

4.1 Στοιχεία θεωρίας

► Ορισμοί:

Κλώνος: Η ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών.

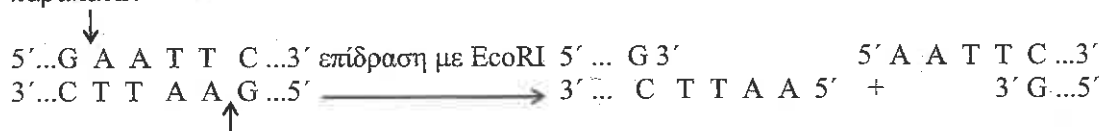
Κλωνοποίηση: Η κατασκευή (κατά προτίμηση μεγάλου αριθμού) πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών

Γενετική Μηχανική: Ο κλάδος της Βιολογίας που χρησιμοποιεί τις κατάλληλες τεχνικές και τη μεθοδολογία, που επιτρέπει επεμβάσεις και τροποποιήσεις στο γενετικό υλικό.

Ανασυνδεδασμένο DNA: Τεχνητό μόριο DNA που περιέχει γονίδια (ή - γενικότερα - τμήματα DNA) από δύο ή περισσότερους οργανισμούς (συνήθως διαφορετικού είδους).

Τεχνολογία ανασυνδεδασμένου DNA: περιλαμβάνει μία σειρά τεχνικών που οδηγεί στη μεταφορά γενετικού υλικού από έναν οργανισμό (ή και περισσότερους) σε έναν άλλον, και έχει ως αποτέλεσμα τη γενετική τους τροποποίηση. Τα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια ή τα γενετικά τροποποιημένα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ικανά να ζουν και να αναπαράγονται, μεταβιβάζοντας τις νέες τους ιδιότητες στους απογόνους τους.

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες: Ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες **δίκλωνου** DNA (μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων ανά αλυσίδα) και υδρολύουν συγκεκριμένους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στο εσωτερικό αυτών των αλληλουχιών. Υδρολύεται ένας φωσφοδιεστερικός δεσμός ανά αλυσίδα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν τμήματα δίκλωνου DNA που έχουν μονόκλινα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις (κολλώδη άκρα). Η επίδραση της EcoRI, μίας ευρέως χρησιμοποιούμενης περιοριστικής ενδονουκλεάσης, φαίνεται παρακάτω:



/ Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες απομονώθηκαν από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η διάσπαση αλληλουχιών ξένου DNA που εισβάλλει σε αυτά, πχ DNA φάγου. Αν η περιοριστική ενδονουκλεάση υδρολύσει την αλληλουχία μέσα σε ένα γονίδιο του φάγου, αυτό δε θα μπορεί να εκφραστεί. Αυτό συμβαίνει εάν το DNA του φάγου περιέχει την αλληλουχία αναγνώρισης. Μερικοί φάγοι επομένως δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε συγκεκριμένα βακτήρια, ανάλογα με την αλληλουχία του DNA του φάγου και ανάλογα με το ποια ή ποιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες περιέχει το βακτήριο.

/ Στην τεχνολογία του ανασυνδεδασμένου DNA οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιούνται, για να τεμαχίσουν το γενετικό υλικό κάποιου οργανισμού που επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε, με την προϋπόθεση, φυσικά, ότι περιέχει την αλληλουχία αναγνώρισης. Το DNA με την επίδραση των περιοριστικών ενδονουκλεασών κόβεται σε «θραύσματα», καθένα από τα οποία θα έχει μονόκλινα άκρα (πχ, αν χρησιμοποιηθεί η EcoRI, τα άκρα θα είναι 5' AATT 3' και 3' TTAA 5', όπως φαίνεται και παραπάνω).

Οργανισμός δότης: ο οργανισμός από τον οποίο χρησιμοποιούμε κύτταρα, προκειμένου να απομονώσουμε γενετικό υλικό (ή το συνολικό ώριμο mRNA συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου), για να κλωνοποιηθεί και - αν χρειάζεται - να εκφραστεί μέσα σε κύτταρα του ξενιστή.

