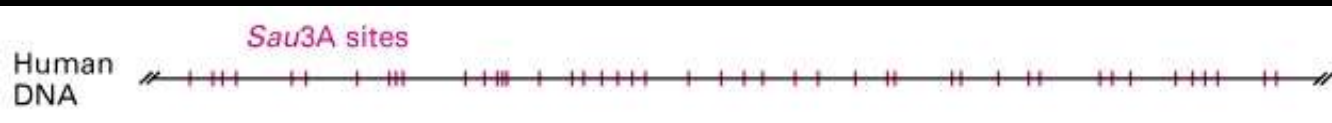
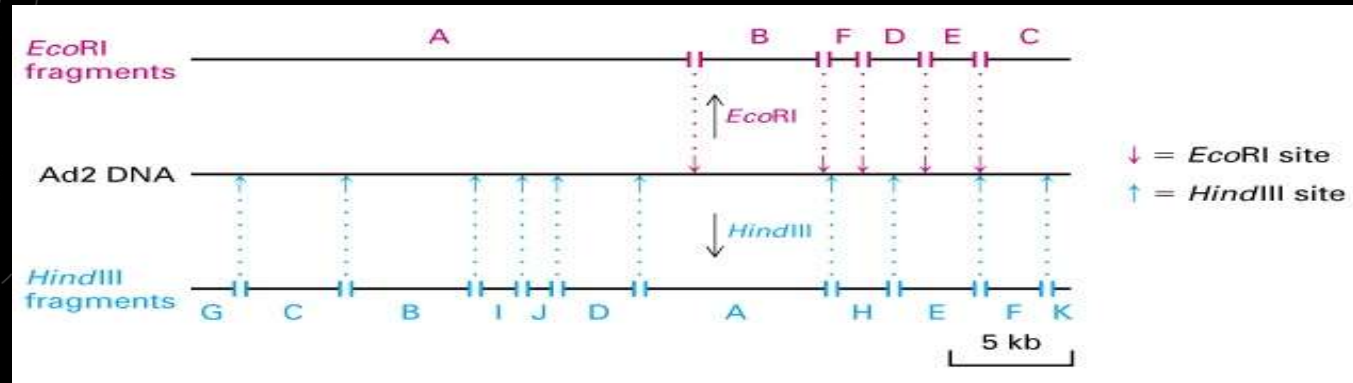


Εργαστηριακές ασκήσεις MB

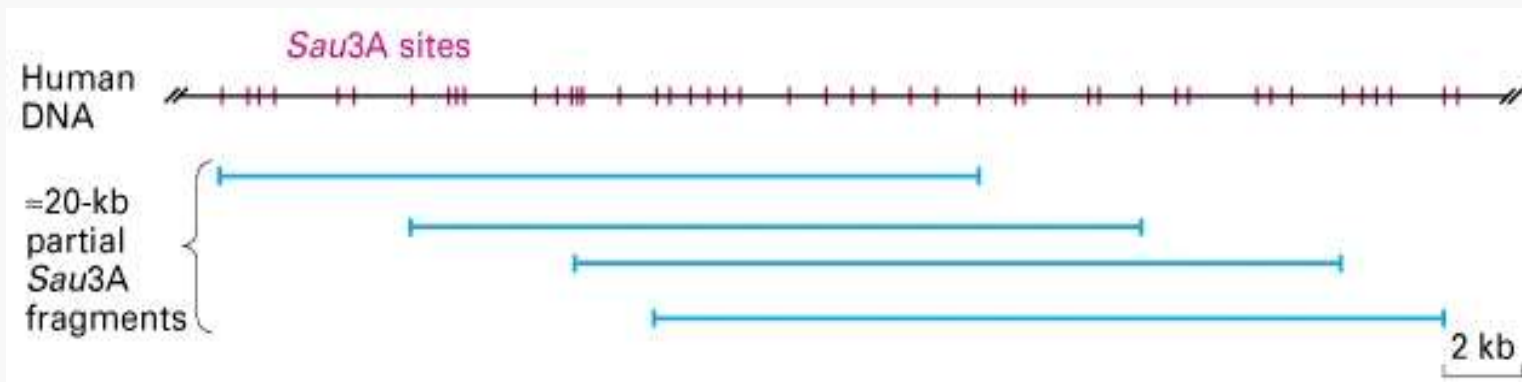
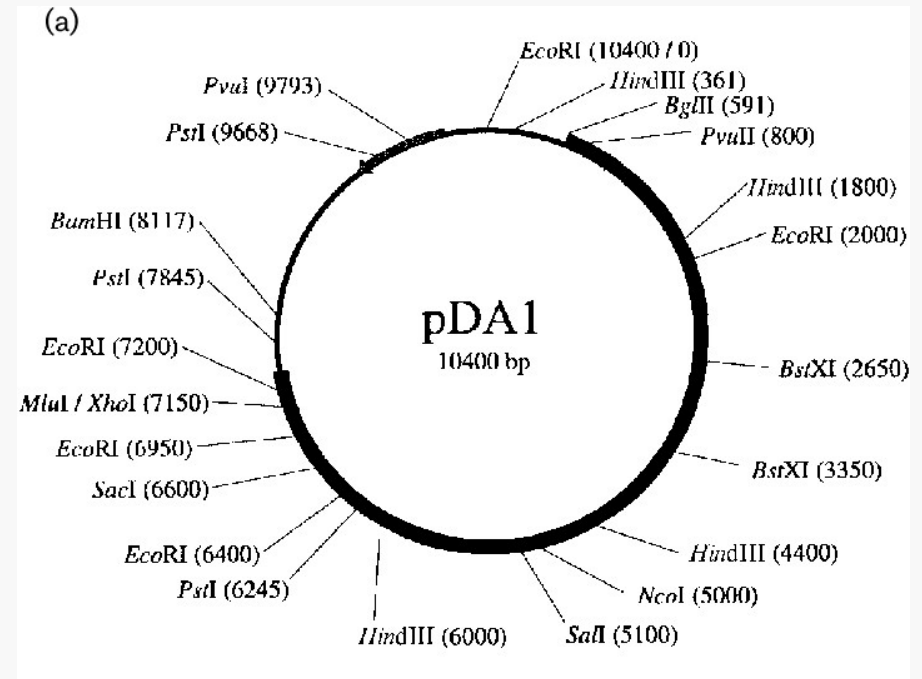
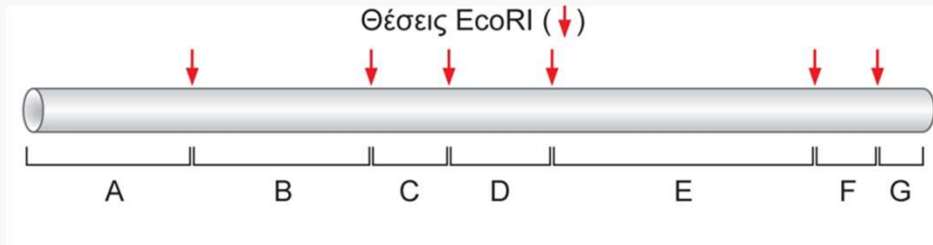
Άσκηση 8

Χαρτογράφηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

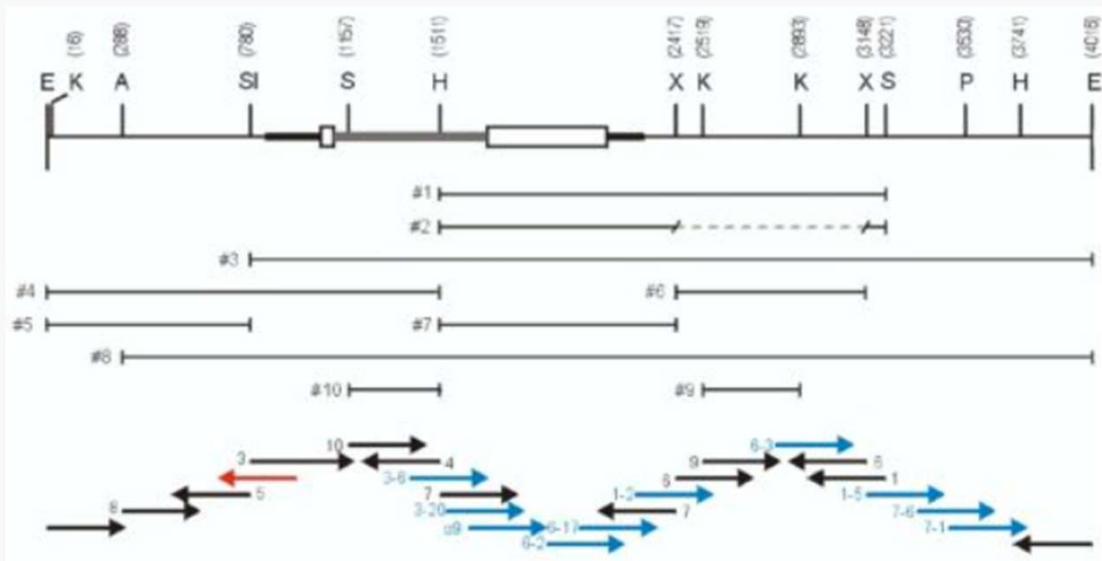


Restriction maps

Χάρτες περιοριστικών ενδονουκλεασών



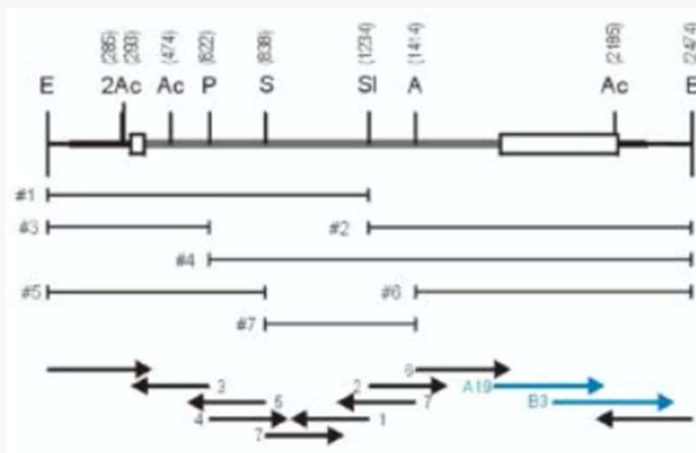
4 kb



Χρωσωμικός κλώνος 4 Kb

Υποκλώνοι

2.4 kb



Χρωσωμικός κλώνος 2.4 Kb

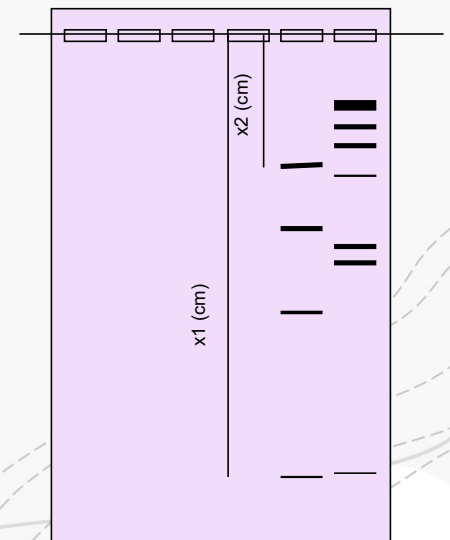
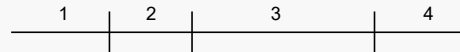
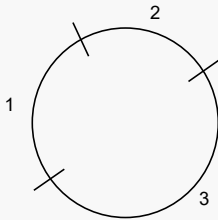
Υποκλώνοι



