



# ΕΙΔΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

## Ενότητα 6<sup>η</sup>: Μηχανήματα Λειτουργικής Γονιδιωματικής

Τριανταφυλλίδης Α  
Τμήμα Βιολογίας



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

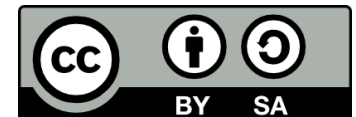


ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

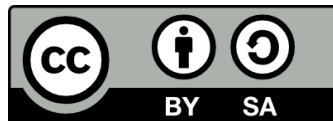


ΕΣΠΑ  
2007-2013  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



# 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 για την παραχώρηση του δικαιώματος χρήσης των εξής εικόνων της παρούσης παρουσίασης:

Εικόνες: 1, 7, 9-11

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

- Λειτουργική Γονιδιωματική - Εισαγωγή
- Μηχανήματα αλληλούχισης πρώτης γενιάς
- Μηχανήματα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς
- Μηχανήματα αλληλούχισης τρίτης γενιάς
- Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχισης
- Συστοιχίες DNA
- Φασματογράφος μαζών



# Λειτουργική Γονιδιωματική (1/3)

Ελπίδες να κατανοήσουμε:

- τη λειτουργία και ρύθμιση όλων των γονιδίων και των πρωτεϊνών,
- αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών λειτουργίας των κυττάρων,
- προσδιορισμό των μηχανισμών δημιουργίας ασθενειών, και
- αποκάλυψη τρόπων να παρέμβουμε για να παρεμποδίσουμε ανώμαλες κυτταρικές λειτουργίες για να βελτιωθεί η υγεία του ανθρώπου και η ποιότητα ζωής.

## Επόμενη βιολογική επανάσταση

Χρειάζεται να γίνει γνωστή η λειτουργία 2500 γονιδίων για να κατανοηθεί το προκαρυωτικό γονιδίωμα



# Λειτουργική Γονιδιωματική (2/3)

Η ανάγκη για συνολικές αναλύσεις οδήγησε στην ανάπτυξη ισχυρών πλατφόρμων (**high-throughput platforms**).

Μια γονιδιωματική πλατφόρμα υψηλής ανάλυσης περιλαμβάνει

- αυτόματα μηχανήματα για παραγωγή τμημάτων DNA για αλληλούχηση,
- αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας
- και πλήθος υπολογιστικών μεθόδων για να συλλεχθούν και να επεξεργασθούν τα δεδομένα



# Λειτουργική Γονιδιωματική (3/3)

Τα μηχανήματα που πραγματικά παράγουν πλήθος δεδομένων είναι τα εξής:

- Ο αυτόματος αναλυτής αλληλουχιών (**sequencer**)
- Οι DNA μικροσυστοιχίες (**DNA arrays**)
- Ο φασματογράφος μαζών (**mass spectrometer**)

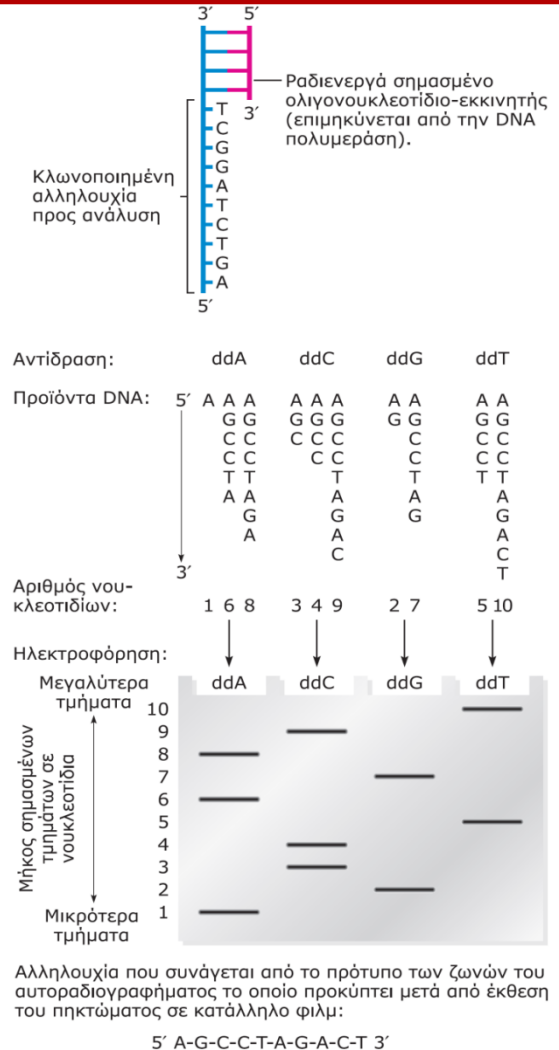




# Μηχανήματα αλληλούχισης πρώτης γενιάς (1/5)

## Εικόνα 1: Μέθοδος εύρεσης αλληλουχίας κατά Sanger

Μια μέθοδος που χρησιμοποιεί  
διδεοξυνουκλεοτίδια



<http://www.youtube.com/watch?v=oYpIIBlOqF8>



# Μηχανήματα αλληλούχισης πρώτης γενιάς (2/5)

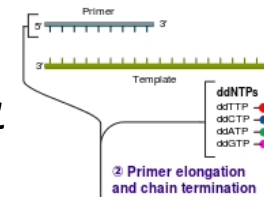
## Στάδιο 1

Η DNA πολυμεράση συνθέτει έναν συμπληρωματικό κλώνο ξεκινώντας από έναν εκκινήτη

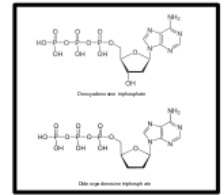
4 διαφορετικές αντιδράσεις, όπου καθμία περιλαμβάνει ένα διδεοξυ-ανάλογο των 4 νουκλεοτιδίων G, A, C, και T ανεμιγμένα με κανονικά νουκλεοτίδια. Τερματίζονται περίπου το 0,5% των αυξανόμενων αλληλουχιών

Επισήμανση των 4 αντιδράσεων με **4 φθορίζουσες χρωστικές** συνδεδεμένες με τους εκκινήτες ή με τα διδεοξυ-νουκλεοτίδια

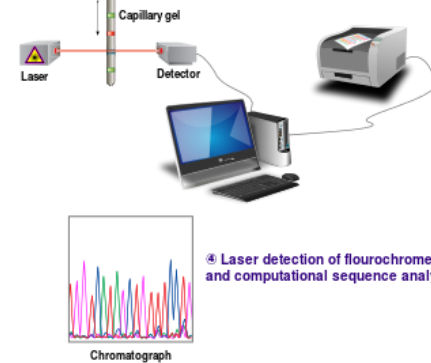
- ① Reaction mixture
- Primer and DNA template
  - DNA polymerase
  - ddNTPs with fluorochromes
  - dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



## Στάδιο 1



- ③ Capillary gel electrophoresis  
separation of DNA fragments



- ④ Laser detection of fluorochromes  
and computational sequence analysis

Εικόνα 2: Sanger sequencing

<http://www.youtube.com/watch?v=dUjMf2Zezlw>

☞ Δεν χρησιμοποιείται ραδιοεπισήμανση



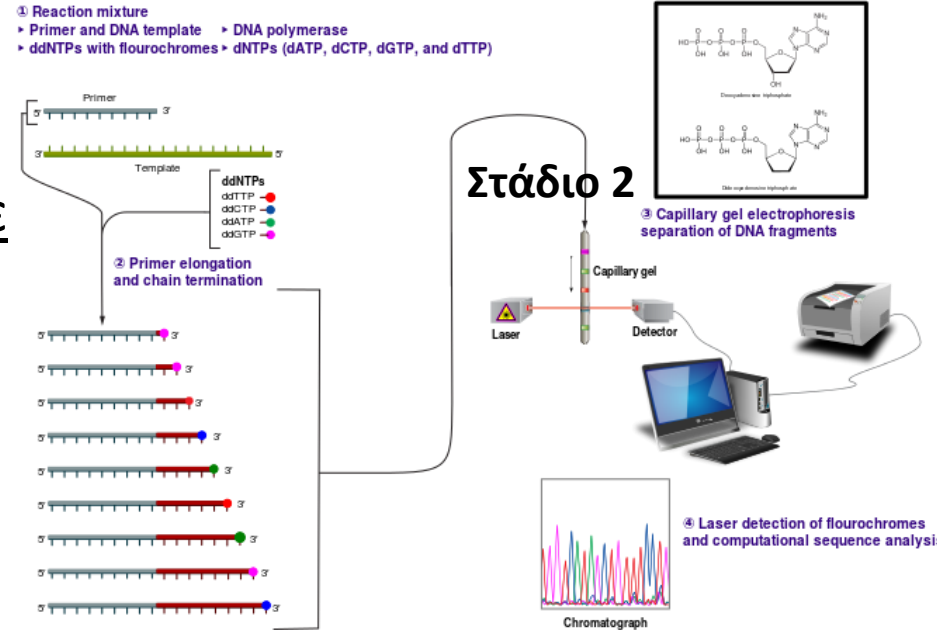
# Μηχανήματα αλληλούχισης πρώτης γενιάς (3/5)

## Στάδιο 2

Οι 4 διαφορετικές αντιδράσεις με τα κομμάτια διαφορετικών μεγεθών ηλεκτροφορούνται μαζί σε μια στήλη ή τριχοειδές

Οι ηλεκτροφορητικές συνθήκες επιτρέπουν το διαχωρισμό τμημάτων DNA που διαφέρουν σε μέγεθος ενός νουκλεοτιδίου

<http://www.yourgenome.org/downloads/animations.shtml>



Εικόνα 2: Sanger sequencing



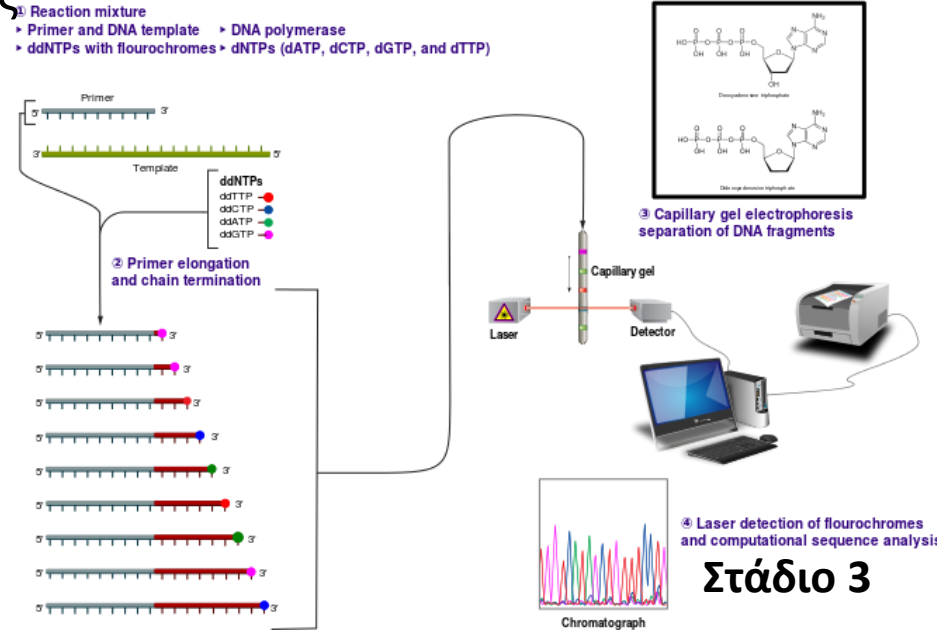
# Μηχανήματα αλληλούχισης πρώτης γενιάς (4/5)

## Στάδιο 3

Όταν τα τμήματα DNA φτάνουν στο τέλος της ηλεκτροφόρησης σαρώνονται με τη βοήθεια λέιζερ.

