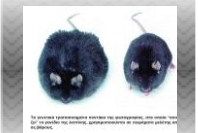
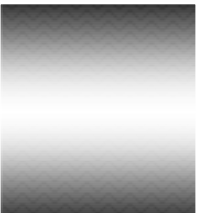


Βιολογία Θετικής Κατεύθυνσης Γ΄ Γενικού Λυκείου



ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΙΑ ΜΑΘΗΤΕΣ - ΜΑΘΗΤΡΙΕΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

Εκπαιδευτικοί στόχοι:

Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης αυτού του κεφαλαίου ο μαθητής θα πρέπει να μπορεί:

- ✓ Να περιγράφει τη μεθοδολογία κατασκευής ανασυνδυασμένου DNA
- ✓ Να περιγράφει τη διαδικασία κλωνοποίησης γονιδίων.
- ✓ Να αναφέρει τα στάδια κατασκευής γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης.
- ✓ Να διακρίνει τις ομοιότητες και τις διαφορές γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης
- ✓ Να αναφέρει τις εφαρμογές μίας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

Τι πρέπει να γνωρίζω προτού ξεκινήσω την μελέτη του κεφαλαίου

1. Τι είναι διαδικασίες in vitro και in vivo.
2. Τι είναι το πλασμίδιο και τις βασικές κατηγορίες γονιδίων που περιέχει.
3. Όλα τα βακτήρια έχουν ένα τουλάχιστον πλασμίδιο και περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα.
4. Τη διαδικασία της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης.
5. Ότι ωρίμανση γίνεται μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα.
6. Την ικανότητα της DNA δεσμάσης να ενώνει τμήματα DNA.
7. Ο μετασχηματισμός είναι ιδιότητα των βακτηρίων και στην φύση.
8. Την βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η μέθοδος της ιχνηθέτησης.
9. Ότι η αντιγραφή τμημάτων ή μορίων DNA γίνεται με εκθετικό τρόπο.
10. Διαφορετικά γονίδια εκφράζονται σε διαφορετικά κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού.
11. Ότι δεν μπορώ να συνδέσω στη σειρά τμήματα DNA με τμήματα RNA.

Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

Aπό το 1953 που οι Watson και Crick πρότειναν το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής του DNA μέχρι σήμερα η πρόοδος της επιστήμης της Βιολογίας ήταν αλματώδης. Η απομόνωση και χρήση πολυάριθμων ενζύμων, έδωσε στους ερευνητές τη δυνατότητα “αναπαραγωγής” των διαδικασιών της αντιγραφής, αντίστροφης μεταγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης *in vitro*. Ειδικότερα η απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών, ενζύμων που κόβουν το DNA σε κομμάτια με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων, καθώς και ειδικών φορέων που μεταφέρουν DNA από κύτταρο σε κύτταρο, επέτρεψε την ανάπτυξη της **τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA** και έδωσε στον άνθρωπο την ικανότητα, όχι μόνο να ερευνά, αλλά να επεμβαίνει και να τροποποιεί το γενετικό υλικό των οργανισμών. Η τεχνολογία αυτή βρίσκει εφαρμογή στην παραγωγή σειράς προϊόντων και τη δημιουργία φυτών και ζώων με «βελτιωμένες» ιδιότητες. Με την ανάπτυξη της υψηλής αυτής τεχνολογίας, το γενετικό υλικό, το DNA, που ήταν τόσο δύσκολο να μελετηθεί, έγινε «παιχνίδι» στα ανθρώπινα χέρια.

Σήμερα μπορούμε να κατασκευάζουμε στο δοκιμαστικό σωλήνα ένα «ανασυνδυασμένο» μόριο DNA, δηλαδή ένα τεχνητό μόριο DNA, που περιέχει γονίδια από δύο ή και περισσότερους οργανισμούς. Το DNA αυτό μπορεί να μπει σε ένα βακτήριο ή σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Τα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια ή ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ικανά να ζουν και να αναπαράγονται μεταφέροντας στους απογόνους τους τις καινούργιες ιδιότητες.

Οι τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό, αποτελούν την **Γενετική Μηχανική**. Η Γενετική Μηχανική άνοιξε τον δρόμο για νέες, εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ερευνητικές και παραγωγικές δυνατότητες, αλλά και για την επίτευξη δύο θεμελιωδών στόχων του ανθρώπου:

- α. την κατανόηση των μυστηρίων της ζωής και της εξέλιξης πάνω στη γη και,*
- β. τη βελτίωση της υγείας και των τρόπου διαβίωσης του. Η βελτίωση αυτή επιτυγχάνεται με τις εφαρμογές της Γενετικής Μηχανικής τόσο στην Ιατρική όσο και στην Γεωργία και την Κτηνοτροφία.*

H τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA περιλαμβάνει όλες τις τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά του γενετικού υλικού από τον ένα οργανισμό στον άλλο. Τα στάδια της διαδικασίας αυτής είναι

- ✓ **Η κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA.** Για το σκοπό αυτό το ολικό DNA από έναν οργανισμό δότη απομονώνεται, κόβεται ενζυματικά με ειδικά ένζυμα, τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, και ενώνεται με ένα φορέα κλωνοποίησης. **Ο φορέας κλωνοποίησης**, είναι ένα μόριο DNA, π.χ πλασμίδιο ή DNA φάγων, το οποίο μπορεί να αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα μέσα σε ένα **κύτταρο-ξενιστή** όπως ένα βακτήριο. Το DNA που δημιουργείται είναι ανασυνδυασμένο.
- ✓ **Η μεταφορά του ανασυνδυασμένου μορίου DNA σε ένα κύτταρο-ξενιστή.** Η εισαγωγή του DNA σε βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή ονομάζεται **μετασηματισμός**.

