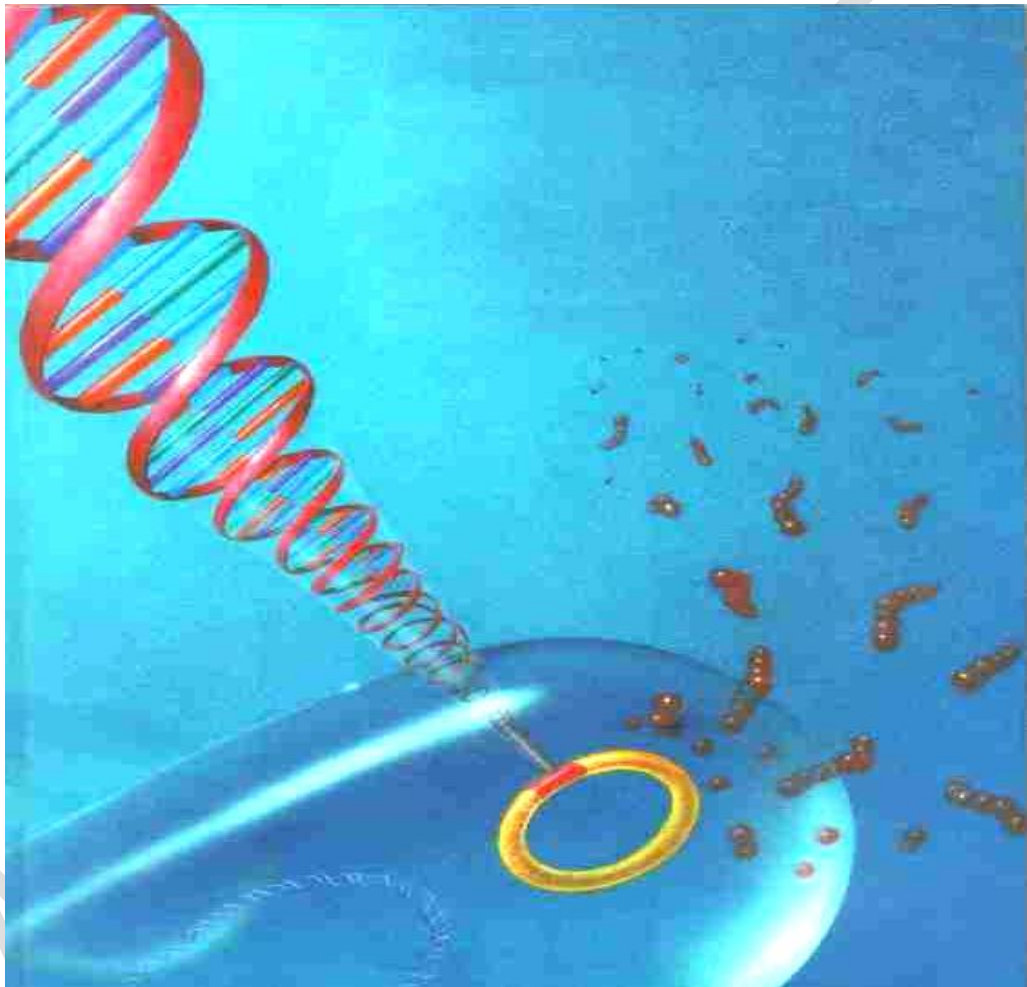


Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA



4ο κεφάλαιο

Περιεχόμενα

	από αελίδα
Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (εισαγωγή)	75
• Μία γονιδιωματική Βιβλιοθήκη περιέχει όλο το γονιδίωμα ενός οργανισμού	78
• Κλωνοποίηση του mRNA: Κατασκευή cDNA Βιβλιοθήκης	83
• Η υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κλώνων γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης	85
• Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA	86
Διευκρινίσεις – επισημάνσεις & απαντημένα θέματα συνδυασμού – σύγκρισης	88

4.1 Τι επέτρεψε την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA;

- Η **απομόνωση και χρήση** πολυάριθμων **ενζύμων**, έδωσε στους ερευνητές τη δυνατότητα «**αναπαραγωγής**» *in vitro* των διαδικασιών:
 - της αντιγραφής, της αντίστροφης μεταγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης.
- Ειδικότερα η **απομόνωση** των:
 - **περιοριστικών ενδονουκλεασών**, ενζύμων που κόβουν*¹ το DNA σε κομμάτια με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων, καθώς και
 - **ειδικών φορέων***² που μεταφέρουν DNA από κύτταρο σε κύτταρο.

4.2 Ποια ικανότητα έδωσε στον άνθρωπο η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και πού βρίσκει εφαρμογή αυτή;

- Έδωσε στον άνθρωπο την ικανότητα όχι μόνο να **ερευνά**, αλλά να **επεμβαίνει** και να **τροποποιεί** το γενετικό υλικό των οργανισμών.
- Η τεχνολογία αυτή **βρίσκει εφαρμογή**:
 - στην παραγωγή σειράς προϊόντων και
 - στη δημιουργία φυτών και ζώων με «βελτιωμένες» ιδιότητες*³.

Όρος	Ορισμός – Χαρακτηριστικές ιδιότητες
Ανασυνδυασμένο DNA ΠΕ '15	• Τεχνητό*⁴ μόριο DNA, που: → περιέχει γονίδια από δυο ή και περισσότερους οργανισμούς και → μπορεί να εισαχθεί σε ένα βακτήριο ή σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο.
Γενετικά τροποποιημένα κύτταρα	• Βακτήρια ή ευκαρυωτικά κύτταρα με ανασυνδυασμένο γενετικό υλικό. → Είναι ικανά να ζουν και να αναπαράγονται, μεταφέροντας τις καινούργιες ιδιότητες στους απογόνους τους.
Γενετική Μηχανική ΠΕ '16	• Οι τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό.

*¹ Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες «κόβουν» φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μόνο σε δίκλινα μόρια DNA, σε καθορισμένες και μοναδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων.

*² Τέτοιοι «μεταφορείς» μικρών ή και μεγάλων τμημάτων ξένου DNA είναι τα **πλασμίδια** των βακτηρίων και το **γενετικό υλικό (DNA) φάγων** (π.χ. βακτηριοφάγος λ). Σύμφωνα με το πείραμα των Hershey & Chase ο φάγος «άφηνε» το DNA του στο εσωτερικό του βακτηρίου, με μέσα που διαθέτει.

*³ Με τη βοήθεια των φορέων μεταφέρουμε τμήμα π.χ. ανθρώπινου DNA (γονίδιο προϊνσουλίνης) σε ένα βακτήριο και το «βελτιώνουμε», ώστε να παράγει χρήσιμα προϊόντα (π.χ. ινσουλίνη).

*⁴ Φορέας και τμήμα DNA δότη.

4.3 Για την επίτευξη ποιών θεμελιωδών στόχων του ανθρώπου άνοιξε το δρόμο η Γενετική Μηχανική;

