

ΦΟΡΕΙΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ – ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΞΕΝΙΣΤΩΝ**Στόχοι Μαθήματος**

1. Η κατανόηση της αναγκαιότητας των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων των φορέων κλωνοποίησης.
2. Η διάκριση μεταξύ μετασχηματισμένων και μη μετασχηματισμένων βακτηρίων – ξενιστών.
3. Η διάκριση μεταξύ βακτηρίων - ξενιστών μετασχηματισμένων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια και βακτηρίων – ξενιστών μετασχηματισμένων με μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια.
4. Η εφαρμογή της αποκτηθείσας γνώσης στην προσέγγιση εφαρμογών και ασκήσεων.

Θεωρητικές Επισημάνσεις

Ως φορείς κλωνοποίησης στην τεχνολογία του Ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιούνται τα πλασμίδια και οι βακτηριοφάγοι, όπως ο φάγος λ. Τα πλασμίδια ενσωματώνουν τμήματα DNA μήκους έως 10.000 ζευγών βάσεων περίπου, ενώ οι φάγοι έχουν δυνατότητα ενσωμάτωσης τμήματος DNA έως 20.000 ζευγών βάσεων.

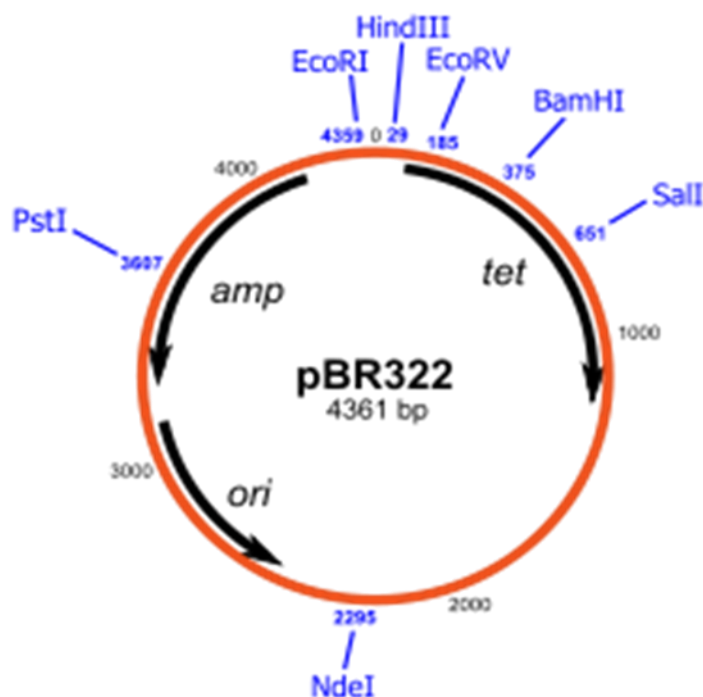
Χαρακτηριστικά γνωρίσματα των πλασμιδίων ως φορέων κλωνοποίησης

1. Διαθέτουν θέση έναρξης της αντιγραφής, άρα μπορούν να αυτοδιπλασιάζονται ανεξάρτητα μέσα στο κύτταρο ξενιστή και να δίνουν πολλά αντίγραφα 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.



Χαρακτηριστικά γνωρίσματα του DNA του βακτηριοφάγου λ ως φορέα κλωνοποίησης

1. Διαθέτει θέση έναρξης της αντιγραφής και μπορεί να αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα από το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου – ξενιστή.
2. Είναι δίκλωνο γραμμικό μόριο και έχει την ειδική αλληλουχία που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση δύο φορές ώστε μετά την επίδρασή της να δημιουργούνται τρία τμήματα. Το «ξένο» DNA ενσωματώνεται ανάμεσα στα δύο ακραία τμήματα, στη θέση του ενδιάμεσου τμήματος που απομακρύνθηκε.

Ιστορικά στοιχεία: Ο F. Blattner και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που τροποποίησαν τον λ φάγο κατάλληλα ώστε να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης. Ονόμασαν τους φάρους αυτούς «φάγους χάροντες» (Charon phages), ορμώμενοι από τον Χάροντα της μυθολογίας, τον βαρκάρη στον ποταμό της Στύγας. Όπως ο Χάροντας μετέφερε ψυχές στον Κάτω Κόσμο, έτσι και οι «φάγοι χάροντες» μεταφέρουν ξένο DNA σε βακτήρια.

