



ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Ενότητα 7^η: Τεχνικές ανάλυσης γενετικού υλικού

Δροσοπούλου Ε.
Σκούρας Ζ.

Τμήμα Βιολογίας



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



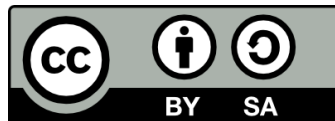
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

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: 1, 4-7, 10, 16, 22-30

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 (1/2)

- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
- Αλληλούχιση DNA
 - Μέθοδος Sanger
 - «Πυροαλληλούχιση» DNA (Pyrosequencing)
 - Illumina sequencing
- Μελέτη θέσης αλληλουχιών
 - Χαρτογράφηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού
 - Υβριδισμός κατά Southern
 - *In situ* υβριδισμός
 - FISH



Περιεχόμενα ενότητας (2/2)

- Μελέτη έκφρασης γονιδίων
 - Υβριδισμός κατά Northern
 - RNA-DNA *in situ* υβριδισμός
 - RT-PCR
 - Real time-PCR

- Μεταλλαξιγένεση *in vitro*
 - Τυχαία μεταλλαξιγένεση
 - Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

- Συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης

- Μεταφορά γονιδίων σε κύτταρα



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (1/15)

Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης PCR:

τεχνική παραγωγής πολλαπλών αντιγράφων συγκεκριμένης ακολουθίας DNA με τη χρήση θερμοανθεκτικών πολυμερασών και κατάλληλων εκκινήτων.

Απλή και γρήγορη διαδικασία με
πολλαπλές εφαρμογές.



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (2/15)

Πλεονεκτήματα

- Μεγάλη ευαισθησία, αρκεί ένα μόριο DNA για την παραγωγή σημαντικής ποσότητας
Το DNA που δημιουργείται σε έναν κύκλο ενίσχυσης χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα στους επόμενους κύκλους.
- Απομόνωση και ενίσχυση μιας ακολουθίας DNA χωρίς να είναι απαραίτητη η κλωνοποίησή της



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (3/15)

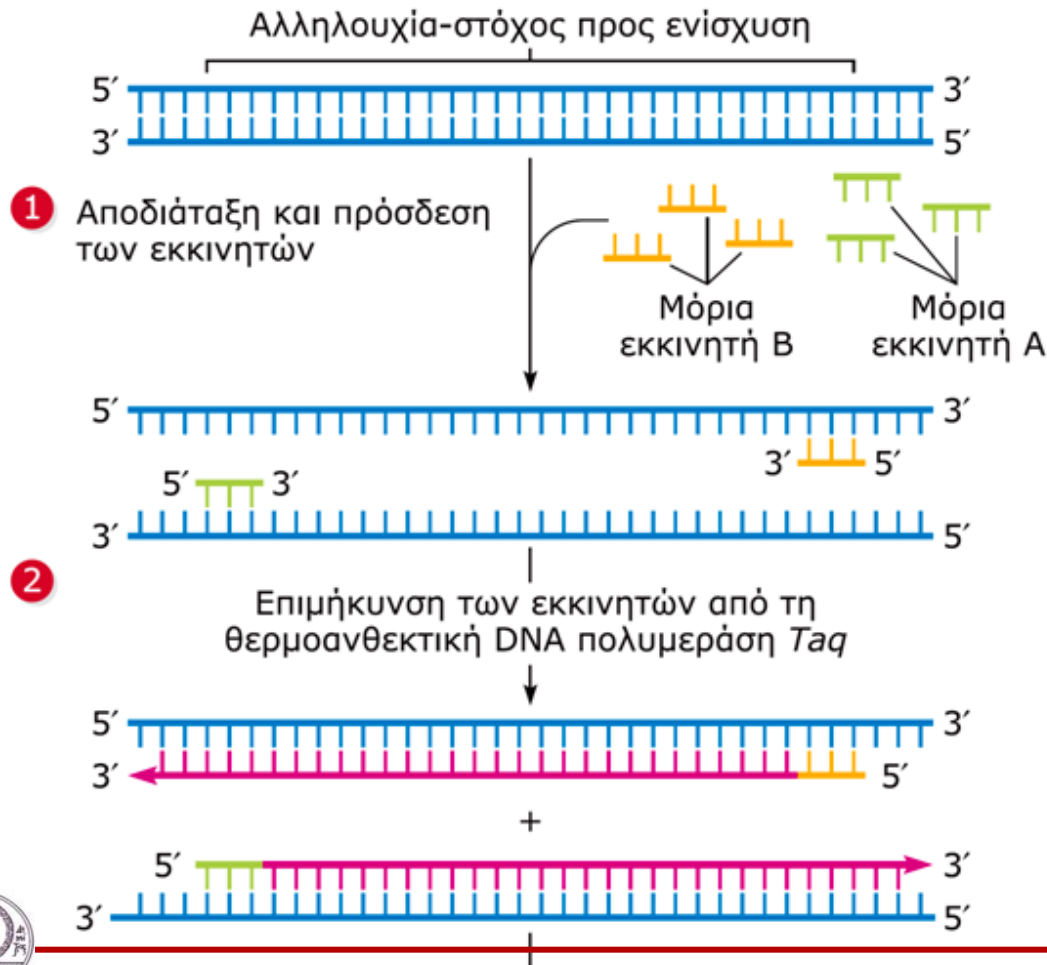
Περιορισμοί

- Απαραίτητη η γνώση των περιοχών αριστερά και δεξιά του γονιδίου (flanking regions) για να είναι εφικτή η σύνθεση των εκκινητών
- Συνήθως είναι επιτυχής για μικρές ακολουθίες DNA (λίγες χιλιάδες βάσεις)



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (4/15)

Αρχικό δίκλωνο DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο

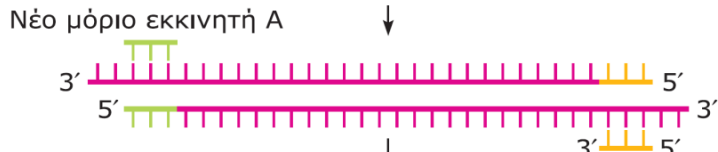


Εικόνα 1α): Τα βήματα της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

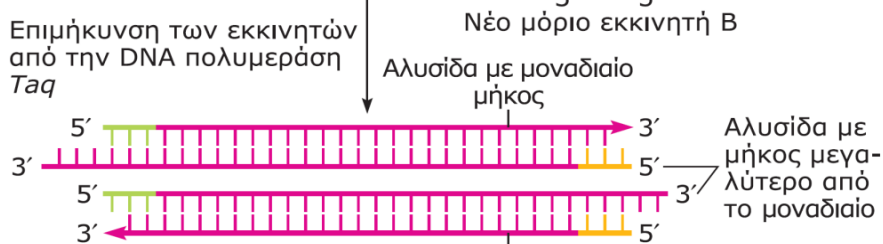


Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (5/15)

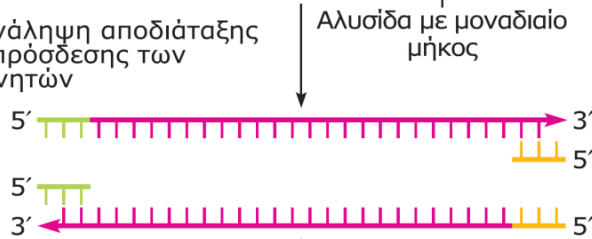
3 Επανάληψη αποδιάταξης και πρόσδεσης των εκκινητών



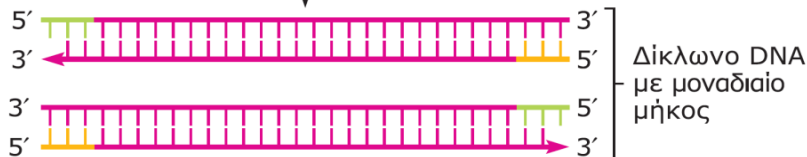
4 Επιμήκυνση των εκκινητών από την DNA πολυμεράση Taq



5 Επανάληψη αποδιάταξης και πρόσδεσης των εκκινητών



6 Επιμήκυνση των εκκινητών από την DNA πολυμεράση Taq



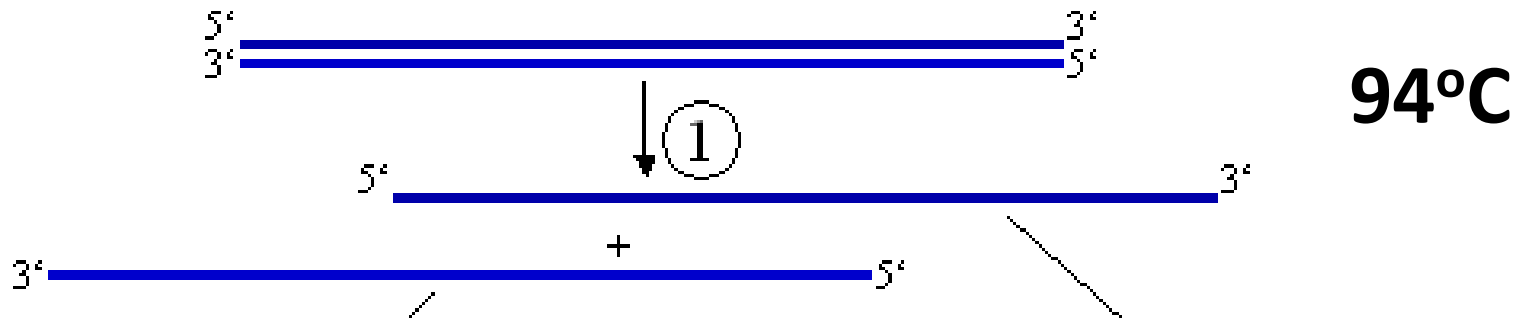
Συνεχιζόμενοι κύκλοι και πολλαπλασιασμός του DNA

Εικόνα 1β): Τα βήματα της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

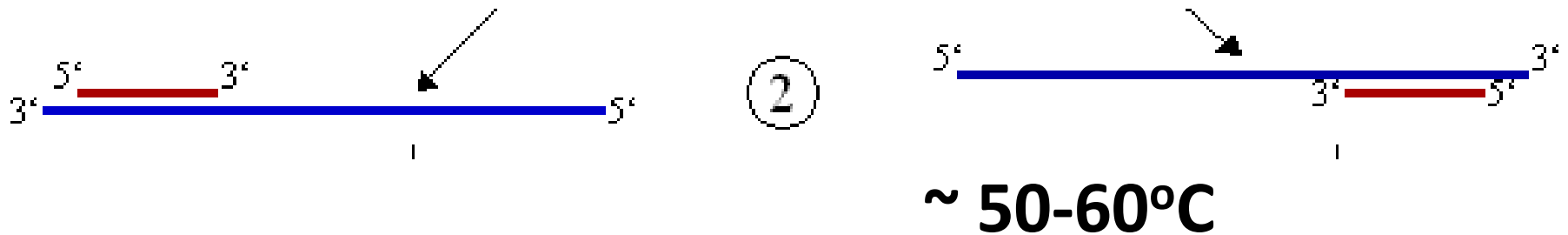


Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (6/15)

1. Αποδιάταξη



2. Σύνδεση εκκινητών

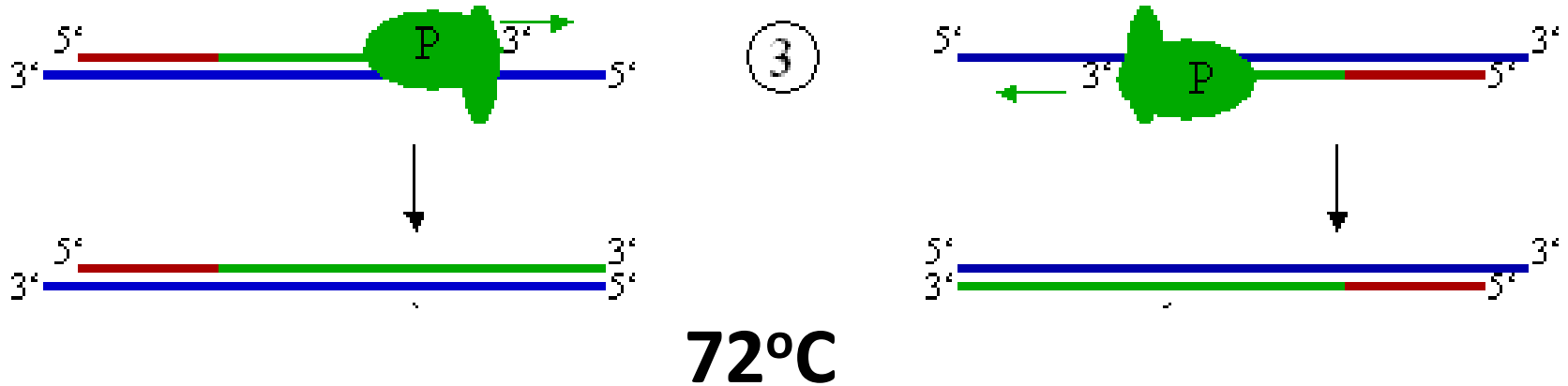


Εικόνα 2α): Βήματα της PCR



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (7/15)

3. Πολυμερισμός



4. Επανάληψη σταδίων 1-3

Εικόνα 2β): Βήματα της PCR



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (8/15)



Εικόνα 3: Θερμοκυκλοποιητής



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (9/15)

- Με το PCR είναι δυνατή η ενίσχυση συγκεκριμένης ακολουθίας με εκθετικό ρυθμό.
- Θεωρητικά, μετά από 35 κύκλους, από ένα μόριο θα προκύψουν 2^{36} αντίγραφα—68 δισεκατομμύρια.
- Ξεκινώντας με 100 αντίγραφα θα πάρεις περίπου 3.73 ug DNA, αρκετό για αλληλούχηση, κλωνοποίηση, ανάλυση σε gel.



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (10/15)

Παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία της αντίδρασης

- DNA στόχος - ποιότητα, ποσότητα, παρουσία παρεμποδιστών
- Νουκλεοτίδια – συγκέντρωση
- Mg^{++} - συγκέντρωση
- Εκκινητές
αλληλουχία-ειδικότητα
Μήκος (17-30nt)
 T_m (50-60° C)
συγκέντρωση
απόσταση-μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος (ιδανικό <1 kb)
- Πολυμεράση – θερμοανθεκτική (Taq, *Thermus aquaticus*)
- Θερμοκρασία και χρόνος κάθε βήματος



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (11/15)

Πρακτικά προβλήματα

- Παραγωγή μη ειδικών προϊόντων
Βελτιστοποίηση συνθηκών
- Ευαισθησία στις επιμολύνσεις
αντίδραση ελέγχου, διαχωρισμός χειρισμών, UV
- Πιστότητα αντιγραφής
Συχνότητα λαθών 2×10^4 ,
πολυμεράσες με επιδιορθωτική δράση (proof reading)



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (12/15)

Εφαρμογές

- ✓ Προ- και μετα-γεννητική διάγνωση ασθενειών
 - ✓ Ιατροδικαστική
 - ✓ Μοριακή οικολογία
 - ✓ Αρχαιογενετική
- } Γενετική ταυτοποίηση ατόμων



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (13/15)

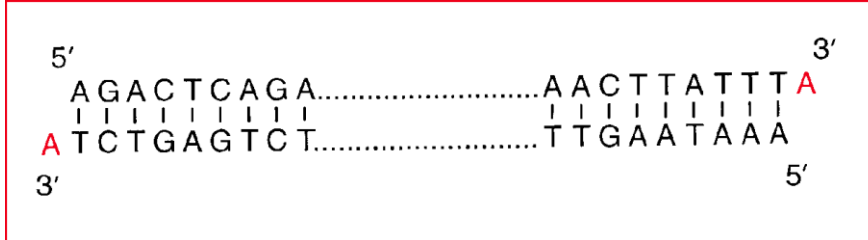
Μετά την ενίσχυση...

