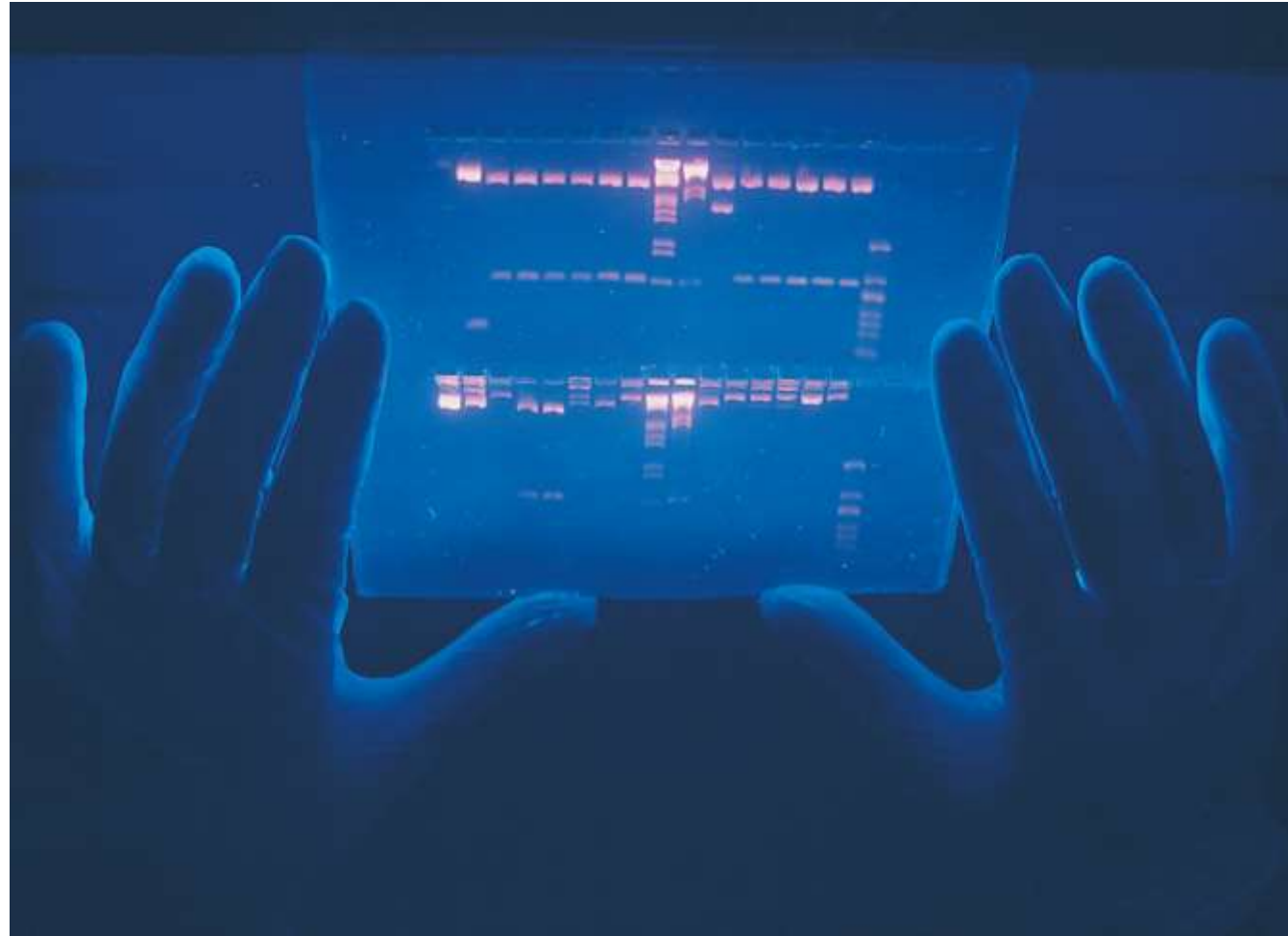


Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA



Βασικές αρχές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA

1. Απομόνωση DNA
2. Πέψη του DNA σε συγκεκριμένες περιοχές με νουκλεάσες περιορισμού
3. Κλωνοποίηση του DNA
4. Ανάλυση αλληλουχίας όλων των νουκλεοτιδίων
5. Υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων
6. Μηχανική του DNA

Απομόνωση DNA

- **Απομόνωση DNA:** είναι μια διαδικασία εξαγωγής του DNA από τα διάφορα δείγματα.
- **Ο στόχος:** είναι να διαχωριστεί το DNA που βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου από τα άλλα κυτταρικά συστατικά.
- Το DNA αποτελεί άριστη πρώτη ύλη για πειράματα μοριακής βιολογίας γιατί **απομονώνεται εύκολα** από πολλές πηγές, **είναι εξαιρετικά σταθερό** και **διατηρείται** για μεγάλο χρονικό διάστημα σε συνθήκες απλής κατάψυξης

Εφαρμογή της DNA απομόνωσης :

Είναι απαραίτητη για τη γενετική ανάλυση που χρησιμοποιείται για:

- **Επιστημονική:** Το DNA είναι απαραίτητη πρώτη ύλη για τα περισσότερα πειράματα μοριακής βιολογίας / βιοτεχνολογίας όπως η εισαγωγή του DNA σε κύτταρα και ζώα ή φυτά (gene cloning)
- **Ιατρική:** διαγνωστικούς σκοπούς σε νοσοκομεία
- **Ιατροδικαστική:** ανάκτηση και ταυτοποίηση DNA για τον προσδιορισμό των ατόμων, (πχ βιαστές, ατύχημα ή πολεμικά θύματα), και προσδιορισμός πατρότητας.

Προϋπόθεση : Η απομόνωσή του σε «καθαρή» μορφή

Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής απομόνωσης DNA καθορίζεται από πολλές παραμέτρους, όπως:

- το αρχικό υλικό (π.χ. κύτταρα, ιστός, αίμα),
- το μέγεθος DNA
- το είδος (π.χ. χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό, ιικό κ.λπ.)
- την ποιότητα του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε.
- Τον χρόνο και το κόστος

Πηγές απομόνωσης DNA

A. DNA μπορεί πρακτικά να απομονωθεί από οποιοδήποτε υλικό περιέχει εμπύρηννα κύτταρα (φυτά, ζώα, μικρόβια)

Αλλά και κύτταρα από βιοψία τροφοβλάστης, μουσειακά εκθέματα, ρίζες τριχών, δόντια, οστά, βιοψίες ιστού σε κύβους παραφίνης κ.ά.

B. Ηλικία δειγμάτων: νωπά ή χρόνια αποθηκευμένο.

Το αποθηκευμένο δείγμα μπορεί να προέλθει από:

Αρχειοθετημένα δείγματα ιστών,

Κατεψυγμένο αίμα ή ιστός (υλικό βιοψίας),

οστά ή ιστούς από εκταφή και αρχαίο ανθρώπινο δείγμα.

Αποξηραμένες κηλίδες αίματος



Παράγοντες που επιδρούν στη δομή του άθικτου DNA

- **pH**

α) Οι υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων είναι σταθεροί μεταξύ pH 4 και 10.

β) Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί στο σκελετό του DNA είναι σταθεροί μεταξύ pH 3 και 12.

γ) Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί των πουρινικών βάσεων (A, G) υδρολύονται σε τιμές pH < 3.

- **Θερμοκρασία**

α) Υπάρχει σημαντική διακύμανση της θερμικής σταθερότητας των υδρογονικών δεσμών στη διπλή έλικα, αλλά τα περισσότερα DNA αρχίζουν να τήκονται στην περιοχή των 80-90 °C.

β) Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί είναι σταθεροί μέχρι τους 100 °C.

- **Ιοντική ισχύς**

Το DNA είναι περισσότερο σταθερό και διαλυτό σε διαλύματα αλάτων. Συγκεντρώσεις άλατος μικρότερες των 50 mM εξασθενούν τους υδρογονοδεσμούς μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων.

- **Κυτταρικές συνθήκες**

α) Διάφορα ένζυμα που υπάρχουν στο κύτταρο μπορεί να συμβάλλουν στην αποικοδόμηση του DNA, αλλά η μεγαλύτερη καταστροφή γίνεται από τις δεοξυριβονουκλεάσες. Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών.

β) Όσον αφορά το DNA των ευκαριωτικών κυττάρων, αυτό βρίσκεται ως σύμπλοκο με ειδικές βασικές πρωτεΐνες που λέγονται ιστόνες και πρέπει να απομακρυνθούν από το DNA κατά τη διαδικασία της εκχύλισης του.

- **Μηχανική καταπόνηση του DNA**

Κατά τη διαδικασία της απομόνωσης θα πρέπει πάντα να γίνονται ήπιοι χειρισμοί. Η ανακίνηση, η ανάδευση καθώς και διάφορες άλλες διαδικασίες μπορεί να προκαλέσουν σπάσιμο των αλυσίδων του DNA. Οι διαδικασίες αυτές συνήθως δεν αλλοιώνουν τη δευτεροταγή δομή του DNA, αλλά μειώνουν το μήκος των μορίων (λόγω θραύσης).

Μέθοδοι απομόνωσης DNA

1. Απομόνωση DNA με χρήση απλών χημικών αντιδραστηρίων

2. Απομόνωση DNA με εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων

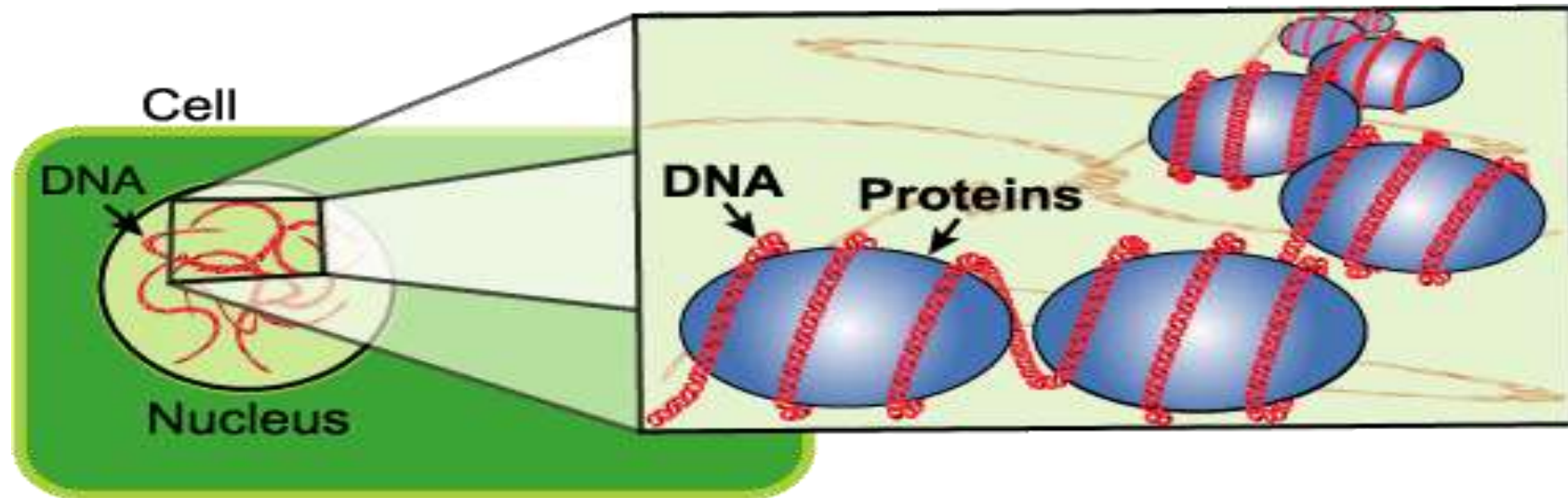
Τα βασικά πλεονεκτήματά της χρήσης κιτ για απομόνωση DNA είναι:

- ευκολία χειρισμού και αναλυτικές οδηγίες εκτέλεσης της διαδικασίας,
- ταυτόχρονος χειρισμός πολλών δειγμάτων,
- ταχύτητα,
- αποφυγή χρήσης επικίνδυνων χημικών (φαινόλη - χλωροφόρμιο),
- υψηλή ποιότητα απομονωμένου DNA,
- επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

