



ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Ενότητα 6^η: Βιβλιοθήκες γενετικού υλικού

Δροσοπούλου Ε.
Σκούρας Ζ.

Τμήμα Βιολογίας



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



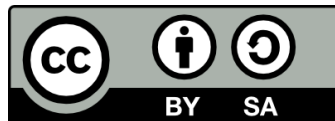
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Άδεια χρήσης εικόνων

Ευχαριστούμε θερμά τις Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Μπάσδρα για την παραχώρηση του δικαιώματος χρήσης των εξής εικόνων της παρούσης παρουσίασης:

Εικόνες: 2-8

Οι εικόνες αυτές προέρχονται από τα βιβλία Peter Russell, iGenetics: Μια μεντελική προσέγγιση, 1η έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε. και Watson J.D., Myers R.M., Caudy A.A., Witkowski J.A., Ανασυνδυασμένο DNA, Γονίδια και γονιδιώματα – Μια συνοπτική παρουσίαση, 1^η Ελληνική έκδοση, 3^η Αγγλική έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.



Περιεχόμενα ενότητας

- Βιβλιοθήκες γενετικού υλικού
- Γονιδιωματικές βιβλιοθήκες
 - Κατασκευή
- cDNA βιβλιοθήκες
 - Κατασκευή
- Βιβλιοθήκες έκφρασης
- Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών



Βιβλιοθήκες γενετικού υλικού

Βιβλιοθήκες γενετικού υλικού: συλλογές κλώνων από ανασυνδυασμένα μόρια DNA, «πακεταρισμένα» σε κατάλληλο βιολογικό σύστημα, ώστε να αναπαράγονται και να πολλαπλασιάζονται εύκολα.

- Γονιδιωματικές βιβλιοθήκες
- cDNA βιβλιοθήκες-Βιβλιοθήκες έκφρασης

Διαφορετικός τρόπος δημιουργίας και εφαρμογές



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες (1/2)

- Αποτελούν «αντίγραφα» του συνολικού γονιδιώματος
 - Περιλαμβάνουν γονίδια αλλά και μη γονιδιακές ακολουθίες
 - Συνήθως «πακετάρονται» σε μεγάλα κομμάτια
-
- ✓ Εύρεση/ανάλυση γονιδίων ΚΑΙ ρυθμιστικών στοιχείων
 - ✓ Ανάλυση γονιδιωματικής οργάνωσης
 - ✓ Χαρτογράφηση γονιδιωμάτων
 - ✓ Εύρεση αλληλουχίας γονιδιωμάτων



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες (2/2)

Το σύνολο του γονιδιώματος ενός οργανισμού, οργανωμένο σε μικρότερα επικαλυπτόμενα κομμάτια, έτσι ώστε:

- Διευκολύνεται η επιλογή και η ανάλυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας
- Γίνεται δυνατή η ανάλυση γειτονικών ακολουθιών με τη διαδικασία του “chromosome walking”

Ιδανική βιβλιοθήκη: Ολόκληρο το γονιδίωμα στο μικρότερο δυνατό αριθμό κλώνων.



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (1/13)

1. Απομόνωση μεγαλομοριακού γονιδιωματικού DNA

- Κατάλληλος ιστός ή ολόκληρος οργανισμός
- Καταστροφή ιστού,
λύση των κυττάρων (μηχανική θραύση, απορυπαντικά, ένζυμα)
- Απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμάτων (φυγοκέντρηση)
- Απομάκρυνση πρωτεϊνών (οργανικοί διαλύτες, ένζυμα)
- Συμπύκνωση DNA (αλκοόλη)
- Ήπιοι χειρισμοί για αποφυγή σπασίματος
>100kb

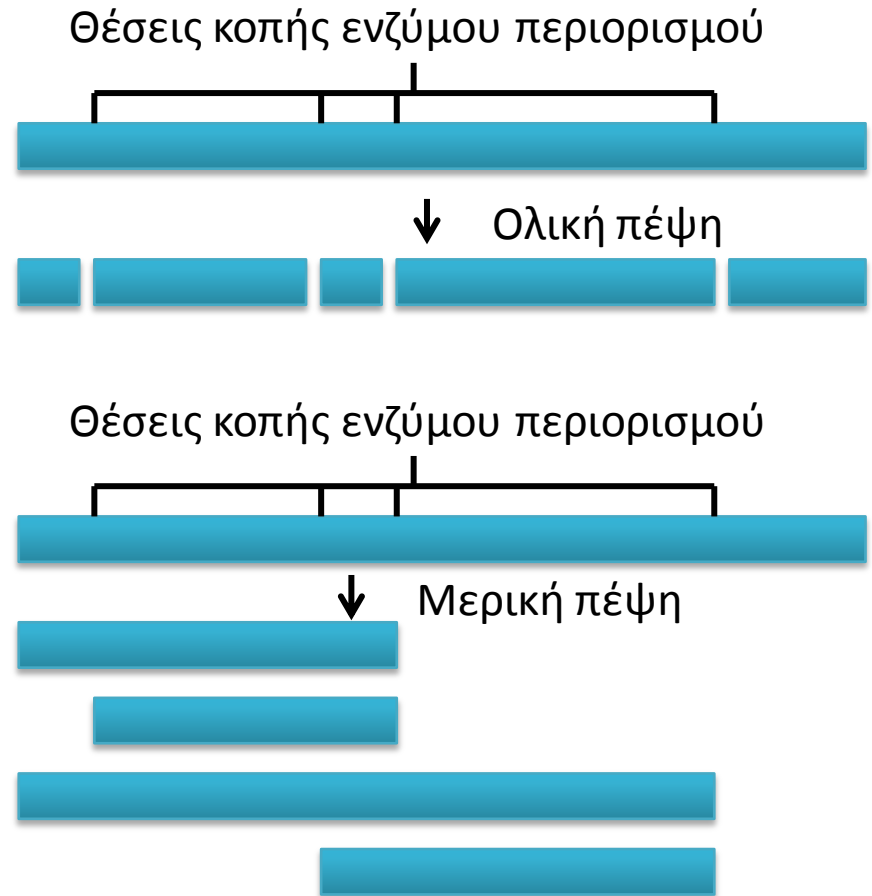


Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (2/13)

2α. Πέψη γονιδιωματικού DNA

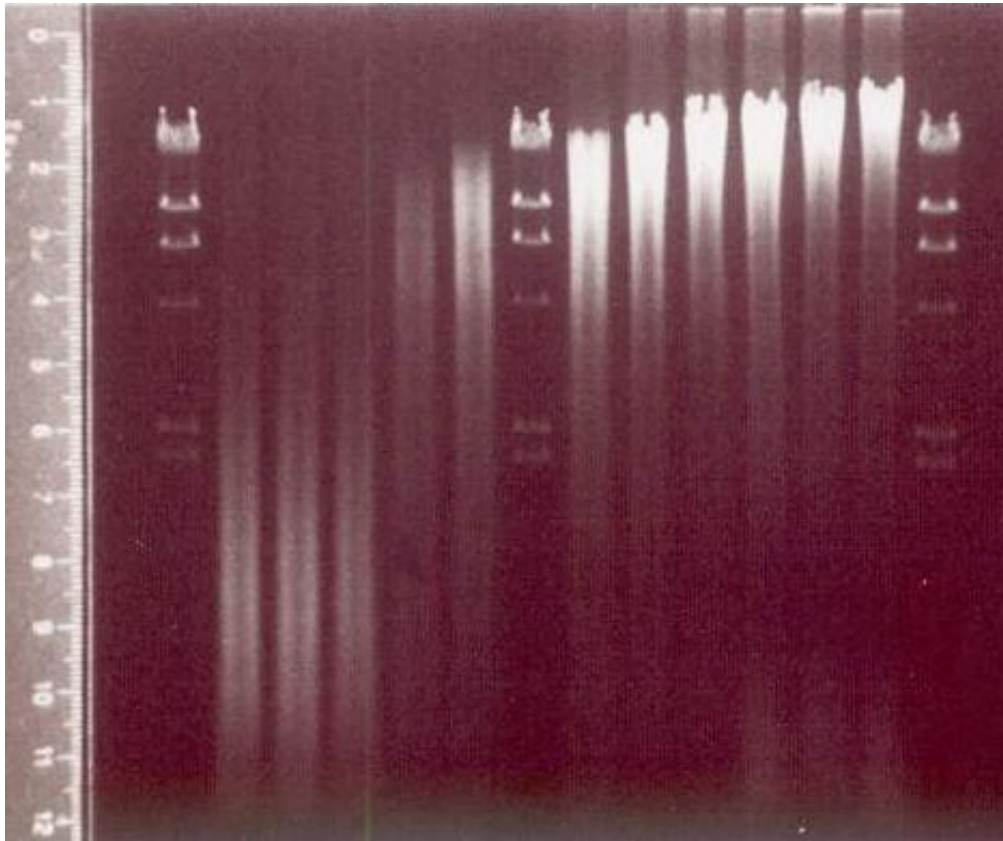
Μερικές Πέψεις

- Κατάλληλο μέγεθος
- Επικαλυπτόμενα τμήματα



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (3/13)

