

# Τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA

## Διαφορές γονιδιωματικής - cDNA βιβλιοθήκης

Γονιδιωματική βιβλιοθήκη	cDNA βιβλιοθήκη
1. Απομονώνεται όλο το DNA ενός οργανισμού δότη.	1. Απομονώνεται το ολικό mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο.
2. Δε χρησιμοποιείται το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.	2. Χρησιμοποιείται το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.
3. Το απομονωμένο DNA κόβεται με περιοριστική ενδονουκλεάση σε κομμάτια ποικίλου μεγέθους.	3. Στο DNA που σχηματίζεται προστίθενται άκρα με την ειδική αλληλουχία που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση, στη συνέχεια γίνεται επεξεργασία με την περιοριστική ενδονουκλεάση.
4. Περιέχει ολόκληρη την ποσότητα του γενετικού υλικού (π.χ. υποκινητές, αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής κ.λ.π.) έτσι έχει το πλεονέκτημα της απομόνωσης και μελέτης των παραπάνω αλληλουχιών.	4. Περιέχει αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά και έχει το πλεονέκτημα της απομόνωσης μόνο των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των εξωνίων.
5. Δε χρησιμοποιείται για την παραγωγή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης επειδή τα γονίδια περιέχουν εσώνια και τα τμήματα τα ενσωματωμένα στον φορέα μπορεί να μην κωδικοποιούν πρωτεΐνες.	5. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, π.χ. μιας ιντερφερόνης.

### Ποιες είναι οι επιθυμητές ιδιότητες ενός φορέα κλωνοποίησης;

1. Ικανότητα αυτόνομου διπλασιασμού μέσα σε ένα κύτταρο-ξενιστή, όπως για παράδειγμα σε ένα βακτήριο.
2. Μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων DNA που αναγνωρίζεται από μια περιοριστική ενδονουκλεάση (μια μόνο φορά).
3. Δυνατότητα εισόδου στο κύτταρο-ξενιστή (π.χ. πλασμίδιο που έχει την ικανότητα μετασχηματισμού των βακτηρίων).
4. Μια ιδιότητα που να μας δίνει τη δυνατότητα να επιλέξουμε τα κύτταρα ξενιστές στα οποία εισήλθε ο φορέας με το ανασυνδυσμένο DNA (π.χ. γονίδια για ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό).

*ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Γνωστοί φορείς κλωνοποίησης που ικανοποιούν τις παραπάνω απαιτήσεις είναι τα **πλασμίδια** και ορισμένοι βακτηριοφάγοι, όπως ο **βακτηριοφάγος λ**.*

**Εξηγείστε τους λόγους για τους οποίους ένα βακτήριο στο οποίο έχει εισαχθεί ένα ανθρώπινο γονίδιο με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA, δε θα παράγει την ίδια ακριβώς πρωτεΐνη που θα παρήγαγε ο ανθρώπινος οργανισμός. Πως μπορεί να ξεπεραστεί το συγκεκριμένο πρόβλημα;**

Οι διαδικασίες έκφρασης ενός γονιδίου υλοποιούνται σχεδόν με τον ίδιο τρόπο στα ευκαρυωτικά και στα προκαρυωτικά κύτταρα. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ορισμένες διαφορές, όπως:

- Τα περισσότερα γονίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι ασυνεχή ή διακεκομμένα. Δηλαδή ακολουθίες νουκλεοτιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα (**εξώνια**) διακόπτονται από ενδιάμεσες αλληλουχίες οι οποίες δε μεταφράζονται (**εσώνια**). Κατά τη διαδικασία μεταγραφής ενός ασυνεχούς γονιδίου, δημιουργείται το πρόδρομο mRNA που περιέχει και εξώνια και εσώνια. Το πρόδρομο mRNA υφίσταται τη διαδικασία της ωρίμανσης, κατά την οποία τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια κόβουν τα εσώνια και συρράπτουν τα εξώνια μεταξύ τους. Έτσι σχηματίζεται το ώριμο mRNA, το οποίο δεν περιέχει εσώνια. Αντίθετα, τα γονίδια των προκαρυωτικών κυττάρων δεν έχουν εσώνια και έτσι οι προκαρυωτικοί οργανισμοί δε διαθέτουν μηχανισμούς ωρίμανσης.
- Στα πλαίσια της γονιδιακής ρύθμισης (στο επίπεδο μετά τη μετάφραση) των ευκαρυωτικών οργανισμών, η πρωτεΐνη που έχει παραχθεί υπόκειται συχνά σε τροποποιήσεις για να γίνει βιολογικά λειτουργική. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη.