- **Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση**
- **Κλωνοποίηση**
- **Ανάλυση της αλληλουχίας**

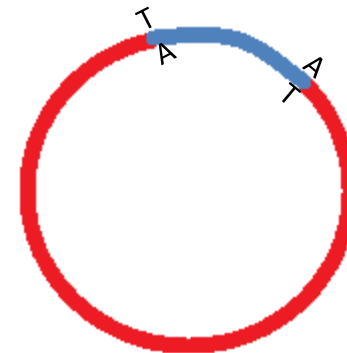
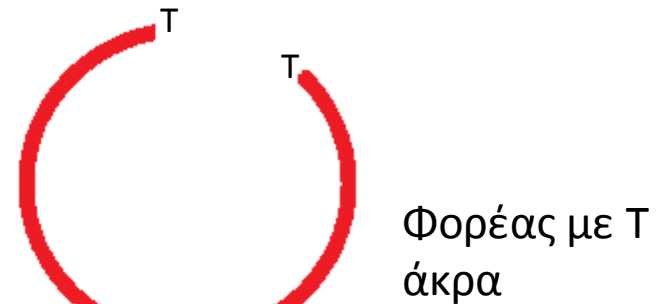
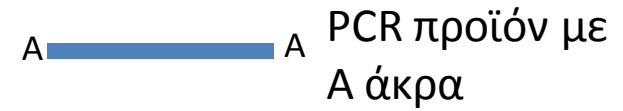


Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (14/15)

- Κλωνοποίηση
TA cloning



Προϊόν PCR

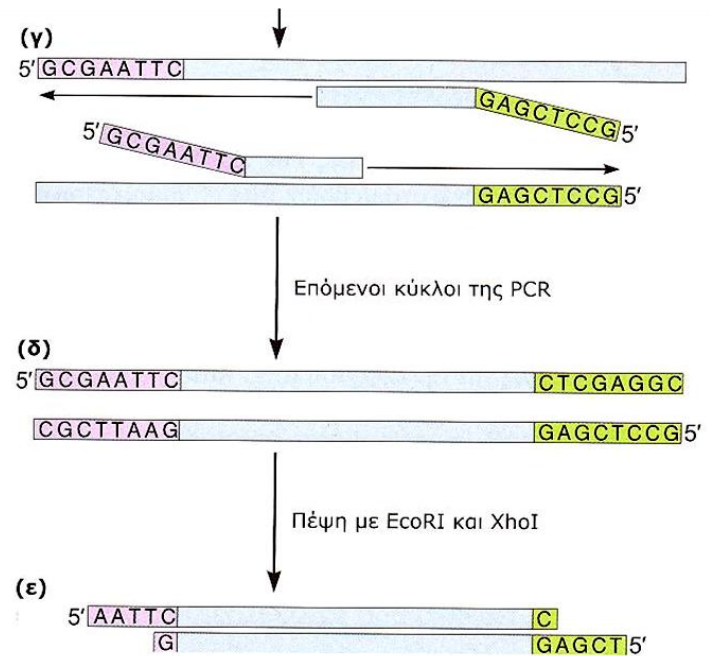
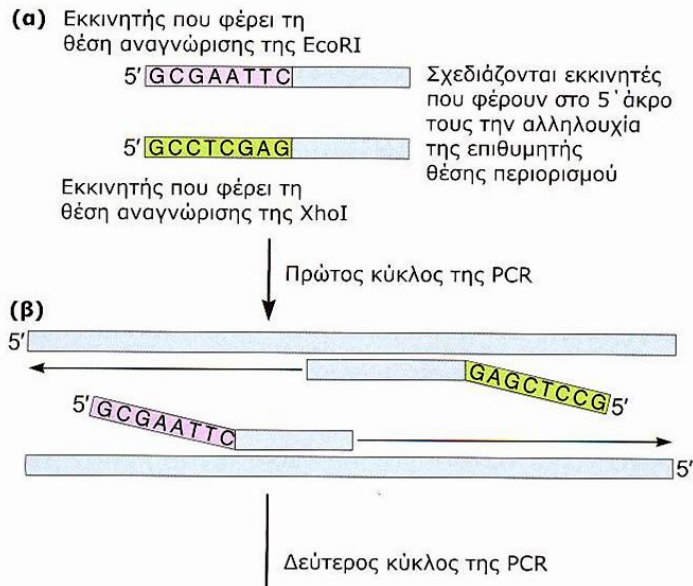


Σύνδεση με κατάλληλο
φορέα



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (15/15)

• Κλωνοποίηση



Εικόνα 4: Προσθήκη περιοριστικής θέσης στα άκρα των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

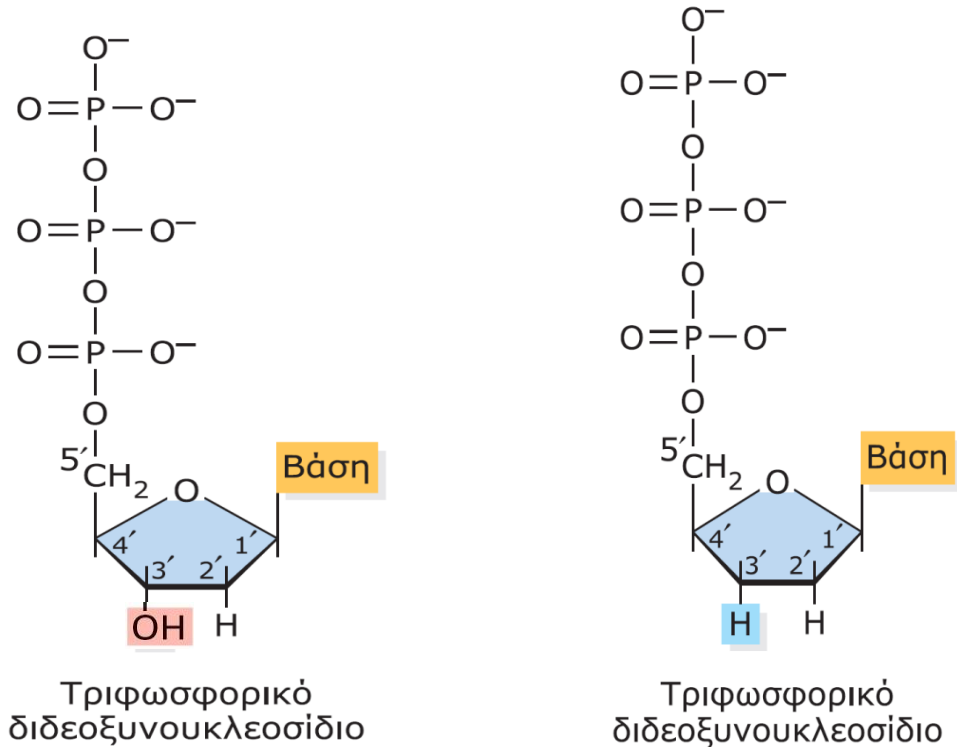


Αλληλούχηση DNA

- **Αναγνώριση αλληλουχίας των βάσεων** συγκεκριμένης DNA ακολουθίας
Σύγκριση με συγγενικές ακολουθίες
Φυλογενετικές αναλύσεις
- **Αναγνώριση πιθανού γονιδίου σε κάποια άγνωστη ακολουθία**
- **Αναγνώριση μεταλλάξεων σε συγκεκριμένο γονίδιο**



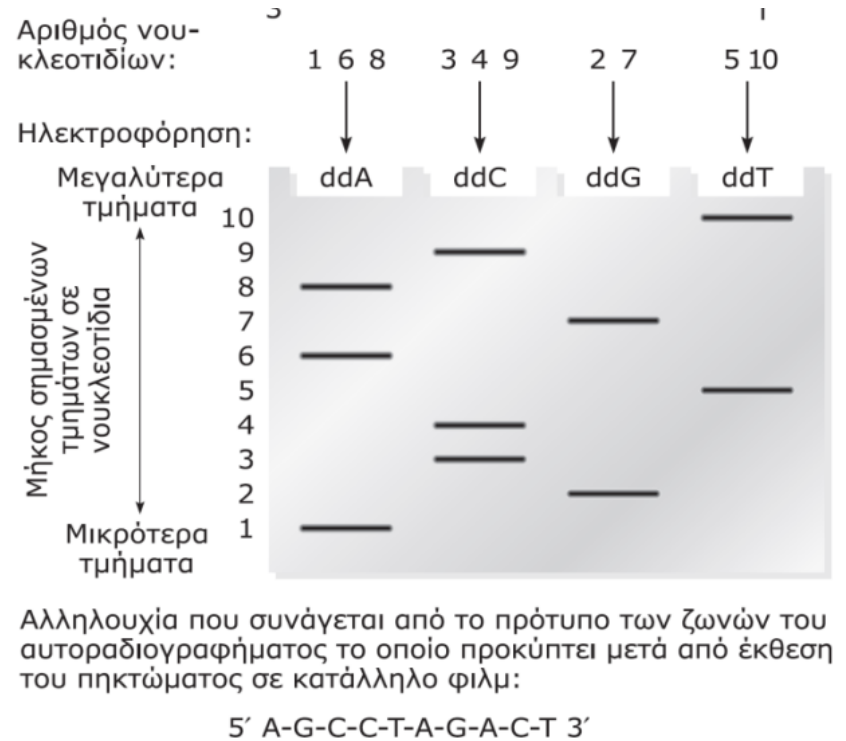
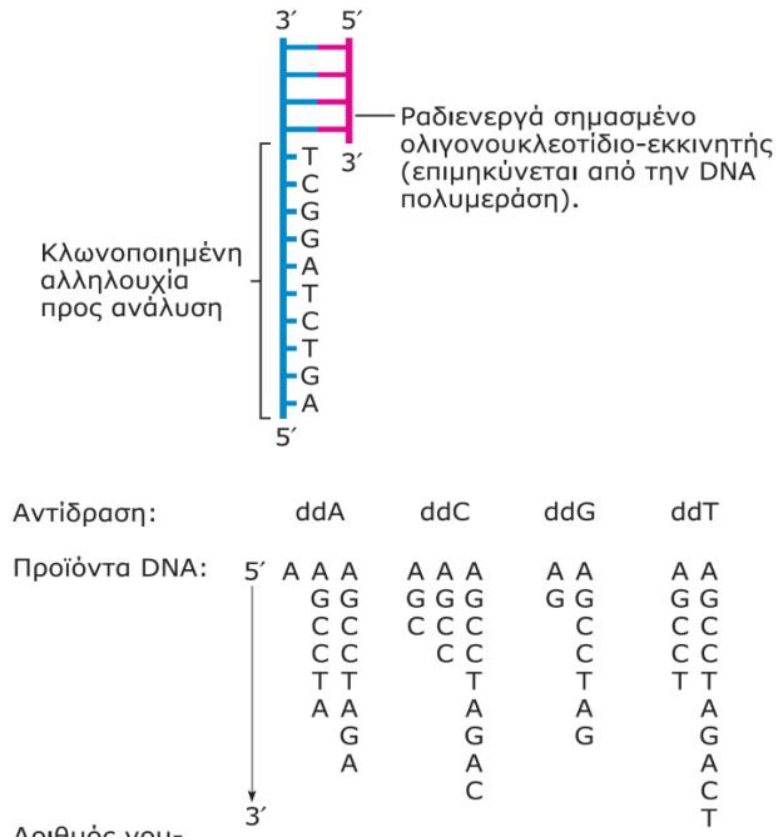
Μέθοδος Sanger (1/5)



Εικόνα 5: Δομή του τριφωσφορικού δεοξυνουκλεοσιδίου και του τριφωσφορικού διδεοξυνουκλεοσιδίου



Μέθοδος Sanger (2/5)



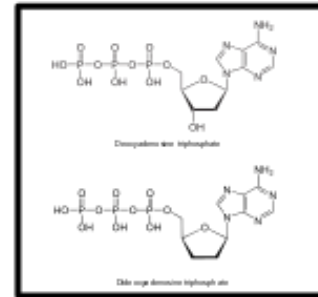
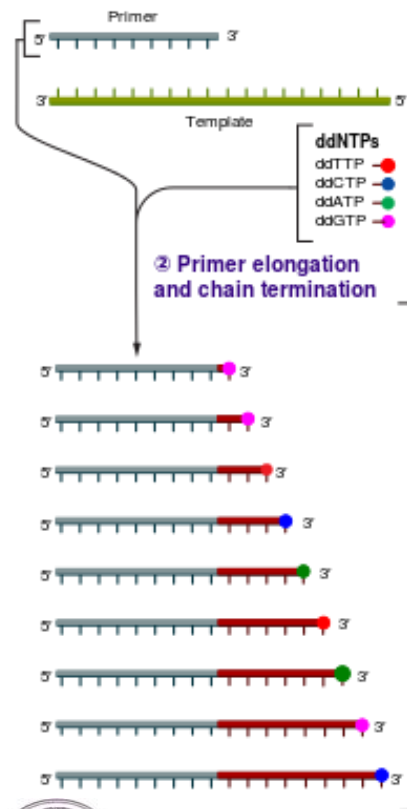
Εικόνα 6: Αλληλούχιση με τη μέθοδο Sanger



Μέθοδος Sanger (4/5)

1 Reaction mixture

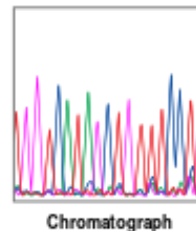
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



3 Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



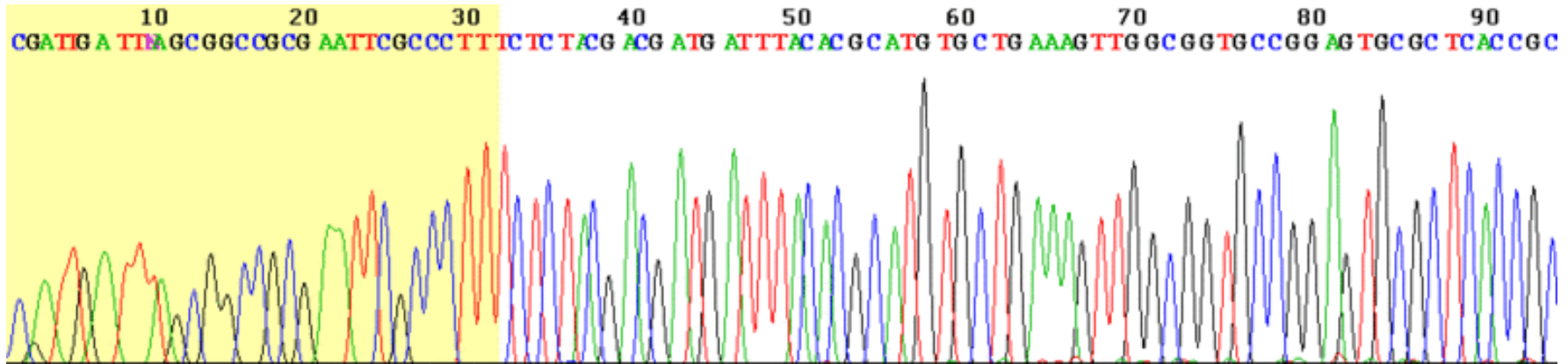
4 Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



Εικόνα 8: Αλληλούχιση με τη μέθοδο Sanger σε αυτόματο αναλυτή



Μέθοδος Sanger (5/5)



Εικόνα 9: Αποτελέσματα αλληλούχισης κατά Sanger.

by Loris, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger_sequencing_read_display.gif



«Πυροαλληλούχιση» DNA (Pyrosequencing - Next generation sequencing)

Μέθοδος ανάλυσης πρωτοταγούς αλληλουχίας DNA
με άμεση αναγνώριση-ανάγνωση

- Κατακερματισμός των μορίων DNA σε μικρά κομμάτια-μετουσίωση
- Σύνδεση των κομματιών με oligo-adaptors
- Σύνδεση των κομματιών σε ειδικά σφαιρίδια
- Τοποθέτηση σφαιριδίων σε ειδικές μήτρες
- Ενίσχυση με PCR

<http://genomesequense.blogspot.gr/2012/04/different-platforms-of-sequencingpart.html>



«Πυροαλληλούχιση» DNA (Pyrosequencing)

- Σε κάθε υποδοχή προστίθεται:
 - DNA polymerase
 - adenosine phosphosulfate (APS)
 - ATP sulfurylase
 - luciferin
 - luciferase
- Ανίχνευση φωτός από ειδικό ανιχνευτή
- Καταστροφή ελεύθερων νουκλεοτιδίων
- Διαδοχική προσθήκη κάθε νουκλεοτιδίου
- Μεταφορά δεδομένων σε υπολογιστή



Illumina sequencing

Illumina

- 2007
- Μήκος ανάγνωσης: 45 βάσεις

http://res.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf



Ταχύτητα
 10^6 bps σε λίγες ώρες!!!!