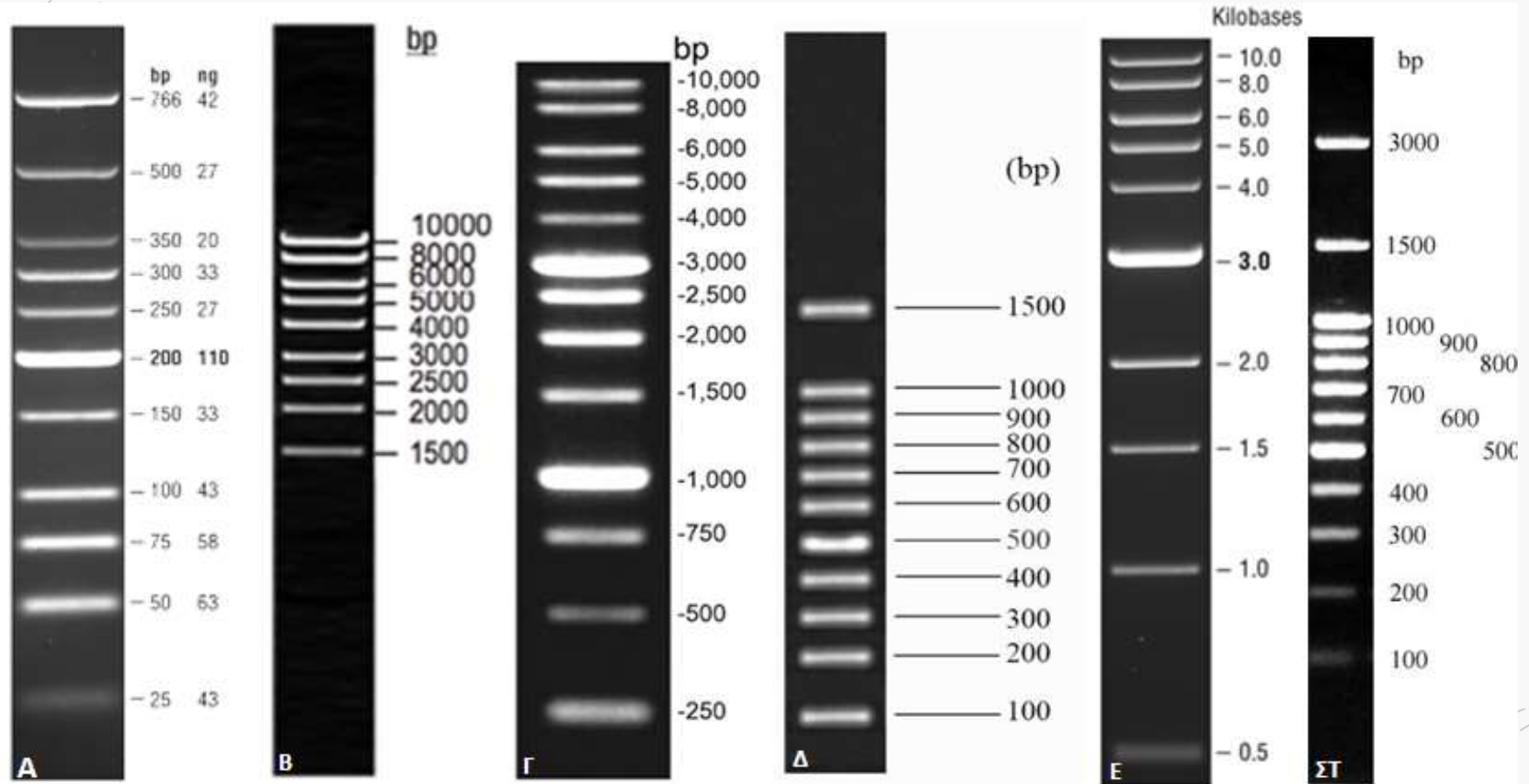
- Πέψη του DNA με δύο ή περισσότερες ενδονουκλεάσες (μόνες τους ή σε συνδυασμούς)
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μαζί με "marker" (κομμένο DNA που αναλύεται σε γνωστού μεγέθους ζώνες, π.χ. λ/HindIII, ρMB9/HaeIII)
- Οι ζώνες αναλύονται με βάση τον κανόνα ότι γραμμικά δίκλινα μόρια DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογάριθμου του μοριακού τους βάρους ($v=1/\log MB$) και κατ' επέκταση του \log_{10} του μεγέθους τους σε bp.
- Κατασκευή πρότυπης καμπύλης σε ημιλογαριθμικό χαρτί (άξονας χ, γραμμικός: απόσταση σε cm των ζωνών του marker από το σημείο εκκίνησης, άξονας ψ, λογαριθμικός: μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε bp ή Kb)
- Υπολογισμός του μεγέθους των ζωνών του DNA με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης και κατασκευή χάρτη

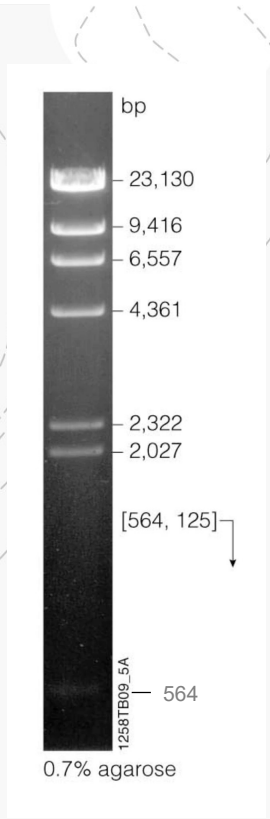
Κυκλικό μόριο: όσες ζώνες προκύπτουν (n), τόσες θέσεις πάνω στο DNA (n)

Γραμμικό μόριο: όσες ζώνες προκύπτουν (n), μία θέση λιγότερη πάνω στο DNA (n-1)



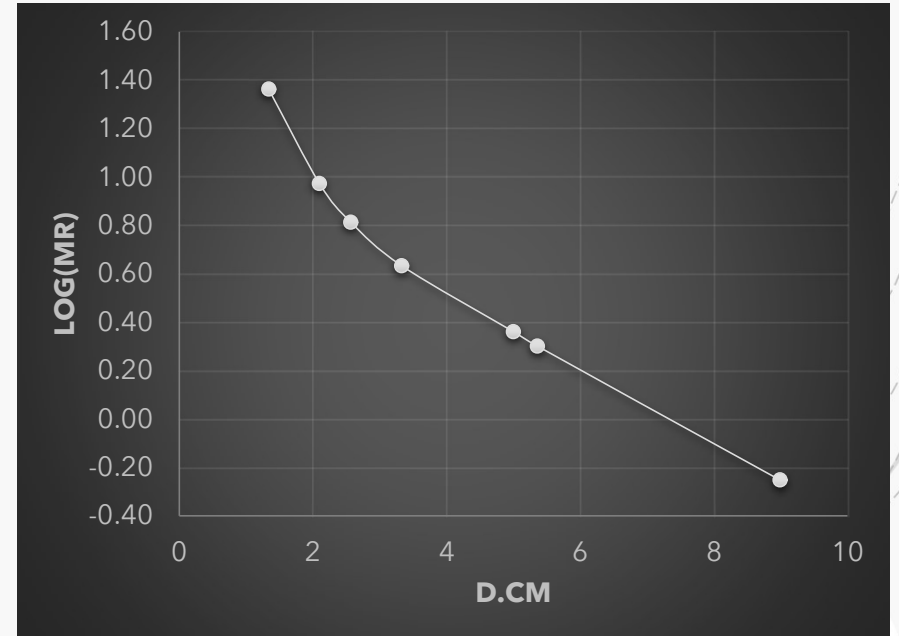
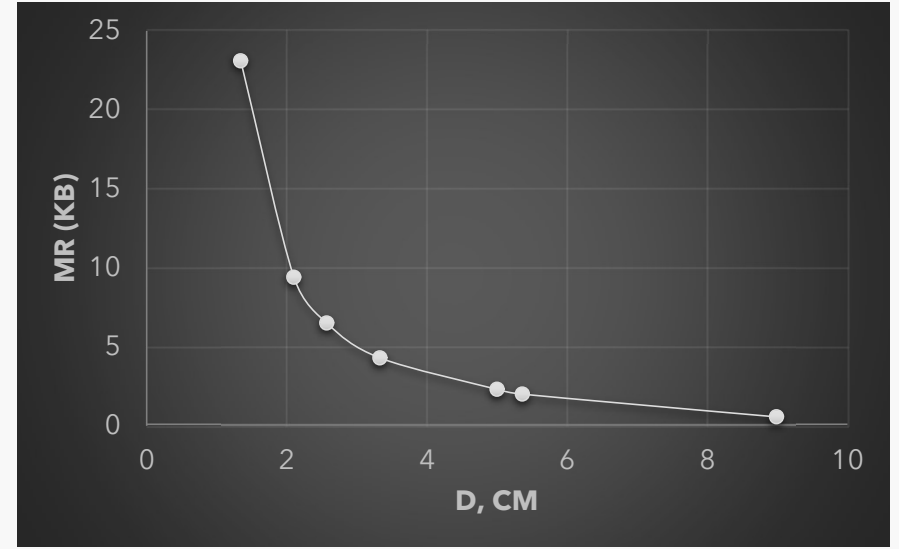
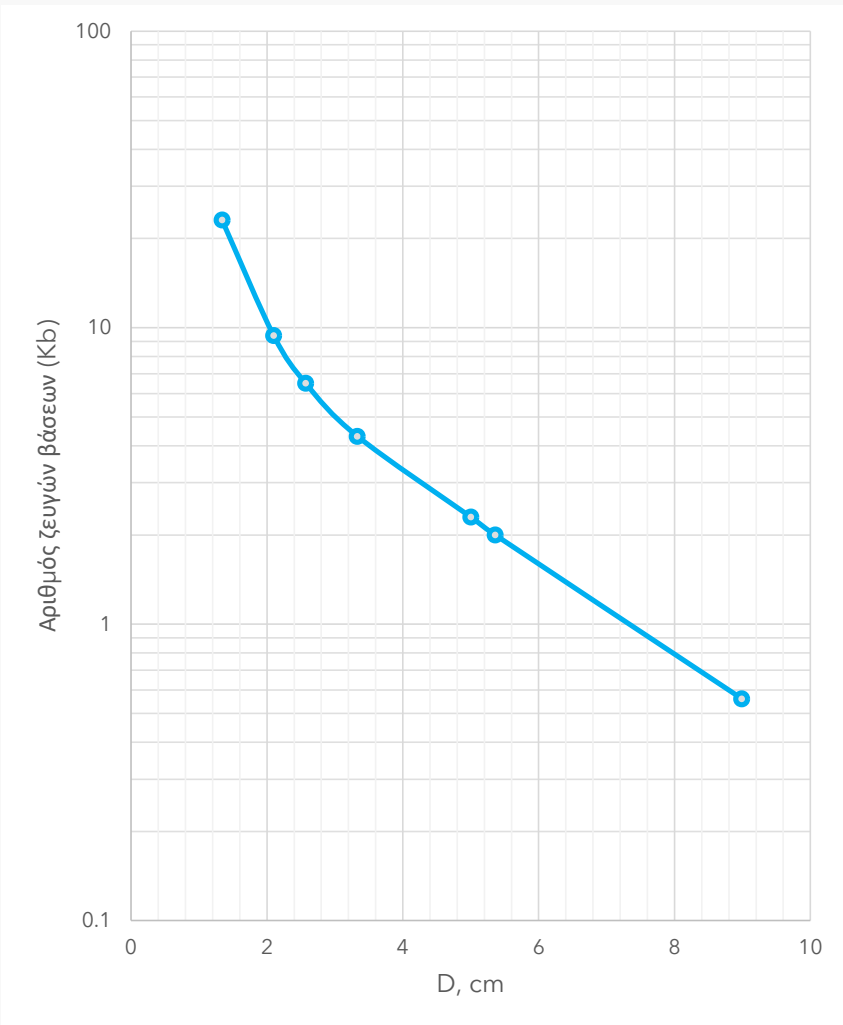
Markers





λHindIII marker Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης

Marker		
cm	Kb	LOG(Kb)
1.41	23.1	1.36
2.1	9.4	0.97
2.57	6.5	0.81
3.33	4.3	0.63
5.07	2.3	0.36
5.36	2	0.30
8.99	0.56	-0.25



