
Μεθοδολογία της Μοριακής Γενετικής Φυτών



ΑΜΒΦ - Κ. Χαρολαμπίδης



Μεθοδολογία στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών

1. Πρότυπα μοντέλα στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών
2. Μέθοδοι μετασχηματισμού και μεταλλαξιγένεσης
3. Απόκτηση μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis*
4. Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
5. Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
6. Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη
7. Τρόποι μελέτης της έκφρασης και λειτουργίας ενός γονιδίου
8. Παραδείγματα μελετών μοριακής γενετικής



Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών

Οι διαφορετικές συνθήκες που ένας ερευνητής μπορεί να χρησιμοποιήσει προκειμένου να αναγνωρίσει και να μελετήσει έναν φαινότυπο μίας μεταλλαγμένης σειράς είναι αναρίθμητες και περιορίζονται μόνο από τη φαντασία του εκάστοτε ερευνητή. Σημαντικό ρόλο παίζει η πρόβλεψη της πιθανής λειτουργίας του υπό μελέτη γονιδίου.

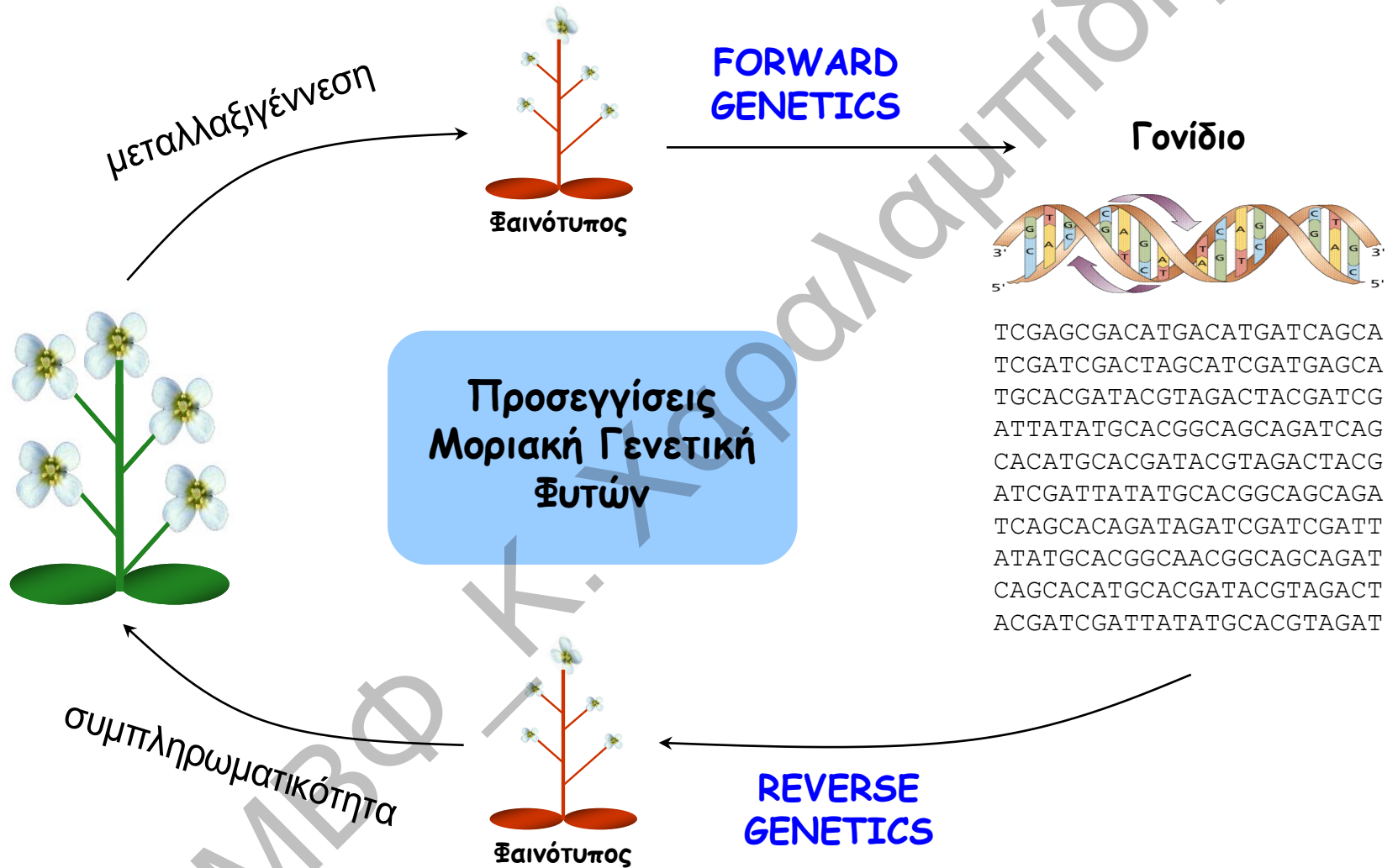
1. Μακροσκοπική παρατήρηση
2. Παράμετροι αύξησης ρίζας, βλαστού, υποκοτυλίου κλπ.
3. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του βλαστού, των ανθέων, των φύλλων, των τριχιδίων, του ρυθμού βλάστησης των σπερμάτων κλπ.
4. Ορμονική απόκριση σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες και παρουσία ή απουσία πρόδρομων ενώσεων και αναστολέων κλπ.
5. Απόκριση σε αβιοτικά ερεθίσματα και καταπονήσεις όπως η αλατότητα, η θερμοκρασία, η αφυδάτωση, τα βαρέα μέταλλα, κλπ.)
6. Απόκριση σε βακτηριακά και ωομυκητιακά παθογόνα.
7. Ιστολογικές αναλύσεις και ειδικές χρώσεις
8. Τεχνικές προηγμένης μικροσκοπίας (SEM, TEM, CM)



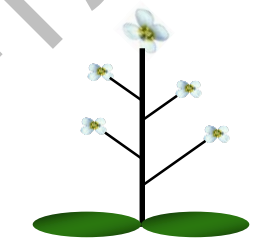
Μεθοδολογία στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών

1. Πρότυπα μοντέλα στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών
2. Μέθοδοι μετασχηματισμού και μεταλλαξιγένεσης
3. Απόκτηση μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis*
4. Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
5. Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
6. Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη
7. Τρόποι μελέτης της έκφρασης και λειτουργίας ενός γονιδίου
8. Παραδείγματα μελετών μοριακής γενετικής

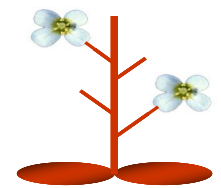
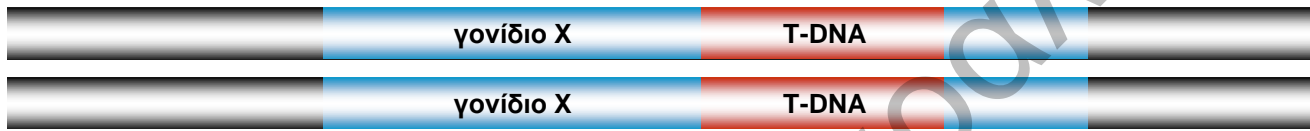
Forward vs. Reverse Genetics



Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη με TAIL-PCR



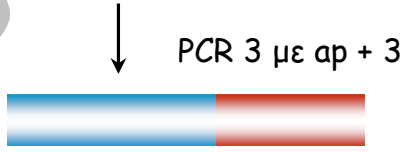
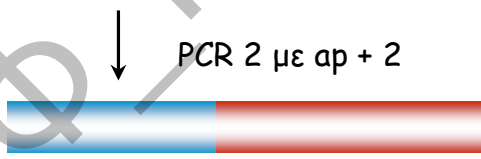
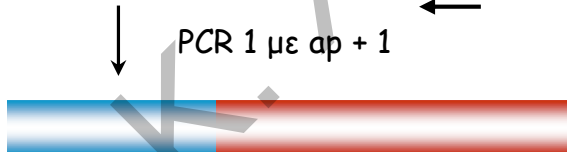
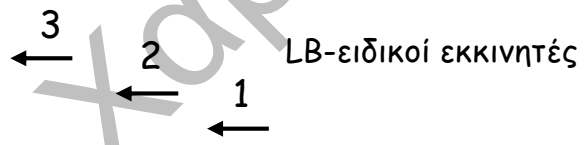
άγριος τύπος = X⁺



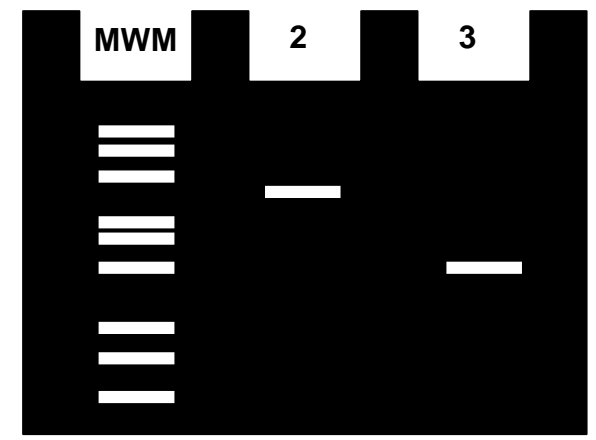
μετάλλαγμα = x⁻

Εκφυλισμένοι εκκινητές (arbitrary primers - ap)

Μείγμα 256 ή 512 διαφορετικών εκκινητών



Arbitrary 13mer*	Mismatches (bp)
AAgCTtGCACCAT	2
AAgcttCGACTGT	4
aagCttGCACCAT	5
AAgctTGATTGCC	4
aagctTAGAGGCA	5
aagcTTTCATATG	4
aagCTTGATTGCC	3



Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη...

...με "κλωνοποίηση θέσης" (positional cloning)

Οι μεταλλάξεις με EMS και βομβαρδισμό νετρονίων δεν σχετίζονται με ενθέσεις γνωστών ακολουθιών. Κατ' αυτό τον τρόπο δεν υπάρχει κάποιος φυσικός δείκτης (marker), ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση του μεταλλαγμένου γονιδίου.

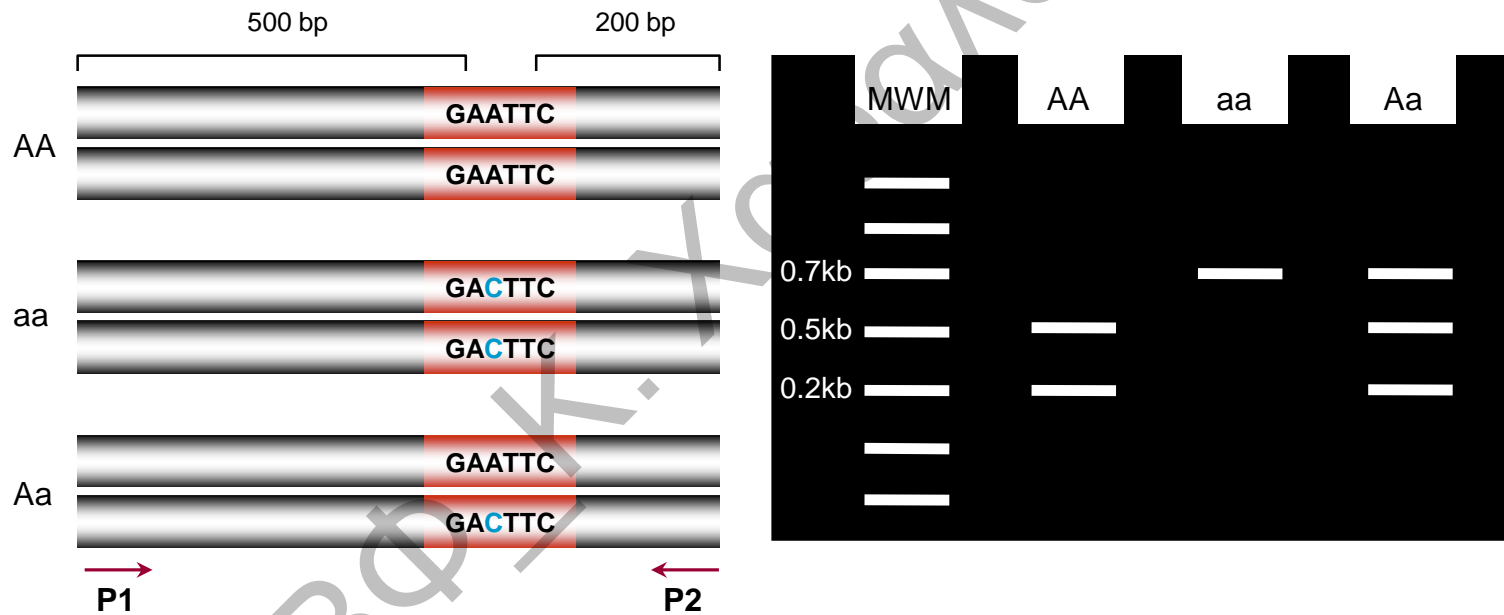
Η μεθοδολογία περιλαμβάνει:

1. Τη χαρτογράφηση του YFG σε μία μικρή περιοχή (<1 cM) με τη βοήθεια CAPS μοριακών δεικτών)
2. Την απομόνωση και κλωνοποίηση της περιοχής που περιέχει το YFG
3. Τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας ολόκληρης της περιοχής ή/και την πραγματοποίηση πειραμάτων συμπληρωματικότητας

