Κεφάλαιο 4

Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

Πώς κόβουμε, ενώνουμε και πολλαπλασιάζουμε το DNA: περιοριστικές ενδονουκλεάσες, κλωνοποίηση, βιβλιοθήκες, υβριδοποίηση και PCR.

1 Βασικοί όροι
2 Γενετική Μηχανική
3 Περιοριστικές ενδονουκλεάσες
4 Κλωνοποίηση
5 Γονιδιωματική βιβλιοθήκη
6 cDNA βιβλιοθήκη
7 Υβριδοποίηση
8 PCR
9 Συγκρίσεις
10 Αυτοέλεγχος

1 Βασικοί όροι

Οι όροι του κεφαλαίου ζητούνται συχνά ως ορισμοί στο Θέμα Α και Β. Κρύψε τους ορισμούς και δοκίμασε να τους πεις μόνος σου.

Ανασυνδυασμένο DNA	Τεχνητό μόριο DNA που περιέχει γονίδια ή τμήματα DNA από δύο ή περισσότερους οργανισμούς.
Ανιχνευτής	Ιχνηθετημένο μονόκλωνο μόριο DNA ή RNA με αλληλουχία συμπληρωματική προς το DNA που ψάχνουμε. Υβριδοποιεί μόνο αυτό και έτσι δείχνει ποιος κλώνος το περιέχει.
Αντίστροφη μεταγραφάση	Ένζυμο που συνθέτει DNA με καλούπι RNA. Στο κεφάλαιο αυτό φτιάχνει cDNA με καλούπι το ώριμο mRNA.
Αποδιάταξη	Ο αποχωρισμός των δύο αλυσίδων του DNA. Γίνεται με θέρμανση ή με κατάλληλες χημικές ουσίες, που σπάνε τους δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις αλυσίδες.
Βακτηριοφάγος λ	Ιός που προσβάλλει βακτήρια. Το DNA του χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης και δέχεται μεγαλύτερα κομμάτια ξένου DNA από τα πλασμίδια.

Γενετική Μηχανική	Το σύνολο των τεχνικών με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό.
Γονιδιωματική βιβλιοθήκη	Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού-δότη.
DNA δεσμάση	Ένζυμο που ενώνει με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς το DNA του δότη με το DNA του φορέα, αφού ζευγαρώσουν τα μονόκλωνα άκρα τους.
EcoRI	Περιοριστική ενδονουκλεάση από το βακτήριο *Escherichia coli*. Αναγνωρίζει την αλληλουχία 5΄-GAATTC-3΄ στο δίκλωνο DNA και κόβει κάθε αλυσίδα ανάμεσα στο G και στο A.
Κλωνοποίηση	Η δημιουργία κλώνων βακτηρίων, δηλαδή πολλών πανομοιότυπων αντιγράφων ενός τμήματος DNA μέσα σε βακτήρια. Γενικότερα, η παραγωγή μεγάλου αριθμού πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών.
Κλώνος βακτηρίων	Ομάδα γενετικά όμοιων βακτηρίων που έχουν προκύψει από ένα αρχικό βακτήριο με διαδοχικές διαιρέσεις.
Κύτταρο-ξενιστής	Το κύτταρο, συνήθως βακτήριο, που δέχεται το ανασυνδυασμένο DNA και το πολλαπλασιάζει.
Μετασχηματισμός	Η εισαγωγή ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε βακτήριο-ξενιστή. Γίνεται με κατάλληλη κατεργασία, που κάνει τα τοιχώματα του βακτηρίου παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια.
Μονόκλωνα άκρα	Άκρα με αζευγάρωτες βάσεις που αφήνει η EcoRI στα κομμένα τμήματα (5΄-AATT-3΄). Ζευγαρώνουν με τα συμπληρωματικά άκρα άλλων τμημάτων που κόπηκαν με το ίδιο ένζυμο.
Οργανισμός-δότης	Ο οργανισμός από τον οποίο προέρχεται το DNA που κλωνοποιούμε.
Περιοριστικές ενδονουκλεάσες	Ένζυμα βακτηρίων που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4 έως 8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA και το κόβουν εκεί. Προστατεύουν το βακτήριο από την εισβολή ξένου DNA.