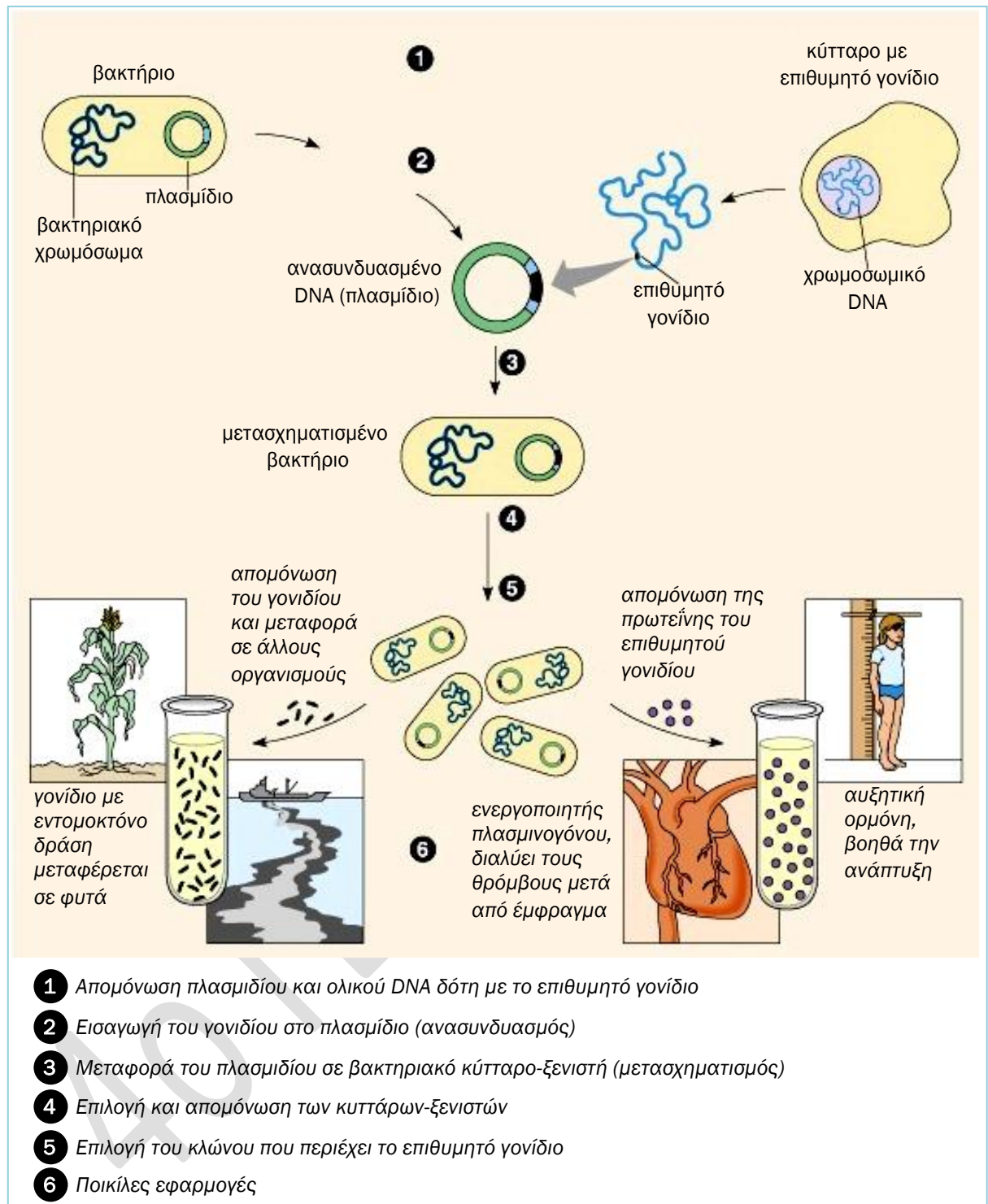
- Η Γενετική Μηχανική άνοιξε το δρόμο για νέες, εξαιρετικά ενδιαφέρουσες και παραγωγικές δυνατότητες, αλλά και για την επίτευξη δύο θεμελιωδών στόχων του ανθρώπου:
 - α. την κατανόηση των μυστηρίων της ζωής και της εξέλιξης πάνω στη Γη και
 - β. τη βελτίωση της υγείας και του τρόπου διαβίωσής του.
- ✓ Η βελτίωση αυτή επιτυγχάνεται με τις εφαρμογές της Γενετικής Μηχανικής τόσο στην Ιατρική όσο και στη γεωργία και την κτηνοτροφία.

4.4 Ποια είναι τα στάδια μεταφοράς γενετικού υλικού από έναν οργανισμό σε άλλον;

- Η **τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA** περιλαμβάνει όλες τις τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά του γενετικού υλικού από τον ένα οργανισμό στον άλλο. Τα στάδια της διαδικασίας αυτής είναι:
 - Η **κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA**.
 - Για το σκοπό αυτό το **ολικό DNA** από έναν οργανισμό δότη απομονώνεται, κόβεται με ειδικά ένζυμα, τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, και ενώνεται με ένα φορέα κλωνοποίησης.
 - ✓ Ο **φορέας κλωνοποίησης** είναι ένα μόριο DNA, π.χ. πλασμίδιο ή DNA φάγων, το οποίο μπορεί να **αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα**^{*1} μέσα σε ένα κύτταρο-ξενιστή, όπως ένα βακτήριο.
 - ✓ Το DNA που δημιουργείται είναι ανασυνδυασμένο.
 - Η **μεταφορά του ανασυνδυασμένου μορίου DNA σε ένα κύτταρο-ξενιστή**.
 - Η εισαγωγή του DNA σε βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή ονομάζεται **μετασχηματισμός**.
 - Η **επιλογή και απομόνωση των κυττάρων-ξενιστών**.
 - Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα-ξενιστές που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο DNA επιλέγονται από εκείνα που δεν το έχουν προσλάβει.
 - ✓ Κάθε βακτήριο που προσλαμβάνει ένα μόριο ανασυνδυασμένου DNA πολλαπλασιάζεται και παράγει μια **αποικία** που αποτελεί ένα **βακτηριακό κλώνο**.
 - ✓ Είναι φανερό ότι με την παραπάνω διαδικασία παράγονται χιλιάδες κλώνοι, που **ο καθένας περιέχει ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA διαφορετικό**^{*2} από τους υπόλοιπους κλώνους.
 - Η **επιλογή ενός βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA**.
 - Αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια **ειδικών μορίων ανιχνευτών**.

^{*1} Επειδή διαθέτουν μία θέση έναρξης της αντιγραφής.

^{*2} Επειδή κάθε πλασμίδιο προσλαμβάνει διαφορετικό θραύσμα από τα τμήματα του ολικού DNA του δότη.

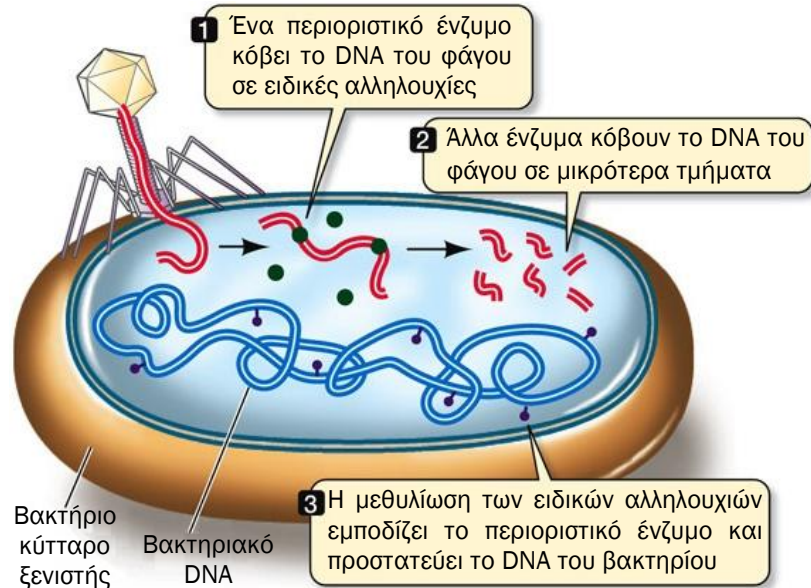


Όρος	Ορισμός – Χαρακτηριστικές ιδιότητες
Κλώνος	Ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών.
Κλωνοποίηση	Η κατασκευή, κατά προτίμηση μεγάλου αριθμού, πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών.

Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει όλο το γονιδίωμα ενός οργανισμού

4.5 Ποια είναι τα χαρακτηριστικά των ενζύμων περιοριστικές ενδονουκλεάσες;

- Η ανακάλυψή τους έθεσε το θεμέλιο για τη δημιουργία των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών.
- Παράγονται από **βακτήρια** και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να **προστατεύουν** τα βακτήρια από την **εισβολή***¹ «ξένου» DNA.
- Αναγνωρίζουν*² **ειδικές αλληλουχίες** **δίκλωνου DNA**, μήκους **4-8 νουκλεοτιδίων***³ στο δίκλωνο DNA.



4.6 Ποια είναι τα χαρακτηριστικά της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI;