Φορέας κλωνοποίησης: Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ένα μόριο DNA (όπως πλασμίδιο, DNA φάγου, DNA ιού), που μπορεί να αναπαράγεται στα κύτταρα του ξενιστή και χρησιμοποιείται για να μεταφερθεί ένα θραύσμα DNA που προέρχεται από οργανισμό δότη μέσα σε ένα κύτταρο ξενιστή. Μέσα στο κύτταρο του ξενιστή θα πολλαπλασιαστεί, χρησιμοποιώντας τα υλικά και τους μηχανισμούς του κυττάρου ξενιστή. Επίσης, αν στο φορέα κλωνοποίησης έχει εισαχθεί γονίδιο, θα πρέπει να εκφραστεί μέσα στο κύτταρο του ξενιστή.

Όταν τα κύτταρα ξενιστές είναι βακτήρια, τότε ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιούνται είτε τα **πλασμίδια** είτε το DNA φάγων όπως, πχ, του **φάγου λ**. Στα φυτικά ευκαρυωτικά κύτταρα, ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιείται συγκεκριμένο πλασμίδιο (πλασμίδιο Ti).

► **Τα βήματα δημιουργίας του ανασυνδεδασμένου DNA, όταν χρησιμοποιείται για την κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης:**

1. Αρχικά απομονώνεται το γονιδίωμα του οργανισμού δότη (πχ. ανθρώπου) από κύτταρά του και υδρολύεται με EcoRI. Προκύπτουν χιλιάδες θραύσματα (γιατί το ανθρώπινο DNA περιέχει χιλιάδες φορές την αλληλουχία αναγνώρισης) με μονόκλωνα άκρα 5' AATT 3' και 3' TTAA 5' στο καθένα από αυτά.

2. Υδρολύονται με το ίδιο ένζυμο πλασμίδια που περιέχουν επίσης την αλληλουχία αναγνώρισης. Κάθε πλασμίδιο πρέπει να έχει μόνο μία φορά την αλληλουχία αναγνώρισης, γιατί αν κοπεί σε πολλά κομμάτια, η επανασύνδεσή τους σε ενιαίο πλασμίδιο είναι σχεδόν αδύνατη. Με τη μία αλληλουχία που διαθέτουν, τα πλασμίδια γίνονται από κυκλικά, γραμμικά. Χρησιμοποιείται η ίδια αλληλουχία και το ίδιο ένζυμο, έτσι ώστε τα γραμμικά πλασμίδια που προκύπτουν, να έχουν συμπληρωματικά άκρα με τα ανθρώπινα θραύσματα, ώστε να μπορούν αυτά να ενωθούν μεταξύ τους.

3. Αναμιγνύονται τα θραύσματα και τα πλασμίδια, και ενώνονται με 16 δεσμούς υδρογόνου εξαιτίας της συμπληρωματικότητας των άκρων τους. Το ένζυμο DNA δεσμάση που χρησιμοποιούμε στο μείγμα, ενώνει τα δύο μόρια ομοιοπολικά με τέσσερις, συγκεκριμένα, φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.

/ Το μόριο DNA που παράγεται από την συνένωση ενός φορέα κλωνοποίησης και ενός θραύσματος ονομάζεται ανασυνδεδασμένο μόριο DNA.

► **Κύτταρα ξενιστές:** Λέγονται τα κύτταρα μέσα στα οποία εισάγεται και μπορεί να εκφραστεί το ανασυνδεδασμένο DNA. Τα κύτταρα αυτά αποκτούν νέες ιδιότητες και χαρακτηριστικά που μπορούν να διαιωνίσουν στα θυγατρικά τους κύτταρα. Αρχικά τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βακτηριακά. Σήμερα χρησιμοποιούνται και ευκαρυωτικά κύτταρα (ζωικά, φυτικά, ανθρώπινα).