Με τη βοήθεια φωτοκύτταρου ανιχνεύεται η εκπομπή του φωτός και το σήμα μεταφέρεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή που αυτόματα αναλύει και αποθηκεύει τα δεδομένα.

Έχει καθιερωθεί ώστε ή ύπαρξη νουκλεοτιδίου A να επισημαίνεται και να φθορίζει σε χρώμα **πράσινο**, το G μαύρο, το C **μπλε** και το T **κόκκινο**.



Εικόνα 2: Sanger sequencing



# Μηχανήματα αλληλούχισης πρώτης γενιάς (5/5)

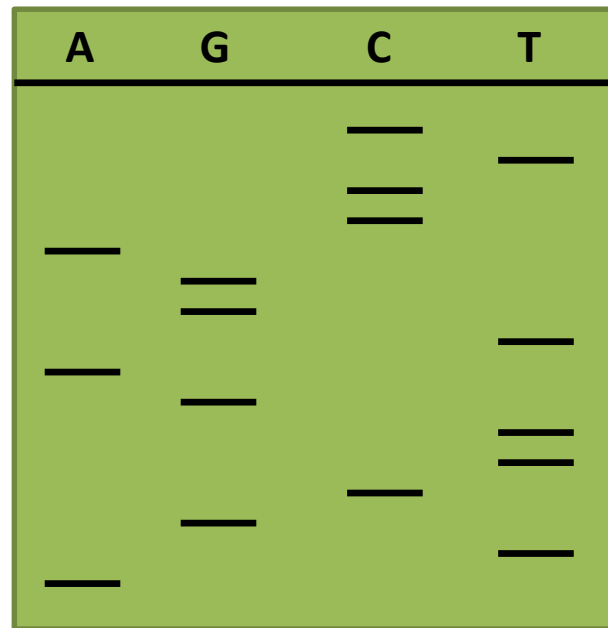
- Τα αυτόματα μηχανήματα εύρεσης αλληλουχίας αναλύουν ταυτόχρονα ακόμα και 384 τμήματα DNA
- Παραγωγή πάνω από 10 Mb δεδομένων την ημέρα





# Άσκηση 2

Σχεδιάστε το πρότυπο αλληλούχησης στο συμπληρωματικό κλώνο



# Άσκηση 2 - Λύση

ATGCTTGATGGACCTC → GAGGTCCATCAAGCAT

A	G	C	T
—			—
—	—	—	
—		—	
—		—	—
	—	—	
—	—	—	—
	—		





**...και οι ρυθμοί αυξάνονται**

**...next generation sequencers  
(NGS)**

**...2<sup>nd</sup> generation sequencers**

**...3<sup>rd</sup> generation sequencers**



# Μηχανήματα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (1/8)

- Το 1987 ένα αυτόματο μηχάνημα ABI παρήγαγε 4.800 βάσεις/μέρα!!!
- Illumina - παράγουν 25 δις βάσεις/μέρα
- Life Technologies - 100 δις βάσεις (σύντομα 300 δις)
- Κόστος ίσως και λιγότερο από \$ 10.000

Μπορούμε να έχουμε άνετα ένα ανθρώπινο γονιδίωμα σε μια εβδομάδα.



# Μηχανήματα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (2/8)

## 454 sequencing

➤ Nature, Rothberg *et al.* 2005

25.000.000 βάσεις σε 4 ώρες!

➤ Εύρεση αλληλουχίας ανθρώπου σε μερικές μέρες

➤ Εύρεση αλληλουχίας *Mycoplasma genitalium* σε 4 ώρες με 99,96% ακρίβεια

➤ Μηχάνημα μεγέθους microwave

Η επανάσταση βασίζεται στην προετοιμασία του δείγματος και στην πλατφόρμα ανάλυσης= 1,6 εκατ. Αντιδραστήρες σε σλάιντ 6,4 cm<sup>2</sup>

Massively parallel machines!

<http://www.454.com/>

<http://454.com/products/technology.asp>



# Μηχανήματα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (3/8)

## 454 sequencing

- Κομμάτιασμα DNA
- Σύνδεση μονόκλωνου DNA με αλληλουχίες αντάπτορες που επιτρέπουν τη σύνδεση σε μοναδική μπίλια-χάντρα 28  $\mu\text{m}$  διαμέτρου
- Ενσωματώνονται σε σταγόνα λαδιού όπου υπάρχουν τα απαραίτητα υλικά για emPCR
- Οι σταγόνες λαδιού δεν ενώνονται  $\rightarrow$  όχι επιμόλυνση



# Μηχανήματα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (4/8)

## 454 sequencing

- Οι μπίλιες με το υπόστρωμα DNA τοποθετούνται μέσα σε σλάιντ φωτοευαίσθητων οπτικών ινών όπου υπάρχουν και τα απαραίτητα ένζυμα για αλληλούχιση
- Με κάθε προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου υπάρχει φωτοευαίσθητος αισθητήρας που διαβάζει το νουκλεοτίδιο σε 1 απο τους 1,6 εκατομ αντιδραστήρες!



# Μηχανήματα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (5/8)

## 454 sequencing – Προβλήματα το 2005

- Ιδανικό για επανάληψη αλληλούχισης ή για μικρά γονιδιώματα με μοναδικό DNA ...ΑΛΛΑ
- Διαβάζει κομμάτια 80-120 βάσεις
- Παρουσιάζει μειωμένη Ακρίβεια
- Το διάβασμα μονόκλωνου DNA δεν επιτρέπει την ακριβή συναρμολόγηση
- Οι διαδικασίες δεν είναι πλήρως αυτοματοποιημένες
- Μήκος ανάγνωσης πια: >500 βάσεις

*Hutchison CA 2007 Nucleic Acids Research 1-11*

*Metzker 2010 Nature Reviews Genetics 31-46*



# Μηχανήματα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (6/8)

## Applied Biosystems SOLiD

- 2006
- Πραγματοποιεί 100 εκατομμύρια αντιδράσεις
- Μήκος ανάγνωσης: 35 βάσεις

<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems/solid-sequencing-chemistry.html>

<https://www.youtube.com/watch?v=nlvYF8bFDwM>



# Μηχανήματα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (7/8)

## Illumina

- 2007
- Πραγματοποιεί 80 εκατομμύρια αντιδράσεις
- Μήκος ανάγνωσης: 45 βάσεις

[http://res.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight\\_sequencing.pdf](http://res.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf)

<http://www.illumina.com/systems/miseq.ilmn>

<https://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM>

**In the 2nd quarter of 2014 Illumina reported adjusted earnings of 57% per share – most probably the biggest increase in the companies history.**





# Μηχανήματα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (8/8)

## Ion Torrent-Life tech-ABI

1.000 \$ genome candidate!

- Κοστίζει μόλις 50.000 δολάρια
- Χρειάζεται ΜΟΝΟ ένα μικροτσιπ ιόντων κόστους 99 δολαρίων για να διαβάσει ένα βακτηριακό γονιδίωμα (25 Mb) σε 2 ώρες
- Υπάρχουν 1,2 εκατομμύρια θέσεις για αντιδράσεις-(ανάλογες με 454)
- Βασίζεται στην ικανότητα του μηχανήματος να αναγνωρίζει την αλλαγή του pH από τα ιόντα που απελευθερώνονται κατά τη προσθήκη των βάσεων κατά τη σύνθεση του DNA σε κάθε θέση αντίδρασης
- Μέσο μέγεθος κομματιών 100bp
- Ήδη πετυχημένα

<http://www.iontorrent.com/>

<http://www.youtube.com/watch?v=yVf2295JqUg&feature=BFa&list=PL171604F04548D64E>

[http://www.youtube.com/watch?v=fxCY\\_f0QaZQ](http://www.youtube.com/watch?v=fxCY_f0QaZQ)



# Μηχανήματα αλληλούχισης τρίτης γενιάς (1/3)

- Pacific Biosciences, Oxford nanopore, Starlight
- Αλληλούχιση ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΜΟΡΙΟΥ χωρίς ΕΝΙΣΧΥΣΗ
- Διαβάζουν την αλληλουχία του υπάρχοντος κλώνου
- Θα ξεπεράσουμε το στόχο του ενός γονιδιώματος ανά άνθρωπο και
- Θα παίρνουμε «φωτογραφίες» από τον ίδιο άνθρωπο από διαφορετικούς ιστούς/κύτταρα όπως γεννητικά, βλαστοκύτταρα, καρκινικά

Δείτε:

<http://www.genome.gov/27543255>



# Μηχανήματα αλληλούχισης τρίτης γενιάς (2/3)

## Single-molecule, real-time DNA SMRT sequencing

<http://www.pacificbiosciences.com/>

- Η μέθοδος του βασίζεται στο φθορισμό
- Γίνεται πραγματικού χρόνου παρατήρηση του DNA πολυμερισμού
- Χρησιμοποιούνται τέσσερα φώσφορο-συνδεδεμένα νουκλεοτίδια διαφορετικών χρωμάτων
- Ο φθορισμός απελευθερώνεται ταυτόχρονα με την νουκλεοτιδική ενσωμάτωση

J. Eid et al., *Science* 323, 133 -138 (2009)

<http://www.dnatube.com/video/3003/SMRT-DNA-Sequencing>



# Μηχανήματα αλληλούχισης τρίτης γενιάς (3/3)

## Oxford Nanopore

Εντελώς διαφορετικές προσεγγίσεις, χρησιμοποιούν νανοτεχνολογία και πρωτεΐνες με νανοπόρους. Ανιχνεύουν το κάθε διαφορετικό νουκλεοτίδιο καθώς περνάει μέσα από τους πόρους.

Η επιτυχία αυτών των μεθόδων βασίζεται στην ευαισθησία τους όσον αφορά την ανίχνευση των πολύ μικρών διαφορών στις φυσικοχημικές ιδιότητες των τεσσάρων βασικών νουκλεοτιδίων καθώς και στην επίτευξη σταθερού ρυθμού διέλευσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέσα από τους πόρους (ίσως μέσω της προσθήκης εξωνουκλεάσης που κόβει ένα ένα τα νουκλεοτίδια και μετα τα διαβάζει).

Δημιουργία μηχανήματος μεγέθους USB

<https://www.nanoporetech.com/>    <https://www.youtube.com/watch?v=Sx6FbYoFGmM>  
<https://nanoporetech.com/technology/the-minion-device-a-miniaturised-sensing-system/the-minion-device-a-miniaturised-sensing-system>



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχισης (1/15)

Το μέγεθος των διαβασμένων τμημάτων και η παραγωγή δεδομένων έχει αυξηθεί με τις αναβαθμίσεις των μηχανημάτων NGS

Field guide to next-generation DNA sequencers –Glenn 2011

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x/pdf>

<http://flxlexblog.wordpress.com/2013/10/01/developments-in-next-generation-sequencing-october-2013-edition/>



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχησης (2/15)

## Κόστος αλληλούχησης

Τα μηχανήματα μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες:

- Αυτά που δίνουν μέτριο αριθμό διαβασμάτων μεγάλου μεγέθους με σχετικά μεγάλο κόστος ανά Mb αλληλουχίας (454, Ion Torrent, PacBio, Starlight)
- Από την άλλη αυτά που δίνουν τεράστιο αριθμό διαβασμάτων μικρού μεγέθους με μικρό κόστος ανά Mb αλληλουχίας (Illumina, SOLiD)
- Τα νέα μηχανήματα 3<sup>ης</sup> γενιάς (πχ Oxford Nanopore) ίσως καταφέρουν να δώσουν πολλά διαβάσματα μεγάλου μεγέθους με σχετικά χαμηλό κόστος
- Για de novo αλληλουχίσεις πάντως, προτείνεται ο συνδυασμός των μηχανημάτων Illumina και 454

Field guide to next-generation DNA sequencers – Glenn 2011

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x/pdf>



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχησης (3/15)

- Πρέπει να θυμόμαστε ότι κανένα από τα μηχανήματα που έχουν δημιουργηθεί μέχρι τώρα δεν έχει τέτοια τεχνολογία που να επιτρέπει την πλήρη συνεχή αλληλούχηση ενός χρωμοσώματος ακόμα και του μικρότερου γονιδιώματος.
- Συνεπώς ευφυείς βιοπληροφορικές προσεγγίσεις συναρμολόγησης των παραγόμενων αλληλουχιών σε ένα συνολικό γονιδίωμα είναι απαραίτητες για την επιτυχία αλληλούχησης των γονιδιωμάτων.
- Επίσης, δε σημαίνει ότι τα παλιότερα μηχανήματα θα τεθούν σε αχρηστία. Καθένα από αυτά έχει τα χαρακτηριστικά του και κάθε ερευνητής ανάλογα με τον προϋπολογισμό και τους στόχους του προγράμματος του θα πρέπει να επιλέγει ύστερα από πολλή σκέψη.