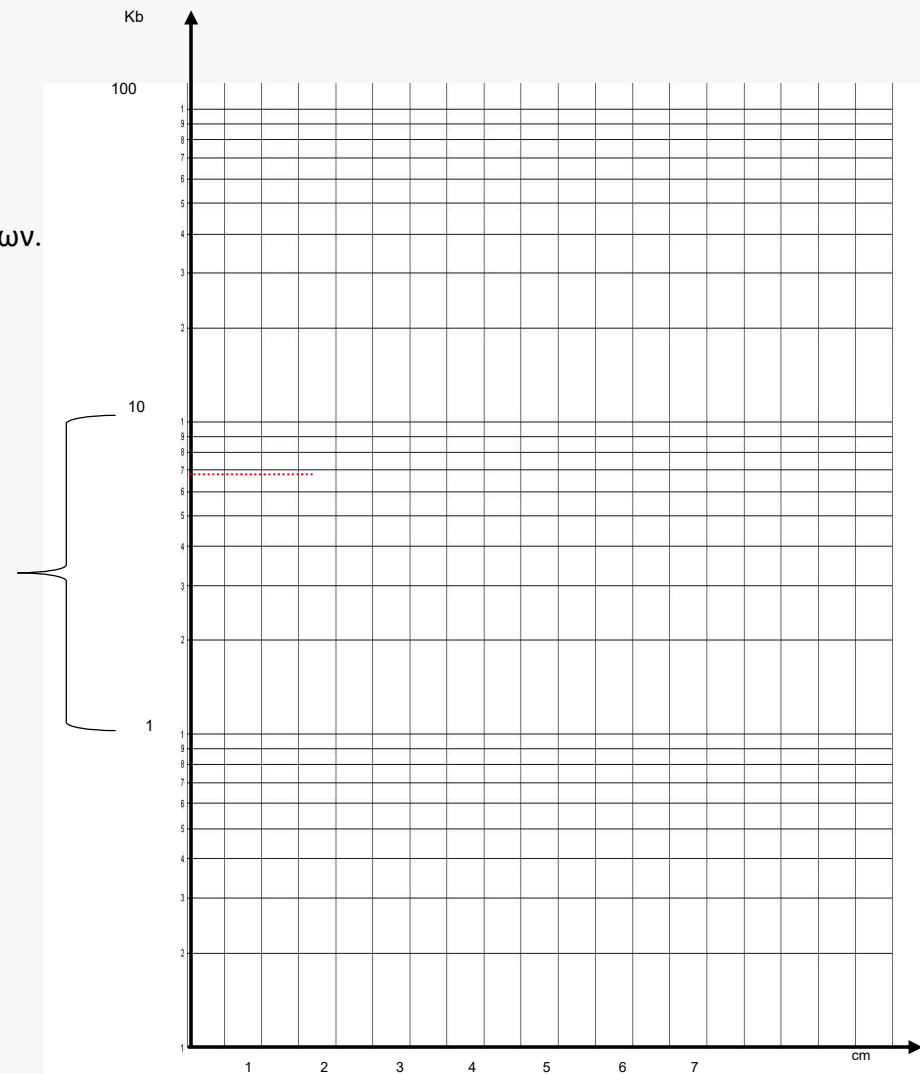
Το ημιλογαριθμικό χαρτί

Άξονας Υ: υποδιαιρέσεις άνισες. Αρχικά μεγαλύτερα διαστήματα τα οποία στη συνέχεια σταδιακά στενεύουν. Η διάταξη αντικαθιστά τον υπολογισμό των λογαρίθμων.

Κύκλος

10 υποδιαιρέσεις.

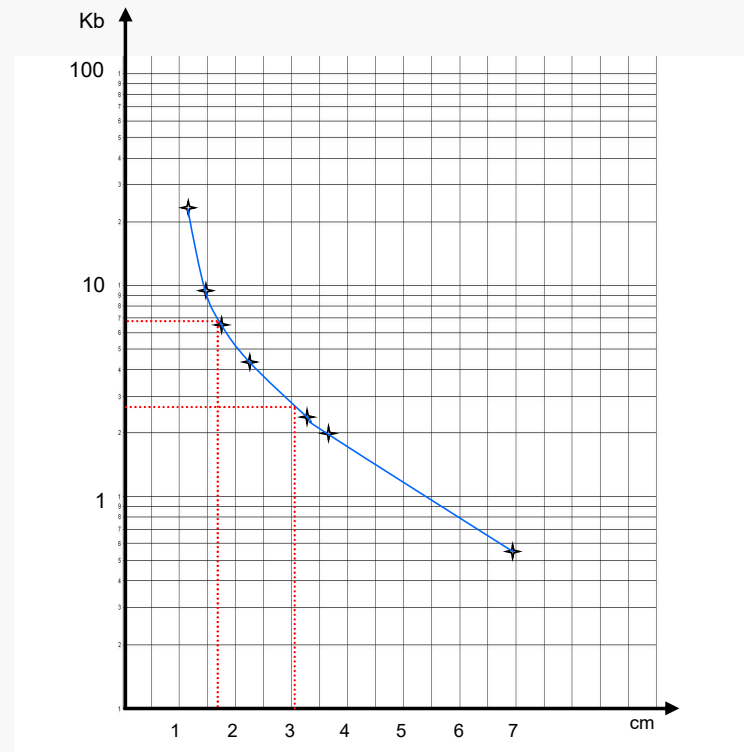
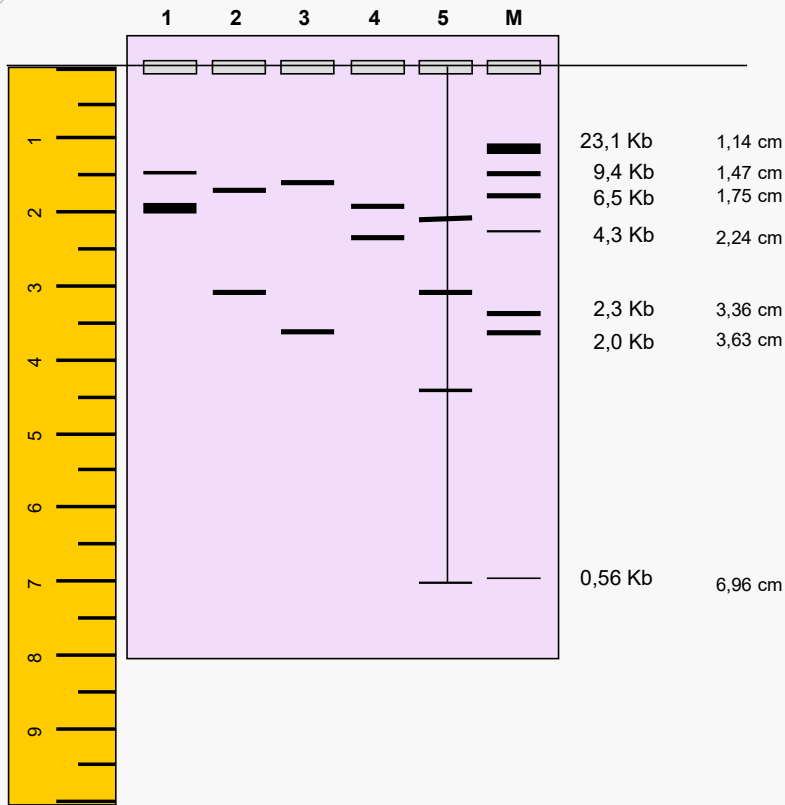
Η πρώτη υποδιαίρεση κάθε κύκλου αντιστοιχεί σε μια δύναμη του 10 (0.1, 1, 10, 100), η δεύτερη σε μια δύναμη διπλάσια της πρώτης, η τρίτη σε μια δύναμη τριπλάσια της πρώτης κ.ο.κ. Π.χ. αν η βάση είναι το 1 (10^0) η επόμενη υποδιαίρεση είναι το 2, η επόμενη το 3 κλπ.



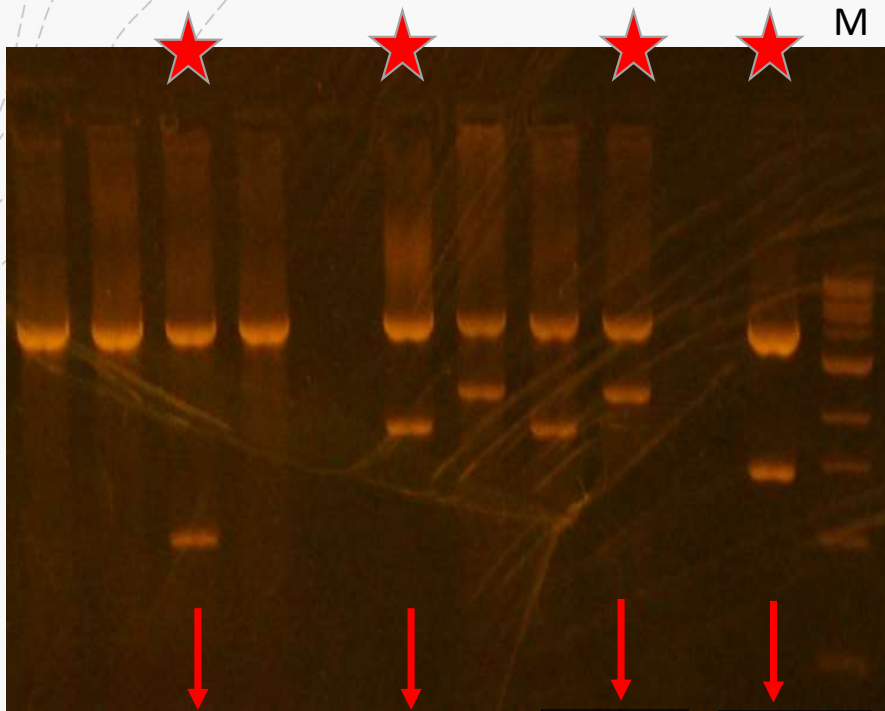
Άξονας Χ: υποδιαιρέσεις σε γραμμική διάταξη

Υπολογισμός μεγέθους (μήκους, br) ζωνών

- Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης και φωτογράφιση
- Κατασκευή πρότυπης καμπύλης και υπολογισμός του μεγέθους των ζωνών
- Τοποθέτηση των θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών στο τμήμα DNA (χαρτογράφηση)



