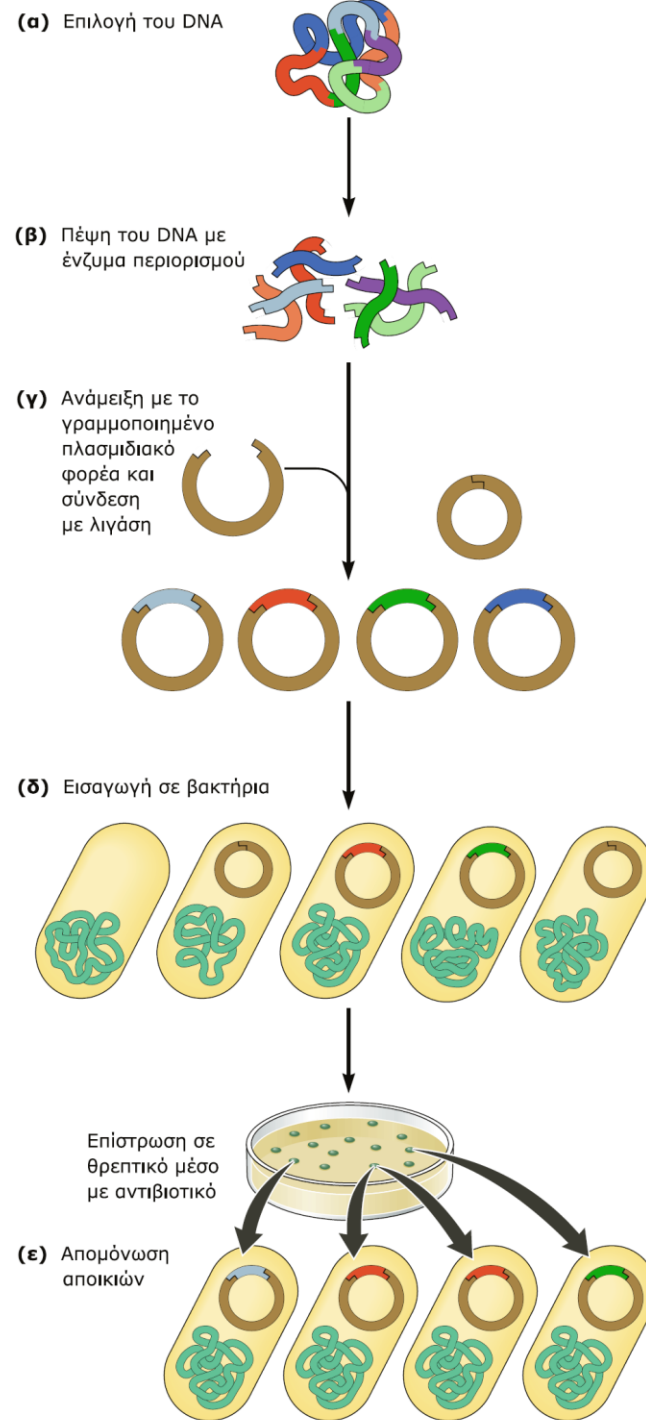


A gel electrophoresis image showing two horizontal lanes of DNA bands. The bands are arranged in a ladder-like pattern, with some lanes showing more bands than others. The image is overlaid with a blue tint and a pair of hands holding the gel. A red vertical bar is located in the top right corner.

Βασικές Τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA

Τα πέντε βασικά βήματα της κλωνοποίησης DNA σε πλασμίδιο.



Κλωνοποίηση του DNA

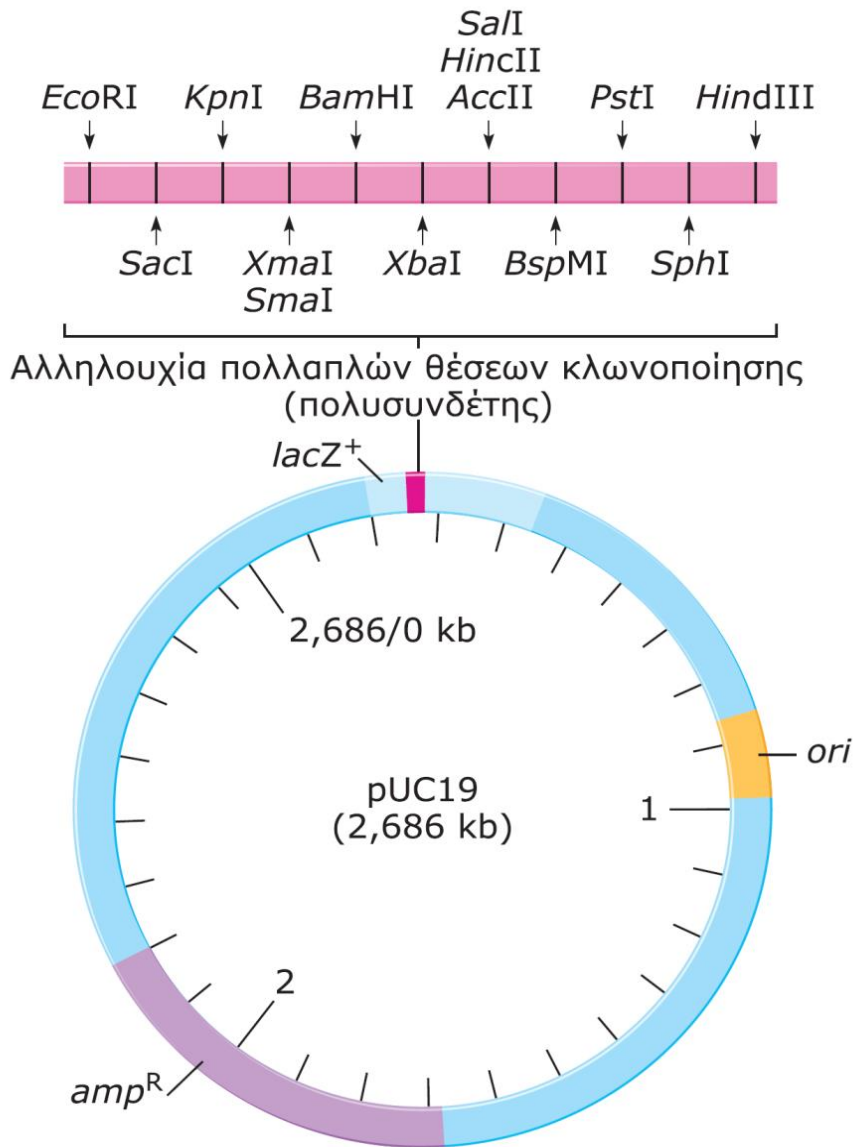
Φορείς κλωνοποίησης: μόρια DNA που περιέχουν μία αφετηρία αντιγραφής και τα οποία μπορούν να διπλασιαστούν στο κύτταρο ξενιστή

Πλασμίδια :εξωχρωμοσωμικά, αυτόνομα διπλασιαζόμενα κυκλικά τμήματα DNA

Πλασμίδια ως φορείς κλωνοποίησης

- Μόνο μία περιοχή στόχο για τουλάχιστον μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση
- Έναν ή περισσότερους επιλεγόμενους γενετικούς δείκτες
- Μία αφετηρία αντιγραφής (origin, ή ori)

Φορέας κλωνοποίησης pUC19

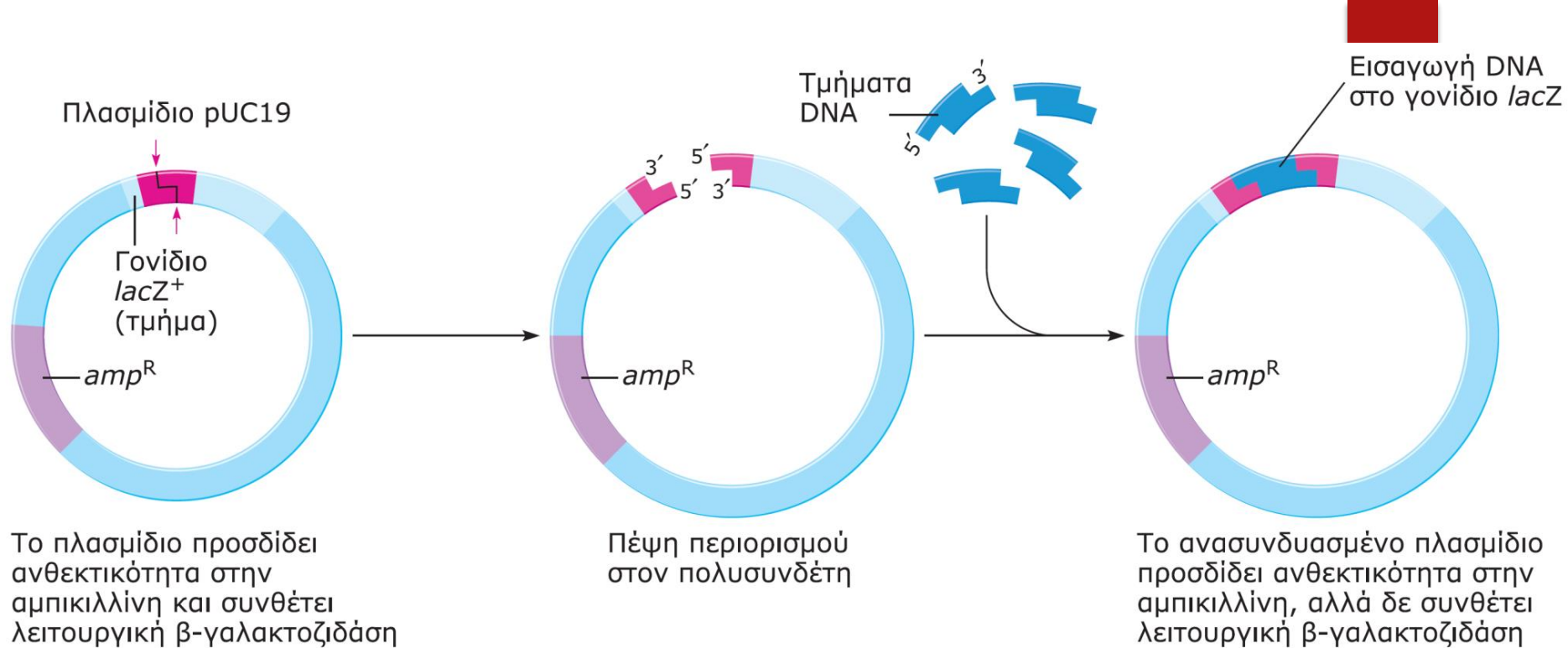


ori = Θέση έναρξης της αντιγραφής
amp^R = Γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη
lacZ⁺ = Τμήμα του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης

Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pUC19.