2α. Πέψη γονιδιωματικού DNA



- Ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν τετρανουκλεοτιδικές αλληλουχίες (*Sau3AI*)

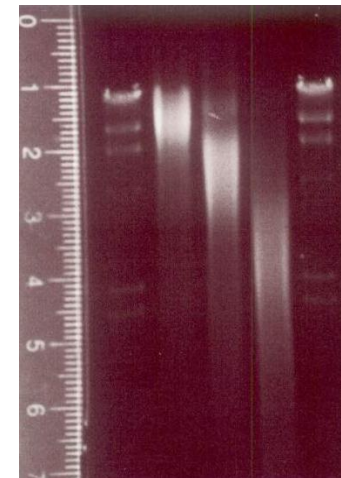
Εικόνα 1: Μερικές πέψεις



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (4/13)

2β. Επιλογή κατάλληλων τμημάτων DNA

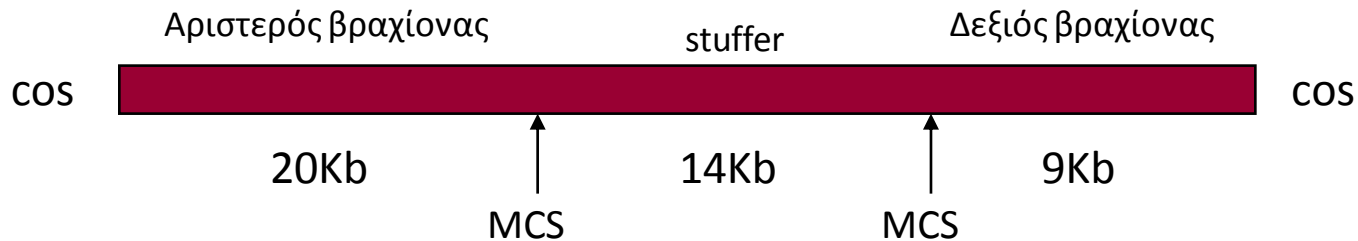
- Ηλεκτροφόρηση
- Υπερφυγοκέντρωση σε διαβάθμιση σουκρόζης
- Επιλογή κλασμάτων



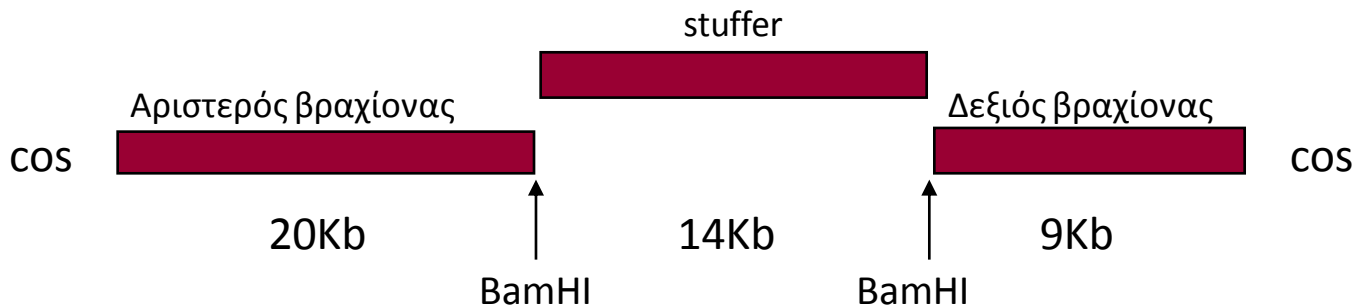
Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (5/13)

3. Επιλογή και προετοιμασία φορέα

- λ βακτηριοφάγοι - Φορείς αντικατάστασης



- Πέψη με κατάλληλη ενδονουκλεάση περιορισμού



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (6/13)

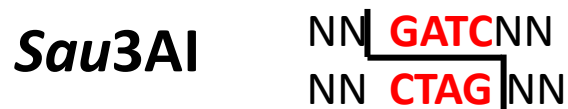
4. Σύνδεση φορέα με γονιδιωματικό DNA

Πέψη γονιδιωματικού DNA με *Sau3AI*

Πέψη φορέα με *BamHI*

Μπορούν να συνδεθούν τα μόρια αυτά?

Συμβατά άκρα:



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (7/13)

4. Σύνδεση φορέα με γονιδιωματικό DNA

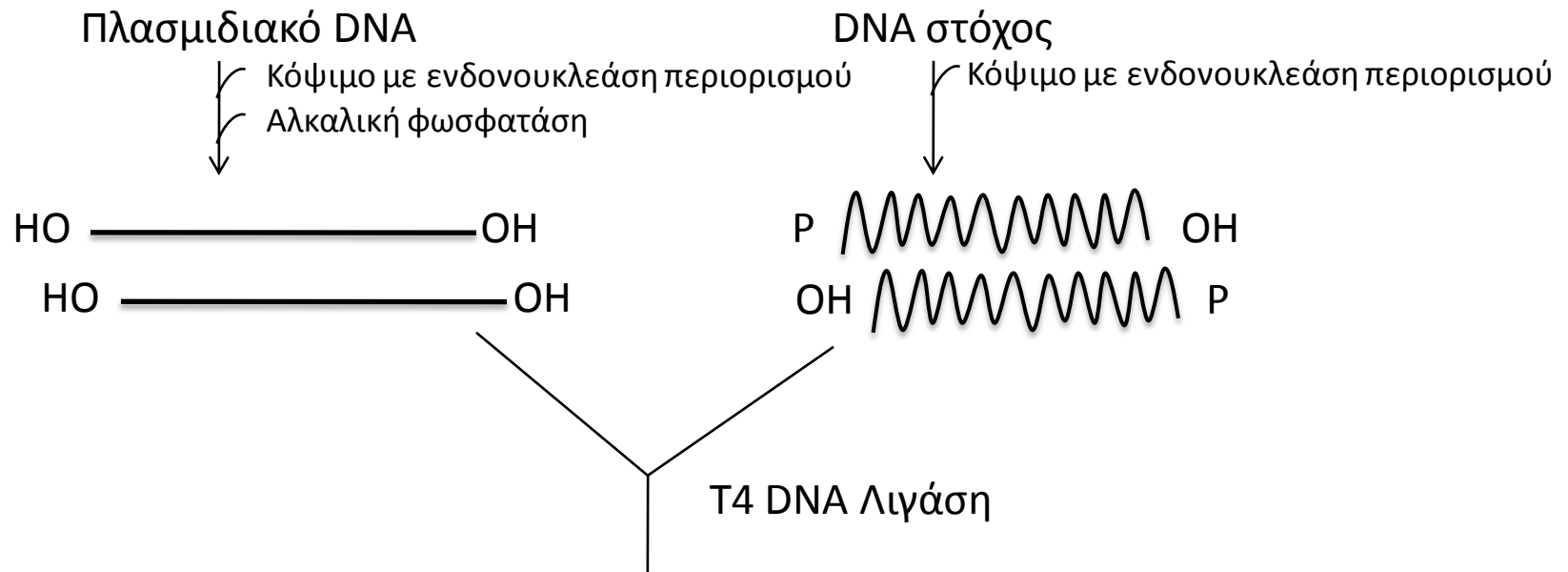
- DNA λιγάση
- Κατάλληλη αναλογία μορίων
- Αποτροπή επανασύνδεσης μορίων φορέα