Σύγκριση κλωνοποίησης σε πλασμίδιο με κλωνοποίηση σε βακτηριοφάγο λ

Πλασμίδιο	Βακτηριοφάγος λ
Είναι πιο δύσκολος ο μετασχηματισμός	Επιτυγχάνεται ευκολότερος μετασχηματισμός
Ενσωματώνει μικρά τμήματα ξένου DNA (έως 10.000 ζεύγη βάσεων)	Ενσωματώνει μεγαλύτερα κομμάτια ξένου DNA (12.000 – 20.000 ζεύγη βάσεων)
Χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση για οργανισμούς με μικρό γονιδίωμα	Χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση για οργανισμούς με μεγάλο γονιδίωμα

Μετασχηματισμός βακτηρίων – ξενιστών

Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές στη διαδικασία μετασχηματισμού έχουν συνήθως τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Δεν έχουν πλασμίδια και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά ή, αν έχουν πλασμίδια, είναι διαφορετικά από τον φορέα κλωνοποίησης.
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.

Δεδομένου ότι ορισμένα από τα βακτηριακά κύτταρα δέχονται το πλασμίδιο, ο εντοπισμός τους επιτυγχάνεται από την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά που τους προσδίδει το πλασμίδιο που εισέρχεται σε αυτά. Στη διαδικασία μετασχηματισμού προκύπτουν τρεις κατηγορίες βακτηρίων:

- I. βακτήρια που δεν δέχτηκαν πλασμίδιο, άρα δεν μετασχηματίστηκαν,
- II. βακτήρια που δέχτηκαν πλασμίδιο μη ανασυνδυασμένο και
- III. βακτήρια που δέχτηκαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων από τα μη μετασχηματισμένα βασίζεται στη χρήση αντιβιοτικού. Παρουσία του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των βακτηρίων θα έχει ως αποτέλεσμα να επιβιώνουν μόνο τα βακτήρια που προσέλαβαν πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη, δηλαδή τα μετασχηματισμένα.

Η επιλογή των βακτηρίων που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια από εκείνα με μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους:

- I. μέσω ενός γονιδίου υπεύθυνου για την παραγωγή μίας κυανής χρωστικής, στο εσωτερικό του οποίου ενσωματώνεται το τμήμα DNA του δότη. Συνεπώς, όσα βακτήρια δέχτηκαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο δεν παράγουν χρωστική. Αντίθετα, τα βακτήρια που δέχτηκαν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βάφονται μπλε! (υπάρχει σχετικό σχήμα στο σχολικό βιβλίο)
- II. μέσω της χρήσης πλασμιδίου που διαθέτει δύο γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διαφορετικά αντιβιοτικά π.χ. στην αμπικιλίνη και στη στρεπτομυκίνη. Η αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει η Π.Ε. που θα χρησιμοποιήσουμε θα πρέπει να βρίσκεται στο εσωτερικό του ενός από τα δύο γονίδια ανθεκτικότητας (έστω στο εσωτερικό του γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη). Έτσι, αν το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο, το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη θα είναι κατεστραμμένο, και το βακτήριο που θα φέρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα είναι ανθεκτικό στη στρεπτομυκίνη, αλλά ευαίσθητο στην αμπικιλίνη. Αρχικά με τη χρήση στρεπτομυκίνης επιλέγονται τα μετασχηματισμένα βακτήρια. Σε μία «δίδυμη καλλιέργεια» τοποθετείται αμπικιλίνη στο θρεπτικό υλικό. Τα βακτήρια που πεθαίνουν είναι τα μετασχηματισμένα με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Κάθε βακτήριο που προσλαμβάνει ένα πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη, διαιρείται και δημιουργεί μία αποικία δηλ. ένα μεγάλο αριθμό βακτηρίων που είναι ίδια μεταξύ τους και περιέχουν ένα αντίγραφο του DNA (**βακτηριακός κλώνος**).