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΘΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

- ✓ **Η επιλογή και απομόνωση των κυττάρων ξενιστών.** Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα ξενιστές που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο DNA απομονώνονται από εκείνα που δεν το έχουν προσλάβει. Κάθε βακτήριο που προσλαμβάνει ένα μόνο μόριο ανασυνδυασμένου DNA πολλαπλασιάζεται και παράγει μια αποικία που αποτελεί ένα βακτηριακό **κλώνο**. Είναι φανερό ότι με την παραπάνω διαδικασία παράγονται χιλιάδες κλώνοι, που ο καθένας περιέχει ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA διαφορετικό από τους υπόλοιπους κλώνους
- ✓ **Η επιλογή ενός βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA.** Αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών μορίων ανιχνευτών.

Επεξήγηση εννοιών και όρων:

Ανασυνδυασμένο DNA: Οποιοδήποτε μόριο DNA που δημιουργείται από τη σύνδεση κομματιών DNA τα οποία προέρχονται από τους ίδιους ή διαφορετικούς οργανισμούς. Το ανασυνδυασμένο DNA χρησιμοποιείται στην κλωνοποίηση γονιδίων, στην γενετική τροποποίηση των οργανισμών, και γενικά για την ανάπτυξη ποικίλων τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας.

Γενετική Μηχανική: Το σύνολο των τεχνικών που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος για να επεμβαίνει στο γενετικό υλικό.

Φορέας κλωνοποίησης: Γενετικό στοιχείο, κυρίως βακτηριοφάγος ή πλασμίδιο, το οποίο χρησιμοποιείται για να μεταφέρει ένα κομμάτι DNA σε ένα κύτταρο δέκτη με σκοπό την κλωνοποίηση γονιδίων.

Μετασχηματισμός: Η γενετική αλλαγή των ιδιοτήτων ενός βακτηριακού κυττάρου μετά από εισαγωγή DNA στο γονιδίωμά του (Ο ίδιος όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει την μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων ενός ευκαρυωτικού οργανισμού σε καρκινικά).

Κλωνοποίηση: η παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός γονιδίου, κυττάρου ή οργανισμού μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αντιγραφής.

Κλώνος: Πληθυσμός κυττάρων ή οργανισμών που παράγονται από επαναλαμβανόμενες (μη αμφιγονικές) διαιρέσεις ενός μόνο κυττάρου ή οργανισμού.

Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει όλο το γονιδίωμα ενός οργανισμού

Η ανακάλυψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών έθεσε το θεμέλιο για τη δημιουργία των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών. Οι **περιοριστικές ενδονουκλεύσες** παράγονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την εισβολή «ξένου» DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες δίκλωνου DNA, μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων. Μία από τις περιοριστικές ενδοκλεάσες που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η EcoRI που απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*. Το ένζυμο αυτό όποτε συναντά την αλληλουχία:



στο γονιδίωμα, κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A (με κατεύθυνση 5'→3') αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Η αλληλουχία GAATTC υπάρχει διάσπαρτη στα γονιδιώματα των οργανισμών. Έτσι το γονιδίωμα ενός ανώτερου ευκαρυωτικού οργανισμού μπορεί να κοπεί σε χιλιάδες κομμάτια με την περιοριστική αυτή ενδονουκλεάση. Στη συνέχεια τα κομμάτια αυτά ενσωματώνονται σε **ειδικούς φορείς**. Οι πιο χαρακτηριστικοί τύποι φορέων είναι τα πλασμίδια, και το DNA φάγων. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης έχουν την συγκεκριμένη αλληλουχία **μια μόνο φορά**. Έτσι τα πλασμίδια κόβονται από την EcoRI σε αυτή τη θέση και δημιουργείται ένα γραμμικό μόριο DNA με μονοκλωνα άκρα. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού αναμιγνύονται, και επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση ενός ενζύμου, της **DNA δεσμάσης**. (Η DNA δεσμάση φυσιολογικό είναι ένα από τα ένζυμα της αντιγραφής που συνδέει κομμάτια του DNA) και δημιουργούνται ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Μερικά πλασμίδια ξαναγίνονται κυκλικά χωρίς να προσλάβουν DNA του οργανισμού.

Βακτήρια-ξενιστές δέχονται σε μικρό ποσοστό πλασμίδια μερικά από τα οποία είναι ανασυνδυασμένα. Συνήθως χρησιμοποιούνται ως ξενιστές, βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά. Για να μπει ένα πλασμίδιο μέσα στο βακτήριο, τα τοιχώματα του βακτηρίου γίνονται παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια, μετά από κατάλληλη κατεργασία. (μεταοχηματισμός).

Η επιλογή των βακτηρίων που δέχθηκαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στηρίζεται στην ικανότητα ανάπτυξης τους παρουσία αντιβιοτικού, επειδή το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Κάθε βακτήριο που προσέλαβε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πολλαπλασιάζεται και δίνει ένα κλώνο. Η διαδικασία δημιουργίας κλώνων βακτηρίων ονομάζεται **κλωνοποίηση**. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού δότη και αποτελεί μια **γονιδιωματική βιβλιοθήκη**. Για να γίνει επιλογή ενός κλώνου που έχει ένα επιθυμητό γονίδιο χρησιμοποιούνται **ειδικοί ανιχνευτές**

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΘΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

Η κλωνοποίηση σε πλασμίδια είναι σχετικά απλή και γι' αυτό τα πλασμίδια αποτελούν το συνηθέστερο φορέα κλωνοποίησης για οργανισμούς με μικρό γονιδίωμα. Ένας άλλος φορέας που χρησιμοποιείται ευρύτατα γιατί μπορεί να ενσωματώσει μεγαλύτερα κομμάτια ξένου DNA, είναι ο βακτηριοφάγος λ. Η στρατηγική της κλωνοποίησης είναι η ίδια με αυτήν που χρησιμοποιείται και στα πλασμίδια

