

Κεφάλαιο 4

Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA

Ανασυνδυασμένο DNA

- Τεχνητό μόριο που περιέχει γονίδια από δύο ή περισσότερους οργανισμούς
- Μπορεί να μπει σε βακτήριο ή ευκαρυωτικό κύτταρο

Γενετικά τροποποιημένο βακτήριο/ευκαρυωτικό

Κύτταρο στο οποίο έχει μπει το ανασυνδυασμένο DNA / ζει, αναπαράγεται και μεταφέρει στους απογόνους του τις καινούργιες ιδιότητες

Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA

- Οι τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά του γενετικού υλικού από έναν οργανισμό σε έναν άλλο
- Βρίσκει εφαρμογή στη παραγωγή σειράς προϊόντων και τη δημιουργία φυτών και ζώων με βελτιωμένες ιδιότητες

Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA

Χάρη στη:

- Απομόνωση και χρήση πολυάριθμων ενζύμων επέτρεψε την **in vitro** αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση και αντίστροφη μεταγραφή
- Ανακάλυψη των **περιοριστικών ενδονουκλεασών**

Περιλαμβάνει τα στάδια:

- Κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA
- Μεταφορά του ανασυνδυασμένου DNA σε ένα κύτταρο-ξενική
- Επιλογή και απομόνωση των κυττάρων-ξενιστών
- Επιλογή ενός βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA

Γενετική μηχανική

Οι τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό

Ερευνητικές και παραγωγικές δυνατότητες:

- Κατανόηση της ζωής και της εξέλιξης
- Βελτίωση της υγείας και του τρόπου διαβίωσης χάρη στις εφαρμογές στην ιατρική, στη γεωργία και την κτηνοτροφία

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- Παράγονται από βακτήρια (προστατεύουν από την εισβολή ξένου DNA)
- Αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA
- Κόβουν το δίκλωνο DNA στην ειδική αλληλουχία

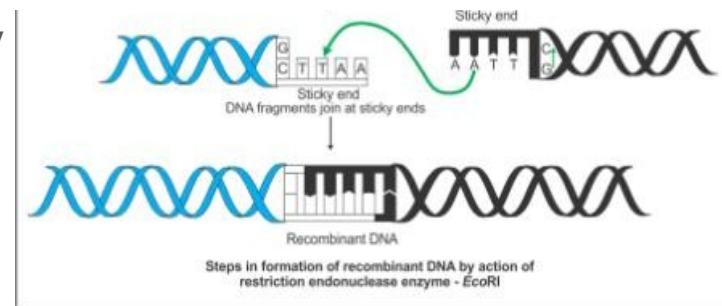
Περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI

- Αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

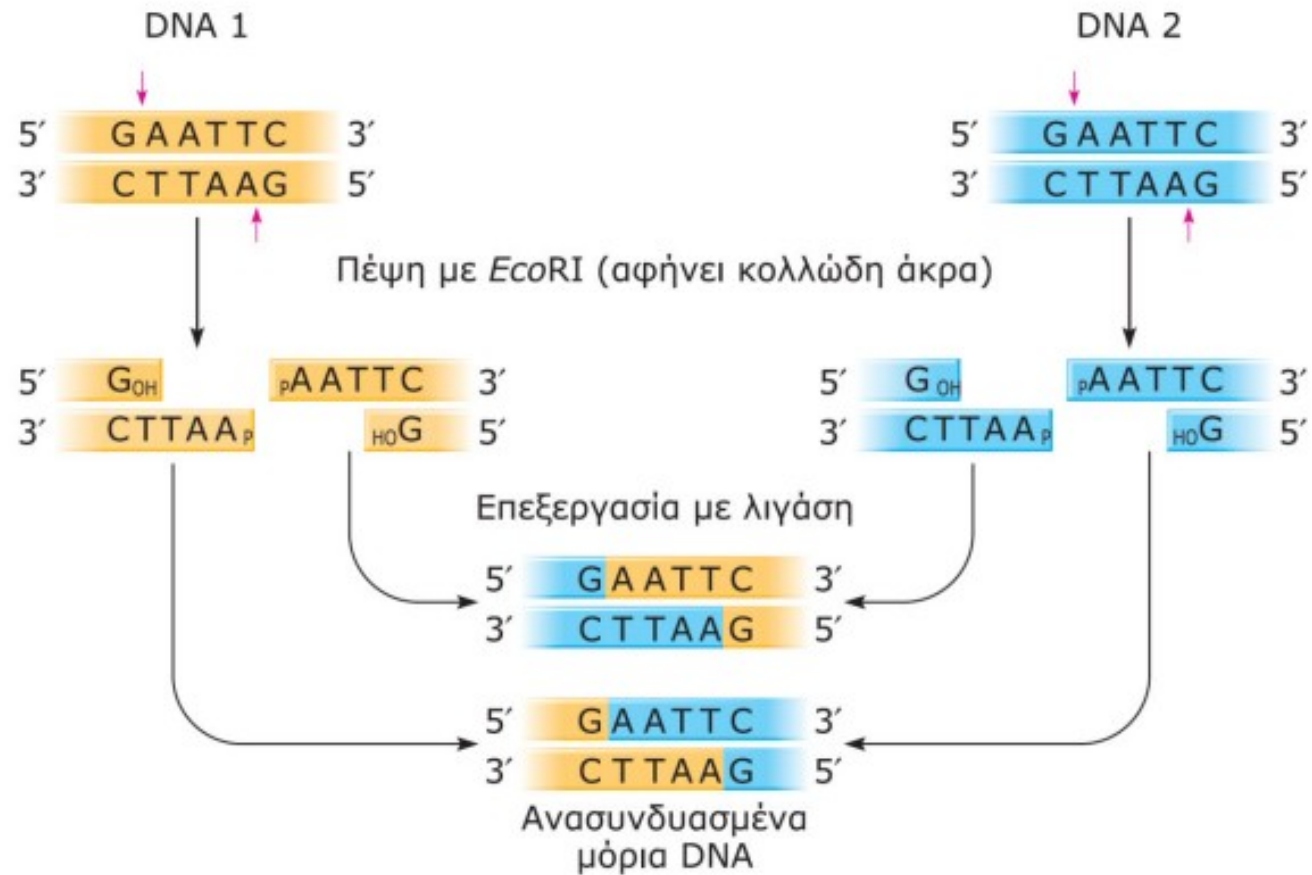
- Κόβει μεταξύ G και A με κατεύθυνση 5'-3'
αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από
αζευγάρωτες βάσεις



