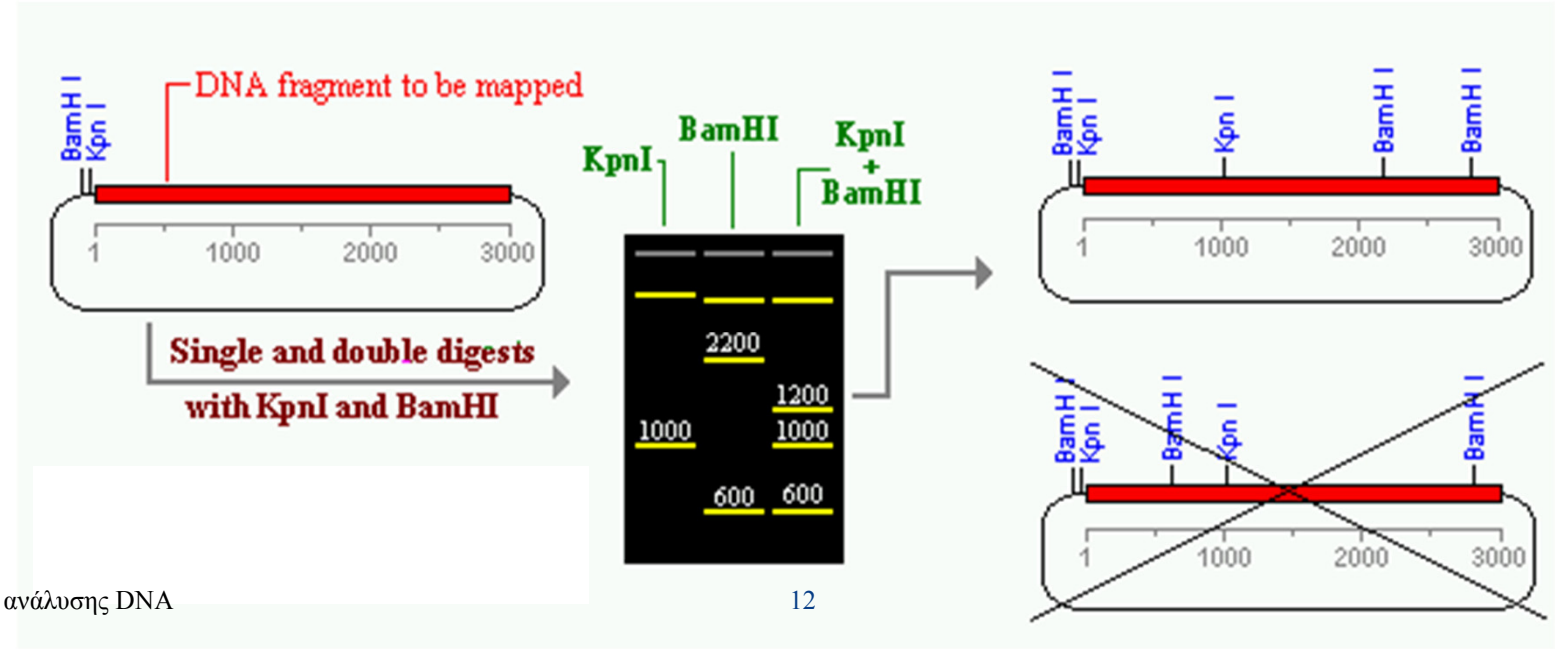
(c) Completed gel. After the addition of a DNA-binding dye, the bands fluoresce pink in ultraviolet light. In the gel shown here, six samples were run, each containing a mixture of fragments from a DNA preparation digested with a restriction enzyme. The pink bands correspond to DNA restriction fragments of different sizes.

Πέψη με ένζυμα περιορισμού

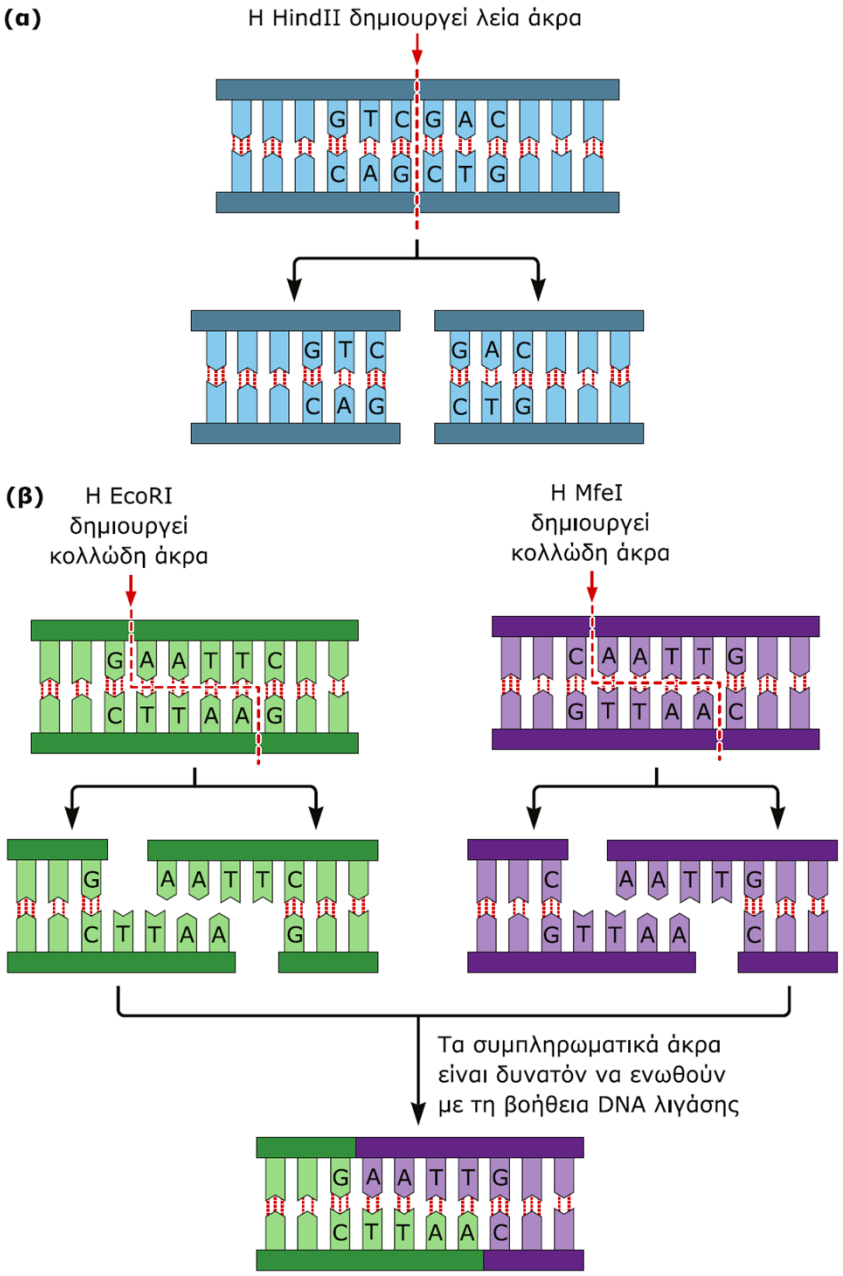
2. Χάρτες DNA

Τα ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία χαρτών DNA


DNA fragment to be mapped
BamH I
Kpn I
1
1000
2000
3000
Single digests
with KpnI and BamHI
KpnI
BamHI
2200
1000
600
?
BamH I
Kpn I
BamH I
BamH I
1
1000
2000
3000
?
BamH I
Kpn I
BamH I
Kpn I
BamH I
1
1000
2000
3000


DNA fragment to be mapped
BamH I
Kpn I
1
1000
2000
3000
Single and double digests
with KpnI and BamHI
KpnI
BamHI
KpnI
+
BamHI
2200
1200
1000
1000
600
600
BamH I
Kpn I
Kpn I
BamH I
BamH I
1
1000
2000
3000
BamH I
Kpn I
BamH I
Kpn I
BamH I
1
1000
2000
3000

Η DNA λιγάση ενώνει τα άκρα τμημάτων DNA που παράγονται από τα ένζυμα περιορισμού



Τα ένζυμα περιορισμού παράγουν είτε λεία (τυφλά) άκρα είτε κολλώδη άκρα.

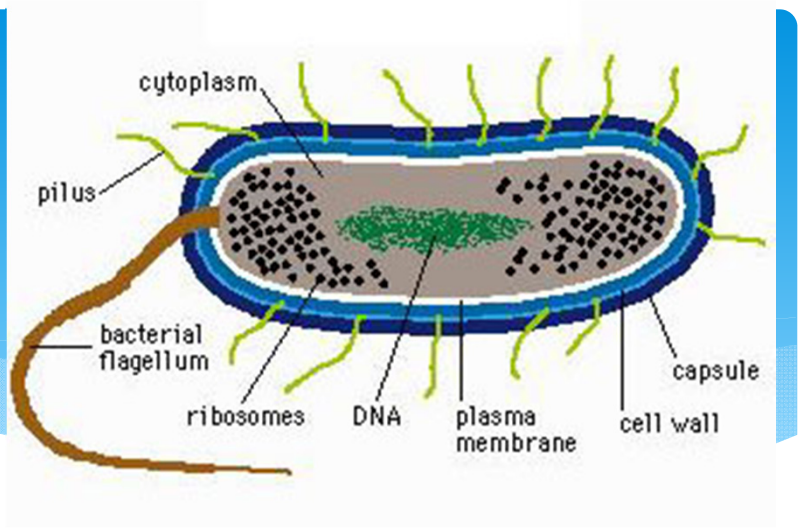
3. Φορείς κλωνοποίησης

Πλασμίδια και ιοί χρησιμοποιούνται ως φορείς αλληλουχιών DNA

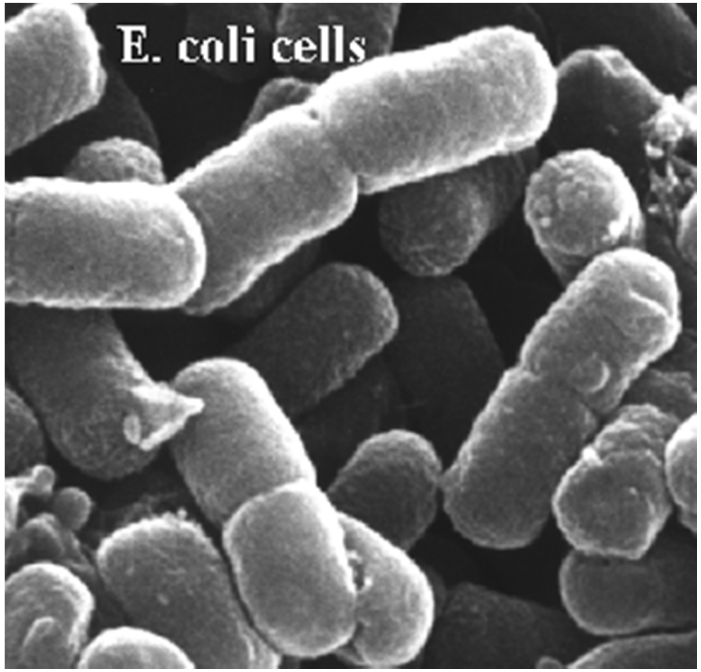
* Στόχος της κλωνοποίησης:
  * απομόνωση γονιδίου
  * παραγωγή σε μεγάλες ποσότητες
* Προφανώς: βακτήρια

Βακτήρια ξενιστές

E. coli K-12



- Gram (-) βακτήριο
- Γονιδίωμα 4.639.221 bp που κωδικοποιεί ~4000 γονίδια
- Πρωτοαπομονώθηκε το 1921 από τα κόπρανα ασθενούς ελονοσίας (ή το 1922 από κόπρανα ασθενούς διφθερίτιδας*)
- Το #1 βακτηριακό μοντέλο



* Bachmann, B., pp. 2460-2488 in Neidhardt et al.1996, *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, ASM Press

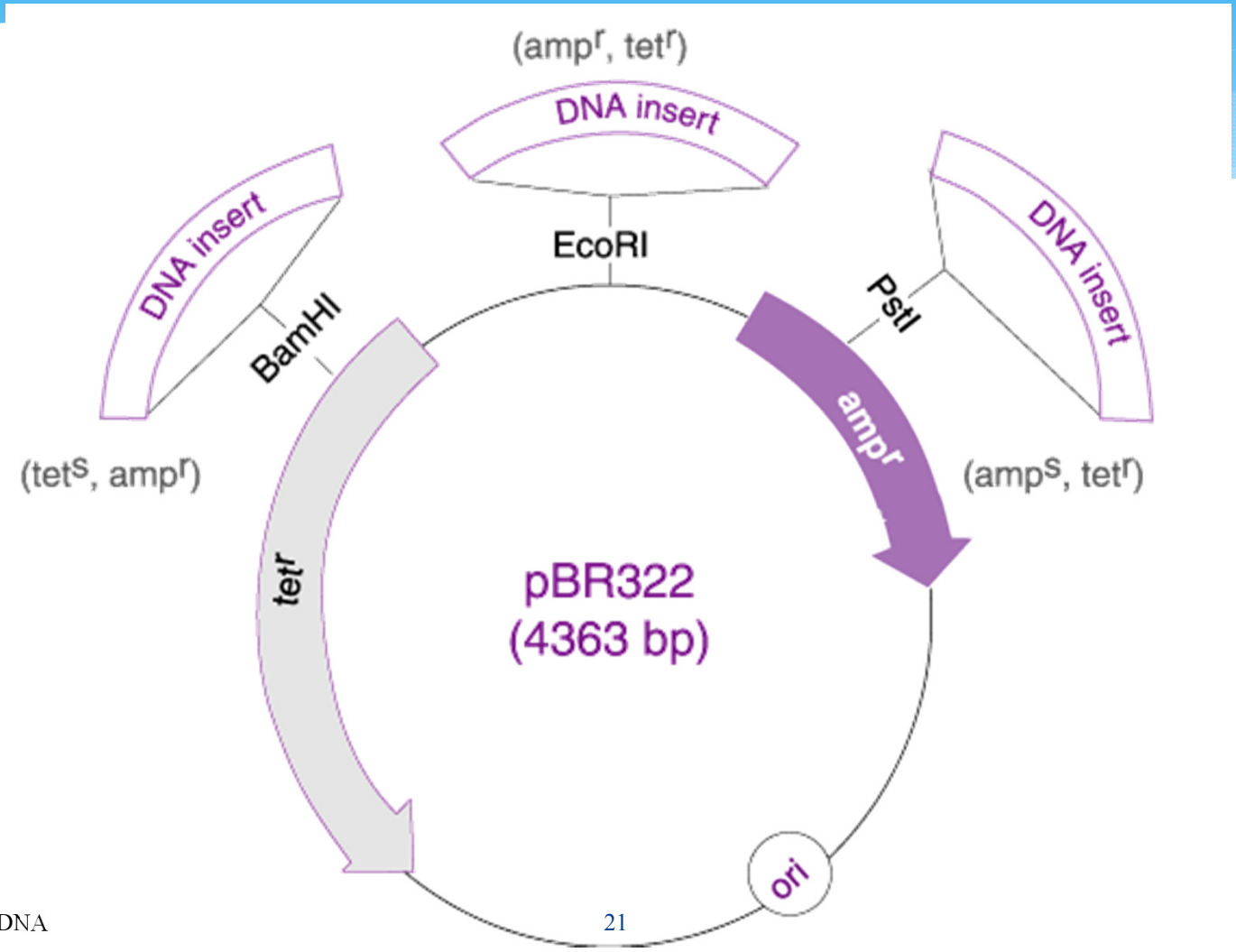
Γενετικές αλλαγές της *E. coli* K-12

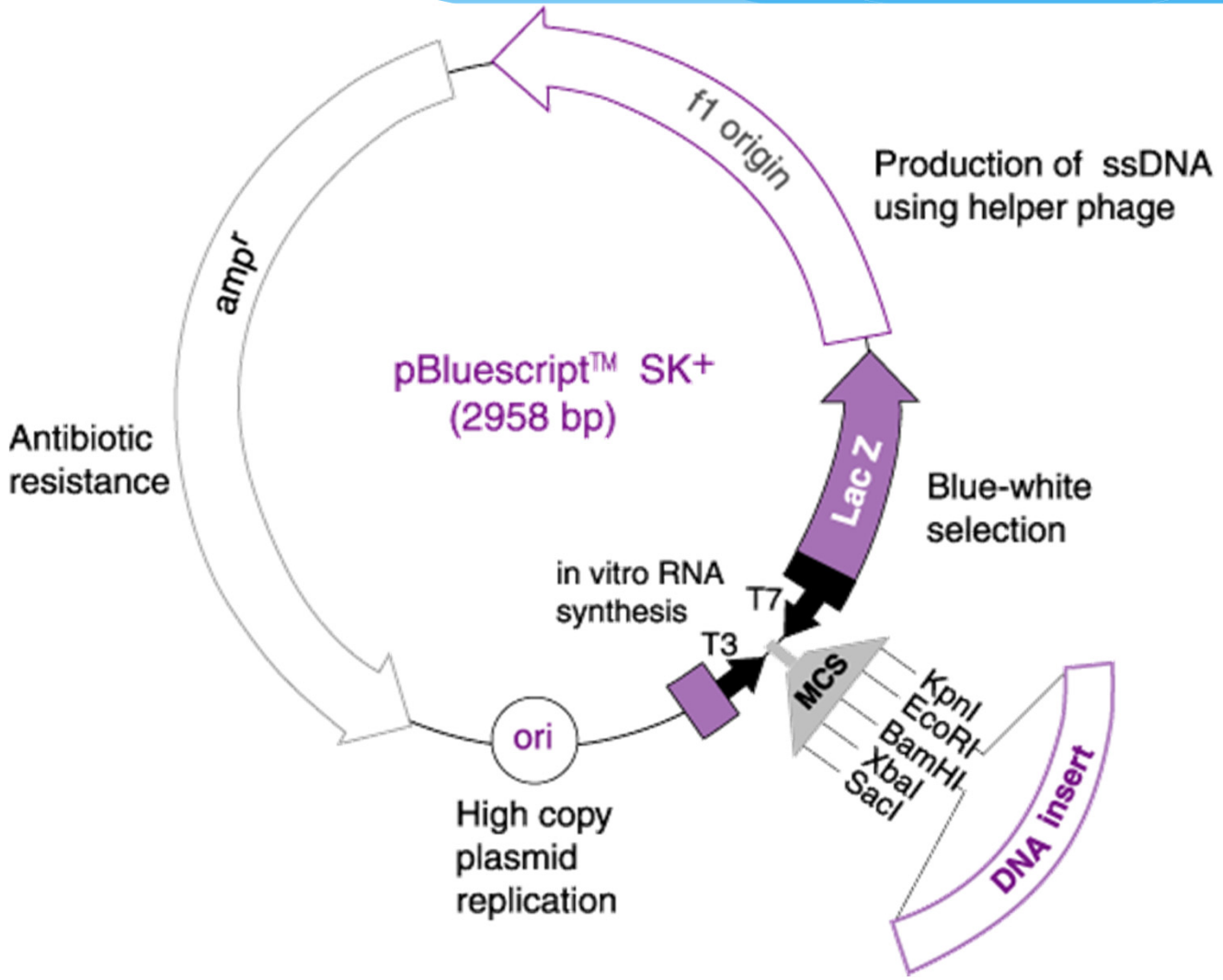
1. Αφαίρεση συστημάτων περιοριστικών μετατροπών (restriction modification)
2. Τροποποίηση συστημάτων ανασυνδυασμού του DNA
3. Μετάλλαξη ενδονουκλεολυτικής δράσης για αύξηση πλασμιδιακής απόδοσης

