

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΟΥ ΒΟΗΘΟΥΝ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΘΕΩΡΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA

ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν και κόβουν συγκεκριμένη δίκλωνη αλληλουχία μόνο σε μόρια δίκλωνου DNA (γραμμικά ή κυκλικά) μήκους 4 – 8 ζ.β.

Η αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση περιέχει την ίδια σειρά βάσεων στις δύο αλυσίδες αν αυτές διαβαστούν με κατεύθυνση 5' → 3'. Οι αλληλουχίες με το παραπάνω χαρακτηριστικό ονομάζονται παλίνδρομες.

Παραδείγματα:

- η αλληλουχία που αναγνωρίζει η EcoRI διαβάζοντας από το 5' άκρο προς το 3' άκρο και τη μία και την άλλη αλυσίδα είναι 5' GAATTC 3' και κόβει μεταξύ G και A.
- η περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' GGATCC 3' και τη συμπληρωματική της και κόβει μεταξύ των δύο G.
- η περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' AAGCTT 3' και τη συμπληρωματική της και κόβει μεταξύ των δύο A.

Η αλληλουχία 5' TTCTA 3' και η συμπληρωματική της δεν μπορεί να αναγνωριστεί και να κοπεί από περιοριστική ενδονουκλεάση αφού δεν έχει το παραπάνω χαρακτηριστικό.

Αν n τα νουκλεοτίδια σε καθεμία από τις δύο αλυσίδες μιας αλληλουχίας αναγνώρισης, τότε ο αριθμός των βάσεων σε κάθε μονόκλωνο άκρο είναι πάντα $n-2$, με την προϋπόθεση ότι η θέση κοπής στις δύο αλυσίδες της αλληλουχίας αναγνώρισης βρίσκεται μεταξύ του 1^{ου} και 2^{ου} νουκλεοτιδίου.

Το είδος του μονόκλωνου άκρου (5' ή 3') που προκύπτει από τη δράση μιας Π.Ε. εξαρτάται από τον τρόπο που αυτή δρα:

- Αν η Π.Ε. κόβει **πριν** το κέντρο της αλληλουχίας αναγνώρισής της, τότε δημιουργείται 5' μονόκλωνο άκρο.
- Αν η Π.Ε. κόβει **μετά** το κέντρο της αλληλουχίας αναγνώρισής της, τότε δημιουργείται 3' μονόκλωνο άκρο.
- Αν η Π.Ε. κόβει **ακριβώς στο κέντρο** την αλληλουχία αναγνώρισης της, τότε δεν δημιουργείται μονόκλωνο άκρο.

Εφαρμογή

Δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες I και II έχουν η καθεμία ως αλληλουχία αναγνώρισης έξι ζεύγη νουκλεοτιδίων. Δίνονται για την Π.Ε.I τα τρία πρώτα νουκλεοτίδια 5' GTC 3' και για την Π.Ε.II τα τρία τελευταία 3' GAC 5' στην αντίστοιχη αλληλουχία αναγνώρισης.

A. Να γράψετε την πλήρη αλληλουχία αναγνώρισης από κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση.

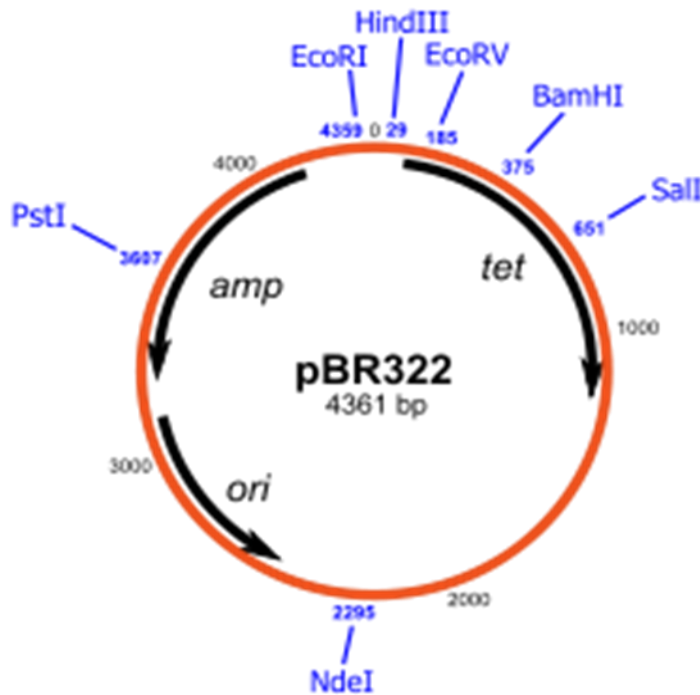
B. Εάν η περιοριστική ενδονουκλεάση I κόβει μεταξύ G και T με προσανατολισμό 5' → 3' και η περιοριστική ενδονουκλεάση II κόβει μεταξύ A και G με προσανατολισμό 5' → 3', να γράψετε τα τμήματα που θα προκύψουν με τα 5' και 3' άκρα τους μετά τη δράση της καθεμίας σε αντίστοιχα δύο διαφορετικά γραμμικά τμήματα DNA, καθένα από τα οποία περιέχει μια φορά την αλληλουχία αναγνώρισής τους.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΩΣ ΦΟΡΕΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

