



ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Ενότητα 8^η: Εφαρμογές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA

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, 10

Οι εικόνες αυτές προέρχονται από το βιβλίο Peter Russell, iGenetics: Μια μεντελική προσέγγιση, 1η έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.



Περιεχόμενα ενότητας

- Εφαρμογές Γενετικής Μηχανικής
 - Ανάλυση δομής και λειτουργίας γονιδίων
 - Απομόνωση γονιδίων ασθενειών
 - Μοριακή Διαγνωστική
 - Αναγνώριση φύλου
 - Ταυτοποίηση DNA
 - Ιατροδικαστική
 - Αρχαιογενετική
 - Μοριακή οικολογία



Εφαρμογές Γενετικής Μηχανικής

- ✓ Ανάλυση δομής και λειτουργίας γονιδίων
 - ✓ Ανάλυση ολόκληρων γονιδιωμάτων
- ✓ Προ- και μεταγεννητική διάγνωση ασθενειών
- ✓ Γενετική ταυτοποίηση ατόμων - Ιατροδικαστική
 - ✓ Αρχαιογενετική
 - ✓ Μοριακή οικολογία
- ✓ Δημιουργία διαγενετικών οργανισμών
- ✓ Οικονομική παραγωγή βιολογικών προϊόντων μεγάλης αξίας-Βιοτεχνολογία
 - ✓ Γονιδιακή θεραπεία



Ανάλυση δομής και λειτουργίας γονιδίων (1/7)

Ανάλυση οργάνωσης γονιδιακής οικογένειας *hsp70* στο μύδι (*Mytilus galloprovincialis*)

- Το πλέον συντηρημένο σύστημα – εξαιρετικά χρήσιμο σε φυλογενετικές μελέτες
- Περιλαμβάνει θερμοεπαγόμενα γονίδια που **δεν** διακόπτονται από ιντρόνια (**inducible genes, *hsp70s***) καθώς και συστατικά εκφραζόμενα γονίδια (**cognates, *hsc70s***)
- Ο αριθμός η κατανομή και η δομή των αντιγράφων διαφέρει μεταξύ των οργανισμών
- Οι πληροφορίες για τα γονίδια της οικογένειας HSP70 είναι λίγες και διάσπαρτες στα Mollusca
- Το *M. galloprovincialis* είναι ένα είδος με ευρεία εξάπλωση και οικονομική σημασία. Ο κύκλος ζωής του περιλαμβάνει κινούμενα και ακίνητα στάδια και αντιμετωπίζει έντονα μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες
- Βιοδείκτες- κλιματική αλλαγή-μηχανισμοί καρκινογένεσης



Ανάλυση δομής και λειτουργίας γονιδίων (2/7)

Ανάλυση οργάνωσης γονιδιακής οικογένειας *hsp70* στο μύδι (*Mytilus galloprovincialis*)

Εξαγωγή ολικού γονιδιωματικού
DNA υψηλού μοριακού βάρους από
ένα άτομο *M. galloprovincialis*



Κατασκευή γονιδιωματικής
βιβλιοθήκης σε λFIXII φορέα
αντικατάστασης



Ανάλυση δομής και λειτουργίας γονιδίων (3/7)

Ανάλυση οργάνωσης γονιδιακής οικογένειας *hsp70* στο μύδι (*Mytilus galloprovincialis*)

Σχεδιασμός εκκινητών για την PCR με βάση τη μοναδική και μερικώς γνωστή *hsp70* αλληλουχία από το *M. edulis*



Ενίσχυση με PCR της ομόλογης *hsp70* αλληλουχίας από το *M. galloprovincialis*



Σάρωση της βιβλιοθήκης με ανιχνευτή το ενισχυμένο *hsp70* τμήμα - απομόνωση ανασυνδυασμένων κλώνων



Ανάλυση δομής και λειτουργίας γονιδίων (4/7)

Ανάλυση οργάνωσης γονιδιακής οικογένειας *hsp70* στο μύδι (*Mytilus galloprovincialis*)

Χαρτογράφηση με ενδονουκλεάσες
περιορισμού και ομαδοποίηση των κλώνων



Υποκλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα
pGEM - εύρεση πρωτοταγούς
αλληλουχίας