- Τα μονόκλωνα άκρα μπορούν να σχηματίσουν
δεσμούς υδρογόνου με τις συμπληρωματικές
βάσεις άλλων κομματιών DNA που έχουν
κοπεί με το ίδιο ένζυμο



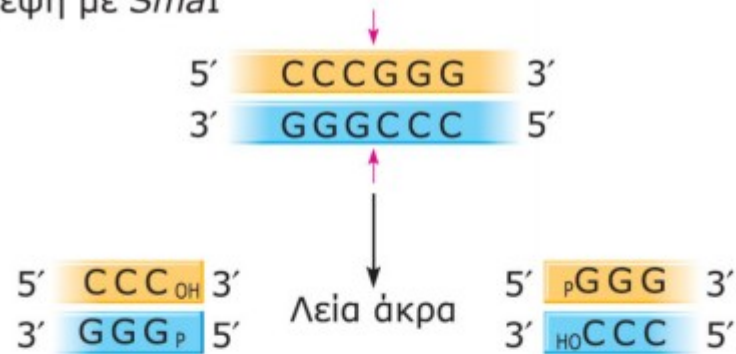
EcoRI



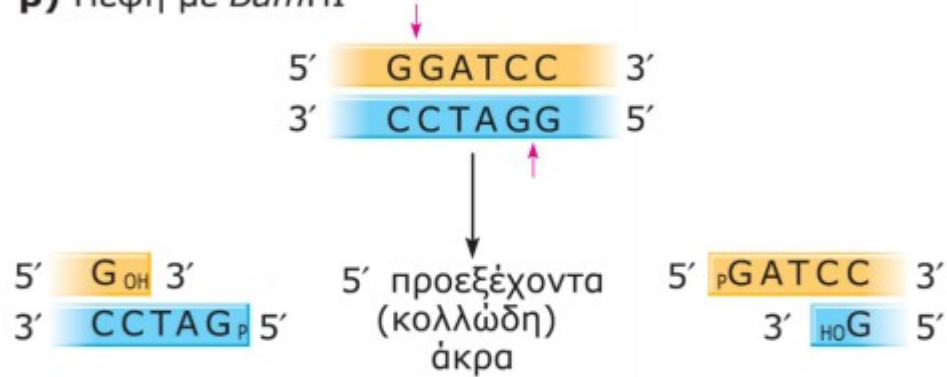
		Οργανισμός από τον οποίο προέρχεται το ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης και θέση κοπής*
Ένζυμα με αλληλουχία αναγνώρισης 6 bp	<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5' -G [↓] G A T C C-3' 3' -C C T A G [↑] G-5'
	<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigi</i>	A [↓] G A T C T T C T A G [↑] A
Πρώτο γράμμα: όνομα γένους Δεύτερο/τρίτο γράμμα: το όνομα του οργανισμού που απομονώθηκαν	<i>Eco</i> RI	<i>E. coli</i> RY13	G [↓] A A T T C C T T A A [↑] G
	<i>Hae</i> II	<i>Haemophilus aegypticus</i>	R G C G C [↓] Y Y [↑] C G C G R
	<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d	A [↓] A G C T T T T C G A [↑] A
	<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	C T G C A [↓] G G [↑] A C G T C
	<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i>	G [↓] T C G A C C A G C T [↑] G
	<i>Sma</i> I	<i>Serratia macrescens</i>	C C C [↓] G G G G G G [↑] C C C

	Ονομασία ενζύμου	Οργανισμός από τον οποίο προέρχεται το ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης και θέση κοπής*
Ένζυμα με αλληλουχία αναγνώρισης 4 bp	<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	G G↓C C C C↑G G
	<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	G C G↓C C↑G C G
	<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	↓C C G C G G C↑C
	<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus 3A</i>	↓G A T C C T A G↑
Ένζυμο με αλληλουχία αναγνώρισης 8 bp	<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	G C↓G G C C G C C G C C G G↑C G

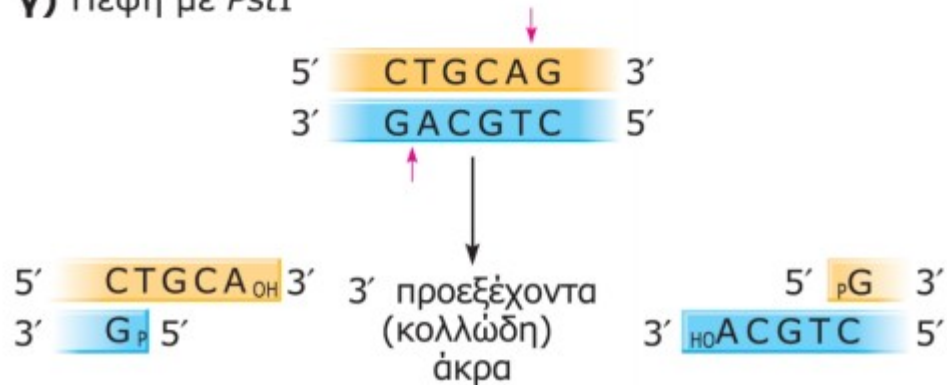
α) Πέψη με *Sma*I



β) Πέψη με *Bam*HI



γ) Πέψη με *Pst*I



Φορέας κλωνοποίησης

- Μόρια DNA που μπορούν να αυτοδιπλασιάζονται ανεξάρτητα μέσα σε ένα κύτταρο-ξενιστή
- Ενσωματώνουν το ξένο DNA
- Φορέα κλωνοποίησης + ξένο DNA = ανασυνδυασμένο DNA

