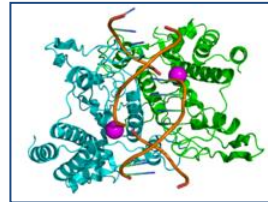


Προαπαιτούμενες Γνώσεις για την κατανόηση της Κλωνοποίησης

1. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- α. Είναι ένζυμα που σπάνε (υδρολύουν) 3'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς **ενδιάμεσα** στο μόριο του DNA, και όχι στα άκρα.
- β. Τα ένζυμα αυτά παράγονται κυρίως από βακτήρια και αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του **δίκλωνου** DNA μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων.
- γ. Ο φυσιολογικός ρόλος των ενζύμων αυτών είναι να προστατεύουν τα βακτήρια από την εισβολή ξένου DNA (π.χ. το DNA φάγου).
- δ. Λόγω της συμπληρωματικότητας των αλυσίδων του DNA κόβουν (υδρολύουν) και τις δύο αλυσίδες.



Παράδειγμα

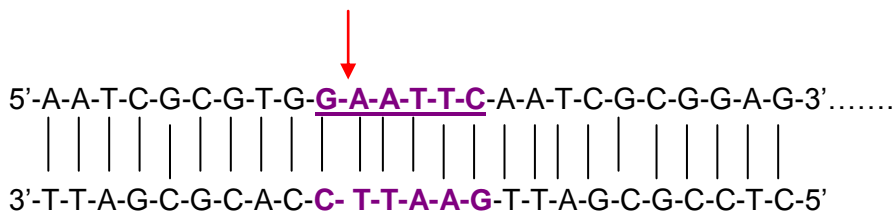
Το ένζυμο EcoRI

που παράγεται από το βακτήριο E. coli, αναγνωρίζει την αλληλουχία

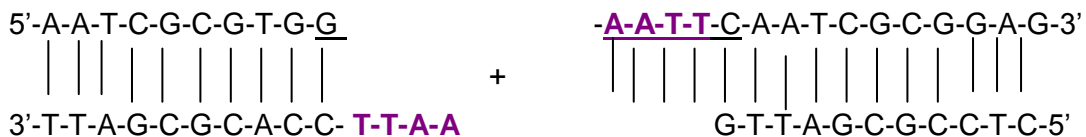
5' G-A-A-T-T-C 3'

3' C-T-T-A-A-G.5'

και κόβει το δίκλωνο DNA μετά από το G όπως δείχνει το **βέλος**



Σύμφωνα λοιπόν με τα πιο πάνω θα προκύψουν δύο τμήματα, που στη συγκεκριμένη περίπτωση έχουν στο ένα άκρο μονόκλωνες ουρές (αζευγάρωτες βάσεις).

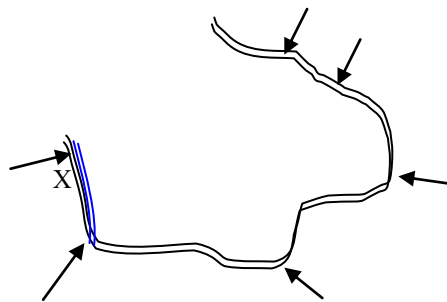


Προσοχή στον προσανατολισμό της αλληλουχίας που αναγνωρίζει η Π. Ε.

Διαβάζεται (αναγνωρίζεται) με φορά από το 5' προς το 3' άκρο της αλυσίδας του DNA.

2. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορεί να κόβουν σε περισσότερες από μία θέσεις

- Έστω ότι έχω ένα τμήμα DNA που περιέχει ένα γονίδιο (X) που θέλω να απομονώσω.
- Με ένα συγκεκριμένο ένζυμο * περιορισμού κόβω το DNA, οπότε και προκύπτουν κομμάτια διαφορετικού μήκους γιατί η περιοριστική ενδονουκλεάση κόβει σε διάφορα σημεία όπως δείχνουν τα βέλη.
- Ένα από αυτά τα κομμάτια περιέχει το γονίδιο που με ενδιαφέρει.



3. Χαρακτηριστικά των φορέων κλωνοποίησης

- Για να εισαχθεί το επιθυμητό DNA μέσα σε ένα κύτταρο –ξενιστή στο οποίο θα πολλαπλασιασθεί πρέπει να προσδεθεί σε ένα κατάλληλο μόριο DNA που θα το μεταφέρει. Το μόριο αυτό είναι ο **φορέας** (π.χ πλασμίδιο ή DNA φάγου)
- Ο φορέας κλωνοποίησης πρέπει:

- α. να μπορεί να αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα από το γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή
- β. να φέρει την ειδική αλληλουχία μία μόνο φορά που αναγνωρίζεται από την Π. Ε. με την οποία επιδράσαμε στο DNA του δότη και προέκυψε το επιθυμητό τμήμα DNA
- γ. να έχει την ικανότητα να εισέλθει σε κύτταρο ξενιστή στο οποίο και θα πολλαπλασιασθεί
- δ. να εξασφαλίζει τις προϋποθέσεις ώστε το τμήμα DNA που μεταφέρει (γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες) να μπορεί και να εκφρασθεί.
- (ε). να μην φέρει γονίδια που όταν εκφραστούν είναι επιβλαβή για το κύτταρο ξενιστή

4. Τα πλασμίδια ως φορείς κλωνοποίησης

Τα πλασμίδια είναι μικρά δίκλινα **κυκλικά** μόρια DNA που υπάρχουν μέσα στα βακτήρια και αντιγράφονται ανεξάρτητα από το βακτηριακό DNA.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΟΥ DNA

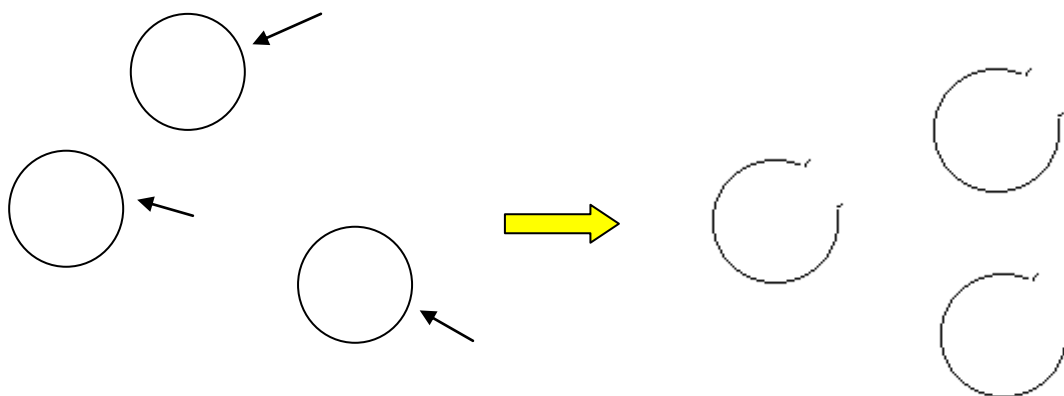
- ▶ Πρώτα απομονώνουμε πλασμίδια
- ▶ Μετά επιδρούμε πάνω στο πλασμίδιο με κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση (το ίδιο ένζυμο που θα χρησιμοποιηθεί για να απομονώσουμε και το γονίδιο X).