Εξαιτίας των παραπάνω διαφορών, αν ένα ανθρώπινο γονίδιο εισαχθεί σε ένα βακτήριο, τότε το βακτήριο μπορεί να εκφράσει το συγκεκριμένο γονίδιο παράγοντας όμως διαφορετική πρωτεΐνη. Αυτό θα συμβεί επειδή:

**α.** Θα μεταφραστούν και οι ακολουθίες των νουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στα εσώνια.

**β.** Υπάρχει αδυναμία τροποποίησης της παραγόμενης πρωτεΐνης.

Το πρώτο πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί με την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης, ενώ το δεύτερο είτε με ενζυμική τροποποίηση της παραγόμενης πρωτεΐνης από τον άνθρωπο (π.χ. μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη), είτε με τη χρήση διαγονιδιακών ζώων.

**Ποια είναι τα πλεονεκτήματα της cDNA βιβλιοθήκης σε σχέση με τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη;**

Οι cDNA βιβλιοθήκες περιέχουν δίκλωνο DNA αντίγραφο των ώριμων mRNA που εκφράζονται σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο ή ιστό. Έχουν το πλεονέκτημα ότι περιέχουν μόνο τις ακολουθίες των νουκλεοτιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των εξονίων, χωρίς να περιέχουν τα εσώνια.

Αν λοιπόν ένα δίκλωνο μόριο DNA (που είναι αντίγραφο ενός μορίου ώριμου mRNA ενός ευκαρυωτικού κυττάρου) εισαχθεί σε κατάλληλο φορέα και μετασχηματίσουμε βακτήρια, τότε τα μετασχηματισμένα βακτήρια θα εκφράσουν το συγκεκριμένο DNA παράγοντας την ίδια πρωτεΐνη που θα παρήγαγε και ο ευκαρυωτικός οργανισμός. Σημειώνουμε όμως ότι τα βακτήρια θα συνεχίσουν να έχουν αδυναμία τροποποίησης της πρωτεΐνης μετά τη μετάφραση, ώστε να γίνει βιολογικά λειτουργική.

Αντίθετα, στις γονιδιωματικές βιβλιοθήκες έχουμε βακτηριακούς κλώνους στους οποίους περιέχονται αυτούσια τα γονίδια του ευκαρυωτικού οργανισμού, δηλαδή υπάρχουν και τα εσώνια. Συνεπώς, όταν τα βακτήρια εκφράσουν τα συγκεκριμένα γονίδια θα μεταφράσουν και τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στα εσώνια, παράγοντας έτσι μια πρωτεΐνη διαφορετική από αυτή που θα παρήγαγε το ευκαρυωτικό κύτταρο. Η πρωτεΐνη αυτή πιθανότατα δε θα είναι λειτουργική.

### Ποια είναι τα πλεονεκτήματα της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε σχέση με τη cDNA βιβλιοθήκη;

Στους βακτηριακούς κλώνους που έχουν δημιουργηθεί κατά την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης περιέχεται το σύνολο του γενετικού υλικού ενός οργανισμού. Δηλαδή εκτός από τα γονίδια που κωδικοποιούν τη σύνθεση mRNA (μαζί με τα εσώνια), περιέχονται και:

- α. γονίδια που κωδικοποιούν τη σύνθεση snRNA, tRNA και rRNA,
- β. οι υποκινητές των γονιδίων,
- γ. οι αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής των γονιδίων και οι αμετάφραστες περιοχές,
- δ. οι ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων,
- ε. τμήματα του γενετικού υλικού που δεν αντιστοιχούν σε γονίδια και συνεπώς δε μεταγράφονται (μη κωδικοποιούσες περιοχές του DNA).

Αντίθετα, στη cDNA βιβλιοθήκη περιέχονται μόνο αντίγραφα του ώριμου mRNA και μάλιστα από ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο ή ιστό.

Κατά συνέπεια με τη χρήση της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης μπορούμε να μελετήσουμε και τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων που απαριθμήσαμε, κάτι το οποίο δε μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση cDNA βιβλιοθήκης.