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (8/13)

- Αποτροπή επανασύνδεσης μορίων φορέα

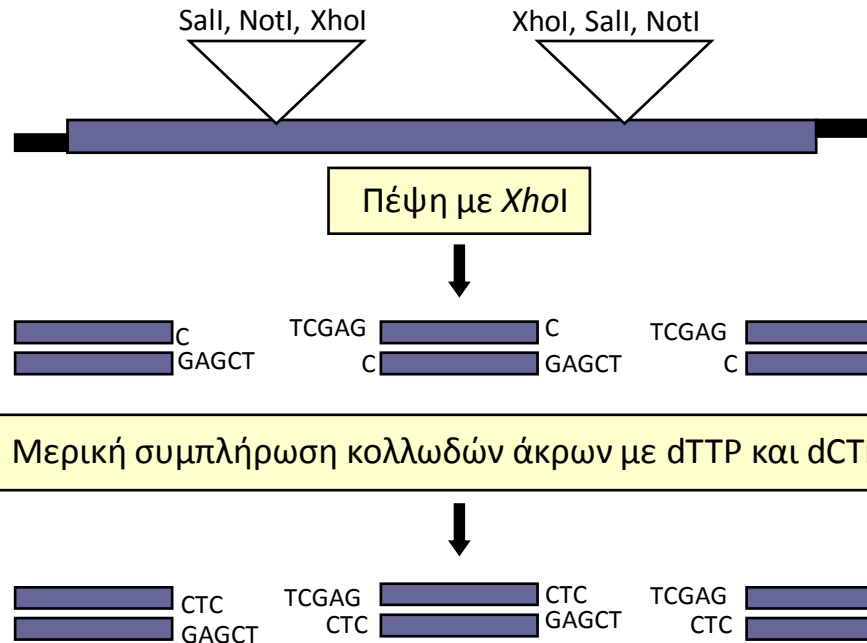
Αποφωσφορυλίωση 5' άκρων φορέα με αλκαλική φωσφατάση



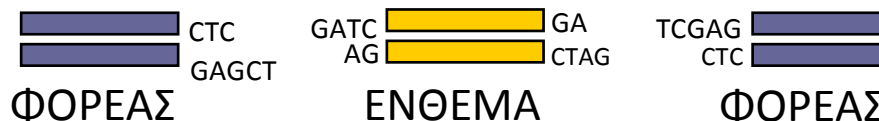
Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (9/13)

- Αποτροπή επανασύνδεσης μορίων φορέα

Μερική συμπλήρωση κολλωδών άκρων



Τα άκρα του φορέα δεν είναι συμβατά μεταξύ τους, αλλά είναι συμβατά με μερικώς συμπληρωμένα άκρα ενθέματος που έχει πεφθειί με *Bam*HI, *Mbo*I, *Bgl*II ή *Sau*3AI.



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (10/13)

5. Πακετάρισμα

Ανάμιξη ανασυνδυασμένου DNA με πρωτεΐνες ιϊκού
καψιδίου



Αυτόματη συναρμολόγηση ικών καψιδίων



Δημιουργία Γονιδιωματικής Βιβλιοθήκης

http://kkk.gobot.com/dna_library.htm

Εικόνα: Vectors for making libraries with larger inserts



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (11/13)

Ιδανική βιβλιοθήκη: Ολόκληρο το γονιδίωμα στο μικρότερο δυνατό αριθμό κλώνων.

Ιδανική βιβλιοθήκη θηλαστικού γονιδιώματος σε βακτηριοφάγο:

Με απλούς υπολογισμούς θα έπρεπε $3 \times 10^9 / 17.000 = \sim 2 \times 10^5$ κλώνους

Γονιδιωματικό ισοδύναμο



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (12/13)

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

P= πιθανότητα εύρεσης μοναδικής ακολουθίας
F= μέσο μέγεθος ενθέματος / μέγεθος γονιδιώματος

Ιδανική βιβλιοθήκη θηλαστικού γονιδιώματος σε βακτηριοφάγο:
για $P = 0,99$ και $f = 17.000 / 3 \times 10^9$

$N = \sim 1 \times 10^6$ κλώνοι \sim **4-5 γονιδιωματικά ισοδύναμα**

Δροσόφιλα

$P = 0,99$ $f = 17.000 / 1,7 \times 10^8$ $N = \sim 1 \times 10^5$ κλώνοι



Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες- Κατασκευή (13/13)

Ενισχυμένες Γονιδιωματικές βιβλιοθήκες

Μόλυνση νέων βακτηρίων με το σύνολο των βακτηριοφάγων της αρχικής βιβλιοθήκης ώστε να πολλαπλασιαστούν και να αυξηθεί ο αριθμός τους

Ποσοτική ενίσχυση όχι ποιοτική

Κάποιοι φάγοι έχουν καλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού
Άρα θα αντιπροσωπεύονται σε μεγαλύτερο ποσοστό

Μια ενισχυμένη βιβλιοθήκη είναι λιγότερο αντιπροσωπευτική
από την αρχική



cDNA Βιβλιοθήκες

- Αποτελούν «αντίγραφα» του γονιδιώματος που μεταγράφεται σε συγκεκριμένο τύπο κυττάρου και συγκεκριμένες συνθήκες.
 - cDNA = DNA συμπληρωματικό (complimentary) του mRNA.
 - Περιλαμβάνει μόνο κωδικοποιούσες ακολουθίες χωρίς ιντρόνια και ρυθμιστικά στοιχεία.
-
- ✓ Απομόνωση και ανάλυση γονιδίων που εκφράζονται έντονα σε κάποιο ιστό
 - ✓ Δυνατή η άμεση έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου σε βακτήρια
 - ✓ Αδυναμία μελέτης της δομής του γονιδίου



cDNA βιβλιοθήκες-Κατασκευή (1/10)

Απομόνωση mRNA από ιστό



Παραγωγή DNA μορίων με ανάστροφη μεταγραφή



Κλωνοποίηση σε κατάλληλους φορείς



cDNA βιβλιοθήκες-Κατασκευή (2/10)

Απομόνωση mRNA

- **Συχνότητα του mRNA που ενδιαφέρει**
 - Επιλογή ιστού που εκφράζει σε αφθονία το γονίδιο που ενδιαφέρει (πάγκρεας –ινσουλίνη)
 - Επαγωγή του γονιδίου που ενδιαφέρει (θερμοεπαγόμενα γονίδια)
- 10.000-30.000 διαφορετικά μόρια mRNA/ κύτταρο



cDNA βιβλιοθήκες-Κατασκευή (3/10)

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-[1/n])}$$

P = πιθανότητα εύρεσης ακολουθίας
 $1/n$ = το ποσοστό του επιθυμητού mRNA

- «Σπάνιο» mRNA <0.5% -1.000.000 κλώνοι
- Εμπλουτισμός mRNA
 - Επιλογή μορίων συγκεκριμένου μεγέθους
 - Αφαιρετική κλωνοποίηση