Πλασμίδιο	Μικρό κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA των βακτηρίων, που αντιγράφεται ανεξάρτητα από το κύριο μόριο DNA. Είναι ο συνηθέστερος φορέας κλωνοποίησης.
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Μέθοδος που αντιγράφει επιλεκτικά, εκατομμύρια φορές, ειδικές αλληλουχίες DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών κυττάρων.
Υβριδοποίηση	Η σύνδεση, με δεσμούς υδρογόνου, δύο μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ή μιας αλυσίδας DNA με μια συμπληρωματική αλυσίδα RNA.
Φορέας κλωνοποίησης	Μόριο DNA (πλασμίδιο ή DNA φάγου) που δέχεται ξένο DNA, το μεταφέρει σε κύτταρο-ξενιστή και αντιγράφεται ανεξάρτητα μέσα σε αυτό.
cDNA	Συμπληρωματικό DNA. Συντίθεται από την αντίστροφη μεταγραφάση με καλούπι ώριμο mRNA, άρα δεν περιέχει εσώνια ούτε υποκινητή.
cDNA βιβλιοθήκη	Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχουν αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα.

2 Γενετική Μηχανική και ανασυνδυασμένο DNA

Οι τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό αποτελούν τη **Γενετική Μηχανική**. Με αυτές ο άνθρωπος μπορεί όχι μόνο να ερευνά αλλά και να τροποποιεί το γενετικό υλικό των οργανισμών. Η Γενετική Μηχανική άνοιξε τον δρόμο για νέες παραγωγικές και ερευνητικές δυνατότητες και υπηρετεί δύο θεμελιώδεις στόχους του ανθρώπου: την κατανόηση των μυστηρίων της ζωής και της εξέλιξης, και τη βελτίωση της υγείας και του τρόπου διαβίωσής του.

Η **τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA** περιλαμβάνει όλες τις τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά γενετικού υλικού από έναν οργανισμό σε άλλον. Εφαρμόζεται στην παραγωγή πρωτεϊνών και άλλων προϊόντων και στη δημιουργία φυτών και ζώων με «βελτιωμένες» ιδιότητες.

Τα στάδια

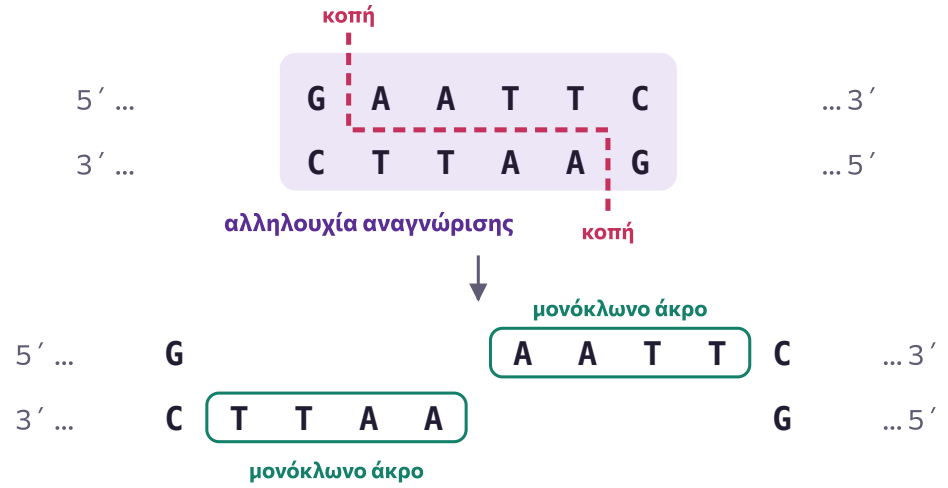
1. **Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA.** Ένα τεχνητό μόριο DNA με γονίδια από δύο ή περισσότερους οργανισμούς.
2. **Μεταφορά σε κύτταρο-ξενιστή.** Συνήθως σε βακτήριο, με τη διαδικασία του μετασχηματισμού.
3. **Επιλογή των ξενιστών.** Απομονώνονται τα κύτταρα που πήραν το ανασυνδυασμένο DNA.
4. **Επιλογή του κλώνου.** Εντοπίζεται ο βακτηριακός κλώνος που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA.

