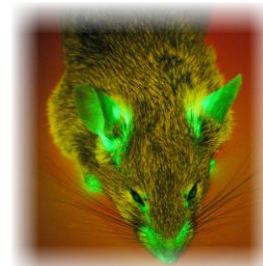




Ανάλυση Μεθοδολογιών Τεχνολογίας Ανασυνδυασμένου DNA



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

Κοσμάς Χαραλαμπίδης, ΕΚΠΑ Τμήμα Βιολογίας

Ανάλυση Μεθοδολογιών Τεχνολογίας Ανασυνδυσασμένου DNA



- Χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών
- Φορείς κλωνοποίησης & Γονίδια δείκτες
- Τρόποι κλωνοποίησης (κατευθυνόμενη και μη)
- Γονιδιωματικές και cDNA βιβλιοθήκες
- Polymerase Chain Reaction (PCR)



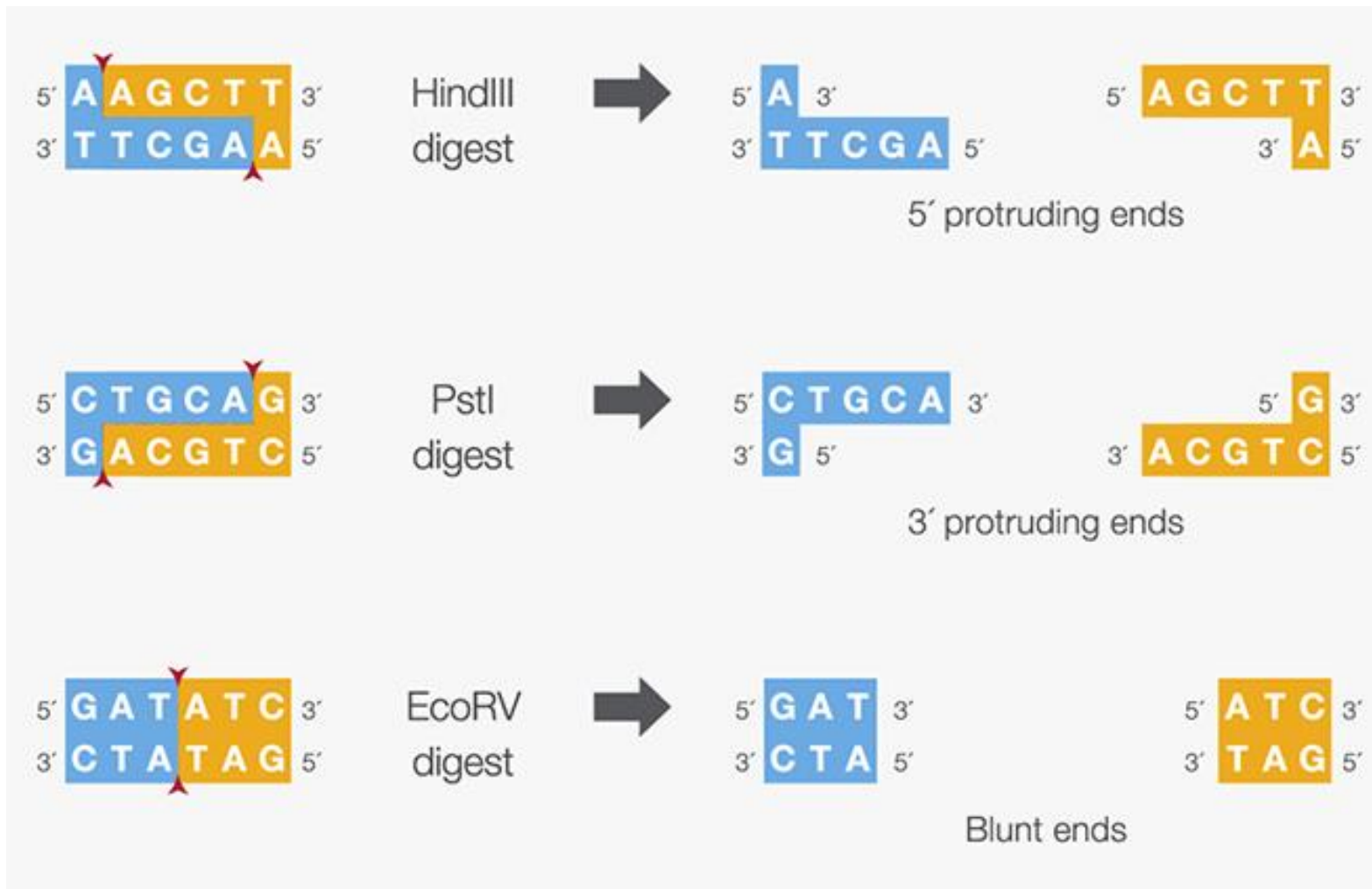
Ανάλυση Μεθοδολογιών Τεχνολογίας Ανασυνδυασμένου DNA



- Χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών
- Φορείς κλωνοποίησης & Γονίδια δείκτες
- Τρόποι κλωνοποίησης (κατευθυνόμενη και μη)
- Γονιδιωματικές και cDNA βιβλιοθήκες
- Polymerase Chain Reaction (PCR)



Περιοριστικές ενδονουκλεάσες



Ποικιλομορφία περιοριστικών ενδονουκλεασών

Enzyme	Organism from which derived	Target sequence (cut at *) 5' -->3'
Ava I	Anabaena variabilis	C* C/T C G A/G G
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens	G* G A T C C
Bgl II	Bacillus globigii	A* G A T C T
Eco RI	Escherichia coli RY 13	G* A A T T C
Eco RII	Escherichia coli R245	* C C A/T G G
Hae III	Haemophilus aegyptius	G G * C C
Hha I	Haemophilus haemolyticus	G C G * C
Hind III	Haemophilus influenzae Rd	A* A G C T T
Hpa I	Haemophilus parainfluenzae	G T T * A A C
Kpn I	Klebsiella pneumoniae	G G T A C * C
Sma I	Serratia marcescens	C C C * G G G
Sal I	Streptomyces albus G	G * T C G A C
Xma I	Xanthomonas malvacearum	C * C C G G G



Ποικιλομορφία περιοριστικών ενδονουκλεασών

Type I Enzymes

<i>EcoKI</i>	AACNNNNNNGTGC	type IA family, prototype
<i>EcoAI</i>	GAGNNNNNNGTCA	type IB family, prototype
<i>EcoR124I</i>	GAANNNNNNRTCG	type IC family, prototype
<i>StySBLI</i>	CGANNNNNNTACC	type ID family, prototype

Type II Enzymes

<i>Sau3AI</i>	GATC	4 nucleotide palindrome
<i>EcoRI</i>	GAATTC	6 nucleotide palindrome
<i>NotI</i>	GCGGCCGC	8 nucleotide palindrome
<i>SapI</i>	GCTCTTC	7 nucleotide non-palindrome
<i>BcgI</i>	CGANNNNNNTGC	interrupted non-palindrome

Type III Enzymes

<i>EcoP1</i>	AGACC.....GGTCT	inverted 5 nucleotide pair
<i>EcoP15I</i>	CAGCAG.....CTGCTG	inverted 6 nucleotide pair



↓
GGATCC
CCTAGG
↑

*Bam*HI
(5' Overhang)

↓
AGATCT
TCTAGA
↑

*Bgl*II
(5' Overhang)

Enzymes Generating
Compatible Cohesive Ends

↓
CTCGTG
GAGCAG
↑

*Bss*SI
(5' Overhang)

↓
NNCAGTGNN
NNGTCACNN
↑

*Tsp*RI
(3' Overhang)

Enzymes Recognizing
Non palindromic Sequences

↓
GATC
CTAG
↑

*Dpn*I
(Requires methylation)

Methylation-sensitive Enzymes

↓
GGCC
CCGG
↑

*Hae*III
(Inhibited by methylation)

↓
CCCGGG
GGGCCC
↑

*Sma*I
(Blunt Ends)

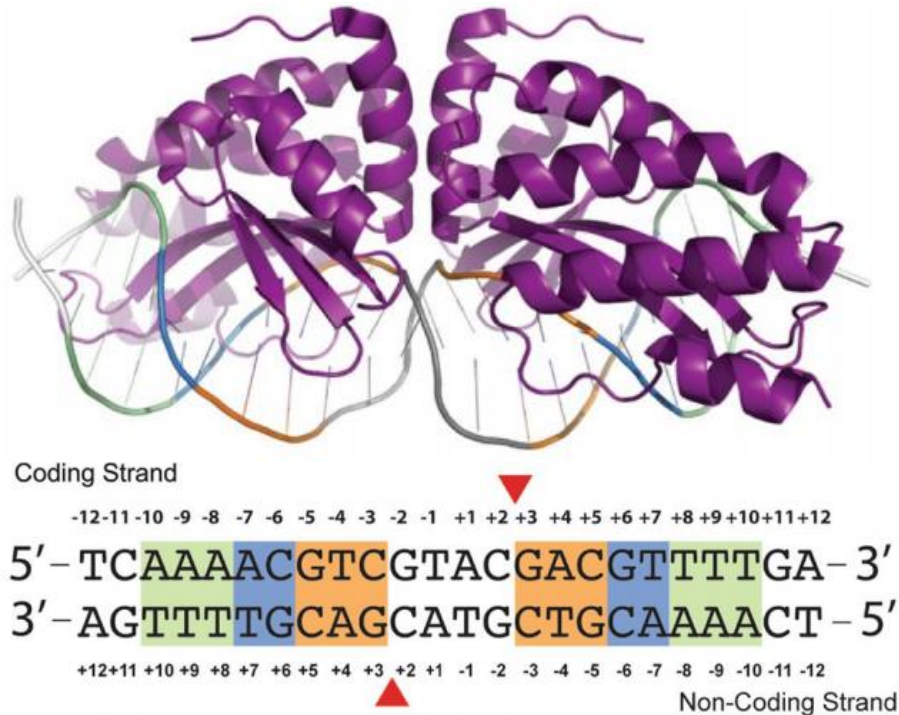
Isoschizomers

↓
CCCGGG
GGGCCC
↑

*Xma*I
(5' Overhang)



Characteristics of Meganucleases (MN)



- Found in archaea, bacteria, phages, fungi, yeast, algae and some plants.
- Expressed in the nucleus, mitochondria or chloroplasts.
- Several hundred of them have been identified.
- Meganucleases are characterized by a large **recognition site** (double-stranded DNA sequences of **12 to 40 base pairs**).

The site generally occurs only once in any given genome. For example, the 18-base pair sequence recognized by the I-SceI meganuclease would on average require a genome twelve times the size of the human genome to be found once by chance.