### Ποια ένζυμα πρέπει να χρησιμοποιηθούν για να κατασκευαστεί η cDNA βιβλιοθήκη ενός συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου ή ιστού;

Για την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης πρέπει να χρησιμοποιηθούν τα παρακάτω ένζυμα:

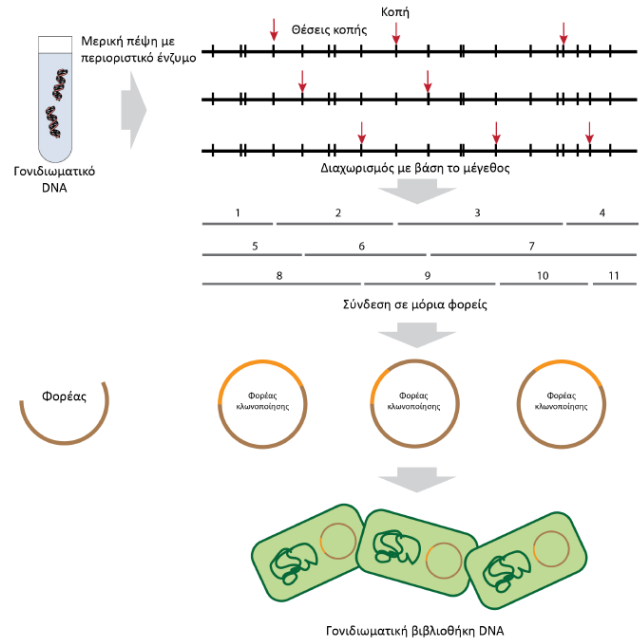
- Αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση του cDNA (με καλούπι το ώριμο mRNA).
- DNA πολυμεράση και πριμόσωμα για να συντεθεί το δίκλωνο DNA (με καλούπι το cDNA).
- Μια περιοριστική ενδονουκλεάση, ώστε να κοπεί το δίκλωνο DNA που συνθέσαμε και το DNA του φορέα.
- DNA δεσμάση για να ενωθούν τα δύο τμήματα DNA, δηλαδή το δίκλωνο DNA που συνθέσαμε και το γενετικό υλικό του φορέα.

### ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ (εμβαθύνοντας την κατανόησή μας)

**Ονοματολογία περιοριστικών ενδονουκλεασών:** Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες παίρνουν την ονομασία τους από το βακτήριο από το οποίο απομονώθηκαν με ένα σύστημα ονοματολογίας που βασίζεται στο γένος, το είδος και το στέλεχος του βακτηρίου, π.χ.:

Όνομα	Επεξήγηση	Περιγραφή
E	Escherichia	Γένος
co	coli	Είδος
R	RY13	Στέλεχος
I	Πρώτο που αναγνωρίστηκε	Σειρά αναγνώρισης στο βακτήριο

**Γονιδιωματικές βιβλιοθήκες:** Στην πραγματικότητα, το συνολικό DNA υπόκειται σε μερική πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση έτσι ώστε να μην καταταμηθεί σε όλες τις θέσεις αναγνώρισης. Με τον τρόπο αυτό το DNA τέμνεται σε διαφορετικές θέσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία αλληλεπικαλυπτόμενων θραυσμάτων. Στη συνέχεια τα θραύσματα κλωνοποιούνται, με κάθε κλώνο να περιέχει ένα μόριο DNA, του οποίου όμως η αλληλουχία του επικαλύπτεται μερικώς με την αλληλουχία που έχει εισαχθεί σε άλλους κλώνους. Οι αλληλεπικαλύψεις αυτές επιτρέπουν να ανασυσταθεί η γραμμική σειρά που έχουν τα θραύσματα μεταξύ τους.



## Προβλήματα

1. Σε μια εφαρμογή PCR επιχειρείται η σύνθεση τουλάχιστον 120 αντιγράφων ενός τμήματος κάποιου μορίου DNA. Το τμήμα αυτό συνίσταται από 50.000 νουκλεοτίδια. Η διάρκεια της αντιγραφής του τμήματος αυτού με τη μέθοδο PCR διαρκεί μια ώρα.