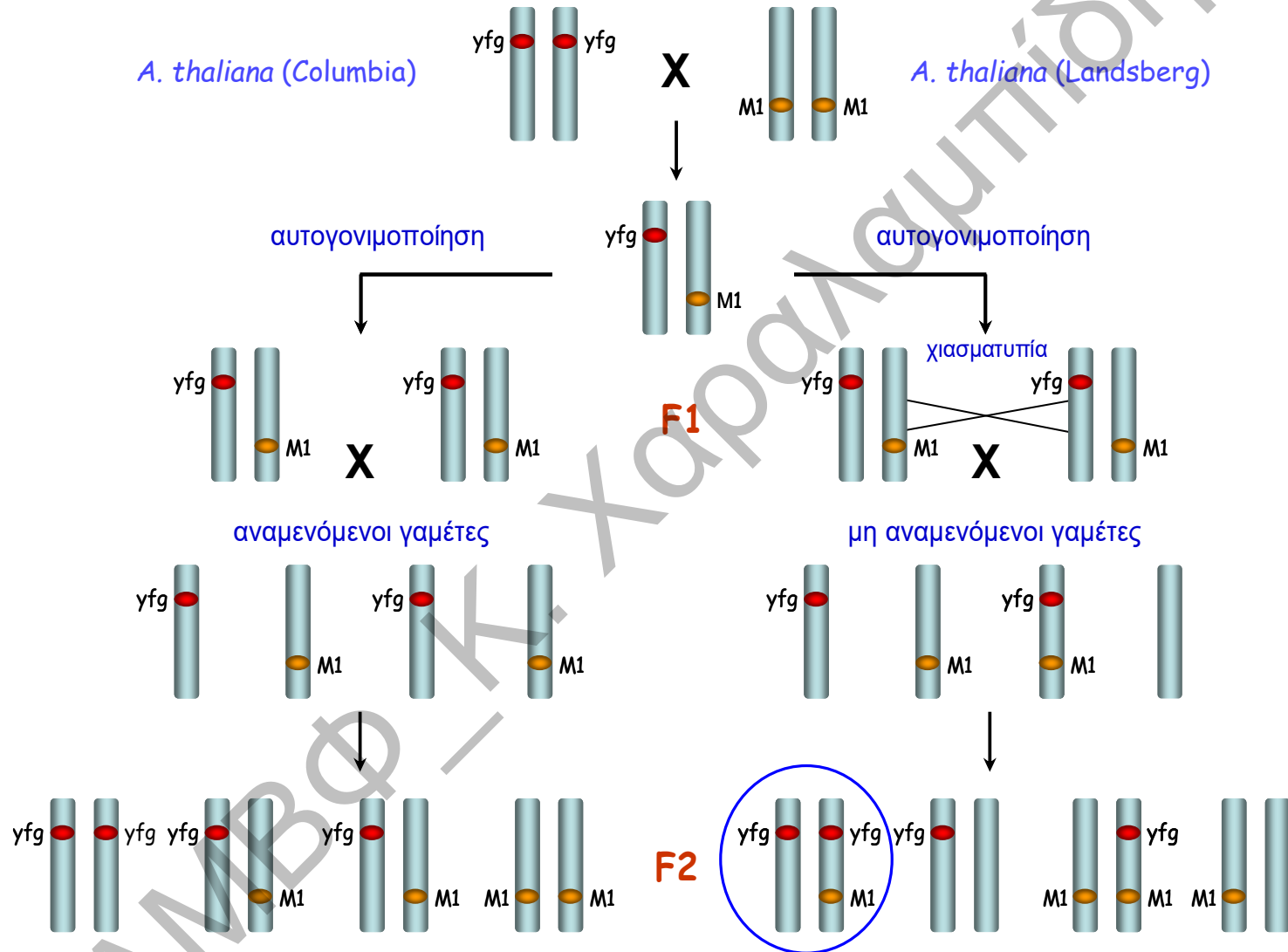


CAPS μοριακοί δείκτες

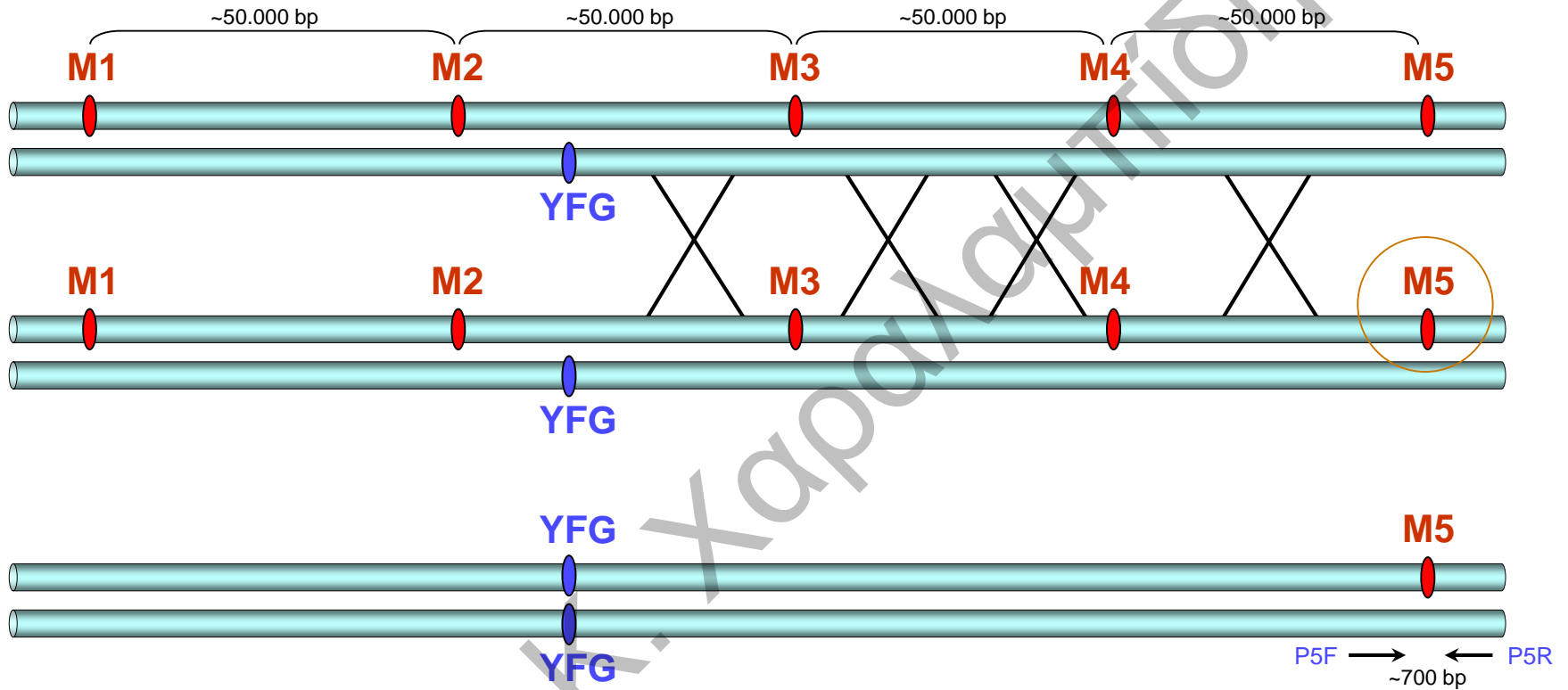
Οι μοριακοί δείκτες CAPS βασίζονται σε πολυμορφισμούς, οι οποίοι δημιουργούν ή καταστρέφουν τη θέση αναγνώρισης μίας συγκεκριμένης περιοριστικής ενδονουκλεάσης.



"Κλωνοποίηση θέσης" (positional cloning - map based cloning)



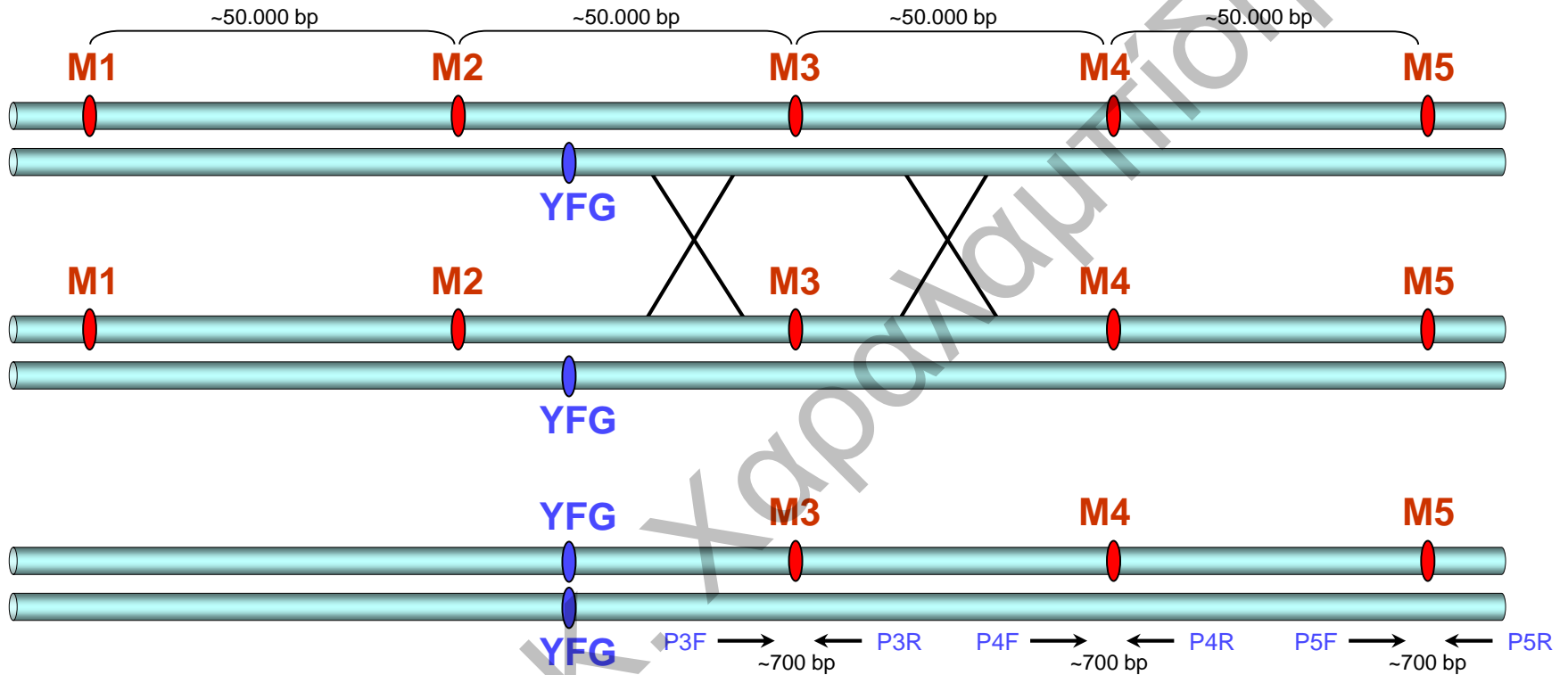
"Κλωνοποίηση θέσης" (positional cloning - map based cloning)



Ομόζυγα άτομα από μη αναμενόμενους γαμέτες = X



"Κλωνοποίηση θέσης" (positional cloning - map based cloning)



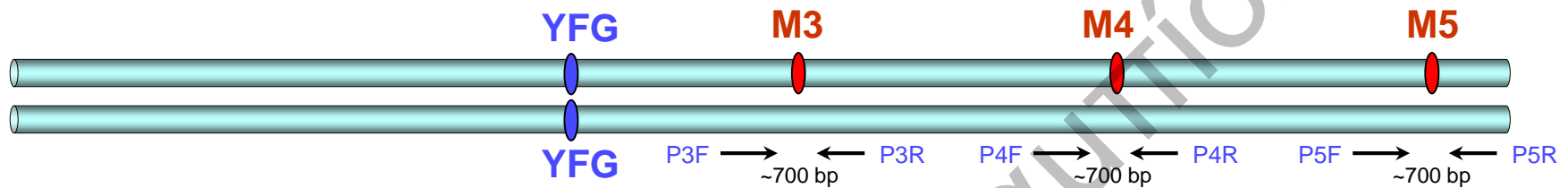
Ομόζυγα άτομα = $X/3$

Ομόζυγα άτομα = $X/2$

Ομόζυγα άτομα από μη αναμενόμενους γαμέτες = X



"Κλωνοποίηση θέσης" (positional cloning - map based cloning)



1. Καθορισμός της θέσης του YFG σε χρωμόσωμα

Αναγνώριση >100 *yfg* ομόζυγων φυτών για τη χαρτογράφηση

Χρησιμοποιούμε μοριακούς δείκτες που εντοπίζονται σε διάφορα χρωμοσώματα

Κάποιοι μοριακοί δείκτες θα πρέπει να δείξουν σύνδεση με το *yfg* (από μη αναμενόμενους γαμέτες)

