ΒΙΟΛ-207 Μοριακή Βιολογία

Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου

Watson/Baker/Bell/Ganin/Levine/Losick

PEARSON/Utopia

Διδάσκων: Χαράλαμπος Γ. Σπηλιανάκης

Αναπληρωτής καθηγητής Μοριακής Βιολογίας & Επιγενετικής

(Τμήμα Βιολογίας, IMBB-ITE)

www.spilianakislab.gr/biol207.html

spiliana@imbb.forth.gr

Διάλεξη 6

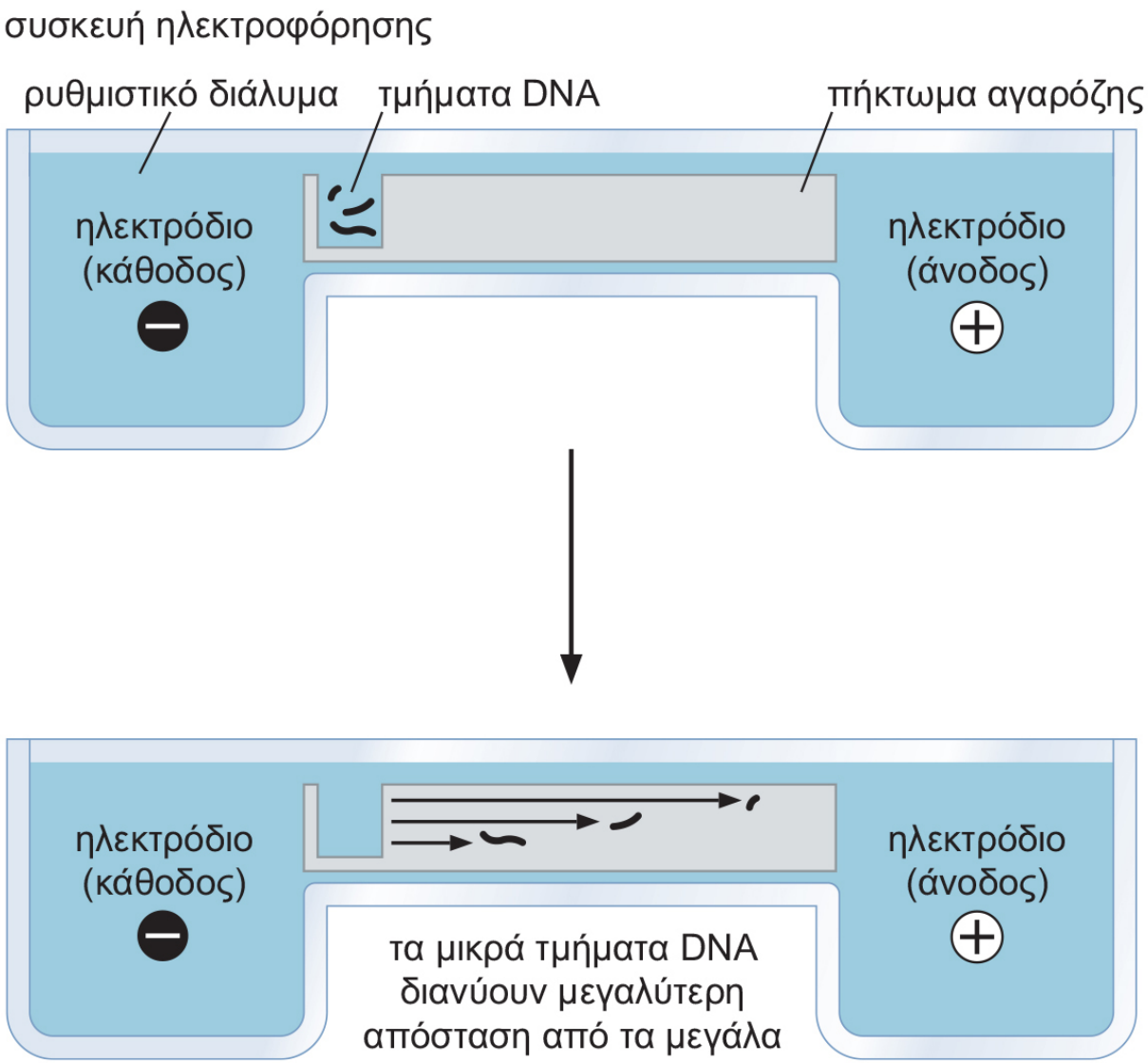
Διαλέξεις

1. **Κεφ.2:** Τα νουκλεϊκά οξέα μεταφέρουν τη γενετική πληροφορία
2. **Κεφ.3:** Η σημασία των ασθενών και των ισχυρών χημικών δεσμών
3. **Κεφ.4:** Η δομή του DNA
4. **Κεφ.5:** Η δομή και η ευελιξία του RNA
5. **Κεφ.6:** Η δομή των πρωτεϊνών
6. **Κεφ.7:** Τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας

Τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας

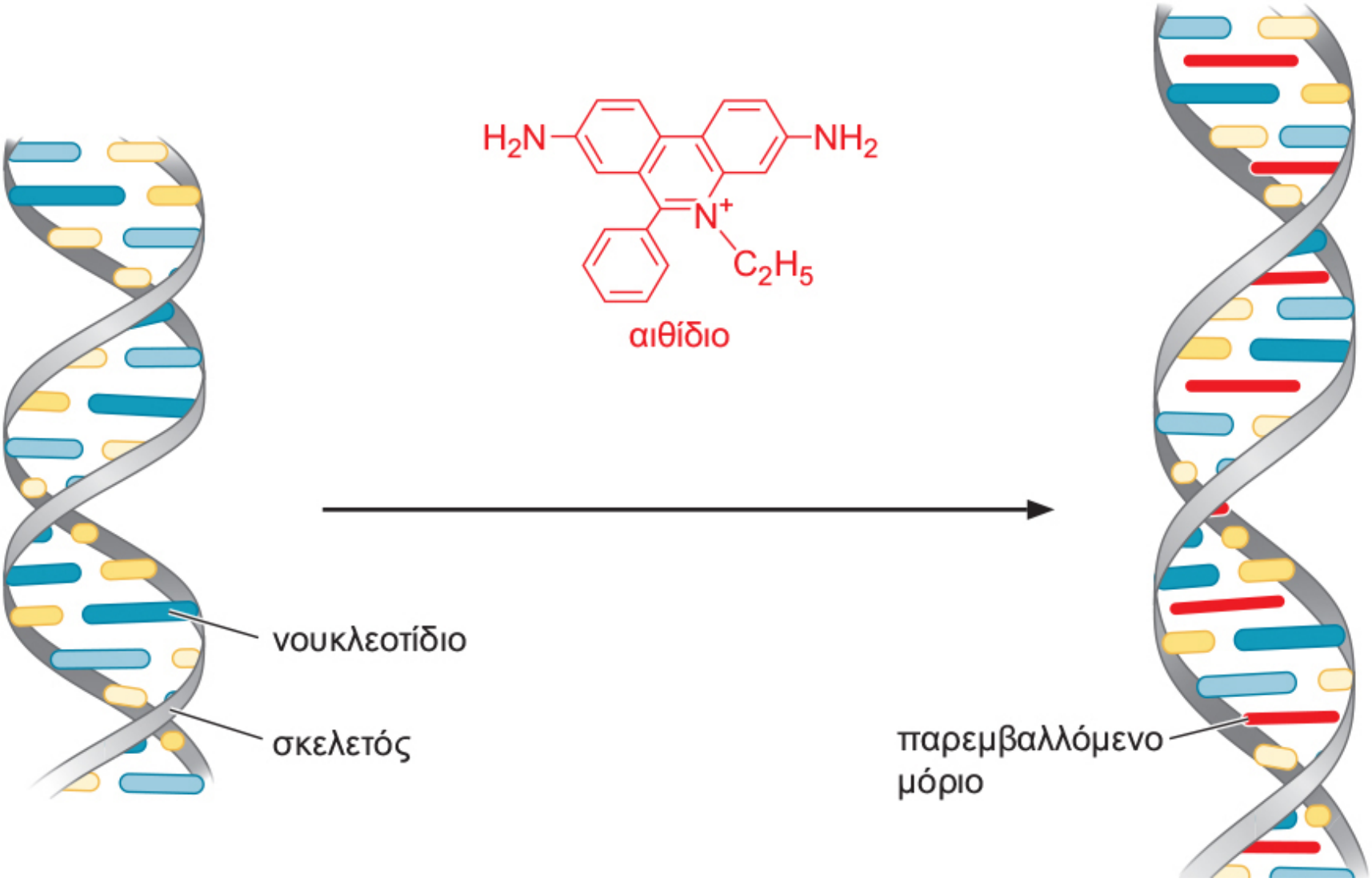
1. Νουκλεϊκά οξέα: Βασικές μέθοδοι

Η **ηλεκτροφόρηση πηκτώματος** διαχωρίζει μόρια DNA και RNA σύμφωνα με το μέγεθός τους



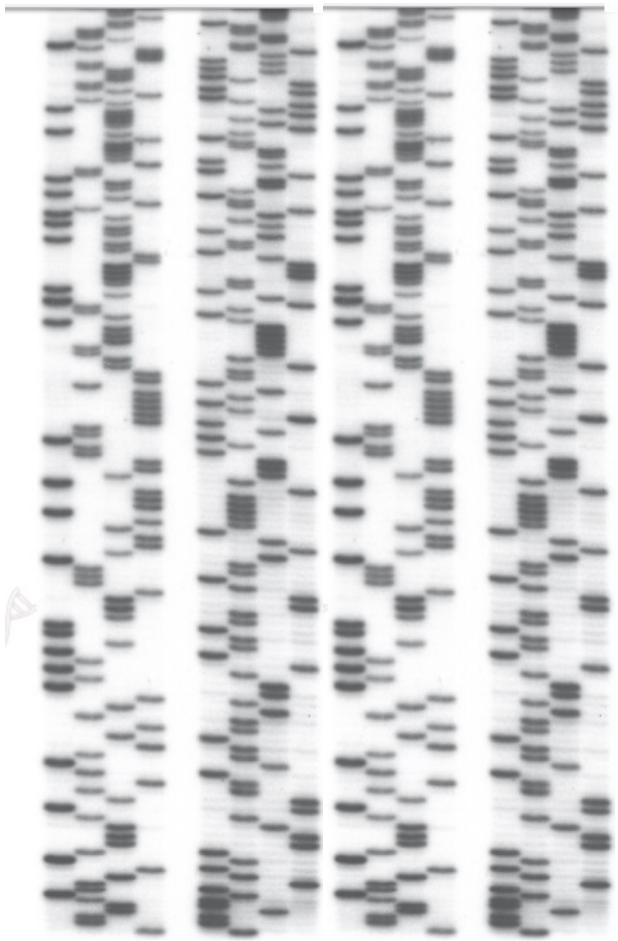
1. Νουκλεϊκά οξέα: Βασικές μέθοδοι

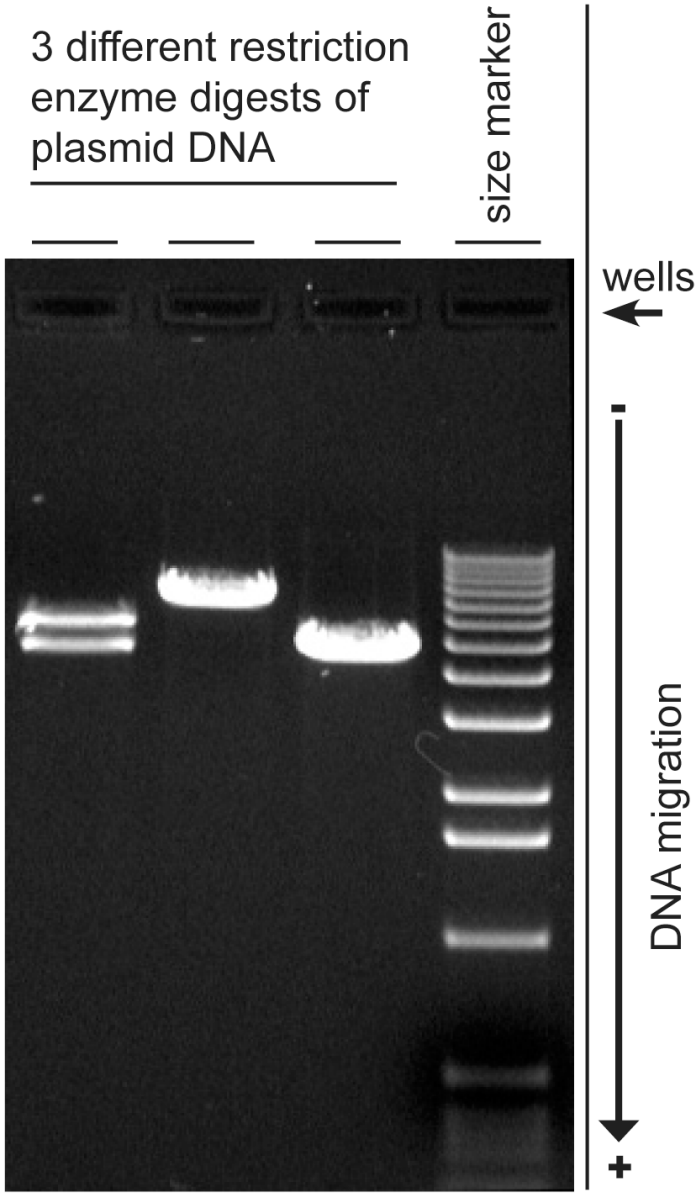
Η **ηλεκτροφόρηση πηκτώματος** διαχωρίζει μόρια DNA και RNA σύμφωνα με το μέγεθός τους



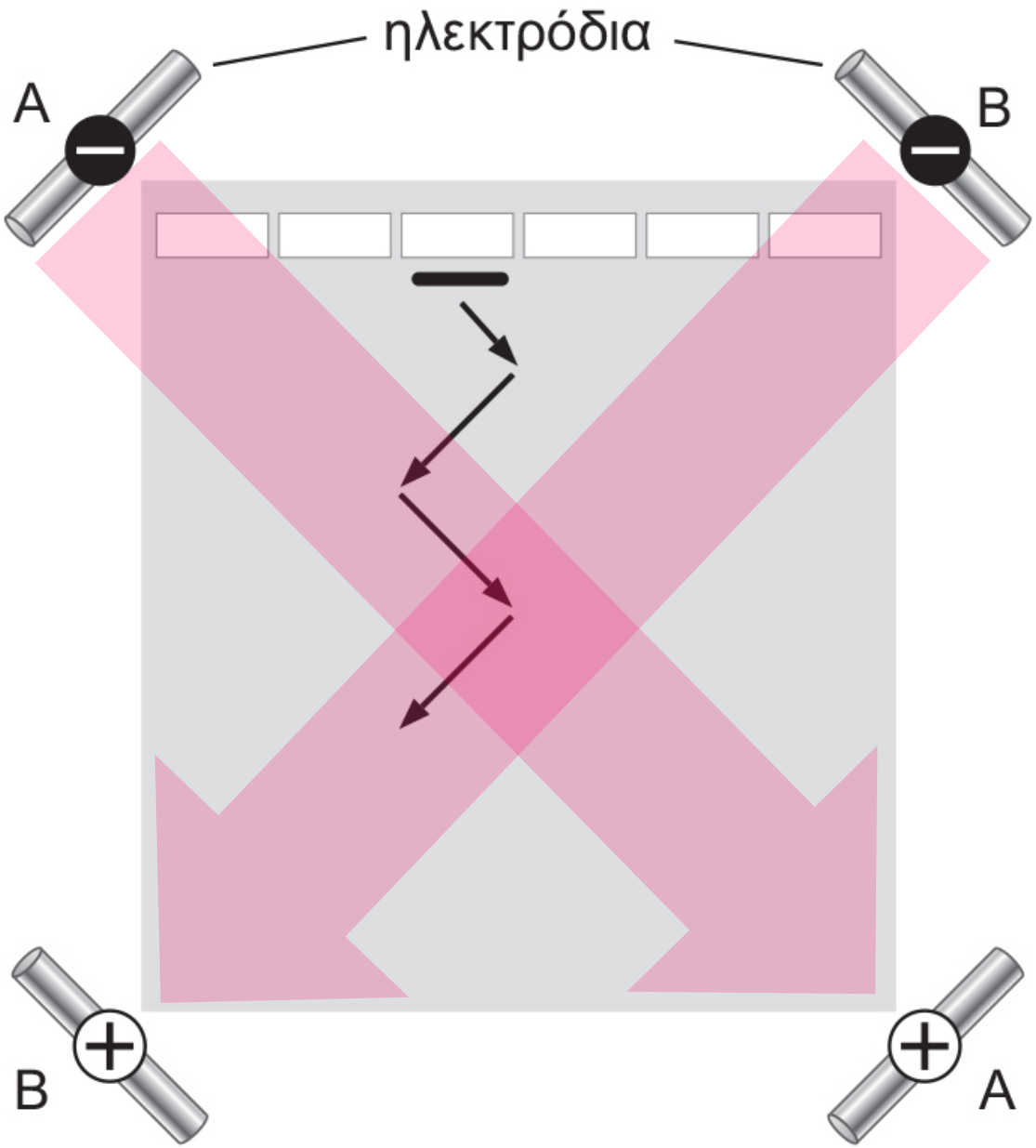
1. Νουκλεϊκά οξέα: Βασικές μέθοδοι

- Πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου
- Πηκτώματα αγαρόζης



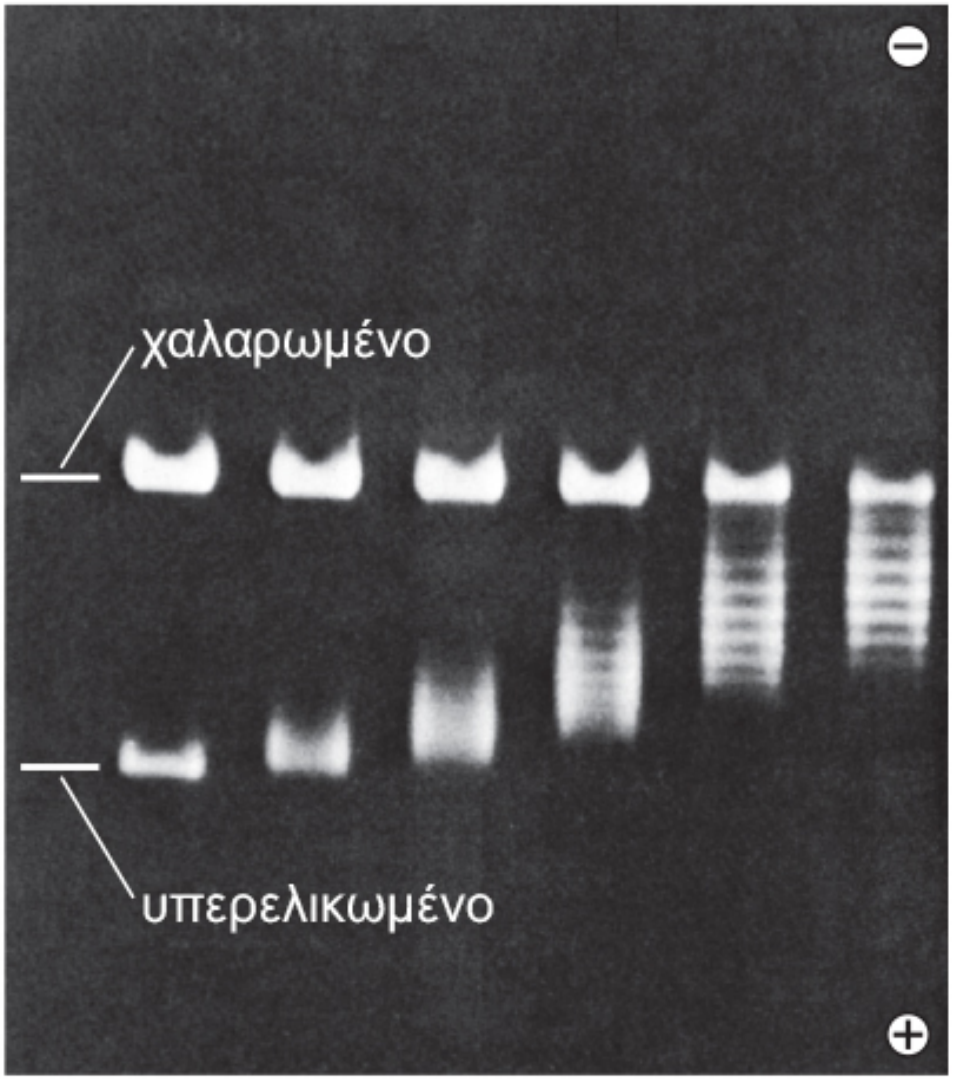


Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος παλμικού πεδίου



1. Νουκλεϊκά οξέα: Βασικές μέθοδοι

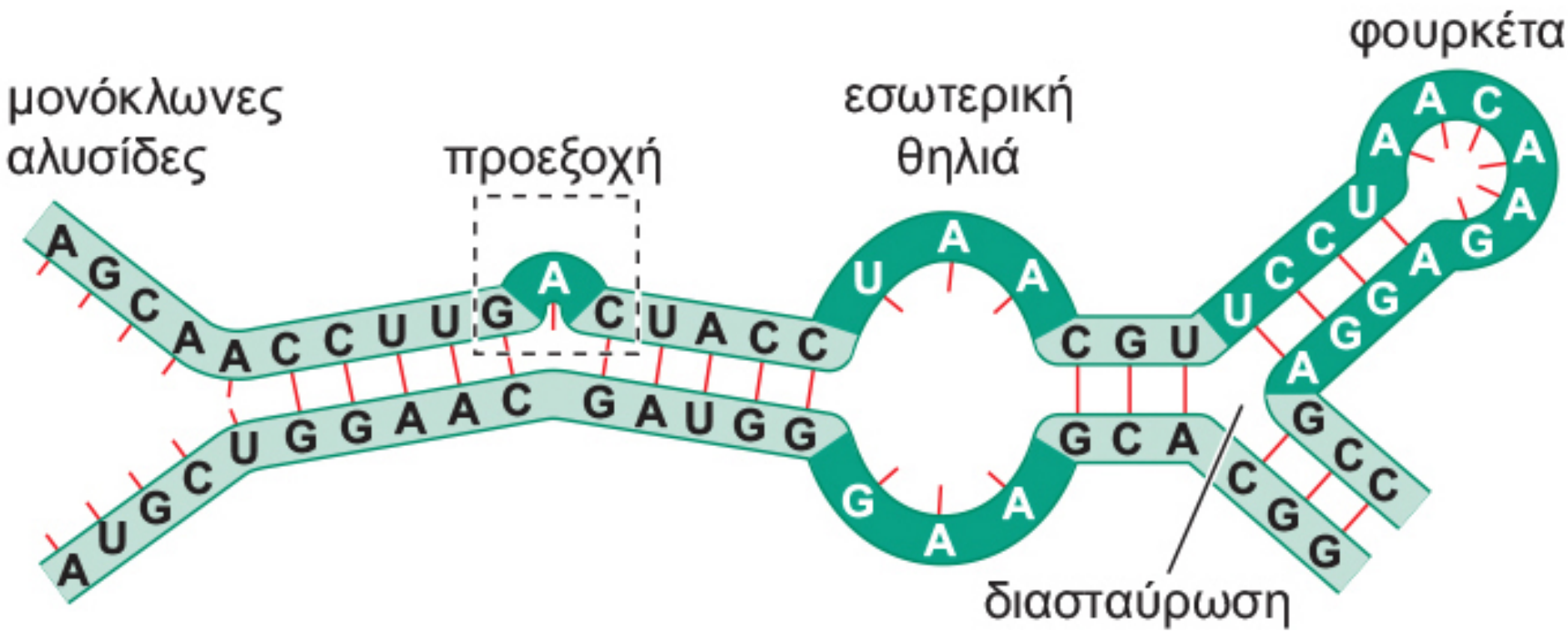
Η **ηλεκτροφόρηση πηκτώματος** διαχωρίζει μόρια DNA και RNA σύμφωνα με το μέγεθός τους



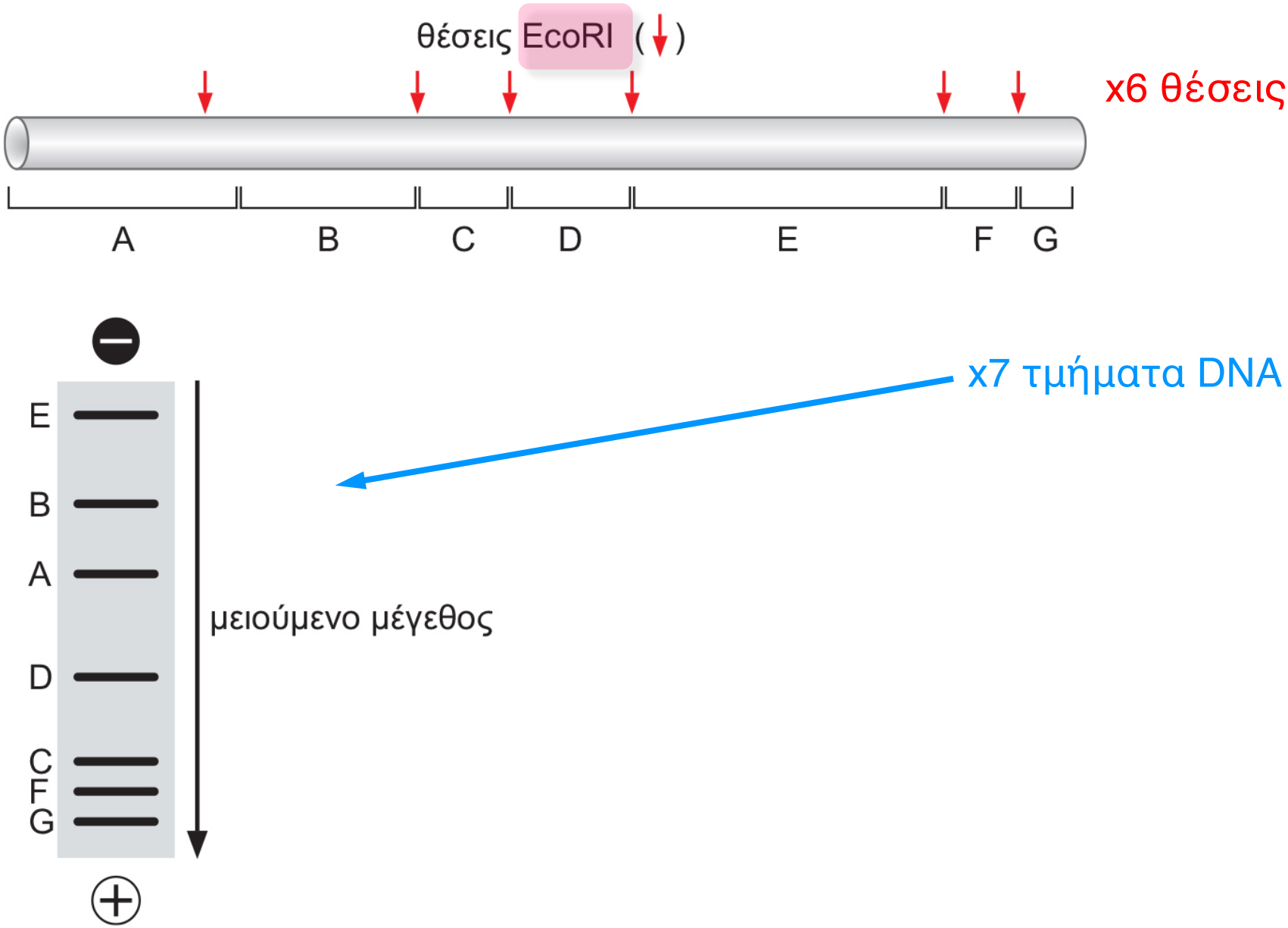
1. Νουκλεϊκά οξέα: Βασικές μέθοδοι

Η **ηλεκτροφόρηση πηκτώματος** διαχωρίζει μόρια DNA και RNA σύμφωνα με το μέγεθός τους