Θεωρητικές Εφαρμογές

1. Σε ένα πλασμίδιο που είχε χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση συνέβη μία μετάλλαξη, δηλαδή μία αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων του. Μετά τη μετάλλαξη, το πλασμίδιο κρίθηκε ως ακατάλληλος φορέας κλωνοποίησης. Ποιες είναι οι πιθανές θέσεις του πλασμιδίου που συνέβη η αλλαγή ώστε να επηρεαστεί η κατάλληλότητά του;
2. Ένα πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης για την κατασκευή μίας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης διαθέτει τρία γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, για στρεπτομυκίνη, αμπικιλίνη και πενικιλίνη. Η αλληλουχία βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση βρίσκεται μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας στη πενικιλίνη. Να εξηγήσετε με ποιο τρόπο θα επιλέξετε τα μετασχηματισμένα από τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια ώστε να προχωρήσετε στη φάση της κλωνοποίησης. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως κύτταρα-ξενιστές φέρουν στο κύριο μόριο DNA ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.
3. Για τη δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης διαθέτουμε τέσσερα (4) διαφορετικά είδη πλασμιδίων και τρία (3) διαφορετικά είδη βακτηρίων. Τα βακτήρια που θα χρησιμοποιηθούν ως ξενιστές δεν περιέχουν πλασμίδια,

φέρουν όμως στο κυρίως γενετικό υλικό τους γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα Α:

Πίνακας Α

Βακτήριο	Α	Β	Γ
Ανθεκτικότητα σε Αντιβιοτικά	αμπικιλίνη στρεπτομυκίνη	καναμυκίνη	αμπικιλίνη καναμυκίνη

Τα πλασμίδια που θα χρησιμοποιηθούν διαθέτουν μια θέση αναγνώρισης για κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση και γονίδιο/γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Στον Πίνακα Β σημειώνεται με (+) η παρουσία και με (-) η απουσία γονιδίου ανθεκτικότητας σε αντίστοιχο αντιβιοτικό:

Πίνακας Β

Πλασμίδιο	1	2	3	4
Ανθεκτικότητα στην Αμπικιλίνη	+	-	+	-
Ανθεκτικότητα στη Στρεπτομυκίνη	-	-	+	+
Ανθεκτικότητα στην Καναμυκίνη	-	+	-	-

Να εξηγήσετε ποιοι συνδυασμοί πλασμιδίων-βακτηρίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων.

(Πανελλαδικές Εξετάσεις 2022)

4. Προκειμένου να κλωνοποιήσουμε ένα επιλεγμένο τμήμα DNA, κατασκευάσαμε ένα τεχνητό πλασμίδιο που περιλαμβάνει:

- I. γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη,
- II. γονίδιο που κωδικοποιεί ένζυμο, το οποίο μετατρέπει μία άχρωμη ουσία σε έγχρωμη. Το γονίδιο αυτό περιλαμβάνει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από μία περιοριστική ενδονουκλεάση.

Αφού πραγματοποιήθηκαν όλα τα στάδια παραγωγής ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και εισαγωγής στα βακτήρια – ξενιστές, προέκυψαν:

Α. Βακτήρια που δεν είναι ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη.

Β. Άχρωμες αποικίες ανθεκτικές στη στρεπτομυκίνη.

Γ. Αποικίες μπλε χρώματος ανθεκτικές στη στρεπτομυκίνη.

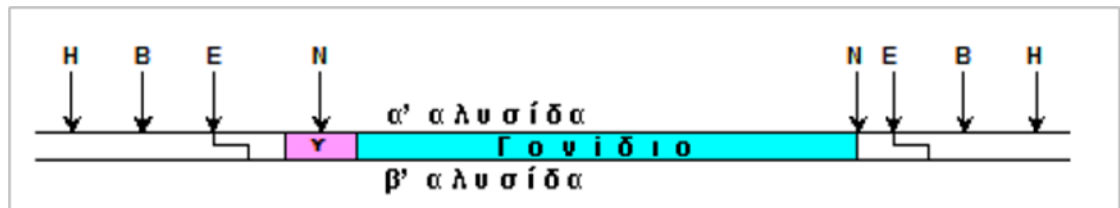
Από ποια αποικία θα επιλεγούν τα βακτήρια που περιέχουν το επιθυμητό τμήμα DNA; Εξηγείστε.