Συμπληρωματικές γνώσεις

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

1. Κόψιμο, με μία περιοριστική ενδονουκλεάση, του γονιδιώματος ενός ευκαρυωτικού οργανισμού.
2. Επιλογή πλασμιδίων (φορέων κλωνοποίησης).
 - α. Γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό
 - β. Μία φορά η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιηθεί.
3. Άνοιγμα των πλασμιδίων με τη χρήση της ίδιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης, που χρησιμοποιήθηκε και για τον τεμαχισμό του γονιδιώματος του ευκαρυωτικού κυττάρου.
4. Ανάμειξη των δύο DNA (αυτού του ευκαρυωτικού οργανισμού με τα πλασμίδια).
5. Δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τη βοήθεια του ενζύμου DNA δεσμάση.
6. Επιλογή βακτηρίων που δεν διαθέτουν πλασμίδιο.
7. Επεξεργασία βακτηρίων, ώστε τα τοιχώματά τους να γίνουν παροδικά διαπερατά και να διευκολυνθεί έτσι η είσοδος των πλασμιδίων.
8. Εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στα βακτήρια (μετασχηματισμός).
9. Επιλογή βακτηρίων που έχουν ενσωματώσει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, με χρήση αντιβιοτικού.
10. Κλωνοποίηση επιλεγμένων βακτηρίων.

Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που θα δημιουργηθούν αποτελεί τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη.

Επεξήγηση εννοιών και όρων:

Περιοριστική ενδονουκλεάση: Ένα ένζυμο που κόβει το DNA σε θέσεις όπου υπάρχει μια μικρή συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Χρησιμοποιείται ευρέως στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA.

EcoR1: Περιοριστική ενδονουκλεάση του βακτηρίου *Escherichia coli*

Βακτηριοφάγος λ: Ιός βακτηρίων που χρησιμοποιείται σαν φορέας κλωνοποίησης.

Ανιχνευτής: Ένα μακρομόριο όπως DNA, RNA ή αντίσωμα το οποίο έχει ιχνηθετηθεί και γι' αυτό μπορεί να εντοπιστεί με μία τεχνική.

Κλωνοποίηση του *m-RNA*: Κατασκευή *cDNA* βιβλιοθήκης

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς πολλά γονίδια μεταγράφονται σε ορισμένους μόνο κυτταρικούς τύπους όπως για παράδειγμα τα γονίδια των αλυσίδων των αιμοσφαιρινών που εκφράζονται μόνο στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα του ανθρώπου. Αν θέλουμε να κλωνοποιήσουμε μόνο τα γονίδια που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα, τότε κατακευάζουμε τις *cDNA* βιβλιοθήκες. Οι *cDNA* βιβλιοθήκες περιέχουν αντίγραφα των *mRNA* όλων των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά και έχουν το πλεονέκτημα απομόνωσης μόνο των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των εξωνίων.

Για να κατασκευαστεί μία ***cDNA* βιβλιοθήκη**, απομονώνεται το ολικό «ώριμο» *mRNA* από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο. Το *mRNA* χρησιμοποιείται σαν καλούπι για την σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (*cDNA*: complementary DNA). Η σύνθεση του *cDNA* γίνεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια *cDNA* - *mRNA*. Το *mRNA* διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αποδιατάσσεται με θέρμανση και τα *cDNA* χρησιμεύουν σαν καλούπι για την σύνθεση μια συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA. Τα δίκλιωνα μόρια DNA εισάγονται σε πλασμίδια ή βακτηριοφάγους και κλωνοποιούνται με την διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως. Με αυτό τον τρόπο δίνουν την δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο-ξενιστή.

Συμπληρωματικές γνώσεις

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ *cDNA* ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

Για να κατασκευαστεί μία ***cDNA* βιβλιοθήκη**,

1. απομονώνεται το ολικό *mRNA* από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο.
2. Το *mRNA* χρησιμοποιείται σαν καλούπι για την σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας **DNA** Η σύνθεση του ***cDNA*** γίνεται απο το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.
3. Παράγονται υβριδικά μόρια ***cDNA*** - *mRNA*.
4. Το *mRNA* διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αποδιατάσσεται με θέρμανση
5. τα ***cDNA*** χρησιμεύουν σαν καλούπι για την σύνθεση μια συμπληρωματικής αλυσίδας **DNA** και το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δίκλωνων μορίων **DNA**.
6. Τα δίκλιωνα μόρια **DNA** εισάγονται σε πλασμίδια ή βακτηριοφάγους και κλωνοποιούνται με την διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Με αυτό τον τρόπο δίνουν την δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο ξενιστή.

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΘΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

