

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	2
Ι. Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA	2

100 ΛΥΚΕΙΟ ΛΑΡΙΣΑΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°

I. Τεχνολογία του ανασυνδυσασμένου DNA

Εκπαιδευτικοί στόχοι:

Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης αυτού του κεφαλαίου ο μαθητής θα πρέπει να μπορεί:

- Να περιγράφει τη μεθοδολογία κατασκευής ανασυνδυσασμένου DNA
- Να περιγράφει τη διαδικασία κλωνοποίησης γονιδίων
- Να αναφέρει τα στάδια κατασκευής γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης.
- Να διακρίνει τις ομοιότητες και τις διαφορές γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης.
- Να αναφέρει τις εφαρμογές μίας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

Βιβλίο καθηγητή

1. Τι είναι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ποιος είναι ο φυσιολογικός τους ρόλος και πώς αυτές συντέλεσαν στην ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυσασμένου DNA;
2. Τι είναι η γονιδιωματική βιβλιοθήκη;
3. Να περιγράψετε τη διαδικασία δημιουργίας μίας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.
4. Πώς κατασκευάζεται το ανασυνδυσασμένο DNA;
5. Πώς επιτυγχάνεται η επιλογή των βακτηρίων που δέχθηκαν ανασυνδυσασμένο πλασμίδιο;
6. Τι ονομάζεται κλωνοποίηση;
7. Να περιγράψετε τη διαδικασία επιλογής ενός κλώνου που έχει το επιθυμητό γονίδιο ή μία συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων.
8. Τι ονομάζουμε αποδιάταξη του DNA και πώς αυτή επιτυγχάνεται στο εργαστήριο;
9. Τι είναι οι ανιχνευτές και για ποιο λόγο χρησιμοποιούνται;
10. Τι είναι η Γενετική Μηχανική;
11. Τι είναι οι φορείς κλωνοποίησης;
12. Τι ονομάζουμε μετασχηματισμό όταν αναφερόμαστε στην τεχνολογία του ανασυνδυσασμένου DNA;
13. Τι ονομάζεται κλώνος;
14. Εάν επιδράσουμε με EcoRI στο τμήμα DNA που ακολουθεί ποιο θα είναι το αποτέλεσμα;

A-C-G-A-T-C-G-G-A-A-T-T-C-A-A-C-A-T-T-C-G-A-A-T-T-C-A-T-A-T
T-G-C-T-A-G-C-C-T-T-A-A-G-T-T-G-T-A-A-G-G-T-T-A-A-G-T-A-T-A

15. Πώς επιτυγχάνεται η είσοδος του ανασυνδυσασμένου DNA στα βακτήρια;
16. Πότε κατασκευάζουμε cDNA βιβλιοθήκες
17. Από τι αποτελούνται οι cDNA βιβλιοθήκες;
18. Ποιο είναι το πλεονέκτημα των cDNA βιβλιοθηκών;
19. Με ποιους τρόπους επιτυγχάνεται η δημιουργία πολλών αντιγράφων ενός γονιδίου ή ενός τμήματος DNA;
20. Τι επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης;
21. Ποιες εφαρμογές έχει η PCR;
22. Γιατί χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης τα πλασμίδια και οι φάγοι;
23. Γιατί το ανασυνδυσασμένο DNA είναι απαραίτητο να εισαχθεί σε βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή;
24. Σε ποια ιδιότητα, του γενετικού κώδικα, οφείλεται το γεγονός ότι το DNA οποιουδήποτε οργανισμού, όταν εισαχθεί στο πλασμίδιο ενός βακτηρίου μπορεί να εκφραστεί;
25. Για ποιο λόγο οι ερευνητές υποχρεώθηκαν να επινοήσουν τη cDNA βιβλιοθήκη, ενώ ήδη είχαν στη διάθεσή τους τις γονιδιωματικές βιβλιοθήκες;
26. Πού βρίσκει εφαρμογή η τεχνολογία του ανασυνδυσασμένου DNA;
27. Με ποιες μεθόδους μπορούμε να παράγουμε αντίγραφα ενός μορίου DNA ή τμήματος αυτού;
28. Ποια χαρακτηριστικά έχουν τα μόρια που θα χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές;
29. Ποια χαρακτηριστικά έχουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούμε στην τεχνολογία του ανασυνδυσασμένου DNA;
30. Ποιες ιδιότητες έχουν τα πλασμίδια που χρησιμοποιούμε στην τεχνολογία του ανασυνδυσασμένου DNA;
31. Γιατί χρησιμοποιείται η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, τόσο για τον τεμαχισμό του γενετικού υλικού του κυττάρου δότη όσο και για το άνοιγμα του πλασμιδίου;
32. Πότε χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης βακτηριοφάγος;
33. Ποιος είναι ο ρόλος των πλασμιδίων και των βακτηρίων στις τεχνικές της γενετικής μηχανικής;
34. Με ποιες μεθόδους μπορούμε να κλωνοποιήσουμε τμήματα DNA;
35. Να συγκρίνετε ως προς το μέγεθός του (τον αριθμό βακτηριακών κλώνων που τις αποτελούν) μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη ηπατικού ανθρώπινου κυττάρου με την