Ασκήσεις

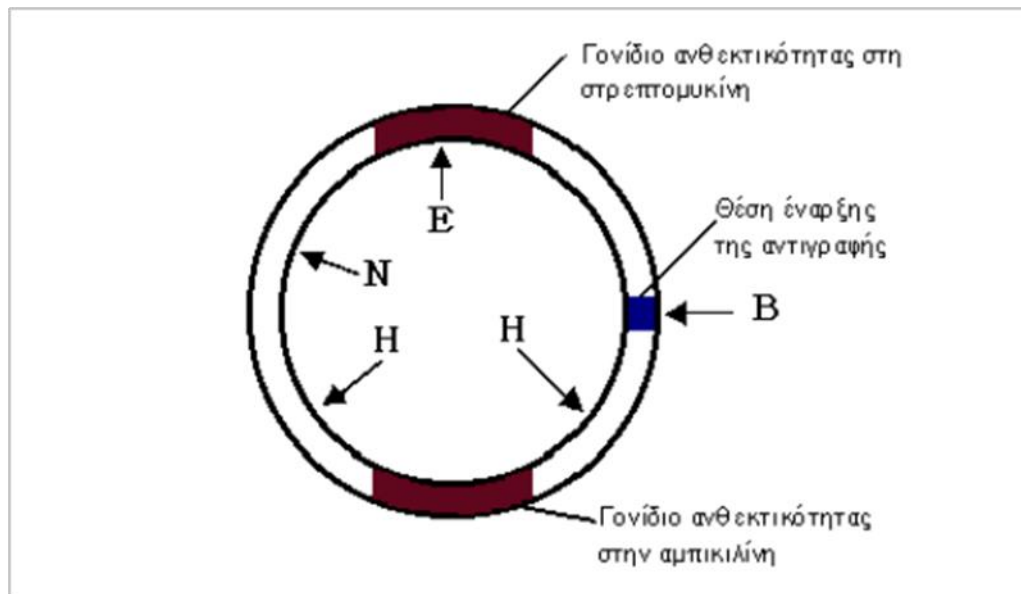
1. Στα ακόλουθα σχήματα παριστάνονται:

- τμήμα DNA προκαρυωτικού κυττάρου, στο οποίο περιέχεται ένα γονίδιο και ο υποκινητής του. (Σχήμα Ι)

- πλασμίδιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης του συγκεκριμένου γονιδίου για την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί στο κυτταρόπλασμα βακτηρίου – ξενιστή. (Σχήμα II)



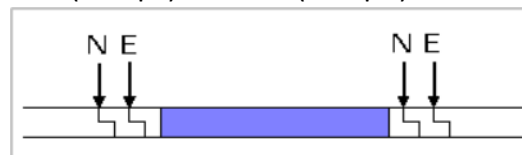
Σχήμα I



Σχήμα II

Τα σημεία E, B, N και H υποδηλώνουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών EcoRI, BamHI, NotI και HindIII αντίστοιχα.

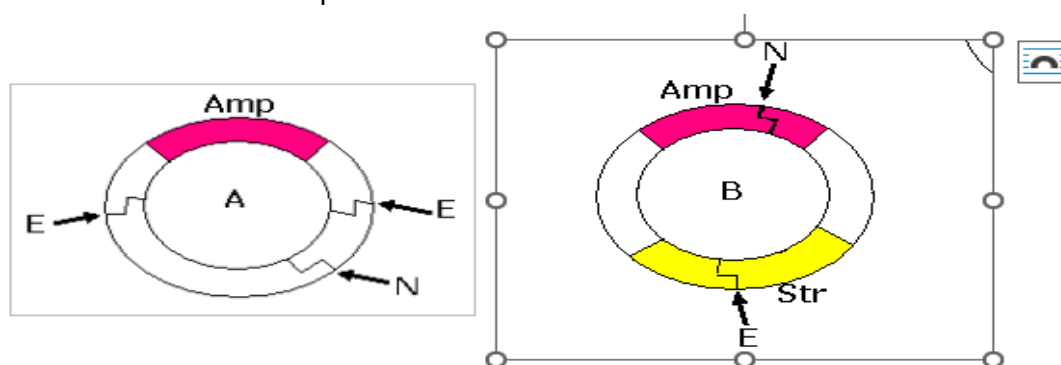
- Α) Ποια από τις δύο αλυσίδες του γονιδίου είναι η μη κωδική;
 - Β) Ποιο από τα τέσσερα ένζυμα είναι το καταλληλότερο για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA με στόχο την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο στο βακτήριο ξενιστή;
2. Στο σχήμα I παριστάνεται χρωμοσωμικό τμήμα που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και οι θέσεις που τέμνεται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI (θέση E) και NotI (θέση N).