► **Ο μετασχηματισμός:** Εισαγωγή DNA σε βακτήριο (είτε in vivo είτε in vitro).

Στη συνέχεια θα πρέπει τα ανασυνδεδασμένα μόρια να εισαχθούν στο κύτταρο του ξενιστή. Αν έχουμε χρησιμοποιήσει πλασμίδιο ως φορέα κλωνοποίησης, εννοείται ότι το ανασυνδεδασμένο DNA προορίζεται να μπει σε βακτήριο. Η εισαγωγή του ανασυνδεδασμένου DNA δε γίνεται εύκολα: Με ειδική κατεργασία το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου καθίσταται παροδικά διαπερατό σε μακρομόρια. Η τεχνική έχει μικρά ποσοστά επιτυχίας. Το ανασυνδεδασμένο DNA έχει κατασκευαστεί in vitro και θέλουμε να εισέλθει στο βακτήριο. Λίγα βακτήρια δέχονται το ανασυνδεδασμένο DNA, και αυτά είναι μετασχηματισμένα. Επίσης, μετασχηματισμένα είναι και τα βακτήρια που δέχονται μη ανασυνδεδασμένο πλασμίδιο. Τέλος, πολλά βακτήρια δε μετασχηματίζονται καθόλου.

► **Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων από τα μη μετασχηματισμένα:**

Τα πλασμίδια περιέχουν γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Έτσι, αν κάποιο βακτήριο μετασχηματιστεί, θα αποκτήσει ανθεκτικότητα στο αντίστοιχο αντιβιοτικό

(πχ αμπικιλίνη). Αν όχι, θα είναι ευαίσθητο στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, αρκεί να μην περιείχε το βακτήριο από πριν δικό του πλασμίδιο με γονίδιο ανθεκτικότητας σε αυτό το αντιβιοτικό. Παρουσία αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των βακτηρίων, θα επιβιώσουν μόνο τα μετασχηματισμένα βακτήρια.

► **Η ανάπτυξη των βακτηριακών κλώνων: Η δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.**

Τα βακτήρια που έχουν επιβιώσει καλλιεργούνται και αναπτύσσουν το καθένα μία αποικία – κλώνο. Κάθε κλώνος έχει προέλθει από ένα μετασχηματισμένο βακτήριο, που περιέχει ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με ένα συγκεκριμένο θραύσμα DNA δότη. Το θραύσμα είναι ίδιο για όλα τα βακτήρια του κλώνου. Ένας διαφορετικός κλώνος θα περιέχει άλλο θραύσμα DNA του δότη. Όλοι μαζί οι βακτηριακοί κλώνοι περιέχουν κλωνοποιημένο το σύνολο του γονιδιώματος του δότη. **Γονιδιωματική βιβλιοθήκη** ονομάζεται το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχουν το συνολικό γονιδίωμα του οργανισμού δότη.

Τα βήματα κατασκευής μίας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης συνοπτικά:

1. Τεμαχισμός του συνολικού DNA του δότη με συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση
2. Επίδραση της ίδιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης στο DNA των πλασμιδίων (γενικότερα φορέων κλωνοποίησης)
3. Ανάμιξη των θραυσμάτων DNA δότη με τα πλασμίδια. Τα μονόκλωνα συμπληρωματικά αζευγάρωτα άκρα συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Η DNA δεσμάση συνδέει με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς τα ακραία νουκλεοτίδια των αλυσίδων. Έτσι, δημιουργούνται τα ανασυνδυασμένα DNA
4. Εισαγωγή των ανασυνδυασμένων μορίων στα βακτήρια → μετασχηματισμός
5. Επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων με αντιβιοτικά
6. Ανάπτυξη των επιλεγμένων βακτηρίων σε κλώνους → γονιδιωματική βιβλιοθήκη

► **Πλεονεκτήματα του πλασμιδίου που δικαιολογούν την επιλογή του ως φορέα κλωνοποίησης:**

