



# Μοριακή Βιολογία

Ενότητα # (1): Εισαγωγή στην τεχνολογία του DNA

Παναγιωτίδης Χρήστος  
Τμήμα Φαρμακευτικής



# 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.





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΑΝΟΙΚΤΑ  
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ  
ΜΑΘΗΜΑΤΑ



# Εισαγωγή στην τεχνολογία του DNA



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ  
2007-2013  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

# Σκοποί ενότητας

- Να περιγραφεί το αντικείμενο της Μοριακής Βιολογίας.
- Να τονισθεί η σημασία των ενδονουκλεασών περιορισμού στη Μοριακή Βιολογία.
- Να περιγραφούν σημαντικές μοριακές τεχνικές, όπως η ηλεκτροφόρηση του DNA, η κλωνοποίηση, το στύπωμα κατά Southern, η μέθοδος Sanger, η PCR.



# Τι είναι η Μοριακή Βιολογία;

---

- Μοριακή βιολογία είναι η επιστήμη που μελετά την δομή και την έκφραση του γενετικού υλικού.



# Εναύσματα για την ανάπτυξη της σύγχρονης Μοριακής Βιολογίας

- Η δυνατότητα μας να αναλύουμε τη δομή και την έκφραση του γενετικού υλικού (αντικείμενο της μοριακής βιολογίας) είναι ευθεία συνάρτηση της ικανότητας μας:
  - Να «κόβουμε» το DNA σε μικρότερα τμήματα.
  - Να «αρχειοθετούμε» το DNA στο εργαστήριο.
  - Να αναλύουμε την πρωτοταγή δομή του DNA.
  - Να μετράμε την έκφραση των γονιδίων.
  - Να εκφράζουμε τα γονίδια σε ετερόλογα συστήματα είτε για να μελετήσουμε τη λειτουργικότητά τους ή για να παράγουμε μεγάλες ποσότητες των προϊόντων τους.
  - Να ενισχύουμε γενετικό υλικό από απειροελάχιστες ποσότητες.



# DNA μπορεί να απομονωθεί από κύτταρα ή ιστούς ώστε να μελετηθεί

- Το DNA είναι ένα ΤΕΡΑΣΤΙΟ μόριο (ακόμη και το DNA των σχετικά μικρών βακτηριακών γονιδιωμάτων είναι αρκετά μεγάλο) που είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στη μηχανική καταπόνηση, δηλαδή μπορεί πολύ εύκολα να «σπάσει» σε μικρότερα θραύσματα κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών χειρισμών.

## ΕΠΟΜΕΝΩΣ

- Το «κόψιμο» του DNA σε μικρότερα θραύσματα μπορεί να βελτιώσει τη μηχανική του σταθερότητα και να απλοποιήσει το χειρισμό του.





# Πώς μπορούμε να «κόψουμε» το DNA σε μικρότερα θραύσματα

- Με τη χρήση ειδικών ενζύμων.
- **ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΙΣ;**
- **ΝΑΙ, ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΑΥΤΑ ΘΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΔΙΑΣΠΟΥΝ ΤΟ DNA ΠΑΝΤΑ ΣΤΙΣ ΙΔΙΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΕΙΝΑΙ ΕΚ ΤΩΝ ΠΡΟΤΕΡΩΝ ΓΝΩΣΤΕΣ.**



# Ενδονουκλεάσες περιορισμού

- Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες παλινδρομικές αλληλουχίες του DNA και τις διασπούν πάντα στο ίδιο σημείο. Μπορούν να θεωρηθούν σαν «μοριακά ψαλίδια» που κόβουν το DNA.



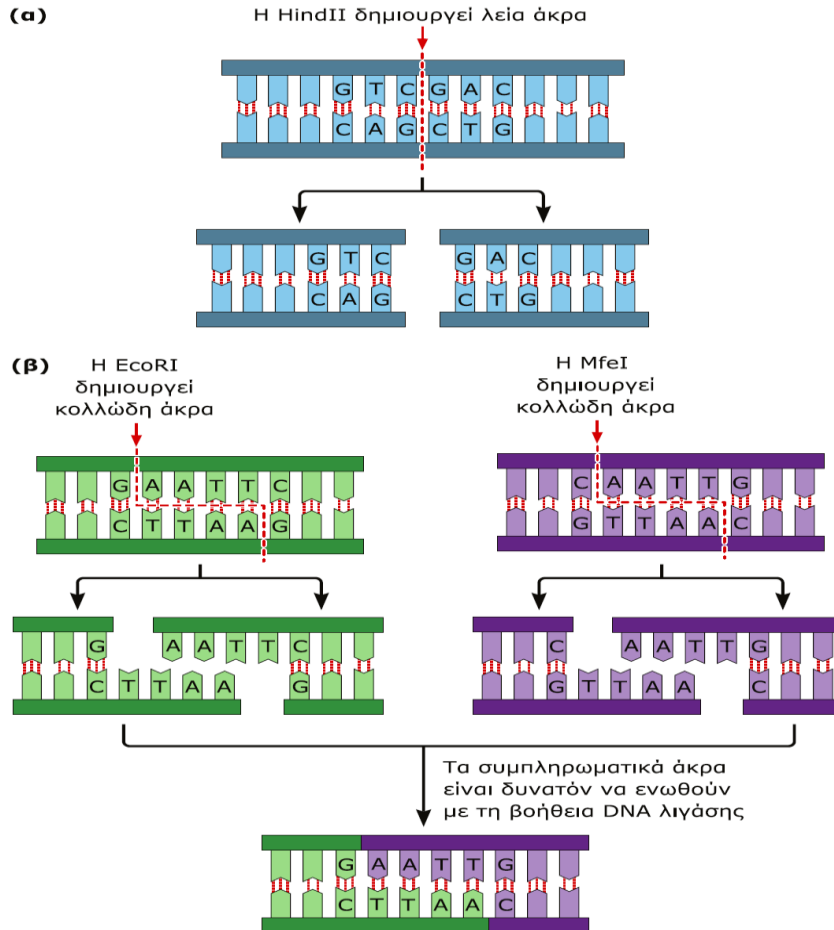
# “Δημοφιλείς” ενδονουκλεάσες περιορισμού

Μικροοργανισμός	Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης	Σημειώσεις
<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeIII	5' ... G G C C... 3' 3' ... C C G G... 5'	1
<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI	5' ... T C G A ... 3' 3' ... A G C T ... 5'	2
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	HhaI	5' ... G C G C ... 3' 3' ... C G C G ... 5'	3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DdeI	5' ... C T N A G ... 3' 3' ... G A N T C ... 5'	4
<i>Moraxella bovis</i>	MboII	5' ... G A A G A (N) <sub>8</sub> ... 3' 3' ... C T T C T (N) <sub>7</sub> ... 5'	5
<i>Escherichia coli</i>	EcoRV	5' ... G A T A T C ... 3' 3' ... C T A T A G ... 5'	1
	EcoRI	5' ... G A A T T C ... 3' 3' ... C T T A A G ... 5'	2
<i>Providencia stuarti</i>	PstI	5' ... C T G C A G ... 3' 3' ... G A C G T C ... 5'	3
<i>Microcoleus</i>	MstII	5' ... C C T N A G G ... 3' 3' ... G G A N T C C ... 5'	4
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	NotI	5' ... G C G G C C G C ... 3' 3' ... C G C C G G C G ... 5'	6

Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



# Παραδείγματα ενδονουκλεασών περιορισμού



Ανασυνδυασμένο DNA.  
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

- Τα ένζυμα περιορισμού παράγουν είτε λεία άκρα είτε κολλώδη άκρα.

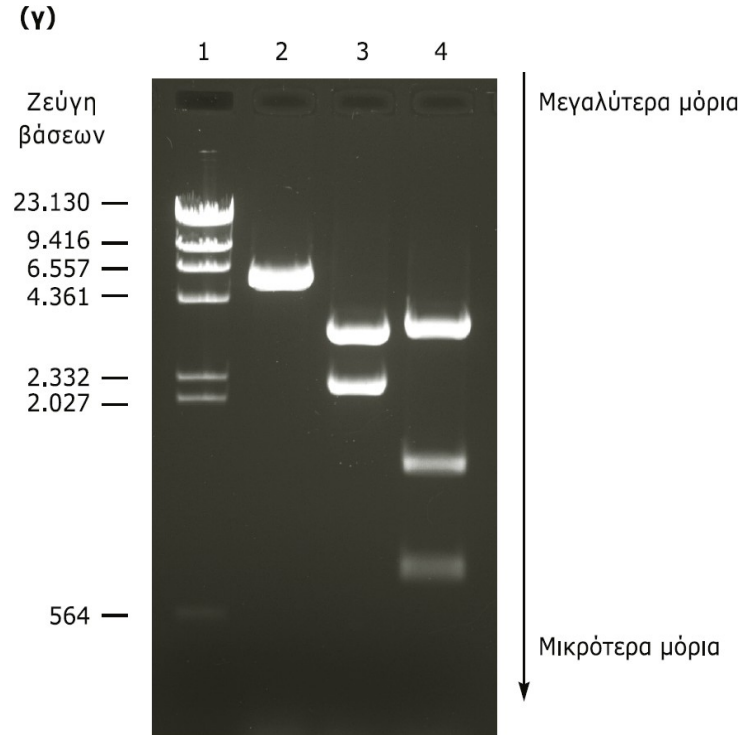
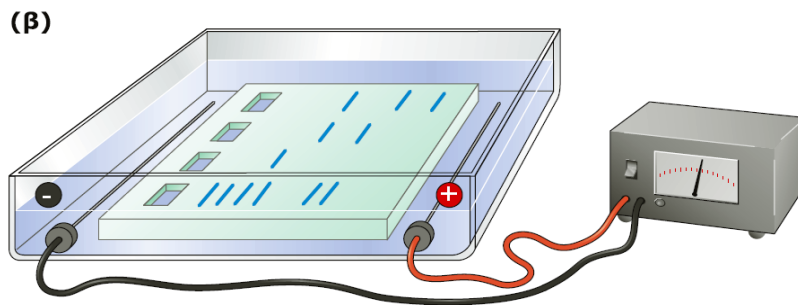
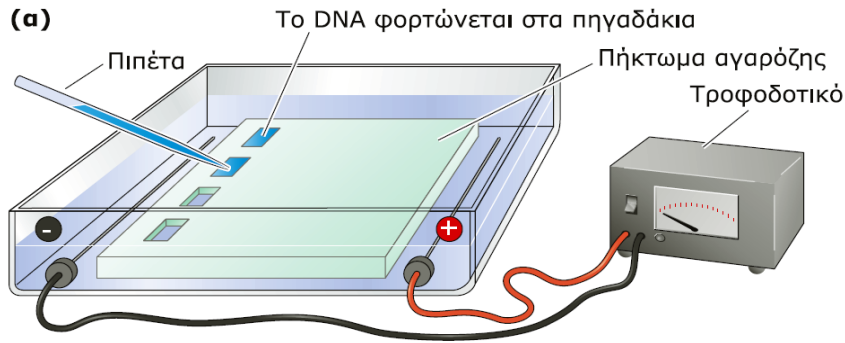