Η **γλυοξάλη** αλληλεπιδρά με το RNA και εμποδίζει το σχηματισμό ζευγών βάσεων



Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διασπούν τα μόρια DNA σε συγκεκριμένες θέσεις



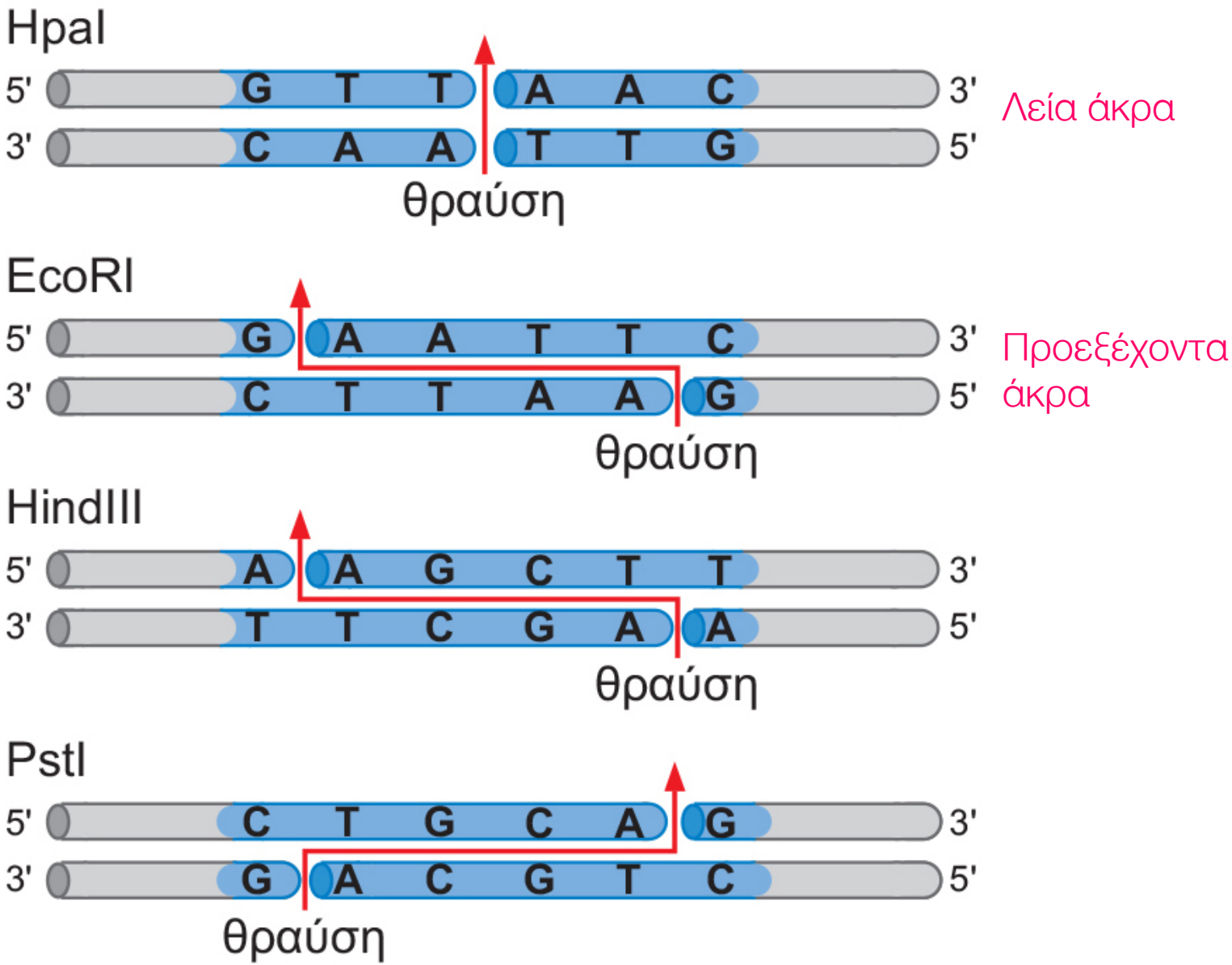
Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διασπούν τα μόρια DNA σε συγκεκριμένες θέσεις

Ένζυμο	Αλληλουχία	Συχνότητα σχάσης[1]
Sau3A1	5′ – GATC – 3′	1 ανά 0.25 kb
EcoRI	5′ – GAATTC – 3′	1 ανά 4 kb
NotI	5′ – GCGGCCGC – 3′	1 ανά 65 kb

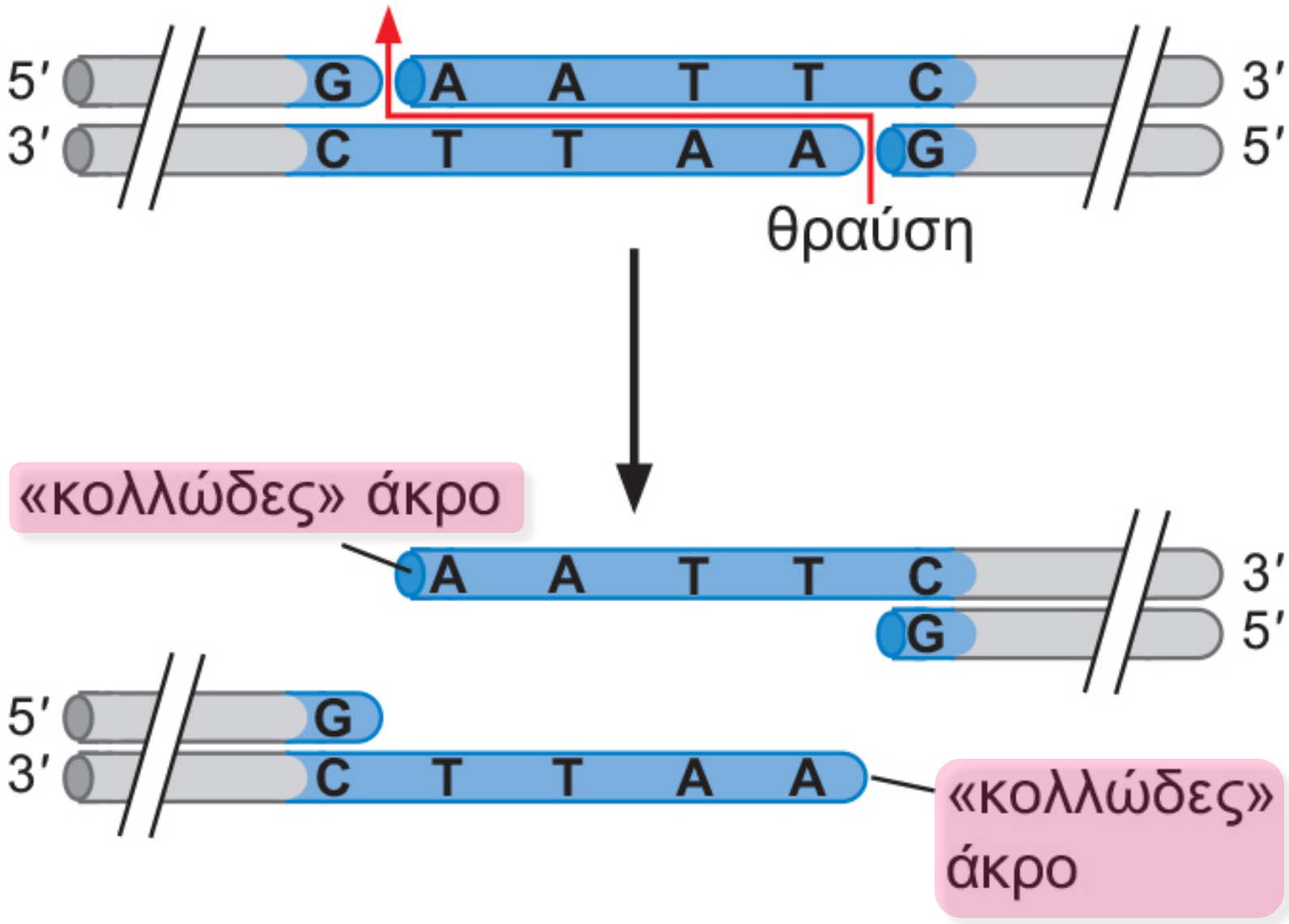
me me

[1]Συχνότητα = 1/4*n*, όπου *n* ο αριθμός ζευγών βάσεων στην αλληλουχία αναγνώρισης

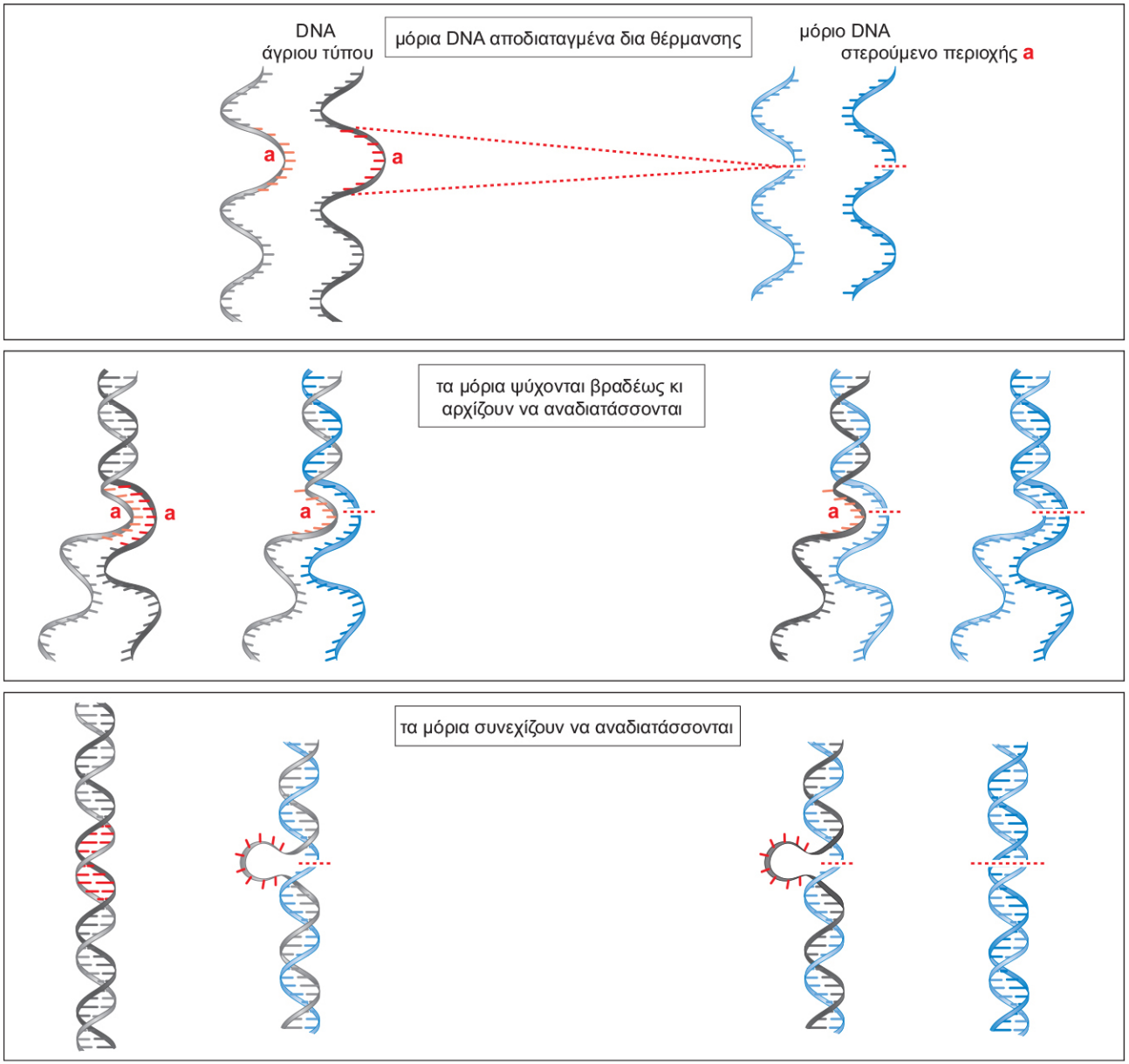
Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διασπούν τα μόρια DNA σε συγκεκριμένες θέσεις



Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διασπούν τα μόρια DNA σε συγκεκριμένες θέσεις

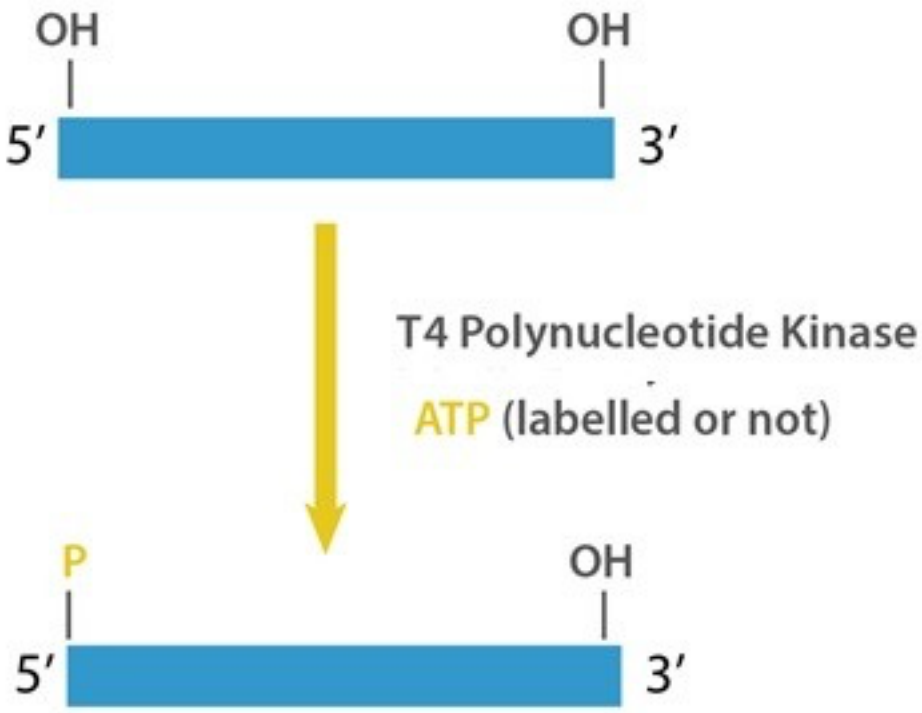


Η υβριδοποίηση του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση μορίων DNA



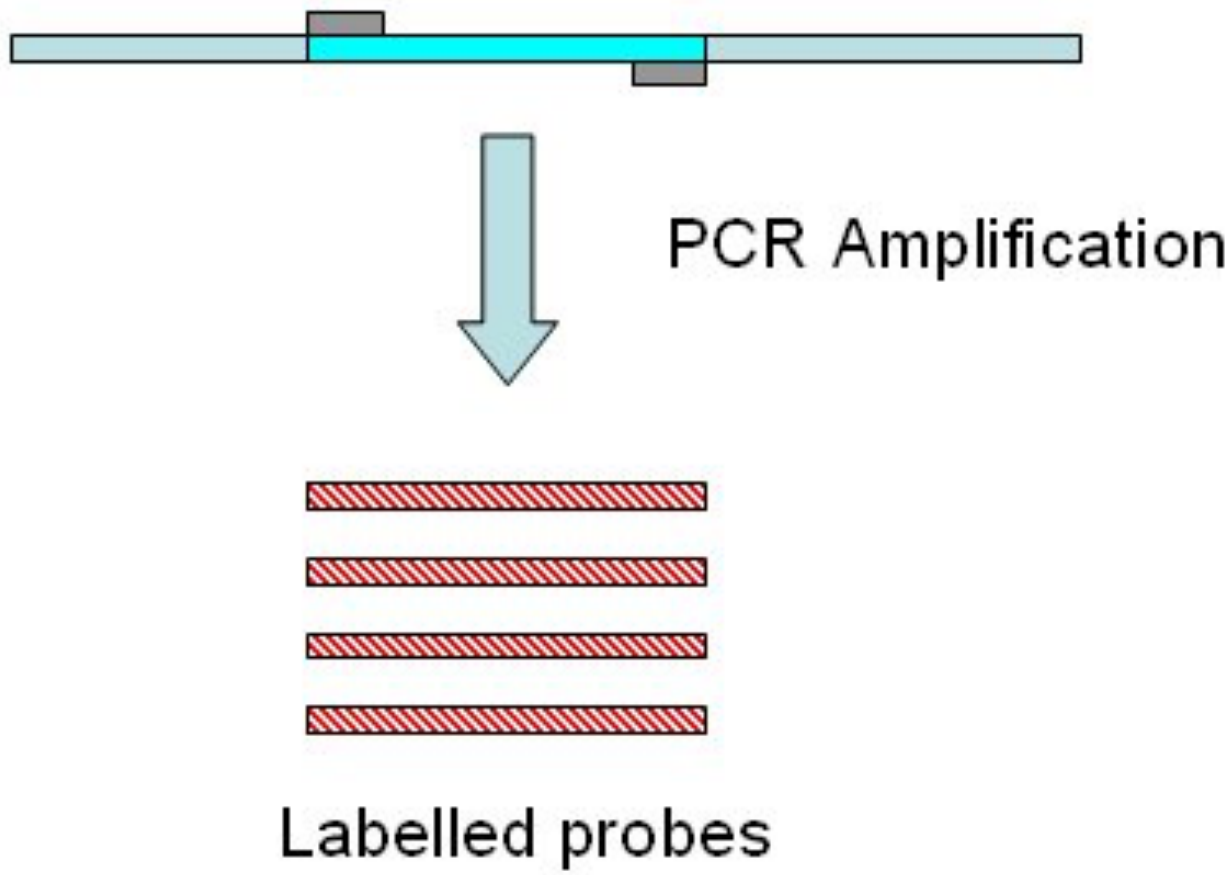
Η υβριδοποίηση του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση μορίων DNA

- Υβριδοποίηση
- Ανιχνευτής
  - ΣΗΜΑΝΣΗ



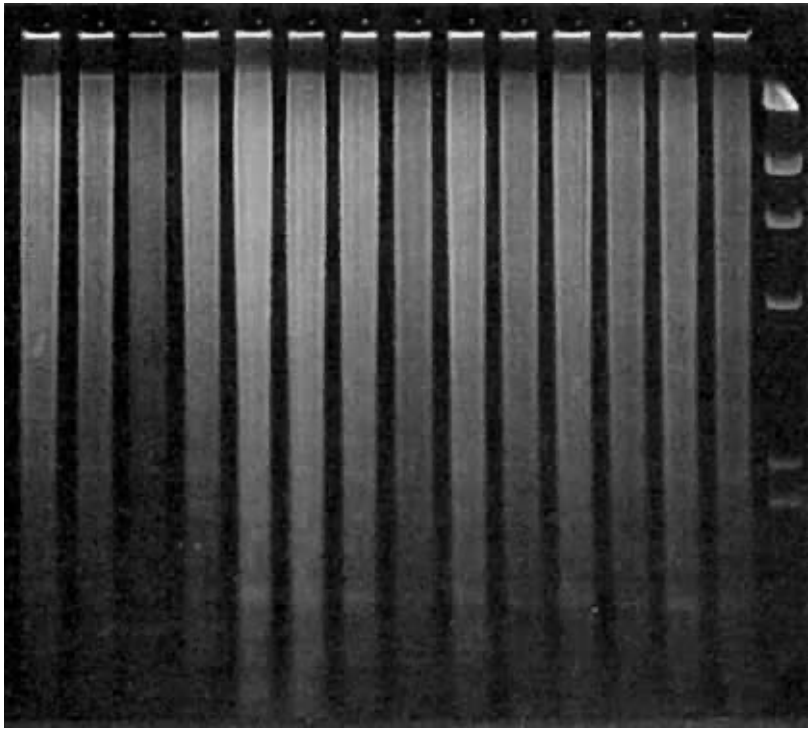
Η υβριδοποίηση του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση μορίων DNA

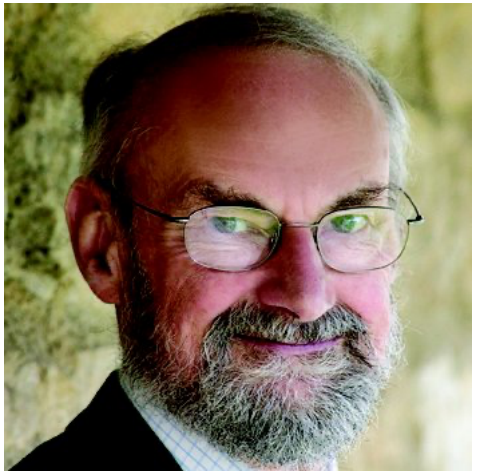
- Υβριδοποίηση
- Ανιχνευτής
  - ΣΗΜΑΝΣΗ



Οι ανιχνευτές υβριδοποίησης μπορούν να ταυτοποιήσουν μόρια DNA και RNA που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση

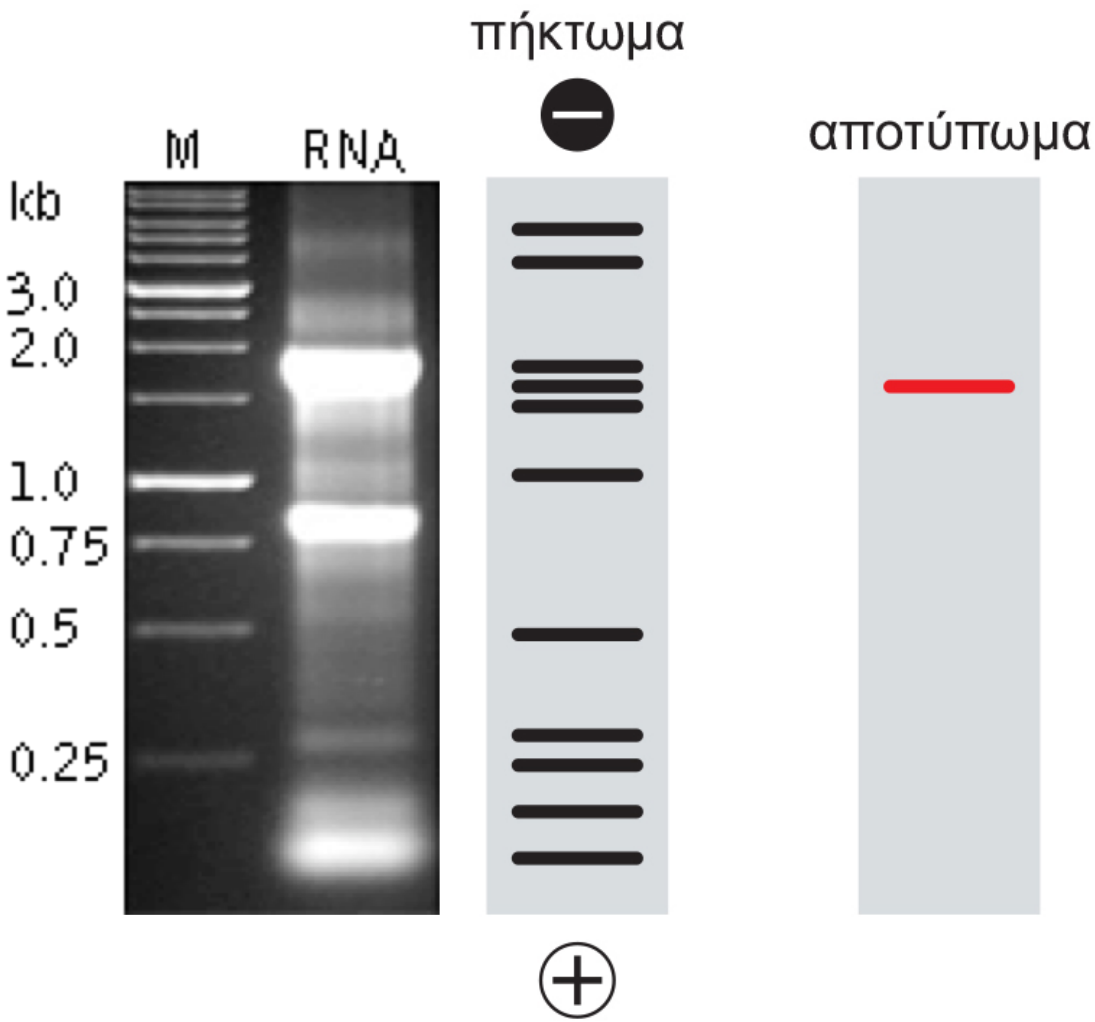
- Υβριδοποίηση στύπωσης κατά Southern

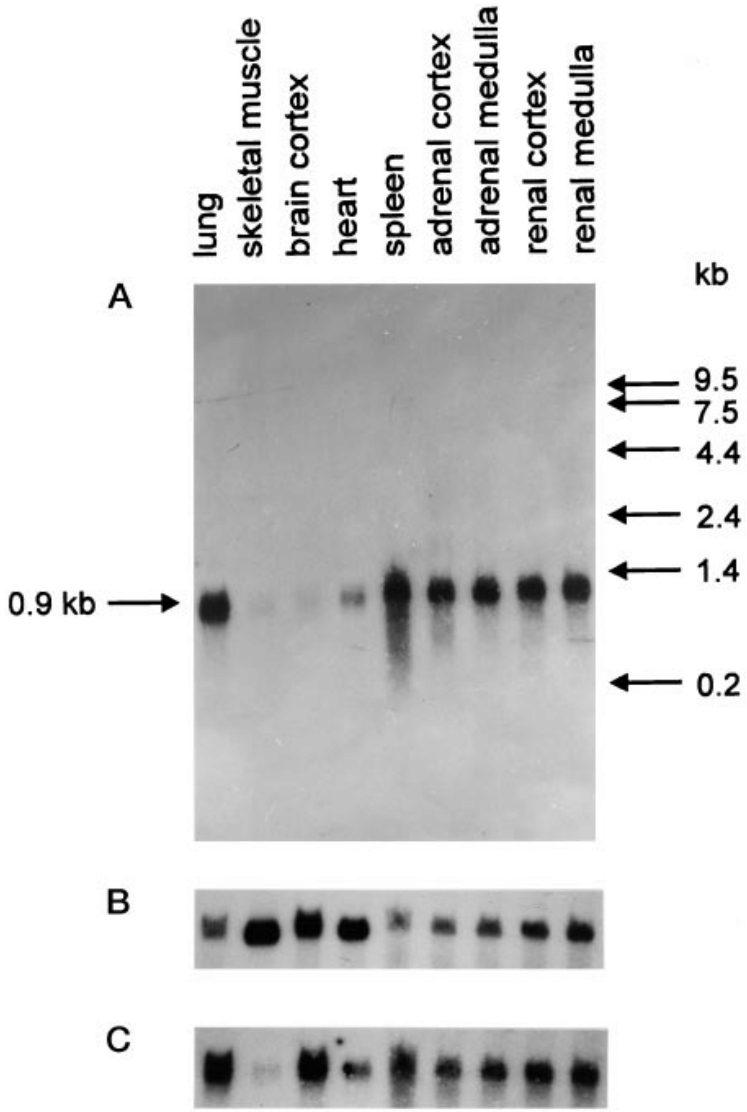




Οι ανιχνευτές υβριδοποίησης μπορούν να ταυτοποιήσουν μόρια DNA και RNA που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση

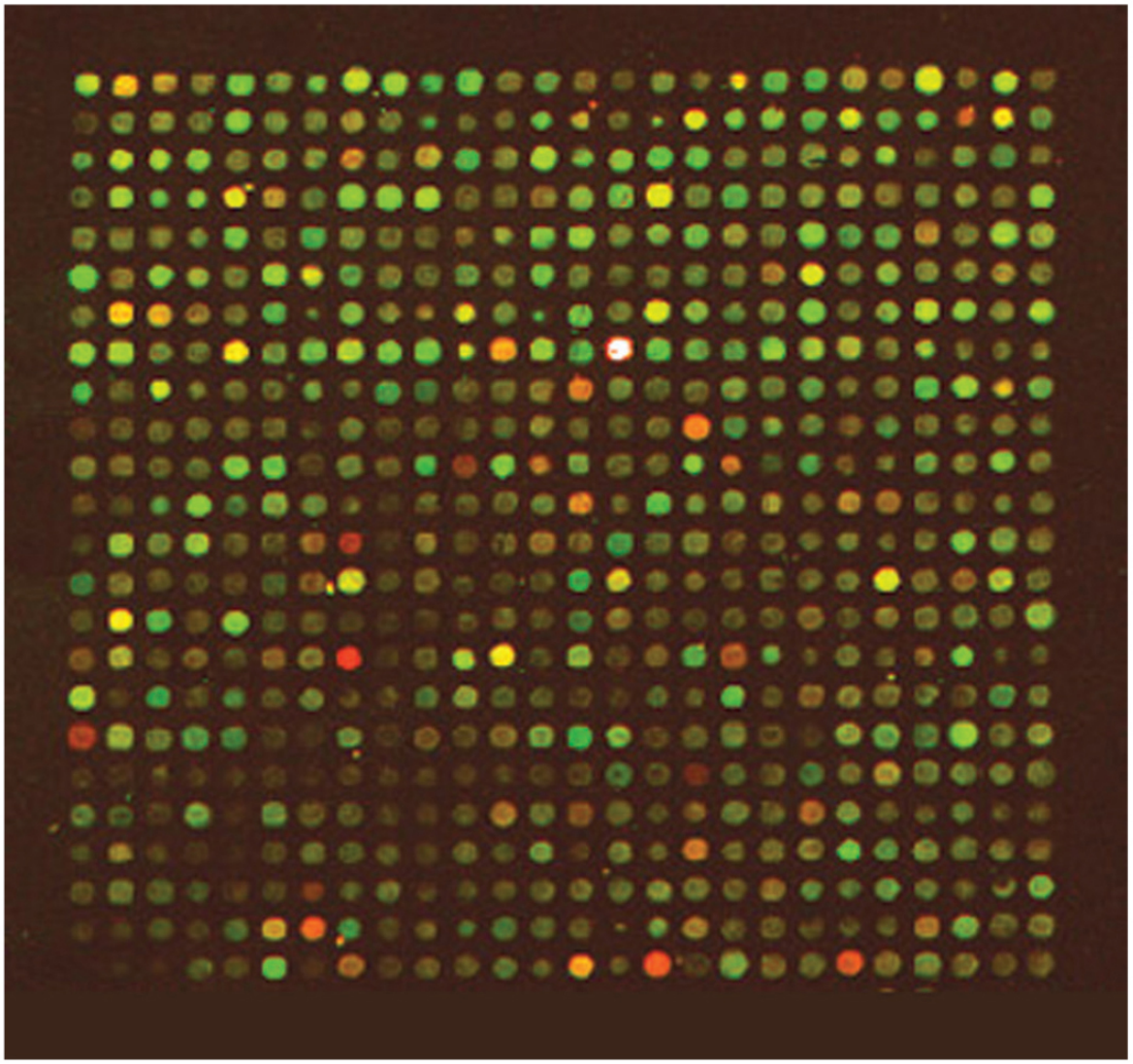
- Υβριδοποίηση στύπωσης Northern





Οι ανιχνευτές υβριδοποίησης μπορούν να ταυτοποιήσουν μόρια DNA και RNA που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση

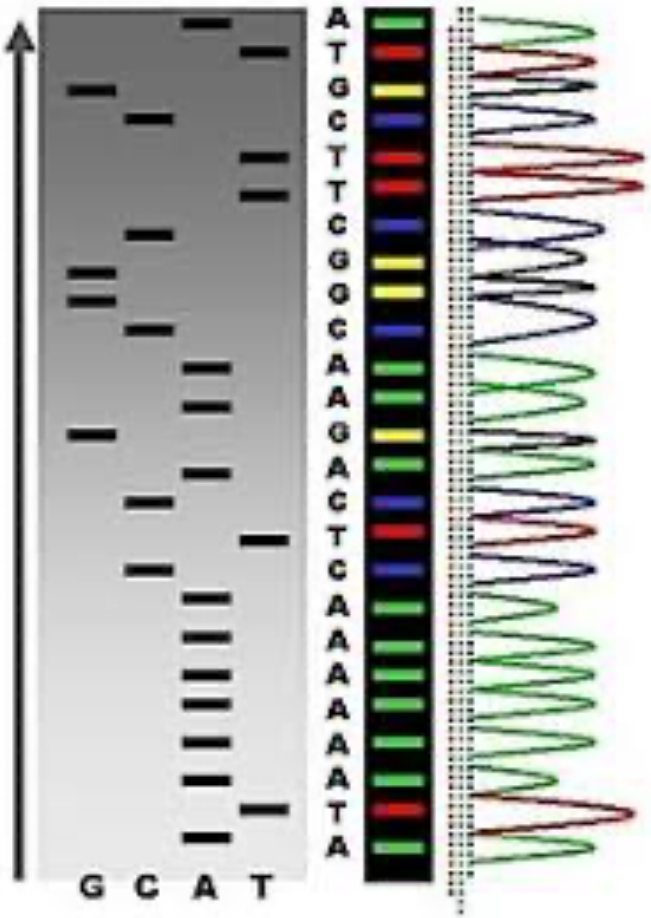
- Πλέγμα μικροσυστοιχιών



Απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων DNA

ΓΙΑ:

- Αλληλούχιση
- Έκφραση
- Χιμαιρικές πρωτεΐνες

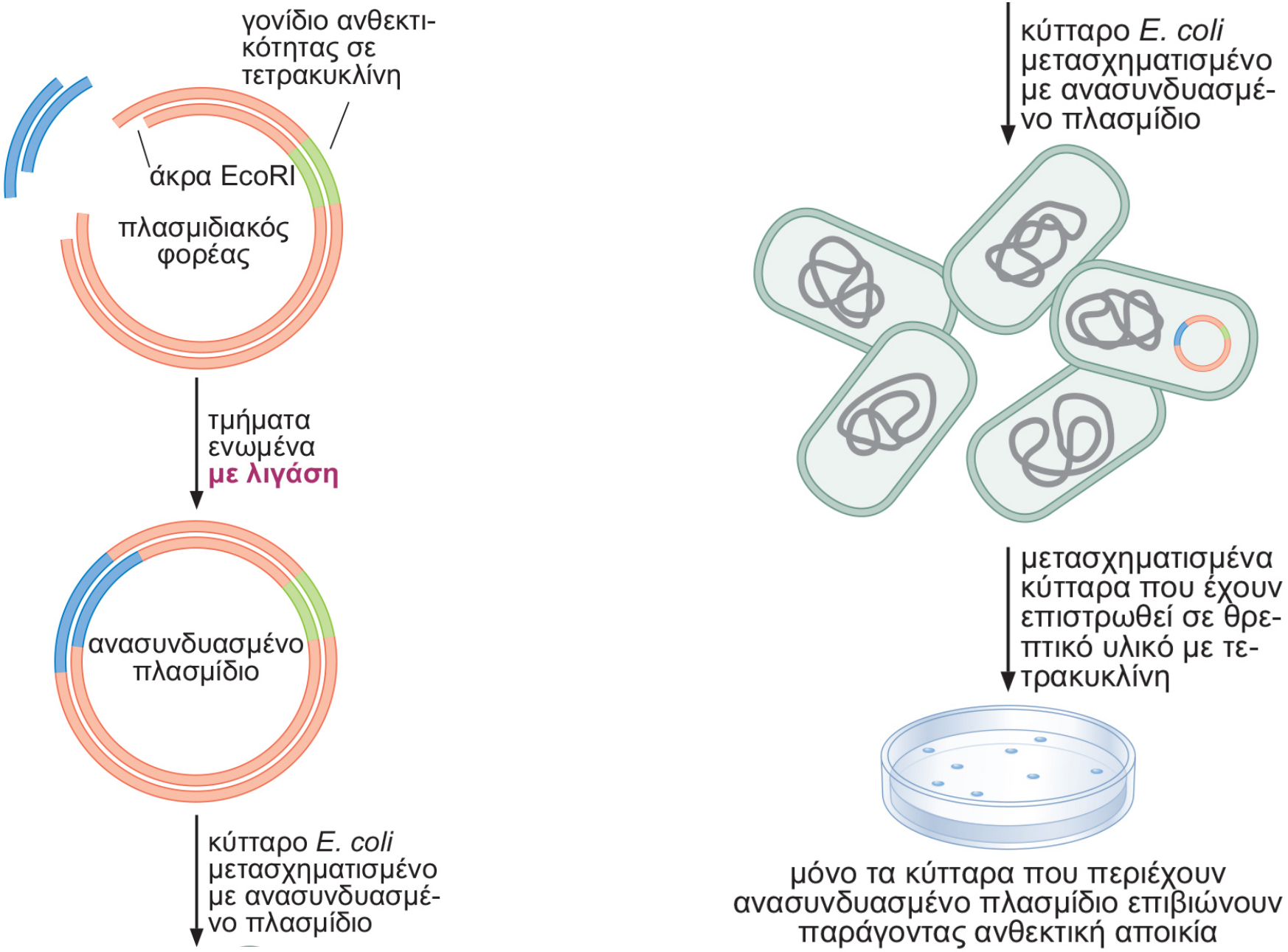


Κλωνοποίηση DNA

- Φορέα (πλασμίδιο, BACs, YACs) – *Φορείς έκφρασης*
  1. Θέση έναρξης αντιγραφής
  2. Δείκτη επιλογής
  3. Πολυσυνδέτη

- Περιοριστικά ένζυμα
- Λιγάσες
- Ξενιστής *E.coli*

Κλωνοποίηση DNA

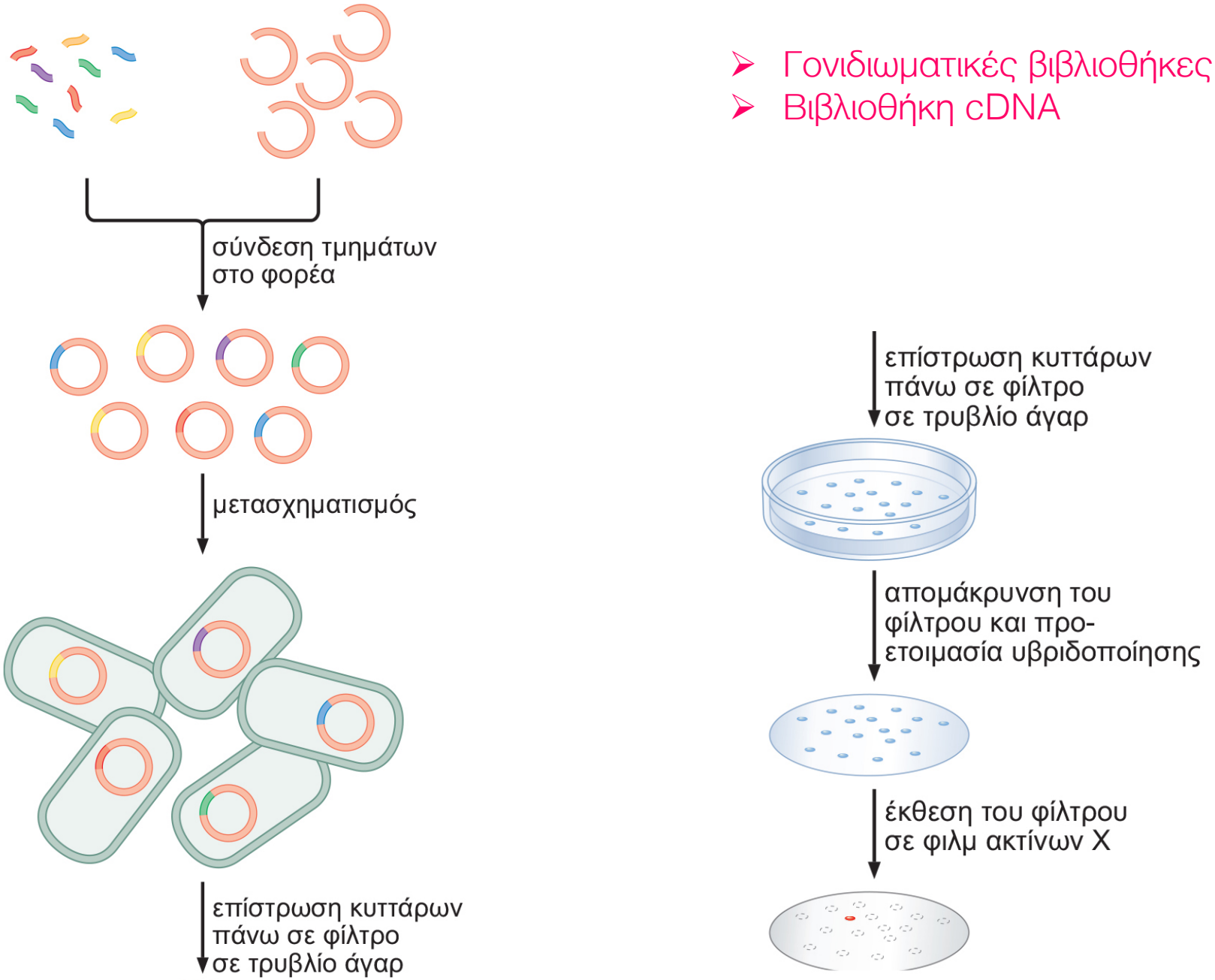


Ο φορέας DNA είναι δυνατόν να εισαχθεί σε οργανισμούς-ξενιστές με μετασχηματισμό

- E.coli + επώαση με Ca^{2+}
- Θρεπτικό + αντιβιοτικό

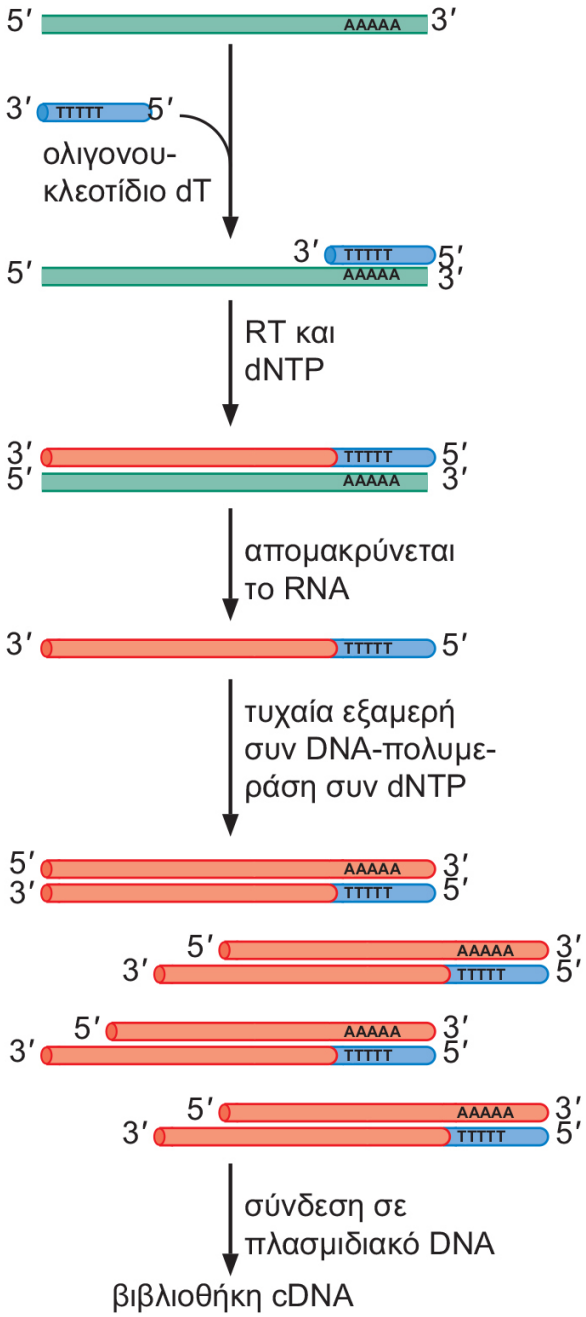
Βιβλιοθήκες DNA μπορούν να δημιουργηθούν με κλωνοποίηση

- Γονιδιωματικές βιβλιοθήκες
- Βιβλιοθήκη cDNA



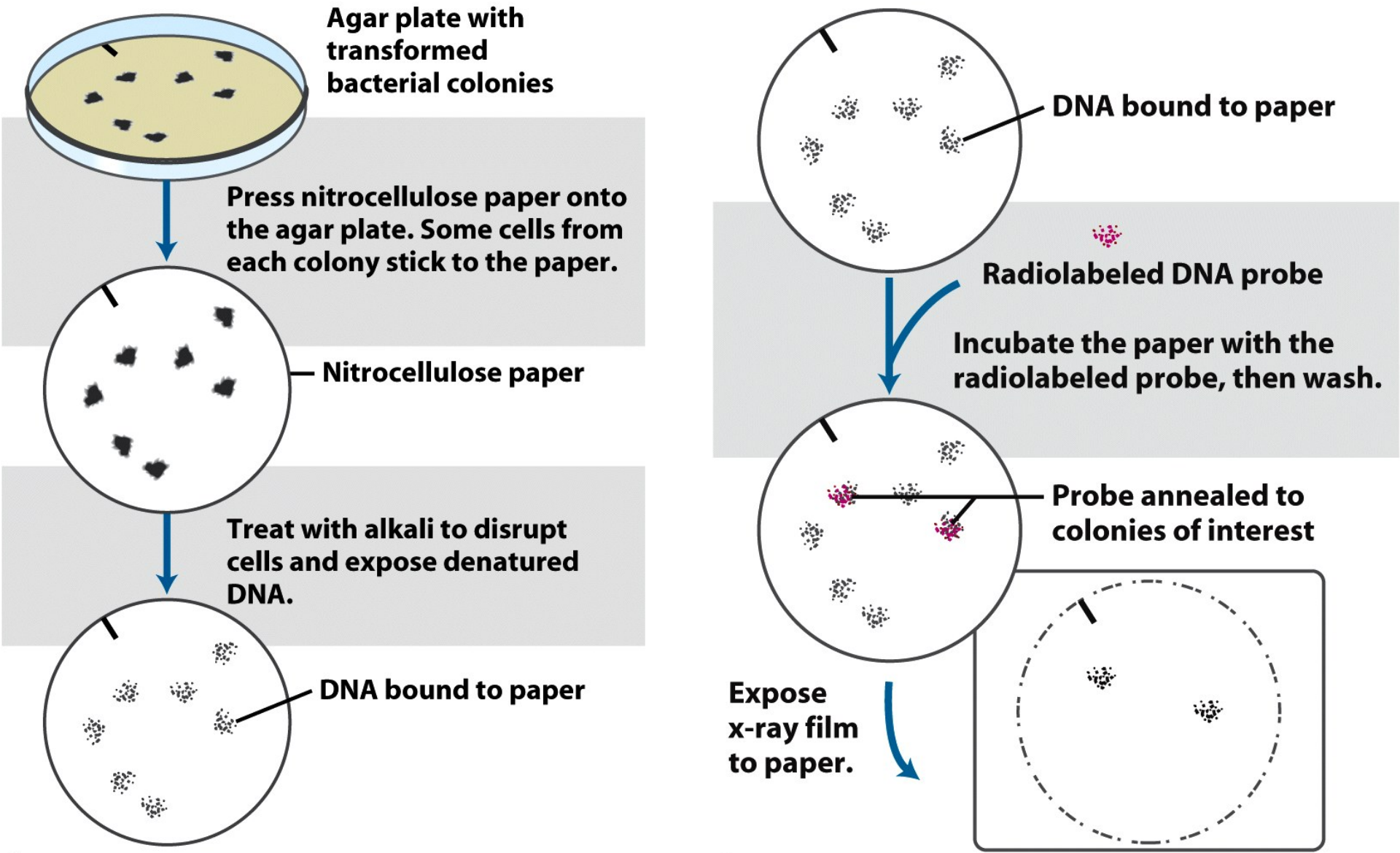
Βιβλιοθήκες DNA μπορούν να δημιουργηθούν με κλωνοποίηση

- Γονιδιωματικές βιβλιοθήκες
- Βιβλιοθήκη cDNA



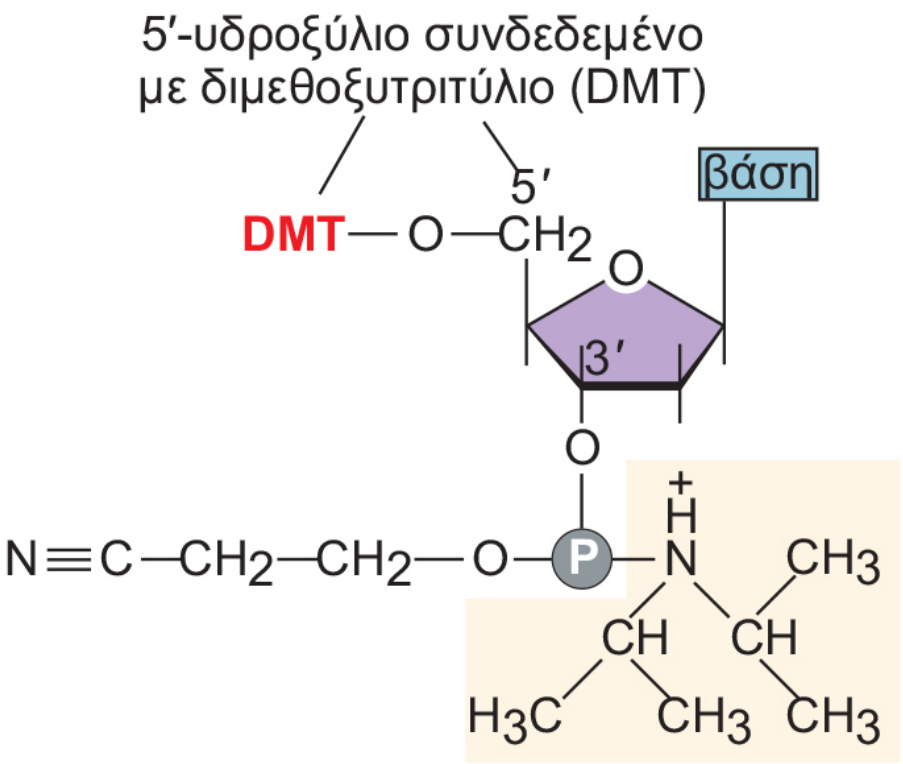
Η υβριδοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ταυτοποιηθεί ένας συγκεκριμένος κλώνος σε μια βιβλιοθήκη DNA