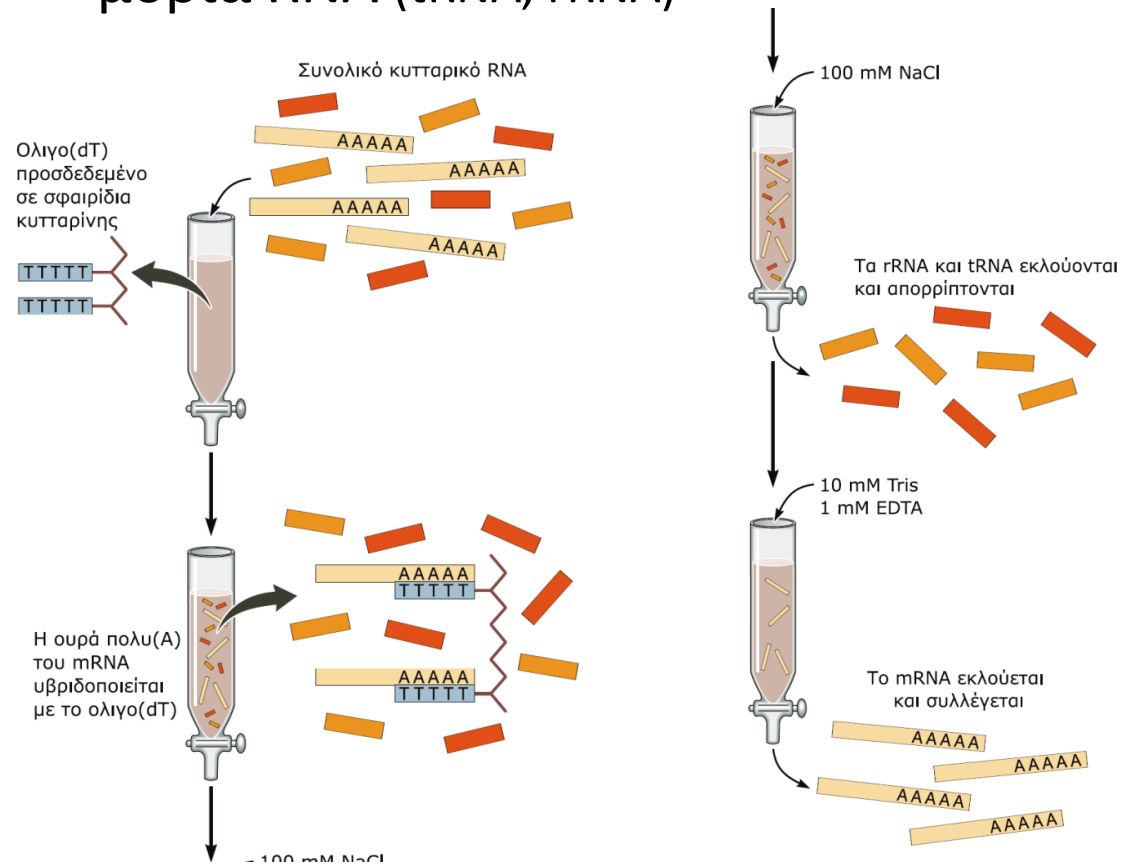
cDNA βιβλιοθήκες-Κατασκευή (4/10)

Απομόνωση mRNA

- Μεγάλη ευαισθησία του RNA σε υδρόλυση

- Ιδιαίτερη προσοχή κατά την απομόνωση για παρουσία RNασών

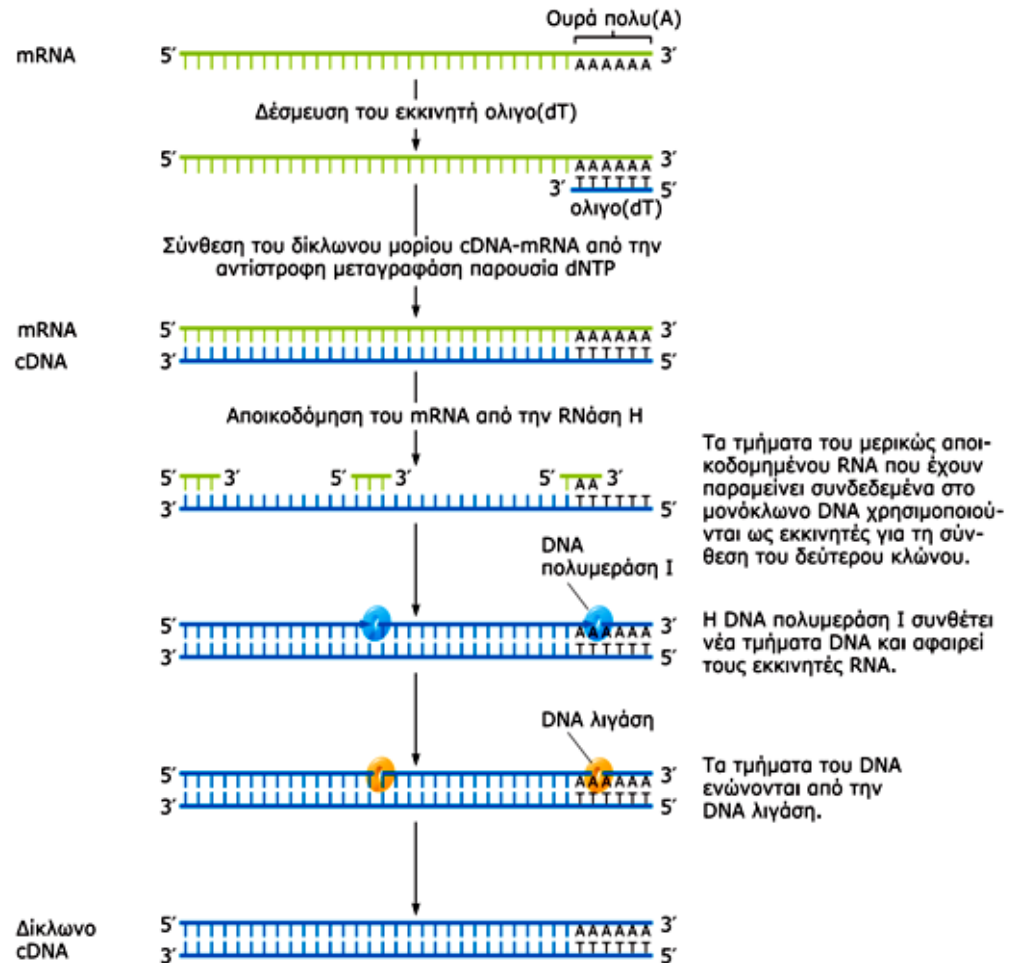
- Εικόνα 2: Επιλογή mRNA από άλλα μόρια RNA (tRNA, rRNA)



cDNA βιβλιοθήκες-Κατασκευή (5/10)

Εικόνα 3: Σύνθεση cDNA

- Ολιγο(dT) εκκινητές
- Ανάστροφη μεταγραφή
- Καταστροφή RNA
- Σύνθεση δεύτερου κλώνου DNA
- Σύνδεση των κενών



cDNA βιβλιοθήκες-Κατασκευή (6/10)

Κλωνοποίηση cDNA

Το cDNA δε διαθέτει μονόκλινα κολλώδη άκρα.
Πώς θα γίνει η σύνδεση με το φορέα;

- Δημιουργία μονόκλωνης ουράς με την τελική δεοξυνουκλεο-τρανσφεράση



cDNA βιβλιοθήκες-Κατασκευή (7/10)

Κλωνοποίηση cDNA

- Σύνδεση «συνδετών» (linkers) ή «προσαρμοστές» (adaptors) με DNA λιγάση

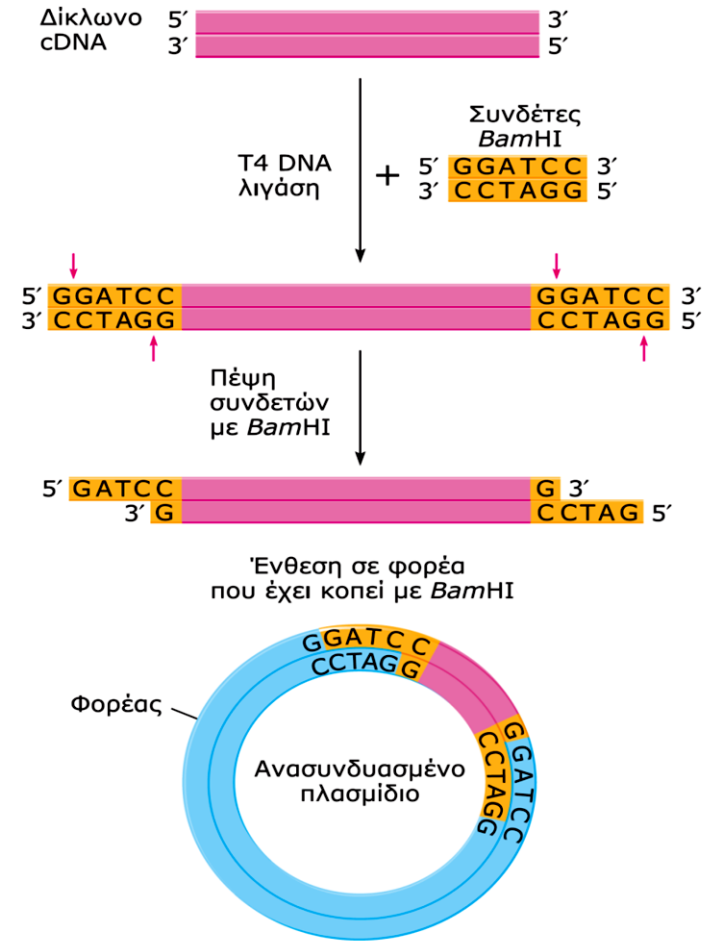
Συνδέτης: δίκλωνο μικρό συνθετικό τμήμα DNA που περιέχει ακολουθία αναγνώρισης κάποιας ενδονουκλεάσης περιορισμού. Ακολουθεί πέψη.