# Από πού προέρχονται οι ενδονουκλεάσες περιορισμού;

- Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού απομονώθηκαν αρχικά από βακτήρια. Είναι συστατικά ενός μηχανισμού άμυνας των βακτηρίων ενάντια σε εισβολή ξένου γενετικού υλικού, π.χ. από μόλυνση με κάποιον βακτηριοφάγο.
- Γιατί οι ενδονουκλεάσες περιορισμού δεν διασπούν και το DNA του βακτηρίου που τα παράγει;
- ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΤΟ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΕΙ ΑΠΟ ΠΕΨΗ ΑΠΟ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ.



# Ηλεκτροφορητική ανάλυση των θραυσμάτων του DNA



Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

Διαχωρισμός μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα.



# ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ : Η «αρχαιοθήτηση» του DNA στο εργαστήριο



# Φορείς κλωνοποίησης - Τα πλασμίδια



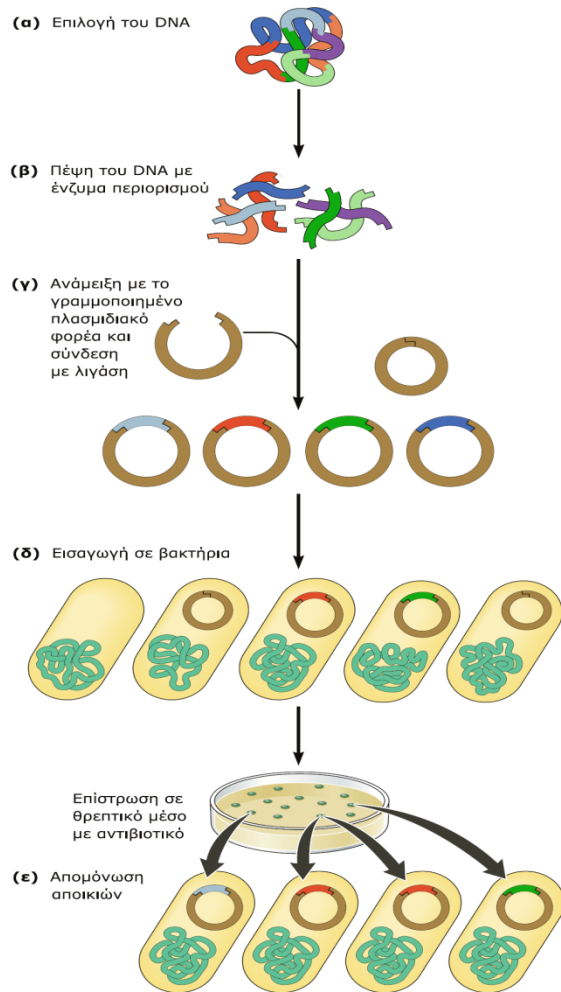
- Φωτογραφία του πλασμιδίου pSC101 στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.





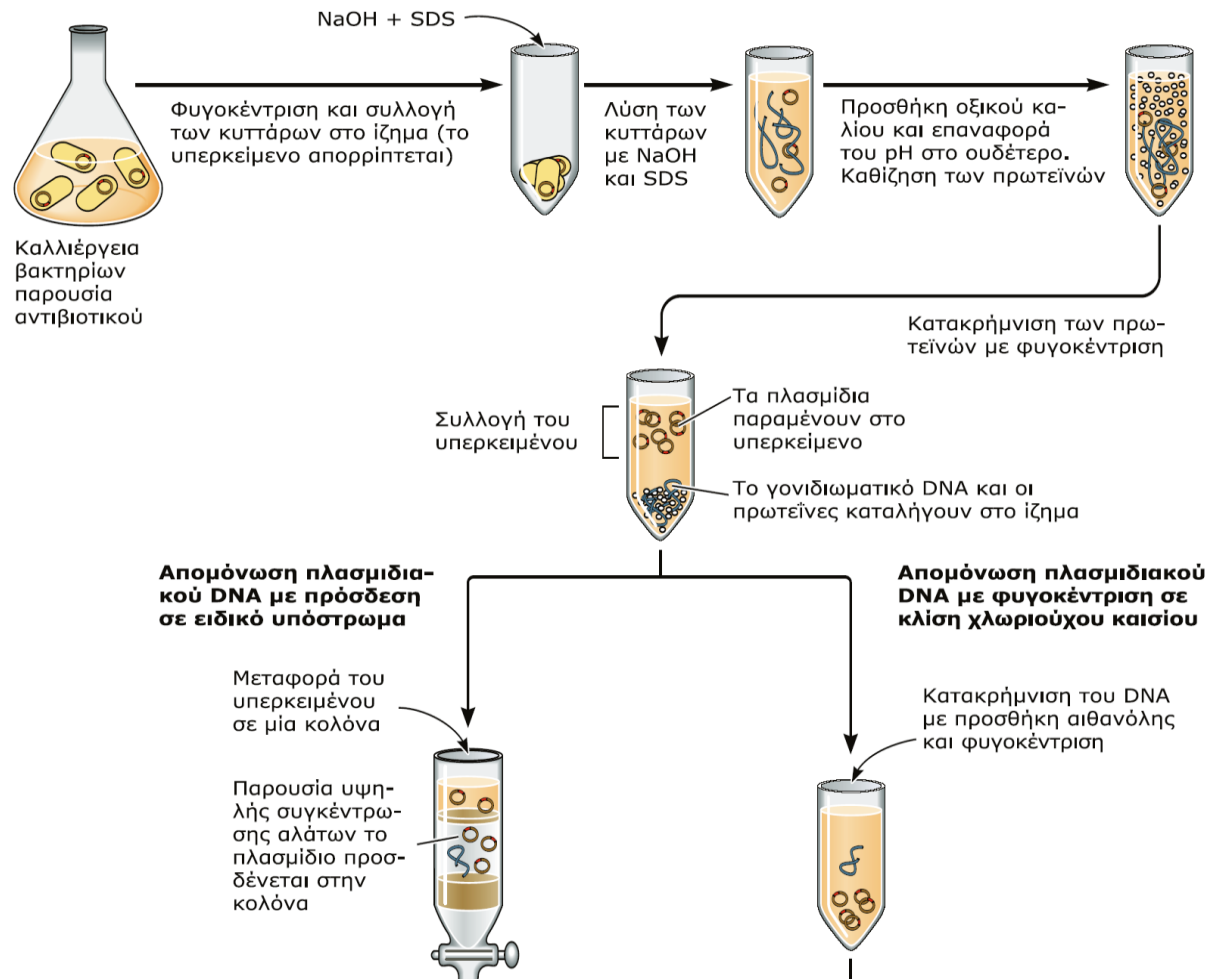
# Η διαδικασία της Κλωνοποίησης



- Τα πέντε βασικά βήματα της κλωνοποίησης DNA σε πλασμίδιο.

Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

# Πολλαπλασιασμός των αντιγράφων ενός γονιδίου με κλωνοποίηση



- Μετά από λύση βακτηρίων μπορούν να απομονωθούν πολλά αντίγραφα πλασμιδιακού DNA.

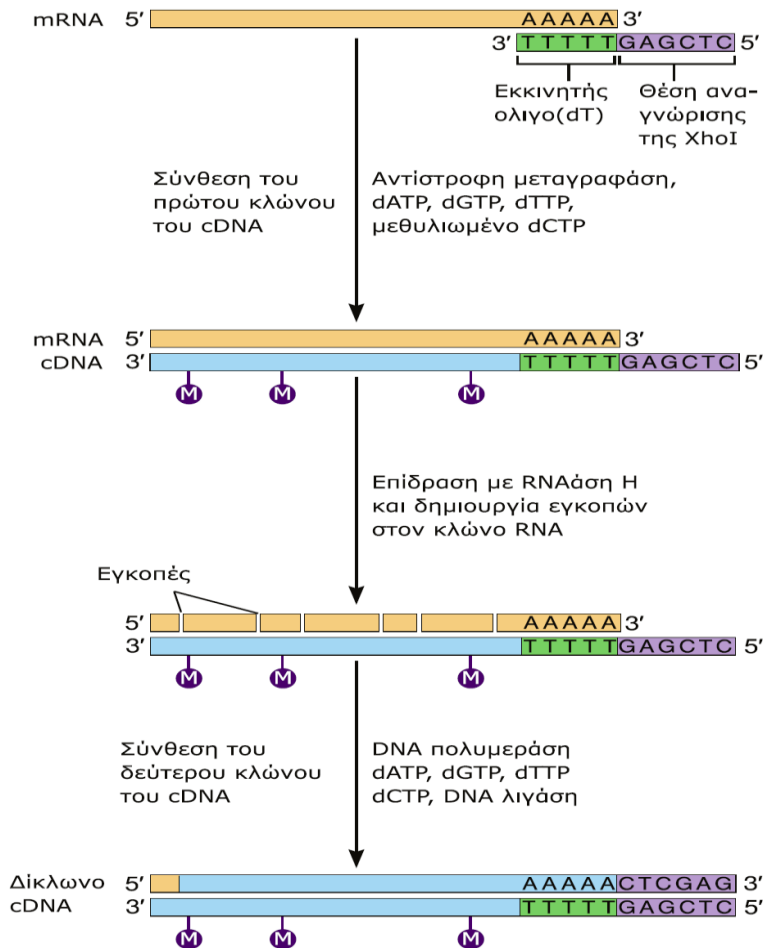
Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

# Απαραίτητες ιδιότητες ενός πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης

- 1) Αλληλουχίες έναρξης αντιγραφής (ORI).
- 2) Γονίδιο που επιτρέπει εύκολη επιλογή (π.χ. Αντίσταση σε αντιβιοτικό).
- 3) Αλληλουχίες που επιτρέπουν κοπή από αρκετές ενδονουκλεάσες περιορισμού (polylinker).
- 4) Έναν υποκινητή που να επιτρέπει ρυθμιζόμενη έκφραση.