> **Γιατί λειτουργεί**
> Το DNA έχει την ίδια χημική δομή σε όλους τους οργανισμούς και ο γενετικός κώδικας είναι σχεδόν καθολικός. Έτσι ένα γονίδιο του ανθρώπου μπορεί να αντιγραφεί και να εκφραστεί μέσα σε ένα βακτήριο.

3 Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται από βακτήρια. Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την εισβολή «ξένου» DNA, π.χ. του DNA ενός φάγου. Αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες **4 έως 8 νουκλεοτιδίων** στο **δίκλωνο** DNA και το κόβουν εκεί. Η ανακάλυψή τους έκανε δυνατή την κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA.

Η πιο γνωστή είναι η **EcoRI**, από το βακτήριο *Escherichia coli*. Όποτε συναντά την αλληλουχία 5΄-GAATTC-3΄, κόβει κάθε αλυσίδα ανάμεσα στο G και στο A (με κατεύθυνση 5΄→3΄). Επειδή οι δύο τομές δεν είναι απέναντι, στα κομμένα άκρα μένουν **μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις**.



Τα μονόκλωνα άκρα μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τα συμπληρωματικά άκρα οποιουδήποτε άλλου τμήματος DNA που κόπηκε με το ίδιο ένζυμο.

Δεσμοί που σπάνε ανά θέση κοπής
2 φωσφοδιεστερικοί (ένας σε κάθε αλυσίδα) και 8 δεσμοί υδρογόνου (τα 4 ζεύγη A–T ανάμεσα στις δύο τομές)

Γραμμικό DNA με ν θέσεις
κόβεται σε ν + 1 κομμάτια

Κυκλικό DNA με ν θέσεις
κόβεται σε ν κομμάτια

Προσοχή
Η αλληλουχία διαβάζεται ίδια και στις δύο αλυσίδες όταν τις διαβάζεις 5΄→3΄. Γι' αυτό, για να βρεις θέσεις κοπής σε μια άσκηση, πρέπει πρώτα να ξέρεις τον προσανατολισμό των αλυσίδων. Το 5΄-CTTAAG-3΄ **δεν** είναι θέση της EcoRI.

Πόσο συχνά κόβει ένα ένζυμο
Μια συγκεκριμένη αλληλουχία 4 ζευγών βάσεων εμφανίζεται τυχαία κάθε $4^4 = 256$ ζεύγη περίπου, ενώ μία 6 ζευγών κάθε $4^6 = 4.096$. Ένα ένζυμο με μικρότερη αλληλουχία αναγνώρισης κόβει το ίδιο DNA σε περισσότερα και μικρότερα κομμάτια.

---

4 Κλωνοποίηση: φορείς, μετασχηματισμός, επιλογή

Για να πολλαπλασιαστεί ένα κομμάτι DNA μέσα σε βακτήρια χρειάζεται έναν **φορέα κλωνοποίησης**: ένα μόριο DNA που αντιγράφεται ανεξάρτητα μέσα στο κύτταρο-ξενιστή. Φορείς είναι τα **πλασμίδια** και το **DNA φάγων**, όπως του βακτηριοφάγου λ. Τα πλασμίδια είναι ο συνηθέστερος φορέας, αλλά δέχονται σχετικά μικρά κομμάτια ξένου DNA. Το DNA των φάγων δέχεται μεγαλύτερα. Η διαδικασία είναι παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις.