1. Διαθέτουν θέση έναρξης της αντιγραφής, άρα μπορούν να αυτοδιπλασιάζονται ανεξάρτητα μέσα στο κύτταρο ξενιστή και να δίνουν πολλά αντίγραφά τους.
2. Περιέχουν ένα ή περισσότερα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Στην ιδιότητα αυτή στηρίζεται η επιλογή των βακτηρίων που προσέλαβαν πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη.
3. Έχουν τη συγκεκριμένη ειδική αλληλουχία που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση μόνο μία φορά.
4. Έχουν μικρό μέγεθος που συμβάλλει στην αύξηση του ποσοστού των βακτηρίων που μετασχηματίζονται και διευκολύνει τον διαχωρισμό τους από το κύριο DNA των βακτηρίων ξενιστών και την απομόνωσή τους μετά την ολοκλήρωση της κλωνοποίησης.
5. Δεν έχουν την ικανότητα μεταφοράς τους από το ένα βακτήριο στο άλλο διότι έχουν αδρανοποιηθεί τα γονίδια που φέρουν και σχετίζονται με αυτή.
6. Δεν έχουν την ικανότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό, ούτε μεταξύ τους ούτε με το κύριο βακτηριακό DNA.

Σημείωση: Επειδή τα φυσικά πλασμίδια δεν διαθέτουν όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά που θα τους επέτρεπαν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά ως φορείς κλωνοποίησης, κατασκευάζονται και χρησιμοποιούνται τεχνητά πλασμίδια. Συνήθως τα τεχνητά πλασμίδια διαθέτουν μεγάλο αριθμό διαφορετικών θέσεων αναγνώρισης για διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες βρίσκονται μία φορά σε αυτά. Κάποιες από αυτές βρίσκονται μέσα σε ένα γονίδιο «δείκτη», έτσι ώστε το γονίδιο αυτό να απενεργοποιείται με την ενσωμάτωση του «ξένου» DNA.

Παράδειγμα τεχνητού πλασμιδίου που χρησιμοποιείται στα εργαστήρια είναι το pBR322 που φαίνεται στην εικόνα.



ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ – ΞΕΝΙΣΤΩΝ

1. Δεν έχουν πλασμίδια και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά.
2. Δεν φέρουν περιοριστικές ενδονουκλεάσες λόγω αδρανοποίησης των γονιδίων τους.
3. Δεν έχουν την ικανότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού ανάμεσα στο κύριο

μόριο DNA και στο DNA του πλασμιδίου (ανασυνδυασμένου ή μη) που εισέρχεται σε αυτά.

ΒΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ Λ ΦΑΓΩΝ

1. Τμήματα DNA του οργανισμού δότη που έχουν προκύψει μετά τη δράση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης ενσωματώνονται με τη βοήθεια της DNA δεσμάσης στο φαγικό DNA που έχει κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση.
2. Τα ανασυνδυασμένα φαγικά DNA αναμειγνύονται με πρωτεΐνες του καψιδίου και της ουράς του φάγου και συγκροτούνται έτσι **ανασυνδυασμένοι φάγοι**.
3. Οι φάγοι αυτοί τοποθετούνται σε υγρές καλλιέργειες βακτηρίων και μολύνουν τα βακτήρια. Το ανασυνδυασμένο φαγικό DNA που εισέρχεται στο βακτήριο αντιγράφεται μέσα σε αυτό και καθοδηγεί τη σύνθεση των πρωτεϊνών του φάγου.
4. Άμεση μεταφορά των μολυσμένων βακτηρίων – ξενιστών σε στερεή καλλιέργεια.
5. Συγκροτούνται νέοι φάγοι, οι οποίοι εξέρχονται από το βακτήριο ξενιστή προκαλώντας τη λύση του.
6. Οι φάγοι αυτοί μολύνουν με τη σειρά τους γειτονικά βακτήρια. Η καταστροφή αυτών των βακτηρίων δημιουργεί μια διαυγή ζώνη στη βακτηριακή καλλιέργεια, η οποία ονομάζεται «πλάκα». Κάθε πλάκα περιέχει ανασυνδυασμένους φάγους που φέρουν ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA του οργανισμού δότη.