# Διαδικασία παρασκευής cDNA



- Σύνθεση cDNA.

Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



# 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

Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

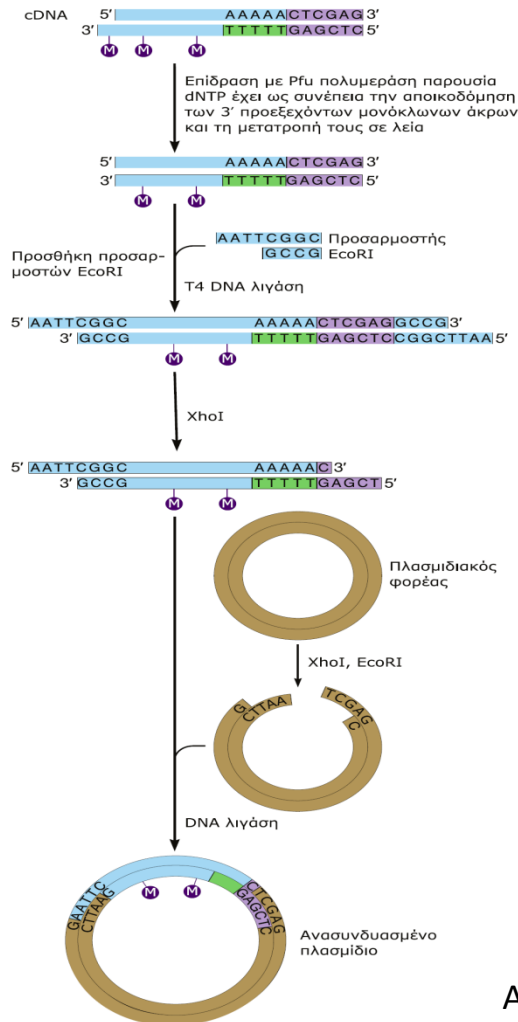




ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

**Βιβλιοθήκες DNA μπορούν να  
κατασκευασθούν και σε φάγους**

# Προσανατολισμένη κλωνοποίηση του δίκλωνου cDNA

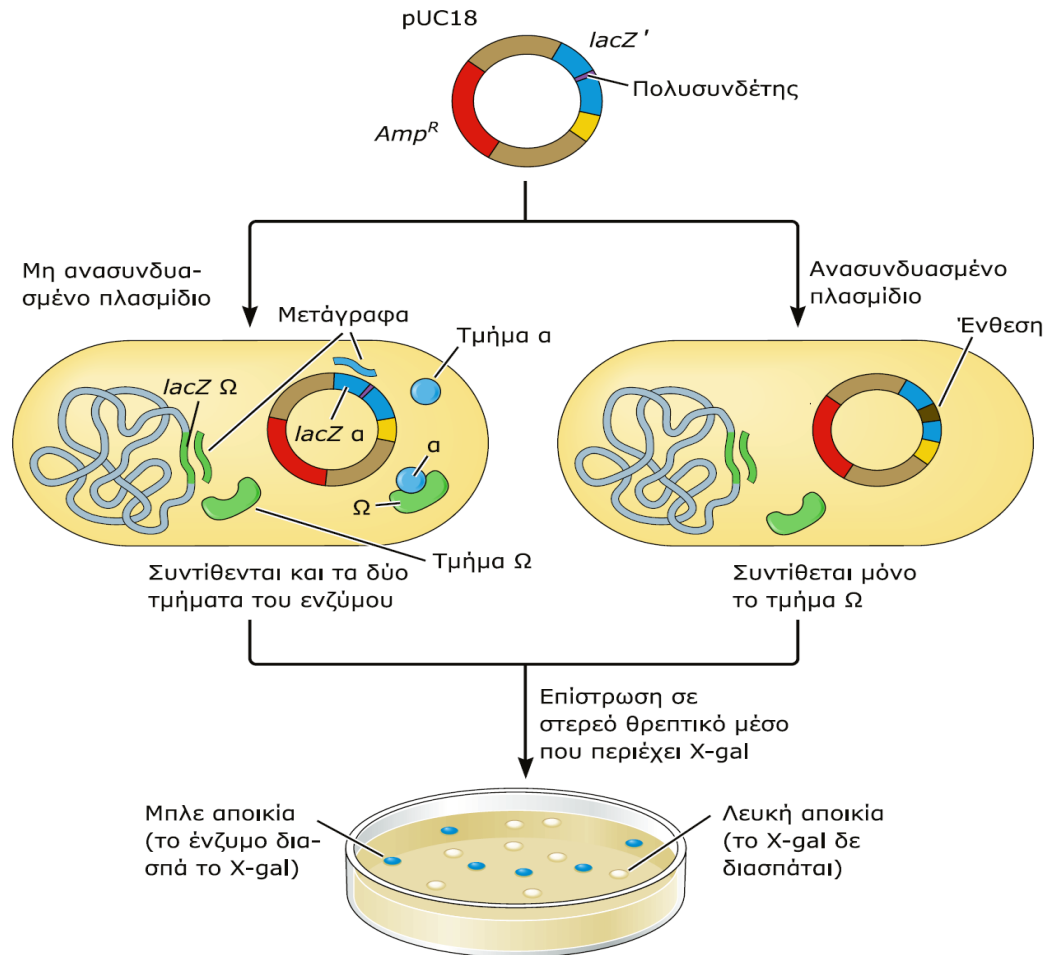


- Προσανατολισμένη κλωνοποίηση του δίκλωνου cDNA σε πλασμιδιακό φορέα.

Ανασυνδυασμένο DNA.  
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



# Διάκριση μπλε-λευκών αποικιών για εντοπισμό ανασυνδυασμένων φορέων



Αναςυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

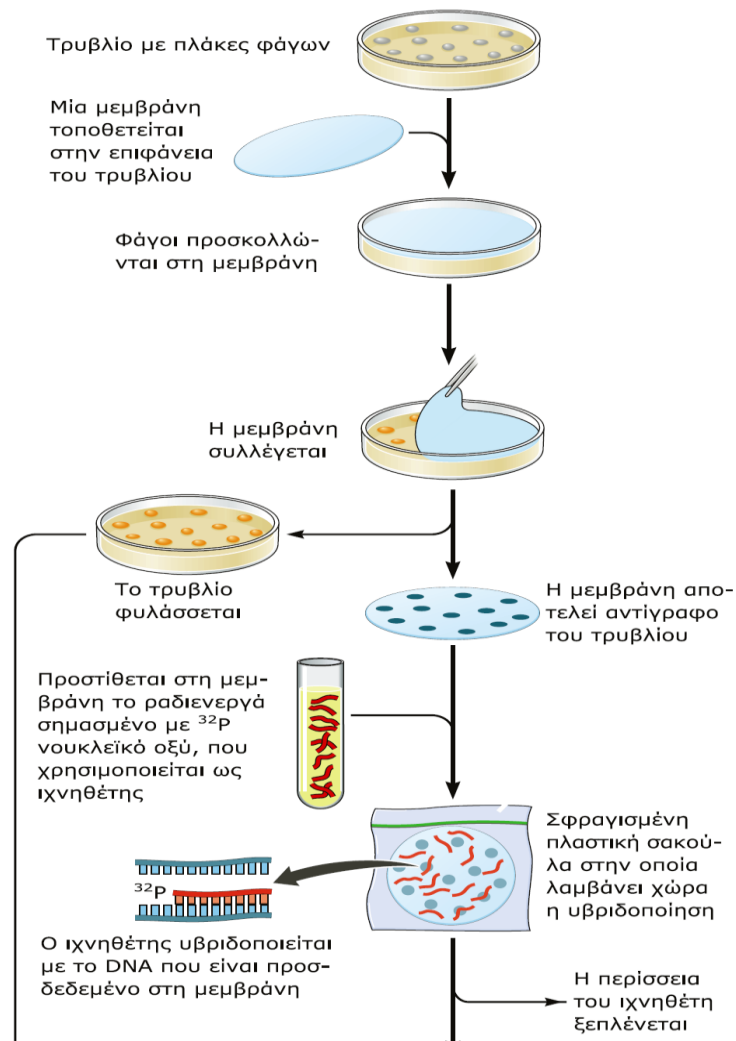






ΠΩΣ ΜΠΟΡΟΥΜΕ ΝΑ  
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΟΥΜΕ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΠΟΥ  
ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ **ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥΣ**  
ΦΟΡΕΙΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΠΟ ΑΥΤΕΣ  
ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ «ΑΔΕΙΟΥΣ»  
ΦΟΡΕΙΣ;