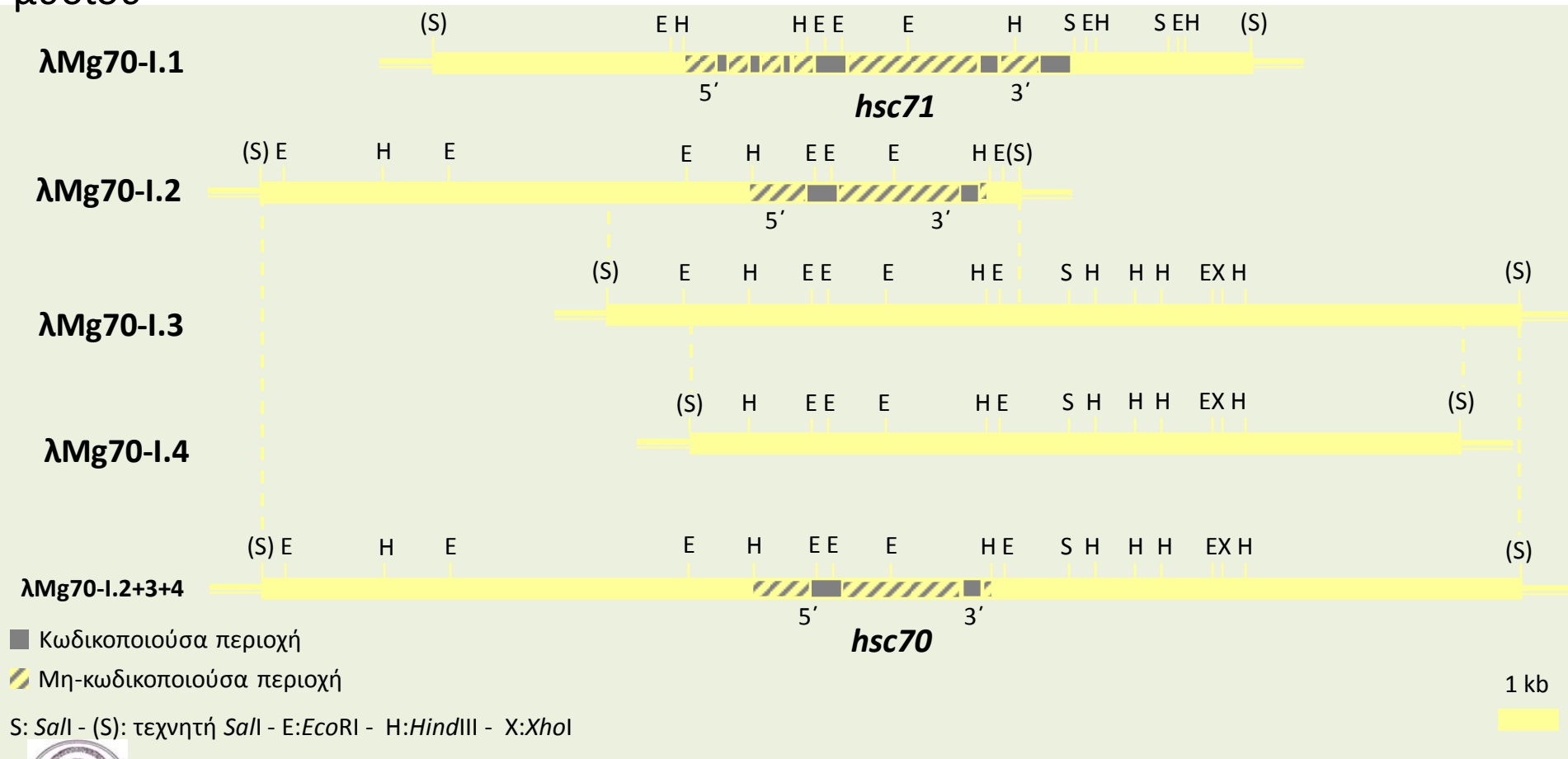


Σχεδιασμός εκκινήτων - ενίσχυση με
PCR και άλλων τμημάτων - εύρεση
πρωτοταγούς αλληλουχίας



Ανάλυση δομής και λειτουργίας γονιδίων (5/7)

Εικόνα 1: Χαρτογράφηση κλώνων που περιέχουν αλληλουχίες των γονιδίων *hsc70* του μυδιού



3121 CAGAGGACATGCCTGTGTCTATGTGATGGTATCTAGCCCTCCTTGGAAAGTCTGAATCATCATGGTTCCAAGTTACTTTCATCTTTGTCTGTCTTTAAAGAAACAGGACAAGTTGAAG
3241 TTATTAATATTATGGTCCAGAACATGCATGAAATATTTGCCACTGGACAATTAAGCAATCAATCATATTGACTGGATTTTTATACGACCGCAAAAATTTAAATTTTCGTCGTATATTGC
3361 TATCACGTTGGCGTCATCGTCGTCGCCAATACTTTTAGTTTTTCGCATTCTAACTTTAGTAAAAGTGAATAGAAAATTTATGAAATTTTAACACAAGGTTTATGACCACAAAAGGAAGGT
3481 TGGGATTGGTTTTGGGAGTTTTGGTCCCAACATTTTAGGAATATGGGCCAAAAAGGGCCAAATAAGCATTTTCTGGTTTTTCGCACATAACTTTAGTTTAAAGTAAATGAAATCTAT
3601 GAAATTTTGACACAAGGTTTATGACCACAAAAGGAGGTTGGGATTGATTTTGGGAGTGTGGTTCCAAGGTTAGGAATTAGGGGCCAAAAAGGGCCAAATAAGCATTATTCTTGG
3721 TTTTCGTAACAATAACTTTAGTATAAGTAAATAGAAAATCAATGAAATTTAAACACAGGTTTATGAACACAAAAGGAAGGTTGGGATTGATTTTGGGAGTTTTGGTCCCAACAGTTTAGGA
3841 ATTAGGGGCCAAAAAGGGGCCAAATAAGCATTATTCTTGGTTTTTCGCACCATAAECTTTAGTATAAGTAAATAGAAAATCTATGAAATTTAAACCAAGGTTTATGACCATAAAAAGGAAG
3961 GTTGGGTTTGATTTTGGGAGGTTGGTCCCAACAGCTTTAGGAATAAGGGGCCAAAGGGTCCAAGGTTGTTGTTGATTTTCATCAAAAATGAAATAATGGGGTCTCTGTATATC
4081 CGAATCTAACTGTGTGTAGATTCTTAATTTTGGTCCGTTTTCAAAATGAACTTAAACTTAAAGTCCAAGGGTCCAAGGTTAGTTGATTTTAAACAAAATTTGAATCCTTGG
4201 GGTCTTTTGATATGCTGAATCTAAAAATGTATTTAGATTTTGTATTGGCCCAAGTTTTCAGTTGGTCCAAATCGGGGTCCAAGGTTGAACTTTGTTGATTTTCATCAAAAATTTGAAT
4321 AATTGGGGTCTTTGATATGCCAAATCTAACTGTGTATGTAGATTCTTAATTTTTGGTCCCGTTTTCAAAATGGTTTACATTTAAAGTGCAAAGGGTCCAAAAATTAACATAAGTTGATTT
4441 TAACAAAATTTGAATTTCTGGGCTTTTTTGTATGCTGAATCTAAACATGTACTTAGATTTTTGATTTATGGGCCAGTTTTCAAGTTGGTCCAATCAGGATCCAATAATTTATATATA
4561 GTATTGTGCTATAGCAAGAAATTTCAATTCACAGTATTCAGCAATAGCAAGAAATCTTCAATTCACAGTATTGTGCAATAGCAAGCAATTTCAATTCACAGTATTGGGCAATAGC
4681 AAGAAATCTTCAATTCACAGTATTGTGCAATAGCAAAATTTTCAATTCACAGTATTGCGCAATAGCAAGATATATCTAATTCACAAATATTTGTGCAATAGCAAGAAATTTCAATTC
4801 GAGTTATCTTTCTTTGTCAGAAATAGTAGTTGAATCAACTTAAATCATTGTTTTATACAATATACAAAGTATATTCACCTTTTACTACCAACTGATAAATTAACAAATCTTTACTATTC
4921 GTGATAACAAGCACTTTTTCACATTTAATTTTTATGATGTATTTAAATGAGTAGTTATTTGTGCAAACTCCATTAGGAATTTGATTGAGATCAGTTTTGGAAAAGGGAAAGGGGG
5041 ATGTGAAAAAAGAAATGGGAAGGGGTTAAATTTTTCTCATTTCAGATTTTCATAAATAAAGAAATTTCTTCAACACTTTTTTGGAGAGGATTAATATTCACACGCAATAGTGAAT
5161 TGCTCAAAGGCCAAAAAATTTAAGTTCAATGACACCAACTTCACTGTGTGCAAAAACCTATGCTGTGCAACTATTTAATCAACTCCAATTTTAGAGCTGAATTCAGCTTAAATG
5281 TTGTGCTATACTTGCCCAACTGTTCAAGGTTTCAACCTCTGCGGTGCTATATAGCTGTGCCCCTGCGGAGCATCTGGTTTAAAAAAGTAATCATTTTGTATCATCAAGTTTAAACATTAC
5401 ATTATCAATAGAAATATAATGTGTCCAGGATGTATATTTGTTTGAAGTAATAGTGTCTTACGAGAATGTAAGAGGTACCAATAGTTTAAACATGTATACACATTAACATACAGCC
5521 ATGTATTGCTTGGTACAGAGATTACATTGATTACTATTTTTTTCAGCTGTGCAGGCAGCCATTTTGTGAGGTGACAAGTCAAGAGGTTACAAGACTTGTATTGTTAGATGTTACCCCA
V Q A A I L S G D K S E E V Q D L L L L D V T P L 400
5641 TGTCCTTGGTATTGAAACAGCTGGAGGTGTGATGACAGCTCTAATCAAACGTAATACAACCAATTCACAACAAACAGACACAACCTTCACTACCTACTCTGACAATCAGCCTGGGTGAT
S L G I E T A G G V M T A L I K R N T T I P T K Q T Q T F T T Y S D N Q P G V L 440
5761 TAATCAGGTTTATGAAGGAGAGAGACTATGACCAAGGACAACAACCTTGGTTGAAAGTTTGAATTAATGAAATACCTCCAGCACCAGAGGTTGCCCCAGATTGAAGTGACCTTTG
I Q V E R A M E T K D N L L G K F E L T G I P P A P R G V P Q I E V T F D 480
5881 ACATTGATGCCAATGGTATCCTGAATGTATCTGKAGTAGATAAGAGTACTGGTAAAGGAAACAAAATCACCACTCACTAACGACAAAGGTAAGATTTTGTGATGCTAAATCTGAAGTGTG
I D A N G I L N V S A V D K S T G K E N K I T I T N D K G 509
6001 ACAATGTGTGATGATGATGAAACACCACCATTTCATTCGCGGTTTCCACCAGAGGACATGCCTGTGTCTATGTGATGGTATCTAGCCCTTCCCTTGGAAAGTCTGAATCATCATGGTTCCA
6121 GTTCTCTTCATCTTTTGTCTGTCTTCATTGAAAGAAAAAACCCTGCTGGTTTAGGTTACAAAAATATCCTGTTGAAATATGCATGAAATAATTTGCTAGTGGACATTAAGCAACCAGA
6241 AATCATATTGAAATAGATTGCTCGCCTTCGATACACAGGGATTAACAATCCGGCAACAGTGTGAACATATTGTTTAAAGCTTTTATTTTTCAGAAGGTAGAAGACC TGGATGCTTCAA
6361 CTTTGTATGCAGATGACTTATGTTAAGAAGTTTCTGTCTGTCAATCTCTAGTTTATGTTGCGTGAATTTCTCACTTATTATGAGTAATAGGATAGCAACTGAACACGTTAGAAATATTG
6481 TAATGGTGAATTTTAGTTCACCAGCTTACACTCGAAAGGAAATGTACATTTTTTCTCATCACATTTCTGTTTACCACCTATTCTATTTCAACAAAAAATAAAAAGAACTGCTTGTAT
6601 TTTTAGTATAAAAATTAATTTGATAGTTGAGCAAGAAATCTCCCTTCAGACTGTAAATGTTGGTAGCATGAGGTATATCATTGATAAAGTCGTTACTATTGCACTTCTTGGCCATA
6721 CTGGCATGGCTACATGAGTCTTATCTCATGCATACAAGTTATTTACAGAAAGAACCAGATCTGATATGATGTTTACTTGTATTTTACTTTCAGGTCGTTTGGAGCAAGAAAGTAAATGAA
R L S K E E I E 517
6841 CGCATGGTCAATGATGCTGAGAAATACAAGGCAGAAGCAGAGAAACAGAAGGACCGTATCACCGCCAAAAATAGTCTAGAAAGCTACTCATTAAACATGAAACAAACAGTTGAAGATGAA
R M V N D A E K Y K A E D E K Q K D R I T A K N S L E S Y S F N M K Q T V E D E 557
6961 AAACCTCAAGGATAAAACTAGTGAAGTGACAAAAAGGAAATCATGGACAATGTGACGAAATCATTAAATGGTTGGATGCCAACCAATCTGGCTGAGAAGGAAAGAAATTTGAACACAAACAG
K L K D K I S E S D K K E I M D K C D E I I K W L D A N N L A E K E E F E H K Q 597
7081 AAAGAACTTGGAGGAGTGTGTAATCCAATCATCACTAAACTGTACCAGTCTGCTGGTGGAGCCCCAGGTTGGTGGTATGCCAACTTTGGTGGAGCTGGTGGAGCCCCAGGAGGTGCACCT
K E L E G V C N P I I T K L Y Q S A G G A P G G G M P N F G G A G G A P G G A P 637
7201 GGATCAGGAGGCACTGGTGGAAAGTGGTGGACCAACCATTTAGGAGGTCGACTAA
G S G G T G G S G G P T I E E V D stop 654