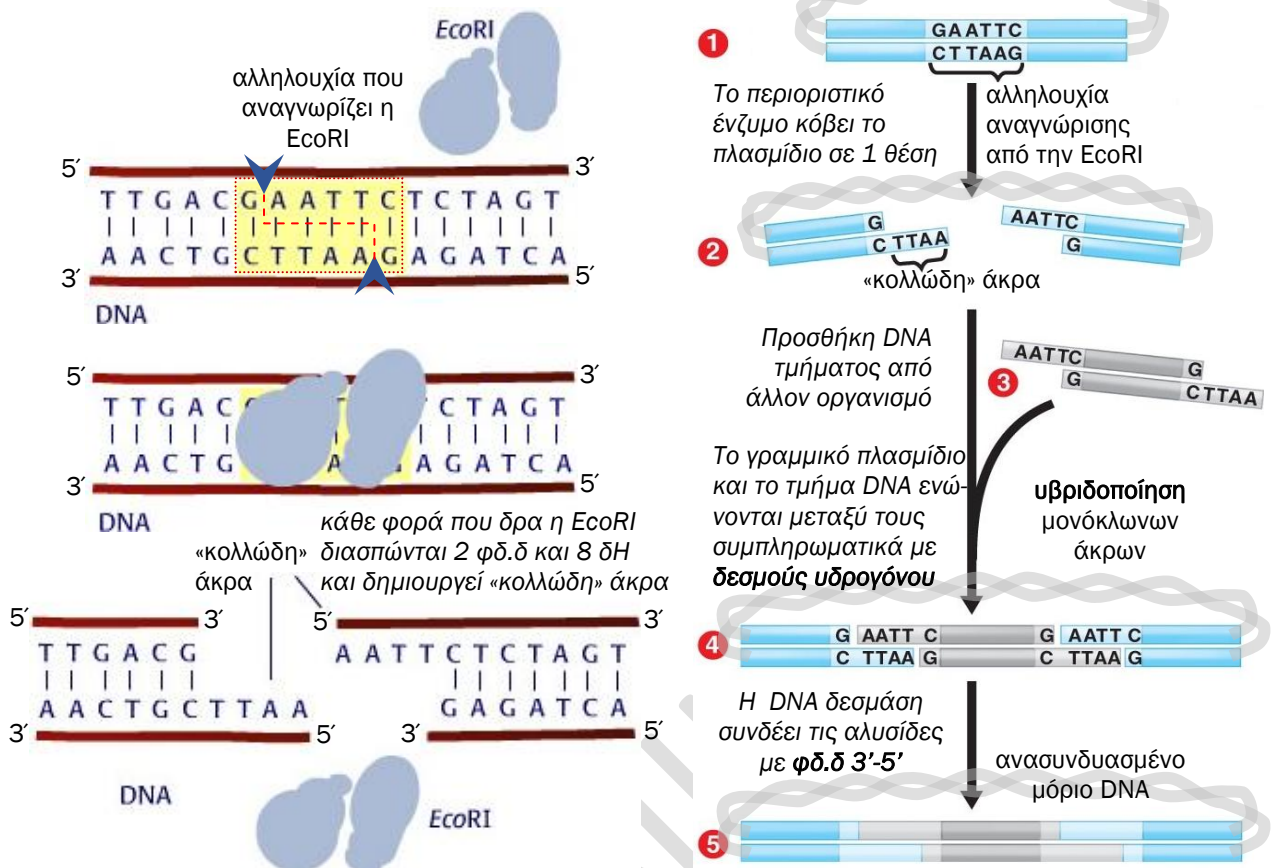
- Η **EcoRI** είναι μια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται ευρέως.
 - Απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*.
 - Όποτε συναντά την αλληλουχία $5'-GAATTC-3'$ / $3'-CTTAAG-5'$ στο γονιδίωμα, **κόβει κάθε αλυσίδα** μεταξύ του **G** και του **A** (με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$), αφήνοντας **μονόκλωνα άκρα** από **αζευγάρωτες βάσεις** στα κομμένα άκρα.
 - ✓ Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν **δεσμούς υδρογόνου** με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA, που **έχουν κοπεί με το ίδιο***⁴ **ένζυμο**.

*¹ Μόλις το DNA του φάγου ελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου-ξενιστή, τα βακτήρια συνθέτουν περιοριστικές ενδονουκλεάσες με σκοπό την καταστροφή του DNA του φάγου.

*² και κόβουν.

*³ ζευγών.

*⁴ **Συνήθως** το ολικό DNA δότη και ο φορέας κλωνοποίησης έχουν επεξεργαστεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση (ΠΕ), **Συχνά** όμως τα προαναφερόμενα επεξεργάζονται με διαφορετικές ΠΕ, που αναγνωρίζουν και κόβουν διαφορετικές αλληλουχίες, αλλά σχηματίζονται συμπληρωματικά άκρα για την υβριδοποίηση των άκρων τους και το σχηματισμό του ανασυνδυασμένου DNA.



4.7 Ποια είναι η παρουσία της δίκλωνης αλληλουχίας 5' GAATTC 3' στα γονιδιώματα των οργανισμών και στα πλασμίδια, που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης;

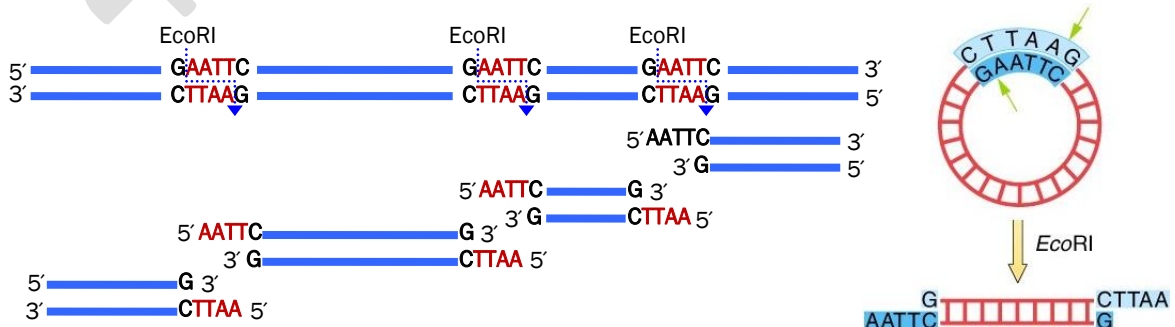
- Η δίκλωνη αλληλουχία 5'- GAATTC -3' υπάρχει:

→ **διάσπαρτη** στα γονιδιώματα των οργανισμών.

- ✓ Έτσι το γονιδίωμα ενός ανώτερου ευκαρυωτικού οργανισμού μπορεί να κοπεί σε **χιλιάδες κομμάτια**, που μπορούν να ενσωματωθούν σε **ειδικούς φορείς**. Οι πιο χαρακτηριστικοί τύποι φορέων είναι τα **πλασμίδια** και το **DNA των φάγων**.

→ **μία*1 φορά μόνο** στα πλασμίδια, που χρησιμοποιούνται*2 ως φορείς κλωνοποίησης.

- ✓ Έτσι τα πλασμίδια κόβονται σε αυτή τη θέση και δημιουργούνται **γραμμικά μέρια DNA** με μονόκλινα άκρα.



- *1 Αν το πλασμίδιο φορέας διέθετε τη δίκλωνη αλληλουχία GAATTC, έστω και δυο φορές, τότε το πλασμίδιο θα κοβόταν σε 2 σημεία, θα προέκυπταν 2 τμήματα και θα καταστρεφόταν.
- *2 Εννοεί ότι επιλέγονται έτσι ώστε να περιέχουν μία μόνο θέση αναγνώρισης, από την περιοριστική ενδονουκλεάση που έχει ήδη επιλεγθεί.

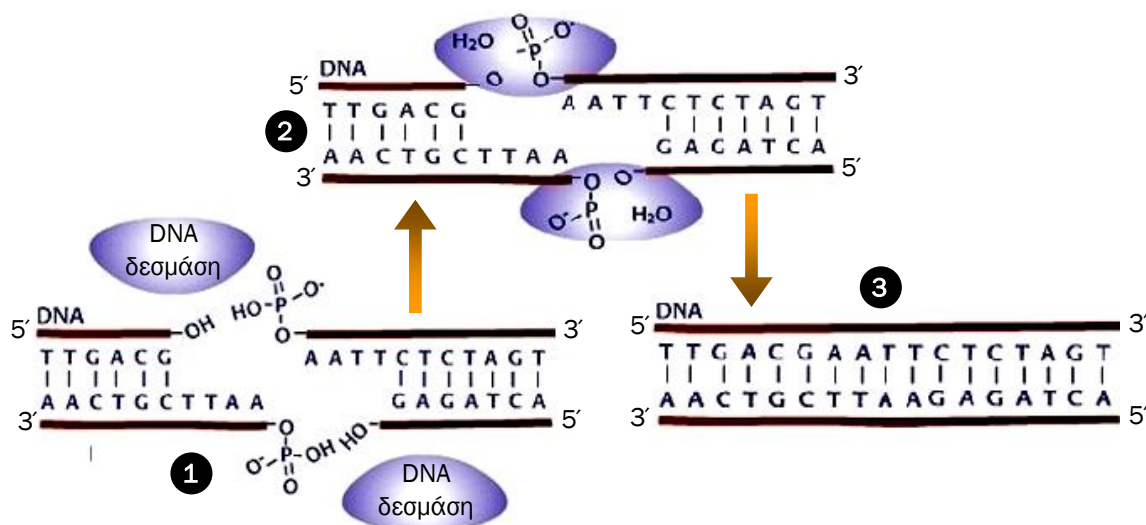
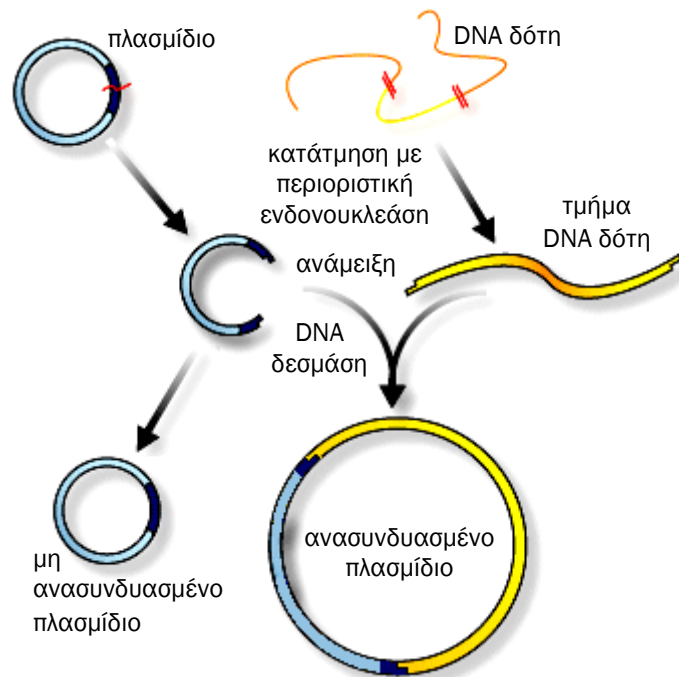
4.8 Πώς δημιουργείται ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;