Προσαρμοστής: μικρό συνθετικό τμήμα DNA που έχει τυφλό άκρο από μία πλευρά και κολλώδες συμβατό με κάποια ενδονουκλεάση περιορισμού από τη άλλη.



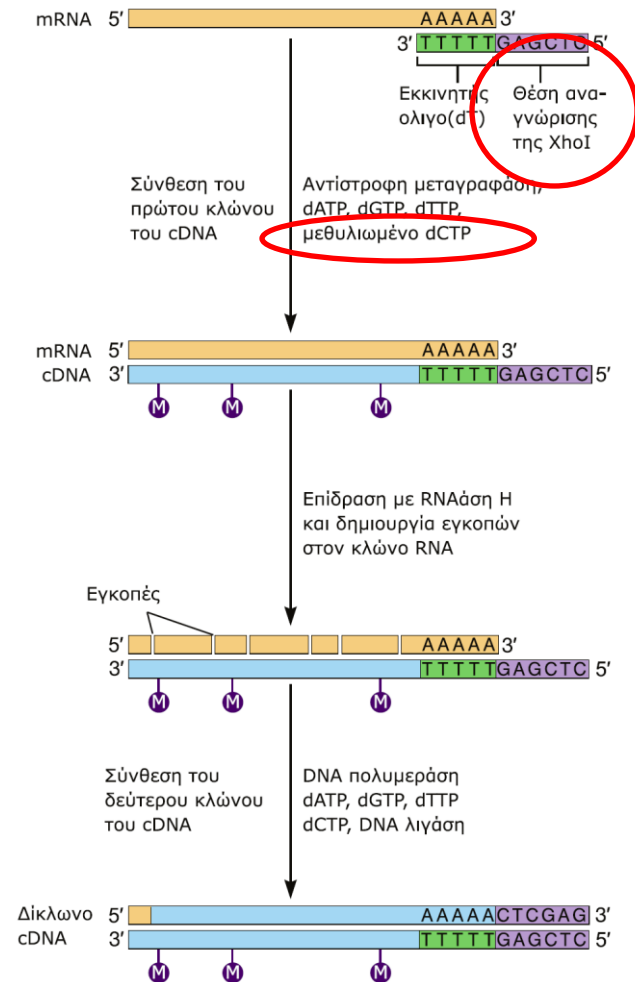
cDNA βιβλιοθήκες-Κατασκευή (8/10)

Εικόνα 4: Κλωνοποίηση cDNA σε πλασμίδιο με τη χρήση συνδέτη *Bam*H I



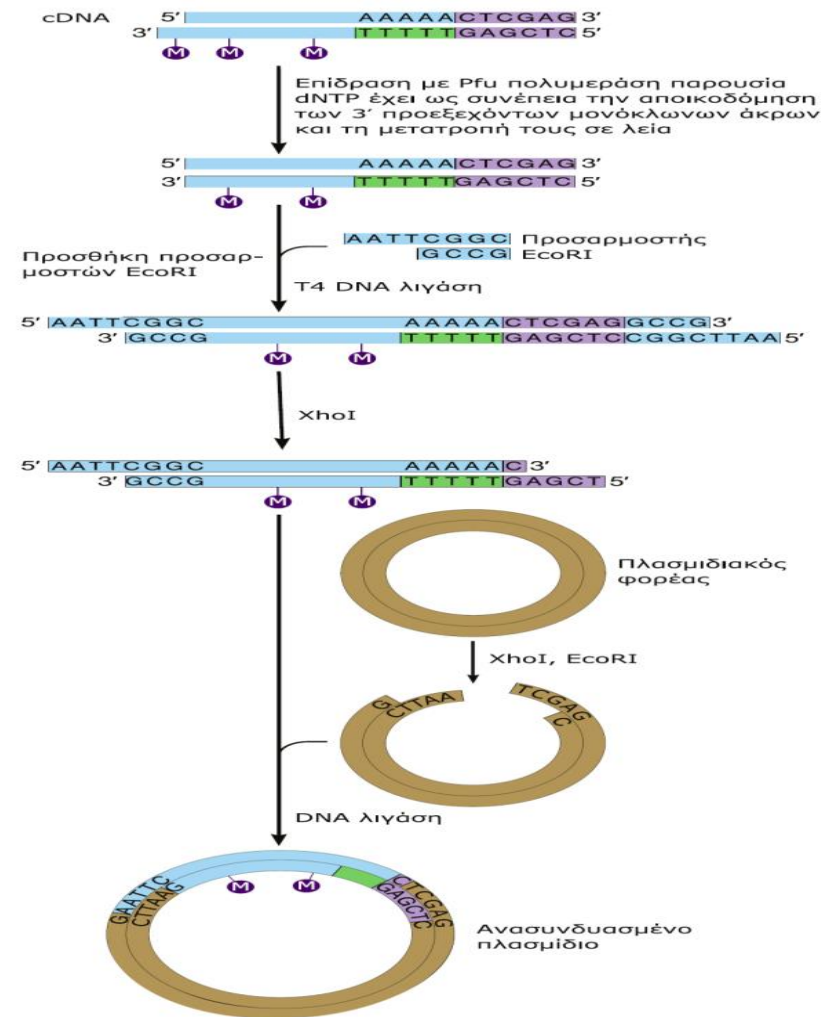
cDNA βιβλιοθήκες-Κατασκευή (9/10)

Εικόνα 5α: Κλωνοποίηση cDNA με συγκεκριμένη κατεύθυνση



cDNA βιβλιοθήκες-Κατασκευή (10/10)

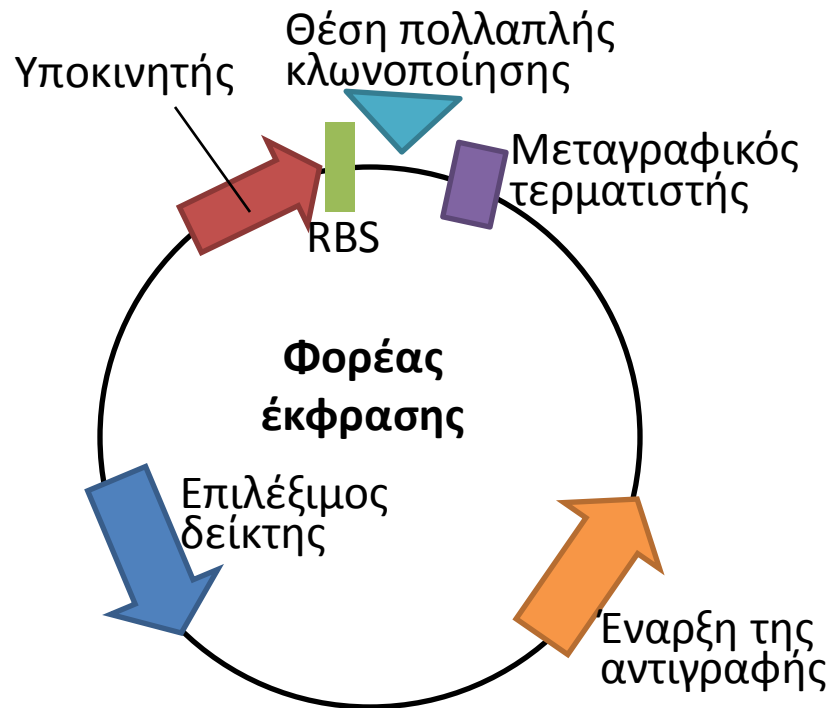
Εικόνα 5β: Κλωνοποίηση cDNA με συγκεκριμένη κατεύθυνση



Βιβλιοθήκες Έκφρασης (1/2)

- Παρόμοιες με cDNA βιβλιοθήκες
- Επιτρέπουν τη μετάφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων
- Φορείς έκφρασης

προαγωγείς, και σήματα για προκαρυωτική μεταγραφή και μετάφραση



Βιβλιοθήκες Έκφρασης (2/2)

- ✓ Δυνατότητα ανίχνευσης κλωνοποιημένου γονιδίου με αντισώματα.
- ✓ Παραγωγή του προϊόντος του κλωνοποιημένου γονιδίου σε μεγάλη ποσότητα.
- ✓ *In vivo* μελέτη του πρωτεϊνικού προϊόντος του κλωνοποιημένου γονιδίου.



Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (1/13)

- Υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων
- Αντισώματα
- Βιολογική δράση



φορείς
έκφρασης



Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (2/13)

Υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων: φυσική τάση των μονόκλωνων νουκλεϊνικών οξέων να βρίσκουν και να σχηματίζουν δίκλινα μόρια με άλλα μονόκλινα που φέρουν συμπληρωματική ακολουθία

Ο υβριδισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη και αν τα μόρια δεν είναι απόλυτα συμπληρωματικά (τουλάχιστον $>80\%$, >25 bp)



Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (3/13)

DNA ανιχνευτές: Επισημασμένα DNA μόρια με ακολουθία συμπληρωματική προς την αναζητούμενη

- ✓ cDNA από ιστό όπου εκφράζεται το γονίδιο
- ✓ Τμήμα της ακολουθίας που αναζητάμε που προέκυψε με PCR
- ✓ DNA κλώνος ομόλογου γονιδίου από συγγενικό οργανισμό
- ✓ DNA κλώνος γονιδίου της ίδιας οικογένειας από τον ίδιο οργανισμό
- ✓ Ολιγονουκλεοτίδια από αντίστροφη μετάφραση

Ομόλογος
ανιχνευτής

Ετερόλογος
ανιχνευτής



Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (4/13)

Μόρια επισήμανσης DNA ανιχνευτών:

- **ραδιενεργά μόρια** (^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H)
- **μη ραδιενεργά μόρια** (διγοξυγενίνη, βιοτίνη, φθορίζουσες χρωστικές)

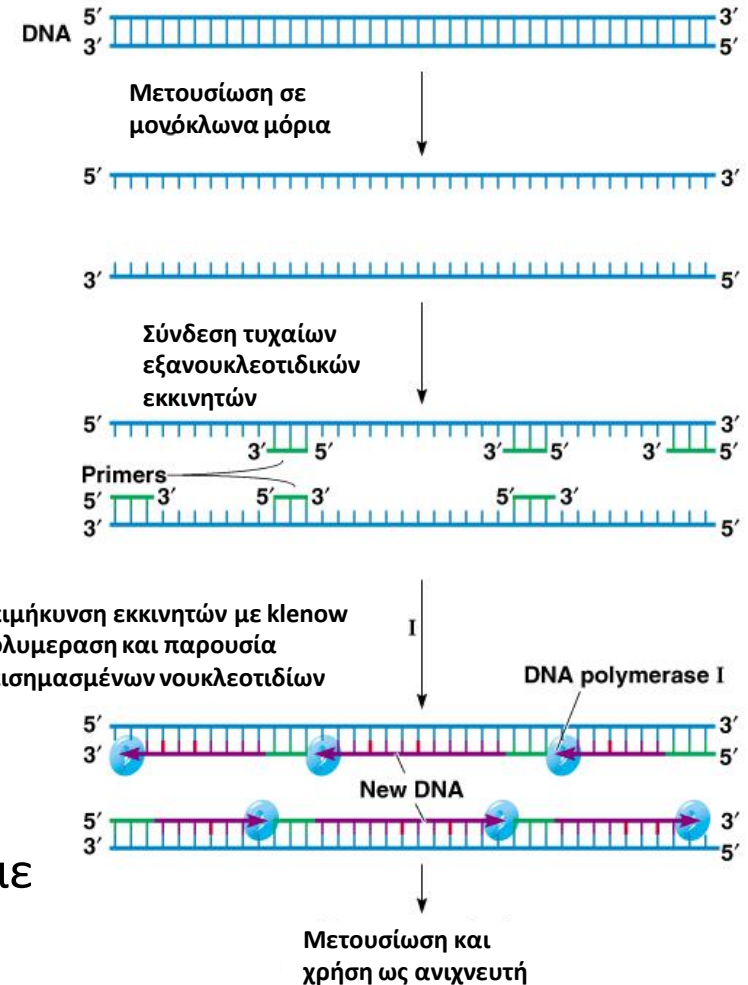


Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (5/13)

Μέθοδοι επισήμανσης DNA ανιχνευτών:

- Μετάφραση εγκοπής (Nick translation)
- Τελική συμπλήρωση (End filling)
- Τυχαίων εξαμερών (Random priming)

Εικόνα 6. Επισήμανση μορίου DNA με τη μέθοδο των τυχαίων εξαμερών



Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (6/13)

1. Μόλυνση βακτηρίων με ανασυνδυασμένους βακτηριοφάγους (μόνο για γονιδιωματικές βιβλιοθήκες)
2. Επίστρωση κατάλληλου αριθμού κλώνων σε στερεό θρεπτικό

Γονιδιωματικές

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

P= πιθανότητα εύρεσης μοναδικής ακολουθίας
F=μέσο μέγεθος ενθέματος/μέγεθος γονιδιώματος

4-5 Γονιδιωματικά ισοδύναμα

cDNA

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-[1/n])}$$

P= πιθανότητα εύρεσης ακολουθίας
1/n=το ποσοστό του επιθυμητού mRNA

«Σπάνιο» mRNA <0.5% N= ~1X10⁶ κλώνοι

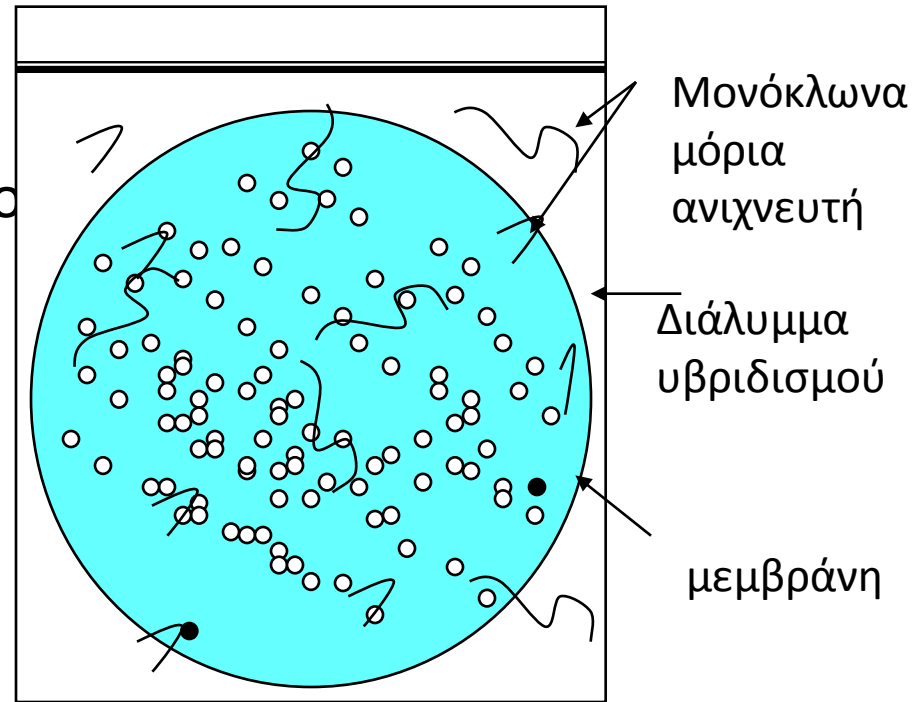
3. Λύση-Πλάκες (γονιδιωματικές βιβλιοθήκες), Ανάπτυξη αποικιών (cDNA βιβλιοθήκες)
4. Μεταφορά πλακών –αποικιών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης



Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (7/13)

5. Αποδιάταξη (NaOH) και στερέωση (80°C για 2 ώρες ή UV ακτινοβολία) του DNA των βακτηριοφάγων (γονιδιωματικές)-βακτηρίων (cDNA)

6. Υβριδισμός με επισημασμένο ανιχνευτή



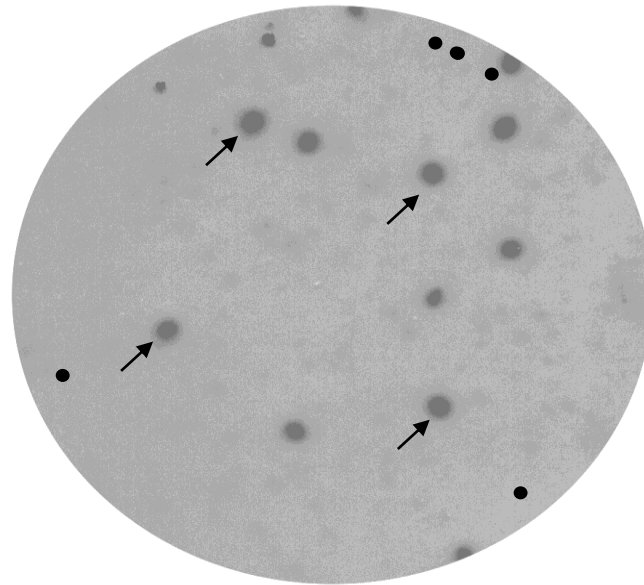
Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (8/13)

7. Ανίχνευση σήματος

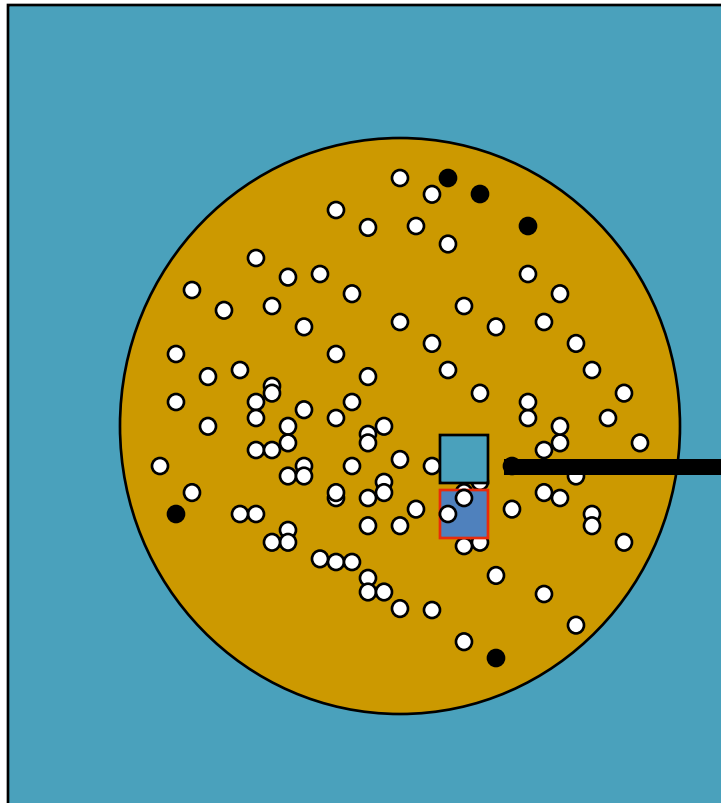
Αυτοραδιογραφία

Χρωμοαντίδραση

Φθορισμός

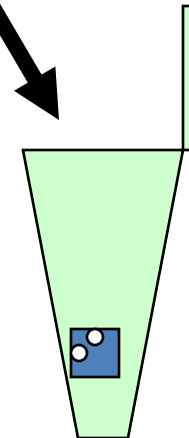


Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (9/13)



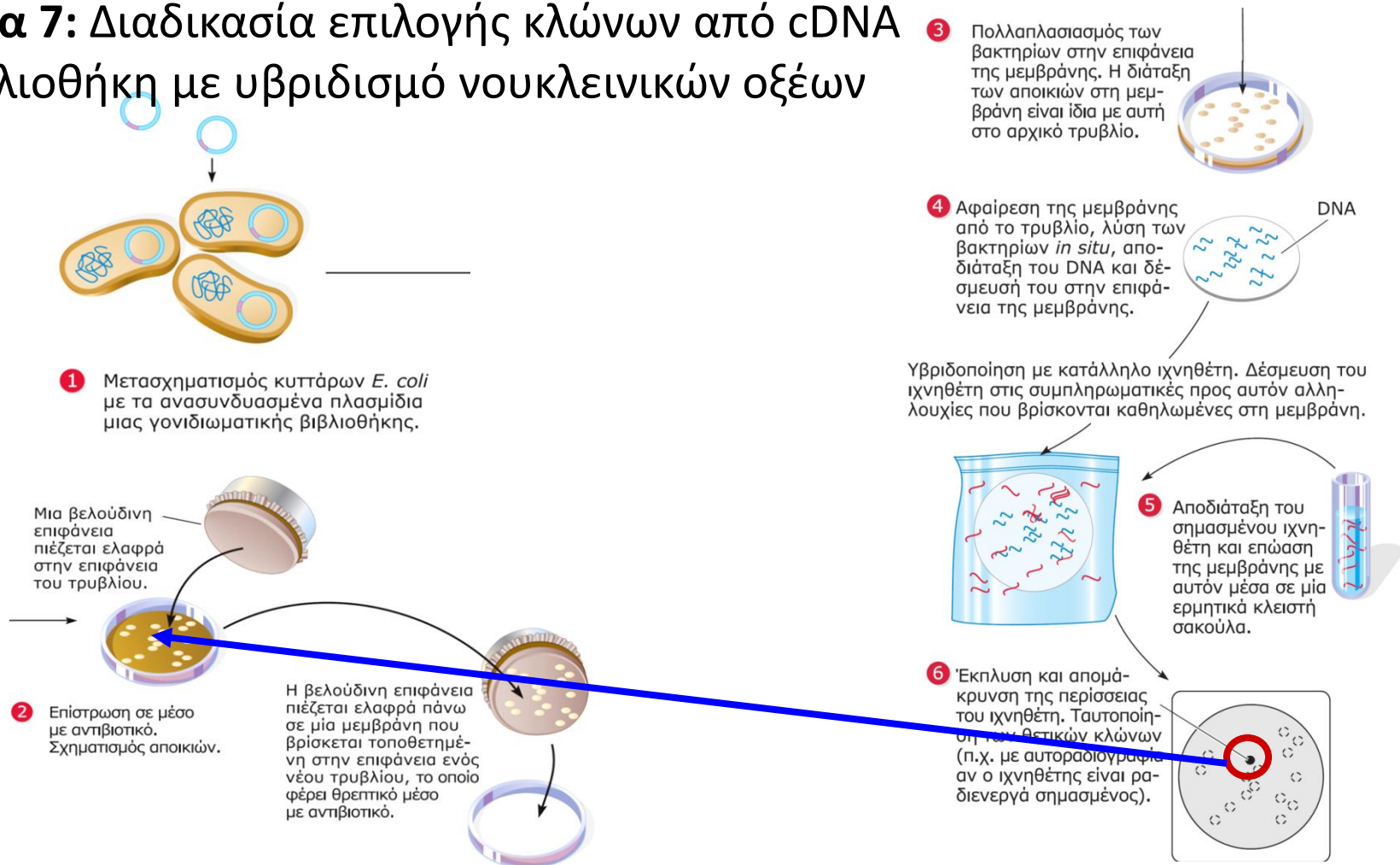
8. Ευθυγράμμιση σημαδιών

9. Μεταφορά πλάκας (γονιδιωματικές) ή αποικίας (cDNA) που αντιστοιχεί στο σήμα σε σωλήνα