Διαφορές γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης

Γονιδιωματική βιβλιοθήκη	cDNA βιβλιοθήκη
Σύνολο βακτηριακών κλώνων που αντιπροσωπεύει, ολόκληρο το γονιδίωμα ενός οργανισμού - δότη.	Σύνολο βακτηριακών κλώνων που περιέχει αντίγραφα DNA του ολικού mRNA που παράγεται από ένα κύτταρο ή ιστό.
Αποτελείται, από μεγάλο αριθμό βακτηριακών κλώνων, διότι περιέχει το συνολικό γονιδίωμα.	Αποτελείται από μικρότερο αριθμό βακτηριακών κλώνων, διότι περιέχει αντίγραφα DNA των γονιδίων που εκφράζονται σε ορισμένο ιστό
Κάθε βακτηριακός κλώνος περιέχει κάποιο (τυχαίο) τμήμα του γονιδιώματος του κυττάρου δότη	Κάθε βακτηριακός κλώνος περιέχει αντίγραφο κάποιου γονιδίου που εκφράζεται στο κύτταρο δότη
Μπορούν να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε κύτταρα ενός οργανισμού, αρκεί να έχουν πυρήνα	Χρησιμοποιούνται κύτταρα στα οποία εκφράζεται το επιθυμητό γονίδιο
Χρησιμοποιείται το συνολικό DNA του κυττάρου	Χρησιμοποιείται το κυτταροπλασματικό m-RNA του κυττάρου δότη
Στόχος είναι η μελέτη του γονιδιώματος και η απομόνωση γονιδίων, υποκινητών κ.λπ.	Στόχος είναι, η μελέτη των εξωνίων των γονιδίων, η παραγωγή πρωτεϊνών σε προκαρυωτικά κύτταρα κ.λπ.
Είναι μία για κάθε είδος και <i>ανάλογο</i> , με την περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιούμε	Υπάρχουν πολλές, <i>ανάλογα</i> με το είδος του ιστού και το στάδιο της ανάπτυξης που επιλέγουμε
Στην κατασκευή της δεν χρησιμοποιείται το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Το DNA του οργανισμού - δότη κόβεται με περιοριστική ενδονουκλεάση σε τμήματα όπου συναντά συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων.	Στην κατασκευή της χρησιμοποιείται το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Το DNA που σχηματίζει επιμηκύνεται στα άκρα με ειδική αλληλουχία που αναγνωρίζει και κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση.
Περιέχει τμήματα του γονιδιώματος ποικίλου μεγέθους που μπορούν να αποτελούνται από τμήματα γονιδίων, υποκινητές, γονίδια, ρυθμιστικές περιοχές κ.λπ.	Περιέχουν αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται στα συγκεκριμένα κύτταρα.
Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη ευκαρυωτικού οργανισμού δεν δίνει τη δυνατότητα παραγωγής πρωτεϊνών	Η cDNA βιβλιοθήκη δίνει τη δυνατότητα παραγωγής πρωτεϊνών σε βακτήρια.
Τα γονίδια που επιλέγονται από μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη, δεν μπορούν κατά κανόνα να εκφραστούν άμεσα από ένα βακτηριακό κύτταρο και να μας δώσουν λειτουργικό προϊόν, λόγω των εσωνίων που περιέχουν	Τα γονίδια μπορούν άμεσα να εκφραστούν από ένα βακτηριακό κύτταρο γιατί δεν περιέχουν εσώνια. Το προϊόν βέβαια που θα παραχθεί μπορεί να μην είναι λειτουργικό και να χρειάζεται τροποποίηση.
Ακόμα και στην περίπτωση που ένας βακτηριακός κλώνος, έχει ένα γονίδιο του οργανισμού δότη, αυτό (αν είναι ασυνεχές) θα περιέχει εσώνια και εξώνια	Οι βακτηριακοί κλώνοι περιέχουν αντίγραφα γονιδίων (ακόμα και των ασυνεχών) χωρίς τα εσώνια

Επεξήγηση εννοιών και όρων:

cDNA βιβλιοθήκη: Συλλογή κλωνοποιημένων τμημάτων DNA που είτε αντιπροσωπεύουν ολόκληρο το γονιδίωμα (γονιδιωματική βιβλιοθήκη) ή αντιπροσωπεύουν DNA αντίγραφα του ολικού mRNA που παράγεται από ένα κύτταρο ή ιστό (cDNA βιβλιοθήκη).

Η υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κλώνων γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης

Η απομόνωση του συνολικού DNA από κύτταρα ενός προκαρυωτικού ή ευκαρυωτικού οργανισμού στο δοκιμαστικό σωλήνα είναι υπόθεση ρουτίνας. Αν επιδράσουμε στο DNA που απομονώθηκε με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αυξήσουμε τη θερμοκρασία τότε σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων και οι δύο αλυσίδες αποχωρίζονται η μια από την άλλη. Η διαδικασία αυτή λέγεται **αποδιάταξη**. Οι δύο μονόκλωνες συμπληρωματικές αλυσίδες σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν να επανασυνδεθούν. Στην ιδιότητα αυτή στηρίζεται η διαδικασία της υβριδοποίησης που είναι η σύνδεση μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ή συμπληρωματικών DNA - RNA. Η **υβριδοποίηση** είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα του DNA που μας δίνει τη δυνατότητα αν έχουμε ένα γνωστό μόριο DNA, να το χρησιμοποιήσουμε ως ανιχνευτή για τον εντοπισμό του συμπληρωματικού του όταν το τελευταίο βρίσκεται μαζί με χιλιάδες άλλα κομμάτια.

Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει ένα τεράστιο αριθμό από κλωνοποιημένα κομμάτια χρωμοσωμικού DNA, τα οποία έχουν παραχθεί με δράση κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Ορισμένα από τα κομμάτια αυτά περιέχουν ολόκληρα γονίδια, άλλα περιέχουν κομμάτια γονιδίων και άλλα τμήματα DNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Έτσι πρέπει μέσα από όλα αυτά τα κομμάτια να εντοπίσουμε αυτό που θέλουμε να μελετήσουμε. Η τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως περιλαμβάνει τη χρήση ιχνηθετημένων ανιχνευτών μορίων DNA ή RNA που περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές προς το κλωνοποιημένο DNA. Οι ανιχνευτές αναμειγνύονται με το DNA της βιβλιοθήκης (το οποίο έχει αποδιαταχθεί) και υβριδοποιούν μόνο το συμπληρωματικό τους DNA

Η διαδικασία της υβριδοποίησης ακολουθείται και για την απομόνωση ενός συγκεκριμένου γονιδίου από μια cDNA βιβλιοθήκη

Επεξήγηση εννοιών και όρων:

Αποδιάταξη του DNA: Καταστροφή της διπλής έλικας του DNA με διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες.

Υβριδοποίηση: Η σύνδεση δύο μονόκλωνων αλυσίδων DNA, με υδρογονικούς δεσμούς, σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών του DNA

Η κατασκευή βιβλιοθηκών μας δίνει τη δυνατότητα να απομονώσουμε το βακτηριακό κλώνο που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια του κλώνου και δημιουργούνται πολλά αντίγραφα του γονιδίου που περιέχει. Η δημιουργία πολλών αντιγράφων είναι απαραίτητη προϋπόθεση τόσο για τη μελέτη του συγκεκριμένου γονιδίου όσο και για την παραγωγή της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί.