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχησης (4/15)

## Κόστος αλληλούχησης

### Gene sequencing leaves the laboratory

Nature 2013, 494, 290-291

<http://www.nature.com/news/gene-sequencing-leaves-the-laboratory-1.12454>

- Κόστος ανθρώπινου γονιδιώματος: ~ \$5.000
- Το κόστος και οι δυνατότητες των τεχνολογιών που υπάρχουν σήμερα καθιστούν τις ιατρικές έρευνες και εφαρμογές αξιόλογες
- Κάποια μηχανήματα μπορούν να αλληλουχήσουν με κόστος μόλις 1 cent/Mb

Τον Οκτώβριο του 2014 η PacBio κυκλοφόρησε μια επικαιροποιημένη χημεία με ένα μέσο μήκος ανάγνωσης 10.000 έως 15.000 βάσεις και ακόμη μεγαλύτερα διαβάσματα έως και 40.000 βάσεις





# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχησης (5/15)

## Κάποιοι χάνουν! The 1000\$ genome

Η Roche θα σταματήσει την παραγωγή μηχανημάτων 454 μετά το 2015

Η Roche θα συνεχίσει να παράγει 454 μηχανήματα μέσα στο 2015

Θα επενδύσει στο βιοδιαγνωστικό δυναμικό των μηχανημάτων Pacific Biosciences (\$PACB), το οποίο κοστίζει \$75 εκ.



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχισης (6/15)

## Κάποιοι Κερδίζουν! The 1000\$ genome

15/1/2014

Παραγωγή 16 Human Genomes / 3 ημέρες = 18.000 HG / χρόνο 30X κάλυψη, χάρη σε καλύτερο πακετάρισμα των αντιδράσεων στους μικροανιχνευτές, καλύτερη καταγραφή του σήματος μέσω βελτιωμένης κάμερας, φθηνότερη πολυμεράση

Αλλά ... πρέπει να αγοράσεις 10 τέτοια μηχανήματα = 10 M \$

<http://www.nature.com/news/is-the-1-000-genome-for-real-1.14530>



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχισης (7/15)

Πλατφόρμα	Εταιρεία	Μέθοδος Αλληλ.	Μέθοδος Ενίσχυσης Υποστρ.	Λόγος Επιτυχίας
454	Roche	Σύνθεση (κλώνου)	emPCR	1 <sup>ο</sup> Μηχάνημα Νέας γενιάς, Μεγάλο μέγεθος διαβασμάτων
Illumina	Illumina	Σύνθεση	BridgePCR	1 <sup>ο</sup> Μηχάνημα βραχέων διαβασμάτων, λιγότερα λάθη, μεγαλύτερη παραγωγή δεδομένων
SOLiD	Life Technologies	Υβριδισμός	emPCR	2 <sup>ο</sup> Μηχάνημα βραχέων διαβασμάτων, πολύ χαμηλό ποσοστό λαθών
Heliscope	Helicos	Σύνθεση	Όχι	Πρώτο μηχάνημα αλληλούχισης μεμονωμένου μορίου DNA
Ion Torrent	Life Technologies	Σύνθεση (ανίχνευση H <sup>+</sup> )	emPCR	1 <sup>ο</sup> μηχάνημα αλληλούχισης που δε βασίζεται στην εκπομπή φωτός, κόστος < \$100.000
PacBio	Pacific Biosciences	Σύνθεση	Όχι	1 <sup>ο</sup> μηχάνημα αλληλούχισης μεμονωμένου μορίου DNA σε πραγματικό χρόνο
Starlight*	Life Technologies	Σύνθεση	Όχι	Μηχάνημα αλληλούχισης μεμονωμένου μορίου DNA με quantum dots



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχισης (8/15)

Πλατφόρμα	Εταιρεία	Βασικές Εφαρμογές
454	Roche	1,2,3,4,7,8
Illumina	Illumina	1,2,3,4,5,6,7,8
SOLiD	Life Technologies	3,5,6,8
Heliscope	Helicos	5,8
Ion Torrent	Life Technologies	1,2,3,4,8
PacBio	Pacific Biosciences	1,2,3,7,8
Starlight*	Life Technologies	1,2,7,8

1 = de novo αλληλούχιση σε BACs και βακτηριακά γονιδιώματα  
2 = χαρακτηρισμός μεταγραφώματος  
3 = στοχευόμενη επανααλληλούχιση  
4 = de novo αλληλούχιση σε ευκαρυωτικά γονιδιώματα,  
5 = επανααλληλούχιση και καταμέτρηση μετάγραφων  
6 = ανίχνευση μεταλλάξεων,  
7 = μεταγονιδιωματικές αναλύσεις,  
8 = άλλα (ChIP-Seq, μRNA-Seq, Methyl-Seq)

Field guide to next-generation DNA sequencers – Glenn 2011

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x/pdf>



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχισης (9/15)

Reducing assembly complexity of microbial genomes with single-molecule sequencing

Koren *et al.* 2013 Genome Biology

<http://genomebiology.com/2013/14/9/R101>

- Η πρώτη και δεύτερης γενιάς τεχνολογίες αλληλούχισης δεν μπορούν να ανακατασκευάσουν πάντα ένα μικροβιακό γονιδίωμα
- Κατά την αλληλούχιση και συναρμολόγηση 6 βακτηριακών γονιδιωμάτων διαφορετικής πολυπλοκότητας αποκαλύφθηκε ότι η πλειονότητα των γονιδιωμάτων των βακτηρίων και των αρχαίων, μπορούν να συναρμολογηθούν χωρίς κενά, χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση αλληλούχισης της Pacific Biosciences
- Αυτού του τύπου οι συναρμολογήσεις είναι περισσότερο ακριβείς από τις τυπικές συναρμολογήσεις μικρού μήκους ανάγνωσης

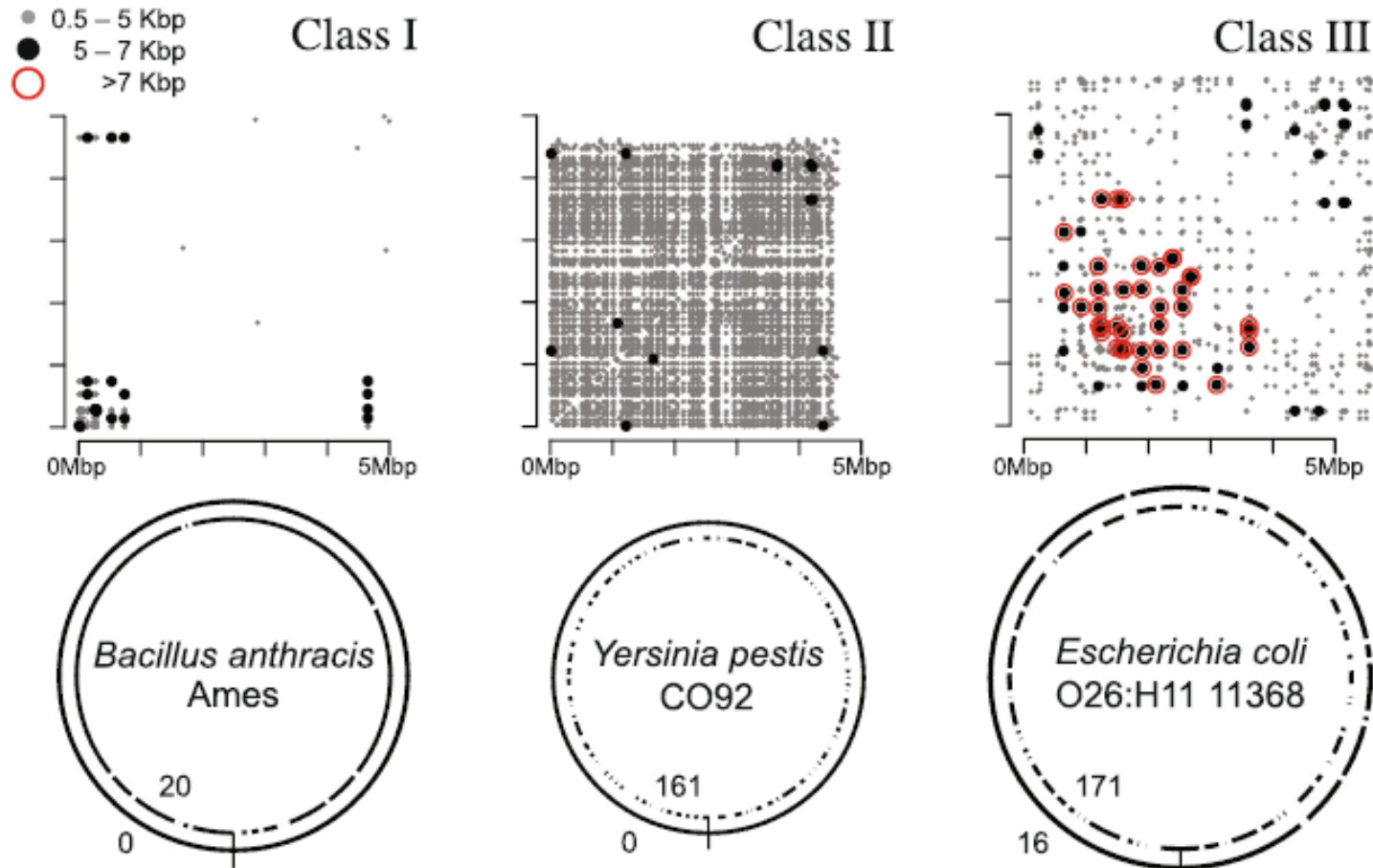


# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχησης (10/15)

- Στην επόμενη εικόνα φαίνεται ότι Γονιδιώματα μικρής πολυπλοκότητας (Τύπος I) μπορούν να συναρμολογηθούν με οποιοδήποτε μηχάνημα αλληλούχησης.
- Γονιδιώματα μέτριας πολυπλοκότητας (Τύπος II) δίνουν ένα καλό αποτέλεσμα συναρμολόγησης, μόνο με τη χρήση του Pacific Biosciences (παρατηρήστε τον ολοκληρωμένο εξωτερικό κύκλο που δείχνει ολοκληρωμένη συναρμολόγηση).
- Γονιδιώματα μεγάλης πολυπλοκότητας (Τύπος III) με πολλές επαναλαμβανόμενες περιοχές δεν μπορούν να συναρμολογηθούν τέλεια με κανένα μηχάνημα αλληλούχησης (ούτε και με το Pacific Biosciences) παρ'όλο που το μέγεθος διαβάσματος μπορεί να ξεπεράσει τις 7 χιλιάδες βάσεις).