# Ταυτοποίηση αποικιών που περιέχουν θετικούς κλώνους με υβριδισμό (1)

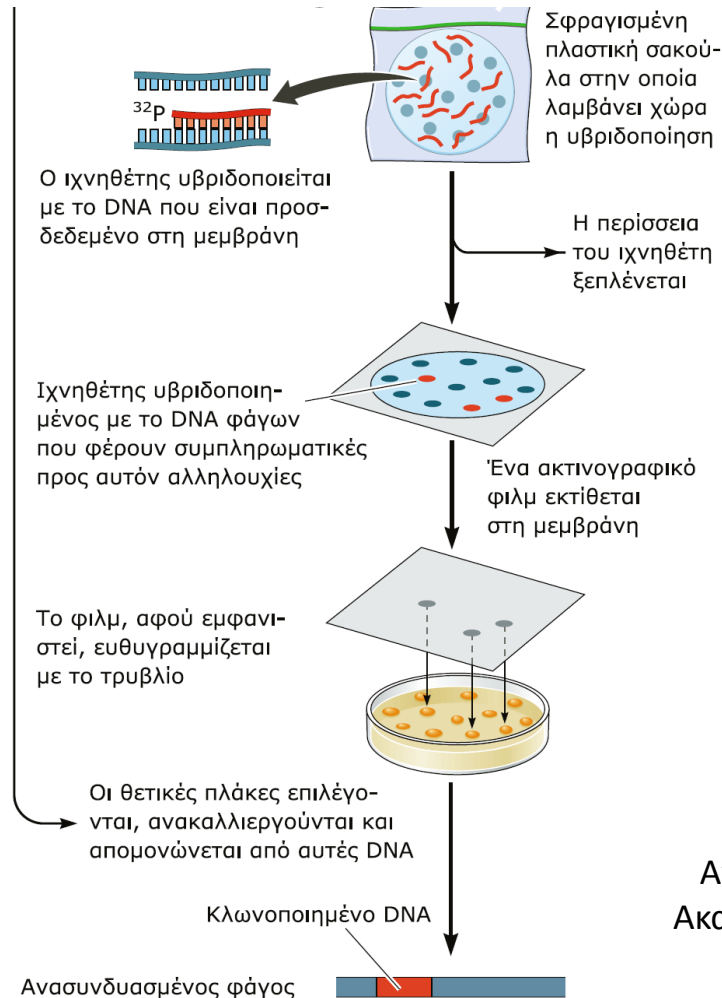


- Σάρωση μιας βιβλιοθήκης για τον εντοπισμό του επιθυμητού κλώνου με ιχνηθέτη νουκλεϊκό οξύ.

Ανασυνδυασμένο DNA.  
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



# Ταυτοποίηση αποικιών που περιέχουν θετικούς κλώνους με υβριδισμό (2)



- Σάρωση μιας βιβλιοθήκης για τον εντοπισμό του επιθυμητού κλώνου με ιχνηθέτη νουκλεϊκό οξύ.

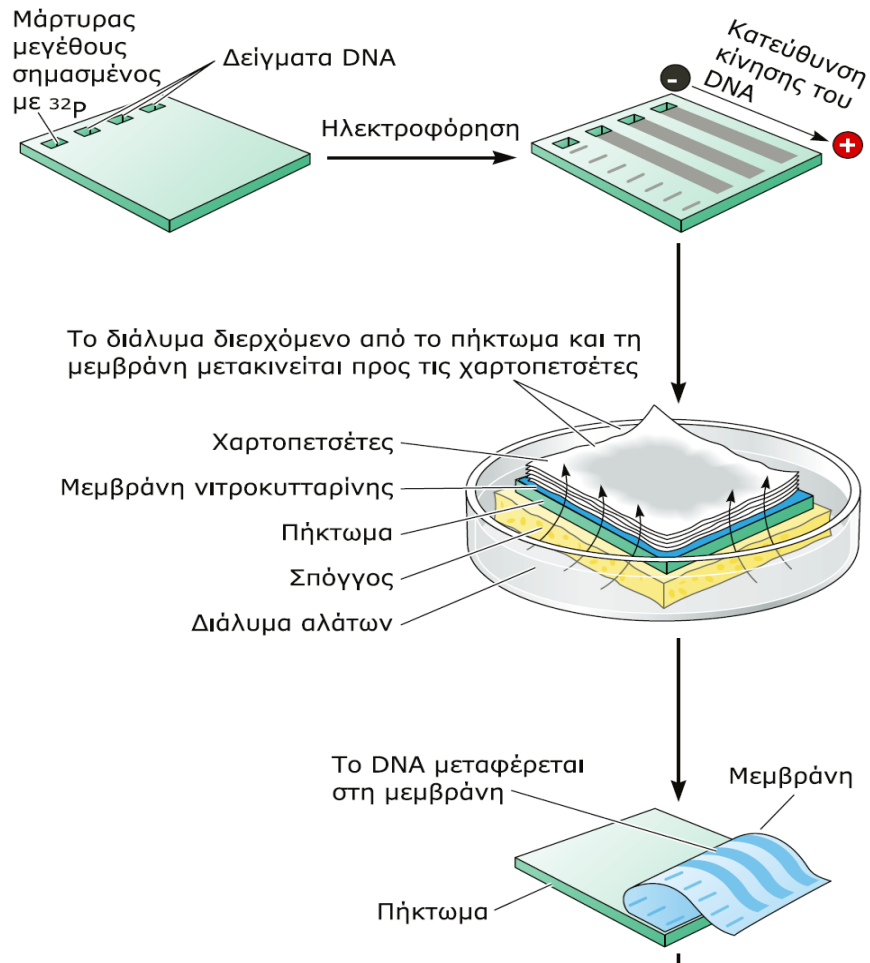
Ανασυνδυασμένο DNA.  
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.





ΠΩΣ ΜΠΟΡΟΥΜΕ  
ΝΑ ΕΠΙΤΥΧΟΥΜΕ ΤΗΝ  
ΑΝΑΛΥΣΗ/ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ  
ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ  
DNA  
(πριν την κλωνοποίηση ή και μετά);

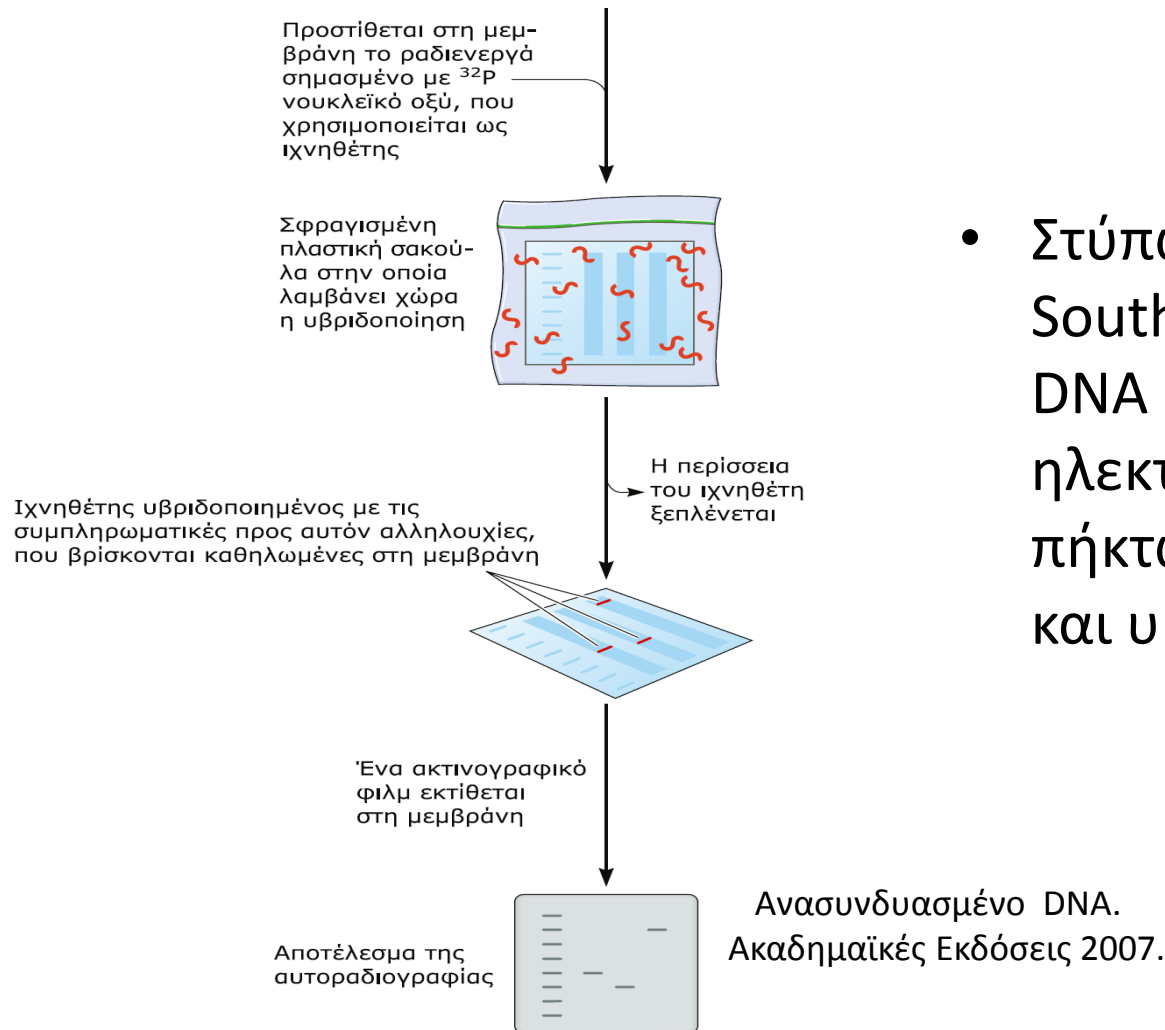
# Στύπωμα κατά Southern (1)