- Υβριδοποίηση αποικιών



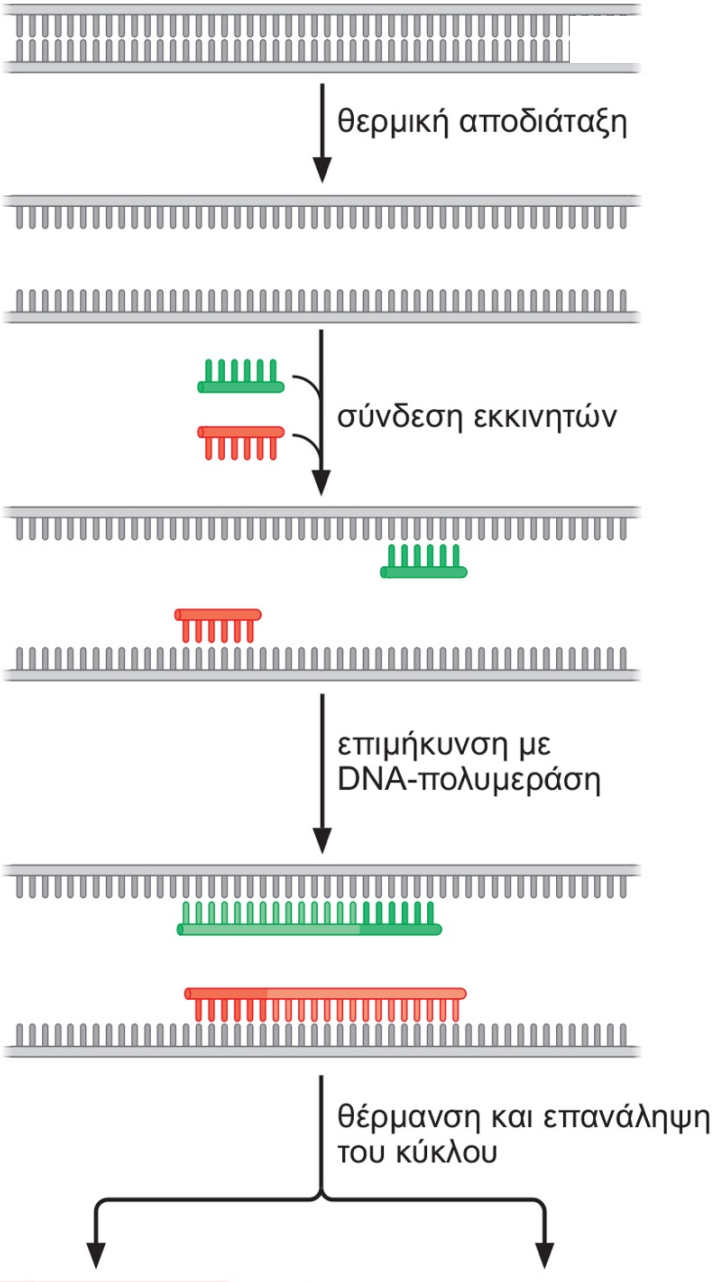
Χημική σύνθεση καθορισμένων αλληλουχιών DNA

- Ολιγονουκλεοτίδια
- Σημειακή μεταλλαξιγένεση

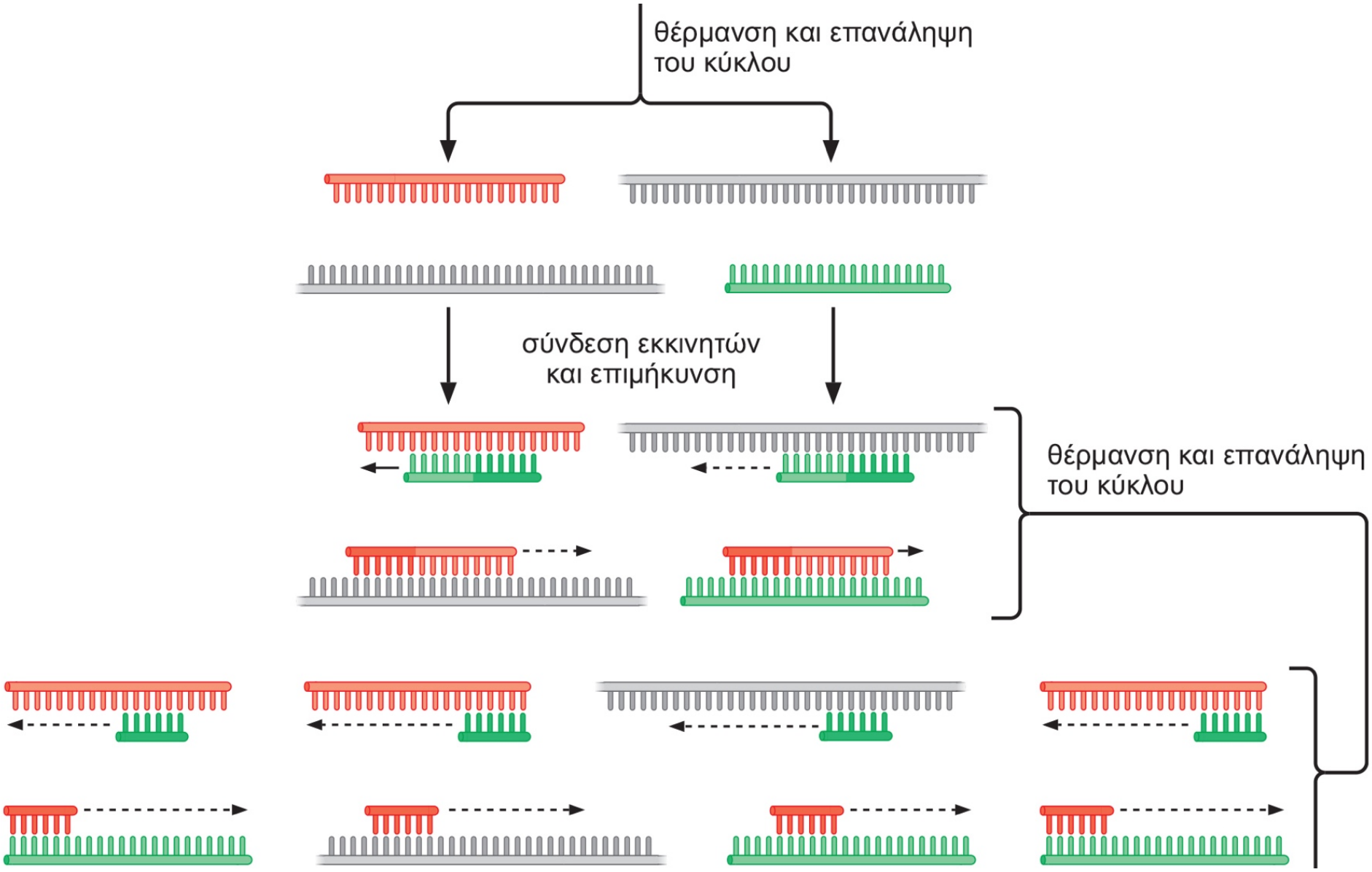


πρωτονιωμένος φωσφοροαμιδίτης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενισχύει DNA μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής DNA *in vitro*

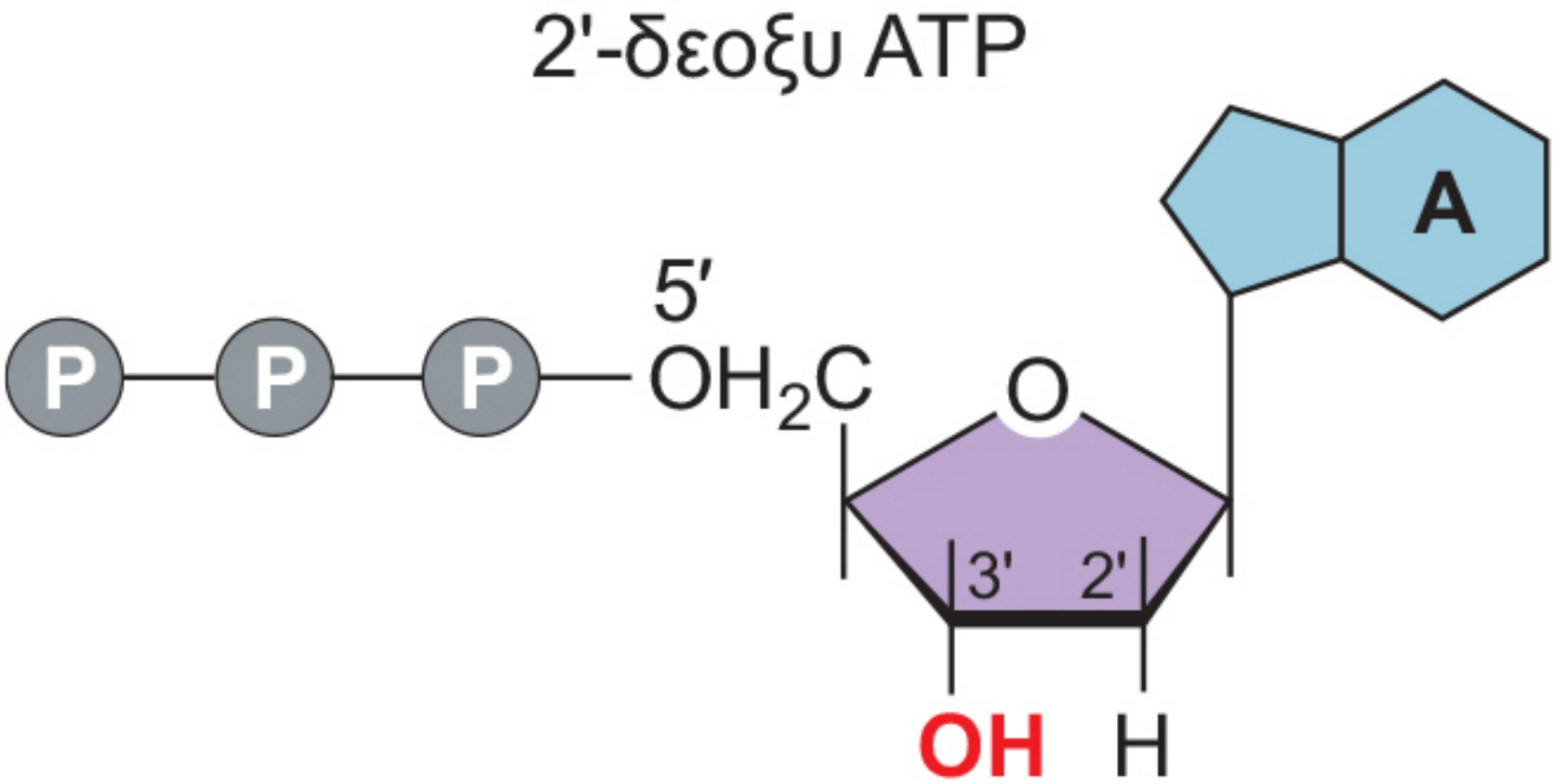


Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενισχύει DNA μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής DNA *in vitro*



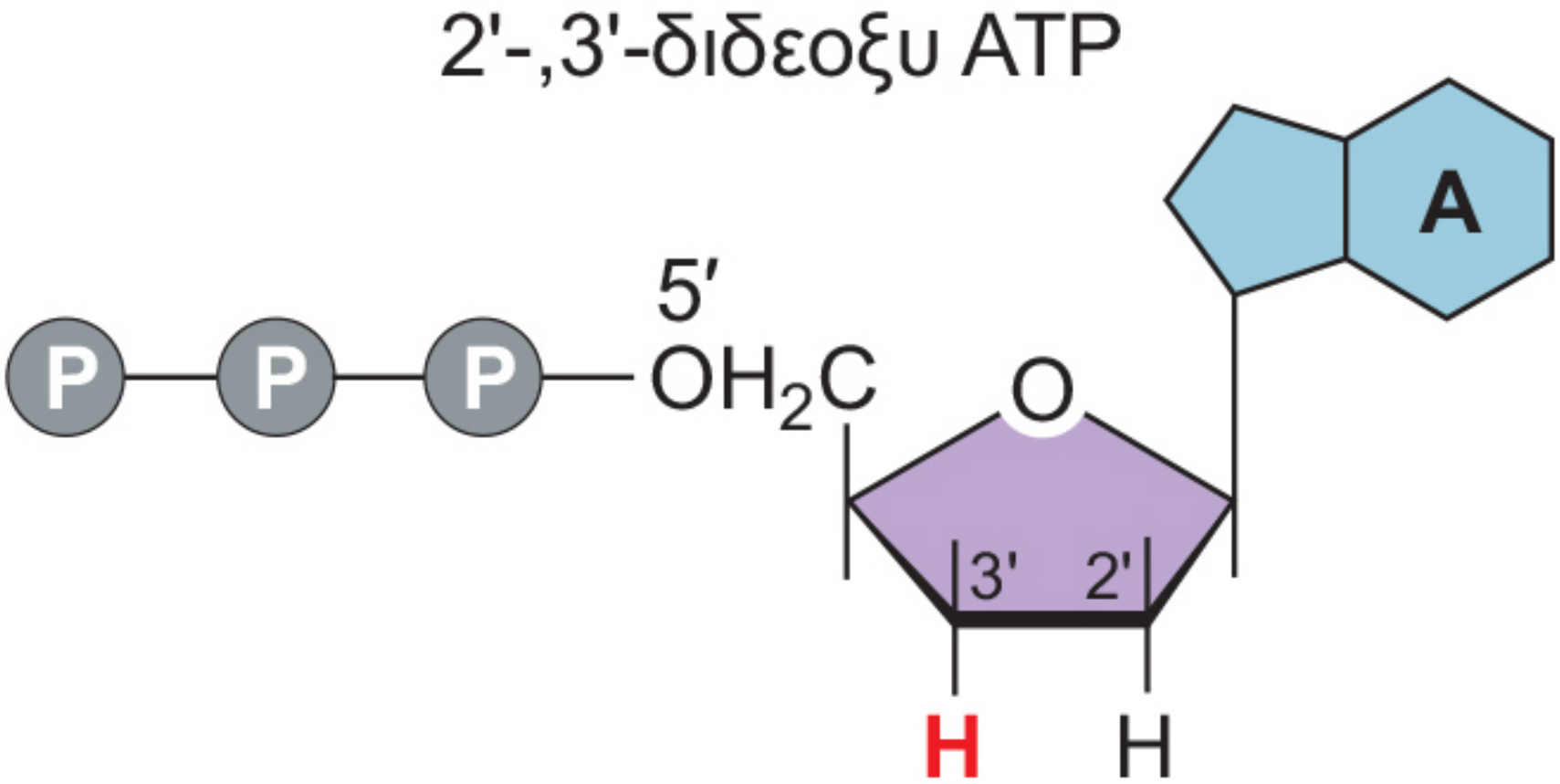
Ένθετες ομάδες τμημάτων DNA αποκαλύπτουν αλληλουχίες νουκλεοτιδίων

- Νουκλεοτίδια τερματισμού αλυσίδας



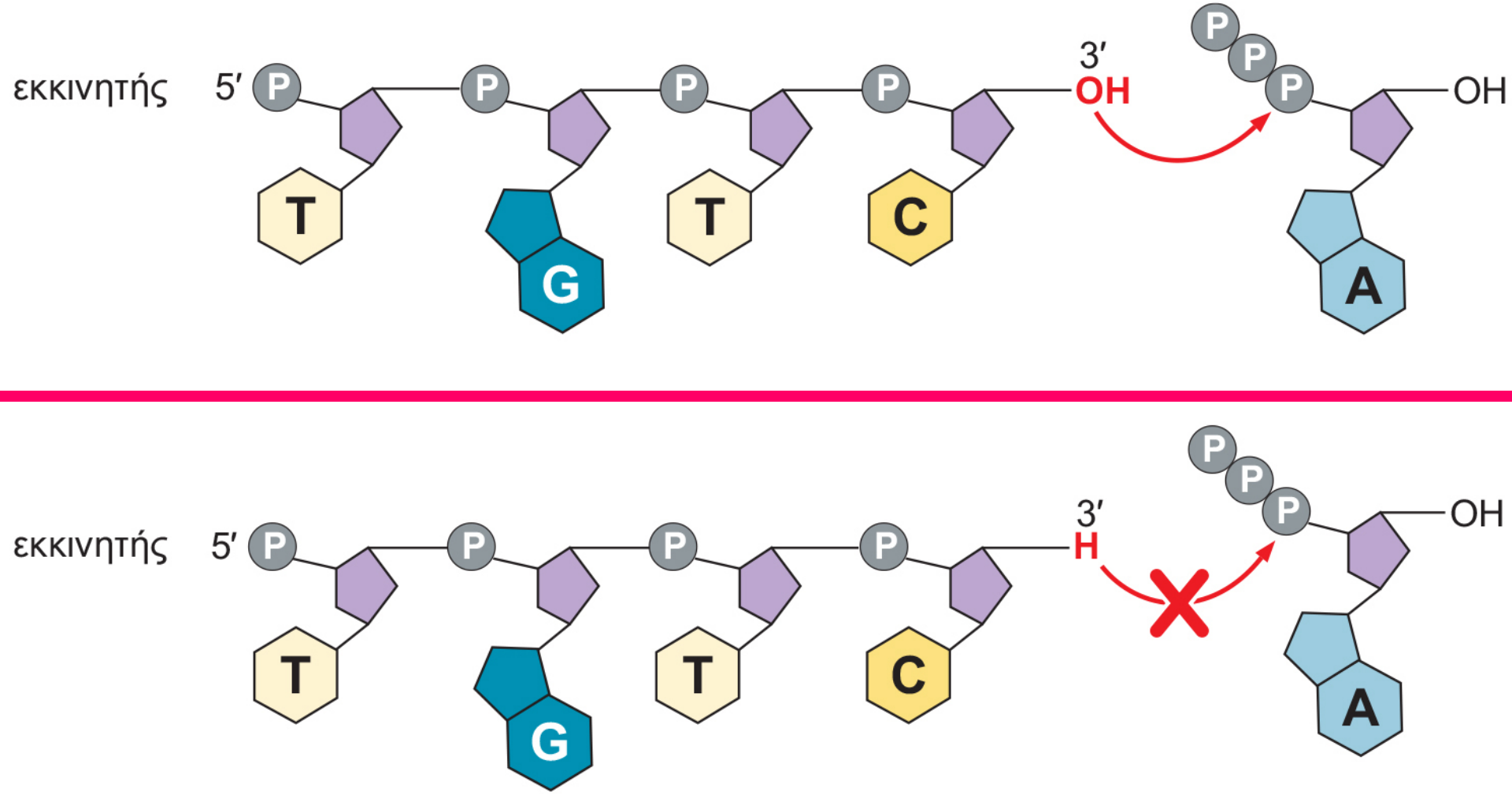
Ένθετες ομάδες τμημάτων DNA αποκαλύπτουν αλληλουχίες νουκλεοτιδίων

- Νουκλεοτίδια τερματισμού αλυσίδας



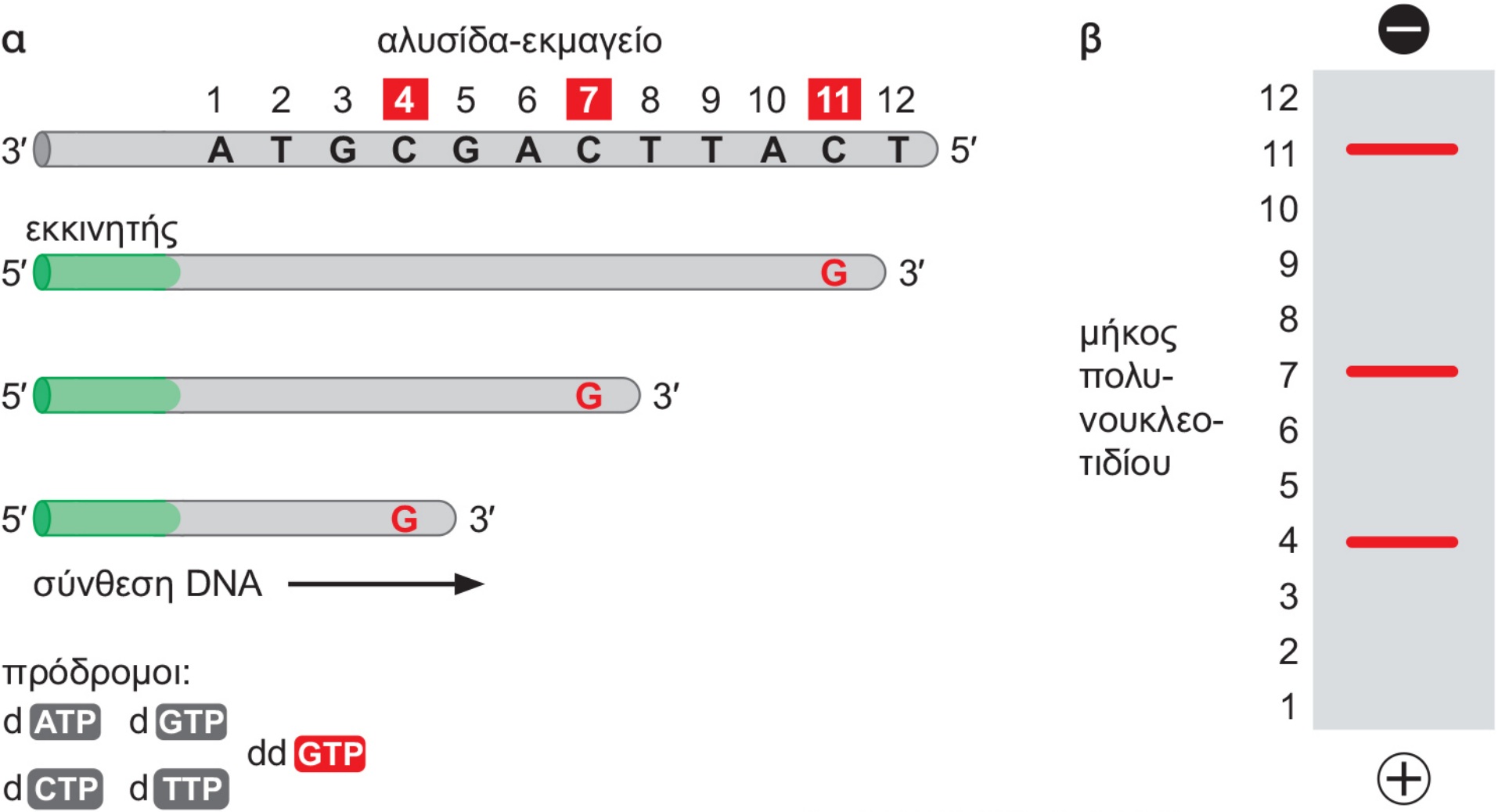
Ένθετες ομάδες τμημάτων DNA αποκαλύπτουν αλληλουχίες νουκλεοτιδίων