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχισης (11/15)



**Εικόνα 3:** Τρεις τάξεις πολυπλοκότητας συναρμολόγησης μικροβιακών γονιδιωμάτων  
Koren *et al.* 2013 Genome Biology, <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχησης (12/15)

## ...συναρμολόγηση δεδομένων?

Υπάρχουν πολλά προγράμματα

Κάθε ένα με τα δικά του χαρακτηριστικά, αλγορίθμους και αδυναμίες

Το πρόγραμμα συναρμολόγησης θα καθορίζεται στο μέλλον από τα χαρακτηριστικά του μελετούμενου γονιδιώματος αλλά και το μηχάνημα αλληλούχησης

- SOAP: Short Oligonucleotide Analysis Package  
([soap.genomics.org.cn/](http://soap.genomics.org.cn/))
- ABySS: Assembly By Short Sequences

**So you want to be a computational biologist?**

<http://www.nature.com/nbt/journal/v31/n11/full/nbt.2740.html>

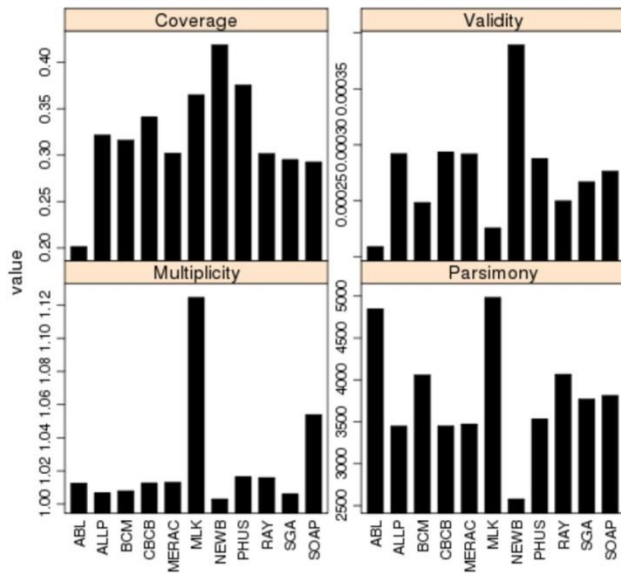




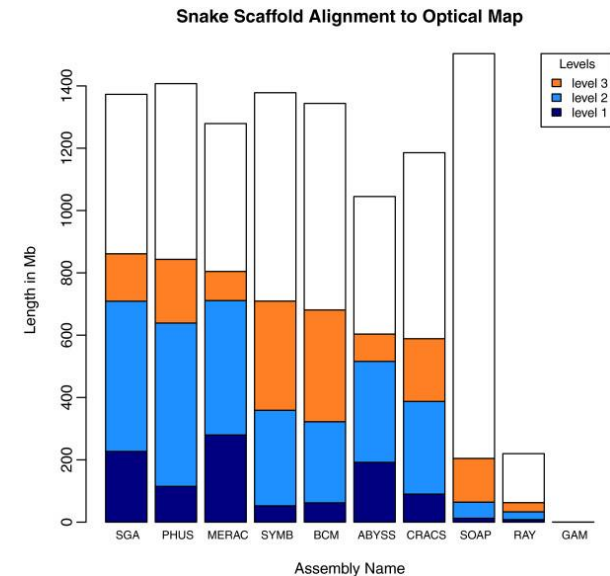
# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχησης (13/15)

Assemblathon 2: evaluating *de novo* methods of genome assembly in three vertebrate species: Bradnam *et al.* 2013, Gigascience

(<http://www.gigasciencejournal.com/content/2/1/10>)



Οι Εικόνες 4  
(αριστερά) και 5  
(δεξιά) δείχνουν τα  
αποτελέσματα  
συναρμολόγησης  
δεδομένων σε  
πουλιά (αριστερά)  
και φίδια (δεξιά)



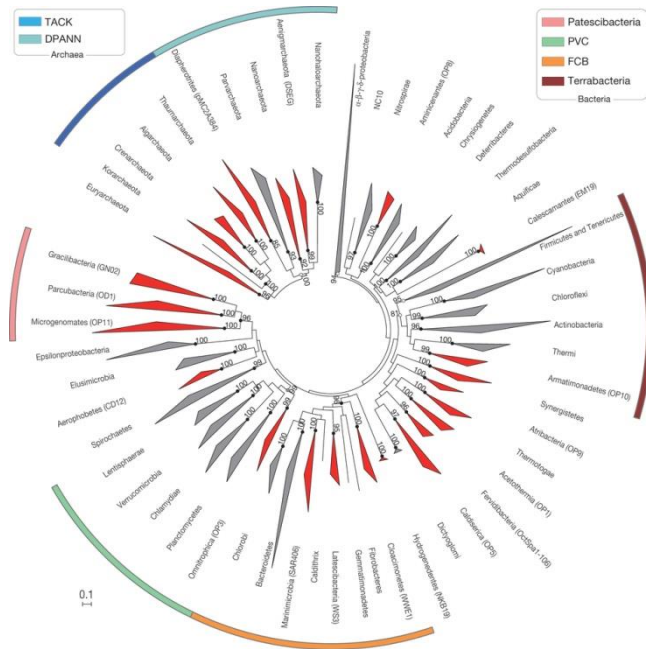
<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>

Φαίνεται ότι υπάρχει ακόμα πολύ μεγάλο περιθώριο βελτίωσης στα προγράμματα



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχισης (14/15)

Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter Nature (2013)



**Εικόνα 6:** Maximum-likelihood phylogenetic inference of Archaea and Bacteria.

<http://www.nature.com/nature/journal/v499/n7459/full/nature12352.html>, CC-BY-NC-SA-3.0, <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

<http://genome.igi.doe.gov/MDM/>



# Σύγκριση Μηχανημάτων αλληλούχησης (15/15)

Πλήρες σύστημα παραγωγής, ανάλυσης αλλά και αποθήκευσης δεδομένων ανθρώπινων γονιδιωμάτων (το knoSYS100). Με κόστος 125.000\$ σκοπός της εταιρείας είναι να μπορεί ένα νοσοκομείο να δίνει συγκεκριμένες πληροφορίες που πραγματικά ενδιαφέρουν κάποιον, δηλαδή να επεξηγεί τα αποτελέσματα γρήγορα και σωστά.

[www.knome.com](http://www.knome.com)



# Άσκηση 3

Δουλεύετε σε μεγάλο γονιδιωματικό κέντρο.

Θέλετε να διαβάσετε γονιδίωμα βακτηρίου.

Θέλετε να αλληλουχήσετε το γονιδίωμα ενός ανθρωποειδούς για να συγκρίνετε την εξέλιξη του με το γονιδίωμα του ανθρώπου και του χιμπατζή.

Θέλετε να αλληλουχήσετε το γονιδίωμα του κουνουπιού *Anopheles gambiae* για να βρείτε τρόπους να αντιμετωπίσετε την ελονοσία.

Ποια τεχνική αλληλούχησης θα χρησιμοποιούσατε σε κάθε περίπτωση και γιατί;



# Άσκηση 3 -Λύση

Γονιδίωμα βακτηρίου: Μπορείτε να χρησιμοποιήσετε ένα οποιοδήποτε μηχάνημα NGS. Σε περίπτωση που είναι υψηλής πολυπλοκότητας το γονιδίωμα του, ίσως χρειαστεί να χρησιμοποιήσετε Pacific Biosciences

Γονιδίωμα ενός ανθρωποειδούς : Αφού θέλετε να δείτε και την εξέλιξη θέλετε μεγάλη ακρίβεια. Άρα χρειάζεστε ιεραρχημένη προσέγγιση.

Γονιδίωμα του κουνουπιού *Anopheles gambiae*. Εδώ ενδιαφέρεστε για τα γονίδια (μοναδικές περιοχές κυρίως) και δεν σας ενδιαφέρει το επαναλαμβανόμενο DNA. Μια συνολική (όχι ιεραρχημένη προσέγγιση) θα σας δώσει τα αποτελέσματα που χρειάζεστε



# Άσκηση 4

---

Εάν είχατε να αλληλουχήσετε το γονιδίωμα του 12πλοειδούς ζαχαρότευτλου ή της 8πλοειδούς εμπορικής φράουλας τι τεχνική θα χρησιμοποιούσατε?



# Άσκηση 4 - Λύση

Θα χρειαζόσασταν σίγουρα μηχανήμα που να μπορεί να δώσει μεγάλα διαβάσματα εξαιτίας της πολυπλοκότητας και επαναληψιμότητας του γονιδιώματος (π.χ. ίσως Pacific Biosciences) και ίσως χρειαζόσασταν να κάνετε και μια ιεραρχημένη προσέγγιση με τη δημιουργία φυσικών και γενετικών χαρτών για να βοηθήσει περαιτέρω στη συναρμολόγηση



# Το DNA ενός κυττάρου

**Genome-Wide Detection of Single-Nucleotide and Copy-Number Variations of a Single Human Cell . Science 2012**

<http://bernstein.harvard.edu/research/MALBAC.html>

Η αλληλούχιση υψηλής απόδοσης αλλάζει ραγδαία τους τρόπους με τους οποίους αντιμετωπίζονται τα βιολογικά ερωτήματα. Αναγκαία πλέον είναι η αλληλούχιση ενός μόνο κυττάρου.





# Το DNA καρκινικών κυττάρων

## Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing

Wang et al 2014 Nature 512, 155-160

Η Nuc-Seq αλληλουχεί κύτταρα με διπλασιασμένο γενετικό υλικό (λίγο πριν διαιρεθούν), ξεκινάει από περισσότερο γενετικό υλικό οπότε μειώνονται οι πιθανότητες για λάθη στην αλλούχηση.

## A defining decade in DNA sequencing

John D McPherson, Nature Methods 11, 1003–1005 (2014)



# Συστοιχίες DNA

- Αποτελούνται από μεγάλο αριθμό τμημάτων DNA τοποθετημένα σε στερεό υπόστρωμα
- Συνθέτονται τμήματα DNA που αποτελούν τμήματα γονιδίων & τοποθετούνται σε συγκεκριμένες θέσεις σε στερεό υπόστρωμα
- Υβριδίζεται μίγμα από τμήματα DNA ή RNA (επισημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές ή ραδιενέργεια) πάνω στη συστοιχία DNA
- Έτσι μετρούνται ποιοτικά και ποσοτικά τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που είναι τοποθετημένα στη συστοιχία

<http://bme240.eng.uci.edu/students/08s/jentel/Diagnose-hereditary-disease.htm>



# Συστοιχίες DNA

## Μακροσυστοιχίες DNA (macroarrays)

- Δημιουργείται μια βιβλιοθήκη cDNA, η οποία μεταφέρεται σε αγαρόζη και μετά σε πηγάδια μικροτιτλοποίησης. Με ρομπότ συλλέγονται μέχρι 20.000 κλώνοι και στερεώνονται σε **νάιλον μεμβράνες** δημιουργώντας μια συστοιχία
- Το μίγμα DNA που θα υβριδιστεί επισημαίνεται με ραδιενέργεια και το αποτέλεσμα του υβριδισμού ελέγχεται με αυτοραδιογραφία
- Σχετικά φθηνές, χρησιμοποιούνται σε προκαταρκτικά στάδια ελέγχου της έκφρασης



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays)

- Τμήματα DNA ενισχυμένα με PCR στερεώνονται σε γυάλινο σλάιντ/chip
- Ένα σλάιντ δέχεται 5.000-40.000 προϊόντα PCR (π.χ. όλα τα 6.200 γονίδια της ζύμης)
- Το μίγμα από mRNAs και cDNAs που θα αναλυθεί, επισημαίνεται με φθορίζουσες χρωστικές και υβριδίζεται
- Το επίπεδο φθορισμού είναι ανάλογο των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays)

- Ταυτόχρονη ανάλυση 2 διαφορετικών δειγμάτων cDNA (ή RNA) από ένα κυτταρικό τύπο σε δύο διαφορετικές καταστάσεις (π.χ. κανονικό/καρκινικό κύτταρο) ή δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές ή σε δύο διαφορετικούς οργανισμούς (ποντίκι/άνθρωπος) ή από δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (εγκέφαλος/έντερο)
- Το καθένα επισημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Μετρούνται τα επίπεδα υβριδισμού για κάθε θέση. Το επίπεδο φθορισμού είναι ανάλογο των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων. Εξάγονται συμπεράσματα για την πρωτεϊνική έκφραση