3. Αυτοματοποιημένα συστήματα απομόνωσης DNA (τεχνολογία των μαγνητικών σφαιριδίων)

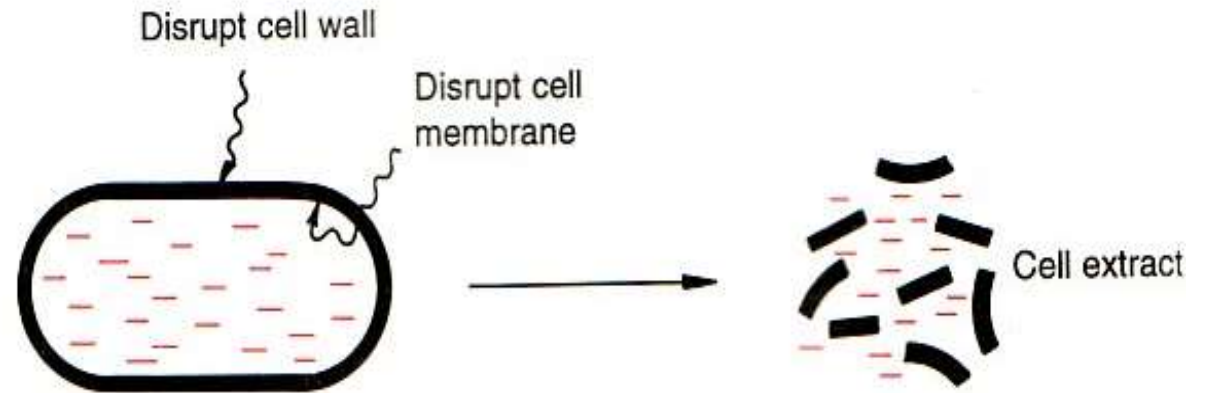
Βασικά στάδια της απομόνωσης DNA

1. Λύση των κυτταρικών μεμβρανών και της μεμβράνης του πυρήνα για να ελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα.
2. Αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών με επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων
3. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες
4. Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 70%
5. Ανασύσταση του DNA σε διάλυμα TE

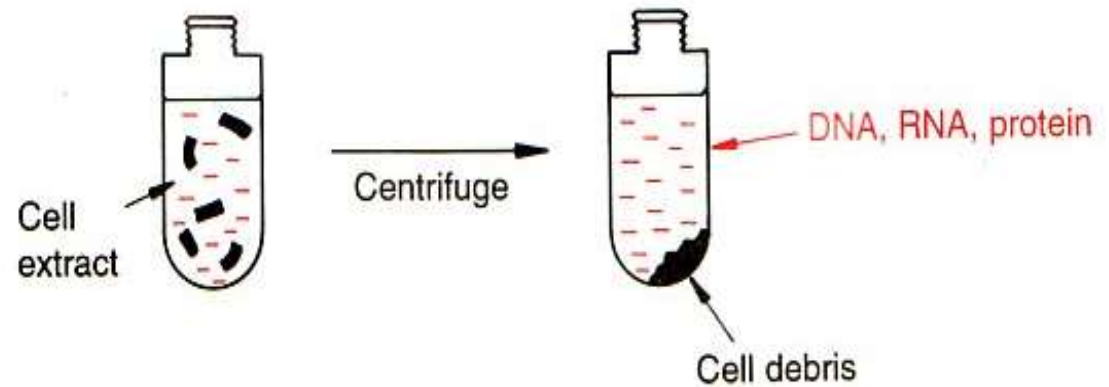


- Διαχωρισμός DNA από τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά
- Αποφυγή αποδιάταξης DNA
- Απενεργοποίηση αμέσως των ενδογενών νουκλεασών (DNAσες)

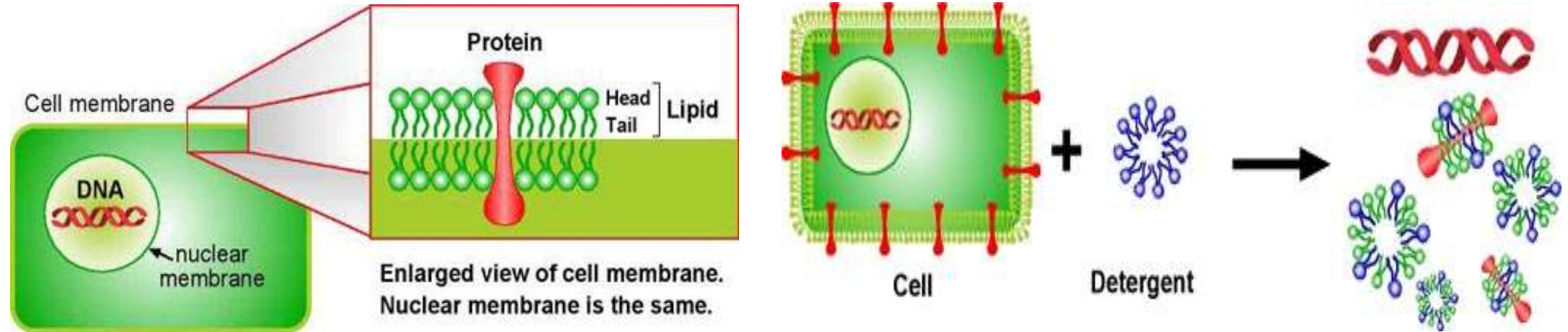
(a) Cell lysis



(b) Centrifugation to remove cell debris



1. Λύση των κυτταρικών μεμβρανών



Η λύση των κυτταρικών μεμβρανών επιτυγχάνεται με χρήση διαλυμάτων που περιέχουν απορρυπαντικά, το πιο κοινό εκ των οποίων είναι το δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)).

Διάλυμα λύσης (Lysis Buffer)

- NaCl : διατηρεί την ωσμωτικότητα του διαλύματος ώστε να μη γίνει απότομη ρήξη των μεμβρανών κατά τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων
- Tris (Trimethamine) : διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή (~ 7.3)
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic - Αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ) : παρεμποδίζει τη δράση ενδονουκλεασών.
- SDS (Δωδεκυλοθειϊκό νάτριο)
- Πρωτεϊνάση K (protease K) : δρά ως πρωτεάση και απενεργοποιεί τις ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες)

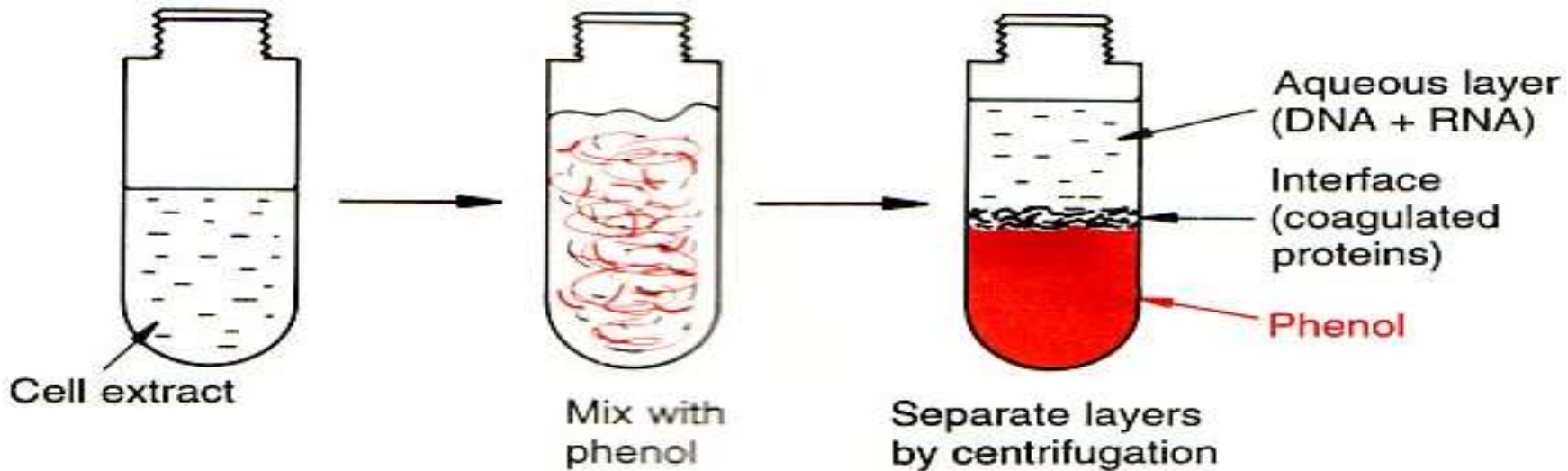
2. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες

Μέθοδοι διαχωρισμού

- με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης - χλωροφορμίου,
- με την προσθήκη διαλυμάτων αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης (100%) αιθανόλης,
- με πρόσδεση σε μεμβράνη ιοντοανταλλαγής
- με πρόσδεση σε μαγνητικά σφαιρίδια.

Μέθοδος Φαινόλης - Χλωροφόρμιο

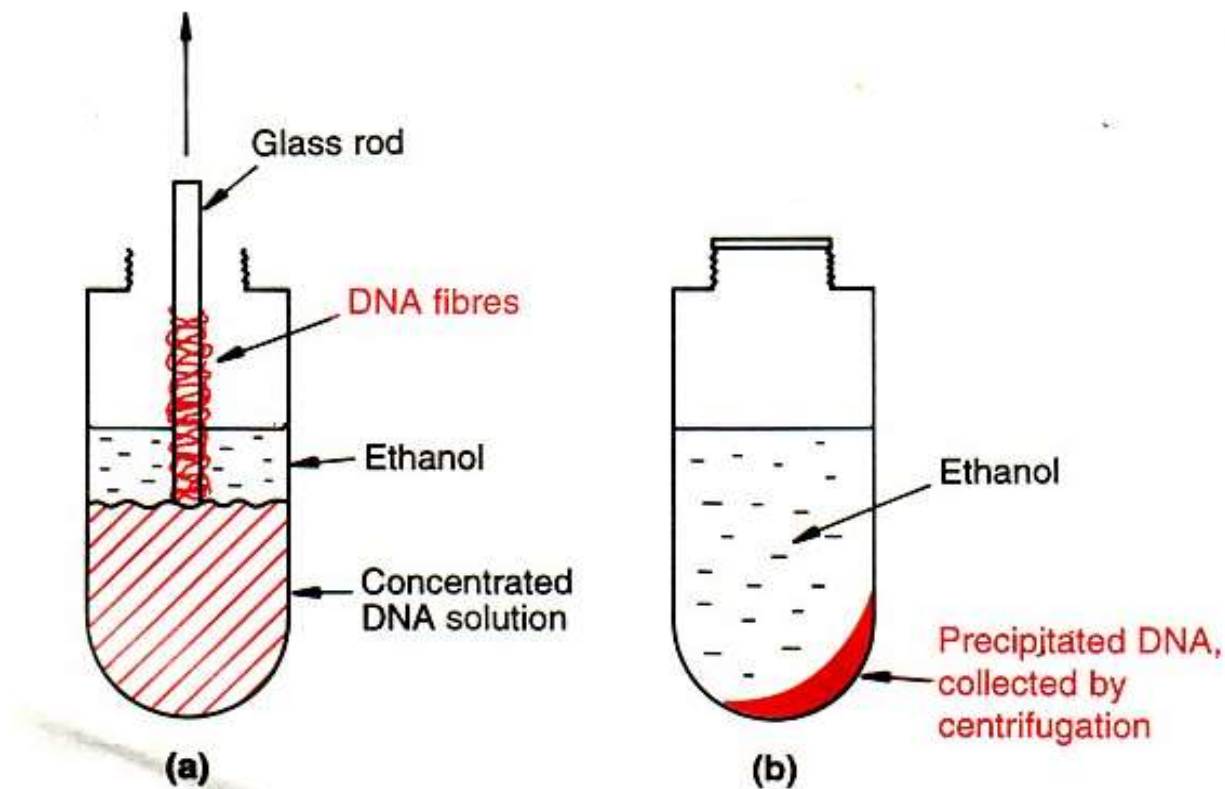
Φαινόλη: μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και στη συνέχεια διαλυτοποιεί τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες



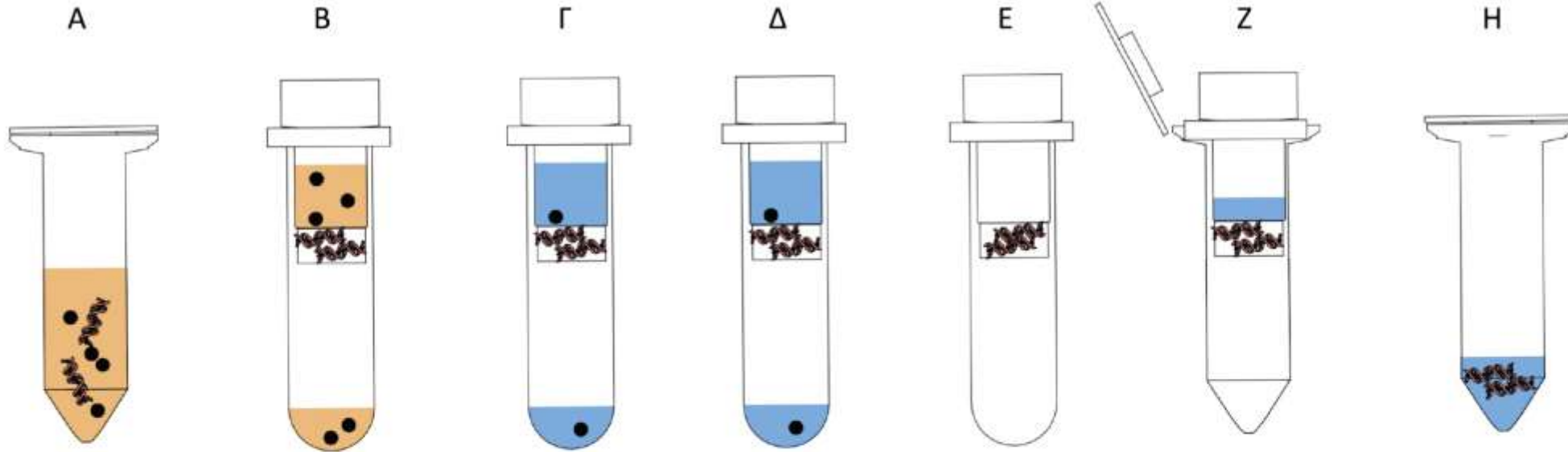
Κατακρήμνιση του DNA

Η προσθήκη της αιθανόλης παρουσία αλάτων προκαλεί δομικές αλλαγές στο μόριο του DNA (καθίσταται αδιάλυτο), με αποτέλεσμα να κατακρημνίζεται εκτός διαλύματος και όταν η ποσότητά του είναι μεγάλη να γίνεται ορατό σαν μια λευκή κλωστή.

Μετά από φυγοκέντρηση το DNA βρίσκεται ως ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου και το υπερκείμενο απομακρύνεται



Στάδια απομόνωσης γενομικού DNA με στήλες που φέρουν μεμβράνη πυριτίου.



Προσθήκη
διαλύματος
λύσης

Πρόσδεση του
DNA στη
μεμβράνη με
φυγοκέντρηση

Προσθήκη
διαλύματος
πλύσης 1

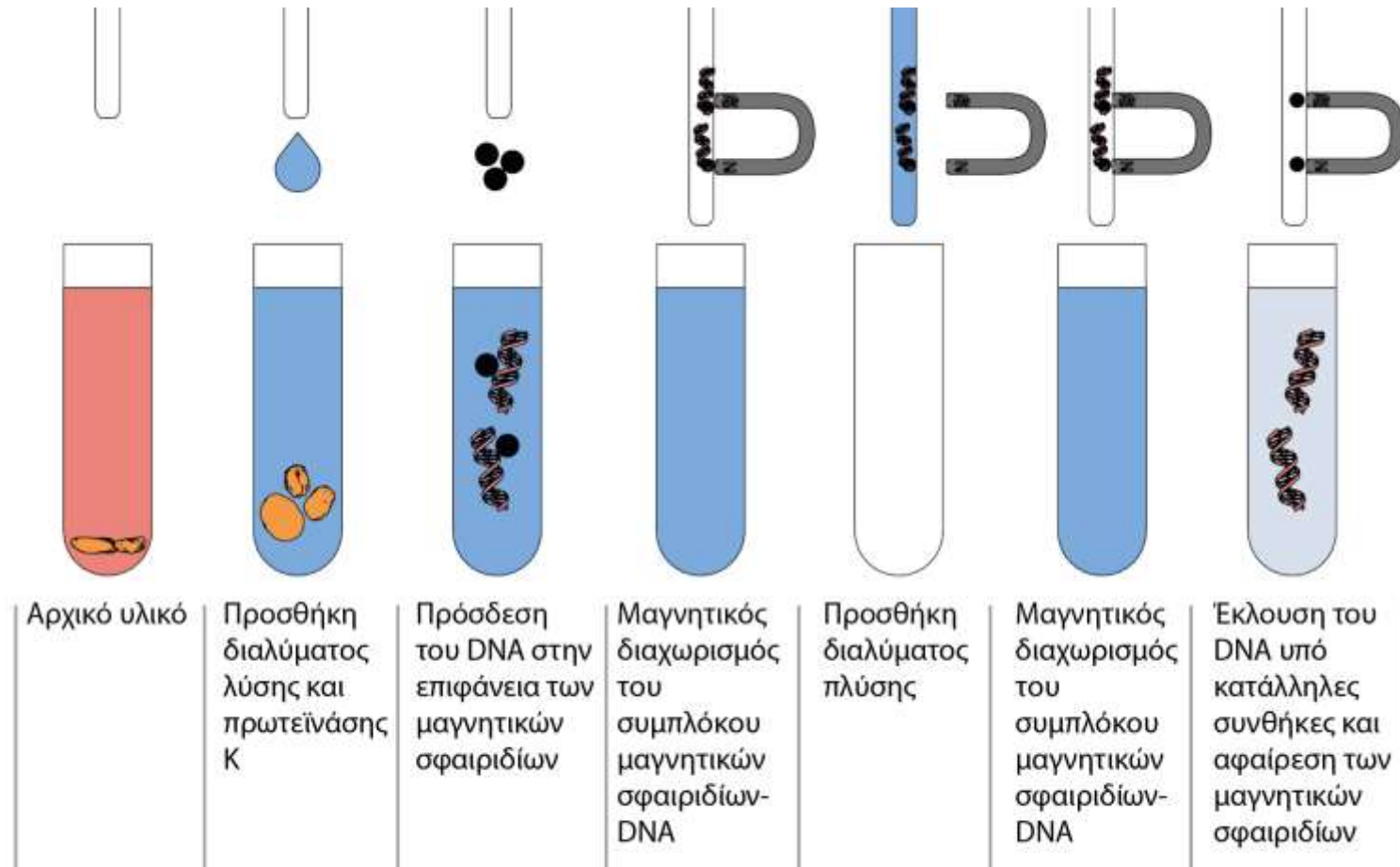
Προσθήκη
διαλύματος
πλύσης 2

Στέγνωμα

Προσθήκη
διαλύματος
έκλουσης

Έκλουση DNA

Στάδια απομόνωσης γενομικού DNA με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων.



Αρχικά πραγματοποιείται λύση του δείγματος παρουσία κατάλληλου διαλύματος και πρωτεΐνάσης K, προστίθενται τα μαγνητικά σφαιρίδια και εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο.

Τα μόρια DNA προσροφώνται σε μαγνητικά σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου και τα μη δεσμευμένα κυτταρικά στοιχεία απομακρύνονται.

Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις για απομάκρυνση των αλάτων και άλλων αναστολέων και, τέλος, έκλυση του καθαρού DNA σε ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας.

Έλεγχος της ποιότητας και μέτρηση της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων

Η καθαρότητα, η ποιότητα και η συγκέντρωση των διαλυμάτων των νουκλεϊκών οξέων αξιολογούνται με τη βοήθεια μεθόδων όπως

- η φασματοφωτομετρία υπεριώδους
- η φασματοφθορισμομετρία
- και σε ορισμένες περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Φασματοφωτόμετρα



Εκτίμηση της καθαρότητας διαλυμάτων νουκλεϊκών οξέων

Λόγος $A_{260nm}/A_{280nm} = 2$ είναι χαρακτηριστικός διαλύματος καθαρού RNA.

Λόγος $A_{260nm}/A_{280nm} = 1,8$ είναι χαρακτηριστικός διαλύματος καθαρού DNA.

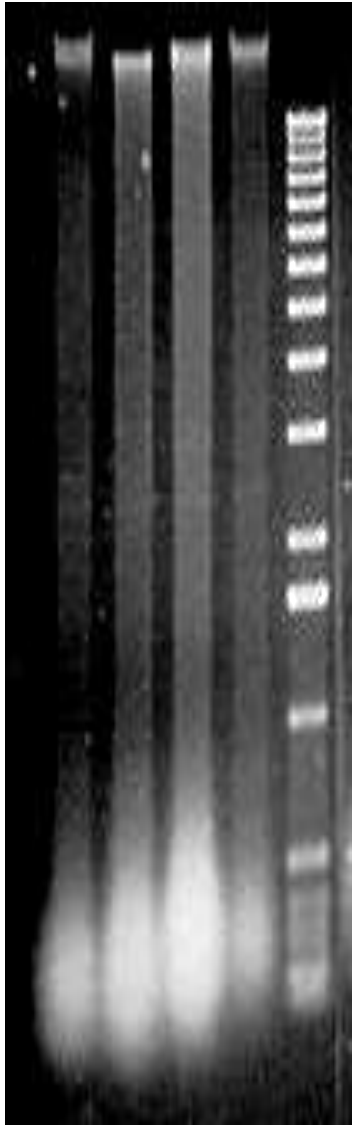
- Κατά συνέπεια, όταν απομονώνουμε νουκλεϊκά οξέα, ένας λόγος A_{260nm}/A_{280nm} μεταξύ 1,8 και 2 είναι ικανοποιητικός.
- Τιμές του λόγου $A_{260nm}/A_{280nm} < 1,7$ είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων
- Τιμές του λόγου $A_{260nm}/A_{280nm} > 1,8$ είναι ενδεικτικές πρόσμιξης με RNA και δεν προκαλούν κάποιο πρόβλημα.