ΟΜΩΣ ΕΞΑΣΦΑΛΙΖΟΥΜΕ

- A.** Η αλληλουχία που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο (Π. Ε.) να υπάρχει μία φορά πάνω στο πλασμίδιο (φαίνεται με τα **βέλη**).
- B.** Κάθε πλασμίδιο να κοπεί σ' ένα σημείο και μάλιστα στο ίδιο σημείο ώστε να προκύψει 1 γραμμικό DNA.
- Γ.** Το πλασμίδιο να φέρει γονίδιο που του προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό.

Πλασμίδια πριν 'κοπούν'

πλασμίδια μετά τη δράση της Π.Ε.

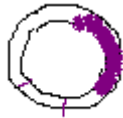


Μην ξεχνάμε ότι και στα πλασμίδια θα σχηματισθούν μονόκλωνες ουρές.



- Τα πλασμίδια είναι έτοιμα να δεχθούν το **X** τμήμα (π.χ.γονίδιο)
- Το τμήμα **X** θα προσδεθεί με τα άκρα του στα άκρα του πλασμιδίου λόγω των συμπληρωματικών ουρών

ΠΡΟΣΟΧΗ Απαιτείται και η δράση της DNA δεσμάσης



Το μόριο που προκύπτει από την ένωση πλασμιδίου (**φορέα**) και **ξένου τμήματος DNA** ονομάζεται **ανασυνδιασμένο DNA**. Ένα ανασυνδιασμένο DNA είναι ένα μόριο DNA που περιέχει γονίδια (ή τμήματα DNA) από δύο ή περισσότερους οργανισμούς.

Στάδια κλωνοποίησης

1. Κατασκευάζουμε ανασυνδιασμένο DNA


Φορέας + Τμήμα DNA \longrightarrow Ανασυνδιασμένο DNA



Η διαδικασία είναι γνωστή ως μετασχηματισμός

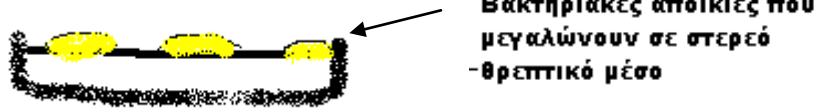
2 Μεταφορά του ανασυνδιασμένου μορίου σ΄ ένα κύτταρο ξενιστή –**Βακτήριο** *2

3. Πολλαπλασιασμός του ανασυνδιασμένου DNA μέσα στο βακτήριο

	Να προβληματιστούμε για πιο λόγο έχουμε πολλά αντίγραφα του ανασυνδιασμένου DNA
---	---

4. Διαίρεση του βακτηρίου

5. Πολλαπλές διαιρέσεις των κυττάρων που οδηγούν σε ένα κλώνο



Ορολογία:

Κλώνος: Ονομάζεται μία ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών

Κλωνοποίηση: Ονομάζεται η διαδικασία κατασκευής, κατά προτίμηση μεγάλου αριθμού, πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών.

Η Επιλογή του βακτηριακού κλώνου με το επιθυμητό γονίδιο γίνεται με το εξής σκεπτικό

(α) Βάζουμε μέσα στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης το αντιβιοτικό στο οποίο έχει αποκτήσει ανθεκτικότητα το βακτηριακό κύτταρο λόγω της ύπαρξης του πλασμιδίου που εισαγάγαμε. Δηλαδή όσα βακτήρια αναπτυχθούν θα είναι αυτά που φέρουν πλασμίδιο.

Το πλασμίδιο όμως μπορεί να είναι είτε το ανασυνδυασμένο DNA είτε πλασμίδιο που επανασυνδέθηκε -«έκλεισε»- χωρίς να φέρει το ξένο γονίδιο.

Όσα βακτήρια **δεν** φέρουν πλασμίδιο ανασυνδυασμένο ή μη, **δεν** θα αναπτυχθούν στο θρεπτικό υλικό, επειδή δεν έχουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό.

(β) Χρησιμοποιούμε μόρια ανιχνευτές που εντοπίζουν λόγω της αρχής της συμπληρωματικότητας των βάσεων το γονίδιο του οποίου γνωρίζουμε εκ των προτέρων την αλληλουχία των βάσεων (εξηγείται πιο κάτω η διαδικασία, βλέπε και Εικόνα _)

Γονιδιωματική βιβλιοθήκη

Μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη είναι το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχει το συνολικό DNA ενός οργανισμού δότη.

Στάδια κατασκευής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

- α. απομονώνεται όλο το DNA από το κύτταρο
- β. επίδραση με κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση → προκύπτουν τμήματα DNA διαφορετικού μήκους που μπορούν να κλωνοποιηθούν
- γ. υδρόλυση με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση του κατάλληλου φορέα κλωνοποίησης
- δ. ανάμειξη των κομμένων (σε ένα σημείο) πλασμιδίων με τα κομμάτια του DNA του οργανισμού δότη

+DNA δεσμάση



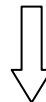
δημιουργία ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης

- δ. εισαγωγή των φορέων κλωνοποίησης (ανασυνδυασμένων ή μη) σε βακτήρια ξενιστές