α) Μετά από πόσο χρόνο θα έχουμε τον επιθυμητό αριθμό αντιγράφων του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει;

β) Πόσα νουκλεοτίδια θα υπάρχουν σε όλα συνολικά τα αντίγραφα και πόσα νουκλεοτίδια θα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεσή τους;

γ) Πόσοι κλώνοι θα έχουν συντεθεί;

2. Θέλουμε να συνθέσουμε 70 αντίγραφα ενός τμήματος DNA, το οποίο αποτελείται από 500 ζεύγη νουκλεοτιδίων.

α. Ποια μέθοδο θα χρησιμοποιήσουμε;

β. Αν η αντιγραφή του παραπάνω κομματιού διαρκεί 5 min, πόσος συνολικά χρόνος θα χρειαστεί;

γ. Ποιος είναι ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν;

δ. Πόσοι 3'-5' φωσφοδιεστερικοί δεσμοί πρέπει να σχηματιστούν;

ε. Ποια ένζυμα είναι απαραίτητα για τη διαδικασία αυτή;

3. Με τη δράση της EcoRI ένα μόριο DNA από ευκαρυωτικό κύτταρο κόπηκε σε πέντε κομμάτια.

α) Σε πόσα σημεία κόπηκε το μόριο;

β) Πόσων δεσμών τη διάσπαση προκάλεσε η EcoRI;

γ) Πόσα πλασμίδια χρειάζονται για την κατασκευή μιας βιβλιοθήκης του συγκεκριμένου μορίου DNA;

δ) Πόσων δεσμών τη διάσπαση θα προκαλέσει η EcoRI στα πλασμίδια αυτά;

4. Έστω ότι ένα μόριο DNA έχει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την EcoRI δεκαπέντε φορές.

α. Με τη χρήση της EcoRI, πόσα κομμάτια θα προκύψουν;

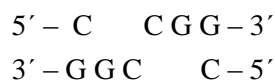
β. Πόσοι χημικοί δεσμοί θα σπάσουν;

5. α) Πόσες φορές αναμένεται να υπάρχει μια τυχαία ακολουθία 6 ζευγών νουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα ενός σωματικού ανθρώπινου κυττάρου;

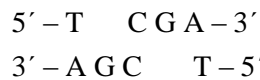
β) Ένα πλασμίδιο αποτελείται από 30.000 ζεύγη νουκλεοτιδίων. Πόσες φορές αναμένεται να υπάρχει στο γονιδίωμα του πλασμιδίου αυτού, η ακολουθία νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI;

6. Από ανάλυση που έγινε σε δύο τμήματα DNA ίδιου μήκους προέκυψε ότι για το πρώτο ισχύει:  $\frac{A+T}{G+C} = 4$  και για το δεύτερο ότι στον έναν κλώνο του η A βρίσκεται σε ποσοστό 20% και η G 30%, ενώ στον συμπληρωματικό του η G είναι 20%. Ποιο τμήμα DNA θα αποδιαταχθεί σε χαμηλότερη θερμοκρασία;

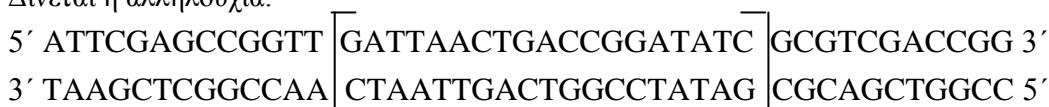
7. Η περιοριστική ενδονουκλεάση MspI κόβει την αλληλουχία  $5' - CCGG - 3'$  μεταξύ των δύο βάσεων C:



και η TaclI κόβει την αλληλουχία  $5' - TCGA - 3'$  μεταξύ των βάσεων T και C:



Δίνεται η αλληλουχία:



Το τμήμα μεταξύ των αγκυλών πρόκειται να κλωνοποιηθεί.