Σχήμα I

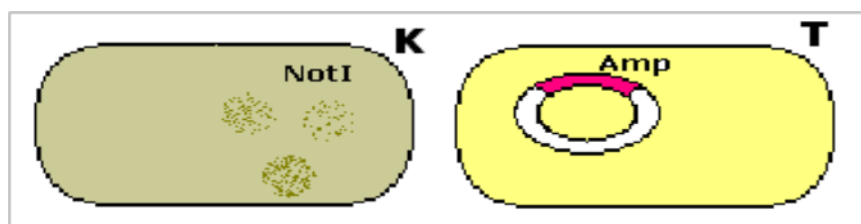
Στο σχήμα II παριστάνονται δύο πλασμίδια που είναι πιθανοί φορείς κλωνοποίησης του χρωμοσωμικού τμήματος, τα γονίδια ανθεκτικότητας σε

αντιβιοτικά που φέρουν (Amp: αμπικιλίνη, Str: στρεπτομυκίνη) και οι θέσεις που οι EcoRI και NotI τα τέμνουν.



Σχήμα II

Στο σχήμα III απεικονίζονται τα βακτήρια K και T που είναι πιθανά κύτταρα-ξενιστές για την κλωνοποίηση του χρωμοσωμικού τμήματος. Στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου K ανιχνεύονται ίχνη της περιοριστικής ενδονουκλεάσης NotI, ενώ στο βακτήριο T προϋπάρχει ένα πλασμίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.



Σχήμα III

A. Ποιος συνδυασμός περιοριστικής ενδονουκλεάσης-πλασμιδίου αποκλείεται να χρησιμοποιηθεί για την κλωνοποίηση του τμήματος, ανεξαρτήτως κυττάρου-ξενιστή; Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.

B. Είναι δυνατή η κλωνοποίηση του χρωμοσωμικού τμήματος με τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου A με τη βοήθεια της NotI και το μετασχηματισμό του βακτηρίου K; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

Γ. Είναι δυνατή η κλωνοποίηση του χρωμοσωμικού τμήματος με τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου B με τη βοήθεια της EcoRI και το μετασχηματισμό του βακτηρίου T; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

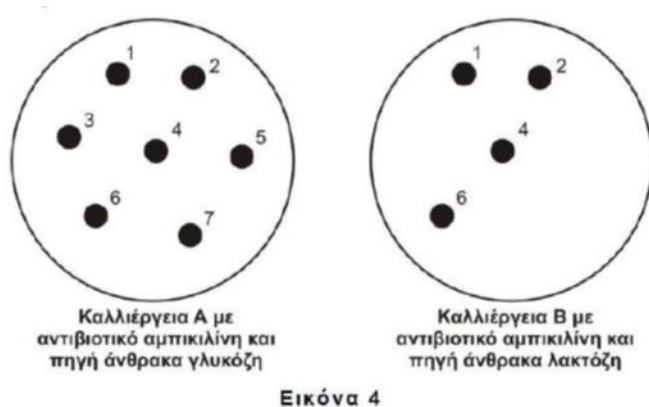
Δ. Πώς είναι δυνατός ο μετασχηματισμός του βακτηρίου T; Με ποιο αντιβιοτικό θα γίνει στην περίπτωση αυτή η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων;

3. Προκειμένου να μελετήσουμε το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη A, το κλωνοποιούμε σε κατάλληλο πλασμίδιο φορέα (Εικόνα 3) που φέρει την αλληλουχία του οπερονίου της λακτόζης. Το γονίδιο εισάγεται στο σημείο που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση E1. Για τον μετασχηματισμό