δημιουργία μετασχηματισμένων βακτηρίων

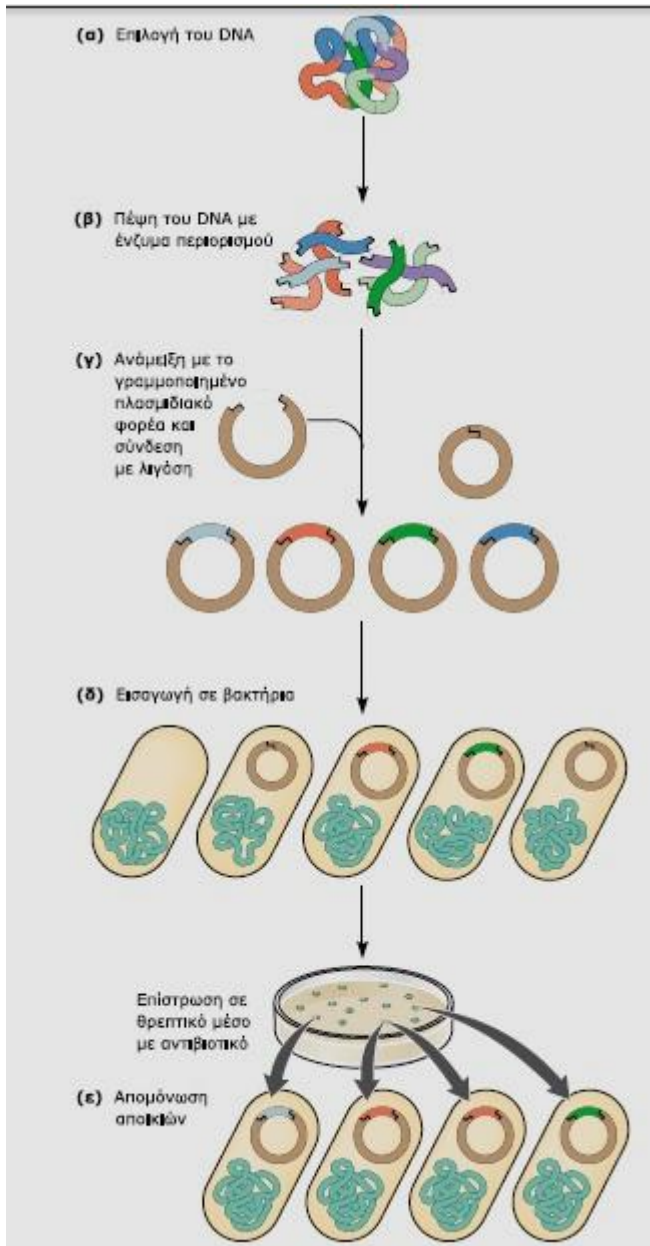
- ε. ανάπτυξη βακτηρίων σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό (με αντιβιοτικό)



δημιουργία κλώνων

βλέπε Εικόνα 1

Ο κάθε κλώνος βακτηρίων περιέχει το φορέα κλωνοποίησης ανασυνδυασμένο με ένα διαφορετικό κομμάτι DNA του οργανισμού δότη



Εικόνα 1. Στάδια κατασκευής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Προσοχή Το δύσκολο σημείο είναι ΝΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΟΥΜΕ μέσα από την βιβλιοθήκη την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει



- Ως Ανιχνευτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα συμπληρωματικό νουκλειικό οξύ (DNA ή RNA), ως προς το τμήμα του DNA-δότη, του οποίου γνωρίζουμε μέρος της αλληλουχίας.
- Η μεθοδολογία που ακολουθείται βασίζεται στην ικανότητα των νουκλειικών οξέων να υβριδοποιούνται

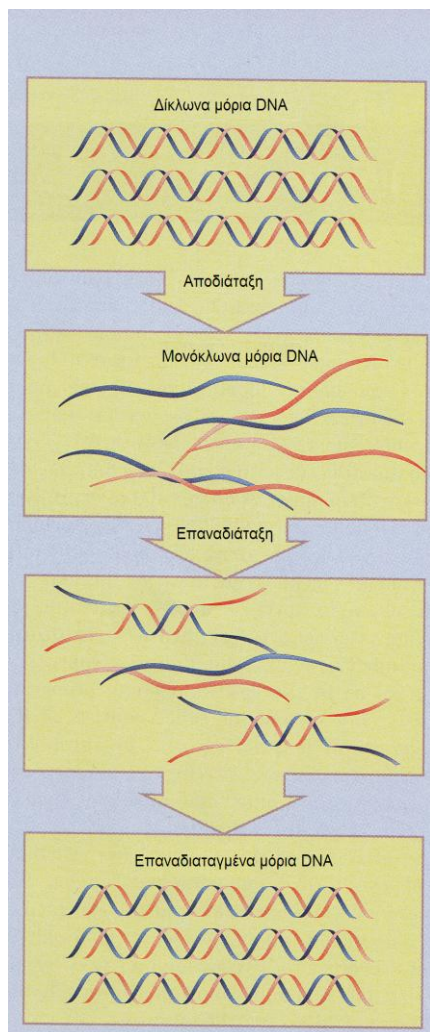
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Όταν ένα υδατικό διάλυμα DNA θερμανθεί στους 100 °C, σπάζουν οι υδρογονικοί δεσμοί και το DNA αποδιάσσεται. Όμως το φαινόμενο αυτό κάτω από ορισμένες συνθήκες είναι αντιστρεπτό. Οι μονόκλωνες συμπληρωματικές αλυσίδες επανασυνδέονται και μάλιστα μπορεί να επανασυνδεθούν με μια άλλη αλυσίδα που έχουμε προσθέσει, συμπληρωματική της μιας από τις δύο αρχικές αλυσίδες → **υβριδοποίηση**.

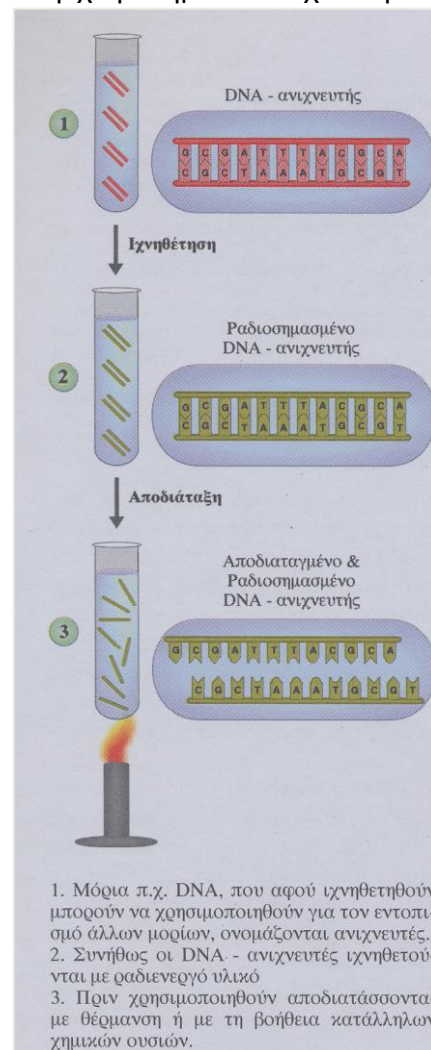
Αντιδράσεις υβριδοποίησης μπορούν να συμβούν ανάμεσα σε οποιοδήποτε συνδυασμό δύο αλυσίδων νουκλεϊνικών οξέων DNA:DNA RNA:RNA DNA:RNA

➤ Συνήθως ο ανιχνευτής είναι ραδιενεργά ιχνηθετημένος οπότε λόγω της συμπληρωματικότητας των βάσεων υβριδοποιείται με τον κλώνο του DNA που περιέχει την συμπληρωματική με τον ανιχνευτή αλληλουχία. Λόγω σήμανσης (ιχνηθέτησης) εντοπίζεται.