- Νουκλεοτίδια τερματισμού αλυσίδας

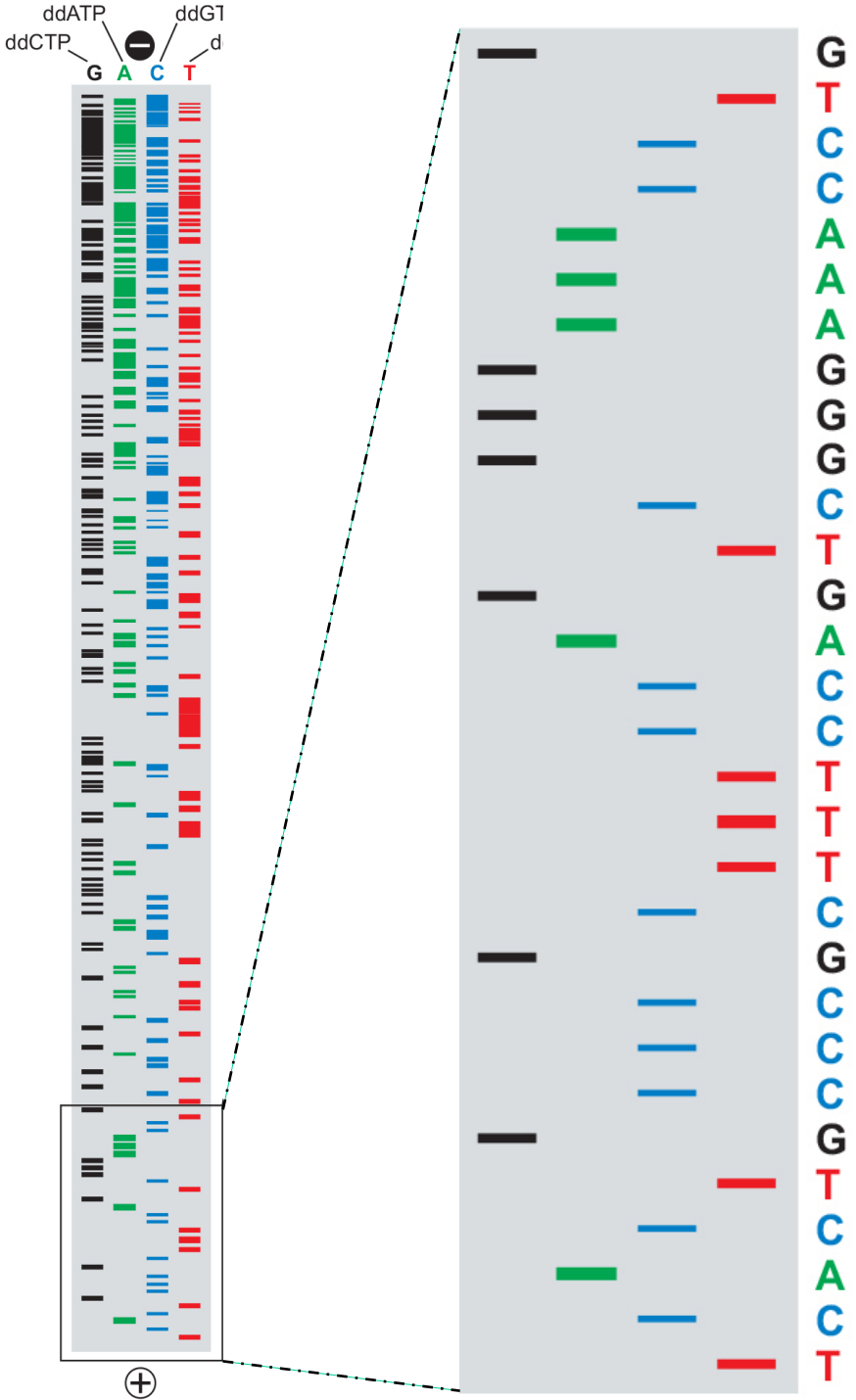


Ένθετες ομάδες τμημάτων DNA αποκαλύπτουν αλληλουχίες νουκλεοτιδίων

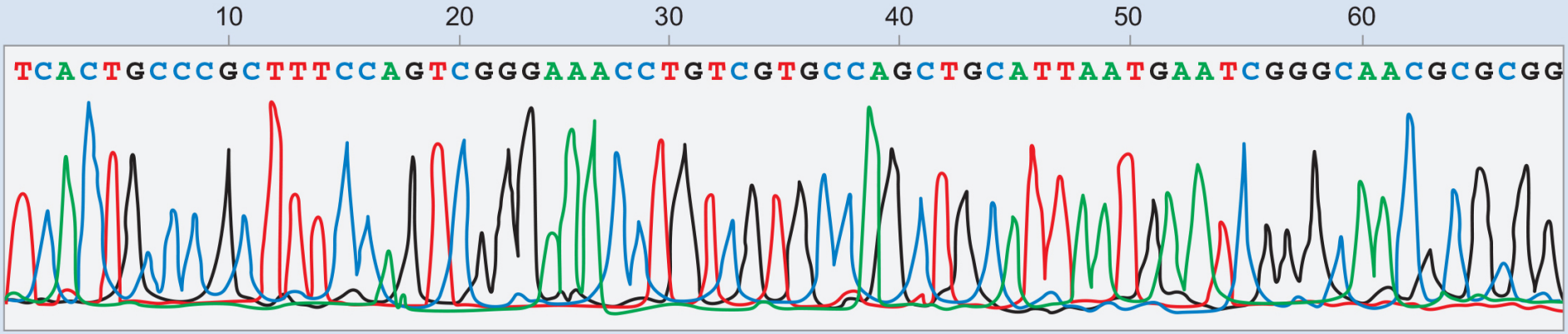
- Νουκλεοτίδια τερματισμού αλυσίδας



Ένθετες ομάδες τμημάτων DNA αποκαλύπτουν αλληλουχίες νουκλεοτιδίων

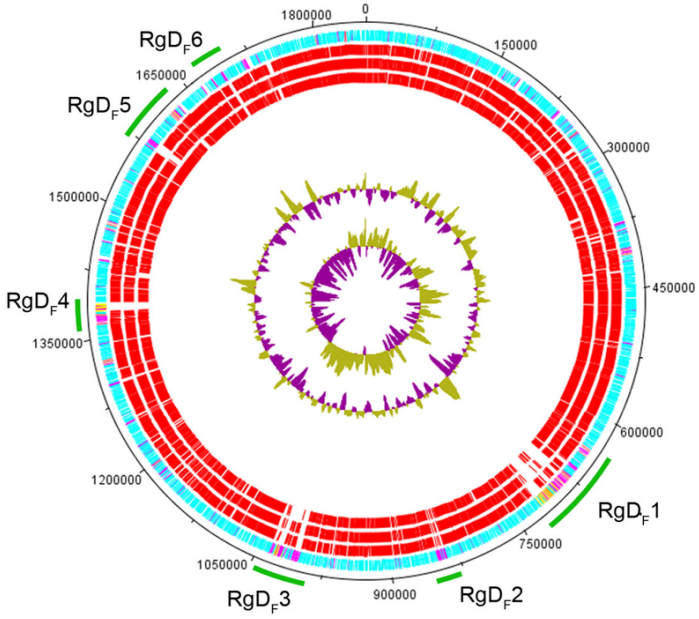


Μηχανές αλληλούχισης

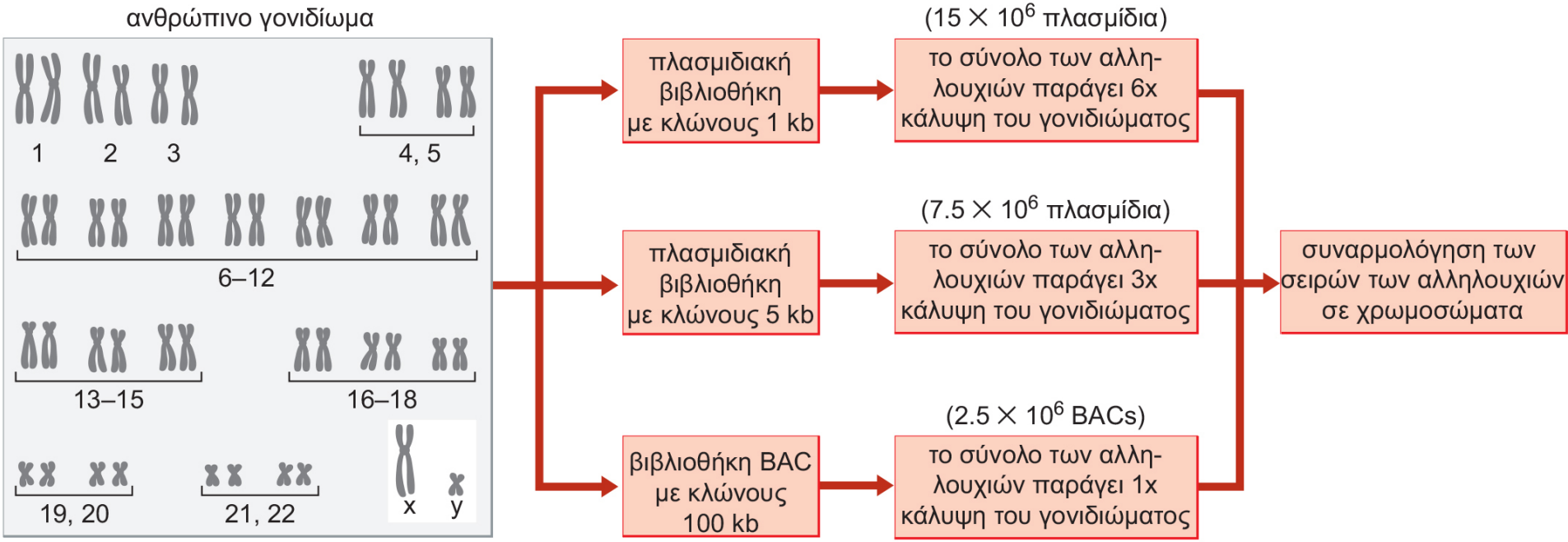


Αλληλούχιση ενός βακτηριακού γονιδιώματος με τυχαία προσπέλαση (shotgun)

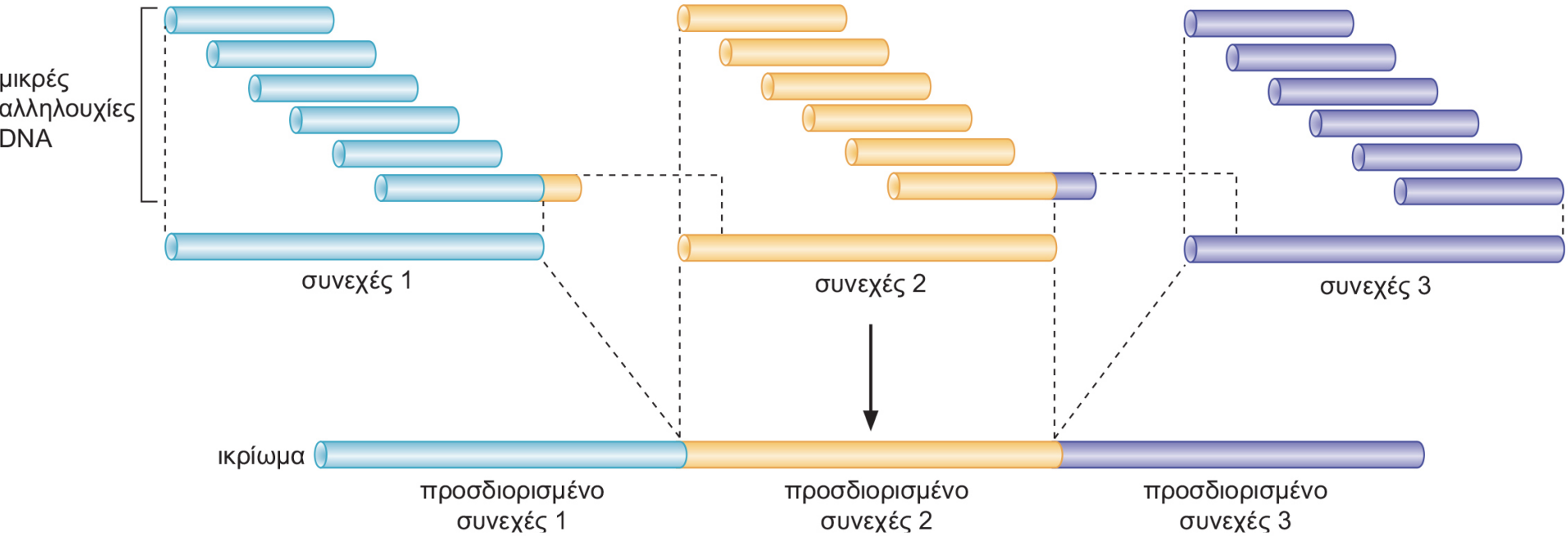
- *Hemophilus influenzae*
- 1.8Mb DNA
- 30-40 x10^3 κλώνοι
- 600bp x 33.000κλώνοι = 20Mb αλληλουχία
- 20Mb αλληλουχίας (10x κάλυψη)



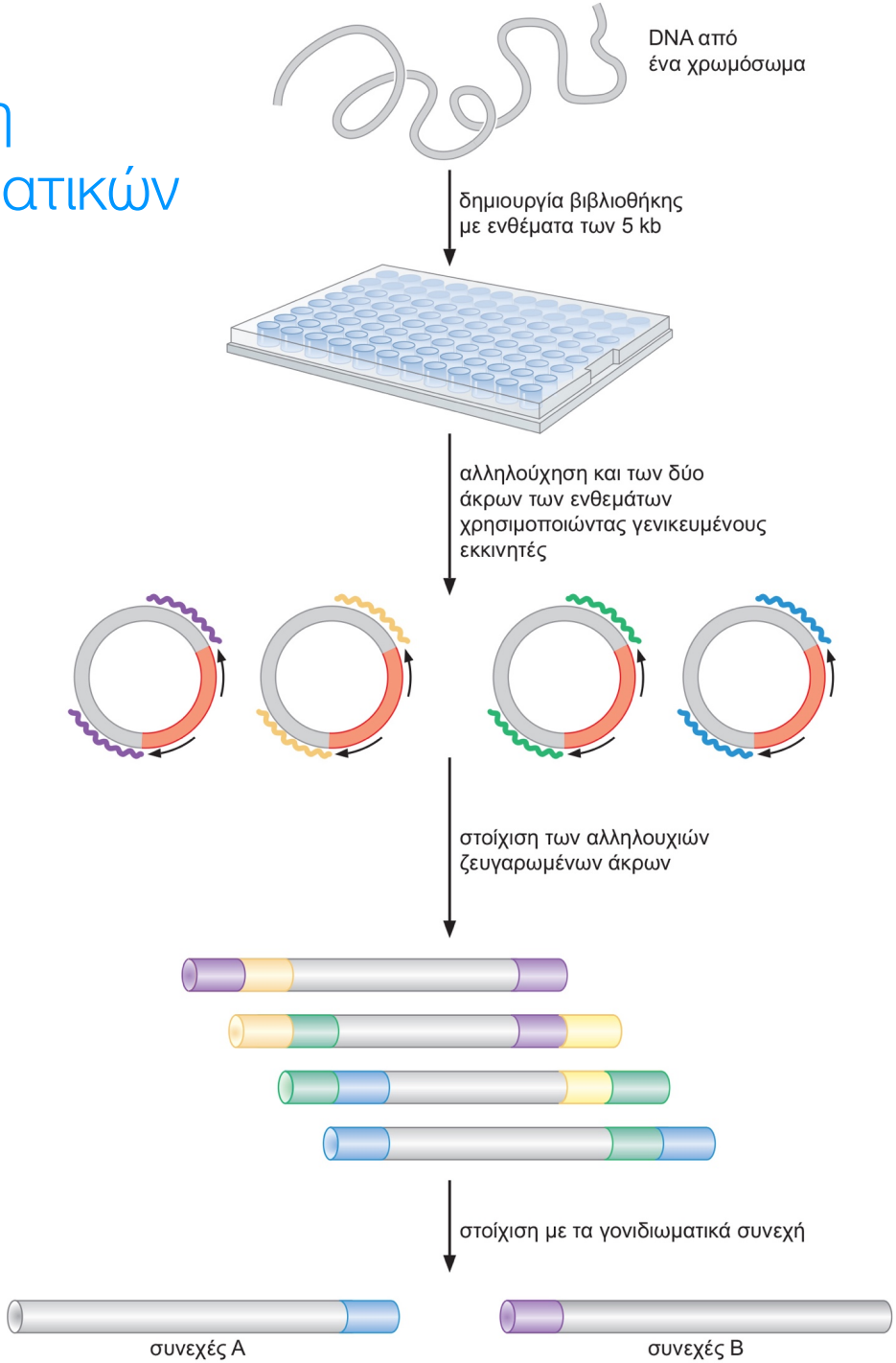
Η στρατηγική της τυχαίας προσπέλασης επιτρέπει μερική συναρμολόγηση μεγάλων αλληλουχιών γονιδιωμάτων



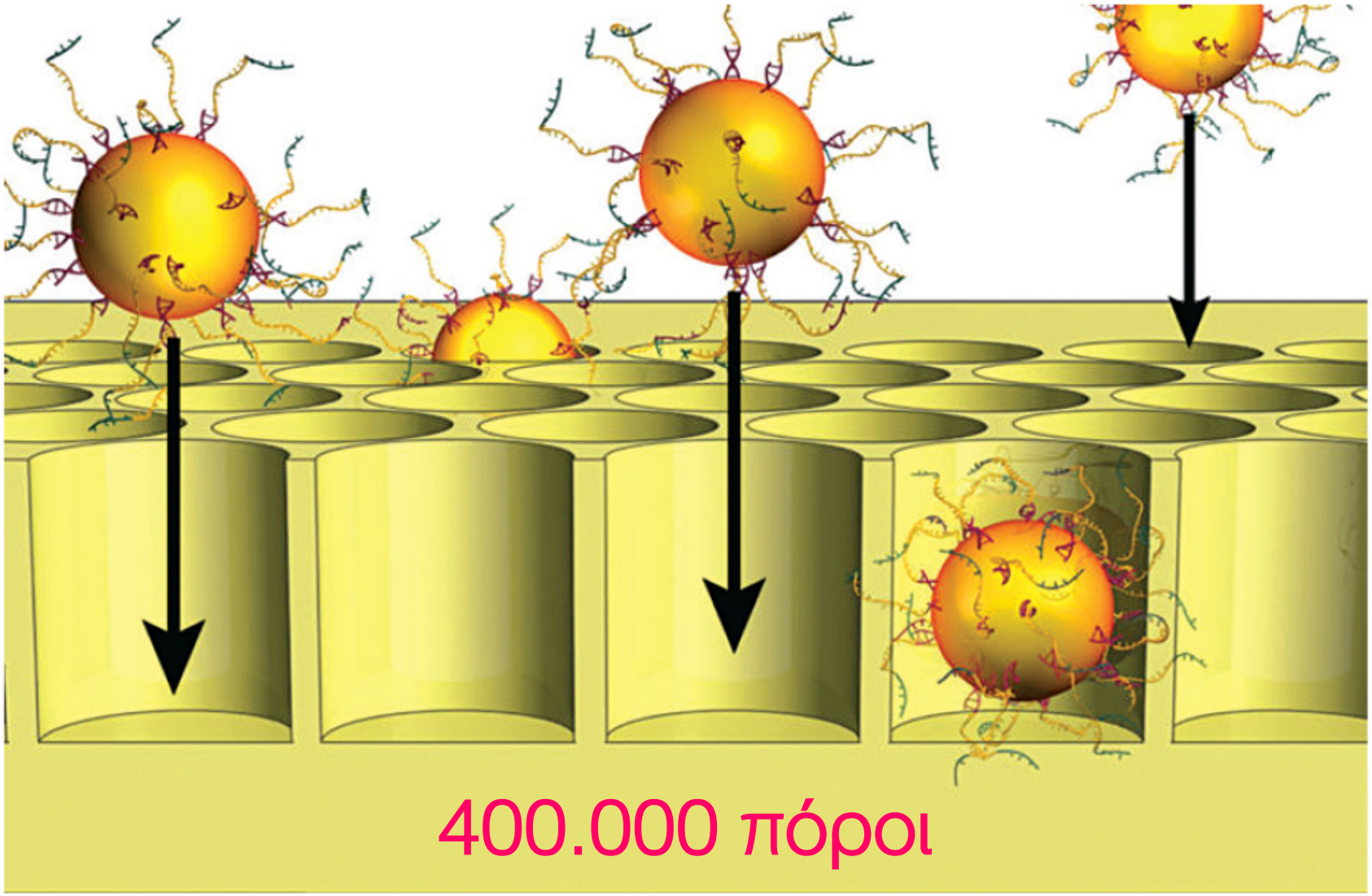
Η στρατηγική της τυχαίας προσπέλασης επιτρέπει μερική συναρμολόγηση μεγάλων αλληλουχιών γονιδιωμάτων



Η στρατηγική της αλληλούχισης ζευγαρωμένων άκρων επιτρέπει τη συναρμολόγηση μεγάλων γονιδιωματικών ικριωμάτων



Το ανθρώπινο γονιδίωμα των 1000 δολαρίων είναι άμεσα προσεγγίσιμος στόχος



ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ

Γονιδιωματική

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/overview/

Overview (39.549)
Eukaryotes (6.578)
Prokaryotes (163.573)
Viruses (19.778)
Plasmids (13.844)
Organelles (12.086)

Overview (47.992)
Eukaryotes (9.408)
Prokaryotes (215.354)
Viruses (33.593)
Plasmids (18.837)
Organelles (14.902)

NIH U.S. National Library of Medicine | NCBI National Center for Biotechnology Information | Log in

Genome > Genome Information by Organism

Organism name (common or scientific) or Accession (Assembly, BioProject or replicon) ... Search

Download Reports from FTP site

Overview (39549); Eukaryotes (6578); Prokaryotes (163573); Viruses (19778); Plasmids (13844); Organelles (12086)

Filters Download

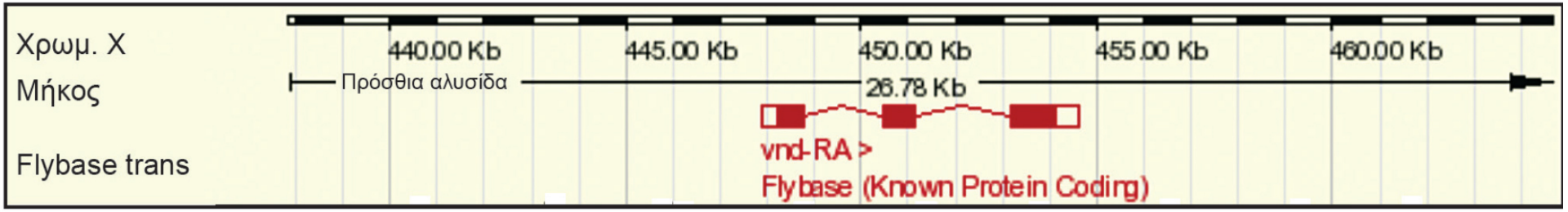
FEEDBACK

Choose Columns | Page 1 of 791 | 50 | View 1 - 50 of 39,549

#	Organism Name	Organism Groups	Size(Mb)	Chromosomes	Organelles	Plasmids	Assemblies
1	'Brassica napus' phytoplasma	Bacteria;Terrabacteria group;Tenericutes	0.743598	-	-	-	1
2	'Candidatus Kapabacteria' thiocyanatum	Bacteria;FCB group;Bacteroidetes/Chlorobi group	3.27299	-	-	-	1
3	'Chrysanthemum coronarium' phytoplasma	Bacteria;Terrabacteria group;Tenericutes	0.739592	-	-	-	1
4	'Echinacea purpurea' witches'-broom phytoplasma	Bacteria;Terrabacteria group;Tenericutes	0.545427	-	-	-	1
5	'Osedax' symbiont bacterium Rs2_46_30_T18	Bacteria;unclassified Bacteria;unclassified Bacteria (miscellaneous)	4.02183	-	-	-	1
6	'Sphingomonas ginsengisoli' Hoang et al. 2012	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria	3.03639	-	-	-	1
7	ANME-1 cluster archaeon	Archaea;Euryarchaeota;Stenosarchaea group	3.18251	-	-	-	3
8	ANME-1 cluster archaeon ex4572_4	Archaea;Euryarchaeota;Stenosarchaea group	1.01808	-	-	-	1
9	ANME-2 cluster archaeon	Archaea;Euryarchaeota;Stenosarchaea group	3.60934	-	-	-	2
10	ANME-2 cluster archaeon HR1	Archaea;Euryarchaeota;Stenosarchaea group	2.19546	-	-	-	1
11	ANMV-1 virus	Viruses;unclassified archaeal viruses;unclassified	0.038465	1	-	-	1
12	Abaca bunchy top virus	Viruses;ssDNA viruses;Nanoviridae	0.006422	6	-	-	1
13	Abalone herpesvirus Victoria/AUS/2009	Viruses;dsDNA viruses, no RNA stage;Malacoherpesviridae	0.211518	1	-	-	1
14	Abalone shriveling syndrome-associated virus	Viruses;dsDNA viruses, no RNA stage;unclassified	0.034952	1	-	-	1
15	Abditibacterium utsteinense	Bacteria;Terrabacteria group;Abditibacteriota	3.60633	-	-	-	1
16	Abelson murine leukemia virus	Viruses;Other;Retroviridae	0.005894	1	-	-	1
17	Abeoforma whisleri	Eukaryota;Protists;Other Protists	101.554	-	-	-	1
18	Abiotrophia	Bacteria;Terrabacteria group;Firmicutes	2.02078	-	-	-	1
19	Abiotrophia defectiva	Bacteria;Terrabacteria group;Firmicutes	2.04344	-	-	-	1
20	Abisko virus	Viruses;Other;Other	0.010187	1	-	-	1
21	Absidia glauca	Eukaryota;Fungi;Other Fungi	48.7464	-	-	-	1
22	Absidia repens	Eukaryota;Fungi;Other Fungi	47.4229	-	-	-	1
23	Absiella	Bacteria;Terrabacteria group;Firmicutes	4.73933	-	-	-	2
24	Absiella dolichum	Bacteria;Terrabacteria group;Firmicutes	2.19105	-	-	-	3
25	Abutilon Brazil virus	Viruses;ssDNA viruses;Geminiviridae	0.005271	2	-	-	1
26	Abutilon golden mosaic virus	Viruses;ssDNA viruses;Geminiviridae	0.002629	1	-	-	1
27	Abutilon mosaic Bolivia virus	Viruses;ssDNA viruses;Geminiviridae	0.005399	2	-	-	1
28	Abutilon mosaic Brazil virus	Viruses;ssDNA viruses;Geminiviridae	0.005282	2	-	-	1

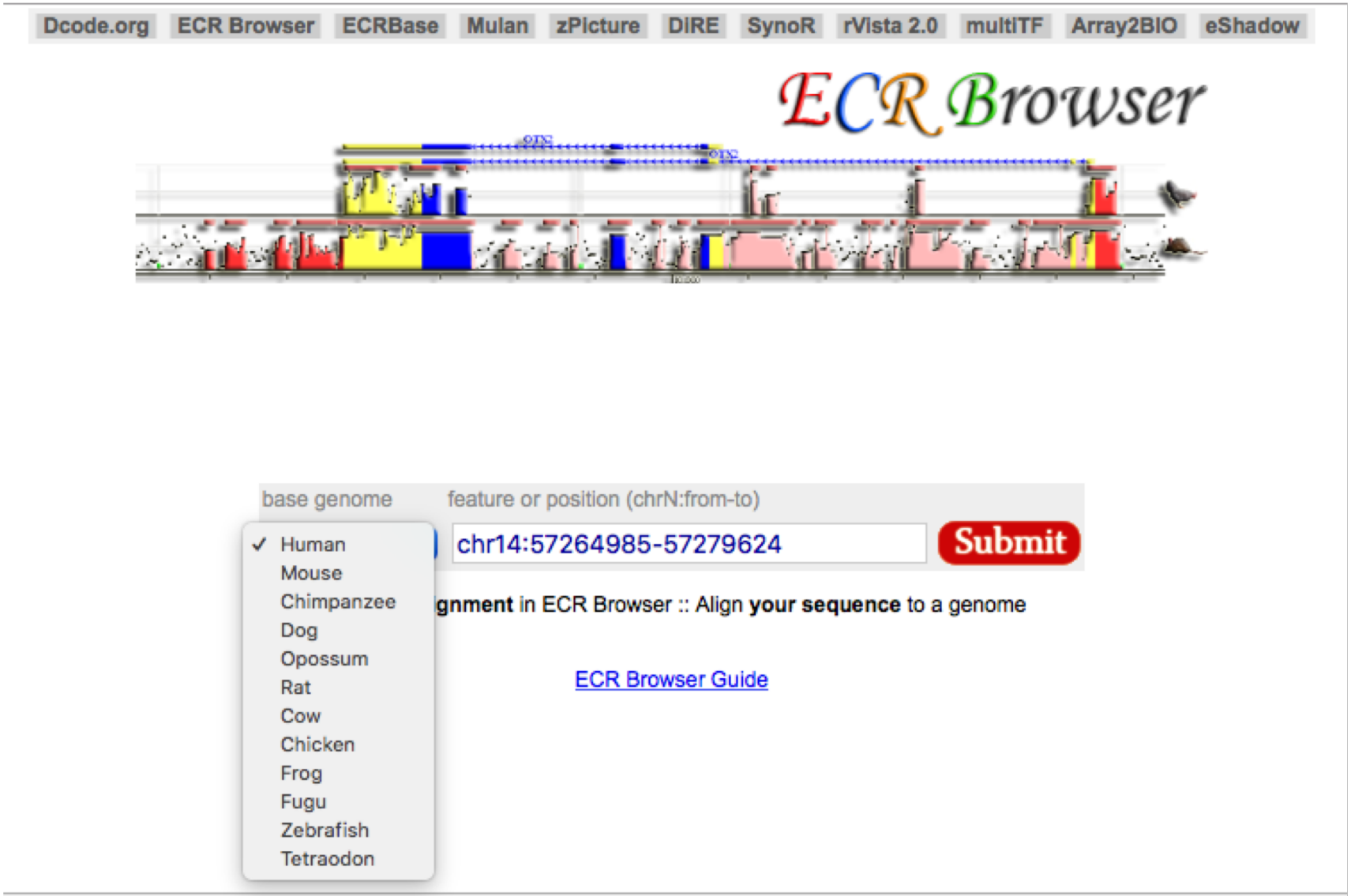
Τα εργαλεία της βιοπληροφορικής διευκολύνουν την ταυτοποίηση των γονιδίων ενός γονιδιώματος που κωδικοποιούν πρωτεΐνες