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

Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

# Στύπωμα κατά Southern (2)

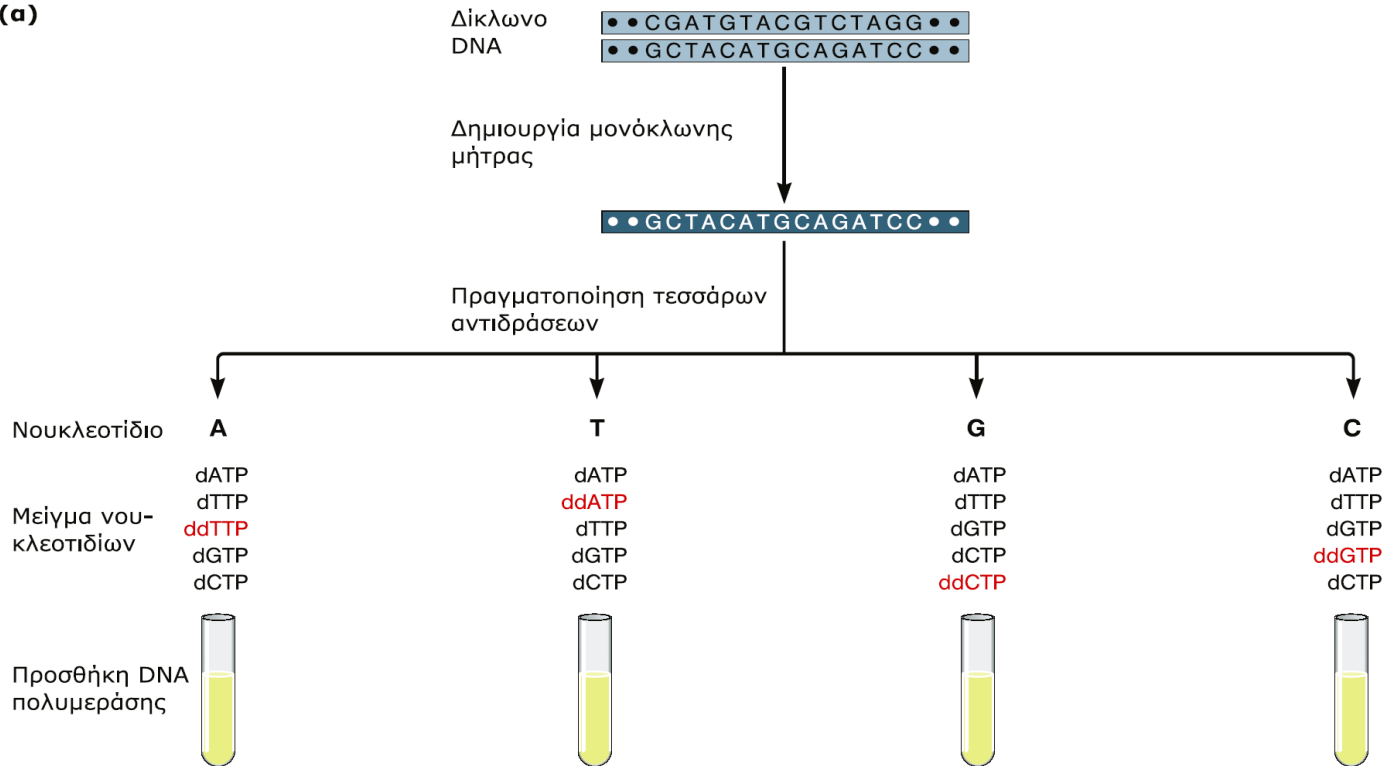


- Στύπωμα κατά Southern: ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα, στύπωμα και υβριδοποίηση.



# Η μέθοδος του Sanger (1)

(α)

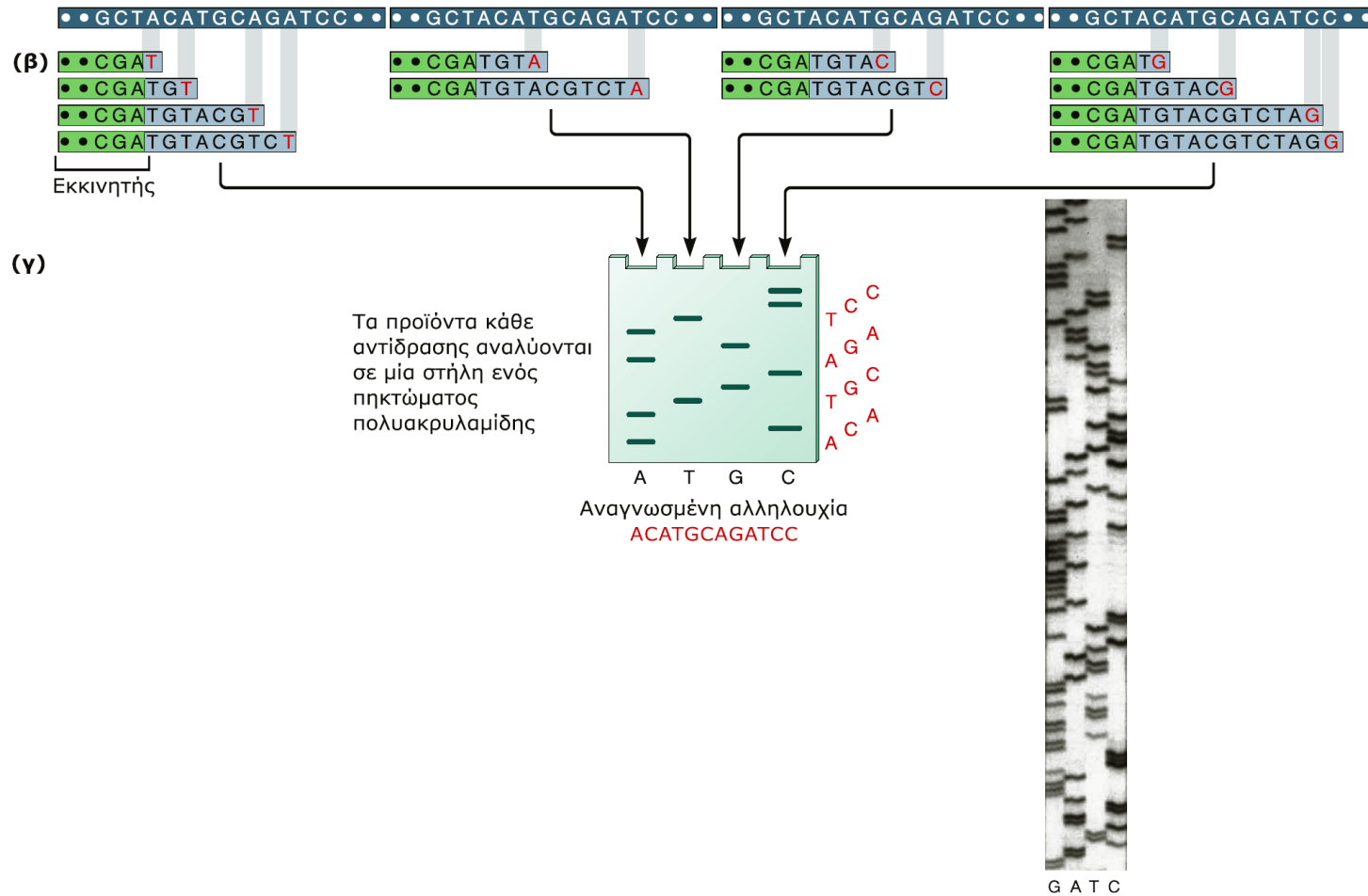


Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

- Η διαδικασία αλληλούχησης DNA με τη μέθοδο του Sanger που βασίζεται στη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων.



# Η μέθοδος του Sanger (2)



Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



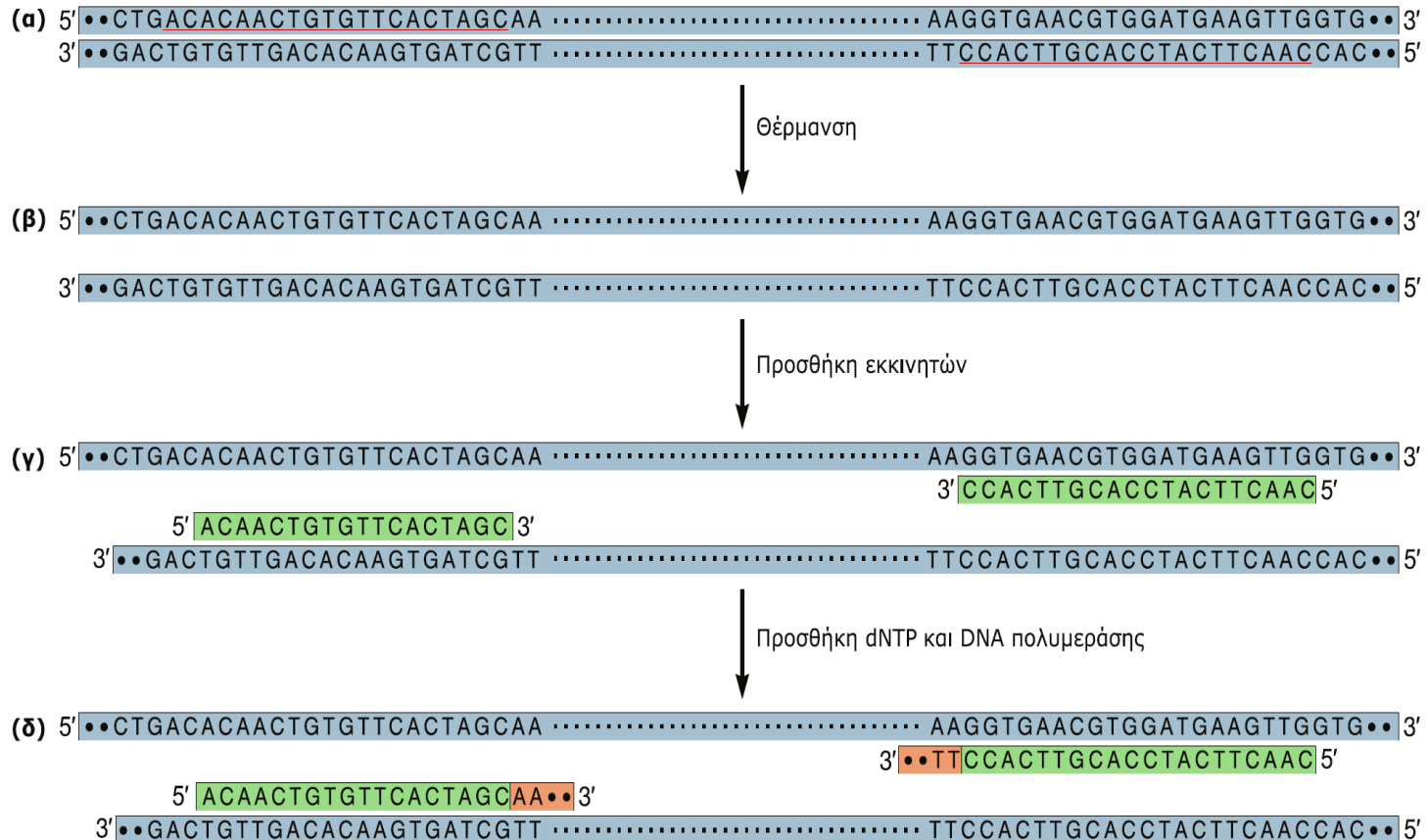




ΤΙ ΚΑΝΟΥΜΕ ΟΤΑΝ ΤΟ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ  
ΥΛΙΚΟ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟ ΣΕ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ  
ΙΚΑΝΕΣ ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ;