- α) Ποια περιοριστική ενδονουκλεάση είναι η κατάλληλη;
- β) Ποια αλληλουχία πρέπει να διαθέτει ο φορέας κλωνοποίησης;
- γ) Πόσους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς θα σπάσει κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση στο δεδομένο τμήμα και πόσοι θα είναι οι υδρογονικοί δεσμοί που θα σπάσουν;

8. Η περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII αναγνωρίζει την εξής ακολουθία νουκλεοτιδίων:



και κόβει μεταξύ της C και της G. Το γονιδίωμα από σωματικά κύτταρα του ανθρώπου έχει τοποθετηθεί σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες. Στον 1ο επιδρούμε με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI και στο 2ο με την περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII. Σε ποιο δοκιμαστικό σωλήνα και γιατί αναμένεται η ύπαρξη περισσότερων τμημάτων DNA;

9. Ένα τμήμα DNA που έχει κοπεί με τη δράση της EcoRI διαθέτει δύο μονόκλινα άκρα. Σε αυτό το τμήμα υπάρχουν 1.428 συνολικά νουκλεοτίδια, τα 420 από τα οποία έχουν G και C. Να υπολογίσετε το σύνολο των χημικών δεσμών που υπάρχουν στο τμήμα αυτό.

10. Δίνεται δίκλωνο μόριο DNA με 1.000 ζεύγη βάσεων, 200 από τις οποίες είναι αδενίνες. Με την EcoRI κόβεται σε 20 κομμάτια. Να βρείτε:

- α. Τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και τους δεσμούς υδρογόνου στο δίκλωνο μόριο DNA.

**β.** Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου παρέμειναν στα 20 κομμάτια που προέκυψαν.

**11.** Κατά τη διαδικασία κατασκευής cDNA βιβλιοθήκης ένα μόριο ώριμου mRNA έχει 2.000 νουκλεοτίδια και χρησιμοποιείται ως καλούπι για σύνθεση υβριδικού mRNA-cDNA. Στο υβριδικό μόριο που δημιουργήθηκε τα 800 νουκλεοτίδια περιέχουν την αζωτούχα βάση G και τα 200 την αζωτούχα βάση T. Να απαντήσετε στις παρακάτω ερωτήσεις:

**α.** Ποιες αλληλουχίες βάσεων (ονομαστική αναφορά) υπάρχουν στο mRNA που χρησιμοποιείται ως καλούπι για τη σύνθεση του DNA;

**β.** Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί υπάρχουν στο υβριδικό μόριο mRNA-cDNA;

**γ.** Ποιο ένζυμο δημιούργησε το μονόκλωνο cDNA;

**δ.** Πόσα νουκλεοτίδια περιέχουν την αζωτούχα βάση U και πόσα την A στο υβριδικό μόριο mRNA-cDNA;

**12.** Δίνεται η αλληλουχία ενός κλώνου DNA που περιέχει την κωδική αλυσίδα ενός συνεχούς γονιδίου:

5' ...ATTCTGAAGCTTCTGATGAATTCTTTGCCGTAAGAATTCGAATGC...3'

Το παραπάνω γονίδιο στοχεύουμε, αφού αρχικά το απομονώσουμε, να το ενσωματώσουμε σε πλασμίδιο και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο να το μεταφέρουμε σε βακτήριο, ώστε να δημιουργηθεί βακτηριακός κλώνος βιβλιοθήκης που θα περιέχει το συγκεκριμένο γονίδιο.

**α.** Με δεδομένο ότι έχετε στη διάθεσή σας δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες, την EcoRI και την Hind, ποια από τις δυο θα χρησιμοποιήσουμε προκειμένου να απομονώσουμε το παραπάνω γονίδιο; Δίνεται ότι το συγκεκριμένο είδος της Hind αναγνωρίζει την αλληλουχία:

3' A A G C T T 5'

5' T T C G A A 3'

και κόβει μεταξύ A και A με κατεύθυνση 3' → 5'.

**β.** Πόσους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και πόσους δεσμούς υδρογόνου θα διασπάσει η περιοριστική ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιήσουμε, ώστε να κοπεί το παραπάνω γονίδιο;

**γ.** Στο βακτήριο που θα εισαχθεί το γονίδιο θα μεταγραφεί. Να γράψετε την αλληλουχία των κωδικονίων του παραγόμενου mRNA, αιτιολογώντας την απάντησή σας. Να τοποθετήσετε τα άκρα αυτού.

