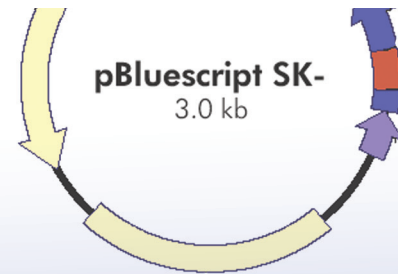


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA



ΟΡΟΛΟΓΙΑ – ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΘΕΩΡΙΑΣ

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR): Είναι μία μέθοδος που μας επιτρέπει να αντιγράψουμε επιλεκτικά (και επομένως να πολλαπλασιάσουμε), εκατομμύρια φορές συγκεκριμένες αλληλουχίες δίκλωνου DNA, ακόμα και όταν αυτές απαντούν σε απειροελάχιστη ποσότητα μέσα σε ένα σύνθετο μίγμα μορίων. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μία θερμοκρασία στην άλλη. Η όλη διαδικασία γίνεται *in vitro* (χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου), με συνέπεια να είναι ταχύτατη και κατά πολύ απλούστερη από τις κλασικές μεθόδους κλωνοποίησης μέσω βιβλιοθηκών (βλέπε για περισσότερες λεπτομέρειες την ανάλυση της μεθόδου στο ένθετο, σελ. 210).

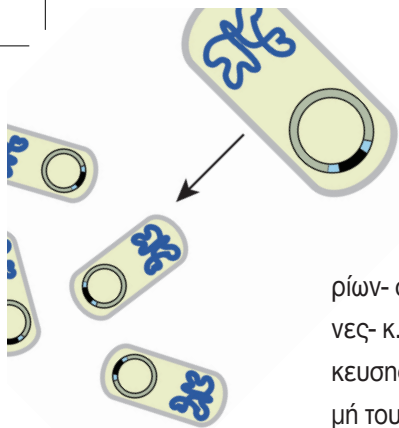


Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε από τον Dr. Kary Mullis στις αρχές της δεκαετίας του 1980 και θεωρήθηκε τόσο σημαντική για την προαγωγή της επιστήμης, ώστε το 1993 του απονεμήθηκε το βραβείο Nobel Χημείας.

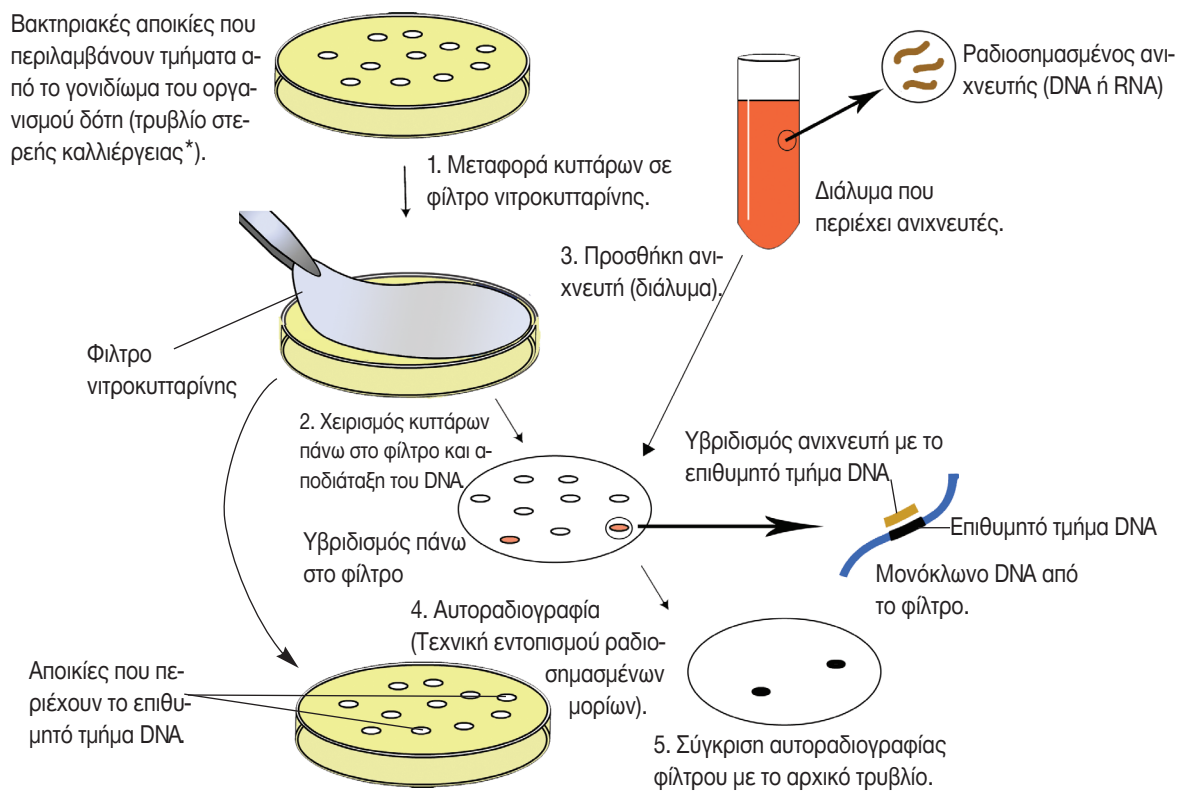
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ DNA: Ονομάζεται κάθε μόριο DNA που προέρχεται από τη σύνδεση (το συνδυασμό) αλληλουχιών DNA από άτομα του ίδιου ή διαφορετικών ειδών. Με άλλα λόγια, οποιοδήποτε μόριο DNA έχει προκύψει με τμήματα από διαφορετικές πηγές. Όπως είναι φανερό, σε ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA μπορεί να εδράζονται γονίδια διαφορετικών οργανισμών. (Βλέπε και Ανασυνδυασμός)

ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ: Ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο αλληλουχίες DNA προερχόμενες από το ίδιο ή διαφορετικά είδη, συνδέονται (συνδυάζονται) μεταξύ τους. Μπορεί να συμβεί *in vivo*, όπως στις περιπτώσεις κατά τις οποίες πλασμίδια ανταλλάσσουν τμήματα, είτε μεταξύ τους, είτε με το βακτηριακό χρωμόσωμα. Μπορεί επίσης να συμβεί *in vitro*, όταν με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και DNA δεσμάσης, σχηματίζονται «τεχνητά» μόρια DNA που περιέχουν αλληλουχίες προερχόμενες από άλλα μόρια του ίδιου ή διαφορετικών οργανισμών (βλέπε και Ανασυνδυασμένο DNA).

ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ: Ένα μόριο DNA ή RNA ή αντίσωμα (πρωτεΐνη), που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό μο-



ρίων- στόχων (γονιδίων, ρυθμιστικών περιοχών, πρωτεϊνών -τα αντισώματα αναγνωρίζουν πρωτεΐνες- κ.α.). Τα μόρια τα οποία χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές έχουν μικρό ή μεγάλο βαθμό εξειδίκευσης ως προς το μόριο - στόχο. Η εξειδίκευση τους ως προς το μόριο - στόχο οφείλεται στη δομή τους όπως για παράδειγμα ένα κλειδί είναι κατασκευασμένο ώστε να ταιριάζει σε μια συγκεκριμένη κλειδαριά. Συνήθως τα μόρια-ανιχνευτές είναι ιχνηθετημένα, φέρουν δηλαδή ένα επιπλέον τμήμα ώστε να είναι ορατά (και συνεπώς μέσω αυτών και το μόριο - στόχος) μέσω κατάλληλων τεχνικών (όπως χρώμα, φθορισμός κ.λπ.). Η διαδικασία ένωσης των ανιχνευτών με συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων ονομάζεται **υβριδοποίηση** (βλέπε ένθετο σχ. βιβλίου, σελ. 180).



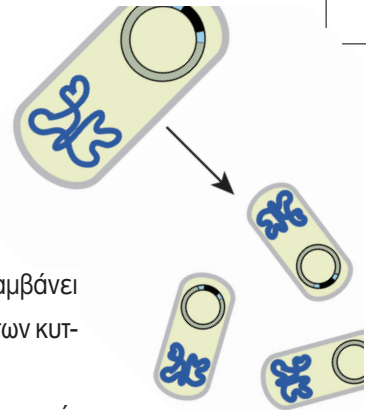
Εικόνα 59: Υβριδοποίηση και εντοπισμός επιθυμητού τμήματος DNA από βιβλιοθήκη (μικροσκοπικά). (Βλέπε εικ. 62)

ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΟΥ DNA: Το φαινόμενο κατά το οποίο, λόγω έκθεσης ενός μορίου DNA σε υψηλή θερμοκρασία ή επεξεργασίας του με κατάλληλες χημικές ουσίες, σπάνε οι ασθενείς δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται αυθόρμητα μεταξύ των νουκλεοτιδίων του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διαχωρίζονται μεταξύ τους οι δύο κλώνοι του.



Γενικότερα, αποδιάταξη ενός βιομορίου ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο το βιομόριο χάνει τη φυσική του διαμόρφωση στο χώρο, επειδή σπάνε οι ασθενείς (συγκριτικά με τους ομοιολογικούς) δεσμοί που αυθόρμητα, αναπτύσσονται μεταξύ ορισμένων χημικών ομάδων του.

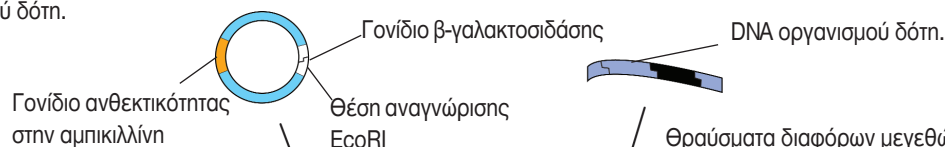
* Για τις τεχνικές καλλιέργειας των μικροοργανισμών στο εργαστήριο βλέπε κεφ. 7 και ένθετο σχ. βιβλίου σελ. 174.



ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ: Πρόκειται για τον τομέα της επιστήμης της Βιολογίας, ο οποίος περιλαμβάνει το σύνολο των τεχνικών που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος, για να επεμβαίνει στο γενετικό υλικό των κυττάρων και κατ' επέκταση των οργανισμών.

ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ: Το σύνολο των τμημάτων DNA, του γονιδιώματος ενός οργανισμού, που έχουν κλωνοποιηθεί σε φορείς κλωνοποίησης (πλασμίδια ή DNA φάγων) και υπάρχουν μέσα σε διακριτές οντότητες (βακτήρια ή βακτηριοφάγους αντίστοιχα).

1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και DNA οργανισμού δότη.



2. Κόψιμο και των δύο DNA με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση.

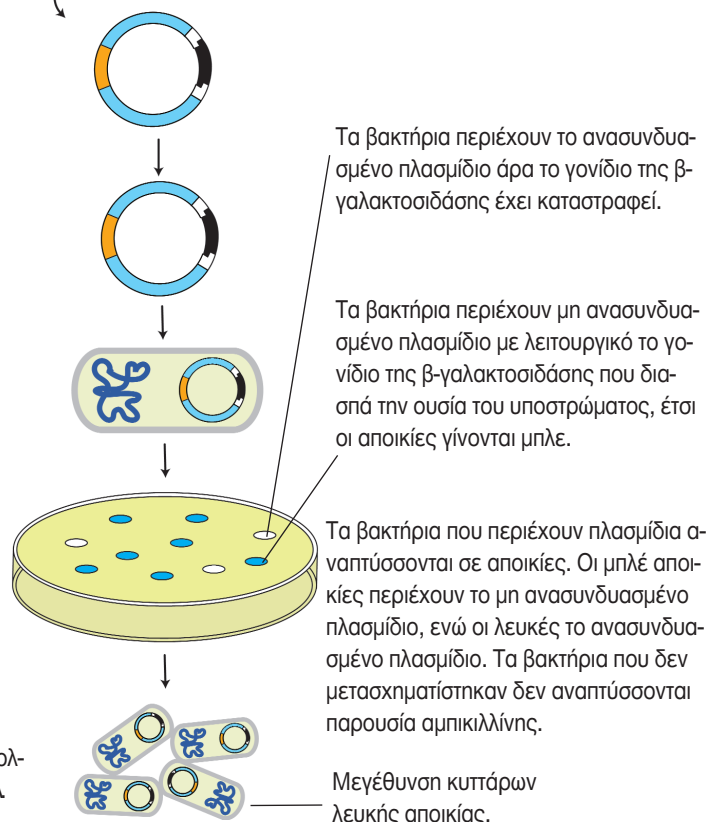
3. Ανάμιξη των δύο διαλυμάτων των DNA. Τα θραύσματα του γονιδιώματος του δότη, έχουν συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα με τα πλασμίδια.

4. Προσθήκη DNA δεσμάσης και δημιουργία ανασυνδυσμένου DNA

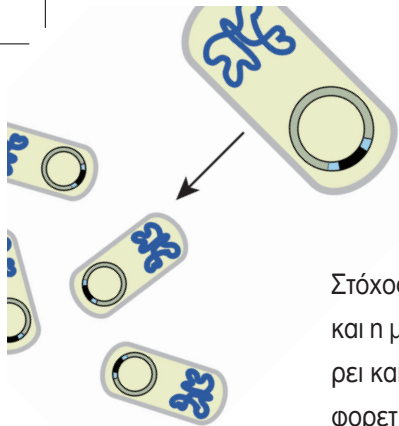
5. Μετασχηματισμός. Εισαγωγή των ανασυνδυσμένων DNA σε βακτήρια.

6. Επίστρωση των βακτηρίων σε στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει αμικικιλίνη και κατάλληλη ουσία που όταν διασπάται δίνει μπλε χρώμα. Επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία.

7. Τα βακτήρια καθώς αναπτύσσονται πολλαπλασιάζουν το ανασυνδυσμένο DNA



Εικόνα 60: Γονιδιωματική βιβλιοθήκη.



Στόχος της δημιουργίας της βιβλιοθήκης είναι η αποθήκευση, ο πολλαπλασιασμός, η απομόνωση, και η μελέτη ενός τμήματος DNA. Αν το τμήμα αυτό είναι γονίδιο, τότε είναι πιθανό να μας ενδιαφέρει και η λειτουργική έκφραση του, σε συγκεκριμένα κύτταρα, ιστούς, όργανα κ.ά. του ίδιου ή διαφορετικού είδους οργανισμού.

Ένα τμήμα DNA του γονιδιώματος ενός οργανισμού, του οποίου έχουμε κατασκευάσει τη γονιδιωματική του βιβλιοθήκη, υπάρχει μέσα σε τρυβλία σε τόσα αντίγραφα, όσοι είναι οι φορείς κλωνοποίησης που το φέρουν.

Έστω για παράδειγμα ότι μέσα σε κάθε βακτήριο ξενιστή υπάρχουν 3 αντίγραφα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με ένα τμήμα DNA του γονιδιώματος και κάθε αποικία των βακτηριών αποτελείται από περίπου 10^6 βακτήρια, τότε έχουμε στο τρυβλίο 3×10^6 αντίγραφα του κλωνοποιημένου αυτού τμήματος του γονιδιώματος του οργανισμού.

Είναι φανερό ότι η γονιδιωματική βιβλιοθήκη ενός οργανισμού (π.χ. φυτού), που έχει το σύνολο του γονιδιώματος είναι η ίδια, ανεξάρτητα του ιστού που έχει απομονωθεί το γονιδιωματικό DNA (ρίζα, φύλλα, βλαστός κ.α.). Από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη μπορούμε να προσδιορίσουμε με ακρίβεια το είδος του οργανισμού. Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη εκτός από τα γονίδια περιέχει και διαγονιδιακές περιοχές του γονιδιώματος, τα κεντρομερίδια και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες.