Flybase



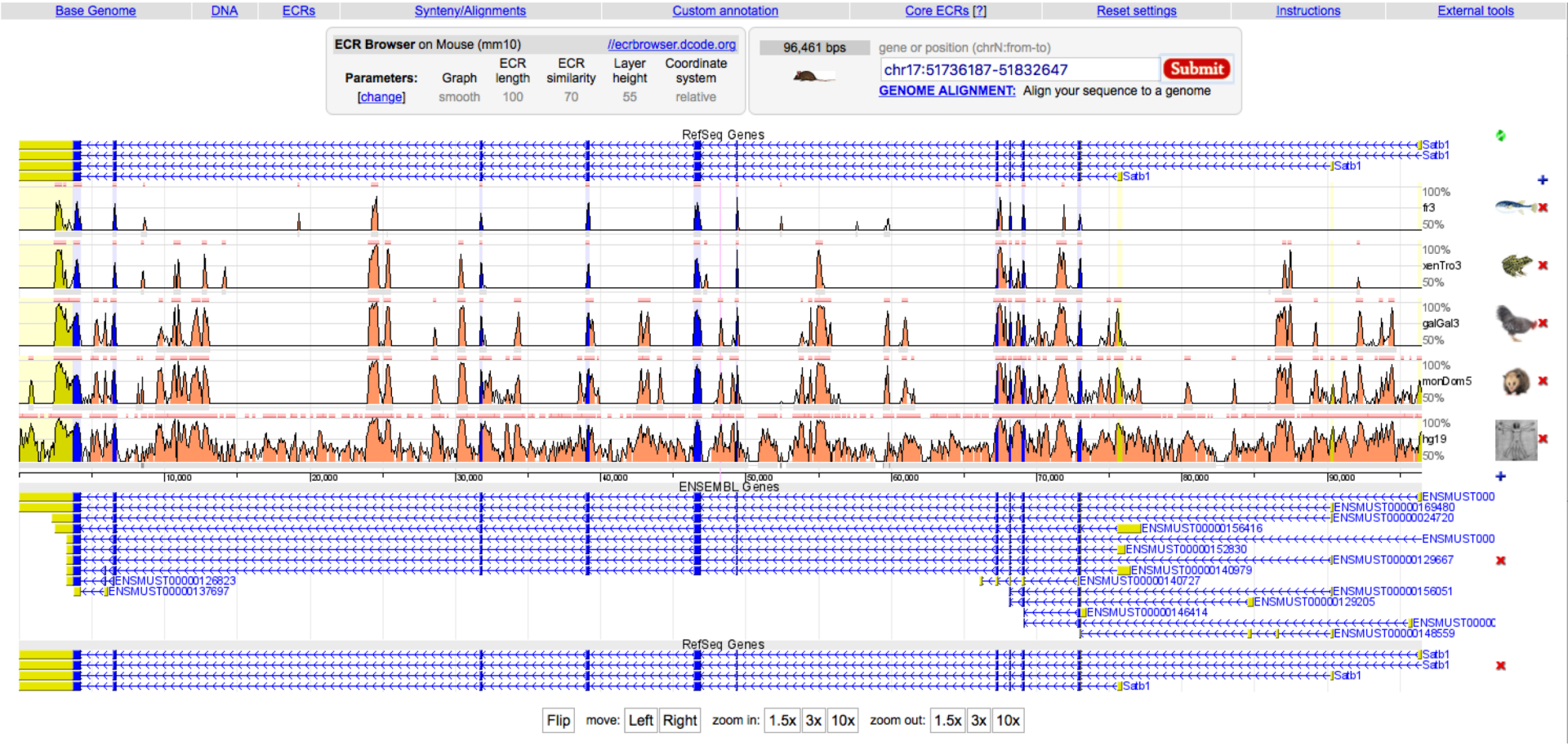
Τα εργαλεία της βιοπληροφορικής διευκολύνουν την ταυτοποίηση των γονιδίων ενός γονιδιώματος που κωδικοποιούν πρωτεΐνες

https://ecrbrowser.dcode.org



Τα εργαλεία της βιοπληροφορικής διευκολύνουν την ταυτοποίηση των γονιδίων ενός γονιδιώματος που κωδικοποιούν πρωτεΐνες

https://ecrbrowser.dcode.org



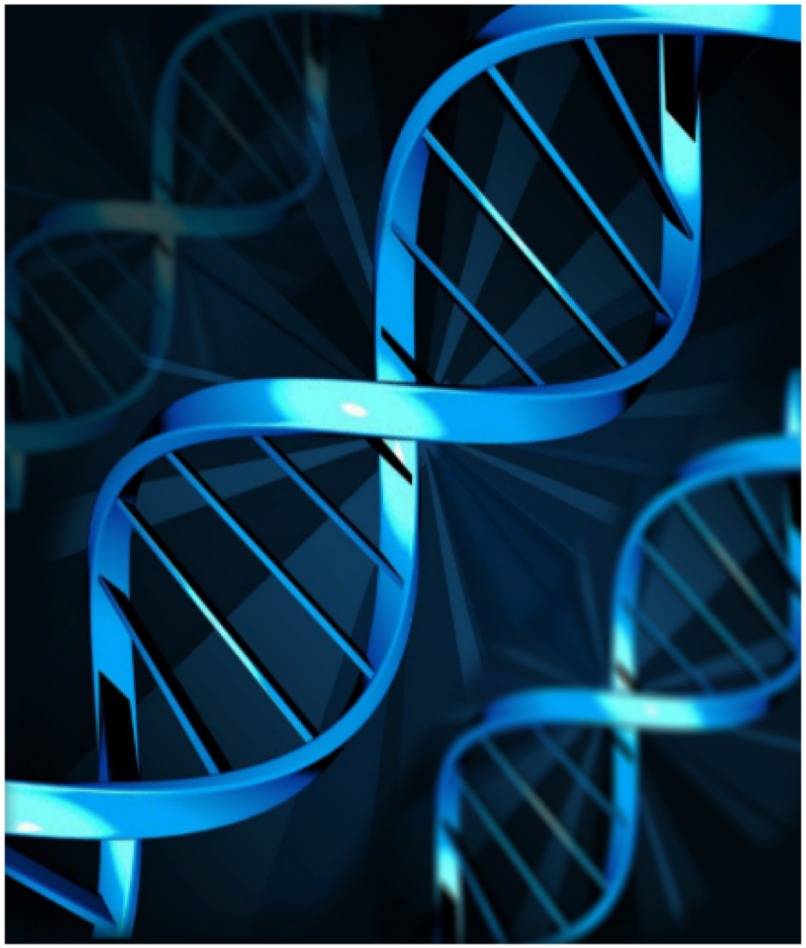
Τα εργαλεία της βιοπληροφορικής διευκολύνουν την ταυτοποίηση των γονιδίων ενός γονιδιώματος που κωδικοποιούν πρωτεΐνες

https://genome.ucsc.edu

UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ Genomics Institute

UCSC **Genome Browser**

Genomes | Genome Browser | Tools | Mirrors | Downloads | My Data | Help | About Us



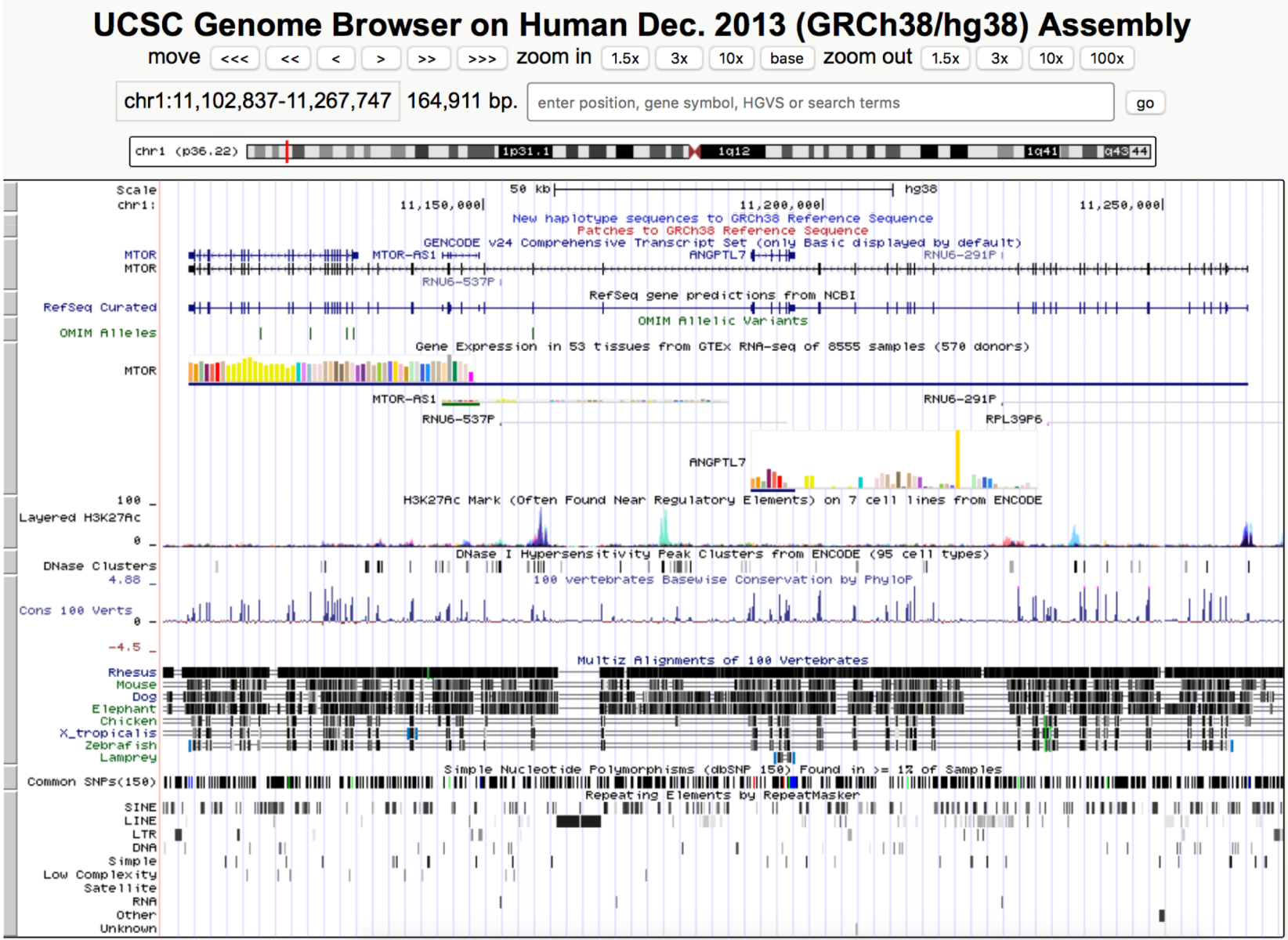
Our tools

- **Genome Browser**
  interactively visualize genomic data
- **BLAT**
  rapidly align sequences to the genome
- **Table Browser**
  download data from the Genome Browser database
- **Variant Annotation Integrator**
  get functional effect predictions for variant calls
- **Data Integrator**
  combine data sources from the Genome Browser database
- **Gene Sorter**
  find genes that are similar by expression and other metrics
- **Genome Browser in a Box (GBiB)**
  run the Genome Browser on your laptop or server
- **In-Silico PCR**
  rapidly align PCR primer pairs to the genome
- **LiftOver**
  convert genome coordinates between assemblies
- **Track Hubs**
  import and view external data tracks

More tools...

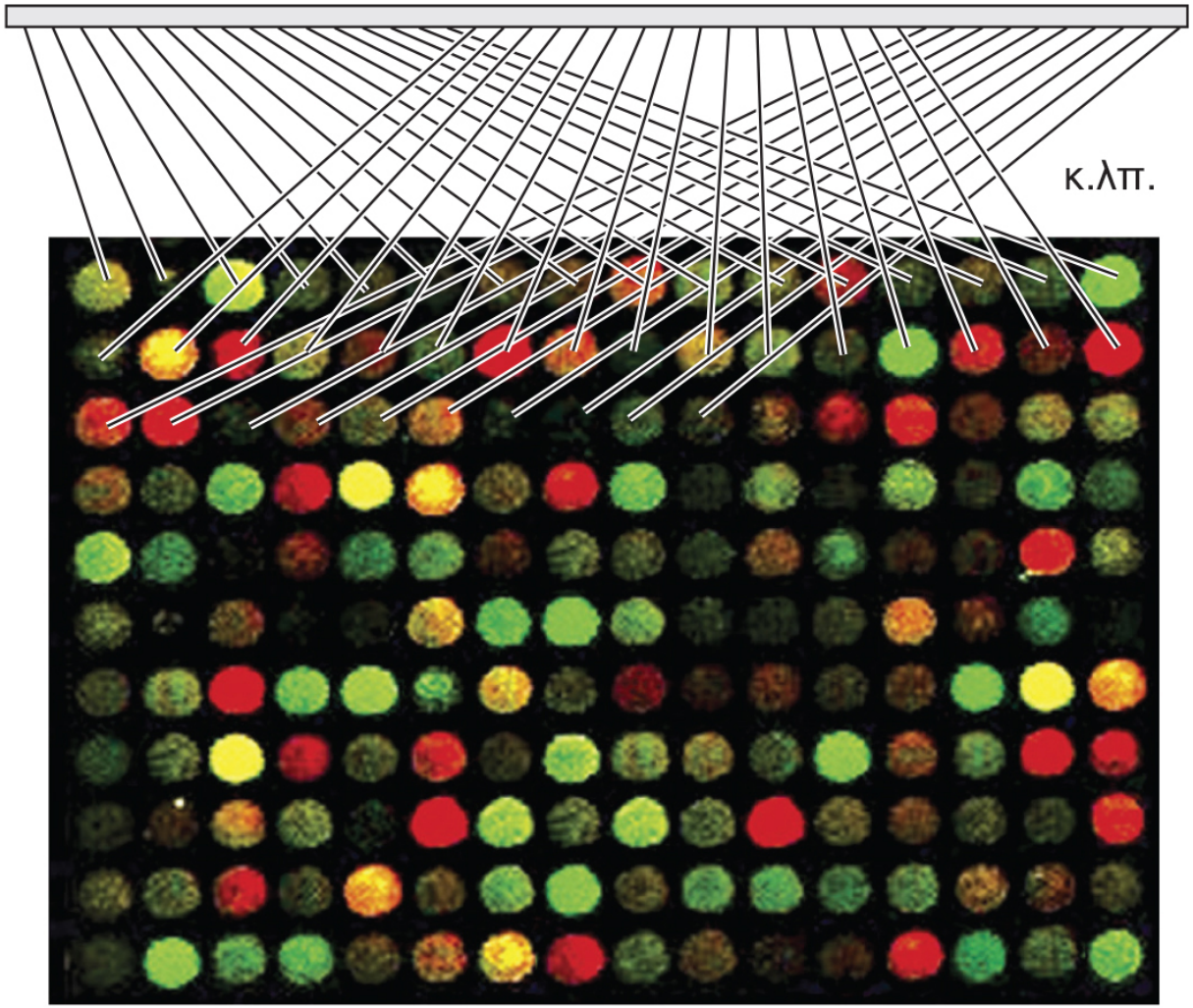
Τα εργαλεία της βιοπληροφορικής διευκολύνουν την ταυτοποίηση των γονιδίων ενός γονιδιώματος που κωδικοποιούν πρωτεΐνες

https://genome.ucsc.edu



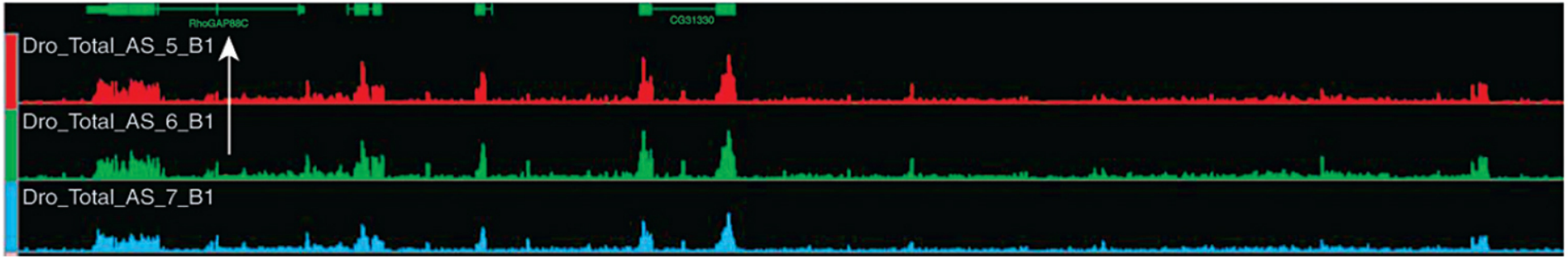
Συστοιχίες που καλύπτουν ολόκληρο το γονιδίωμα χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση του μεταγραφώματος (transcriptome)

Συστοιχία ψηφιδωτής κάλυψης (tilling array)



Συστοιχίες που καλύπτουν ολόκληρο το γονιδίωμα χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση του μεταγραφώματος (transcriptome)

Συστοιχία ψηφιδωτής κάλυψης (tilling array)



Μη κωδικά RNA (miRNA, antisense RNA)
5’-UTR, 3’-UTR

Ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη χρήση ειδικών εργαλείων στοίχισης αλληλουχιών

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

NIH U.S. National Library of Medicine | NCBI National Center for Biotechnology Information | Sign in to NCBI

BLAST®

Home | Recent Results | Saved Strategies | Help

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. Learn more

NEWS

Learn how to use BLAST

See our collection of webinars and tutorials designed to help you.
Wed, 17 Oct 2018 15:00:00 EST

More BLAST news...

Web BLAST

Nucleotide BLAST
nucleotide ▶ nucleotide

blastx
translated nucleotide ▶ protein

tblastn
protein ▶ translated nucleotide

Protein BLAST
protein ▶ protein

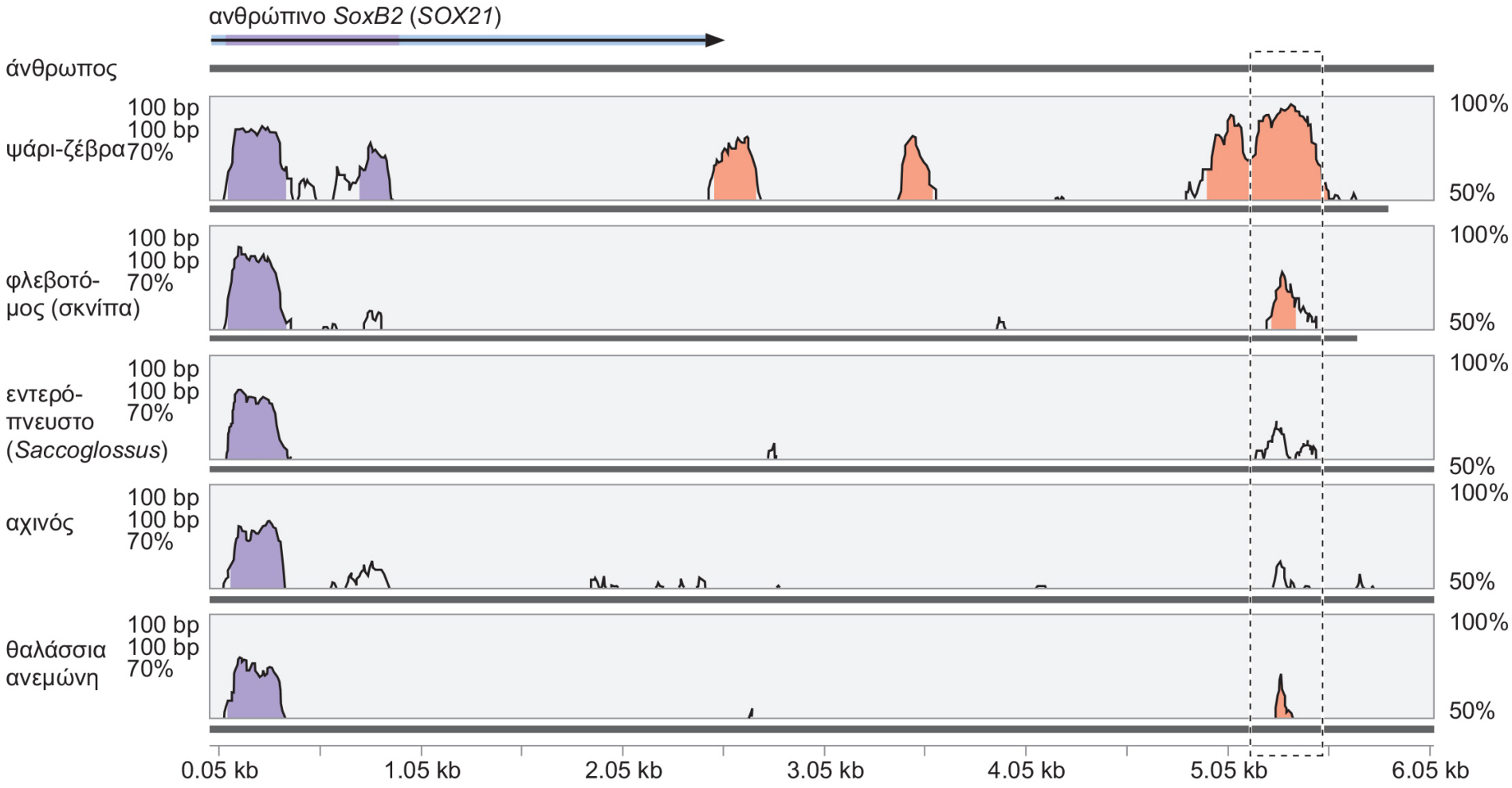
BLAST Genomes

Enter organism common name, scientific name, or tax id | Search

Human | Mouse | Rat | Microbes

Ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη χρήση ειδικών εργαλείων στοίχισης αλληλουχιών

VISTA



Ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη χρήση ειδικών εργαλείων στοίχισης αλληλουχιών

Εύρεση ρυθμιστικών στοιχείων

Η γονιδιωματική στοιχειοθεσία (genome editing) χρησιμεύει για επακριβείς τροποποιήσεις σύνθετων γονιδιωμάτων

- Knockouts
- TALENS
- CRISPR-Cas9

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Συγκεκριμένες πρωτεΐνες μπορούν να καθαριστούν από εκχυλίσματα κυττάρων

- Μέγεθος
- Φορτίο
- Σχήμα
- Λειτουργία

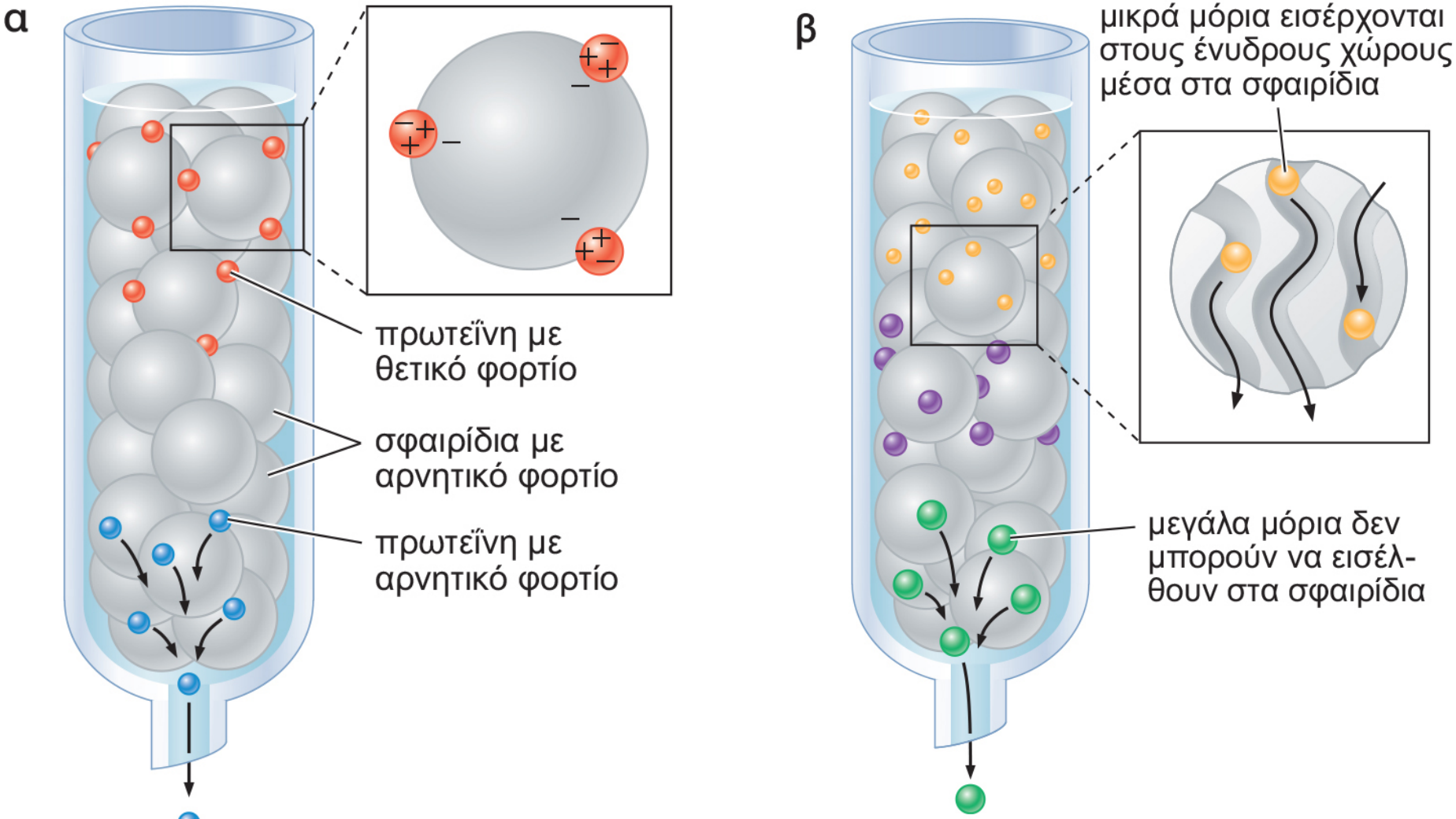
Ο καθαρισμός μιας πρωτεΐνης απαιτεί μια ειδική πειραματική διαδικασία