Παράδειγμα 1

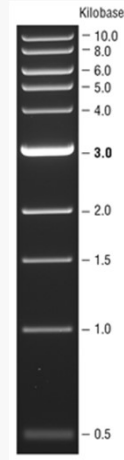


1.49	4.0
2.82	1.0

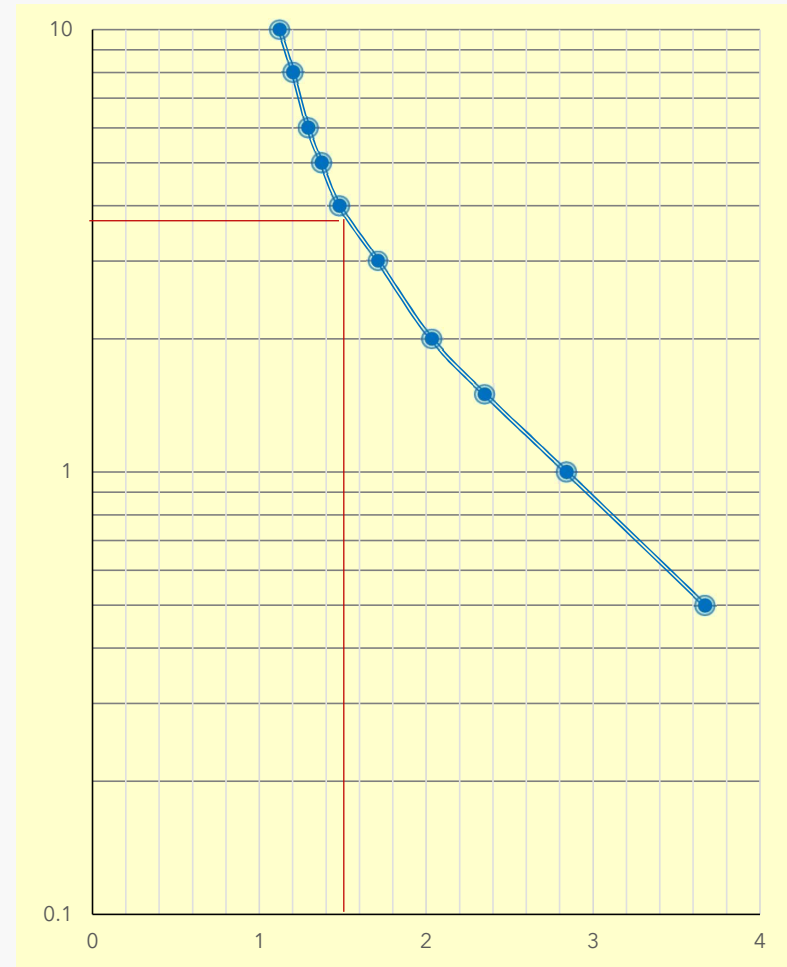
1.48	4.0
2.12	1.9

D	Kb
1.44	4.4
1.88	2.5

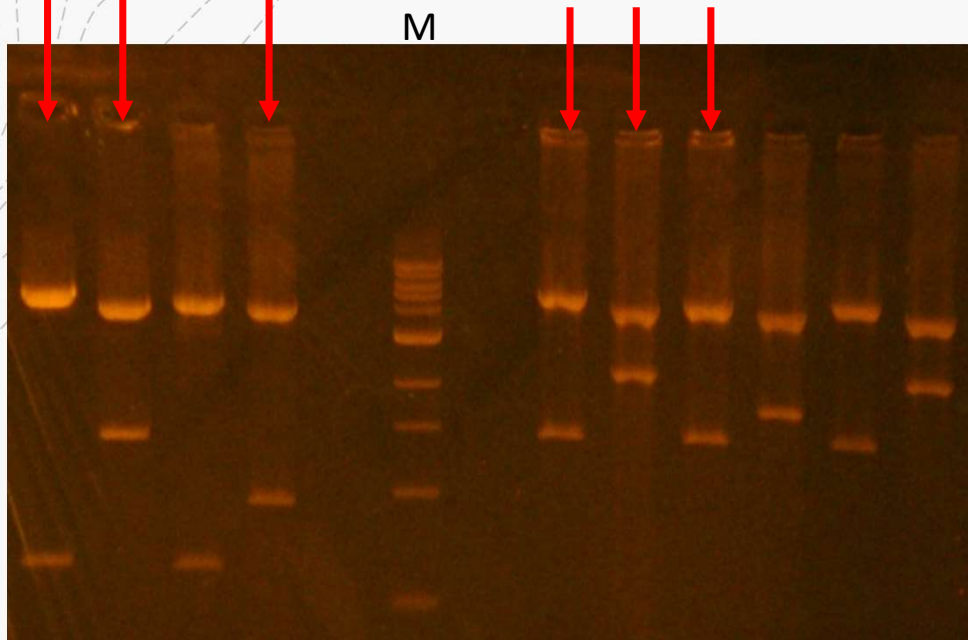
D	Kb
1.52	3.8
2.42	1.4



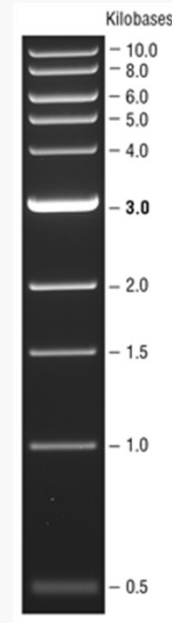
D (in)	Kb
1.12	10
1.2	8
1.29	6
1.37	5
1.48	4
1.71	3
2.03	2
2.35	1.5
2.84	1
3.67	0.5



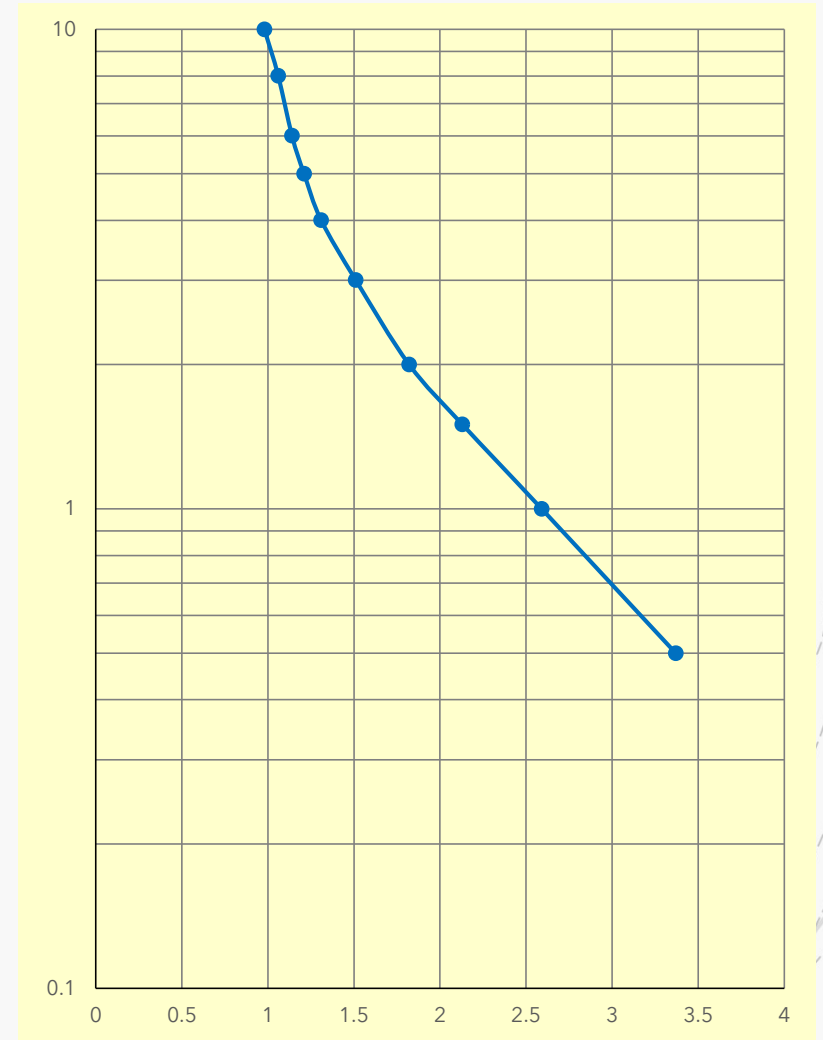
Παράδειγμα 2



Kb
3.8
0.6

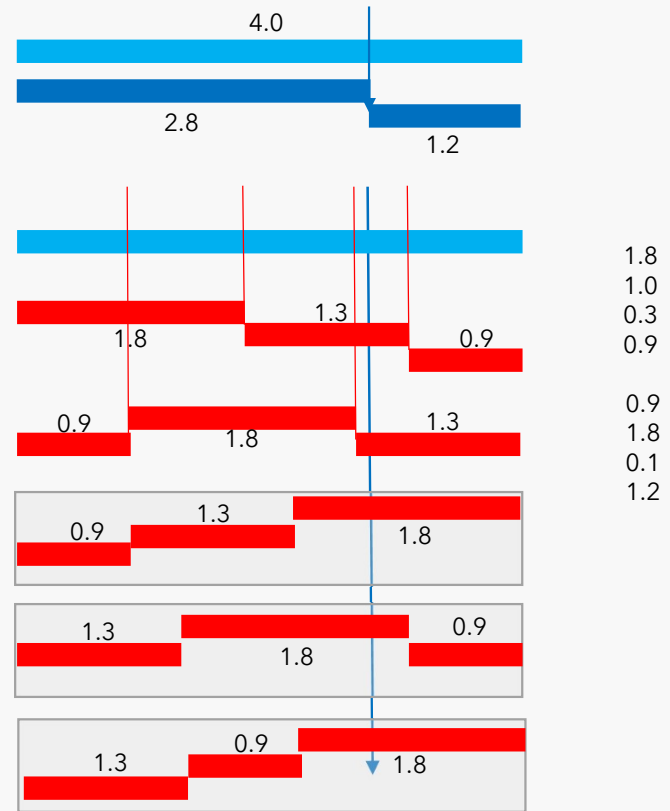
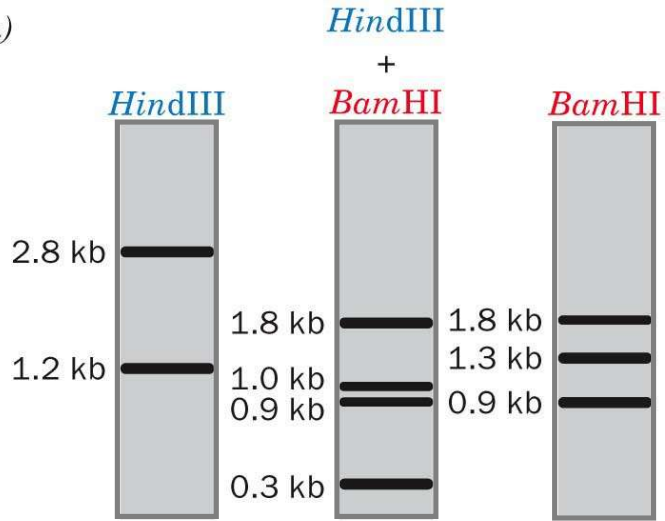


D (in)	Kb
0.98	10
1.06	8
1.14	6
1.21	5
1.31	4
1.51	3
1.82	2
2.13	1.5
2.59	1
3.37	0.5



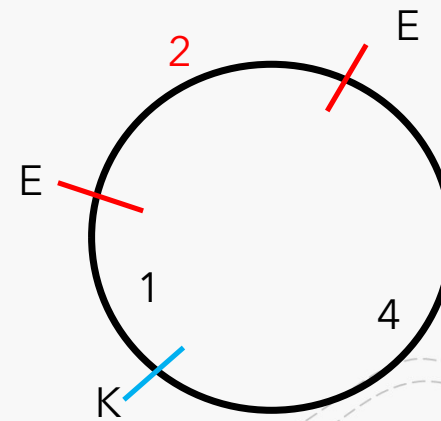
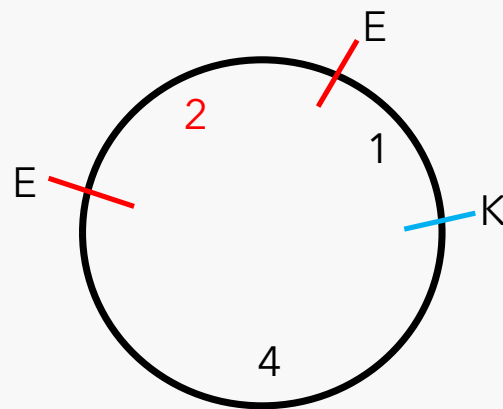
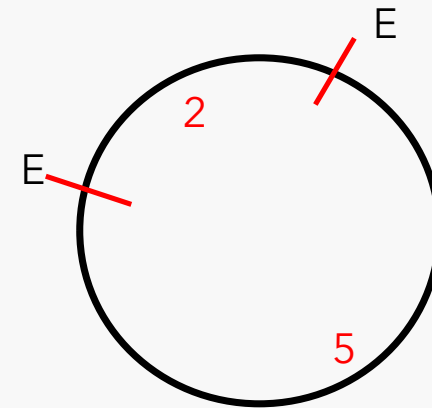
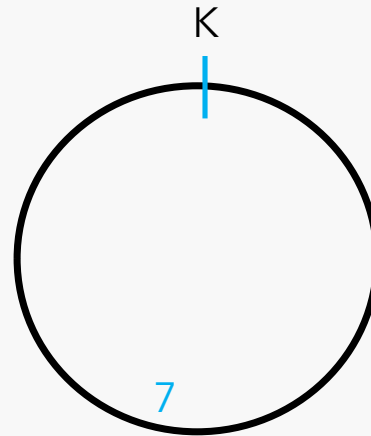
Κατασκευή χάρτη - Γραμμικό μόριο