1. Μπορεί να αυτοδιπλασιάζεται μέσα στο βακτήριο, ανεξάρτητα από το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου και μαζί με αυτό θα διπλασιάζεται και το θραύσμα του DNA του δότη (που έχει ενσωματωθεί σ' αυτό). Αυτό είναι απαραίτητο για την κλωνοποίηση του DNA του δότη.
2. Βοηθά στην επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων από αυτά που δεν μετασχηματίστηκαν λόγω των γονιδίων ανθεκτικότητας που διαθέτει σε αντιβιοτικά.
3. Βοηθά στην έκφραση των γενετικών πληροφοριών του DNA του δότη (κυρίως στη cDNA βιβλιοθήκη).

Παρατήρηση: Το πλασμίδιο διαθέτει υποκινητή που αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση και από τους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες του βακτηρίου – εκτός ύλης.

► **Κριτήρια επιλογής του κατάλληλου για φορέα κλωνοποίησης πλασμιδίου:**

1. Να διαθέτει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση που σκοπεύουμε να χρησιμοποιήσουμε. Μόνο τότε τα άκρα των τμημάτων που δημιουργούνται, δηλαδή του πλασμιδίου και του τμήματος του δότη, θα είναι συμπληρωματικά και θα μπορούν να συνδεθούν.
2. Να διαθέτει την συγκεκριμένη αλληλουχία μόνο μία φορά. Αν υπάρχει περισσότερες από μία φορές, το πλασμίδιο θα τεμαχιστεί σε περισσότερα γραμμικά τμήματα, τα οποία θα είναι αδύνατο να επανασυνδεθούν.

3. Σε περίπτωση που θέλουμε να διαχωρίσουμε τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια από τα μετασχηματισμένα, αλλά και μεταξύ των μετασχηματισμένων, εκείνα που προσέλαβαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από εκείνα που προσέλαβαν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, θα χρειαστεί το πλασμίδιο να περιέχει δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντίστοιχα αντιβιοτικά, και μάλιστα η αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση θα πρέπει να περιέχεται στο εσωτερικό του ενός από αυτά.
4. Αν το πλασμίδιο έχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, η αλληλουχία αναγνώρισης δεν θα πρέπει να περιέχεται μέσα στο γονίδιο αυτό.
5. Επίσης δεν θα πρέπει η αλληλουχία αναγνώρισης να βρίσκεται μέσα στη μοναδική θέση έναρξης αντιγραφής που περιέχει το πλασμίδιο, γιατί τότε θα χάσει την ικανότητα αυτοδιπλασιασμού του.
6. Τέλος επειδή το βακτήριο ενδέχεται να περιέχει περιοριστικές ενδονουκλεάσες, το πλασμίδιο δεν θα πρέπει να περιέχει καμιά αλληλουχία που να αναγνωρίζεται από αυτές. Αν συμβεί αυτό, τότε μετά την είσοδο του πλασμιδίου στο βακτήριο, (μετασχηματισμός), το πιθανότερο είναι το πλασμίδιο να κοπεί, άρα να καταστραφεί.

► **Η επιλογή των μετασχηματισμένων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βακτηρίων από τα μετασχηματισμένα με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βακτήρια.**