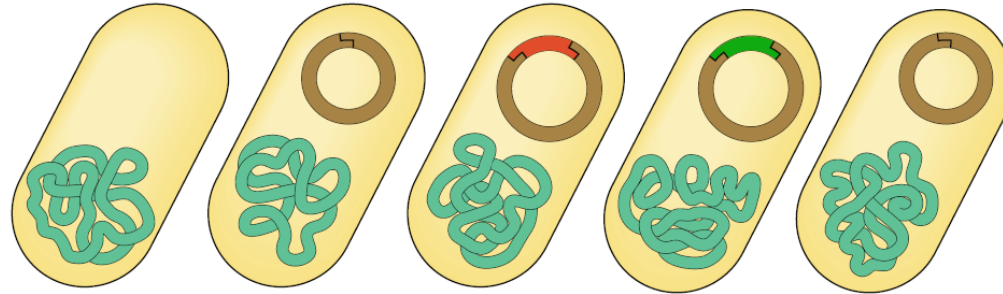
Το πλασμίδιο αυτό φέρει :

- μια θέση έναρξης της αντιγραφής (*ori*),
- το δείκτη επιλογής *amp^R*
- και έναν πολυσυνδέτη που εδράζεται στο τμήμα άλφα του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης, *lacZ⁺*.



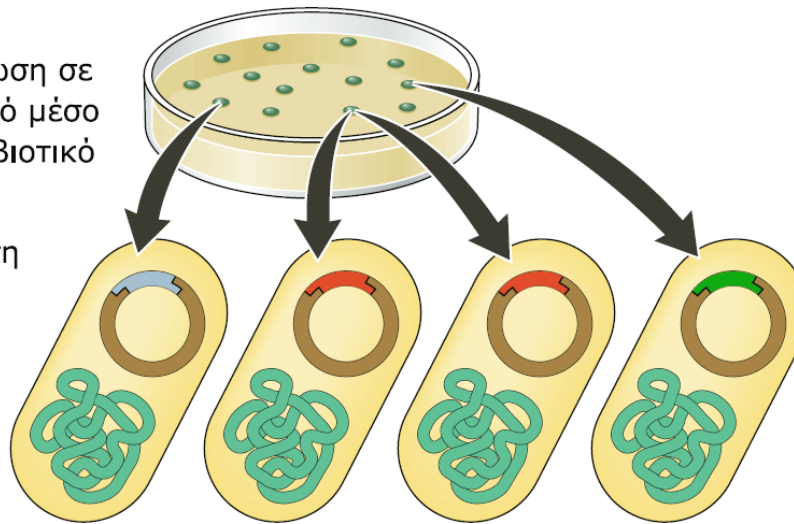
Ένθεση ενός τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pUC19 και δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου μορίου DNA.

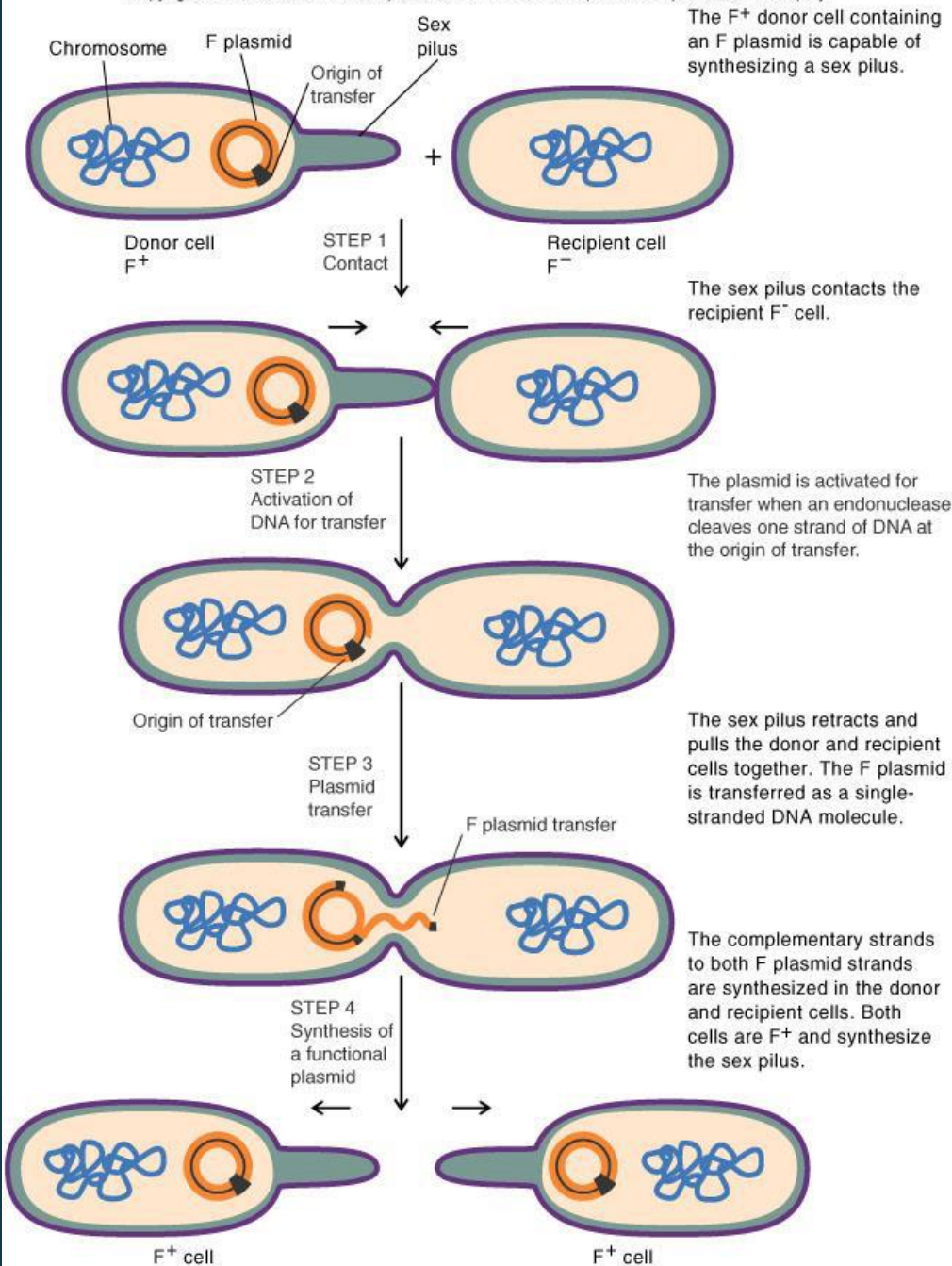
(δ) Εισαγωγή σε βακτήρια



Επίστρωση σε
θρεπτικό μέσο
με αντιβιοτικό

(ε) Απομόνωση
αποικιών





Η ανταλλαγή γενετικού μεταξύ βακτηρίων γίνεται με σύζευξη, επαγωγή και μετασχηματισμό.