- Τα δυο είδη DNA, του πλασιμιδίου και του οργανισμού, αναμιγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση του ενζύμου **DNA δεσμάση**.

→ Η DNA δεσμάση είναι ένα από τα ένζυμα της αντιγραφής που συνδέει κομμάτια DNA.

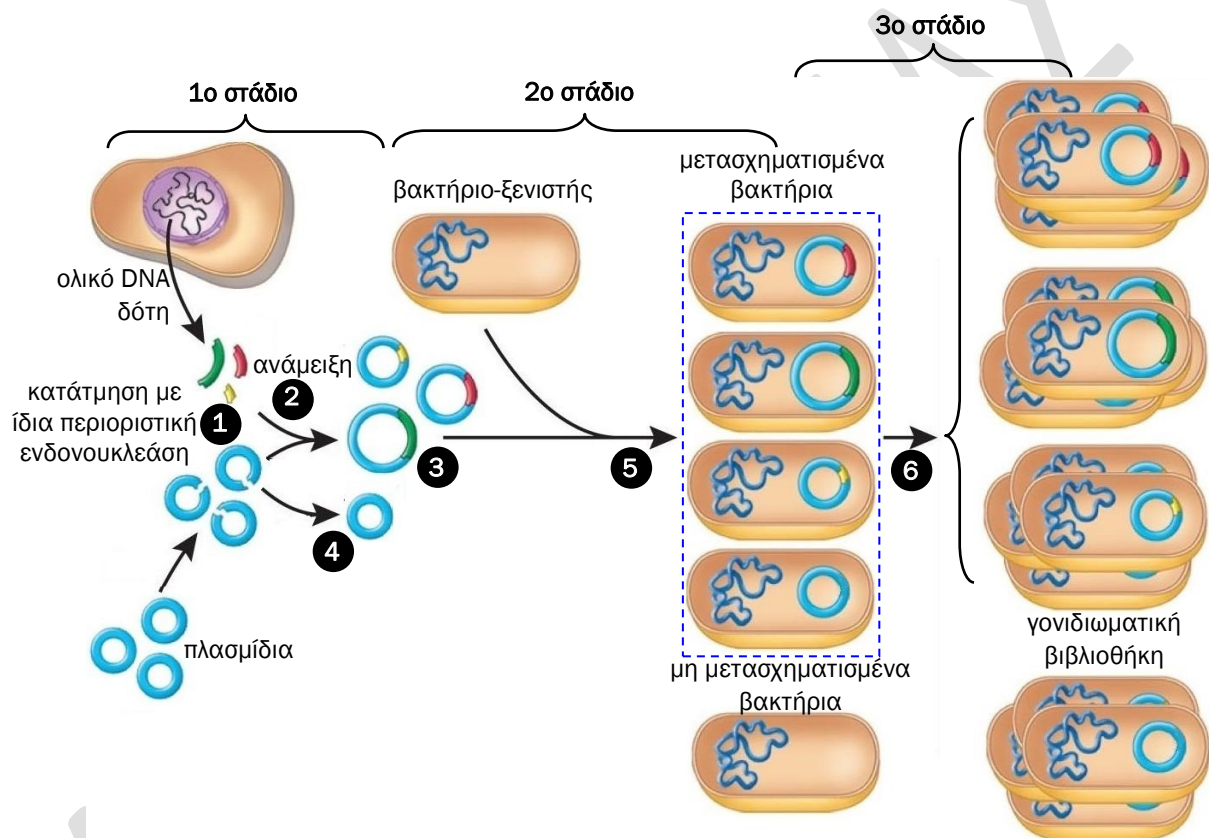
- Έτσι δημιουργούνται **ανασυνδυασμένα πλασμίδια**.

→ Μερικά πλασμίδια ξαναγίνονται κυκλικά, χωρίς να προσλάβουν DNA του οργανισμού.



4.9 Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ή κλωνοποίηση ολικού DNA δότη:

- **1ο ΣΤΑΔΙΟ** Κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA
 - Απομόνωση ολικού DNA από οργανισμό δότη.
 - Κοπή του DNA και του φορέα με την ίδια **περιοριστική ενδονουκλεάση**. (1)
 - **Ανάμιξη** και **ένωση** των τμημάτων DNA με τα πλασμίδια, αφού έχουν συμπληρωματικά άκρα. (2)
 - Δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA με τη βοήθεια του ενζύμου **DNA δεσμάση**. (3)
 - ✓ Μερικά πλασμίδια **ξαναγίνονται κυκλικά** χωρίς να προσλάβουν τμήμα DNA του οργανισμού δότη. (4)



- **2ο ΣΤΑΔΙΟ** Μεταφορά του ανασυνδυασμένου μορίου DNA σε ένα κύτταρο - ξενιστή (5)
 - Ως **ξενιστές** χρησιμοποιούνται συνήθως **βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια** και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά.
 - **Κατάλληλη κατεργασία** των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων, ώστε να γίνουν **παροδικά διαπερατά** σε μακρομόρια*1.
 - Είσοδος του πλασμιδίου στο βακτήριο (**μετασχηματισμός**).
 - ✓ Τα βακτήρια-ξενιστές δέχονται*2 σε **μικρό ποσοστό** πλασμίδια, **μερικά** από τα οποία είναι ανασυνδυασμένα.

*1 Πλασμίδια.

*2 Από την κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA (1ο στάδιο) ξέρουμε, ότι πολλά από τα πλασμίδια που χρησιμοποιούμε «έκλεισαν» χωρίς να προσλάβουν τμήμα ξένου DNA. Άρα, κατά το μετασχηματισμό των βακτηρίων (2ο στάδιο), θα προκύψουν **3 ομάδες βακτηρίων**, όπως δείχνει και το σχήμα.

- (Α) Βακτήρια που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (τα οποία και χρειαζόμαστε).
- (Β) Βακτήρια που έχουν προσλάβει μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
- (Γ) Βακτήρια που δεν έχουν προσλάβει καθόλου πλασμίδιο.

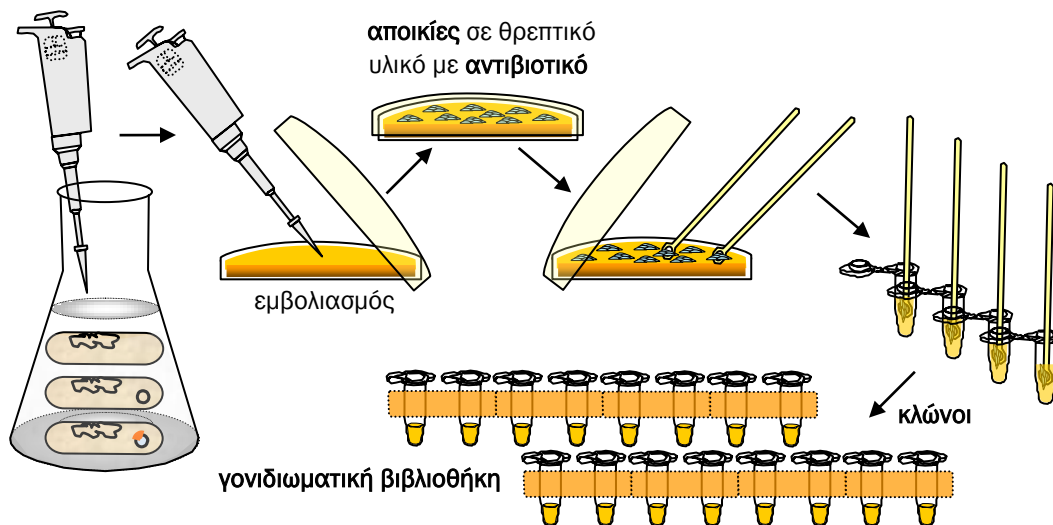


• 3ο ΣΤΑΔΙΟ Επιλογή και απομόνωση των κυττάρων-ξενιστών (6)

→ Η επιλογή των βακτηρίων που δέχτηκαν*1 ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στηρίζεται στην ικανότητα ανάπτυξής τους παρουσία **αντιβιοτικού**, επειδή το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

→ Κάθε βακτήριο που προσέλαβε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πολλαπλασιάζεται και δίνει*2 ένα βακτηριακό κλώνο.