Μερικά πλασμίδια αφού γίνουν γραμμικά με την περιοριστική ενδονουκλεάση, προλαβαίνουν να γίνουν πάλι κυκλικά, αφού τα ίδια τα άκρα του πλασμιδίου είναι μεταξύ τους συμπληρωματικά. Η DNA δεσμάση επομένως τα ενώνει (αφού πρώτα σχηματίστηκαν οι δεσμοί υδρογόνου), χωρίς να προσλάβουν τμήμα DNA δότη. Τα πλασμίδια αυτά (μη ανασυνδυασμένα), εισέρχονται μέσα στα βακτήρια κατά τη διαδικασία του μετασχηματισμού. Τα μετασχηματισμένα από τέτοια πλασμίδια βακτήρια επιβιώνουν παρουσία αντιβιοτικού, αλλά δεν είναι χρήσιμα. Ένας τρόπος να τα διαχωρίσουμε από τα επιθυμητά βακτήρια, είναι να έχουμε επιλέξει εξαρχής πλασμίδια με 2 γονίδια ανθεκτικότητας σε διαφορετικά αντιβιοτικά (έστω σε αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη). Στο εσωτερικό του ενός γονιδίου ανθεκτικότητας (πχ, ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη), έχουμε φροντίσει να υπάρχει η αλληλουχία αναγνώρισης για την EcoRI. Αν το πλασμίδιο ανασυνδυαστεί, το γονίδιο της αμπικιλίνης θα καταστραφεί, λόγω εισόδου του θραύσματος στο εσωτερικό του γονιδίου (απενεργοποίηση με ένθεση). Αν ξαναγίνει κυκλικό χωρίς να ενσωματώσει το θραύσμα ξένου DNA, το πλασμίδιο θα διατηρήσει τις ιδιότητες ανθεκτικότητας στα 2 αντιβιοτικά. Αντίστοιχα, τα βακτήρια μετά τη διαδικασία μετασχηματισμού, θα έχουν ανθεκτικότητα σε 0, 1 ή και σε 2 αντιβιοτικά.

Βακτήρια	Ανθεκτικότητα	
	σε αμπικιλίνη	σε τετρακυκλίνη
1. που δεν έχουν μετασχηματιστεί	-	-
2. που μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο	-	+
3. που μετασχηματίστηκαν με το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο	+	+

Αρχικά με τετρακυκλίνη θανατώνονται τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια. Στη συνέχεια, σε δείγματα των υπόλοιπων αποικιών των βακτηρίων, τοποθετείται αμπικιλίνη. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια που περιέχουν θραύσμα DNA δότη, δεν επιβιώνουν. Έτσι γνωρίζουμε από τα δείγματα, ποιες αποικίες πρέπει να αναπτυχθούν.

► **Κριτήρια επιλογής του κατάλληλου για κότταρο ξενιστής βακτηρίου:**

1. Να μην περιέχει πλασμίδια πριν την προσπάθεια μετασχηματισμού του, ώστε να είναι ευαίσθητο σε αντιβιοτικά.

2. Να μην περιέχει περιοριστική ενδονουκλεάση που θα μπορούσε να τεμαχίσει το ανασυνδυασμένο DNA που εισάγεται σε αυτό (αναγνωρίζοντας κάποια αλληλουχία στο πλασμίδιο ή στο θραύσμα). Στην περίπτωση αυτή, θα εμποδίζε την αντιγραφή του και την έκφρασή του. Για παράδειγμα, δεν πρέπει να περιέχει EcoRI, εάν με αυτή επιδράσαμε στο πλασμίδιο και στο DNA του δότη.

► **Το DNA του φάγου λ ως φορέας κλωνοποίησης:**

• **Πλεονεκτήματα:**

1. Μπορεί να ενσωματώνει μεγαλύτερα τμήματα DNA δότη από ό,τι το πλασμίδιο. Επομένως είναι καταλληλότερος φορέας για οργανισμούς με μεγάλα γονιδιώματα, πχ άνθρωπος, γιατί θα απαιτηθεί μικρότερος αριθμός φορέων (θα τεμαχιστεί το DNA του δότη σε λίγα μεγάλα κομμάτια), άρα οικονομία υλικών και χρόνου.
 2. Η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA του φάγου στο βακτήριο είναι μία «φυσική» ικανότητα του φάγου, άρα γίνεται με μεγαλύτερη επιτυχία από την εισαγωγή πλασμιδίου σε αυτό. Δεν απαιτείται η χρήση αντιβιοτικών για τον έλεγχο των μετασχηματισμένων βακτηρίων, αφού ο φάγος θα μολύνει όλα τα βακτήρια της αποικίας.
- **Μειονέκτημα:** Το πλασμίδιο είναι πιο εύχρηστο μόριο και η κλωνοποίηση με αυτό προτιμάται αν το DNA του δότη είναι σχετικά μικρό.