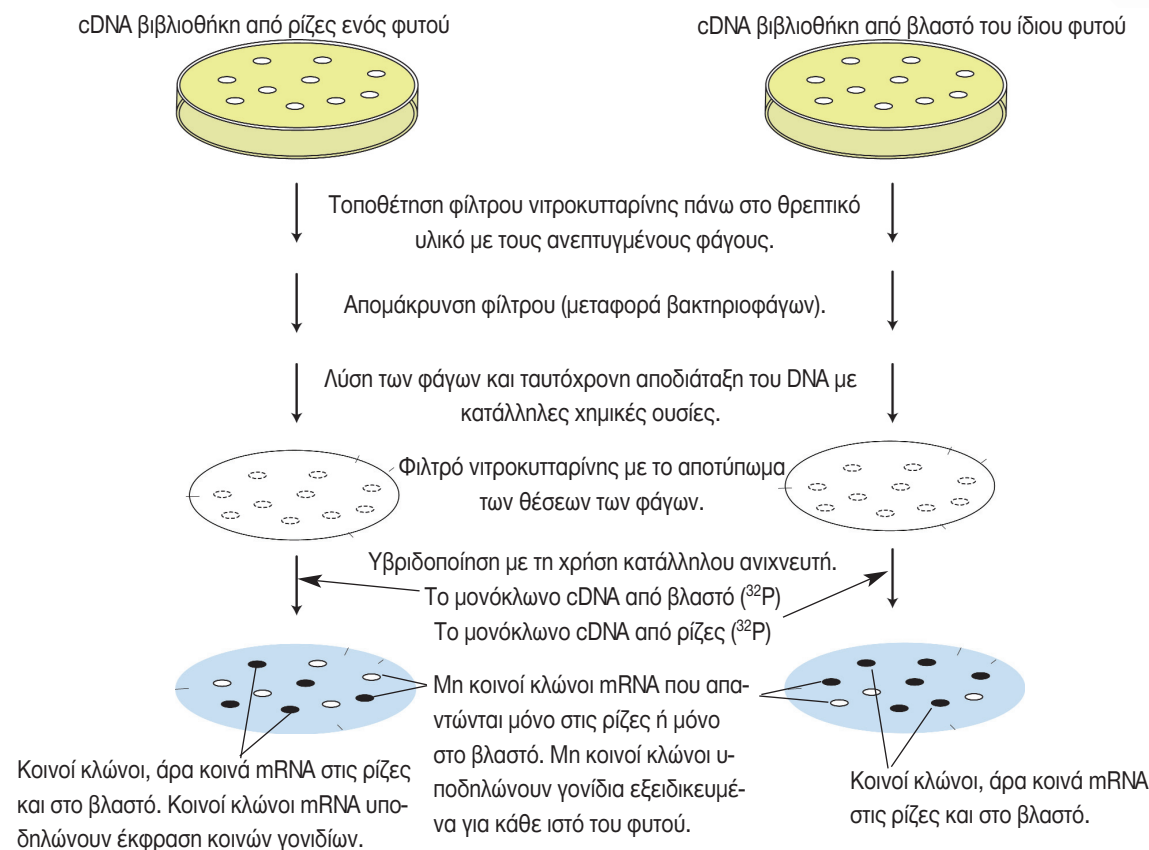
cDNA: Πρόκειται για ένα μονόκλωνο μόριο DNA το οποίο κατασκευάστηκε με μήτρα ένα μόριο RNA. Έτσι, το συγκεκριμένο cDNA είναι συμπληρωματικό του RNA από το οποίο προήλθε. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης (*βλέπε και ds-cDNA*).

cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ: Μία συλλογή κλώνων (π.χ. βακτηριακών ή φαγικών) στην οποία περιέχονται με τη μορφή του ds-cDNA, όλα τα γονίδια που μεταγράφονται στα κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της (*βλέπε επίσης cDNA και ds-cDNA*). Η cDNA βιβλιοθήκη αποτελείται μόνο από τα γονίδια τα οποία εκφράζονται την στιγμή της κατασκευής της και όχι από το σύνολο των γονιδίων του κυτταρικού γονιδιώματος. Αυτό συμβαίνει διότι για την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης χρησιμοποιείται το συνολικό mRNA του κυττάρου και, συνεπώς, μόνο τα εκφραζόμενα (ενεργά) εκείνη τη στιγμή στο κύτταρο γονίδια αντιπροσωπεύονται από mRNA στο κυτταρόπλασμα.

Η cDNA βιβλιοθήκη δημιουργείται αξιοποιώντας δύο χαρακτηριστικές ιδιότητες:

- την δυνατότητά μας να απομονώνουμε εκλεκτικά μόνο τα ώριμα mRNA από το εκχύλισμα των υπό μελέτη κύτταρων (αφορά στα ευκαρυωτικά κύτταρα) και
- τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης των ρετροϊών, η οποία μπορεί να συνθέσει DNA (cDNA) με μήτρα mRNA.

Το περιεχόμενο μιας cDNA βιβλιοθήκης μπορεί να διαφέρει σε κύτταρα του ίδιου ιστού σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, ενώ διαφέρει και μεταξύ κύτταρων που προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς του ίδιου οργανισμού. Η διαφοροποίηση αυτή των περιεχομένων μιας cDNA βιβλιοθήκης δικαιολογείται ακριβώς από το φαινόμενο της κυτταρικής διαφοροποίησης.



Εικόνα 61: Σύγκριση cDNA βιβλιοθηκών από διαφορετικά μέρη ενός φυτού.

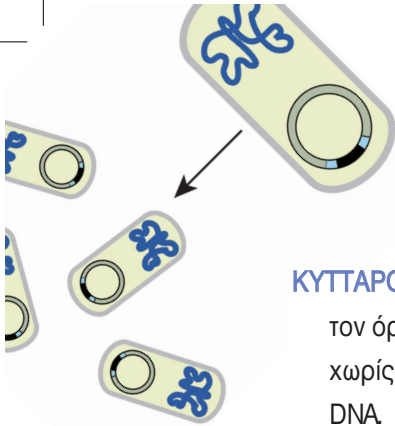
ds-cDNA: Πρόκειται για ένα δίκλωνο μόριο DNA. Μπορεί να προκύπτει από τη χρησιμοποίηση ενός cDNA ως μήτρα. Για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας *in vitro* χρησιμοποιείται μια DNA πολυμεράση (βλέπε και cDNA).

ΕΤΕΡΟΛΟΓΟ DNA: Το «ξένο» DNA.

ΚΛΩΝΟΣ: Ένα σύνολο πανομοιότυπων μορίων (π.χ. τα αντίγραφα του PCR), κυττάρων ή οργανισμών. Ο πληθυσμός των πανομοιότυπων κυττάρων ή οργανισμών παράγεται από επαναλαμβανόμενες, μη αμφιγονικές, διαιρέσεις ενός μόνο κυττάρου ή οργανισμού π.χ. τα κύτταρα μιας βακτηριακής αποικίας.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ: Ονομάζεται η διαδικασία παραγωγής μιας ομάδας από πανομοιότυπα αντίγραφα (κατά προτίμηση σε μεγάλο αριθμό), ενός μορίου ή ενός κυττάρου ή ενός οργανισμού. **Δηλαδή είναι η διαδικασία παραγωγής κλώνων.**

Ειδικότερα, κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA μπορεί να γίνει *in vitro* (PCR) ή *in vivo* (φυσιολογικά ή με βιβλιοθήκες). *In vivo* κλωνοποίηση είναι ο πολλαπλασιασμός του μέσα στο ίδιο ή διαφορετικό κύτταρο ξενιστή. Το τμήμα αυτό του DNA μπορεί να μεταβιβάζεται σε επόμενες γενεές του ξενιστή. Η κλωνοποίηση του DNA επιτρέπει την απομόνωση, το χαρακτηρισμό και την ανάλυση κάποιου τμήματος του γονιδιώματος ή του cDNA, την εύρεση της αλληλουχίας των βάσεων, την ταυτοποίηση των κωδικονίων, άρα και την εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια. Επίσης η κλωνοποίηση επιτρέπει και την εύρεση των ρυθμιστικών περιοχών της έκφρασης των γονιδίων, όπως είναι π.χ. η αλληλουχία ενός υποκινητή.



ΚΥΤΤΑΡΟ ΞΕΝΙΣΤΗΣ: Στα πλαίσια της τεχνολογίας του ανασυνδυσασμένου DNA, χρησιμοποιούμε τον όρο αυτό, αναφερόμενοι σε ένα κύτταρο στο οποίο έχει εισαχθεί και φιλοξενείται, συνήθως χωρίς να εκφράζεται, κάποιο ετερόλογο (ξένο ως προς το γονιδίωμα του οργανισμού) μόριο DNA.



Η μοριακή βιολογία έχει δανειστεί τον όρο «ξενιστής» από την παρασιτολογία. Ως ξενιστής στην παρασιτολογία, αναφέρεται ένα κύτταρο ή ένας οργανισμός που φέρει κάποιο παράσιτο. Ένας ασθενής με AIDS π.χ., είναι ένας ξενιστής του ιού HIV.

Λ-ΦΑΓΟΣ: Είναι ένας βακτηριοφάγος, το γενετικό υλικό του οποίου χρησιμοποιείται στην γενετική μηχανική ως φορέας κλωνοποίησης. Ο λ-φάγος αποτελείται από ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA, το οποίο περιέχει 48.514 ζεύγη βάσεων, των οποίων σήμερα γνωρίζουμε την αλληλουχία. Σε κάθε άκρο του μορίου υπάρχουν 12 βάσεις που σχηματίζουν κολλώδη (μονόκλωνα) άκρα. Αμέσως μόλις το γενετικό υλικό του λ-φαγού εισέλθει στο βακτήριο-ξενιστή κυκλοποιείται εξαιτίας των κολλωδών άκρων του με την βοήθεια της DNA δεσμάσης του βακτηριακού κυττάρου.

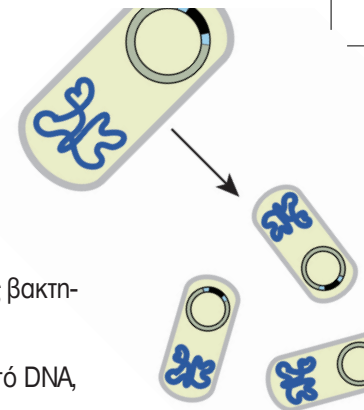
Προκειμένου το μόριο DNA του φαγού να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης, αφαιρούνται τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον λυσιγόνο κύκλο ζωής του (ώστε να μην είναι βλαπτικός για το βακτηριακό κύτταρο - ξενιστή) και στην θέση τους γίνεται ένθεση του επιθυμητού (ετερόλογου) τμήματος DNA, το οποίο θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το τμήμα αυτό του DNA μπορεί να προέρχεται από οποιαδήποτε πηγή (π.χ. καλαμπόκι) αλλά θα πρέπει να έχει μέγεθος της τάξεως των 20.000 ζευγών βάσεων, όσο περίπου και το τμήμα του γονιδιώματος του φαγού που αφαιρέθηκε.

ΛΥΣΙΓΟΝΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ: Κατά τον λυσιγονικό κύκλο ζωής του ο φάγος συνυπάρχει με τον ξενιστή του, ενσωματώνοντας το γενετικό του υλικό στο χρωμοσωμικό γενετικό υλικό του ξενιστή του. Η ενσωματωμένη μορφή του φαγού ονομάζεται πρόφαγος. Με αυτή τη μορφή ο φάγος μπορεί να περνάει από τη μια βακτηριακή γενεά στην άλλη, ώσπου να διεγερθεί από κάποιον παράγοντα, να αποσχιστεί από το βακτηριακό χρωμόσωμα και να αρχίσει λυτικό κύκλο (βλέπε εικόνα 56, κεφ. 3, σελ. 171).

ΛΥΤΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ: Κατά το λυτικό κύκλο ζωής τους οι ιοί, εισάγουν το γενετικό τους υλικό μέσα στο βακτήριο, αμέσως μετά καταστρέφουν το DNA του ξενιστή και δίνουν εντολή για την παραγωγή νέων ιών και λυσοζύμης. Το ένζυμο αυτό καταστρέφει τελικά το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα με σκοπό την απελευθέρωση των απόγονων φάγων. Με σκοπό την αντιμετώπιση των φάγων, τα βακτήρια παράγουν περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες καταστρέφουν (κόβουν) το φαγικό DNA μόλις εισαχθεί στο βακτηριακό κύτταρο (βλέπε εικόνα 57, κεφ. 3, σελ. 172).

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ: Ο όρος χρησιμοποιείται από το σχολικό βιβλίο με δύο διαφορετικές, συγγενικές όμως, σημασίες:

1. Μετασχηματισμός ονομάζεται η διαδικασία εισαγωγής DNA σε ένα βακτήριο (βλέπε σχ. βιβλίο, σελ. 57 και 59) και



2. Μετασχηματισμός ονομάζεται το φαινόμενο της μεταβολής των γενετικών ιδιοτήτων ενός βακτηρίου, λόγω της εισαγωγής σε αυτό DNA (βλέπε σχ. βιβλίο, σελ. 18 και 193).

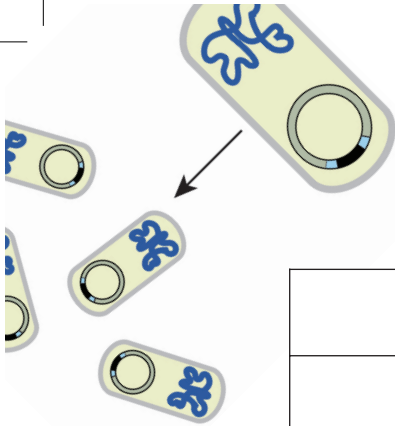
Όταν λοιπόν λέμε πως ένα βακτήριο μετασχηματίστηκε, εννοούμε είτε ότι εισήχθη σε αυτό DNA, είτε ότι απέκτησε καινούριες γενετικές ιδιότητες λόγω της εισαγωγής σε αυτό DNA.



Προκείμενου να αποφύγουμε πιθανή σύγχυση, κατά τη χρησιμοποίηση του όρου «μετασχηματισμός», ακολουθούμε τον ορισμό του σχολικού βιβλίου, αν και είναι ανακριβής. Ο όρος μετασχηματισμός αναφέρεται στην πρόσληψη «γυμνού» DNA, όταν αυτό προστίθεται σε ένα εναιώρημα βακτηρίων. Όταν εισάγεται σε ένα βακτήριο DNA μέσω κάποιου φάγου, τότε το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **μεταγωγή** και όχι μετασχηματισμός. Ανεξάρτητα από τα παραπάνω, όπως αναφέρει και το σχολικό βιβλίο στη σελ. 193, ο όρος μετασχηματισμός χρησιμοποιείται επίσης για να περιγράψει τη μετατροπή ενός φυσιολογικού ευκαρυωτικού κυττάρου σε καρκινικό. Συχνά λοιπόν λέμε ότι π.χ. ένα ανθρώπινο κύτταρο μετασχηματίστηκε, εννοώντας ότι τροποποιήθηκαν οι γενετικές του ιδιότητες με αποτέλεσμα να μετατραπεί σε καρκινικό.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ: Ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες δίκλωνου DNA με μήκος 4 - 8 νουκλεοτιδίων και πέττουν (κόβουν) το μόριο του DNA σε συγκεκριμένο σημείο εντός του ορίου των αλληλουχιών αυτών. Με τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών δημιουργούνται τμήματα DNA με χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα (για κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση) μονόκλωνα άκρα (κολλώδη άκρα). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται από βακτήρια και αποτελούν μέρος του βιοχημικού οπλοστασίου άμυνας των βακτηρίων απέναντι σε μόρια ξένου DNA. Με την δράση των ενζύμων αυτών το ξένο DNA το οποίο θα εισβάλει στο βακτηριακό κύτταρο κόβεται σε θραύσματα και έτσι καθίσταται μη λειτουργικό. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες απομονώνονται από βακτήρια με βιοχημικές μεθόδους και αποτελούν σημαντικά εργαλεία της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA επειδή από τη μια παράγουν μονόκλωνα κολλώδη άκρα, μέσω των οποίων τα τμήματα του DNA που επεξεργαζόμαστε μπορούν να επανασυνδεθούν και από την άλλη τα τμήματα που προκύπτουν από τη δράση τους έχουν μέγεθος ικανό για κλωνοποίηση. Αξίζει να σημειώσουμε ότι υπάρχουν και κάποιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες που κόβουν κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να δημιουργούν δίκλωνα άκρα (τυφλά άκρα).