2. Χαρτογράφηση του YFG σε όσο το δυνατό μικρότερη περιοχή

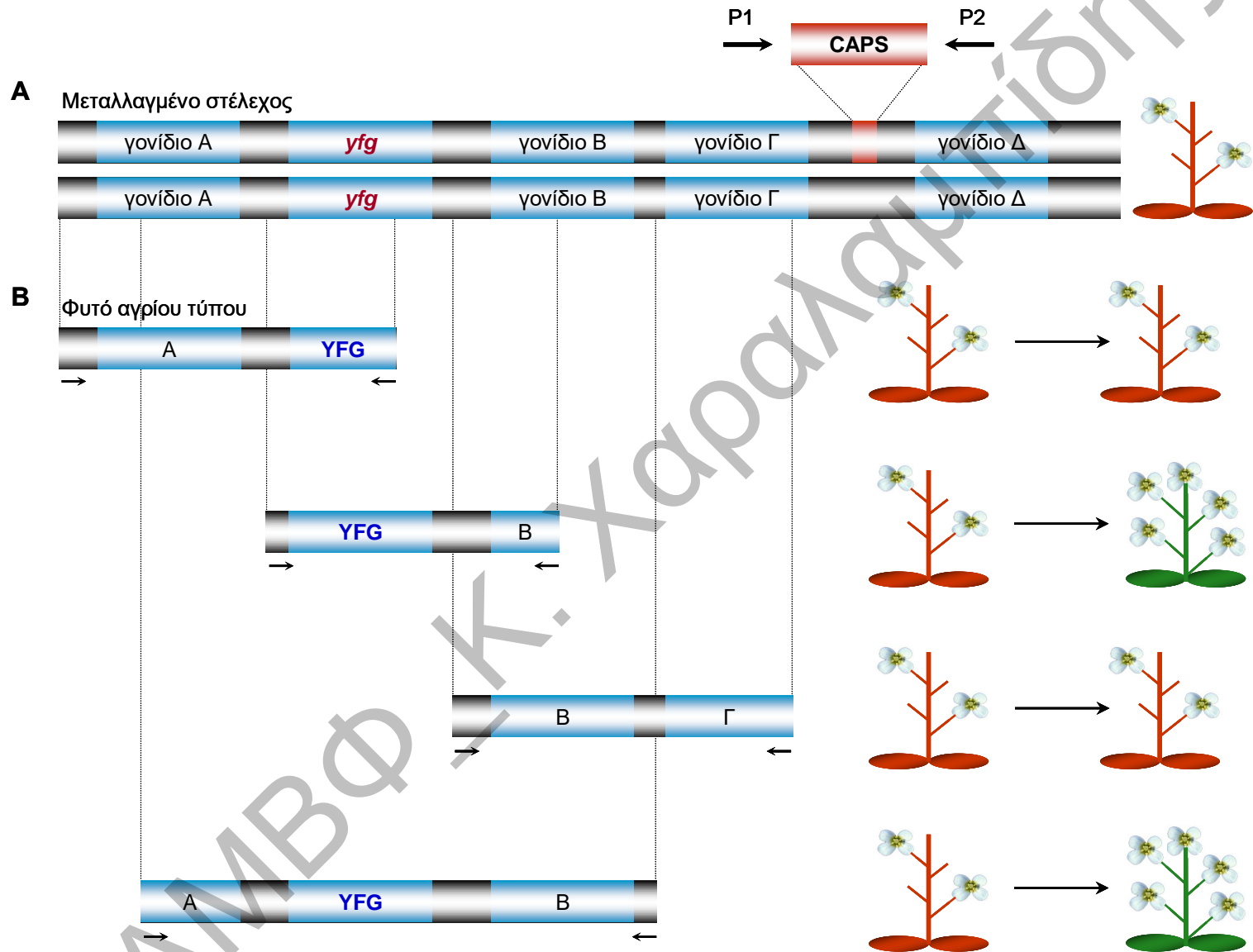
Χαρτογράφηση του YFG σε μία περιοχή ~50.000 bp (0.25 cM για το *Arabidopsis thaliana*)

>1600 F2 φυτά (>400 ομόζυγα) πρέπει να σαρωθούν με μοριακούς δείκτες του χρωμοσώματος

Εύρεση του αντίστοιχου BAC ή YAC κλώνου για συνέχιση των πειραμάτων



Αναγνώριση του γονιδίου που ευθύνεται για τον φαινότυπο



Μεθοδολογία στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών

1. Πρότυπα μοντέλα στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών
2. Μέθοδοι μετασχηματισμού και μεταλλαξιγένεσης
3. Απόκτηση μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis*
4. Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
5. Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
6. Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη
7. Τρόποι μελέτης της έκφρασης και λειτουργίας ενός γονιδίου
8. Παραδείγματα μελετών μοριακής γενετικής

1. RNA έκφραση σε ολόκληρα φυτά, ιστούς και *in situ*
 - RNA blot υβριδισμός
 - RT-PCR ανάλυση
 - RNA *in situ* υβριδισμός
 - Whole -mount *in situ* υβριδιαμός
2. Χρήση γονιδίων μάρτυρες (reporter genes)
 - β-γλουκουρονιδάση (GUS).
 - Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP).
 - Λουσιφεράση (LUC).
3. Μαζική ανάλυση γονιδιακής έκφρασης
 - cDNA-AFLP
 - Microarrays
4. Μελέτες πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων
 - Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
 - Πειράματα ενζυμική δραστηριότητα
 - Παραγωγή αντισωμάτων
 - Ανοσοκαθίζηση και ανοσοανίχνευση
 - Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις
5. Knock-outs και γονιδιακή σίγηση (RNAi - PTGS)

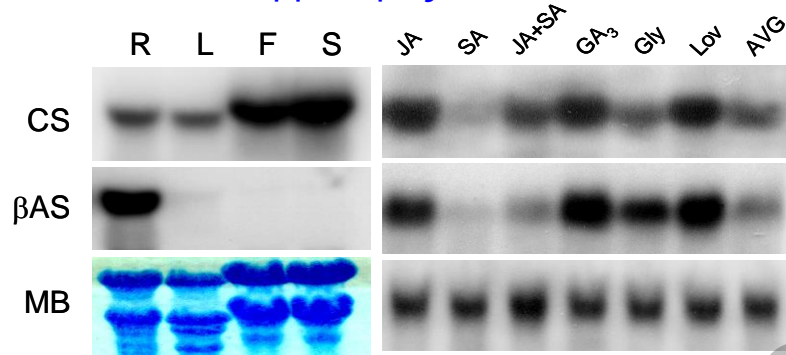


Northern blot RNA υβριδισμός (Northern hybridization)

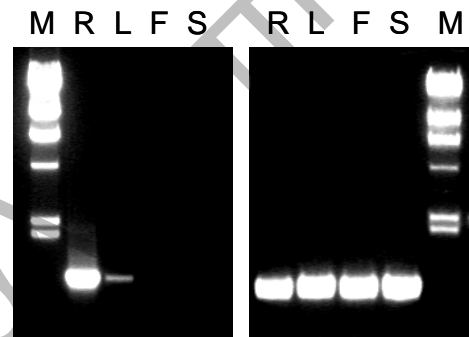


RNA έκφραση

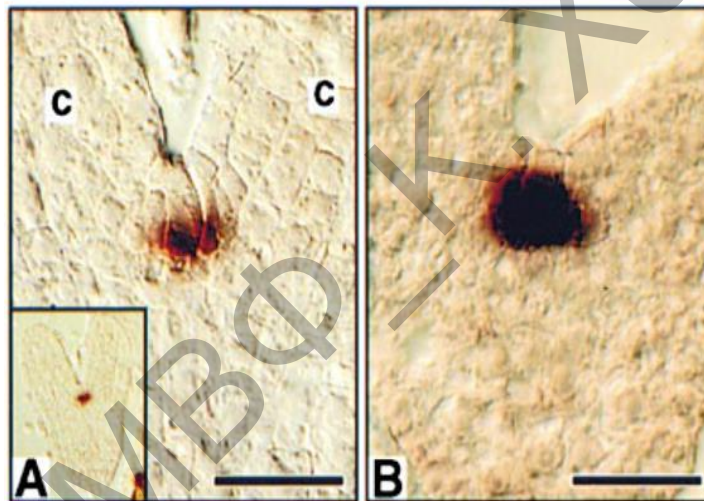
RNA blot υβριδισμός



RT-PCR ανάλυση



RNA *in situ* υβριδισμός



Whole-mount *in situ*

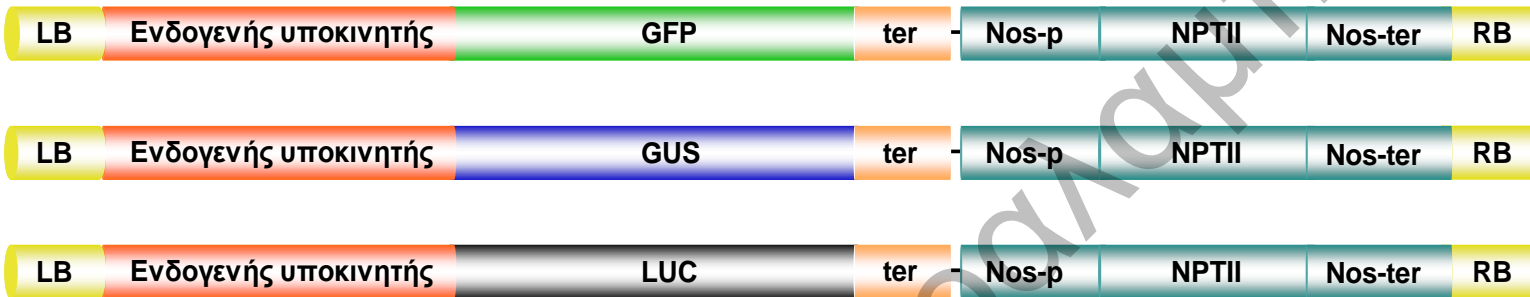


1. RNA έκφραση σε ολόκληρα φυτά, ιστούς και *in situ*
 - RNA blot υβριδισμός
 - RT-PCR ανάλυση
 - RNA *in situ* υβριδισμός
 - Whole -mount *in situ* υβριδιαμός
2. Χρήση γονιδίων μάρτυρες (reporter genes)
 - β-γλουκουρονιδάση (GUS).
 - Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP).
 - Λουσιφεράση (LUC).
3. Μαζική ανάλυση γονιδιακής έκφρασης
 - cDNA-AFLP
 - Microarrays
4. Μελέτες πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων
 - Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
 - Πειράματα ενζυμική δραστηριότητα
 - Παραγωγή αντισωμάτων
 - Ανοσοκαθίζηση και ανοσοανίχνευση
 - Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις
5. Knock-outs και γονιδιακή σίγηση (RNAi - PTGS)

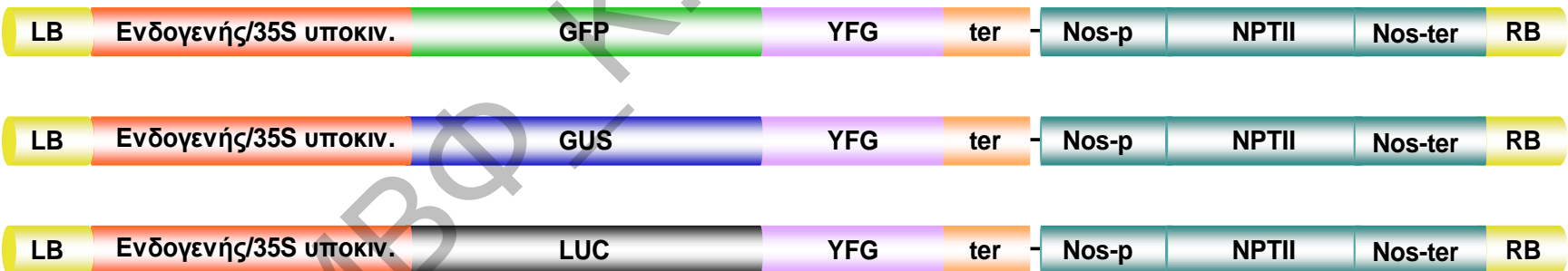


Χρήση γονιδίων μάρτυρες (reporter genes)

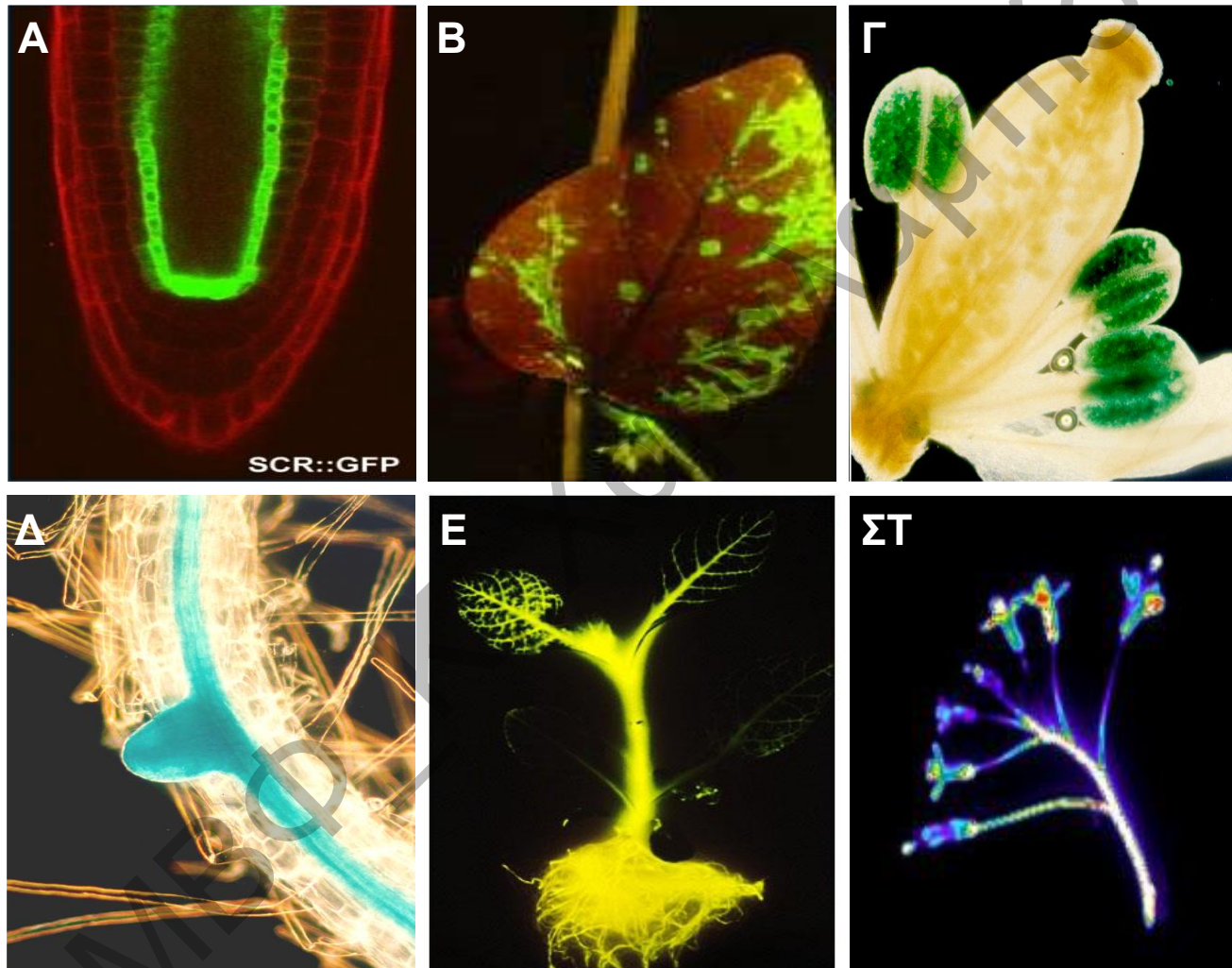
«Κατασκευές» μεταγραφικής σύντηξης ενός ενδογενούς υποκινητή με ένα γονίδιο μάρτυρα



«Κατασκευές» μεταφραστικής σύντηξης ενός υπό μελέτη γονιδίου με ένα γονίδιο «μάρτυρα».