- ✓ Η διαδικασία δημιουργίας κλώνων βακτηρίων ονομάζεται **κλωνοποίηση**.
- ✓ Το **σύνολο** των **βακτηριακών κλώνων** περιέχει το **συνολικό DNA** του οργανισμού **δότη** και αποτελεί μια **γονιδιωματική βιβλιοθήκη**.



*1 Χρησιμοποιώντας την ιδιότητα ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, που προσφέρουν τα πλασμίδια στους ξενιστές, εύκολα θα απαλλαχθούμε από τα βακτήρια που δεν έχουν προσλάβει καθόλου πλασμίδιο, αφού στις καλλιέργειες με αντιβιοτικό αναπτύσσονται μόνο όσα έχουν προσλάβει πλασμίδιο.

Για το διαχωρισμό όμως των βακτηρίων, που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο, από εκείνα που έχουν προσλάβει μη ανασυνδυασμένο, ακολουθείται διαφορετική διαδικασία.

Αρχικά έχει επιλεγθεί στο πλασμίδιο φορέα η θέση, που θα ενσωματωθεί το τμήμα ξένου DNA. Η θέση αυτή είναι ίδια για όλα τα πλασμίδια, αφού έχουν «κοπεί» με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση. Στη θέση αυτή υπάρχει ένα 2ο γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, που προφανώς καταστρέφεται.

→ Έτσι λοιπόν όσα βακτήρια έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο δεν είναι ανθεκτικά στο 2ο αντιβιοτικό, σε αντίθεση με εκείνα που προσέλαβαν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

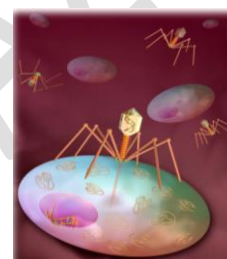
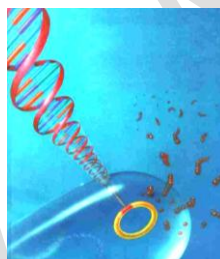
→ Χρειαζόμαστε όμως μόνο τα βακτήρια που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

→ Σε μικρά δείγματα βακτηρίων ελέγχουμε για ανθεκτικότητα στο 2ο αντιβιοτικό. Όσα δείγματα πεθαίνουν, σημαίνει ότι τα πλασμίδιά τους είναι ανασυνδυασμένα και έτσι επιλέγουμε αυτούς τους κλώνους.

*2 Παράγει μια αποικία.

4.10 Ποια είναι τα χαρακτηριστικά των φορέων κλωνοποίησης;

- Η κλωνοποίηση σε **πλασμίδια** είναι σχετικά απλή και γι' αυτό αποτελούν το συνηθέστερο φορέα κλωνοποίησης για οργανισμούς με **μικρό γονιδίωμα**.
- Ένας άλλος φορέας που χρησιμοποιείται ευρύτατα, γιατί μπορεί να ενσωματώσει **μεγαλύτερα κομμάτια ξένου DNA**, είναι ο **βακτηριοφάγος λ**.
→ Η στρατηγική της κλωνοποίησης είναι η ίδια*¹ με αυτή που χρησιμοποιείται και στα πλασμίδια.
- Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ένα μόριο DNA, π.χ. πλασμίδιο ή DNA φάγων, το οποίο μπορεί να **αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα***² μέσα σε ένα κύτταρο-ξενιστή, όπως ένα βακτήριο. ΠΕ '20



Κλωνοποίηση του mRNA: Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης

4.11 Πότε κατασκευάζουμε τις cDNA βιβλιοθήκες και τι περιέχουν;

ΠΕ '11

- Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, πολλά γονίδια μεταγράφονται σε ορισμένους μόνο κυτταρικούς τύπους.
→ Για παράδειγμα, τα γονίδια των αλυσίδων των αιμοσφαιρινών που εκφράζονται μόνο στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα του ανθρώπου.
- Τις cDNA βιβλιοθήκες τις κατασκευάζουμε **αν θέλουμε να κλωνοποιήσουμε τα γονίδια που εκφράζονται***³ σε συγκεκριμένα κύτταρα.
- Οι cDNA βιβλιοθήκες:
→ περιέχουν **αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων**, που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά και
→ έχουν το πλεονέκτημα απομόνωσης **μόνο***⁴ των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των **εξωνίων**.

*¹ Υπάρχουν **διαφορές** στο 2^ο και 3^ο στάδιο. Βλέπε συγκριτικό πίνακα της ερώτησης 4.19

*² Διότι διαθέτουν μία θέση έναρξης της αντιγραφής.

*³ και παράγουν mRNA. Όχι τα γονίδια που μεταγράφονται σε r, t ή snRNA.

*⁴ Το ώριμο mRNA, εκτός από τα εξώνια που μεταφράζονται σε αμινοξέα, περιέχει και δύο εξώνια που δεν μεταφράζονται σε αμινοξέα, τις 5' & 3' αμετάφραστες περιοχές, αλλά έχουν λειτουργικό ρόλο.

• **1ο ΣΤΑΔΙΟ** Κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA

→ Απομόνωση ολικού «ώριμου» mRNA^{*1}

από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο. (1)

→ Σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA: complementary DNA) με καλούπι το mRNA, με τη βοήθεια του ενζύμου **αντίστροφη μεταγραφάση**. (2)

✓ Παραγωγή υβριδικών μορίων νουκλεϊκού οξέος, mRNA//cDNA.

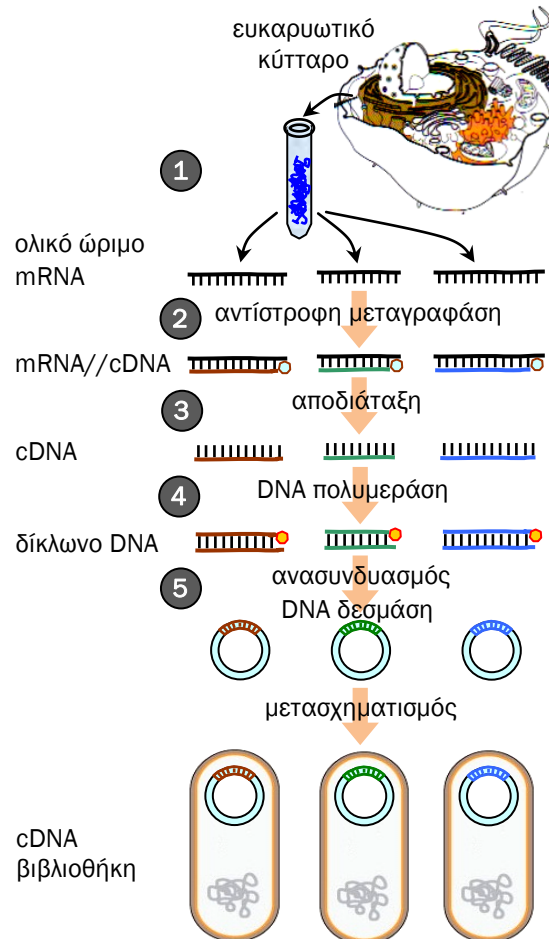
→ Διάσπαση του mRNA με κατάλληλες χημικές ουσίες^{*2} ή αποδιάταξη με θέρμανση. (3)

→ Σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας DNA^{*3} με καλούπι το cDNA. (4)

✓ Δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA.

→ Εισαγωγή των δίκλωνων^{*4} μορίων DNA σε πλασμίδια ή βακτηριοφάγους (5) και κλωνοποίησή τους, όπως^{*5} και στην κατασκευή της γονιδιωματικής.

✓ Με αυτό τον τρόπο δίνουν τη δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης^{*6} ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο-ξενιστή.