► **Η cDNA βιβλιοθήκη:**

Συγκροτείται από βακτηριακούς κλώνους που δημιουργούνται με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, χρησιμοποιώντας το ολικό ώριμο mRNA από ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο ως καλούπι, και κατασκευάζοντας τα αντίστοιχα DNA. Επειδή ο κάθε κλώνος βακτηρίων περιέχει ένα συγκεκριμένο γονίδιο χωρίς εσώνια, οι βακτηριακοί κλώνοι συνολικά περιέχουν όλα τα γονίδια (χωρίς εσώνια) που εκφράζονται σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο ενός οργανισμού δότη μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

Τα βήματα κατασκευής μίας cDNA βιβλιοθήκης:

1. Απομόνωση του ολικού (ώριμου) mRNA από συγκεκριμένο ανθρώπινο κυτταρικό τύπο
2. Σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας cDNA για κάθε αλυσίδα mRNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή
3. Διάσπαση των αλυσίδων mRNA με ειδικές ουσίες ή αποδιάταξη των υβριδικών μορίων mRNA – cDNA με θέρμανση
4. Σύνθεση για κάθε αλυσίδα cDNA της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA με χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση
5. Επίδραση στα πλασμίδια (φορείς κλωνοποίησης) με συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση, εισαγωγή των δίκλωνων μορίων DNA και σύνδεσή τους με DNA δεσμάση με τα πλασμίδια. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυασμένα μόρια DNA.
Εναλλακτικά: Εισαγωγή με τη χρήση του ενζύμου DNA δεσμάση των δίκλωνων τμημάτων DNA στο DNA του φάγου λ, αφού το τελευταίο έχει πρώτα κοπεί με περιοριστική ενδονουκλεάση
6. Εισαγωγή των ανασυνδυασμένων μορίων DNA στα βακτήρια (κύτταρα ξενιστές) (μετασχηματισμός) με ειδική κατεργασία των τοιχωμάτων τους που τα καθιστά παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια, στην περίπτωση που έχουμε πλασμίδιο ως φορέα κλωνοποίησης, ή μόλυνση των βακτηρίων με τους φάγους, στην περίπτωση που έχουμε χρησιμοποιήσει το DNA του φάγου λ ως φορέα κλωνοποίησης
7. Ανάπτυξη των βακτηριακών κλώνων σε καλλιέργεια και απομόνωση των μετασχηματισμένων βακτηρίων με αντιβιοτικά (μόνο τα μετασχηματισμένα επιβιώνουν), αν έχει χρησιμοποιηθεί το πλασμίδιο ως φορέας. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχουν αντίγραφα των γονιδίων που εκφράζονται στον κυτταρικό τύπο του οργανισμού δότη χωρίς τα εσώνια, συνιστά τη cDNA βιβλιοθήκη.