Το κατάλληλο πλασμίδιο

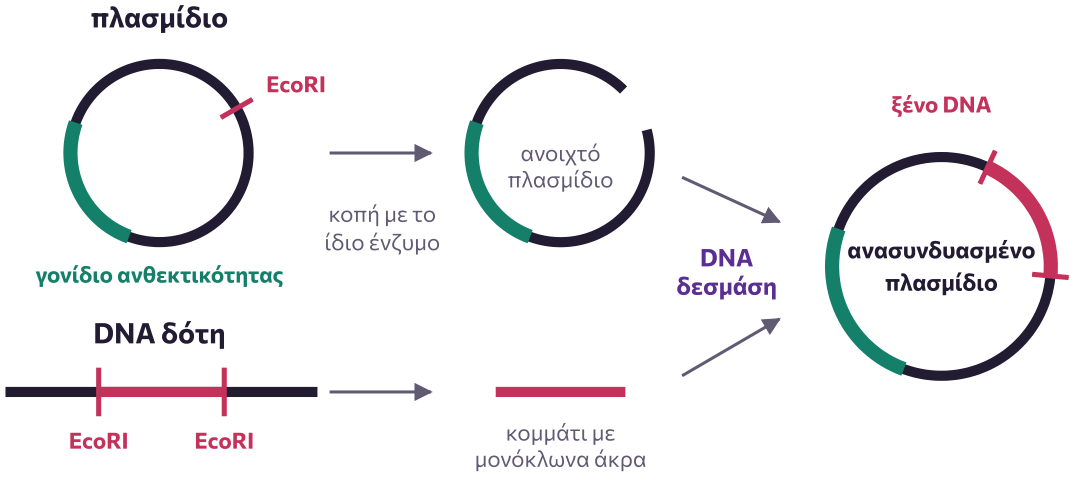
Μία θέση αναγνώρισης
έχει την αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο μία μόνο φορά, ώστε να ανοίγει και να γίνεται γραμμικό χωρίς να χάνει κομμάτι

Γονίδιο ανθεκτικότητας
σε αντιβιοτικό, π.χ. αμπικιλλίνη, για να ξεχωρίζουν τα βακτήρια που το πήραν

Ανεξάρτητη αντιγραφή
διαθέτει θέση έναρξης αντιγραφής και πολλαπλασιάζεται μέσα στον ξενιστή

Κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

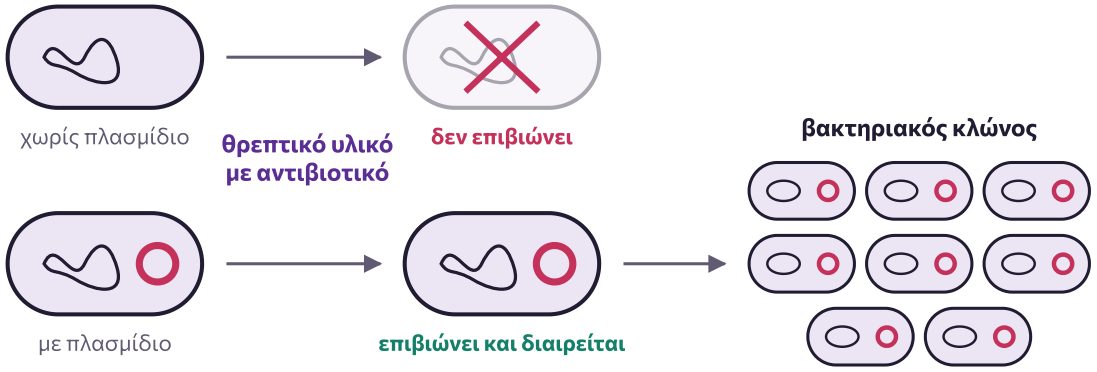
Το DNA του δότη και το πλασμίδιο κόβονται με την **ίδια** περιοριστική ενδονουκλεάση, ώστε να έχουν συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα. Όταν αναμειχθούν, τα άκρα ζευγαρώνουν με δεσμούς υδρογόνου και η **DNA δεσμάση** ενώνει τα τμήματα με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.



Στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο η θέση αναγνώρισης του ενζύμου υπάρχει πλέον δύο φορές, μία σε κάθε σημείο ένωσης.