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) μας επιτρέπει να αντιγράψουμε επιλεκτικά, εκατομμύρια φορές, ειδικές αλληλουχίες DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Η τεχνική αυτή που άρχισε να εφαρμόζεται ευρέως από το 1985, έχει αυξήσει την ευαισθησία των γενετικών αναλύσεων και έχει πολλές πρακτικές εφαρμογές. Για παράδειγμα χρησιμοποιείται στην ιατρική για την διάγνωση ασθενειών όπως του AIDS, στην εγκληματολογία για την διαλεύκανση υποθέσεων και στη μελέτη DNA από απολιθώματα.

Επεξήγηση εννοιών και όρων:

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR): Μέθοδος δημιουργίας μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός ειδικού τμήματος DNA με γνωστή αλληλουχία στα άκρα.

Μεθοδολογία επίλυσης προβλημάτων και ασκήσεων

Η τεχνική έχει εφαρμοστεί αρχικά στα πλασμίδια των βακτηρίων. Τα πλασμίδια περιέχουν πληροφορίες για την αντιμετώπιση αντιβιοτικών. Υπάρχει περίπτωση το τμήμα DNA που θα συγκολληθεί στο πλασμίδιο με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA να εισαχθεί σε περιοχή γονιδίου που προσδίδει στο βακτήριο ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό. Η εισαγωγή όμως αυτή καταστρέφει το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου και έτσι η ανθεκτικότητα σε αυτό το αντιβιοτικό χάνεται. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων και αποκόπτουν την αλληλουχία σε συγκεκριμένο σημείο. Παραδείγματος χάριν η EcoR1 αναγνωρίζει την αλληλουχία:



και την αποκόπτει μεταξύ της G και της A αφήνοντας ένα τμήμα τεσσάρων βάσεων και στα δύο τμήματα που προκύπτουν μετά την αποκοπή μονόκλινα.. Είναι προφανές ότι η δράση αυτή της EcoR1 έχει σαν αποτέλεσμα το σπάσιμο δύο φωσφοδιεστερικών δεσμών και 10 δεσμών υδρογόνου από αυτούς που συνέδεαν μεταξύ τους της συμπληρωματικές βάσεις. Η δράση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης σε μια μόνο περιοχή ενός γραμμικού μορίου DNA έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία δύο μορίων DNA. Η αντίστοιχη δράση σε κυκλικό μόριο DNA έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πάλι μορίου DNA, το οποίο όμως είναι γραμμικό. Μια περιοριστική ενδονουκλεάση είναι κατάλληλη για αποκοπή ενός γονιδίου για μεταφορά του σε φορέα κλωνοποίησης αν δεν υπάρχει η αλληλουχία που αποκόπτει μέσα στο παραπάνω γονίδιο.

ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΙΑ ΜΑΘΗΤΕΣ - ΜΑΘΗΤΡΙΕΣ

1. Το ένζυμο EcoRI αποκόπτει μικρό γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA σε δύο κομμάτια A και B. Το κομμάτι A αποτελείται από 212 νουκλεοτίδια 40 από τα οποία περιέχουν τη βάση αδενίνη. α) Ποιος ο αριθμός των άλλων βάσεων του A; β) Ποιος ο αριθμός των φωσφοδιεστερικών δεσμών που υπάρχουν στο κομμάτι A; γ) Πόσοι δεσμοί υδρογόνου συγκρατούν μεταξύ τους τις συμπληρωματικές αλυσίδες του κομματιού A; δ) Ποιος ο αριθμός του κάθε είδους βάσεων του κομματιού B αν το αρχικό μόριο DNA περιείχε 400 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και 85 αδενίνες;
- α) Στο κομμάτι A του DNA υπάρχουν 4 νουκλεοτίδια (2A και 2T) σε μονόκλωνο τμήμα ενώ τα υπόλοιπα $212-4=208$ στο δίκλωνο τμήμα. Το δίκλωνο τμήμα έχει $40-2=38A$ και $38T$ και $(208-2 \times 38)/2=66 G$ και $66 C$. Άρα συνολικά το κομμάτι A έχει 40A, 40 T, 66 G και 66 C.
- β) Ο ένας κλώνος θα έχει $208/2=104$ νουκλεοτίδια άρα 103 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και ο άλλος, που φέρει και το μονόκλωνο τμήμα θα έχει $104+4=108$ νουκλεοτίδια άρα 107 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Συνολικά υπάρχουν $103+107=210$ φωσφοδιεστερικοί δεσμοί
- γ) Στο δίκλωνο τμήμα του κομματιού A υπάρχουν $2 \times 38 + 3 \times 66 = 274$ δεσμοί υδρογόνου
- δ) Αφού το αρχικό μόριο DNA έχει 400 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και είναι γραμμικό θα αποτελείται από 402 βάσεις: 85 A και 85 T καθώς και $(402 - 2 \times 85)/2 = 116 G$ και 116 C. Άρα το τμήμα B θα έχει $85-40=45 A$, $85-40=45T$, $116-66=50G$ και $116-66=50C$
2. Ένα πλασμίδιο με γονίδια που το καθιστούν ανθεκτικό στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη αποκόπτεται με περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Η τομή του DNA του σε θέση του γονιδίου ανθεκτικότητας έναντι της αμπικιλίνης. Το κομμένο πλασμίδιο συνδυάζεται με τμήματα DNA δροσόφιλας, που έχουν προκύψει από την επεξεργασία του DNA της με περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, για τη δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Το ανασυνδυασμένο DNA μετασχηματίζει κύτταρα Escherichia coli. α) Ποιο αντιβιοτικό θα πρέπει να προστεθεί στο θρεπτικό μέσο για να επιλέξουμε κύτταρα που έχουν ενσωματώσει ένα πλασμίδιο; β) Πως μπορούμε να εξηγήσουμε την παρουσία αποικιών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα και στα δύο αντιβιοτικά;
- α) Στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια δεν έχει καταστραφεί το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, ενώ αντίθετα έχει καταστραφεί το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Άρα η επιλογή θα γίνει με τετρακυκλίνη.
- β) Γιατί μερικά πλασμίδια επανασυγκολλήθηκαν χωρίς να έχουν ανασυνδιαστεί το DNA τους και έτσι διατηρούν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΘΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