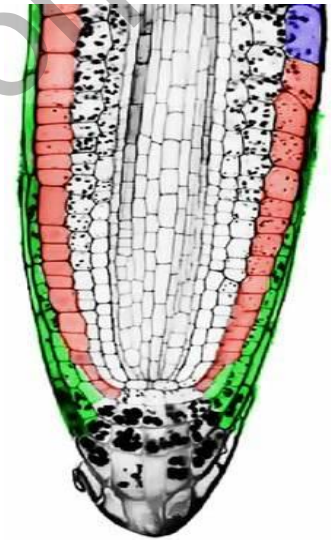


Χρήση γονιδίων μάρτυρες (reporter genes)



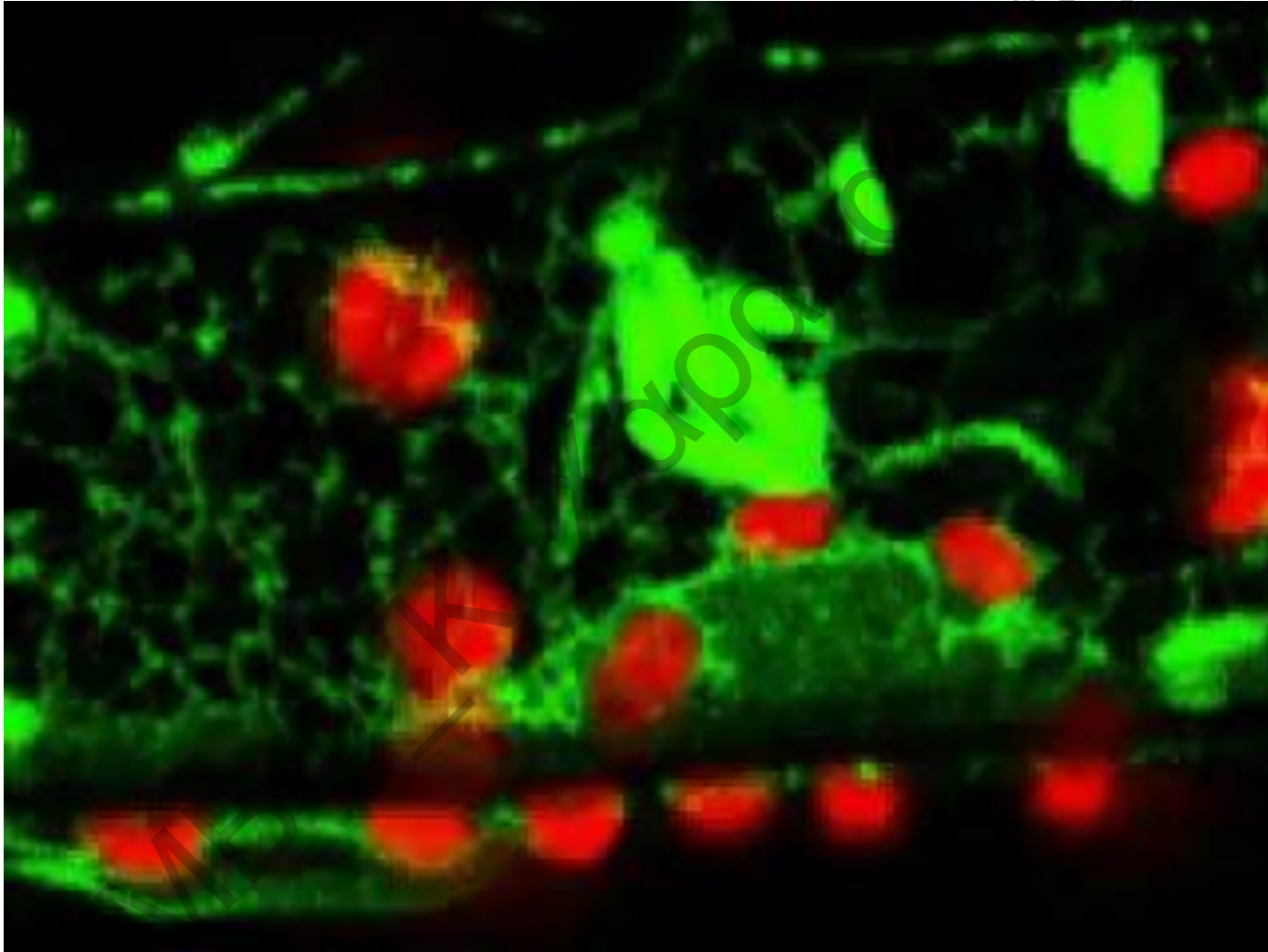
Εντοπισμός GFP πρωτεΐνης σε ιστούς και κυτταρικά οργανίδια

GFP expression in pericycle, endodermis and cortex



Εντοπισμός GFP πρωτεΐνης σε ιστούς και κυτταρικά οργανίδια

ER GFP in organelles in hypocotyl epidermal cells

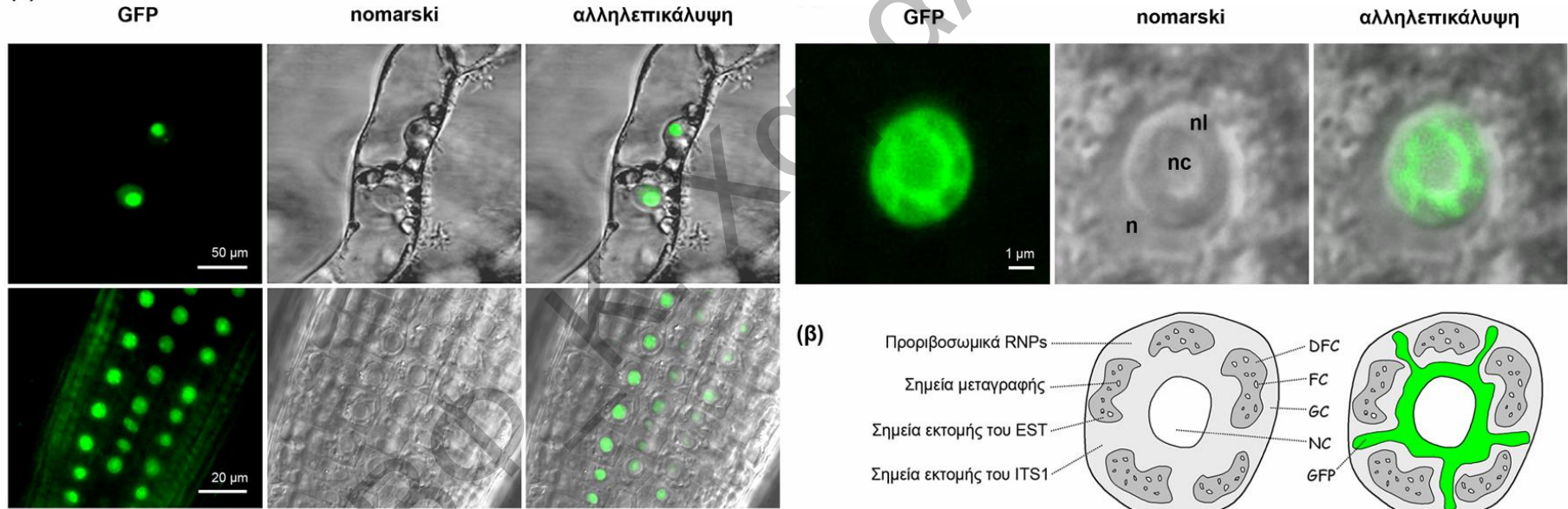


Υποκυτταρικός εντοπισμός πρωτεΐνης με μεταφραστική σύντηξη με GFP/YFP

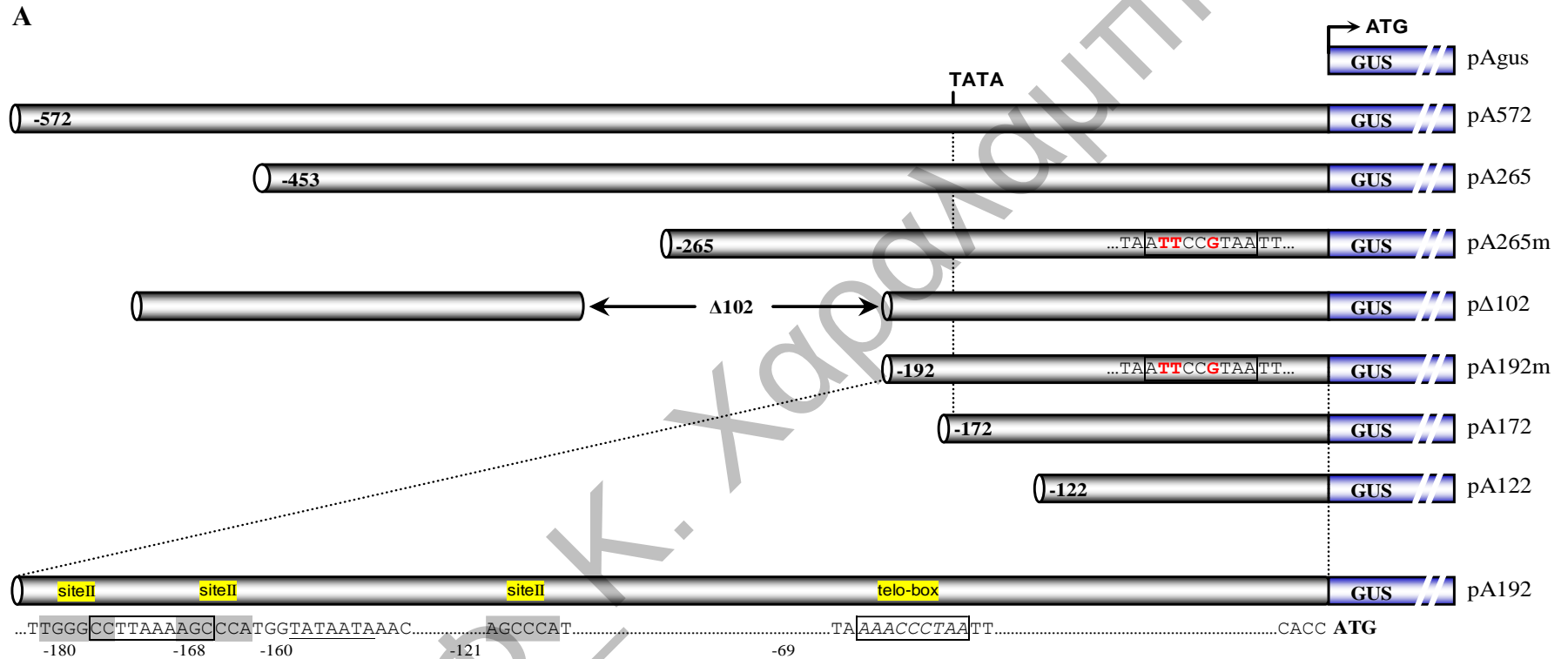
«Κατασκευές» μεταφραστικής σύντηξης ενός υπό μελέτη γονιδίου με ένα γονίδιο «μάρτυρα».



(α)