Φορείς κλωνοποίησης

* Φορείς κλωνοποίησης είναι μόρια DNA που χρησιμο-ποιούνται για να "μεταφέρουν" κλωνοποιημένες αλληλου-χίες μεταξύ βιολογικών δεικτών και του δοκιμαστικού σωλήνα (πχ. από βακτηριακά κύτταρα στο δοκιμαστικό σωλήνα σε φυτικό κύτταρο)
* Οι φορείς κλωνοποίησης έχουν 4 κοινές ιδιότητες:
  * 1. Ικανότητα αυτόνομης αντιγραφής
  * 2. Περιέχουν ένα γενετικό δείκτη (συνήθως επικρατή) προς επιλογή
  * 3. Μοναδικές θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού για να διευκολύνουν την πέψη του DNA
  * 4. Ελάχιστη ποσότητα μη-απαραίτητου DNA για τη βελτιστοποίηση της κλωνοποίησης

Αντιπροσωπευτικοί φορείς κλωνοποίησης




f1 origin
Production of ssDNA
using helper phage
ampr
pBluescript™ SK+
(2958 bp)
Antibiotic
resistance
Lac Z
Blue-white
selection
in vitro RNA
synthesis
T7
T3
MCS
KpnI
EcoRI
BamHI
XbaI
SacI
ori
High copy
plasmid
replication
DNA insert

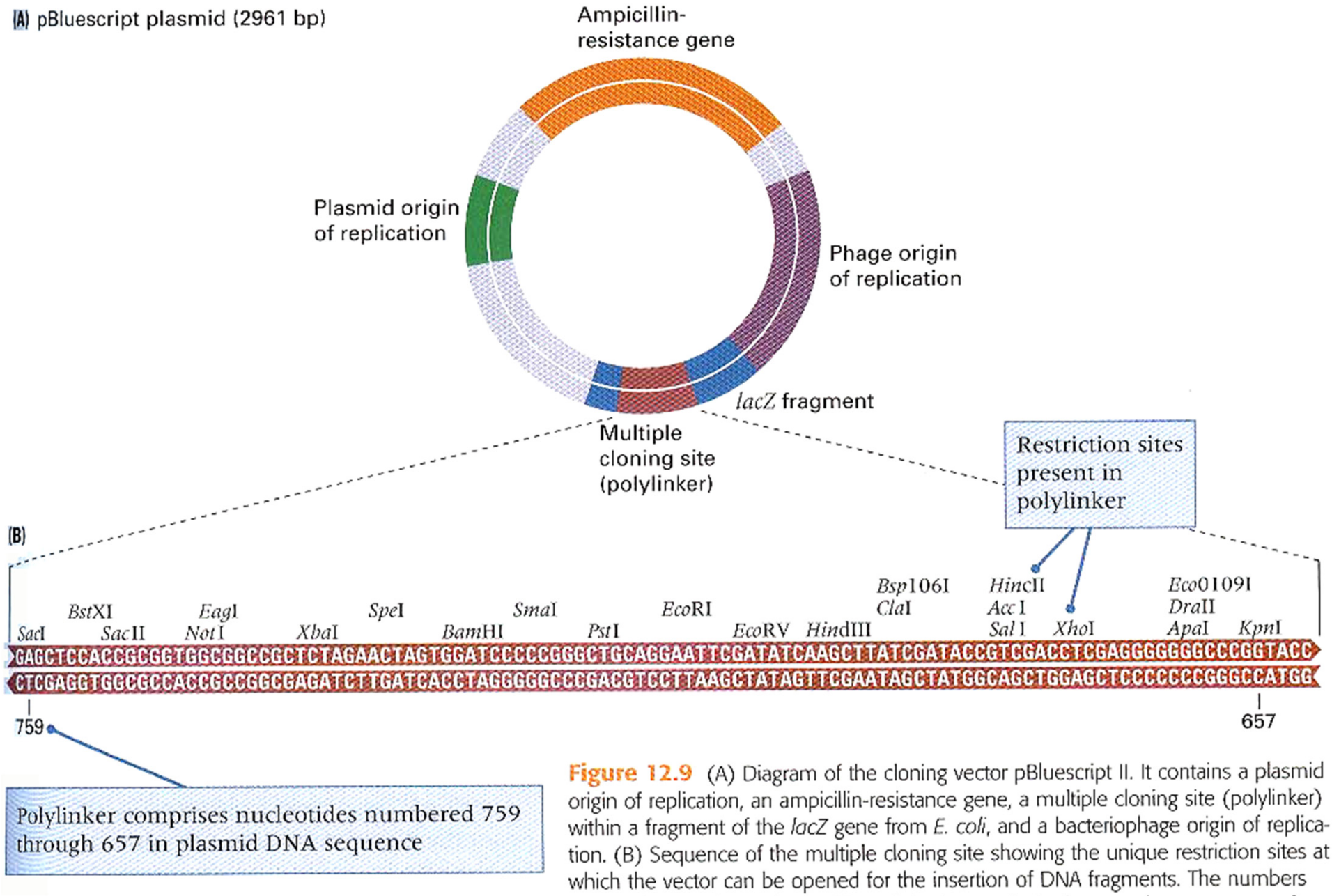
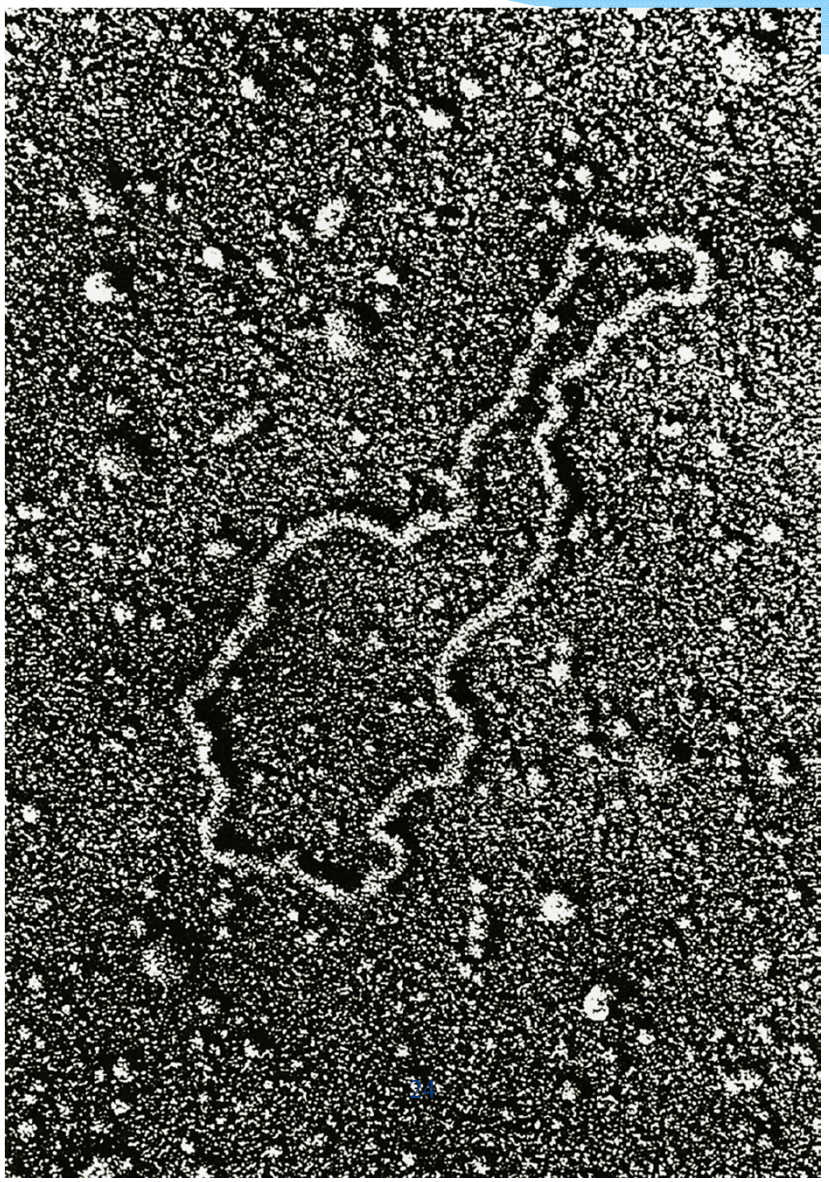
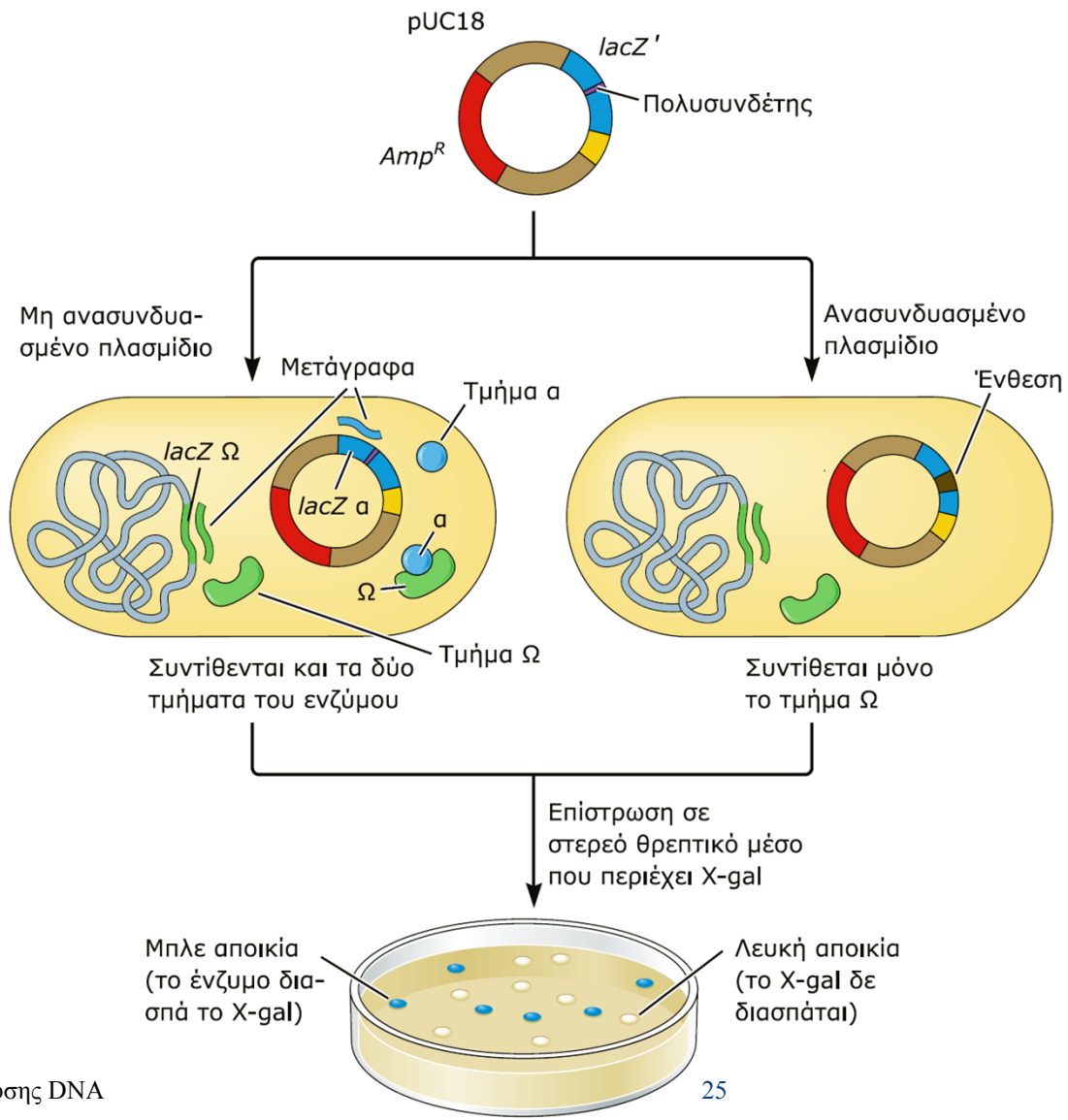


Figure 12.9 (A) Diagram of the cloning vector pBluescript II. It contains a plasmid origin of replication, an ampicillin-resistance gene, a multiple cloning site (polylinker) within a fragment of the *lacZ* gene from *E. coli*, and a bacteriophage origin of replication. (B) Sequence of the multiple cloning site showing the unique restriction sites at which the vector can be opened for the insertion of DNA fragments. The numbers 657 and 759 refer to the position of the base pairs in the complete sequence of pBluescript. [Courtesy of Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA.]

Φωτογραφία του πλασμιδίου pSC101 στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

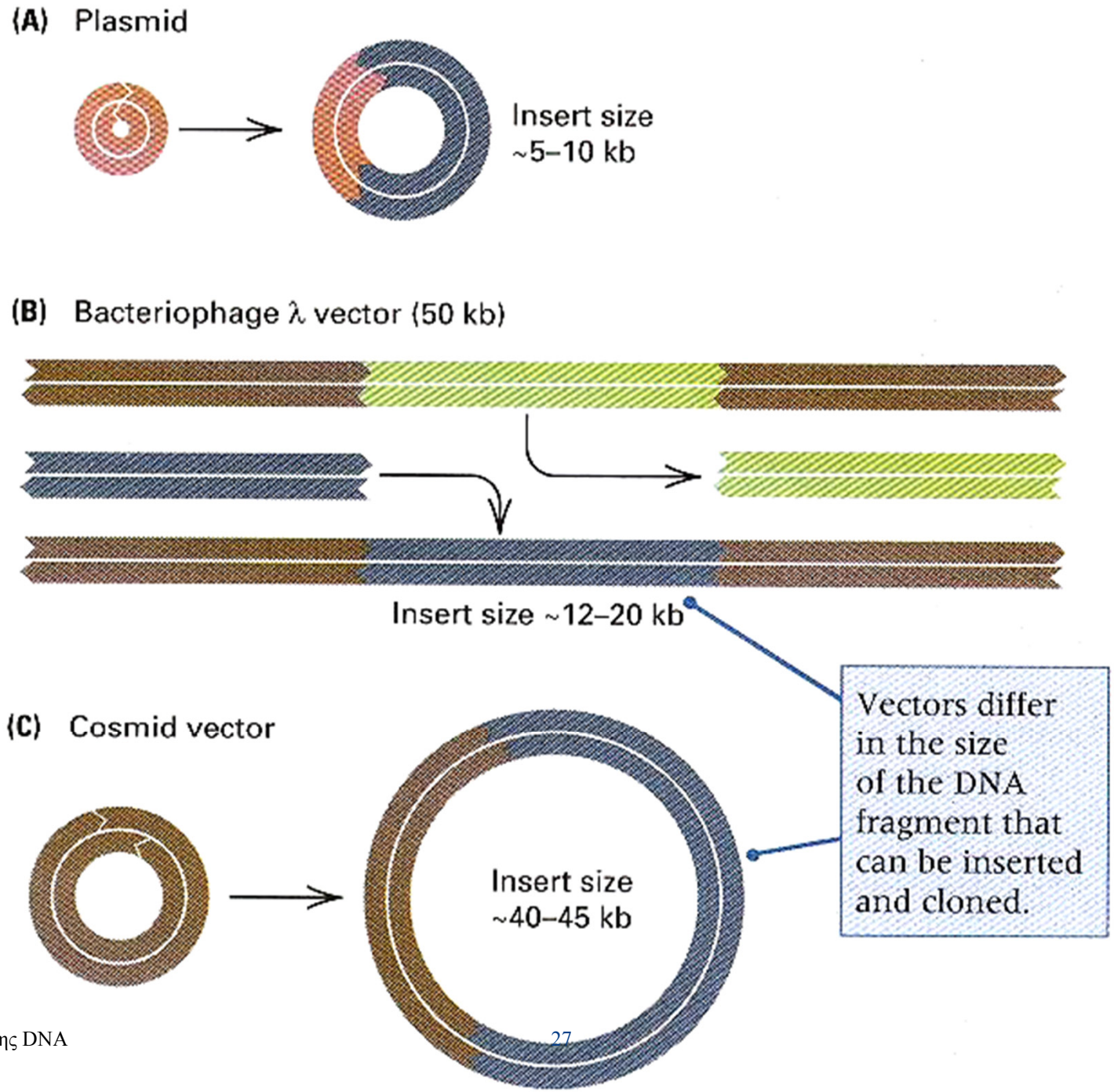


Διάκριση μπλε-λευκών αποικιών για τον εντοπισμό ανασυνδυασμένων φορέων.