3. Μελετάμε ένα γραμμικό μόριο DNA μήκους 12 Kbp (1 Kbp = 1000 ζεύγη βάσεων). Όταν στο μόριο αυτό επιδράσει η περιοριστική ενδονουκλεάση A δημιουργούνται δύο θραύσματα 4 και 8 Kbp, ενώ όταν επιδράσει η περιοριστική ενδονουκλεάση B δημιουργούνται επίσης δύο θραύσματα 5 και 7 Kbp. Αν οι δύο ενδονουκλεάσες A και B επιδράσουν μαζί πόσα θραύσματα DNA και τι μήκους περιμένουμε να πάρουμε;

Έστω η ενδονουκλεάση A δρα σε απόσταση 4 kbp από την μια άκρη του μορίου DNA.

- I) Αν η ενδονουκλεάση B δρα σε απόσταση 5 kbp από την ίδια άκρη τότε σχηματίζονται με την δράση και των δύο τμήματα 4 kbp, 1 kbp και 7 kbp
- II) Αν η ενδονουκλεάση B δρα σε απόσταση 7 kbp από την ίδια άκρη τότε σχηματίζονται με την δράση και των δύο τμήματα 4 kbp, 3 kbp και 5 kbp
4. Ένα γραμμικό μόριο DNA έχει μήκος 10 Kbp (1 Kbp = 1000 ζεύγη βάσεων). Όταν στο μόριο αυτό επιδράσει η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI δημιουργούνται δύο θραύσματα 3 και 7 Kbp, ενώ όταν επιδράσει η περιοριστική ενδονουκλεάση Hind III δημιουργούνται θραύσματα 2, 3 και 5 Kbp. Αν οι δύο ενδονουκλεάσες επιδράσουν μαζί δημιουργούνται θραύσματα 1, 2, 3 και 4 Kbp. Σε ποια απόσταση από την μια άκρη του μορίου DNA δρα η κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση;

Έστω η EcoRI δρα σε απόσταση 3 kbp από τη μια άκρη του μορίου DNA.

Οι πιθανοί συνδυασμοί των αποστάσεων από την ίδια άκρη του μορίου DNA αν δράσει μόνη της η Hind III είναι έξι. οι οποίοι αποδίδουν τμήματα με μήκη: 2,3,5 – 2,5,3 – 3,5,2 – 3,2,5 – 5,3,2 και 5,2,3. Από τους έξι συνδυασμούς διαπιστώνουμε ότι μόνο ο συνδυασμός 2,5,3 της Hind III δίνει κομμάτια 1, 2, 3 και 4 kb αν δράσει από κοινού με την EcoRI

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ - ΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΜΕ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

1. Γιατί οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες και οι φορείς κλωνοποίησης είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική;

- Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Διασπών τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στο εσωτερικό του μορίου και είναι τα απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική, επειδή αναγνωρίζουν και κόβουν τις ίδιες πάντα ειδικές αλληλουχίες του δι-κλωνου DNA, αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζεργάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα. (Υπάρχουν ορισμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που κόβουν το DNA χωρίς να δημιουργούν μονόκλωνες ουρές). Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές βάσεις του φορέα κλωνοποίησης που έχει κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Τα δύο είδη DNA μπορεί να αναμειχθούν, και επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυασμένα μόρια DNA.
- Οι φορείς κλωνοποίησης είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική, επειδή είναι μόρια αυτόνομα, που μπορούν να αναπαράγονται ανεξάρτητα. Οι φορείς κλωνοποίησης είναι μόρια DNA όπως πλασμίδια, DNA φάγων, που μπορούν να αυτόδιπλασιάζονται μέσα σε ένα κύτταρο ξενιστή όπως ένα βακτήριο. Το DNA απομονώνεται από έναν οργανισμό-δότη, κόβεται ενζυματικά με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ενώνεται με το φορέα κλωνοποίησης και δημιουργείται ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA

2. Τι είναι μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη;

- α. ένα κλώνος βακτηρίων που περιέχει ένα τμήμα DNA ενός οργανισμού
- β. μια συλλογή βιβλίων για κλώνους
- γ. ένα σύνολο από κλώνους βακτηρίων που ο καθένας έχει ένα πλασμίδιο με διαφορετικό τμήμα DNA ενός οργανισμού
- δ. ένα σύνολο από περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται για να παράγουν διαφορετικούς κλώνους
- ε. τίποτε από τα παραπάνω.

Ποια είναι η σωστή απάντηση;

Η σωστή απάντηση είναι η γ.

3. Θα μπορούσε να αναπτυχθεί η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, αν ο γενετικός κώδικας δεν ήταν καθολικός; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

Με τον όρο τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA εννοούμε όλες τις τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά τμήματος DNA από έναν οργανισμό σε έναν άλλο. Το DNA που μεταφέρθηκε θέλουμε να μπορεί να παράγει στο νέο οργανισμό την ίδια πρωτεΐνη. Αυτό μπορεί να συμβεί, μόνο αν η ίδια τριπλέτα DNA καθορίζει (μέσω των κωδικονίων του mRNA) την ένταξη του ίδιου αμινοξέος στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αυτό επιτυγχάνεται, μόνο επειδή ο γενετικός κώδικας είναι καθολικός.