➤ $4^{18} = 69 \times 10^9$ (human genome is about 6×10^9), $4^{15} = 10^9$ (6 times in human genome)

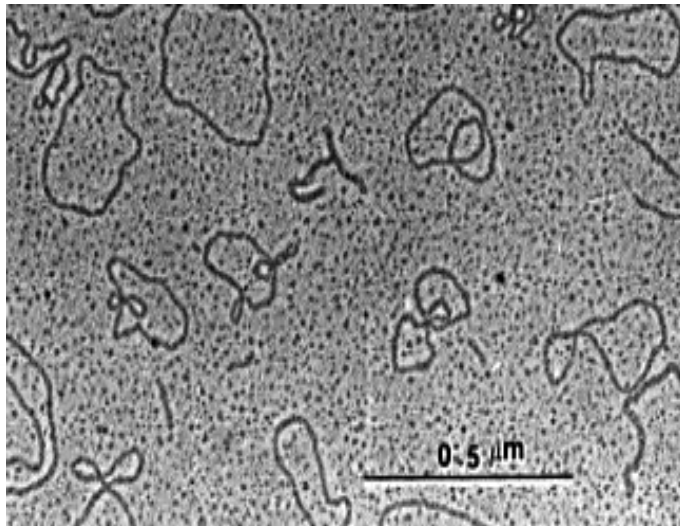
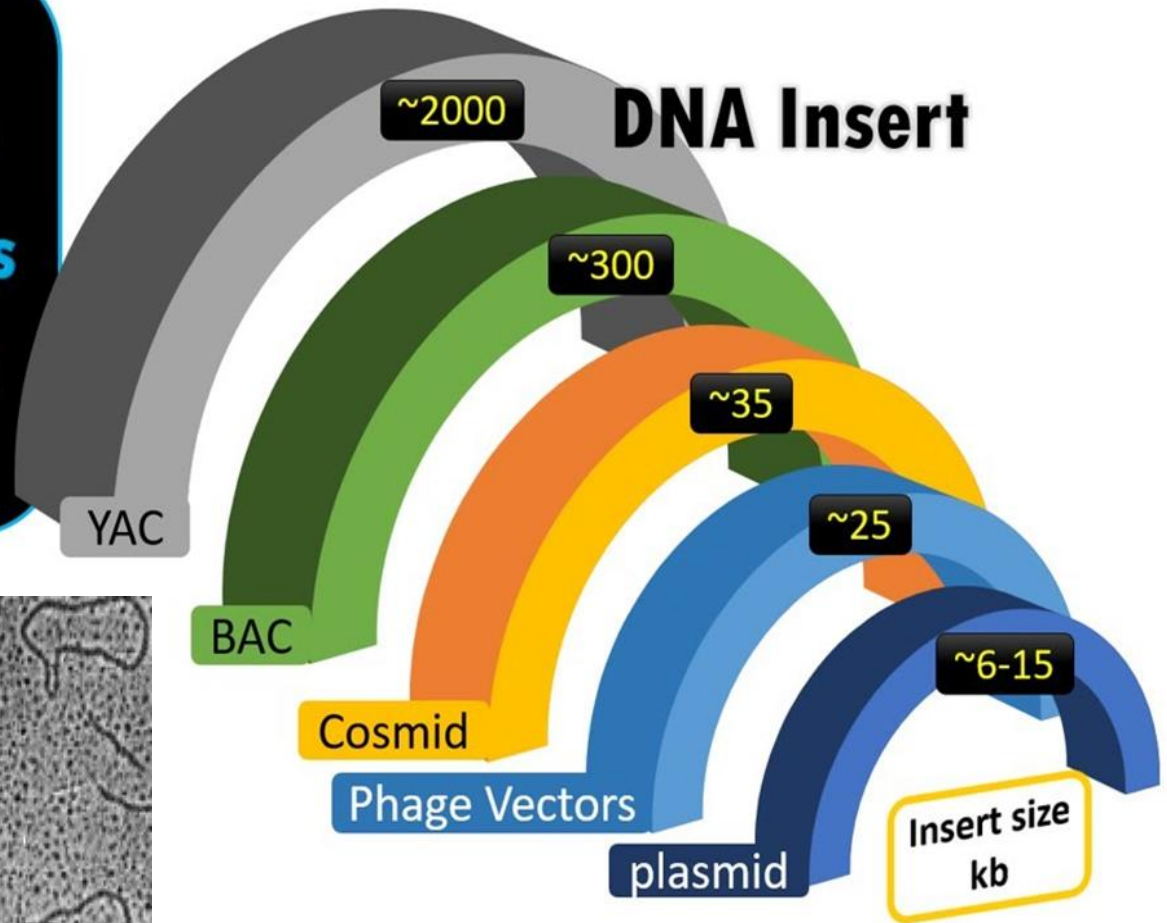
Ανάλυση Μεθοδολογιών Τεχνολογίας Ανασυνδυασμένου DNA



- Χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών
- **Φορείς κλωνοποίησης & Γονίδια δείκτες**
- Τρόποι κλωνοποίησης (κατευθυνόμενη και μη)
- Γονιδιωματικές και cDNA βιβλιοθήκες
- Polymerase Chain Reaction (PCR)

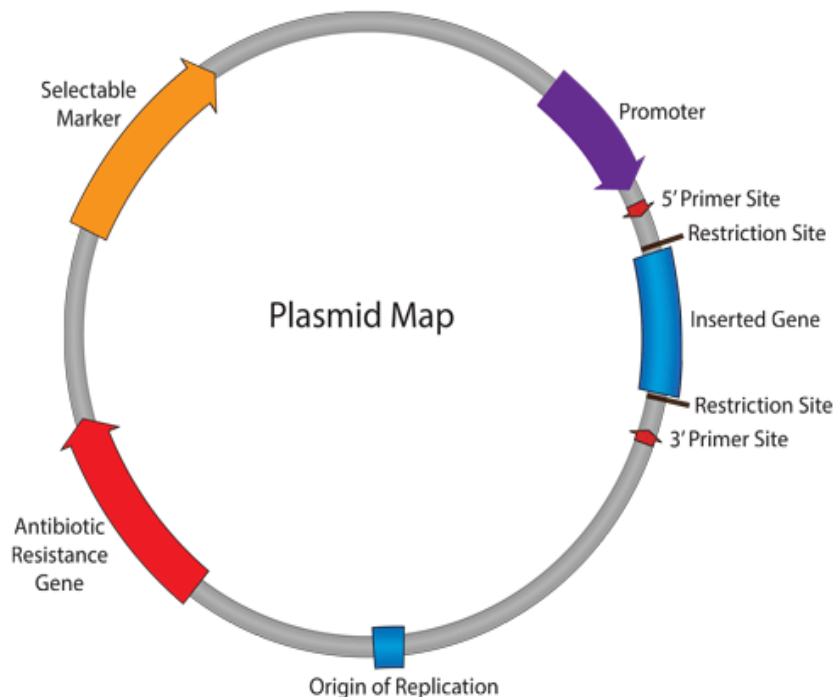
Φορείς κλωνοποίησης (Cloning vectors)

What is a Gene Cloning Vector?
5 Different Types of Gene Cloning Vectors



Γονίδια δείκτες επιλογής (marker genes or selection markers)

Βακτήρια-ξενιστές δέχονται σε μικρό ποσοστό πλασμίδια, μερικά από τα οποία είναι ανασυνδυασμένα...

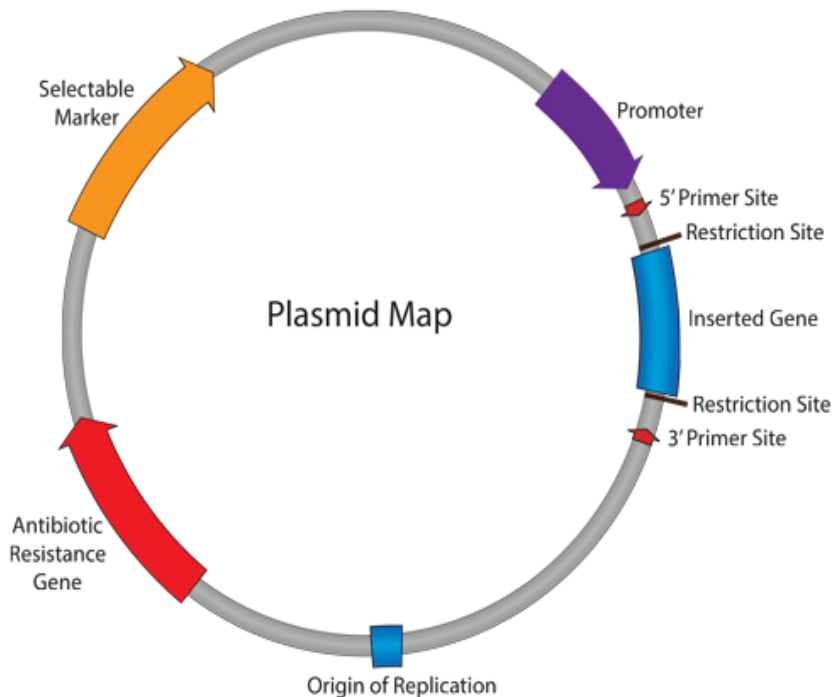


- ➔ Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό
- ➔ **β-gal (blue/white selection)**
- ➔ Οπερόνιο λακτόζης
- ➔ Οπερόνιο τρυπτοφάνης
- ➔ **GFP/RFP/YFP**
- ➔ Περιβαλλοντικής καταπόνησης
- ➔ Αυξοτροφία αμινοξέων (Yeast)

Γονίδια δείκτες επιλογής (marker genes or selection markers)

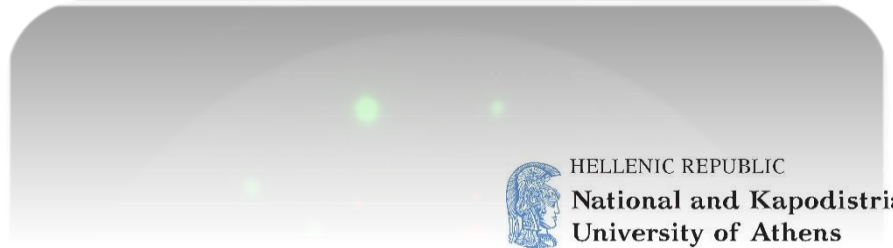
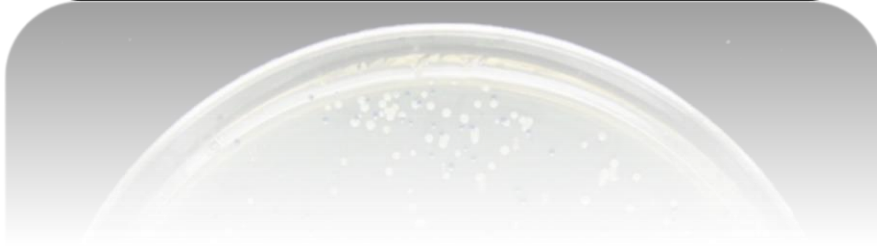
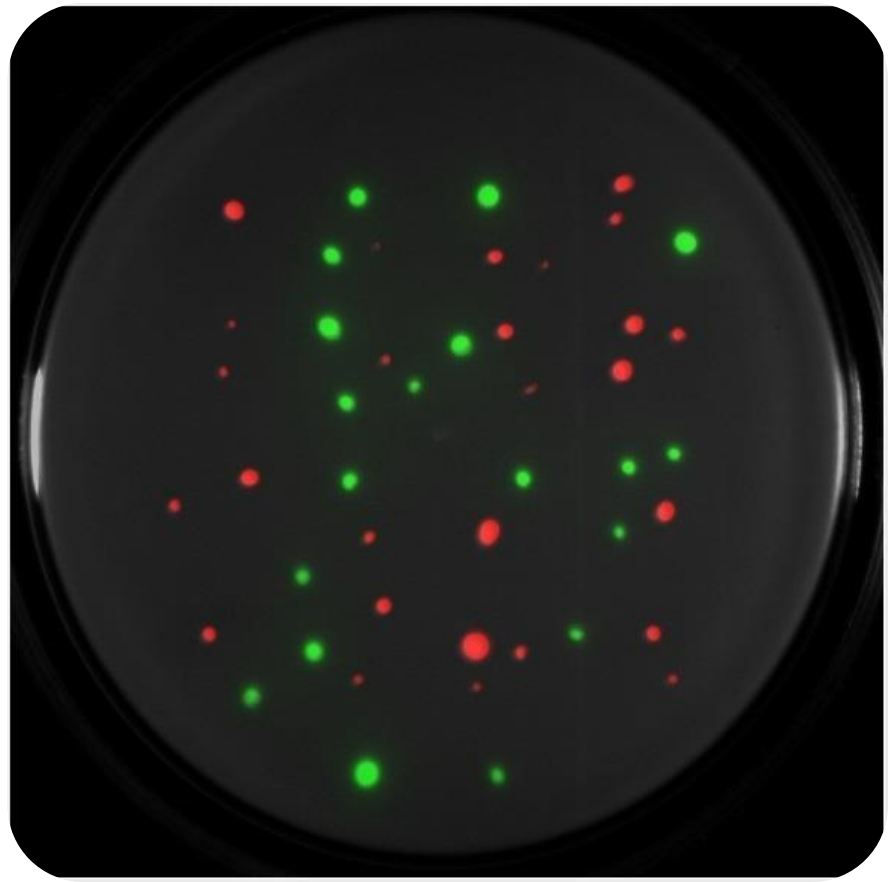
Το 99,9% των βακτηρίων είναι μη μετασχηματισμένα και από τα μετασχηματισμένα το 99,9% είναι μη ανασυνδυσασμένα.