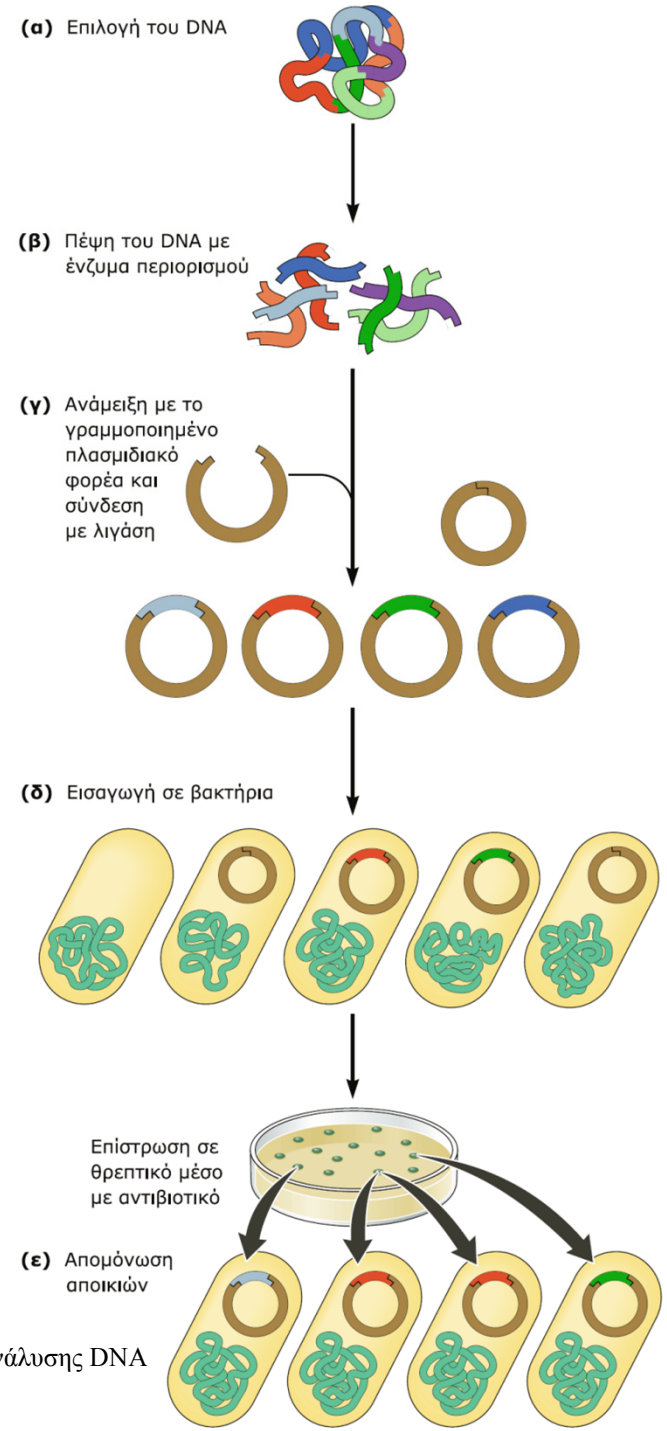
Χωρητικότητα κοινών φορέων κλωνοποίησης.

Φορέας	Μέγεθος ένθεσης (kb)
Πλασμίδια	< 10
Φάγοι	< 23
Κοσμίδια	30-46
Τεχνητά χρωμοσώματα του φάγου P1 (PAC)	130-150
Τεχνητά χρωμοσώματα βακτηρίων (BAC)	< 300
Τεχνητά χρωμοσώματα ζυμομύκητα (YAC)	200-2.000


(A) Plasmid
Insert size
~5–10 kb
(B) Bacteriophage λ vector (50 kb)
Insert size ~12–20 kb
(C) Cosmid vector
Insert size
~40–45 kb
Vectors differ in the size of the DNA fragment that can be inserted and cloned.

4. Αρχές κλωνοποίησης
5. Βιβλιοθήκες γενετικού υλικού: cDNA και γονιδιωματικού DNA

Τα πέντε βασικά βήματα της κλωνοποίησης



Τα πέντε βασικά βήματα της κλωνοποίησης DNA σε πλασμίδιο

Κλωνοποίηση: Βήμα πρώτο

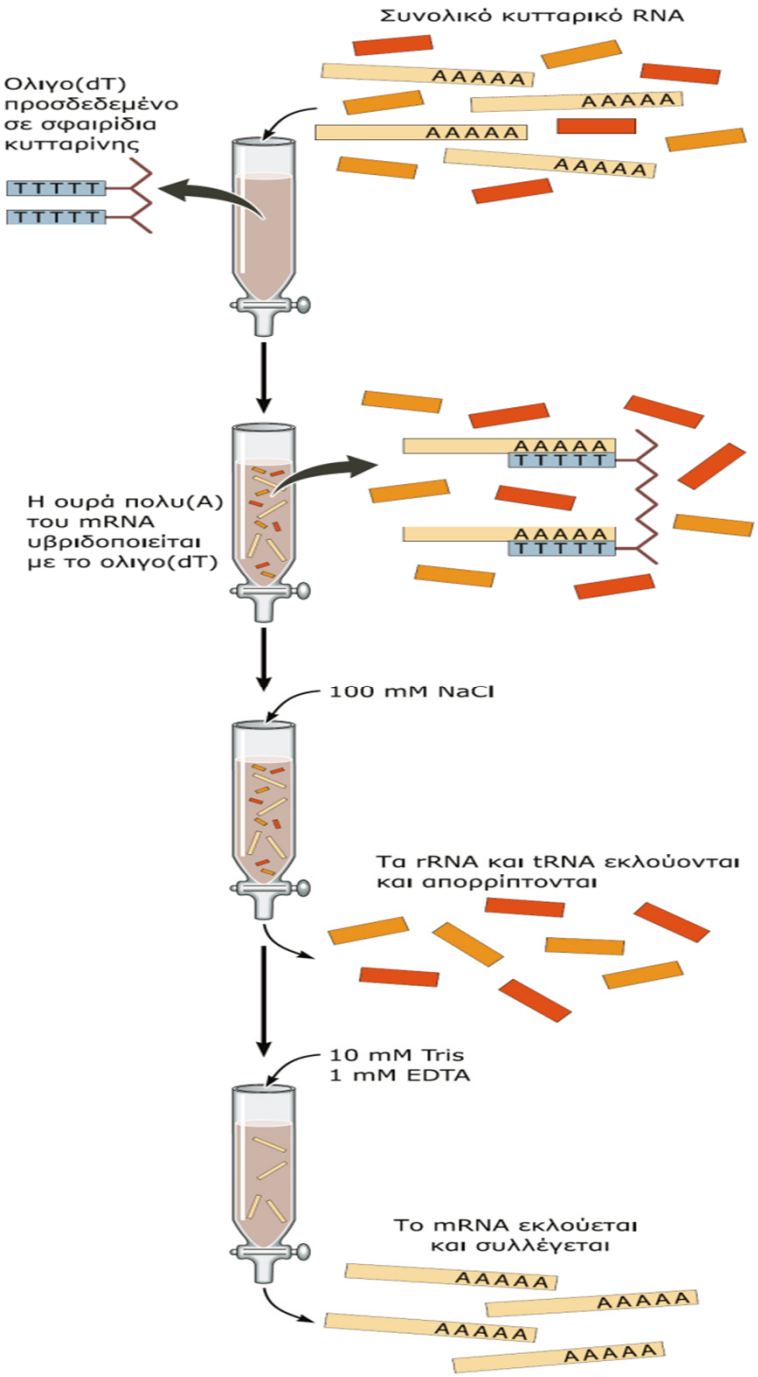
Επιλογή νουκλεϊκού οξέος

* Χρωμοσωμικό DNA ή cDNA ?
* Καθαρότητα
* Επιλογή του κατάλληλου δείγματος

Κλωνοποίηση Βήμα πρώτο:

Α. Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης

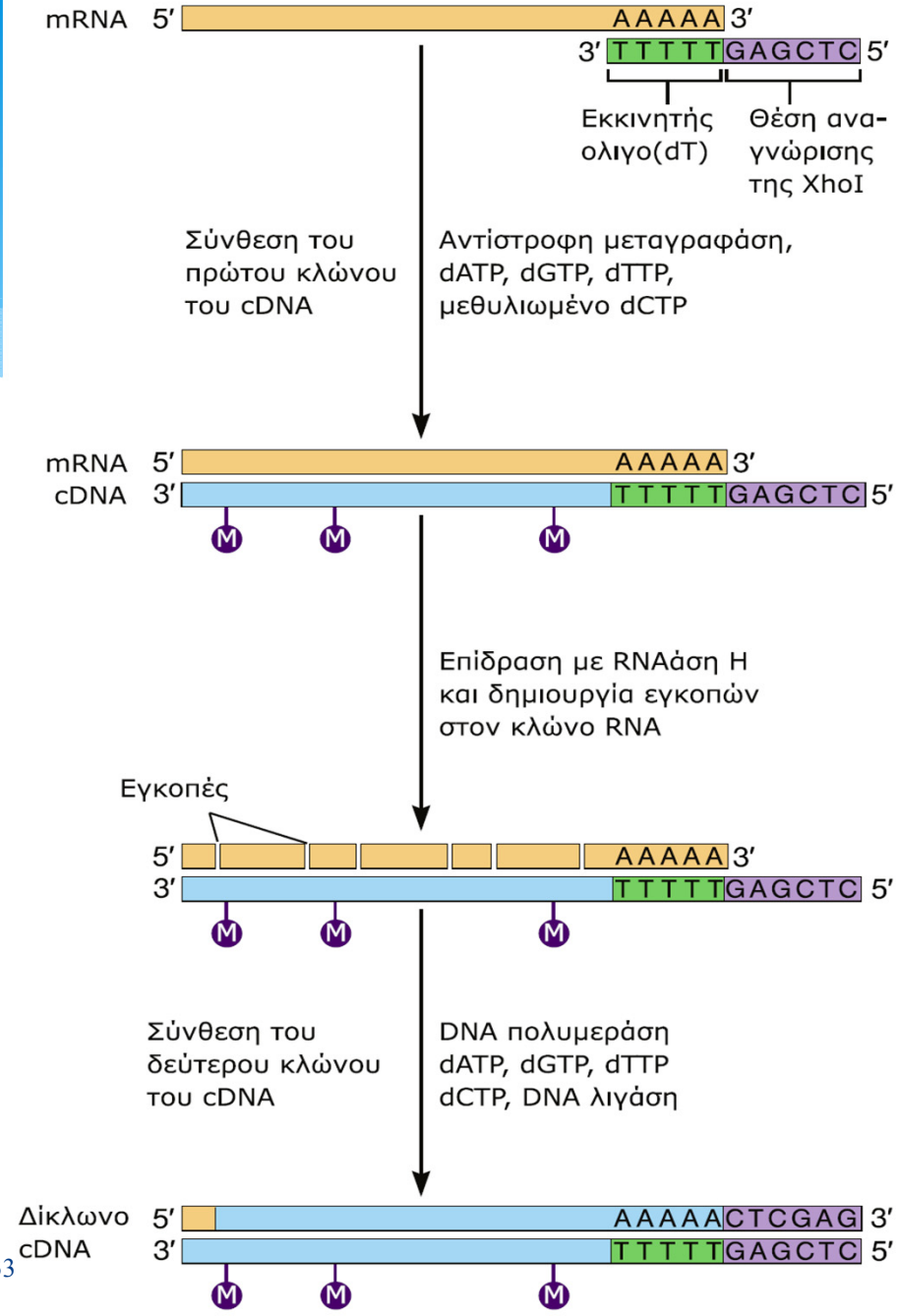
Απομόνωση mRNA



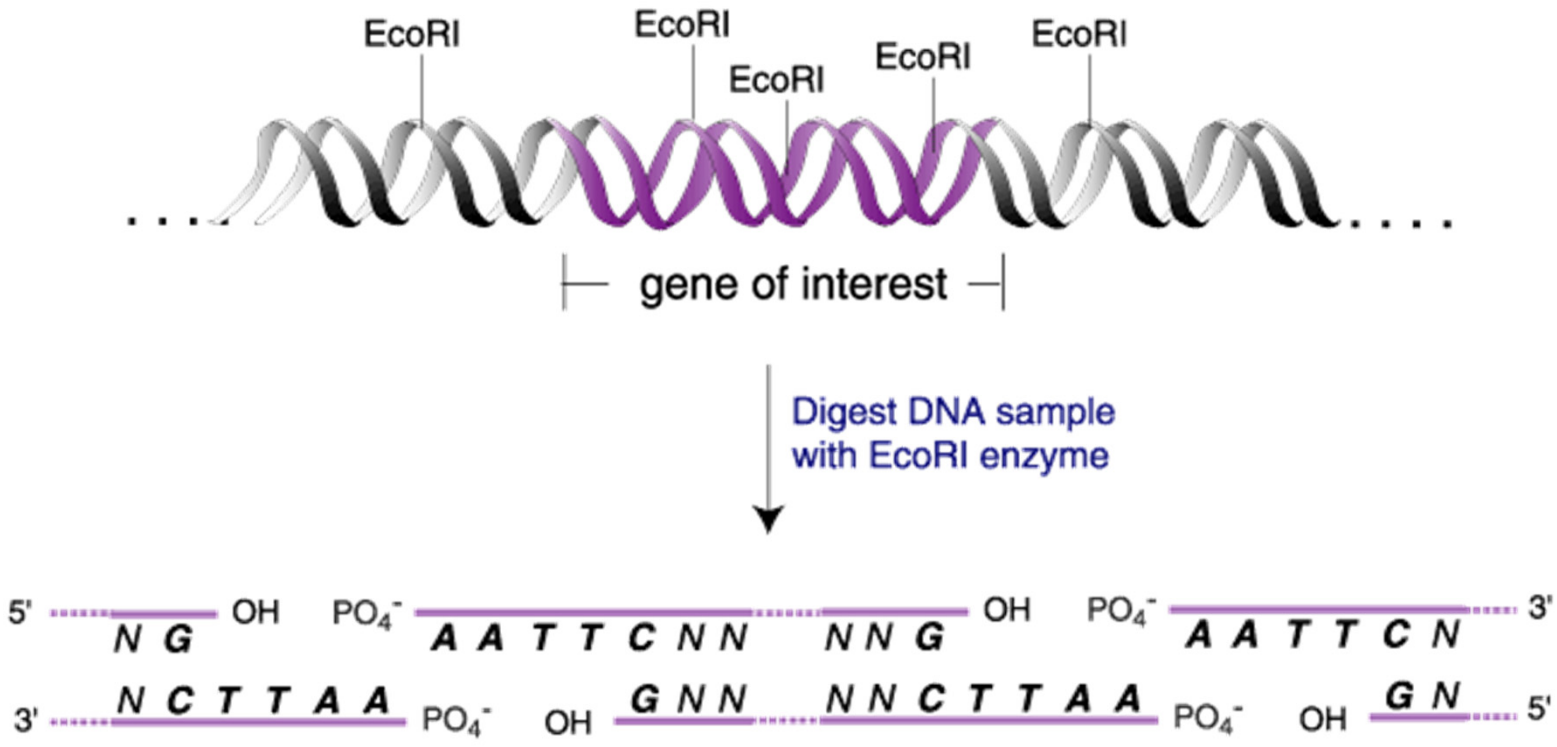
Κλωνοποίηση Βήμα πρώτο:

Α. Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης

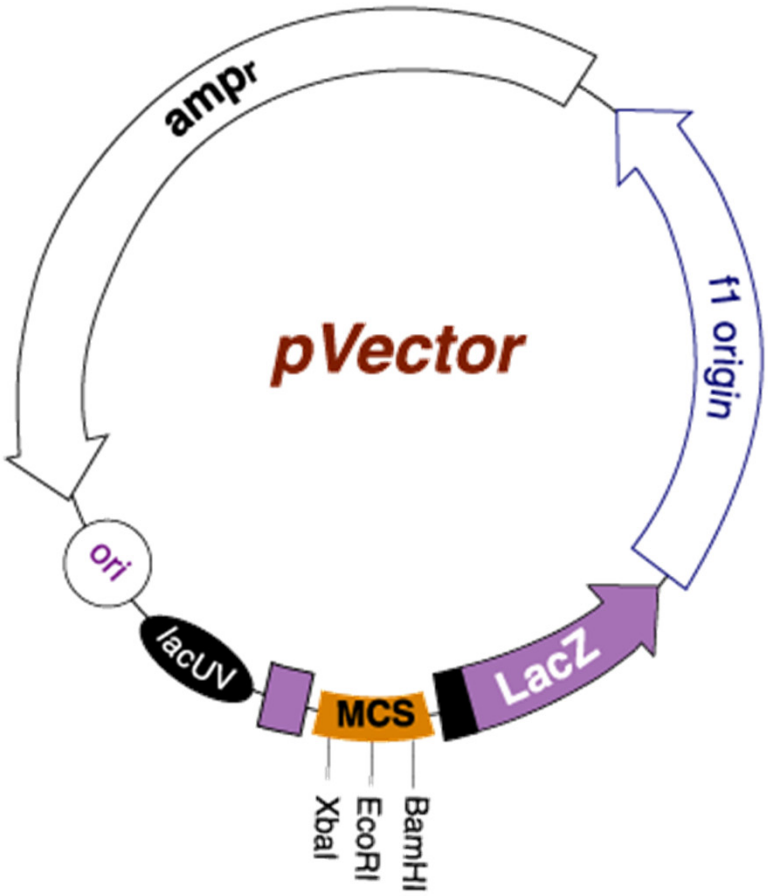
Σύνθεση cDNA



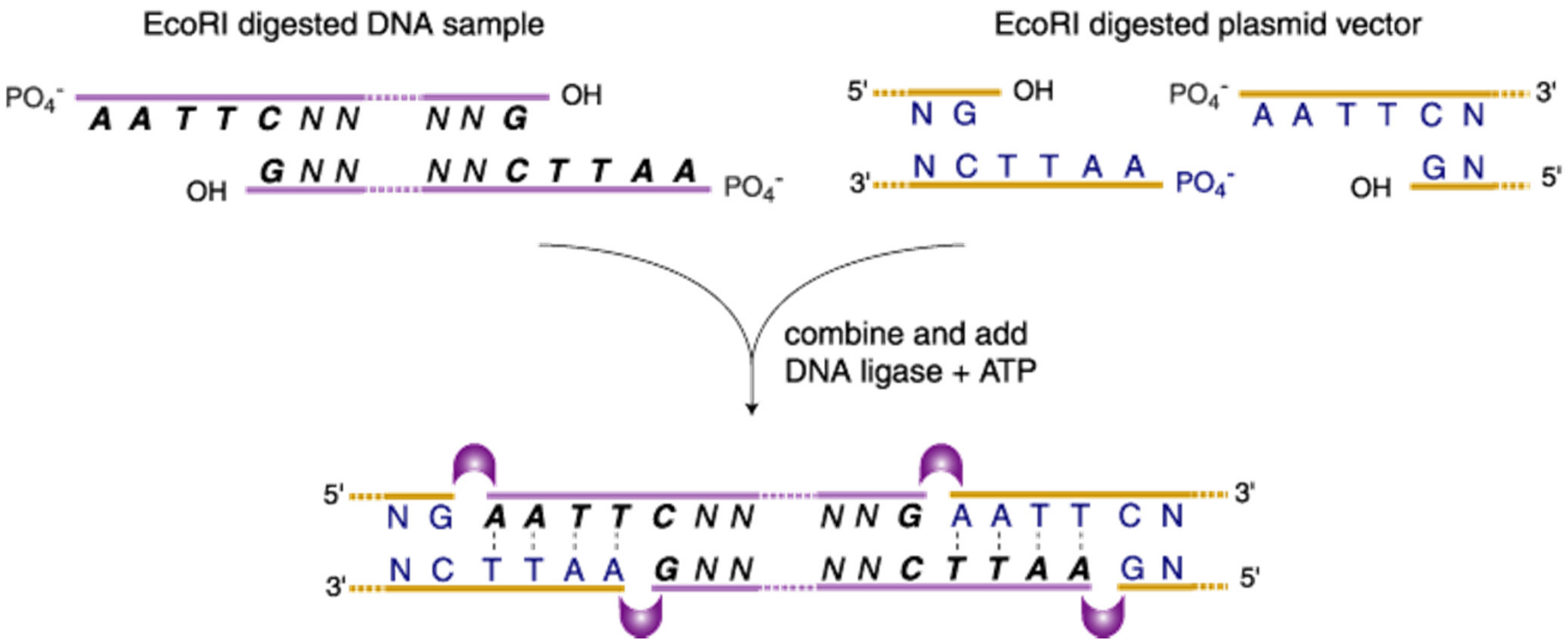
Κλωνοποίηση Βήμα πρώτο:
Β. Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης



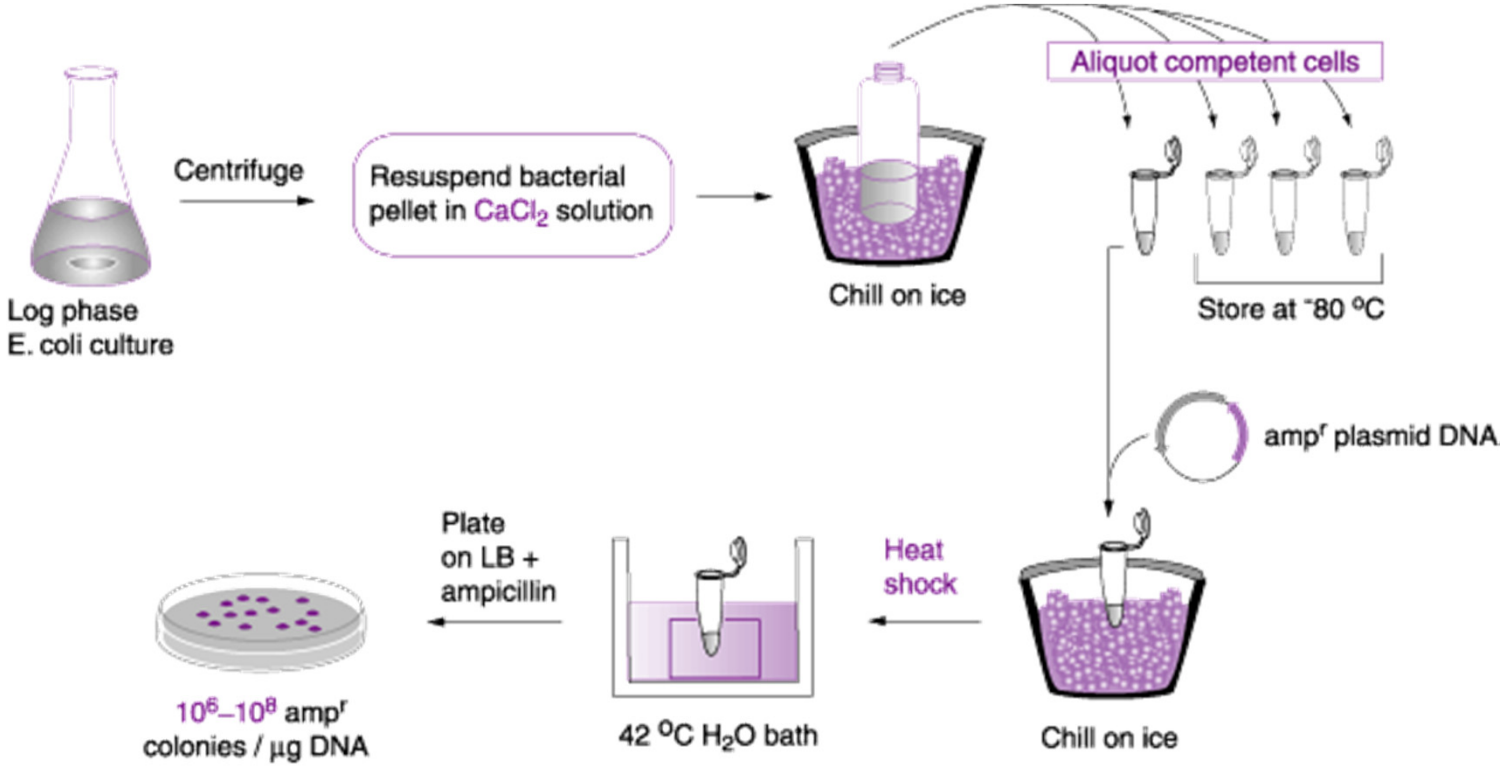
Κλωνοποίηση
Βήμα δεύτερο:
Πέψη πλασμιδιακού φορέα με ένζυμα περιορισμού



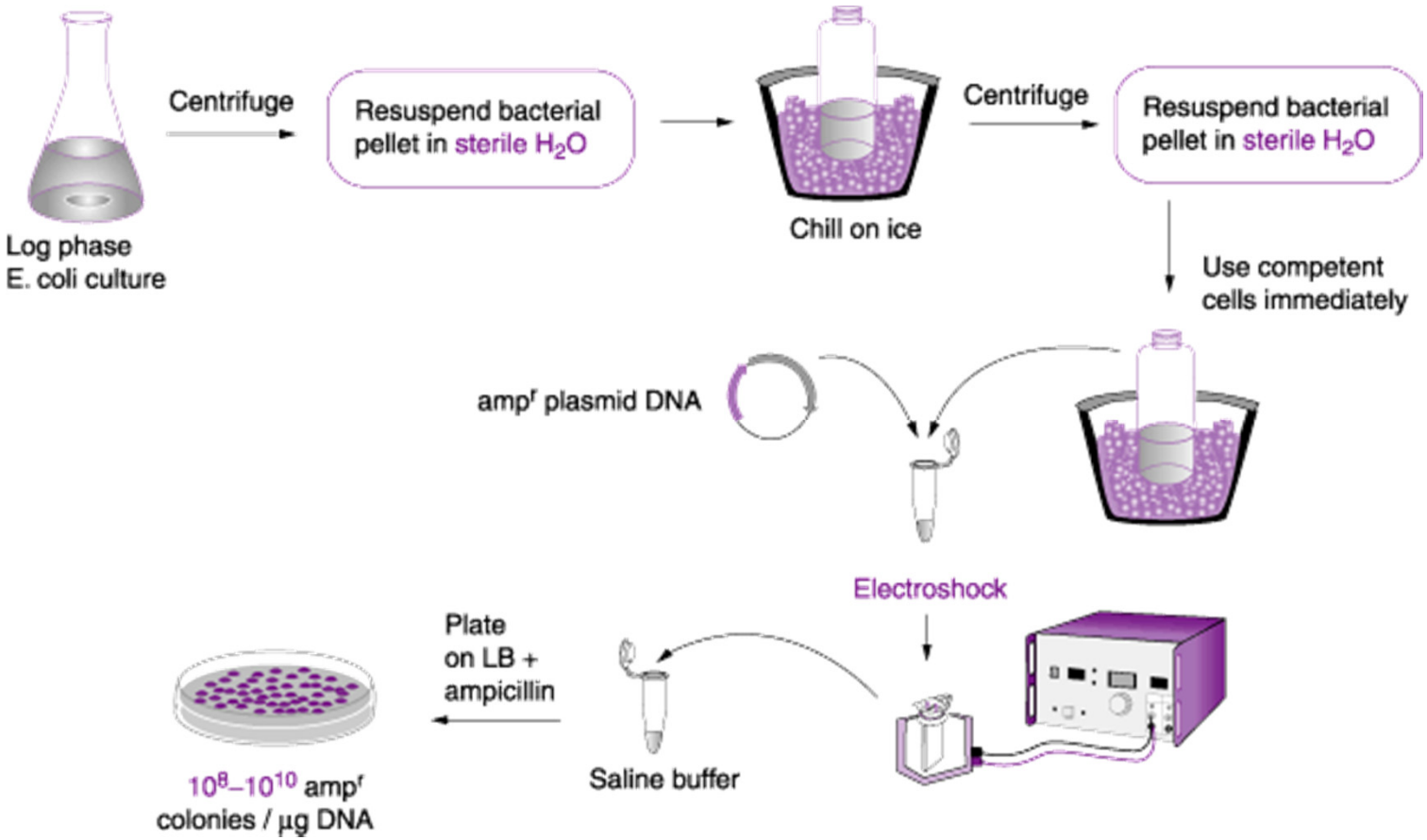
Κλωνοποίηση Βήμα τρίτο:
Σύνδεση προϊόντων πέψης DNA με πλασμιδιακό φορέα



Κλωνοποίηση Βήμα τέταρτο:
Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με τα προϊόντα σύνδεσης

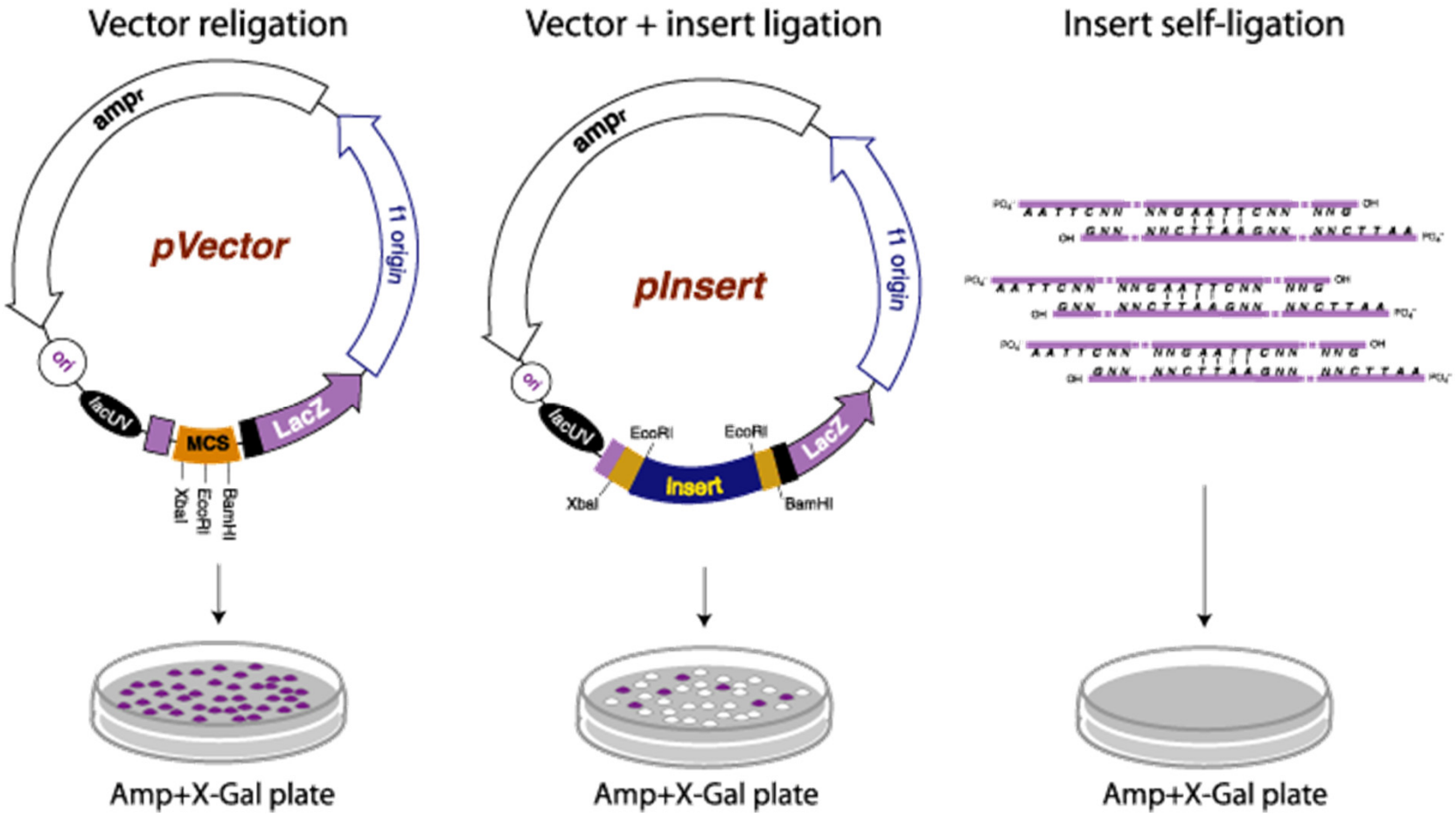


Χημικός μετασχηματισμός με $CaCl_2$

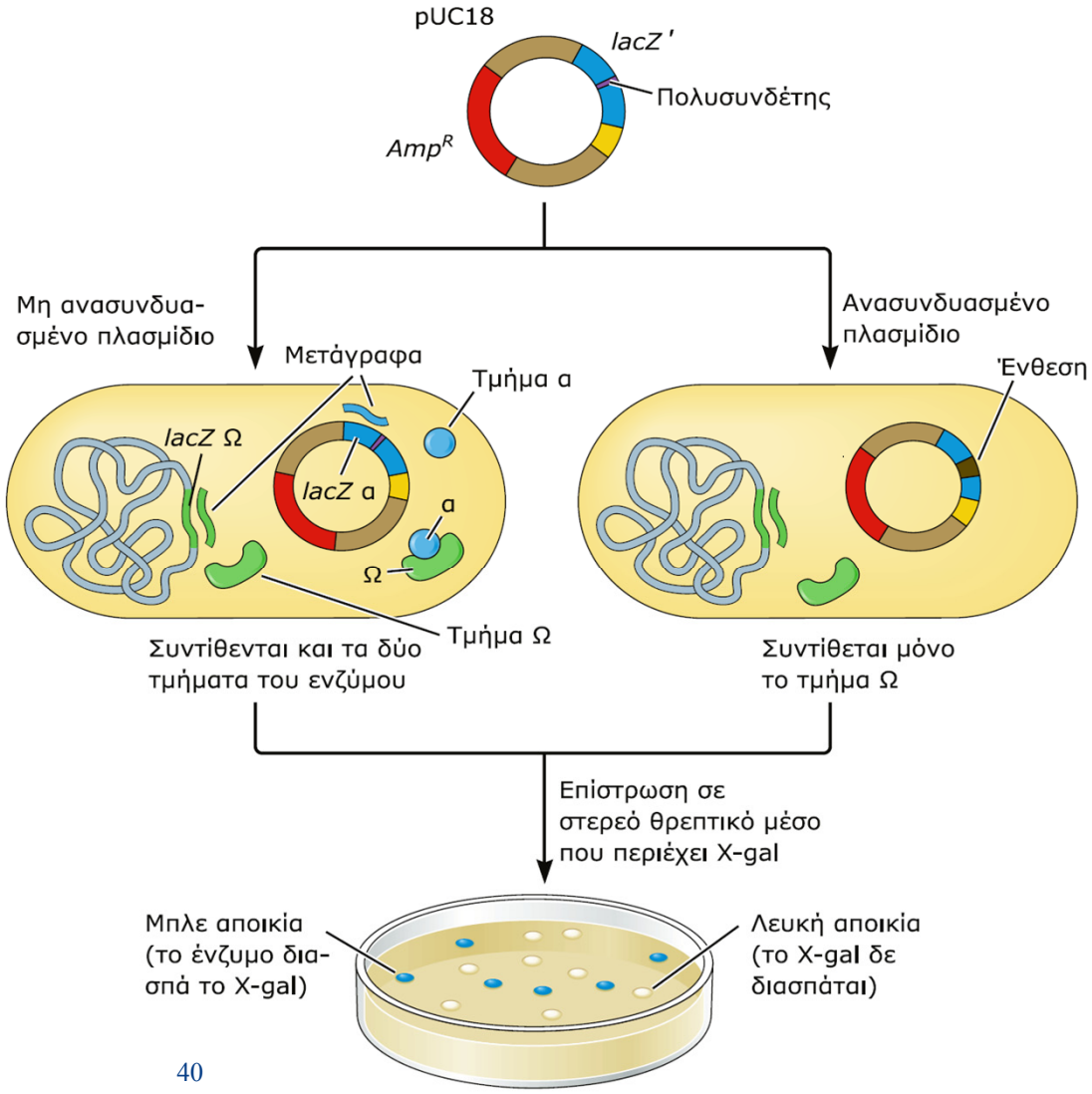


Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση

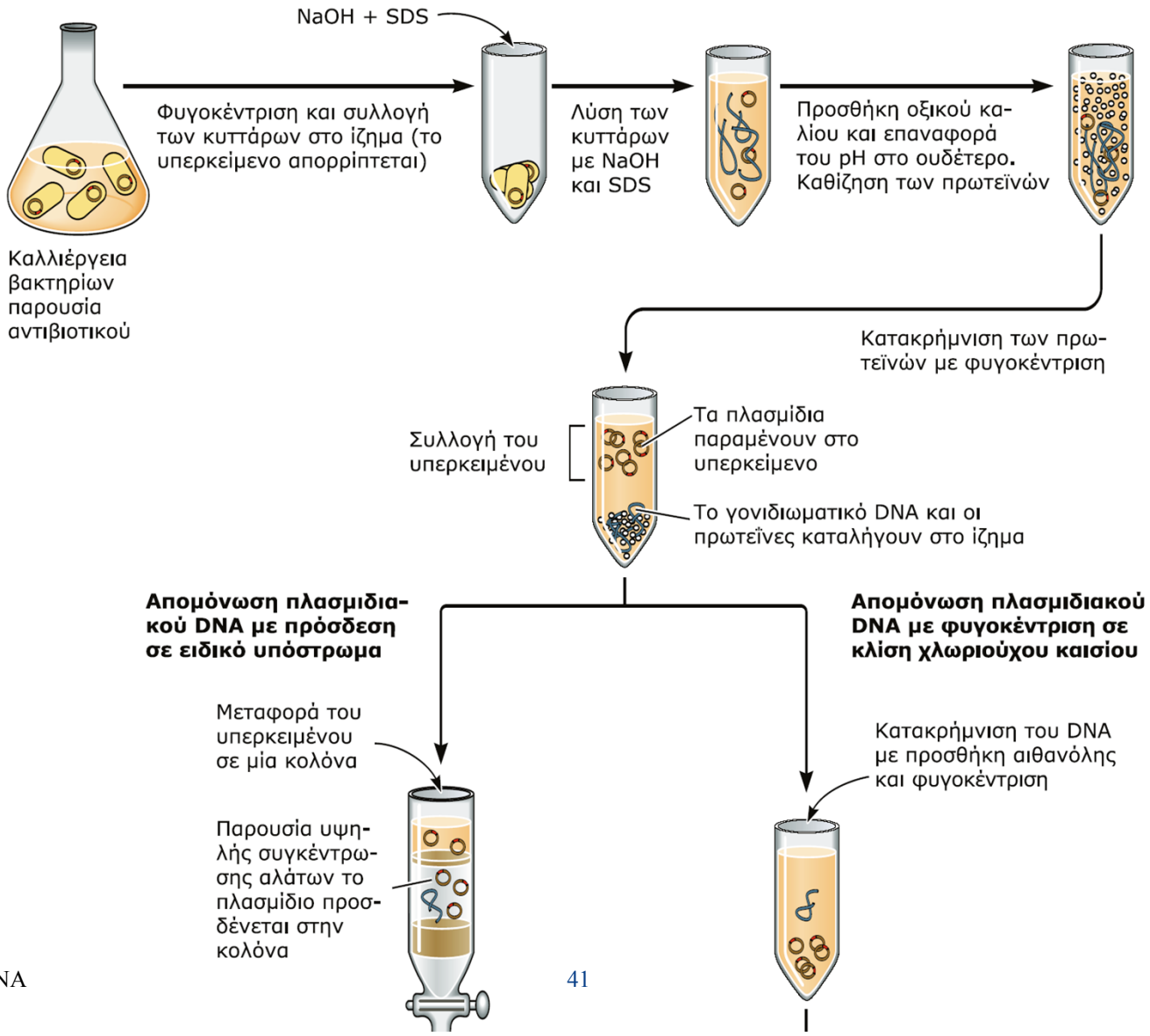
Ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό



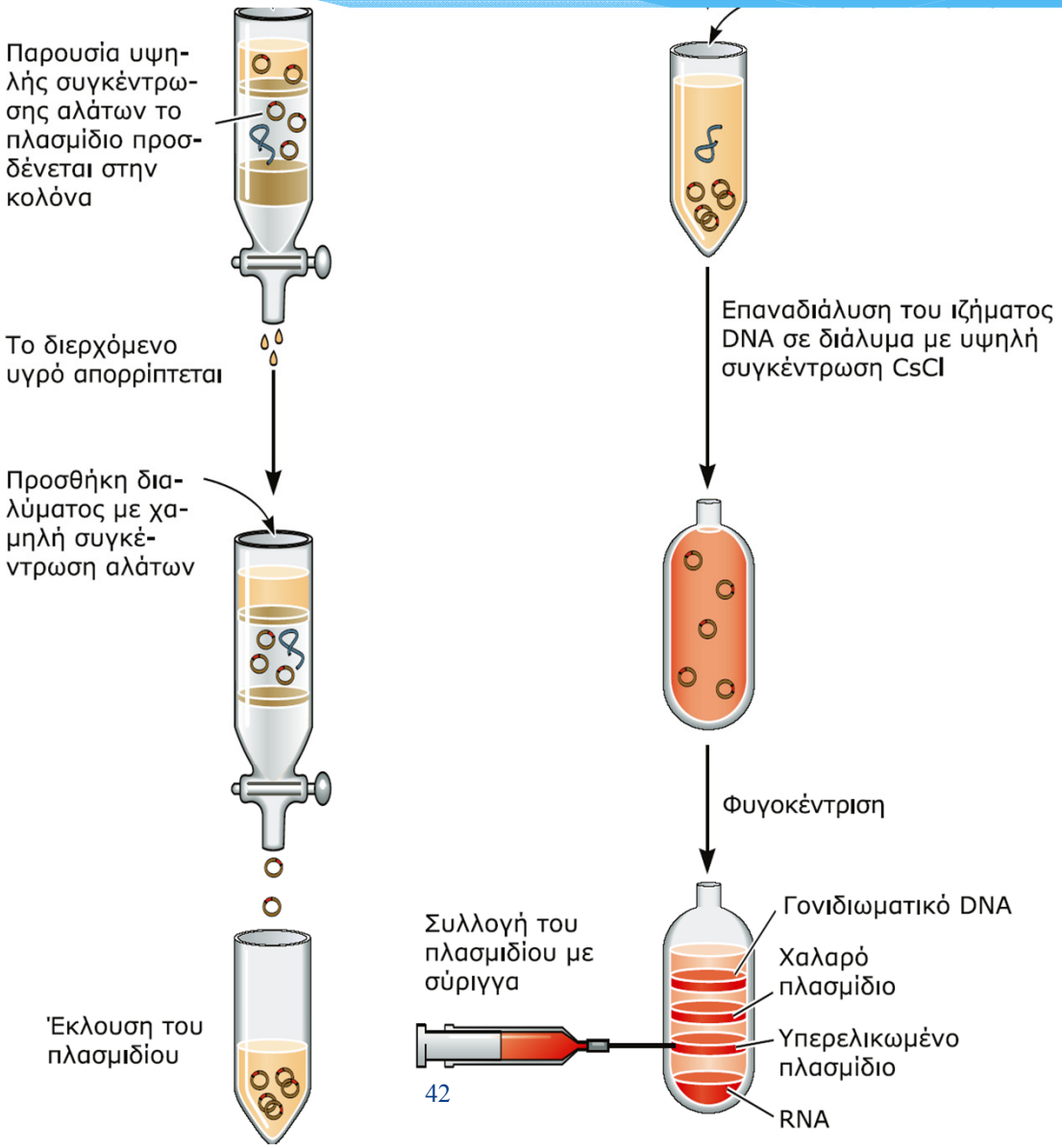
Κλωνοποίηση Βήμα πέμπτο:
Διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων



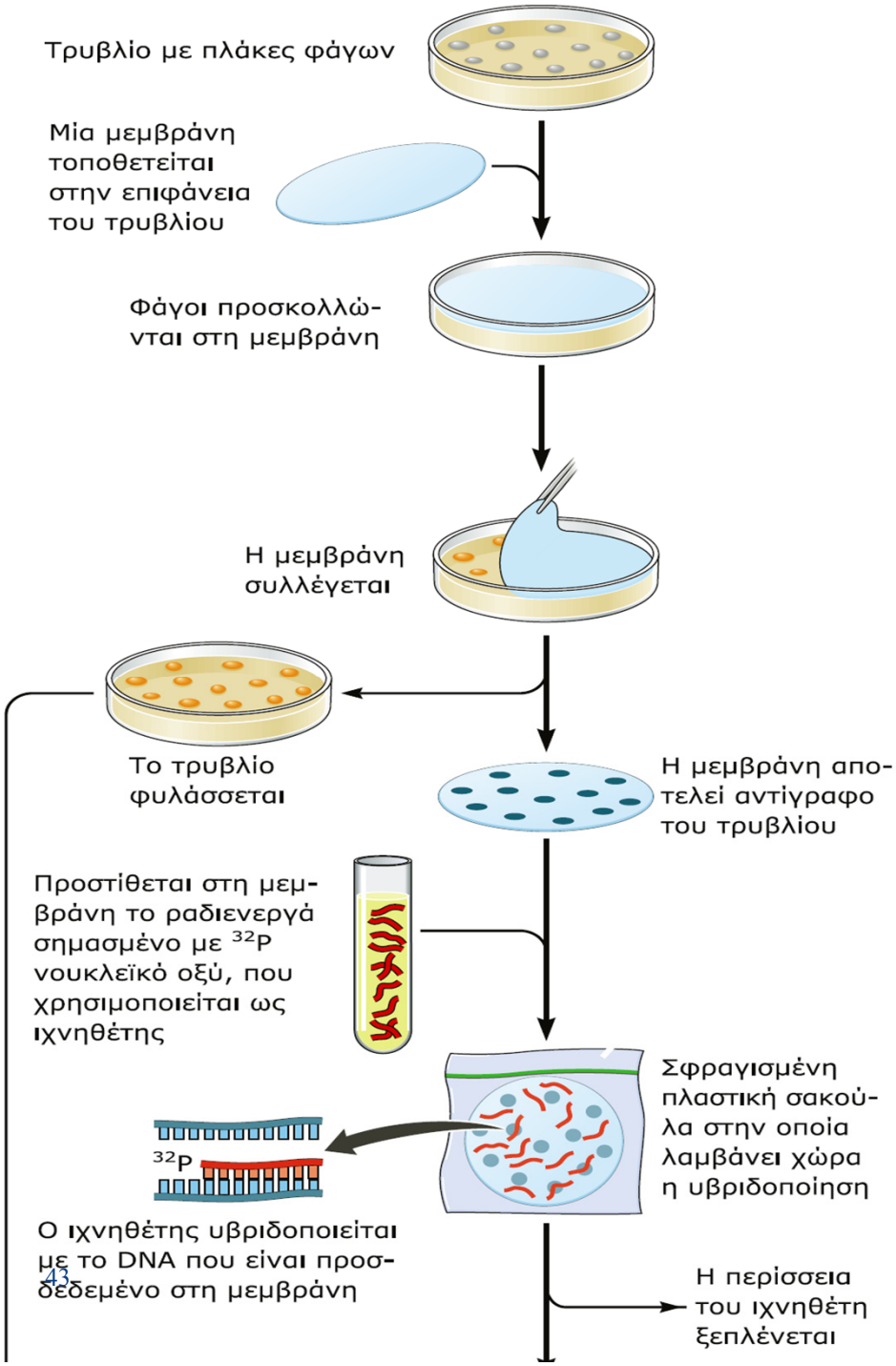
Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από *Escherichia coli*



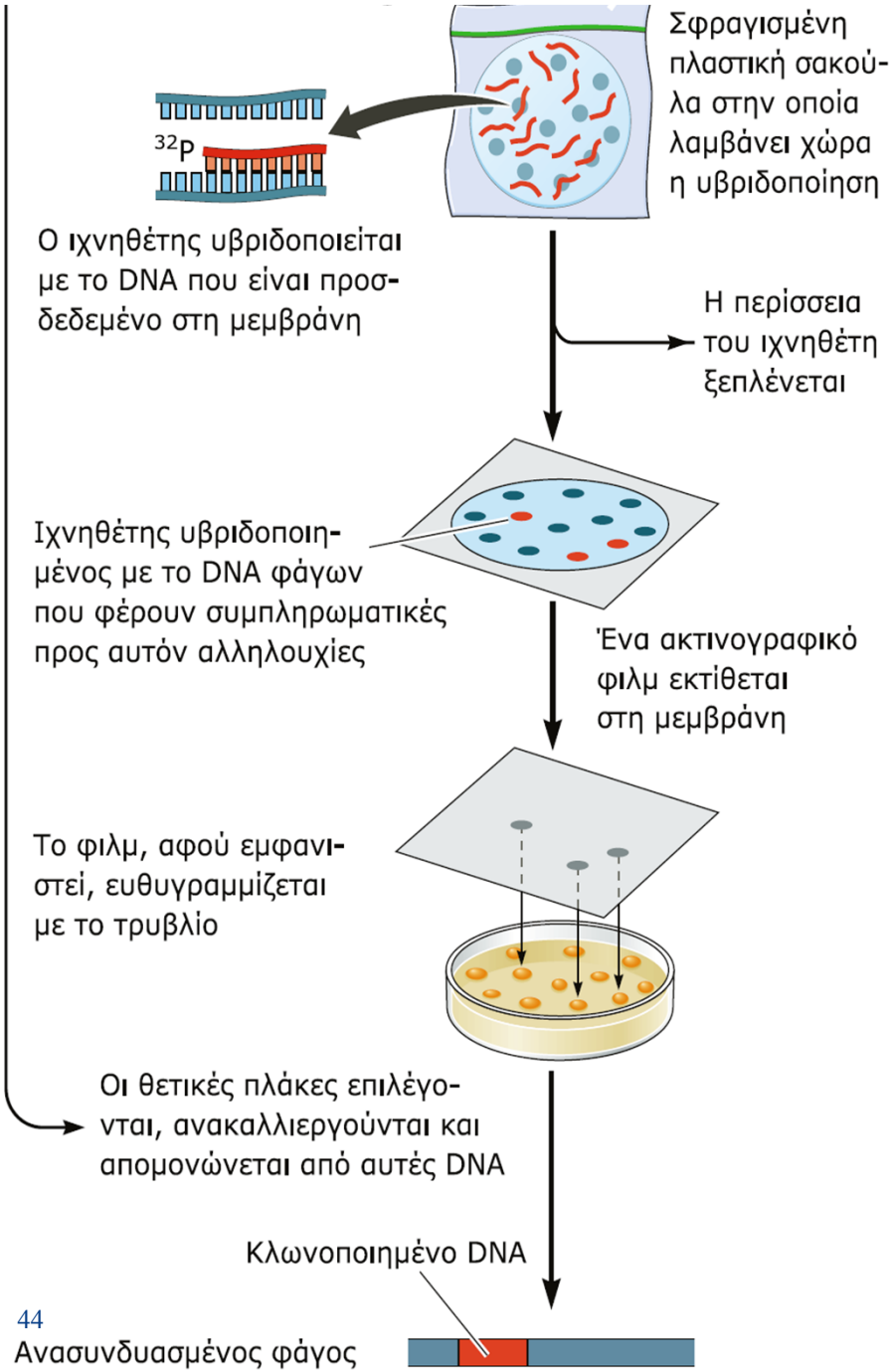
Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από *Escherichia coli*



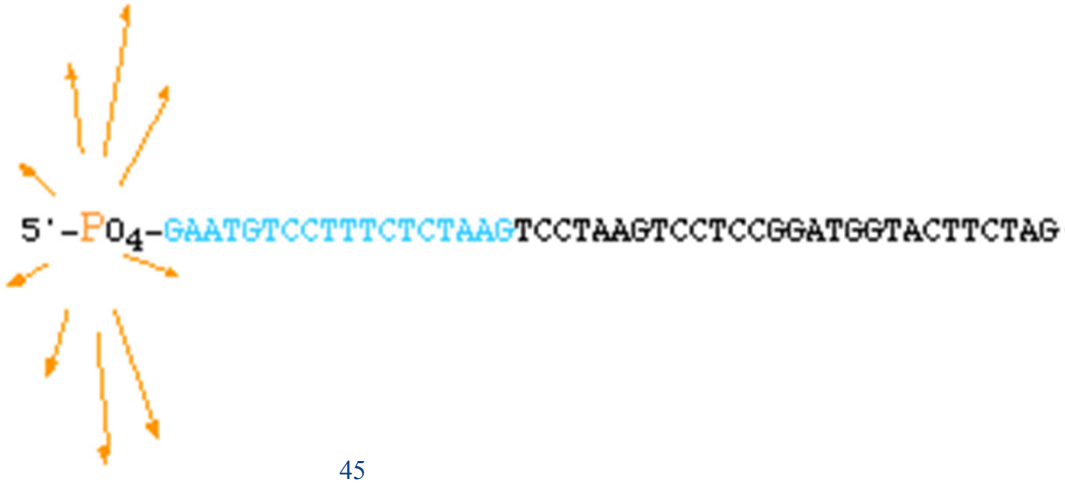
Σάρωση βιβλιοθήκης για τον εντοπισμό του επιθυμητού κλώνου



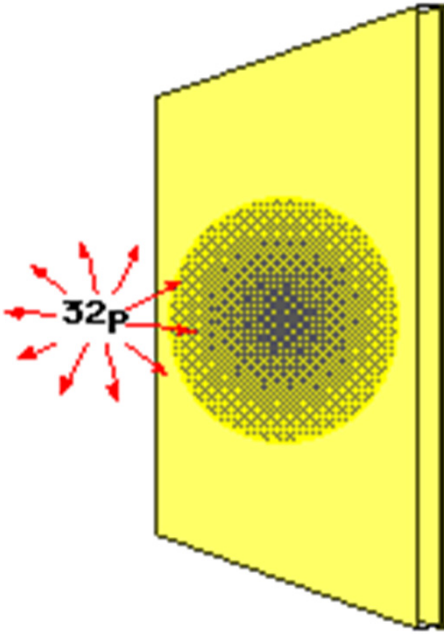
Σάρωση βιβλιοθήκης για τον εντοπισμό του επιθυμητού κλώνου