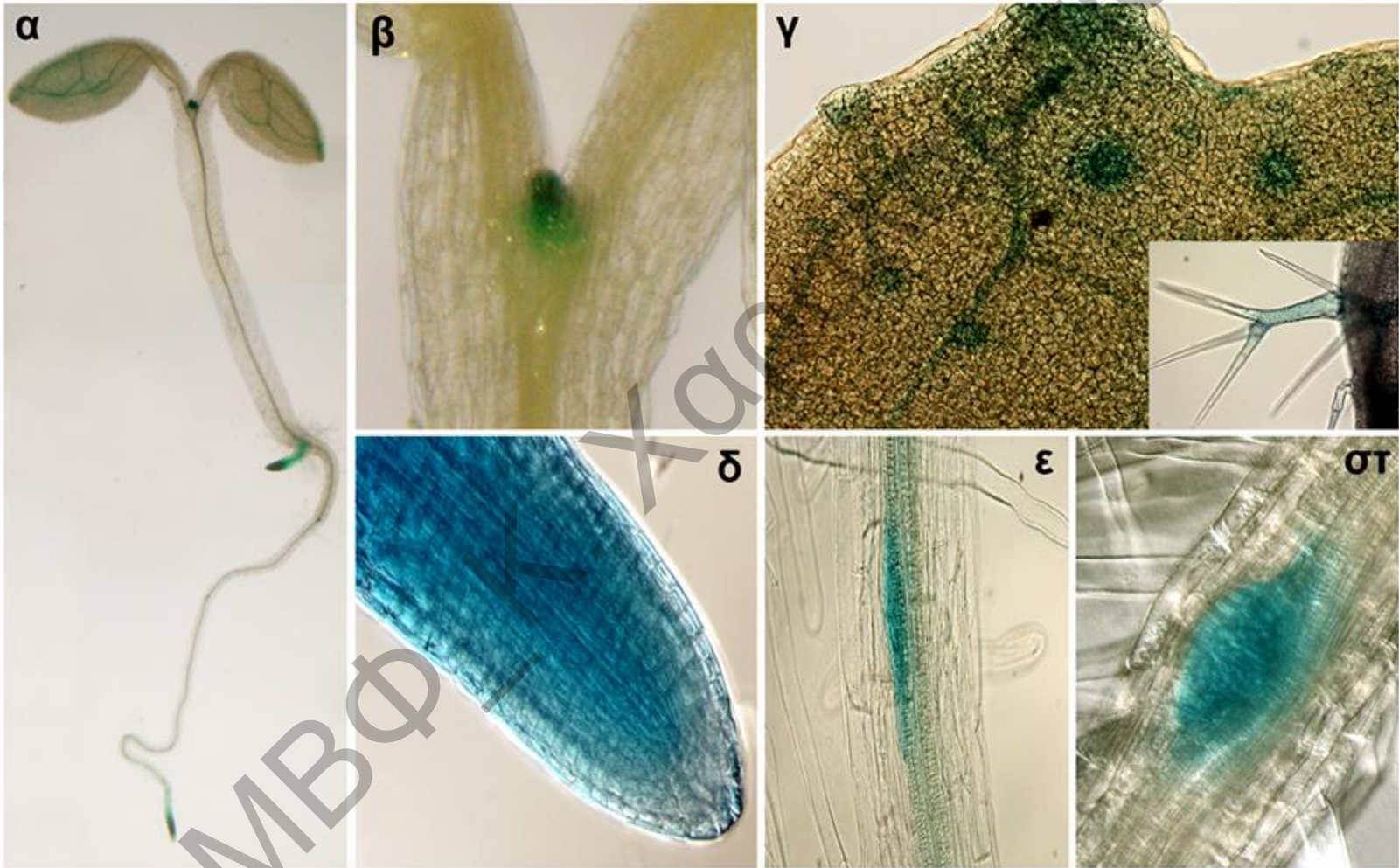


Ανάλυση υποκινητή γονιδίου



Ανάλυση υποκινητή γονιδίου

B



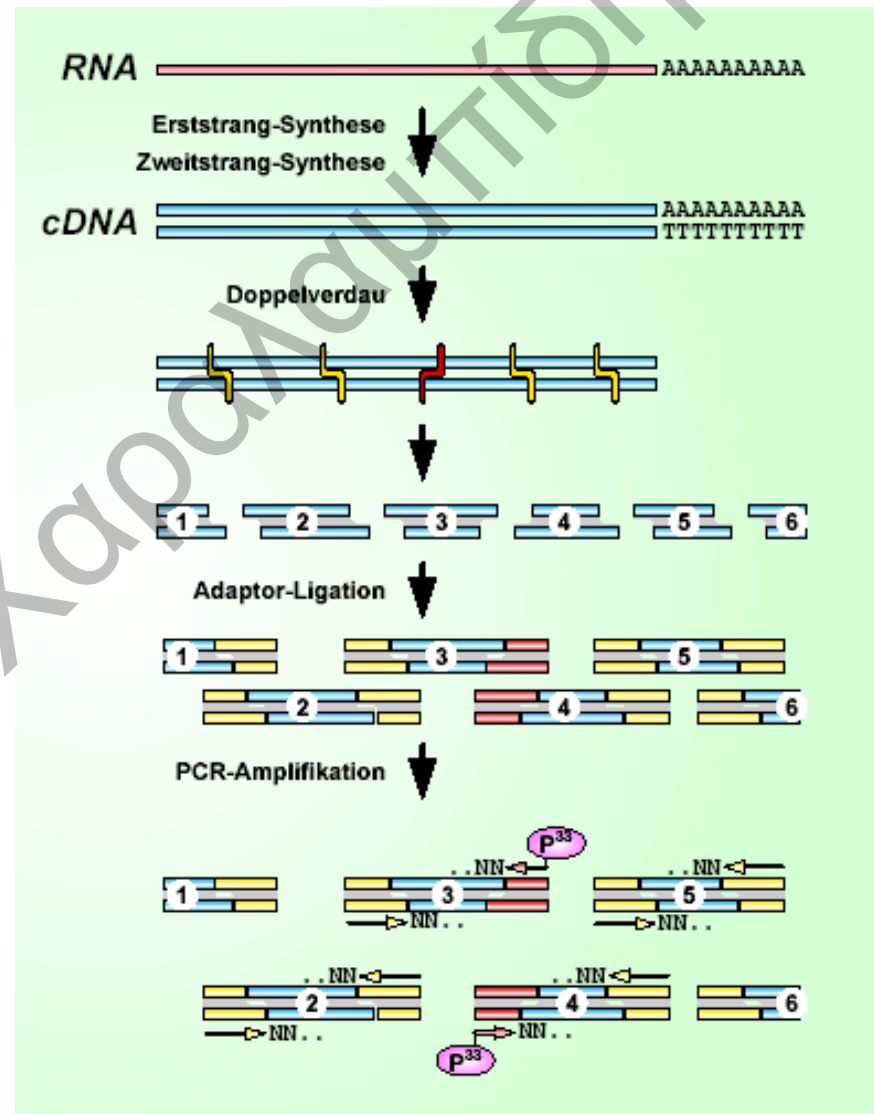
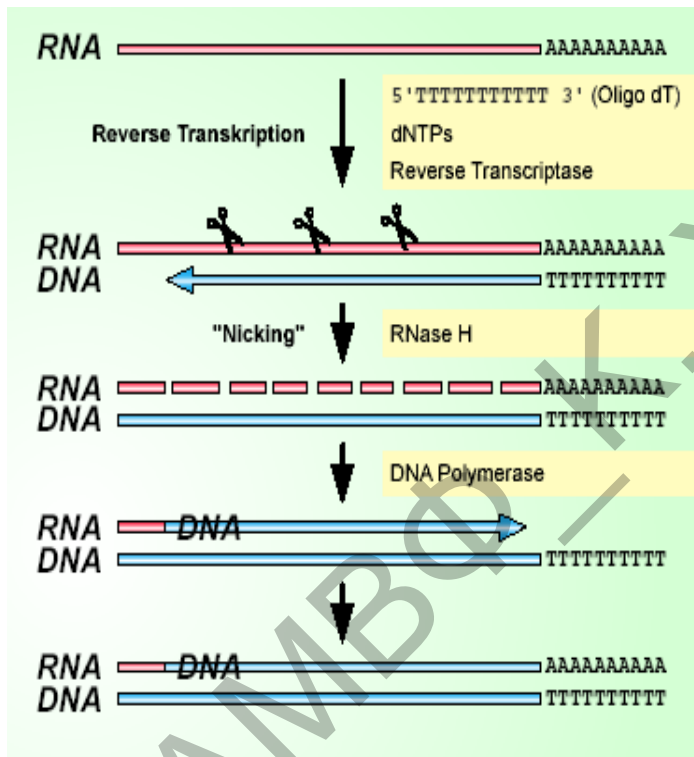
1. RNA έκφραση σε ολόκληρα φυτά, ιστούς και *in situ*
 - RNA blot υβριδισμός
 - RT-PCR ανάλυση
 - RNA *in situ* υβριδισμός
 - Whole -mount *in situ* υβριδιαμός
2. Χρήση γονιδίων μάρτυρες (reporter genes)
 - β-γλουκουρονιδάση (GUS).
 - Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP).
 - Λουσιφεράση (LUC).
3. Μαζική ανάλυση γονιδιακής έκφρασης
 - cDNA-AFLP
 - Microarrays
4. Μελέτες πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων
 - Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
 - Πειράματα ενζυμική δραστηριότητα
 - Παραγωγή αντισωμάτων
 - Ανοσοκαθίζηση και ανοσοανίχνευση
 - Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις
5. Knock-outs και γονιδιακή σίγηση (RNAi - PTGS)



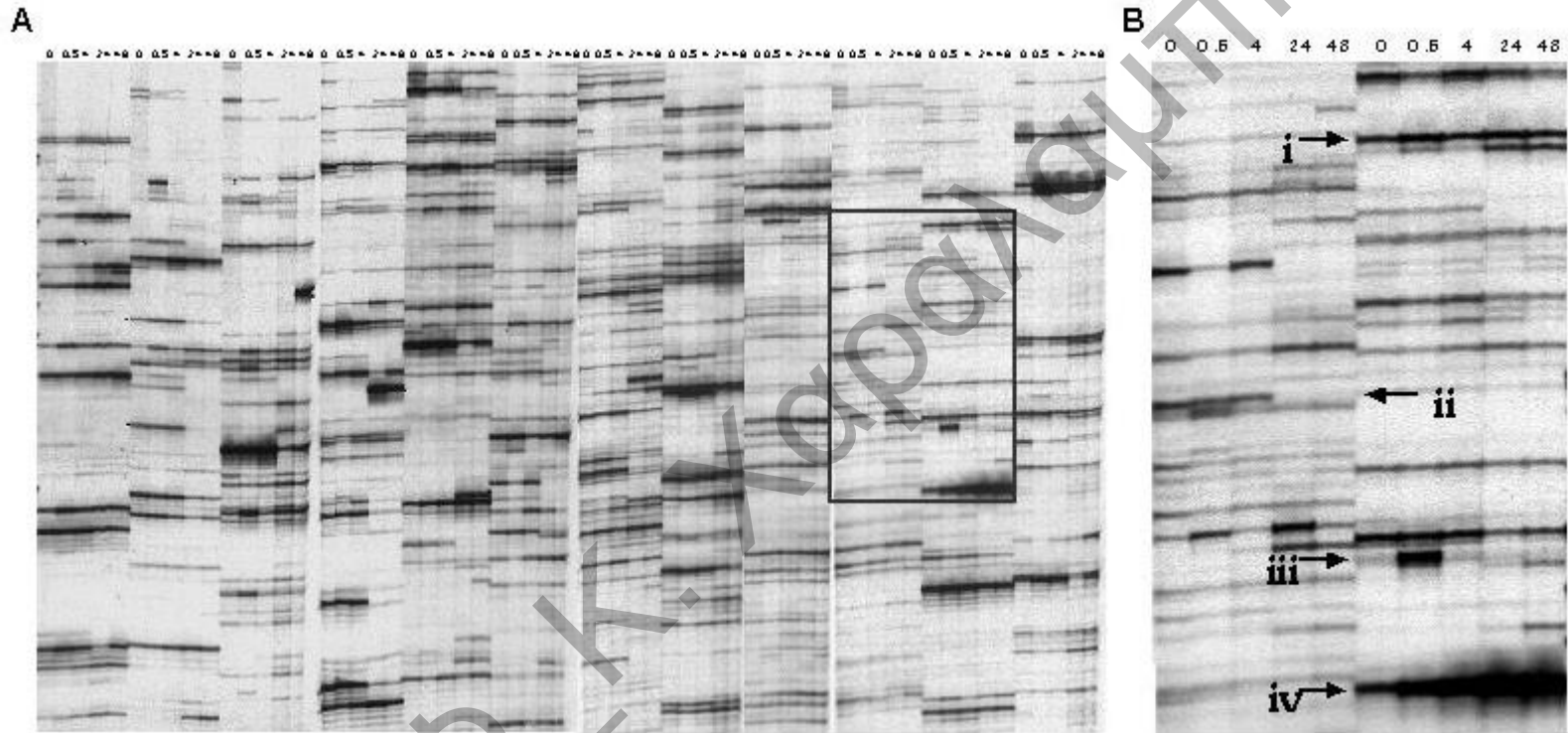
Μαζική ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

cDNA-AFLP

Η τεχνική του cDNA-AFLP βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση με PCR ενός υποπληθυσμού cDNA μορίων.



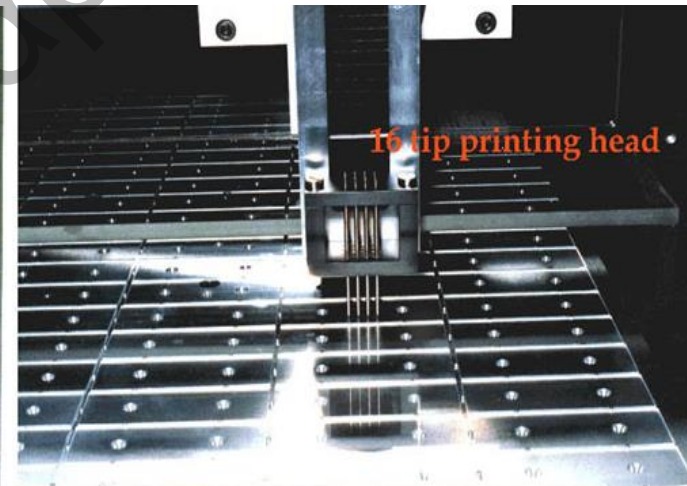
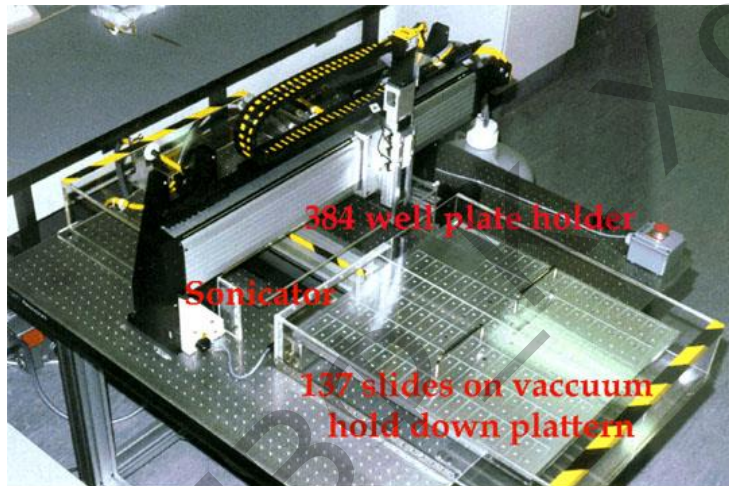
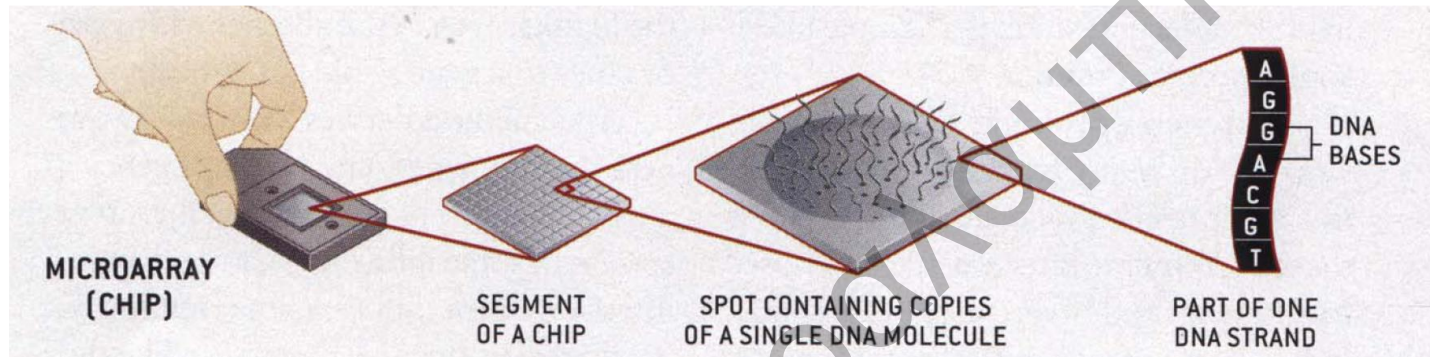
cDNA-AFLP autoradiography



