

ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Στόχοι Μαθήματος

- Η κατανόηση του τρόπου δράσης των περιοριστικών ενδονουκλεασών.
- Η αναγνώριση του απαραίτητου ρόλου της στην ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA.
- Η εφαρμογή της αποκτηθείσας γνώσης στην προσέγγιση θεωρητικών εφαρμογών και στην επίλυση ασκήσεων.

Θεωρητικές Επισημάνσεις

Κατασκευή Ανασυνδυασμένου DNA

Για την κατασκευή του Ανασυνδυασμένου DNA είναι απαραίτητα τα εξής ένζυμα:

- οι περιοριστικές ενδονουκλεάσεις (Π.Ε.),
- η DNA δεσμάση

Επίσης, είναι απαραίτητοι οι φορείς κλωνοποίησης, μέσω των οποίων γίνεται η μεταφορά του DNA από έναν οργανισμό σε έναν άλλο. Τέτοιοι είναι:

- τα πλασμίδια,
- οι βακτηριοφάγοι, όπως ο λ φάγος.

Χαρακτηριστικά Περιοριστικών Ενδονουκλεασών

- Παράγονται κυρίως από βακτήρια.
- 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**.
- Προστατεύουν από την εισβολή 'ξένου' DNA δηλ. κόβουν μόνο 'ξένο' DNA π.χ. αν σε ένα βακτήριο Α εισέλθει DNA βακτηρίου Β, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες του Α κόβουν το DNA του Β, όχι όμως και του Α, το οποίο είναι προστατευμένο.
- Δεν κόβουν στα άκρα του μορίου του DNA αλλά μόνο στο εσωτερικό του και σε συγκεκριμένες θέσεις.
- Λόγω συμπληρωματικότητας κόβουν και τις δύο αλυσίδες δημιουργώντας μονόκλωνες συμπληρωματικές ουρές (κολλώδη άκρα). 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.

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

Παραδείγματα:

1. 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, δημιουργώντας 5' μονόκλωνα άκρα.
2. η περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' GGATCC 3' και τη συμπληρωματική της και κόβει μεταξύ των δύο G, δημιουργώντας 5' μονόκλωνα άκρα.
3. η περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' AAGCTT 3' και τη συμπληρωματική της και κόβει μεταξύ των δύο A, δημιουργώντας 5' μονόκλωνα άκρα.
4. η περιοριστική ενδονουκλεάση PvuI αναγνωρίζει την αλληλουχία αναγνώρισης 5' CGATCG 3' και τη συμπληρωματική της και κόβει μεταξύ T και C, δημιουργώντας 3' μονόκλωνα άκρα.
5. η περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' GGCC3' και τη συμπληρωματική της και κόβει μεταξύ G και C, μη δημιουργώντας μονόκλωνα άκρα.

Το γονιδίωμα ενός ευκαρυωτικού οργανισμού μπορεί να κοπεί σε χιλιάδες κομμάτια από μία περιοριστική ενδονουκλεάση. Τα κομμάτια αυτά ενσωματώνονται σε ειδικούς φορείς – μόρια DNA (πλασμίδια ή DNA φάγων) που έχουν κοπεί από το **ίδιο** ένζυμο. Τα πλασμίδια ενσωματώνουν τμήματα DNA μήκους έως 10.000 ζευγών βάσεων, ενώ οι φάγοι έχουν δυνατότητα ενσωμάτωσης τμήματος DNA έως 20.000 ζευγών βάσεων.

Η περιοριστική ενδονουκλεάση **δεν** πρέπει να τέμνει το πλασμίδιο:

- Δύο ή περισσότερες φορές, διότι τότε δεν είναι δυνατό να δημιουργηθεί κυκλικό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
- Στη μοναδική θέση έναρξης αντιγραφής που αυτό διαθέτει.
- Στο γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, αν αυτό είναι μόνο ένα.
- Στον υποκινητή του μοναδικού γονιδίου ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό.

Θεωρητικές Εφαρμογές

1. Δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες I και II έχουν η καθεμία ως αλληλουχία αναγνώρισης έξι ζεύγη νουκλεοτιδίων. Δίνονται για την Π.Ε.Ι τα τρία πρώτα

νουκλεοτίδια 5' GTC 3' και για την ΠΕ.ΙΙ τα τρία τελευταία 3' GAC 5' στην αντίστοιχη αλληλουχία αναγνώρισης.

Α) Να γράψετε την πλήρη αλληλουχία αναγνώρισης από κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση.

Β) 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.

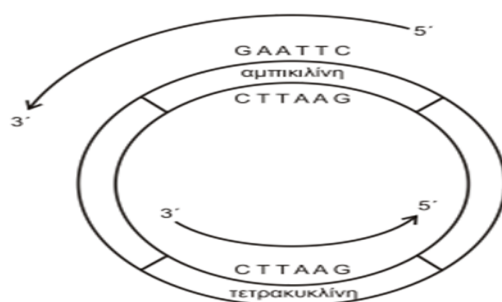
2. Το τμήμα DNA που απεικονίζεται στην εικόνα 2 έχει προκύψει μετά την επίδραση της EcoRI. Να σημειώσετε τα 3' και 5' άκρα του αιτιολογώντας την απάντησή σας.