Μετασχηματισμός και επιλογή

1. **Μετασχηματισμός.** Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται σε βακτήρια-ξενιστές. Με κατάλληλη κατεργασία τα τοιχώματά τους γίνονται παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια.
2. **Καλλιέργεια με αντιβιοτικό.** Οι ξενιστές δεν είχαν πλασμίδια και ήταν ευαίσθητοι στο αντιβιοτικό. Όσοι δεν πήραν πλασμίδιο πεθαίνουν. Όσοι πήραν, επιβιώνουν χάρη στο γονίδιο ανθεκτικότητας.
3. **Κλώνοι.** Κάθε μετασχηματισμένο βακτήριο διαιρείται και δίνει έναν κλώνο, δηλαδή πολλά γενετικά όμοια βακτήρια με το ίδιο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.



Το αντιβιοτικό ξεχωρίζει τα μετασχηματισμένα βακτήρια από τα υπόλοιπα.

Προσοχή

Το απλό αντιβιοτικό δείχνει ποια βακτήρια πήραν **πλασμίδιο**, όχι αν το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο. Ένα πλασμίδιο μπορεί να ξανακλείσει χωρίς ξένο DNA. Γι' αυτό στις ασκήσεις χρησιμοποιείται συχνά το κόλπο με τα δύο γονίδια ανθεκτικότητας.

Επιλογή με δύο γονίδια ανθεκτικότητας

Αν η θέση κοπής βρίσκεται **μέσα** σε ένα γονίδιο ανθεκτικότητας, το ξένο DNA το διακόπτει και το γονίδιο παύει να λειτουργεί. Έστω πλασμίδιο με γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά Α και Β, και θέση κοπής μέσα στο γονίδιο για το Β:

Τι μεγαλώνει πού

Βακτήριο	Με αντιβιοτικό Α	Με αντιβιοτικό Β
Χωρίς πλασμίδιο	Πεθαίνει	Πεθαίνει
Με πλασμίδιο χωρίς ξένο DNA	Μεγαλώνει	Μεγαλώνει
Με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο	Μεγαλώνει	**Πεθαίνει**

Τα βακτήρια που μας ενδιαφέρουν είναι όσα μεγαλώνουν στο Α αλλά όχι στο Β. Η θέση κοπής δεν πρέπει ποτέ να βρίσκεται στη θέση έναρξης της αντιγραφής, ούτε να υπάρχει δύο φορές στο πλασμίδιο.

5 Γονιδιωματική βιβλιοθήκη

Σκοπός: να δημιουργηθούν βακτηριακοί κλώνοι που όλοι μαζί περιέχουν το **συνολικό DNA** ενός οργανισμού-δότη.

1. Απομονώνεται το ολικό DNA από κύτταρα του δότη, καθώς και τα κατάλληλα πλασμίδια.
2. Το DNA του δότη και τα πλασμίδια κόβονται με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση. Το DNA του δότη δίνει χιλιάδες κομμάτια.
3. Τα δύο είδη DNA αναμειγνύονται και, με τη βοήθεια της DNA δεσμάσης, σχηματίζονται ανασυνδυασμένα πλασμίδια.
4. Τα βακτήρια-ξενιστές μετασχηματίζονται με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

5. Τα βακτήρια καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό και επιλέγονται όσα έχουν πλασμίδιο.

6. Κάθε βακτήριο δίνει έναν κλώνο. Το σύνολο των κλώνων είναι η γονιδιωματική βιβλιοθήκη.

Τι περιέχει κάθε κλώνος
ένα κομμάτι του DNA του δότη: ολόκληρο γονίδιο, μέρος γονιδίου ή DNA που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη

Εσώνια και υποκινητές
υπάρχουν, αφού κλωνοποιείται το ίδιο το DNA του δότη

Από ποιο κύτταρο
είναι ίδια από όποιο σωματικό κύτταρο του οργανισμού κι αν φτιαχτεί, γιατί όλα έχουν το ίδιο DNA

Πόσα πλασμίδια, πόσοι κλώνοι
Κάθε κομμάτι του δότη ενσωματώνεται σε ξεχωριστό πλασμίδιο και κάθε βακτήριο παίρνει ένα πλασμίδιο. Για να μπει ένα κομμάτι σε πλασμίδιο πρέπει να έχει μονόκλωνα άκρα **και στις δύο** πλευρές του.