(a)



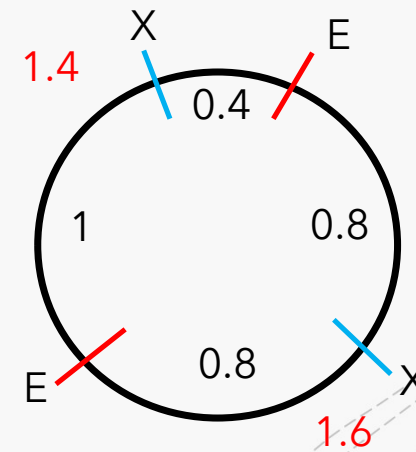
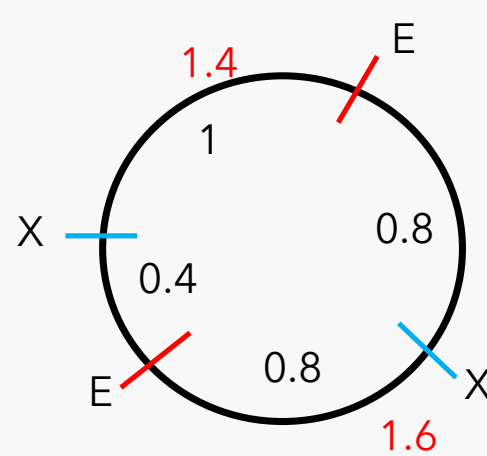
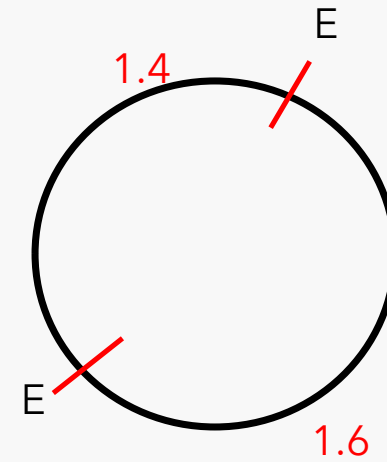
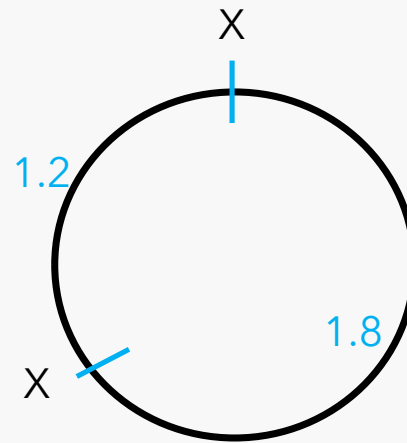
Κατασκευή χάρτη - Κυκλικό μόριο

KpnI	EcoRI	KpnI/ EcoRI
7 Kb	5 Kb	4 Kb
	2 Kb	2 Kb
		1 Kb
7	7	7

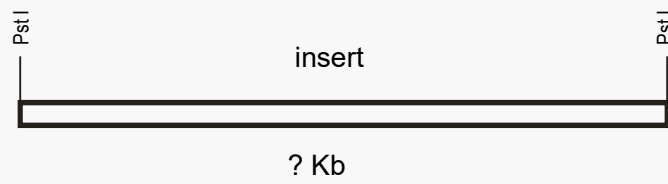


Κατασκευή χάρτη - Κυκλικό μόριο

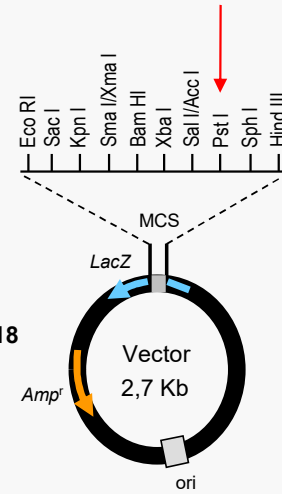
XhoI	EcoRI	XhoI/ EcoRI
1.8 Kb	1.6 Kb	1 Kb
1.2 Kb	1.4 Kb	0.8 Kb x2
		0.4 Kb
3	3	2.2 → 3



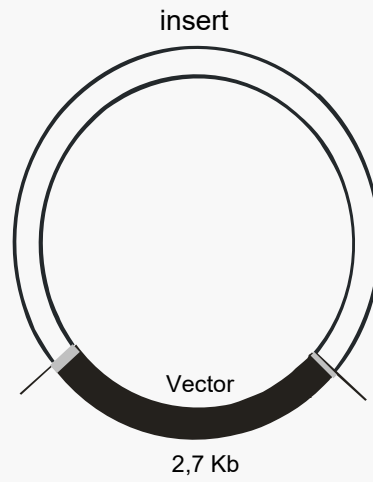
Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο



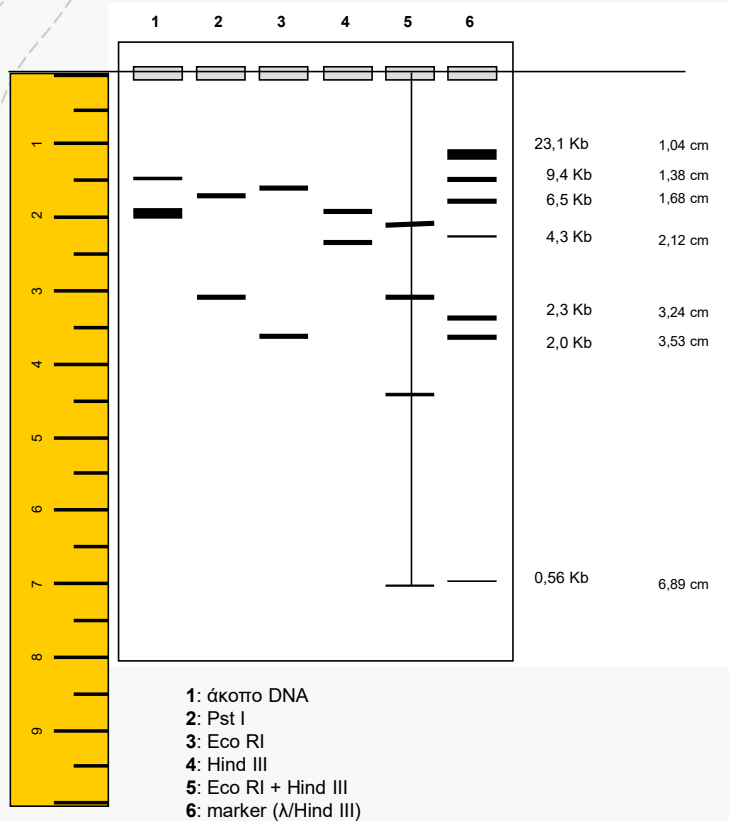
Πολυσύνδεσμος
(polylinker)



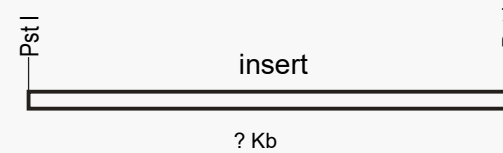
Πλασμιδιακός φορέας pUC18



Κατασκευή χάρτη - Κυκλικό μόριο, ανασυνδυασμένο πλασμίδιο



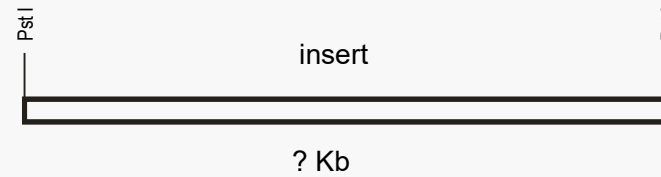
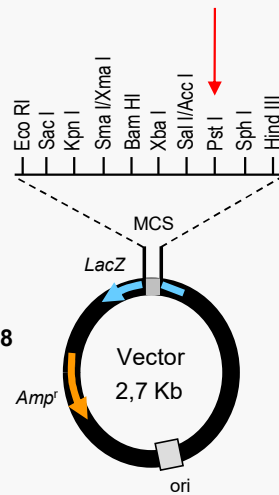
Πλασμιδιακός φορέας pUC18



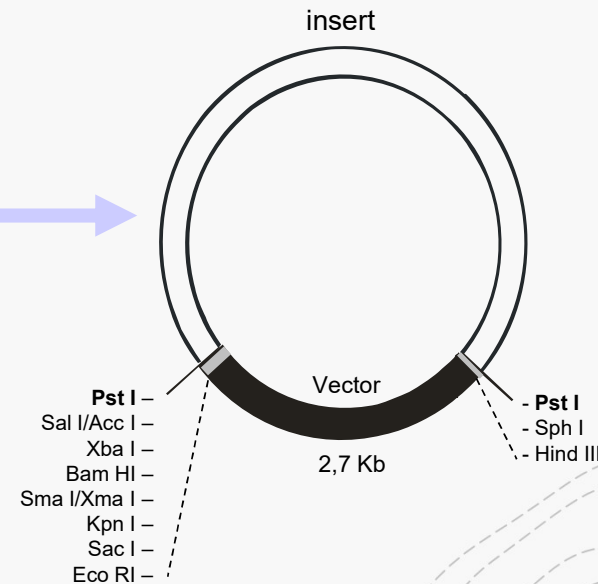
Pst I		Eco RI		Hind III		Eco RI / Hind III	
Kb	cm	Kb	cm	Kb	cm	Kb	cm
7,32	1,6	7,99	1,53	5,86	1,82	5,31	1,93
2,7	3,03	2,0	3,53	4,14	2,24	2,7	3,03
						1,46	4,78
						0,56	6,9
10,02		9,99		10,0		10,03	

Πολυσύνδεσμος
(polylinker)

Πλασμιδιακός φορέας pUC18

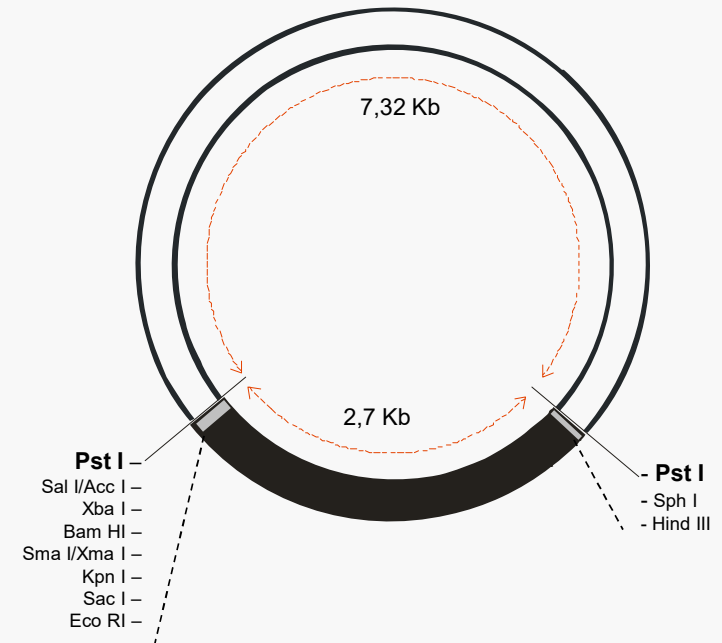
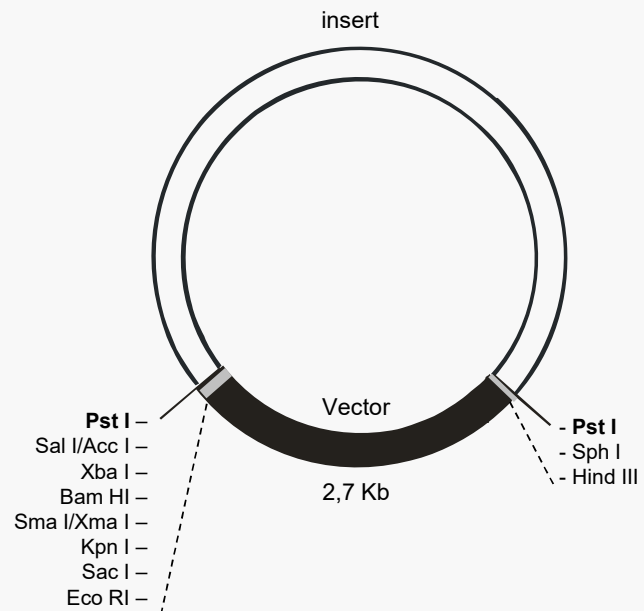


