**Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης**

Σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού μας (εκτός από τους γαμέτες) το γονιδίωμα είναι ίδιο. Μπορούμε να φτιάξουμε γονιδιωματική βιβλιοθήκη παίρνοντας γενετικό υλικό από οποιοδήποτε κύτταρο του οργανισμού μας, επειδή η γονιδιωματική βιβλιοθήκη φτιάχνεται από ολικό DNA.

[η διαδικασία δημιουργίας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης που περιγράφουμε για τον άνθρωπο ισχύει και για όλους τους υπόλοιπους οργανισμούς. π.χ. το γενετικό υλικό – το ολικό DNA – στα φύλλα της ροδακινιάς είναι ίδιο με το ολικό DNA των κυττάρων της ρίζας της ροδακινιάς].

Κάθε κύτταρο του οργανισμού μας είναι εξειδικευμένο να πραγματοποιεί συγκεκριμένες λειτουργίες. Δηλαδή θα εκφράζει συγκεκριμένα γονίδια και θα παράγει συγκεκριμένα προιόντα που έχουν σχέση με αυτές τις λειτουργίες. Όλα τα υπόλοιπα γονίδια αυτού του κυττάρου θα είναι ανενεργά. Αυτή είναι η ουσία της κυτταρικής διαφοροποίησης. Εξαίρεση: υπάρχουν κάποια γονίδια που έχουν σχέση με λειτουργίες «νοικοκυριού», είναι δηλαδή γονίδια γενικών καθηκόντων και είναι απαραίτητα για την ύπαρξη όλων των κυττάρων – όπως γονίδια για ιστόνες, πολυμεράσες, ριβοσώμικές πρωτείνες και rRNA κλπ. αυτά τα γονίδια εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού.

Αν θέλουμε να απομονώσουμε μια συγκεκριμένη πρωτείνη (για να τη μελετήσουμε ή να την χρησιμοποιήσουμε στη βιομηχανία)πρώτα βρίσκουμε σε ποια κύτταρα του οργανισμού εκφράζεται. Σίγουρα, σε αυτά τα κύτταρα, αυτή η πρωτείνη θα βρίσκεται σε αφθονία. Επίσης, σε αυτά τα κύτταρα θα βρίσκεται σε αφθονία και το ώριμο mRNA αυτής της πρωτείνης. Από αυτά τα κύτταρα μπορούμε να το απομονώσουμε. Με την γενετική πληροφορία που περιέχει το mRNA μιας συγκεκριμένης πρωτείνης μπορούμε να δημιουργήσουμε το cDNA (complementary DNA) αυτής της πρωτείνης. Το mRNA που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα είναι ώριμο, χωρίς εσώνια, συνεπώς μπορεί να μεταφραστεί από προκαρυωτικούς οργανισμούς (π.χ. E. Coli).

Το **cDNA** είναι μόριο DNA που δημιουργείται με αντίστροφη μεταγραφή (την πραγματοποιεί το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση) χρησιμοποιώντας την πληροφορία που περιέχεται σε ένα μόριο ώριμου mRNA.

Βήματα :

1) Απο κύτταρα στα οποία εκφράζεται το γονίδιο που μας ενδιαφέρει απομονώνουμε το ώριμο mRNA του γονιδίου (το βρίσκουμε στο κυτταρόπλασμα την ώρα που μεταφράζεται).

2) βάζουμε το mRNA σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και άφθονα δεοξυριβονουκλεοτίδια. Θα γίνει αντίστροφη μεταγραφή και θα δημιουργηθεί υβρίδιο mRNA – cDNA.

3) το υβρίδιο είναι ασταθές και αν αυξήσουμε τη θερμοκρασία ή το επωάσουμε με κατάλληλες χημικές ουσίες σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου και απομακρύνονται οι αλυσίδες. Απομακρύνουμε το mRNA.

4) στο μονόκλωνο DNA προσθέτουμε DNA πολυμεράση, άφθονα δεοξυριβονουκλεοτίδια και φυσικά πριμόσωμα και ριβονουκλεοτίδια (για να σχηματιστεί πρωταρχικό τμήμα). Το μονόκλωνο DNA έτσι θα γίνει δίκλωνο.

5) σε αυτό το μόριο DNA δημιουργούμε τα κατάλληλα άκρα χρησιμοποιώντας την κατάλληλη ενδονουκλεάση ώστε να μπορούμε να το ενσωματώσουμε στον κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης. Δεν ξεχνάμε να προσθέσουμε DNA δεσμάση.

Το δίκλωνο μόριο cDNA μπορεί να ενσωματωθεί σε έναν φορέα κλωνοποίησης και με τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης να μετασχηματίσουμε έναν προκαρυωτικό οργανισμό, π. χ. E. coli. Στον προκαρυωτικό οργανισμό ο φορέας κλωνοποίησης θα μεταγράφεται και θα μεταφράζεται χωρίς πρόβλημα, γιατί δεν περιέχει εσώνια. Πρέπει να προσέξουμε μόνο να υπάρχει κοντά του βακτηριακός υποκινητής. Όλοι οι απόγονοι αυτού του μετασχηματισμένου κυττάρου θα περιέχουν αυτό το μόριο cDNA και θα το εκφράζουν. Έτσι, το προιόν του γονιδίου (του cDNA) θα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες.

Για παράδειγμα, εάν το γονίδιο που κλωνοποιούμε είναι το γονίδιο της ανθρώπινης ινσουλίνης - (το mRNA του γονιδίου της ανθρώπινης ινσουλίνης το απομονώσαμε από τα κύτταρα των β-νησίδων Langerhast) - τότε μπορούμε να πάρουμε παραγωγή ανθρώπινης ινσουλίνης σε μεγάλες ποσότητες από καλλιέργειες προκαρυωτικών κυττάρων. Έτσι μπορούμε να παράγουμε ινσουλίνη σε βιομηχανική κλίμακα με χαμηλό κόστος.

 ***cDNA βιβλιοθήκη*** είναι το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχουν αντίγραφα όλων των ώριμων mRNA των γονιδίων που εκφράζονται σε έναν κυτταρικό τύπο.