**δ.** Ποια είναι η αλληλουχία των αντικωδικονίων των μορίων tRNA που θα χρησιμοποιηθούν για τη μετάφραση του mRNA αυτού;

**ε.** Προκειμένου να εντοπίσουμε το παραπάνω γονίδιο, στον βακτηριακό κλώνο στον οποίο αυτό περιέχεται, δημιουργήσαμε μόριο ανιχνευτή με αλληλουχία 3'CUUAAGAAA 5'. Ποιον κλώνο θα υβριδοποιήσει ο ανιχνευτής αυτός και γιατί; Ποια διαδικασία πρέπει να προηγηθεί της υβριδοποίησης του συγκεκριμένου κλώνου;

**στ.** Στο πλασμίδιο που θα χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης, πόσες φορές θα περιέχεται η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση η οποία χρησιμοποιήθηκε και πόσους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και δεσμούς υδρογόνου θα διασπάσει η περιοριστική αυτή ενδονουκλεάση στο πλασμίδιο;

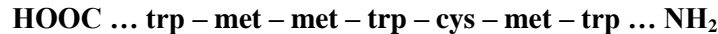
**13.** Το ένζυμο EcoRI κόβει μικρό γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA σε δυο τμήματα, το K και το Λ. Το K αποτελείται από 212 νουκλεοτίδια, 40 από τα οποία περιέχουν τη βάση αδενίνη.

**α.** Ποιος είναι ο αριθμός των άλλων βάσεων του K τμήματος;

**β.** Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται στο τμήμα K;

**γ.** Αν το αρχικό γραμμικό και δίκλωνο μόριο DNA είχε 400 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και 85 A, να βρείτε τον αριθμό κάθε είδους βάσεων του τμήματος Λ.

**14.** Προκειμένου να ανιχνευτεί σε cDNA βιβλιοθήκη ο βακτηριακός κλώνος που παράγει την ανθρώπινη ακτίνη, πρωτεΐνη των μυών, παράχθηκε RNA σύμφωνα με μέρος της αλληλουχίας της αλυσίδας της ακτίνης που αποτελείται από τα αμινοξέα:



- α.** Ποιο είναι το πλεονέκτημα της επιλογής της συγκεκριμένης αλληλουχίας αμινοξέων;
- β.** Ποιες είναι οι πιθανές αλληλουχίες του ανιχνευτή;
- γ.** Ποιος είναι ο ελάχιστος αριθμός δεσμών υδρογόνου που αναπτύχθηκαν κατά την υβριδοποίηση του ανιχνευτή με 50 αποδιαταγμένα πλασμίδια που απομονώθηκαν από 5 βακτήρια ενός κλώνου που περιείχε το γονίδιο της ακτίνης;
- δ.** Πώς είναι δυνατό να απομονώσουμε τόσο μεγάλο αριθμό πλασμιδίων από 5 μόνο μετασχηματισμένα βακτήρια;

**15.** Η περιοριστική ενδονουκλεάση KpnI αναγνωρίζει και τέμνει (από 5' προς 3') μεταξύ G και G την αλληλουχία:



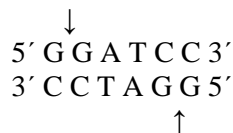
Γραμμικό μόριο DNA, που περιέχει τη συγκεκριμένη αλληλουχία τέσσερις φορές, αναμιγνύεται με KpnI και επωάζεται.

- α.** Πόσα θραύσματα προκύπτουν από την επίδραση της KpnI στο τμήμα DNA; Να σχεδιάσετε τα άκρα των διάφορων θραυσμάτων που προκύπτουν από την επίδραση της KpnI στο μόριο.
- β.** Σε ένα θραύσμα με μονόκλινα άκρα, που προέκυψε από το συγκεκριμένο μόριο, περιέχονται συνολικά 100 βάσεις A και 50 G. Πόσοι δεσμοί υδρογόνου περιέχονται στο θραύσμα;
- γ.** Πόσοι δεσμοί υδρογόνου και πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί θα σπάσουν στην περίπτωση που σε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με ένα από τα θραύσματα του τμήματος DNA επιδράσει πάλι η KpnI;

**16.** Η αλληλουχία βάσεων αποτελεί το mRNA που απομονώθηκε από ανθρώπινο κύτταρο με σκοπό την παραγωγή ανθρώπινης πρωτεΐνης με την τεχνική της cDNA βιβλιοθήκης.



Για τη δημιουργία της βιβλιοθήκης θα χρησιμοποιηθεί πλασμίδιο, το οποίο έχει μια θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI και μια για την BamHI. Η περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI αναγνωρίζει την αλληλουχία:



την οποία κόβει μεταξύ G και C.