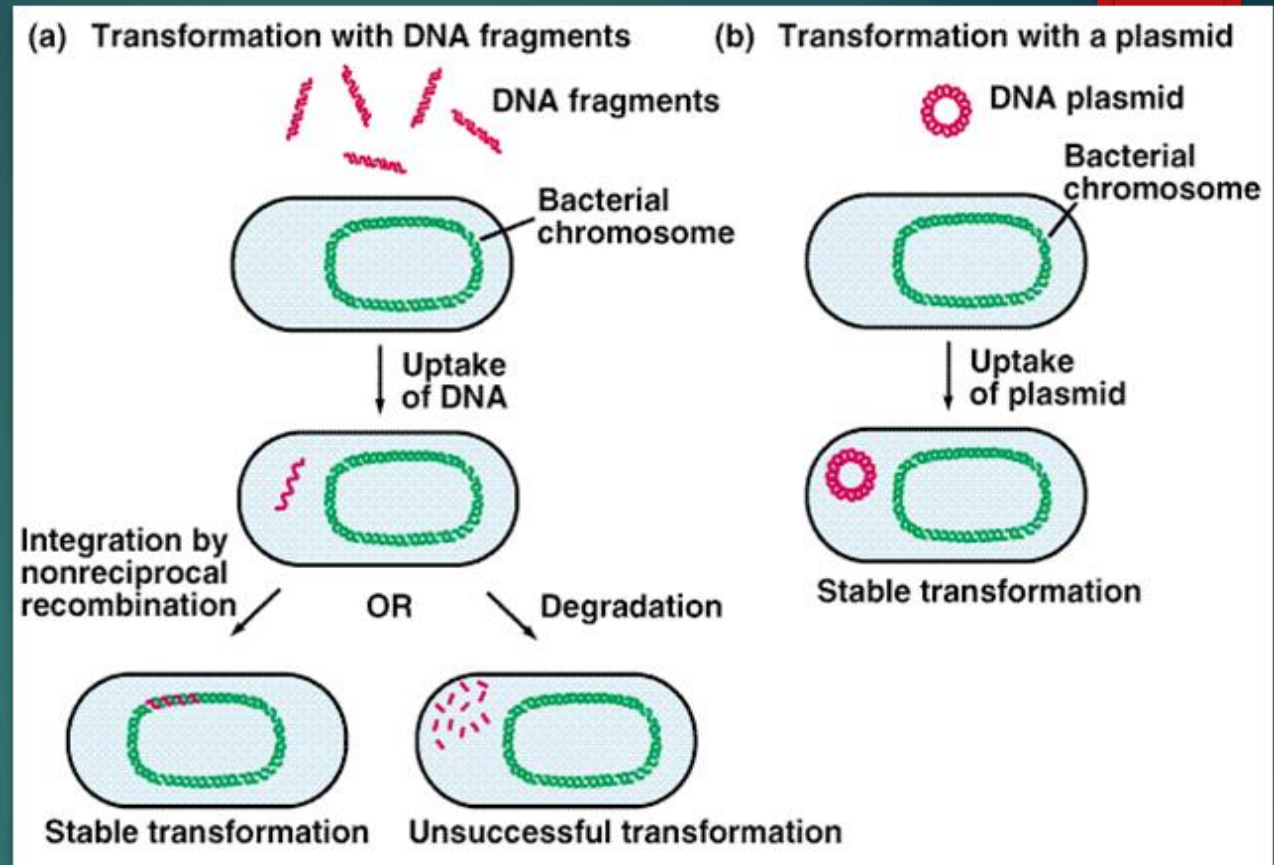
Σύζευξη

F^+ , που δείχνει την ικανότητα του βακτηρίου να είναι δότης γενετικής πληροφορίας και F^- που είναι δέκτης. Η βακτηριακή σύζευξη έχει δύο συνέπειες, τη μεταφορά γενετικού υλικού από τον δότη στον δέκτη και τη μετατροπή του δέκτη από F^- σε F^+ φαινότυπο

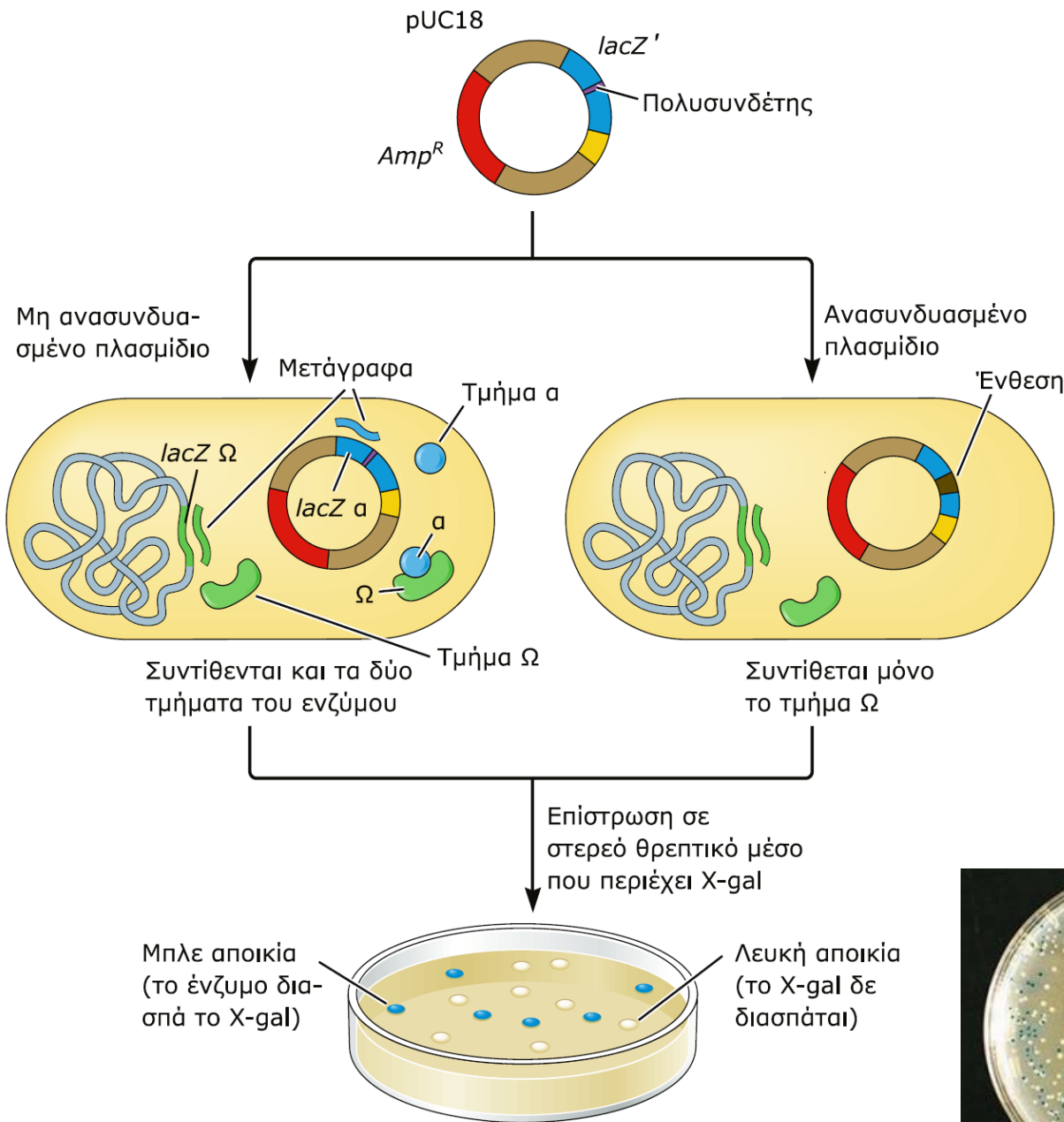
Μετασχηματισμός

Μετασχηματισμός :

η κληρονομήσιμη αλλαγή στις ιδιότητες ενός βακτηριακού στελέχους που προέρχεται από την ενσωμάτωση εξωγενούς DNA.



Μετά την ολοκλήρωση του ανασυνδυασμού, η γενετική πληροφορία που βρίσκεται ενσωματωμένη στο βακτηριακό χρωμόσωμα μπορεί να εκφραστεί έχοντας σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση του λειτουργικού μετασχηματισμένου κυττάρου.

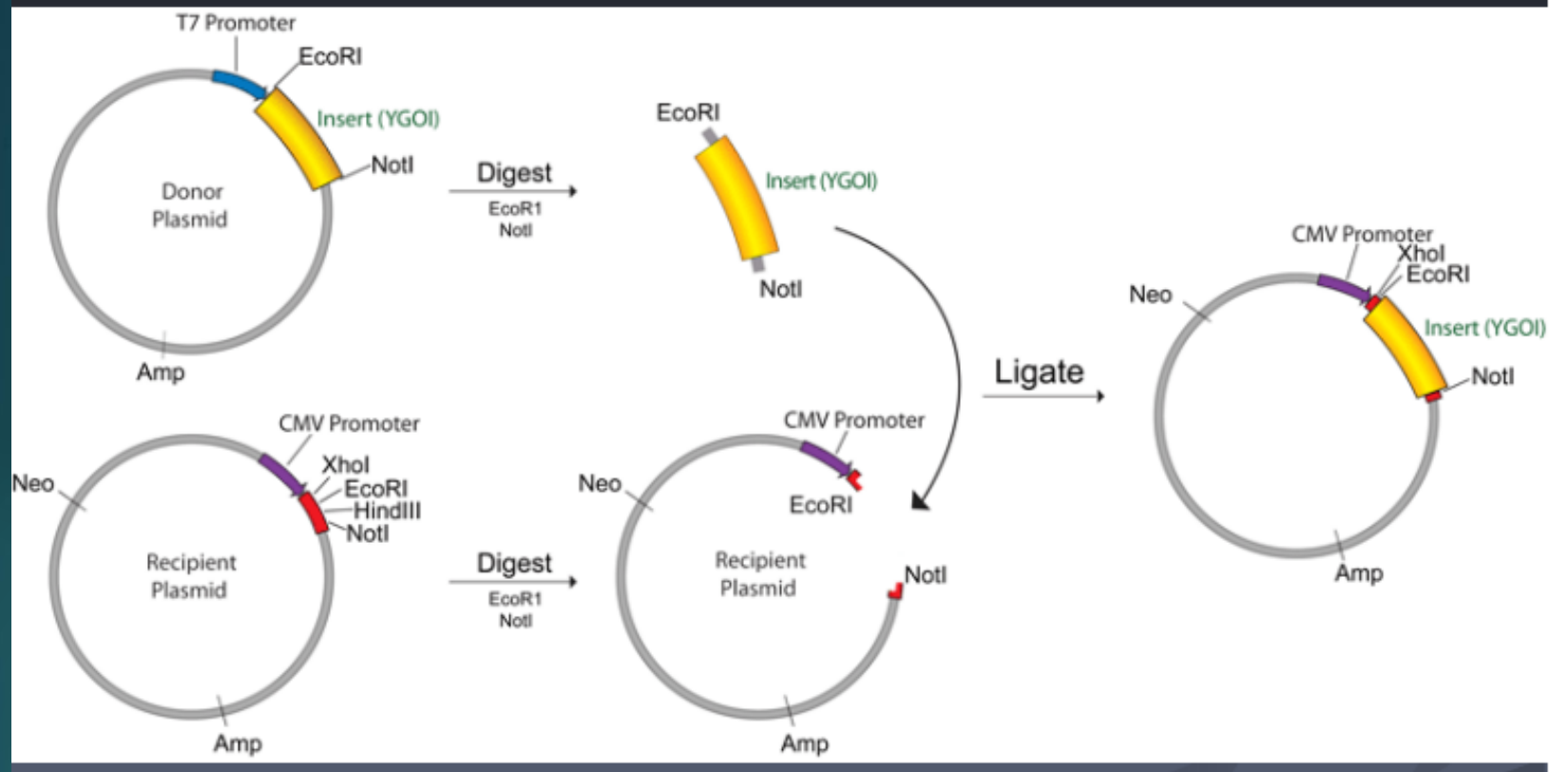


Διάκριση μπλε-λευκών αποικιών για τον εντοπισμό ανασυνδυασμένων φορέων.