- Πέψη του πλασμιδιακού φορέα (vector) με Pst I
- Αντίδραση σύνδεσης (ligation) του ξένου τμήματος DNA (insert) με τον πλασμιδιακό φορέα
- Μετασχηματισμός βακτηρίων με το **ανασυνδυασμένο πλασμίδιο**
- Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων (παρουσία αντιβιοτικού) τα οποία έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (παρουσία X-gal)
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA
- Χαρτογράφηση του κλωνοποιημένου τμήματος DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες



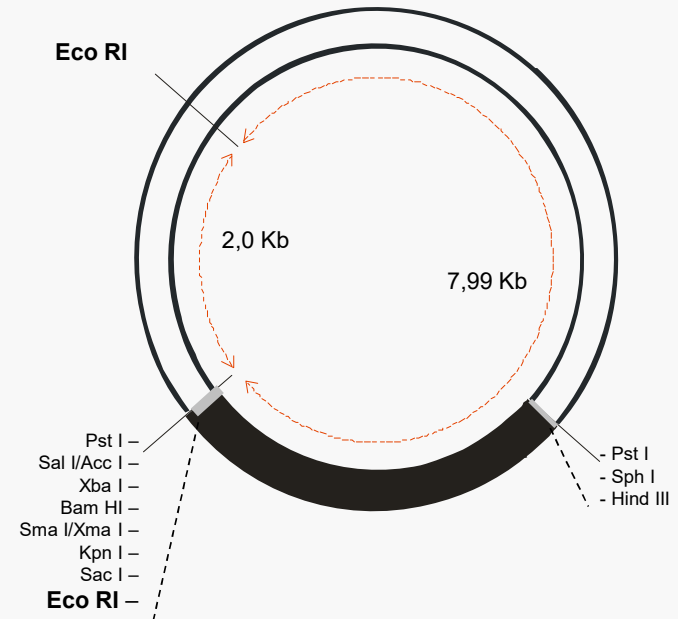
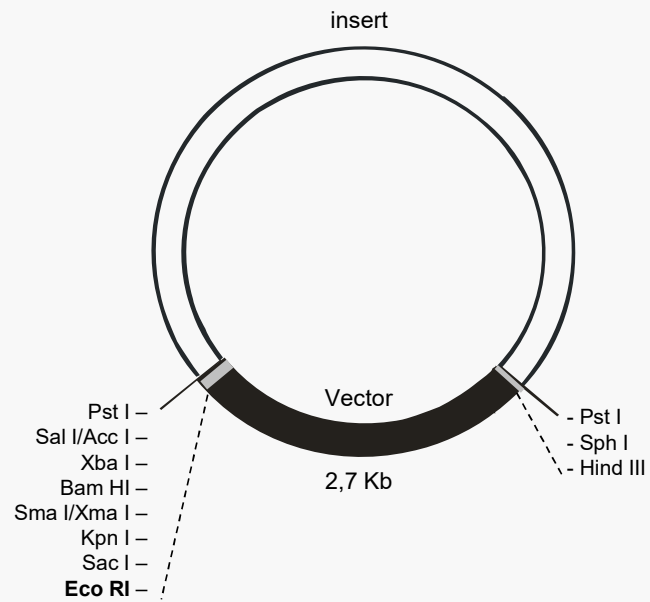
Πέψη με Pst I

Pst I	Eco RI	Hind III	Eco RI / Hind III
<i>Kb</i>	<i>Kb</i>	<i>Kb</i>	<i>Kb</i>
7,32	7,99	5,86	5,31
2,7	2,0	4,14	2,7
			1,46
			0,56
10,02	9,99	10,0	10,03



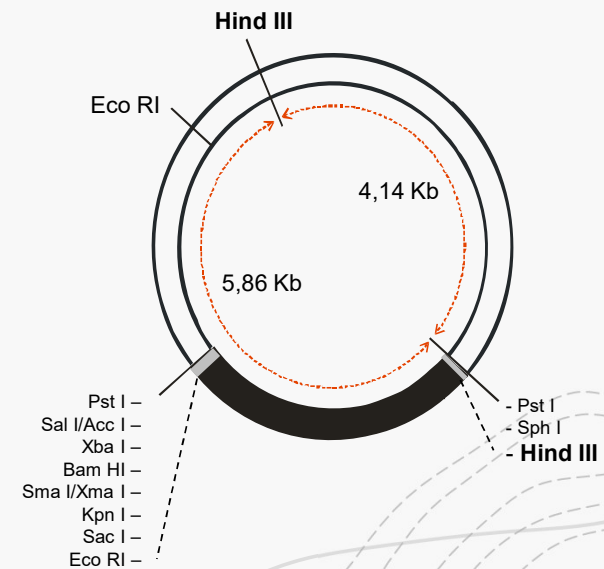
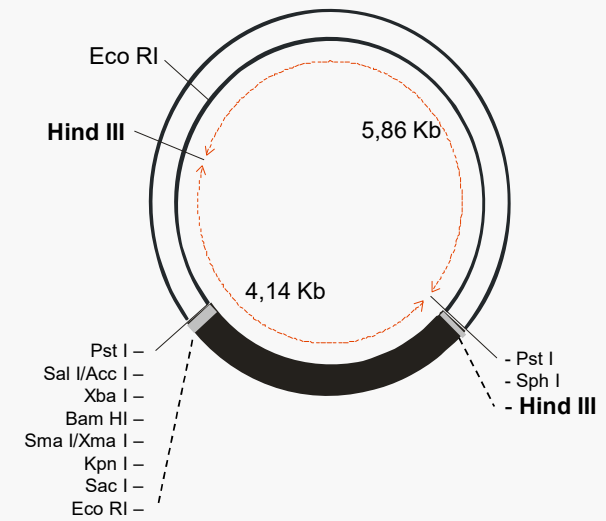
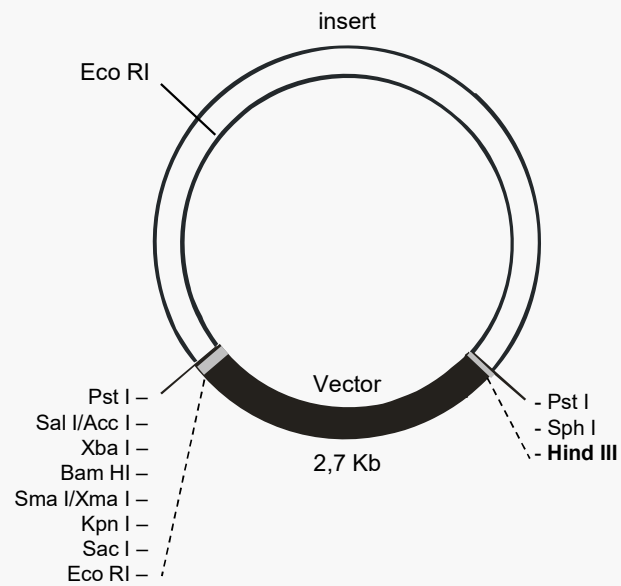
Πέψη με Eco RI

Pst I	Eco RI	Hind III	Eco RI / Hind III
<i>Kb</i>	<i>Kb</i>	<i>Kb</i>	<i>Kb</i>
7,32	7,99	5,86	5,31
2,7	2,0	4,14	2,7
			1,46
			0,56
10,02	9,99	10,0	10,03



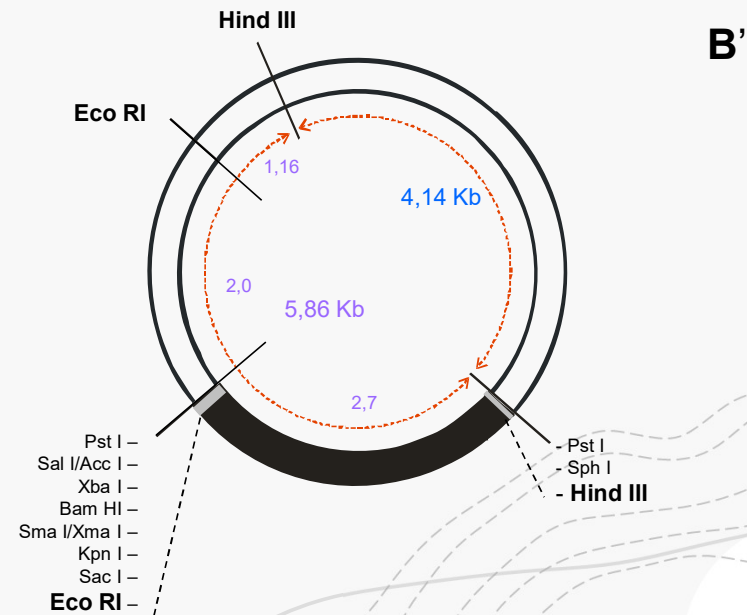
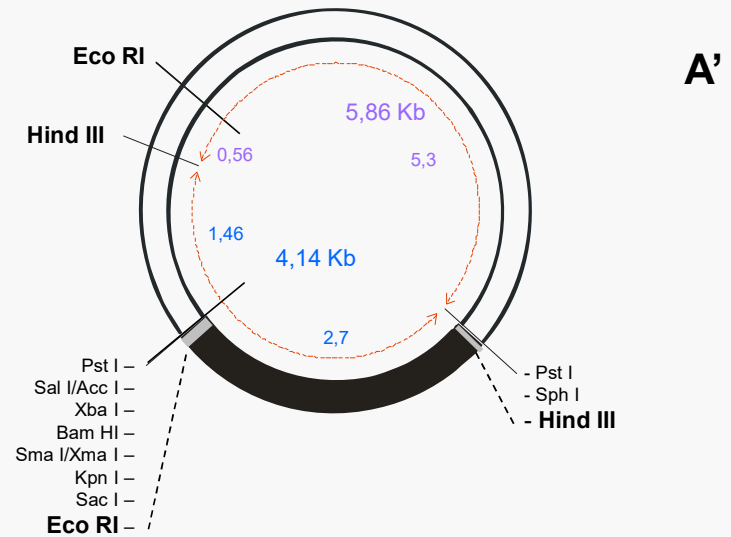
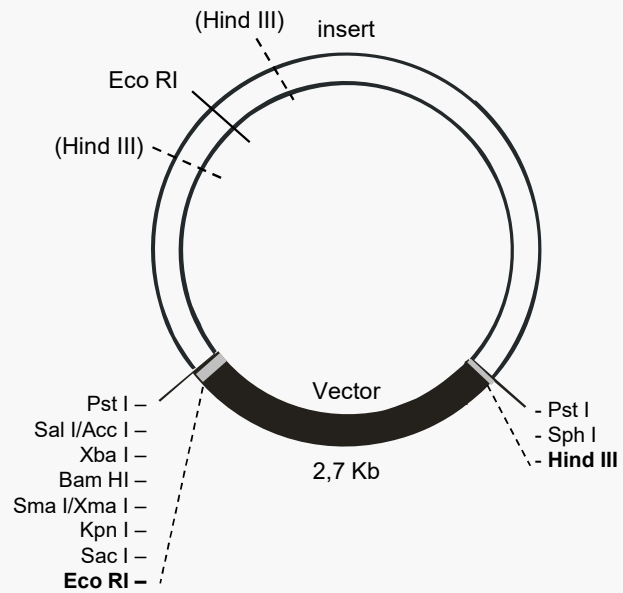
Πέψη με Hind III