=> Αναγκαστική χρήση 2 γονιδίων δεικτών !

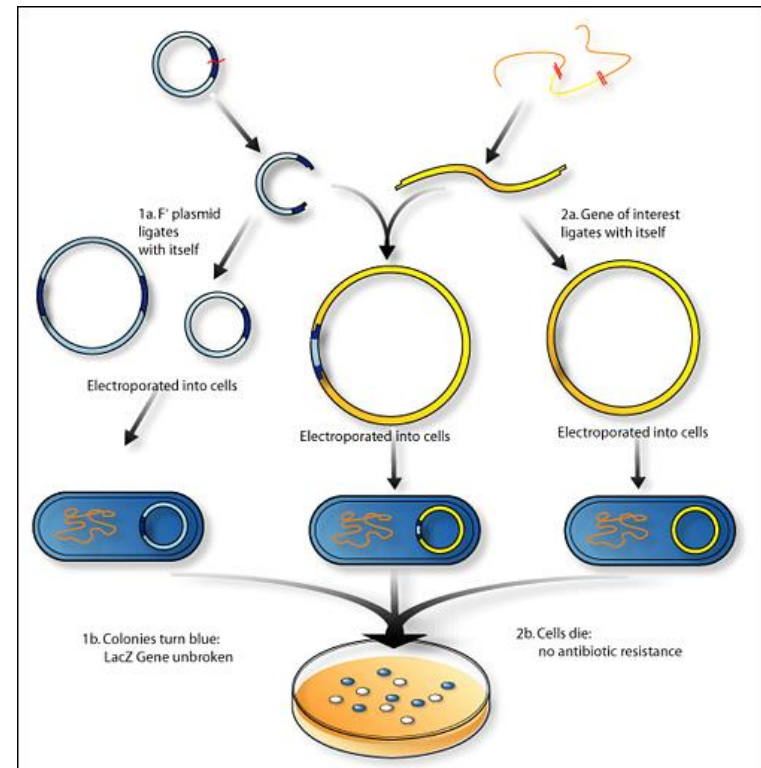
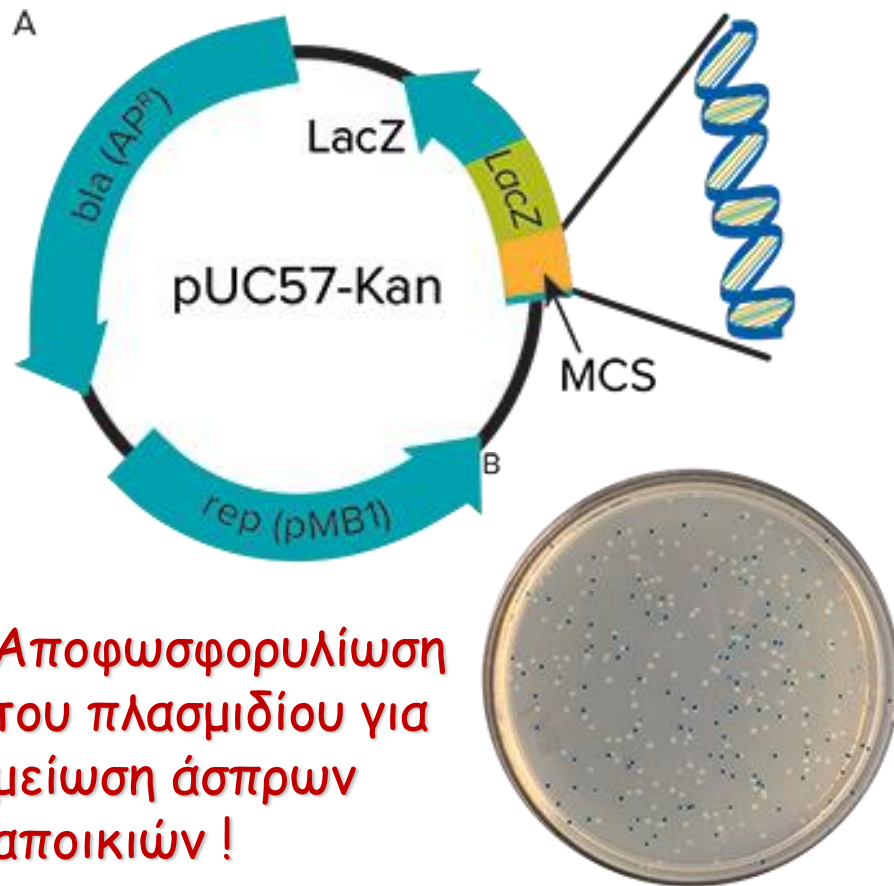
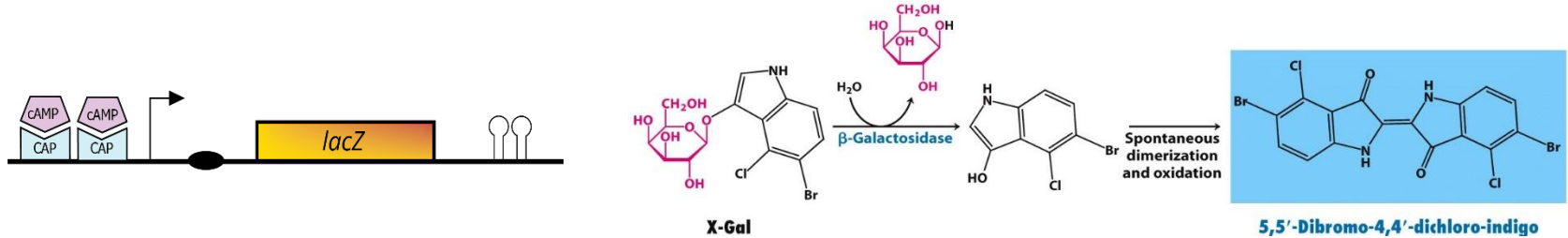


- ➔ Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό
- ➔ **β-gal (blue/white selection)**
- ➔ Οπερόνιο λακτόζης
- ➔ Οπερόνιο τρυπτοφάνης
- ➔ **GFP/RFP/YFP**
- ➔ Περιβαλλοντικής καταπόνησης
- ➔ Αυξοτροφία αμινοξέων (Yeast)

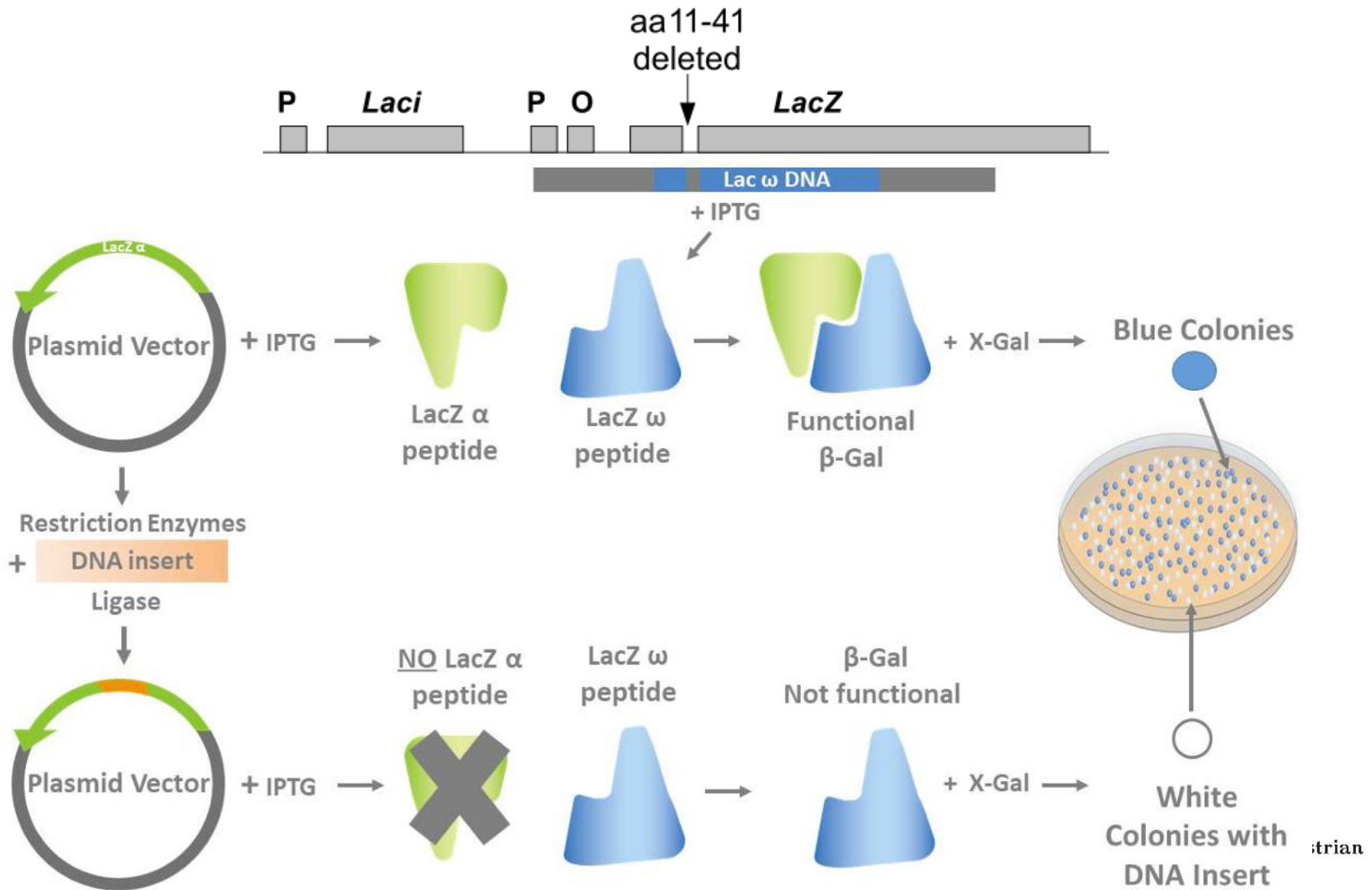
Μπλε/Άσπρες αποικίες ή κόκκινες (RFP) ή πράσινες αποικίες (GFP)