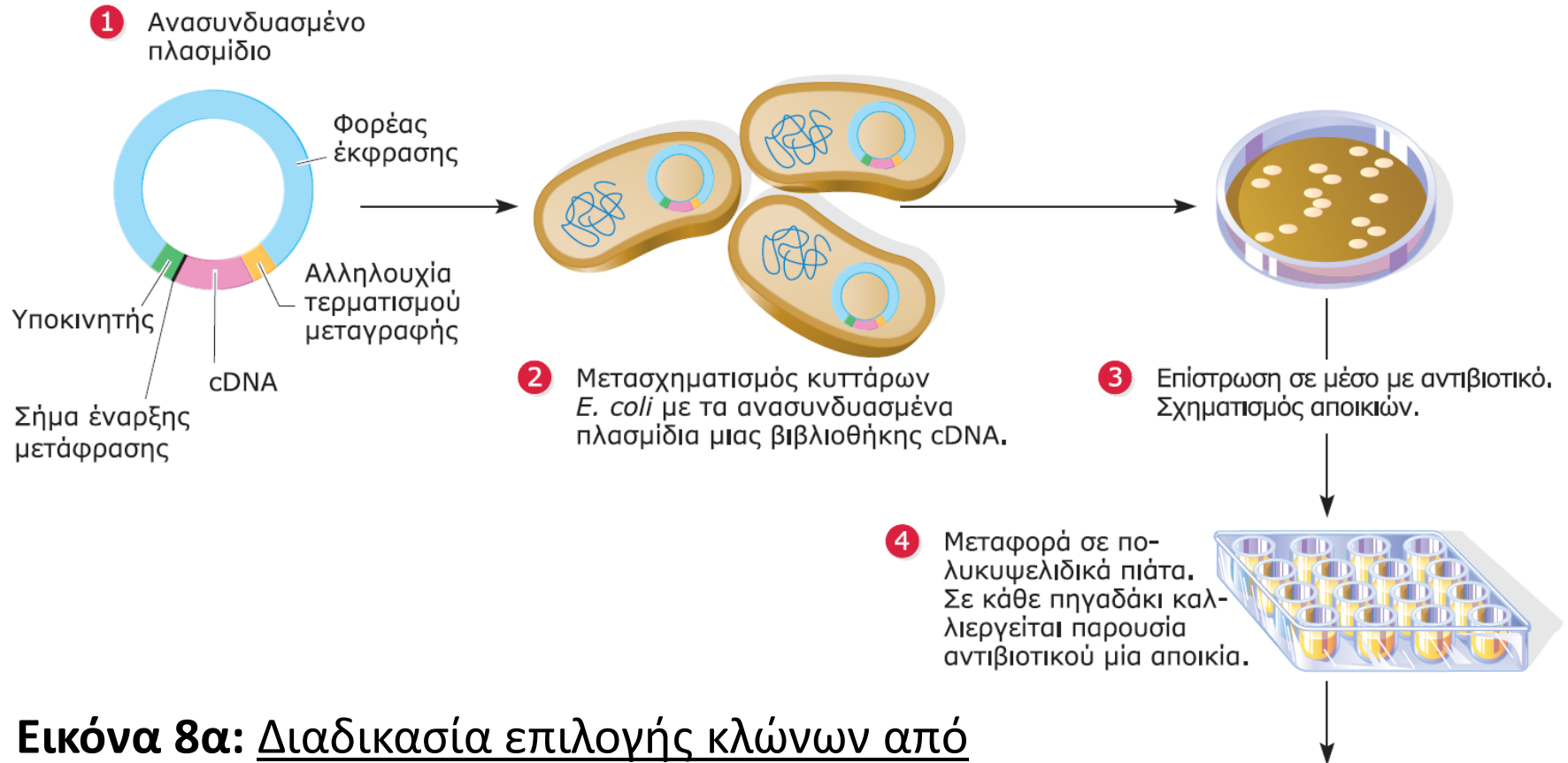


Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (10/13)

Εικόνα 7: Διαδικασία επιλογής κλώνων από cDNA βιβλιοθήκη με υβριδισμό νουκλειικών οξέων



Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (11/13)

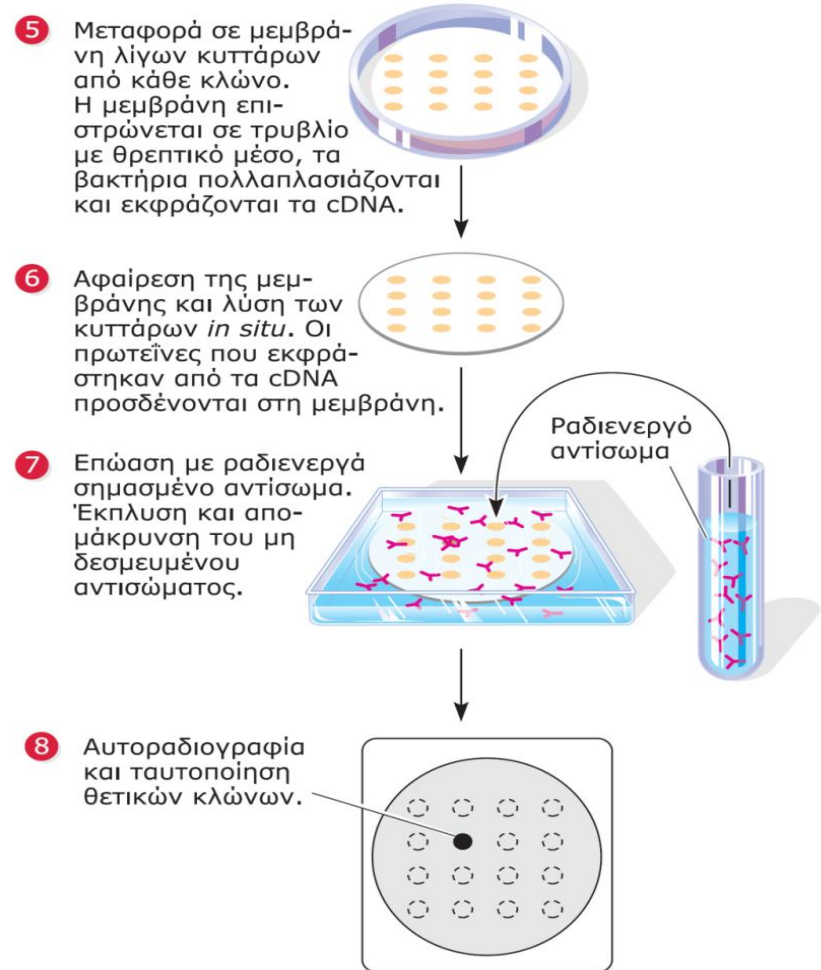


Εικόνα 8α: Διαδικασία επιλογής κλώνων από βιβλιοθήκη έκφρασης με χρήση αντισωμάτων



Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (12/13)

Εικόνα 8β: Διαδικασία επιλογής κλώνων από βιβλιοθήκη έκφρασης με χρήση αντισωμάτων



Επιλογή επιθυμητών κλώνων-Σάρωση βιβλιοθηκών (13/13)

Σάρωση με λειτουργικότητα

- ❖ Αποκατάσταση ελλατωματικής λειτουργίας-Λειτουργική συμπληρωματικότητα (*hisB* - *E. coli* - *HIS3* yeast gene)

- ❖ Απόκτηση νέας λειτουργίας



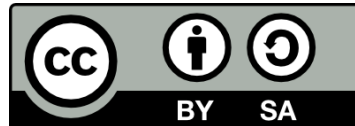
Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Δροσοπούλου Ελένη.
«Γενετική Μηχανική. Βιβλιοθήκες γενετικού υλικού». Έκδοση: 1.0.
Θεσσαλονίκη 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:
http://opencourses.auth.gr/eclass_courses.



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά - Παρόμοια Διανομή [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>





Τέλος ενότητας

Επεξεργασία: Μηνούδη Στυλιανή
Θεσσαλονίκη, Χειμερινό εξάμηνο 2013-2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

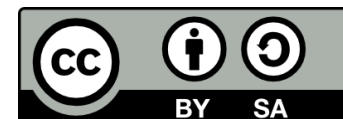


ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