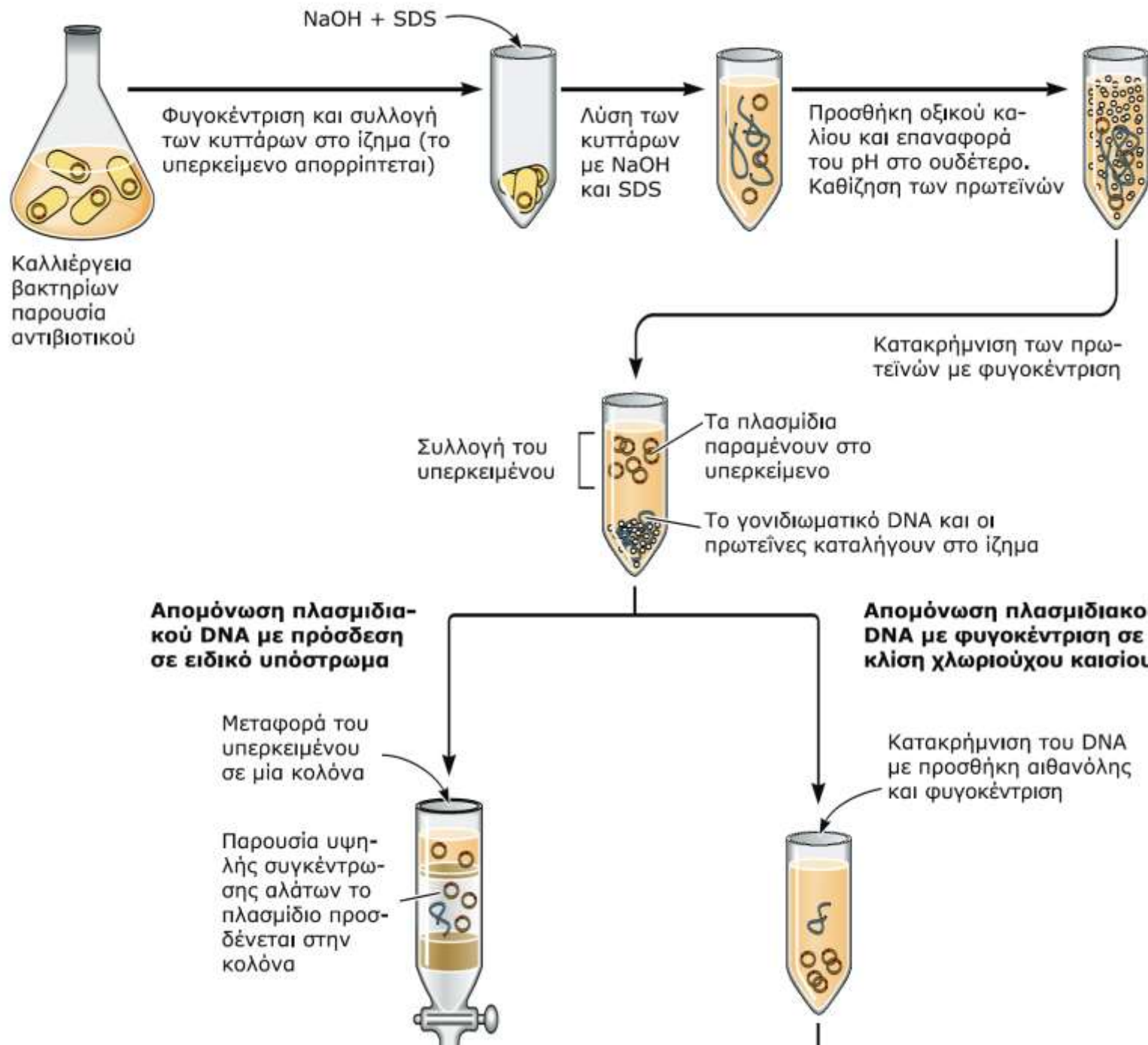
- Διάλυμα καθαρού δίκλωνου DNA (Double stranded DNA, dsDNA) που έχει στα 260 nm απορρόφηση $A_{260nm} = 1$ έχει συγκέντρωση 50 ng/μl.
- Διάλυμα καθαρού RNA που έχει στα 260 nm απορρόφηση $A_{260nm} = 1$ έχει συγκέντρωση 40 ng/μl.
- Με βάση τα παραπάνω, η συγκέντρωση ενός διαλύματος δίκλωνου DNA μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$C(\text{ng}/\mu\text{l}) = A_{260nm} \times 50$$

Εκτίμηση της καθαρότητας διαλυμάτων νουκλεϊκών οξέων

← Έλεγχος για αποδιαταγμένο DNA
(Degradation DNA)





Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από *Escherichia coli*.

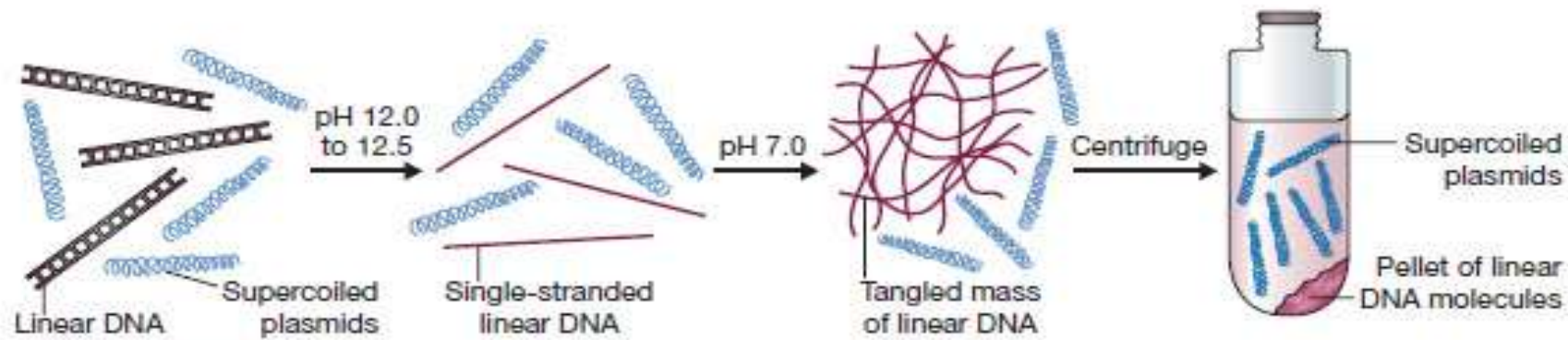


Figure 3.13

Plasmid purification by the alkaline denaturation method.

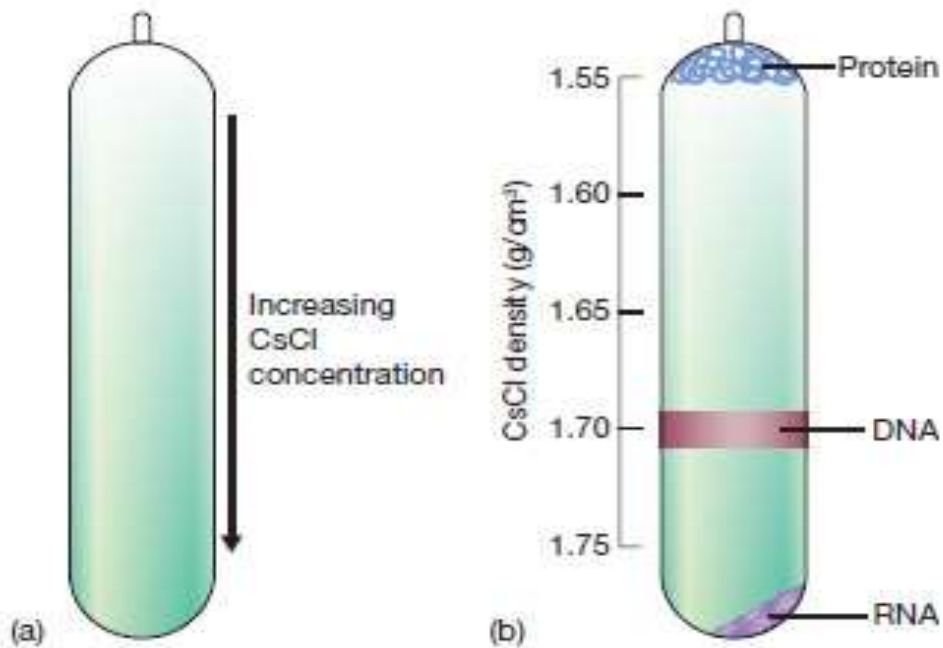


Figure 3.14

Caesium chloride density gradient centrifugation. (a) A CsCl density gradient produced by high speed centrifugation. (b) Separation of protein, DNA, and RNA in a density gradient.

Παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων το πλασμίδιο προσδένεται στην κολόνα



Το διερχόμενο υγρό απορρίπτεται



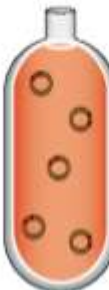
Προσθήκη διαλύματος με χαμηλή συγκέντρωση αλάτων



Έκλουση του πλασμιδίου



Επαναδιάλυση του ιζήματος DNA σε διάλυμα με υψηλή συγκέντρωση CsCl



Φυγοκέντριση



Συλλογή του πλασμιδίου με σύριγγα



Γονιδιωματικό DNA

Χαλαρό πλασμίδιο

Υπερελικωμένο πλασμίδιο

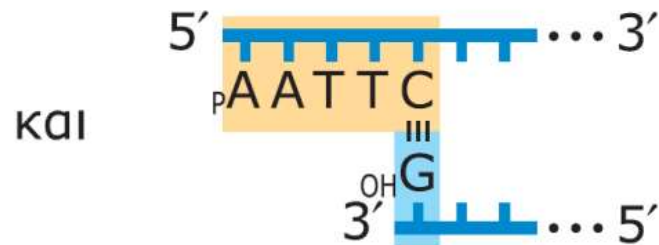
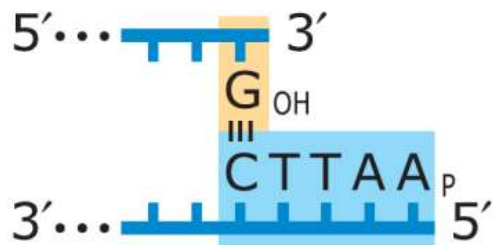
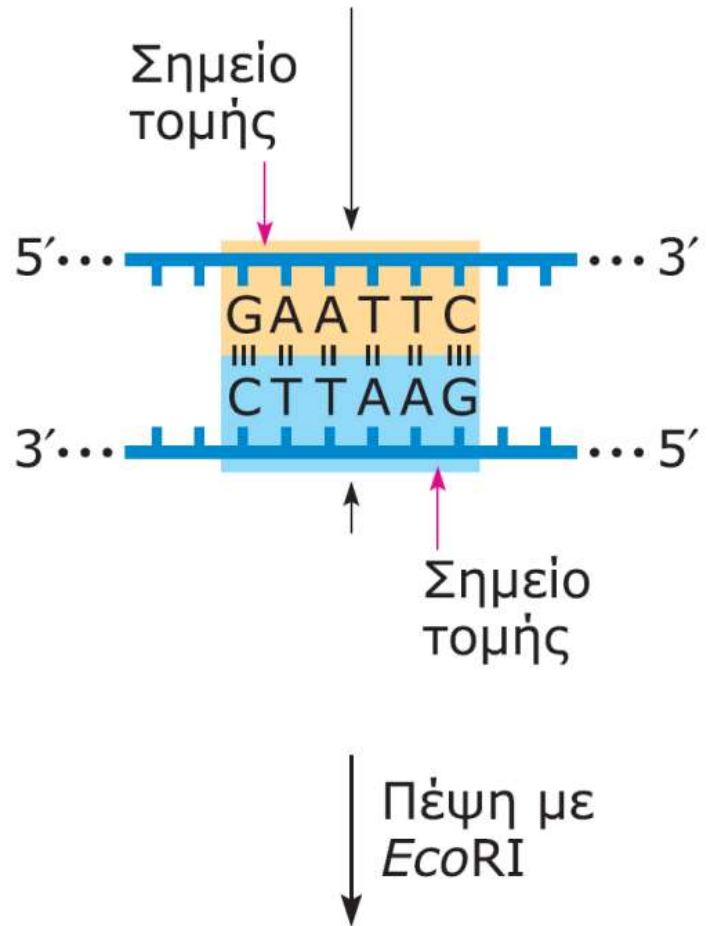
RNA

ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ ή ΠΕΡΙΟΣΠΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕ

Ενδονουκλεάσες που κόβουν dsDNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Ονομάζονται από το είδος του βακτηρίου από το οποίο απομονώθηκαν (π.χ. EcoRI από την *Escherichia coli*, Sau3A από τον *Staphylococcus aureus*)

Θέσεις αναγνώρισης: συνήθως 4 ή 6 bp σε μήκος και παλινδρομικές (π.χ. CTGCAG ή GGCC).

Η αλληλουχία είναι συμμετρική



Θέση περιορισμού συμμετρική ως προς τον άξονα που περνά από το μέσο της.