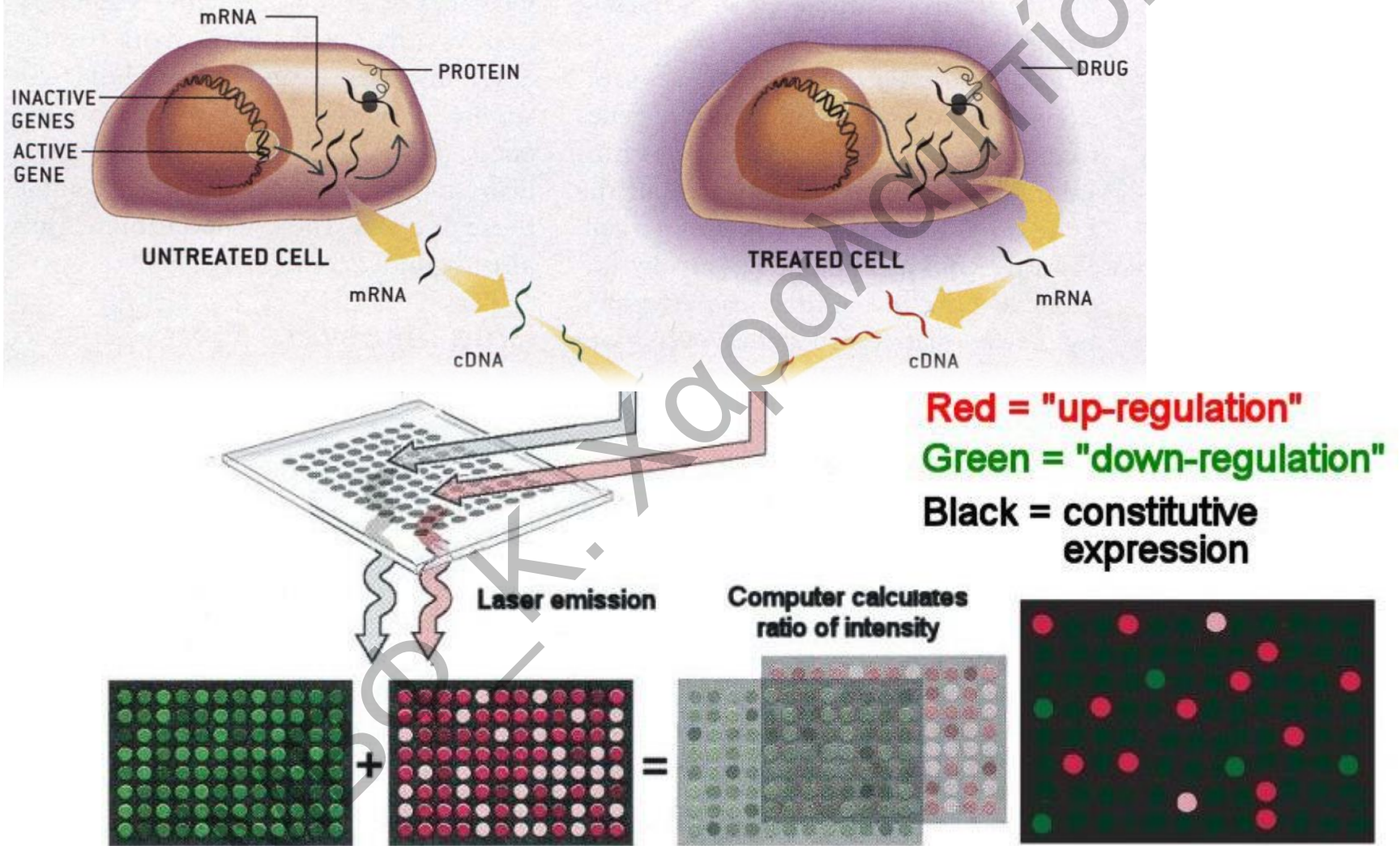
Milioni D et al., Plant Cell 2002



Microarray or chip analysis



Microarray analysis

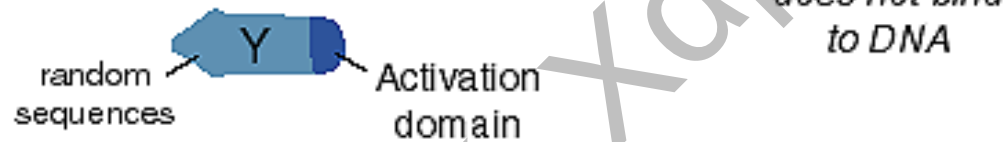


Μελέτες πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

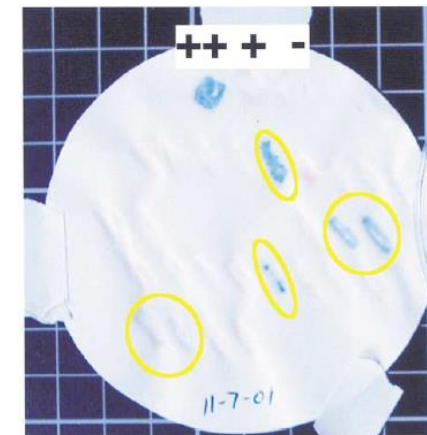
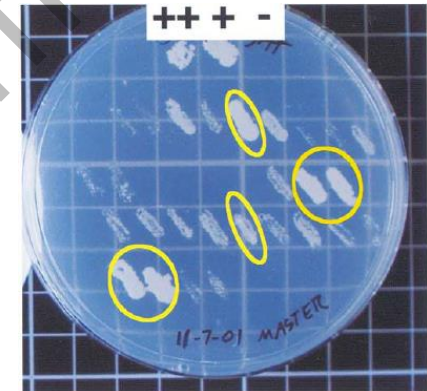
Two-hybrid system

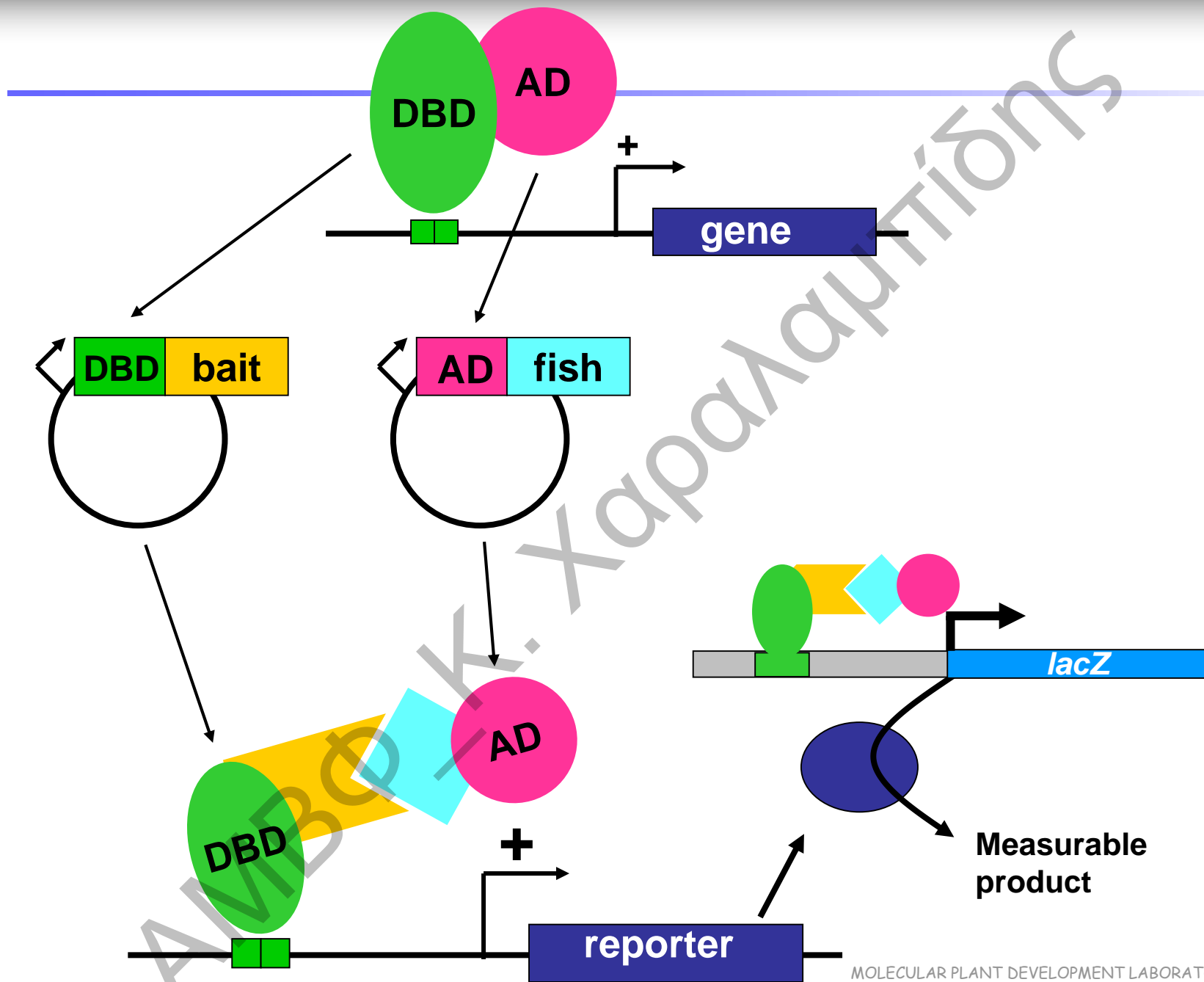


+ Activation domain hybrid library

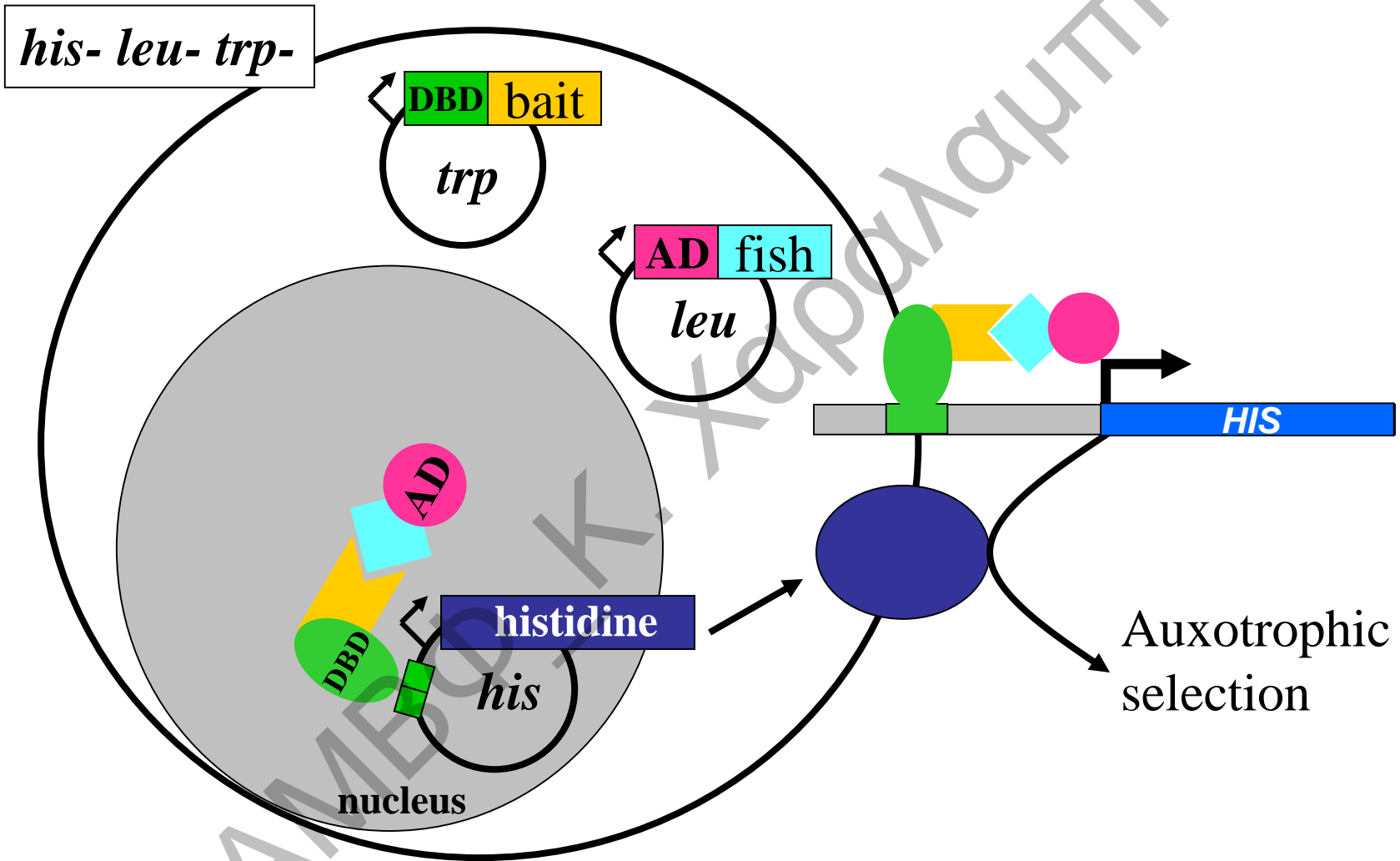


Interaction between proteins X and Y brings DNA binding and activation domains together in one complex