Περιοριστική Ενδονουκλεάση	Μικροοργανισμός προέλευσης	Αλληλουχία αναγνώρισης στο δίκλωνο DNA
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'G↓AATTC3' 3'CTTAA↑G5'
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'G↓CCTGGC3' 3'CGGACC↑G5'
<i>HindII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'GTG↓TAC3' 3'CACTATG5'
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'A↓AGCTT3' 3'TTCA↑TA5'



<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'GG↓CC3' 3'CC↑GG5'
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5'C↓CGG3' 3'CCG↑G5'
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	5'CTGCA↓G3' 3'G↑ACGTC5'
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	5'CCC↓GGG3' 3'GGG↑CCC5'
<i>BamI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'G↓GATCC3' 3'CCTAG↑G5'
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globiggi</i>	5'A↓GATCT3' 3'TCTAG↑A5'

Πίνακας 3: Είδη διαφορετικών περιοριστικών ενδονουκλεασών, οι μικροοργανισμοί από τους οποίους απομονώθηκαν για πρώτη φορά (προσέξτε το όνομα του ένζυμου και του μικροοργανισμού προέλευσης) και οι παλίνδρομες (οι δυο κλώνοι έχουν την ίδια αλληλουχία νουκλεοτιδίων με αντιπαράλληλο προσανατολισμό) αλληλουχίες του δίκλωνου DNA που αναγνωρίζουν και κόβουν τα περιοριστικά αυτά ένζυμα.

ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ: Μικρό κυκλικό βακτηριακό εξωχρωμοσωμικό μόριο DNA, που αντιγράφεται ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό μόριο DNA του βακτηρίου και φέρει συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή /και γονίδια μεταφοράς σε άλλους οργανισμούς καθώς και γονίδια ανταλλαγής μεταξύ μορίων γενετικού υλικού (βλέπε εικόνα 64).

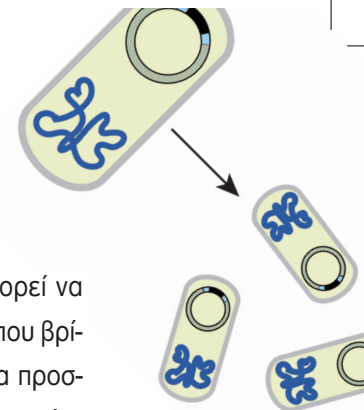
ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ: Ο προσδιορισμός πάνω σε ένα μόριο DNA των αλληλουχιών που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες και η απεικόνιση του μορίου και των σημείων αυτών (θέσεις περιορισμού) με ένα απλό σχήμα (βλέπε εφαρμογή σελ. 246).

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA: Με τον όρο αυτό αναφερόμαστε στην δημιουργία νέων συνδυασμών του γενετικού υλικού με την εισαγωγή, τροποποίηση ή απάλειψη τμημάτων νουκλεϊκών οξέων που δομούνται ή παράγονται, με οποιονδήποτε τρόπο εκτός κυττάρου. Οι δομήσεις αυτές γίνονται με την βοήθεια κάποιου πλασμιδίου ή ιού. Η προκύπτουσα δομή, αν και δεν υπάρχει φυσιολογικά, επιτρέπει την ενσωμάτωση μέσα στον οργανισμό ξενιστή στον οποίο μπορεί να συνεχίσει να πολλαπλασιάζεται και να μεταβιβάζεται στην επόμενη γενεά. Η ενσωμάτωση του ανασυνδυασμένου DNA μπορεί να γίνει μέσα στον ίδιο οργανισμό από τον οποίο έχει προέλθει το γενετικό υλικό ή σε οργανισμό διαφορετικού είδους.

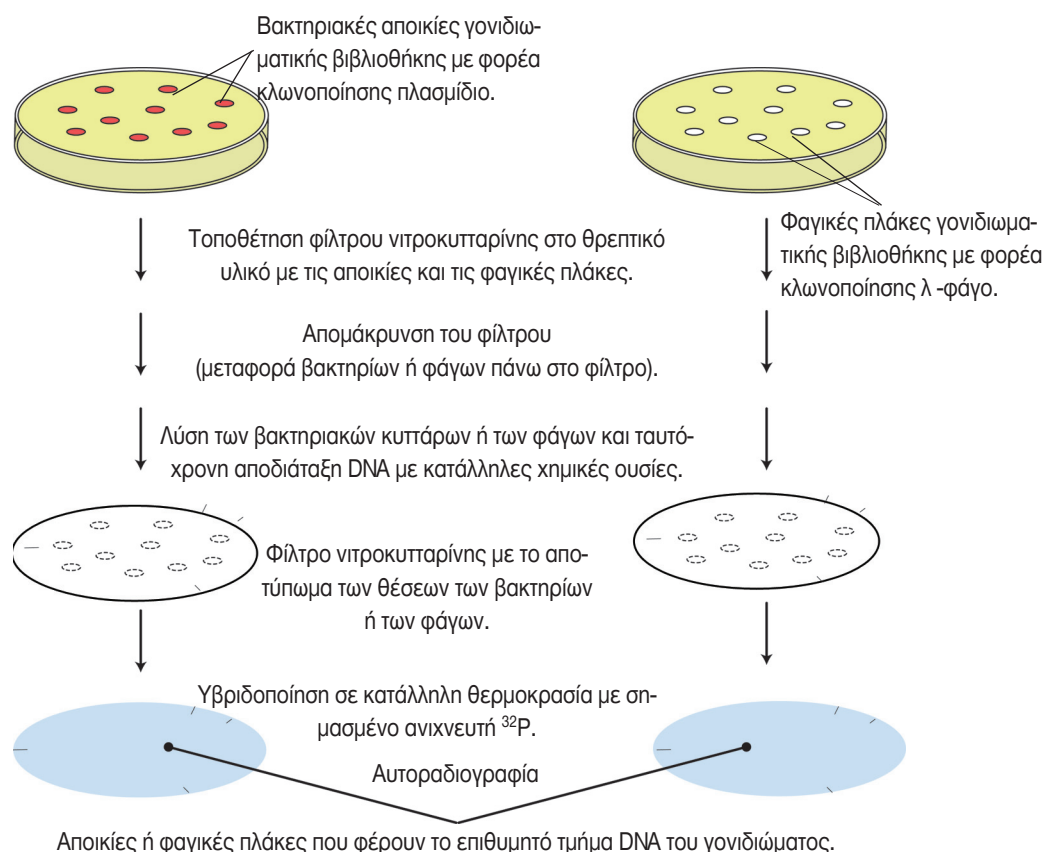
ΤΕΧΝΗΤΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ DNA: Το μόριο DNA που κατασκευάζεται τεχνητά και περιέχει γονίδια από δύο ή περισσότερους οργανισμούς.

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Η σύνδεση δυο μονόκλωνων αλυσίδων DNA ή DNA – RNA ή RNA – RNA με υδρογονικούς δεσμούς, σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κλώνων γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης.

Ο υβριδισμός συγκεκριμένων τμημάτων είναι μια αναλυτική μέθοδος χαρτογράφησης γονιδίων



πάνω σε έναν περιοριστικό χάρτη ενός τμήματος DNA. Η αναλυτική αυτή μέθοδος μπορεί να προσδιορίσει ένα συγκεκριμένο γονίδιο από ολόκληρο το υπόλοιπο γονιδιωματικό DNA, που βρίσκεται μια φορά μέσα στο γονιδίωμα του οργανισμού δοτή. Σε επίπεδο RNA, μπορεί να προσδιορίσει την έκφραση κάποιου συγκεκριμένου γονιδίου από την πληθώρα των mRNA που υπάρχουν μέσα στο κύτταρο, στο όργανο ή το αναπτυξιακό στάδιο (βλέπε εικ. 59).



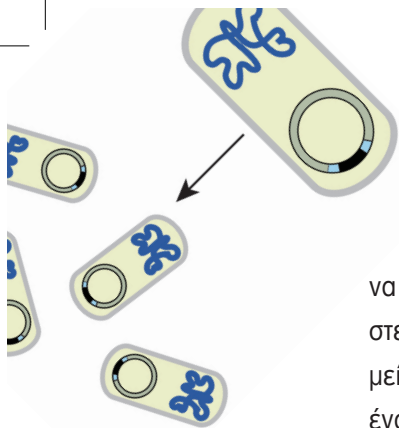
Ακολουθεί απομόνωση και καλλιέργεια βακτηρίων ή φάγων που φέρουν το επιθυμητό τμήμα του DNA. Έτσι είναι δυνατό από ένα τρυβλίο με 500 κλώνους να ξεχωρίζουμε και να απομονώνουμε τον κλώνο που φέρει το επιθυμητό τμήμα DNA.

Εικόνα 62: Υβριδοποίηση και εντοπισμός επιθυμητών κλώνων από βιβλιοθήκη (μακροσκοπικά).

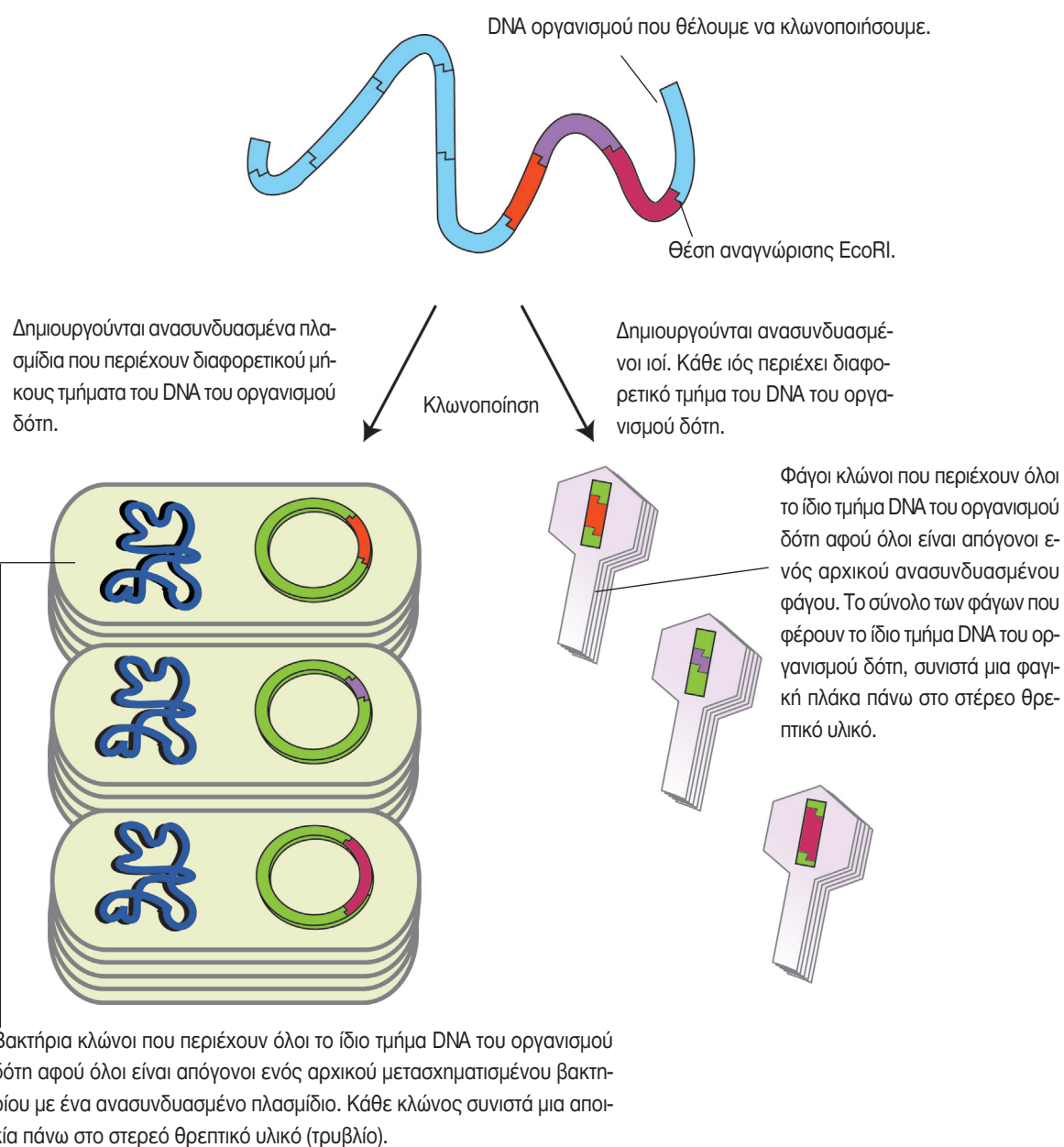
ΦΟΡΕΑΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: Οι φορείς κλωνοποίησης είναι μόρια DNA που μπορούν να αυτοδιπλασιάζονται ανεξάρτητα από το κυρίως μόριο DNA σε ένα κύτταρο - ξενιστή όπως (συνήθως) ένα βακτήριο και χρησιμοποιούνται για να μεταφέρουν στο κύτταρο - ξενιστή τμήματα DNA (τα οποία έχουν ενσωματώσει), με σκοπό την κλωνοποίησή τους. Οι συνθετικότερα χρησιμοποιούμενοι φορείς κλωνοποίησης είναι τα πλασμίδια και το DNA βακτηριοφάγων.

Ένας φορέας κλωνοποίησης όταν είναι πλασμίδιο πρέπει απαραίτητα να διαθέτει:

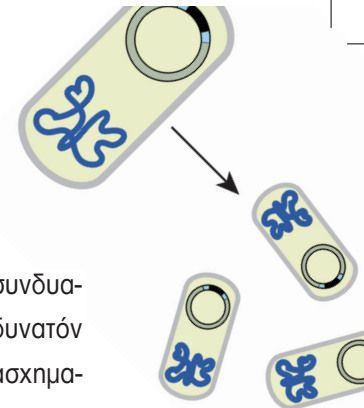
- Μια θέση έναρξης της αντιγραφής ώστε να αυτοδιπλασιάζεται.
- Μια και μοναδική θέση αναγνώρισης από μια ορισμένη περιοριστική ενδονουκλεάση, ώστε



να πέπτεται μόνο μια φορά από αυτήν την περιοριστική ενδονουκλεάση. Έτσι θα ανοίγει ώστε να εισαχθεί (ενθεθεί) σε αυτό το επιθυμητό ετερόλογο τμήμα DNA σε συγκεκριμένο σημείο του πλασμιδίου χωρίς όμως το πλασμίδιο να καταστρέφεται (σκεφτείτε τι θα γινόταν αν ένα πλασμίδιο είχε δύο ή περισσότερες θέσεις αναγνώρισης από μια συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση: θα κοβόταν σε δύο ή περισσότερα τμήματα χωρίς βεβαίως τη δυνατότητα να επανασυναρμολογηθεί σωστά).



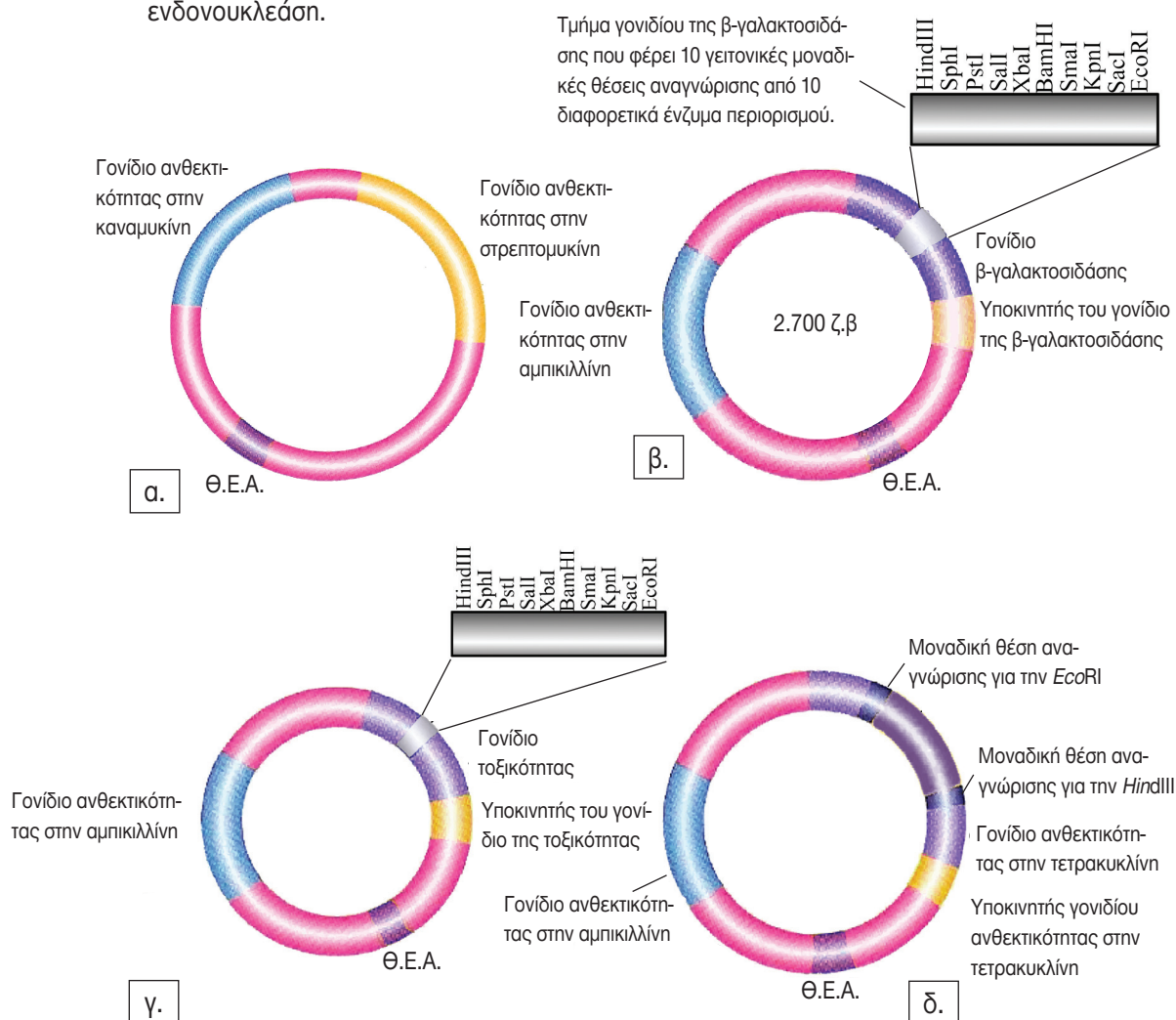
Εικόνα 63: Τμήματα γενετικού υλικού σε φορείς κλωνοποίησης (βιβλιοθήκες).