αντίστοιχη cDNA βιβλιοθήκη. Και οι δύο βιβλιοθήκες δημιουργήθηκαν με τη χρήση της ίδιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης.

36. Να συγκρίνετε ως προς το μέγεθός τους (τον αριθμό βακτηριακών κλώνων που περιλαμβάνουν) τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη ηπατικού κυττάρου ανθρώπου με την αντίστοιχη επιθηλιακού κυττάρου του ίδιου ανθρώπου όταν για τη δημιουργία τους χρησιμοποιήθηκε η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση.
37. Σε πόσα σημεία θα ανοίξει ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο η περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του;
38. Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τέσσερις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που έχουν απομονωθεί από τα αντίστοιχα βακτήρια και ο τρόπος δράσης κάθε μιας. Ποιες από αυτές πιστεύετε ότι είναι περισσότερο κατάλληλες να χρησιμοποιηθούν στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και γιατί;

ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ	ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΕ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΠΟΥ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΕΙ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ
EcoRI	Escherichia coli R13	↓ G-A-A-T-T-C C-T-T-A-A-G ↑
HhaI	Haemophilus haemolyticus	↓ G-C-G-C C-G-C-G ↑
SmaI	Serratia marcescens	↓ C-C-C-G-G-G G-G-G-C-C-C ↑
HaeIII	Haemophilus aegyptius	↓ G-G-C-C C-C-G-G ↑

39. Γιατί για τη δημιουργία των cDNA βιβλιοθηκών χρησιμοποιείται το κυτταροπλασματικό mRNA;
40. Εξηγείστε τον ρόλο καθενός από τα ακόλουθα, κατά τη διαδικασία δημιουργίας ανασυνδυασμένου DNA:
 - A. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες.
 - B. DNA δεσμάση.
41. Έχει παρατηρηθεί ότι τα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με κλωνοποιημένα γονίδια ανθρώπου, συχνά δεν παράγουν λειτουργικά προϊόντα. Εξηγείστε γιατί μπορεί να συμβαίνει αυτό;
42. Τι προκαλεί η θέρμανση σε ένα δίκλωνο μόριο DNA;

43. Να αναφέρετε τα χαρακτηριστικά των περιοριστικών ενδονουκλεασών, τον ρόλο τους στα βακτηριακά κύτταρα που τις παράγουν και τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία.
44. Υποθέστε ότι ένα γραμμικό μόριο DNA κόβεται με την βοήθεια της EcoRI. Η EcoRI αναγνωρίζει μία φορά την αντίστοιχη αλληλουχία κατά μήκος του μορίου αυτού. Σε πόσα κομμάτια θα χωριστεί το μόριο; Ποιο θα ήταν το αποτέλεσμα αν το μόριο ήταν κυκλικό;
45. Τι είδους βιβλιοθήκη θα χρησιμοποιούσατε για να μελετήσετε ένα εσώνιο του γονιδίου της ακτίνης και τον υποκινητή του γονιδίου τα αιμοσφαιρίνης;
46. Σε δοκιμαστικό σωλήνα βρίσκονται δύο είδη DNA, το Α και το Β. Αν θερμάνουμε τον σωλήνα, ποιο από τα δύο μόρια πιστεύετε ότι θα αποδιαταχθεί πρώτο και γιατί;

