**Κεφάλαιο 4**

**Η Τεχνολογία του**

**Ανασυνδυασμένου DNA**

Γενετική Μηχανική

* Οι ανακάλυψη της δομής του DNA και η απομόνωση πολυάριθμων ενζύμων έχουν κάνει δυνατή όχι μόνο τη έρευνα αλλά και τροποποίηση του γενετικού υλικού.
* Αντιγραφή, μεταγραφή, αντίστροφη μεταγραφή και μετάφραση μπορούν να αναπαραχθούν *in vitro*
* Οι τεχνικές επέμβασης στο γενετικό υλικό αποτελούν τη **Γενετική Μηχανική**.
* Η γενετική μηχανική βοηθά:
* Την κατανόηση του φαινομένου της ζωής.
* Τη βελτίωση της ποιότητας της ζωής, χάρη στις εφαρμογές   
  της στην **ιατρική**, **γεωργία** και **κτηνοτροφία**

Τεχνολογία Ανασυνδυασμένου DNA

* «**Ανασυνδυασμένο**» ονομάζεται ένα μόριο DNA που περιέχει γονίδια από δύο ή περισσότερους οργανισμούς.
* Το ανασυνδυασμένο μόριο DNA μπορεί να εισαχθεί σε ένα βακτηριακό ή ευκαρυωτικό κύτταρο που ονομάζεται «**γενετικά τροποποιημένο**»
* Το γενετικά τροποποιημένο κύτταρο μπορεί να επιβιώσει και να αναπαραχθεί.
* Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA περιλαμβάνει τις τεχνικές μεταφοράς γενετικού υλικού από ένα οργανισμό σε άλλο

Η τεχνολογία αυτή βασίζεται σε 2 ανακαλύψεις:

* Τις «**περιοριστικές ενδονουκλεάσες**»
* Είναι ένζυμα που κόβουν το DNA σε συγκεκριμένα σημεία
* Αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες δίκλωνου DNA μήκους 4-8 ζ.β.
* Παράγονται από βακτήρια για προστασία από εισβολή ξένου DNA
* Τους ειδικούς «**φορείς κλωνοποίησης**»
* Μεταφέρουν το DNA από κύτταρο σε κύτταρο
* Μπορούν να αυτοδιπλασιάζονται ανεξάρτητα από τα κύτταρα-ξενιστές
* Είναι συνήθως πλασμίδια ή DNA φάγων:
* Τα πλασμίδια είναι συνηθέστερα γιατί απλούστερα στη χρήση,   
  αλλά μπορούν να ενσωματώσουν μόνο μικρά κομμάτια DNA
* Οι φάγοι μπορούν να ενσωματώσουν μεγαλύτερα κομμάτια DNA

Διαδικασία Ανασυνδυασμού DNA

* Κόψιμο γενετικού υλικού δότη οργανισμού από περιοριστικές ενδονουκλεάσες
* Ένωση κάθε τμήματος με φορέα κλωνοποίησης για δημιουργία του ανασυνδυασμένου DNA
* Εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA στα κύτταρα-ξενιστές
* Στην περίπτωση βακτηρίων, αυτό ονομάζεται ***μετασχηματισμός***
* Επιλογή και απομόνωση κυττάρων ξενιστών
* Διαχωρισμός κυττάρων που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς από αυτά που δεν πήραν ανασυνδυασμένο DNA
* Επιλογή και καλλιέργεια κλώνου ξενιστή που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA
* Με τη βοήθεια ειδικών μορίων ανιχνευτών

Λεξιλόγιο

* ***Κλώνος***:   
  ομάδα πανομοιότυπων μορίων/κυττάρων/οργανισμών
* ***Κλωνοποίηση***:  
  Διαδικασία δημιουργίας (μεγάλου αριθμού) κλώνων
* π.χ. η ανάπτυξη αποικίας από ένα βακτήριο με πολλαπλές κυτταρικές διαιρέσεις (αυτοδιπλασιασμός)
* ***Γονιδιωματική Βιβλιοθήκη***:  
  Το σύνολο των (βακτηριακών) κλώνων που περιέχει όλο το DNA ενός οργανισμού δότη

**Κατασκευή Βιβλιοθηκών**

**I. Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες**

Παράδειγμα 1: Φορέας Πλασμίδιο [εικ. 4.1]