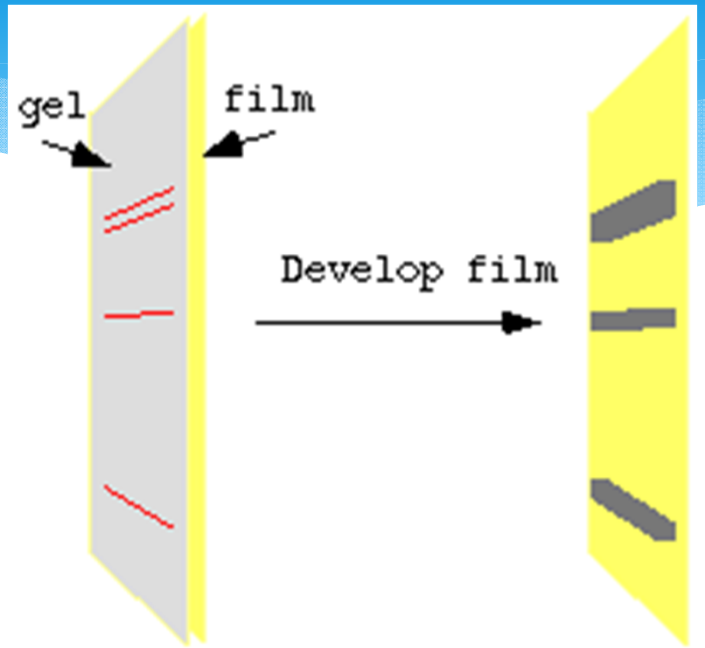


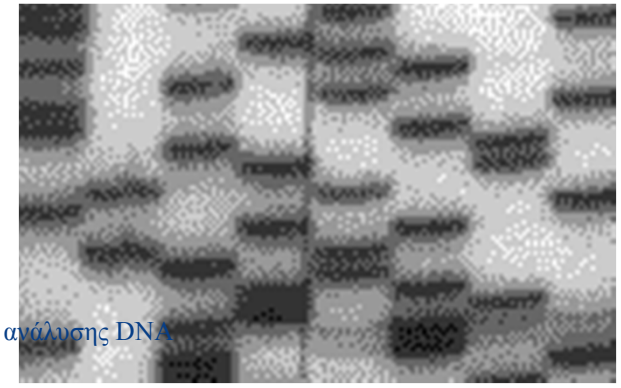
Ραδιενεργή σήμανση



Αυτοραδιογραφία







6. Αλληλούχηση DNA

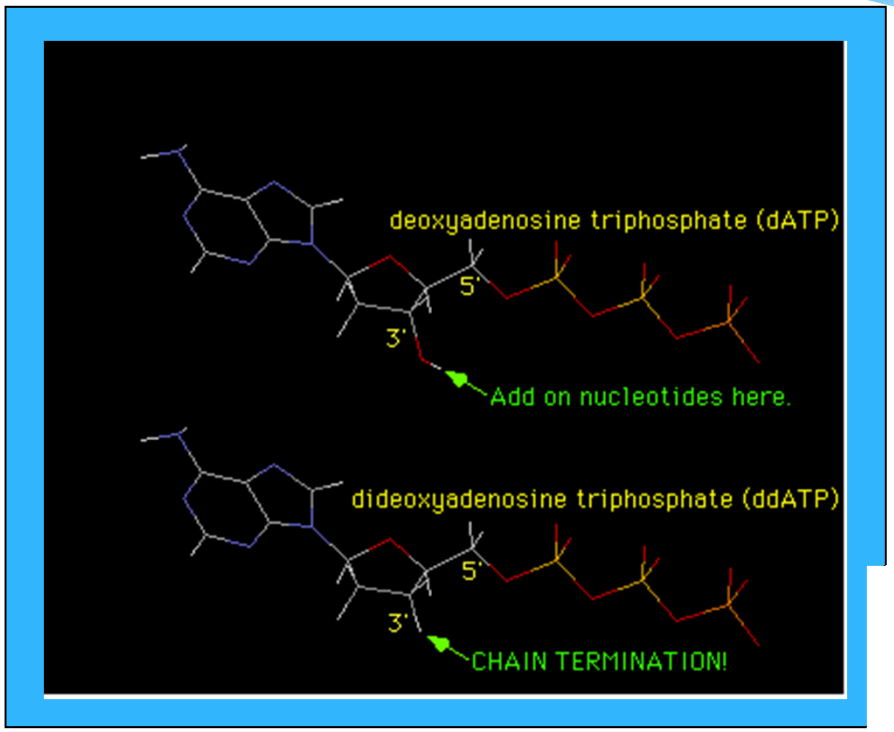
Διαδικασία αλληλούχησης με τη μέθοδο Sanger

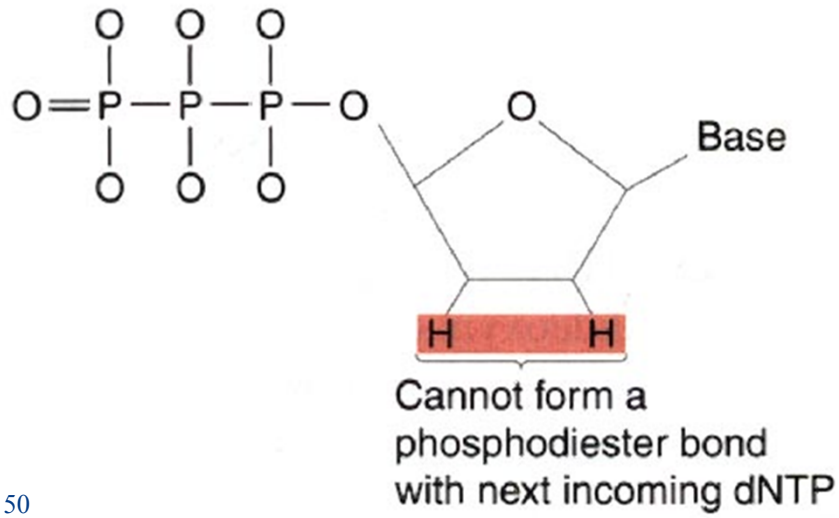
- Η πιο χρησιμοποιούμενη σήμερα (ή τροποποιήσεις της)
- Βασίζεται στη διαδικασία της αντιγραφής

Μεθοδολογία

- Βασίζεται στον βασεο - ειδικό τερματισμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης επέκτασης εκκινητή (χρήση διδεόξυ-νουκλεοτιδίων)
  - Σήμανση εκκινητή ή νουκλεοτιδίου
  - Αποδιάταξη DNA – επαναδιάταξη με εκκινητή
  - Χωρισμός δείγματος σε 4 τμήματα
  - Προσθήκη σε κάθε τμήμα των τεσσάρων κανονικών νουκλεοτιδίων και σε κάθε ένα από αυτά μια ποσότητα ενός τροποποιημένου διδεόξυ – νουκλεοτιδίου
  - Αντίδραση επέκτασης – τερματισμός σε διαφορετικά σημεία – σε κάθε δείγμα όμως σε ίδια βάση (A ή G ή C ή T)
  - Παράλληλη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Τερματισμός με διδεόξυ - νουκλεοτίδιο

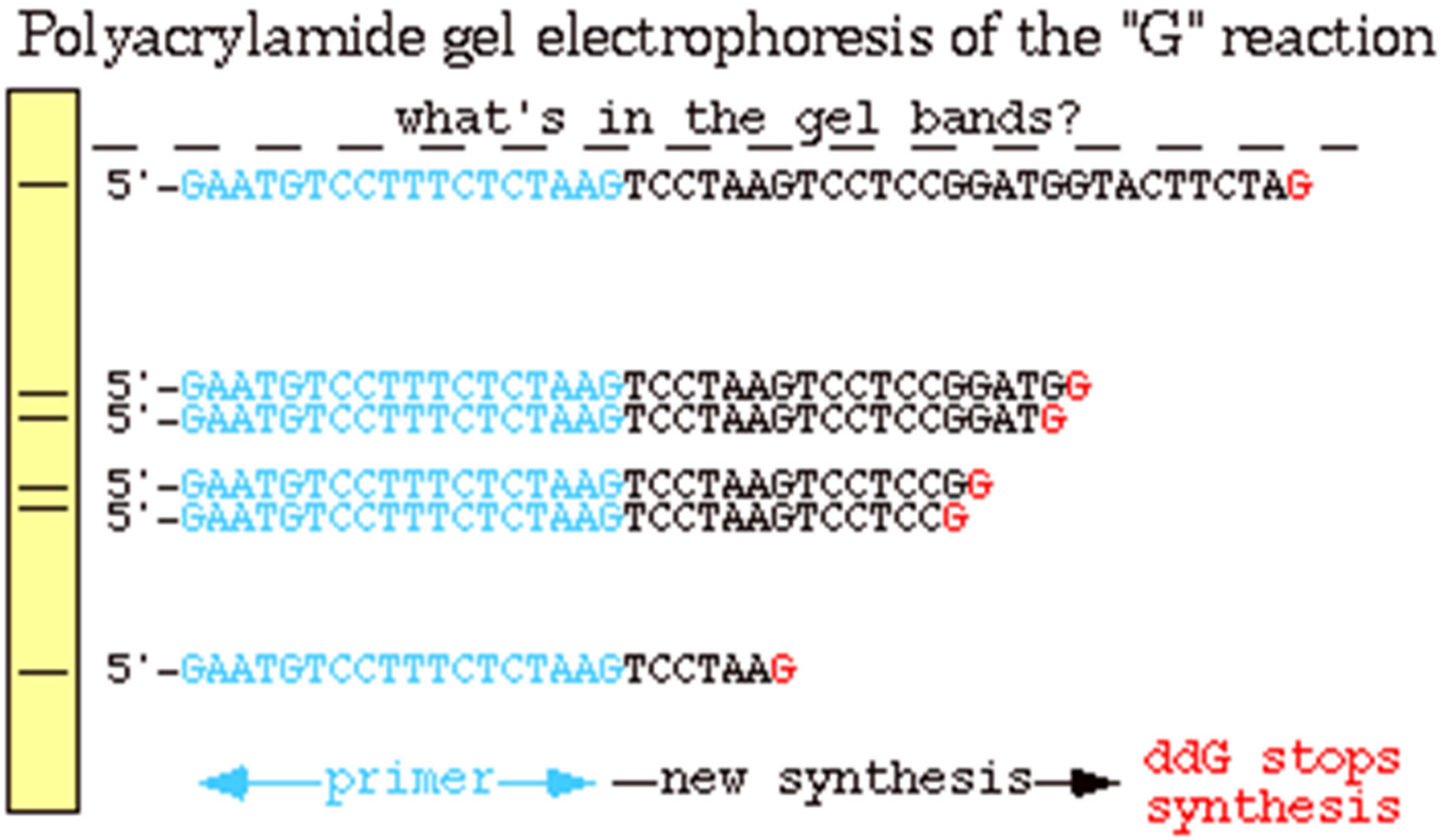




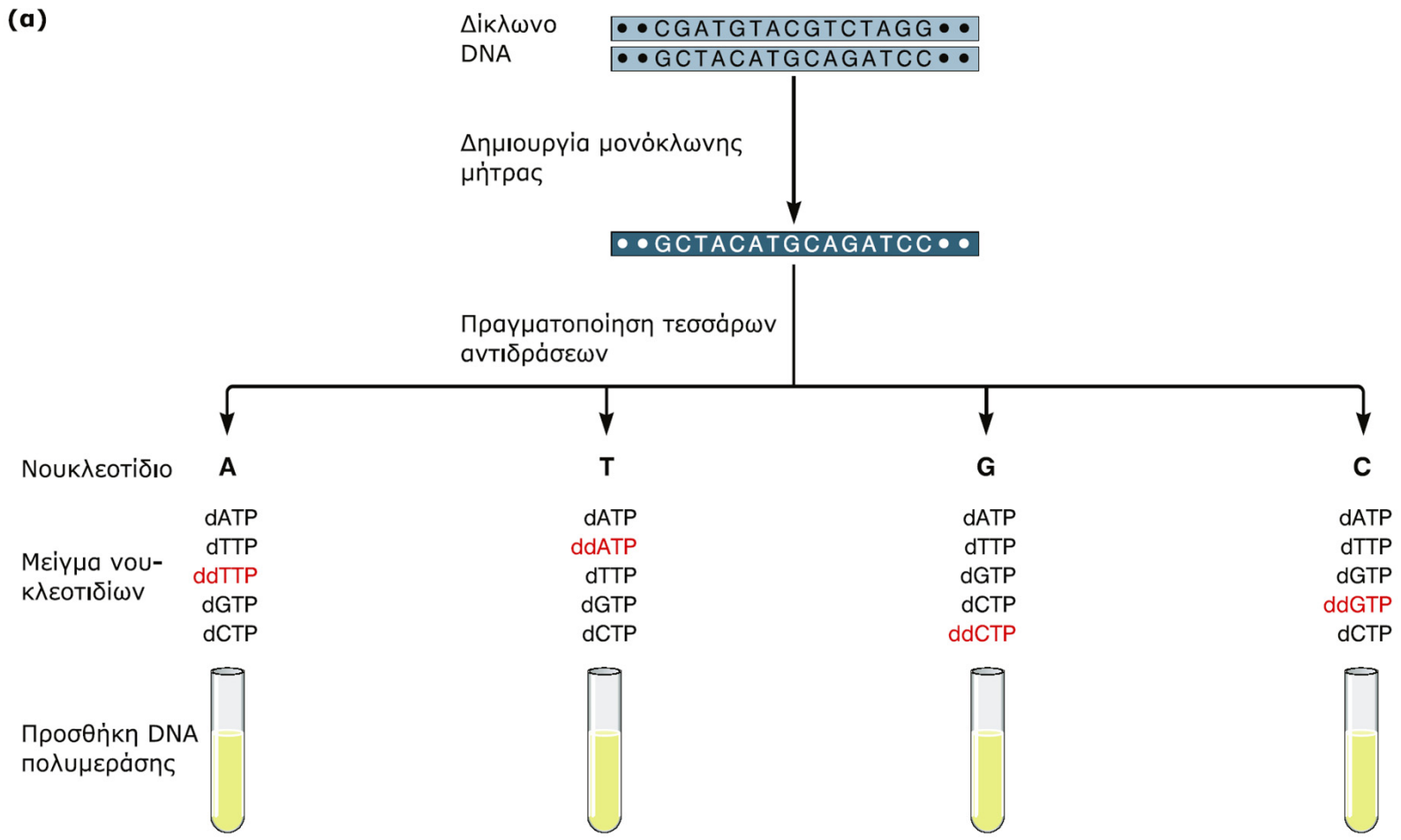
Τερματισμός επέκτασης σε διαφορετικά σημεία της αλυσίδας

```
     5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAG
3'-GGAGACTTACAGGAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

     5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCCG
3'-GGAGACTTACAGGAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

     5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCCGG
3'-GGAGACTTACAGGAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

     5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCCGGATG
3'-GGAGACTTACAGGAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

     5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCCGGATGG
3'-GGAGACTTACAGGAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

     5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCCGGATGGTACTTCTAG
3'-GGAGACTTACAGGAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'
```

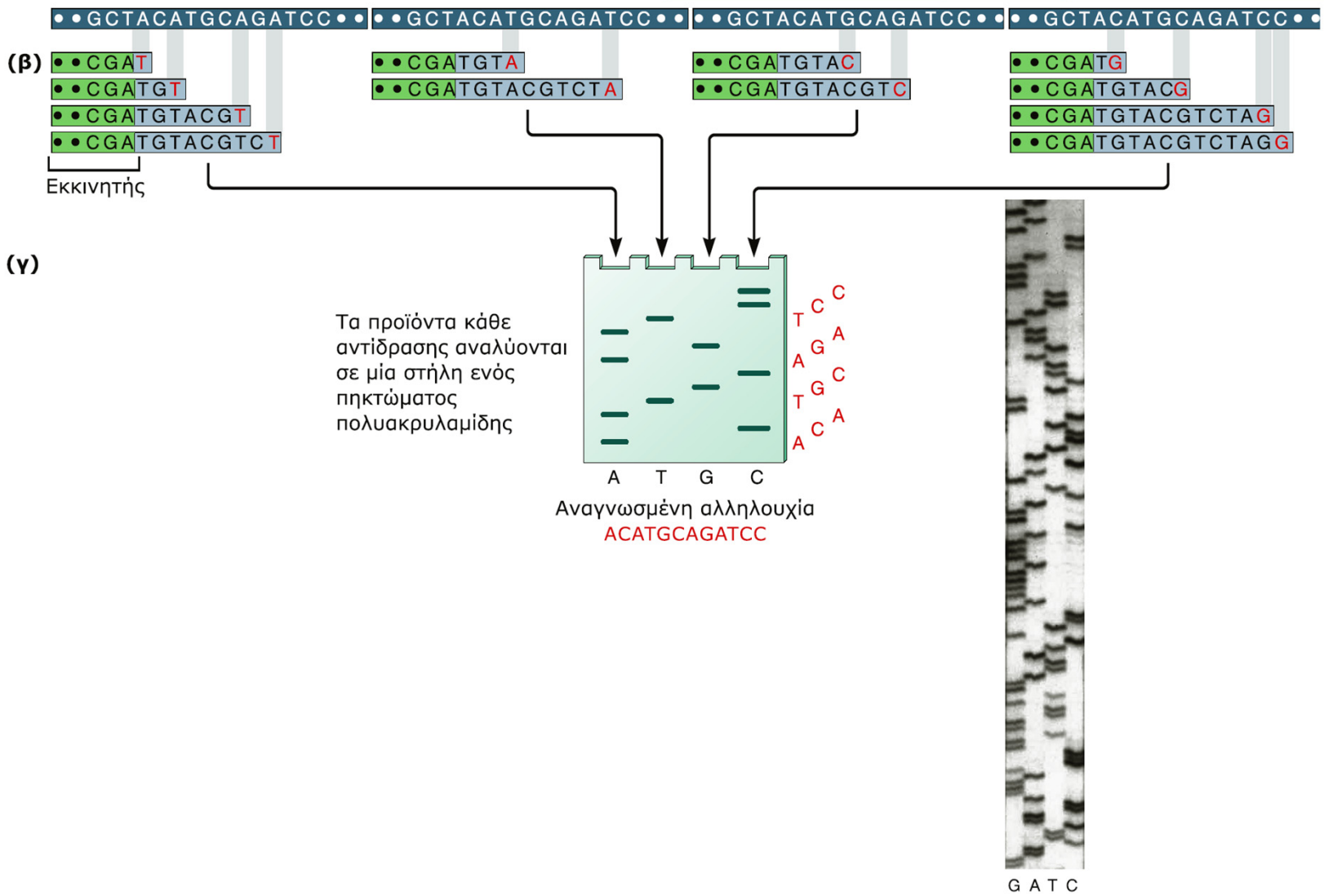
Ηλεκτροφόρηση μίας αντίδρασης τερματισμού



Η διαδικασία αλληλούχησης DNA με τη μέθοδο του Sanger που βασίζεται στη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων.



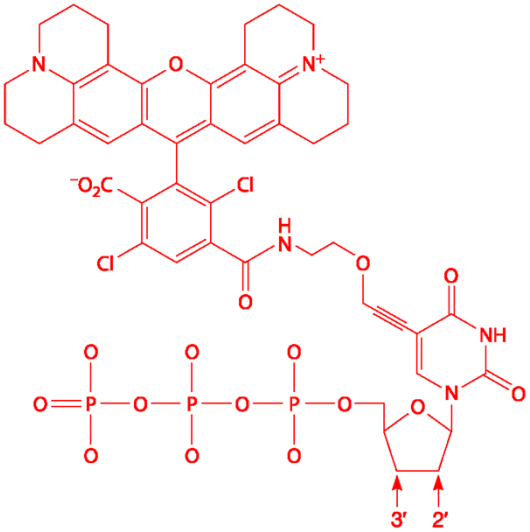
Η διαδικασία αλληλούχησης DNA με τη μέθοδο του Sanger που βασίζεται στη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων.