Φορείς κλωνοποίησης

- **Πλασμίδια:** Σχετικά απλή κλωνοποίηση, κατάλληλα για οργανισμούς με μικρό γονιδίωμα
- **DNA βακτηριοφάγου λ:** Μπορεί να ενσωματώσει μεγαλύτερα κομμάτια ξένου DNA

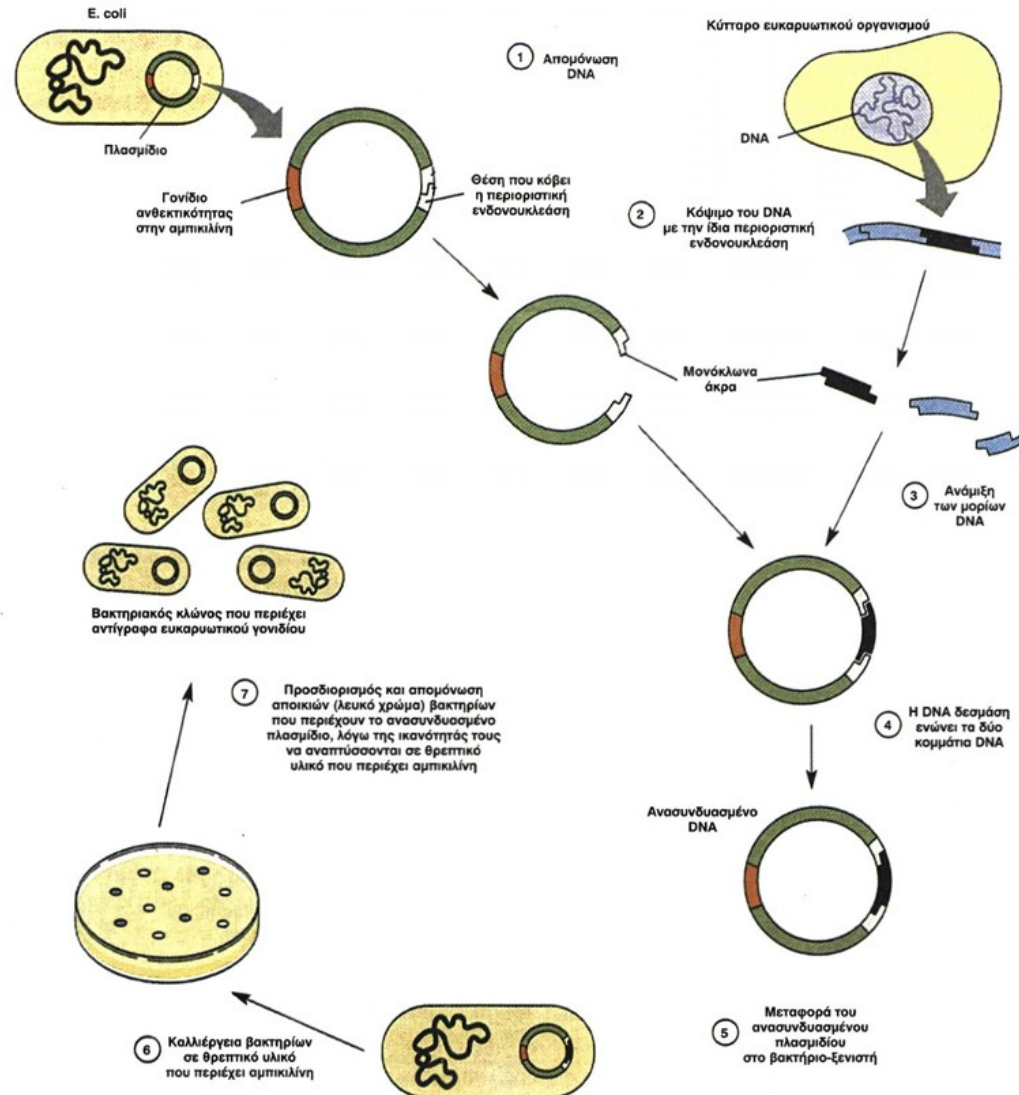
Κλώνος

Μία ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών

Κλωνοποίηση

Η κατασκευή πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών

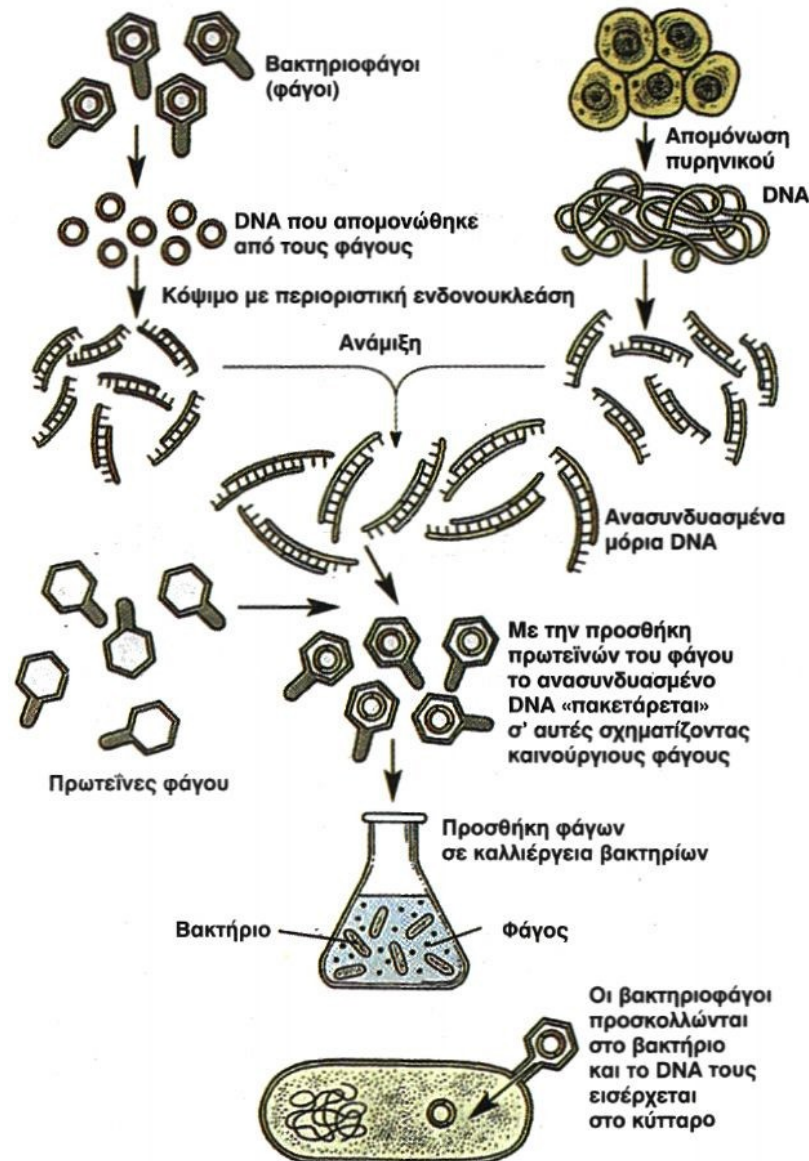
Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA και κλωνοποίηση