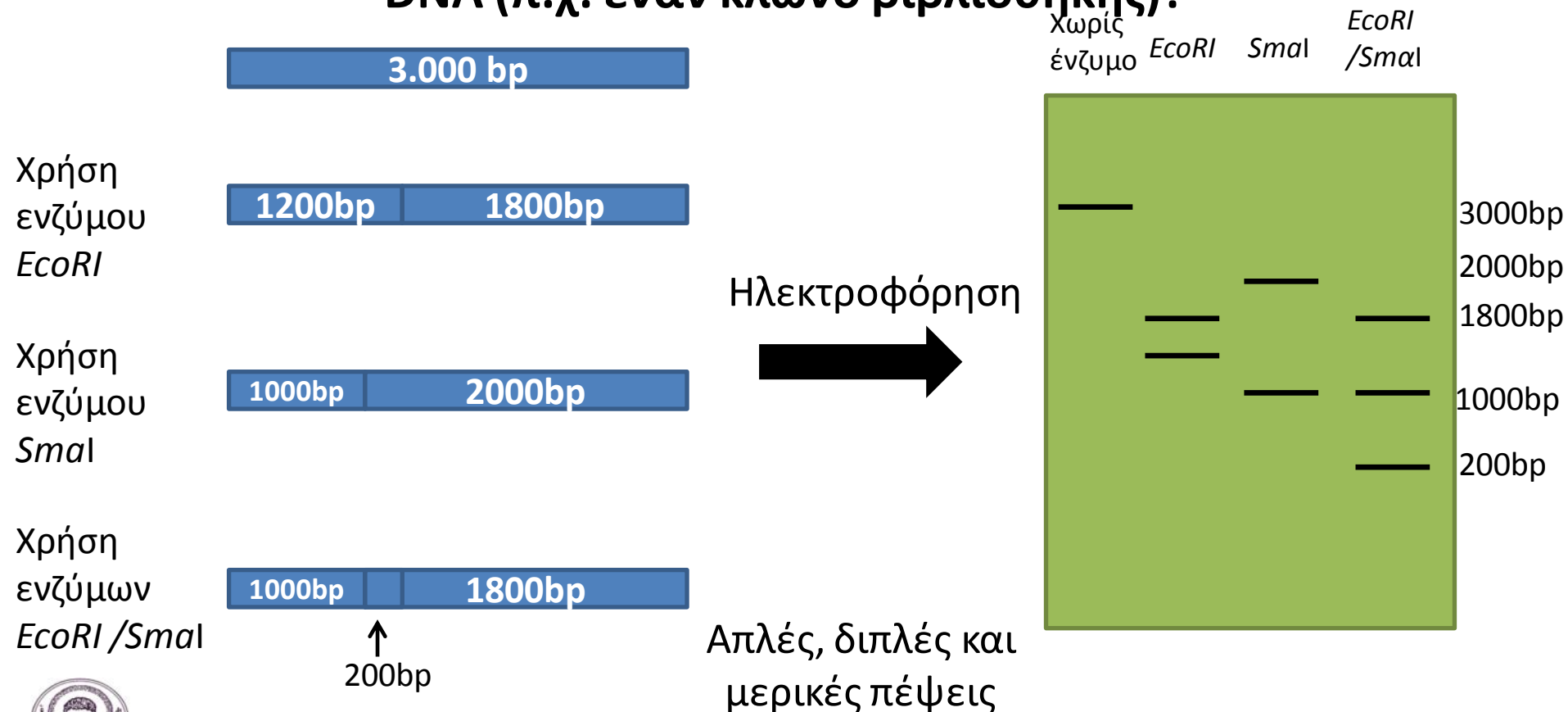
Μείωση κόστους
1000\$/genome



Μελέτη θέσης αλληλουχιών

Χαρτογράφηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Πως θα προσδιορίσουμε τη θέση ενός γονιδίου σε ένα μόριο DNA (π.χ. έναν κλώνο βιβλιοθήκης)?



Μελέτη θέσης αλληλουχιών Υβριδισμός κατά Southern (1/5)

1 Γονιδιωματικό DNA.

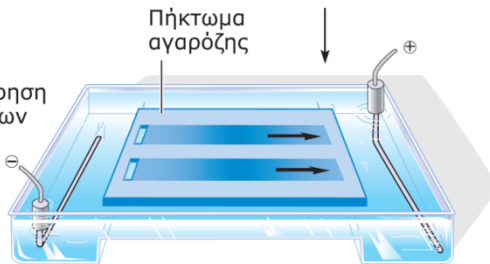


Πέψη με ένζυμο περιορισμού

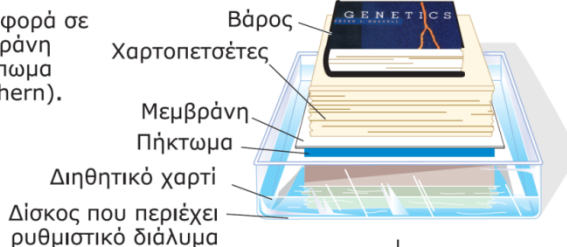
2 Τμήματα περιορισμού ποικίλων μεγεθών.



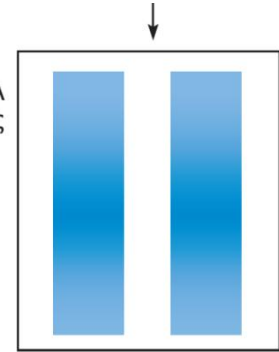
3 Ηλεκτροφόρηση των τμημάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.



4 Μεταφορά σε μεμβράνη (στύπωμα Southern).



5 Μεταφορά των τμημάτων DNA στη μεμβράνη. Η διάταξή τους είναι ακριβώς ίδια με αυτή που είχαν στο πήκτωμα.



Υβριδοποίηση με σημασμένο ιχνηθέτη

6 Τα τμήματα DNA που είναι συμπληρωματικά με τον ιχνηθέτη καθίστανται ορατά μετά από αυτοραδιογραφία (ή με άλλη μέθοδο, ανάλογα με τον τρόπο σήμανσης του ιχνηθέτη).



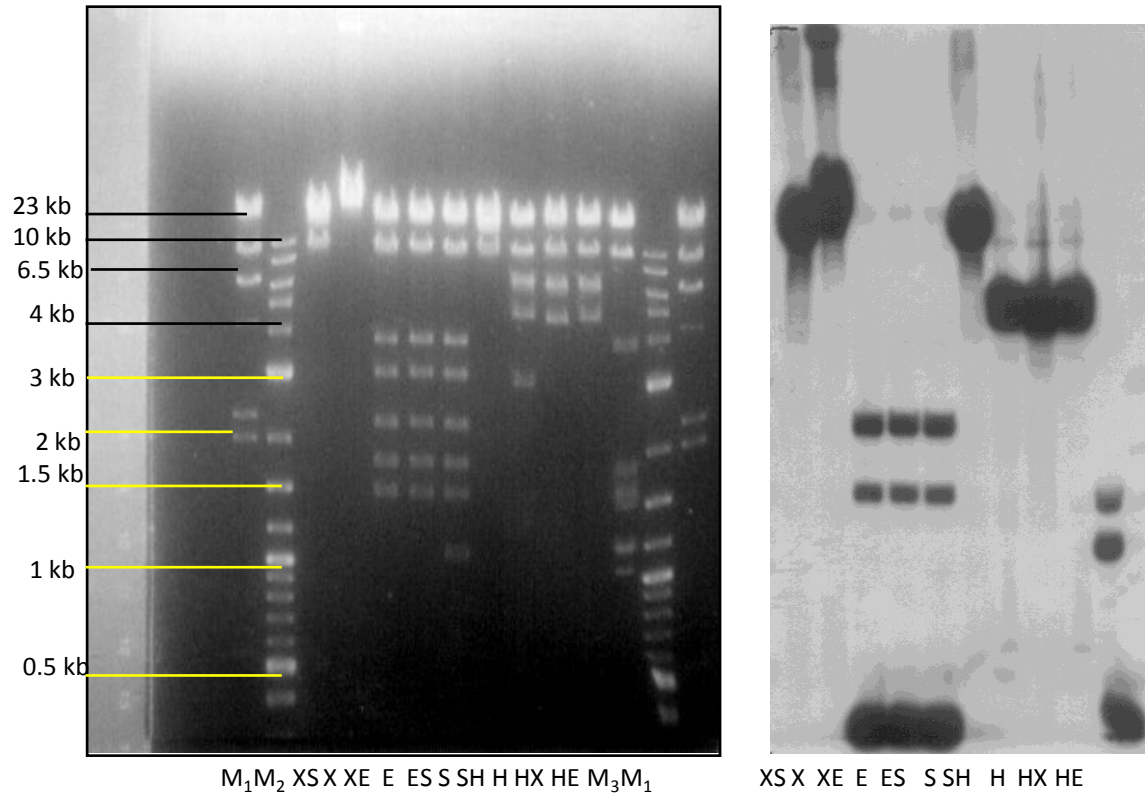
Εικόνα 10: Ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA με σκοπό τον εντοπισμό αλληλουχιών συμπληρωματικών προς ένα σημασμένο ιχνηθέτη



Μελέτη θέσης αλληλουχιών

Υβριδισμός κατά Southern (2/5)

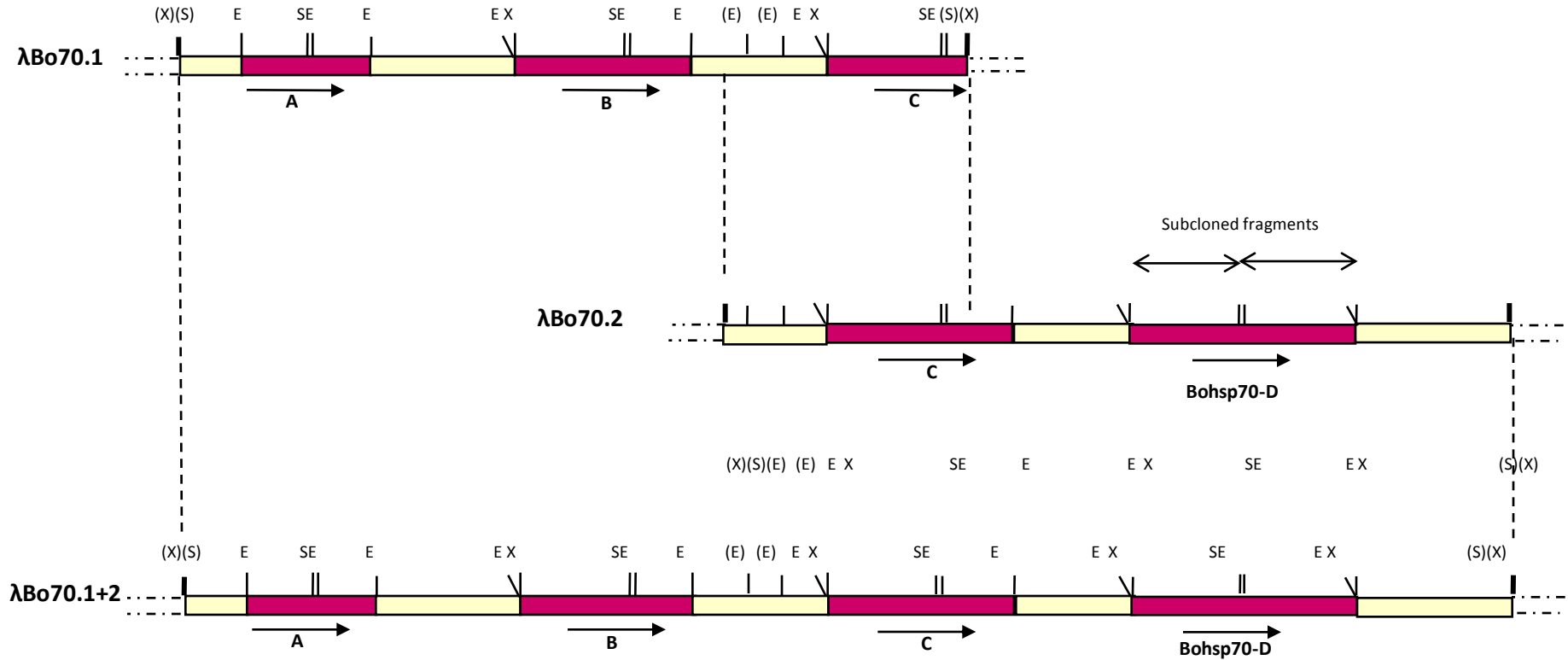
- Απομόνωση DNA
- Πέψεις
- Μεταφορά σε μεμβράνη
- Υβριδισμός
- Αυτοραδιογραφία
- Αναγνώριση επιθυμητών τμημάτων



Εικόνα 11: Ανάλυση κλώνων από γονιδιωματική βιβλιοθήκη



Μελέτη θέσης αλληλουχιών Υβριδισμός κατά Southern (3/5)