*Ο συνηθέστερος φορέας κλωνοποίησης για κατασκευή   
γονιδιωματικών βιβλιοθηκών μικρών γονιδιωμάτων.*

1. Κόψιμο ολικού DNA δότη:

* Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI (από E. coli) κόβει την αλληλουχία: 5’-GAATTC-3’  
   3’-CTTAAG-5’
* Τα μονόκλωνα άκρα που σχηματίζονται μπορούν να κολλήσουν με δεσμούς-H με τα άκρα άλλων κομματιών κομμένων με το ίδιο ένζυμο
* Το γονιδίωμα του δότη κόβεται σε χιλιάδες κομμάτια από την EcoRI, καθώς η αλληλουχία GAATTC υπάρχει διάσπαρτη σε πολλά σημεία στο DNA κάθε οργανισμού
* Το κάθε πλασμίδιο κόβεται μόνο σε ένα σημείο δίνοντας   
  ένα γραμμικό μόριο DNA με μικρά μονόκλωνα άκρα

1. Ενσωμάτωση στο φορέα

* Χρήση πλασμιδίου που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό, π.χ. αμπικιλίνη
* Ανάμιξη τμημάτων DNA δότη και πλασμιδίων κομμένων με EcoRI
* Κόλλημα μονόκλωνων άκρων λόγω συμπληρωματικότητας για σχηματισμό κυκλικών πλασμιδίων άδειων ή ανασυνδυασμένων (με ενσωματωμένο τμήμα DNA δότη)
* Ένωση αλυσίδων με DNA δεσμάση

1. Μετασχηματισμός βακτηρίων

* Χρήση βακτηρίων χωρίς πλασμίδια, ευαίσθητων σε αντιβιοτικά
* Κατάλληλη κατεργασία κάνει τα τοιχώματα των   
  βακτηρίων προσωρινά διαπερατά σε μακρομόρια

1. Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων

* Τα βακτήρια καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει το αντίστοιχο αντιβιοτικό (π.χ. αμπικιλίνη)
* Μόνο τα βακτήρια που έλαβαν πλασμίδιο με το γονίδιο ανθεκτικότητας μπορούν και επιβιώνουν.
* Κάθε μετασχηματισμένο βακτήριο πολλαπλασιάζεται και δίνει ένα κλώνο (**αποικία**)

1. Επιλογή κλώνου που φέρει συγκεκριμένο γονίδιο

* Γίνεται με υβριδοποίηση με ειδικά ιχνηθετημένα ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές

Παράδειγμα 2: Φορέας Φάγος [εικ. 4.4]

*Χρήση βακτηριοφάγου λ για μεγάλα γονιδιώματα*

1α. Απομόνωση πυρηνικού DNA δότη και κόψιμο με περιοριστική ενδονουκλεάση

1β. Απομόνωση DNA φάγου και κόψιμο μα την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση

2α. Ανάμιξη DNA δότη και φάγου για δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA

2β. Προσθήκη πρωτεϊνών φάγου οδηγεί στο πακετάρισμα του ανασυνδυασμένου DNA σε νέους φάγους

3α. Προσθήκη φάγων σε καλλιέργεια βακτηρίων οδηγεί σε μόλυνση των βακτηρίων

3β. Μετασχηματισμός με έγχυση του ανασυνδυασμένου DNA στα «μολυσμένα» βακτήρια

**II. cDNA Βιβλιοθήκες**

Κλωνοποίηση του mRNA

* Μία cDNA βιβλιοθήκη περιέχει αντίγραφα όλων των ώριμων mRNA που μεταγράφονται σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο
* Πλεονεκτήματα:
* Μικρότερο μέγεθος βιβλιοθήκης
* Ευκολότερη αναζήτηση συγκεκριμένου γονιδίου
* Ευκολότερη διατήρηση βιβλιοθήκης
* Τα εσώνια δεν συμπεριλαμβάνονται
* Υπάρχει δυνατότητα σύνθεσης των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών από τα κύτταρα-ξενιστές