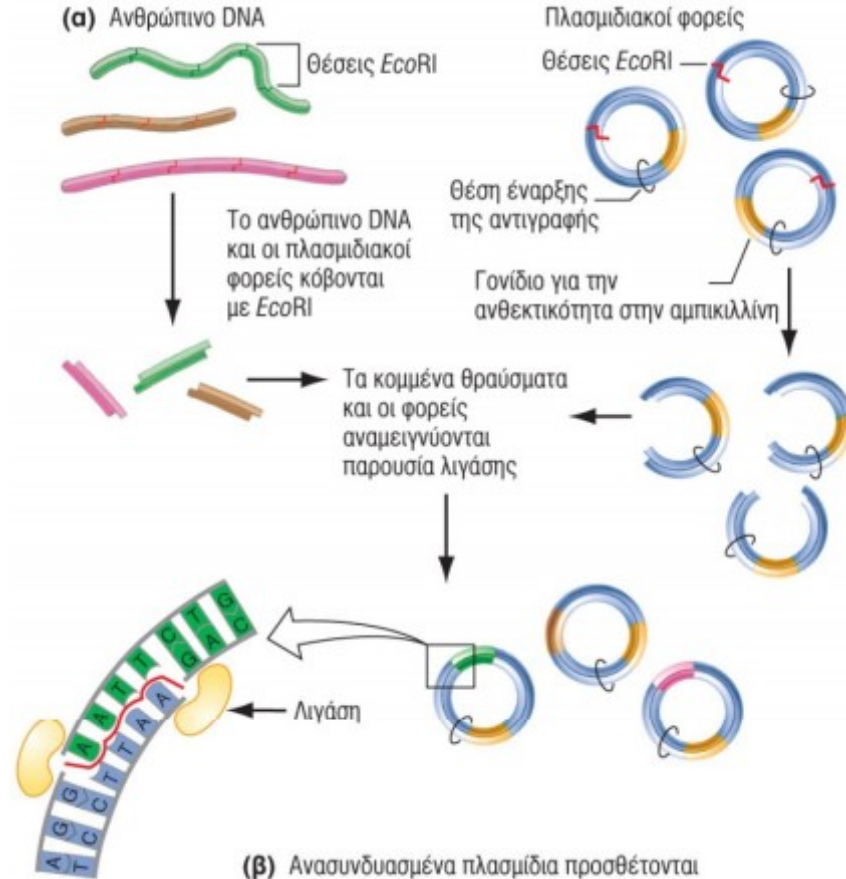


Γονιδιωματική βιβλιοθήκη

- Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχουν το συνολικό DNA του οργανισμού δότη
- Περιέχει γονίδια, τμήματα γονιδίων και τμήματα DNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες

Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

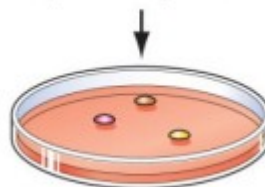




(β) Ανασυνδυασμένα πλασμίδια προσθέτονται σε έναν πληθυσμό κυττάρων *E. Coli*.