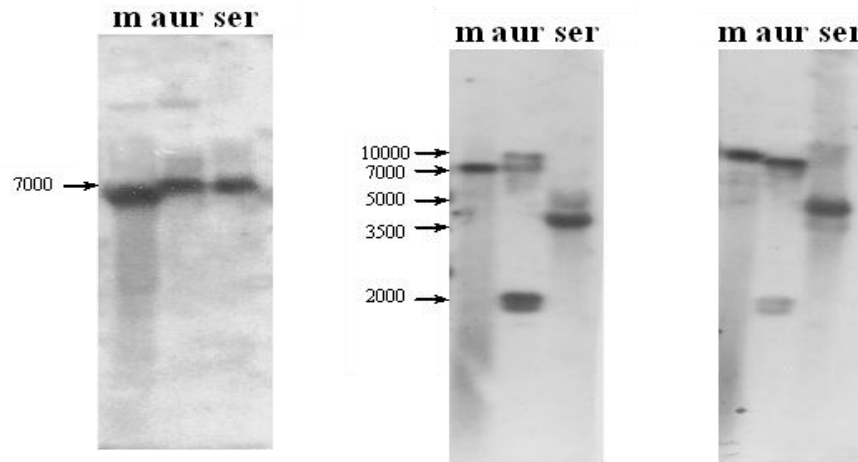
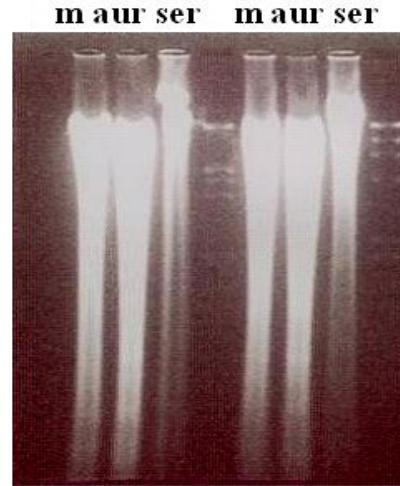


Εικόνα 12: Χάρτης κλώνων από γονιδιωματική βιβλιοθήκη



Μελέτη θέσης αλληλουχιών Υβριδισμός κατά Southern (4/5)

Ανάλυση
γονιδιωματικού
DNA



Εικόνα 13: Ανίχνευση
γονιδιακών αλληλουχιών
σε γονιδιωματικό DNA
εντόμων



Μελέτη θέσης αλληλουχιών Υβριδισμός κατά Southern (5/5)

- Αναγνώριση **μεγέθους γονιδιωματικού τμήματος** που περιέχει το γονίδιο - Δυνατότητα απομόνωσης και κλωνοποίησης
- Ανίχνευση **αριθμού γονιδίων σε ένα δείγμα-είδος**
- Ανίχνευση προτύπου **ομόλογων γονιδίων σε διαφορετικά δείγματα-είδη**
- **Ανακάλυψη μεταλλαγών – Διάγνωση ασθενειών**
Ελλείματα ή προσθήκες
Αλλαγές βάσεων που αλλάζουν θέσεις αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού



Μελέτη θέσης αλληλουχιών Υβριδισμός *in situ* (1/3)

Χρήση επισημασμένων νουκλεοτιδικών ανιχνευτών για εντοπισμό αλληλουχιών «επί τόπου» (*in situ*).

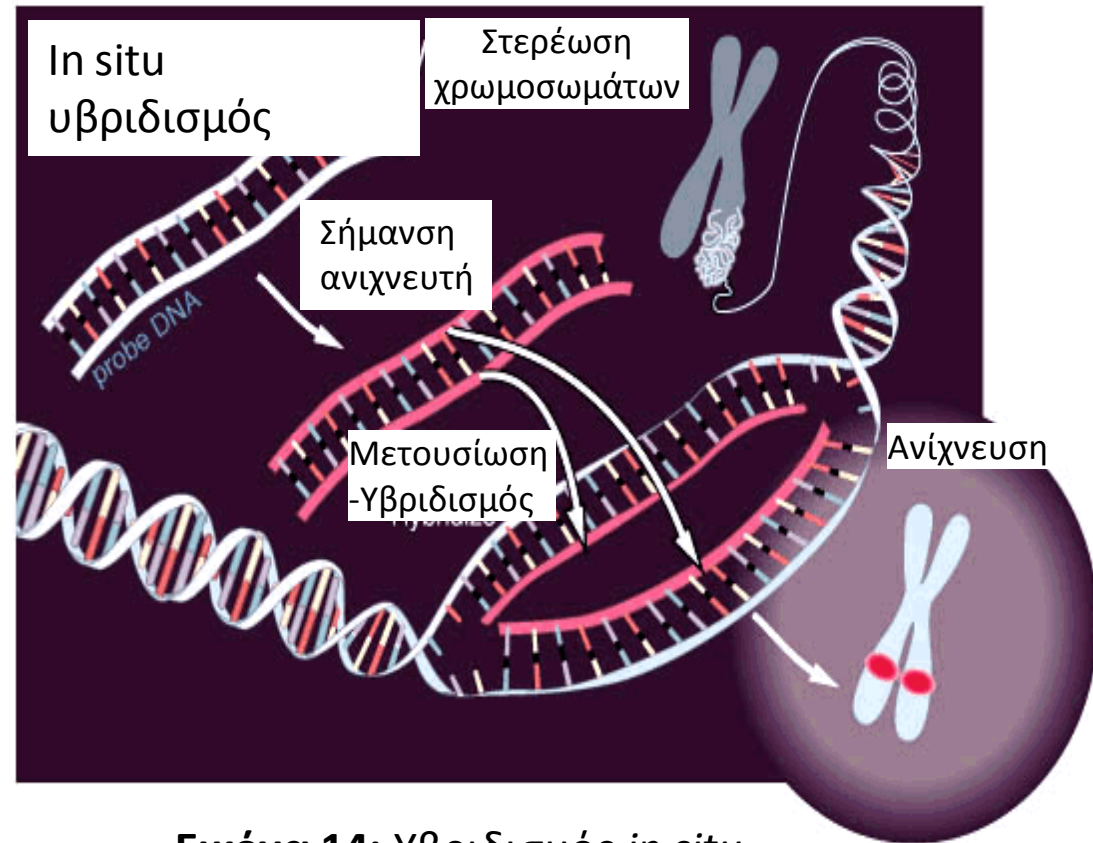
- Χρωμοσώματα
- Ιστός
- Άτομο



Μελέτη θέσης αλληλουχιών Υβριδισμός *in situ* (2/3)

1960, Mary Lou Pardue, πολυταινικά χρωμοσώματα

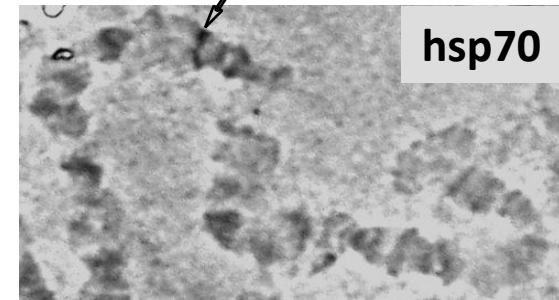
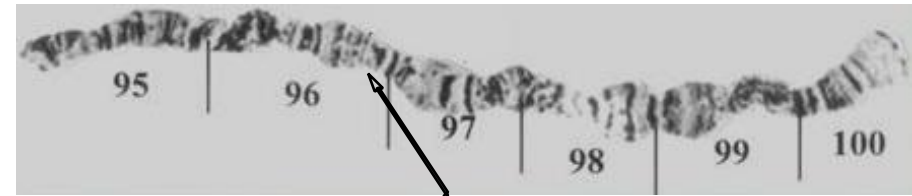
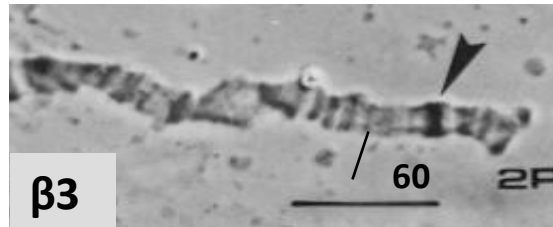
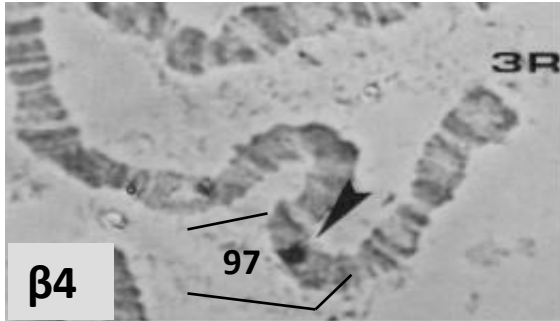
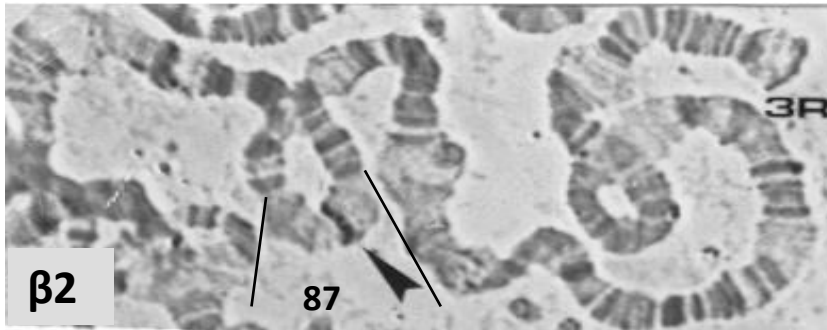
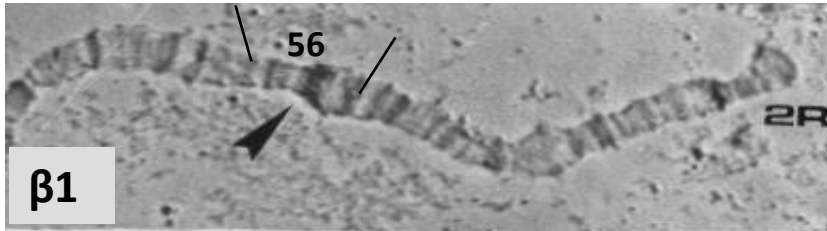
- Στερέωση και μετουσίωση χρωμοσωμάτων σε αντικειμενοφόρους
- Υβριδισμός με σημασμένη ακολουθία-ανιχνευτή
- Ανίχνευση των υβριδίων μορίων
- Άμεσος εντοπισμός της χρωμοσωματικής θέσης της ακολουθίας



Εικόνα 14: Υβριδισμός *in situ*



Μελέτη θέσης αλληλουχιών Υβριδισμός *in situ* (3/3)



Εικόνα 15: Εντοπισμός
γονιδιακών θέσεων σε
πολυταινικά
χρωμοσώματα εντόμων

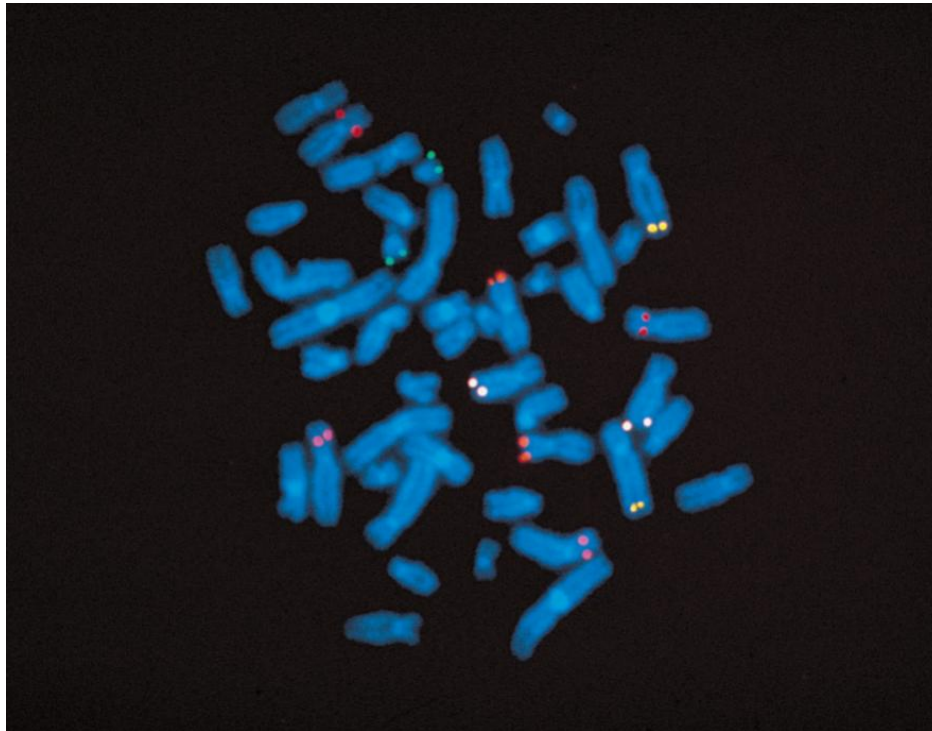


Μελέτη θέσης αλληλουχιών FISH - *in situ* υβριδισμός φθορισμού (1/3)

- Υβριδισμός μεταφασικών χρωσωμάτων με ακολουθίες επισημασμένες με φθορίζουσες χρωστικές
- Μικροσκοπική παρατήρηση σε υπεριώδες (UV)
- Εντοπισμός φθορισμού
 - **Ανίχνευση αριθμητικών χρωσωματικών ανωμαλιών και αναδιατάξεων**
 - **Χρωσωματικός χρωματισμός (Chromosome painting)**



Μελέτη θέσης αλληλουχιών FISH - *in situ* υβριδισμός φθορισμού (2/3)

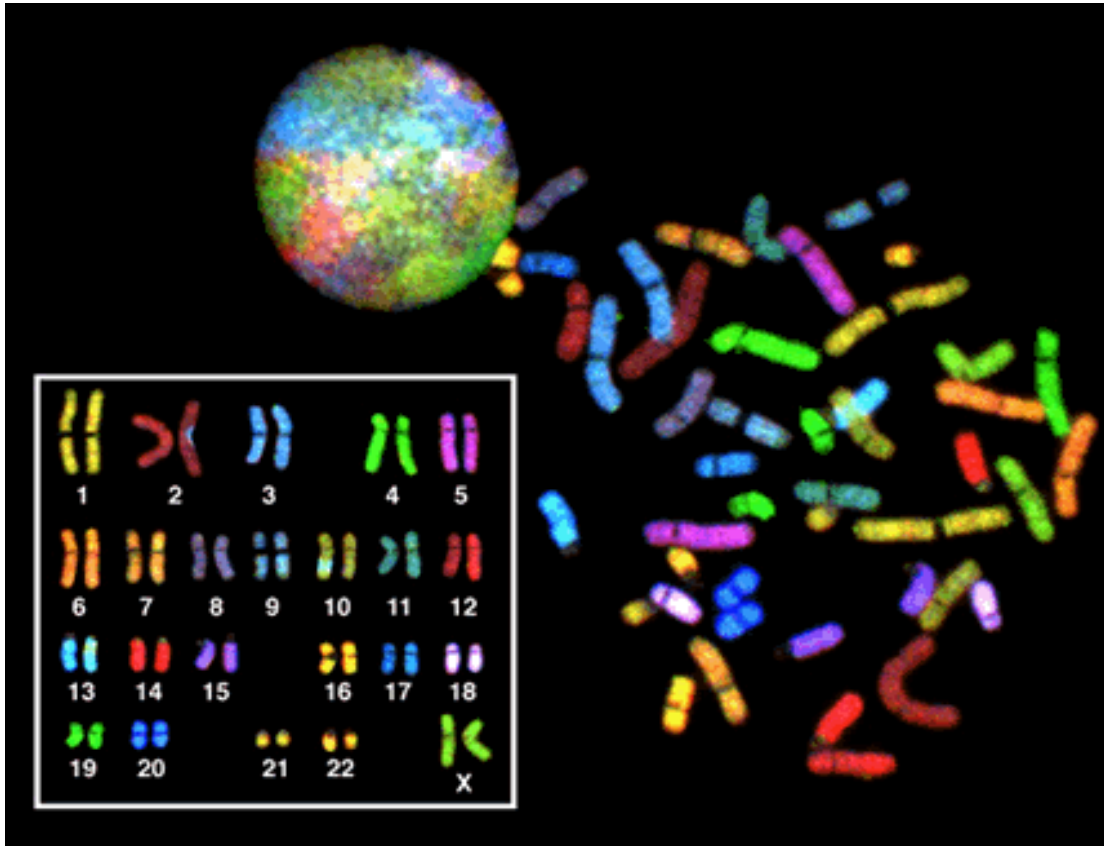


Εικόνα 16: Τεχνική FISH



Μελέτη θέσης αλληλουχιών

FISH - *in situ* υβριδισμός φθορισμού (3/3)