Επιλογή μπλε-άσπρων αποικιών με υπόστρωμα X-Gal



Επιλογή μπλε-άσπρων αποικιών με υπόστρωμα X-Gal

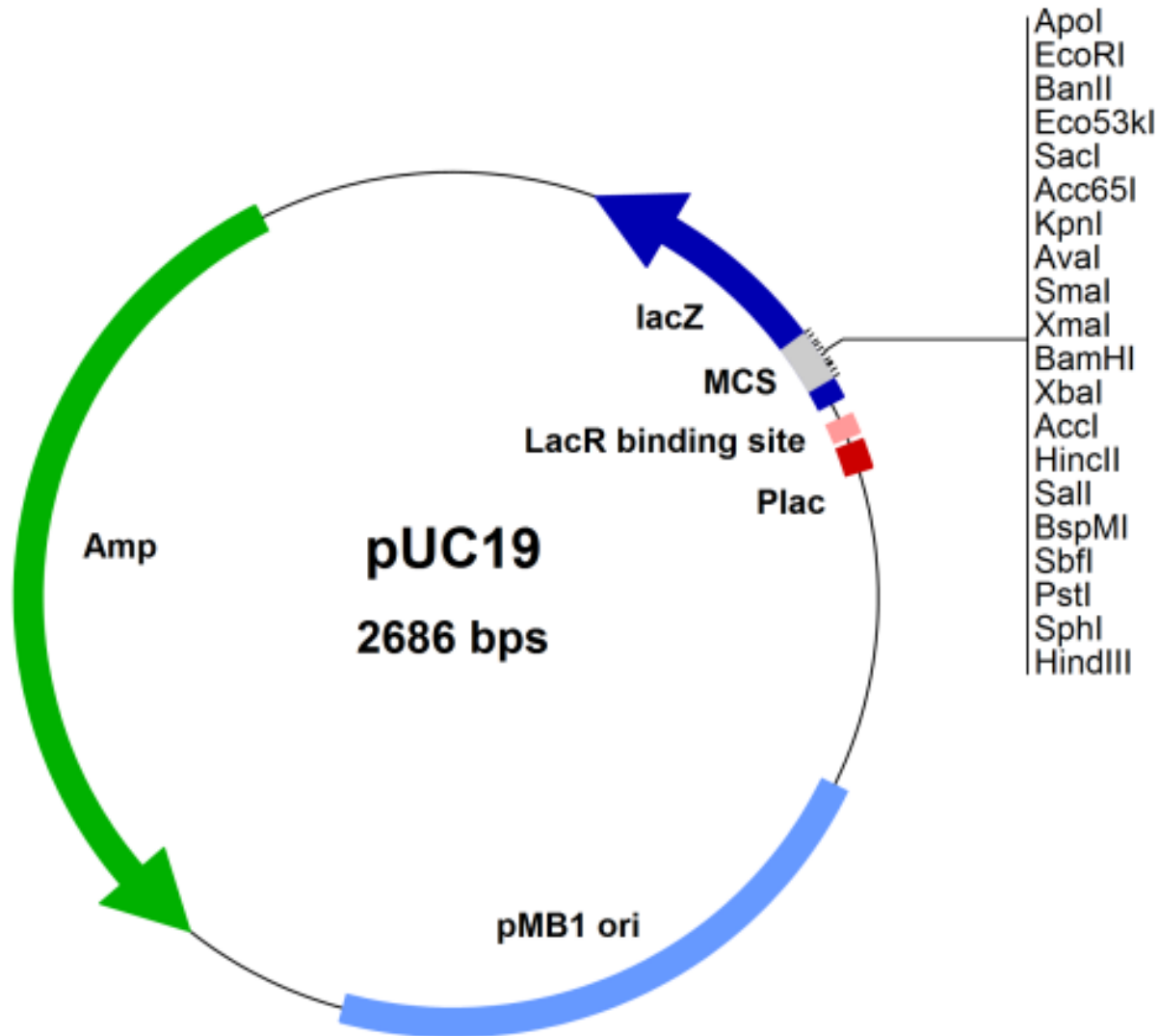


Ανάλυση Μεθοδολογιών Τεχνολογίας Ανασυνδυασμένου DNA

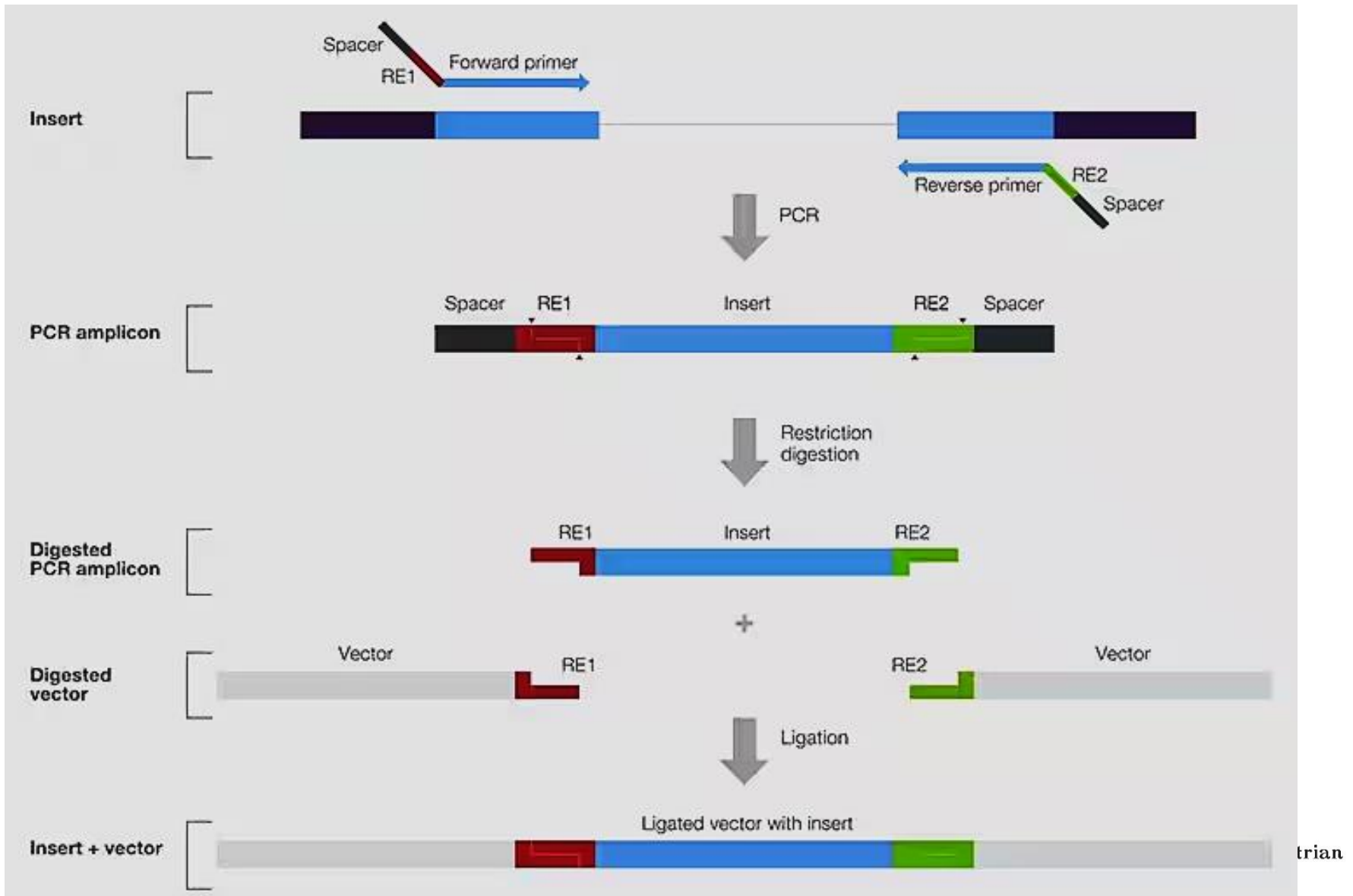


- Χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών
- Φορείς κλωνοποίησης & Γονίδια δείκτες
- **Τρόποι κλωνοποίησης (κατευθυνόμενη και μη)**
- Γονιδιωματικές και cDNA βιβλιοθήκες
- Polymerase Chain Reaction (PCR)

Πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site - MCS)

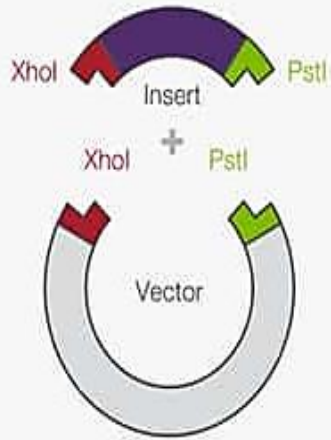


Κατευθυνόμενη κλωνοποίηση (Directional cloning)

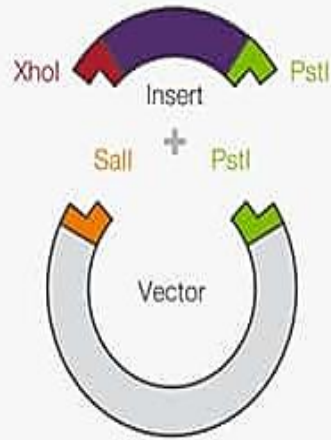


Κατευθυνόμενη κλωνοποίηση (Directional cloning)