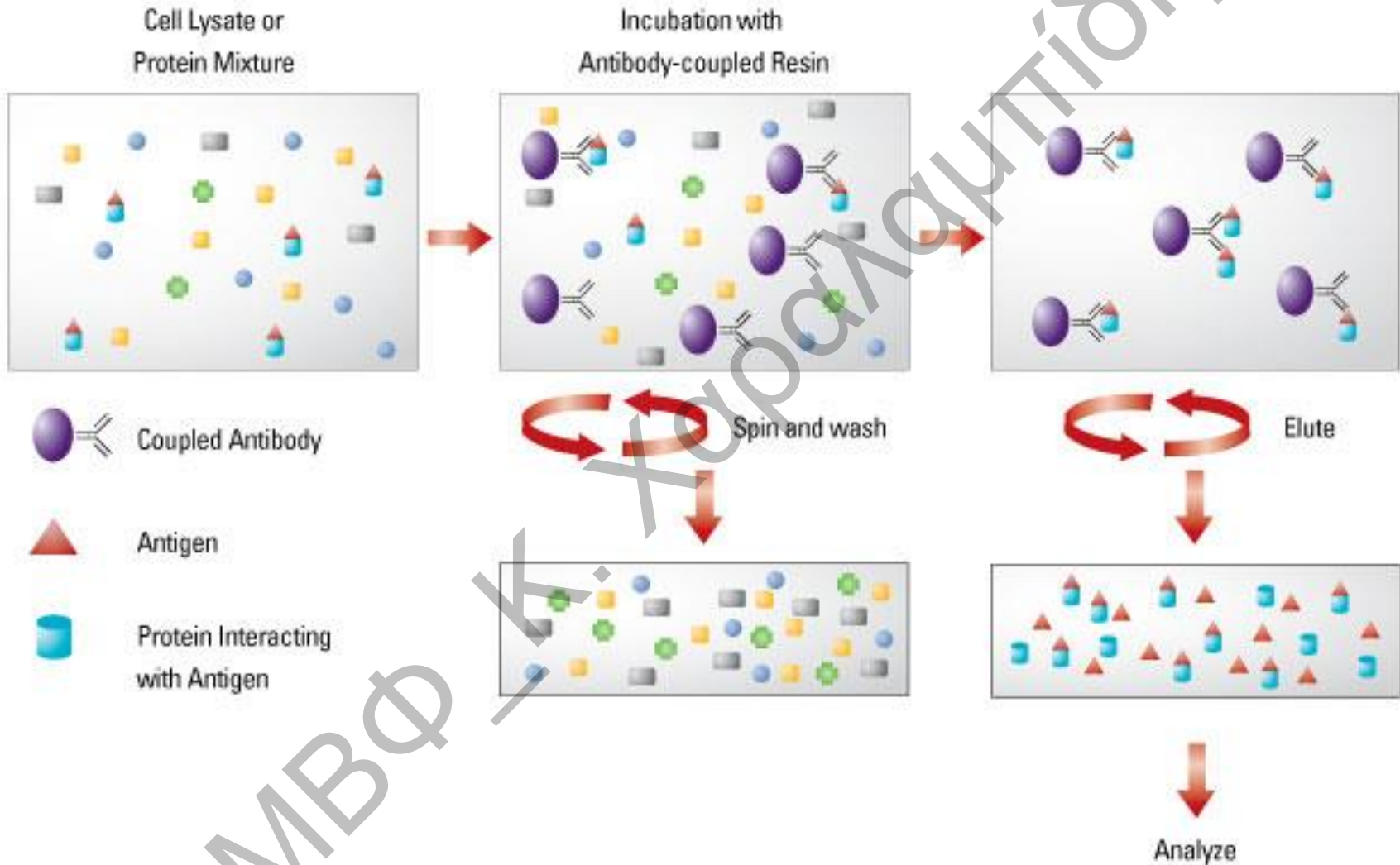




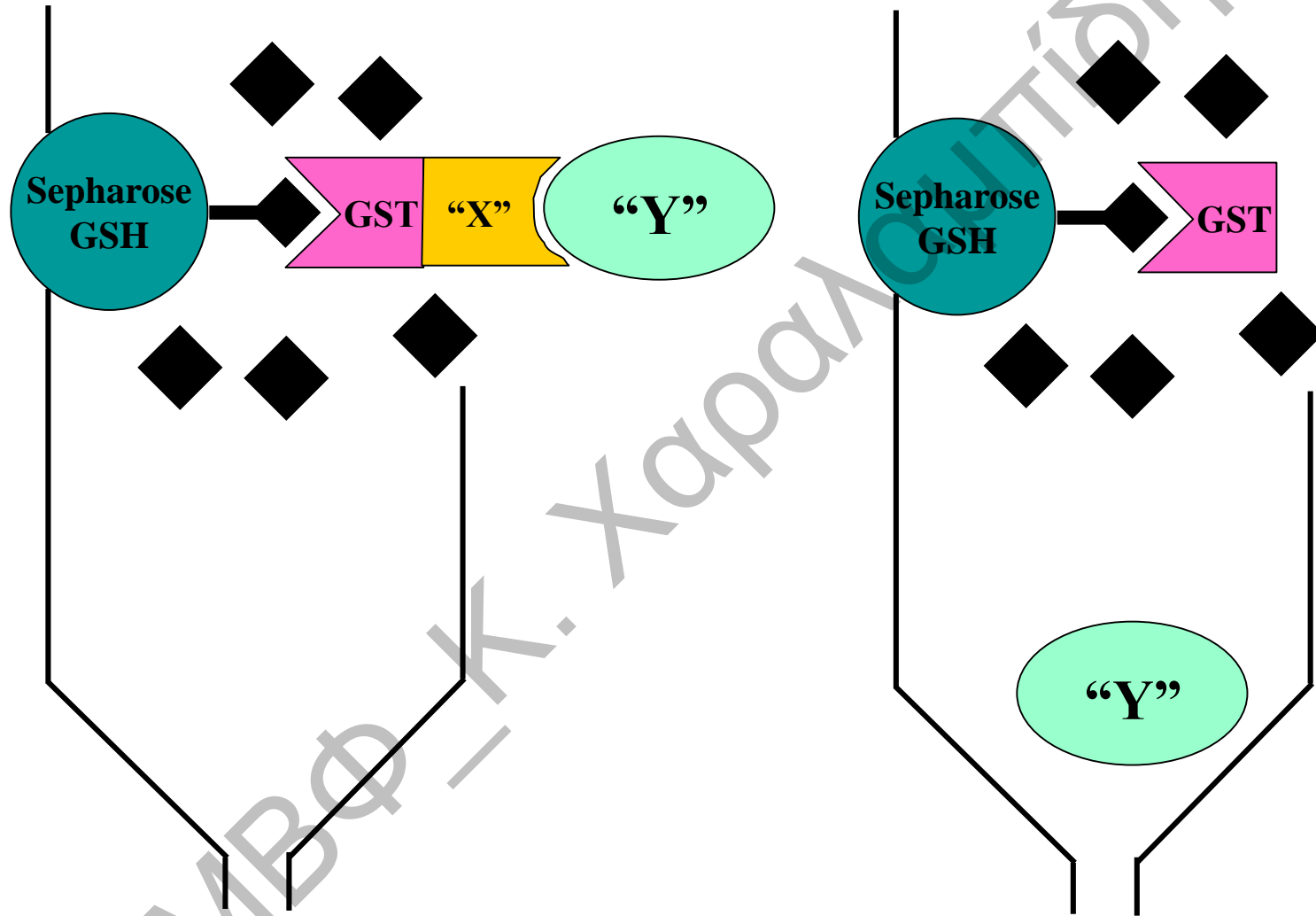
Yeast 2-Hybrid Assay



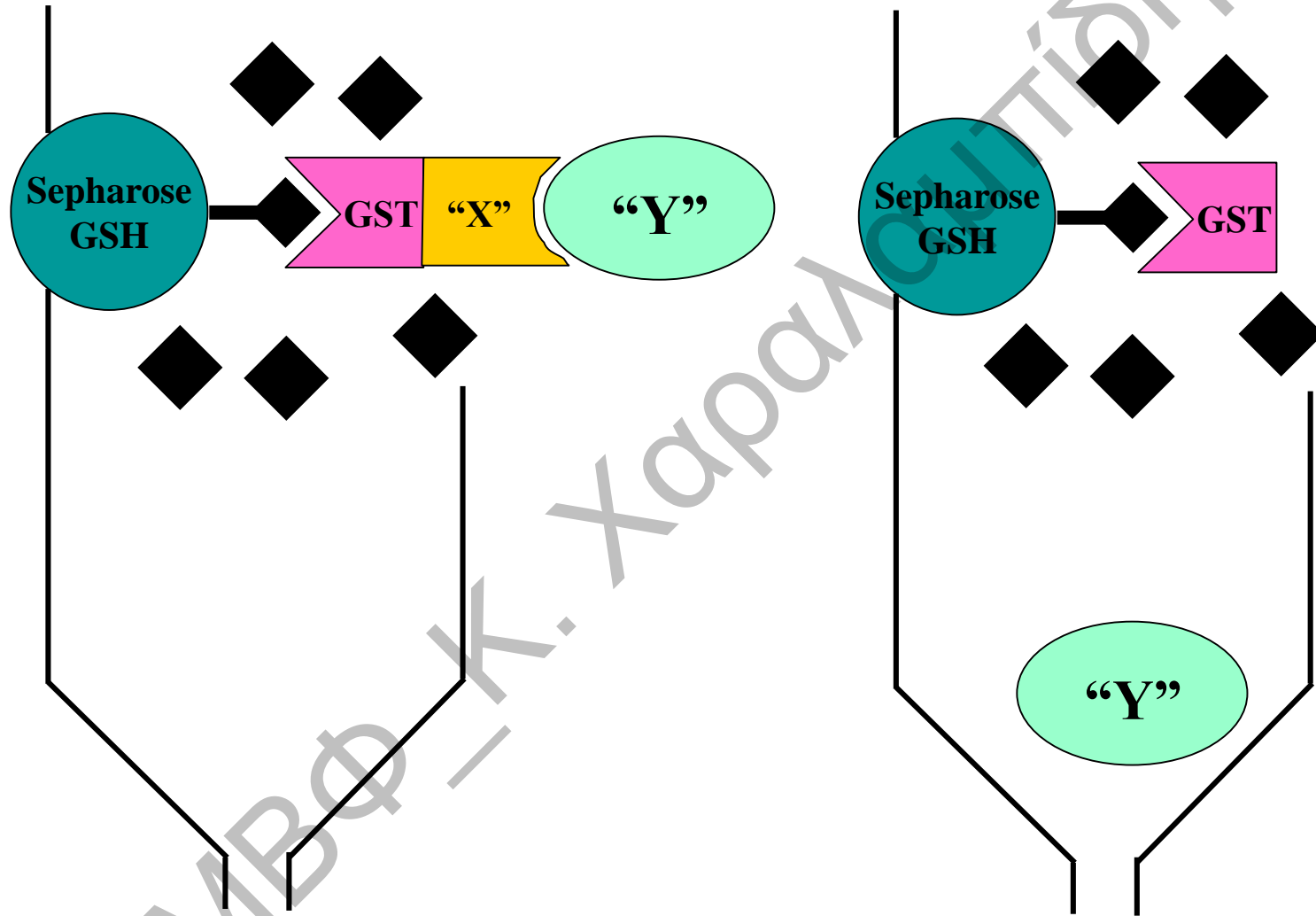
Μελέτες πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Co-immunoprecipitation)