Αποδιάταξη-Υβριδοποίηση

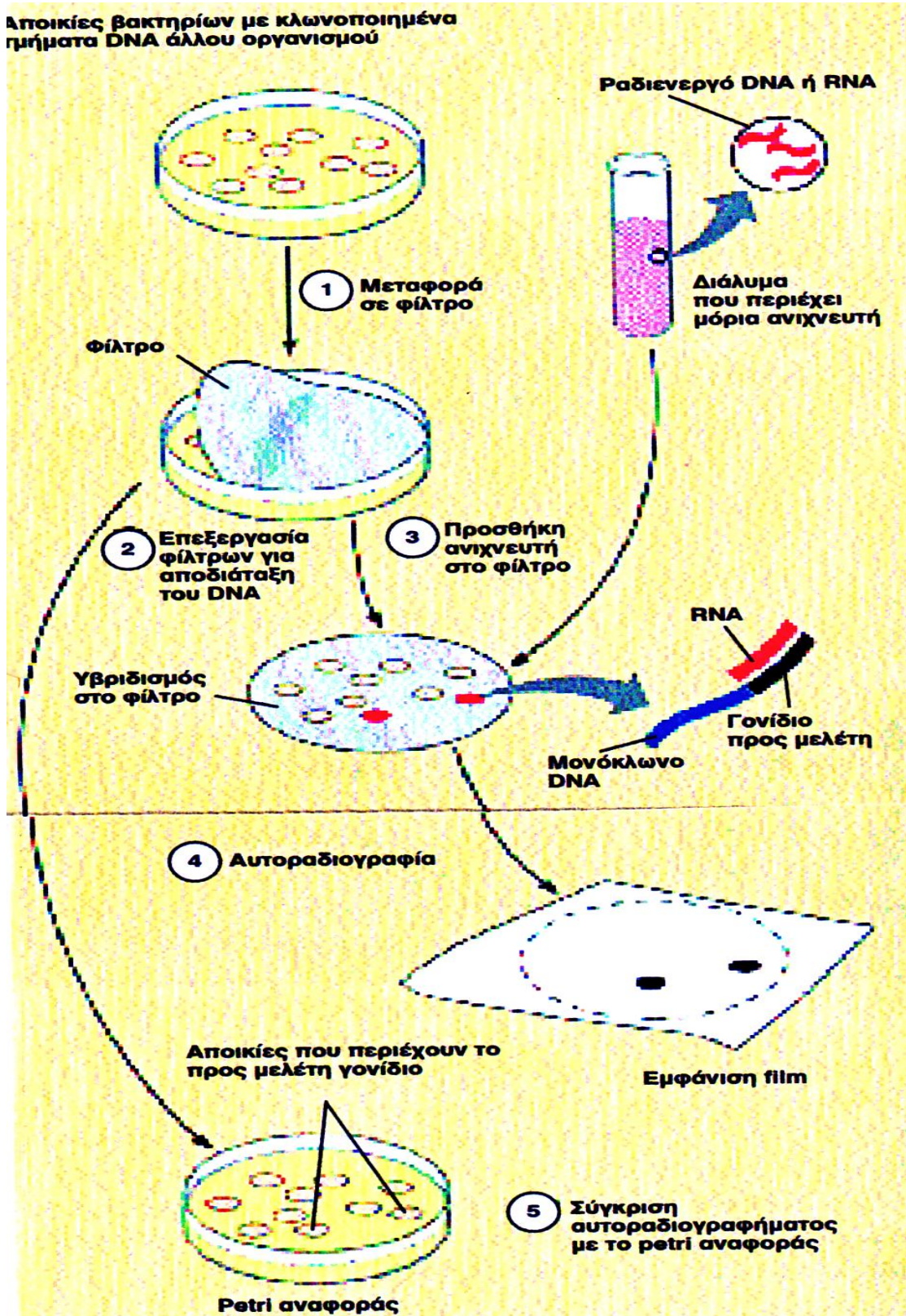


Κατασκευή ιχνηθετημένου ανιχνευτή



ΕΙΚΟΝΑ

Επιλογή του βακτηριακού κλώνου με το επιθυμητό γονίδιο



cDNA βιβλιοθήκη

Είναι γνωστό ότι

κάθε κύτταρο ενός οργανισμού περιέχει τον ίδιο αριθμό γονιδίων, αλλά στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους ενός πολυκύτταρου οργανισμού, εκφράζονται διαφορετικά γονίδια ενώ τα άλλα παραμένουν «σιωπηλά».

Το γεγονός

ότι μόνο ορισμένα γονίδια εκφράζονται σε κάθε κυτταρικό τύπο, το εκμεταλευόμαστε ώστε να φτιάξουμε μια βιβλιοθήκη όπου το υλικό που θα κλωνοποιηθεί αντιπροσωπεύεται στο mRNA και μάλιστα στο ώριμο mRNA.

Με άλλα λόγια,

Τα γονίδια που πρόκειται να εκφραστούν αυτά και μόνο αυτά θα μεταγραφούν σε mRNA σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο

Οπότε

εάν χρησιμοποιήσουμε το mRNA ως το αρχικό υλικό, τότε οι κλώνοι που θα προκύψουν θα είναι μια επιλογή γονιδίων από το συνολικό αριθμό γονιδίων αυτού του κυττάρου.

Όμως

το mRNA δεν μπορεί να προσδεθεί σε ένα φορέα –πλασμίδιο (μόριο DNA)

Για το λόγο αυτό, το mRNA το μετατρέπουμε σε DNA με το ένζυμο **αντίστροφη μεταγραφάση** το οποίο χρησιμοποιώντας ως καλούπι το RNA συνθέτει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA. (complementary DNA, cDNA).

Στάδια κατασκευής cDNA βιβλιοθήκης.

- α. απομόνωση ολικού mRNA
- β. σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας DNA για την υπάρχουσα αλυσίδα RNA.
- γ. δημιουργία έτσι υβριδικού μορίου DNA-RNA.
- δ. αποικοδόμηση της αλυσίδας RNA
- ε. μικρά τμήματα RNA (που έχουν απομείνει) δρουν ως πρωταρχικά τμήματα RNA (διαδικασία αντιγραφής), ώστε να μπορέσει η DNA πολυμεράση να επιμηκύνει την αλυσίδα και έτσι να φτιαχτεί η δεύτερη cDNA αλυσίδα
- ε. δημιουργία τελικά δίκλωνου DNA μορίου που μπορεί να δεθεί μέσα σε ένα φορέα και στη συνέχεια να κλωνοποιηθεί.