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays)

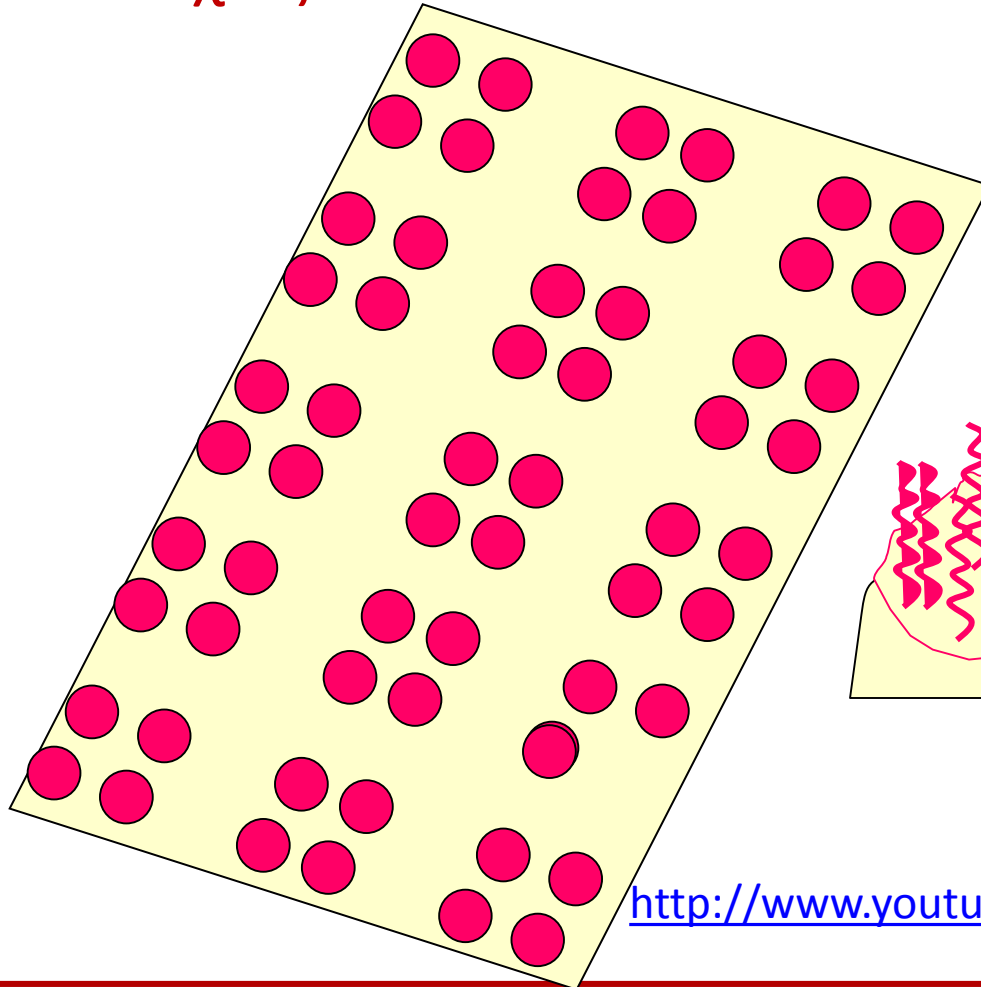
Τα cDNA δείγματα έστω ότι επισημαίνονται με κόκκινες (καρκινικά) και πράσινες (κανονικά) χρωστικές αντίστοιχα και υβριδίζονται σε μικροσυστοιχία DNA. Όταν και τα δύο δείγματα υβριδίζονται σε μια θέση, παράγεται ένα κίτρινο χρώμα. Το κόκκινο χρώμα υποδηλώνει mRNA (ή cDNA) υπερεκφρασμένο σε καρκινικό κύτταρο και το πράσινο mRNA (ή cDNA) υπερεκφρασμένο σε κανονικό κύτταρο.

<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9F.htm>

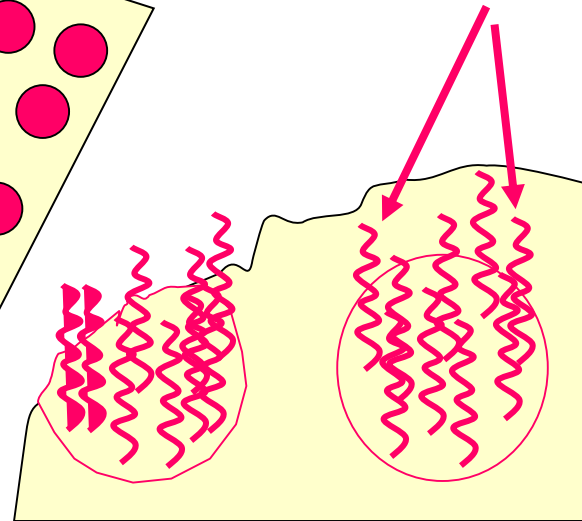


# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες cDNA



Κλώνοι cDNA



<http://www.youtube.com/watch?v=VNsThMNjKhM>



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες cDNA

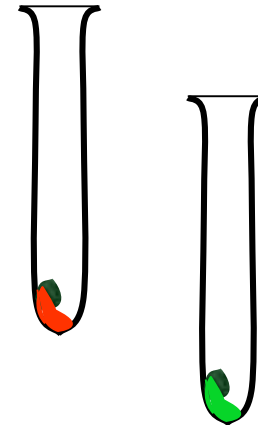
Σύγκριση έκφρασης, δύο δειγμάτων

**PRINT**

**Δείγματα**

Γονίδιο cDNA σε κάθε  
θέση

cDNA κατηγορ. red/green



e.g. **Rna αναφοράς (reference)/**  
**Rna μελέτης (target)**



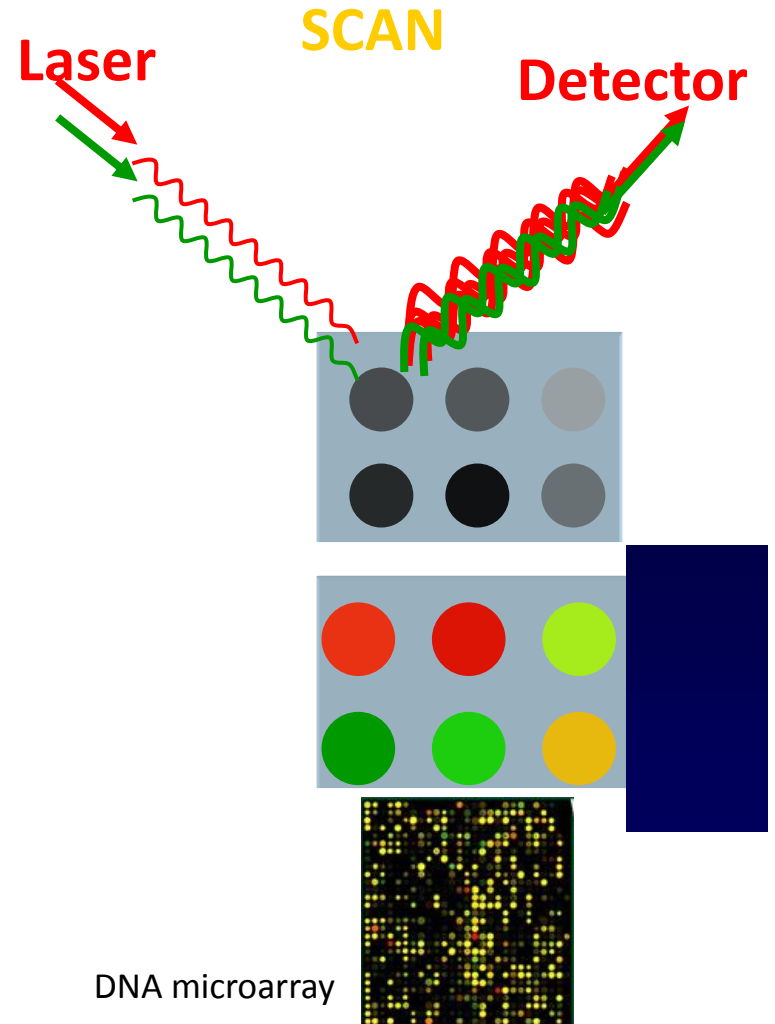
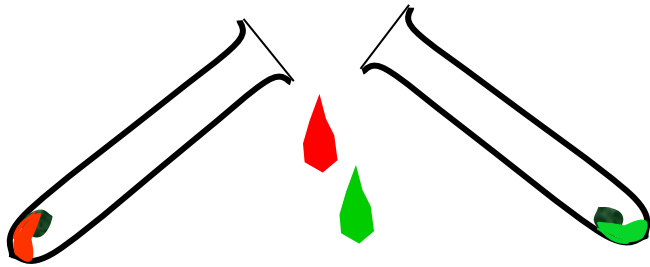


# Συστοιχίες DNA

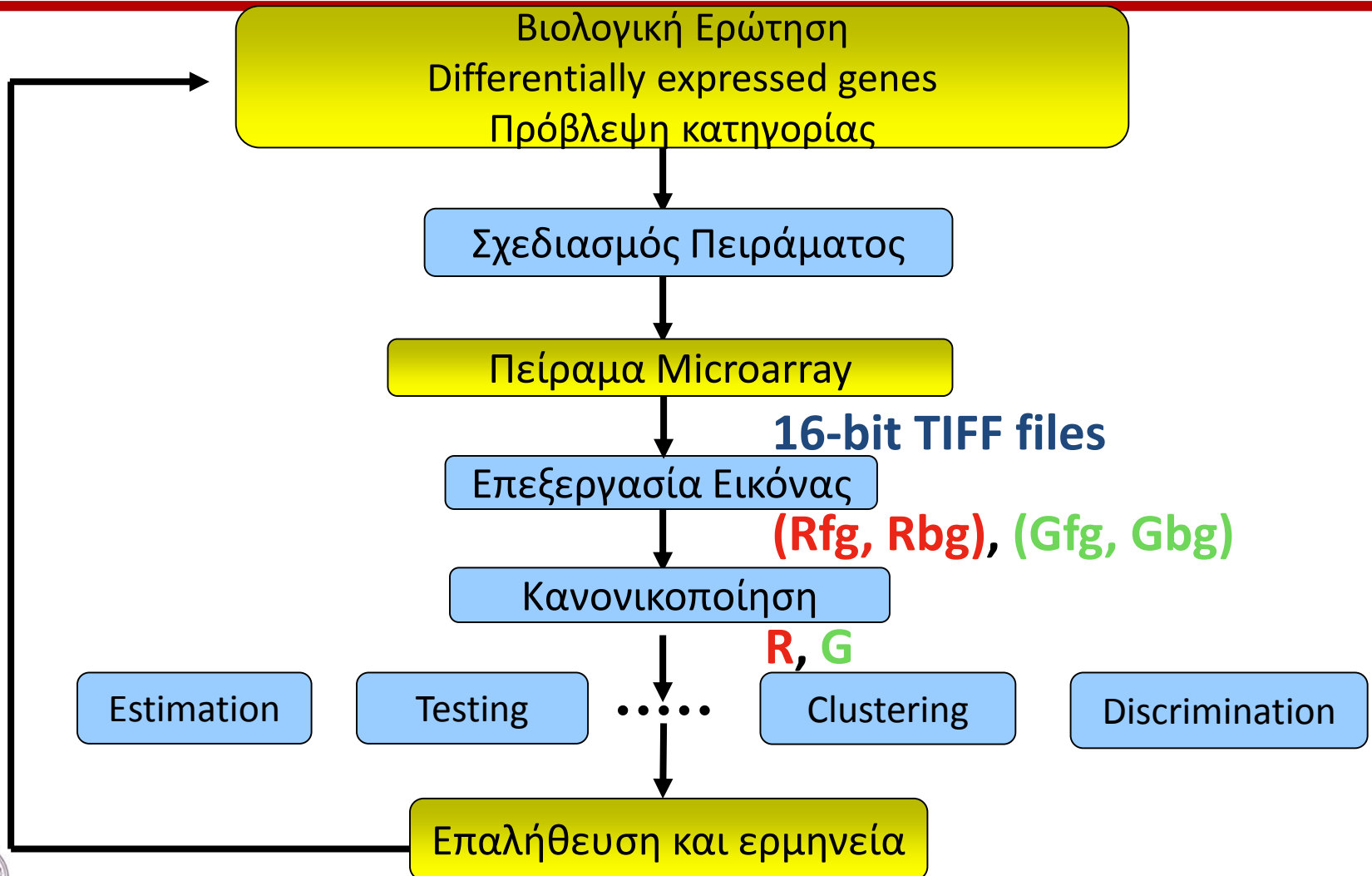
## Μικροσυστοιχίες cDNA

### Υβριδοποίηση

Βάλε ίσες ποσότητες  
κατηγοριοποιημένου  
δειγμάτων cDNA στην  
μικροσυστοιχία



# Συστοιχίες DNA



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays)