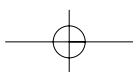
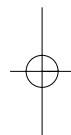
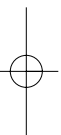
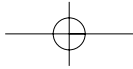
- Κατάλληλα γονίδια τα οποία να του προσδίδουν ιδιότητες τέτοιες ώστε, όταν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έχει μετασχηματίσει κάποιο κύτταρο ξενιστή, το τελευταίο να είναι δυνατόν να επιλέγει μεταξύ των υπόλοιπων που δεν έχουν μετασχηματιστεί ή που έχουν μετασχηματιστεί αλλά δεν έχουν δεχθεί το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

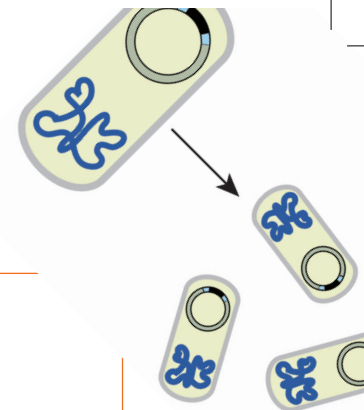
Τέτοιοι συνδυασμοί γονιδίων είναι:

- Δυο γονίδια ανθεκτικότητας σε δυο διαφορετικά αντιβιοτικά, ένα εκ των οποίων διαθέτει μια θέση αναγνώρισης από ορισμένη περιοριστική ενδονουκλεάση και το άλλο όχι.
- Ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό και το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, που φέρει και μια θέση αναγνώρισης μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης.
- Ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό και ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια τοξική πρωτεΐνη για τον ξενιστή. Το τελευταίο γονίδιο φέρει θέση αναγνώρισης για μια περιοριστική ενδονουκλεάση.



Εικόνα 64: Διάφοροι τύποι πλασμιδιακών φορέων κλωνοποίησης.

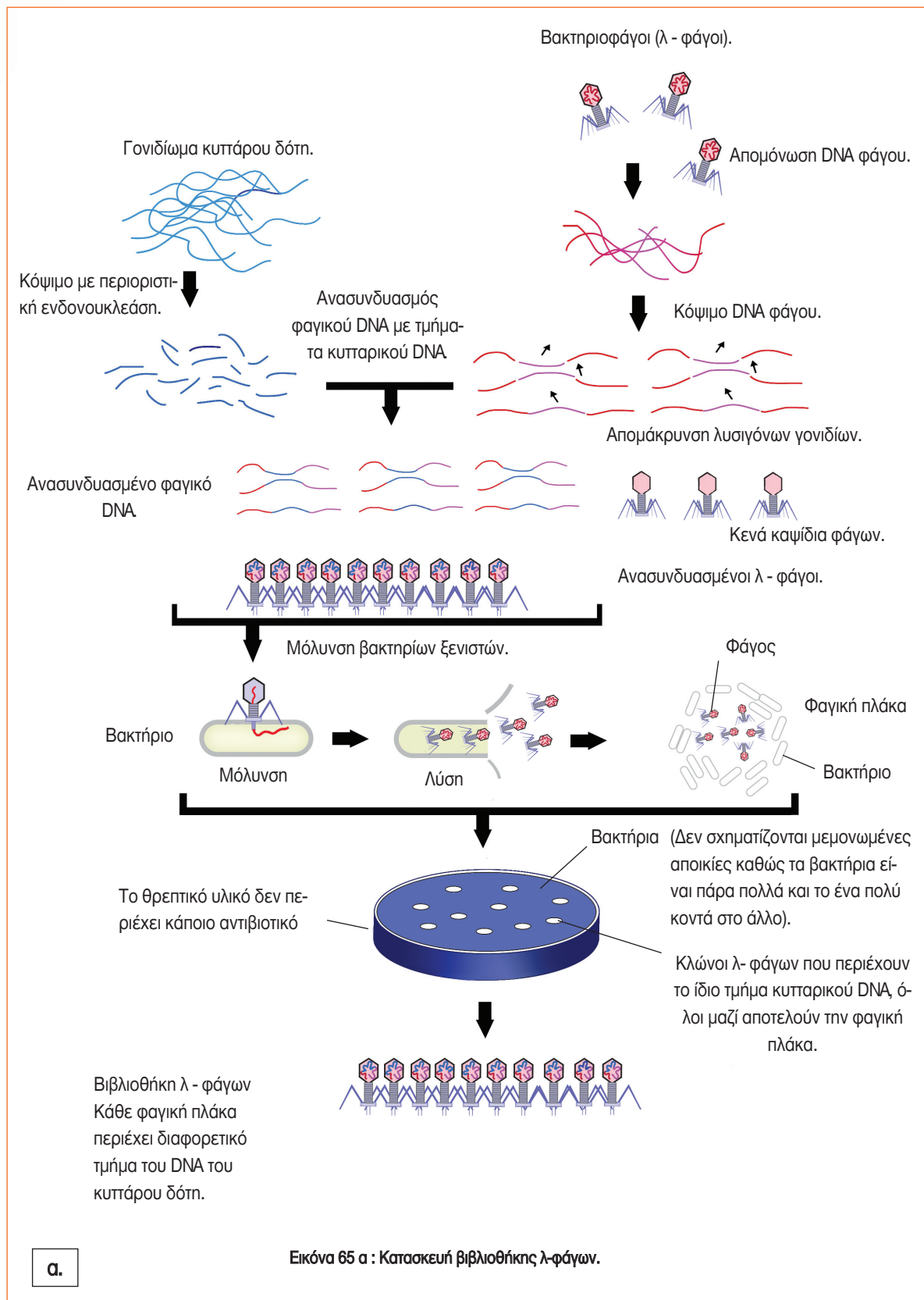


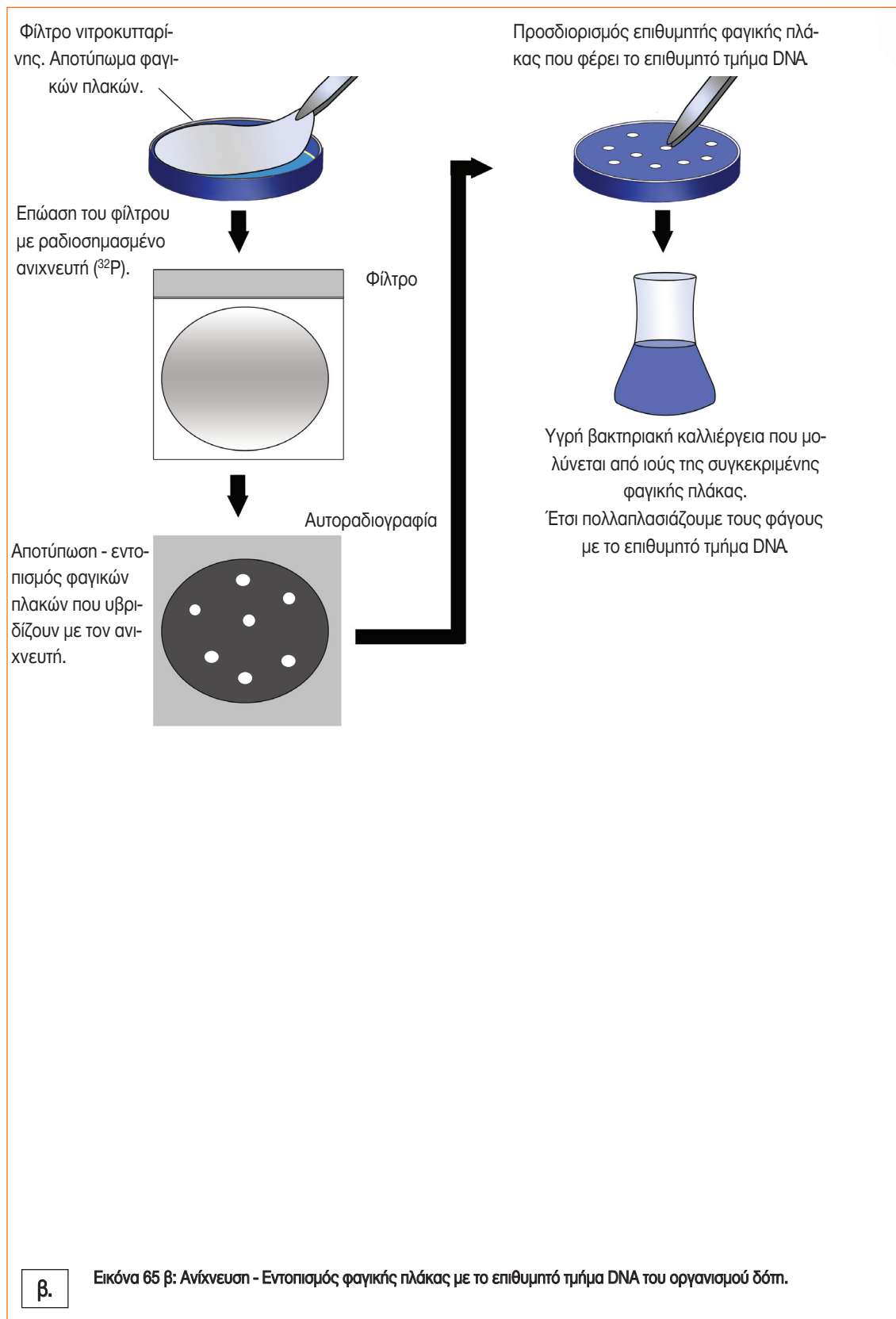


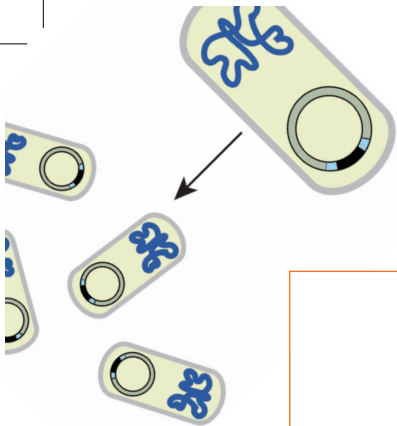
ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΜΕ ΦΟΡΕΙΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ λ-ΦΑΓΟΥΣ

Για να δημιουργήσουμε μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη ενός οργανισμού με φορείς κλωνοποίησης λ-φάγους, αρχικά απομονώνουμε το DNA από τον οργανισμό δότη και από τους φάγους. Το DNA του οργανισμού που θέλουμε να κλωνοποιηθεί κόβεται με μια περιοριστική ενδονουκλεάση. Με το ίδιο ένζυμο κόβεται και το DNA του βακτηριοφάγου λ. Το DNA του φάγου είναι γραμμικό και έχει τροποποιηθεί ώστε να κόβεται σε δύο θέσεις. Έτσι κόβεται σε τρία τμήματα. Το κεντρικό τμήμα περιέχει τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη λυσιγόνος φάση του κύκλου ζωής του φάγου και μπορεί να απομακρυνθεί χωρίς να επηρεάσει το λυτικό κύκλο ζωής του.

Το κομμάτι αυτό που έχει μήκος 20.000 ζεύγη βάσεων, μπορεί ν' αντικατασταθεί από ένα τμήμα ετερόλογου DNA αντίστοιχου μήκους. Τα δύο πλευρικά τμήματα του φάγου που ονομάζονται βραχίονες απομονώνονται και αναμειγνύονται με τα τμήματα του ετερόλογου DNA. Επειδή όλα τα τμήματα έχουν τα ίδια «κολλώδη άκρα» ενώνονται σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας και με τη βοήθεια του ένζυμου DNA δεσμάση. Το ανασυνδυασμένο DNA του φάγου που αποτελείται από τους δύο βραχίονες του φαγικού DNA και το ετερόλογο τμήμα DNA έχει το σωστό μέγεθος και αναμειγνύεται με τις πρωτεΐνες της κεφαλής και της ουράς, *in vitro*. Έτσι παράγονται ανασυνδυασμένοι μολυσματικοί φάγοι που έχουν τη δυνατότητα να μολύνουν ένα βακτήριο ξενιστή. Είναι φανερό ότι παράγονται χιλιάδες ανασυνδυασμένοι φάγοι που ο καθένας έχει ένα διαφορετικό ετερόλογο τμήμα DNA. Δηλαδή δημιουργείται μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη λ-φάγων. Προσθέτουμε τους φάγους σε υγρή βακτηριακή καλλιέργεια με πολλαπλάσιο αριθμό κυττάρων, οπότε οι βακτηριοφάγοι προσκολλώνται στα βακτήρια και το DNA τους εισέρχεται στα κύτταρα. Όπως και στην περίπτωση κλωνοποίησης σε πλασμίδια, η υγρή καλλιέργεια επιστρώνεται σε στερεό θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί επώαση για μερικές ώρες σε κατάλληλη θερμοκρασία, οπότε τα μολυσμένα από τους φάγους κύτταρα λύονται και οι φάγοι που ελευθερώνονται προσβάλλουν γειτονικά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται τελικά μικρές περιοχές στις οποίες τα βακτήρια έχουν λυθεί από φάγους. Κάθε τέτοια περιοχή περιέχει εκατομμύρια φάγους που έχουν προέλθει όλοι από τον πολλαπλασιασμό του ίδιου αρχικού ιού, άρα αποτελούν κλώνο και συνιστούν μια φαγική πλάκα. Όπως και στην περίπτωση της κλωνοποίησης σε πλασμίδια ο κλώνος με το επιθυμητό γονίδιο εντοπίζεται με τη χρήση κατάλληλων ιχνηθετημένων ανιχνευτών.







ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Με τη μέθοδο PCR μπορούμε να αντιγράψουμε επιλεκτικά ένα ορισμένο δίκλωνο τμήμα DNA (DNA στόχος), που βρίσκεται μεταξύ πολλών άλλων διαφορετικών τμημάτων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού οργανισμού. Δηλαδή είναι μια διαδικασία *in vitro*.

Κατ' αρχήν, για την μέθοδο PCR πρέπει να διαθέτουμε το δίκλωνο DNA που φέρει το τμήμα DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε (κλωνοποιήσουμε). Στο επιθυμητό τμήμα DNA, πρέπει να γνωρίζουμε την αλληλουχία των βάσεων του στα 3' άκρα των δύο αλυσίδων του*, έτσι ώστε να κατασκευάσουμε τεχνητές εκκινητικές ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες μονόκλωνου DNA, συμπληρωματικές ως προς τα 3' άκρα των αλυσίδων του DNA του τμήματος που μας ενδιαφέρει. Αυτές θα λειτουργήσουν ως πρωταρχικά τμήματα.