Οι κλώνοι cDNA αντιπροσωπεύουν το mRNA του αρχικού παρασκευάσματος.

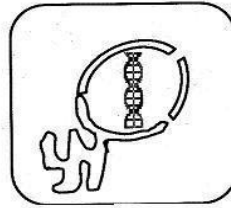
Προσοχή

Σε μια cDNA βιβλιοθήκη δεν έχουν κλωνοποιηθεί:

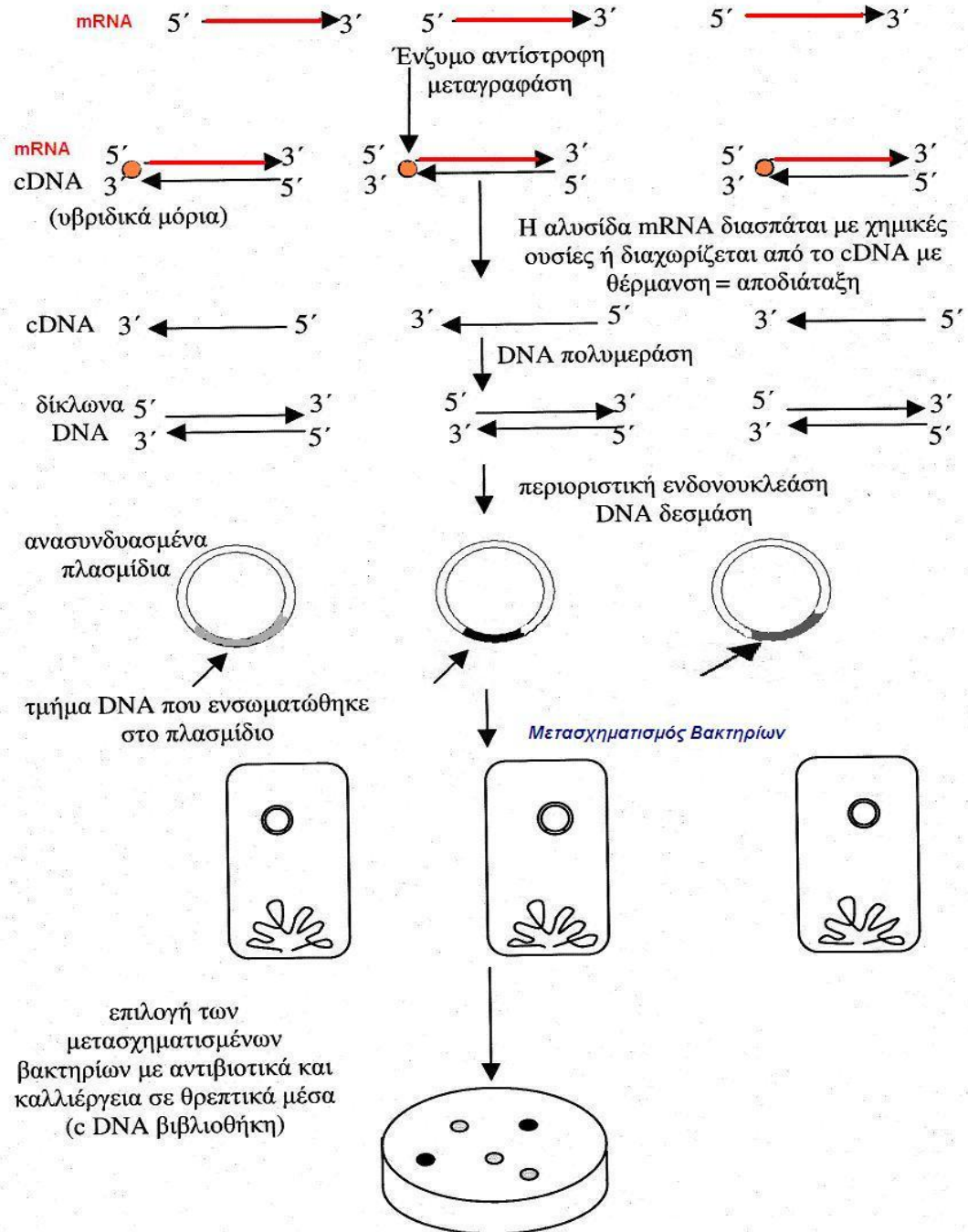
- περιοχές που δεν περιέχουν γονίδια
 - υποκινητές και αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής
 - εσώνια
 - μη ενεργά γονίδια στο συγκεκριμένο κύτταρο από το οποίο απομονώθηκε το ολικό m RNA.
 - γονίδια που μεταγράφονται σε tRNA, rRNA, snRNA
-

ΕΙΚΟΝΑ_ Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης

Στο σχήμα δείχνονται
τρία μόρια mRNA



Κύτταρο ανθρώπινου ιστού
από το οποίο απομονώνουμε
ολικό mRNA



ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ-ΑΣΚΗΣΕΙΣ

1. Τι είναι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες;
2. Ποια είναι η σημασία των βιβλιοθηκών;
3. Τι ονομάζεται μετασχηματισμός και πως επιτυγχάνεται;
4. Σε ένα πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης και διαθέτει ένα γονίδιο ανοχής σε ένα αντιβιοτικό, η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση μπορεί να βρίσκεται σε οποιαδήποτε θέση του;
5. Τι απαιτείται για την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης;
6. Παρουσιάστε σε ένα πίνακα τις διαφορές μεταξύ γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης.
7. Ποιες είναι οι περιοχές του γενετικού υλικού του ανθρώπου που δεν μπορούν να κλωνοποιηθούν με τη δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης;
8. Συγκρίνετε τους ιούς και τα πλασμίδια ως φορείς κλωνοποίησης.
9. Αναφέρατε σε ποιες περιπτώσεις γίνεται υβριδοποίηση *in vitro*.
10. Σε ποια ιδιότητα του γενετικού κώδικα οφείλεται το ότι ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιέχει γονίδιο από ένα οποιοδήποτε οργανισμό μπορεί να εκφρασθεί σένα βακτήριο;
11. Αναφέρατε τρόπους για την παραγωγή πολλών αντιγράφων DNA.
12. Ποια χαρακτηριστικά πρέπει να έχει ένας φορέας κλωνοποίησης;

13. Δίνεται ένα τμήμα της αλληλουχίας βάσεων της κωδικής αλυσίδας του πρώτου εξωνίου ενός γονιδίου

5' ...AAGCTTCCATGAAGTTCAAAGAATTCTTTCCC...3'

Να εξηγήσετε αν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η EcoRi για την κλωνοποίηση του σε βακτήριο –ξενιστή

14. Δίνεται η παρακάτω αλληλουχία ενός τμήματος DNA

5' AATCTCGAATTCAA....T TACTTAAGGTT 3'
3' TTAGAGCTTAAGTT....AATGAATTCCAA..5'

Σε πόσα και ποια σημεία θα κοπεί η παραπάνω αλληλουχία από το ένζυμο EcoRI;

15. Σένα ευκαρυωτικό κύτταρο ένα γονίδιο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης που αποτελείται από 210 αμινοξέα. Αν το ίδιο γονίδιο κλωνοποιηθεί σένα βακτηριακό πληθυσμό, θα παραχθεί η ίδια πρωτεΐνη;
16. Να αναφέρετε πιθανούς λόγους που αιτιολογούν την μη παραγωγή μιας πρωτεΐνης της οποίας το γονίδιο που ελέγχει την έκφρασή της ενσωματώθηκε σε πλασμίδιο και στη συνέχεια εισήχθη σε βακτήριο.

1° ΚΡΙΤΗΡΙΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Να σημειώσετε την σωστή απάντηση στις ακόλουθες ερωτήσεις και να αιτιολογήσετε την επιλογή σας.

1. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που βρίσκονται:
 - α. στα πλασμίδια
 - β. στους μύκητες
 - γ. στα βακτήρια
 - δ. σε ορισμένους μόνο ευκαρυωτικούς και σε όλους τους προκαρυωτικούς οργανισμούς.
2. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διασπούν 3'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς:
 - α. σε κατάλληλη θέση στα πλασμίδια
 - β. σε κατάλληλες θέσεις στο γονιδίωμα ευκαρυωτικών κυττάρων
 - γ. σε κατάλληλη θέση το ανασυνδυασμένο μόριο DNA
 - δ. σε όλα τα παραπάνω
3. Ποιο από τα παραπάνω δεν είναι ιδιότητα ενός φορέα κλωνοποίησης;
 - α. είναι μόριο DNA φάγου
 - β. είναι πλασμίδιο
 - γ. είναι ένα μόριο RNA φάγου
 - δ. μπορεί να αντιγράφεται ανεξάρτητα
4. Οι ανιχνευτές είναι:
 - α. ένζυμα
 - β. γονίδια
 - γ. ιχνηθετημένα μόρια DNA
 - δ. ιχνηθετημένα μονόκλιωνα μόρια DNA ή RNA με γνωστή αλληλουχία βάσεων
5. Μετασχηματισμός είναι:
 - α. η ένωση δύο μορίων DNA από δύο διαφορετικούς οργανισμούς
 - β. η μετατροπή της μορφής ενός βακτηριακού κυττάρου
 - γ. η είσοδος του DNA του φάγου στο βακτήριο –ξενιστή
 - δ. η διαδικασία εισαγωγής ανασυνδυασμένου DNA σε βακτήριο.
6. Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη είναι:
 - α. το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχει το ώριμο mRNA ενός ιστού
 - β. το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού δότη
 - γ. το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχει το σύνολο των γονιδίων του οργανισμού δότη
 - δ. το συνολικό DNA του οργανισμού δότη ενσωματωμένο σε φορέα κλωνοποίησης
7. Ποια από τα παρακάτω ένζυμα δεν είναι απαραίτητα στη δημιουργία του ανασυνδυασμένου DNA:
 - α. DNA πολυμεράση
 - β. DNA δεσμάση
 - γ. περιοριστική ενδονουκλεάση
 - δ. το α και το β

8. Ως φορείς κλωνοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθούν:
- πλασμίδια
 - ιοί βακτηρίων
 - βακτηριακά κύτταρα
 - τα α και β.
9. Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI:
- καταλύει τη σύνθεση φωσφοδιεστερικών δεσμών
 - αναγνωρίζει την αλληλουχία GAATTC στη μονόκλωνη αλυσίδα του DNA
 - μπορεί να δράσει και εκτός βακτηριακών κυττάρων
 - αναγνωρίζει την αλληλουχία GAATTC σε ένα δίκλωνο DNA
10. Κατά την υβριδοποίηση σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου:
- μεταξύ δύο μονόκλωνων αλυσίδων DNA
 - μεταξύ μονόκλωνων αλυσίδων DNA και RNA
 - μεταξύ μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ή DNA και RNA
 - όλα τα παραπάνω.

Να χαρακτηρίσετε με (Σ) σωστό ή με (Λ) λάθος τις παρακάτω προτάσεις

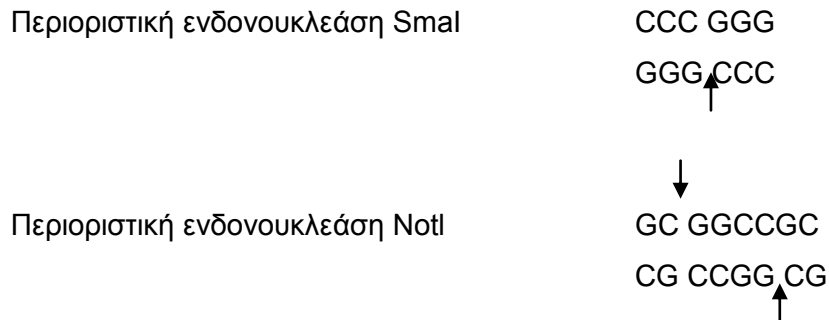
- Κάθε βακτήριο προσλαμβάνει ένα μόριο ανασυνδυασμένου DNA.
- Κάθε βακτηριακός κλώνος προκύπτει από ένα μόνο βακτήριο.
- Η μέθοδος PCR είναι in vitro διαδικασία κλωνοποίησης.
- Ως φορέας κλωνοποίησης μπορεί να είναι το DNA ιών.
- Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη δίνει την δυνατότητα παραγωγής πρωτεϊνών από ευκαρυωτικά κύτταρα.
- Όλα τα πλασμίδια των βακτηρίων έχουν την αλληλουχία 5'–GAATTC– 3' μία μόνο φορά.
- Για την δημιουργία κλώνων είναι απαραίτητη η χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών.
- Η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σ' ένα ευκαρυωτικό κύτταρο ονομάζεται μετασχηματισμός.
- Οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί είναι ικανοί να αναπαράγονται, κληρονομώντας στους απογόνους τους τις καινούργιες ιδιότητες.
- Με τη μέθοδο της PCR μπορούμε να πολλαπλασιάσουμε μόνο τις αλληλουχίες του DNA που αντιστοιχούν σε γονίδια.