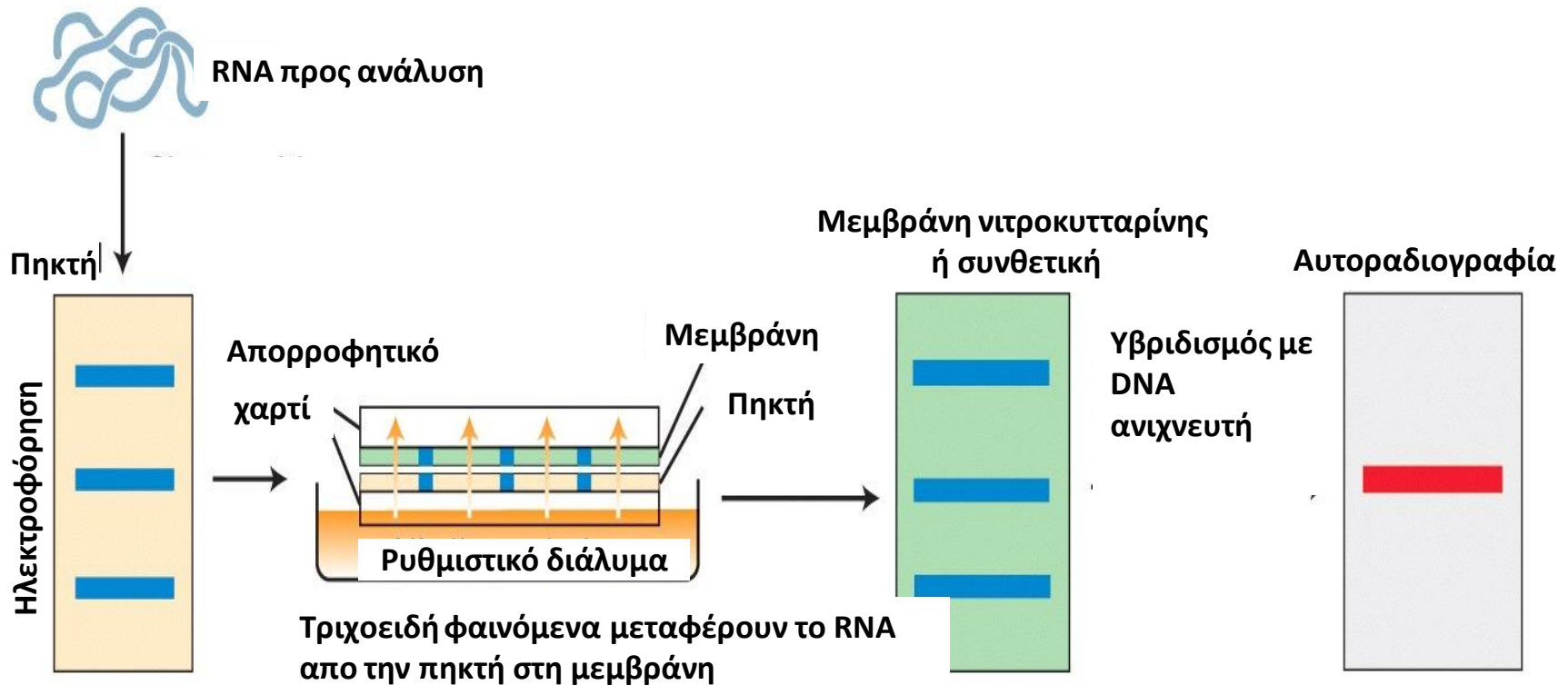


Εικόνα 17: SKY Φασματικός καρυότυπος (spectral karyotyping)



Μελέτη έκφρασης γονιδίων

Υβριδισμός κατά Northern (1/2)



Εικόνα 18: Ανάλυση κατά Northern



Μελέτη έκφρασης γονιδίων

Υβριδισμός κατά Northern (2/2)

- **Αναγνώριση μεταγραφήματος** συγκεκριμένου γονιδίου σε κάποιο ιστό
- **Αναγνώριση μεταγραφήματος** συγκεκριμένου γονιδίου σε συγκεκριμένες συνθήκες
- **Ποσοτική εκτίμηση επαγωγής-μεταγραφής**
- **Αναγνώριση μεταλλαγών** ως προς το μέγεθος και την ποσότητα του παραγόμενου mRNA



Μελέτη έκφρασης γονιδίων RNA-DNA Υβριδισμός *in situ*

Αναπτυξιακή μελέτη έκφρασης γονιδίου

- Επεξεργασία, στερέωση ιστού-εμβρύου
- Υβριδισμός με σημασμένη ακολουθία-ανιχνευτή
- Ανίχνευση των υβριδίων μορίων
- Άμεσος εντοπισμός της θέσης έκφρασης της ακολουθίας



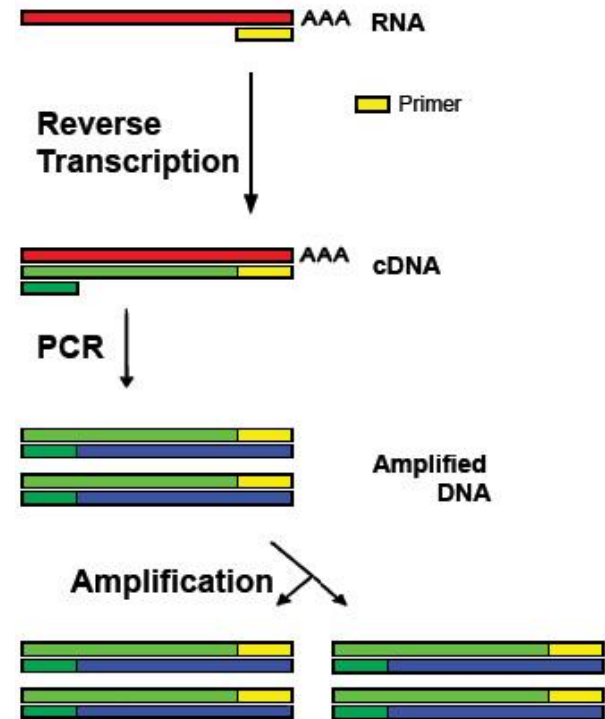
Μελέτη έκφρασης γονιδίων

Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)

RT PCR

Φτιάχνεις cDNA αντίγραφο της RNA ακολουθίας

Ενισχύεις με PCR το cDNA



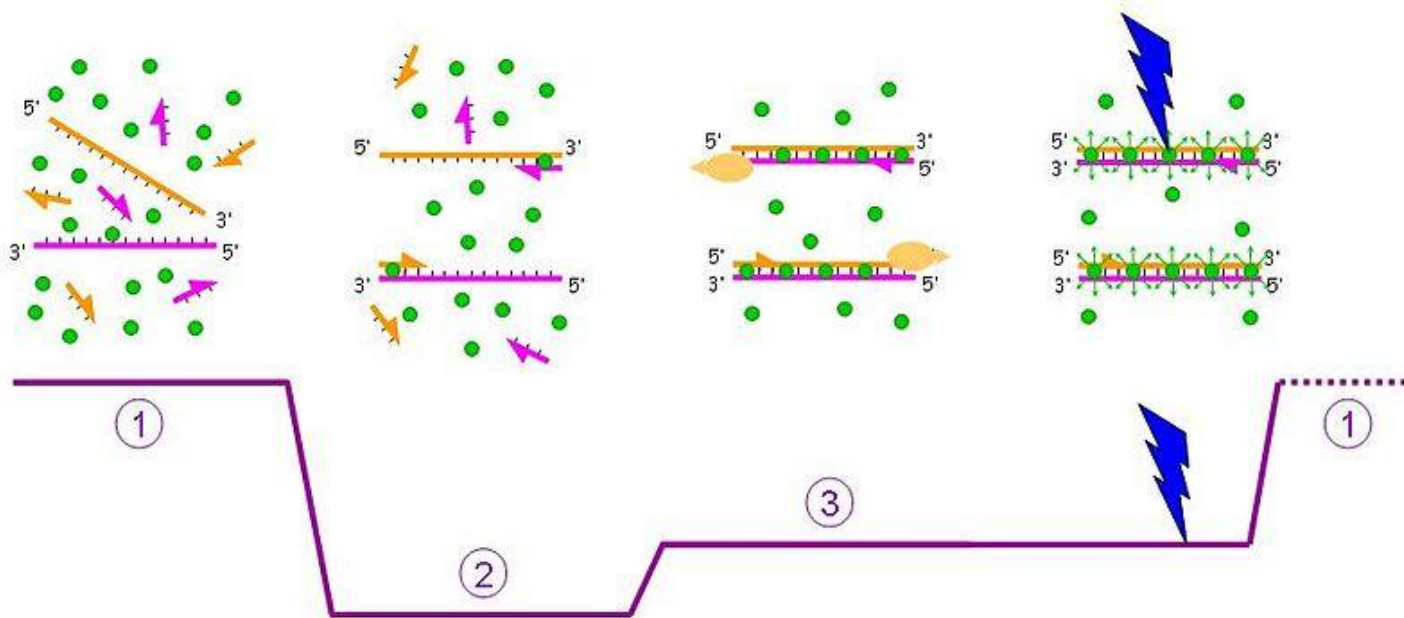
Εικόνα 19: Reverse transcription polymerase chain reaction



Μελέτη έκφρασης γονιδίων

Real-time PCR (1/3)

Real-time PCR (Q-PCR)

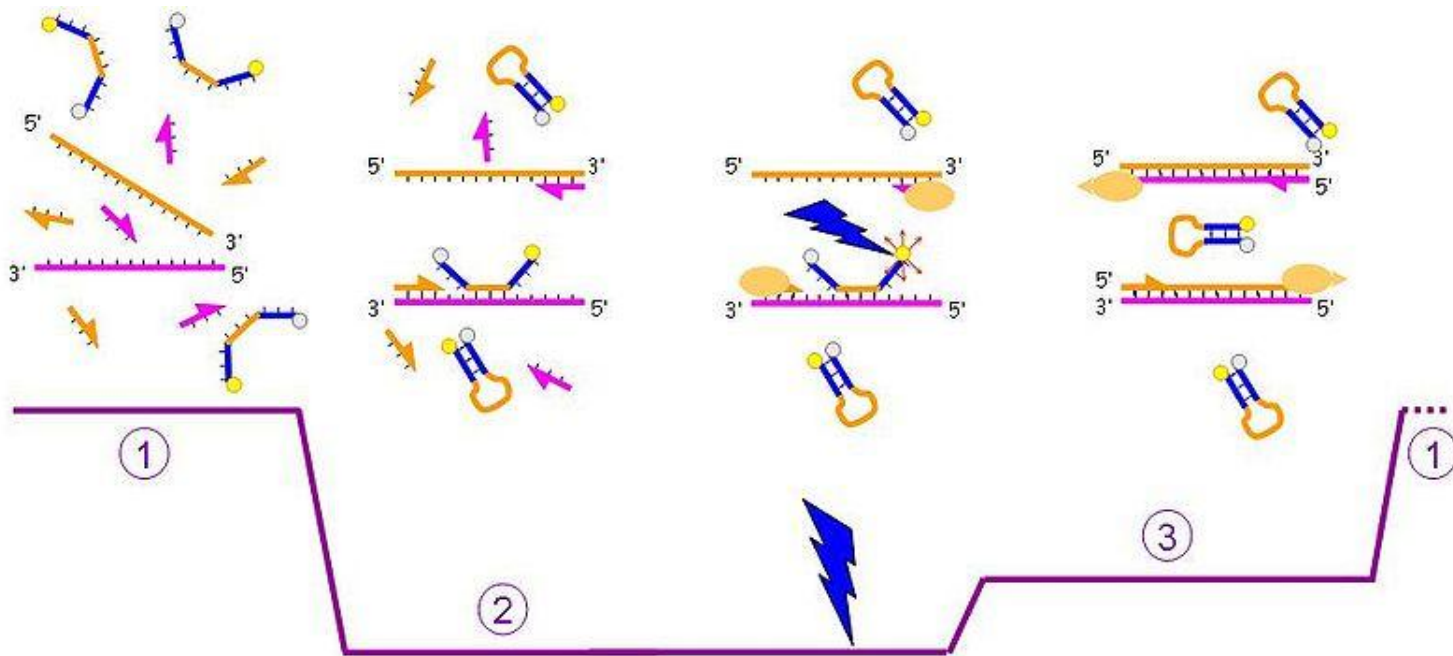


Εικόνα 20: Real-time PCR με SYBR Green I.



Μελέτη έκφρασης γονιδίων

Real-time PCR (2/3)



Εικόνα 21: Real-time PCR με μοριακό φάρο.