X-gal διασπάται από τη β-γαλακτοσιδάση σε γαλακτόζη και 5-βρομο-4-χλωρο-3-υδροξυ-ινδόλη το οποίο οξειδώνεται στη συνέχεια σε 5,5'-διβρωμο-4,4'-διχλωρο-*indigo* που είναι ένα μπλε αδιάλυτο προϊόν.



Η χρησιμότητα της πέψης με δύο περιοριστικά ένζυμα.



Η χρήση δύο περιοριστικών ενζύμων δεν επιτρέπει την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου χωρίς την ένθεση του νέου τμήματος DNA. Επίσης το νέο τμήμα DNA εισέρχεται στο φορέα με συγκεκριμένη κατεύθυνση.

Άλλοι φορείς κλωνοποίησης

➤ **Ίικοί φορείς (λ φάγος ο πιο συνηθισμένος)**

- Μεγάλα τμήματα του DNA του φάγου λ δεν είναι απαραίτητα για μόλυνση του ξενιστή και μπορούν να αντικατασταθούν από ξένο DNA
- Μεταλλαγμένοι φάγοι ειδικά κατασκευασμένοι για κλωνοποίηση (π.χ. λgt-λβ, περιέχει μόνο 2 περιοριστικές θέσεις, EcoRI)
- Εισάγονται πιο εύκολα στα βακτήρια από ότι τα πλασμίδια

➤ **Κοσμίδια: υβρίδια πλασμιδιακών και ικών φορέων**

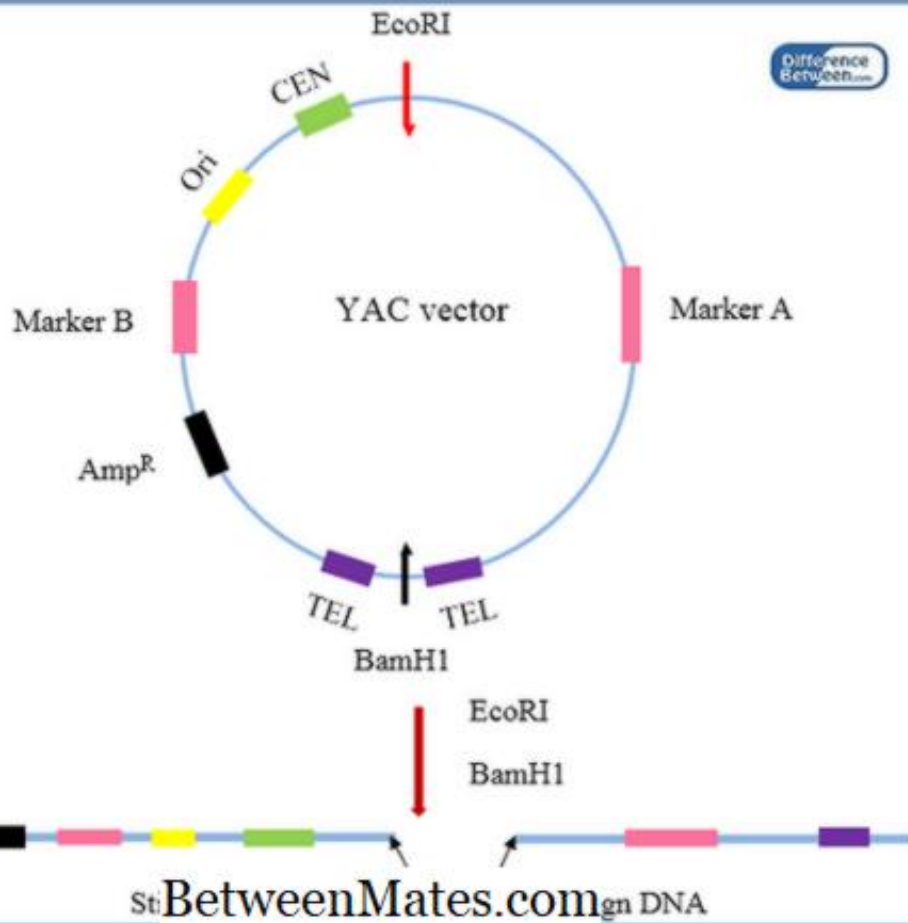
- Επιτρεπτή η κλωνοποίηση μεγάλων τμημάτων DNA (μέχρι ~ 45 kb)

➤ **Τεχνητά χρωμοσώματα (BAC – YAC)**

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

Τυπικό τεχνητό χρωμόσωμα ζυμομύκητα (YAC).



Το YAC περιέχει :

- ένα τελομερές ζυμομύκητα (TEL) σε κάθε άκρο,
- ένα κεντρομερές ζυμομύκητα (CEN),
- ένα δείκτη επιλογής ζυμομύκητα σε κάθε βραχίονα
- μία αυτόνομα αντιγραφόμενη αλληλουχία
- και θέσεις περιορισμού για την κλωνοποίηση του εξωγενούς DNA.

Επιλογή σωστού αρχικού υλικού για την κλωνοποίηση

1. **Γονιδιωματική βιβλιοθήκη** : συλλογή κλώνων που περιέχει όλες τις αλληλουχίες DNA του γονιδιώματος
2. **cDNA βιβλιοθήκη** : συλλογή κλώνων αντιγράφων DNA που προέρχονται από το τα mRNA του κυττάρου



Σύνθεση cDNA.

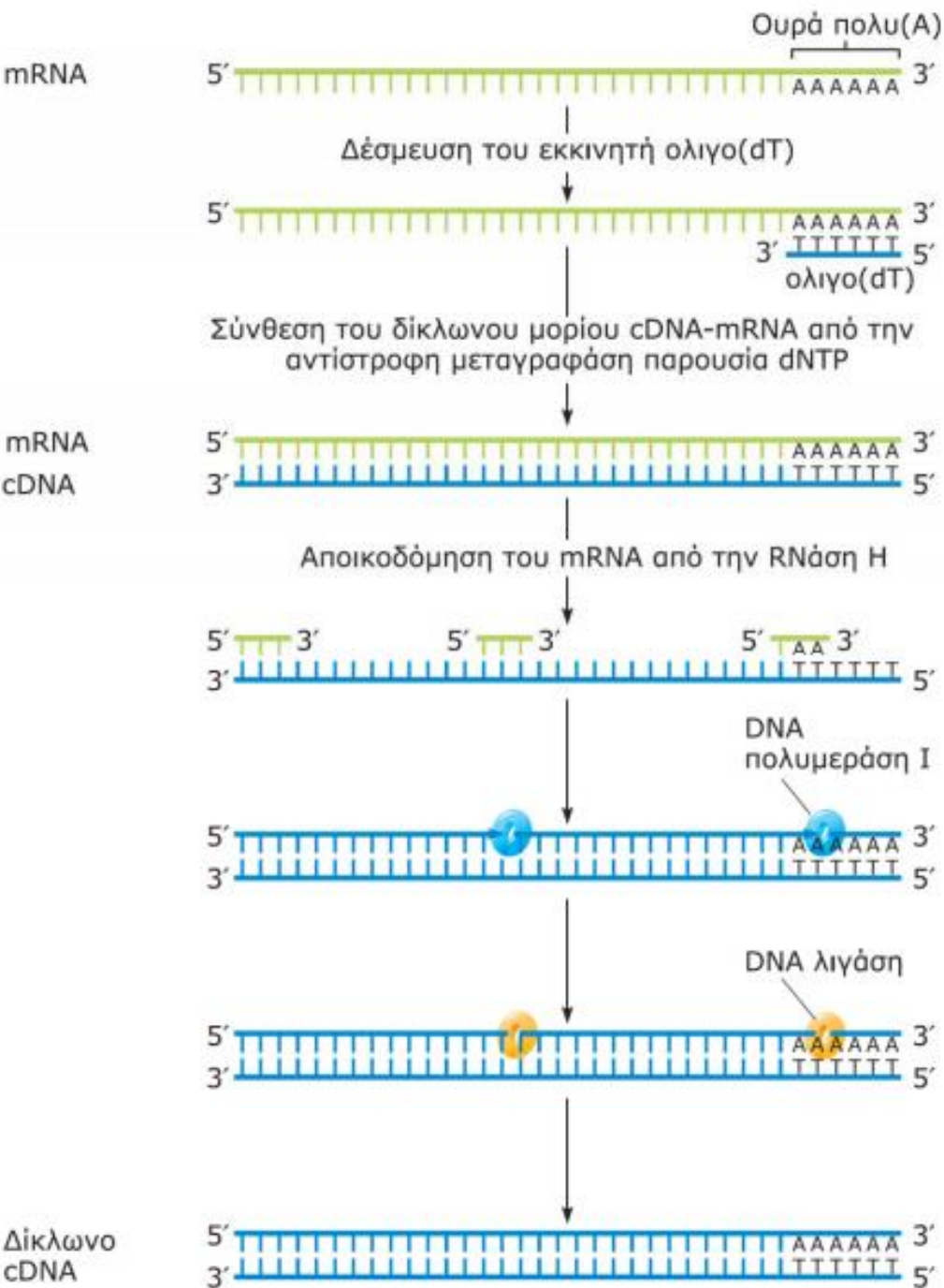
Το μόριο έχει τυφλά άκρα και η εισαγωγή του σε πλασμιδιακό ή ιικό γίνεται με κατάλληλες τεχνικές