Ανιχνεύονται πλήθος γνωστών αλλά και άγνωστων γονιδίων. Είναι δυνατόν να ανακαλυφθεί π.χ. σε ποια γονίδια μειώνεται και σε ποια αυξάνεται η έκφραση κατά τη διάρκεια της μετατροπής ενός κανονικού κύτταρου σε καρκινικό, ή κατά τη μετάβαση από τα πρωταρχικά καρκινικά στάδια σε στάδια μετάστασης. Λαμβάνοντας το προφίλ ενός ατόμου με τη βοήθεια των μικροσυστοιχιών DNA, είναι δυνατόν να γίνει διάγνωση του σταδίου της ασθένειας. Πάντως ακόμη απέχουμε αρκετά από τη χρήση αυτών των μηχανημάτων για εύρεση biomarkers (Nature March 2011) – χρειάζονται > 90% ευαισθησία και > 90% εξειδίκευση.



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays)

### - Διάγνωση Καρκίνου

- Μελέτη μέσω μικροσυστοιχιών της αντίδρασης των ασθενών σε χημειοθεραπεία
- Φαίνεται ότι οι ασθενείς έχουν διαφορετικό προφίλ γονιδιακής έκφρασης

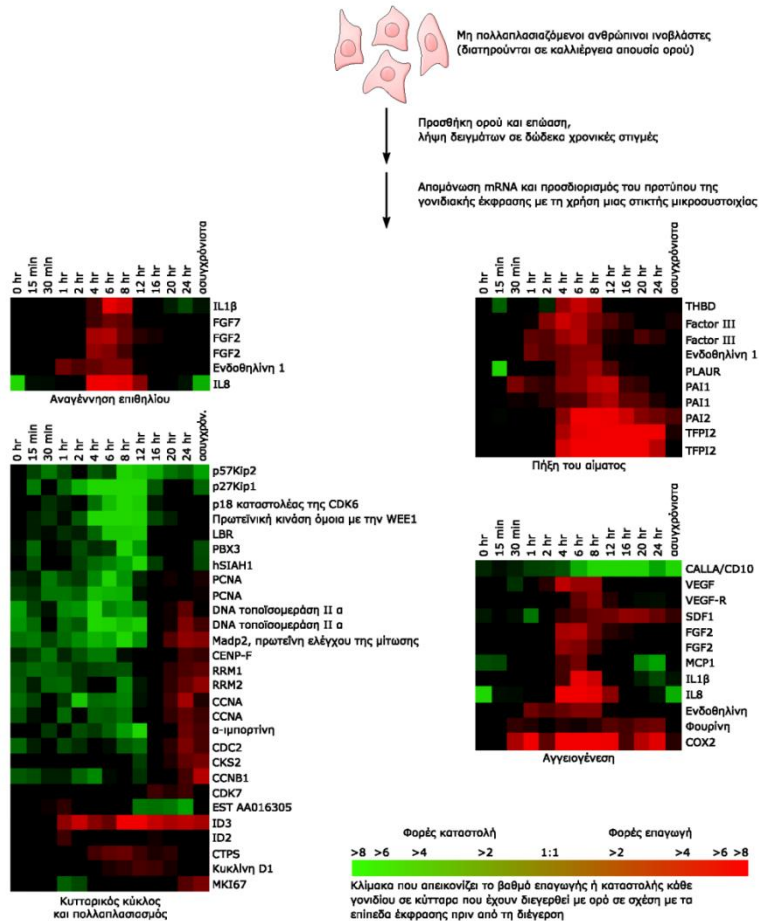
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.003638>

3



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays)



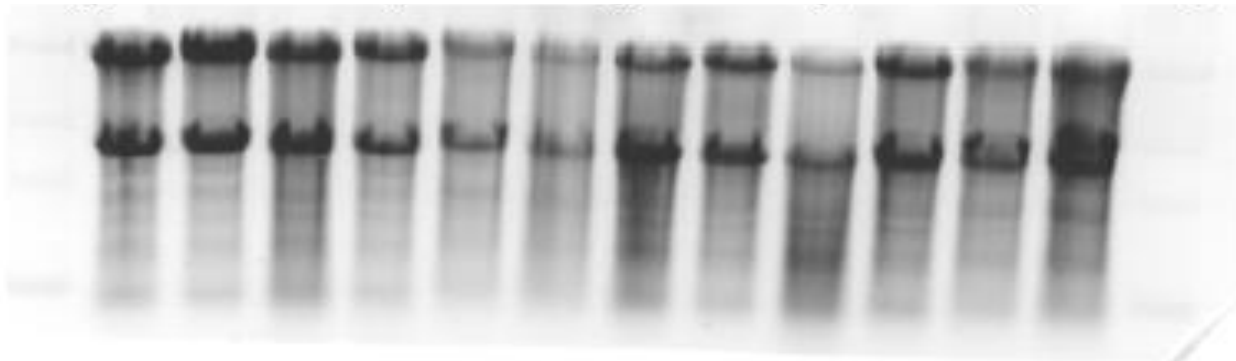
**Εικόνα 7:** Με τη χρήση μικροσυστοιχιών αποκαλύφθηκε ότι κατά την απόκριση ινοβλαστών σε αυξητικούς παράγοντες μεταβάλλεται το πρότυπο έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην επούλωση των πληγών.



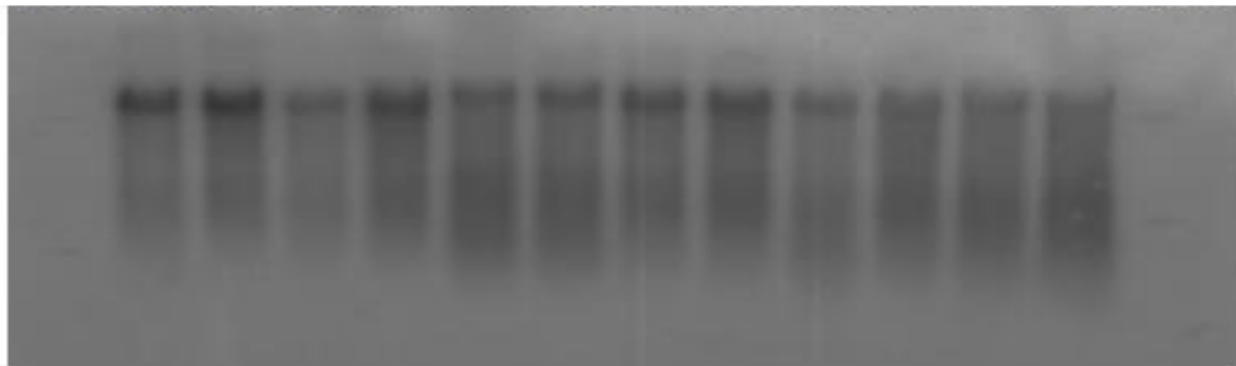
# Συστοιχίες DNA

Στα Northern Blot γινόταν έλεγχος έκφρασης ενός μόνο γονιδίου

Εικόνα 8 α): Διαχωρισμός RNA σε πηκτή αγαρόζης

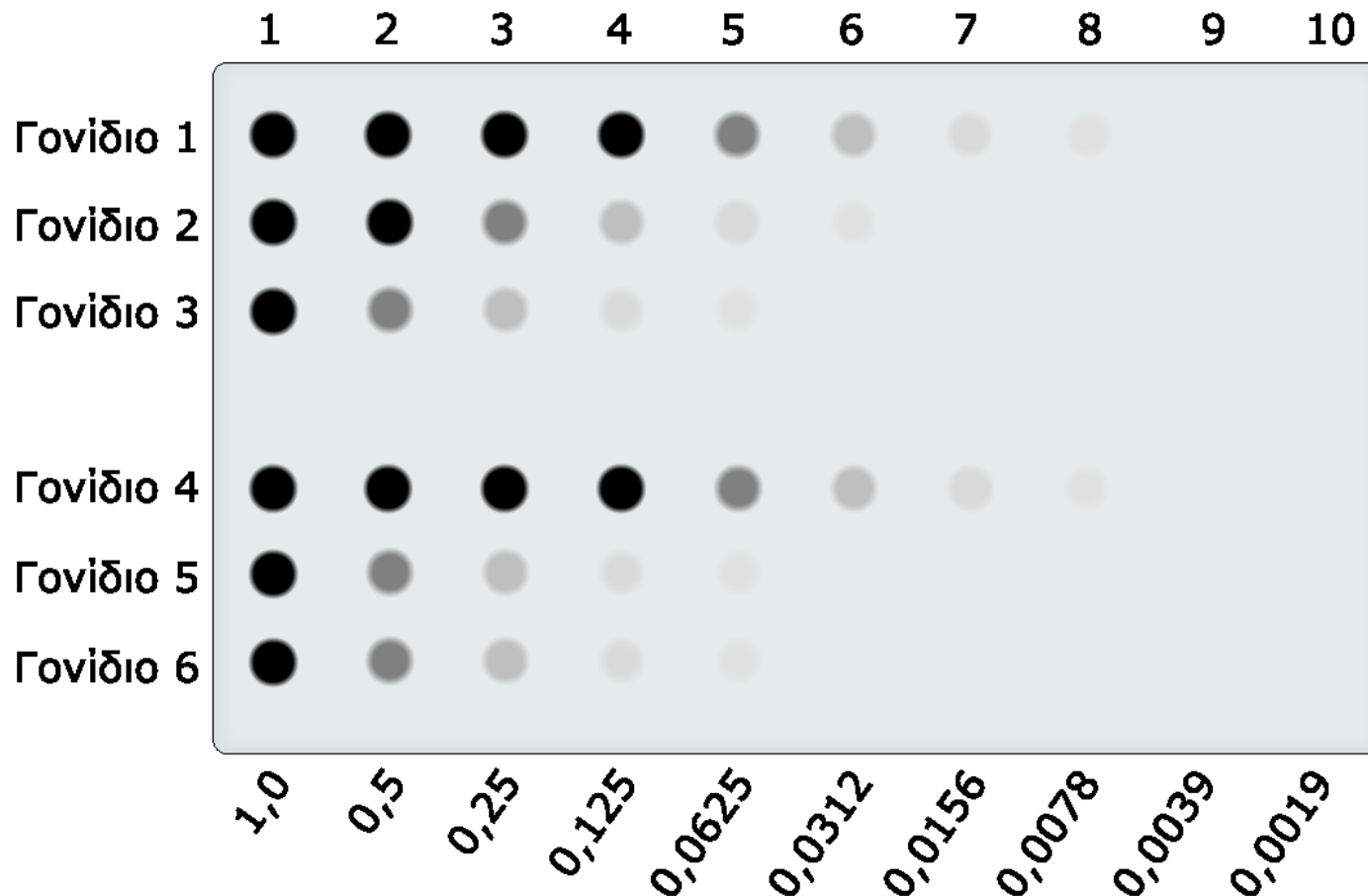


β): Ανίχνευση συγκεκριμένου mRNA με υβριδισμό με σημασμένο ανιχνευτή



# Northern Blot

Εικόνα 9: Μέτρηση των επιπέδων mRNA με στύπωμα κουκκίδας (dot blot) και υβριδισμό.