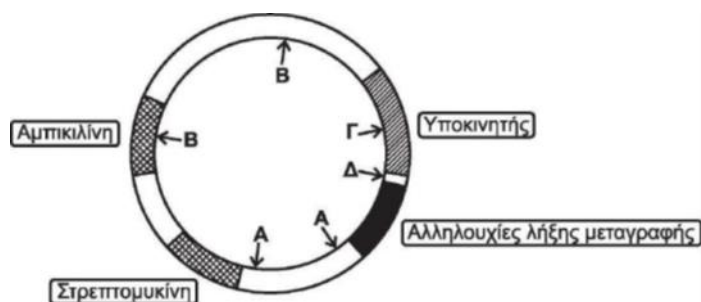
χρησιμοποιούμε ως βακτήρια ξενιστές στελέχη *E.coli* στα οποία δεν λειτουργεί το οπερόνιο της λακτόζης και είναι ευαίσθητα στην αμπικιλίνη.



Μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού, τα βακτήρια μεταφέρονται σε στερεό θρεπτικό υλικό με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και αντιβιοτικό αμπικιλίνη (καλλιέργεια Α, Εικόνα 4). Στη συνέχεια μεταφέρουμε δείγματα από όλες τις αριθμημένες αποικίες σε νέο στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει λακτόζη και αμπικιλίνη, οπότε αναπτύσσεται η καλλιέργεια Β (Εικόνα 4). Να αναφέρετε τα είδη των βακτηρίων που αναπτύσσονται στις δύο παραπάνω καλλιέργειες Α και Β. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.



4. Στην Εικόνα 1 δίνεται ένα πλασμίδιο που φέρει γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και στρεπτομυκίνη, έναν υποκινητή και αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής. Στις θέσεις Α, Β, Γ και Δ βρίσκονται αλληλουχίες, οι οποίες αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες α, β, γ και δ αντίστοιχα. Το πλασμίδιο αυτό το χρησιμοποιούμε ως φορέα για την κλωνοποίηση ενός ανθρώπινου συνεχούς γονιδίου με σκοπό να παράγουμε ένα ολιγοπεπτίδιο σε καλλιέργειες *in vitro*. Στα βακτήρια που θα χρησιμοποιηθούν για τον μετασχηματισμό περιέχονται όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες που απαιτούνται για τη μεταγραφή και δεν περιέχονται πλασμίδια.



Α. Ποια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες α, β, γ ή δ είναι η κατάλληλη για τη χρήση του πλασμιδίου αυτού ως φορέα κλωνοποίησης;

Β. Με ποιον τρόπο μπορούμε να επιλέξουμε τους βακτηριακούς κλώνους που έχουν προσλάβει πλασμίδιο (ανασυνδυασμένο ή μη) από τους κλώνους που δεν έχουν προσλάβει πλασμίδιο; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

Παρακάτω δίνεται τμήμα DNA το οποίο περιέχει το συνεχές ανθρώπινο γονίδιο που επιθυμούμε να εισαγάγουμε στο πλασμίδιο του σχήματος.

Αλυσίδα I **OH-GCCAATATTAAATGAGCATGCCGTAGGAATATTCGG**

Αλυσίδα II **CGGTTATAATTTACTCGTACGGCATCCTTATAAGCC**

Γ. Να εντοπίσετε την κωδική αλυσίδα του παραπάνω γονιδίου. Να γράψετε το mRNA και να σημειώσετε τον προσανατολισμό του. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

Δ. Με βάση το παραπάνω γονίδιο, να γράψετε την αλληλουχία μήκους έξι ζευγών βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση, την οποία προσδιορίσατε στο ερώτημα Ι, για την κλωνοποίηση του γονιδίου.

Ε. Να εξηγήσετε γιατί η κλωνοποίηση του παραπάνω γονιδίου στο πλασμίδιο του σχήματος μπορεί να οδηγήσει:

- I. στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων που παράγουν το ολιγοπεπτίδιο και
- II. στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων που δεν παράγουν το ολιγοπεπτίδιο παρόλο που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

(Πανελλήνιες Επαναληπτικές Εξετάσεις 2014)