Μελέτη έκφρασης γονιδίων

Real-time PCR (3/3)

➤ Έρευνα

Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίων

➤ Μοριακή διάγνωση

Ποσοτικοποίηση μολυσματικών παραγόντων



Μεταλλαξιγένεση *in vitro* (1/7)

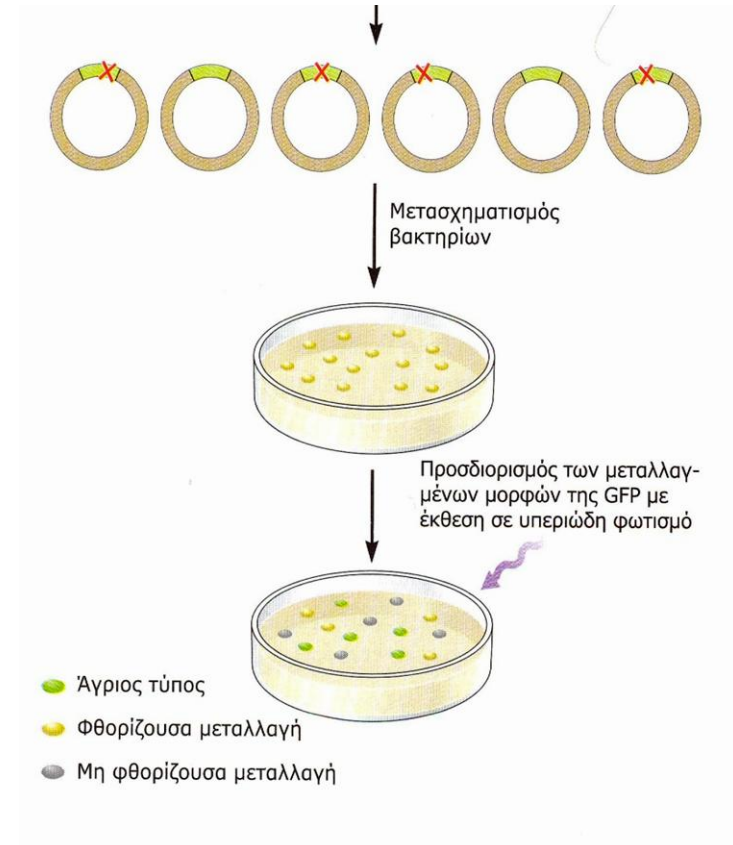
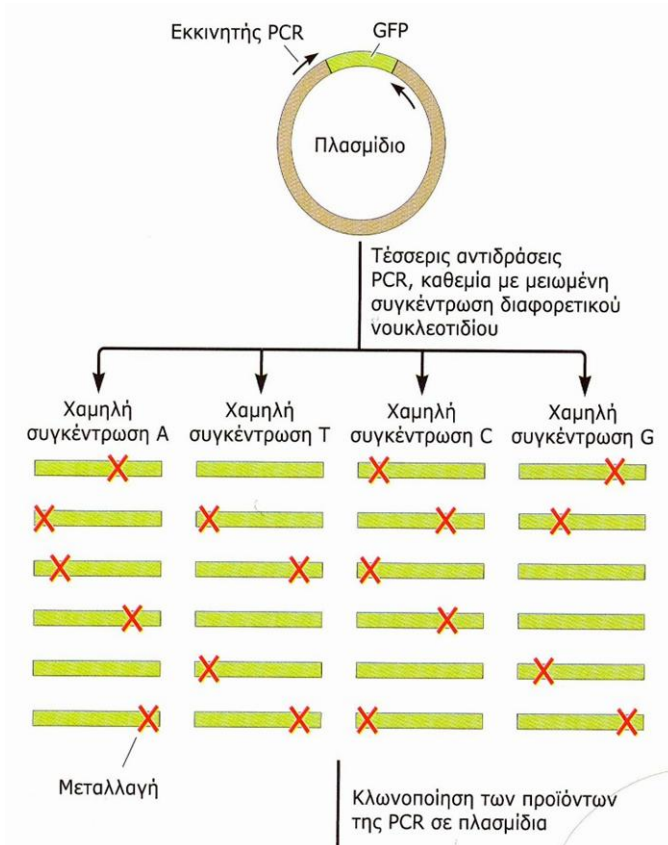
- ✓ Προκαλείται αλλαγή στην αλληλουχία κάποιου γονιδίου, με σκοπό να παρατηρηθούν οι επακόλουθες αλλαγές στη λειτουργία του.
- ✓ Εξαγωγή συμπερασμάτων για τη λειτουργικότητα κάθε περιοχής-θέσης.

Τυχαία μεταλλαξιγένεση

Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση



Μεταλλαξιγένεση *in vitro* (2/7)



Εικόνα 22: Τυχαία μεταλλαξιγένεση ενός συγκεκριμένου γονιδίου και επιλογή των μεταλλαγμένων μορφών του.



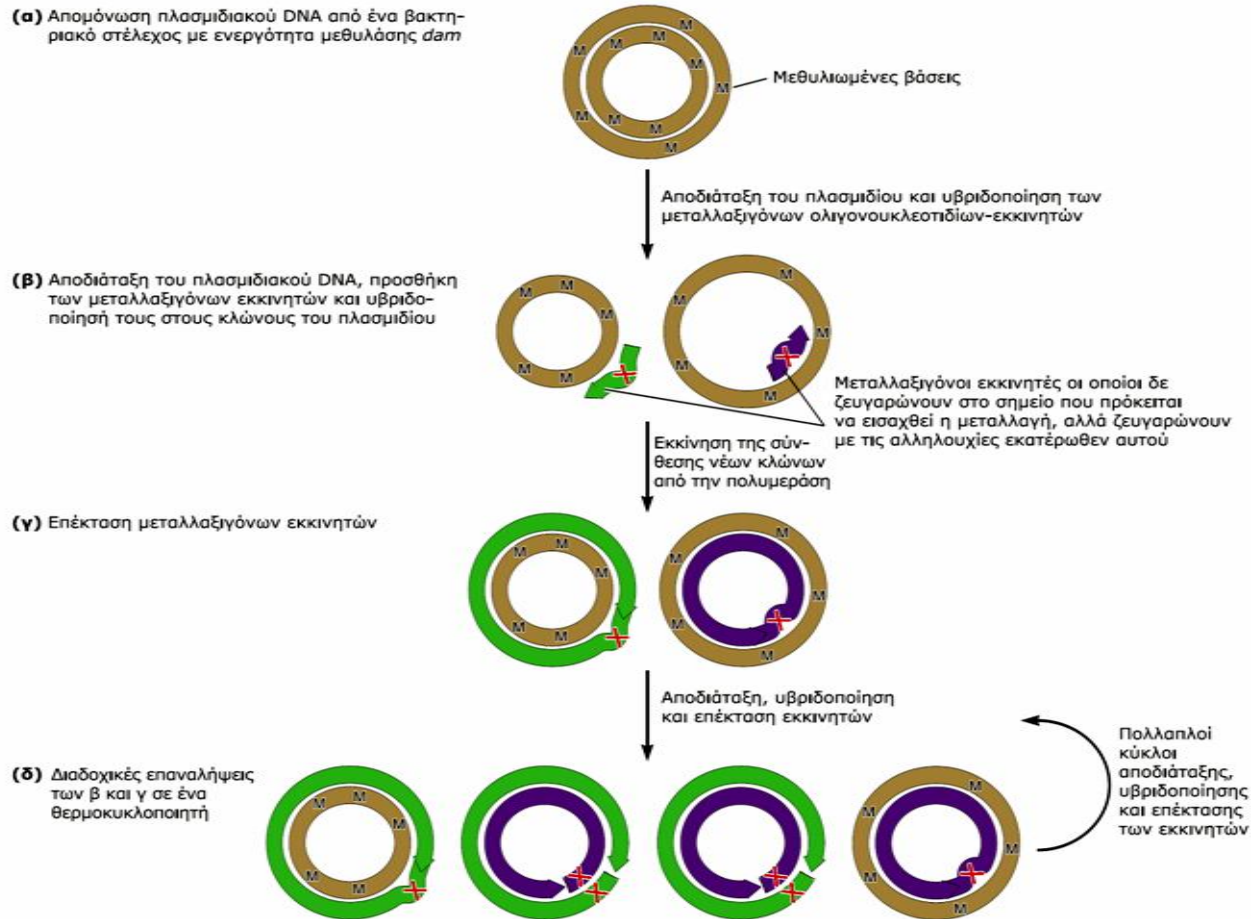
Μεταλλαξιγένεση *in vitro* (3/7)

Τυχαία μεταλλαξιγένεση: επιτρέπει τον προσδιορισμό των λειτουργικά σημαντικών περιοχών

Λεπτομερής χαρακτηρισμός του λειτουργικού ρόλου επιμέρους αλληλουχίων απαιτεί πειράματα **Κατευθυνόμενης** μεταλλαξιγένεσης



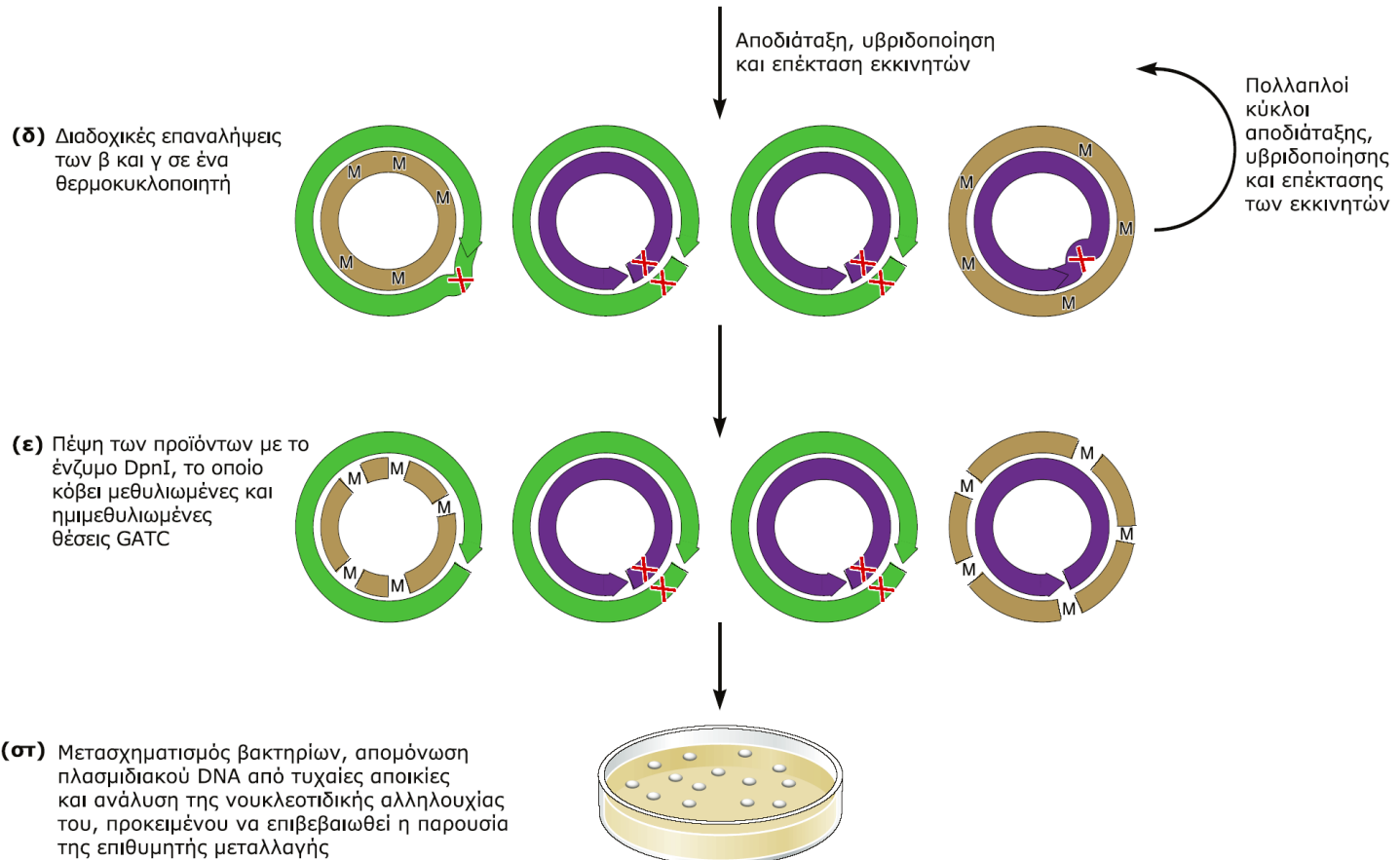
Μεταλλαξιγένεση *in vitro* (4/7)



Εικόνα 23α: Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω ολιγονουκλεοτιδίου.



Μεταλλαξιγένεση *in vitro* (5/7)



Εικόνα 23β: Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω ολιγονουκλεοτιδίου.



Μεταλλαξιγένεση *in vitro* (6/7)

Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

Ανάλυση με ελλείμματα

Αναγνώριση ρυθμιστικών περιοχών σε υποκινητές
ευκαρυωτικών γονιδίων



Μεταλλαξιγένεση *in vitro* (7/7)

Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

Ανάλυση με ελλείμματα

Αναγνώριση ρυθμιστικών περιοχών σε υποκινητές ευκαρυωτικών γονιδίων

Γονίδιο αναφοράς

- Φαινότυπος που δεν υπάρχει στον ξενιστή
- Εύκολα αναγνωρίσιμος
- Ποσοτικοποιήσιμος



Συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (1/6)

Οπερόνιο lac

- Καταστολέας Lac
- Χειριστής lacO
- Επαγωγέας (λακτόζη)

Οπερόνιο tet

- Καταστολέας Tet
- Χειριστής tetO
- Επαγωγέας (τετρακυκλίνη)



Συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (2/6)

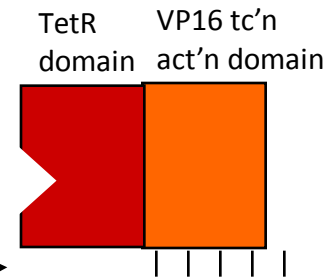
Σύστημα Tet-off/Tet-on

tTA = υβριδική πρωτεΐνη ενεργοποίησης:

tetR: περιοχή καταστολέα που δεσμεύεται
στο DNA

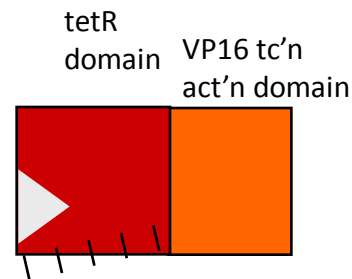
VP16 AD: τμήμα πρωτεΐνης ενεργοποίησης
της μεταγραφής

ΟΧΙ tet
Δέσμευση στον tet O



ενεργό

Παρουσία tet
Μη δέσμευση
στον tet O

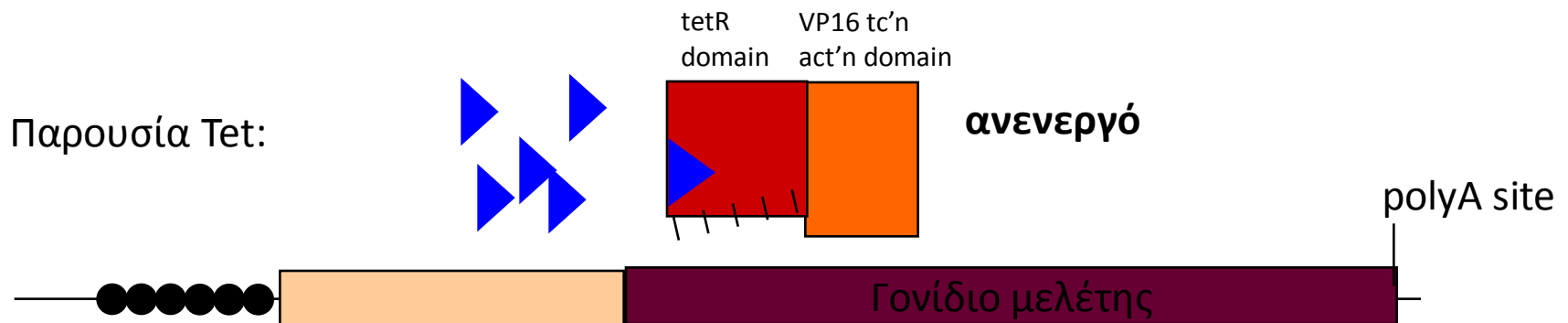


μη ενεργό



Συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (3/6)

Απουσία Tet: Σύστημα Tet-off/Tet-on



Συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (4/6)