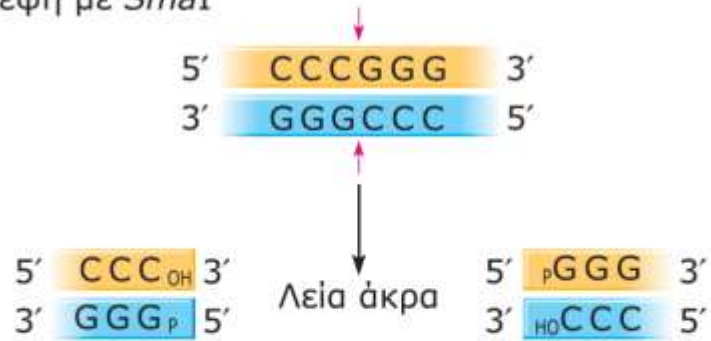
Στην εικόνα φαίνεται η θέση αναγνώρισης της *EcoRI*. Η αλληλουχία είναι παλίνδρομη: είναι ίδια και στις δύο αλυσίδες του DNA όταν διαβάζεται στην ίδια κατεύθυνση (στο παράδειγμα αυτό είναι 5' GAATTC 3').

Ορισμένα ένζυμα περιορισμού και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν.

Μικροοργανισμός	Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης	Σημειώσεις
<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeIII	$\begin{array}{l} 5' \dots \text{G G} \text{C C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C C} \text{G G} \dots 5' \end{array}$	Λεία άκρα 1
<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI	$\begin{array}{l} 5' \dots \text{T} \text{C G A} \dots 3' \\ 3' \dots \text{A G C} \text{T} \dots 5' \end{array}$	5' μονόκλωνα άκρα 2
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	HhaI	$\begin{array}{l} 5' \dots \text{G C G} \text{C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C} \text{G C G} \dots 5' \end{array}$	3' μονόκλωνα άκρα 3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DdeI	$\begin{array}{l} 5' \dots \text{C} \text{T N A G} \dots 3' \\ 3' \dots \text{G A N T} \text{C} \dots 5' \end{array}$	4
<i>Moraxella bovis</i>	MboII	$\begin{array}{l} 5' \dots \text{G A A G A} (N)_8 \dots 3' \\ 3' \dots \text{C T T C T} (N)_7 \dots 5' \end{array}$	5
<i>Escherichia coli</i>	EcoRV	$\begin{array}{l} 5' \dots \text{G A T} \text{A T C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C T A} \text{T A G} \dots 5' \end{array}$	1
	EcoRI	$\begin{array}{l} 5' \dots \text{G} \text{A A T T C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C T T A A} \text{G} \dots 5' \end{array}$	2
<i>Providencia stuarti</i>	PstI	$\begin{array}{l} 5' \dots \text{C T G C A} \text{G} \dots 3' \\ 3' \dots \text{G A} \text{C G T C} \dots 5' \end{array}$	3
<i>Microcoleus</i>	MstII	$\begin{array}{l} 5' \dots \text{C C} \text{T N A G G} \dots 3' \\ 3' \dots \text{G G A N T} \text{C C} \dots 5' \end{array}$	4
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	NotI	$\begin{array}{l} 5' \dots \text{G C} \text{G G C C G C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C G C C G G} \text{C G} \dots 5' \end{array}$	6

Τα περισσότερα ένζυμα είναι ομοδιμερή αναγνωρίζουν παλίνδρομες αλληλουχίες

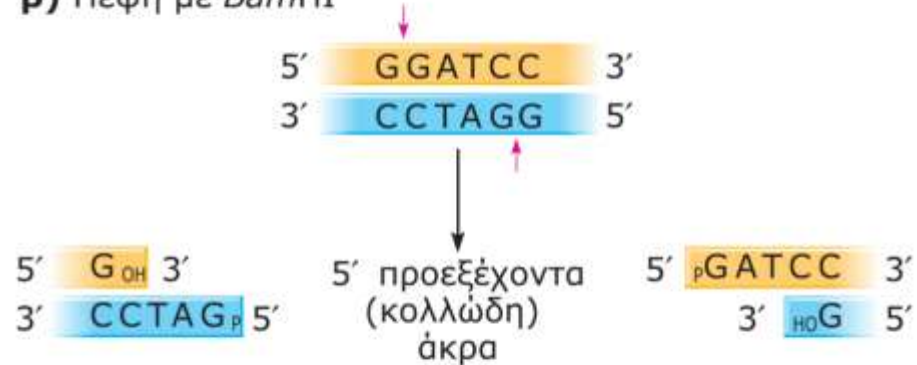
α) Πέψη με *Sma*I



Παραδείγματα του τρόπου με τον οποίο τα ένζυμα περιορισμού κόβουν το DNA.

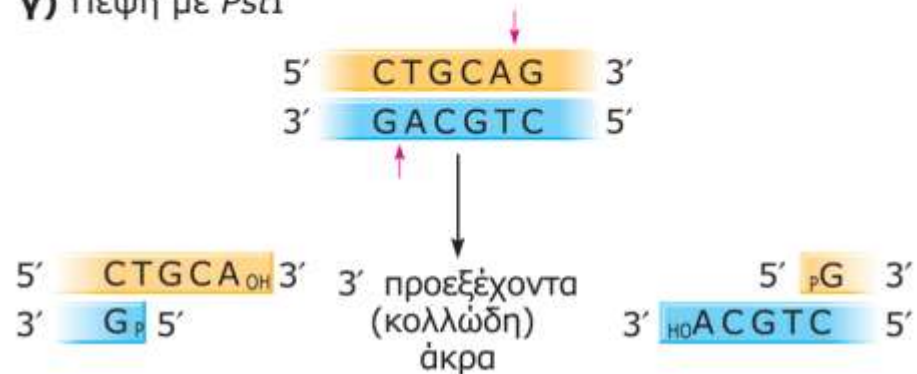
(α) Η *Sma*I δημιουργεί λεία άκρα.

β) Πέψη με *Bam*HI



(β) Η *Bam*HI δημιουργεί προεξέχοντα 5' μο νόκλωνα (κολλώδη) άκρα.

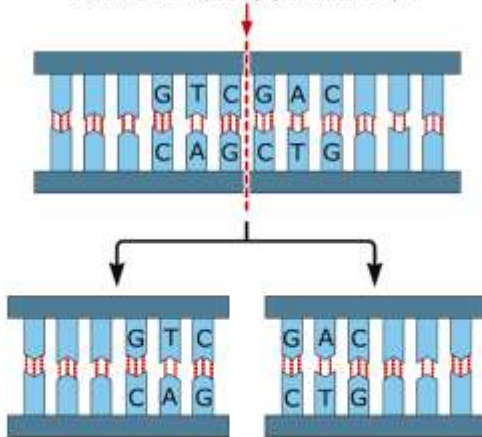
γ) Πέψη με *Pst*I



(γ) Η *Pst*I δημιουργεί προεξέχοντα 3' μονόκλωνα (κολλώδη) άκρα.

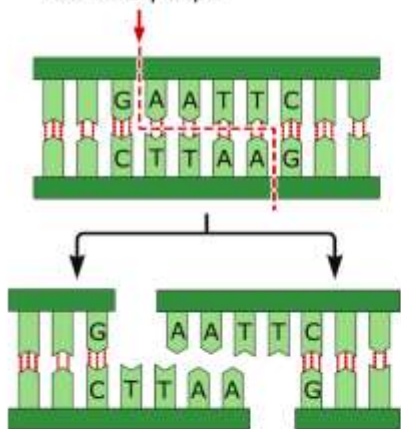
(α)

Η HindII δημιουργεί λεία άκρα

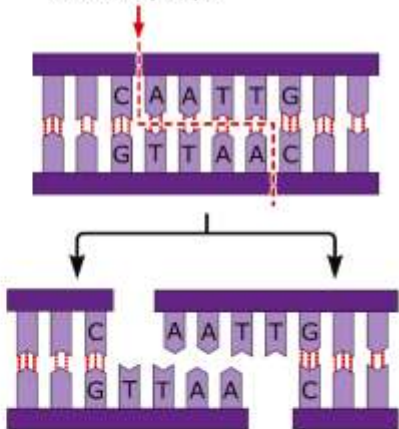


(β)

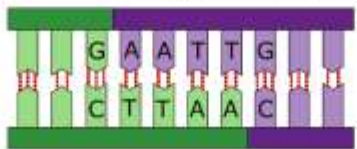
Η EcoRI δημιουργεί κολλώδη άκρα



Η MfeI δημιουργεί κολλώδη άκρα



Τα συμπληρωματικά άκρα είναι δυνατόν να ενωθούν με τη βοήθεια DNA λιγάσης



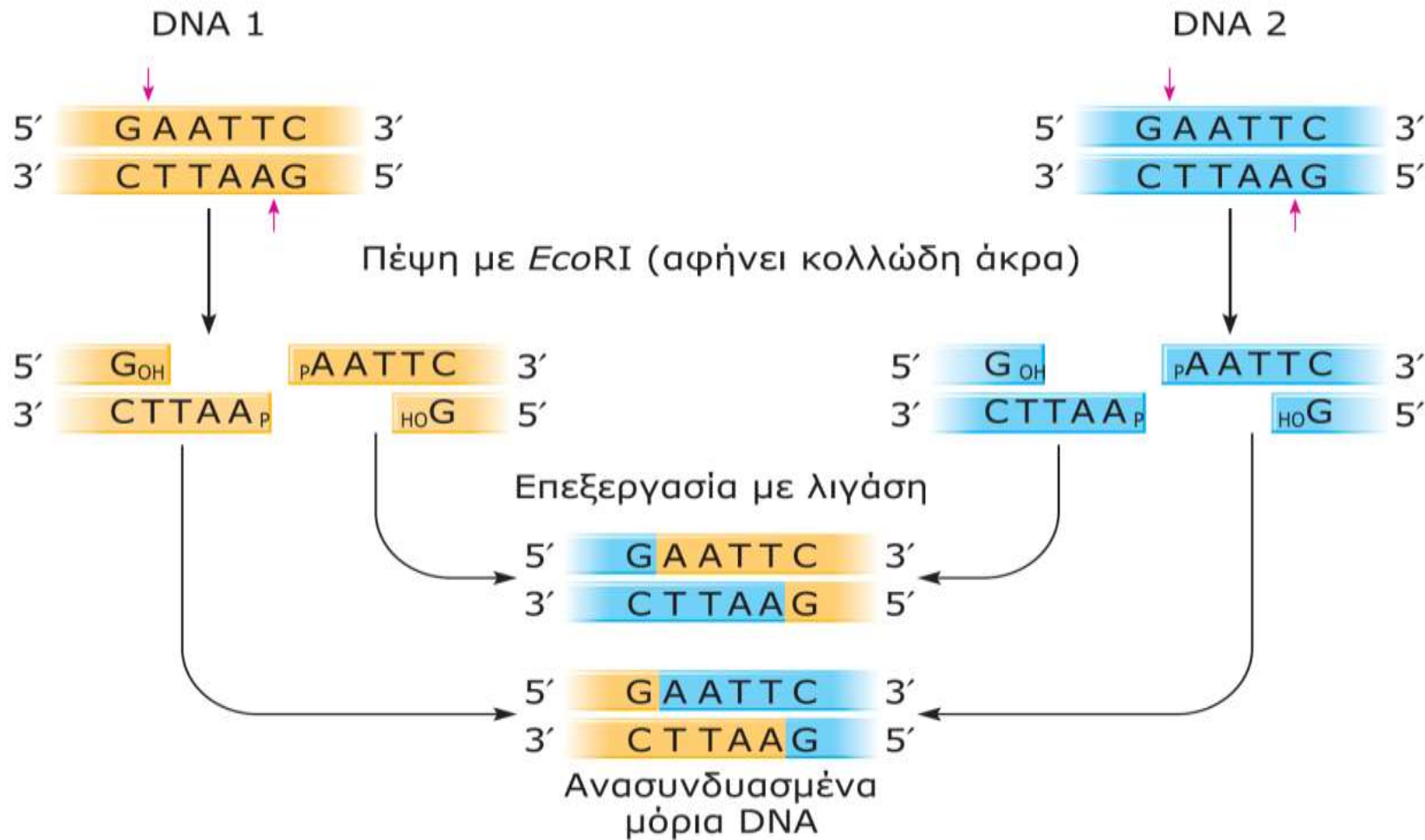
Ένζυμα με συμβατά άκρα

Ένζυμο	Αλληλουχία	Προϊόν	Μονόκλιωνα άκρα
BamHI	GGATCC	GGATCC CCTAG G	5'-GATC
BglII	AGATCT	AGATCT TCTAG A	5'-GATC
BclI	TGATCA	TGATCA ACTAG T	5'-GATC
Sau3AI	NGATCN	NGATCN NCTAG N	5'-GATC

Συχνές και σπάνιες θέσεις αναγνώρισης

Πίνακας 16.2 Συχνότητα εμφάνισης θέσεων περιορισμού σε DNA στην αλληλουχία του οποίου οι τέσσερις βάσεις αντιπροσωπεύονται εξίσου

Αριθμός bp στη θέση περιορισμού	Συχνότητα εμφάνισης
4	$(1/4)^4 = 1$ ανά 256 bp
5	$(1/4)^5 = 1$ ανά 1.024 bp
6	$(1/4)^6 = 1$ ανά 4.096 bp
8	$(1/4)^8 = 1$ ανά 65.476 bp
n	$(1/4)^n$



Πέψη του DNA από το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*.