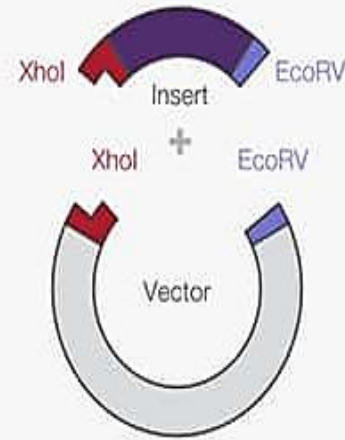
Cloning with two sticky ends



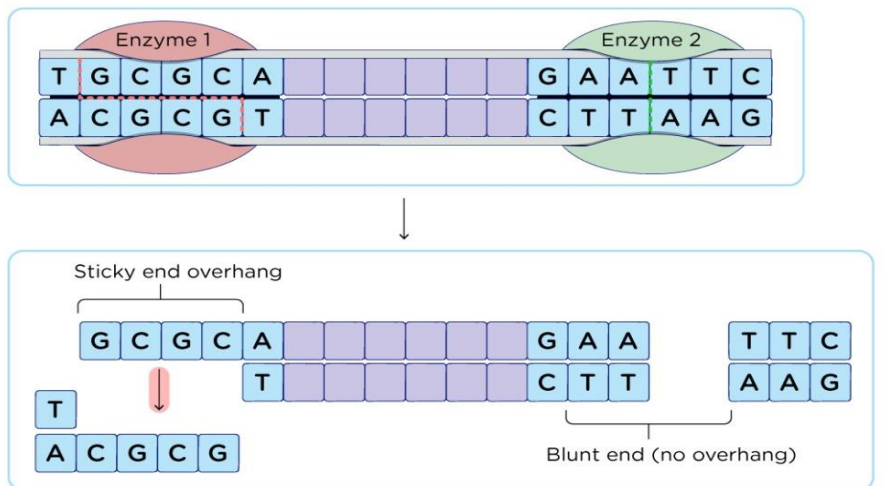
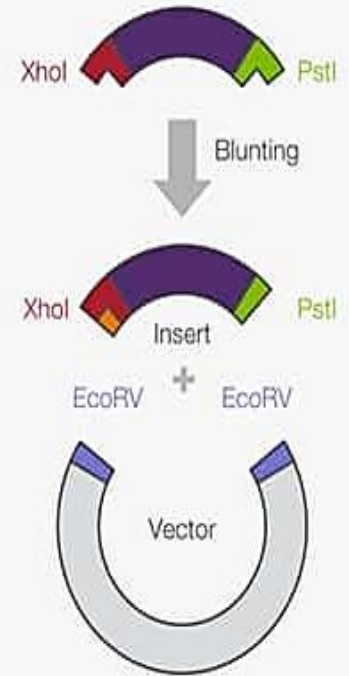
Cloning with two different but compatible ends



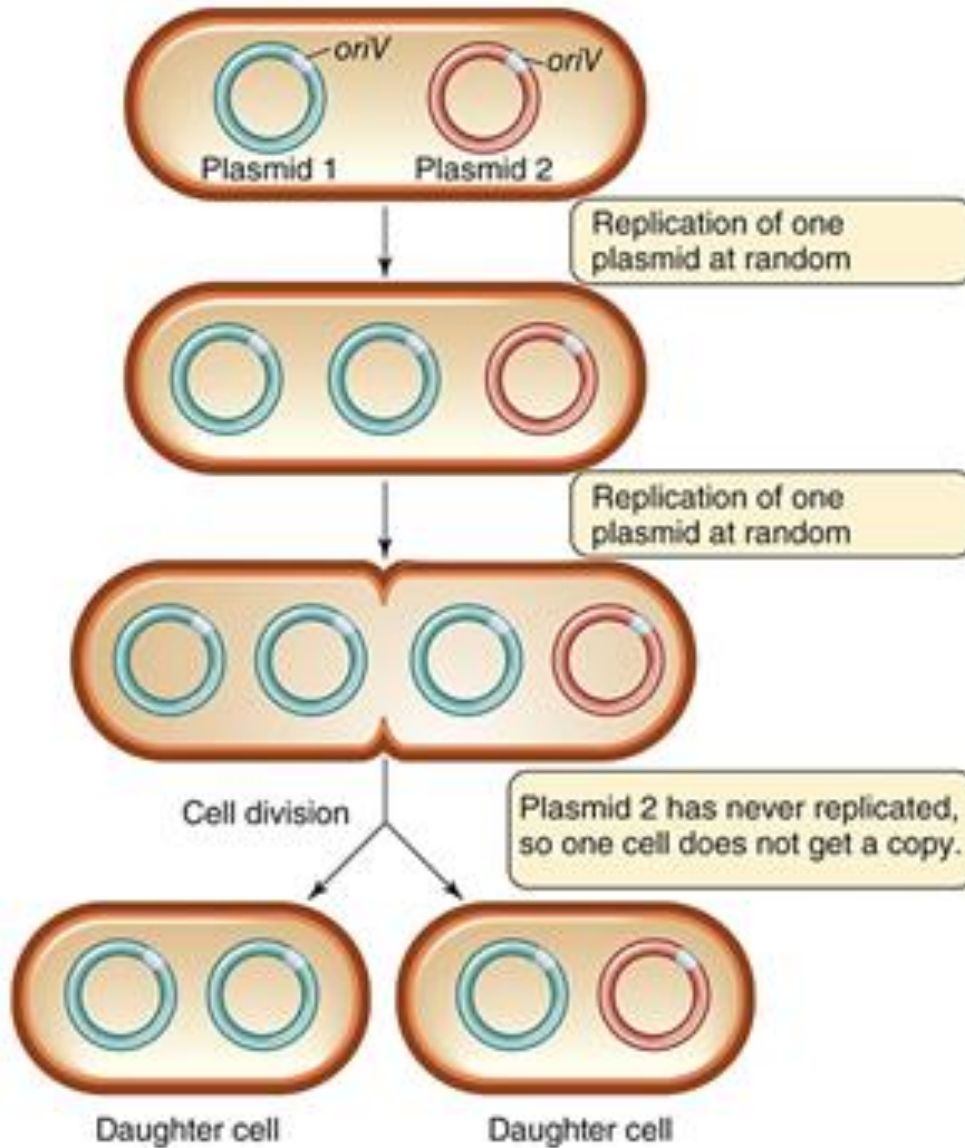
Cloning with one sticky end and one blunt end



Cloning with blunt ends



Ασυμβατότητα πλασμιδίων (Incompatible plasmids/ORIs)



Κάθε βακτήριο που προσλαμβάνει ένα μόνο μόριο ανασυνδυασμένου DNA πολλαπλασιάζεται και παράγει μια αποικία που αποτελεί ένα βακτηριακό κλώνο. Είναι φανερό ότι με την παραπάνω διαδικασία παράγονται χιλιάδες κλώνοι, που ο καθένας περιέχει ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA διαφορετικό από τους υπόλοιπους κλώνους.



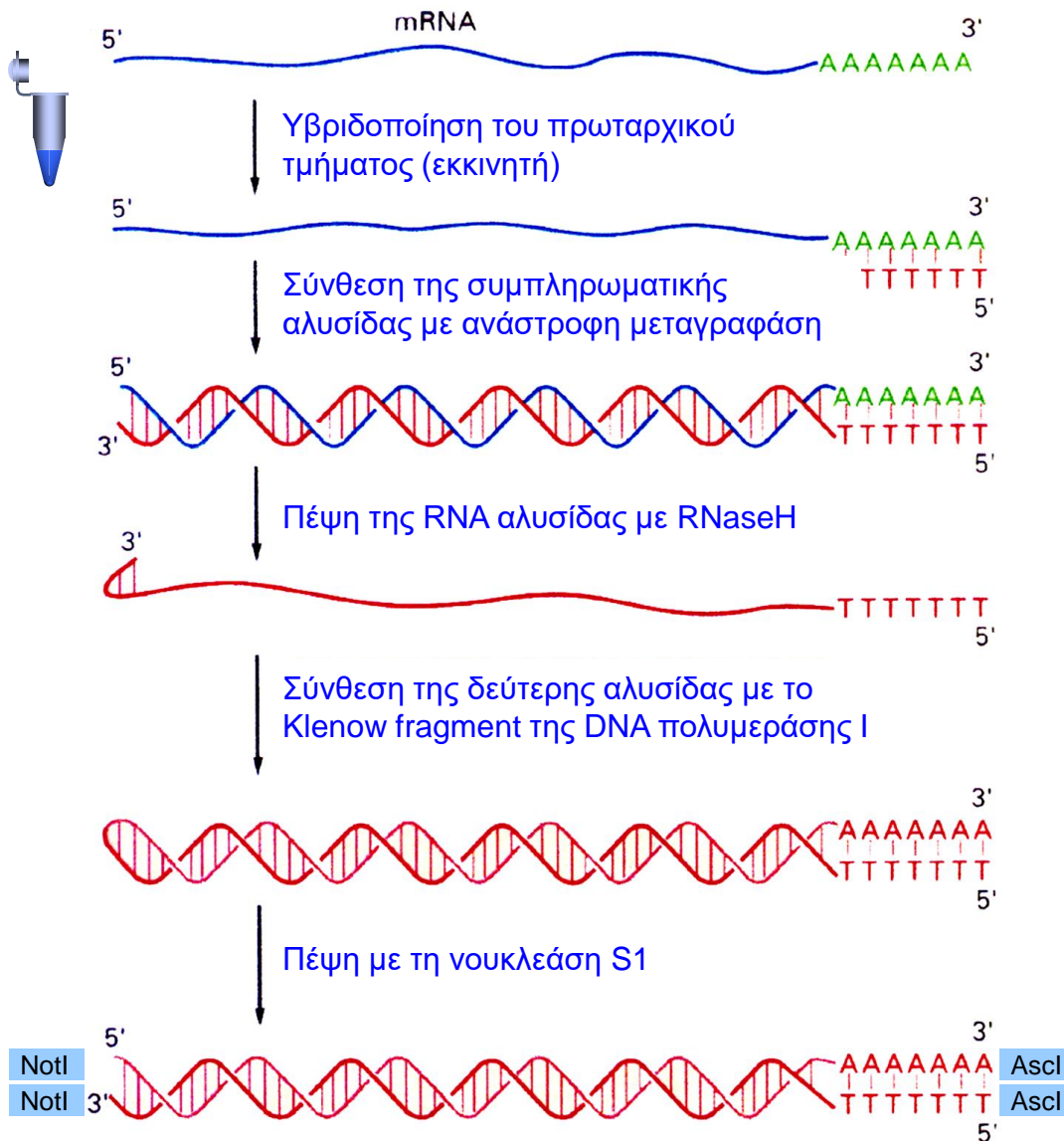
Ανάλυση Μεθοδολογιών Τεχνολογίας Ανασυνδυασμένου DNA



- Χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών
- Φορείς κλωνοποίησης & Γονίδια δείκτες
- Τρόποι κλωνοποίησης (κατευθυνόμενη και μη)
- **Γονιδιωματικές και cDNA βιβλιοθήκες**
- Polymerase Chain Reaction (PCR)



Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης με oligo-dT & random priming



Ανάλυση Μεθοδολογιών Τεχνολογίας Ανασυνδυασμένου DNA



- Χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών
- Φορείς κλωνοποίησης & Γονίδια δείκτες
- Τρόποι κλωνοποίησης (κατευθυνόμενη και μη)
- Γονιδιωματικές και cDNA βιβλιοθήκες
- **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Η δημιουργία πολλών αντιγράφων είναι απαραίτητη προϋπόθεση τόσο για τη μελέτη ενός γονιδίου όσο και για την παραγωγή της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί.

Η κατασκευή βιβλιοθηκών μας δίνει τη δυνατότητα να απομονώσουμε το βακτηριακό κλώνο που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια του κλώνου και δημιουργούν **πολλά αντίγραφα** του γονιδίου που περιέχει.

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) μας επιτρέπει να **αντιγράψουμε πολλές φορές...**

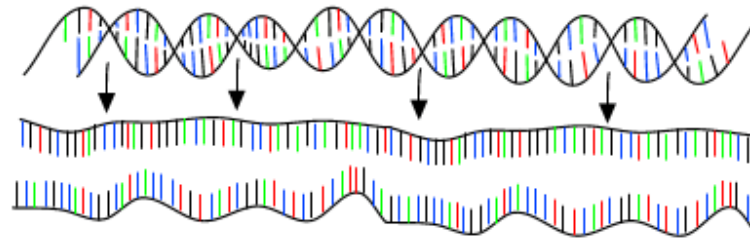


Η τεχνική της PCR

Ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος σε >1.000.000.000 αντίγραφα...