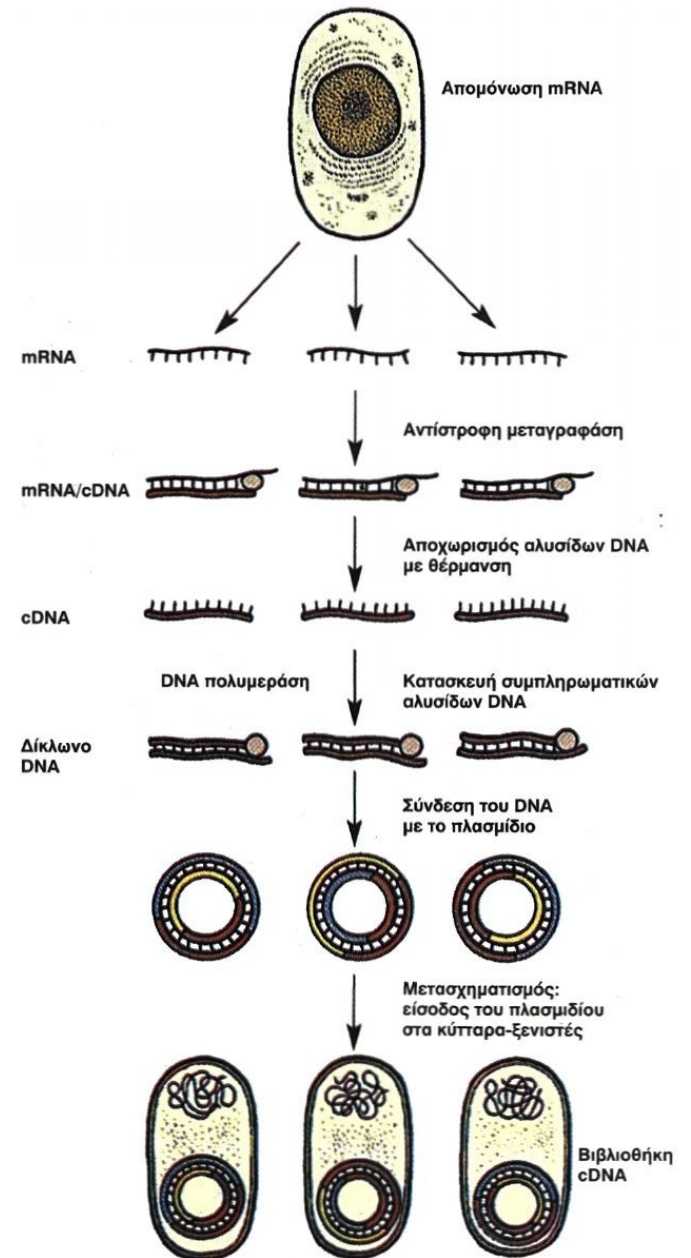
Τα κύτταρα του *E. coli* επιστρώνονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αμπικιλίνη. Μόνο τα κύτταρα που περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια είναι σε θέση να αναπτυχθούν.



cDNA βιβλιοθήκη

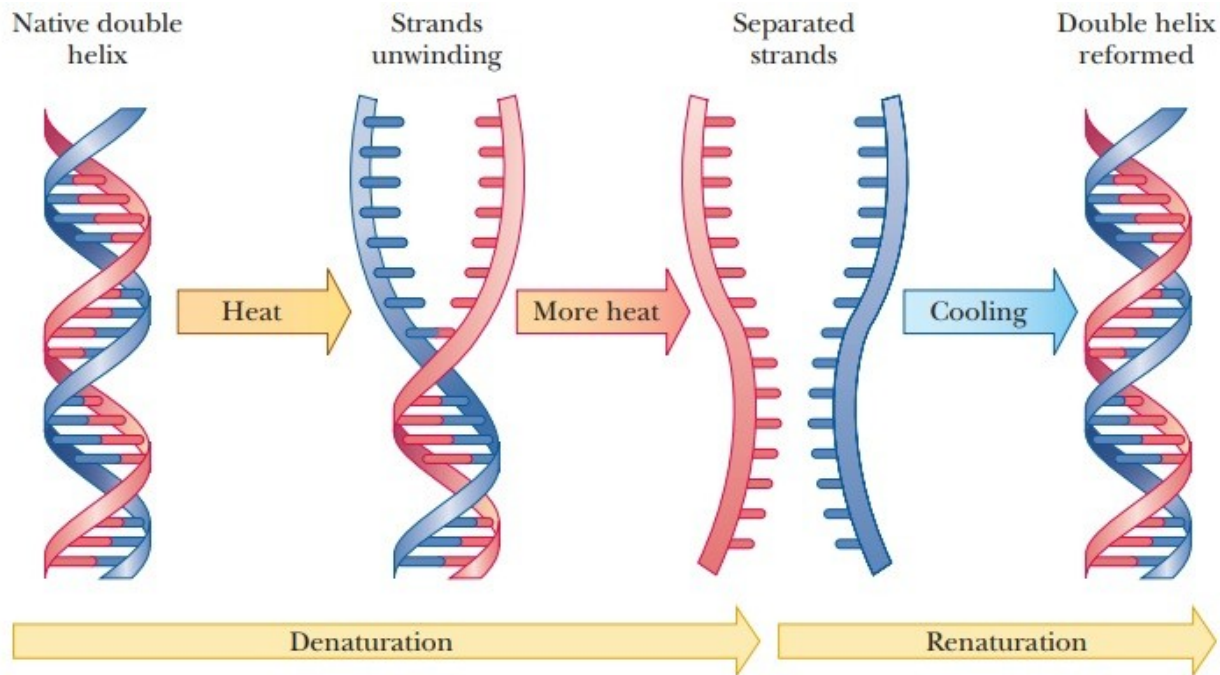
- Περιέχει αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται σε συγκεκριμένο είδος κυττάρου
- Περιέχει μόνο τις αλληλουχίες που μεταφράζονται σε αμινοξέα (εξώνια)

Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης



Αποδιάταξη νουκλεϊκών οξέων

- Το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου και ο αποχωρισμός των συμπληρωματικών αλυσίδων ενός μορίου DNA
- Αύξηση της θερμοκρασίας, κατάλληλες χημικές ουσίες

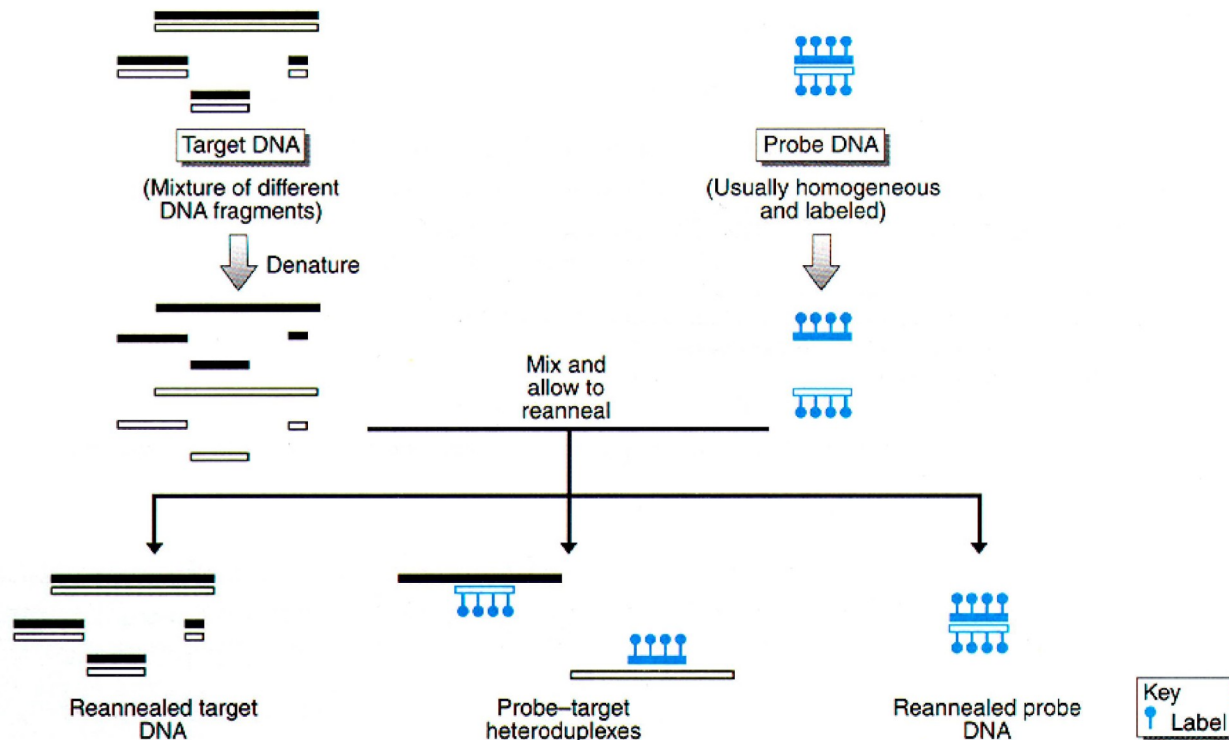


■ **FIGURE 9.19 Helix unwinding in DNA denaturation.** The double helix unwinds when DNA is denatured, with eventual separation of the strands. The double helix is re-formed on renaturation with slow cooling and annealing.

Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων

Σύνδεση μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ή σύνδεση συμπληρωματικών DNA-RNA

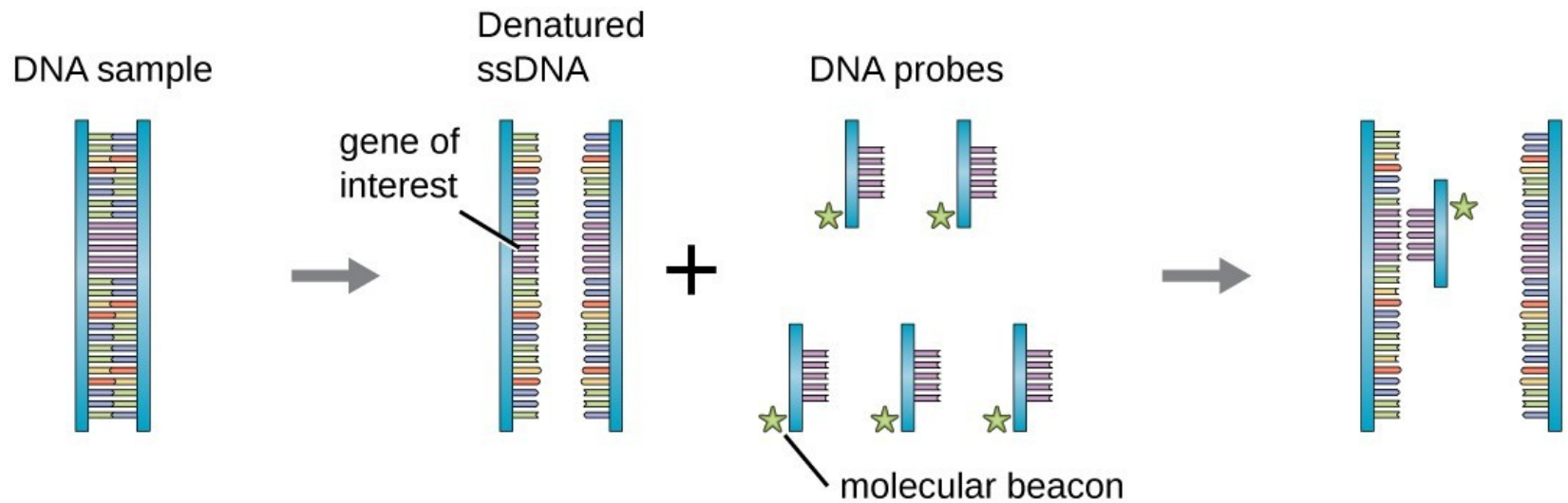
Δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε ένα γνωστό μόριο ως ανιχνευτή για τον εντοπισμό του συμπληρωματικού του ανάμεσα από χιλιάδες μόρια