Σύστημα Tet-off/Tet-on: tTA

Σύστημα Tet-on/Tet-off: rtTA

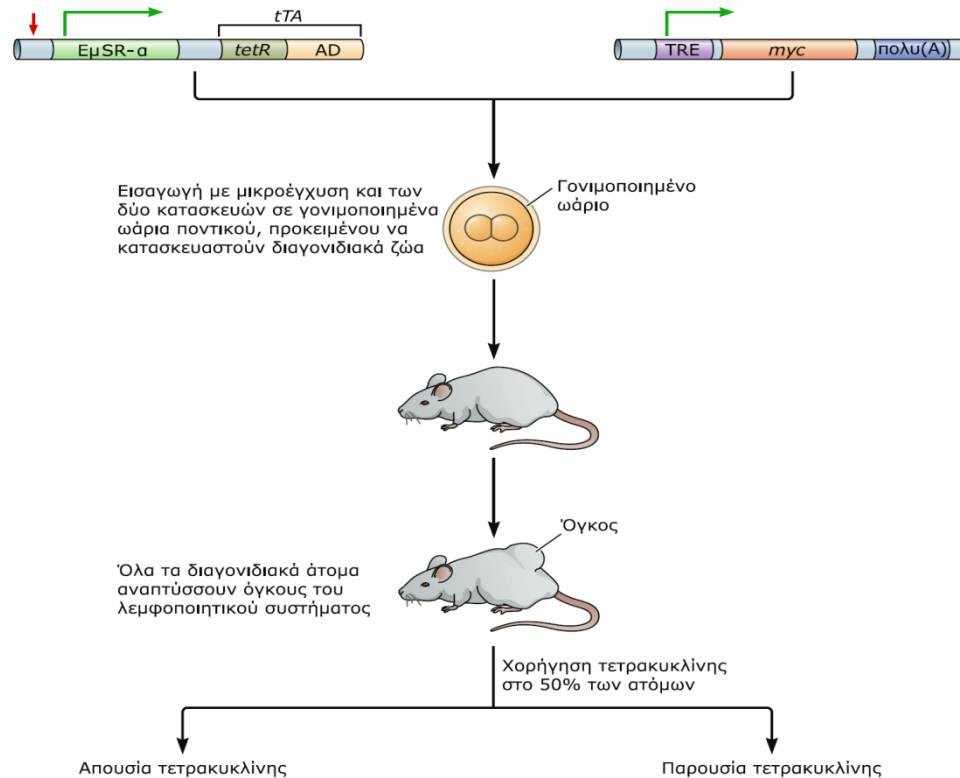
✓ Ανάπτυξη σε ζυμομύκητες, φυτά και ζώα



Συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (5/6)

Η πρωτεΐνη tTA υπό τον έλεγχο του υποκινητή ΕμSR-α, που είναι ενεργός μόνο στα κύτταρα Β

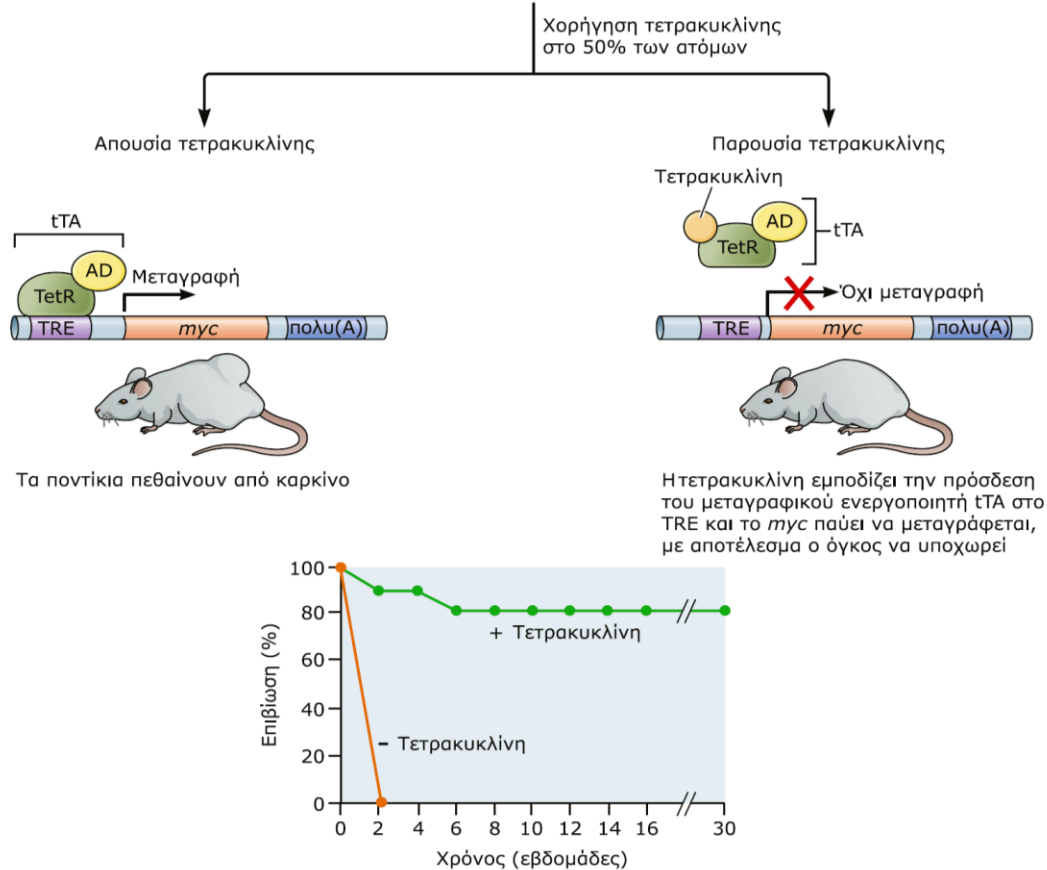
Το ογκογονίδιο *myc* υπό τον έλεγχο στοιχείων TRE



Εικόνα 24α: Σύστημα Tet-off/Tet-on. Χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν η συνεχής έκφραση του *myc* είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ανάπτυξης ενός όγκου.



Συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (6/6)



Εικόνα 24β: Σύστημα Tet-off/Tet-on. Χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν η συνεχής έκφραση του *myc* είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ανάπτυξης ενός όγκου.



Μεταφορά γονιδίων σε κύτταρα

Βακτήρια

μετασχηματισμός

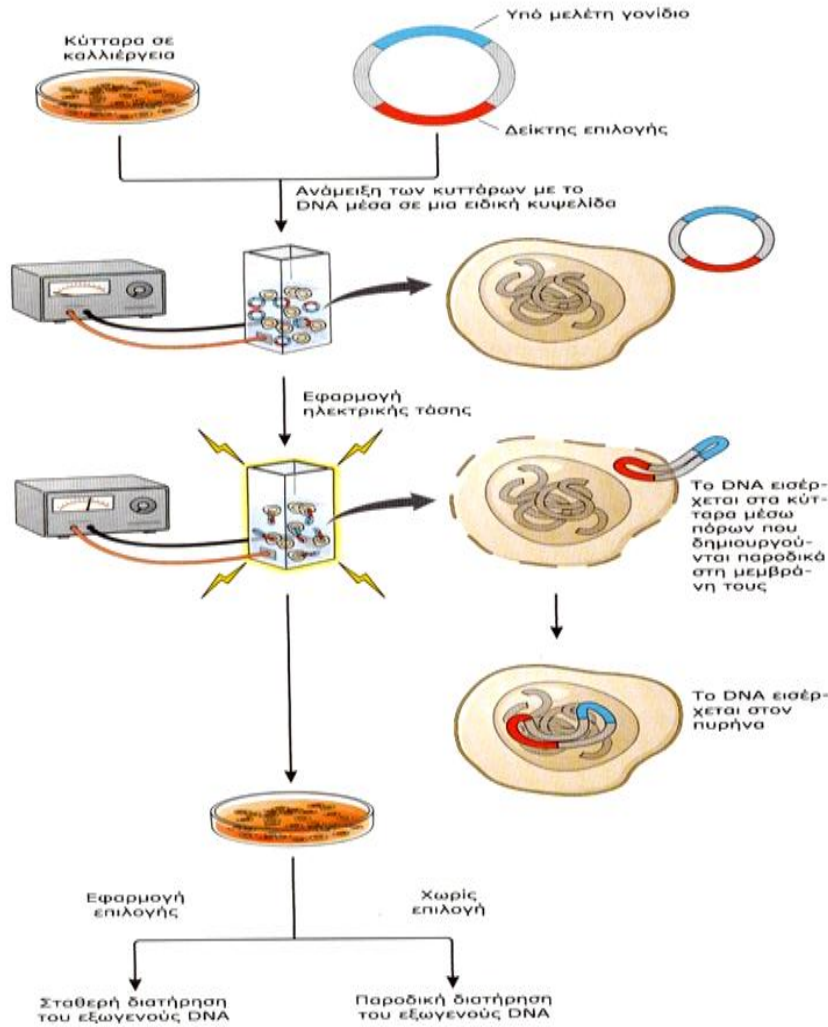
φάγοι

Ευκαρυώτες

- σύμπλοκο DEAE- δεξτράνης
- ίζημα με φωσφορικό ασβέστιο
- μικροέγχυση



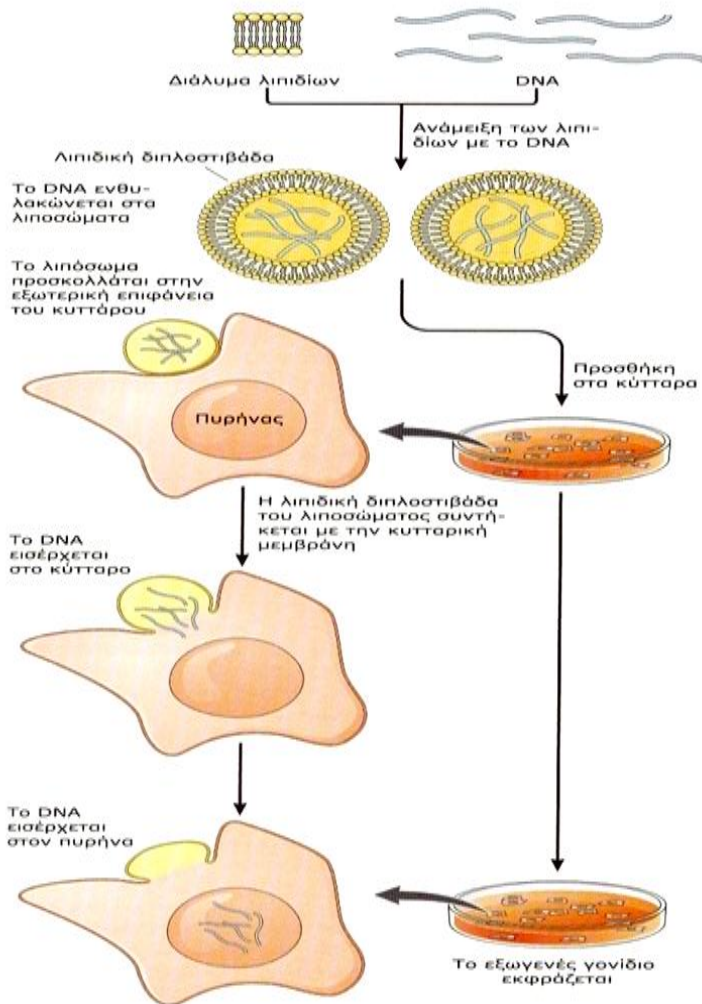
Μεταφορά γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα (1/7)



Εικόνα 25: Μεταφορά γονιδίων με ηλεκτροδιάτρηση.



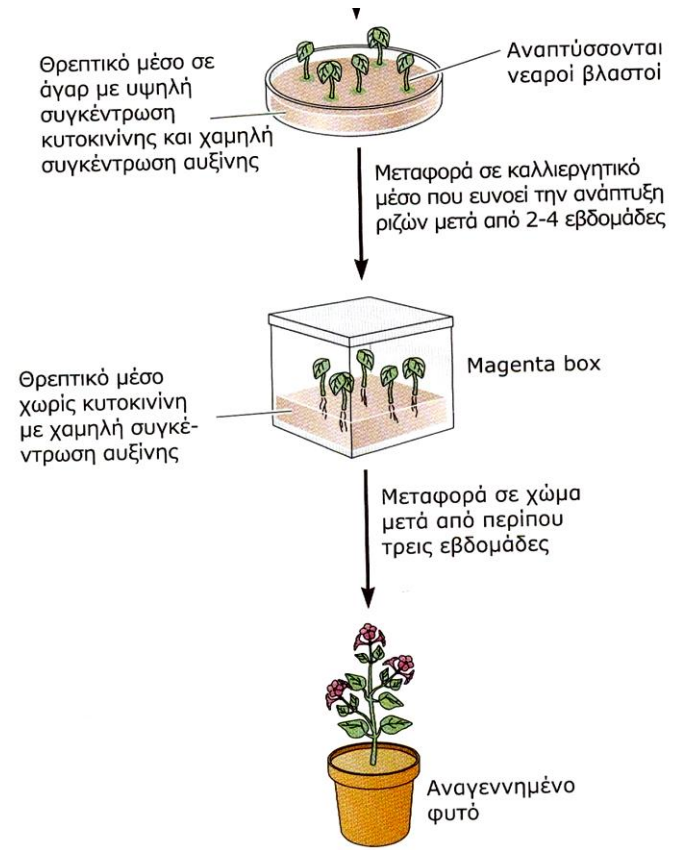
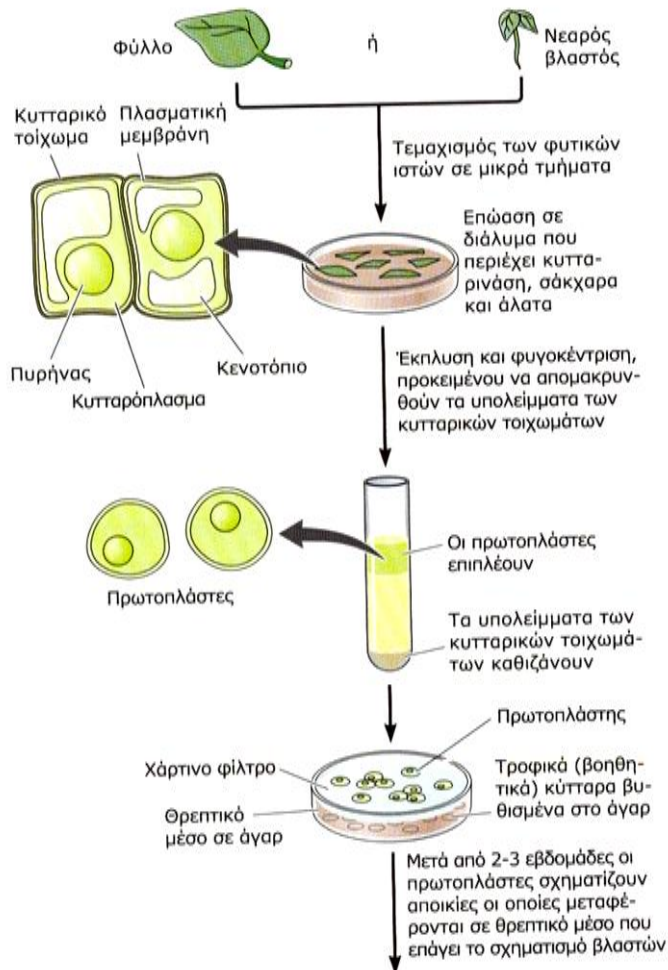
Μεταφορά γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα (2/7)



Εικόνα 26: Διαμόλυνση με χρήση λιποσωμάτων.