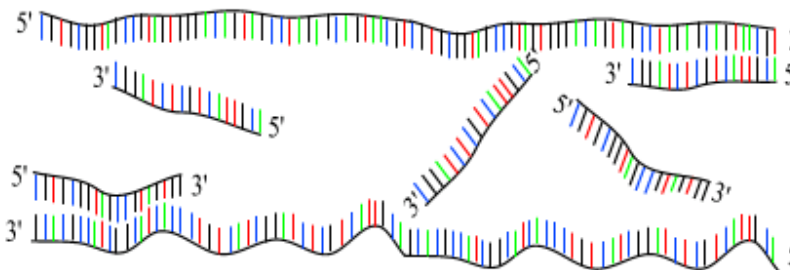


- dH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα
- Μήτρα DNA (δείγμα)
- Πρωταρχικά τμήματα
- **PPP-νουκλεοτίδια**
- Ιόντα Mg⁺⁺
- DNA πολυμεράση



1. Αποδιάταξη

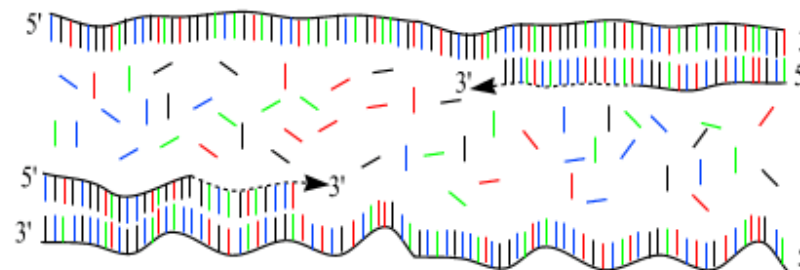
1 minut 94 °C



2. Υβριδοποίηση

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



3. Επιμήκυνση

2 minutes 72 °C

only dNTP's



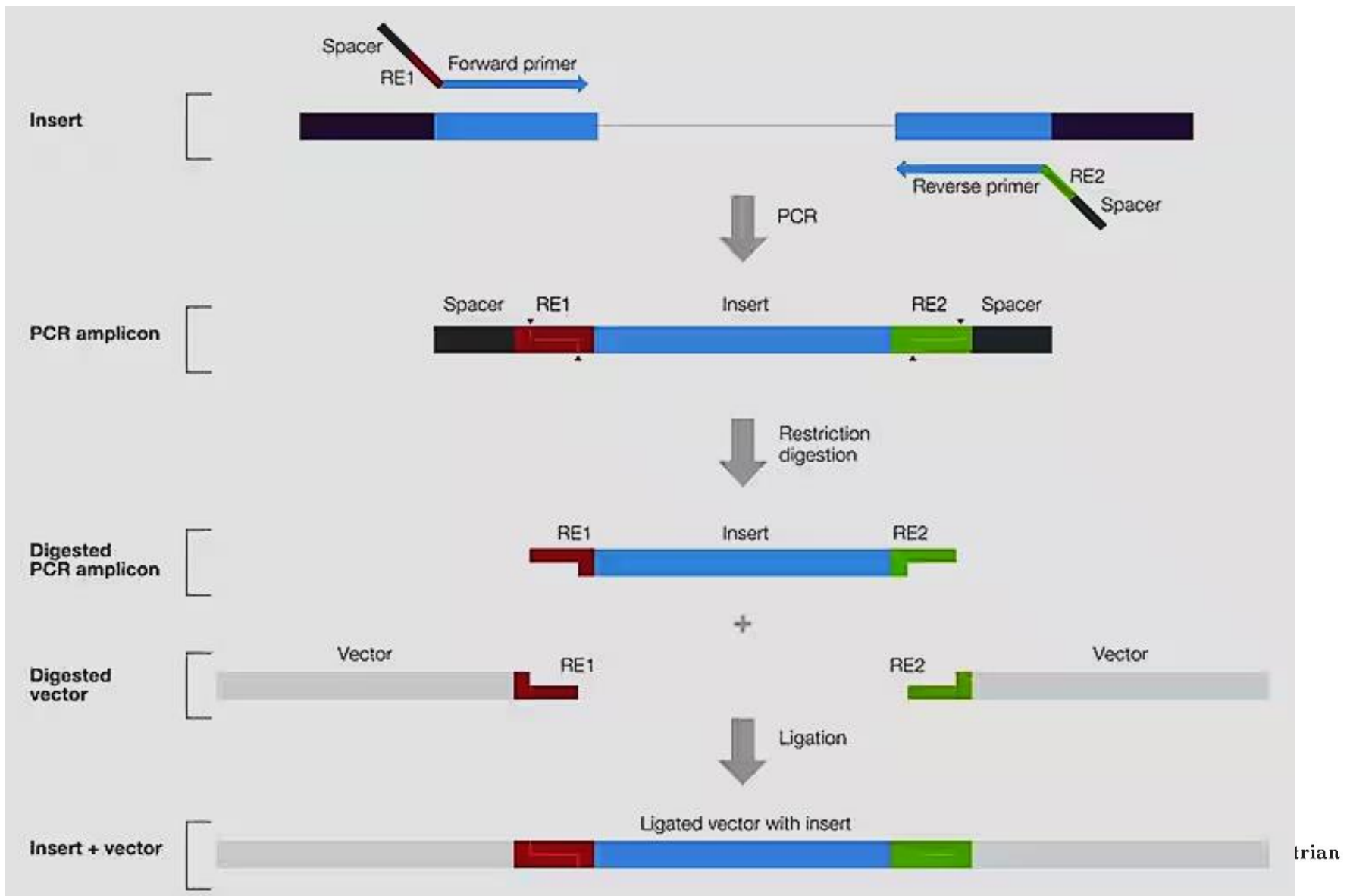
University of Ioannina
EST. 1837

istrian

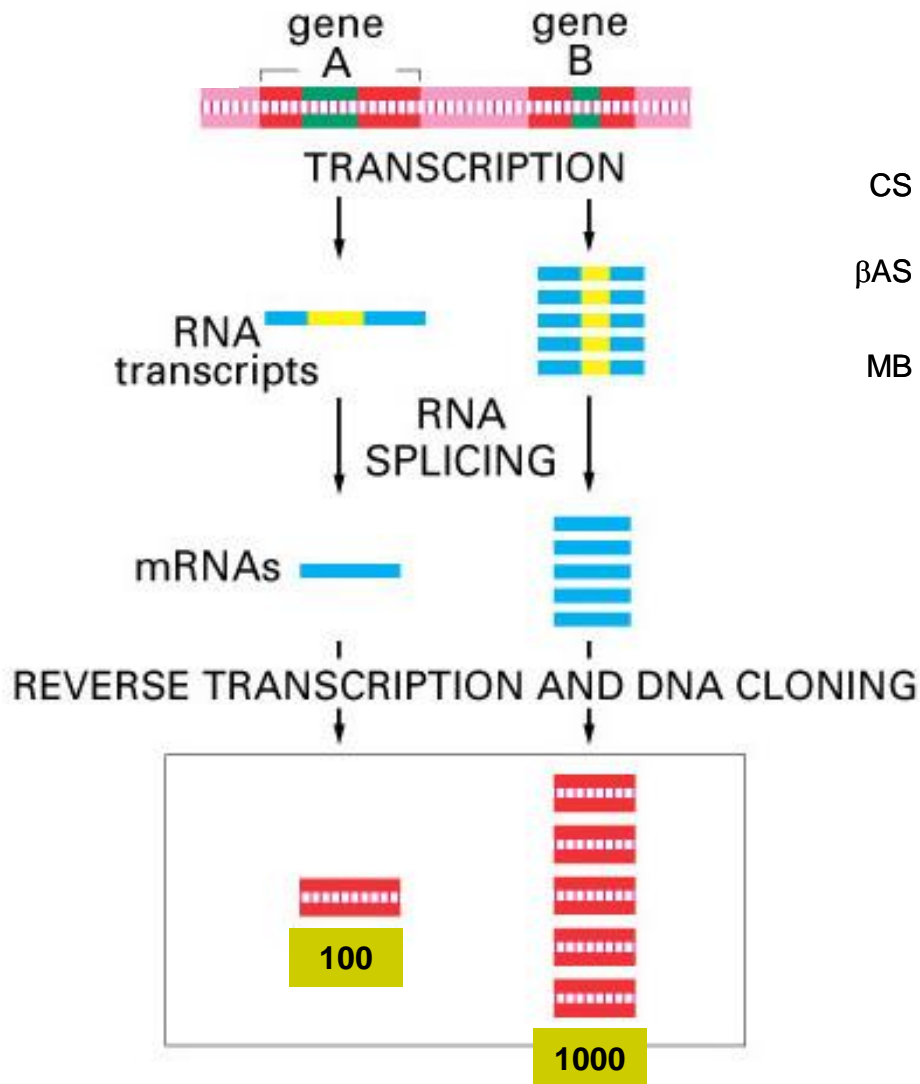
Εφαρμογές της τεχνολογίας PCR

1. Κλωνοποίηση τμημάτων DNA και γονιδίων
2. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης (μεταγραφή)
3. Ανίχνευση μολυσμένων με παθογόνα δειγμάτων
4. Εγκληματολογία και ταυτοποίηση πατρότητας
5. Ανίχνευση διαγονιδιακών φυτών/σπερμάτων

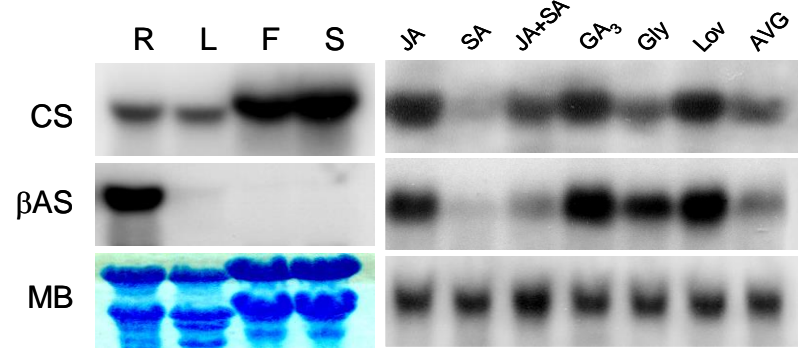
Κατευθυνόμενη κλωνοποίηση (Directional cloning)



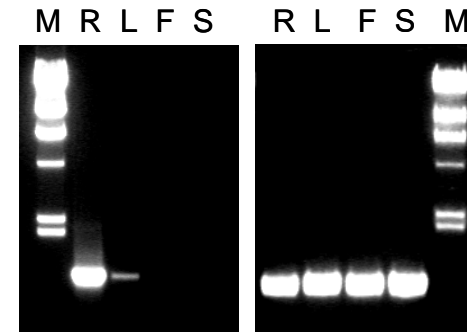
Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης (μεταγραφή)