Pst I	Eco RI	Hind III	Eco RI / Hind III
<i>Kb</i>	<i>Kb</i>	<i>Kb</i>	<i>Kb</i>
7,32	7,99	5,86	5,31
2,7	2,0	4,14	2,7
			1,46
			0,56
10,02	9,99	10,0	10,03

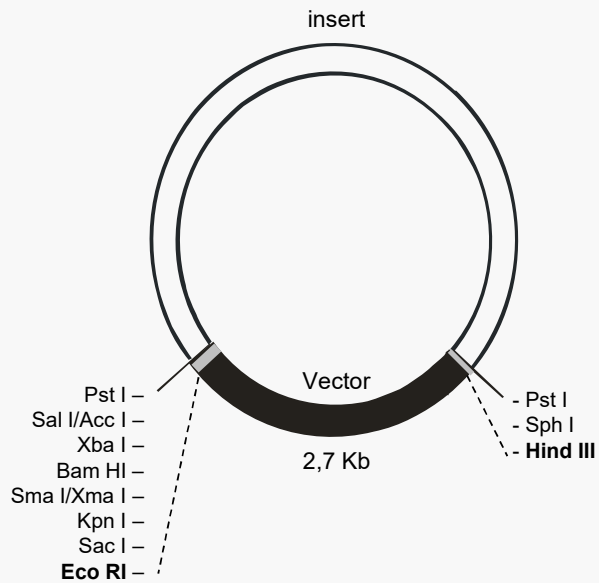


Διπλή πέψη με EcoRI/ Hind III

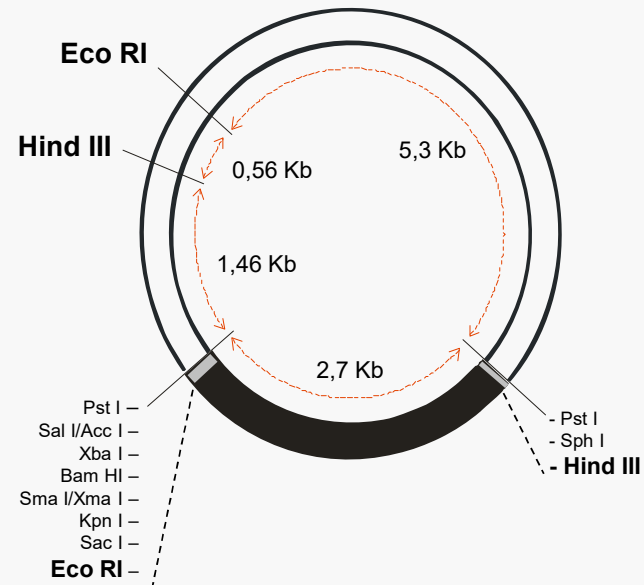
Pst I	Eco RI	Hind III	Eco RI / Hind III
Kb	Kb	Kb	Kb
7,32	7,99	5,86	5,31
2,7	2,0	4,14	2,7
			1,46
			0,56
10,02	9,99	10,0	10,03



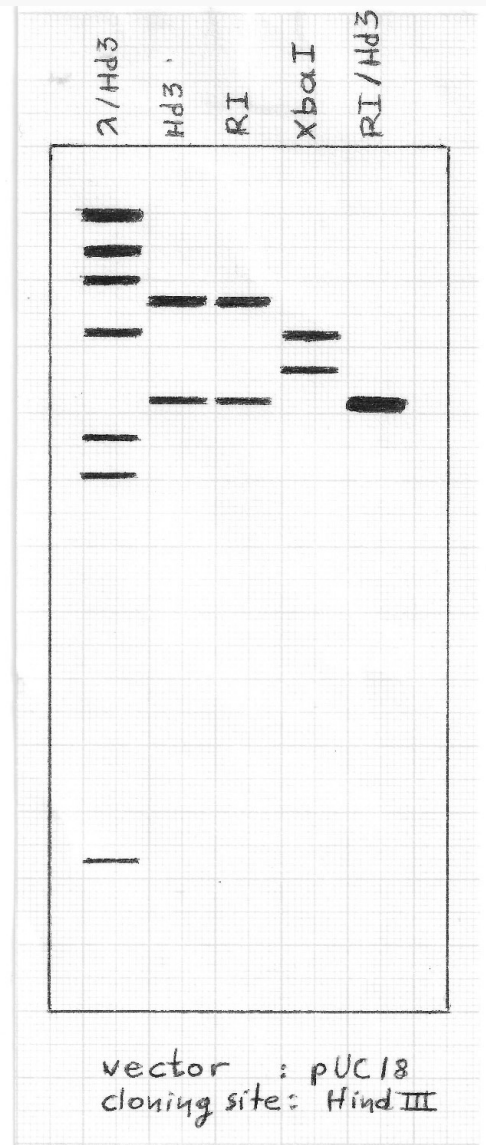
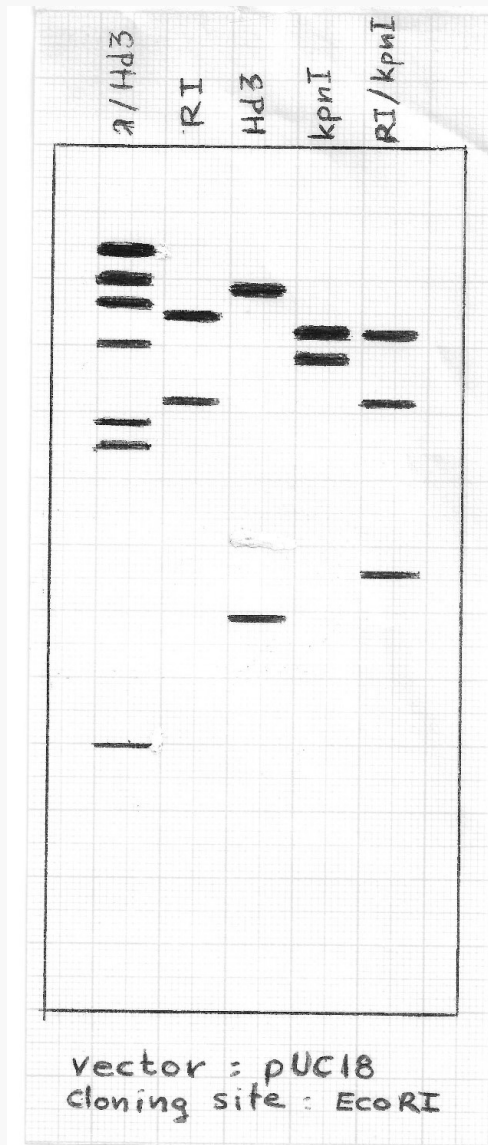
Pst I	Eco RI	Hind III	Eco RI / Hind III
<i>Kb</i>	<i>Kb</i>	<i>Kb</i>	<i>Kb</i>
7,32	7,99	5,86	5,31
2,7	2,0	4,14	2,7
			1,46
			0,56
10,02	9,99	10,0	10,03



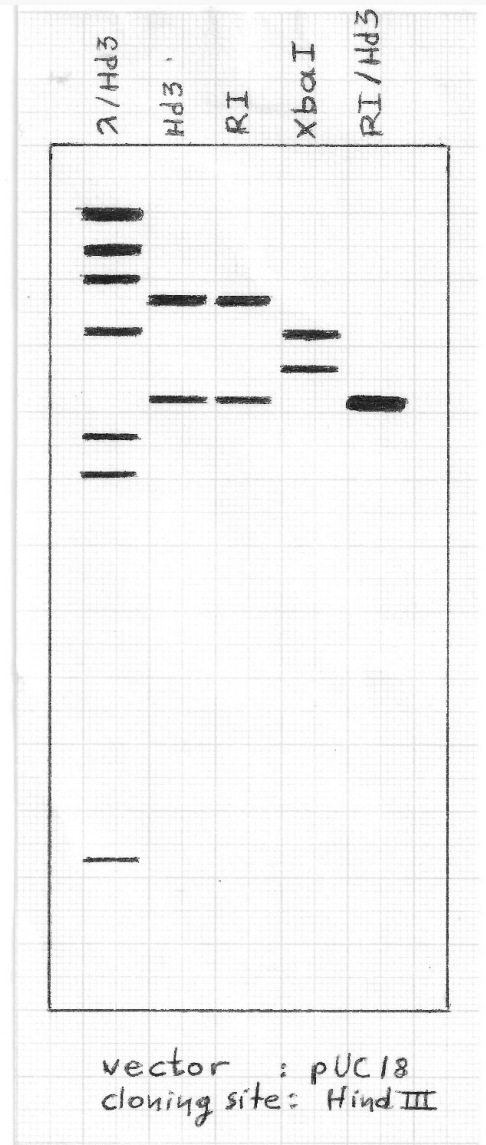
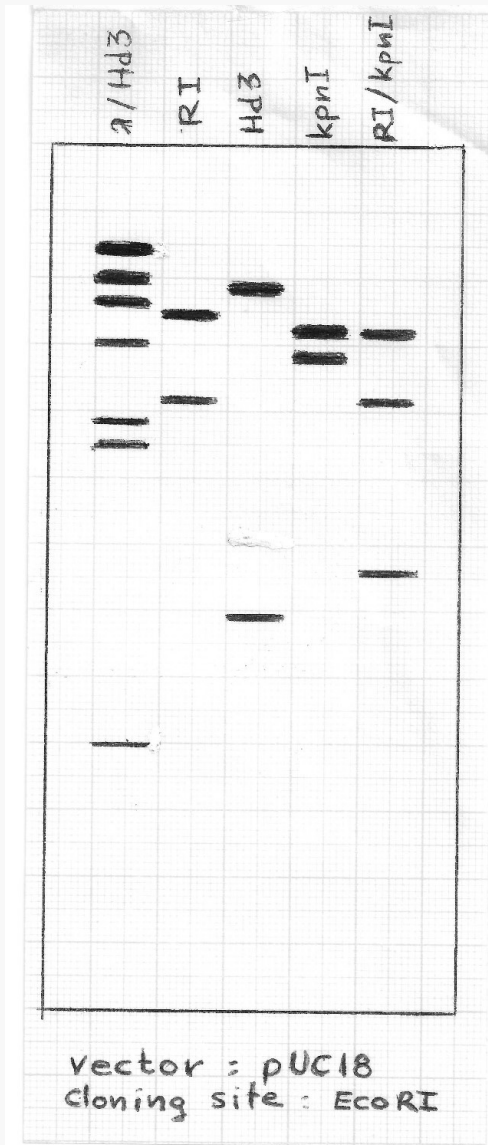
Τελικός χάρτης (περίπτωση Α')