# Σύγκριση Συστοιχιών/Northern Blot

	Northern	Συστοιχία
Στόχος (target)	Μίγμα RNA διαχωρισμένο σε πηκτή με βάση το μέγεθος, στερεωμένο σε μεμβράνη	Μόρια cDNA (που έχουν προκύψει από mRNA με τη βοήθεια της ανάστροφης μεταγραφάσης) επισημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές
Ανιχνευτής (probe)	Ραδιενεργά επισημασμένο cDNA σε διάλυμα	Δεκάδες χιλιάδες μόρια cDNA στερεωμένα σε chip
Ποιότητα	Υψηλή, Καθορίζεται και μέγεθος του mRNA	Όχι τόσο καλή, δεν είναι γνωστό το μέγεθος
Αριθμός γονιδίων	Ένα / έλεγχο	Έως και 35.000 γονίδια/ έλεγχο





# Συστοιχίες DNA

## Ολιγονουκλεοτιδικές συστοιχίες (oligonucleotide arrays)

Σύνθεση και στερέωση τουλάχιστον 100.000 ολιγονουκλεοτιδίων σε γυάλινα σλάϊντ εμβαδού ορισμένων  $\text{cm}^2$

Τα ολιγονουκλεοτίδια συνθέτονται τεχνητά και έχουν μέγεθος 20-60 bp

### Πλεονεκτήματα

- 1) Ανιχνεύουν πολυμορφισμούς SNP & διαχωρίζουν γονιδιακά προϊόντα που διαφέρουν λίγα bps
- 2) Δεν απαιτούν χρήση βιβλιοθηκών ή μεγάλων ποσοτήτων προϊόντων PCR. Μία ολιγονουκλεοτιδική συστοιχία απαιτεί τμήματα 50-70 bp για κάθε γονίδιο

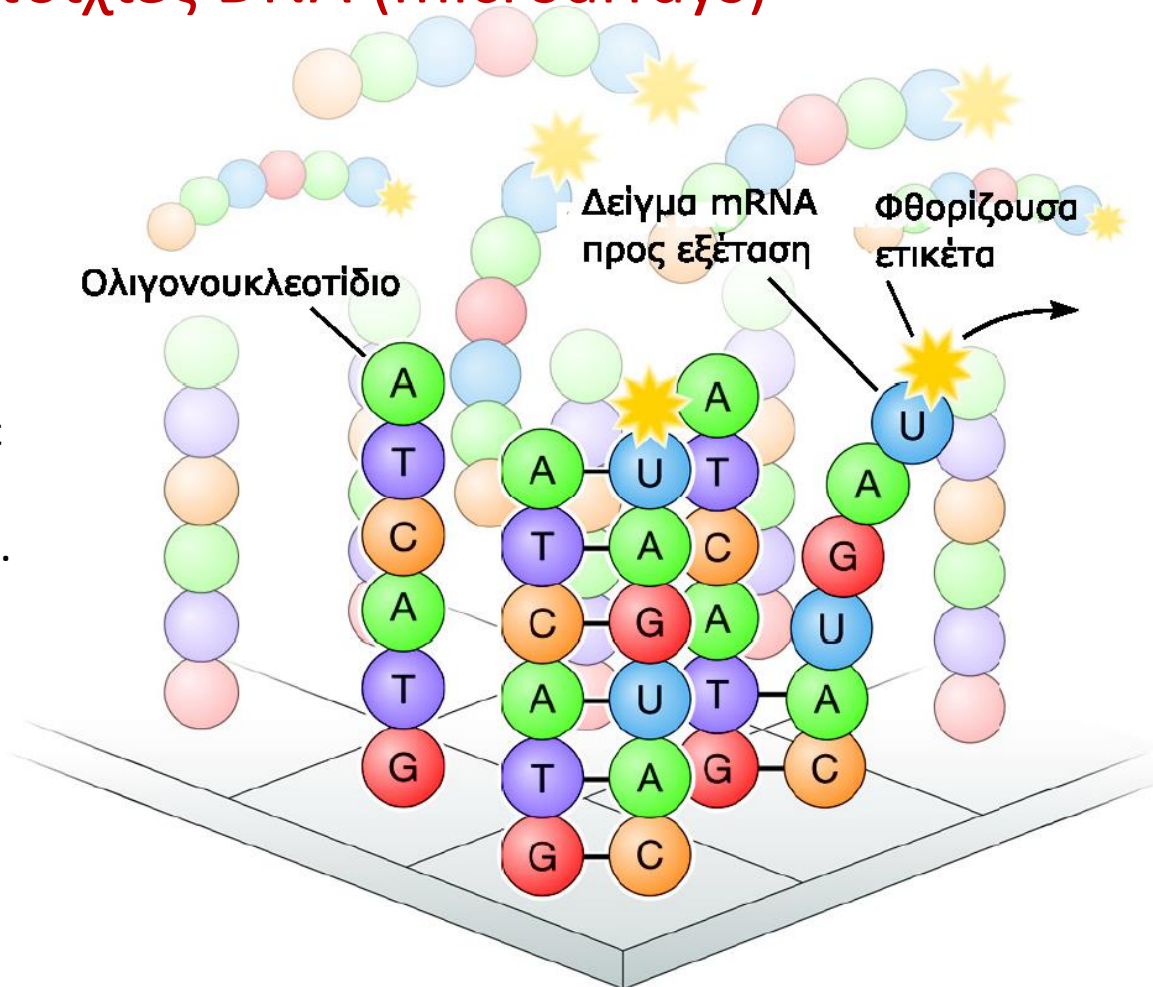
<http://www.cs.tau.ac.il/~rshamir/algmb/00/scribe00/html/lec11/node10.html>



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays)

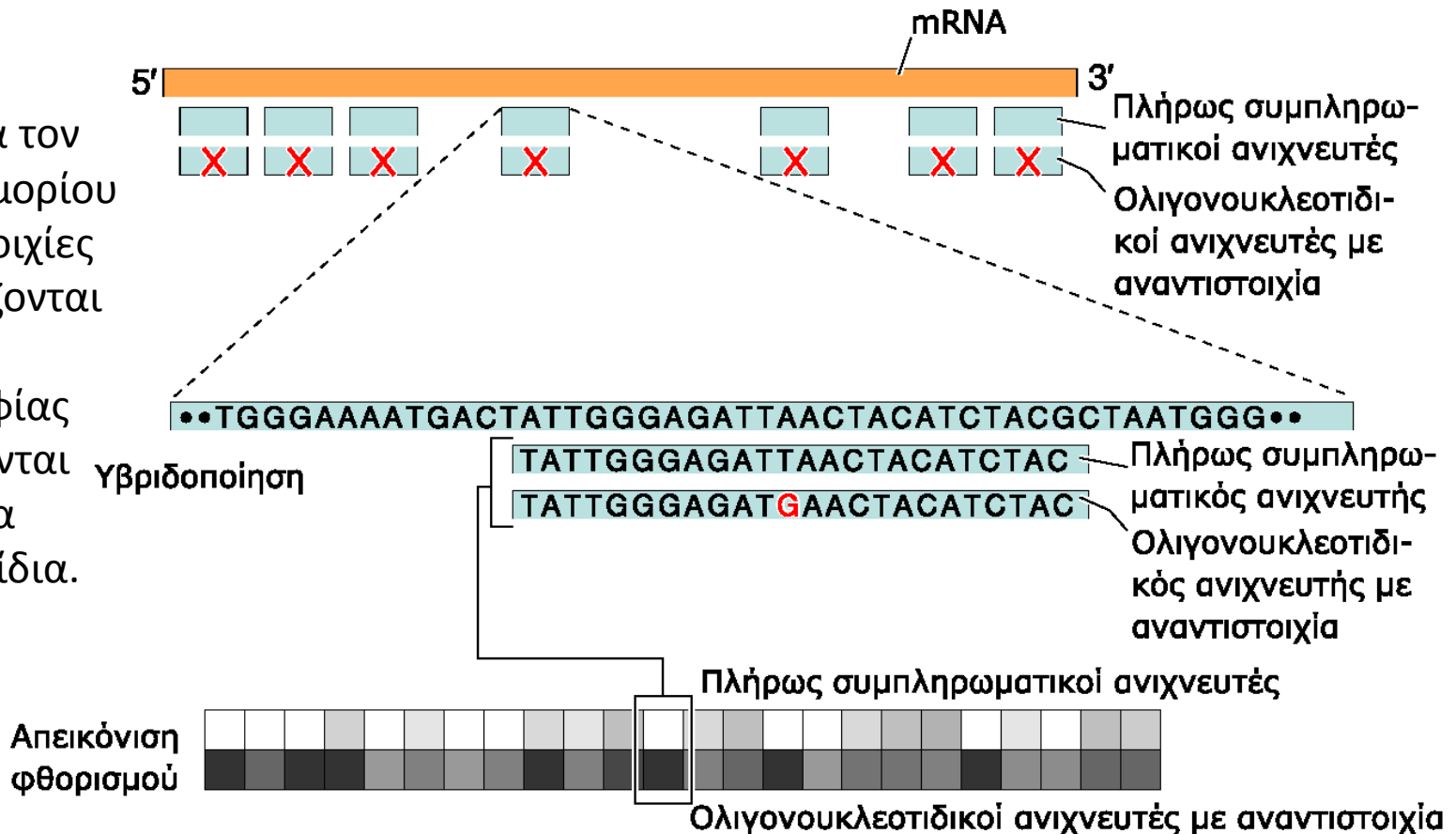
**Εικόνα 10:**  
Υβριδοποίηση  
τμημάτων mRNA σε  
μικροσυστοιχίες  
ολιγονουκλεοτιδίων.



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays)

**Εικόνα 11:** Για τον εντοπισμό κάθε μορίου στις μικροσυστοιχίες που κατασκευάζονται μέσω φωτολιθογραφίας χρησιμοποιούνται πολυάριθμα ολιγονουκλεοτίδια.



# Συστοιχίες DNA

## Ολιγονουκλεοτιδικές συστοιχίες (oligonucleotide arrays)

Καινούριες τεχνικές: οπτικές ίνες (διαμέτρου 1mm) 96 οπτικές ίνες ανά μηχανήμα.

Έως 50.000 πηγάδια/ ίνα. Εκεί τοποθετούνται 50.000 σφαιρίδια όπου στερεώνονται ολιγονουκλεοτίδια 25 bp.

Αυξάνεται θεαματικά ο αριθμός των ελέγχων που μπορούν να γίνουν για πολυμορφισμό SNP ή στο επίπεδο της πρωτεϊνικής έκφρασης.

50.000 πηγάδια X 96 ίνες = 4.700.000 μετρήσεις!!