Το ένζυμο *EcoRI* δημιουργεί δύο συμμετρικές εγκοπές που ονομάζονται ασυμπτωτικές. Έτσι προκύπτουν κολλώδη άκρα. Όταν δύο τμήματα DNA προέρχονται από πέψη με το ίδιο ένζυμο, έχουν τα ίδια κολλώδη άκρα και μπορούν να συνδεθούν μέσω ζευγαρώματος των συμπληρωματικών βάσεων. Οι εγκοπές που παραμένουν είναι δυνατόν να κλείσουν με το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών από την DNA λιγάση.

REBASE:

Βάση δεδομένων περιοριστικών ενδονουκλεασών

Η βάση δεδομένων **RE**striction enzyme data**BASE** (REBASE),

<http://http://rebase.neb.com>

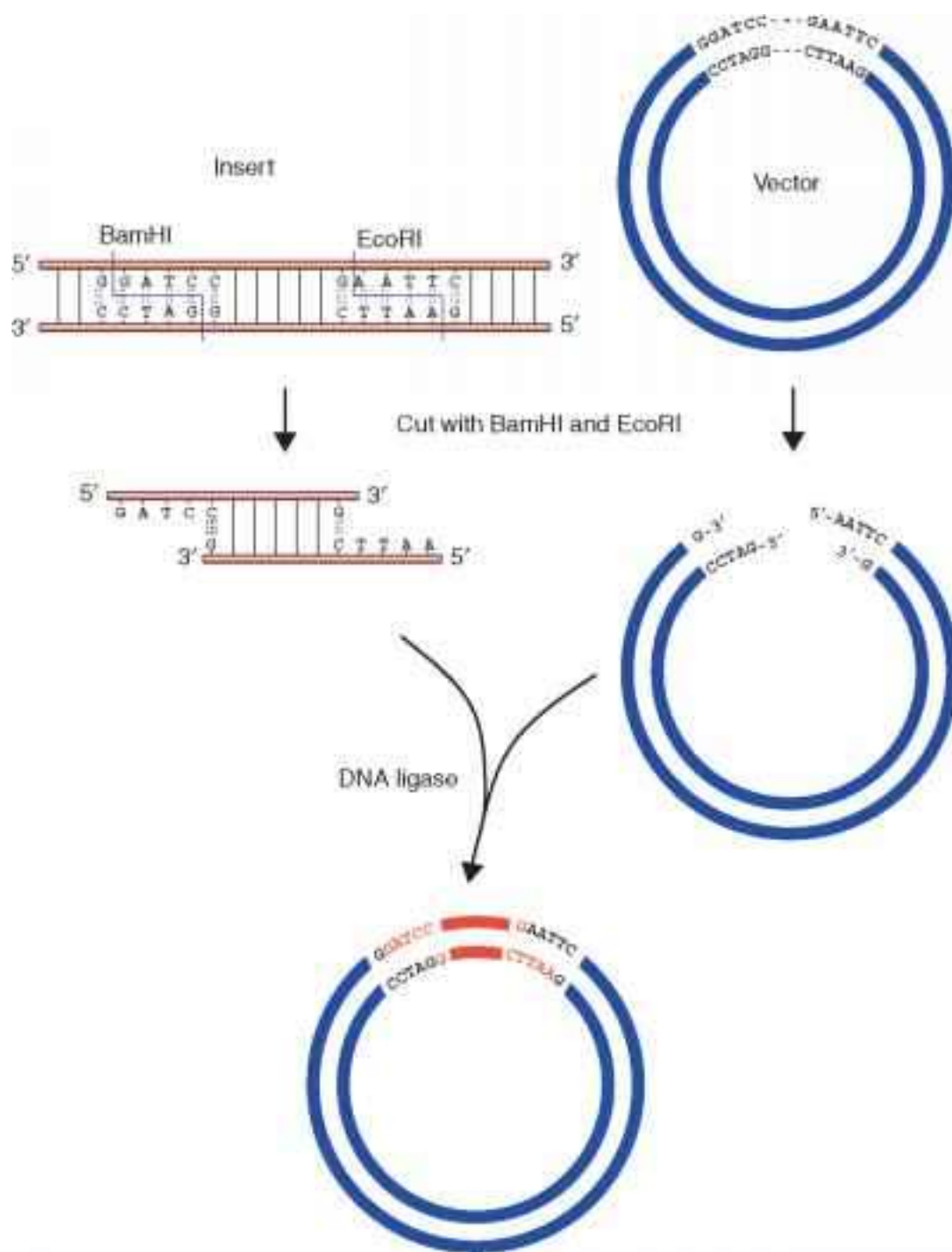
είναι μια πλήρης και καλά σχολιασμένη βάση που περιέχει πληροφορίες για τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των μεθυλτρανσφερασών, την εμπορική διαθεσιμότητα των ενζύμων, τις αλληλουχίες τους κ.ά.

Οι πληροφορίες βρίσκονται οργανωμένες σε αρχεία που ενημερώνονται σε μηνιαία βάση και η πρόσβαση σε αυτά είναι ελεύθερη.

Εφαρμογές των περιοριστικών ενδονουκλεασών

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία με πολλές εφαρμογές, οι κυριότερες από τις οποίες είναι:

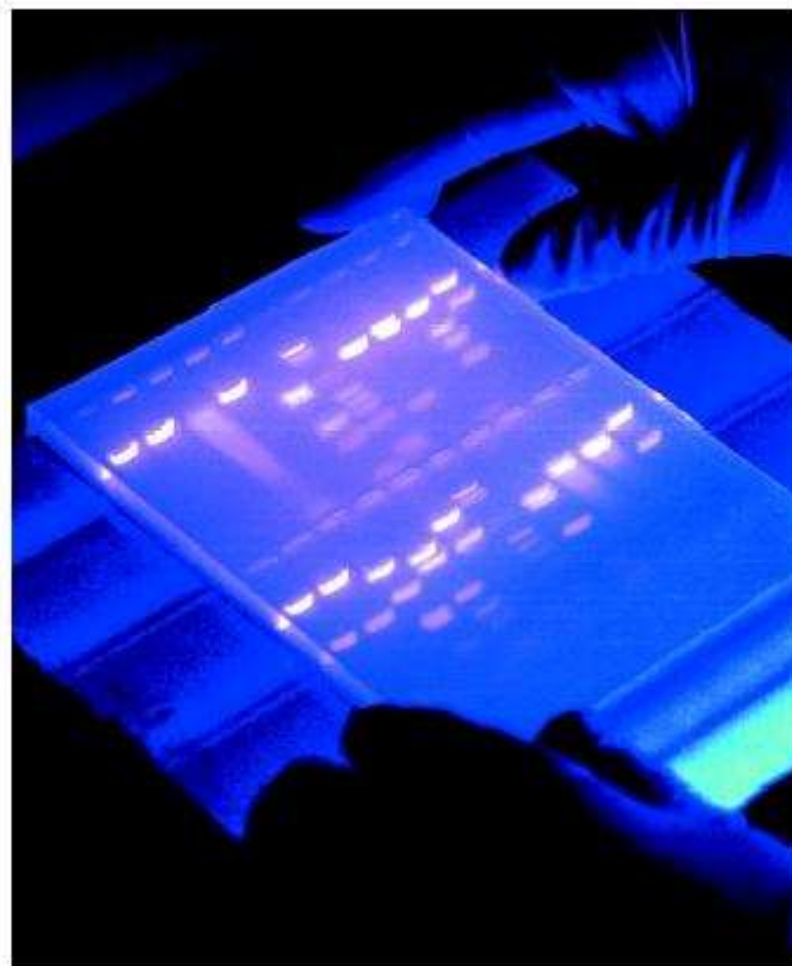
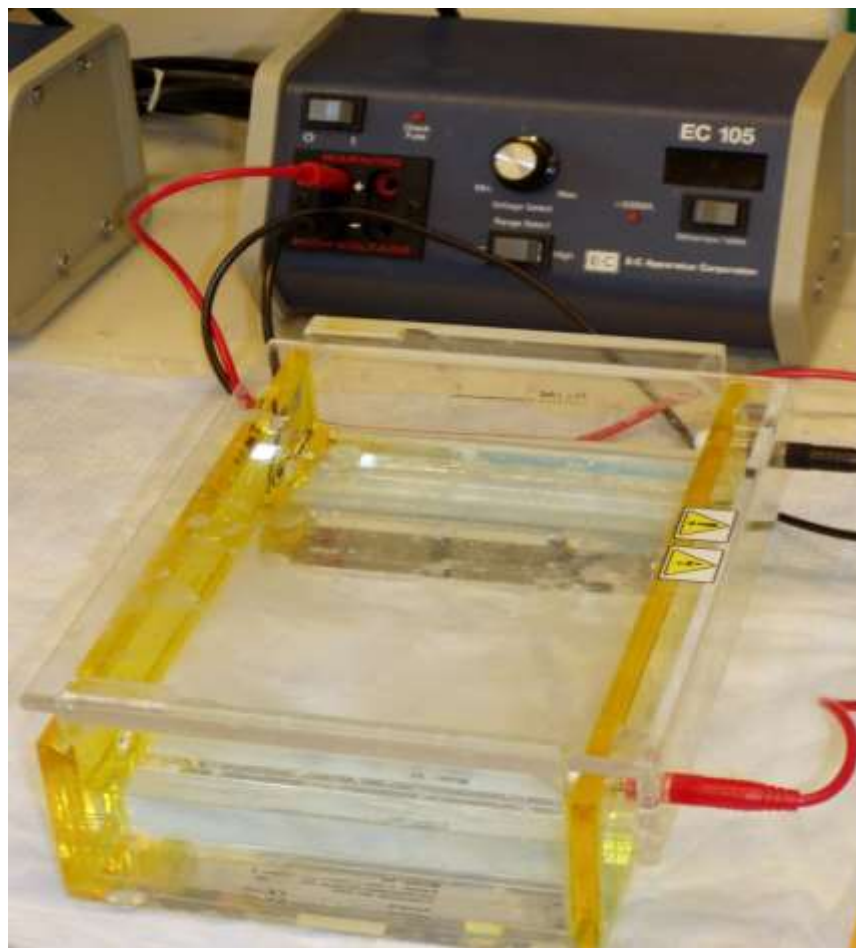
- Η κλωνοποίηση DNA
- Η κατασκευή βιβλιοθηκών DNA
- Η ανίχνευση πολυμορφισμών
- Το αποτύπωμα DNA (DNA fingerprint)
- Η δημιουργία χαρτών του DNA
 - Η μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων
- Η επεξεργασία του DNA