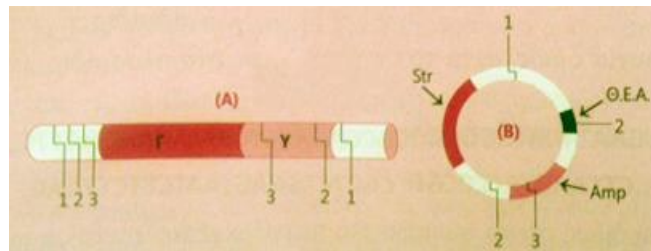
- α.** Από πόσα αμινοξέα αποτελείται κατά τη σύνθεσή της η συγκεκριμένη πρωτεΐνη;
- β.** Να γράψετε τις αλληλουχίες βάσεων που θα συντεθούν *in vitro* από αυτή την αλληλουχία κατά την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης, σημειώνοντας σε κάθε περίπτωση τα 5' και 3' άκρα τους.
- γ.** Ποια περιοριστική ενδονουκλεάση (EcoRI ή BamHI) είναι πιθανότερο ότι θα χρησιμοποιηθεί προκειμένου να κοπεί το DNA που θα προκύψει από την προηγούμενη διαδικασία για να εισαχθεί στο πλασμίδιο; Να θεωρηθεί ότι οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν οι δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες δεν υπάρχουν στην εσωτερική αλληλουχία των 167 νουκλεοτιδίων.

17. Το πλασμίδιο (B) του σχήματος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης τμήματος DNA (A) που προέρχεται από βακτήριο και περιέχει γονίδιο (Γ) και τον υποκινητή του (Υ). Τα σημεία 1, 2 και 3 υποδεικνύουν τις θέσεις αναγνώρισης τριών περιοριστικών ενδονουκλεασών στο πλασμίδιο και το γονίδιο αντίστοιχα, τα Amp και Str γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και τη στρεπτομυκίνη αντίστοιχα, ενώ υποδεικνύεται και η θέση έναρξης (Θ.Ε.Α.) αντιγραφής του πλασμιδίου.

α) Ποια από τις ενδονουκλεάσες 1, 2, 3 είναι κατάλληλη για την κλωνοποίηση του γονιδίου και τη μελέτη αποκλειστικά της αλληλουχίας του;

β) Ποια από τις ενδονουκλεάσες 1, 2, 3 είναι κατάλληλη για την κλωνοποίηση του γονιδίου και την παραγωγή της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί;

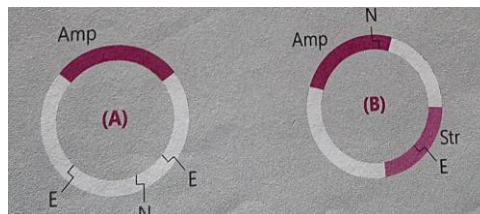
γ) Ποιο αντιβιοτικό θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων;



18. Στο σχήμα παριστάνεται τμήμα που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και οι θέσεις που τέμνεται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI (θέση E) και NotI (θέση N):



Στο επόμενο σχήμα παριστάνονται δυο πλασμίδια που είναι πιθανοί φορείς κλωνοποίησης του τμήματος, τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που φέρουν (Amp και Str) και οι θέσεις που οι EcoRI και NotI τέμνουν:



Επίσης, απεικονίζονται τα βακτήρια K και T που είναι πιθανοί ξενιστές για την κλωνοποίηση του τμήματος.

Στο κυτταρόπλασμα του K ανιχνεύονται ίχνη της ενδονουκλεάσης NotI, ενώ στο T προϋπάρχει πλασμίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.



α. Ποιος συνδυασμός περιοριστικής ενδονουκλεάσης - πλασμιδίου αποκλείεται να χρησιμοποιηθεί για την κλωνοποίηση του τμήματος, ανεξαρτήτως κυττάρου ξενιστή;

β. Είναι δυνατή η κλωνοποίηση του τμήματος με τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου A με τη NotI και τον μετασχηματισμό του βακτηρίου K;

γ. Είναι δυνατή η κλωνοποίηση του τμήματος με τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου B με τη βοήθεια της EcoRI και τον μετασχηματισμό του βακτηρίου T;

δ. Πώς είναι δυνατός ο μετασχηματισμός του βακτηρίου T; Με ποιο αντιβιοτικό θα γίνει, στην περίπτωση αυτή, η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων;