

Ανασυνδυασμένο DNA

Κατασκευή γονιδιωματικής και
cDNA βιβλιοθήκης

Εισαγωγή

Γενετική Μηχανική: τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό

Εφαρμογές:

- α) μελέτη της εξέλιξη των ειδών
- β) Ιατρική, γεωργία, κτηνοτροφία

Ανασυνδυασμένο DNA

Ανασυνδυασμένο DNA:

μόριο DNA που περιέχει γενετικό υλικό από δύο ή και περισσότερους οργανισμούς

ικανότητα αναπαραγωγής μέσα σε βακτήρια ή ευκαρυωτικά κύτταρα

μεταφορά νέων ιδιοτήτων στους απογόνους

Χρήσιμοι όροι

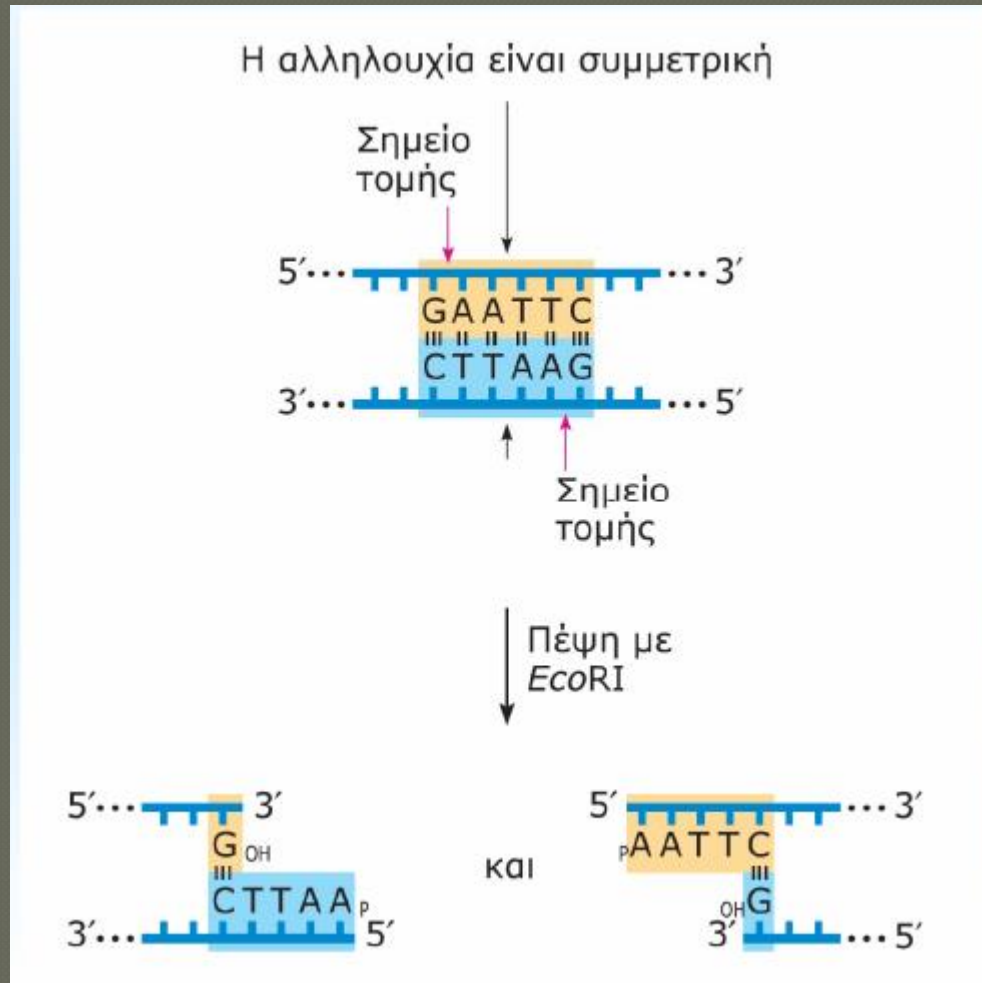
Κλώνος: ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών

Κλωνοποίηση: διαδικασία κατασκευής κλώνων

Γονιδιωματική βιβλιοθήκη: σύνολο βακτηριακών κλώνων που περιέχει το συνολικό DNA ενός οργανισμού

Αποδιάταξη και υβριδοποίηση αλυσίδων νουκλεϊκών οξέων

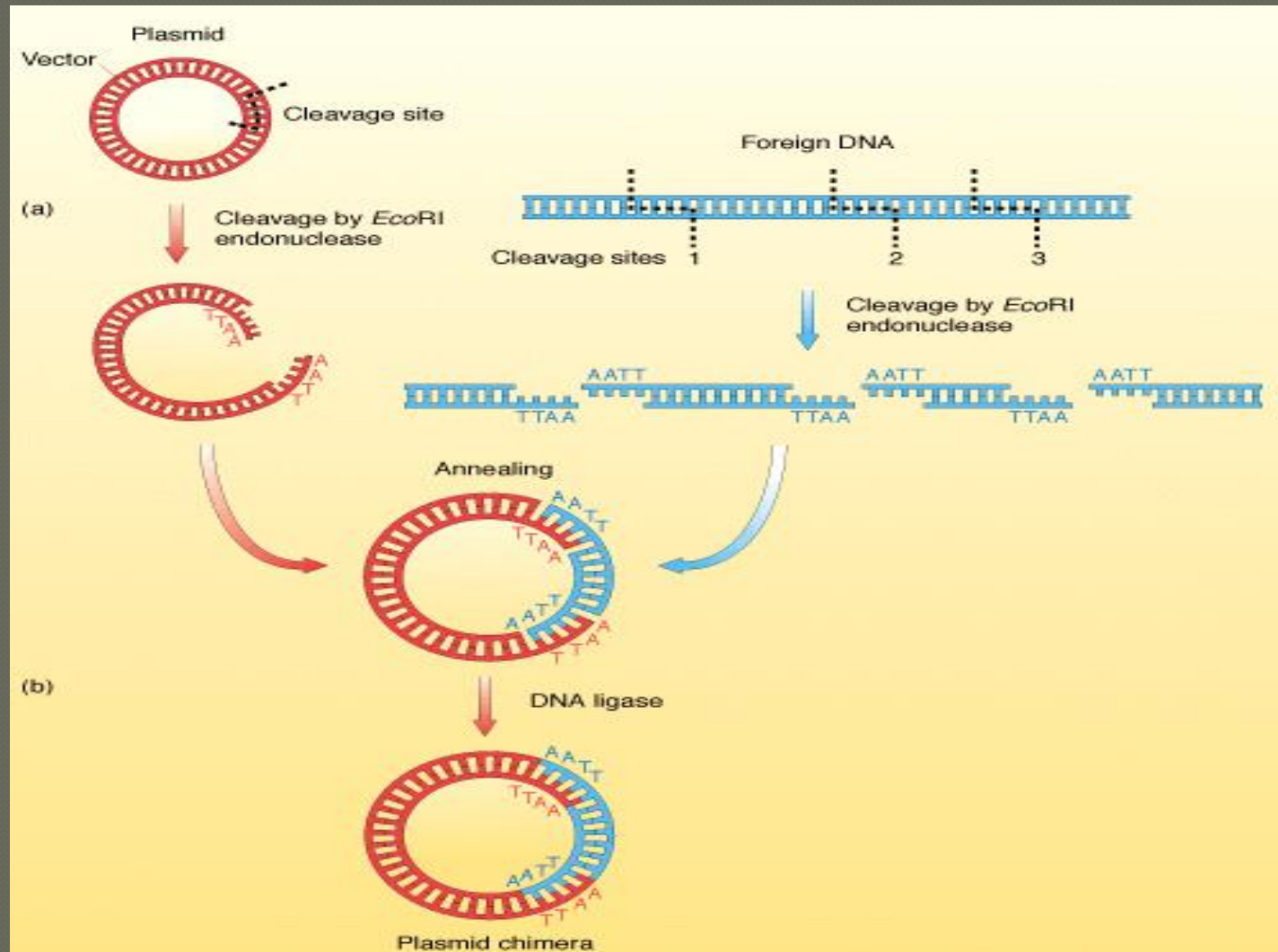
Περιοριστικές ενδονουκλεάσες



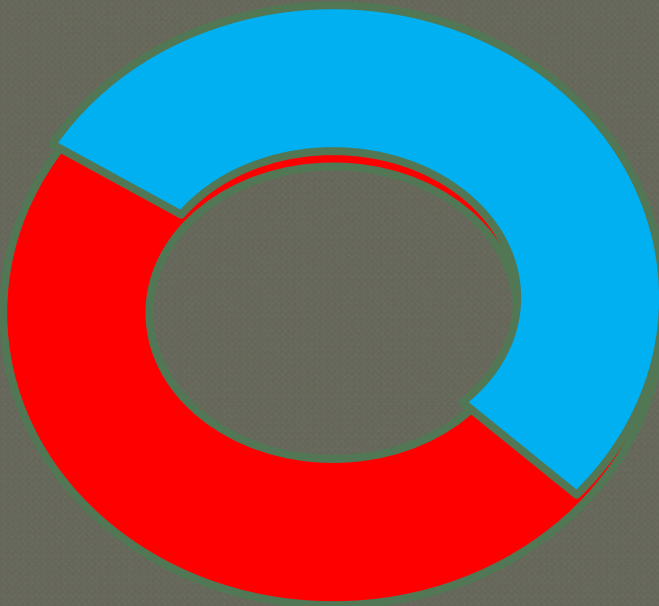
Στάδια κατασκευής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

- 1.Κατασκευή ανασυνδυασμένου μορίου DNA
2. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων
3. Κλωνοποίηση βακτηριακών κυττάρων
- 4.Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο
5. Επιλογή του βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA

Δημιουργία ανασυνδυασμένου μορίου DNA



Αποτέλεσμα ανασυνδυασμού

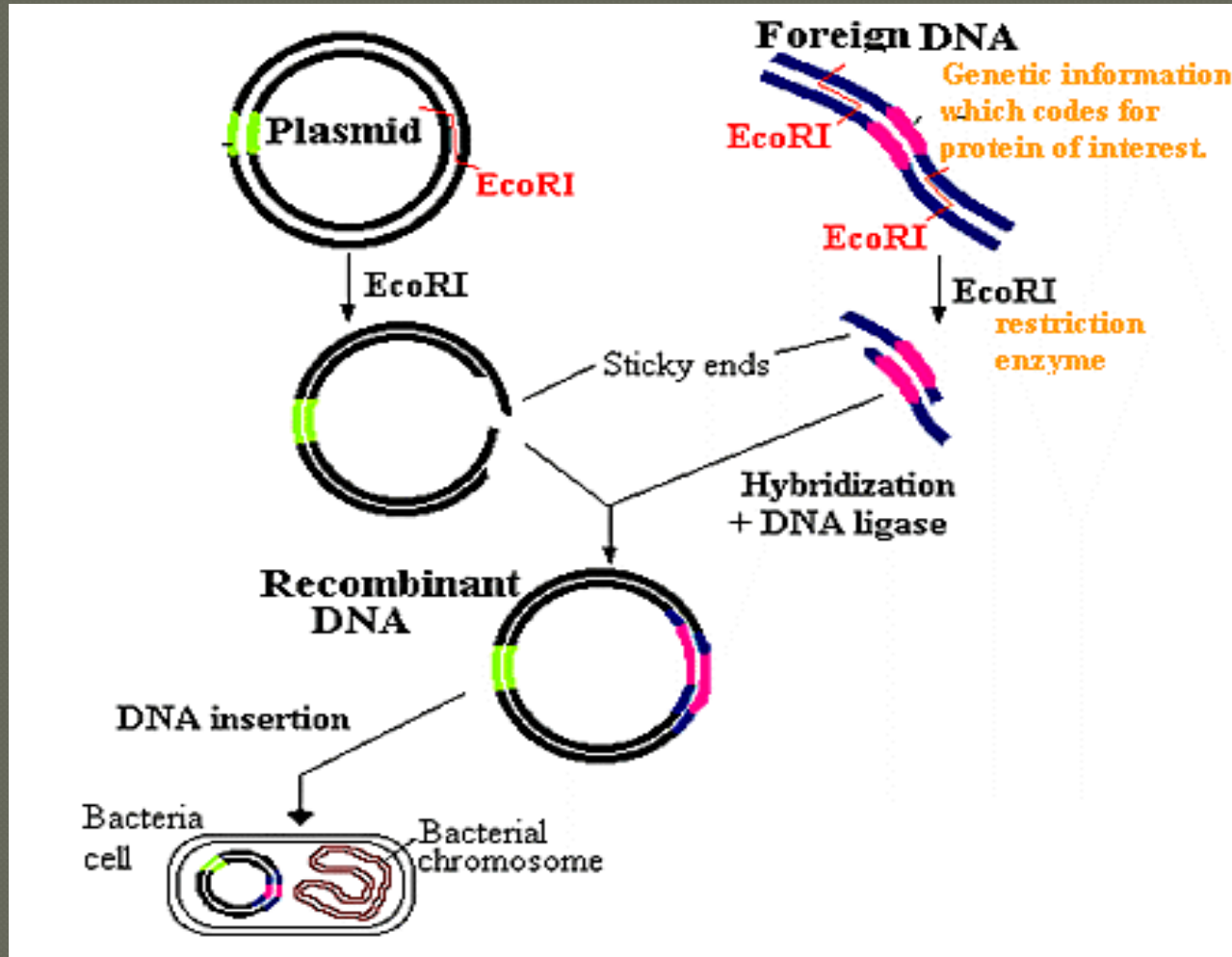


Αναςυνδυασμένο πλασμίδιο



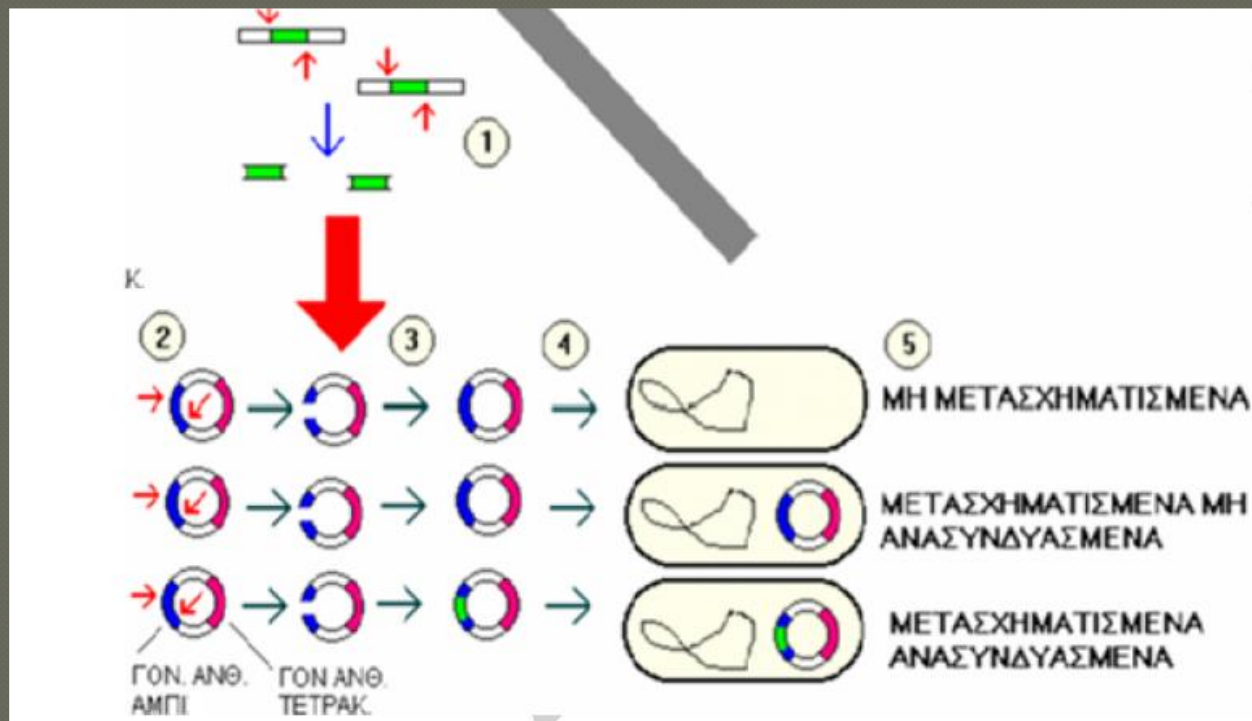
Μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων



Αποτέλεσμα μετασχηματισμού

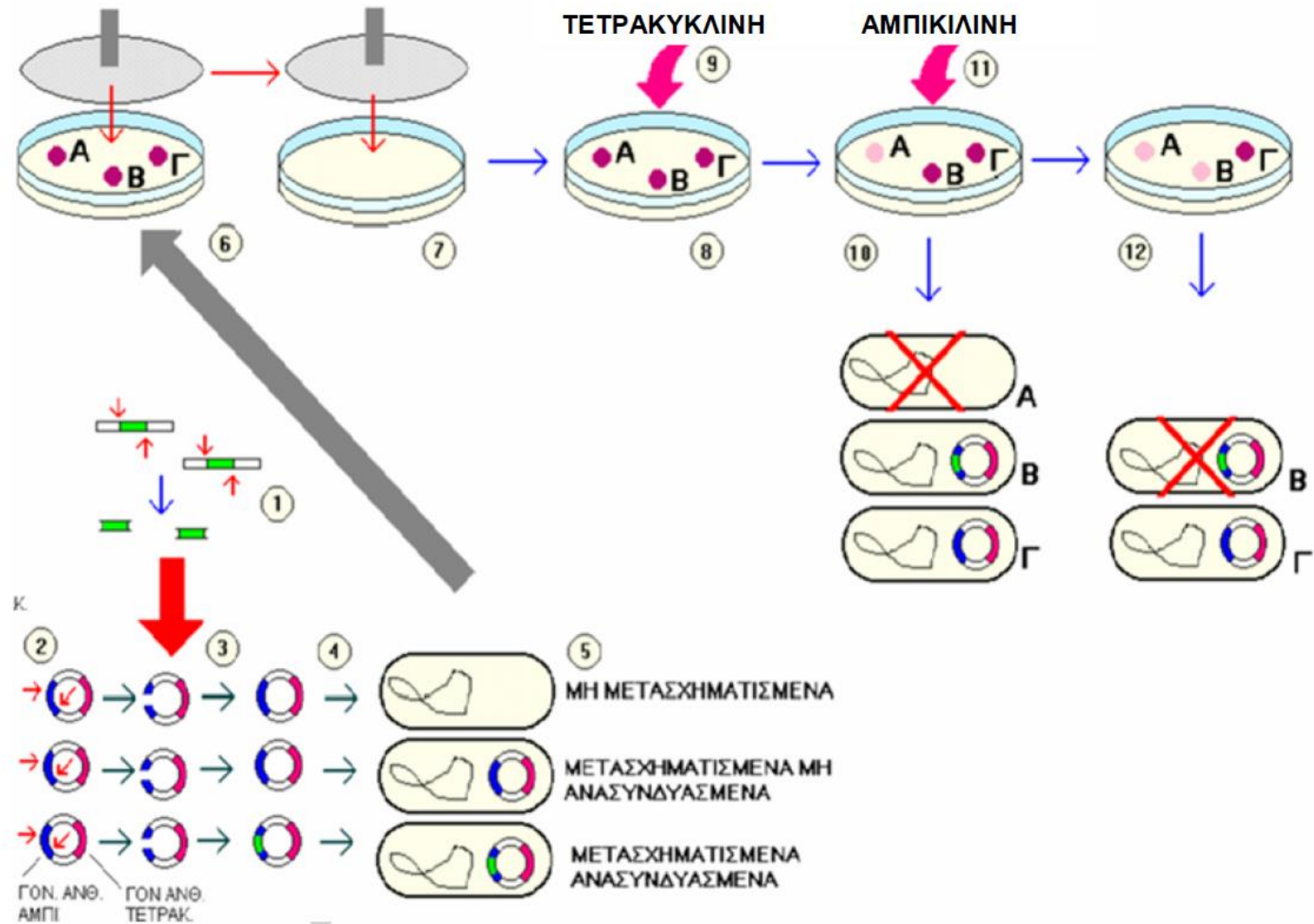
- μη μετασχηματισμένα βακτήρια
- μετασχηματισμένα βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο
- μετασχηματισμένα βακτήρια με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο



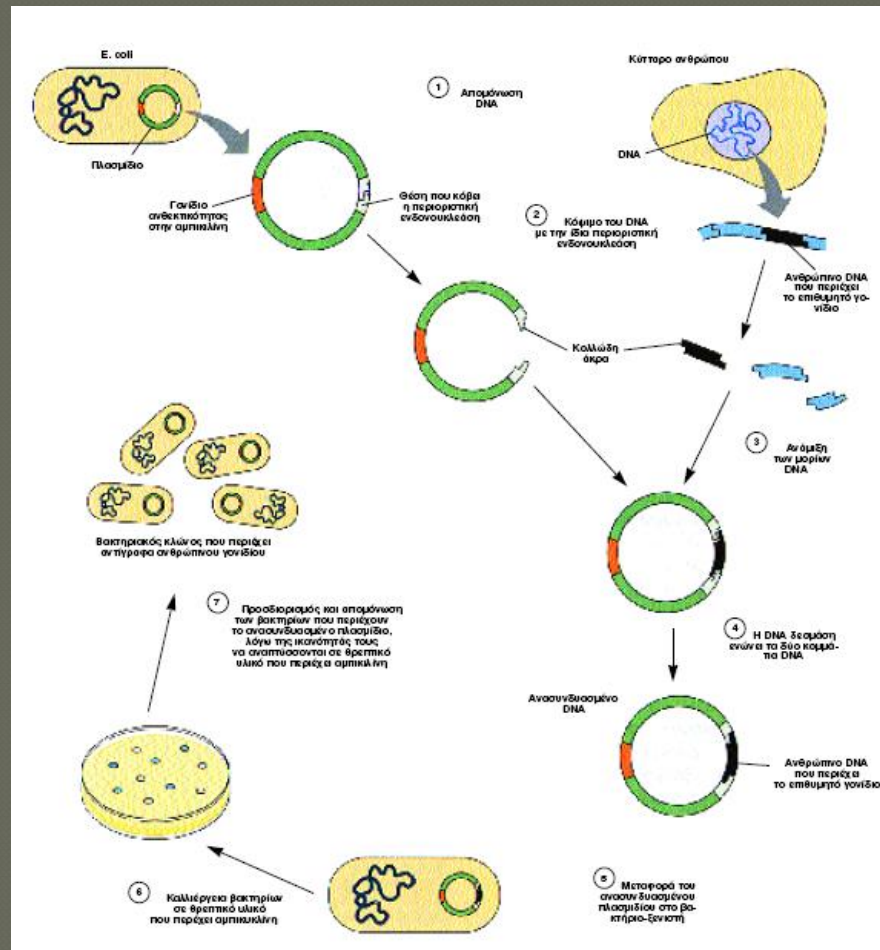
Κλωνοποίηση βακτηριακών κυττάρων



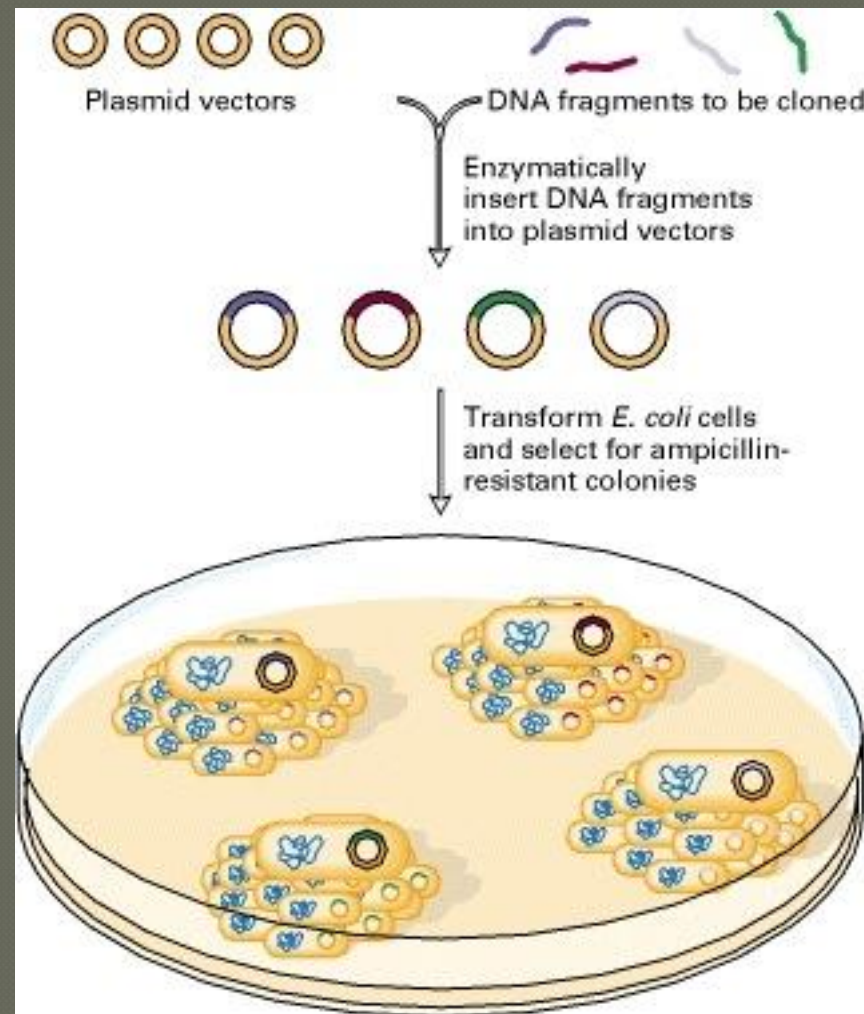
Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο



Επιλογή κλώνων που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο



Γονιδιωματική βιβλιοθήκη



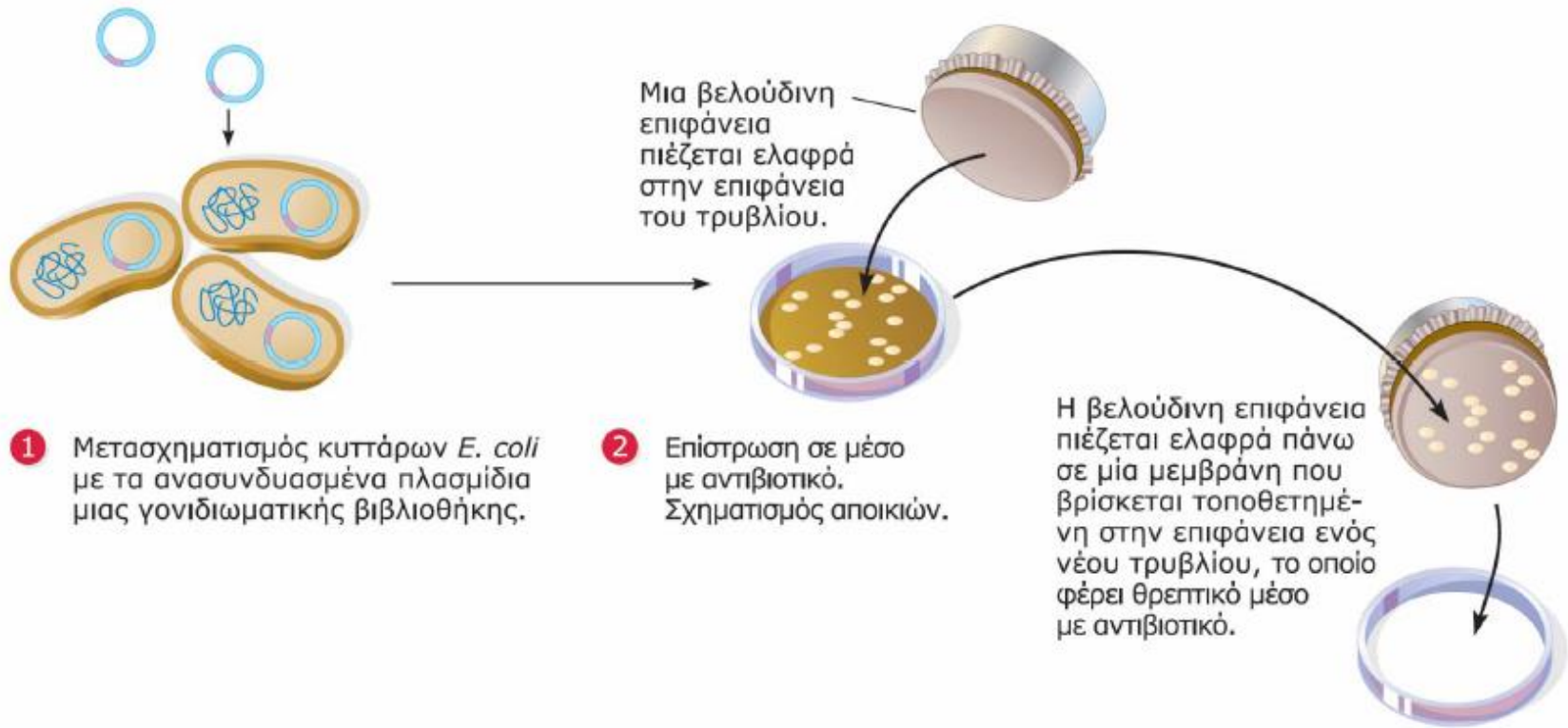
Επιλογή του βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA

Ιχνηθετημένα μόρια DNA ή RNA που είναι μονόκλωνα και συμπληρωματικά προς την επιθυμητή αλληλουχία

Αποδιάταξη βιβλιοθήκης

Υβριδισμός ανιχνευτή με την επιθυμητή αλληλουχία

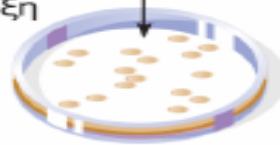
Επιλογή του βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA



Επιλογή του βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA

3

Πολλαπλασιασμός των βακτηρίων στην επιφάνεια της μεμβράνης. Η διάταξη των αποικιών στη μεμβράνη είναι ίδια με αυτή στο αρχικό τρυβλίο.

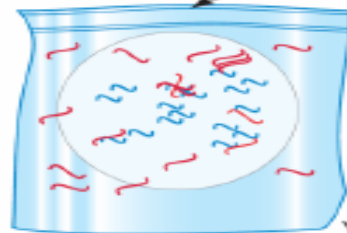


4

Αφαίρεση της μεμβράνης από το τρυβλίο, λύση των βακτηρίων *in situ*, αποδιάταξη του DNA και δέσμευσή του στην επιφάνεια της μεμβράνης.

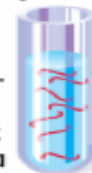


Υβριδοποίηση με κατάλληλο ιχνηθέτη. Δέσμευση του ιχνηθέτη στις συμπληρωματικές προς αυτόν αλληλουχίες που βρίσκονται καθηλωμένες στη μεμβράνη.



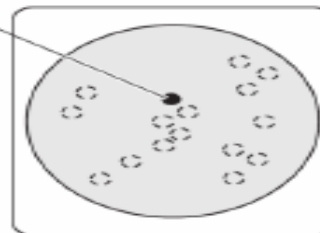
5

Αποδιάταξη του σημασμένου ιχνηθέτη και επώαση της μεμβράνης με αυτόν μέσα σε μία ερμητικά κλειστή σακούλα.



6

Έκπτυση και απομάκρυνση της περίσσειας του ιχνηθέτη. Ταυτοποίηση των θετικών κλώνων (π.χ. με αυτοραδιογραφία αν ο ιχνηθέτης είναι ραδιενεργά σημασμένος).



Φορείς κλωνοποίησης

Μόρια DNA που ενσωματώνουν κομμάτια ξένου DNA

Ικανότητα μετασχηματισμού βακτηριακού κυττάρου

Ανεξάρτητος διπλασιασμός

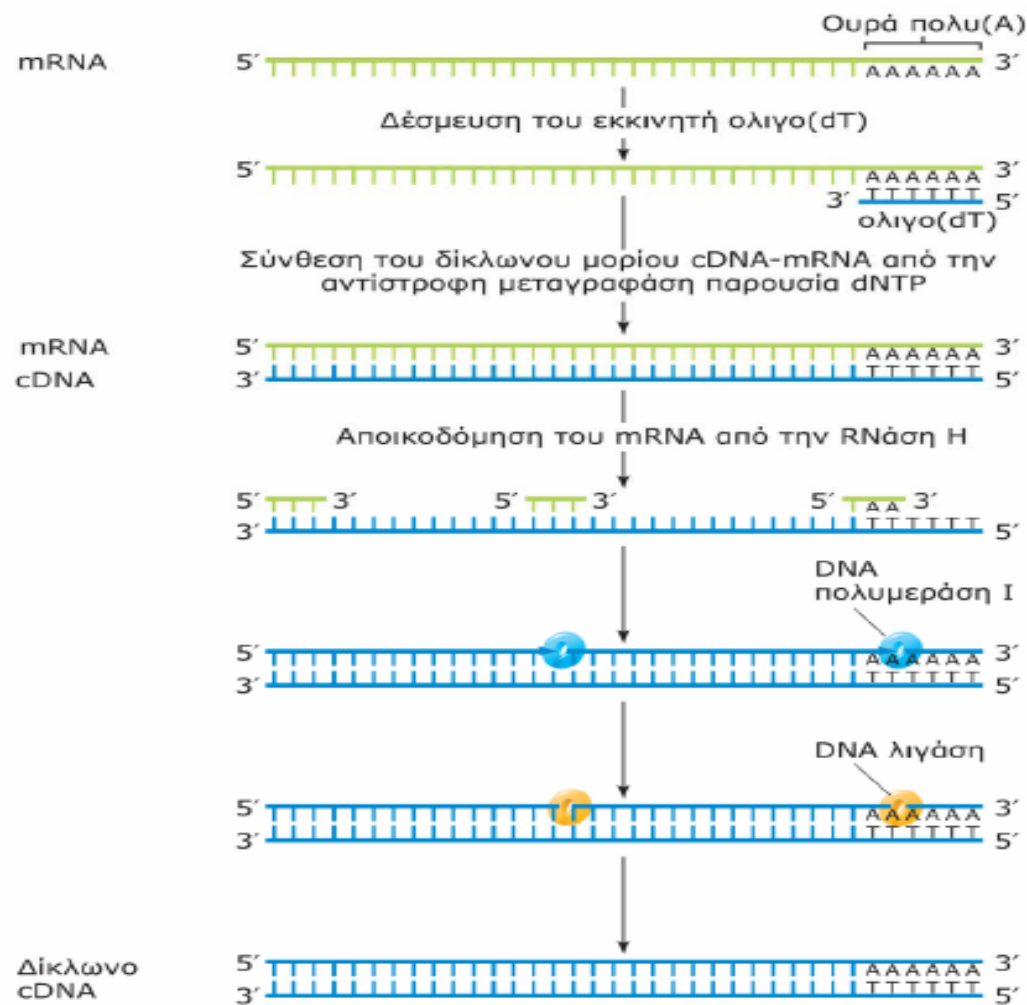
Διαθέτει μία θέση αναγνώρισης από περιοριστική ενδονουκλεάση

Διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Πλασμίδιο: ενσωματώνει μικρά κομμάτια ξένου DNA

Βακτηριοφάγος λ: ενσωματώνει μεγαλύτερα κομμάτια ξένου DNA

Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης



Τα τμήματα του μερικώς αποικοδομημένου RNA που έχουν παραμείνει συνδεδεμένα στο μονόκλωνο DNA χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για τη σύνθεση του δεύτερου κλώνου.

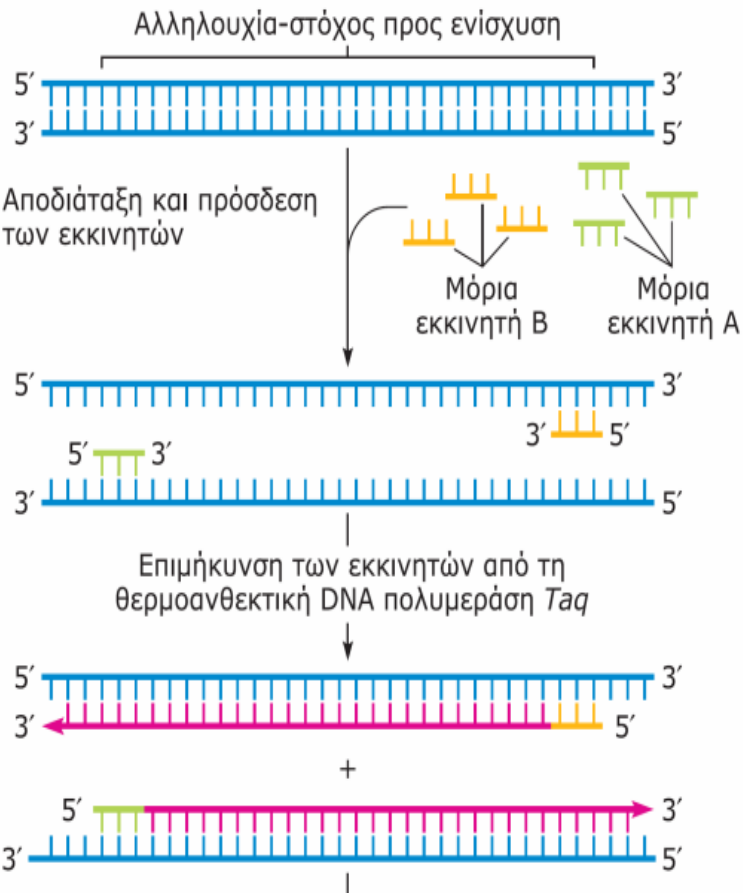
Η DNA πολυμεράση I συνθέτει νέα τμήματα DNA και αφαιρεί τους εκκινητές RNA.

Τα τμήματα του DNA ενώνονται από την DNA λιγάση.

PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Αρχικό δίκλωνο DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο



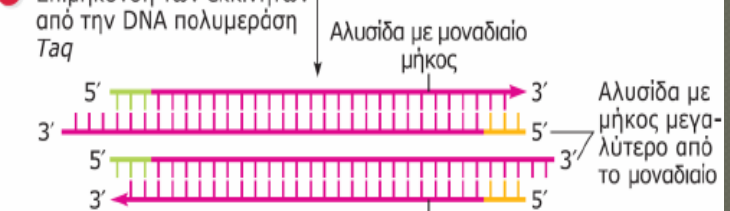
3 Επανάληψη αποδιάταξης και πρόσδεσης των εκκινητών

Νέο μόριο εκκινητή A

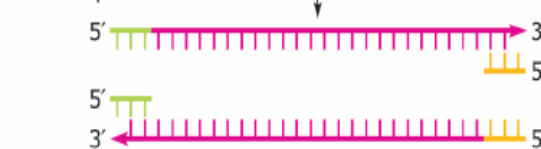


4 Επιμήκυνση των εκκινητών από την DNA πολυμεράση *Taq*

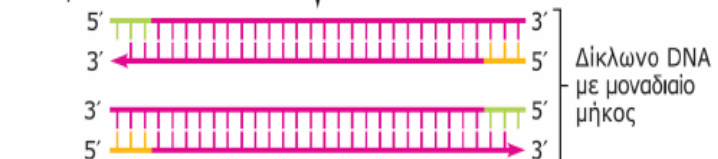
Νέο μόριο εκκινητή B



5 Επανάληψη αποδιάταξης και πρόσδεσης των εκκινητών



6 Επιμήκυνση των εκκινητών από την DNA πολυμεράση *Taq*



Συνεχιζόμενοι κύκλοι και πολλαπλασιασμός του DNA