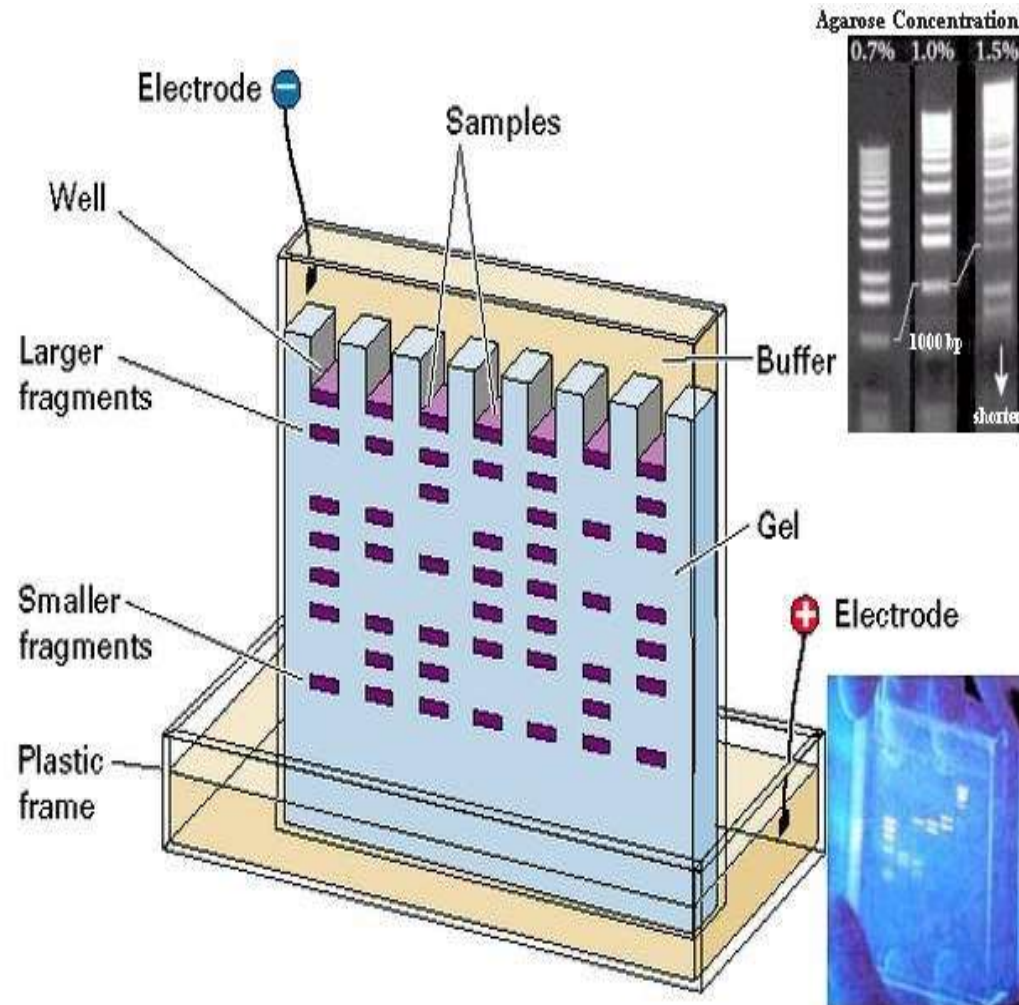
Ηλεκτροφόρηση DNA

- Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών.
- Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση.
- Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους.
- Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία

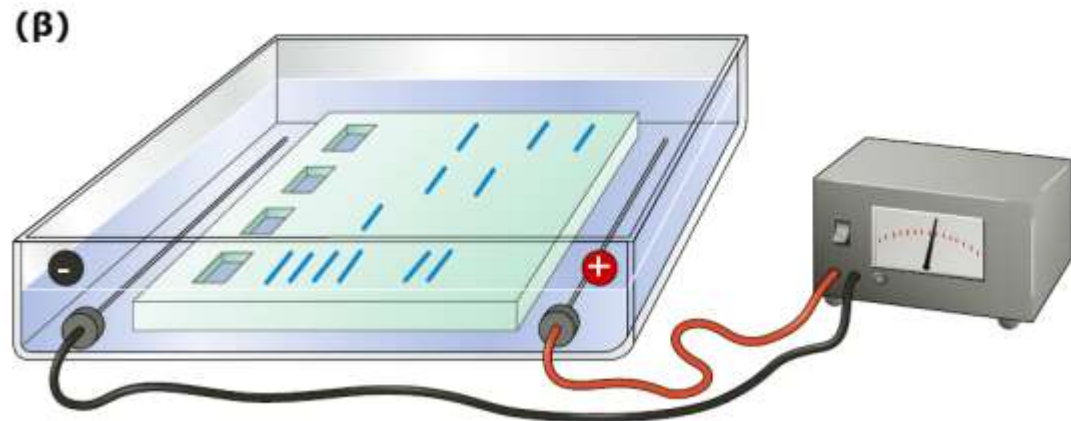
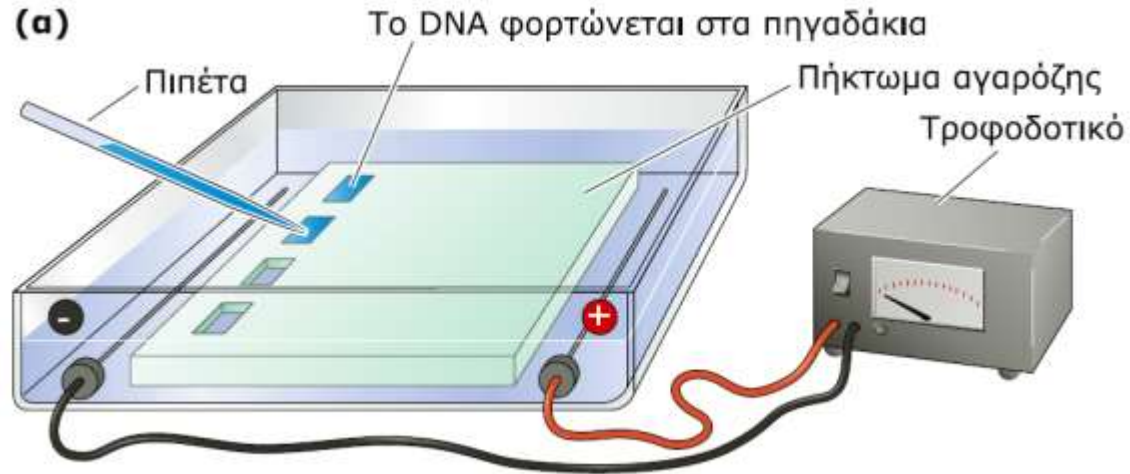
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα



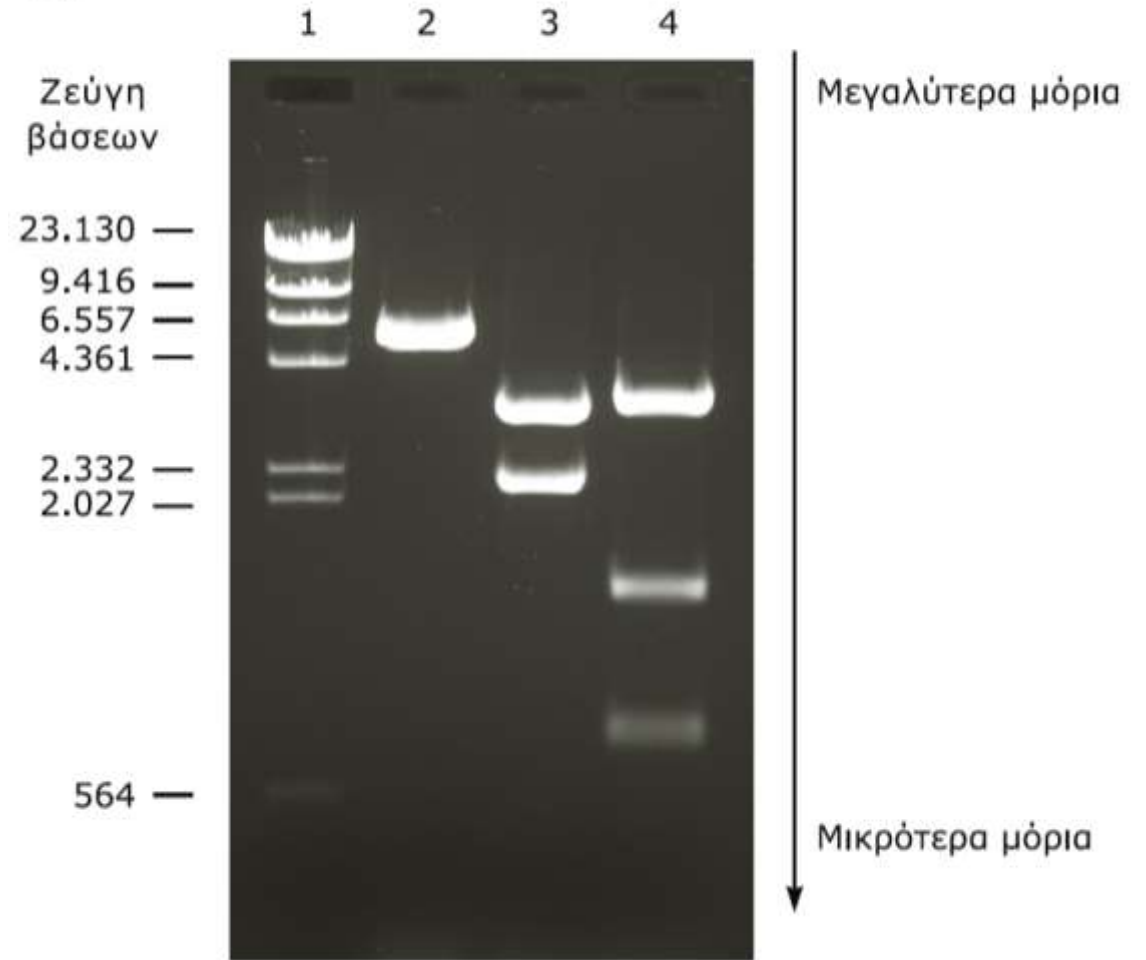
Vertical electrophoresis



Διαχωρισμός μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα.



(γ)

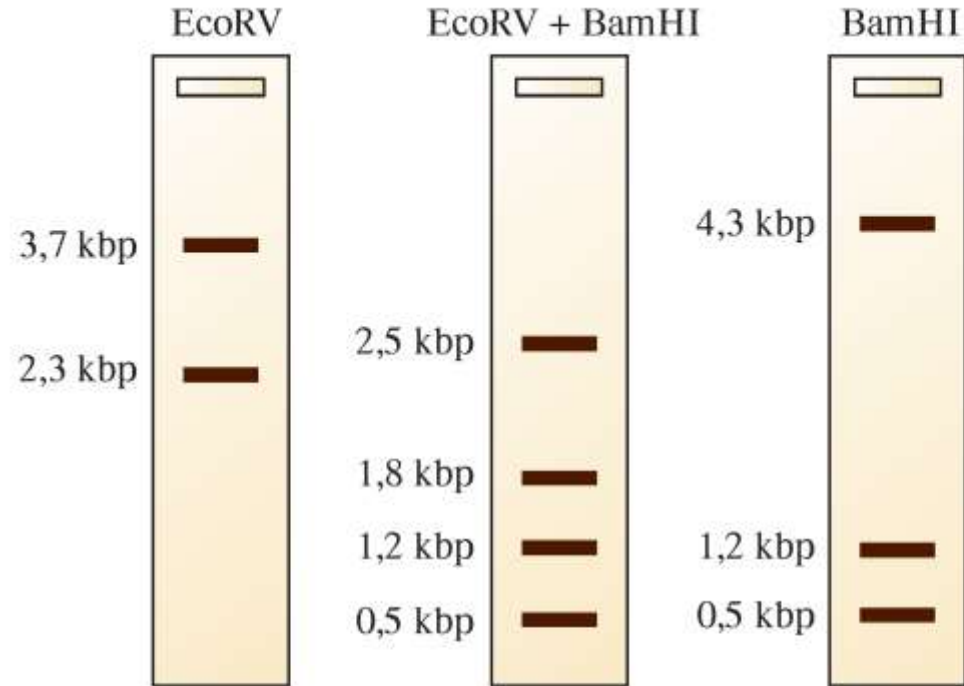


Η κινητικότητα των μορίων DNA σε ένα πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από

1. Το μέγεθος : Ένα γραμμικό μόριο DNA κινείται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού του βάρους.
2. Τη συγκέντρωση της αγαρόζης
3. Τη διαμόρφωση του DNA
4. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
5. Την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου

Κατασκευή ενός περιοριστικού χάρτη

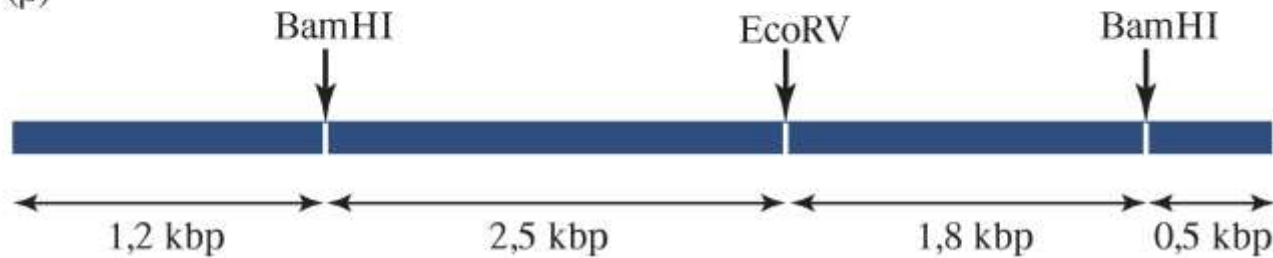
(α)



(α) Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης πέσεων ενός γραμμικού μορίου DNA μεγέθους 6.000 bp με τα ένζυμα που υποδεικνύονται σε κάθε περίπτωση.