- ΦΤΙΑΧΝΟΥΜΕ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΟ ΜΕ ΤΗ  
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ **ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ**  
**ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).**

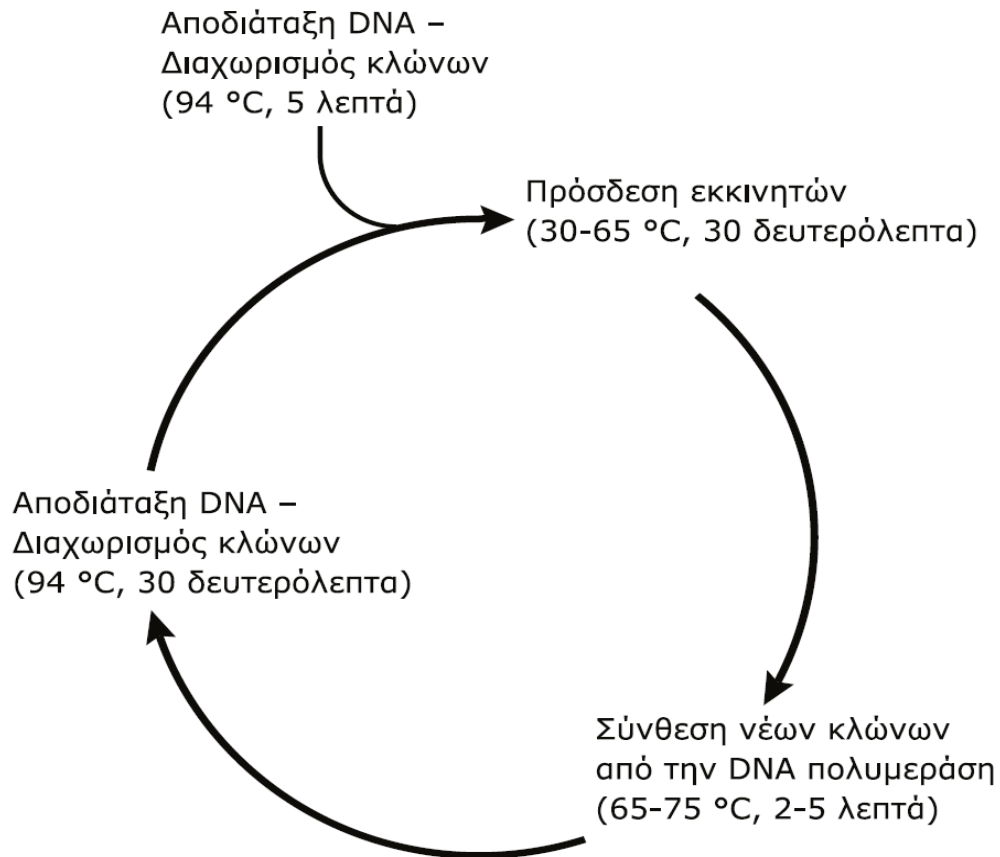
# PCR – Η ενίσχυση του DNA in vitro



Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



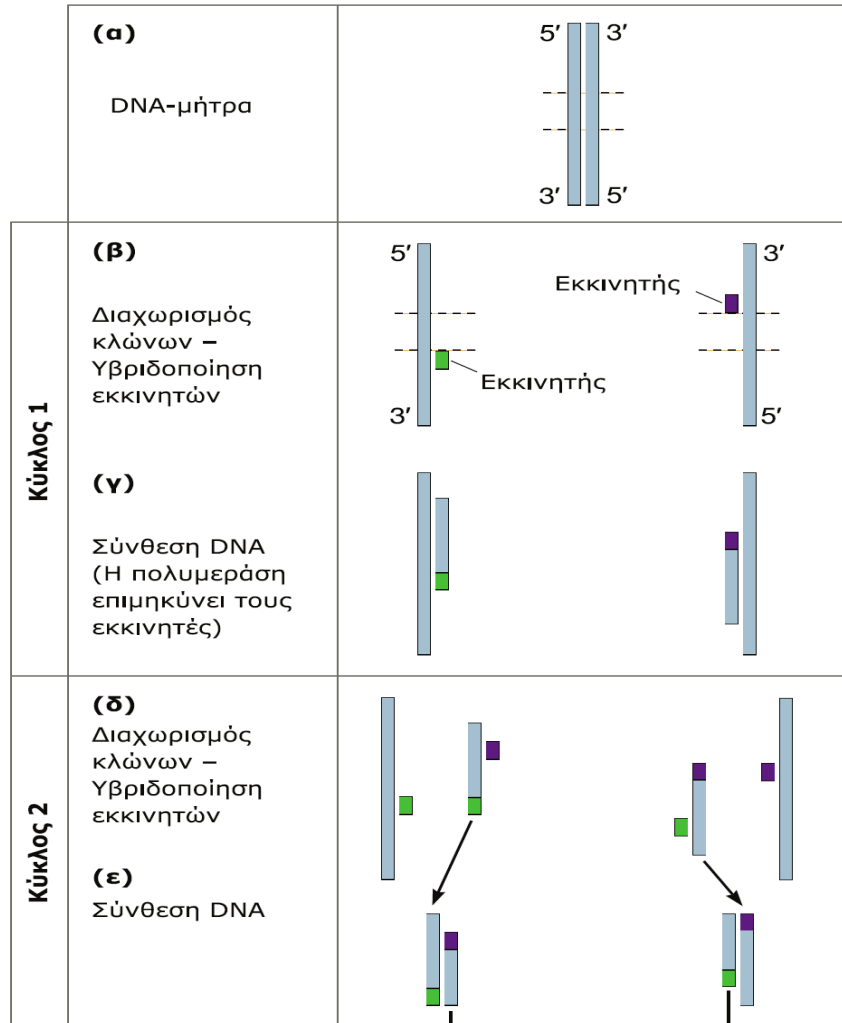
# Ο κύκλος της τεχνικής PCR



Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



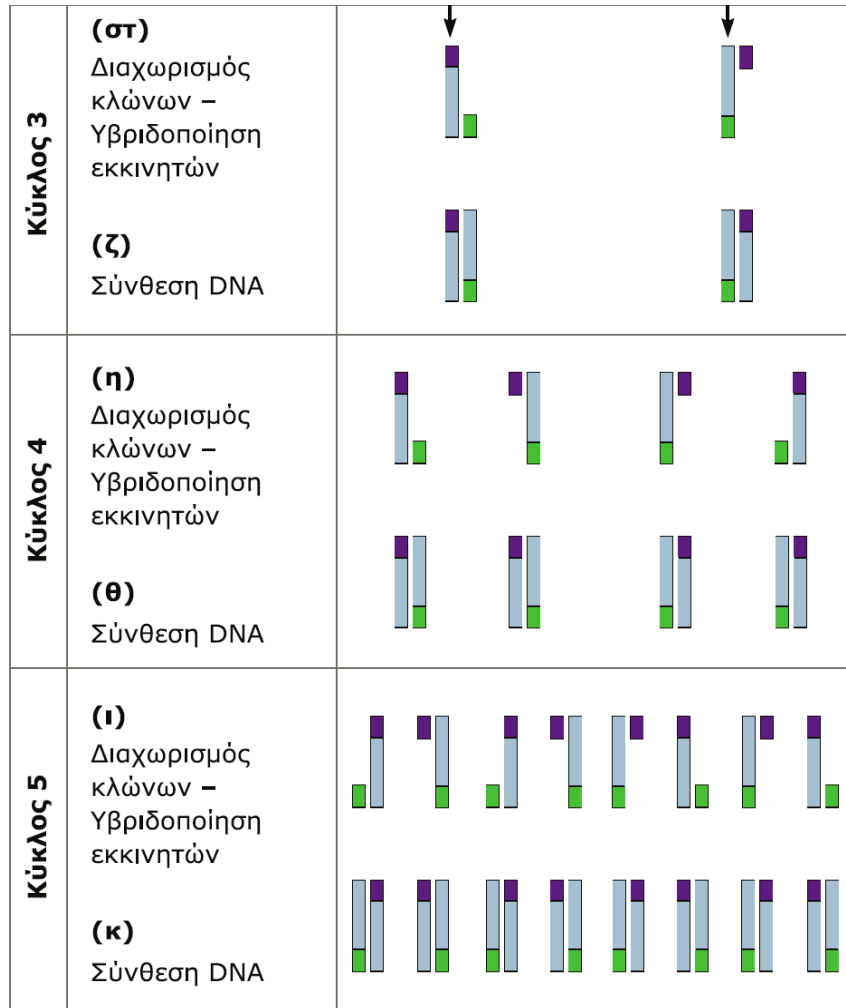
# Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων του DNA κατά την PCR (1)