1 AAGCTTAAACTTGAGAGTTCAACCTTGTCTTCTAAAGTGTATGATTCGATTGATTTATTATTATACCCACGCAACGAAGTTGCGGAGGGTATAAAGTTTGTGACCCGTCAGCTCTGTT

121 CTGTCATCGCAACTCCTCTCAAACCCACACAAGAAATTTTCATGAAACCTGTTTCAGATAATAAGGACATACCTATGTAAGTTGTCATATCGACGGGAAATTCGCATCAATTTTTTTCTCA

241 GGAGTTACGCCCCCTTGAAGTTTACTTTTAAATGTACTACTGCAACAGTTTTCATCGCAACTCCTCTCAAACCCACACAAGAAATTTCAAAAACCTTTTCAGATAAAGGACATAC

361 TAATGTAAGTTGTCATATCGACGGGAAATTCGCATCAATTTTTTTCTAGGAGTTACGCCCTTTGAAGTTAATTTACTTTAAATGTAAGTTACTACTGCAACAGTTTTCATCGCAACTCCTCTCA

481 AACCACACAAGAAATTTCAAGAAACCTTTTCAGATAATAAGGACATACCTATGTAAGTTGTCATATCGACGGGAAATTCGCATCAATTTTTTTCTAGGAGTTGCGCCCCCTTGAAGTT

601 ATTTACTTTTAAATGTAAGTTACTACTGCAACAGTTTTCATCGCAACTCCTCTCAAACCCACACAAGAAATTTTCATGAAACTTTGTGAGATAATAAGGACATACCTATGTAAGTTGTCATATCGACAG

721 GAAATTCAGGTTCAATTTTTTTCTAGGAGTTATGCCCCTTTGAAGTTAATTTGCTTCAATGTAAGTTACTACTGCAACAGTTTTCATCGCAACTCCTCTGAAAAACACAACGAATTTTCATGA

841 AATTTGTAGATAATAAGGACATACCTATGTAAGTTGTCATATCGACGGGAAATTTTCATCAATTTTTTTCTTATACTTATTTAATTTCTCCAATGACAATGTGGTGAC

961 GTGGGGTATGTGAGCGTCTCACTAAGGTTCTTTAATTAATAAAGAATTTATTTGGTTCATCTAGGTTAGGTGGGAAAGAATGTACTCATCTTTGACTTGGGTGGTGGAACTTTTGATG

V G G E R N V L I F D L G G G T F D V

1081 TGTCAATCCTTACAATTGAGGATGGTATTTTTGAAGTTAAATCAACCTCTGGTGATACCACCTGGGTGAAGACTTTGACAACAGAAATGGTCAATCACTTTCAAGAAATTTCAAC

S I L T I E D G I F E V K S T S G D T H L G G E D F D N R M V N H F I Q E F K R

1201 GCAAGCACAAAAAGACATTAGTGAAAAACAAGCGTGTCTTCGACGACTTAGAACTGCTTGTGAAAGGGCAAAGAGAACCCTTTCTTCAAGCACACAAGCAAGTGTGAGATTGACTCTC