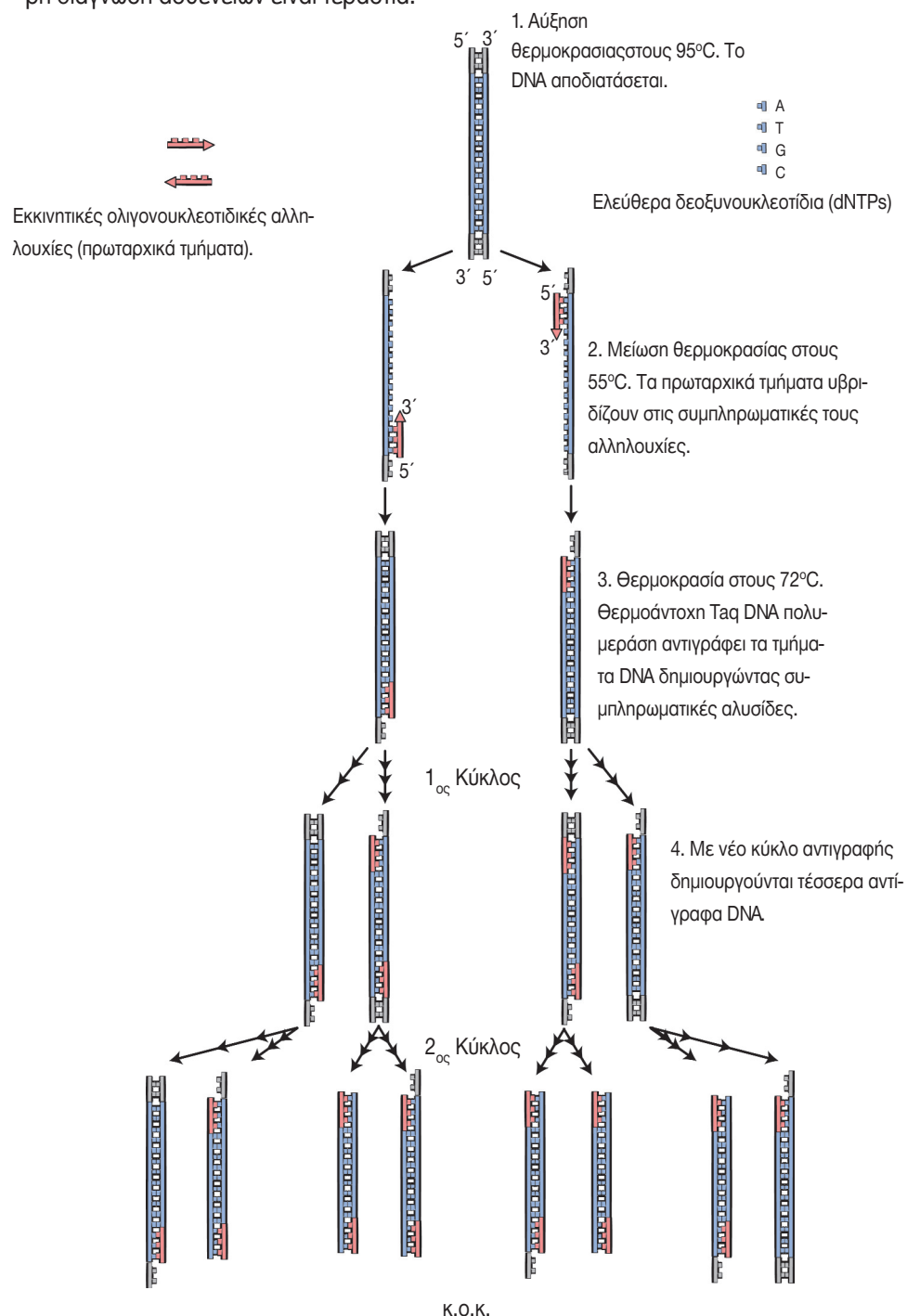
Στο δοκιμαστικό σωλήνα υπό μορφή διαλύματος, τοποθετούμε το δίκλωνο DNA που φέρει το τμήμα DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε, τα τεχνητά πρωταρχικά τμήματα, ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (A, T, G, C) που θα χρησιμεύσουν στον πολυμερισμό των αλυσίδων και Taq DNA πολυμεράσες - που είναι DNA πολυμεράσες, οι οποίες απομονώθηκαν από ένα θερμόφιλο μικροοργανισμό (*Thermus aquaticus*) που ζει σε θερμοπηγές (80°C). Τα ένζυμα αυτά μπορούν να λειτουργήσουν σε υψηλές θερμοκρασίες (μέχρι τους 95°C) - τέλος προσθέτουμε διάφορα μεταλλικά ιόντα, που βοηθούν στη λειτουργία της Taq DNA πολυμεράσης όπως Mg^{++} .

Αρχικά, αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 95°C, ώστε να αποδιαταχθούν οι αλυσίδες του δίκλωνου DNA που έχουμε στο δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα, μειώνουμε τη θερμοκρασία στους 55°C, ώστε να μπορέσουν οι τεχνητές ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες να προσδεθούν (να υβριδίσουν) στα 3' άκρα των δύο μονόκλωνων αλυσίδων του DNA και να λειτουργήσουν ως πρωταρχικά τμήματα, δίνοντας ένα ελεύθερο 3' OH- άκρο στην Taq DNA πολυμεράση, ώστε να ξεκινήσει τον πολυμερισμό. Η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 72°C και η Taq DNA πολυμεράση με τη βοήθεια των ιόντων και χρησιμοποιώντας τα ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια που υπάρχουν στο δοκιμαστικό σωλήνα, ξεκινά τον πολυμερισμό των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων DNA, πάντα με κατεύθυνση 5'→3'. Μετά το τέλος του πολυμερισμού έχουμε δύο νέα επιθυμητά τμήματα DNA, όμοια με το αρχικό και μεταξύ τους, ενώ η θερμοκρασία μειώνεται σε 35°C. Ύστερα αυξάνουμε εκ νέου τη θερμοκρασία και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία για όσες φορές θέλουμε (συνήθως 20 - 30), πάντα με τον ίδιο τρόπο, οπότε σε κ κύκλους αντιγραφής του PCR θα έχουμε $N_t = N_o \times 2^k$ αντίγραφα του επιθυμητού τμήματος. Όπου N_t = τελικός αριθμός αντιγράφων μετά από κ κύκλους αντιγραφής, N_o = αρχικός αριθμός μορίων του επιθυμητού τμήματος DNA. Κάθε κύκλος αντιγραφής διαρκεί περίπου 5 λεπτά.

Η μέθοδος PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη. Επιτρέπει την ταχεία κλωνοποίηση και μελέτη ειδικών περιοχών DNA που βρίσκονται σε απειροελάχιστη ποσότητα. Έτσι, σήμερα αποτελεί ένα

* Ακόμη και αν δεν γνωρίζουμε την αλληλουχία στα 3' άκρα του DNA στόχου, είναι δυνατή η κλωνοποίησή του με PCR, με κατάλληλο σχεδιασμό των τεχνητών εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων DNA που θα χρησιμοποιήσουμε.

από τα σημαντικότερα εργαλεία της βιοτεχνολογικής έρευνας και βρίσκει εφαρμογές σε πολλές επιστήμες από την παλαιοντολογία (μελέτη DNA σε απολιθώματα) μέχρι την εγκληματολογία (ανάλυση DNA υπόπτων). Ταυτόχρονα η προσφορά της στην ιατρική και ειδικότερα στην έγκαιρη διάγνωση ασθενειών είναι τεράστια.



Εικόνα 66: Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.



TOM MANIATIS (1943 - ...)

Έλληνας τρίτης γενιάς που γεννήθηκε στο Denver του Colorado των Η.Π.Α. Πήρε πτυχίο από το Πανεπιστήμιο του Colorado και πραγματοποίησε τη διδακτορική του διατριβή στο Πανεπιστήμιο Vanderbilt.

Μεταδιδακτορικά εργάστηκε μαζί με τον καθηγητή Mark Ptashne στο Πανεπιστήμιο του Harvard και τον καθηγητή Frederick Sanger στο Πανεπιστήμιο του Cambridge.

Ο Tom Maniatis είναι πρωτοπόρος στον τομέα της Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας. Όχι μόνο προσδιόρισε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός ρυθμιστικού στοιχείου του λ-φάγου στα πρώιμα στάδια της Μοριακής Βιολογίας, αλλά ακόμη ανέπτυξε πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό και την απομόνωση γονιδίων. Ο T. Maniatis αποτελεί ακόμη πρωτοπόρο στην ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, καθώς ήταν αυτός που ανέπτυξε την τεχνολογία των cDNA βιβλιοθηκών.

Το 1982 ο T. Maniatis μαζί με τους συνεργάτες του έγραψε την «Μπλε Βίβλο» των εργαστηρίων Μοριακής Βιολογίας, ένα μνημειώδες έργο που διαθέτει κάθε εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας («Molecular Cloning- A Laboratory Manual»). Το εγχειρίδιο αυτό, που περιγράφει με απλό τρόπο το σύνολο των τεχνικών της Γενετικής Μηχανικής άσκησε τεράστια επίδραση, σηματοδοτώντας την ολοκλήρωση της πρώτης φάσης ανάπτυξης της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA.

Η συμβολή του όμως στην επιστήμη δε σταματάει στην «Μπλε Βίβλο». Μαζί με άλλους δυο διεθνούς φήμης Έλληνες επιστήμονες, το Φώτη Καφάτο και τον Αργύρη Ευστρατιάδη, στα μέσα του 1970 συνέθεσαν τον πρώτο ολοκληρωμένο κλώνο DNA από το γονίδιο της αιμοσφαιρίνης.

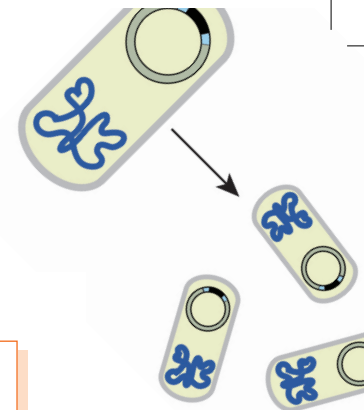
Ο Tom Maniatis έχει τιμηθεί με πληθώρα σημαντικών βραβείων για τη συμβολή του στην επιστήμη της Βιολογίας και είναι μέλος της Ακαδημίας Επιστημών των Η.Π.Α.

Σήμερα ο Tom Maniatis είναι διευθυντής του Τμήματος Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας στο Πανεπιστήμιο του Harvard ενώ είναι καθηγητής και στο Cold Spring Harbor Laboratory και στο California Institute of Technology (CalTech).

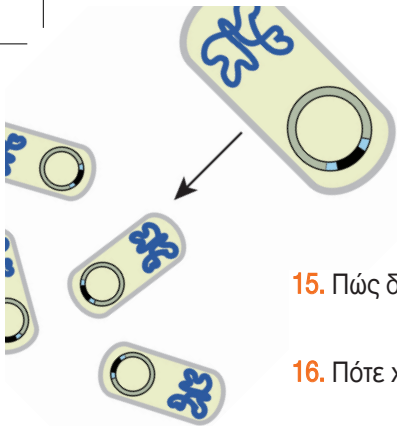
Τα ερευνητικά του ενδιαφέροντα στρέφονται τώρα στη ρύθμιση και την έκφραση των γονιδίων στα εγκεφαλικά κύτταρα, και στα κύτταρα του ανοσοβιολογικού συστήματος.



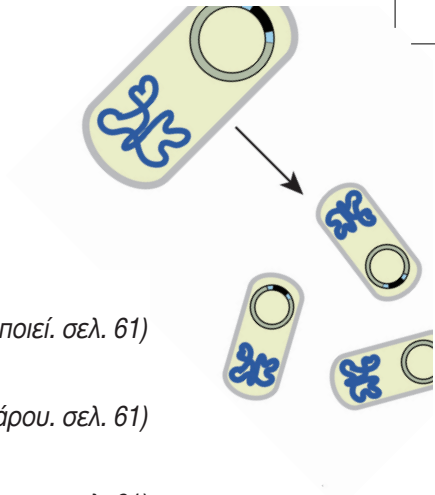
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΚΜΑΘΗΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΩΡΙΑΣ



1. Ποιοι παράγοντες συντέλεσαν ώστε να αναπτυχθεί αλματώδης η γενετική μηχανική;
(Απ.: Από το 1953 ... ανασυνδυασμένου DNA. σελ. 57)
2. Ποιες δυνατότητες έδωσε στον άνθρωπο η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;
(Απ.: Τεχνολογία ... χέρια. σελ. 57)
3. Πότε ένα μόριο DNA ονομάζεται ανασυνδυασμένο;
(Απ.: Σήμερα ... οργανισμούς. σελ. 57)
4. Ποιες δυνατότητες έχουν τα γενετικά τροποποιημένα μικρόβια;
(Απ.: Το DNA ... ιδιότητες. σελ. 57)
5. Τι ορίζουμε ως γενετική μηχανική;
(Απ.: Οι τεχνικές ... μηχανική. σελ. 57)
6. Ποιους στόχους του ανθρώπου εξυπηρετεί η γενετική μηχανική;
(Απ.: Η γενετική ... κτηνοτροφία. σελ. 57)
7. Αναφέρετε συνοπτικά τα στάδια της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA.
(Απ.: Η τεχνολογία ... ανιχνευτών. σελ. 57)
8. Ορίστε τη βιολογική διαδικασία του μετασχηματισμού.
(Απ.: Η εισαγωγή ... μετασχηματισμός. σελ. 57)
9. Τι ονομάζεται φορέας κλωνοποίησης και ποια μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό;
(Απ.: Ο φορέας ... ανασυνδυασμένο. σελ. 57)
10. Δώστε τους ορισμούς των εννοιών κλώνος και κλωνοποίηση.
(Απ.: Ο όρος ... οργανισμών. σελ. 57)
11. Ποιος είναι ο λόγος που οι προκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν τα ένζυμα περιοριστικές ενδο-νουκλεάσες;
(Απ.: Οι περιοριστικές ... ξένου DNA. σελ. 57)
12. Ποιες ιδιότητες έχουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες;
(Απ.: Οι περιοριστικές ... δίκλωνο DNA. σελ. 57)
13. Ποια περιοριστική ενδονουκλεάση γνωρίζετε; Από ποιο μικρόβιο απομονώθηκε και ποια αλληλουχία αναγνωρίζει;
(Απ.: Μια ... ένζυμο. σελ. 57-58)
14. Τι είναι δυνατό να συμβεί στο γονιδίωμα ενός ανώτερου ευκαρυωτικού οργανισμού όταν αναμειχθεί με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI;
(Απ.: Η αλληλουχία ... ενδονουκλεάση σελ. 58)



15. Πώς δημιουργείται ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;
(Απ.: Στη συνέχεια ... του οργανισμού σελ. 58-59)
16. Πότε χρησιμοποιούμε το ένζυμο DNA δεσμάση στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;
(Απ.: Τα δύο ... κομμάτια του DNA. σελ. 58-59)
17. Μετά την κατασκευή του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης, τι διαδικασία ακολουθείται για την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης;
(Απ.: Βακτήρια ... γονιδιωματική βιβλιοθήκη. σελ. 59)
18. Τι απαιτείται ώστε να επιτευχθεί ο μετασχηματισμός των βακτηρίων ξενιστών;
(Απ.: Για να μπει ... (μετασχηματισμός). σελ. 59)
19. Πώς επιλέγουμε τα μετασχηματισμένα βακτήρια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;
(Απ.: Η επιλογή ... κλώνο. σελ. 59)
20. Από τι αποτελείται μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη;
(Απ.: Το σύνολο ... γονιδιωματική βιβλιοθήκη. σελ. 59)
21. Σε ποιους οργανισμούς τα πλασμίδια αποτελούν τον συνθεστότερο φορέα κλωνοποίησης;
(Απ.: Η κλωνοποίηση ... μικρό γονιδίωμα. σελ. 59)
22. Πότε χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης ο λ - φάγος;
(Απ.: Ένας ... πλασμίδια. σελ. 59-60)
23. Περιγράψτε την διαδικασία κατασκευής μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με φορέα κλωνοποίησης πλασμίδιο.
(Απ.: Μια από τις ... με μικρό γονιδίωμα. σελ. 57-59)
24. Περιγράψτε την διαδικασία κατασκευής μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με φορέα κλωνοποίησης λ - φάγο.
(Απ.: Ένθετο σχ. βιβλίου σελ. 184 ή στο παρόν βιβλίο αντίστοιχο ένθετο κεφ. 4)
25. Πότε επιλέγουμε να κατασκευάσουμε cDNA βιβλιοθήκη;
(Απ.: Στους ανώτερους ... βιβλιοθήκης. σελ. 60)
26. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα μιας cDNA βιβλιοθήκης;
(Απ.: Οι cDNA ... των εξωνίων. σελ. 60)
27. Περιγράψτε την διαδικασία κατασκευής μιας cDNA βιβλιοθήκης.
(Απ.: Για να ... στο κύτταρο ξενιστή. σελ. 60)
28. Τι ονομάζεται αποδιάταξη;
(Απ.: Η απομόνωση ... αποδιάταξη. σελ. 60)
29. Ποια διαδικασία ονομάζεται υβριδοποίηση, σε ποια ιδιότητα στηρίζεται και ποιες δυνατότητες μας δίνει;
(Απ.: Οι δυο μονόκλωνες ... άλλα κομμάτια. σελ. 60)
30. Πώς επιλέγεται η βακτηριακή αποικία - κλώνος που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA;
(Απ.: Μια γονιδιωματική ... συμπληρωματικό τους DNA. σελ. 60-61)
31. Πού αλλού βρίσκει εφαρμογή η υβριδοποίηση;
(Απ.: Η διαδικασία ... βιβλιοθήκη. σελ. 61)



32. Για ποιο λόγο κατασκευάζουμε βιβλιοθήκες;

(Απ.: Η κατασκευή ... αυτό κωδικοποιεί. σελ. 61)

33. Σε τι αποσκοπεί η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης;

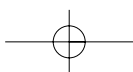
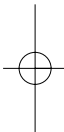
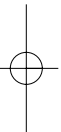
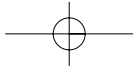
(Απ.: Η μέθοδος ... ζωντανού κυττάρου. σελ. 61)

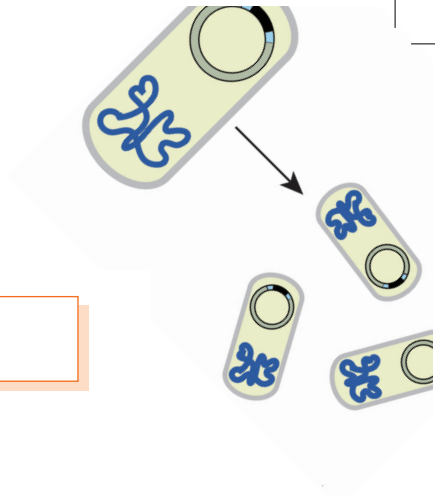
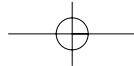
34. Πού βρίσκει εφαρμογή η PCR;

(Απ.: Η τεχνική αυτή ... απολιθώματα. σελ. 61)

35. Περιγράψτε την μέθοδο PCR.