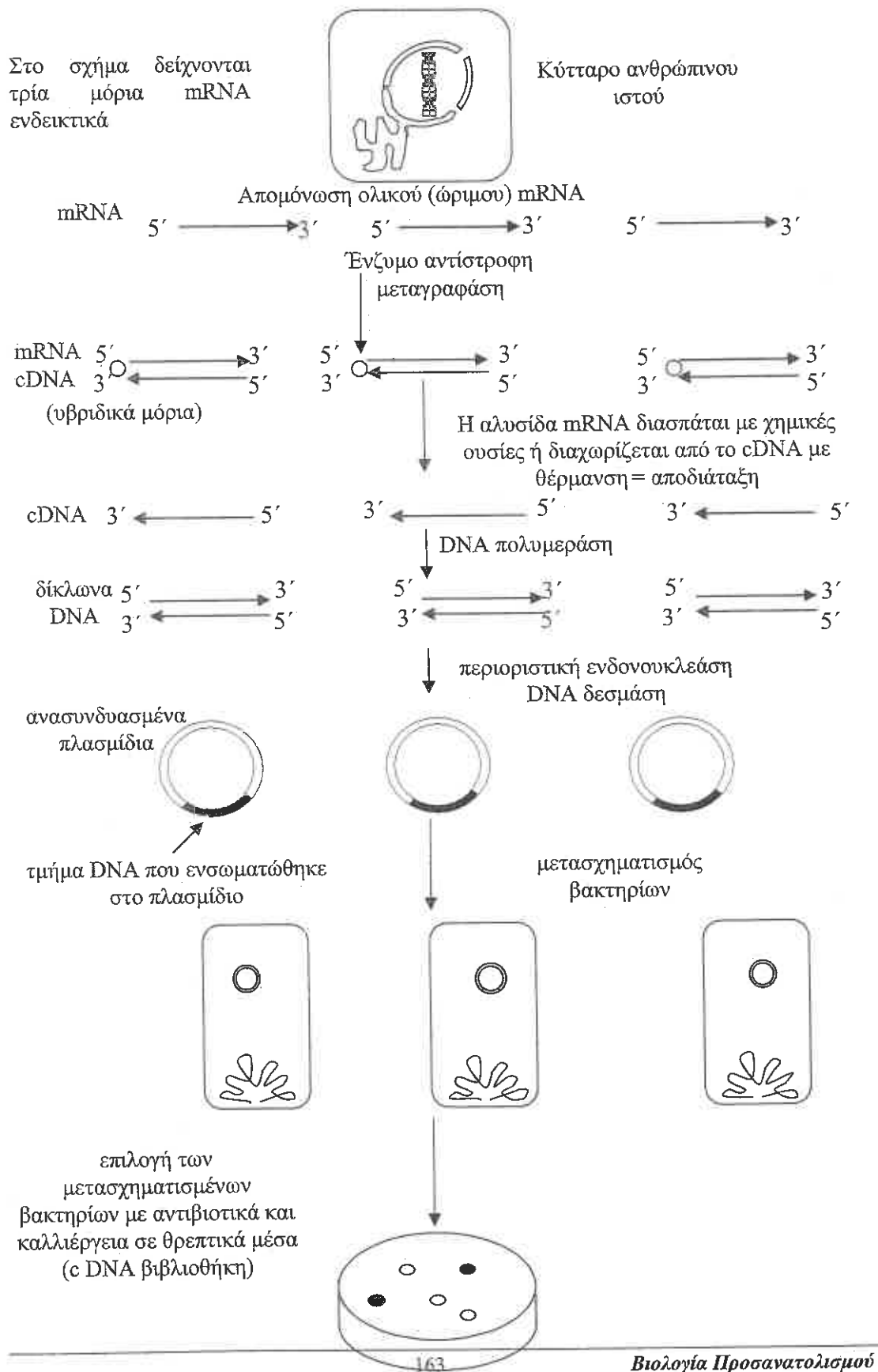
► **Περιοχές DNA που δεν έχουν κλωνοποιηθεί σε μία cDNA βιβλιοθήκη:**

- περιοχές που δεν περιέχουν γονίδια
- υποκινητές και αλληλουχίες λήξης μεταγραφής
- εσώνια
- γονίδια που μεταγράφονται σε t, r, snRNA
- μη ενεργά γονίδια στο συγκεκριμένο κύτταρο από το οποίο απομονώσαμε το ολικό ώριμο mRNA
- μιτοχονδριακό DNA