(β) Ο περιοριστικός χάρτης του μορίου όπως προκύπτει από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των τριών πέσεων.

(β)

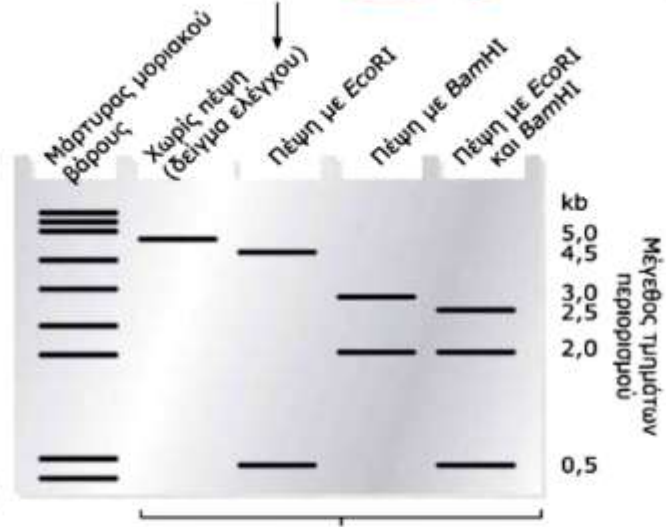


Πολλαπλά αντίγραφα ενός κλωνοποιημένου γραμμικού τμήματος DNA, μεγέθους 5,0 kb.



Πέψη με ένζυμα περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

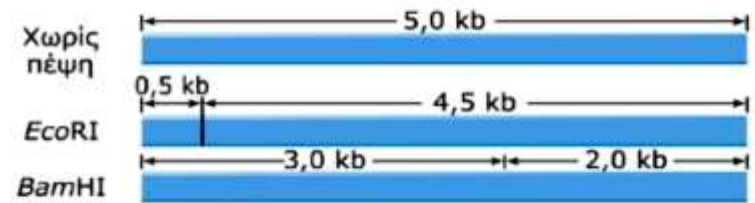
DNA μεγαλύτερου μεγέθους
 Μετανάστευση
 DNA μικρότερου μεγέθους



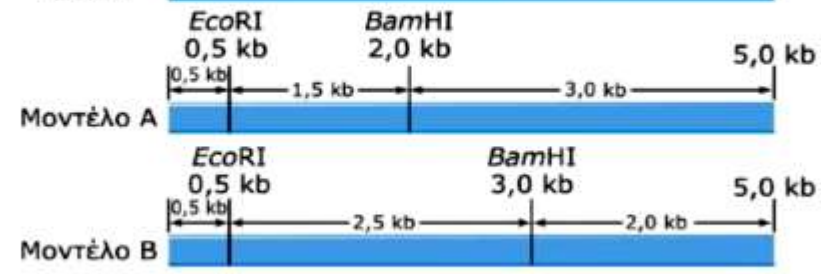
Αποτελέσματα

Χωρίς πέψη	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>
5,0 kb	4,5 kb 0,5 kb	3,0 kb 2,0 kb	2,5 kb 2,0 kb 0,5 kb

Ερμηνεία



Κατασκευή μοντέλων



Προβλεπόμενα μεγέθη τμημάτων μετά από διπλή πέψη με *EcoRI* και *BamHI*

3,0, 1,5 και 0,5 kb

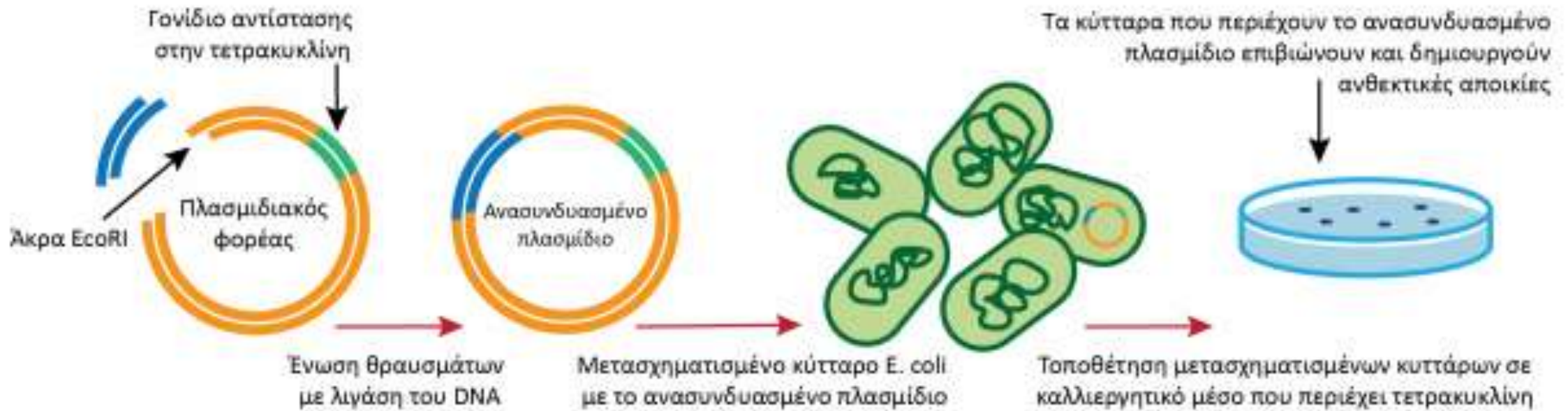
2,5, 2,0 και 0,5 kb

Συμπέρασμα

Τα πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι σωστό είναι το μοντέλο Β.

Κλωνοποίηση DNA

Η κλωνοποίηση μορίων DNA επιτρέπει να παραχθούν πολλά αντίγραφα μιας αλληλουχίας DNA και στη συνέχεια να μελετηθούν ή να τροποποιηθούν κατάλληλα.

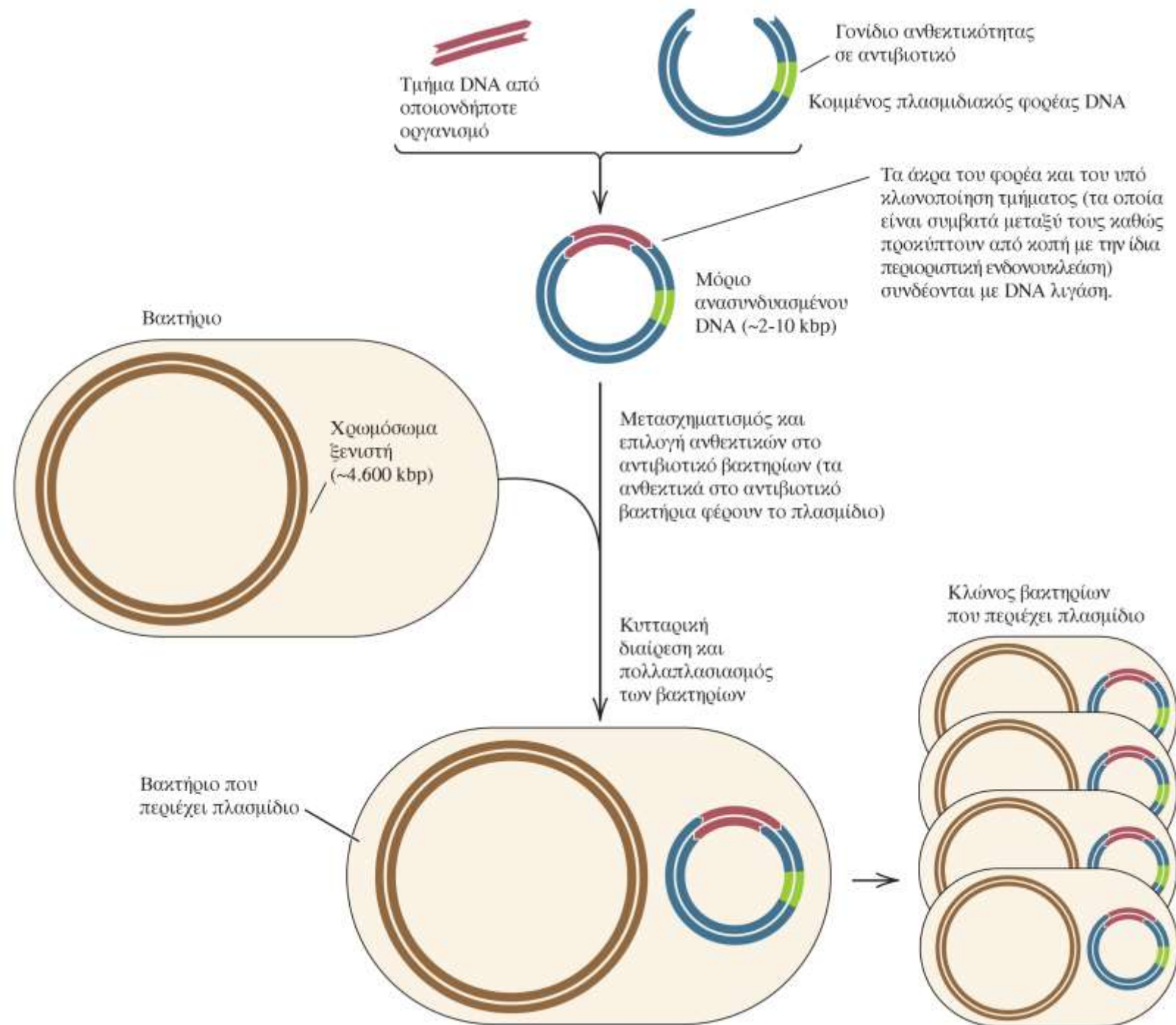


Κατασκευή βιβλιοθηκών DNA : Βιβλιοθήκη DNA είναι το σύνολο των κλώνων που περιέχουν μόρια φορέων, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει ένα διαφορετικό μόριο DNA, που προέρχεται από το σύνολο του DNA ενός κυττάρου

Παράδειγμα κλωνοποίησης

Ένα περιοριστικό κομμάτι DNA που μπορεί να προέρχεται από οποιονδήποτε οργανισμό ενσωματώνεται σε κάποιον πλασμιδιακό φορέα που έχει κοπεί με το ίδιο ένζυμο.

Το **ανασυνδυασμένο πλασμίδιο** που σχηματίζεται χρησιμοποιείται για τον **μετασχηματισμό** δεκτικών βακτηρίων. Μέσα στα βακτηριακά κύτταρα το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αντιγράφεται και μεταβιβάζεται στους απογόνους τους.



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