(Απ.: Ένθετο σχ. βιβλίου, σελ. 182 ή στο παρόν βιβλίο αντίστοιχο ένθετο, κεφ. 4)





ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΚΛΕΙΣΤΟΥ ΤΥΠΟΥ

Να βάλετε σε κύκλο το γράμμα που αντιστοιχεί στη σωστή απάντηση ή στη φράση που συμπληρώνει σωστά την πρόταση:

1. Πώς ονομάζονται τα κυκλικά μόρια DNA που αναπαράγονται ανεξαρτήτως;

- A. διακεκομμένα γονίδια
- B. εσώνια
- Γ. ρυθμιστικά γονίδια
- Δ. πλασμίδια

2. Αποδιάταξη είναι το φαινόμενο κατά το οποίο

- A. ωριμάζει το πρόδρομο RNA
- B. μεταφράζεται το DNA
- Γ. αποχωρίζονται μεταξύ τους οι αλυσίδες του DNA
- Δ. συνδέονται μεταξύ τους οι κλώνοι του DNA

3. Πώς ονομάζονται τα βακτηριακά ένζυμα που τεμαχίζουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις;

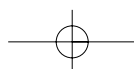
- A. πολυμεράσες
- B. δεσμάσες
- Γ. περιοριστικές ενδοκλουνεάσες
- Δ. κινάσες

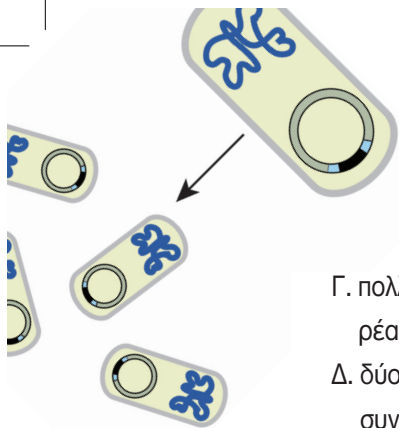
4. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- A. κόβουν τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων A και G
- B. κόβουν τις πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του μορίου του DNA σε ειδικές θέσεις
- Γ. ενώνουν τμήματα του ανασυνδυασμένου DNA με 3 - 8 νουκλεοτίδια
- Δ. ενσωματώνουν το DNA του δότη σε ειδική θέση του φορέα κλωνοποίησης

5. Το ένζυμο *EcoRI* κόβει την αλυσίδα του γονιδιώματος ενός ευκαρυωτικού κυττάρου στις θέσεις μεταξύ G και A. Έτσι προκύπτουν

- A. χιλιάδες τμήματα του DNA με τον ίδιο αριθμό νουκλεοτιδίων, που μπορούν να συνδεθούν με το πλασμίδιο φορέα
- B. πολλά τμήματα του DNA από τα οποία μόνο ένα μπορεί να συνδεθεί με το πλασμίδιο φορέα





- Γ. πολλά διαφορετικά τμήματα του DNA που έχουν τη δυνατότητα να συνδεθούν με το πλασμίδιο φορέα
- Δ. δύο τμήματα του DNA με διαφορετικό αριθμό νουκλεοτιδίων από τα οποία μόνο το ένα μπορεί να συνδεθεί με το πλασμίδιο φορέα

6. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες έχουν τη δυνατότητα να κόβουν

- A. το πλασμίδο σε κατάλληλη θέση
- B. το ανασυνδυσμένο DNA σε κατάλληλη θέση
- Γ. το γονιδίωμα του ευκαρυωτικού κυττάρου σε κατάλληλη θέση
- Δ. σε όλες τις θέσεις που περιγράφονται στα α,β,γ

7. Μερικά πλασμίδια φέρουν γονίδιο που σχετίζεται με την ευαισθησία των βακτηρίων σε κάποιο αντιβιοτικό. Αυτό εξυπηρετεί

- A. την κλωνοποίηση των βακτηρίων στα οποία έχει εισαχθεί αυτό το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο
- B. την καταστροφή του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου πριν την εισαγωγή του στο βακτήριο ξενιστή
- Γ. την κλωνοποίηση των βακτηρίων που δε φέρουν το πλασμίδιο
- Δ. την αναπαραγωγή του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

8. Πώς ονομάζεται το μόριο του DNA που συντίθεται με μήτρα το mRNA και την παρουσία της αντίστροφης μεταγραφάσης;

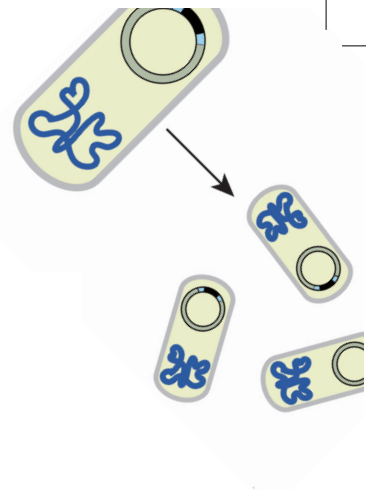
- A. ανασυνδυσμένο DNA
- B. cDNA
- Γ. γονιδιωματικό DNA
- Δ. χρωμοσωμικό DNA

9. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- A. περιορίζουν τη μεταγραφή γονιδίων
- B. είναι απαραίτητες για την έναρξη της αντιγραφής
- Γ. μεταγράφουν το DNA των ιών σε RNA
- Δ. κόβουν το DNA σε καθορισμένες θέσεις

10. Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει

- A. αντίγραφα ενός μόνο ανασυνδυσμένου πλασμιδίου
- B. αντίγραφα του συνολικού γονιδιώματος ενός οργανισμού
- Γ. αντίγραφα του mRNA του οργανισμού δότη
- Δ. τα απαραίτητα ένζυμα για την παραγωγή ανασυνδυσμένου DNA



11. Η αποδιάταξη του DNA γίνεται με

- A. τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών
- B. αύξηση της θερμοκρασίας
- Γ. ραδιενεργά σημασμένα μόρια τους ανιχνευτές
- Δ. το ένζυμο DNA δεσμάση

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

- | | Σ | Λ |
|---|--------------------------|--------------------------|
| 1. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία κόβουν το DNA σε ορισμένες περιοχές. | ☐ | ☐ |
| 2. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες δίκλωνου DNA και το κόβουν σε ορισμένη θέση. | ☐ | ☐ |
| 3. Η απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών επέτρεψε στους ερευνητές να αναπτύξουν την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. | ☐ | ☐ |
| 4. Ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιείται πάντα DNA ευκαρυωτικών κυττάρων. | ☐ | ☐ |
| 5. Ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιούνται πλασμίδια, βακτηριοφάγοι και άλλοι ιοί. | ☐ | ☐ |
| 6. Με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA μπορούμε να ερευνήσουμε αλλά και να τροποποιήσουμε το γενετικό υλικό. | ☐ | ☐ |
| 7. Το ανασυνδυασμένο μόριο DNA αποτελείται από DNA ενός οργανισμού και RNA άλλου οργανισμού. | ☐ | ☐ |
| 8. Το ένζυμο EcoRI αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία βάσεων $5'GAATTC_{3'}$ μεταξύ $3'CTTAAG_{5'}$ A και G. | ☐ | ☐ |
| 9. Η επίδραση μιας συγκεκριμένης περιοριστικής ενδονουκλεάσης έχει ως αποτέλεσμα όλα τα τμήματα DNA, που προκύπτουν από τη δράση της, να έχουν το ίδιο μήκος και να κωδικοποιούν τις ίδιες πληροφορίες. | ☐ | ☐ |
| 10. Τα ικνηθετημένα μόρια ανιχνευτές περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων με το κλωνοποιημένο DNA. | ☐ | ☐ |
| 11. Η διαδικασία δημιουργίας υβριδίων DNA - RNA ονομάζεται μετασχηματισμός. | ☐ | ☐ |
| 12. Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αντιγράφουμε ειδικές αλληλουχίες DNA <i>in vitro</i> . | ☐ | ☐ |

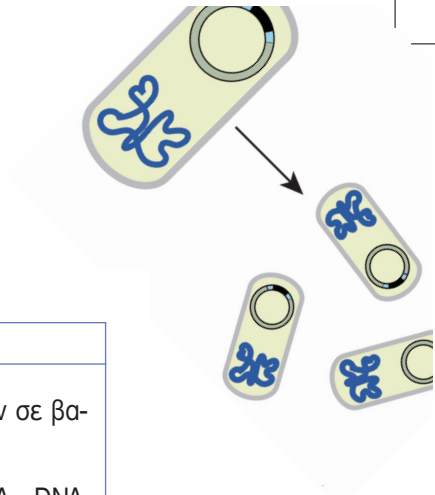
Na συμπληρώσετε με τους κατάλληλους όρους τα κενά στις παρακάτω προτάσεις:

1. Κατά τη διαδικασία παραγωγής ανασυνδυασμένου DNA τα ένζυμα κόβουν το DNA του δότη και του φορέα κλωνοποίησης σε συγκεκριμένη θέση.
2. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχουν ολόκληρο το DNA του δότη ονομάζεται
3. Το ένζυμο *EcoRI*, που απομονώθηκε από το βακτήριο *E.coli*, όταν συναντά την αλληλουχία βάσεων, κόβει την αλυσίδα μεταξύ των G – A.
4. Με τη μέθοδο PCR αντιγράφουμε επιλεκτικά ειδικές αλληλουχίες
5. Το mRNA χρησιμοποιείται ως καλούπι για τη σύνθεση cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου
6. Κατά τη διαδικασία κατασκευής του ανασυνδυασμένου DNA, το DNA του δέκτη και το DNA του δότη ενώνονται με τη βοήθεια του ενζύμου

Na αντιστοιχίσετε τους όρους που αναγράφονται στην στήλη I με τις έννοιες ή τις φράσεις που αναγράφονται στη στήλη II. Για το σκοπό αυτό να γράψετε δίπλα από κάθε γράμμα της στήλης I τον αριθμό που ταιριάζει από τη στήλη II. (π.χ. A-1)

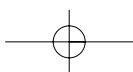
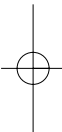
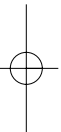
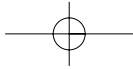
I	II
A. ___ Περιοριστικές ενδονουκλεάσες	1. Κυκλικά μόρια DNA των βακτηρίων.
B. ___ DNA δεσμάση	2. Πρωτεΐνες που περιβάλλουν το γενετικό υλικό των φάγων.
Γ. ___ Πλασμίδια	3. Κόβουν το DNA σε ειδικές θέσεις.
	4. Ένζυμο που συνδέουν κομμάτια DNA με συμπληρωματικά άκρα.

I	II
A. ___ Ανασυνδυασμένο DNA	1. Ένζυμο <i>EcoRI</i> .
B. ___ Πλασμίδια	2. Υβριδοποιεί DNA - RNA.
Γ. ___ Περιοριστική ενδονουκλεάση	3. Φορείς κλωνοποίησης.
	4. Μόριο με γονίδια από δύο ή περισσότερους οργανισμούς.



I	II
A. ___ Υβριδοποίηση	1. Εισαγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε βακτήρια.
B. ___ Αποδιάταξη	2. Σύνδεση συμπληρωματικών κλώνων DNA - DNA.
Γ. ___ Μετασχηματισμός	3. Απομόνωση συγκεκριμένου γονιδίου.
	4. Διάσπαση δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων.

I	II
A. ___ Γονιδιωματική βιβλιοθήκη	1. Διαδικασία εισόδου ανασυνδυασμένου DNA στα βακτήρια.
B. ___ cDNA βιβλιοθήκη	2. Περιέχει τα αντίγραφα του ώριμου mRNA.
Γ. ___ Μετασχηματισμός	3. Αντίγραφα υβριδίων DNA - RNA.
	4. Περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού δότη.



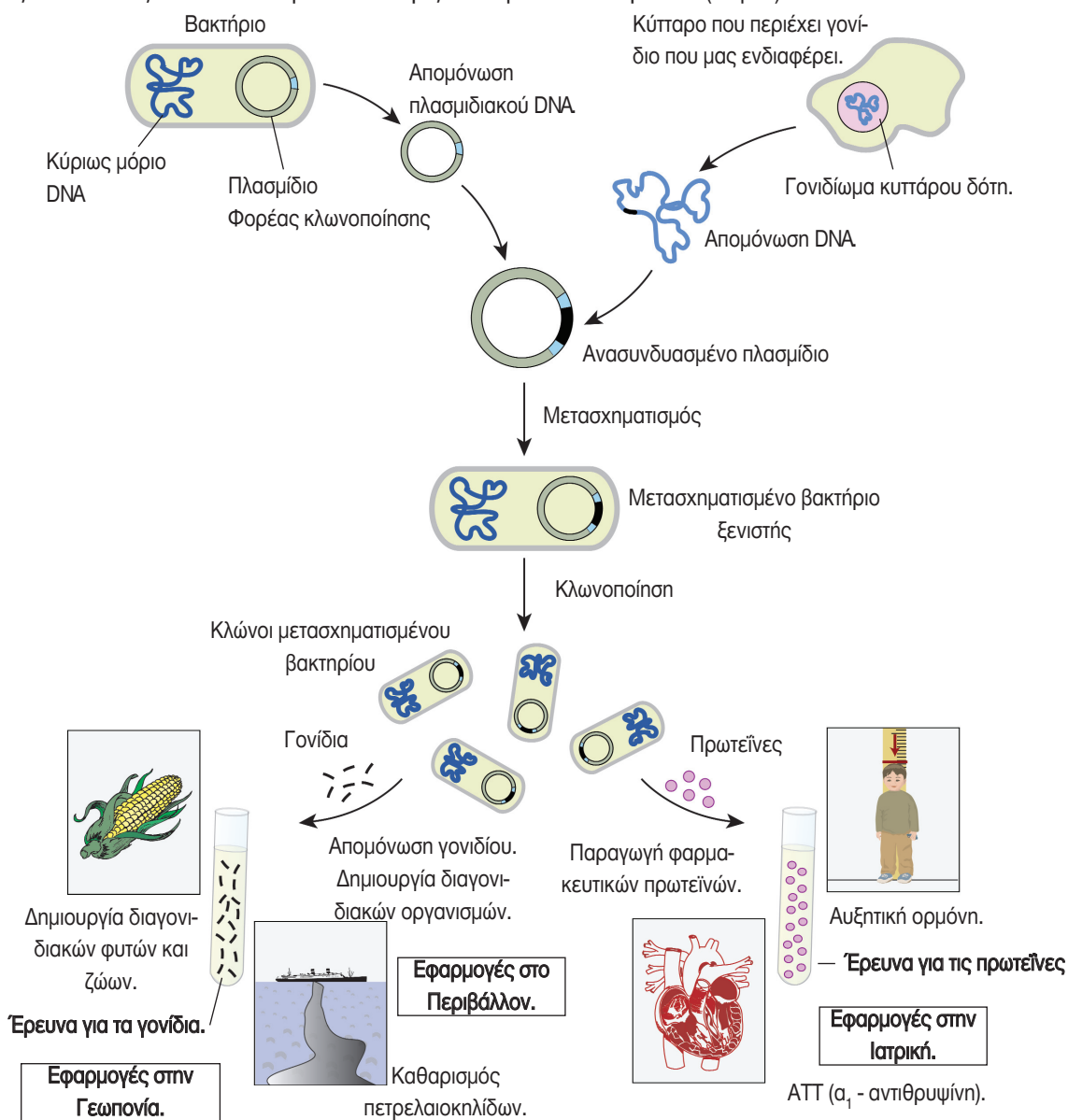


ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΙΚΑ ΑΠΑΝΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

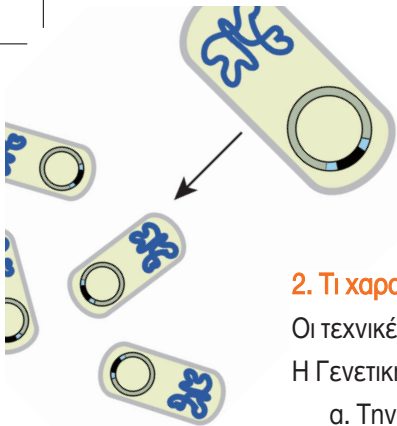
Να απαντήσετε σύντομα σε καθεμία από τις παρακάτω ερωτήσεις:

1. Πού βρίσκει εφαρμογή η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;

Στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων και τη δημιουργία «βελτιωμένων» μικροοργανισμών, φυτών και ζώων. Επίσης στην τεχνολογία αυτή στηρίζεται η γονιδιακή θεραπεία (κεφ. 8).