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays)

### MassARRAY Nanodispenser (Sequenom)

<http://bgiamericas.com/service-solutions/genotyping/massarray-genotyping/>

**384 θέσεις / 8 min**

▪ **6-30 nl**

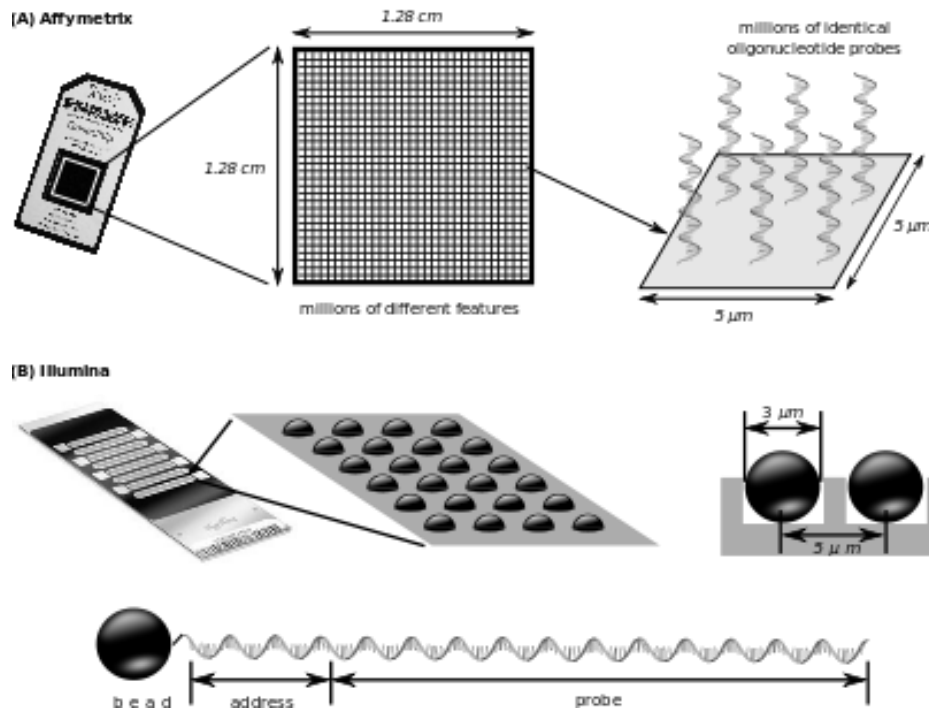
Πλεονεκτήματα:

- Υψηλή ευαισθησία
- Οικονομικά αποδοτικό
- Ευέλικτο



# Συστοιχίες DNA

## Μικρο/Ολιγοσυστοιχίες DNA



**GeneChip Zebrafish Genome Array:** παρέχει ολοκληρωμένη κάλυψη του γονιδιώματος του zebrafish και αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για αναπτυξιακές μελέτες

[www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

[www.roche.com](http://www.roche.com)

Εικόνα 12: Affymetrix GeneChip and Illumina BeadChip designs



# Συστοιχίες DNA

## Κατάλογος Συστοιχιών Affymetrix

[Arabidopsis Genome Arrays](#)  
[B. subtilis Genome Array \(Antisense\)](#)  
[Barley Genome Array](#)  
[Bovine Genome Array](#)  
[C. elegans Genome Array](#)  
[Canine Genome Array](#)  
[Drosophila Genome Arrays](#)  
[E. coli Genome Arrays](#)  
[Human Genome Arrays](#)  
[Mouse Genome Arrays](#)  
[P. aeruginosa Genome Array](#)  
[Plasmodium/Anopheles Genome Array](#)  
[Rat Genome Arrays](#)  
[S. aureus Genome Array](#)  
[Soybean Genome Array](#)  
[Vitis vinifera \(Grape\) Array](#)  
[Xenopus laevis Genome Array](#)  
[Yeast Genome Arrays](#)  
[Zebrafish Genome Array](#)



# Συστοιχίες DNA

## Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays) - Κόστος

100 δολάρια /chip, 20 chips/πείραμα= 2000 δολάρια

+ 2000 αναλώσιμα

+1000 for qPCR

**Σύνολο**

5000 δολάρια

Για μια εργασία σε ένα καλό επιστημονικό περιοδικό





# Διαδικτυακοί τόποι για Microarrays

## **Microarray methods and reagents:**

[http://www.genisphere.com/pdf/array50v2\\_10\\_19\\_04.pdf](http://www.genisphere.com/pdf/array50v2_10_19_04.pdf), Array 50 Kit Manual (Genisphere)

## **DNA sequence databases and related resources:**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Taxonomy>, NCBI Taxonomy Browser

[http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T\\_index.cgi?species=r\\_trout](http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=r_trout), TIGR rainbow trout gene index

[http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T\\_index.cgi?species=salmon](http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=salmon), TIGR Atlantic salmon gene index

<http://www.molecularcloning.com>, Molecular Cloning, a Laboratory Manual on the Web

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, National Center for Biotechnology Information (NCBI)

<http://www.phrap.org>, PHRAP program for DNA sequence assembly

## **Minimum Information About a Microarray Experiment guidelines:**

[http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame\\_checklist.html](http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_checklist.html), MIAME Checklist (Brazma et al. 2001)

## **Microarray data extraction and analysis software:**

<http://www.biodiscovery.com/index/imagene>, ImaGene microarray image processing software (BioDiscovery)

<http://www.silicongenetics.com/cgi/SiG.cgi/Products/GeneSpring/features.smf>, GeneSpring microarray data analysis software (Agilent Technologies)

[http://www.moleculardevices.com/pages/software/gn\\_genepix\\_pro.html](http://www.moleculardevices.com/pages/software/gn_genepix_pro.html), GenePix Pro 6.0 microarray image analysis software (Molecular Devices)

<http://www.bioconductor.org>, Bioconductor 1.8 (open source software for genomic data analysis)

## **Functional annotation of nucleic acid or protein sequences, and identification of molecular pathways:**

<http://www.geneontology.org>, Gene Ontology Consortium home page

<http://ca.expasy.org>, Expert Protein Analysis System (ExPASy) proteomics server

<http://www.genmapp.org/introduction.asp>, GenMAPP Gene Map Annotator and Pathway Profile

## **Submission of microarray platform, sample, and series information to a public data repository:**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, NCBI GEO (Gene Expression Omnibus)



# Φασματογράφος Μαζών (Mass Spectrometer)

Υπολογίζει τη μάζα μορίων (πρωτεΐνες, πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια) με βάση την ταχύτητα μετακίνησης τους μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο (μικρές μάζες μετακινούνται πιο γρήγορα από μεγάλες).

Τα βασικά του στοιχεία είναι:

- Ο ιονιστής,
- Ο αναλυτής μαζών και
- Ο ανιχνευτής



# Φασματογράφος Μαζών (1/3)

- Η πηγή ιονισμού ιονίζει τα μόρια
- Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει τα ιονισμένα τμήματα ανάλογα με το πηλίκο μάζα / φορτίο ( $m/z$ , mass charge ratio)
- Ο ανιχνευτής υπολογίζει το χρόνο διαχωρισμού,
- Ισχυρά υπολογιστικά προγράμματα, αναζητούν σε πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων, ποια πρωτεΐνη θα μπορούσε, να δώσει τα συγκεκριμένα πεπτίδια με τις συγκεκριμένες μάζες



# Φασματογράφος Μαζών (2/3)

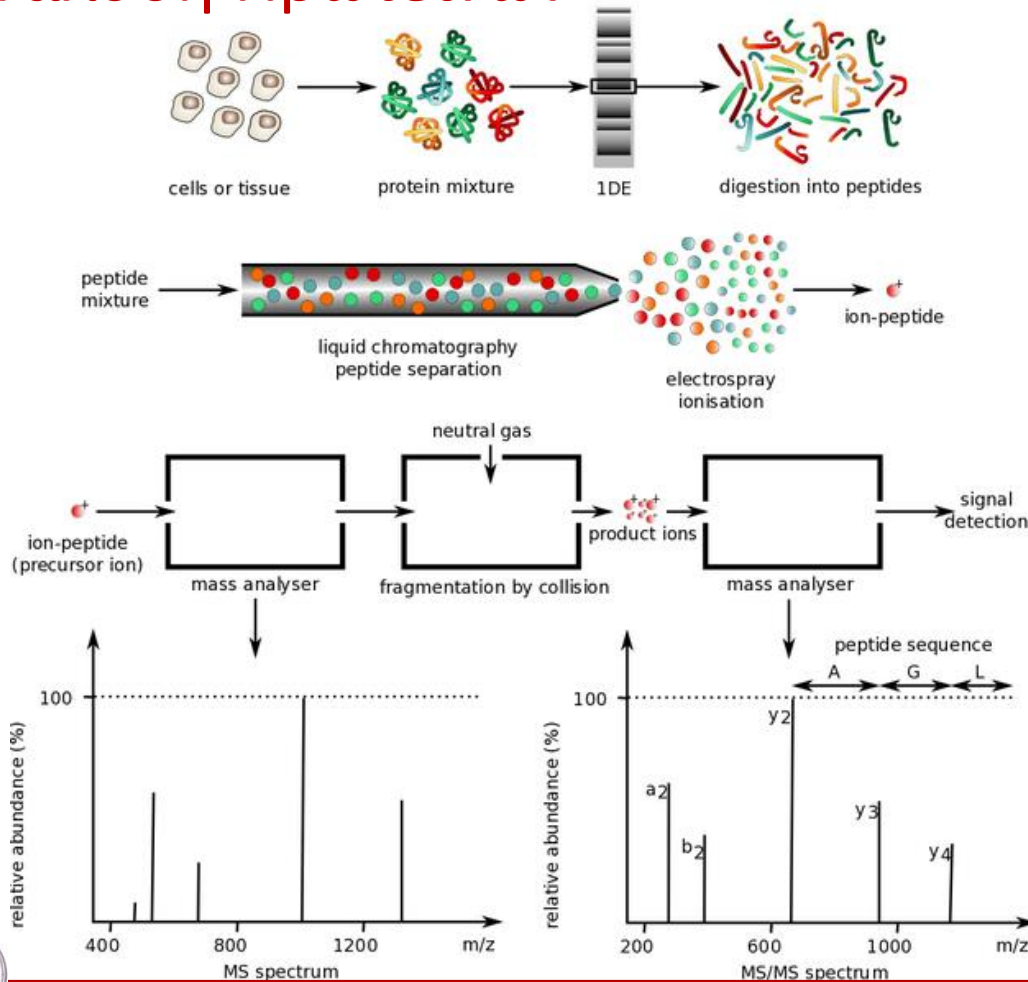
- Ο MS μπορεί να αλληλουχήσει πεπτίδια, σπάζοντάς τα και στη συνέχεια υπολογίζοντας τη μάζα των νέων πεπτιδίων
- Ένα τέτοιο μηχάνημα ονομάζεται **Σειριακός φασματογράφος μαζών (tandem mass spectrometer, MS/MS)**
- Εργαλείο για ταυτοποίηση και αλληλούχηση πεπτιδίων από σύμπλοκα πρωτεϊνών καθώς και για γενοτύπηση SNP

[http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n4/fig\\_tab/nprot.2006.257\\_F4.html](http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n4/fig_tab/nprot.2006.257_F4.html)



# Φασματογράφος Μαζών (3/3)

## Ανάλυση Πρωτεϊνών



**Εικόνα 13:** Mass spectrometry protocol



# Σημείωμα χρήσης έργων τρίτων

**Sanger sequencing**, <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>)

**DNA microarray**, <http://www.flickr.com/photos/ajc1/2034113679/sizes/o/>, by AJC1, CC-BY-NC-2.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)

**Affymetrix GeneChip and Illumina BeadChip designs**,

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Affymetrix\\_GeneChip\\_and\\_Illumina\\_BeadChip\\_designs.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Affymetrix_GeneChip_and_Illumina_BeadChip_designs.svg), by Philippe Hupe, CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>)

**Mass spectrometry protocol**, [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mass\\_spectrometry\\_protocol.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mass_spectrometry_protocol.png), by Philippe Hupe, CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>)



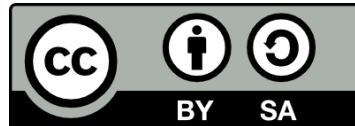
# Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τριανταφυλλίδης Αλέξανδρος. «Ειδικά Θέματα Γενετικής. Μηχανήματα λειτουργικής γονιδιωματικής». Έκδοση: 1.0. Θεσσαλονίκη 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: [http://opencourses.auth.gr/eclass\\_courses](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 2014-2015



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.