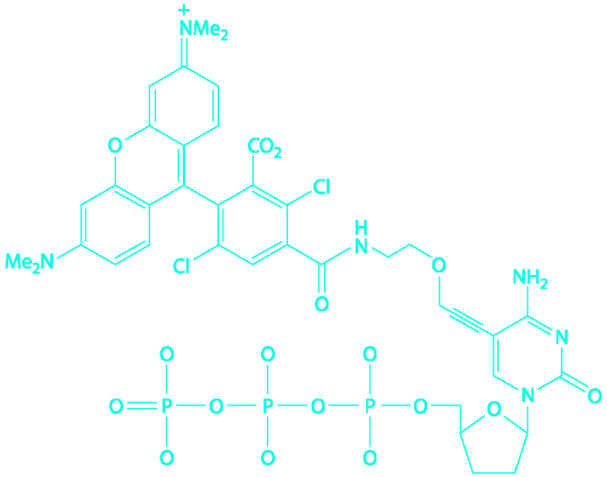
Τεχνικές βελτιώσεις

* Ανάπτυξη φθοριζουσών χρωστικών
* Τροποποιημένες DNA πολυμεράσες
* Χρήση ρομπότ
* Συσκευές αλληλούχησης με τριχοειδή
* Υπολογιστική δύναμη

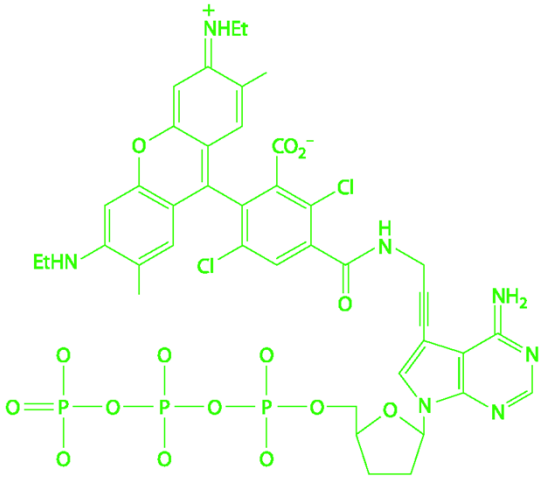
Δομές διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTP) σημασμένων με φθορίζουσες χημικές ομάδες.



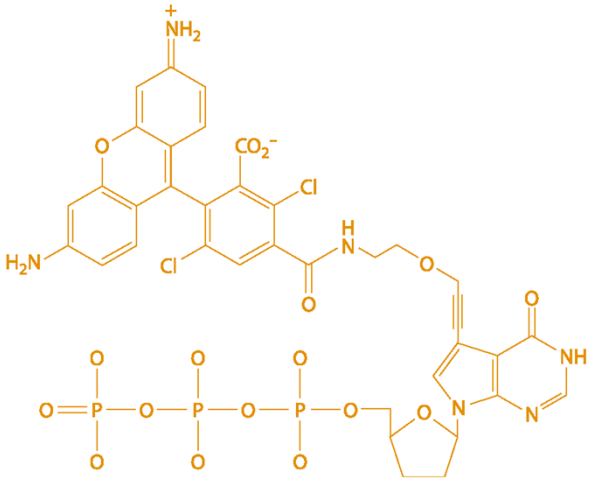
ddTTP



ddCTP

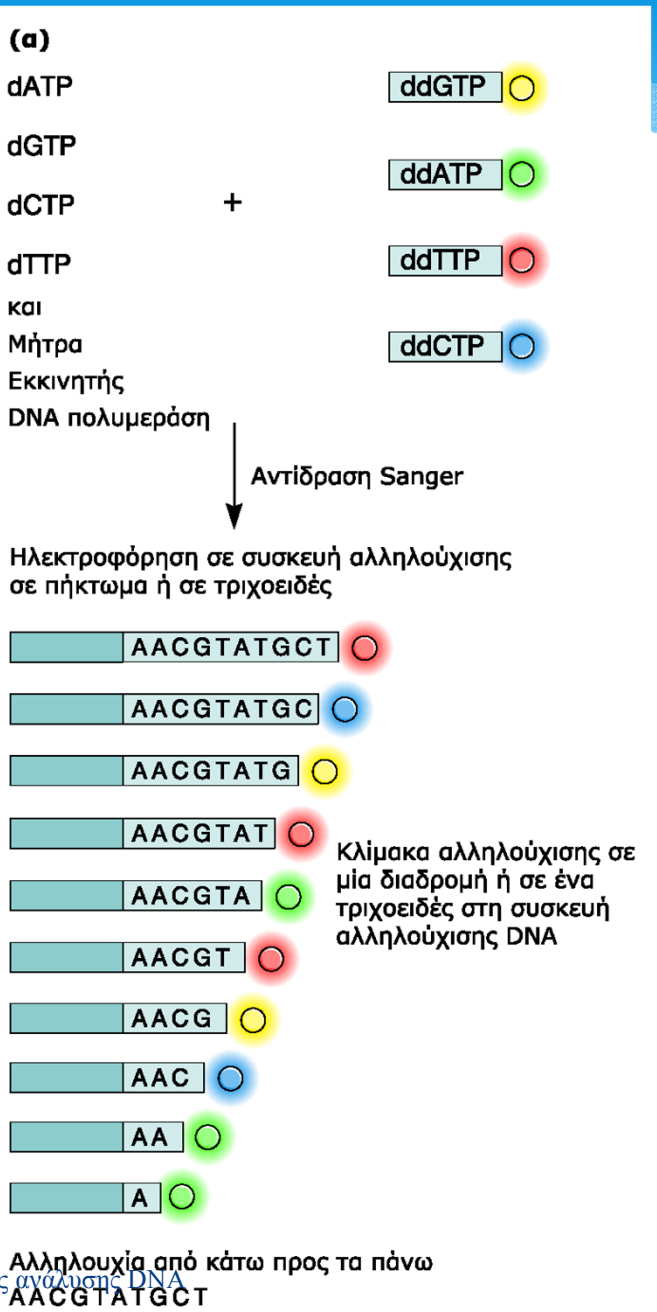


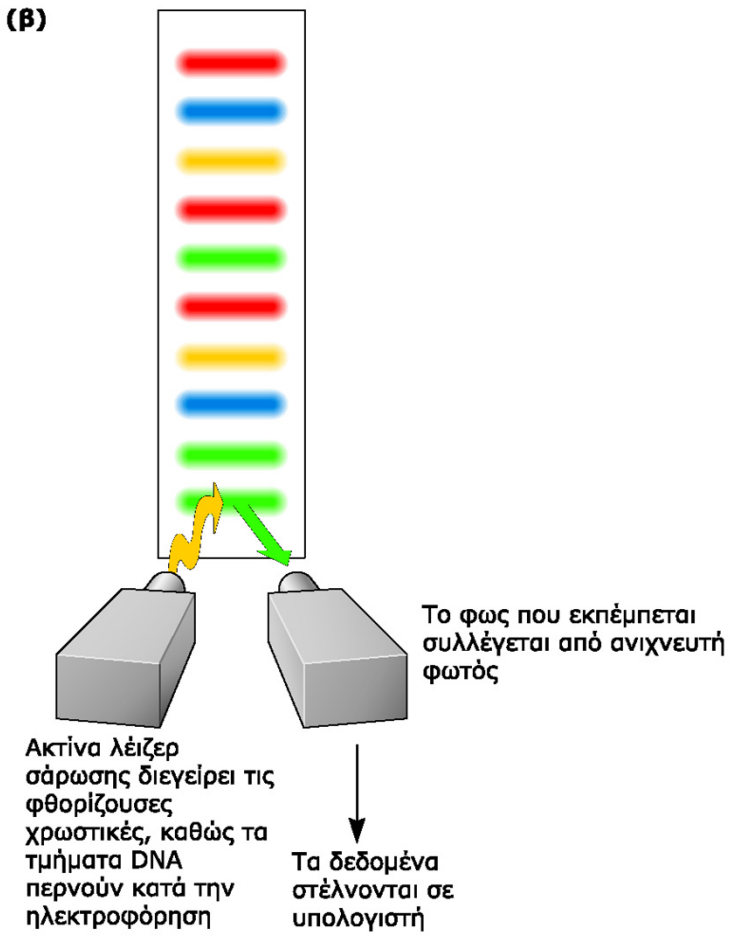
ddATP



ddGTP

Αυτοματοποιημένη αλληλούχηση

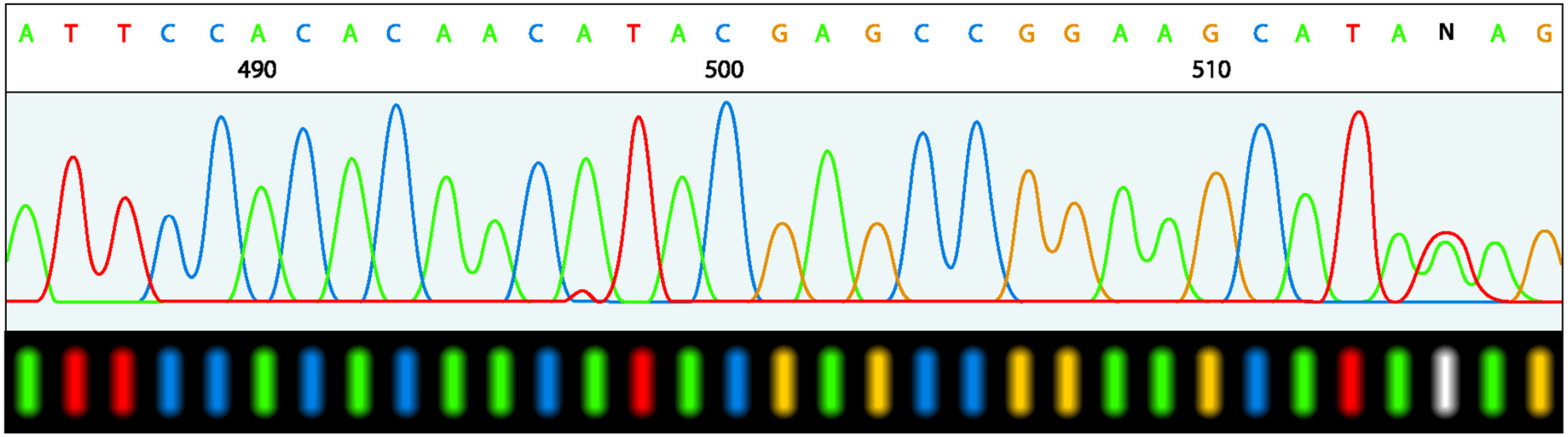




Here's what the products would look like in separate gel lanes.

Here's what the products would look like in a single gel lanes.

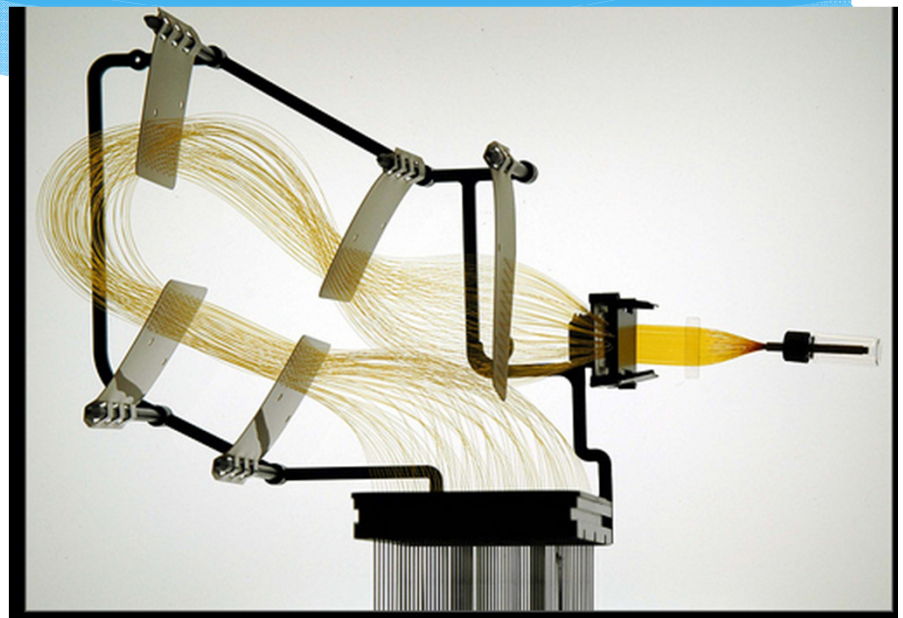
Το αρχείο γραφήματος εκπομπής περιέχει την απεικόνιση των αποτελεσμάτων μιας αντίδρασης αλληλούχησης όπως παράγονται από έναν αυτόματο αναλυτή.



Ο αυτόματος αναλυτής ABI 310 DNA Sequencer – τριχοειδής (capillary) ηλεκτροφόρηση

Τριχοειδής κολόνα

Macrogen - ABI 3730 capillary sequencers



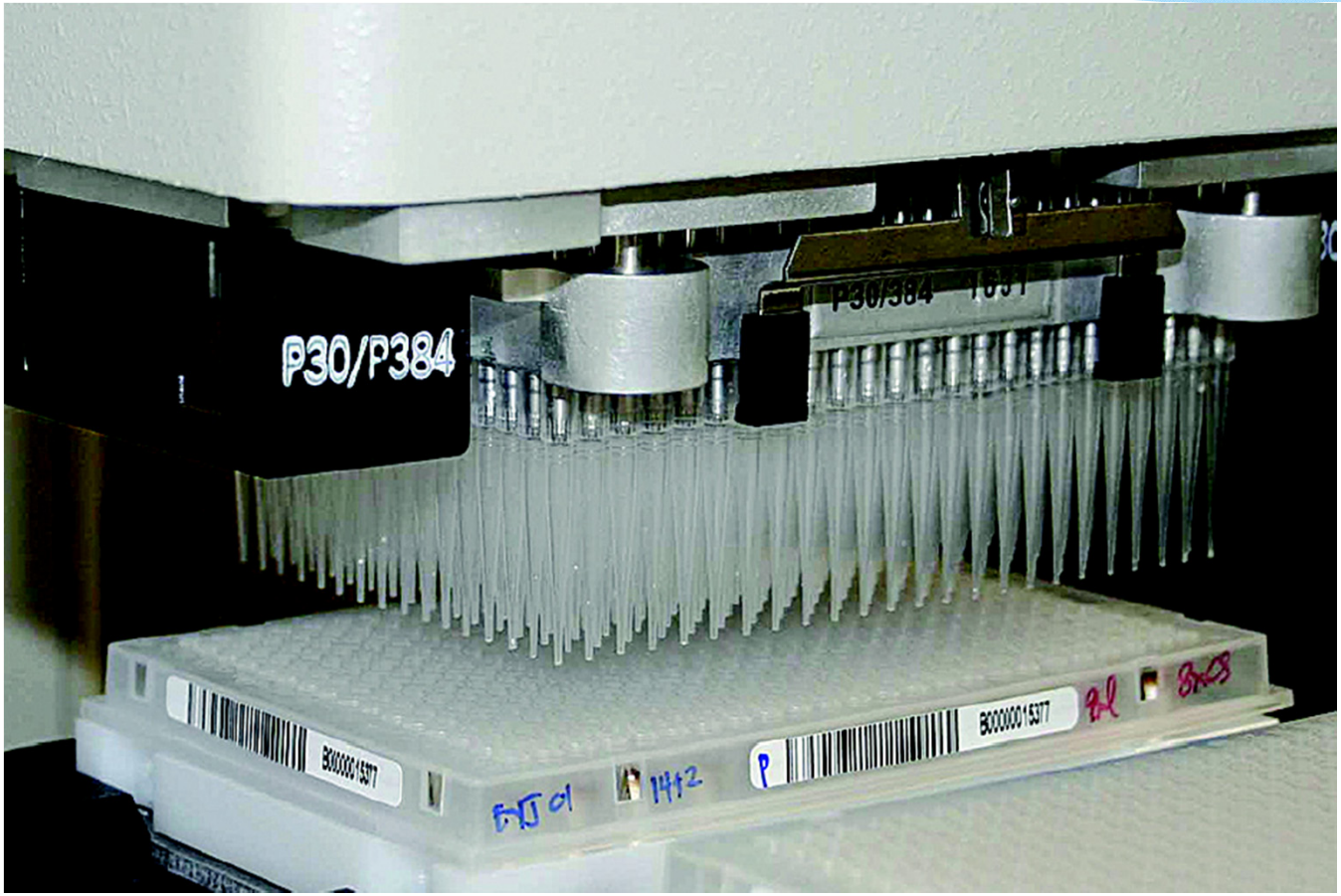
ABI 3730 50cm capillary array

This array of glass capillaries is used to sequence DNA. Each glass capillary is hollow and acts like a mini-gel; Dye labeled DNA fragments migrate from the bottom of the array to the detection window (near the bundled ended) and as they do that the DNA fragments separate out based upon size. At the detection window and laser and CCD cause the dye labeled DNA fragments to fluoresce depending upon which base was at the terminal position on the strand.

Κόστος: ~ 5 ευρώ / αντίδραση (και κατεβαίνει)

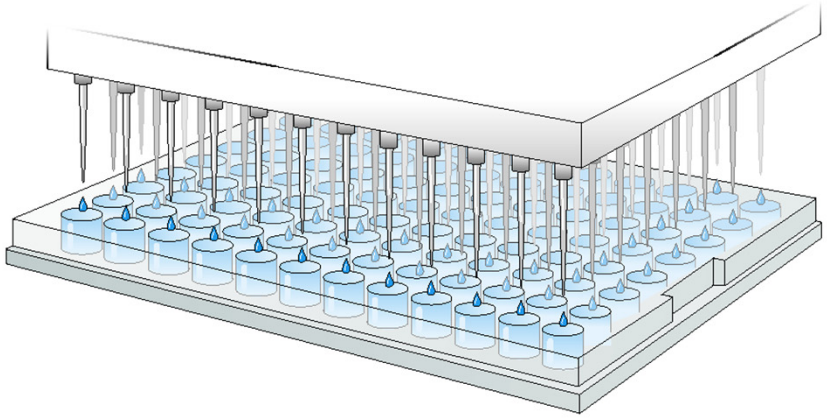
Διάβασμα~ 700 bp (και ανεβαίνει)

Η εισαγωγή ρομποτικών συσκευών αύξησε σημαντικά την παραγωγικότητα των προγραμμάτων αλληλούχησης γονιδιωμάτων.