Εικόνα 67: Οι εφαρμογές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA.



2. Τι χαρακτηρίζουμε ως Γενετική Μηχανική και ποιους στόχους εξυπηρετεί;

Οι τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό, αποτελούν τη Γενετική Μηχανική. Η Γενετική Μηχανική έχει δύο στόχους:

- Την κατανόηση των μυστηρίων της ζωής και της εξέλιξης της πάνω στη γη.
- Τη βελτίωση της υγείας του ανθρώπου και του τρόπου διαβίωσής του. Η βελτίωση αυτή επιτυγχάνεται με εφαρμογές της Γενετικής Μηχανικής στην Ιατρική, στη Γεωργία, την Κτηνοτροφία, το Περιβάλλον και τη Βιομηχανία.

3. Γιατί χρησιμοποιούμε την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση για να κόψουμε το DNA του πλασμιδίου φορέα κλωνοποίησης και το DNA του δότη;

Για να ενωθούν στη συνέχεια πρώτα με δεσμούς υδρογόνου (αφού θα έχουν συμπληρωματικά κολλώδη άκρα) και μετά με 3'→5' φωσφοδιεστερικό δεσμό με τη συμβολή της DNA δεσμάσης.

4. Ποιος είναι ο ρόλος της DNA δεσμάσης στη διαδικασία μετασχηματισμού του ανασυνδυσσμένου DNA;

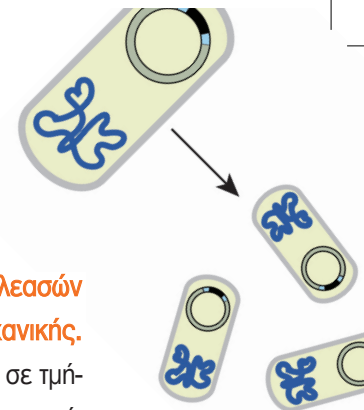
Ενώνει με 3'→5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς τα τμήματα του φορέα κλωνοποίησης και του ετερόλογου (ξένου) DNA. Αν ο φορέας κλωνοποίησης δεν έχει προσλάβει τμήμα DNA, η DNA δεσμάση επανασυνδέει τα τμήματά του ή τον επανακυκλοποιεί.

5. Να γράψετε δύο μεθόδους παραγωγής αντιγράφων μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων ενός μορίου DNA. Σε τι πλεονεκτεί η μια έναντι της άλλης;

Η μία μέθοδος είναι η δημιουργία βιβλιοθήκης, δηλαδή η ένθεση της αλληλουχίας σε πλασμίδιο και η κλωνοποίηση του μετά την εισαγωγή του σε βακτήρια με μετασχηματισμό, ενώ η δεύτερη είναι η PCR. Το πλεονέκτημα της πρώτης είναι ότι λειτουργεί για άγνωστες αλληλουχίες που μπορούμε να τις διατηρούμε για μεγάλο χρονικό διάστημα αλλά είναι κοπιώδη και χρονοβόρα, ενώ η δεύτερη είναι πιο γρήγορη και δε χρειάζεται κυτταρική μεσολάβηση αλλά τα αντίγραφα δεν διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

6. Να περιγραφούν τα στάδια της κλωνοποίησης ανασυνδυσσμένου DNA σε βακτηριοφάγο λ.

Αρχικά γίνεται απομόνωση DNA από φάγους και τον οργανισμό του οποίου θέλουμε να δημιουργήσουμε τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη. Στη συνέχεια και τα δύο DNA κόβονται με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση. Τα αναμιγνύουμε και προσθέτουμε DNA δεσμάση. Εκεί δημιουργούνται ανασυνδυσσμένα φαγικά μόρια DNA. Μετά προσθέτουμε τις πρωτεΐνες του φάγου, το φαγικό DNA πακετάρεται σε αυτές και με τους νέους φάγους μολύνουμε μία βακτηριακή υγρή καλλιέργεια. Το μίγμα επιστρώνεται σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη των βακτηρίων και μετά από επώαση παρατηρούμε πλήρη ανάπτυξη βακτηρίων και ιικές (φαγικές) πλάκες στην επιφάνεια του τρυβλίου. Οι τελευταίες περιέχουν ανασυνδυσσμένους φάγους. Το σύνολο των φαγικών πλακών συνιστούν την γονιδιωματική βιβλιοθήκη του οργανισμού (βλέπε και σελ. 207 για αναλυτικότερη περιγραφή).



7. Να εξηγήσετε τους λόγους για τους οποίους η απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των φορέων κλωνοποίησης συνέβαλε τα μέγιστα στην ανάπτυξη της Γενετικής Μηχανικής.

Πριν την απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών ήταν αδύνατον να κόψουμε το DNA σε τμήματα ικανού μεγέθους για κλωνοποίηση και με καθορισμένα άκρα που να είναι πάντα τα ίδια και επομένως δεν μπορούσαμε να πάρουμε ένα συγκεκριμένο γονίδιο από ένα γονιδίωμα. Το DNA μπορούσε μόνο μηχανικά να σπάσει σε τυχαία τμήματα, διαφορετικά κάθε φορά. Ακόμα και αν κάποιος έκοβε το DNA, το τμήμα αυτό αυτό χάνονταν επειδή δεν υπήρχε φορέας κλωνοποίησης για να ενθεθεί και να πολλαπλασιαστεί αυτόνομα. Άρα η Γενετική Μηχανική ήταν σε νηπιακό επίπεδο, αφού δεν μπορούσε να γίνει μελέτη και μεταφορά γονιδίων.

8. Να γράψετε τα στάδια παραγωγής του ανασυνδυασμένου DNA.

Βλέπε σελ. 57 σχολικού βιβλίου (Η τεχνολογία του... μορίων ανιχνευτών.).

9. Γιατί τα πλασμίδια φορείς του DNA του οργανισμού δότη εισάγονται σε βακτήρια ξενιστές τα οποία δεν έχουν πλασμίδια και είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά;

Για να μπορούν τα βακτήρια που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο ανασυνδυασμένο ή μη, να επιβιώσουν έναντι των μη μετασχηματισμένων βακτηρίων με επίδραση αντιβιοτικού. Λόγω του πλασμιδίου τα μετασχηματισμένα βακτήρια θα είναι ανθεκτικά σε σχέση με τα υπόλοιπα που δεν έχουν προσλάβει πλασμίδιο.

10. Ποια είναι η διαφορά μεταξύ μιας γονιδιωματικής και μιας cDNA βιβλιοθήκης;

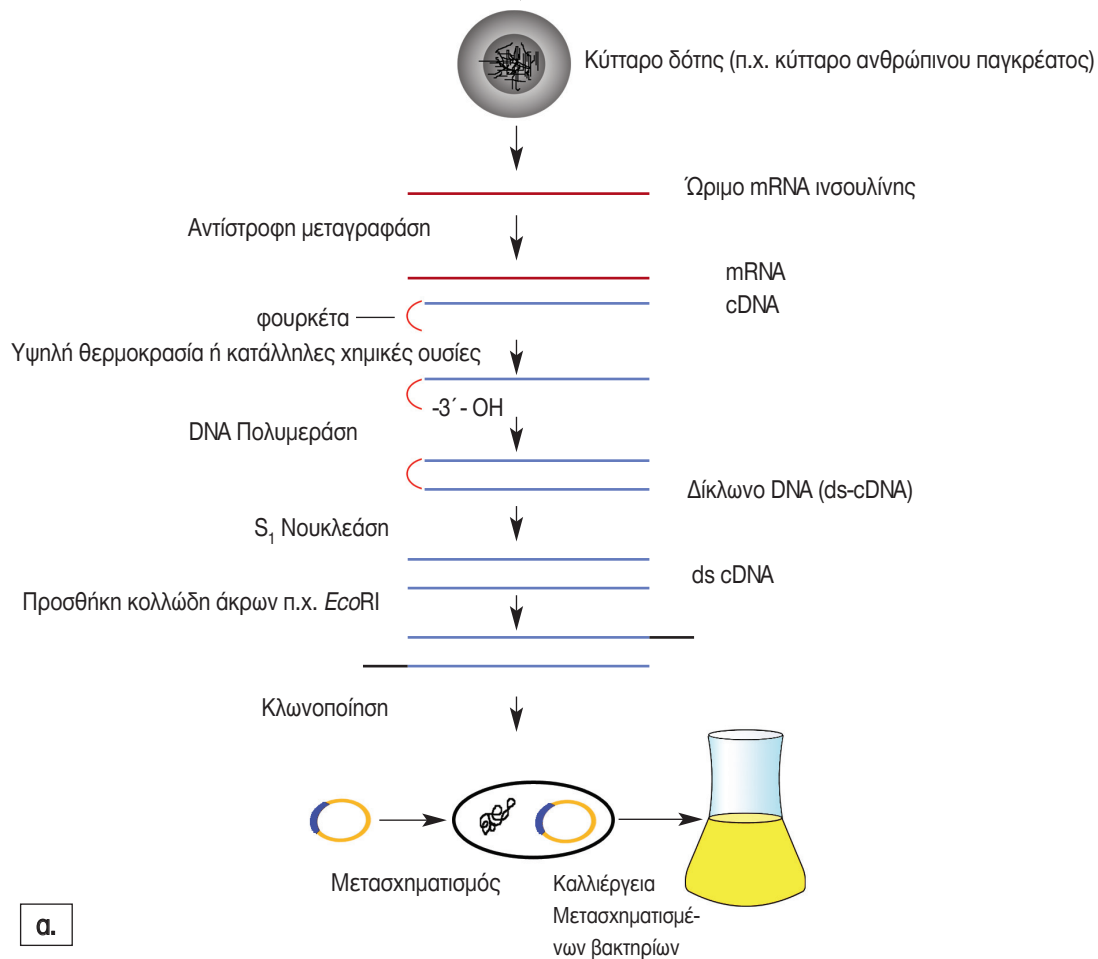
Γονιδιωματική βιβλιοθήκη	cDNA βιβλιοθήκη
1. Απομονώνεται όλο το DNA του οργανισμού.	1. Απομονώνεται το mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο.
2. Δεν χρησιμοποιείται αντίστροφη μεταγραφάση.	2. Χρησιμοποιείται το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.
3. Το απομονωμένο DNA κόβεται με περιοριστική ενδονουκlease σε τμήματα ποικίλου μεγέθους.	3. Τα απομονωμένα mRNA κλωνοποιούνται ως ds - cDNA.
4. Περιέχει όλη την ποσότητα του γενετικού υλικού (π.χ. υποκινητές, αλληλουχίες λήξης μεταγραφής, εσώνια κ.α), έτσι παρέχει το πλεονέκτημα της απομόνωσης και μελέτης αυτών των αλληλουχιών.	4. Περιέχει αντίγραφα των αλληλουχιών mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά την δεδομένη χρονική στιγμή και έχει το πλεονέκτημα της απομόνωσης μόνο των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των εξωνίων.
5. Δεν χρησιμοποιείται για παραγωγή πρωτεϊνών από βακτήρια, επειδή τα γονίδια περιέχουν και εσώνια.	5. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης π.χ. της ινσουλίνης, από βακτήρια (βλέπε και ερώτηση κατανόησης 14).

11. Να περιγράψετε τη διαδικασία κατασκευής μιας cDNA βιβλιοθήκης.

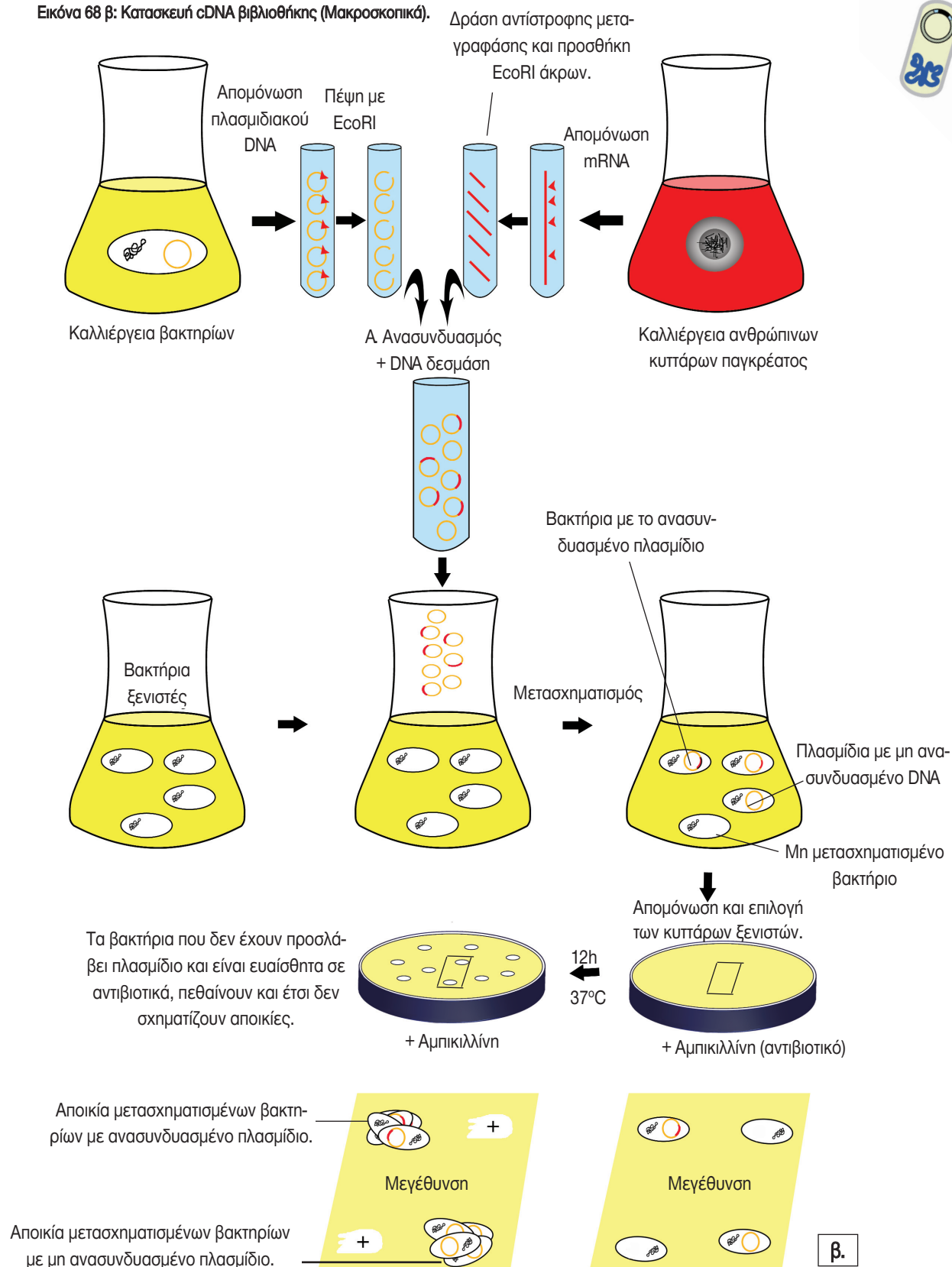
- Απομονώνεται ολικό mRNA από τον ιστό του οργανισμού που εκφράζεται το γονίδιο που μας ενδιαφέρει να κλωνοποιήσουμε.
- Προστίθεται αντίστροφη μεταγραφάση και δημιουργείται υβριδικό δίκλωνο μόριο mRNA - cDNA. Το ένζυμο με μήτρα το RNA συνθέτει μονόκλωνο συμπληρωματικό DNA.