- Πρόσδεση DNA
- EMSA
- Πολυμερισμός με ραδιενεργά νουκλεοτίδια

Παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων που περιέχουν ενεργές πρωτεΐνες

- $4^{o}C$
- Προσθήκη απορρυπαντικού
- Μηχανική θραύση
- Χαμηλή ιοντική ισχύ
- Απότομες μεταβολές πίεσης

Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν από άλλες πρωτεΐνες με χρωματογραφία στήλης



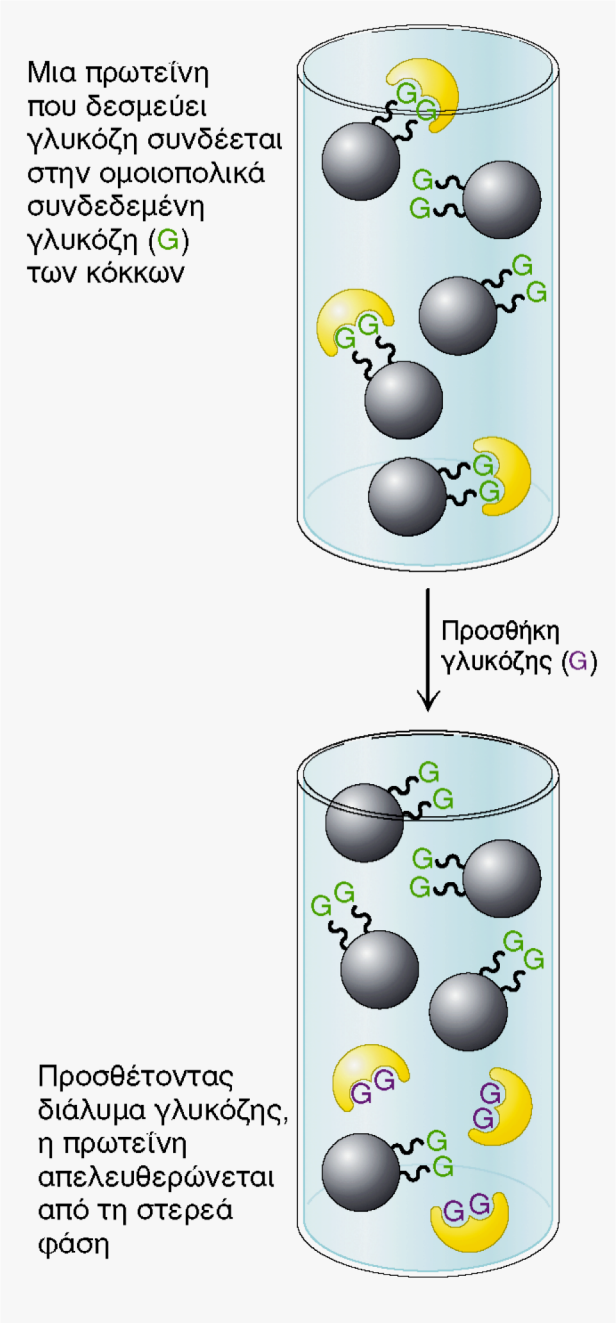
Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν από άλλες πρωτεΐνες με χρωματογραφία στήλης

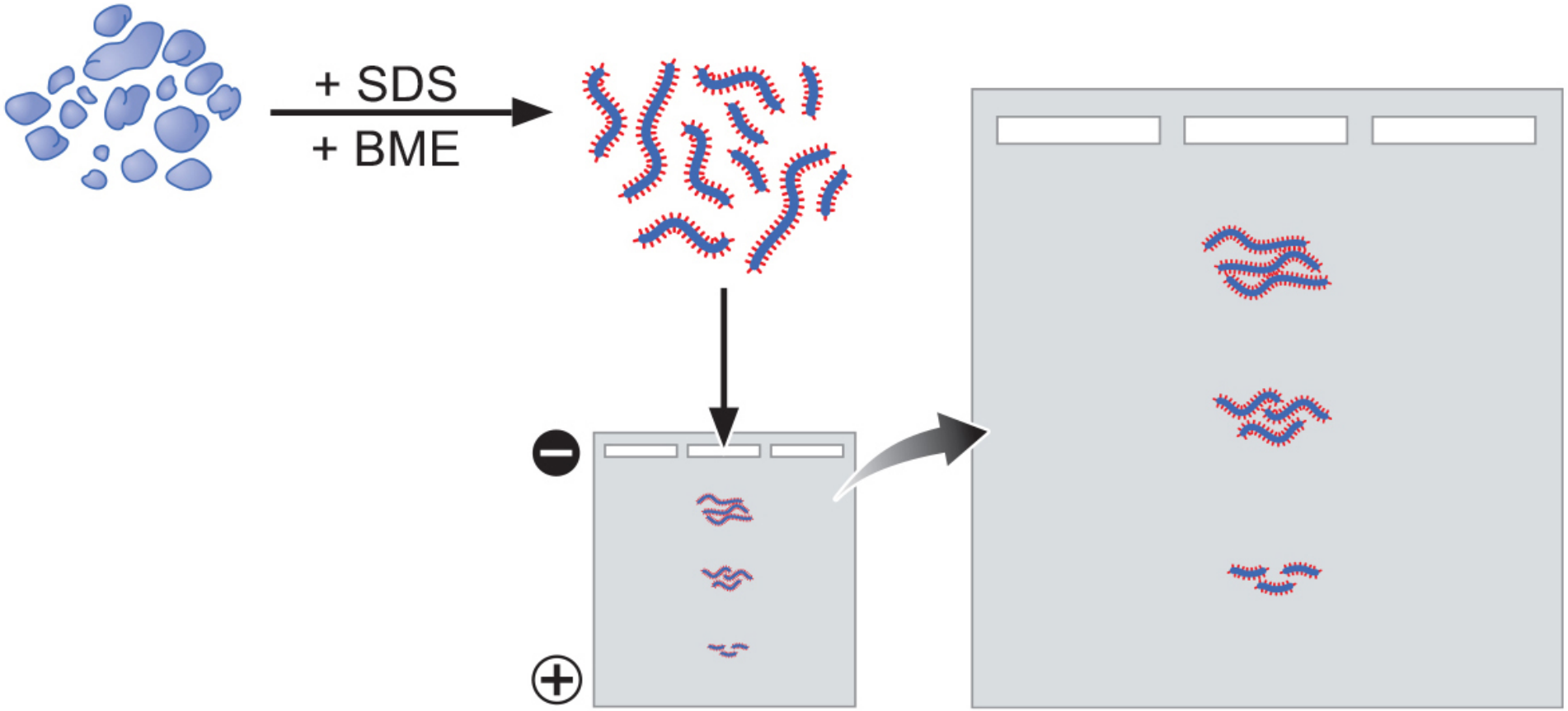
- Χρωματογραφία συγγένειας
- (Χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας)
- Ετικέτες
- Ανοσοκατακρήμνιση

1. Ομοιοπολική δέσμευση παράγοντα Χ ή παραγώγου του
2. Προσθήκη μίγματος πρωτεϊνών
3. Πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα
4. Έκλουση με προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης διαλυτής μορφής Χ



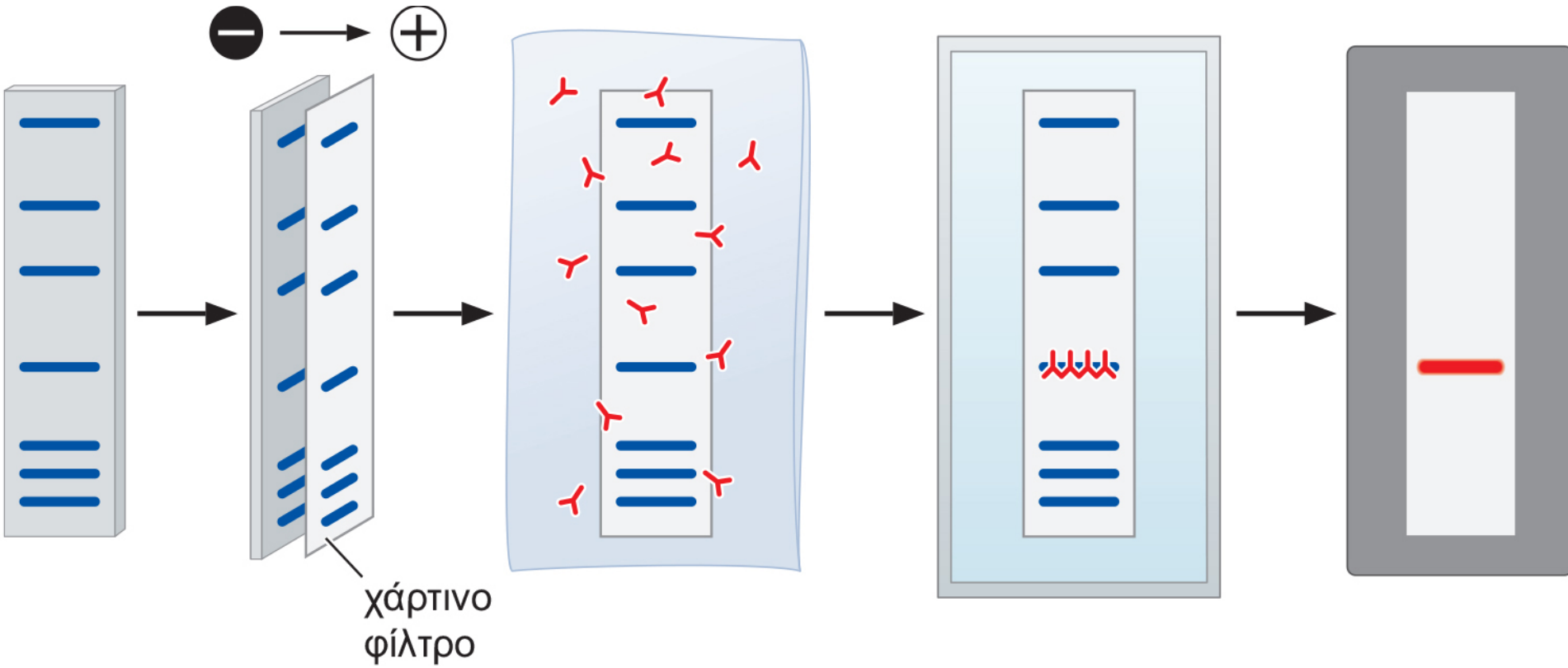
Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου

- Θειοδωδεκυλικό νάτριο (±SDS)
- Μερκαπτοαιθανόλη
- Coomassie brilliant blue



Για να γίνουν ορατές οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται αντισώματα

- Ανοσοστύπωση

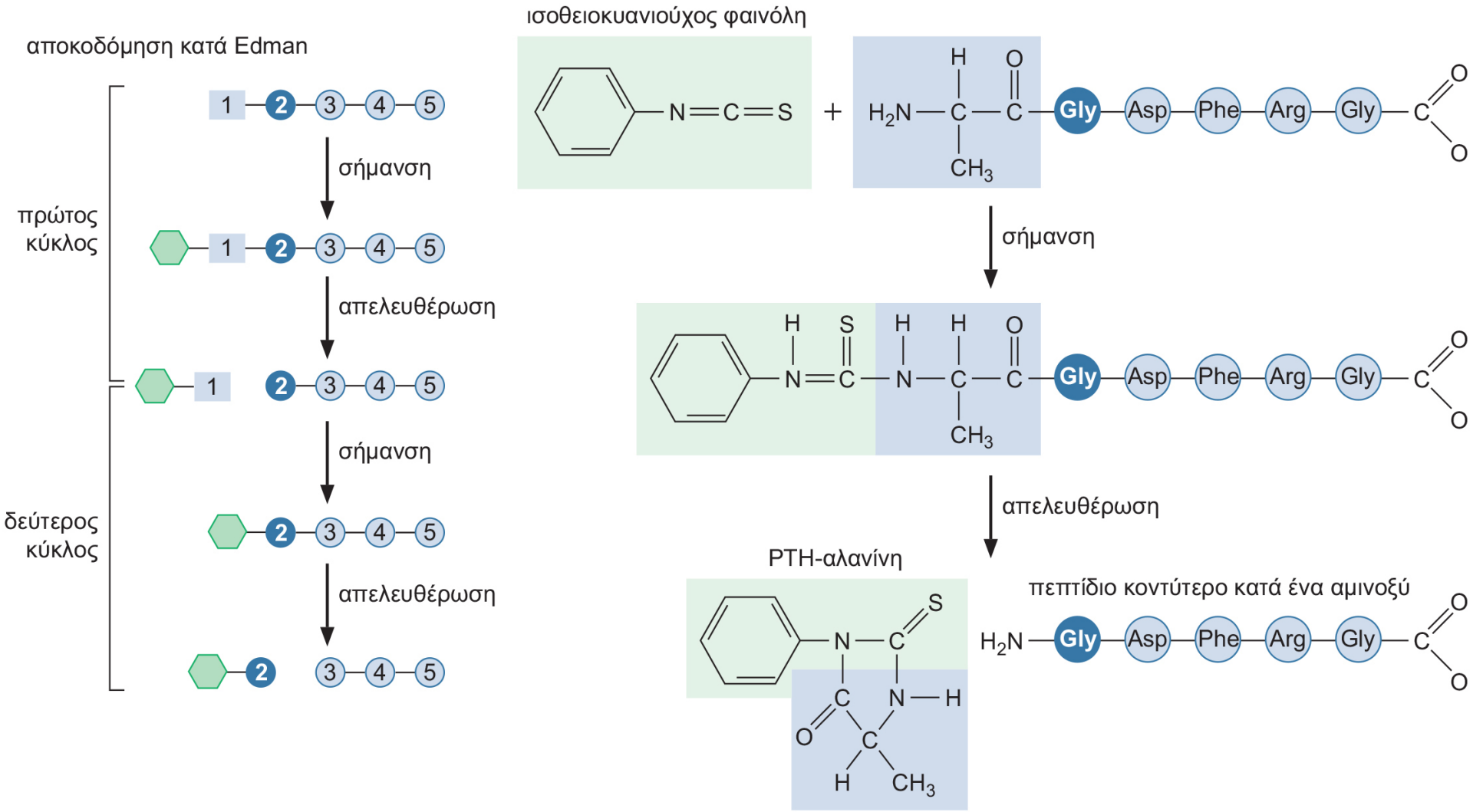


Τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να προσδιοριστούν απευθείας με αλληλούχιση

- Αποικοδόμηση κατά Edman
- Διπλή φασματομετρία μάζας

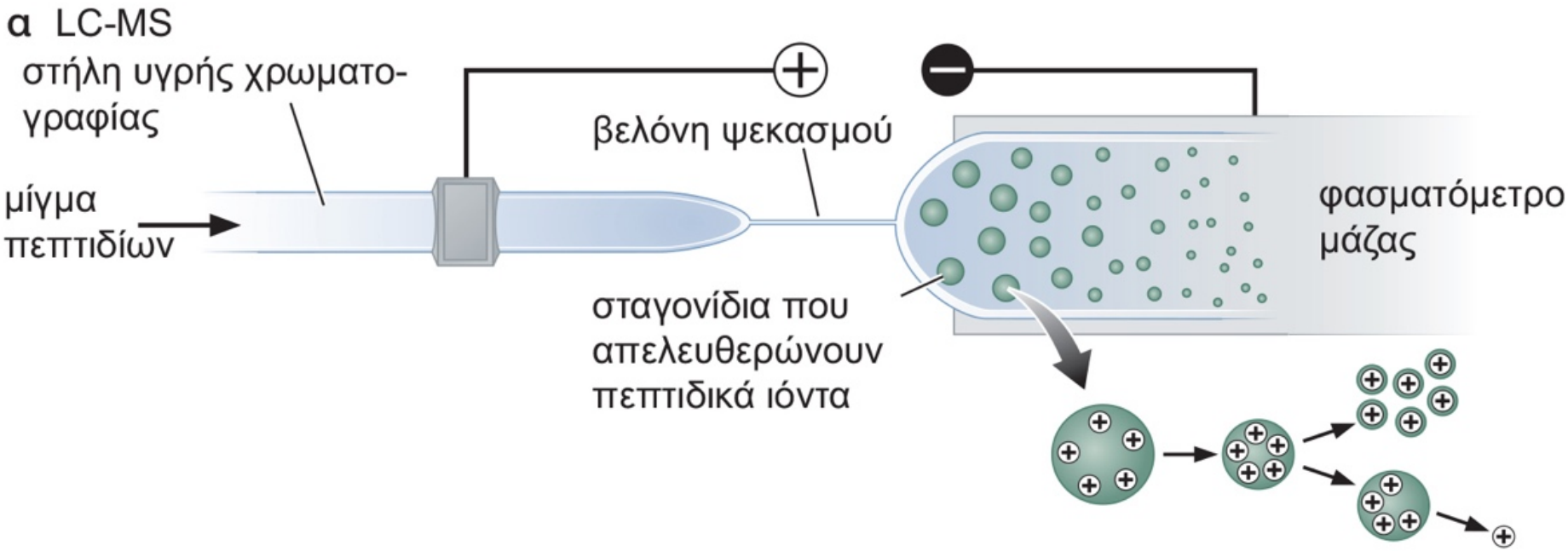
Τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να προσδιοριστούν απευθείας με αλληλούχιση

Αποικοδόμηση κατά Edman



Τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να προσδιοριστούν απευθείας με αλληλούχιση

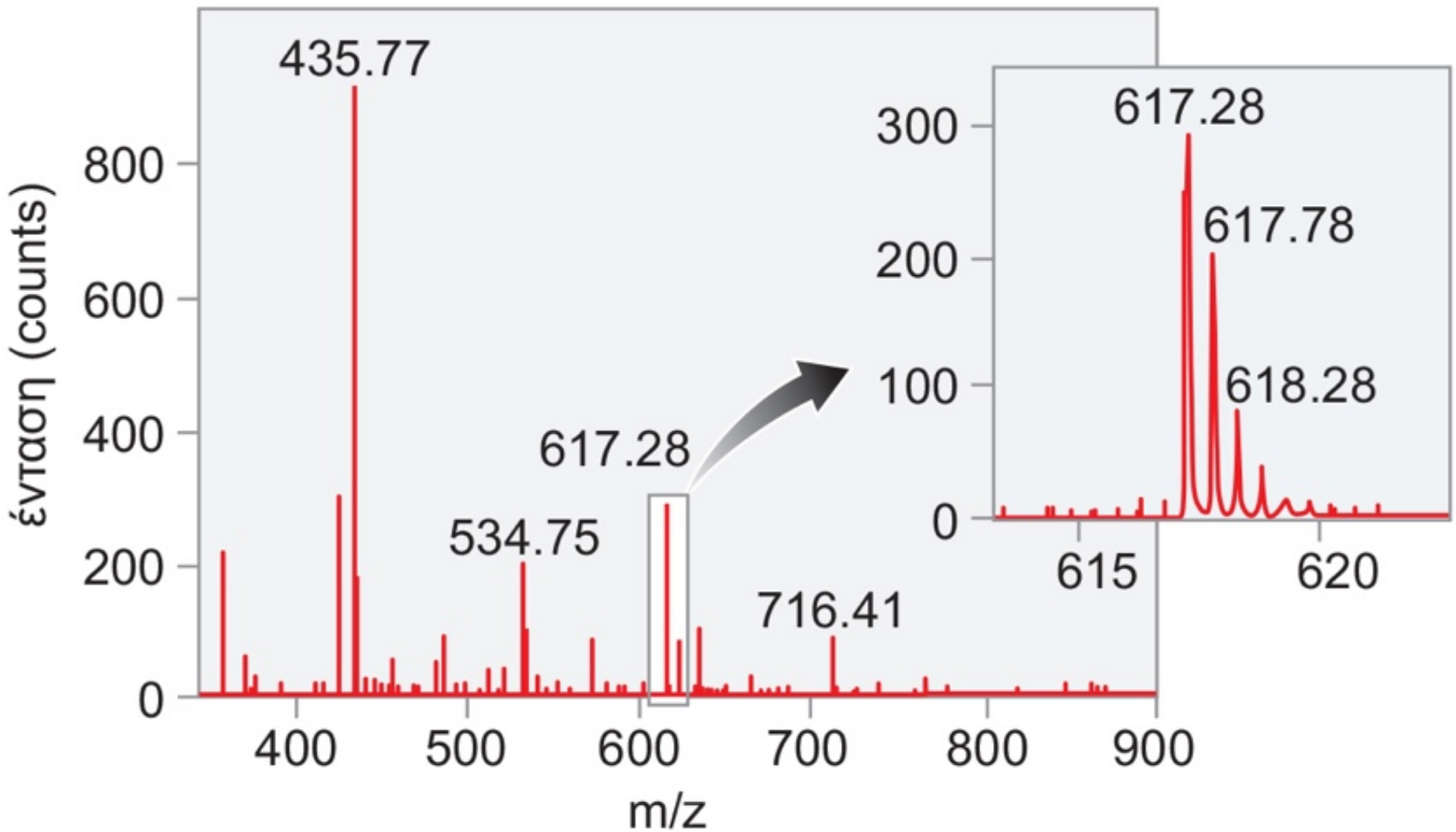
Διαδοχική φασματομετρία μάζας (tandem mass soectrometry, MS/MS)



Τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να προσδιοριστούν απευθείας με αλληλούχιση

Διαδοχική φασματομετρία μάζας (tandem mass soectrometry, MS/MS)

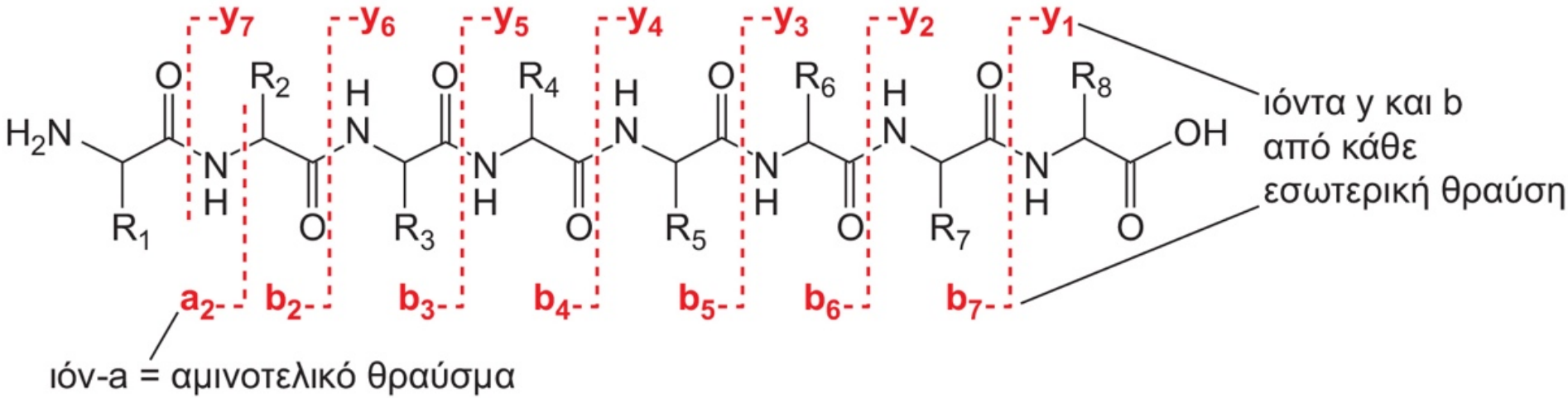
β Συνολικό φάσμα πεπτιδίων
που εκλούονται σε συγκεκριμένο χρόνο



Τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να προσδιοριστούν απευθείας με αλληλούχιση