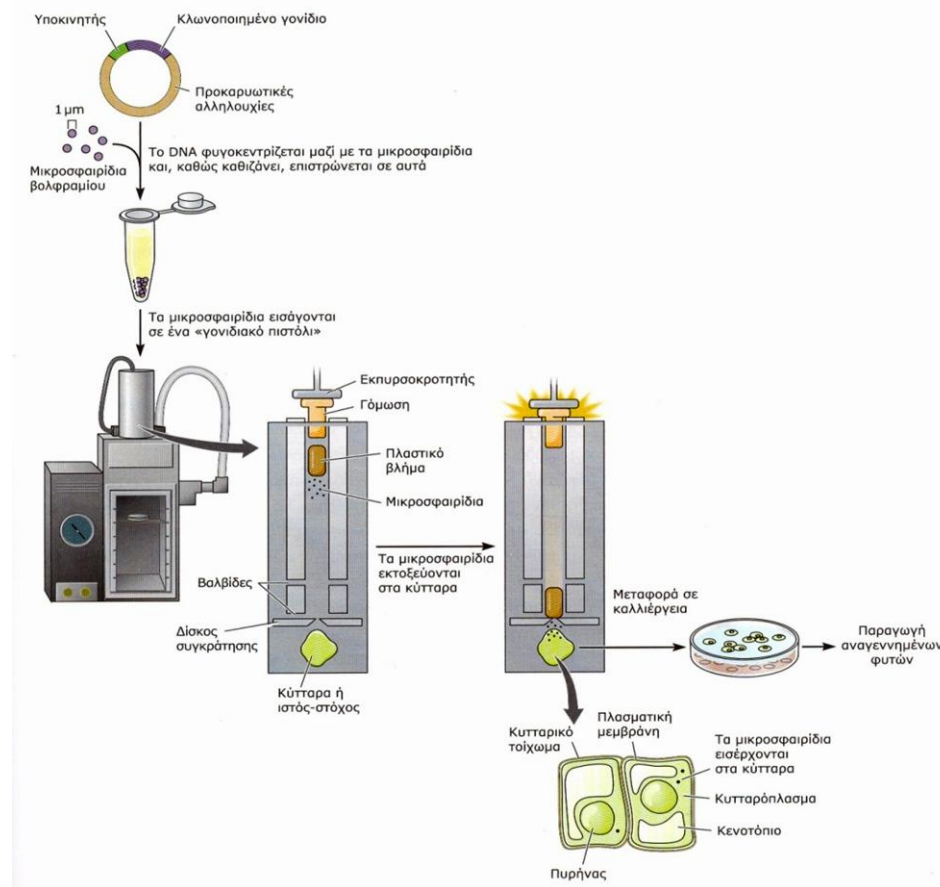


Μεταφορά γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα (3/7)



Εικόνα 27: Αναγέννηση φυτών από πρωτοπλάστες.

Μεταφορά γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα (4/7)



Εικόνα 28: Γονιδιακό πιστόλι (gene gun). Άμεση μεταφορά DNA σε φυτικά κύτταρα με βομβαρδισμό μικροσφαιριδίων.



Μεταφορά γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα (5/7)

Ιοί
Μη λυτικοί

Ογκογόνοι ιοί
(SV40)

DNA-Μικρά γονίδια

Ρετροϊοί

RNA- διαιρούμενα κύτταρα

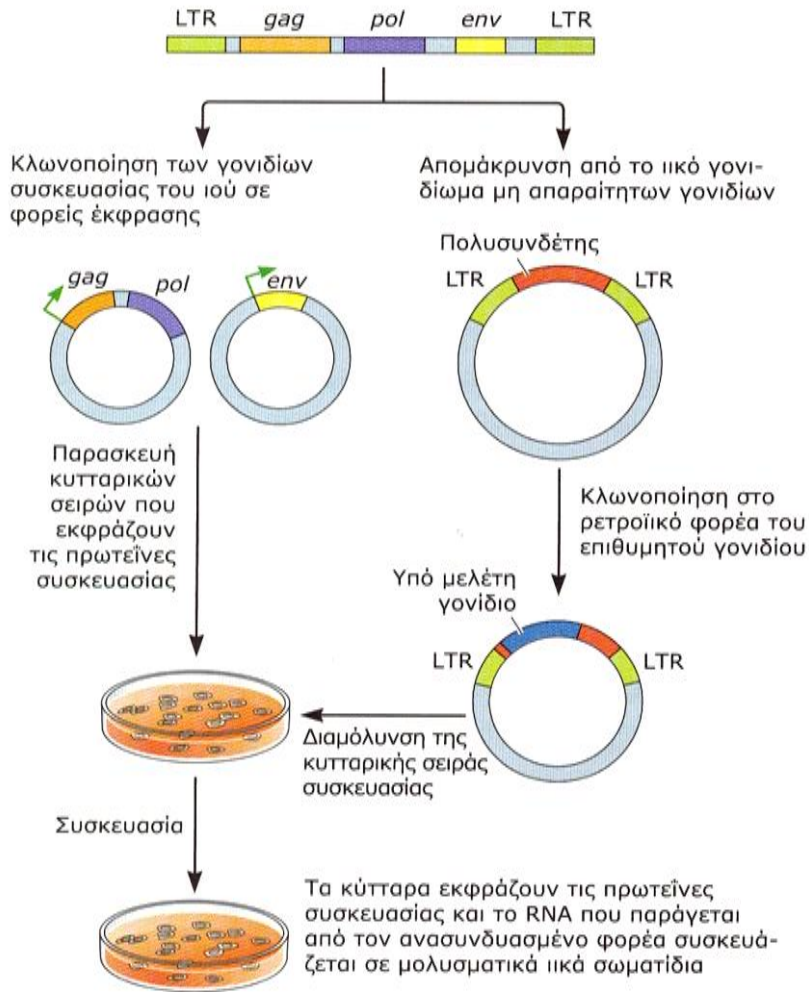
Αδενοϊοί

Αδενο-
σχετιζόμενοι ιοί

} DNA-και μη διαιρούμενα κύτταρα



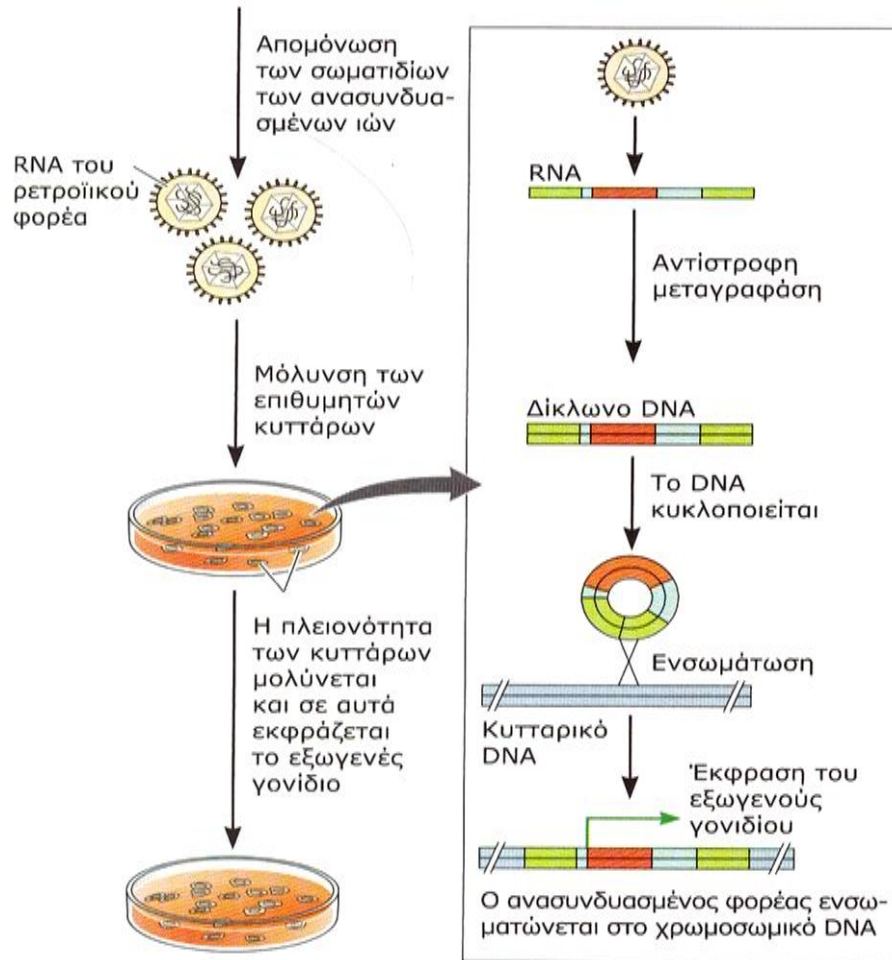
Μεταφορά γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα (6/7)



Εικόνα 29α: Χρήση ενός ρετροϊκού φορέα για τη σταθερή και μακροπρόθεσμη έκφραση ενός εξωγενούς γονιδίου.



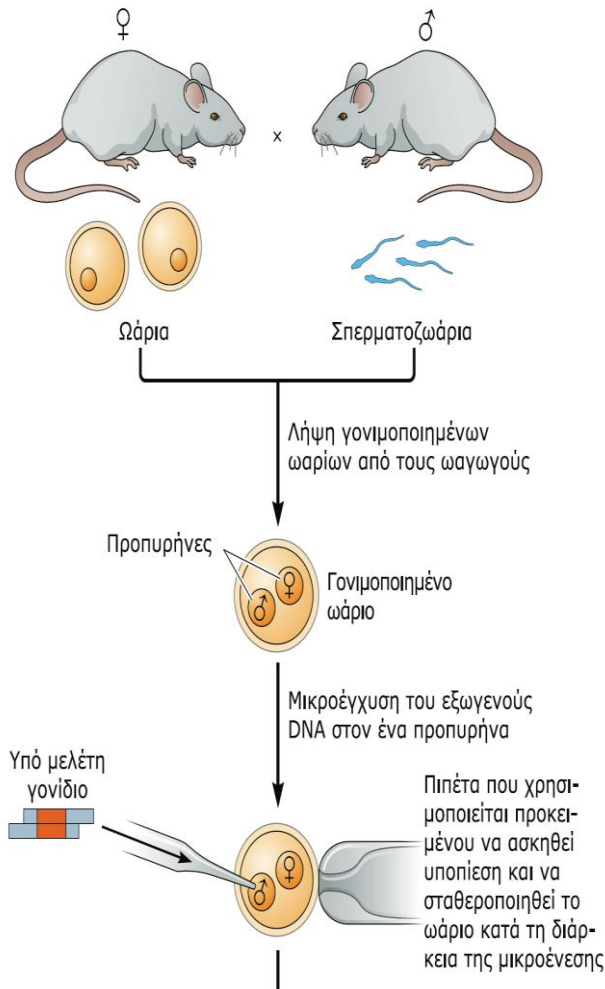
Μεταφορά γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα (7/7)



Εικόνα 29β: Χρήση ενός ρετροϊκού φορέα για τη σταθερή και μακροπρόθεσμη έκφραση ενός εξωγενούς γονιδίου.



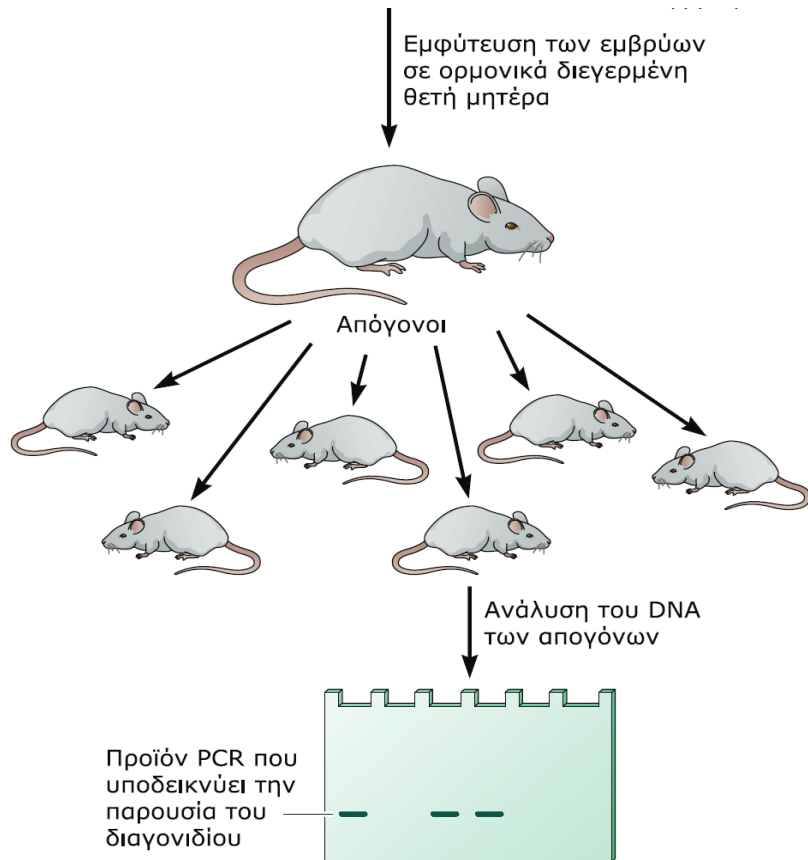
Μεταφορά γονιδίων σε οργανισμούς (1/2)



Εικόνα 30α: Κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών με μικροένεση.



Μεταφορά γονιδίων σε οργανισμούς (2/2)



Εικόνα 30β: Κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών με μικροένεση.



Σημείωμα χρήσης έργων τρίτων

Εικόνα 2: <http://no.wikipedia.org/wiki/File:Pcr.png>, by Magnus Manske, CC-BY-SA-2.5, (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/deed.en>).

Εικόνα 3: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_thermocycler_Biometra.jpg, by Rkalendar, CC-BY-SA-3.0, (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>).

Εικόνα 8: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger-sequencing.svg>, by Estevezj, CC-BY-SA-3.0, (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>).

Εικόνα 14: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FISHtechniqueInt.JPG>, CC-BY-SA-3.0, (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>).

Εικόνα 17: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sky_spectral_karyotype.png, by National Human Genome Research Institute.

Εικόνα 19: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction.jpg, by Jpark623, CC-BY-SA-3.0, (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>).

Εικόνα 20: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_with_SYBR_green.jpg, by Ygonaar, CC-BY-SA-3.0, (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>).

Εικόνα 21: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_with_Molecular_Beacons_probe.jpg, by Ygonaar, CC-BY-SA-3.0, (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>).



Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Δροσοπούλου Ελένη.
«Γενετική Μηχανική. Μέθοδοι ανάλυσης 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

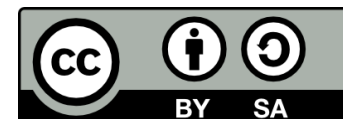


ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

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
- το Σημείωμα χρήσης έργων τρίτων

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