Κλωνοποίηση Συγκεκριμένου Γονιδίου

1. Απομόνωση ολικού ώριμου mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο
2. Σύνθεση με το ένζυμο *αντίστροφη μεταγραφάση* και καλούπι το mRNA μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (**c**omplimentary**DNA**), με αποτέλεσμα τη δημιουργία υβριδικού δίκλωνου μορίου mRNA-cDNA
3. Διαχωρισμός των δύο αλυσίδων με θέρμανση ή χημική καταστροφή του mRNA
4. Δημιουργία δίκλωνου DNA από το cDNA με το ένζυμο DNA πολυμεράση
5. Εισαγωγή του δίκλωνου DNA σε πλασμίδιο η βακτηριοφάγο και κλωνοποίηση (όπως παραπάνω)

**III. Ανίχνευση Γονιδίων**

Το Πρόβλημα

* Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιλαμβάνει ένα τεράστιο αριθμό διαφορετικών κομματιών DNA, που μπορεί να περιέχουν:
* Ολόκληρα γονίδια
* Τμήματα γονιδίων ή
* Μη κωδικές αλληλουχίες
* Μια cDNA βιβλιοθήκη, αν και μικρότερη, μπορεί να περιλαμβάνει αντίγραφα των mRNA χιλιάδων γονιδίων
* Προκειμένου να μελετηθεί ένα γονίδιο, πρέπει να εντοπιστεί μέσα σε μια βιβλιοθήκη ο κλώνος που το περιέχει, να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί.

Αποδιάταξη και Υβριδοποίηση

* Αύξηση της θερμοκρασίας ή προσθήκη χημικών ουσιών μπορεί να οδηγήσει στο σπάσιμο των δεσμών-H μεταξύ των δύο αλυσίδων του δίκλωνου DNA και διαχωρισμό τους. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «**αποδιάταξη**» του DNA.
* Υπό κατάλληλες συνθήκες (μείωση της θερμοκρασίας), δύο συμπληρωματικές μονόκλωνες αλυσίδες DNA ή RNA/DNA μπορούν να (επανα)συνδεθούν. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «**υβριδοποίηση**».
* Η διαδικασία της αποδιάταξης και ακόλουθης υβριδοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων στο DNA μιας βιβλιοθήκης με προσθήκη μικρών ιχνηθετημένων μορίων DNA ή RNA που έχουν κατασκευαστεί να έχουν αλληλουχία συμπληρωματική μιας χαρακτηριστικής αλληλουχίας του γονιδίου στόχου.

**PCR - Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης**

Η Ανάγκη Πολλών Αντίγραφων

* Η μελέτη ενός γονιδίου απαιτεί μεγάλο αριθμό αντιγράφων.
* Ακόμη και οι συγχρονότερες μέθοδοι χημικής ανάλυσης απαιτούν μια ελάχιστη *συγκέντρωση* ενός μορίου για να δουλέψουν, και όχι μόνο *1* μόριο που με δυσκολία ανιχνεύεται στο ηλ. μικροσκόπιο.
* Η παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί ένα γονίδιο σε χρήσιμες ποσότητες απαιτεί ακόμα μεγαλύτερους αριθμούς αντιγράφων.
* Παραδοσιακά τα απαιτούμενα αντίγραφα παράγονται με τη διαδικασία της κλωνοποίησης (εισαγωγή του γονιδίου σε κύτταρο-ξενιστή και πολλαπλασιασμός του ξενιστή σε καλλιέργεια)
* Από το 1985, η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει τον ταχύτατο επιλεκτικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA εκατομμύρια   
  φορές χωρίς τη χρήση ζωντανών οργανισμών-ξενιστών:

Τα Πλεονεκτήματα της PCR

* Υψηλή ταχύτητα σε σχέση με την ταχύτητα αναπαραγωγής οποιουδήποτε ζωντανού ξενιστή
* Απλούστευση και δυνατότητα αυτοματισμού της διαδικασίας.
* Δεν απαιτείται απομόνωση του DNA-στόχου και παράγεται ουσιαστικά καθαρό DNA
* Τεράστιος αριθμός αντιγράφων ακόμη και από ένα αρχικό μόριο έχει αυξήσει την ευαισθησία των γενετικών αναλύσεων με πρακτικές εφαρμογές:
* Στην ιατρική, π.χ. διάγνωση ασθενειών όπως το AIDS
* Στην εγκληματολογία για ταυτοποίηση υπόπτων
* Στην παλαιοντολογία για μελέτη DNA απολιθωμάτων
* κ.λπ.