Marker	λ HindIII
(Kb)	
	23.1
	9.4
	6.5
	4.3
	2.3
	2
	0.56

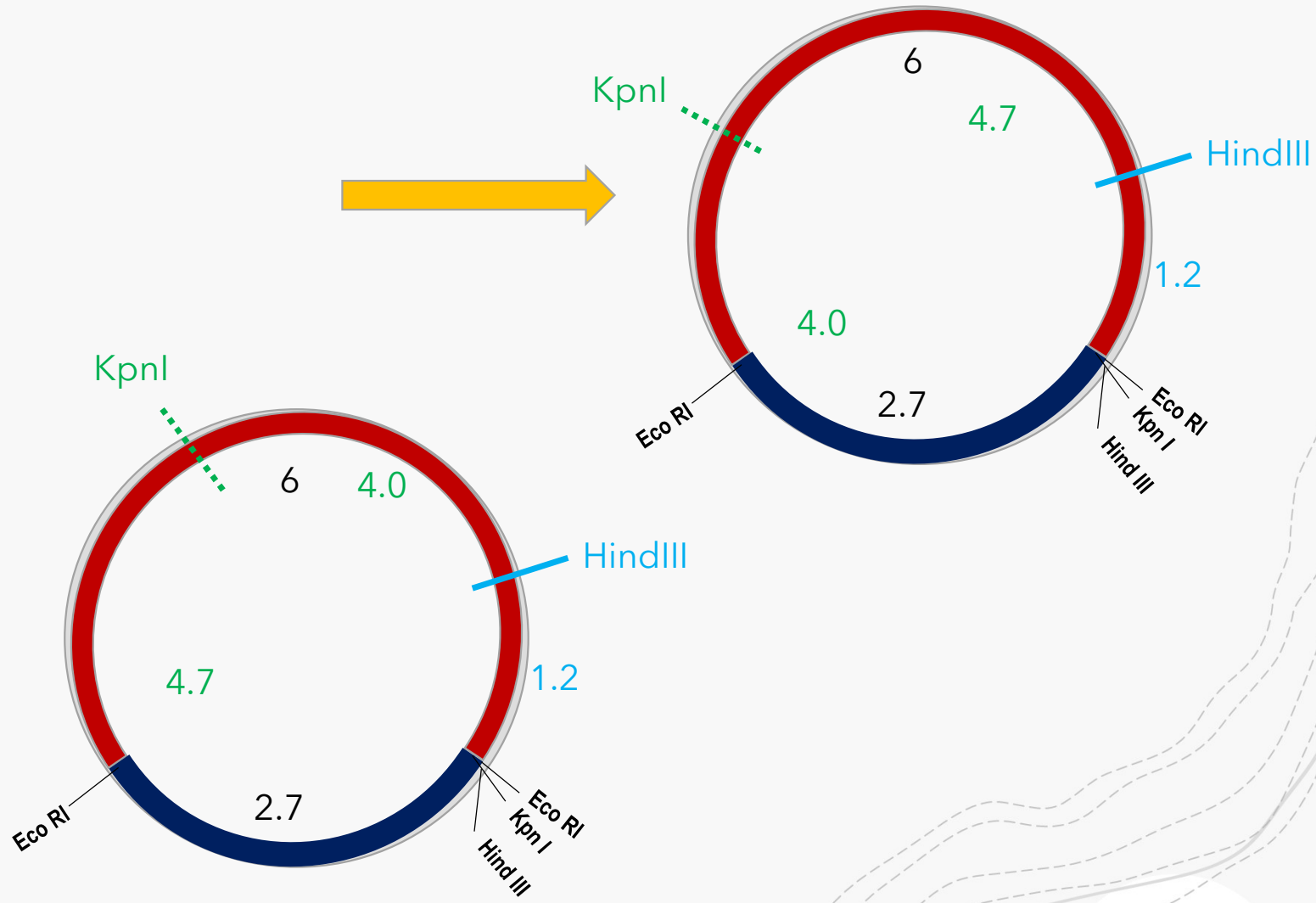
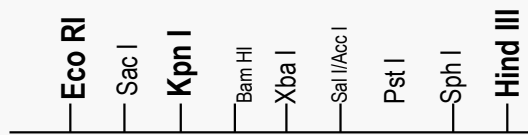


RI	Hd3	KpnI	RI/KpnI
6	7.6	4.7	4.7
2.7	1.2	4.0	2.7
			1.3
8.7	8.8	8.7	8.7

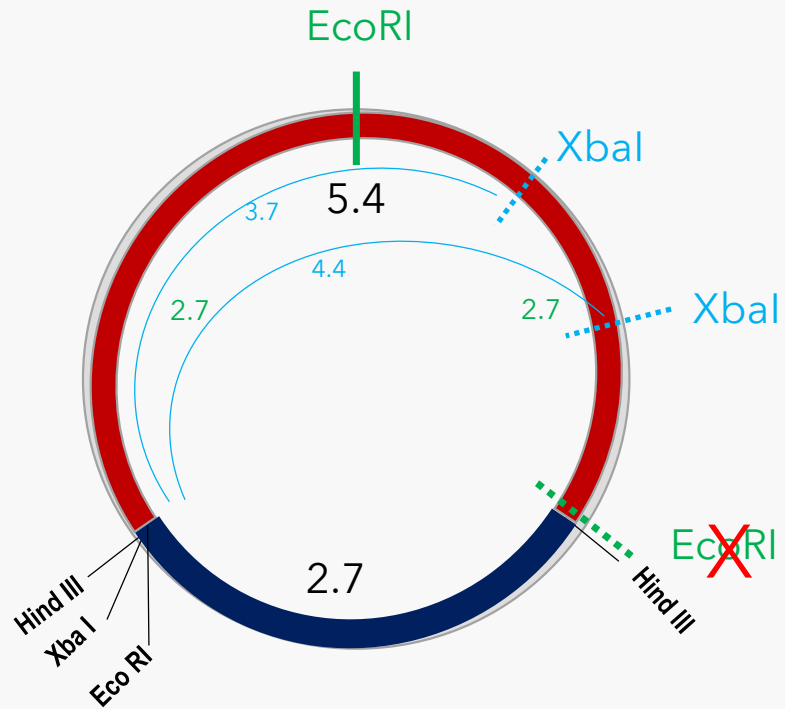
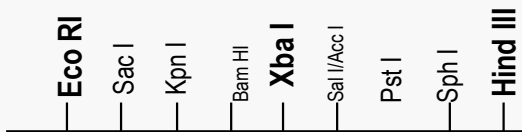


Hd3	RI	XbaI	RI/Hd3
5.4	5.4	4.4	
2.7	2.7	3.7	2.7
8.1	8.1	8.1	8.1

RI	Hd3	KpnI	RI/KpnI
6	7.6	4.7	4.7
2.7	1.2	4.0	2.7
			1.3
8.7	8.8	8.7	8.7

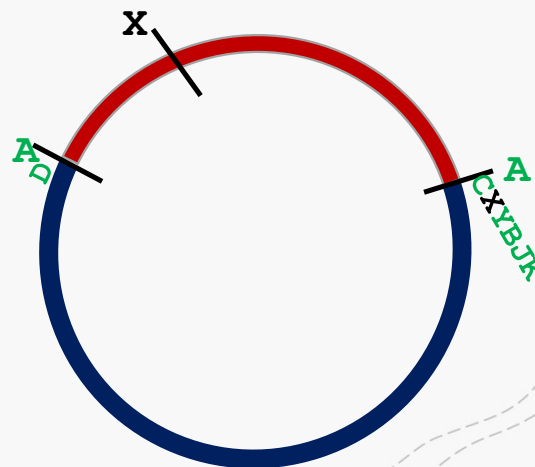
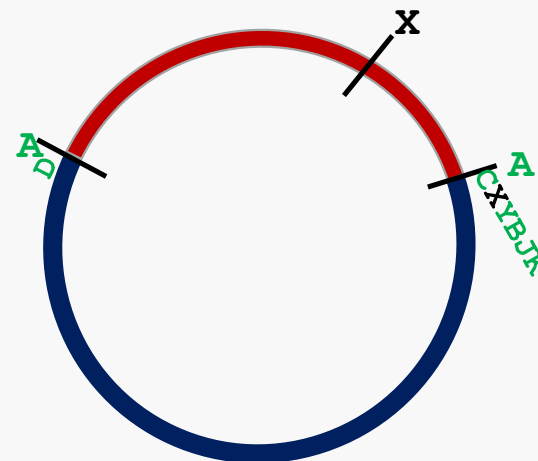


Hd3	RI	XbaI	RI/Hd3
5.4	5.4	4.4	
2.7	2.7	3.7	2.7
8.1	8.1	8.1	8.1

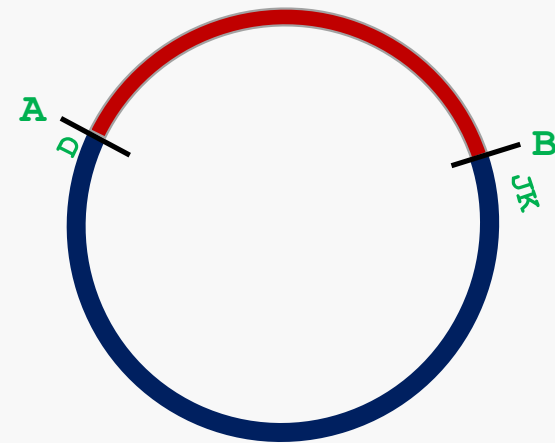
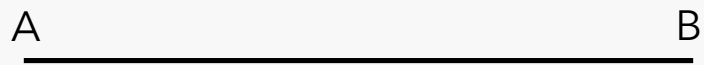


2 εναλλακτικές θέσεις για την XbaI. Πώς βρίσκω τη σωστή;

Κλωνοποίηση του τμήματος A-A (που φέρει εσωτερικά θέση για Π.Ε. X) στον παρακάτω φορέα (που επίσης φέρει θέση για το X).
Εύρεση προσανατολισμού κλωνοποίησης με πέψη με X



Κατά την κλωνοποίηση του τμήματος A-B (δηλαδή που έχει προκύψει από πέψη με τα Π.Ε. A και B) στον παρακάτω φορέα οι θέσεις του πολυσυνδέσμου ανάμεσα στις A και B χάνονται.

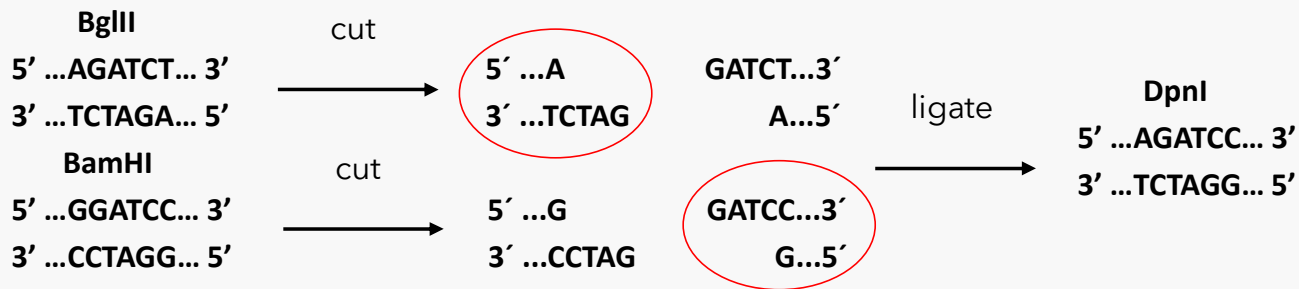


Κατά την κλωνοποίηση:

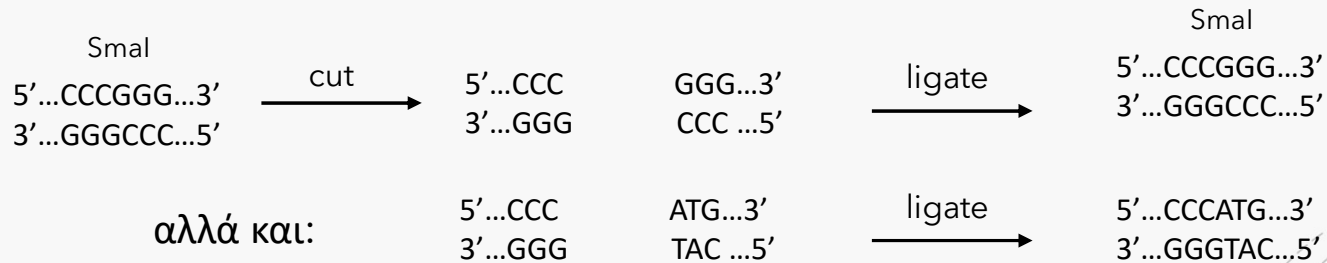
Ένωση συμπληρωματικών άκρων από την ίδια πέψη → η θέση ξαναδημιουργείται



Ένωση συμπληρωματικών άκρων διαφορετικές πέψεις → δημιουργείται θέση για άλλο ένζυμο ή όχι



Ευθύγραμμα άκρα ενώνονται ανεξαρτήτως αλληλουχίας



Δεν αναγνωρίζεται από κάποια Π.Ε.