^{*1} Από το **κυτταρόπλασμα** του ευκαρυωτικού κυττάρου, για να είναι όλο ώριμο. Σύμφωνα με τη θεωρία, **απομονώνουμε μόνο τα ώριμα mRNA** και όχι t ή rRNA, οπότε **κλωνοποιούνται μόνο τα γονίδια για mRNA** και όχι τα γονίδια για t ή rRNA.

^{*2} Πρόκειται για υδrolυτικές ουσίες που καταστρέφουν μόνο το RNA και όχι το DNA.

^{*3} Με τη βοήθεια του ενζύμου **DNA πολυμεράση**.

^{*4} **Προσθήκη:**

α) στο δίκλωνο cDNA κατάλληλων DNA αλληλουχιών, όπως «**κολλώδη**» άκρα, επεξεργασμένα με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, για να ενσωματωθούν στα ανοιγμένα πλασμίδια.

β) στο δίκλωνο cDNA κατάλληλου **υποκινητή**, ο οποίος θα αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες του βακτηρίου, εάν ο φορέας δεν διαθέτει,

γ) του ενζύμου **DNA δεμάση**.

^{*5} Ακολουθούν το 2ο και 3ο ΣΤΑΔΙΟ κατασκευής βιβλιοθήκης.

^{*6} Προηγείται η επιλογή του βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο (4ο ΣΤΑΔΙΟ) και → ακολουθεί η καλλιέργεια του επιλεγμένου επιθυμητού κλώνου και η σύνθεση της πρωτεΐνης του συγκεκριμένου γονιδίου.

Η υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κλώνων γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης

4.13 Ποια διαδικασία ονομάζεται αποδιάταξη και πώς πραγματοποιείται;

- Αν επιδράσουμε στο DNA που απομονώθηκε με κατάλληλες **χημικές ουσίες** ή αυξήσουμε τη **θερμοκρασία**, τότε **σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου** μεταξύ των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων και οι δύο αλυσίδες αποχωρίζονται η μία από την άλλη.
→ Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **αποδιάταξη**.

4.14 Πού στηρίζεται η διαδικασία της υβριδοποίησης και τι δυνατότητα μας δίνει; ΠΕ '03, '10

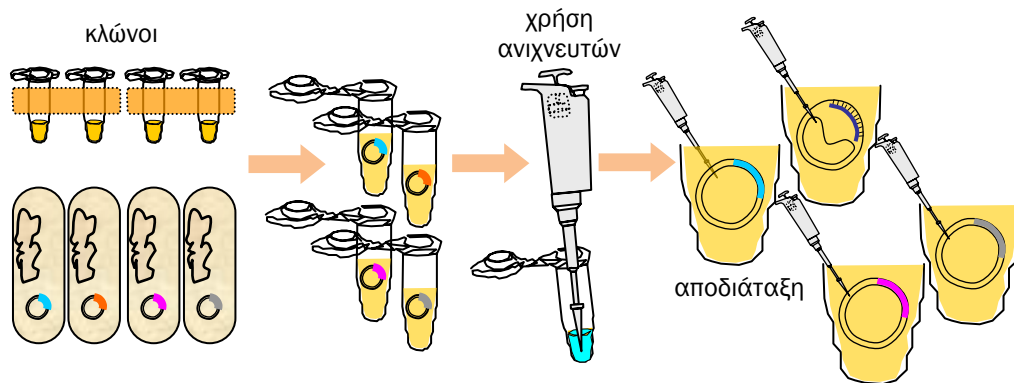
- Κατά την αποδιάταξη αποχωρίζονται οι δύο συμπληρωματικές αλυσίδες η μία από την άλλη.
- Οι δύο μονόκλωνες **συμπληρωματικές** αλυσίδες **μπορούν να επανασυνδεθούν** σε κατάλληλες συνθήκες.
→ Στην ιδιότητα αυτή στηρίζεται η διαδικασία της υβριδοποίησης, που είναι η **επανασύνδεση μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ή συμπληρωματικών DNA-RNA**.
- Η **υβριδοποίηση** είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα του DNA που μας δίνει τη δυνατότητα, αν διαθέτουμε ένα γνωστό μόριο DNA, να το χρησιμοποιήσουμε ως **ανιχνευτή** για τον εντοπισμό του συμπληρωματικού του, όταν αυτό βρίσκεται μαζί με χιλιάδες άλλα κομμάτια.

4.15 Τι περιέχει μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη;

- Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη*¹ περιέχει ένα **τεράστιο αριθμό από κλωνοποιημένα κομμάτια** χρωμοσωμικού DNA, τα οποία έχουν παραχθεί με δράση κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης.
→ Ορισμένα από τα κομμάτια αυτά περιέχουν **ολόκληρα γονίδια**,
→ άλλα περιέχουν **κομμάτια γονιδίων** και
→ άλλα περιέχουν **τμήματα DNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες**.

4.16 Πώς μπορούμε να εντοπίσουμε, μέσα από όλα τα κομμάτια μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, αυτό που θέλουμε να μελετήσουμε; ΠΕ '10

- Η τεχνική που συνήθως χρησιμοποιείται περιλαμβάνει τη **χρήση ιχνηθετημένων ανιχνευτών** μορίων DNA ή RNA που **περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές** προς το κλωνοποιημένο DNA.
- Οι ανιχνευτές **αναμιγνύονται με το DNA*² της βιβλιοθήκης** (το οποίο έχει προηγουμένως **αποδιαταχθεί**) και **υβριδοποιούν*³ μόνο το συμπληρωματικό τους DNA**.
→ Η διαδικασία της υβριδοποίησης ακολουθείται και για την απομόνωση ενός συγκεκριμένου γονιδίου από μια cDNA βιβλιοθήκη.



- *1 Περιέχει το σύνολο των βακτηριακών κλώνων, που περιέχουν το συνολικό DNA του οργανισμού δότη.
 *2 Αναμιγνύονται με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια κάθε κλώνου.
 *3 Συνδέονται συμπληρωματικά.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA

4.17 Τι ακολουθεί μετά την απομόνωση του κλώνου που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο και γιατί είναι απαραίτητη η παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός γονιδίου;

- Η κατασκευή βιβλιοθηκών μας δίνει τη δυνατότητα να απομονώσουμε το βακτηριακό κλώνο που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο.
- Στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια του κλώνου και δημιουργούνται **πολλά αντίγραφα** του γονιδίου που περιέχει.
 → Η δημιουργία πολλών αντιγράφων είναι απαραίτητη προϋπόθεση:
 - ✓ τόσο για τη **μελέτη** του συγκεκριμένου **γονιδίου**,
 - ✓ όσο και για την **παραγωγή** της **πρωτεΐνης** που αυτό κωδικοποιεί.

4.18 Τι μας επιτρέπει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ποιες πρακτικές εφαρμογές έχει;

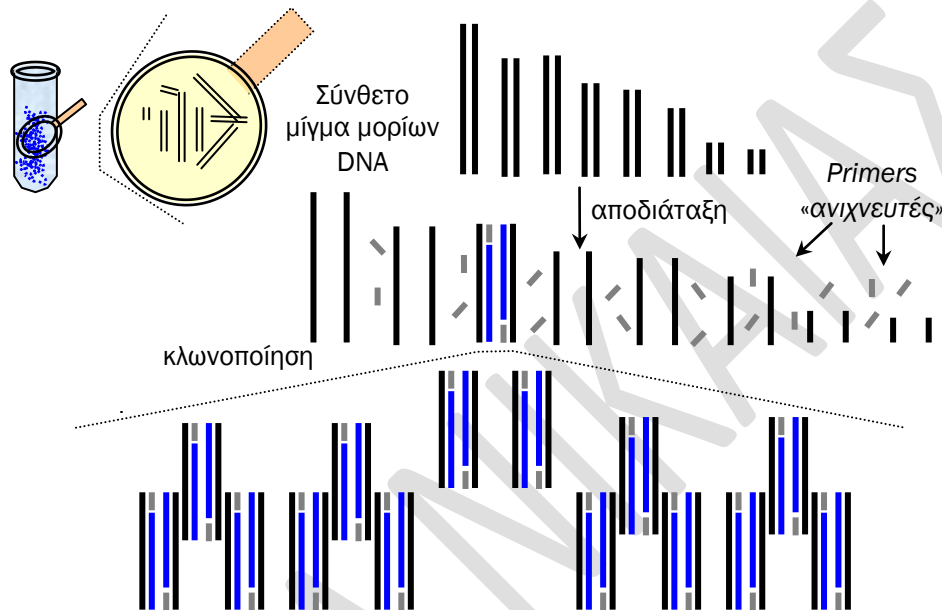
ΠΕ '07

- Η PCR μας επιτρέπει την **επιλεκτική***¹ **αντιγραφή**, εκατομμύρια φορές, ειδικών αλληλουχιών DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA*², χωρίς τη **μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου***³.
- Η τεχνική αυτή άρχισε να εφαρμόζεται ευρέως από το 1985 και έχει **αυξήσει την ευαισθησία** των γενετικών αναλύσεων και έχει πολλές πρακτικές εφαρμογές. Π.χ. για τη:
 - **διάγνωση ασθενειών**, όπως του AIDS, στην Ιατρική,
 - διαλεύκανση υποθέσεων, στην **εγκληματολογία**,
 - **μελέτη DNA** από **απολιθώματα**.