Ανίχνευση κλώνων γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης

- Χρησιμοποιούνται ιχνηθετημένα μόρια DNA ή RNA (ανιχνευτές) που περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες προς το κλωνοποιημένο DNA
- Οι ανιχνευτές αναμιγνύονται με το DNA της βιβλιοθήκης και υβριδοποιούνται μόνο με το συμπληρωματικό τους DNA

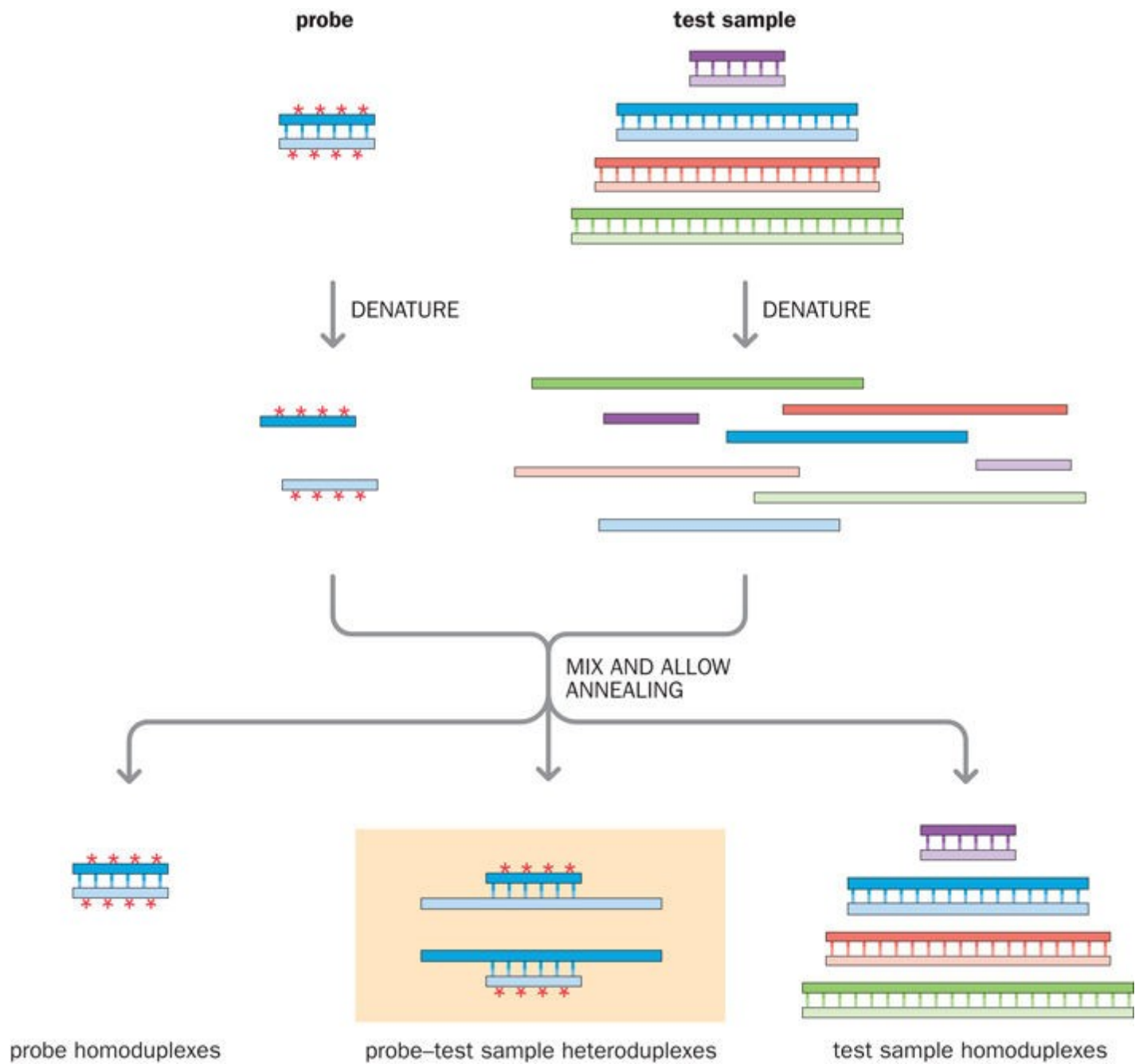
Ανίχνευση κλώνων γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης



1 Isolate DNA from body fluid sample.

2 Denature DNA sample and combine with DNA probes. Probes are complementary to the gene of interest and labeled with a molecular beacon.