Κάθε κλώνος που προκύπτει καλείται cDNA κλώνος

Ολόκληρη η συλλογή των κλώνων, cDNA βιβλιοθήκη

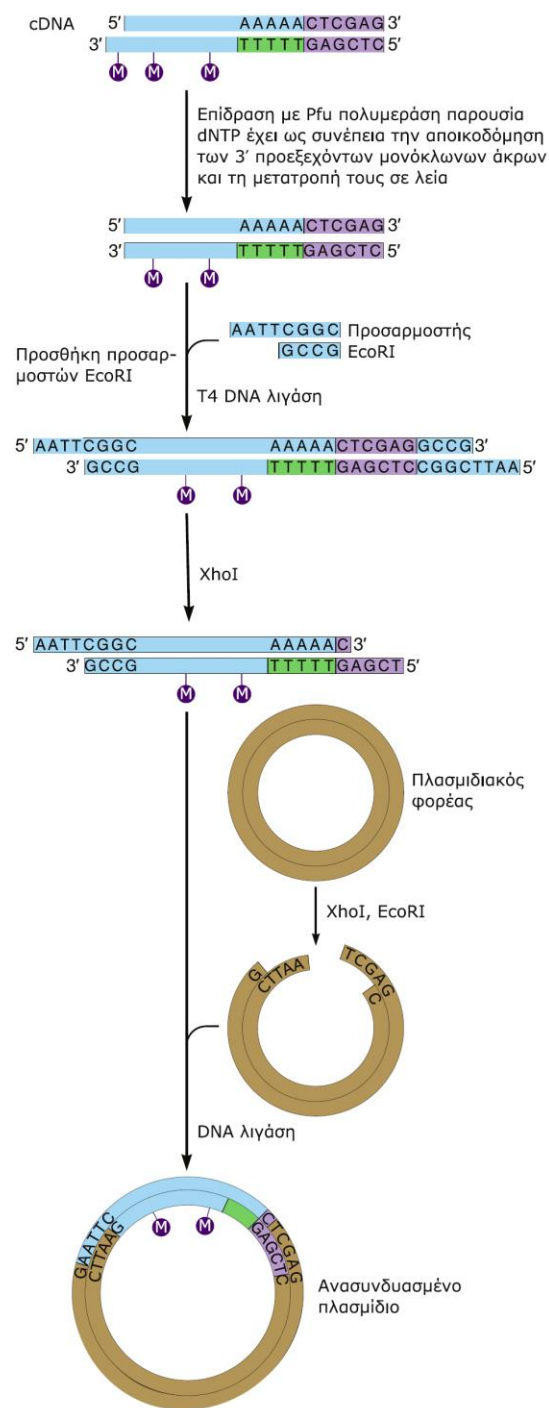
Σύνθεση δικλωνου cDNA με τη χρήση

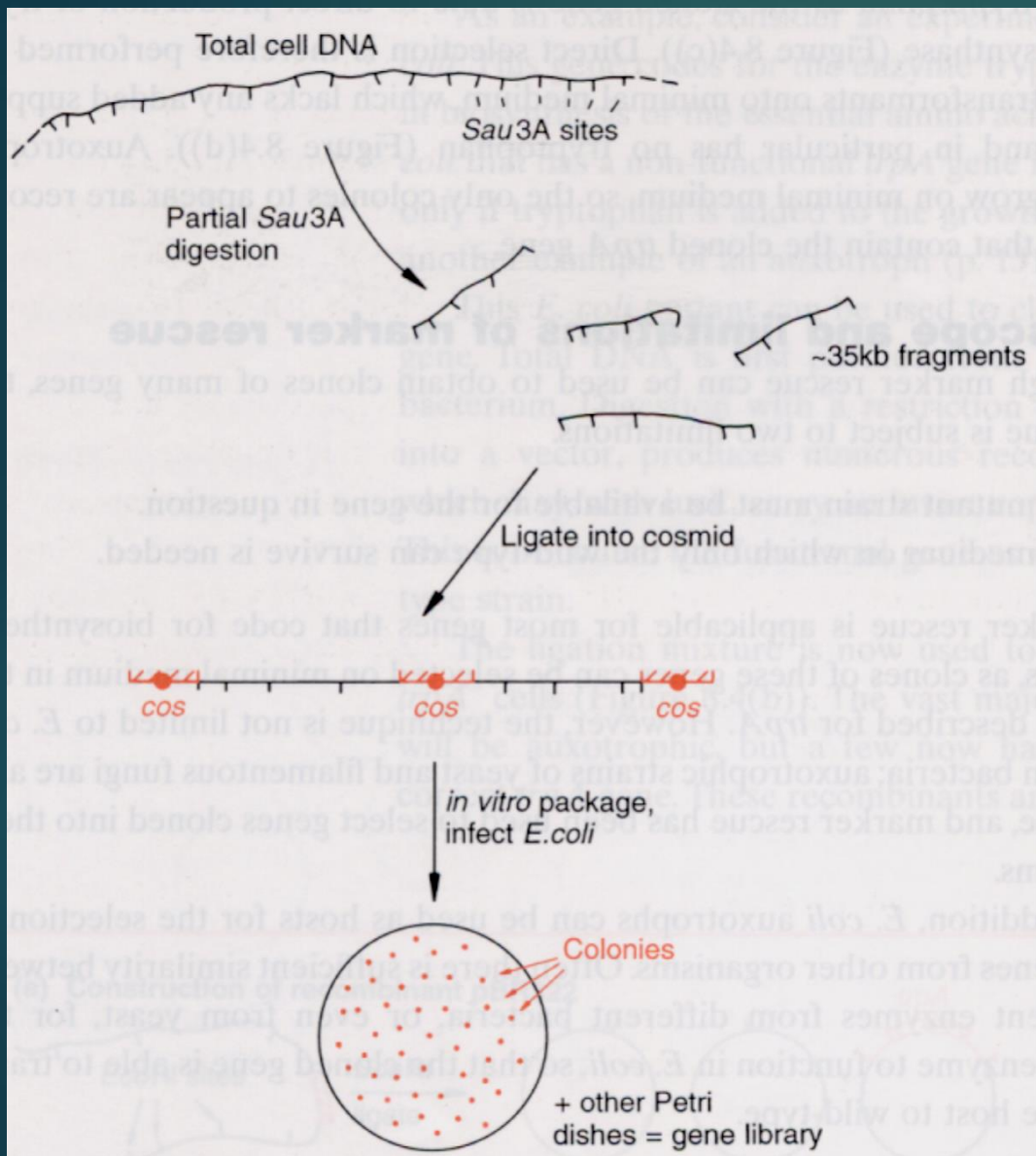
- της αντίστροφης μεταγραφάσης
- της RNάσης H,
- της DNA πολυμεράσης II
- και της DNA λιγάσης.



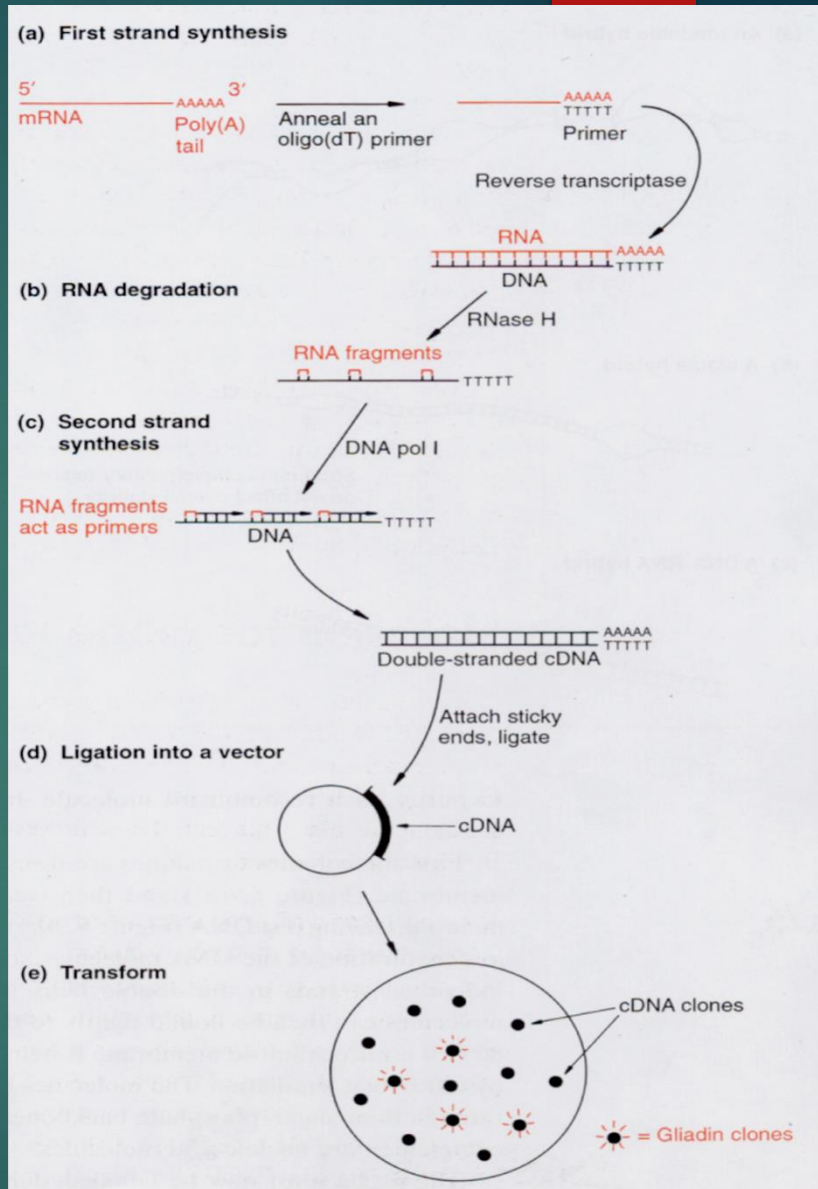
Δίκλωνο cDNA

Προσανατολισμένη κλωνοποίηση του δίκλωνου cDNA σε πλασμιδιακό φορέα.





Γονιδιωματική Βιβλιοθήκη



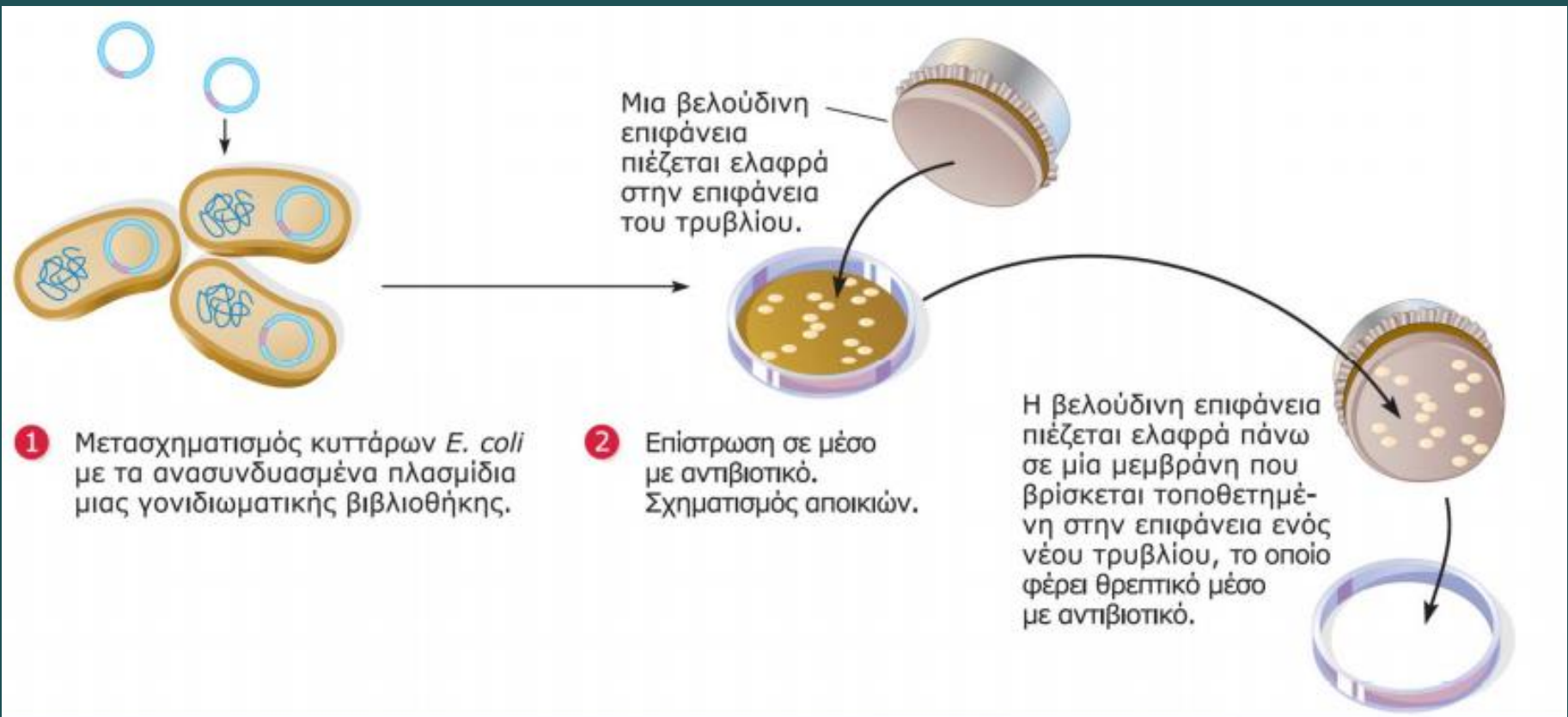
cDNA Βιβλιοθήκη

Μέθοδος κλωνοποίησης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Τυφλής σκόπευσης κλωνοποίηση	<ul style="list-style-type: none"> •Εύκολη να γίνει 	<ul style="list-style-type: none"> ▪Πολλοί διαφορετικοί κλώνοι ▪Γονίδια με ιντρόνια δεν θα εκφραστούν σωστά σε βακτήρια ▪Η έκφραση εξαρτάται από την αναγνώριση προαγωγέων από το βακτήριο ▪Η επιλογή των κωδικονίων μπορεί να μην είναι ιδανική για το βακτήριο
Κλωνοποίηση cDNA	<ul style="list-style-type: none"> •Αν το επιθυμητό mRNA βρίσκεται σε αφθονία •Τα ιντρόνια δεν είναι πρόβλημα 	<ul style="list-style-type: none"> •Δεν είναι πάντα άφθονο το επιθυμητό mRNA •Τεχνικά πιο δύσκολη •Το κλωνοποιημένο γονίδιο πρέπει να τοποθετηθεί μετά έναν προαγωγέα •Η επιλογή των κωδικονίων μπορεί να μην είναι ιδανική για το βακτήριο

Επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων

- Υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων (*in situ* υβριδισμός)
- Επιλογή με βάση την παραγόμενη πρωτεΐνη (ιχνηλάτες)

Σάρωση μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε πλασμιδιακό φορέα με ιχνηθέτη ένα σημασμένο μόριο DNA



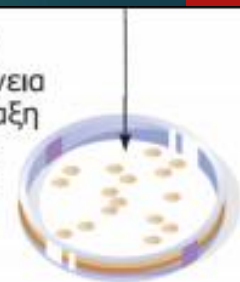
Σάρωση μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε πλασμιδιακό φορέα με ιχνηθέτη ένα σημασμένο μόριο DNA

Η ραδιενεργή σήμανση του ιχνηθέτη γίνεται με αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA και ενίσχυση του ιχνηθέτη με τυχαίους εκκινητές (εξανουκλεοτίδια με τυχαία αλληλουχία) και ραδιοσημασμένα dNTPs.

Νουκλεοτιδικοί ιχνηθέτες

Εφόσον γνωρίζουμε μέρος της αμινοξικής αλληλουχίας του γονιδίου: Σχεδιάζουμε μείγμα με σημασμένα oligos 20bp όλων των δυνατών επιλογών βασιζόμενοι στον εκφυλισμό του γενετικού κώδικα.

3 Πολλαπλασιασμός των βακτηρίων στην επιφάνεια της μεμβράνης. Η διάταξη των αποικιών στη μεμβράνη είναι ίδια με αυτή στο αρχικό τρυβλίο.



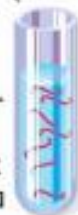
4 Αφαίρεση της μεμβράνης από το τρυβλίο, λύση των βακτηρίων *in situ*, αποδιάταξη του DNA και δέσμευσή του στην επιφάνεια της μεμβράνης.



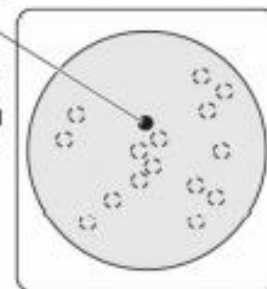
Υβριδοποίηση με κατάλληλο ιχνηθέτη. Δέσμευση του ιχνηθέτη στις συμπληρωματικές προς αυτόν αλληλουχίες που βρίσκονται καθηλωμένες στη μεμβράνη.



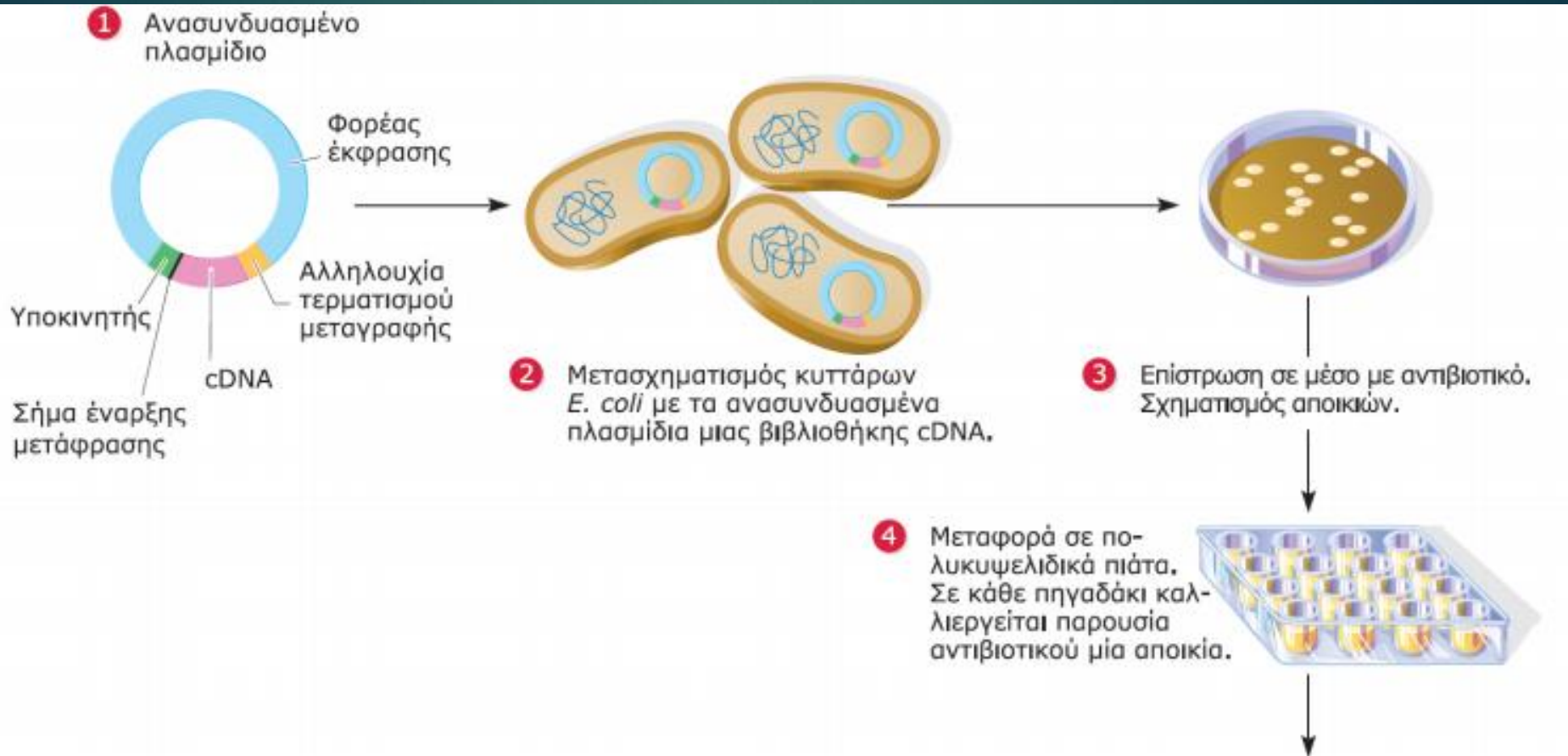
5 Αποδιάταξη του σημασμένου ιχνηθέτη και επώαση της μεμβράνης με αυτόν μέσα σε μία ερμητικά κλειστή σακούλα.



6 Έκπλυση και απομάκρυνση της περίσσειας του ιχνηθέτη. Ταυτοποίηση των θετικών κλώνων (π.χ. με αυτοραδιογραφία αν ο ιχνηθέτης είναι ραδιενεργά σημασμένος).




Σάρωση μιας βιβλιοθήκης cDNA με τη χρήση ενός σημασμένου αντισώματος.

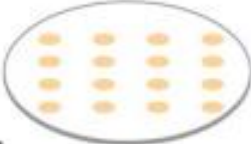


Σάρωση μιας βιβλιοθήκης cDNA με τη χρήση ενός σημασμένου αντισώματος.

5 Μεταφορά σε μεμβράνη λίγων κυττάρων από κάθε κλώνο. Η μεμβράνη επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο, τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται και εκφράζονται τα cDNA.

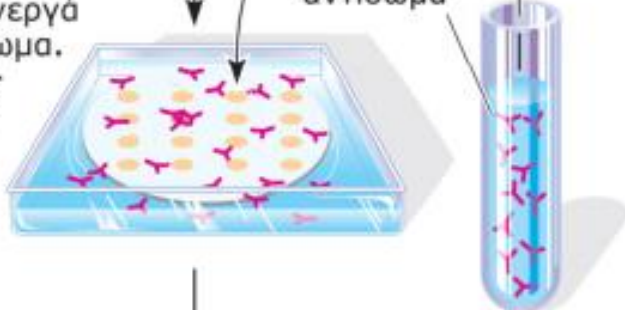


6 Αφαίρεση της μεμβράνης και λύση των κυττάρων *in situ*. Οι πρωτεΐνες που εκφράστηκαν από τα cDNA προσδένονται στη μεμβράνη.

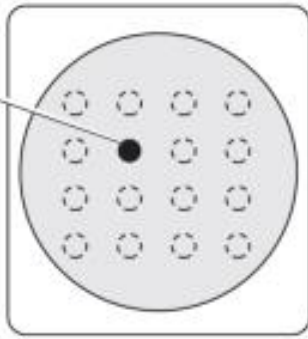


7 Επώαση με ραδιενεργά σημασμένο αντίσωμα. Έκπλυση και απομάκρυνση του μη δεσμευμένου αντισώματος.

Ραδιενεργό αντίσωμα



8 Αυτοραδιογραφία και ταυτοποίηση θετικών κλώνων.



1 Γονιδιωματικό DNA.

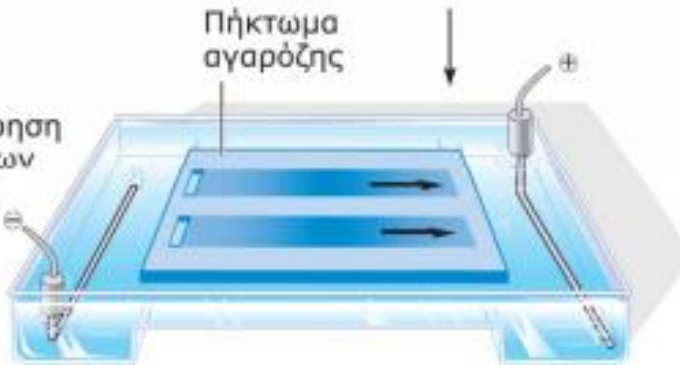


Πέψη με ένζυμο περιορισμού

2 Τμήματα περιορισμού ποικίλων μεγεθών.



3 Ηλεκτροφόρηση των τμημάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.



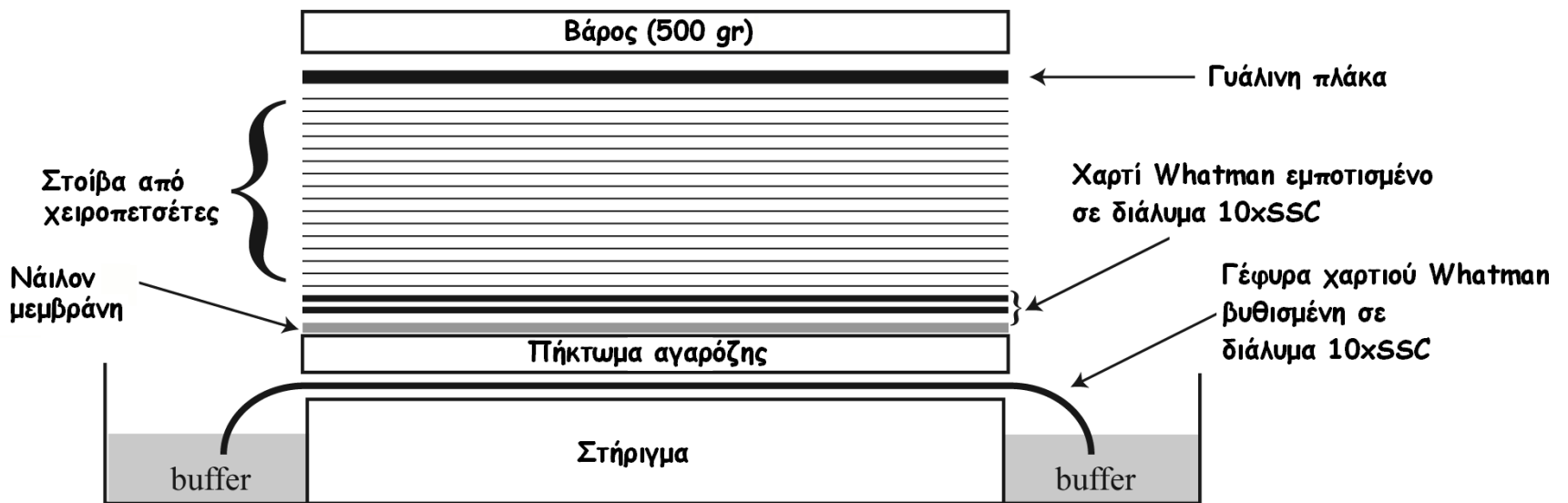
4 Μεταφορά σε μεμβράνη (στύπωμα Southern).



Στύπωμα κατά Southern:

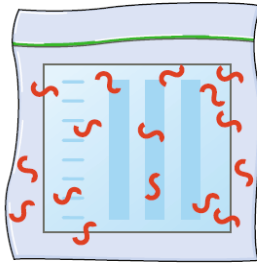
Ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα, στύπωμα και υβριδοποίηση.

Ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA με σκοπό τον εντοπισμό αλληλουχιών συμπληρωματικών προς ένα σημασμένο ιχνηθέτη (για παράδειγμα, ένα μόριο cDNA).



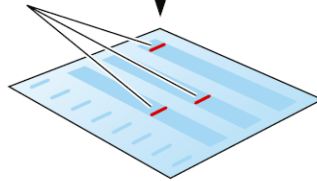
Προστίθεται στη μεμβράνη το ραδιενεργά σημασμένο με ^{32}P νουκλεϊκό οξύ, που χρησιμοποιείται ως ιχνηθέτης

Σφραγισμένη πλαστική σακούλα στην οποία λαμβάνει χώρα η υβριδοποίηση



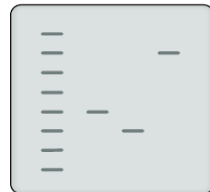
Η περίσσεια του ιχνηθέτη ξεπλένεται

Ιχνηθέτης υβριδοποιημένος με τις συμπληρωματικές προς αυτόν αλληλουχίες, που βρίσκονται καθλωμένες στη μεμβράνη



Ένα ακτινογραφικό φιλμ εκτίθεται στη μεμβράνη

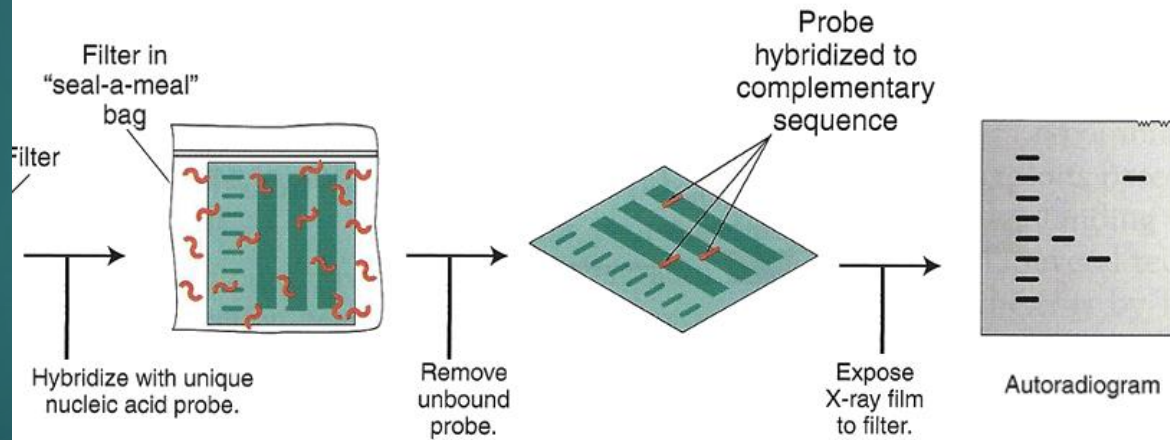
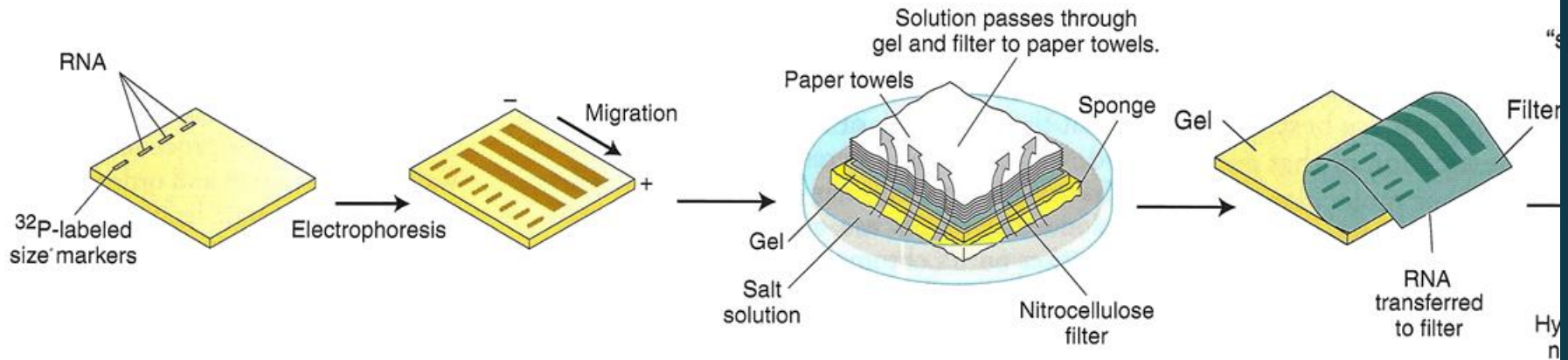
Αποτέλεσμα της αυτοραδιογραφίας



Στύπωμα κατά Southern: ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα, στύπωμα και υβριδοποίηση.

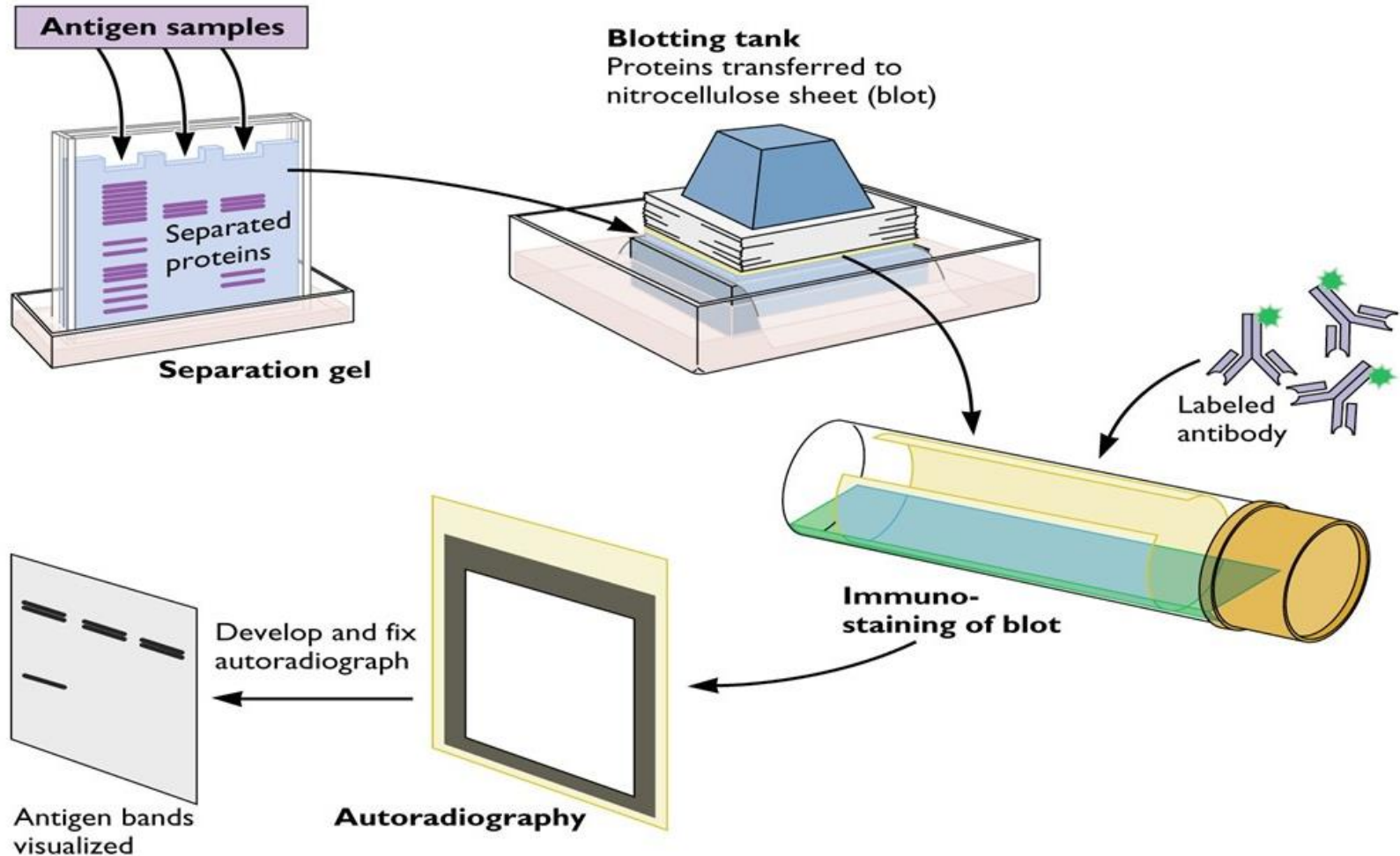
Σε αυτό το θεωρητικό παράδειγμα, ο ιχνηθέτης υβριδοποιείται με τρία τμήματα DNA. Οι αντίστοιχες ζώνες καθίστανται ορατές μέσω αυτοραδιογραφίας ή χημειοφωταύγειας.

Στύπωμα κατά Northern (RNA blot):



Στύπωμα κατά Western (protein immunoblot) :

Western Blotting Technique



Comparison of Southern, Northern, and Western blotting techniques

	Southern blotting	Northern blotting	Western blotting
Molecule detected	DNA (ds)	mRNA (ss)	Protein
Gel electrophoresis	Agarose gel	Formaldehyde agarose gel	Polyacrylamide gel
Gel pretreatment	Depurination, denaturation, and neutralization	-	-
Blotting method	Capillary transfer	Capillary transfer	Electric transfer
Probes	DNA Radioactive or nonradioactive	cDNA, cRNA Radioactive or nonradioactive	primary antibody
Detection system	Autoradiography Chemiluminescent Colorimetric	Autoradiography Chemiluminescent Colorimetric	Chemiluminescent Colorimetric

FISH: Fluorescence *in situ* Hybridization

Fluorescent *in situ* Hybridization