Το διάγραμμα παρουσιάζει ένα κομμάτι του μορίου του DNA:

- α) Να συμπληρώσετε τα κενά πλαίσια με τα γράμματα που αντιστοιχούν στις σωστές βάσεις.
- β) Να σχηματίσετε τόξα, που θα δείχνουν τους χημικούς δεσμούς που ανοίγουν, όταν γίνεται αποδιάταξη των κλώνων.
- γ) Να δώσετε την ονομασία των ενζύμων που παίζουν τον ρόλο της “κόλας” ανάμεσα στα μέρη του DNA του ίδιου κλώνου.



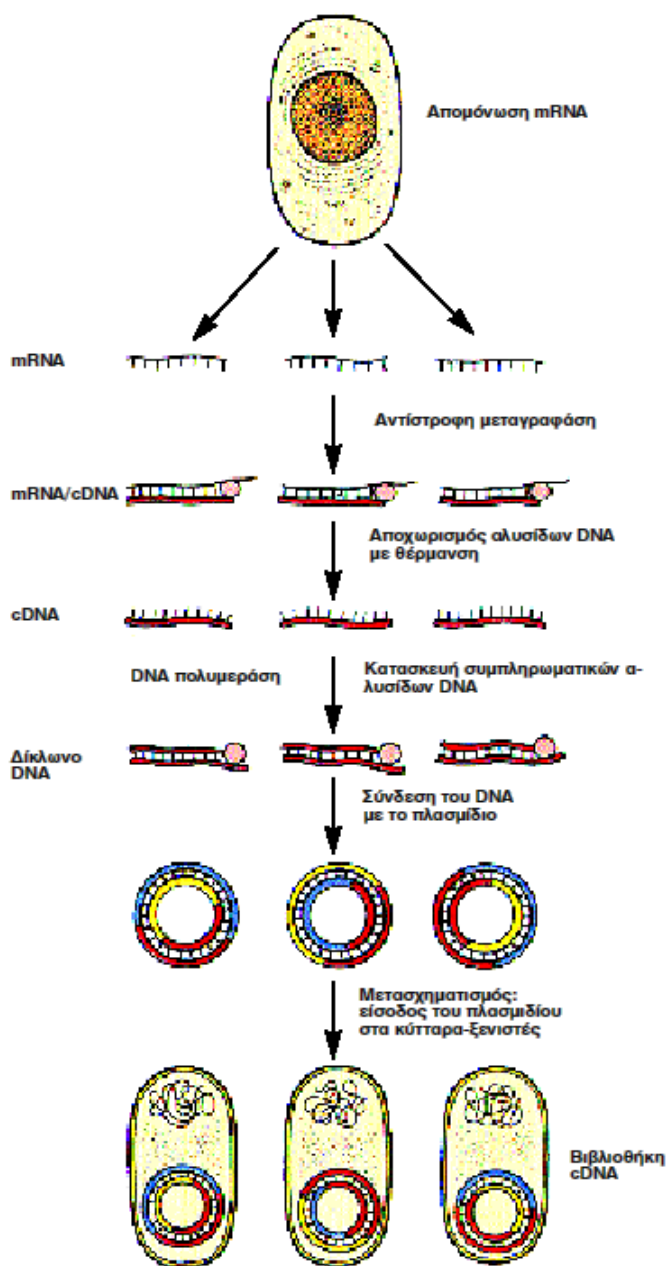
α. Συμπληρωματικότητα των βάσεων A-T και G-C

β. οι δεσμοί που ανοίγουν είναι, οι δεσμοί υδρογόνου, δύο ανάμεσα στη A και τη T και τρεις ανάμεσα στη G και C

γ. DNA δεσμάσες

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΘΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

4. Εξηγήστε με σχήματα πως παράγεται το cDNA και πως χρησιμοποιείται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA.



Για να κατασκευαστεί cDNA, απομονώνεται το ολικό mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο που μας ενδιαφέρει.

Το mRNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για την σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA).

Η σύνθεση του cDNA γίνεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.

Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA-mRNA.

Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή θέρμανση και το cDNA χρησιμεύει σαν καλούπι για την σύνθεση μια συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δίκλωνου μορίου DNA.

Το δίκλωνο μόριο DNA εισάγεται σε πλασμίδιο η βακτηριοφάγο και κλωνοποιείται.

Το cDNA περιέχει αντίγραφο του mRNA και έχει το πλεονέκτημα απομόνωσης μόνο των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των εξονίων. Με αυτό τον τρόπο δίνει τη δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο ξενιστή.

5. Συμπληρώστε με τις κατάλληλες λέξεις τα κενά στο κείμενο:

Το DNA κόβεται μεσε κομμάτια με γνωστά άκρα. Τα κομμάτια συνδέονται με ένα, που έχει συμπληρωματικό άκρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που λέγεται Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί από τομε τη βοήθεια του ενζύμου που ονομάζεται..... και να συνδεθεί με ένα.....Το ανασυνδυασμένο μόριο εισάγεται κατόπιν σε.....

Το DNA κόβεται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε κομμάτια με γνωστά άκρα. Τα κομμάτια συνδέονται με ένα φορέα κλωνοποίησης, που έχει συμπληρωματικά άκρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που λέγεται DNA δεσμάση.

Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί από το m-RNA με τη βοήθεια ενζύμου, που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση και να συνδεθεί με ένα φορέα κλωνοποίησης. Το ανασυνδυασμένο μόριο εισάγεται σε βακτήριο

ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΙΑ ΜΑΘΗΤΕΣ - ΜΑΘΗΤΡΙΕΣ

6. Ποια κύτταρα θα χρησιμοποιούσατε, για να κατασκευάσετε μία cDNA βιβλιοθήκη, εάν θα θέλατε να απομονώσετε το γονίδιο για την:

- α. Ινσουλίνη**
- β. Αιμοσφαιρίνη**
- γ. Αντισώματα**
- δ. Μυοσίνη**

α. Ινσουλίνη	=>	κύτταρα παγκρέατος
β. Αιμοσφαιρίνη	=>	πρόδρομα ερυθροκύτταρα
γ. Αντισώματα	=>	B λεμφοκύτταρα
δ. Μυοσίνη	=>	μυϊκά κύτταρα

7. Για ποιο λόγο για την ενσωμάτωση DNA ευκαρυωτικού οργανισμού σε πλασμίδιο χρησιμοποιείται η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, για να κόψει το πλασμίδιο και το DNA του οργανισμού;

Όπως γνωρίζουμε, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA, μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων. Έχουν απομονωθεί πολλές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες, όποτε συναντούν την ειδική αλληλουχία στο γονιδίωμα, κόβουν κάθε αλυσίδα σε συγκεκριμένη θέση αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA, που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Επομένως, η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση μπορεί και κόβει το πλασμίδιο και το DNA του οργανισμού στις ίδιες συγκεκριμένες θέσεις και έτσι δημιουργούνται σ' αυτά άκρα με συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού, αναμειγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυσασμένα πλασμίδια

8. Ποιος είναι ο ρόλος των παρακάτω στις τεχνικές της Γενετικής Μηχανικής

- α. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες**
- β. Πλασμίδια**
- γ. Βακτήρια**

α. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα, που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA και κόβουν κάθε αλυσίδα του σε συγκεκριμένη θέση αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα.

β. Τα πλασμίδια είναι οι φορείς κλωνοποίησης, με τους οποίους ενώνονται τα κομμάτια του DNA από τον οργανισμό-δότη, ώστε να δημιουργηθεί το ανασυνδυσασμένο μόριο DNA.

γ. Στα βακτήρια μεταφέρονται τα ανασυνδυσασμένα μόρια DNA και τα μετασχηματίζουν. Κάθε βακτήριο προσλαμβάνει ένα μόνο μόριο DNA και μετά τον πολλαπλασιασμό του, δημιουργεί ένα βακτηριακό κλώνο

9. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

- α. παράγονται φυσιολογικά από ευκαρυωτικά κύτταρα**
 - β. κόβουν μονόκλωνο μόριο DNA**
 - γ. κόβουν το DNA σε πολύ εξειδικευμένες θέσεις**
 - δ. εισάγονται στα βακτήρια από τους βακτηριοφάγους**
- Ποια από τις προτάσεις α, β, γ, δ είναι σωστή;**

Η σωστή πρόταση είναι η γ.

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΘΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

10. Ποια από τις παρακάτω προτάσεις που αφορούν την DNA δεσμάση είναι λανθασμένη;
- α. είναι ένζυμο
 - β. είναι φυσιολογικό συστατικό των κυττάρων
 - γ. μπορεί να ενώνει κομμάτια στο ανασυνδυασμένο DNA
 - δ. παίρνει μέρος στην αντιγραφή του DNA
 - ε. ενώνει πολυπεπτίδιο.

Η λανθασμένη πρόταση είναι η ε.

11. Τι είναι ή σε τι χρησιμοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR):
- α. είναι μέθοδος εύρεσης της ακολουθίας βάσεων του DNA
 - β. Χρησιμοποιείται, για να ανιχνεύει ένα ειδικό τμήμα DNA
 - γ. Χρησιμοποιείται, για να παράγει μεγάλες ποσότητες ενός ειδικού τμήματος DNA
 - δ. Χρησιμοποιείται για την χαρτογράφηση γονιδίων

Η σωστή πρόταση είναι η γ.

12. Σε πείραμα Γενετικής Μηχανικής χρησιμοποιείται πλασμίδιο που έχει δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντίστοιχα αντιβιοτικά: το ένα γονίδιο προσδίδει ανθεκτικότητα σε αμικιλίνη και το άλλο σε στρεπτομυκίνη. Στο πλασμίδιο αυτό εισάγεται τμήμα DNA μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας της αμικιλίνης. Στη συνέχεια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σχηματίζονται κύτταρα *Escherichia coli*, που δεν είναι ανθεκτικά και στα δύο αντιβιοτικά. Αναλύστε τον τρόπο με τον οποίο μπορούν να επιλεγούν τα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Τα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα έχουν ανθεκτικότητα μόνο στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, παρουσία του οποίου αναπτύσσονται.

Τα βακτήρια που δεν περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο δεν αναπτύσσονται παρουσία ενός ή και των δύο αντιβιοτικών και τα βακτήρια που περιέχουν το πλασμίδιο χωρίς το ξένο DNA θα είναι ανθεκτικά και στα δύο αντιβιοτικά

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

Δεν ξέρουμε αν θα εκφραστεί το γονίδιο.

α. Αν το γονίδιο περιέχει εσώνια, η μετάφραση του πρόδρομου mRNA που προκύπτει θα δώσει μια πρωτεΐνη με περισσότερα από 148 αμινοξέα, αφού δεν υπάρχει «διαδικασία της ωρίμανσης» στο βακτηριακό κύτταρο.

β. Αν το γονίδιο δεν περιέχει εσώνια, η μετάφραση του σχηματιζόμενου mRNA θα δώσει την ακριβή πρωτεΐνη, αν δεν γίνεται αποκοπή, τμήματος της πρωτεΐνης

γ. Σε πολλές πρωτεΐνες, μετά τη σύνθεσή τους απομακρύνονται ορισμένα αμινοξέα από το αρχικό αμινικό τους άκρο, οπότε αν συμβεί αυτό θα πάρουμε άλλη πρωτεΐνη.

14. Παρατηρήθηκε ότι οι κλώνοι ενός μορίου DNA αποχωρίζονται στη θερμοκρασία των 100°C. 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 επανέλιξής τους.

α. Διασπά τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες,

β. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.(PCR)