*1 Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικά τμήματα DNA-«ανιχνευτές» (primers), συμπληρωματικά προς τα 3' άκρα των επιθυμητών μορίων DNA, που θα λειτουργήσουν ως πρωταρχικά τμήματα, για την εκκίνηση της αντιγραφής επιλεκτικά.

*2 π.χ. από ολικό DNA.

*3 π.χ. βακτηρίων.



• Στην τεχνική PCR χρησιμοποιούνται:

- θερμότητα για την αποδιάταξη των δίκλωνων DNA από το σύνθετο μείγμα μορίων,
- ειδικά τμήματα DNA-«ανιχνευτές» (primers), που λειτουργούν ως πρωταρχικά τμήματα,
- ειδική DNA πολυμεράση (Taq pol), που δεν μετουσιώνεται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες.

ΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΕΙΣ – ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΕΙΣ & ΘΕΜΑΤΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ – ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ

4.19 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα από τη χρήση των πλασμιδίων και των φάγων (ιών), ως φορέων κλωνοποίησης, στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA:

Κριτήριο	Πλασμίδια	Φάγοι (ιοί)
Μέγεθος τμημάτων ξένου DNA που ενσωματώνονται	Συνήθως για οργανισμούς με μικρό γονιδίωμα	Μεγαλύτερα τμήματα ξένου DNA (αλλά και μικρότερα)
Πολλαπλασιάζονται	Ανεξάρτητα	Ανεξάρτητα
Ικανότητα μετασχηματισμού	- Βακτήρια - Φυτά (Τι πλασμίδιο)	Θεωρητικά, με τον κατάλληλο ιό, οποιοδήποτε κύτταρο
Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	Διαθέτουν → Βοηθά στην επιλογή των κυττάρων ξενιστών	Δεν διαθέτουν αντίστοιχα γονίδια → Εισάγουν το DNA τους με μέσα που διαθέτουν
Τρόπος εισόδου στον ξενιστή	Απαιτείται προεργασία για την αύξηση της διαπερατότητας των τοιχωμάτων των βακτηρίων	Δεν απαιτείται ανάλογη διαδικασία. Διαθέτουν δικούς τους μηχανισμούς
Παρενέργειες από τη χρήση τους	Όγκους σε φυτά (Τι πλασμίδιο)	Συχνά προκαλούν παρενέργειες στους ξενιστές
Η «τύχη» τους μέσα στον ξενιστή	«Φιλική» παρουσία στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου ξενιστή - Ενσωμάτωση στο γενετικό υλικό του φυτικού κυττάρου ξενιστή (Τι πλασμίδιο)	Συχνά «θύματα» των περιοριστικών ενδονουκλεασών όταν «μολύνουν» βακτήρια

4.20 ☼ Διευκρίνιση-επισήμανση: Η διαφορά μεταξύ του κλώνου και της αποικίας.

- Ο όρος **κλώνος** αναφέρεται σε μια **ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών**. Μια **αποικία** είναι ένα **σύνολο μικροοργανισμών**, που έχει προέλθει από διαδοχικές διαιρέσεις ενός κυττάρου, όταν αυτό αναπτύσσεται σε **στερεό** θρεπτικό υλικό.
- Όπως προκύπτει από τους δύο ορισμούς, η έννοια του **κλώνου** είναι **ευρύτερη**, αφού αναφέρεται σε μόρια, κύτταρα ή οργανισμούς, ενώ η αποικία μόνο σε κύτταρα, όταν αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υλικό.
- Η έννοια της **αποικίας** είναι ταυτόσημη με το **βακτηριακό κλώνο**.

4.21 ☼ Διευκρίνιση-επισήμανση: Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένα μόριο DNA, για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης:

- Να μπορεί να **αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα** μέσα σε ένα κύτταρο – ξενιστή.
→ Προφανώς, να διαθέτει μία λειτουργική θέση έναρξης της αντιγραφής.
- Να φέρει γονίδια, με τα οποία να μπορεί να γίνει η **επιλογή** των κυττάρων – ξενιστών που θα το προσλάβουν, π.χ.:
→ γονίδια **ανθεκτικότητας** σε αντιβιοτικά ή
→ γονίδια που δημιουργούν **χρώμα** στις αποικίες.
- Να φέρει την αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση **μία μόνο φορά**.
→ Αυτό απαιτείται **μόνο για το πλασμίδιο** και όχι για το DNA των φάγων.

4.22 ☼* Διευκρίνιση-επισήμανση: Δύο διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι ενός ανθρώπου έχουν όμοιες ή διαφορετικές γονιδιωματικές βιβλιοθήκες;

- Γονιδιωματική βιβλιοθήκη ονομάζεται ένα **σύνολο βακτηριακών κλώνων**, όπου:
→ ο κάθε κλώνος περιέχει έναν **ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης** με διαφορετικό τμήμα DNA ενός οργανισμού και
→ το σύνολο των κλώνων περιέχει το **συνολικό DNA του οργανισμού** αυτού.
- Όλοι οι **διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι** του ίδιου οργανισμού περιέχουν το ίδιο DNA. Κατά συνέπεια, όλα τα σωματικά κύτταρα ενός οργανισμού έχουν την **ίδια γονιδιωματική βιβλιοθήκη**.

4.23 ☼* Διευκρίνιση-επισήμανση: Δύο διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι ενός ανθρώπου έχουν όμοιες ή διαφορετικές cDNA βιβλιοθήκες;

- Σε κάθε ομάδα κυττάρων ενός πολυκύτταρου οργανισμού εκφράζονται κυρίως **διαφορετικά γονίδια**, λόγω κυτταρικής διαφοροποίησης.
→ Π.χ., στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα, για παράδειγμα, εκφράζονται κυρίως τα γονίδια των αιμοσφαιρινών, ενώ στα Β-λεμφοκύτταρα τα γονίδια των αντισωμάτων.
- Έτσι, δύο **διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι** του ανθρώπου θα περιέχουν στο κυτταρόπλασμά τους κυρίως **διαφορετικά μόρια mRNA**.
- Η cDNA βιβλιοθήκη περιέχει αντίγραφα των ώριμων mRNA όλων των γονιδίων, που **εκφράζονται** σε ένα κυτταρικό τύπο.
→ Κατά συνέπεια, αφού οι δύο διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι παράγουν κυρίως διαφορετικά μόρια mRNA, έχουν και **διαφορετικές cDNA βιβλιοθήκες**.

4.24 Διευκρίνιση-επισήμανση: Ο υποκινητής του γονιδίου, μιας από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες των αιμοσφαιρινών, υπάρχει στη cDNA βιβλιοθήκη των πρόδρομων ερυθροκυττάρων;

- Στα **πρόδρομα ερυθροκύτταρα**, για παράδειγμα, εκφράζονται κυρίως τα γονίδια των **αιμοσφαιρινών**. Ο υποκινητής είναι η περιοχή που προσδένεται η RNA πολυμεράση, για να αρχίσει τη μεταγραφή και βρίσκεται **πριν** την αρχή κάθε γονιδίου. Επομένως, ο υποκινητής **δεν μεταγράφεται** και δεν υπάρχει αντίγραφό του στο mRNA που προκύπτει.
- Μια cDNA βιβλιοθήκη περιέχει μόνο αντίγραφα των **ώριμων mRNA** όλων των γονιδίων, που εκφράζονται σε ένα κυτταρικό τύπο.
→ Κατά συνέπεια, ο υποκινητής μιας από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες των αιμοσφαιρινών **δεν υπάρχει** στη cDNA βιβλιοθήκη των πρόδρομων ερυθροκυττάρων, παρά το γεγονός ότι τα γονίδια των αιμοσφαιρινών εκφράζονται στα κύτταρα αυτά.