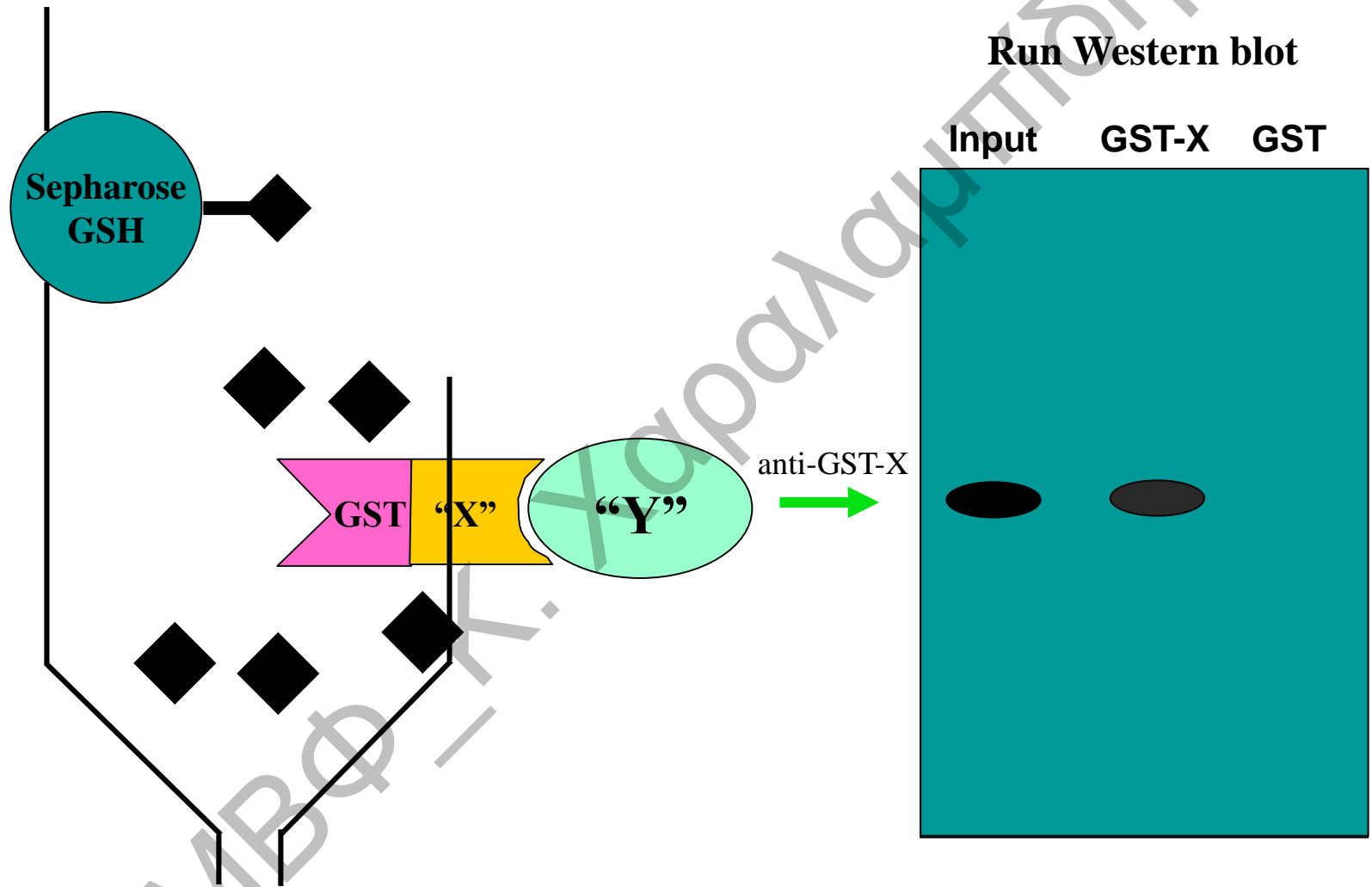
GST pull-down assay



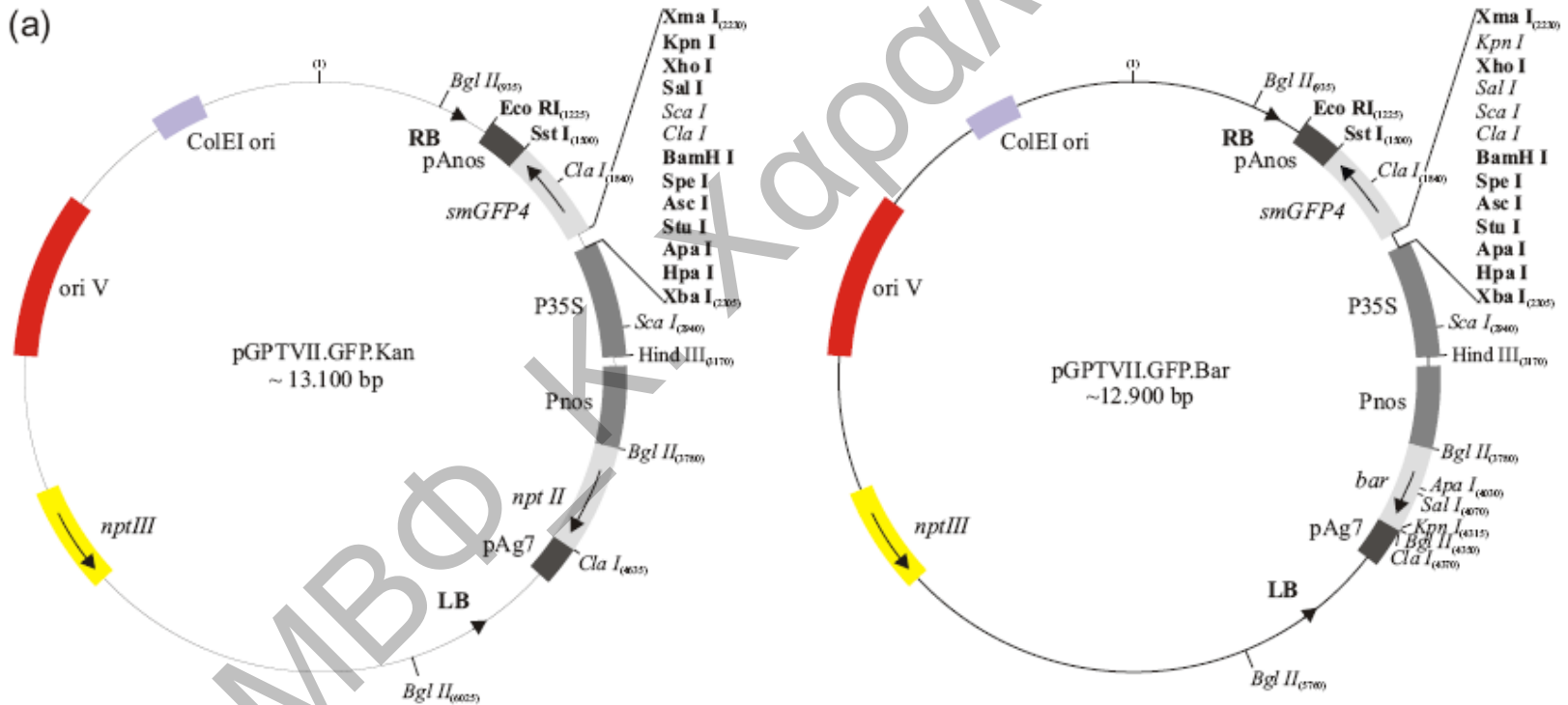
GST pull-down assay



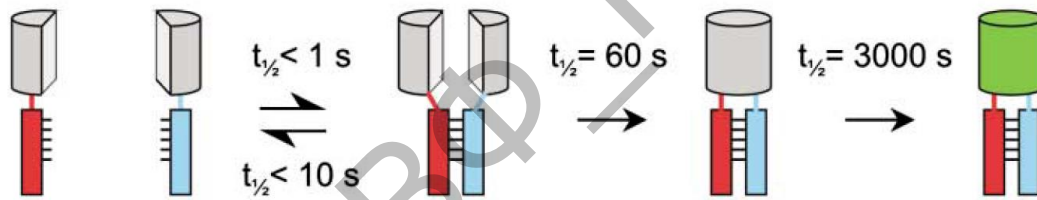
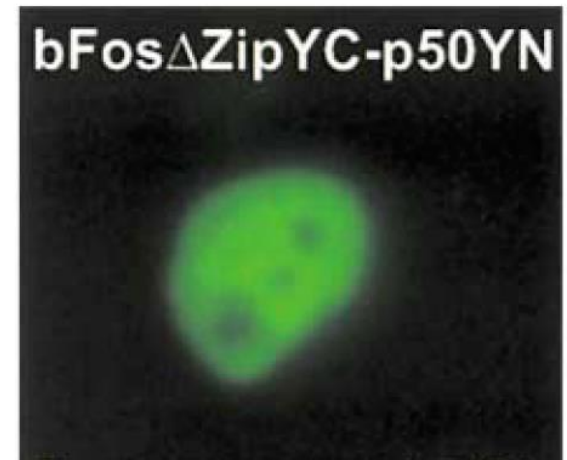
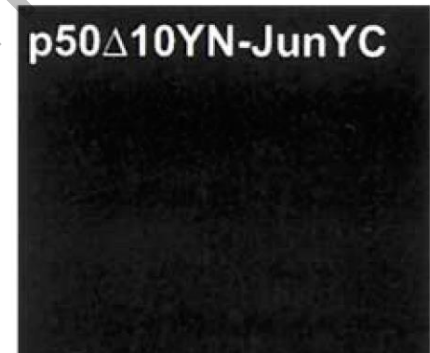
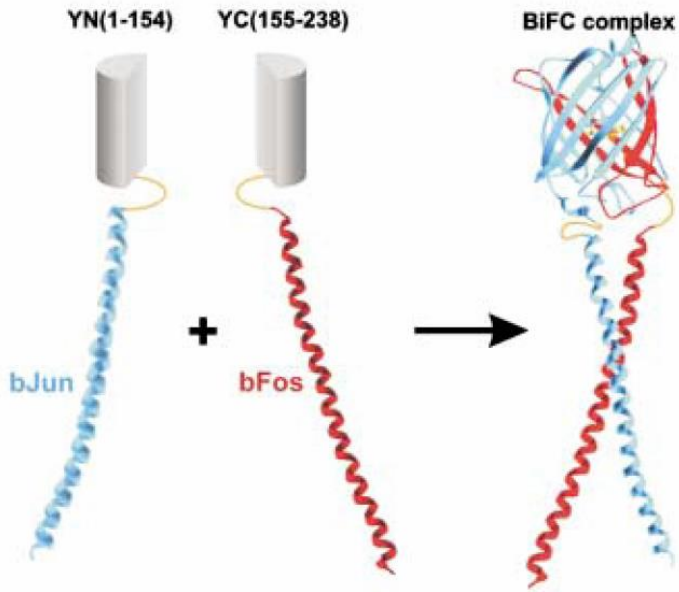
GST pull-down assay



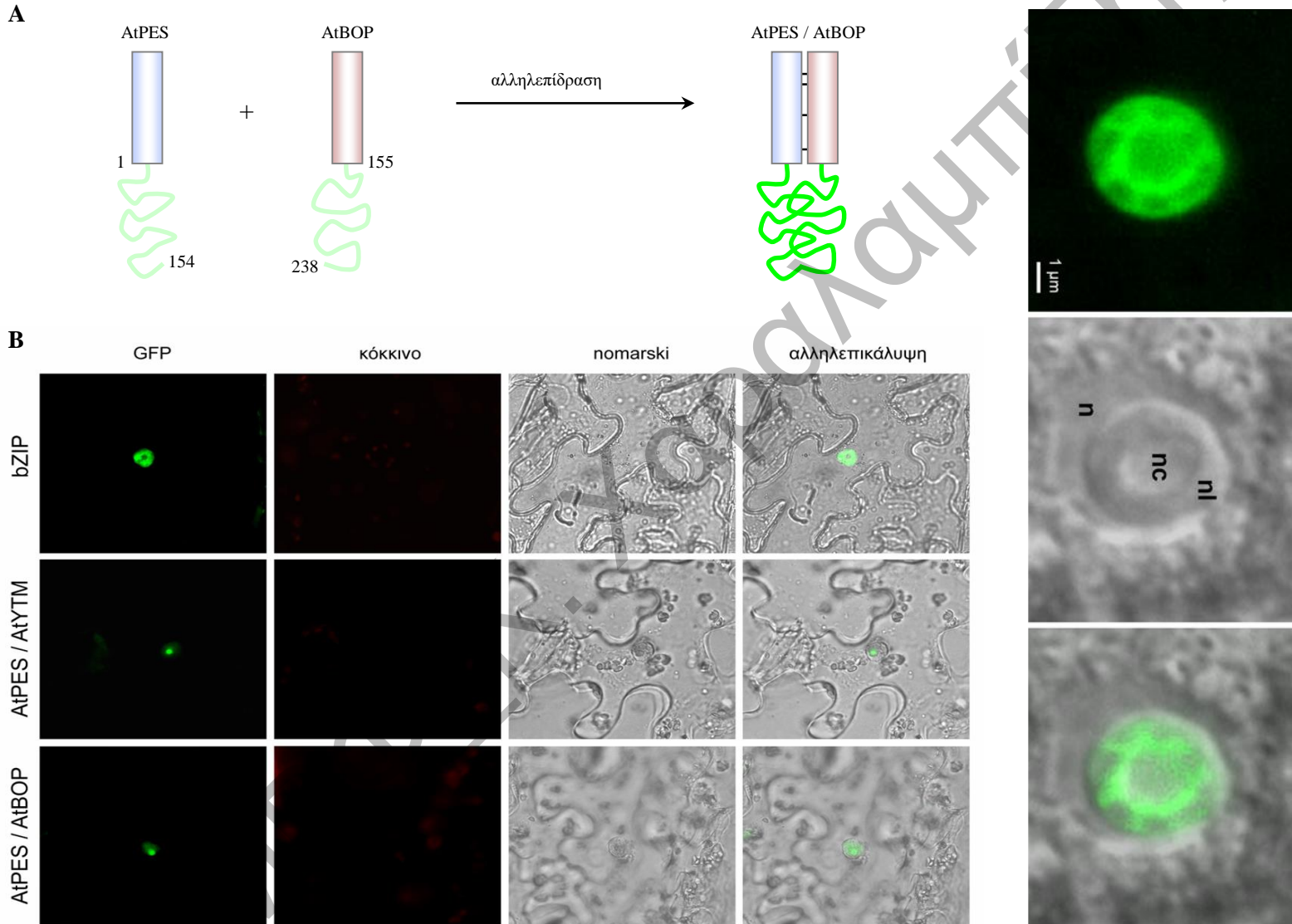
Αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με το SPLIT-GFP vector system



Αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με το SPLIT-GFP vector system



Αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με το SPLIT-GFP vector system

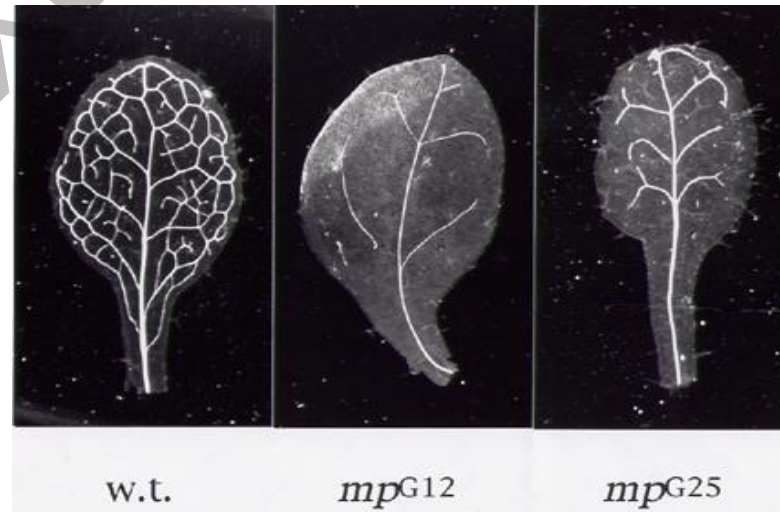


Προσδιορισμός της λειτουργίας ενός γονιδίου με *knock-out mutants*



dwarf2 (dwf2): Brassica BR *dwf2* T-DNA mutant. From left to right: wild-type, *dwf2* treated with gibberellic acid, *dwf2* without any treatment

monopteros (mp): Auxin-response transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development



Προσδιορισμός της λειτουργίας ενός γονιδίου με RNA gene silencing

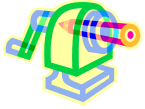
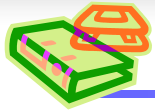
pin mutant have defects in auxin polar transport



pes mutant have defects in ribosome biogenesis



END OF PART IV



Thanks for your attention

ΑΜΒΦ - Κ. Χαρολαμπτίδης