Να αντιστοιχήσετε τους όρους της 1^{ης} στήλης με τις φράσεις της 2^{ης} στήλης

A. Γονιδιωματική βιβλιοθήκη	1. Αύξηση θερμοκρασίας
B. Υβριδοποίηση	2. Εσώνια
Γ. Αποδιάταξη	3. Αντίστροφη μεταγραφάση
Δ. PCR	4. Σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων
E. cDNA βιβλιοθήκη	5. in vitro
	6. Διάσπαση 3'-5' φωσφοδιεστερικών δεσμών

Προβλήματα

1. Να εξηγήσετε ποια από τις παρακάτω περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι κατάλληλη ως εργαλείο για την τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA:



2. Πρόσφατα παρασκευάστηκε ένα πλασμίδιο φορέας κλωνοποίησης που φέρει δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, την αμπικιλίνη και τη μπαρνάση. Το γονίδιο της μπαρνάσης κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που είναι τοξική για το βακτήριο *E. coli*. Στο μέσο του γονιδίου της μπαρνάσης βρίσκεται η μοναδική θέση αναγνώρισης για την EcoRI που υπάρχει σε αυτό το πλασμίδιο.

Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA με τα χαρακτηριστικά άκρα που δημιουργεί η EcoRI.

Να αναλύσετε με ποιο τρόπο επιλέχθηκαν τα βακτήρια *E. coli* που περιείχαν ανασυνδυσμένο πλασμίδιο, σε σχέση με αυτά που δεν περιείχαν πλασμίδιο και με αυτά που περιείχαν μη ανασυνδυσμένο πλασμίδιο.

3. Προκειμένου να κλωνοποιήσουμε επιλεγμένο τμήμα DNA (έχει κοπεί με το ένζυμο EcoRI), κατασκευάζουμε ένα τεχνητό πλασμίδιο που περιλαμβάνει: (α) γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη και (β) γονίδιο που κωδικοποιεί ένα ένζυμο που μετατρέπει μια άχρωμη ουσία σε μπλε. Το γονίδιο (β) περιλαμβάνει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Με την ολοκλήρωση όλων των σταδίων για την παρασκευή του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου με το επιθυμητό τμήμα DNA και την εισαγωγή του σε βακτήρια –ξενιστές που δεν έχουν πλασμίδια και είναι ευαίσθητα στα αντιβιοτικά προκύπτουν:

(1) άχρωμες αποικίες και (2) αποικίες χρώματος μπλε.

Σε ποια αποικία βακτηρίων περιέχεται το επιθυμητό τμήμα DNA;

4. Στα ακόλουθα σχήματα παρουσιάζονται:

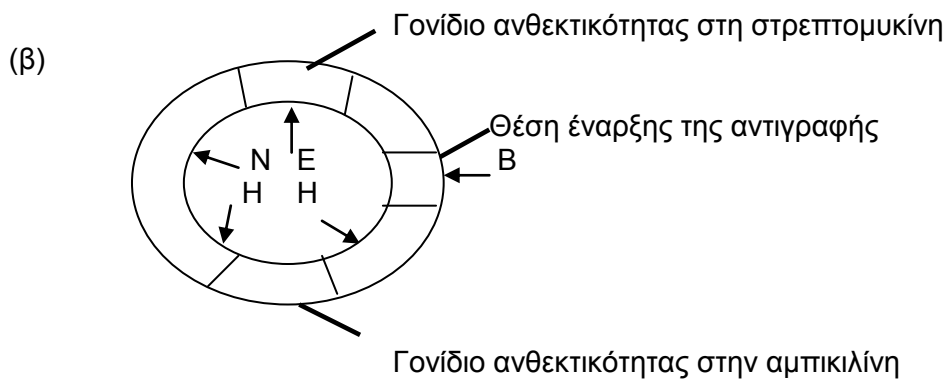
(α) τμήμα DNA προκαρυωτικού κυττάρου στο οποίο περιέχεται ένα γονίδιο και ο υποκινητής του (Y)

(β) πλασμίδιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης του ανωτέρω γονιδίου, με σκοπό την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί.

Το σημείο E δείχνει τη θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI. Τα σημεία B, N και H δείχνουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών BamHI, NotI, και HindIII αντίστοιχα.

1) ποια από τις δύο αλυσίδες του γονιδίου είναι η μη κωδική;

2) Ποιο από τα τέσσερα ένζυμα είναι καταλληλότερο για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA;

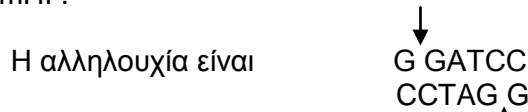


5. Ένα μόριο DNA ενός χρωμοσώματος, το οποίο απομονώθηκε από σωματικό κύτταρο ενός προβάτου, περιέχει 1000 γονίδια, ενώ καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του κυττάρου αυτού, παράγονται 300 διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

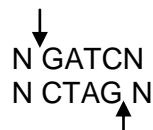
A) που μπορεί να οφείλεται αυτή η διαφορά στον αριθμό των γονιδίων και των πολυπεπτιδικών αλυσίδων;

B) Η επώαση αυτού του μορίου DNA με μία περιοριστική ενδονουκλεάση δημιουργεί διαφορετικό αριθμό θραυσμάτων από εκείνον που προκύπτει από την επώαση ενός μορίου DNA του ομόλογου χρωμοσώματος με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση. Για ποιο λόγο συμβαίνει αυτό;

6. Ένα πλασμίδιο περιέχει μια αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI .



Τμήμα DNA που περιέχει ένα γονίδιο που μας ενδιαφέρει πρόκειται να κλωνοποιηθεί στη θέση BamHI του πλασμιδίου. Το γονίδιο φέρει και στα δύο άκρα του την αλληλουχία GATC που αποτελεί θέση αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση Sau3A που κόβει όπως φαίνεται



α) Να σχεδιάσετε τα τμήματα που θα προκύψουν από την δράση του ενζύμου BamHI στο πλασμίδιο και από την δράση του ενζύμου Sau3A στο τμήμα του DNA β) Να σχεδιάσετε του ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

7. Ένας κλώνος ενός γονιδίου έχει την ακόλουθη αλληλουχία

AACGAATTCGATGGATCCA..602..νουκλεοτίδια...GGATCCGTAGAATTCACC

Στο γονίδιο υπάρχουν δύο θέσεις που αναγνωρίζονται από τις ενδονουκλεάσες



Να βρεθούν:

- (α) που αρχίζει και που τελειώνει η μεταγραφή;
- (β) πόσα νουκλεοτίδια έχει το μεταφραζόμενο τμήμα mRNA;
- (γ) ποιος είναι ο μεγαλύτερος αριθμός αμινοξέων που κωδικοποιεί το παραπάνω γονίδιο;
- (δ) ποιο ένζυμο πρέπει να χρησιμοποιήσουμε για να κλωνοποιήσουμε το γονίδιο;

8. Με τη μέθοδο του PCR κλωνοποιούμε ένα τμήμα που αποτελείται από 3000 νουκλεοτίδια και σταματάμε την διαδικασία όταν πάρουμε 30 αντίγραφα συνολικά

- α) Πόσος χρόνος μεσολάβησε για την παραγωγή των 30 αντιγράφων;
- β) πόσα νουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των παραπάνω αντιγράφων; (ο κάθε κύκλος αντιγραφής πραγματοποιείται σε 5 min).

ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ

A. Συμπλήρωση κενών

1. Μια ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών ονομάζεται-----
2. Η κατασκευή κατά προτίμηση μεγάλου αριθμού πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών ονομάζεται-----
3. Η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA στο κύτταρο ξενιστή ονομάζεται-----
4. Ένα τεχνητό μόριο DNA που περιέχει γονίδια από δύο ή και περισσότερους οργανισμούς ονομάζεται-----
5. Ειδικά ένζυμα που κόβουν το DNA σε συγκεκριμένα σημεία ονομάζονται -----
6. Ένα μόριο DNA, όπως ----- ή -----, με το οποίο ενώνεται το DNA που απομονώσαμε από έναν οργανισμό, ονομάζεται -----
7. Κύτταρα ξενιστές ονομάζουμε τα κύτταρα εκείνα μέσα στα οποία μπορεί να ----- και να ----- ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA
8. Η επιλογή των ----- βακτηρίων γίνεται με βάση την ανθεκτικότητά τους σε -----
9. Μια ----- βιβλιοθήκη δεν περιέχει τα εσώνια των γονιδίων που εκφράζονται σε ένα συγκεκριμένο ιστό
10. Η σύνδεση με δεσμούς υδρογόνου μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ονομάζεται -----.

B. Ερωτήσεις Σωστού- Λάθους

1. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες υδρολύουν όλους τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς σε ένα μόριο DNA
2. Κλώνος είναι μια ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών
3. Μετασηματισμός είναι η εισαγωγή τμήματος DNA από έναν οργανισμό σε φορέα κλωνοποίησης
4. Κατά τον μετασηματισμό ορισμένα βακτήρια δεν προσλαμβάνουν το ανασυνδυασμένο DNA
5. Ο αποχωρισμός των δύο αλυσίδων ενός μορίου DNA ονομάζεται αποδιάταξη

6. Το DNA του βακτηριοφάγου λ μπορεί να ενσωματώνει μεγαλύτερα κομμάτια ξένου DNA απ' ό,τι τα πλασμίδια.
7. Τα ιχνηθετημένα μόρια ανιχνευτές διαθέτουν συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων με ολόκληρο το κλωνοποιημένο DNA
8. Το ένζυμο EcoRI αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία βάσεων GAATTC μεταξύ A και G
9. Ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιούνται πλασμίδια ή RNA φάγοι
10. Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης PCR αντιγράφουμε ειδικές αλληλουχίες DNA in vitro.

Γ. Άσκηση

Κατά την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης ενός ανθρώπινου κυτταρικού ιστού απομονώθηκε ένα υβριδικό μόριο mRNA-cDNA. Η cDNA αλυσίδα του μορίου είχε την ακόλουθη αλληλουχία βάσεων:

.....TTATGGGTACTTTGAGCCCAAACCTATAGTATT

Αν το γονίδιο στο οποίο αντιστοιχεί η συγκεκριμένη αλυσίδα cDNA είναι συνεχές,

- α) να προσδιορίσετε την αλληλουχία και τα άκρα της μεταγραφόμενης αλυσίδας του
- β) να προσδιορίσετε τα κωδικόνια στην κωδική αλυσίδα του γονιδίου.

ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ενότητα: Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA, Κλωνοποίηση
Ημερομηνία:
Όνοματεπώνυμο:

Συμπληρώστε τις έννοιες που αντιστοιχούν στο νόημα των παρακάτω προτάσεων:

α) Πρωτεΐνες που υδρολύουν δίκλινα μόρια DNA σε συγκεκριμένες θέσεις:

β) Ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών: _____

γ) Μόριο DNA όπως πλασμίδιο ή DNA φάγου, το ποποίο χρησιμοποιείται για να μεταφέρει ένα τμήμα DNA σε ένα κύτταρο ξενιστή με σκοπό την κλωνοποίηση του:

δ) Τεχνητό μόριο DNA που περιλαμβάνει γονίδια, τα οποία προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς: _____

ε) Σύνολο βακτηριακών κλώνων που έχουν προκύψει από την απομόνωση του ολικού ώριμου mRNA που παράγεται από ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο:

στ) Δίκλινο μόριο νουκλεϊκού οξέος που αποτελείται από μία RNA και μία DNA αλυσίδα:

ζ) Ο αποχωρισμός των αλυσίδων της διπλής έλικας του DNA μετά από την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας, λόγω διάσπασης των δεσμών υδρογόνου που τις συγκρατούν:

Ερωτήσεις κατανόησης:

α) Να αναφέρετε δύο παραδείγματα ενζύμων που μπορούν να δράσουν τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*

β) Σε ποια σημεία του πλασμιδίου –φορέα κλωνοποίησης- δεν πρέπει να εντοπίζεται η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση με την οποία επιδρούμε;

γ) Ποια ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης δεν χρησιμοποιούνται για την κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών;

Κατερίνα Καλόσακα, Βιολόγος

δ) Πόσα διαφορετικά είδη δεσμών πρέπει να δημιουργηθούν προκειμένου να κατασκευαστεί ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA; Πως δημιουργείται κάθε είδος δεσμού κατά την κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA;

ε) Η χρήση ανιχνευτών βοηθά στην κατασκευή γονιδιωματικών ή cDNA βιβλιοθηκών; Αιτιολογείστε.

στ) Επιδρούμε σε ένα γραμμικό μόριο DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση (Π.Ε) EcoRI και προκύπτουν 2 θραύσματα. Όταν επιδρούμε στο ίδιο μόριο DNA με την Π.Ε. HindIII τότε προκύπτουν 3 θραύσματα. Πόσα θραύσματα θα προκύψουν αν επιδράσουμε ταυτόχρονα στο μόριο αυτό και με τις δύο Π.Ε. ταυτόχρονα; Πόσα γραμμικά τμήματα θα προέκυπταν αν το DNA ήταν κυκλικό;

η) Δύο δίκλινα μόρια DNA μήκους 10000 ζευγών βάσεων το κάθε ένα παρουσιάζουν τα εξής ποσοστά σε αζωτούχες βάσεις:

DNA	% A	%T	%C	%G
1 ^ο μόριο	20	20	30	30
2 ^ο μόριο	5	5	45	45

Ποιο από τα δύο μόρια απαιτεί την υψηλότερη θερμοκρασία για να αποδιαταχθεί;