A: 5' GCTAAGTAGCCGATCGGATTGCGCCGCATGGCCGAT 3'
3' CGATTCATCGGCTAGCCTAAGCGGGCGTACCGGCTA 5'

B: 5' GCTAAGTAATTATCGTATTGCGCAATATTATGAT 3'
3' CGATTCATTAATAGCATAAAGCGGTTATAATACTA 5'

47. Ένα πλασμίδιο της E.coli έχει δύο φορές την αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση HhaI. Ποιο θα είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης της ενδονουκλεάσης αυτής στο πλασμίδιο;
48. Ένα πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης για την κατασκευή μιας 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 στην πενικιλίνη. Να εξηγήσετε με ποιον 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.
49. Με την τεχνική της PCR θέλουμε να κλωνοποιήσουμε το ακόλουθο τμήμα DNA:

5' GCTAAGTAGCCGATCGG.....ATTGCGCCGCATGGCCGAT 3'
3' CGATTCATCGGCTAGCC.....TAAGCGGGCGTACCGGCTA 5'

Ποια από τα πρωταρχικά τμήματα RNA που ακολουθούν θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε και γιατί;

3' CGAUUCAUCGGCUAGCC 5' 3' UAAGCGGGCGUACCGGCUA 5'

α

β

5' GCUAAGUAGCCGAUCGG 3' 5' AUUCGCCCCGCAUGGCCGAU 3'

γ

δ

50. Το πρόδρομο mRNA για την ιωσθαιμίνη της κότας περιέχει επτά εσώνια και οκτώ εξώνια. Τα εσώνια καταλαμβάνουν το 70% του mRNA.

Αν απομονωθεί το γονίδιο της ωοαλβουμίνης, υποστεί αποδιάταξη και υβριδοποιηθεί με το κυτταροπλασματικό mRNA που παραγάγει την ωοαλβουμίνη, να εξηγηθεί:

- α. Ποια αλυσίδα του DNA θα μετέχει στην υβριδοποίηση;
β. Ποιο θα είναι το ποσοστό υβριδοποίησης στο mRNA και στην DNA αλυσίδα;

51. Η περιοριστική ενδονουκlease EcoRI αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία 6 ζευγών βάσεων στο DNA. Η περιοριστική ενδονουκlease HaeIII αναγνωρίζει μια αλληλουχία 4 ζεύγη βάσεων στο DNA. Απομονώνεται το DNA ενός ευκαρυωτικού κυττάρου και δημιουργούνται δύο δείγματα ενός καθαρού παρασκευάσματος DNA σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στο καθένα επιδρούμε με διαφορετική περιοριστική ενδονουκlease. Ποιος δοκιμαστικός σωλήνας αναμένεται να περιέχει περισσότερα κομμάτια DNA;

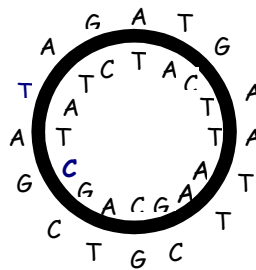
52. Ένα γραμμικό μόριο DNA χωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση HhaI σε τρία κομμάτια. Το ίδιο μόριο χωρίζεται από την EcoRI σε δύο κομμάτια.