K H K K D I S E N K R A V R R L R T A C E R A K R T L S S S T Q A S V E I D S L

1321 TGTTTGAAGGAGTTGACTTTTATACAAGCATCAAGAGCCAGGTTTGGAGGAATGAAATGCAGATCTTTTCAGAGGAACCATGGAACCAAGTTGAAAAAGCTCTACCGCATGCCAAACTAG

F E G V D F Y T S I T R A R F E E L N A D L F R G T M E P V E K A L R D A K L D

1441 ACAAGCTGTGTCCATGAAATGTCTTGGTAGGTGGATCAACCAGAAATCCAAAAATCAGAAGTTACTTCAGGACTTTTTCAATGGCAAGAATTTGAACAAATTCATTAACCTGTATG

K A A V H E I V L V G G S T R I P K I Q K L L Q D F F N G K E L N K S I N P D E

1561 AAGCTGTAGCATACGGTGCAGGTATAACATTTGAAATATGTTCTTTTATCAGTGTAAATGATAGGAATTTGGACCATGTATGGTGATGATGAACACCTACCATTCAATTCGCGGTTT

A V A Y G A A

1681 CCACCAGAGGACATGCCTGTGTCTATGTGATGGTATCTAGCCCTTCTTGGAAAGTGAATCATCATGGTTCCAAGTTACTTTTCATCTTTGTCTGTCTTTAAAGAAACAGGACAAGTT

1801 GAAGTTATTAATATTTGGTCCAGAATCCATGAAATTTGGCCACTGGACAATTAAGCAATCAATCATATGACTGGATTTTTATACGACCCGCAAAAATTTAATTTTCGTCGTATA

1921 TGCTATCAAGTTGGCGTCATCGTCCGTAATCTTTAGTTTTGCGATCTTAACTTTAGTAAAGTGAATAGAAATTTAAGAAATTTAACAACAAGGTTTATGACACAAAAGGA

2041 AGGTGGGATTTGATTTTTGGGAGTTTGGTCCCAACATTTAGGAATTTGGGCCAAAAGGGCCCAATAAGCATTCTTGGTTTTGCGACTTAACTTTAGTTTAAAGTAAATTTGAAAT

2161 TATGAAATTTTGACACAAGGTTTATGACCACAAAAGGAAGTTGGGATGATTTTGGGAGTGGTGGTTCCACAGTTTAGGAATTAAGGGCCAAAAGGGCCCAATAAGCATTATTT

2281 TTTGGTTTTCGCACCATAACTTTTATGTAAGTAAATAGAAAATCTATGAAATTTAAACACAAGGTTTATGACCATAAAGGAAGGTTGGTTTTGATTTTGGTAGGTTGGTCCCAACAGT

2401 TTAGGAATAAAGGGCCCAAGGGTTCAAACCTGAACCTTCTTTGATTTTCATCAAAAATTTGAATAATTTGGGGTTCTTTGATATGCCAAATCTAACTGTGTAATGATGATTCTTAATTTTTGG

2521 TCCGCTTTTCAAATTTGGTCTACA TTAAGGTCCA TAGGTTCCAAAATTAACCTTAGTTTGAATTTAACA AAAATTTGAATCCCTTGGGTTCTTTGATA TGCTGAATCTAAAATTTGACTTAGA

2641 TTTTGTATTTATGGCCAGTTTTCAAGTTGGTCCAAAATTTGGGGTCCAAAATTAACCTTTGTTTGTATTTCAATCAAAAATTTGAATAATTTGGGGTTCTTTGATATGCCAAATCTAACTGTGTA

2761 TCTGATCTCTTAAATTTTGGCTCCCTTTTTCAAAATTTGGCTCTACATTAAGTCCAA TCGCTCCAAAATTTAAAGTAACTTTGATTTTAAACAAAATTTGAAATTTCTTGGCTTTTTCATATGCT

2881 CAATCTAAACATATAACTTACAAATTTTCAATTTATGCGCCCACTTTTCAACTTGGCTTCAAATCAGCACTCAAAATTTAATATATCAAGTATCTGCAATAGCAAGAAATTTTCAATTTCCACACT

3001 ATTGTGCAATAGCAAGCAATTTTCAATTTGCACAGTATTTGTGCAATAGCAAGCAATTTTCAATTTGCACAGTATTTGCAATAG CAATAG TAAGAAATCTTCAATTTGCACAGTATTTGTGCAATAGCAA

3121 ATATTTTCAATTTGCACAGTATTTGTGCAATAGCA TAGAAATTTTCAATTTGGAGTTATCTTTCTTTGTCCAGAAATGATAGTTGAATCAACTTAAATCAATTTGTTTTCACAAATTAACAATGAT

3241 ATTCACCTTTACTACCAACTGATAAATTAACAACATCTTTACCATTCCAGTATAACAAGAACTTTATTTTACATTTTAAATATTTTATGATGATTTAAATGAGTAGTTATTTGTGCAAC

3361 TCCATTAGGAATTTGAATTTGAGATCAGTTTGGAAAAAGGGAAAGGGGGATGTGAAAAAAAATTTGGGGAGGGGGTAAATTTTTCTCATTTTCAGATTTTCAATAAAAAGAAATTT

3481 CTTCAAACATTTTTTTGAGAGGATTAATATTTCAACAGCATAGTAAATTTGCTCAAAGGCAAAAATTTAATTTAAGTTTCATAGACCACATTCATCTGTGTGCAGAAACCTATGCTGTGTC

3601 AACTATTTAATCAAAATCCAATTTAGAGCTGAATCCAAGTTTAAATGTTGTGTCCTACTTTGCCCAACTGTTCAAGGTTCAACCTCTGCGGTGATATAGCTGCGCCCTGTGGAGCAT

3721 CTGGTTTAAAAAGTAATCATTTTGTATCATCAAGTTTAAACATTACATATCAATAGAAGTATAATGTGTCAGGATGATATTTTTGTTTGAAGTAATATTTCTTACGAGAATGGAAAA

3841 GGTACCAATAGTTTTAATATGATACACATTAACATATAACAAGCCATGATTTGCTTGGTACAGAGATTACATTTACTATTTTTTTCAGCTGTGCAGGCAGCCATTTTGTGAGGTGACAA

V Q A A I L S G D K

3961 GTCAGAAGAGGTACAAGACTTGTATTGTTAGATGTTACCCCACTGTCTCTTGGTATTTGAACAGCTGGAGGTGTGATGACAGCTCTAATCAAACGTAATACAACCAATTTCCAAACAAACA

S E E V Q D L L L L D V T P L S L G I E T A G G V M T A L I K R N T T I P T K Q

4081 GACGCAAACTTCACTACCTACTCTGACAATCAGCCCTGGTGTATTAATCAGGTTTATGAAGGAGAGAGCTATGACCAAGGACAACAACCTTGCCTTGGAAAGTTTGAATTAACTGGAAT

T Q T F T T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E R A M T K D N N L L G K F E L T G I

4201 ACCTCCAGCACAAGAGGTGTGCCCCAGATTTGAAGTGAACCTTTGACATTTGATGCAATGATATCTGCAATGATATCTGCAATGATATAGAGTACTGGTAAAGAGAACAAAATCACCATCAC

P P A P R G V P Q I E V T F D I D A N G I L N V S A V D K S T G K E N K I T I T

4321 TAACGCAAAAGGTAAGATTTTGTGATTGCTAAATCTGAAGTGTGATGATGATGAAACACCACCATTCAATTCGCGGTTTCCACCAGAGGACATGCCTGTTGTCTATGTGATGGTGTCTAGA

N D K

4441 CCTTCTTGAAGTCTGAGTCACCATTGTTTACACATACATAAGCTT



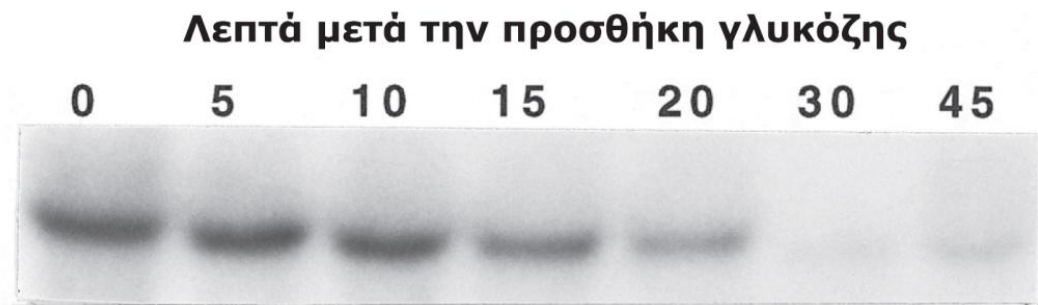
Ανάλυση δομής και λειτουργίας γονιδίων (6/7)

Ζύμη-Γονίδια GAL

Επαγωγή από γαλακτόζη-Καταστολή παρουσίας γλυκόζης

Τι συμβαίνει όταν προστίθεται γλυκόζη σε καλλιέργεια σε μέσο γαλακτόζης?

- Απομόνωση RNA
- Υβριδισμός κατά Northern



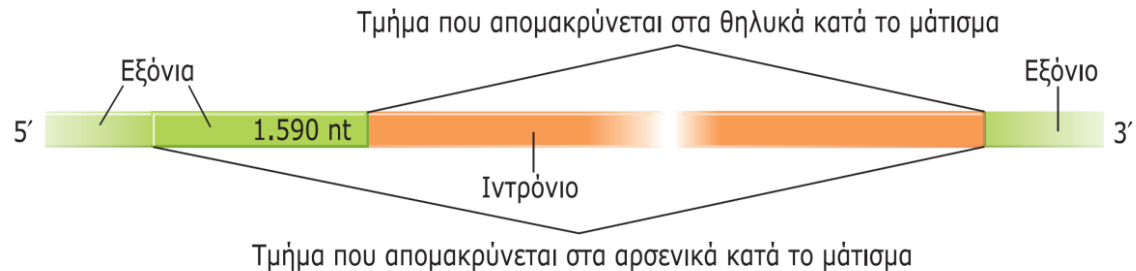
Εικόνα 2: Ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *GAL1* του ζυμομύκητα από τη γλυκόζη



Ανάλυση δομής και λειτουργίας γονιδίων (7/7)

- Κλωνοποίηση γονιδίου fru
- Υβριδισμός κατά Northern
- Αλληλούχιση cDNA
- Σχεδιασμός εκκινητών
- RT PCR

Εικόνα 3: Εναλλακτικό μάτισμα σε γονίδια σεξουαλικής συμπεριφοράς στη δροσόφιλα



Μεταγραφικός παράγοντας

Έκφραση σε συγκεκριμένους νευρώνες



Απομόνωση γονιδίων ασθενειών (1/4)

Εντοπισμός του γονιδίου της κυστικής ίνωσης - Κλωνοποίηση θέσης

- Αναγνώριση δείκτη RFLP που παρουσιάζει σύνδεση με το γονίδιο της κυστικής ίνωσης

Γονιδιωματικός κατά Southern υβριδισμός

- Εντοπισμός του χρωμοσώματος 7

In situ υβριδισμός του RFLP δείκτη

- Εντοπισμός της χρωμοσωμικής θέσης 7q31-q32

Γενετική ανάλυση για RFLP δείκτες του χρωμοσώματος 7
Αναγνώριση των στενότερα συνδεδεμένων

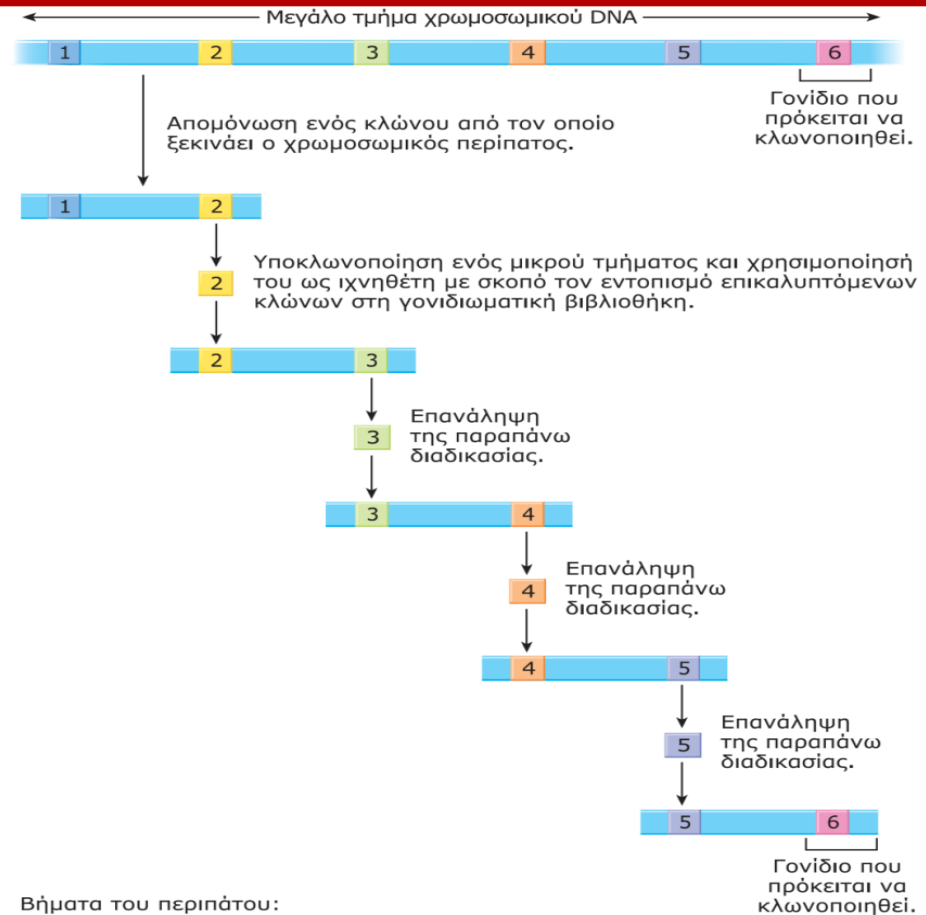


Απομόνωση γονιδίων ασθενειών (2/4)

Εντοπισμός του γονιδίου της κυστικής ίνωσης - Κλωνοποίηση θέσης

➤ Χρωμοσωμικός περίπατος

Σάρωση βιβλιοθηκών με γνωστά τμήματα για την απομόνωση κλώνων που εκτείνονται πέρα από αυτά



Εικόνα 4: Χρωμοσωμικός περίπατος



Απομόνωση γονιδίων ασθενειών (3/4)

Εντοπισμός του γονιδίου της κυστικής ίνωσης - Κλωνοποίηση θέσης

- Αναγνώριση κλώνων που πιθανόν περιέχουν γονίδια

Γονιδιωματικός κατά Southern υβριδισμός με δείγματα ζώων

- Αποκλεισμός κλώνων

Απουσία ORFs

- Αναγνώριση κλώνων που περιέχουν εκφραζόμενες αλληλουχίες

Υβριδισμός κατά Northern

- Αναγνώριση κλώνου που περιέχει αλληλουχίες εκφραζόμενες στα κύτταρα ιδρωτοποιών αδένων

Κατασκευή και σάρωση cDNA βιβλιοθήκης



Απομόνωση γονιδίων ασθενειών (4/4)

Εντοπισμός του γονιδίου της κυστικής ίνωσης - Κλωνοποίηση θέσης

➤ Ανάλυση της δομής του γονιδίου

Σύγκριση με cDNA

Αναγνώριση 24 εξωνίων σε 250 kb

➤ Επιβεβαίωση ότι ο απομονωμένος κλώνος περιλαμβάνει το γονίδιο της κυστικής ίνωσης!!!

Σύγκριση αλληλουχίας υγιών και ασθενών

Αναγνώριση μεταλλάξεων



Μοριακή Διαγνωστική (1/6)

Μοριακές αναλύσεις DNA: Αναγνώριση μεταλλάξεων σε άτομα που εμφανίζουν συμπτώματα ή διατρέχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης γενετικής ασθένειας

Προϋπόθεση: Λεπτομερής χαρακτηρισμός των παθολογικών μεταλλάξεων

Δυσκολίες: Μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων με διαφορετική βαρύτητα και σε διαφορετικά γονίδια μπορεί να σχετίζονται με μία ασθένεια

Η αναγνώριση μετάλλαξης δεν ισοδυναμεί πάντα με εμφάνιση της ασθένειας



Μοριακή Διαγνωστική (2/6)

Μοριακές αναλύσεις DNA

- ✓ Προεμφυτευτική διάγνωση
- ✓ Προγεννητική διάγνωση
- ✓ Σάρωση νεογνών
- ✓ Εντοπισμός φορέων

Μυϊκή δυστροφία Duchenne, Tay-Sachs, θαλασσαιμία, κυστική ίνωση κ.α.

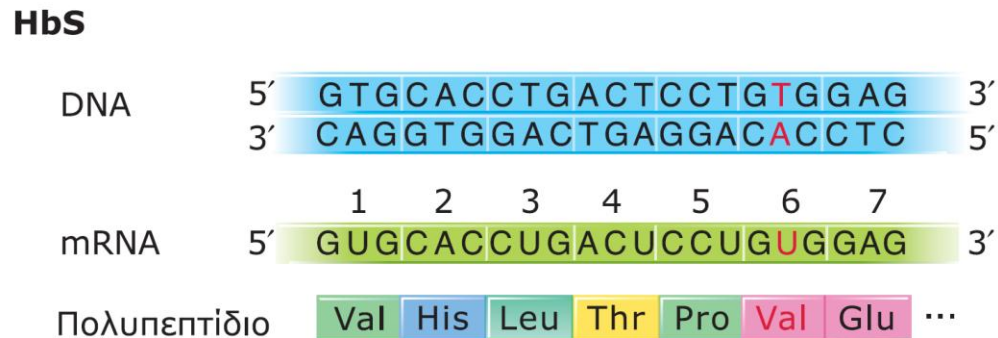
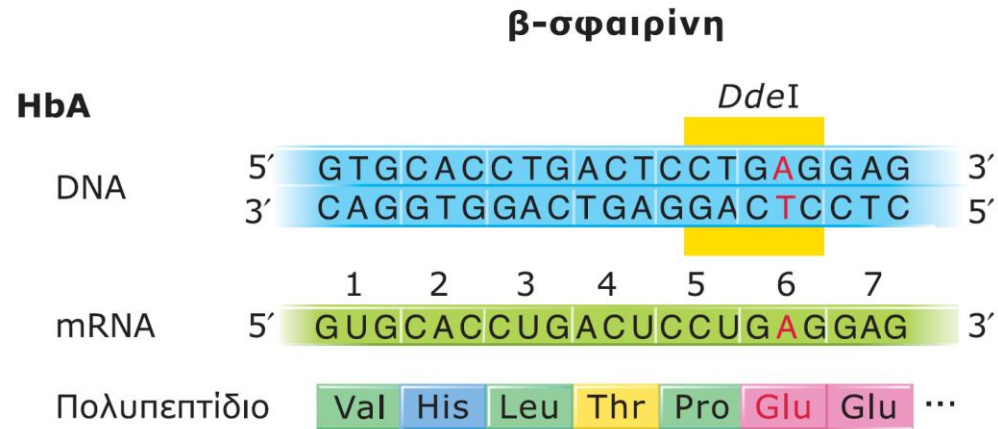


Μοριακή Διαγνωστική (3/6)

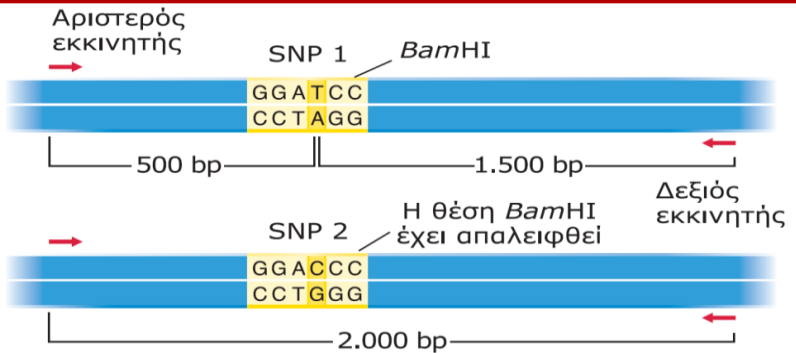
Αλληλόμορφα με σημειακή
μετάλλαξη

Παράδειγμα: αλληλόμορφο
δρεπανοκυτταρικής αναιμίας

Εικόνα 5: Η αρχή του γονιδίου της β-σφαιρίνης, του mRNA του και του πολυπεπτιδίου του: οι φυσιολογικές αλληλουχίες HbA και οι μεταλλαγμένες αλληλουχίες HbS



Μοριακή Διαγνωστική (4/6)

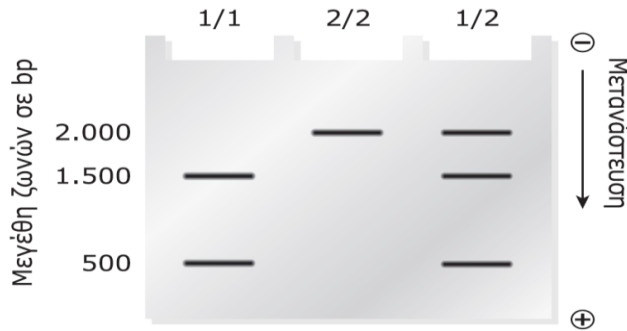


Εντοπισμός με PCR- RFLPs

Πολυμορφισμοί θέσεων περιορισμού (RFLPs)

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA, PCR και πέψη με *Bam*HI

Γονότυποι



Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης

Παρουσία – απουσία θέσης κοπής ενδονουκλεάσης

Εικόνα 6: Ανάλυση SNP που επηρεάζουν θέσεις περιορισμού με PCR

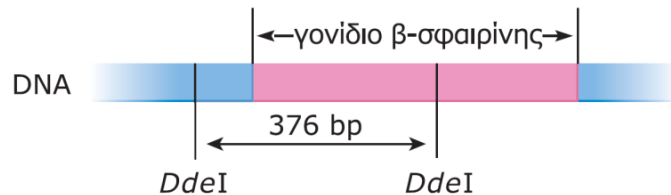


Μοριακή Διαγνωστική (5/6)

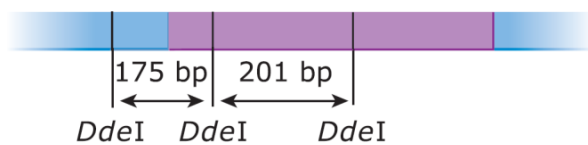
Εντοπισμός με υβριδισμό κατά Southern - RFLPs

α) Περιοριστικές θέσεις *DdeI*

β^S (μεταλλαγμένο αλληλόμορφο δρεπανοκυτταρικής αναιμίας)

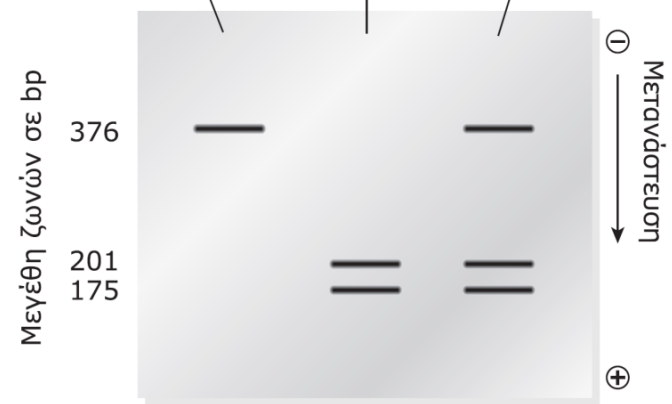


β^A (φυσιολογικό αλληλόμορφο)



β) Τμήματα περιορισμού μετά από πέψη με *DdeI* που ανιχνεύονται με έναν ιχνηθέτη από την αρχή του γονιδίου της β -σφαιρίνης σε ανάλυση κατά Southern

Γονότυποι Ομόζυγος μεταλλαγμένος Ομόζυγος φυσιολογικός Ετερόζυγος



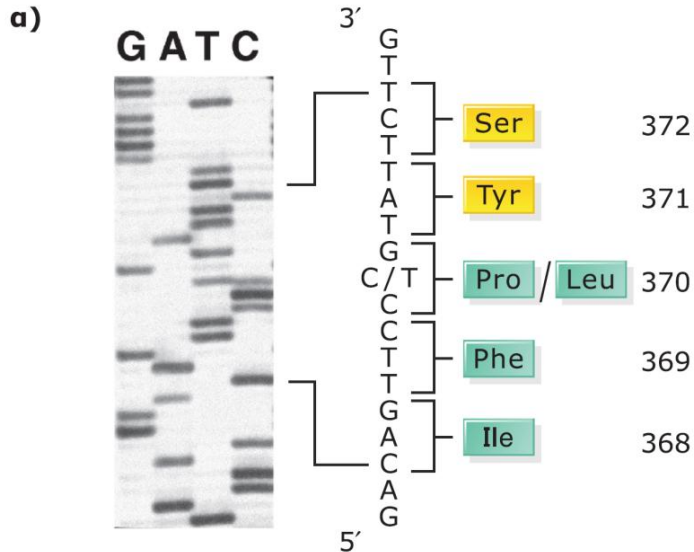
Αυτοραδιογράφημα

Εικόνα 7: Εντοπισμός του αλληλομόρφου της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας με Υβριδισμό κατά Southern - RFLPs



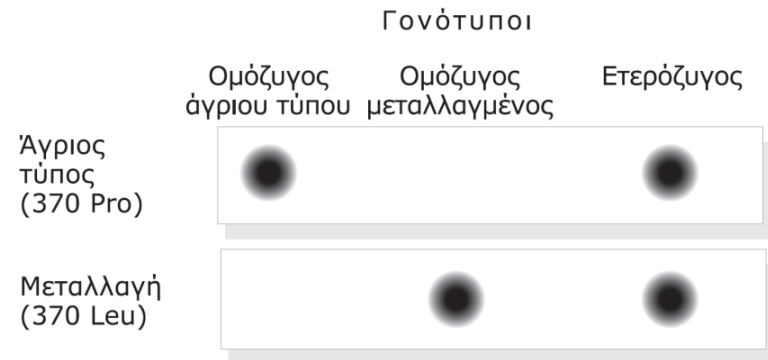
Μοριακή Διαγνωστική (6/6)

Εντοπισμός με PCR-ASO



Εικόνα 8: Εντοπισμός μεταλλάξεων με PCR και υβριδισμό ASO (Allele Specific Oligonucleotide)

γ) Ιχνηθέτης ASO



GLC1A-γλαύκωμα

β) ASO

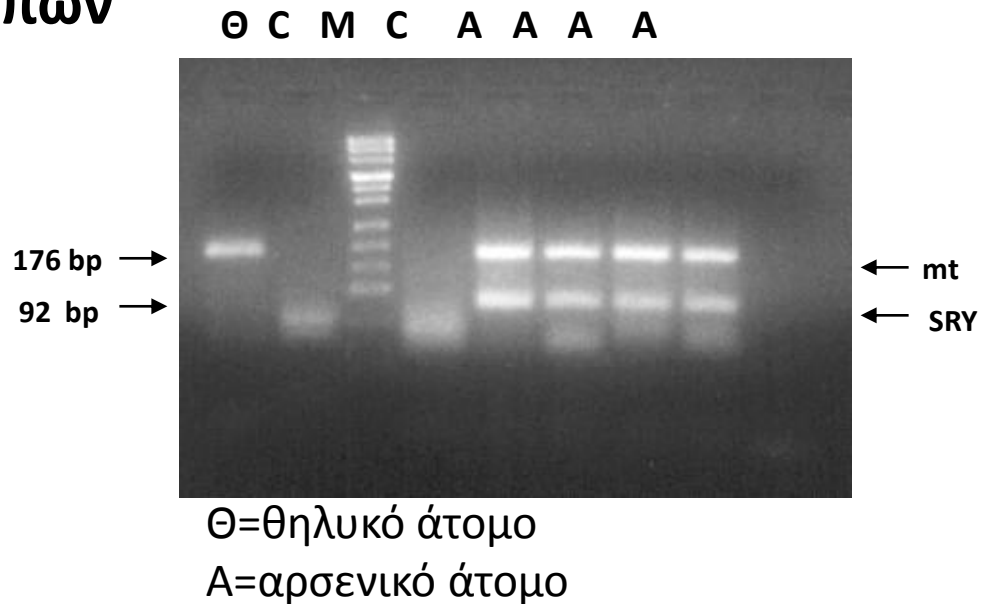


Αναγνώριση φύλου

Ενίσχυση Υ ειδικών τόπων

Παρουσία: αρσενικό

Απουσία: θηλυκό



Εικόνα 9: Εικόνα ηλεκτροφόρησης προϊόντων ενίσχυσης του SRY τόπου σε άγνωστα δείγματα πεδίου



Ταυτοποίηση του DNA – Ιατροδικαστική (1/2)

Διαλεύκανση εγκληματικών υποθέσεων

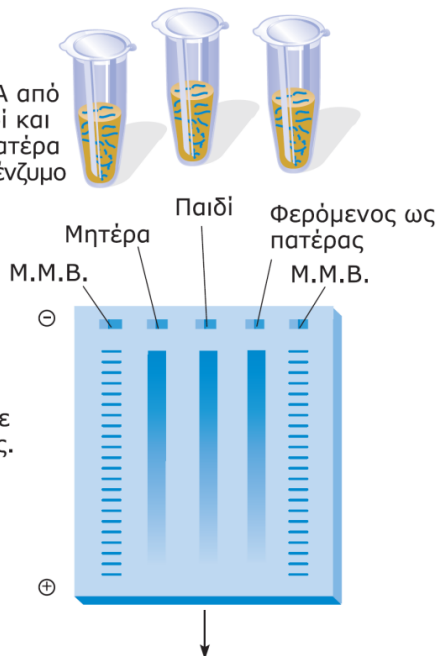
- Αναγνώριση ενόχων
 - Αποκλεισμός ενόχων
 - Συλλογή στοιχείων
-
- ✓ Τεχνικές απόμονωσης γενετικού υλικού από ελάχιστο /παλιό δείγμα
 - ✓ PCR ενίσχυση γενετικού υλικού
 - ✓ Τεχνικές Ταυτοποίησης DNA
 - ✓ Ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου αριθμού τόπων_Multiplex PCR
 - ✓ Βάσεις δεδομένων
 - ✓ Υπολογιστικά Εργαλεία ανάλυσης μεγάλου όγκου δεδομένων



Ταυτοποίηση του DNA – Ιατροδικαστική (2/2)

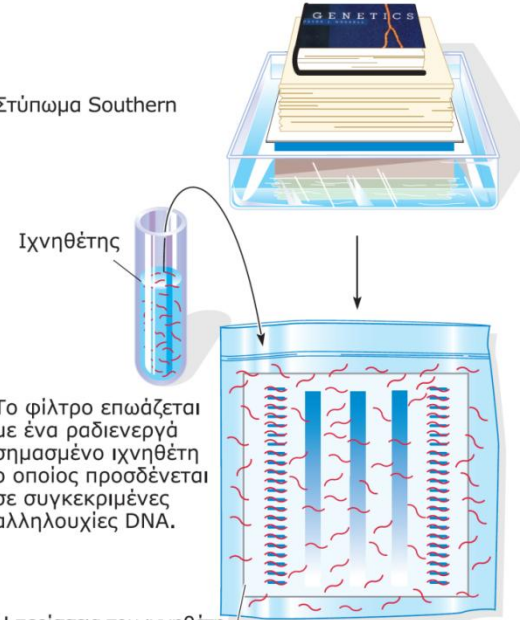
Αναγνώριση συγγένειας-Τεστ πατρότητας

- 1 Απομονώνεται DNA από τη μητέρα, το παιδί και το φερόμενο ως πατέρα και πέπεται με ένα ένζυμο περιορισμού.



- 2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

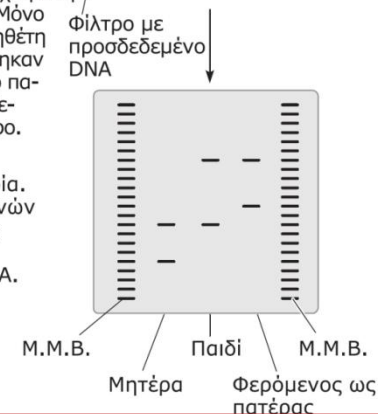
- 3 Στύψωμα Southern



- 4 Το φίλτρο επωάζεται με ένα ραδιενεργό σημασμένο ιχνηθέτη ο οποίος προσδένεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA.

- 5 Η περίσσεια του ιχνηθέτη απομακρύνεται. Μόνο τα μόρια του ιχνηθέτη που υβριδοποιήθηκαν με το DNA-στόχο παραμένουν προσδεδεμένα στο φίλτρο.

- 6 Ακολουθεί αυτοραδιογραφία. Το πρότυπο ζωνών κάθε δείγματος αποτελεί ένα αποτύπωμα DNA.



Εικόνα 10:
Αποτύπωμα με σκοπό τον έλεγχο πατρότητας



Ταυτοποίηση του DNA – Αρχαιογενετική

Ανάλυση μιτοχονδριακού DNA

- ❖ Η καταγωγή του *Homo sapiens*
 - “μιτοχονδριακή Εύα”
 - «- Αδάμ-Υ χρωμοσώματος»

- ❖ Ο άνθρωπος του Neanderthal δεν είναι πρόγονος των ευρωπαίων

- ❖ Η αρχή της γεωργίας στην Ευρώπη



Ταυτοποίηση του DNA – Μοριακή οικολογία

- Πληθυσμιακή γενετική
- Καταγραφή και μελέτη άγριων πληθυσμών
- Μετακινήσεις-επιμιξίες πληθυσμών

<http://faculty.sites.uci.edu/johncavise/files/2011/03/150-sea-turtles.pdf>

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10344-011-0598-7>

<http://mbe.oxfordjournals.org/content/12/3/432.full.pdf>



Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Δροσοπούλου Ελένη.
«Γενετική Μηχανική. Εφαρμογές της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA».
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

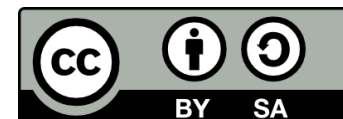


ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

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.