4.25 ☼* Απομόνωση κλωνοποιημένου DNA (π.χ. γονίδιο A) από βιβλιοθήκη (εκτός ύλης)

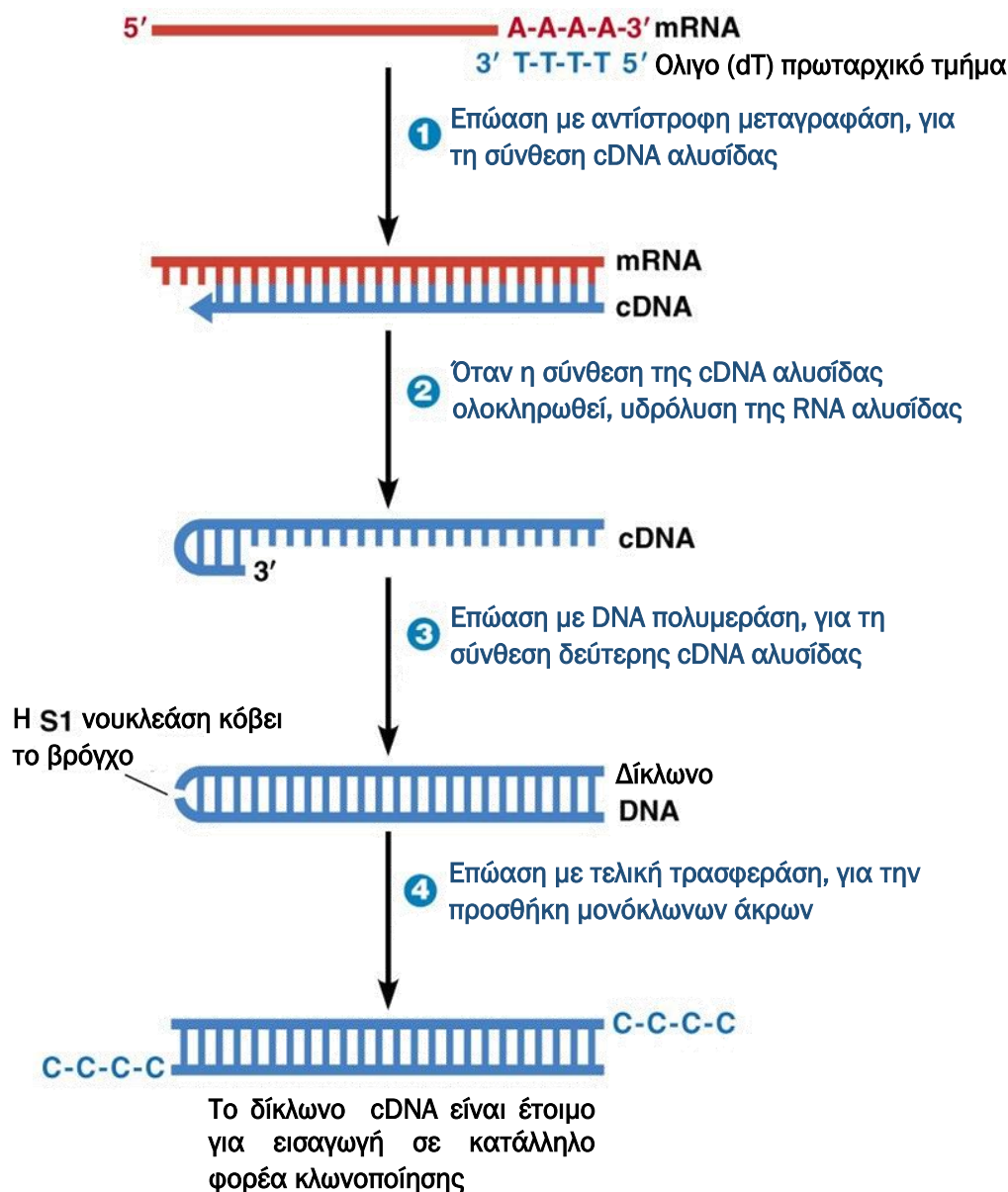
- **Πολλαπλασιασμός του επιθυμητού κλώνου σε υγρή καλλιέργεια.**
Αφού εντοπιστεί ο επιθυμητός κλώνος, μεταφέρεται σε υγρή καλλιέργεια όπου και πολλαπλασιάζεται. Δημιουργούνται έτσι χιλιάδες βακτήρια με το ίδιο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
- **Λύση των βακτηρίων και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.**
Προκαλούμε λύση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, οπότε το περιεχόμενο των βακτηρίων (κύριο DNA, πλασμίδια, ριβοσώματα, ένζυμα, άλλα μόρια) απελευθερώνεται μέσα στο υγρό. Με κατάλληλες τεχνικές (π.χ. φυγοκέντρηση) μπορούμε να απομονώσουμε σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα μόνο τα πλασμίδιά τους, τα οποία φυσικά θα περιέχουν όλα το ίδιο γονίδιο A.
- **Προσθήκη περιοριστικής ενδονουκλεάσης.**
Χρησιμοποιούμε την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιήσαμε κατά την κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA στο 1ο στάδιο κατασκευής της βιβλιοθήκης. Η

περιοριστική ενδονουκλεάση θα κόψει τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια στις δύο θέσεις αναγνώρισης που περιέχουν και έτσι θα αποσυνδεθεί το πλασμίδιο από το θραύσμα που περιείχε, δηλαδή το γονίδιο A. Και τα δύο όμως θα βρίσκονται στο ίδιο δοχείο.

- **Απομόνωση επιθυμητού γονιδίου.**

Με κατάλληλες τεχνικές (π.χ. φυγοκέντρηση) μπορούμε να διαχωρίσουμε τα πλασμίδια από τα γονίδια A. Έτσι, στο τέλος έχουμε απομονώσει το επιθυμητό γονίδιο A σε χιλιάδες αντίγραφα. Δηλαδή έχουμε επιτύχει κλωνοποίηση του γονιδίου A.

4.26 Μετατροπή ώριμου mRNA σε δίκλωνο cDNA, κατά το πρώτο στάδιο κατασκευής μιας cDNA βιβλιοθήκης.



4.27 Σύγκριση γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης.

Κριτήριο	Γονιδιωματική	cDNA
Είδος νουκλεϊκού οξέος που απομονώνεται	• Ολικό DNA δότη	• Ολικό ώριμο mRNA, από κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο
Χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης	• Όχι	• Ναι
Χρήση DNA πολυμεράσης	• Όχι	• Ναι
Χρήση DNA δεσμάσης	• Ναι	• Ναι
Χρήση περιοριστικής ενδονουκλεάσης	• Στο ολικό DNA • Στο φορέα κλωνοποίησης	• Στο φορέα κλωνοποίησης • Στα δίκλωνα DNA μετά την ενσωμάτωση άκρων που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα
Περιέχει	• Ασυνεχή γονίδια • Υποκινητές • Αλληλουχίες λήξης μεταγραφής • Μη μεταγραφόμενες περιοχές	• Συνεχή γονίδια (χωρίς εσώνια) • Υποκινητές και αλληλουχίες λήξης μεταγραφής ενσωματώνουμε πριν τον ανασυνδυασμό
Πληροφορίες που περιέχει	• Όλο το γονιδίωμα	• Μόνο τα mRNA των γονιδίων που εκφράζονται σε αυτό το κύτταρο
Χρήση	• Μελέτη γονιδίων • Παραγωγή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης ή Π-Π αλυσίδας	

4.28 🌟 Ποιες περιπτώσεις οργανισμών ή κυττάρων γνωρίζετε, που έχουν υποστεί τροποποίηση του γενετικού τους υλικού με τις τεχνικές της Γενετικής Μηχανικής;

- Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA έδωσε στον άνθρωπο την ικανότητα όχι μόνο να **ερευνά**, αλλά να **επεμβαίνει** και να **τροποποιεί** το γενετικό υλικό των οργανισμών. Τέτοιες περιπτώσεις τροποποίησης είναι:
 - **Βακτήρια** – ξενιστές που αποτελούν μια **γονιδιωματική ή cDNA βιβλιοθήκη**.
 - **Φάγοι**, όταν το DNA τους χρησιμοποιείται ως **φορέας κλωνοποίησης** στην κατασκευή γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης.
 - **Βακτήρια** που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή **φαρμακευτικών πρωτεϊνών** (8ο κεφάλαιο).
 - Κύτταρα – **υβριδώματα** (8ο κεφάλαιο).
 - **Ιοί** που χρησιμοποιούνται ως φορείς στη **γονιδιακή θεραπεία** (8ο κεφάλαιο).
 - **Σωματικά ανθρώπινα κύτταρα** μετά από **γονιδιακή θεραπεία** (8ο κεφάλαιο).
 - **Γενετικά τροποποιημένα φυτά** (9ο κεφάλαιο).
 - **Γενετικά τροποποιημένα ζώα** (9ο κεφάλαιο).