RNA blot υβριδισμός

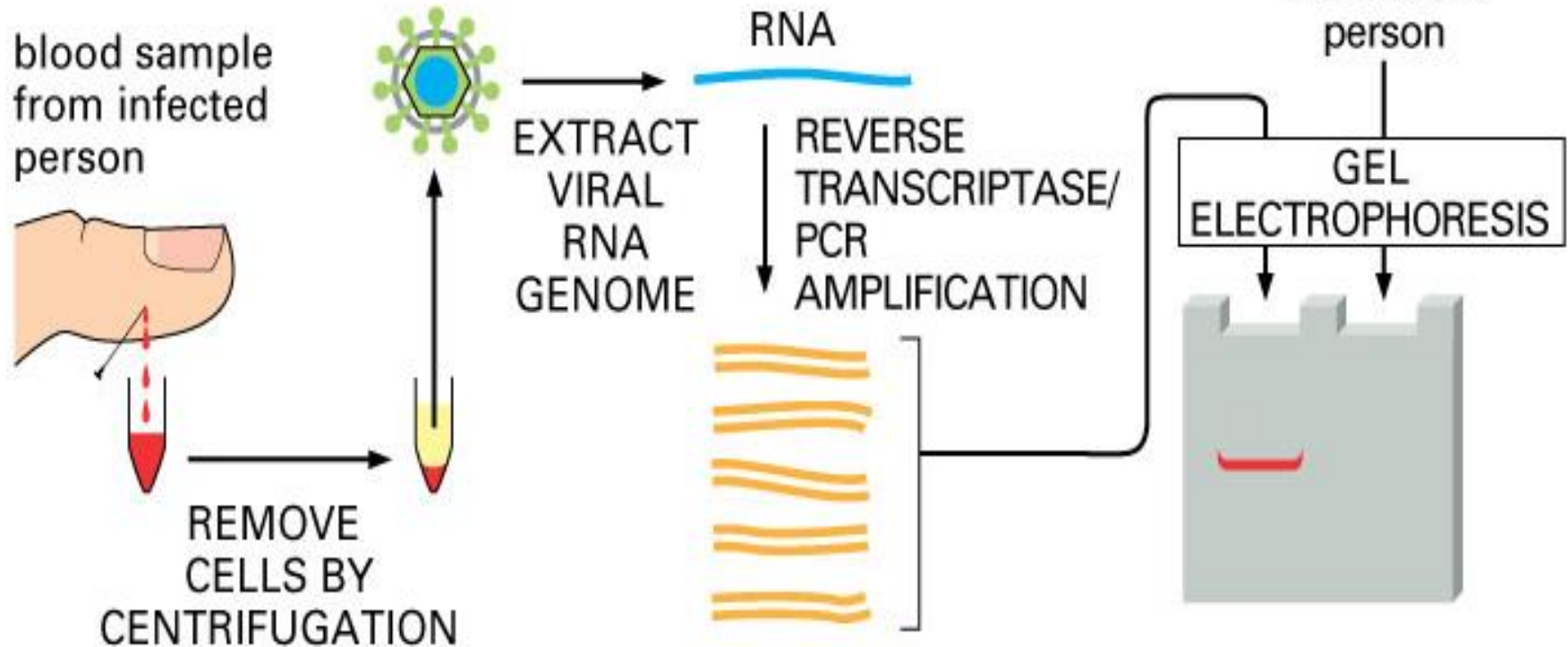


RT-PCR ανάλυση

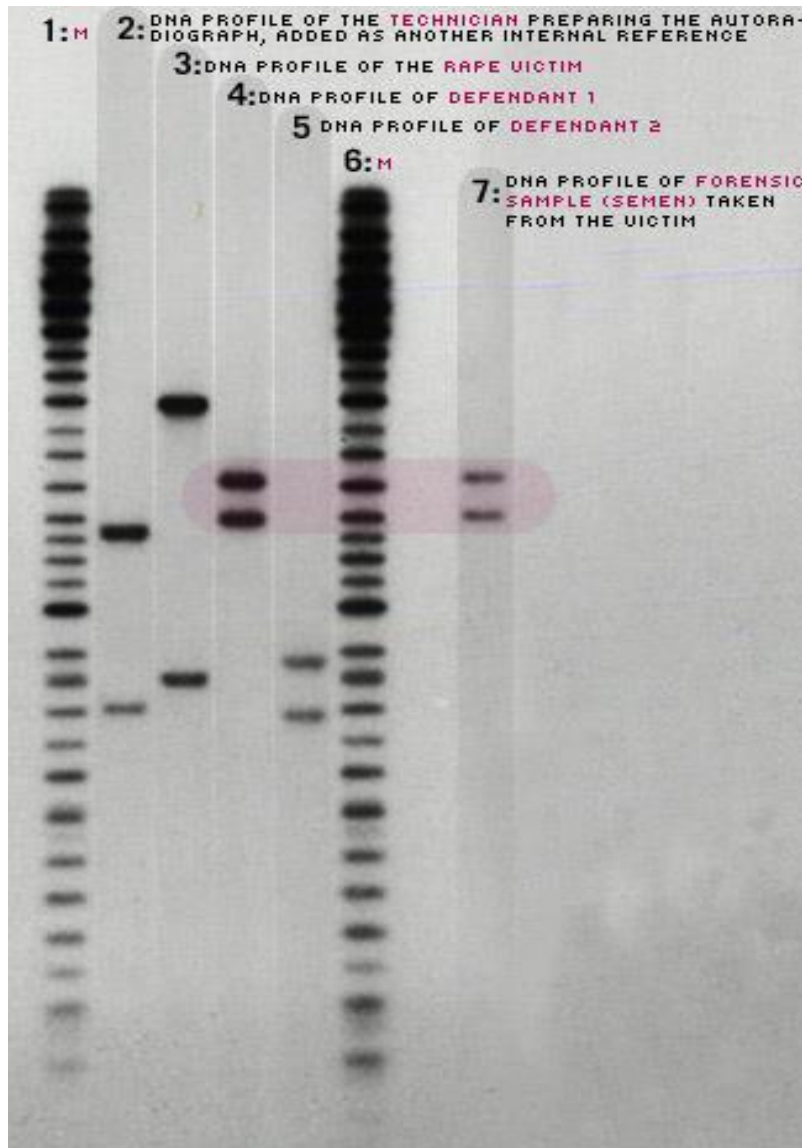


Η χρήση της PCR στην ανίχνευση μολυσμένων ατόμων

HIV or **H1N1** or **COVID-19** particles
in serum of
infected person

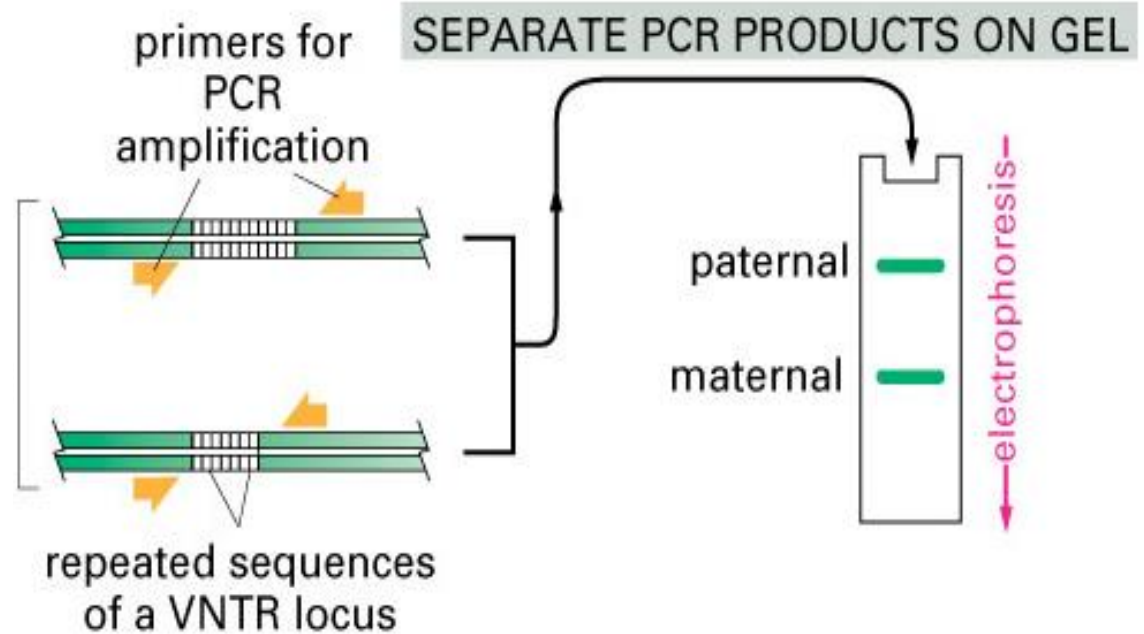
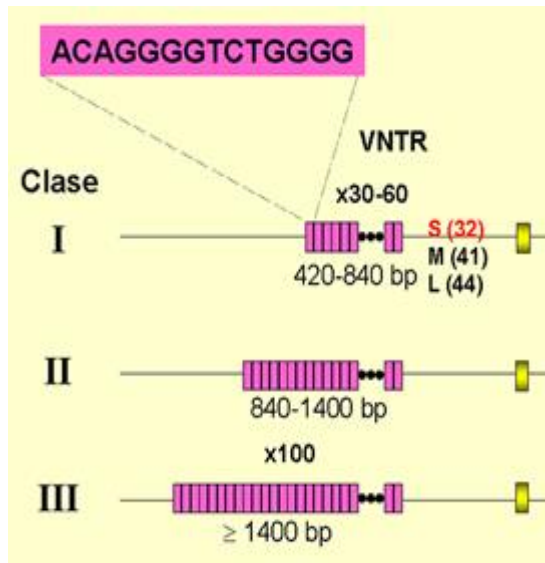