- α. Πόσες θέσεις αναγνωρίζει σε αυτό η HhaI και πόσες η EcoRI;
β. Σε πόσα κομμάτια θα κοπεί αυτό το DNA αν χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα και οι δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες;

Η αλληλουχία που αναγνωρίζει η HhaI είναι η



53. Εάν το πλασμιδίο και το τμήμα DNA που ακολουθούν δεχθούν την επίδραση της EcoRI: α) Να σημειώσετε με βέλη τα σημεία που θα ανοίξει το πλασμιδίο και το τμήμα του DNA. β) Να σχεδιάσετε το ανασυνδυασμένο πλασμιδίο που θα δημιουργηθεί όταν ενσωματωθεί στο πλασμιδίο, το τμήμα του γραμμικού μορίου που θα αποκοπεί.



ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

1. Κόψιμο, με μία περιοριστική ενδονουκλεάση, του γονιδιώματος ενός ευκαρυωτικού οργανισμού.
2. Επιλογή πλασμιδίων (φορέων κλωνοποίησης).
 - α. Γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό
 - β. Μία φορά η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιηθεί.
3. Άνοιγμα των πλασμιδίων με τη χρήση της ίδιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης, που χρησιμοποιήθηκε και για τον τεμαχισμό του γονιδιώματος του ευκαρυωτικού κυττάρου.
4. Ανάμειξη των δύο DNA (αυτού του ευκαρυωτικού οργανισμού με τα πλασμίδια).
5. Δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τη βοήθεια του ενζύμου DNA δεσμάση.
6. Επιλογή βακτηρίων που δεν διαθέτουν πλασμίδιο.
7. Επεξεργασία βακτηρίων, ώστε τα τοιχώματά τους να γίνουν παροδικά διαπερατά και να διευκολυνθεί έτσι η είσοδος των πλασμιδίων.
8. Εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στα βακτήρια (μετασχηματισμός).
9. Επιλογή βακτηρίων που έχουν ενσωματώσει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, με χρήση αντιβιοτικού.
10. Κλωνοποίηση επιλεγμένων βακτηρίων.

Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που θα δημιουργηθούν αποτελεί τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη.

ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ- c-DNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

	ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ	c-DNA
1.	Μπορούν να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε κύτταρα ενός οργανισμού, αρκεί να έχουν πυρήνα	Χρησιμοποιούνται κύτταρα στα οποία εκφράζεται το επιθυμητό γονίδιο
2.	Χρησιμοποιείται το συνολικό DNA του κυττάρου	Χρησιμοποιείται το κυτταροπλασματικό m-RNA του κυττάρου δότη
3.	Κάθε βακτηριακός κλώνος περιέχει κάποιο (τυχαίο) τμήμα του γονιδιώματος του κυττάρου δότη	Κάθε βακτηριακός κλώνος περιέχει αντίγραφο κάποιου γονιδίου που εκφράζεται στο κύτταρο δότη
4.	Ακόμα και στην περίπτωση που ένας βακτηριακός κλώνος, έχει ένα γονίδιο του οργανισμού δότη, αυτό (αν είναι ασυνεχές) θα περιέχει εσώνια και εξώνια	Οι βακτηριακοί κλώνοι περιέχουν αντίγραφα γονιδίων (ακόμα και των ασυνεχών) χωρίς τα εσώνια
5.	Περιλαμβάνει περισσότερους βακτηριακούς κλώνους	Περιλαμβάνει λιγότερους βακτηριακούς κλώνους, το πολύ τόσους όσα είναι τα γονίδια που εκφράζονται στον κυτταρικό τύπο του κυττάρου δότη
6.	Τα γονίδια που επιλέγονται από μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη, δεν μπορούν κατά κανόνα να εκφραστούν άμεσα από ένα βακτηριακό κύτταρο και να μας δώσουν λειτουργικό προϊόν, λόγω των εσωνίων που περιέχουν	Τα γονίδια μπορούν άμεσα να εκφραστούν από ένα βακτηριακό κύτταρο γιατί δεν περιέχουν εσώνια. Το προϊόν βέβαια που θα παραχθεί μπορεί να μην είναι λειτουργικό και να χρειάζεται τροποποίηση.

10ο ΛΥΚΕΙΟ ΛΑΡΙΣΑΣ