Ανασυνδυασμένο DNA.  
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



# Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων του DNA κατά την PCR (2)



Ανασυνδυασμένο DNA.  
 Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



# Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων του DNA κατά την PCR (3)

Αριθμός κύκλου	Αριθμός δίπλωνων μορίων-στόχων
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1.024
13	2.048
14	4.096
15	8.192
16	16.384
17	32.768
18	65.536
19	131.072
20	262.144
21	524.288
22	1.048.576
23	2.097.152
24	4.194.304
25	8.388.608
26	16.777.216
27	33.554.432
28	67.108.864
29	134.217.728
30	268.435.456
31	536.870.912
32	1.073.741.824

Ανασυνδυσασμένο DNA.  
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

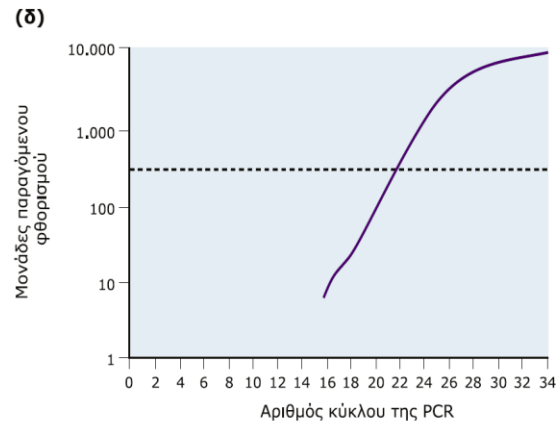
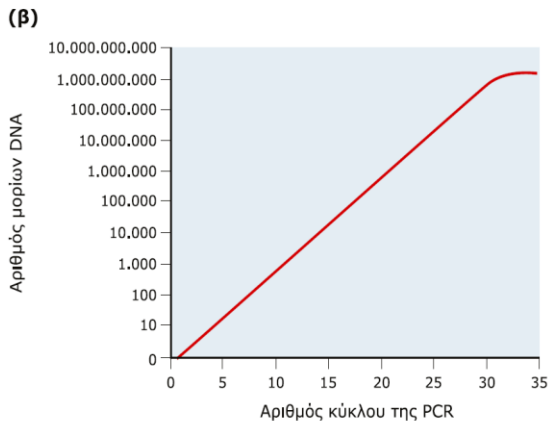
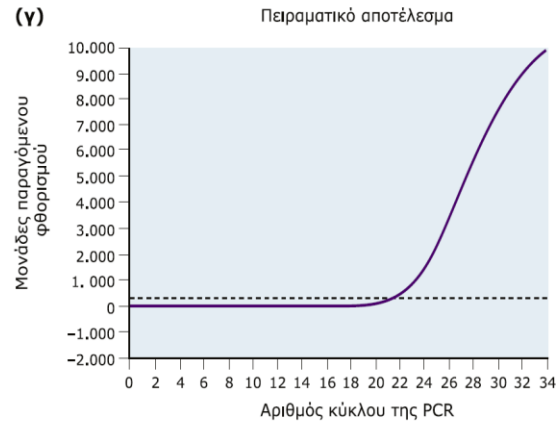
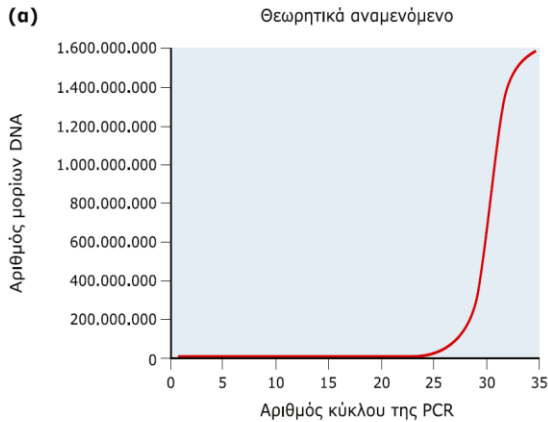


# Μοριακή διαγνωστική με PCR

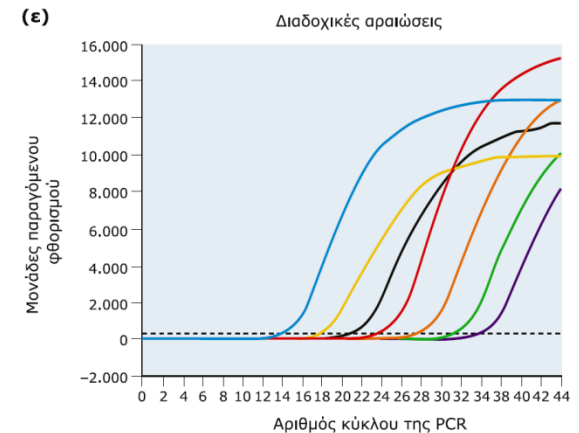
- Μοριακή διαγνωστική με PCR χρησιμοποιείται :
  - Στην ιατροδιαστική.
  - Στην ανίχνευση HIV (με RT-PCR).
  - Στη μοριακή διαγνωστική μιάς ιογενούς κτηνιατρικής νόσου (χρήση RT-PCR με πολλαπλούς εκκινητές).



# Η PCR πραγματικού χρόνου



- Χρήση της PCR πραγματικού χρόνου για τη μέτρηση της ποσότητας των μορίων-στόχων που περιέχει ένα δείγμα.



Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

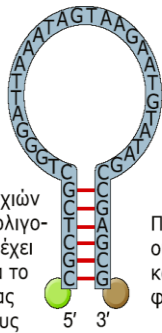




# Μοριακοί φάροι για την PCR πραγματικού χρόνου

(α)

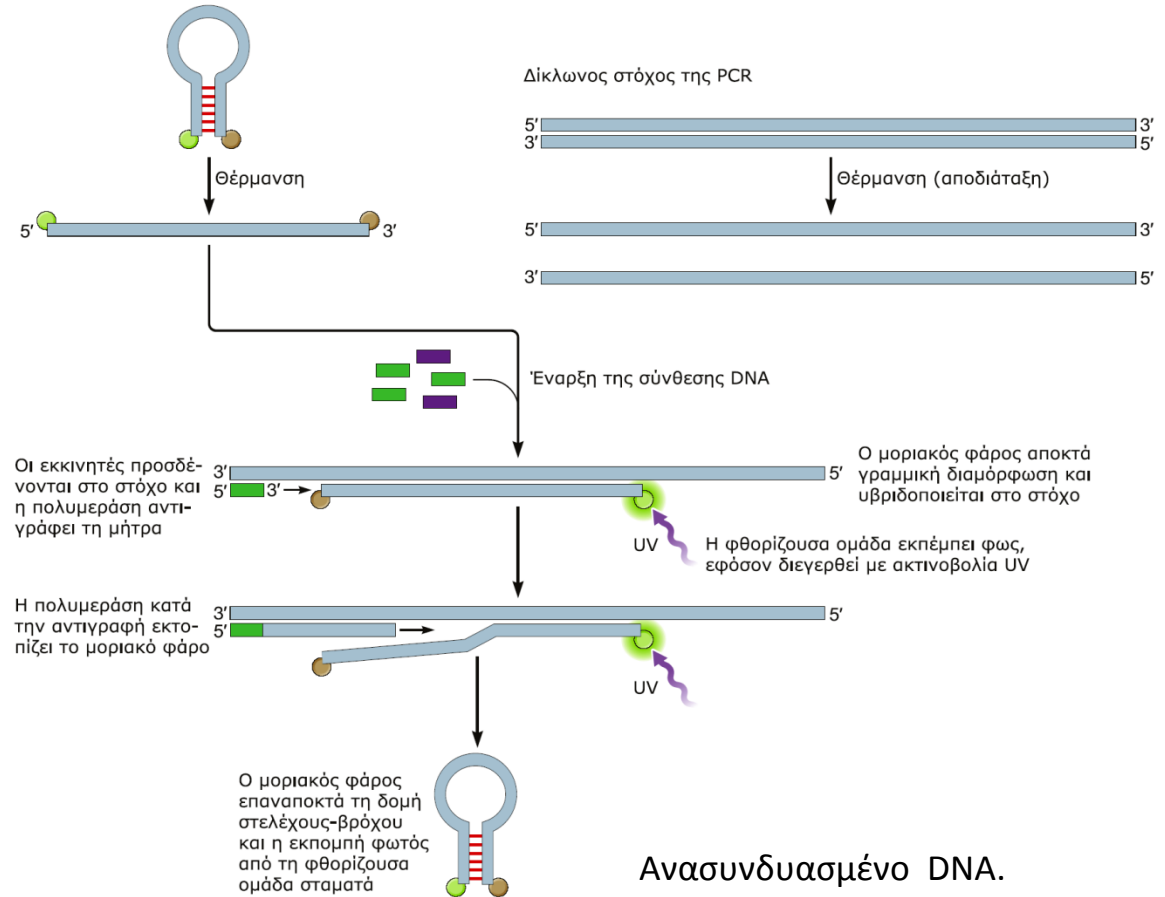
Η παρουσία συμπληρωματικών αλληλουχιών στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας δομής στελέχους-βρόχου



Οι αλληλουχίες του βρόχου είναι συμπληρωματικές με μία εσωτερική περιοχή του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος

Προσαρτάται μία φθορίζουσα ουσία στο 5' άκρο του ιχνηθέτη και μία ουσία απορρόφησης φθορισμού στο 3' άκρο του