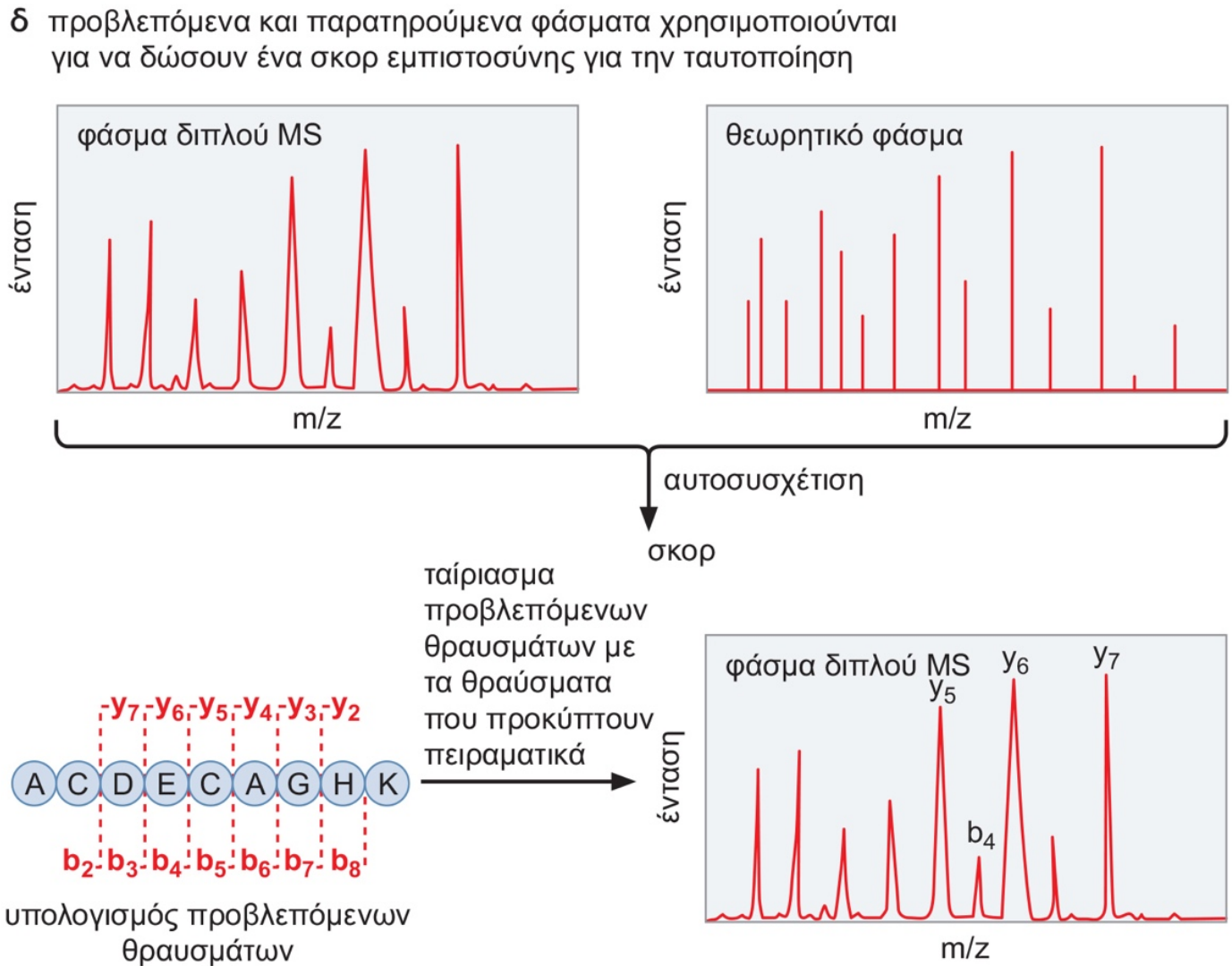
Διαδοχική φασματομετρία μάζας (tandem mass soectrometry, MS/MS)

γ Πεπτιδικά θραύσματα που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον προσδιορισμό αλληλουχίας με MS/MS



Τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να προσδιοριστούν απευθείας με αλληλούχιση

Διαδοχική φασματομετρία μάζας (tandem mass soectrometry, MS/MS)



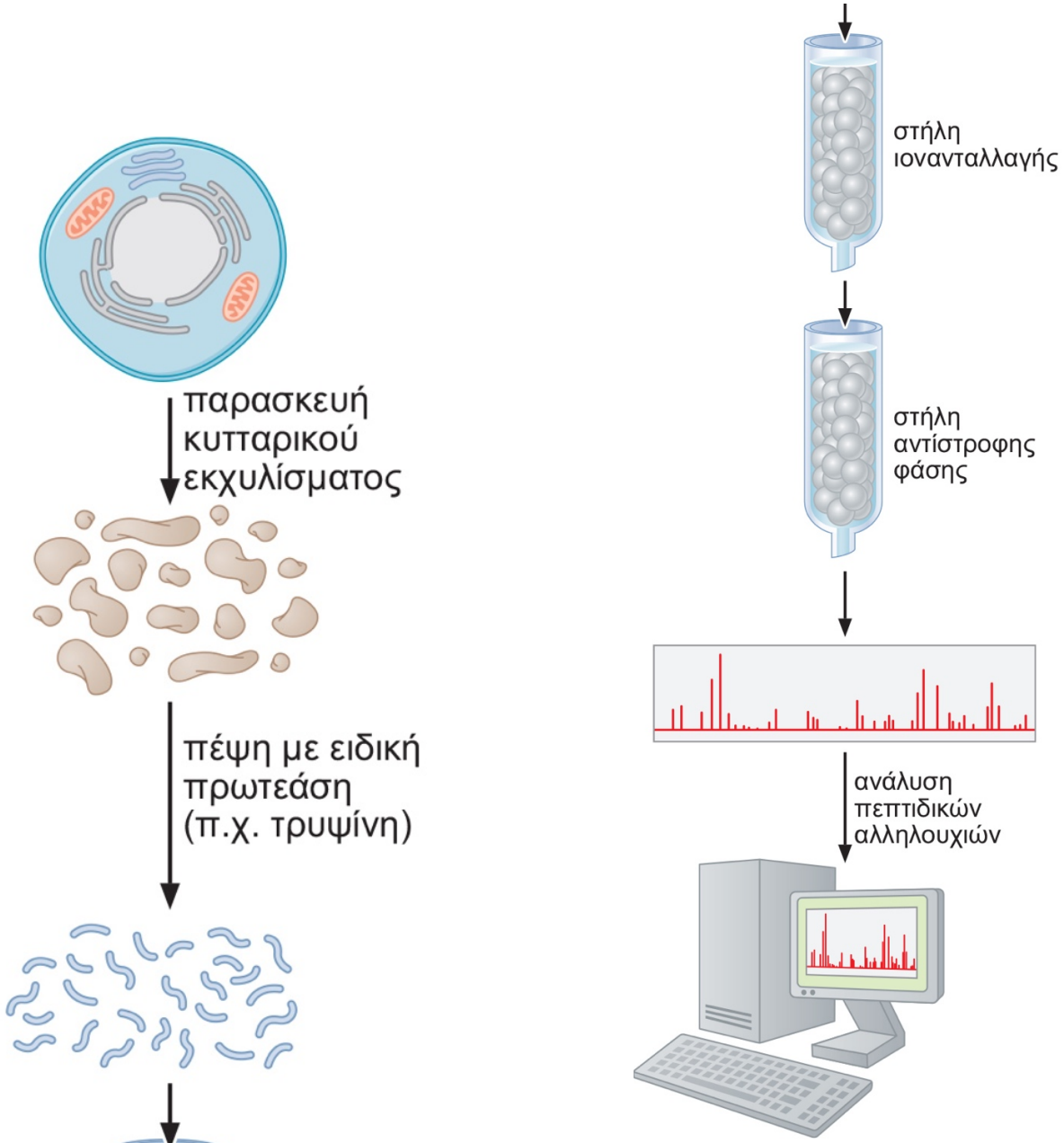
ΠΡΩΤΕΪΝΩΜΑΤΙΚΗ

ΠΡΩΤΕΪΝΩΜΑΤΙΚΗ

- Μεταγράφωμα
- Πρωτεΐνωμα
- Χρόνος ημίσειας ζωής mRNA
- Συσσώρευση mRNA – πρωτεΐνη
- Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις

Ο συνδυασμός **υγρής χρωματογραφίας** και **φασματομετρίας μάζας** ταυτοποιεί μεμονωμένες πρωτεΐνες από σύνθετα κυτταρικά εκχυλίσματα

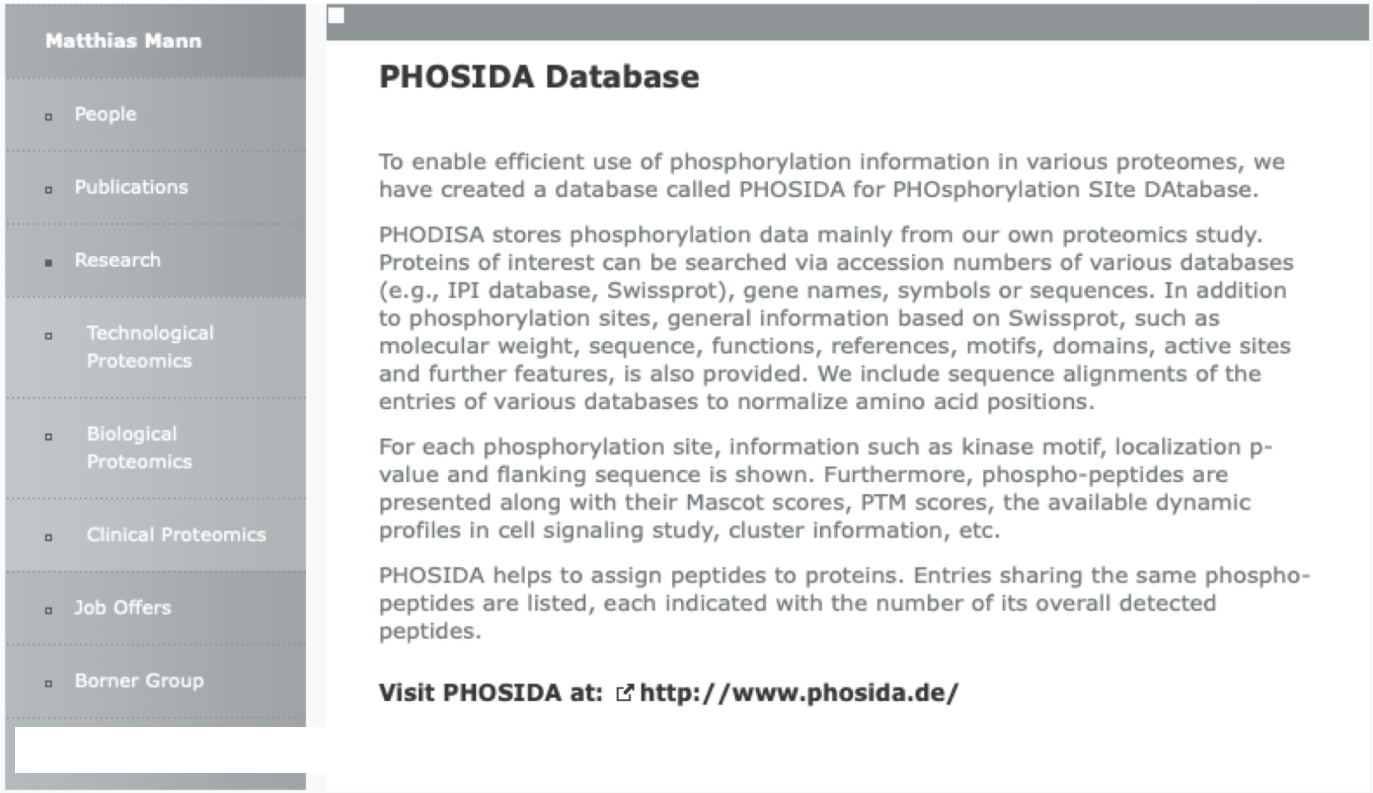
LC-MS



Οι συγκρίσεις πρωτεϊνωμάτων εξακριβώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ κυττάρων

Η φασματομετρία μάζας μπορεί να παρακολουθεί την κατάσταση τροποποίησης πρωτεϊνών

- Ενεργότητα/σταθερότητα
- Φωσφορυλίωση (ΦΩΣΦΟΠΡΩΤΕΪΝΩΜΑ)
- Μεθυλίωση
- Ακετυλίωση
- Ουβικουϊτινυλίωση



Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μπορούν να μας δώσουν πληροφορία για τη λειτουργία των πρωτεϊνών

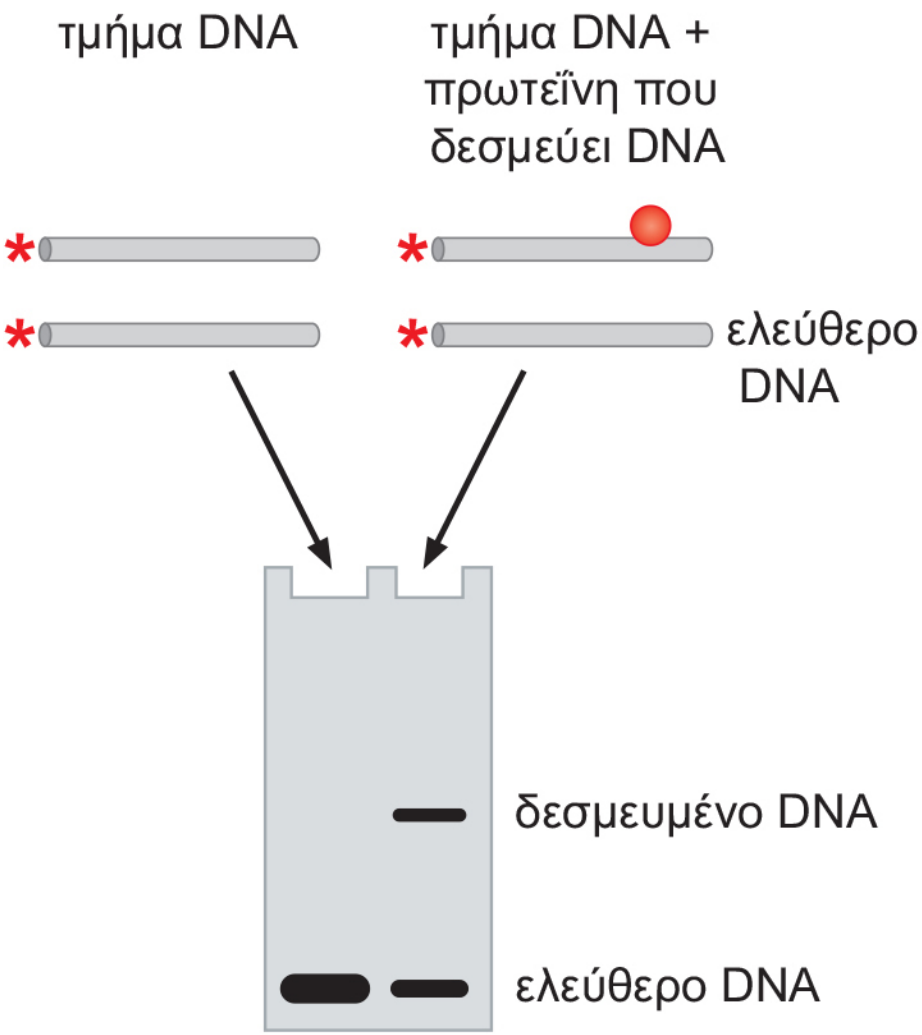
- Πωτεϊνώματα αλληλεπιδράσεων (interactomes)
- Μέθοδος δύο υβριδίων (yeast two-hybrid)
- Ανοσοκατακρήμνιση
- Χρωματογραφία συγγένειας

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ και ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA αλλάζει με τη δέσμευση πρωτεϊνών

Ανάλυση μετατόπισης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας

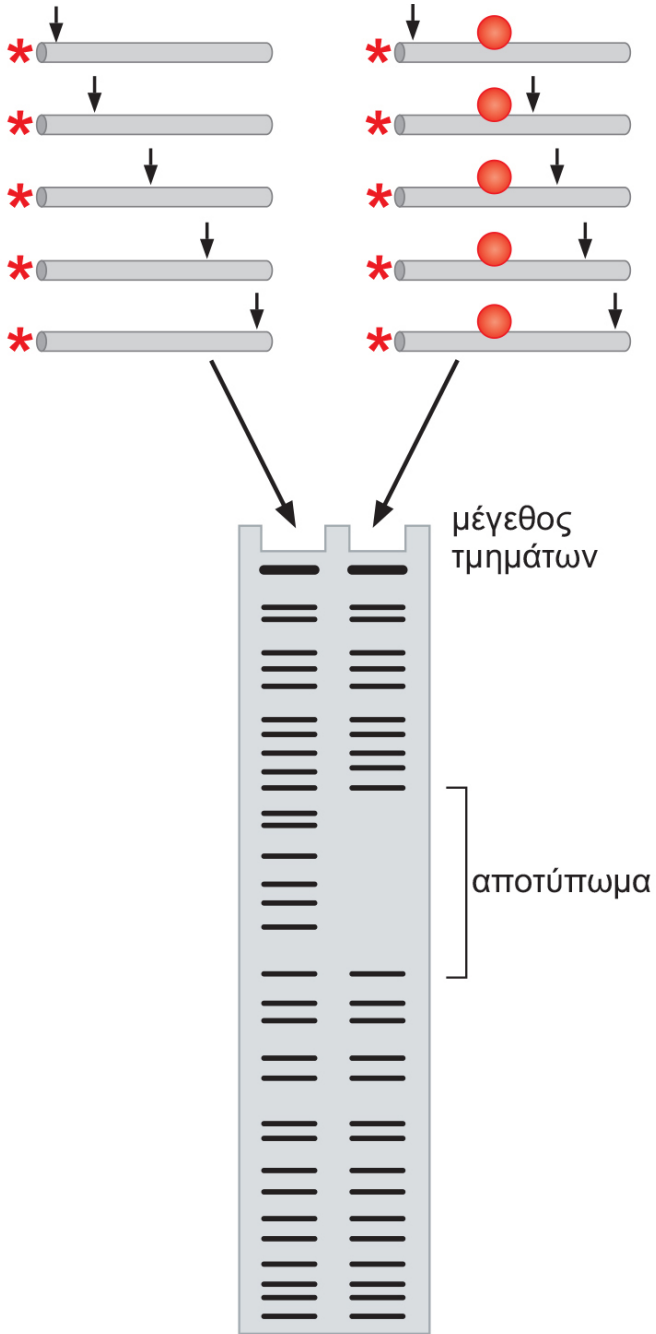
- EMSA – electrophoretic mobility-shift assay
- (Supershift)
- Μεταλλαξιγένεση



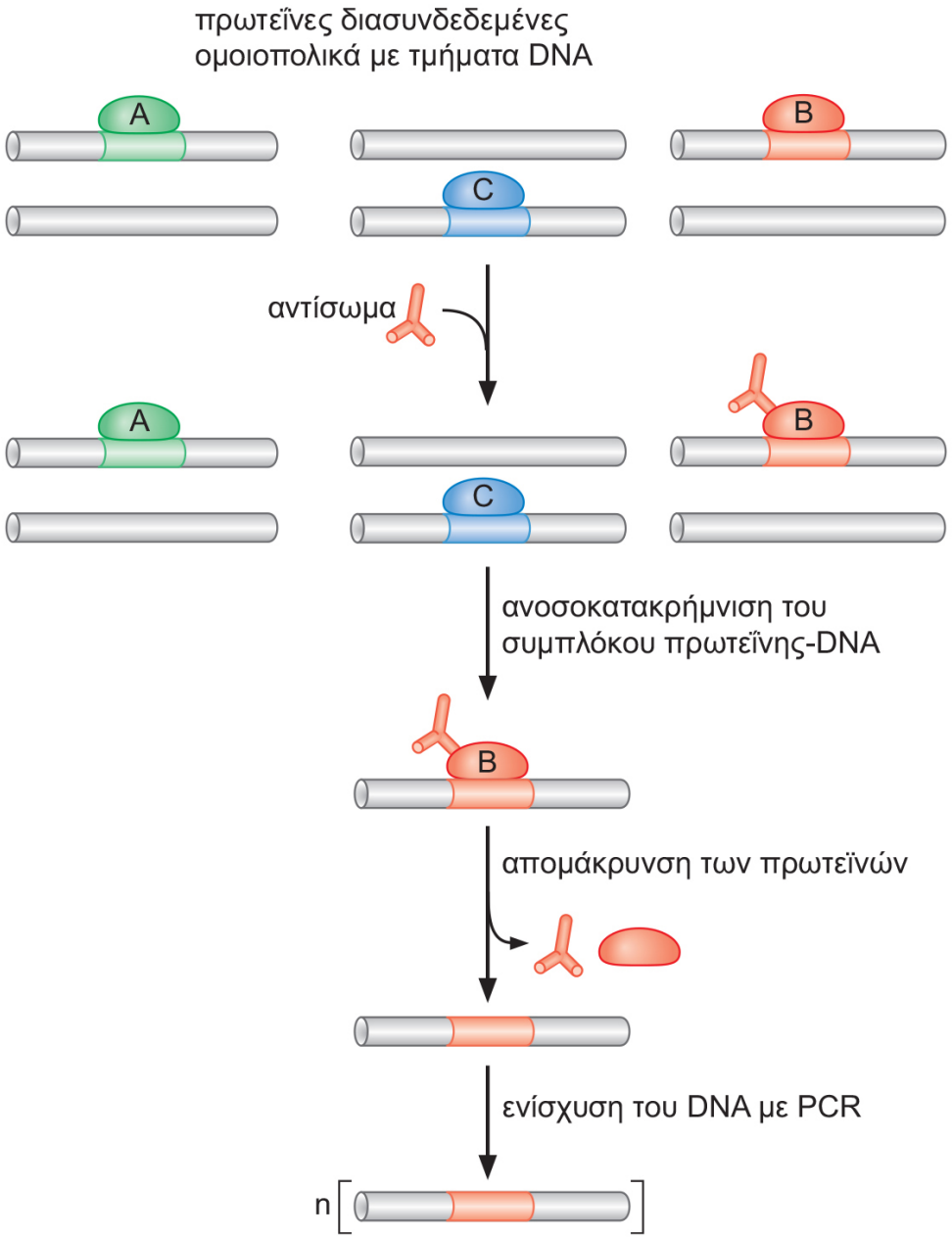
Η δεσμευμένη στο DNA πρωτεΐνη το προστατεύει από νουκλεάσες και από χημική τροποποίηση

Μέθοδοι αποτύπωσης DNA (DNA footprinting)

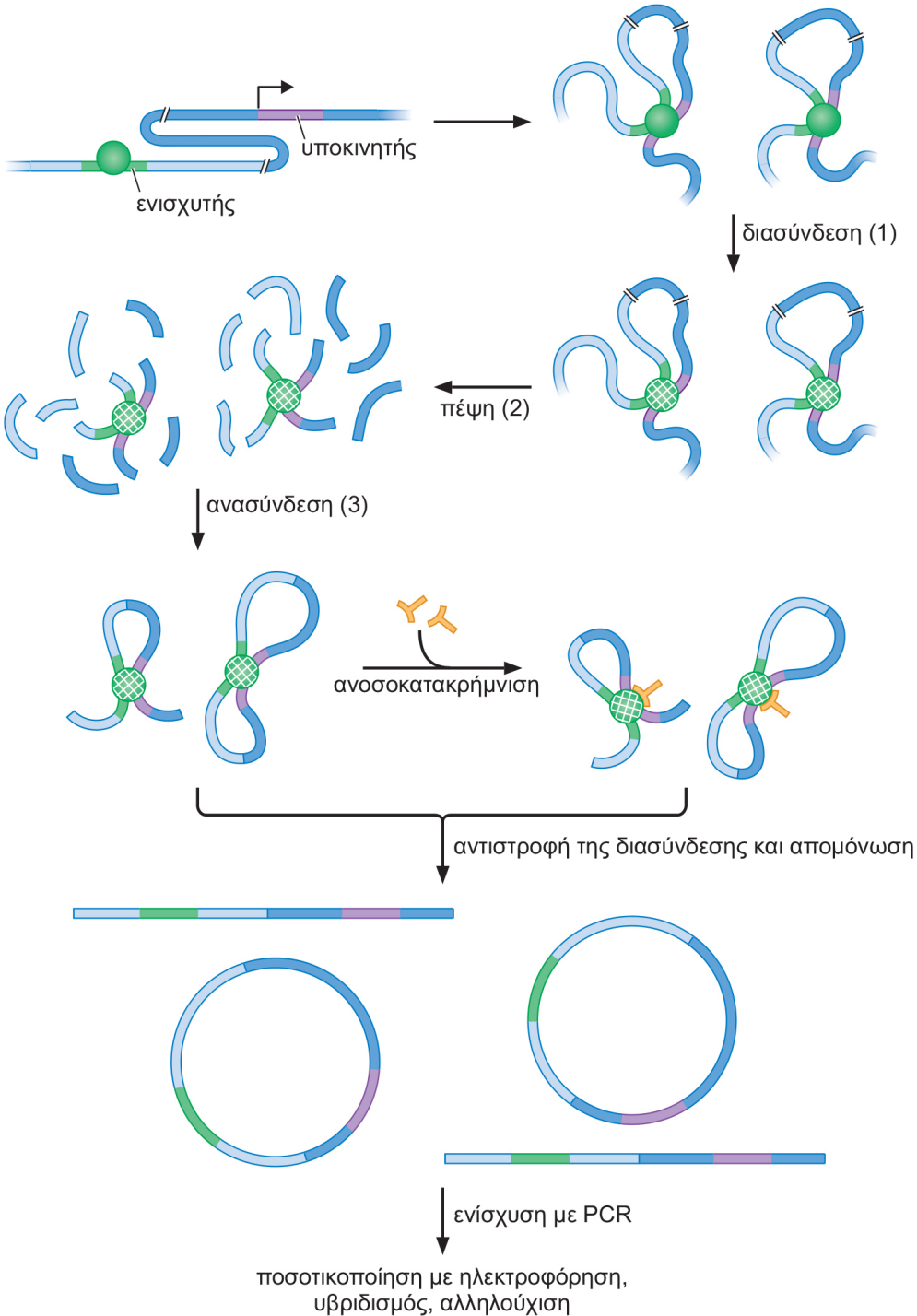
- Αποτύπωση προστασίας έναντι νουκλεάσης (nuclease protection footprinting)



Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης μπορεί να ανιχνεύσει τη σύνδεση πρωτεΐνης με DNA μέσα στο κύτταρο



Για να αναλυθούν αλληλεπιδράσεις μακράς απόστασης χρησιμοποιούνται πειράματα παγίδευσης της διαμόρφωσης του χρωμοσώματος



Merci
Dekuji
Tak
Kitos
Hvala
Obrigado
Dziękuję
Bedankt
תודה רבה
Ευχαριστώ
Grazzi
Gracias
Takk
Tack
Danke
Grazie
Thank you!!!