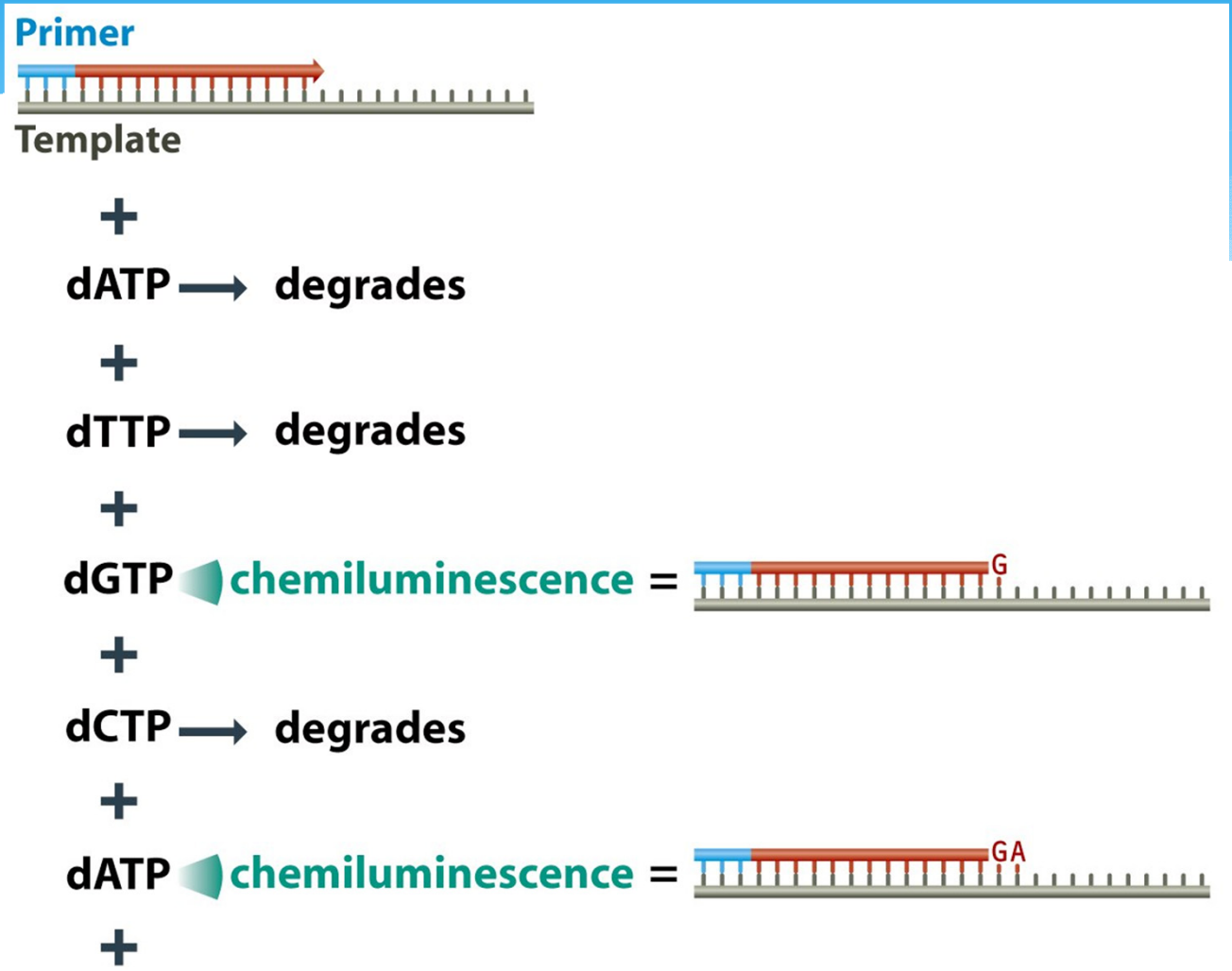
Πολυκυψελιδικά πιάτα.

(α)



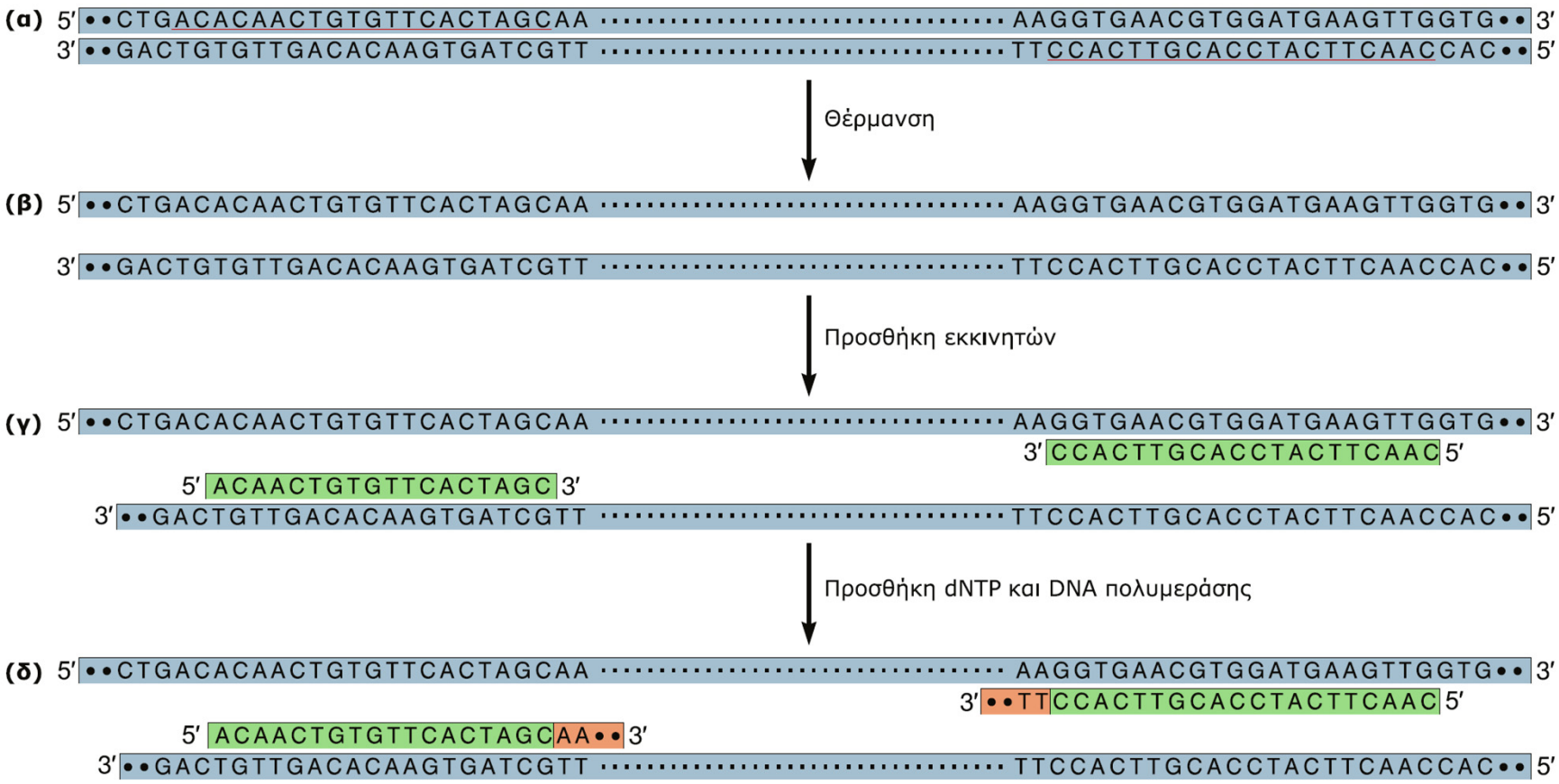
(β)

Πυρο-αλληλούχηση

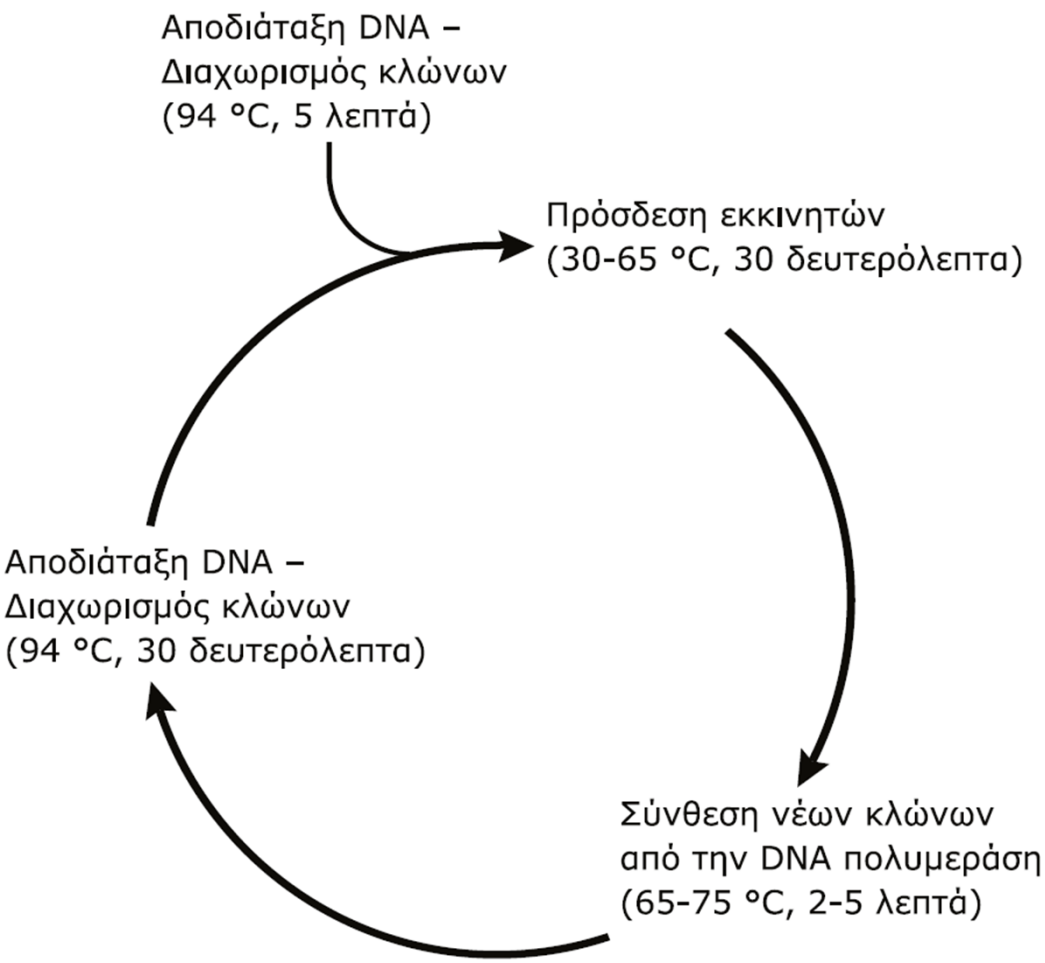


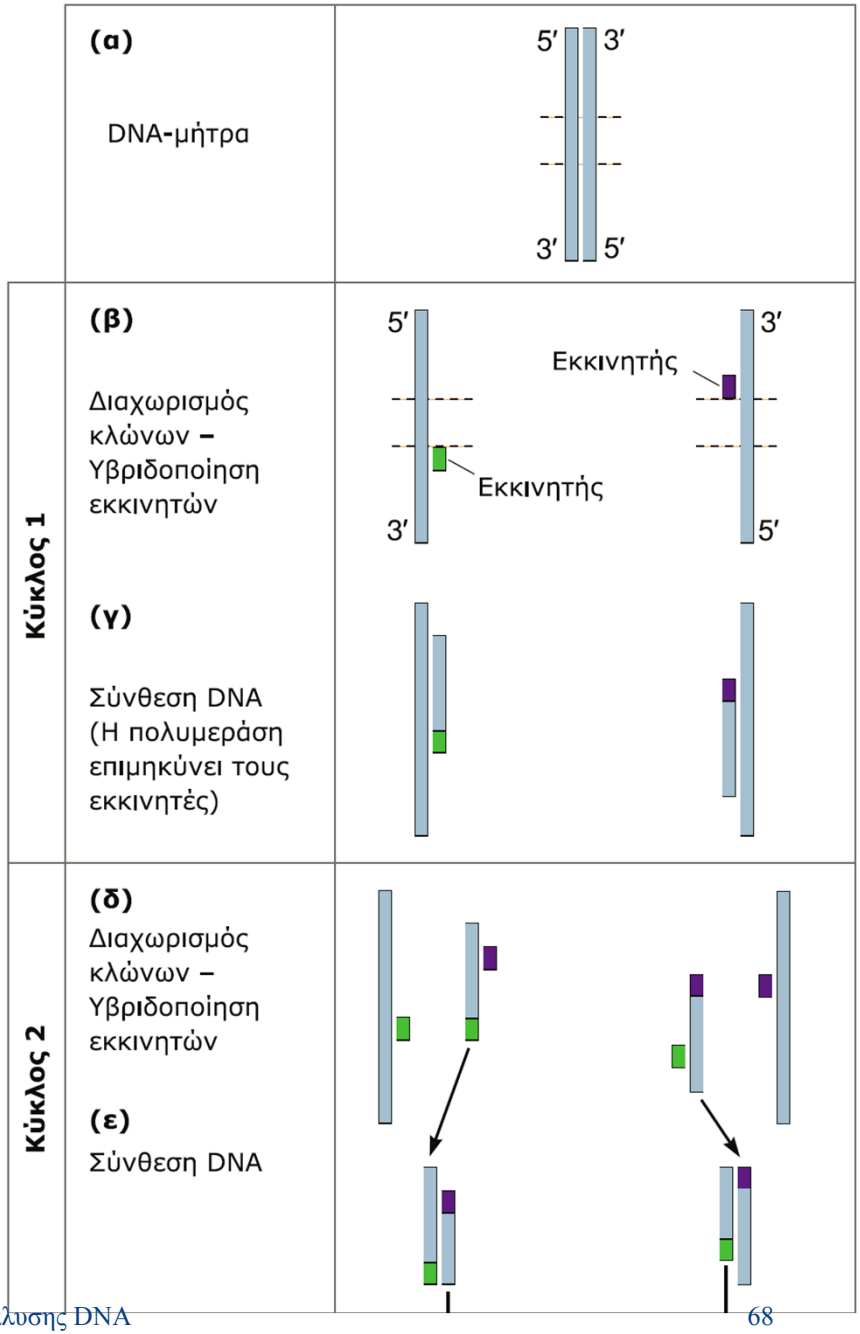
7. Η αντίδραση PCR

Εκκινητές της DNA πολυμεράσης.

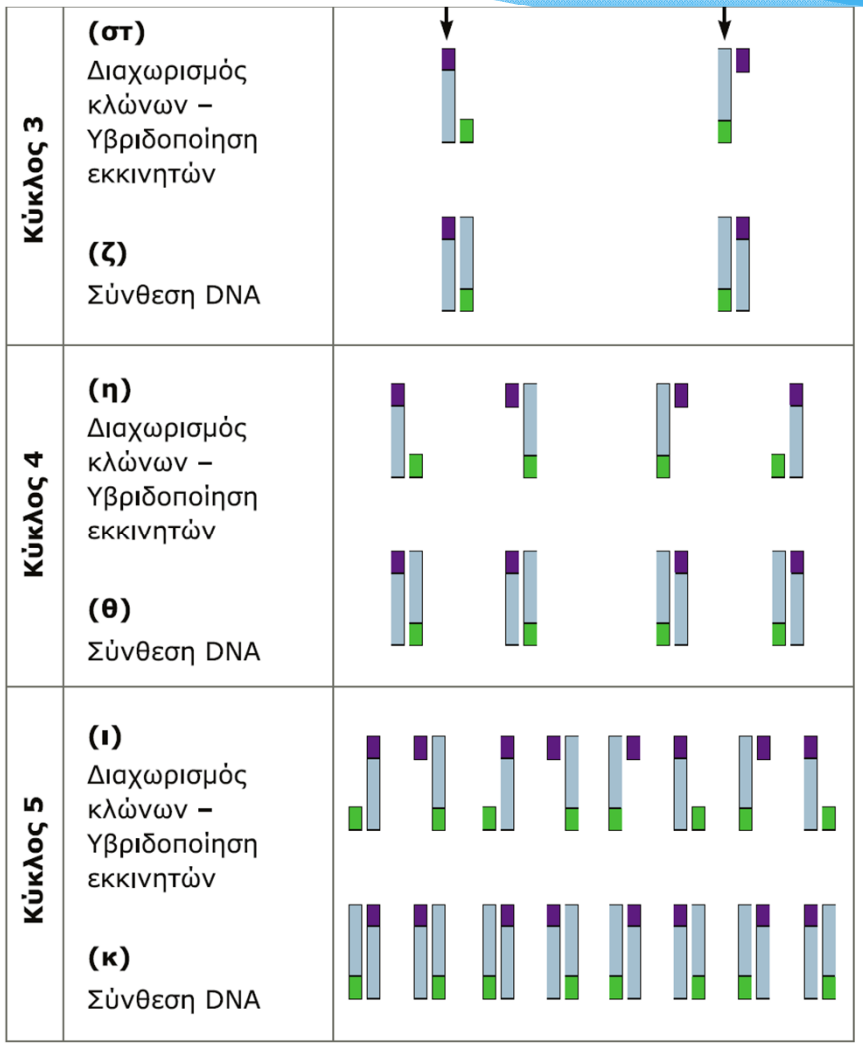


Ο κύκλος της τεχνικής PCR.





Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων DNA κατά την PCR.



Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων DNA κατά την PCR.

Αριθμός κύκλου	Αριθμός δίκλωνων μορίων-στόχων
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1.024
13	2.048
14	4.096
15	8.192
16	16.384
17	32.768
18	65.536
19	131.072
20	262.144
21	524.288
22	1.048.576
23	2.097.152
24	4.194.304
25	8.388,608
26	16.777.216
27	33.554.432
28	67.108.864
29	134.217.728
30	268.435.456
31	536.870.912
32	1.073.741.824

Πολλαπλασιασμός μορίων κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.