► **Διαφορές γονιδιωματικής – cDNA βιβλιοθήκης**

Γονιδιωματική βιβλιοθήκη	cDNA βιβλιοθήκη
1. Απομονώνουμε το συνολικό DNA ενός κυττάρου του οργανισμού δότη	1. Απομονώνουμε το ολικό (ώριμο) mRNA από συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο του οργανισμού δότη
2. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούμε είναι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες και η DNA δεσμάση	2. Χρησιμοποιούνται επιπλέον η αντίστροφη μεταγραφή και η DNA πολυμεράση
3. Κλωνοποιείται όλο το γονιδίωμα του οργανισμού δότη	3. Κλωνοποιούνται μόνο τα εξώνια και οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές των γονιδίων που εκφράζονται στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο από τον οποίο απομονώθηκε το mRNA
4. Μπορούμε να μελετήσουμε οποιαδήποτε αλληλουχία του DNA του δότη (π.χ. εσώνια, υποκινητές, περιοχές χωρίς πληροφορίες)	4. Δεν έχουν κλωνοποιηθεί όλες οι περιοχές του γονιδιώματος, παρά ένα πολύ μικρό ποσοστό. (εξώνια και οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές ενεργών γονιδίων), άρα μόνο αυτές μπορούν να μελετηθούν.
5. Δεν είναι κατάλληλη για τη σύνθεση πρωτεϊνών του οργανισμού δότη, αν η βιβλιοθήκη γίνεται σε βακτήρια. Ο λόγος είναι ότι τα γονίδια του δότη (ευκαρυωτικού) περιέχουν εσώνια (τα βακτήρια δε διαθέτουν μηχανισμούς ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA) και επιπλέον μπορεί κάποια γονίδια να μην είναι ολόκληρα, εφόσον μπορεί να έχουν τεμαχιστεί από την περιοριστική ενδονουκλεάση, εάν περιέχουν την αλληλουχία αναγνώρισης στο εσωτερικό τους.	5. Παράγονται πρωτεΐνες του δότη αφού ξεκινάμε με ώριμο mRNA, με μόνη διαφορά το ότι τα βακτήρια δεν τροποποιούν με τον ίδιο τρόπο τις πρωτεΐνες μετά τη μετάφραση, με τα ευκαρυωτικά
6. Φυσιολογικά η γονιδιωματική βιβλιοθήκη δε διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο του ίδιου οργανισμού (αν χρησιμοποιηθεί η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση).	6. Κάθε κυτταρικός τύπος ενός πολυκύτταρου οργανισμού έχει τη δική του cDNA βιβλιοθήκη (προκύπτουν συμπεράσματα γύρω από την κυτταρική διαφοροποίηση).

Η κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης σχηματικά:



► **Αποδιάταξη του DNA**: Είναι ο αποχωρισμός των δύο αλυσίδων του DNA, που οφείλεται στη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που τις συγκρατούν. Γίνεται είτε με την επίδραση χημικών ουσιών είτε με την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας.

► **Υβριδοποίηση**: Η σύνδεση μονόκλωνων μορίων DNA με δεσμούς υδρογόνου, λόγω συμπληρωματικότητας, ή αλυσίδας DNA με RNA, ή γενικά οποιωνδήποτε συμπληρωματικών τμημάτων νουκλεϊκών οξέων. Διαδικασία αντίθετη της αποδιάταξης.

► **Ανιχνευτές**: Ειδικά ιχνηθετημένα (συνήθως με ^{32}P) μονόκλωνα μόρια DNA ή RNA, που έχουν συμπληρωματική αλληλουχία με τη μία αλυσίδα ενός γονιδίου ή με μία άλλη αλληλουχία που επιθυμούμε να εντοπίσουμε (ανιχνεύσουμε) σε μία βιβλιοθήκη (γονιδιωματική ή cDNA). Ο ανιχνευτής συνδέεται με την επιθυμητή αλληλουχία, που είναι επίσης μονόκλωνη, γιατί το DNA κάθε βακτηριακού κλώνου της βιβλιοθήκης έχει προηγούμενα αποδιαταχθεί.

► **PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)**: Είναι η επιλεκτική κλωνοποίηση μίας αλληλουχίας DNA μέσα από ένα μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών κυττάρων και χωρίς την επίτονη διαδικασία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

Εφαρμογές: α) διάγνωση ασθενειών, όπως το AIDS, β) εγκληματολογία, γ) μελέτη DNA από απολιθώματα.