Χρήση της VNTR-PCR τεχνικής στην εγκληματολογία/πατρότητα

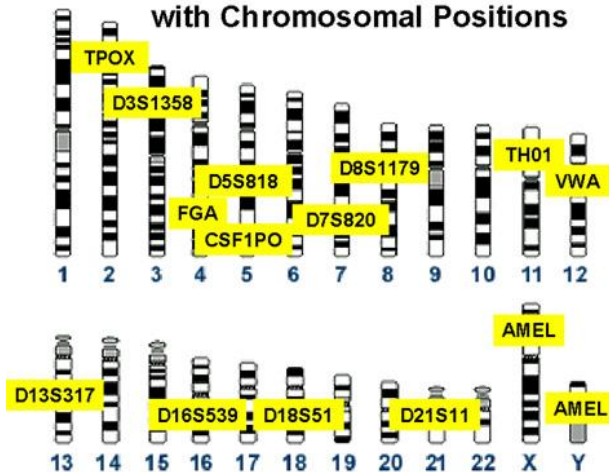


Χρήση της VNTR-PCR τεχνικής στην εγκληματολογία/πατρότητα

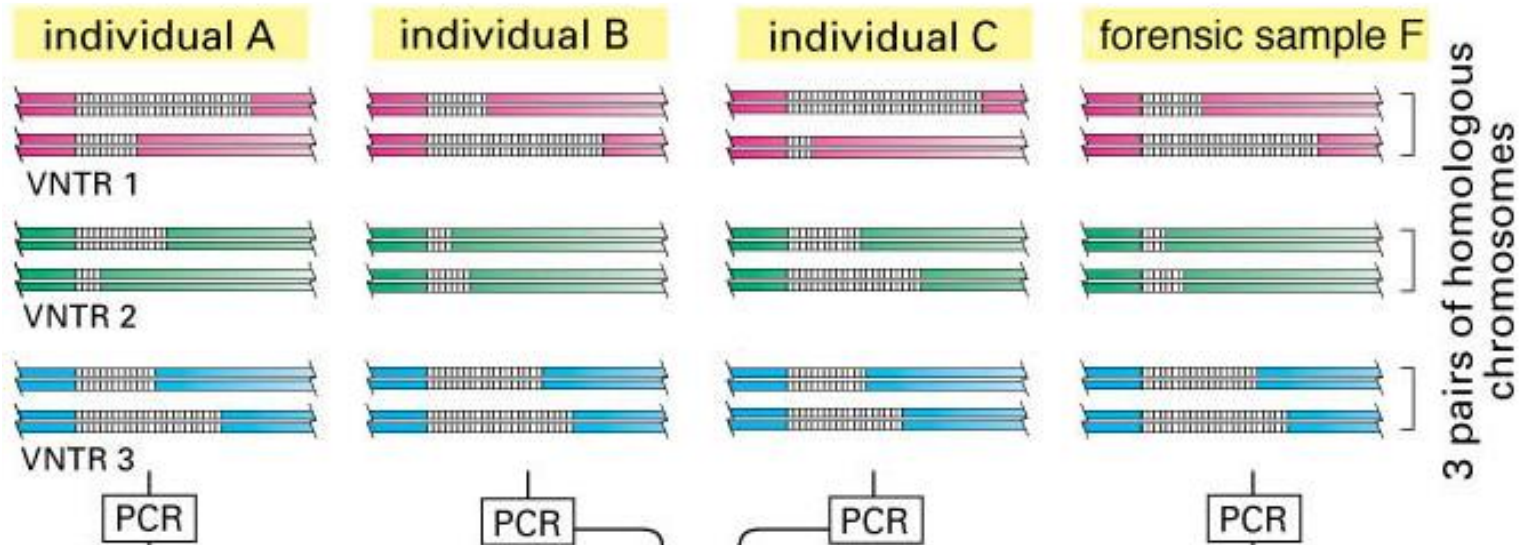
VNTR: διαδοχικές επαναλήψεις ποικίλου αριθμού (variable number tandem repeats)



13 CODIS Core STR Loci with Chromosomal Positions

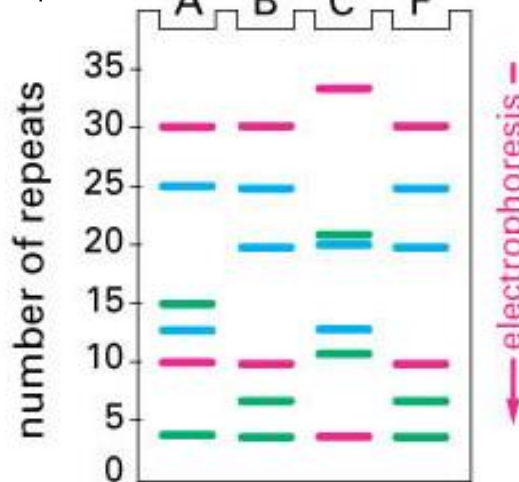


Χρήση της VNTR-PCR τεχνικής στην εγκληματολογία/πατρότητα



VNTR: variable number tandem repeats

Ενίσχυση με PCR τριών διαφορετικών περιοχών για τη δημιουργία του DNA αποτυπώματος



Probability of two persons

1 VNTR (6 alleles) = 1:64

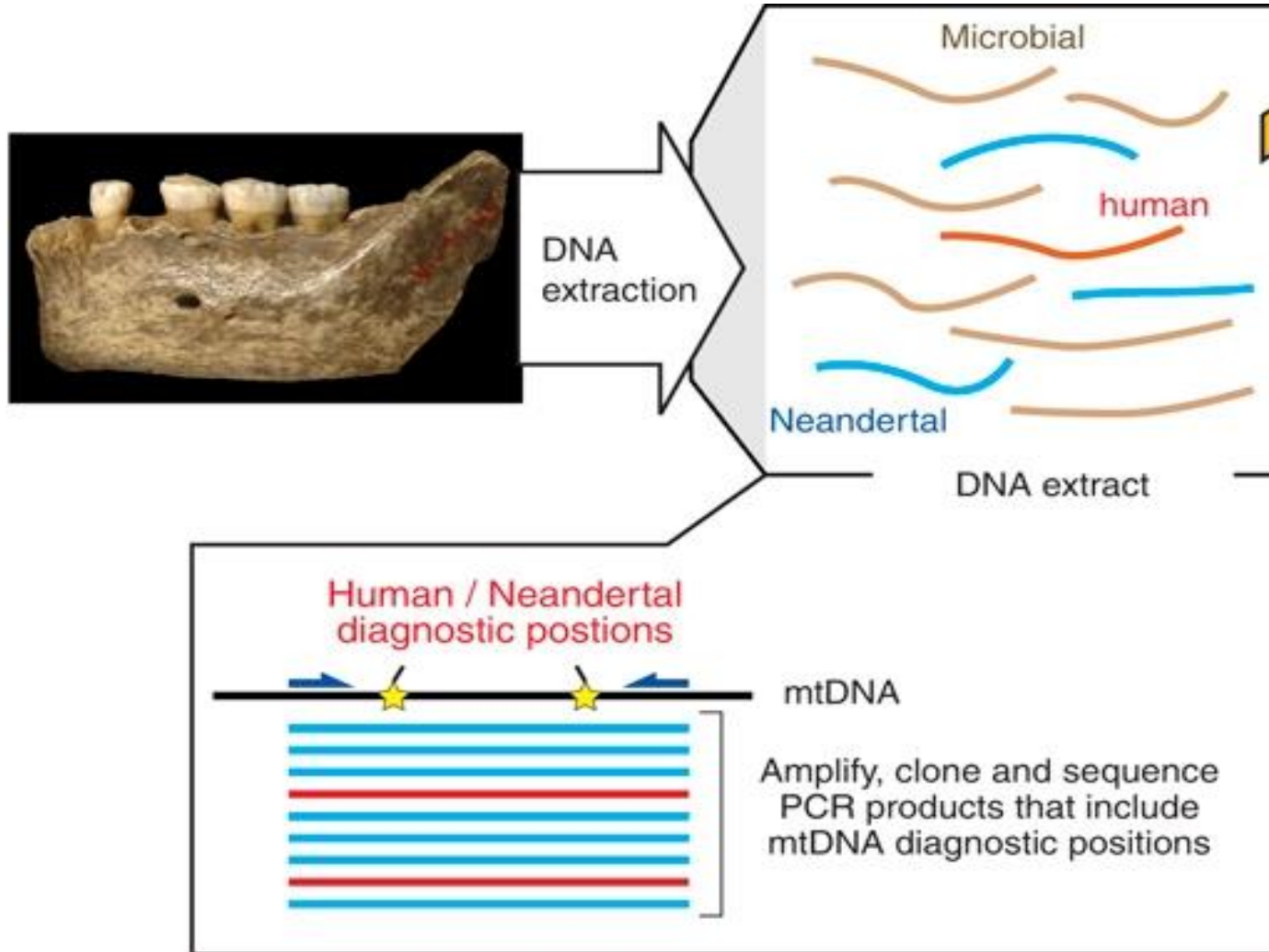
4 VNTRs (10 alleles) > 1: 18.000.000

5 VNTRs (10 alleles) > 1: 1.000.000.000

Paternity = 1/10.000 (99,9%)

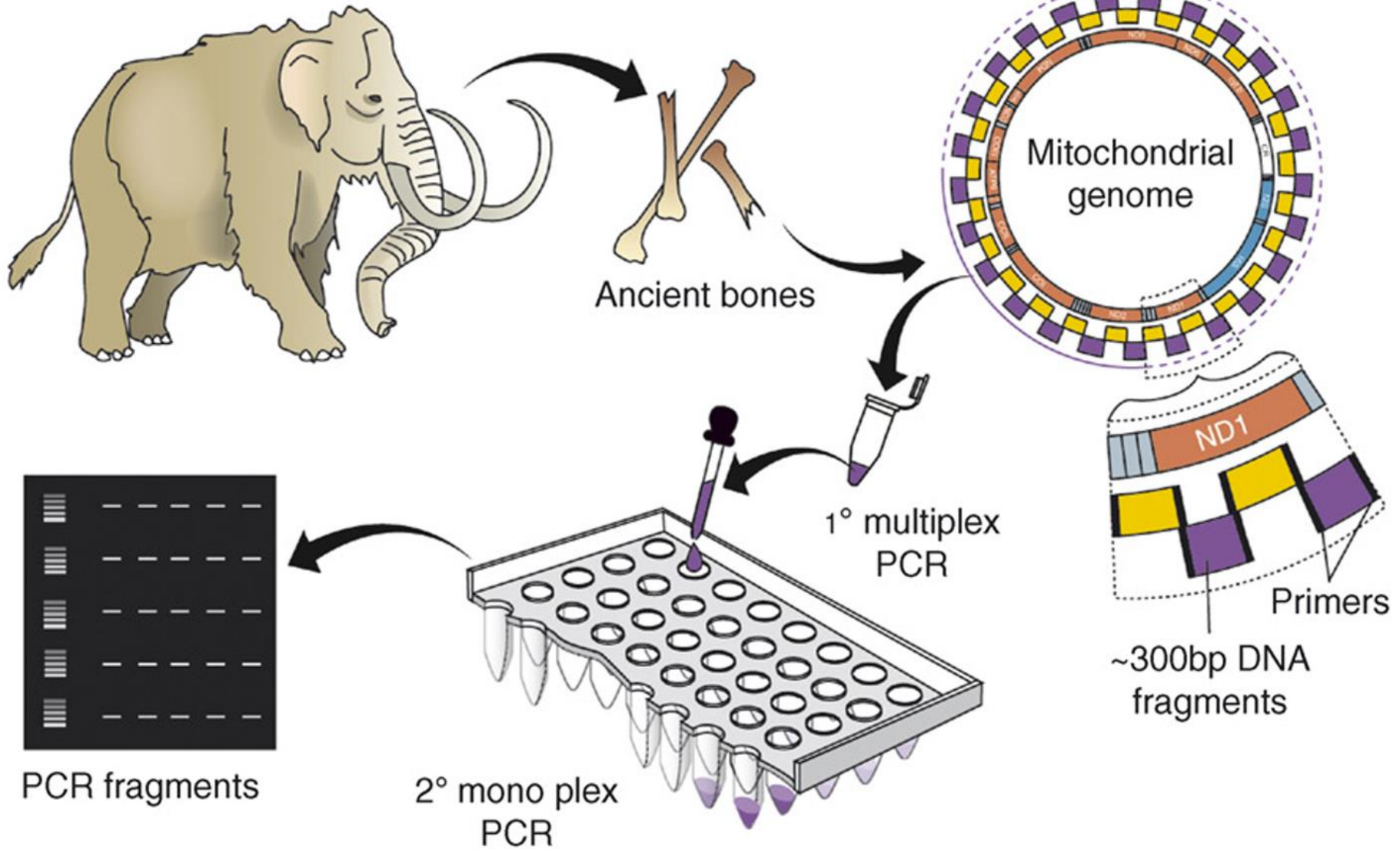
Guilt = 1/10.000.000

Μελέτη DNA από απολιθώματα



Μελέτη DNA από απολιθώματα

Mammoth





Ευχαριστώ



HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

EST. 1837

Kosmas Haralampidis - kharalamp@biol.uoa.gr