ΑΑΤΤCCGCAAΑΤΤΑΑ
GGCGTTTAAATT

Εικόνα 2

Να εξηγήσετε αν είναι δυνατό το συγκεκριμένο τμήμα να κλωνοποιηθεί με τη βοήθεια πλασμιδίου χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. (Πανελλαδικές Εξετάσεις 2017)

3. Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI αναγνωρίζει μία συγκεκριμένη αλληλουχία 6 ζεύγη βάσεων στο DNA. Η περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII αναγνωρίζει μια αλληλουχία 4 ζεύγη βάσεων στο DNA. Απομονώνεται το DNA ενός ευκαρυωτικού κυττάρου και δημιουργούνται δύο δείγματα ενός καθαρού παρασκευάσματος DNA σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στο καθένα επιδρούμε με διαφορετική περιοριστική ενδονουκλεάση. Ποιος δοκιμαστικός σωλήνας αναμένεται να περιέχει περισσότερα κομμάτια DNA;
4. Στο σχήμα 3 απεικονίζεται πλασμίδιο που διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας σε δύο αντιβιοτικά, την αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη και αναγράφονται εσωτερικές αλληλουχίες των δύο γονιδίων ανθεκτικότητας. Αφού το πλασμίδιο κοπεί με την EcoRI και εισαχθεί ένα γονίδιο ξένου οργανισμού σε αυτό να εξηγήσετε ποιο από τα δύο αντιβιοτικά θα χρησιμοποιούσατε για τη διάκριση των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. (Πανελλαδικές Εξετάσεις 2018)



σχήμα 3

Ασκήσεις

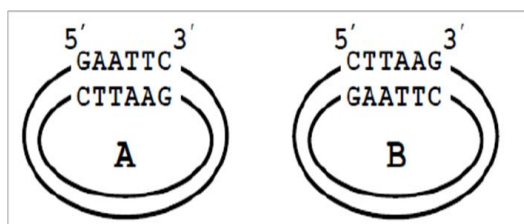
- Με τη δράση της EcoRI ένα μόριο DNA από ευκαρυωτικό κύτταρο κόπηκε σε 5 κομμάτια.
Α. Σε πόσα σημεία κόπηκε το μόριο;
Β. Πόσων δεσμών τη διάσπαση προκάλεσε η EcoRI;
Γ. Σε ένα από τα εσωτερικά θραύσματα (δηλαδή όχι τα ακραία) περιέχονται 204 νουκλεοτίδια με τη βάση αδενίνη και 1300 δεσμοί υδρογόνου. Πόσα νουκλεοτίδια με τη βάση γουανίνη υπάρχουν στο θραύσμα;
Δ. Πόσα πλασμίδια χρειάζονται για την κατασκευή μίας «βιβλιοθήκης» του συγκεκριμένου μορίου DNA;
Ε. Πόσων δεσμών τη διάσπαση θα προκαλέσει η EcoRI στα πλασμίδια αυτά;
Στ. Όταν ένα θραύσμα ενσωματώνεται επιτυχώς σε ένα πλασμίδιο πόσοι φωσφοδιεστερικοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου δημιουργούνται;
- Στο ακόλουθο τμήμα DNA προκαρυωτικού κυττάρου περιέχεται γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός τριπεπτιδίου.

3' GAATTCTTAAGAGTATGAAGGTAAGCTTAAGAAATTC 5'

5' CT TAAGAAATTCATCTTC CATGAATTCTTAAG 3'

- Α. Να γράψετε την αλληλουχία βάσεων του θραύσματος που προκύπτει μετά την επίδραση της EcoRI, στο οποίο περιέχεται το γονίδιο.
 - Β. Να γράψετε την αλληλουχία του μεταφραζόμενου τμήματος του mRNA.
 - Γ. Να χρησιμοποιήσετε τον γενετικό κώδικα και να γράψετε την αλληλουχία των αμινοξέων του τριπεπτιδίου.
- Δίνεται το παρακάτω τμήμα βακτηριακού DNA το οποίο κωδικοποιεί ένα ολιγοπεπτίδιο.

Αλυσίδα 1: GTTGAATTCTTAGCTTAAGTCGGGCATGAATTCTC
Αλυσίδα 2: CAACTTAAGAATCGAATTCAGCCCGTACTTAAGAG



Το παραπάνω τμήμα DNA κόβεται με το ένζυμο EcoRI, προκειμένου να ενσωματωθεί σε ένα από τα δύο πλασμίδια Α και Β που φαίνονται στην εικόνα.

- Α. Ποιο από τα δύο πλασμίδια θα επιλέξετε για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου πλασμιδίου; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.
- Β. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί θα διασπαστούν στο πλασμίδιο που επιλέξατε και πόσοι θα δημιουργηθούν κατά το σχηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου; (Πανελλαδικές Εξετάσεις 2012)