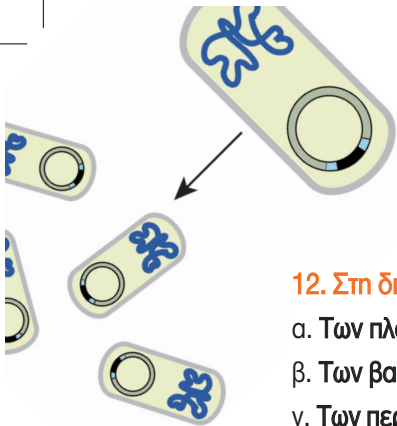
- Με προσθήκη NaOH (αλκαλικό περιβάλλον) ή αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος, καταστρέφεται το RNA και το μονόκλωνο DNA, στο οποίο έχει σχηματιστεί από την αντίστροφη μεταγραφάση μια δίκλωνη φουρκέτα, που τελειώνει σε 3' άκρο, είναι έτοιμο να γίνει δίκλωνο.
- Με προσθήκη DNA πολυμεράσης το μονόκλωνο DNA μετατρέπεται σε δίκλωνο και με ένα άλλο ένζυμο (S_1 νουκλεάση), κόβεται η φουρκέτα, δίνοντας ένα τέλει δίκλωνο τμήμα.
- Στο δίκλωνο τμήμα DNA προστίθενται τεχνητά κολλώδη άκρα, συμπληρωματικά προς αυτά που θα έχει το πλασμίδιο όταν επωαστεί με μια περιοριστική ενδονουκλεάση. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται πλασμίδια κομμένα με κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση που αφήνει μονόκλωνα άκρα, τέτοια ώστε να είναι συμπληρωματικά με τα μονόκλωνα άκρα του τμήματος DNA που έχει δημιουργηθεί. Τέλος προστίθεται και DNA δεσμάση.
- Τα ανασυνδυασμένα μόρια DNA του φορέα κλωνοποίησης εισάγονται σε βακτήρια με μετασχηματισμό.
- Τα βακτήρια που έχουν προσλάβει πλασμίδιο ανασυνδυασμένο ή μη, επιλέγονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό.
- Ανάλογα με το πλασμίδιο - φορέα κλωνοποίησης, οι αποικίες με τα μετασχηματισμένα βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, επιλέγονται στο ίδιο ή σε διαφορετικό θρεπτικό υλικό (βλέπε ορολογία σελ. 203).

Εικόνα 68 α: Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης (Μικροσκοπικά).



Εικόνα 68 β: Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης (Μακροσκοπικά).





12. Στη διαδικασία κατασκευής του ανασυνδυασμένου DNA ποιος είναι ο ρόλος:

- α. Των πλασμιδίων: Φορείς κλωνοποίησης.
- β. Των βακτηρίων: Ξενιστές.
- γ. Των περιοριστικών ενδονουκλεασών: Κόβουν το DNA σε ποικίλα τμήματα και δημιουργούν κολλώδη άκρα για να συνδεθούν τα μόρια.
- δ. Της DNA δεσμάσης: Συνδέει με 3'→5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς τα ανασυνδυασμένα μόρια DNA.

13. Με ποια μέθοδο εισάγονται σε βακτήρια τα πλασμίδια με το ανασυνδυασμένο DNA; Πώς απομονώνονται τα βακτήρια αυτά από τα υπόλοιπα, που δεν δέχθηκαν το ανασυνδυασμένο DNA;

- α. Με μετασχηματισμό, με ειδική κατεργασία των βακτηρίων ώστε να γίνουν οι μεμβράνες τους παροδικά διαπερατές σε μακρομόρια.
- β. Με επίδραση αντιβιοτικού που θανατώνει όλα τα βακτήρια που δεν είναι ανθεκτικά, αφού δεν έχουν προσλάβει πλασμίδιο. Η διάκριση των ξενιστών που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, γίνεται με βάση τις ιδιότητες του φορέα κλωνοποίησης (βλέπε ορολογία σελ. 203).

14. Από όσα γνωρίζετε ποιος νομίζετε ότι είναι ο φυσιολογικός ρόλος του πλασμιδίου σε ένα βακτήριο;

Τα πλασμίδια χρησιμεύουν στα βακτήρια, για την **επιβίωση** και την **επικράτηση** τους, μέσω των γονιδίων που διαθέτουν καθώς και της δυνατότητας αυτόνομης αντιγραφής τους.

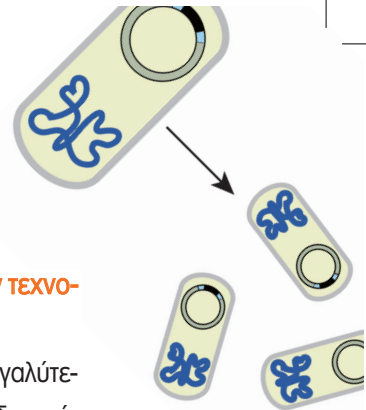
- α. Με τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά τα πλασμίδια προστατεύουν το βακτήριο έναντι συγκεκριμένων αντιβιοτικών, που μπορεί να παράγουν άλλοι μικροοργανισμοί, με τους οποίους μοιράζονται το ίδιο περιβάλλον στη φύση.
- β. Με τα γονίδια μεταφοράς γενετικού υλικού, το πλασμίδιο μεταφέρει από βακτήριο σε βακτήριο ή φυτικό κύτταρο (κεφ. 9) νέες ιδιότητες, που μπορεί να είναι η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά ή άλλα γονίδια του βακτηρίου δότη. Χάρη στην αυτόνομη αντιγραφή των πλασμιδίων, το βακτήριο δότης μπορεί να κρατάει αντίγραφο της μεταφερομένης γενετικής πληροφορίας.

15. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και ποια τα μειονεκτήματα της χρησιμοποίησης των πλασμιδίων στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;

Τα πλεονεκτήματα είναι ότι τα πλασμίδια υπάρχουν και πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από το κεντρικό μόριο DNA του βακτηρίου και επομένως τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια πολλαπλασιάζουν και το ετερόλογο γενετικό υλικό φτιάχνοντας πολλά αντίγραφα του σε κάθε βακτήριο που το φέρει. Επίσης τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στη Μοριακή Βιολογία διαθέτουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό που μας βοηθά να ξεχωρίσουμε τα βακτήρια που προσέλαβαν πλασμίδιο στο μετασχηματισμό από τα περισσότερα βακτήρια που δεν προσέλαβαν πλασμίδιο. Ακόμα έχουν μοναδικές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών που βοηθούν στην εύκολη ένθεση τμημάτων DNA που έχουν κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση.

Τέλος με το πλασμίδιο Τι μπορούμε να μετασχηματίσουμε και φυτικά κύτταρα (βλέπε κεφ. 9).

Μειονέκτημα των πλασμιδίων είναι ότι προσλαμβάνουν σχετικά μικρά τμήματα ετερόλογου DNA.



16. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και ποια τα μειονεκτήματα της χρησιμοποίησης των ιών στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;

Παρόλο που οι ιοί είναι δύσκολοι στο χειρισμό τους, μπορούμε να κλωνοποιήσουμε σε αυτούς μεγαλύτερα τμήματα DNA από ότι σε πλασμίδια. Ουσιαστικά χρησιμοποιείται ο λ - φάγος ο οποίος έχει τη δυνατότητα να ενσωματώνει τμήματα DNA μήκους 10.000 - 20.000 ζευγών βάσεων αντί των 3.000 - 5.000 που ενσωμάτωναν τα πρώτα πλασμίδια. Επίσης πλεονέκτημα του φάγου είναι ότι επειδή κόβεται σε δύο τμήματα από την περιοριστική ενδονουκλεάση δεν μπορεί να ξαναγίνει λειτουργικός, παρά μόνο αν ενσωματώσει το ετερόλογο γενετικό υλικό. Άρα από αυτή τη διαδικασία παράγονται μόνο ανασυνδυασμένοι φάγοι. Επειδή οι ιοί εμφανίζουν εξειδίκευση μόλυνσης τόσο σε επίπεδο οργανισμού όσο και σε επίπεδο ιστού πολυκύτταρου οργανισμού, θεωρητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το μετασχηματισμό οποιουδήποτε κύτταρου. Έτσι οι ιοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την γονιδιακή θεραπεία, αλλά υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου στον ασθενή (βλέπε κεφ. 8).

17. Θέλουμε να μελετήσουμε το γενετικό υλικό ενός ρετροϊού. Μπορούμε να εφαρμόσουμε τη μέθοδο PCR; Απολογήστε την απάντησή σας.

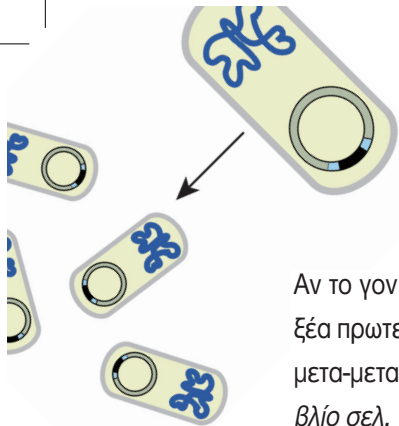
Δεν μπορούμε άμεσα επειδή για μήτρα σε PCR πρέπει να χρησιμοποιηθεί δίκλωνο DNA και όχι μονόκλωνο RNA που έχει ως γενετικό υλικό ο ρετροϊός. Θα πρέπει πρώτα με αντίστροφη μεταγραφάση να μετατρέψουμε το RNA σε cDNA και κατόπιν με DNA πολυμεράση σε δίκλωνο DNA. Μετά μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε PCR για να πολλαπλασιάσουμε το δίκλωνο πλέον DNA.

18. Ένα γονίδιο ενσωματώθηκε σε ένα πλασμίδιο αλλά στο μετασχηματισμένο βακτηριακό κύτταρο δεν εκφραζόταν το γονίδιο. Μπορείτε να σκεφτείτε μερικούς λόγους γι' αυτό το γεγονός;

Πιθανόν να μην είχε καθόλου υποκινητή ή να μην διέθετε τον κατάλληλο υποκινητή, που να επιτρέπει την έκφραση του γονιδίου. Μόνο αν υπάρχει ο σωστός συνδυασμός μεταγραφικών παραγόντων στο κύτταρο ξενιστή, που μπορούν να συνδέονται στον συγκεκριμένο υποκινητή, είναι δυνατό να ξεκινήσει η μεταγραφή. Έτσι, όποια και αν είναι η προέλευση του γονιδίου που εισάγεται σε ένα βακτήριο-ξενιστή, προκειμένου το γονίδιο να μπορεί να εκφραστεί θα πρέπει να διαθέτει έναν υποκινητή του βακτηρίου-ξενιστή. Έτσι αν ο φορέας κλωνοποίησης στον οποίο θα ενθέσουμε το γονίδιο θέλουμε να είναι και φορέας έκφρασης, φροντίζουμε αμέσως πριν από τη θέση ένθεσης του ετερόλογου γονιδίου, να διαθέτει έναν ισχυρό υποκινητή ενός γονιδίου του ξενιστή.

19. Σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο ένα γονίδιο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης 148 αμινοξέων. Αν το ίδιο γονίδιο κλωνοποιηθεί σε ένα βακτηριακό πληθυσμό, θα παραχθεί η ακριβής πρωτεΐνη; Να απολογηθείτε την απάντησή σας.

Αν το γονίδιο περιέχει εσώνια, η μετάφραση του πρόδρομου mRNA που θα προκύψει από τα βακτηριακά ριβοσώματα θα δώσει μια πρωτεΐνη με περισσότερα από 148 αμινοξέα και πιθανόν μη λειτουργική. Δεδομένου ότι τα βακτηριακά κύτταρα δεν επιτελούν τις μετα-μεταγραφικές ούτε τις εκτεταμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ευκαρυωτικών κυττάρων.



Αν το γονίδιο προέρχεται από cDNA βιβλιοθήκη, μπορεί να προκύψει μια μεγαλύτερη από 148 αμινοξέα πρωτεΐνη, που στο ευκαρυωτικό κύτταρο υφίσταται απομάκρυνση ενός ή περισσότερων αμινοξέων μετα-μεταφραστικά, κάτι που δε γίνεται, τουλάχιστον όχι στον ίδιο βαθμό, στο βακτήριο (βλέπε σχ. βιβλίο σελ. 118).

20. Παρατηρήθηκε ότι οι κλώνοι ενός μορίου DNA αποχωρίζονται στη θερμοκρασία των 100°C και οι παρατηρήσεις έδειξαν ότι οι κλώνοι παραμένουν ανέπαφοι. Αυτό το φαινόμενο οι ερευνητές το ονόμασαν αποδιάταξη της νουκλεοτιδικής αλυσίδας.

α) Πώς δρα η θερμοκρασία στο DNA για να γίνει η αποδιάταξη των κλώνων του;

β) Παρατηρήθηκε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η αποδιάταξη των κλώνων είναι φαινόμενο αντιστρεπτό. Ποια σημαντική μέθοδος για τη σύγχρονη Βιολογία ανακαλύφθηκε, που βασίζεται αφενός στην ιδιότητα της αποδιάταξης των κλώνων και αφετέρου στην ιδιότητα της επανέλιξης τους;

α) Οι δεσμοί υδρογόνου με τους οποίους συγκρατούνται οι δύο αλυσίδες ενός δίκλωνου μορίου DNA είναι ασθενείς, μη-ομοιοπολικοί δεσμοί. Αντίθετα οι 3'→5' φωσφοδιεστερικοί δεσμοί με τους οποίους σχηματίζονται οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες είναι ισχυροί ομοιοπολικοί δεσμοί. Όταν ένα διάλυμα DNA θερμανθεί αρκετά, οι ασθενείς δεσμοί υδρογόνου αδυνατίζουν και τελικά σπάζουν. Αντίθετα οι ισχυροί φωσφοδιεστερικοί δεσμοί μένουν ανέπαφοι. όταν συμβεί αυτό, οι δύο αλυσίδες του DNA αποχωρίζονται και καταστρέφεται η δευτεροταγής δομή του μορίου. Η θερμοκρασία αποδιάταξης ενός μορίου DNA καθορίζεται από την ποσοστιαία αναλογία ζευγών G-C που διαθέτει. Αυτό συμβαίνει επειδή μεταξύ ενός ζεύγους G-C αναπτύσσονται 3 δεσμοί υδρογόνου ενώ μεταξύ ενός ζεύγους A-T αναπτύσσονται 2 δεσμοί υδρογόνου. Γίνεται σαφές πως όσο αυξάνεται το ποσοστό των G-C σε ένα μόριο DNA τόσο αυξάνει και η θερμοκρασία που αυτό απαιτεί για να αποδιαταχθεί.

β) Οι διαχωρισμένες συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA επανασυνδέονται αυτομάτως δημιουργώντας πάλι διπλή έλικα όταν η θερμοκρασία πέσει κάτω από τη θερμοκρασία αποδιάταξης. Οι ιδιότητες της θερμικής αποδιάταξης και επαναδιάταξης της διπλής έλικας του DNA έδωσε τη δυνατότητα ανάπτυξης της μεθόδου της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).