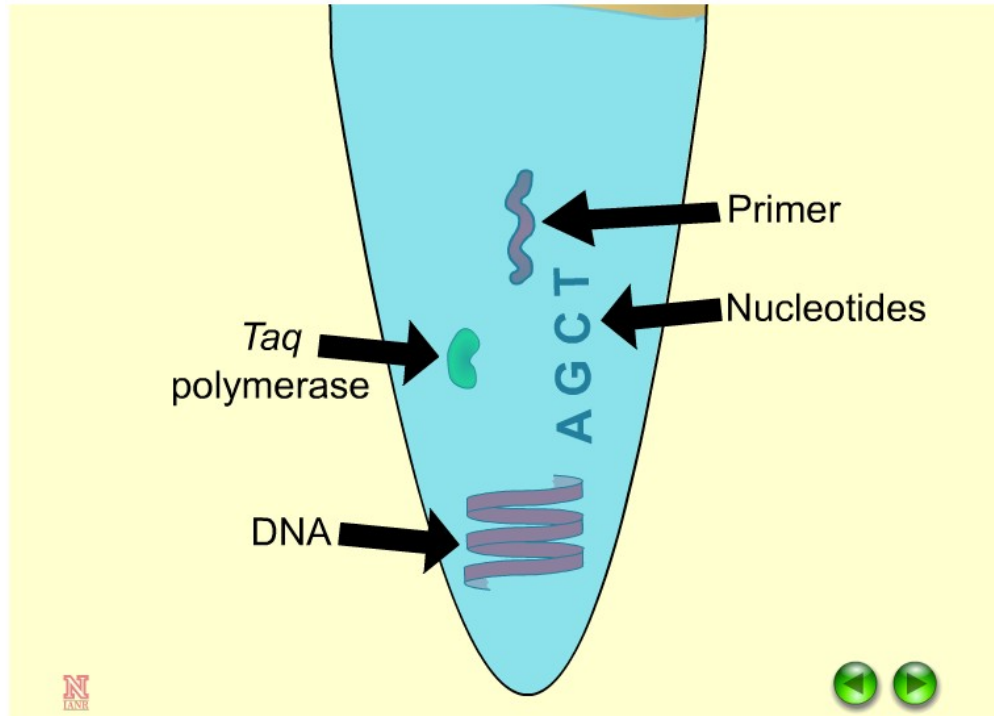
3 DNA probes will bind to the gene of interest if it is present in the DNA sample.



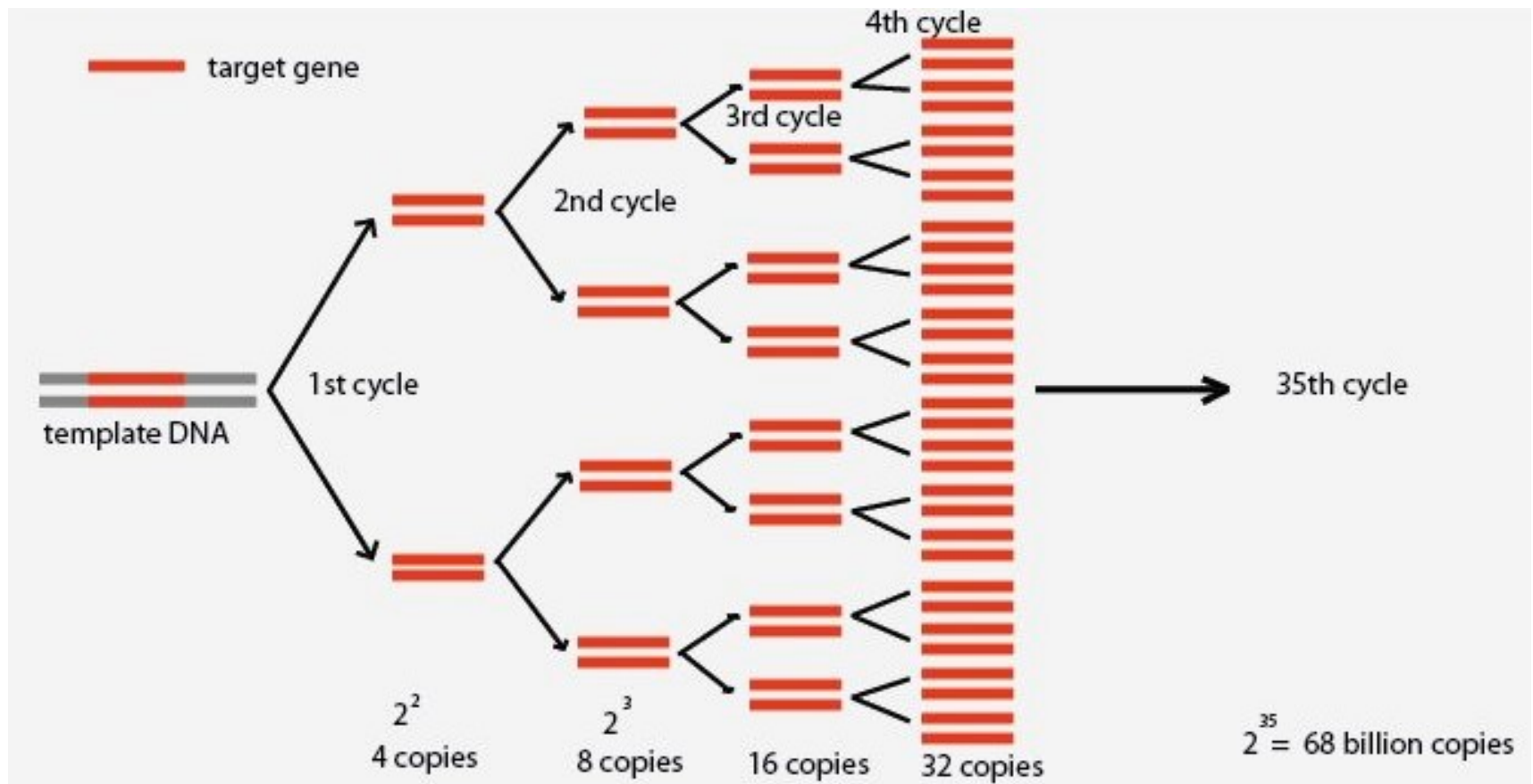
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

- Επιτρέπει να αντιγράψουμε επιλεκτικά, εκατομμύρια φορές, ειδικές αλληλουχίες DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA **χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου**
- Έχει αυξήσει την ευαισθησία των γενετικών αναλύσεων
- Έχει εφαρμογές στην Ιατρική (διάγνωση ασθενειών π.χ. AIDS), εγκληματολογία, μελέτη DNA από απολιθώματα

PCR



PCR



PCR