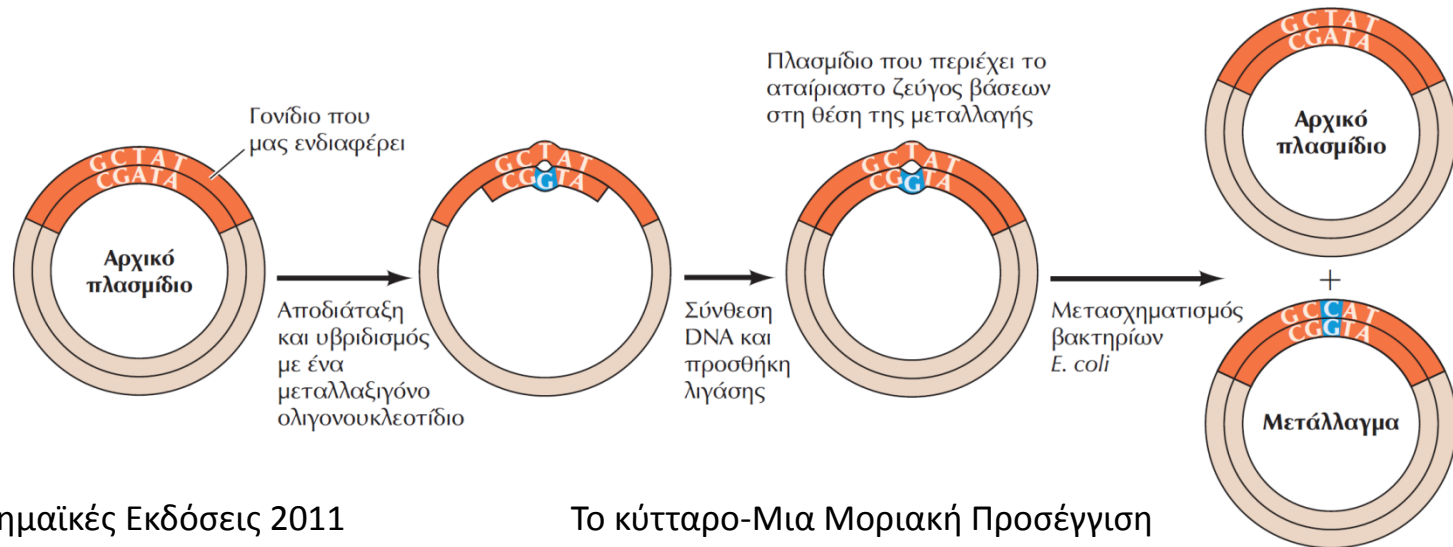
(β)



Ανασυνδυασμένο DNA.  
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



# Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω ολιγονουκλεοτιδίου



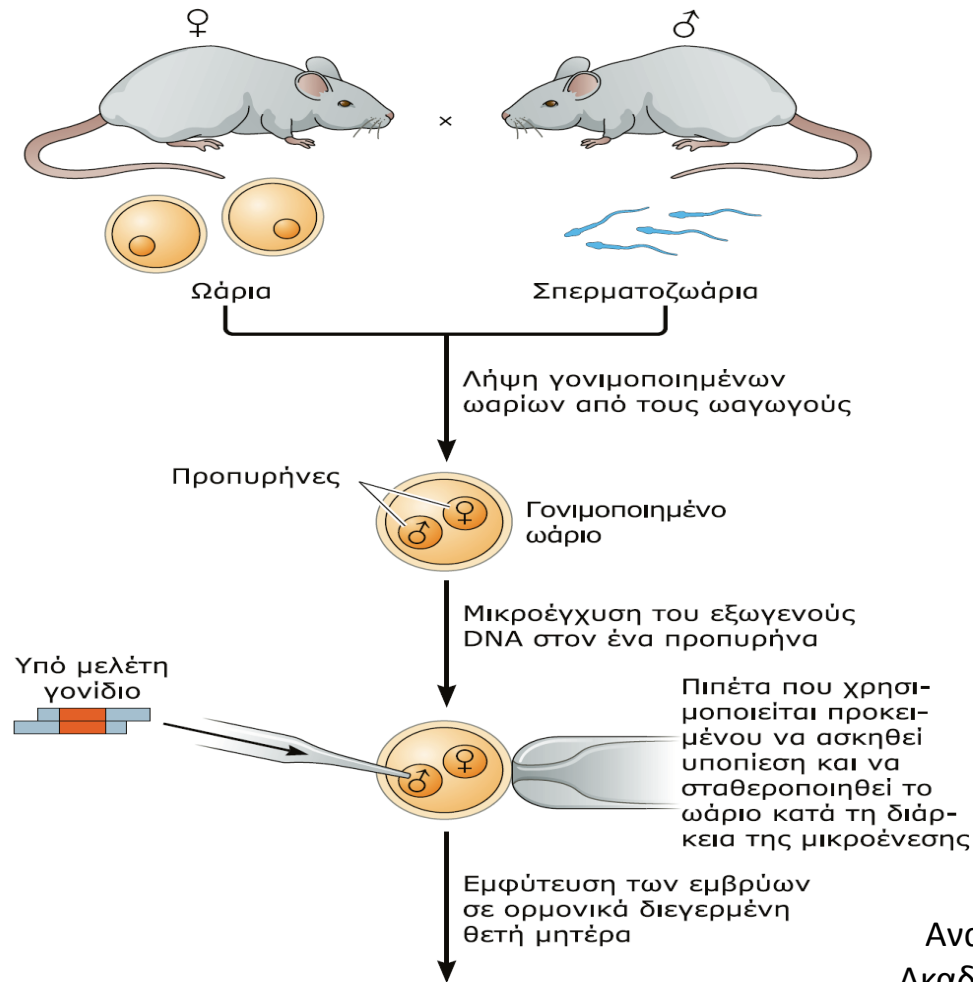
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011

Το κύτταρο-Μια Μοριακή Προσέγγιση

- Ένα ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει την επιθυμητή μεταλλαγή (στο παράδειγμα αυτό την αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου) λειτουργεί ως εκκινητής για τη σύνθεση DNA, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον ένα κλώνο ενός πλασμιδίου.
- Η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα κυκλοποιείται με επώαση με DNA λιγάση. Έτσι, παράγονται πλασμίδια στα οποία η μία αλυσίδα έχει τη φυσιολογική αλληλουχία ενώ η άλλη αλυσίδα έχει τη μεταλλαγμένη αλληλουχία.
- Όταν τα πλασμίδια αυτά εισαχθούν στην *E. coli*, από την αντιγραφή τους προκύπτει ένα μεικτός πληθυσμός που αποτελείται τόσο από τα αρχικά όσο και από τα μεταλλαγμένα μόρια.



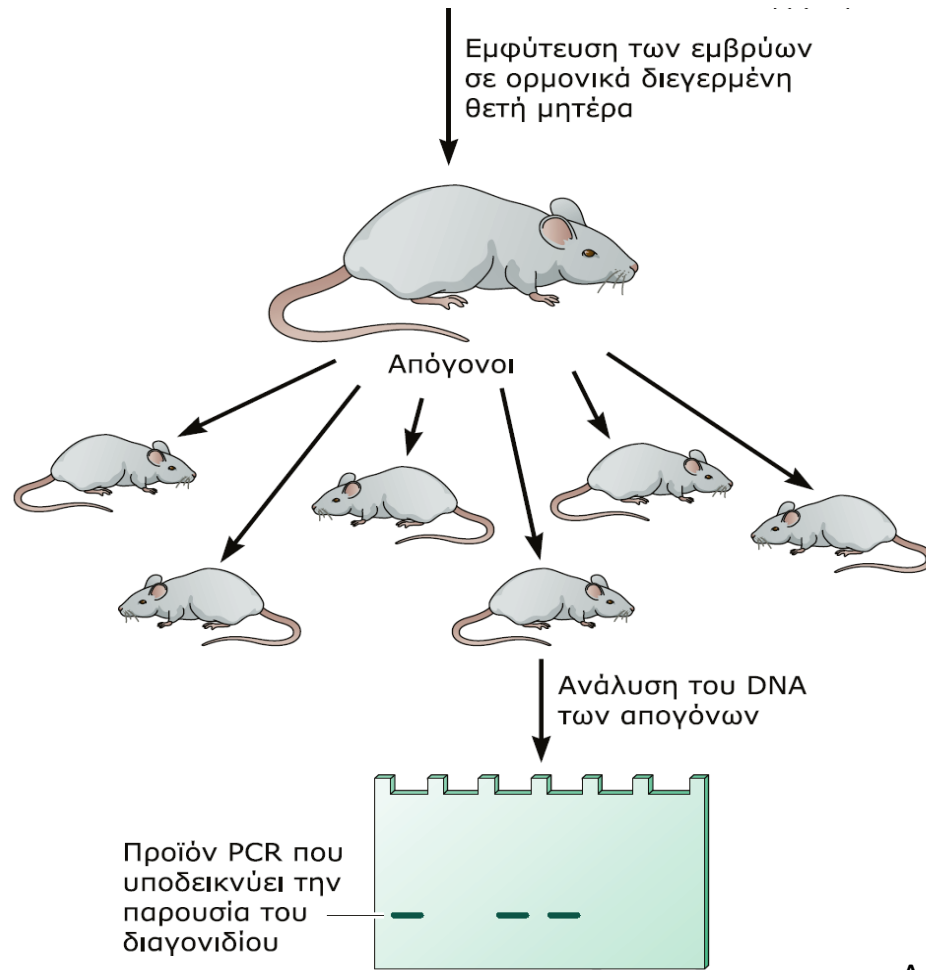
# Κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών (1)



Ανασυνδρασμένο DNA.  
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



# Κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών (2)



Ανασυνδυασμένο DNA.  
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



# Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, **Παναγιωτίδης Χρήστος**. «**Μοριακή Βιολογία. Εισαγωγή στην τεχνολογία του DNA**». Έκδοση: 1.0. Θεσσαλονίκη 2014. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://opencourses.auth.gr/courses/OCRS496/>



# 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.

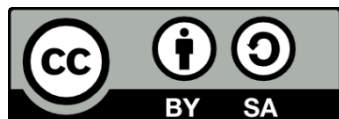
[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>





# Τέλος ενότητας

Επεξεργασία: Τσαχουρίδου Βασιλική  
Θεσσαλονίκη, Σεπτέμβριος 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