6 cDNA βιβλιοθήκη

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς κάθε κυτταρικός τύπος εκφράζει μόνο ορισμένα γονίδια. Αν θέλουμε να κλωνοποιήσουμε **μόνο τα γονίδια που εκφράζονται** σε συγκεκριμένα κύτταρα, φτιάχνουμε cDNA βιβλιοθήκη. Αυτή περιέχει αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά. Πλεονέκτημά της είναι ότι απομονώνονται μόνο οι αλληλουχίες που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή τα εξώνια.

Παράδειγμα: για το γονίδιο της β-πολυπεπτιδικής αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης παίρνουμε mRNA από πρόδρομα ερυθροκύτταρα, όπου το γονίδιο εκφράζεται έντονα.

1. Απομονώνονται τα κύτταρα στα οποία εκφράζεται το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.

2. Απομονώνεται το ολικό **ώριμο mRNA** των κυττάρων αυτών.

3. Με καλούπι το mRNA, η **αντίστροφη μεταγραφάση** συνθέτει συμπληρωματικές αλυσίδες DNA (cDNA). Προκύπτουν υβριδικά μόρια mRNA–cDNA.

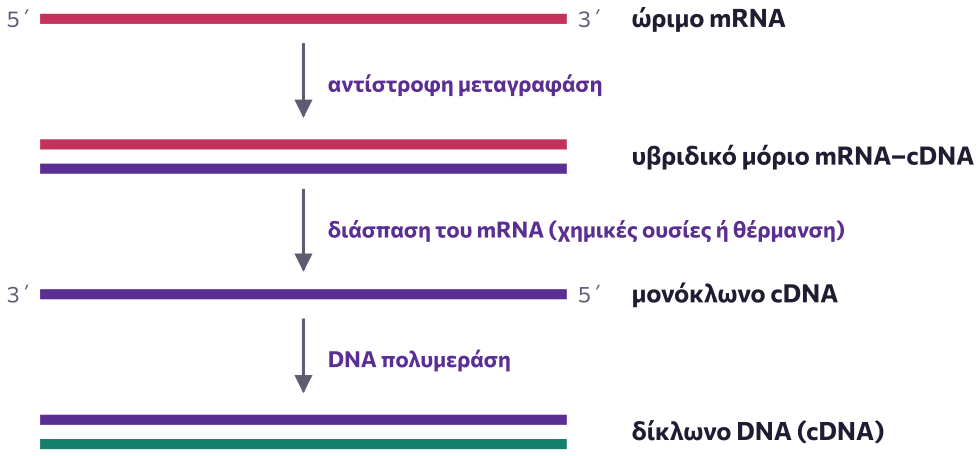
4. Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή απομακρύνεται με θέρμανση, και μένουν μονόκλωνες αλυσίδες cDNA.

5. Με καλούπι το cDNA, η **DNA πολυμεράση** συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα. Προκύπτουν δίκλωνα μόρια DNA.

6. Τα δίκλωνα μόρια εισάγονται σε πλασμίδια (ή σε DNA φάγων) με περιοριστική ενδονουκλεάση και DNA δεσμάση.

7. Τα βακτήρια-ξενιστές μετασχηματίζονται, καλλιεργούνται με αντιβιοτικό και επιλέγονται.

8. Οι κλώνοι που προκύπτουν είναι η cDNA βιβλιοθήκη.



Το δίκλωνο cDNA έχει όσα ζεύγη βάσεων έχει νουκλεοτίδια το ώριμο mRNA.

Προσοχή

Η cDNA βιβλιοθήκη **διαφέρει από ιστό σε ιστό** και από στάδιο σε στάδιο ανάπτυξης, γιατί κάθε κυτταρικός τύπος εκφράζει άλλα γονίδια. Το cDNA δεν περιέχει εσώνια, υποκινητή ή άλλες αλληλουχίες που δεν μεταγράφονται, περιέχει όμως τις 5′ και 3′ αμετάφραστες περιοχές του mRNA.

Γιατί cDNA για ανθρώπινες πρωτεΐνες σε βακτήρια

Τα βακτήρια δεν έχουν μηχανισμό ωρίμανσης. Αν πάρουν το γονίδιο με τα εσώνιά του, θα τα μεταφράσουν και η πρωτεΐνη θα βγει λάθος. Το cDNA περιέχει μόνο την πληροφορία των εξωνίων, οπότε το βακτήριο φτιάχνει τη σωστή πολυπεπτιδική αλυσίδα.

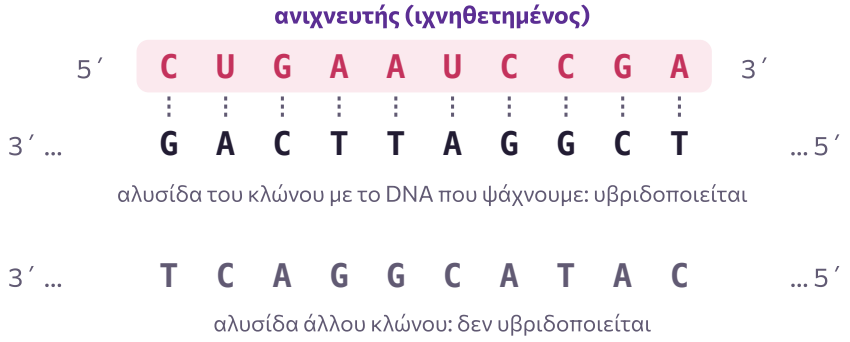
7 Αποδιάταξη, υβριδοποίηση και ανιχνευτές

Μια βιβλιοθήκη έχει χιλιάδες κλώνους. Για να βρούμε εκείνον που περιέχει το κομμάτι DNA που μας ενδιαφέρει, αξιοποιούμε τη συμπληρωματικότητα των βάσεων.

Αποδιάταξη
με θέρμανση ή κατάλληλες χημικές ουσίες σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου και οι δύο αλυσίδες αποχωρίζονται, χωρίς να καταστραφούν

Υβριδοποίηση
σε κατάλληλες συνθήκες, μονόκλωνες συμπληρωματικές αλυσίδες DNA, ή DNA με RNA, συνδέονται ξανά μεταξύ τους

1. Φτιάχνεται ένας **ανιχνευτής**: ιχνηθετημένο μονόκλωνο μόριο DNA ή RNA με αλληλουχία συμπληρωματική προς το DNA που ψάχνουμε.
2. Το DNA των κλώνων της βιβλιοθήκης αποδιατάσσεται.
3. Οι ανιχνευτές αναμειγνύονται με το αποδιαταγμένο DNA και υβριδοποιούν **μόνο** το συμπληρωματικό τους DNA.
4. Η ιχνηθέτηση δείχνει ποιος κλώνος περιέχει το επιθυμητό τμήμα. Ο κλώνος αυτός απομονώνεται και καλλιεργείται.



Ο ανιχνευτής πρέπει να είναι συμπληρωματικός και αντιπαράλληλος με την αλυσίδα που υβριδοποιεί.

Κόλπο για τις ασκήσεις

Ένας ανιχνευτής με ίδια αλληλουχία με την κωδική αλυσίδα (ή με το mRNA) υβριδοποιεί τη μη κωδική. Ένας συμπληρωματικός και αντιπαράλληλος προς την κωδική υβριδοποιεί την κωδική. Όσο λιγότερους δεσμούς υδρογόνου έχει ένα δίκλωνο μόριο (περισσότερα ζεύγη A–T), τόσο ευκολότερα αποδιατάσσεται.

---

8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR επιτρέπει να αντιγράψουμε **επιλεκτικά**, εκατομμύρια φορές, ειδικές αλληλουχίες DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, **χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών κυττάρων**. Άρχισε να εφαρμόζεται ευρέως το 1985 και αύξησε πολύ την ευαισθησία των γενετικών αναλύσεων.

Εφαρμογές

Ιατρική
διάγνωση ασθενειών, όπως το AIDS

Εγκληματολογία
διαλεύκανση υποθέσεων από ελάχιστες ποσότητες αίματος ή άλλων ιστών

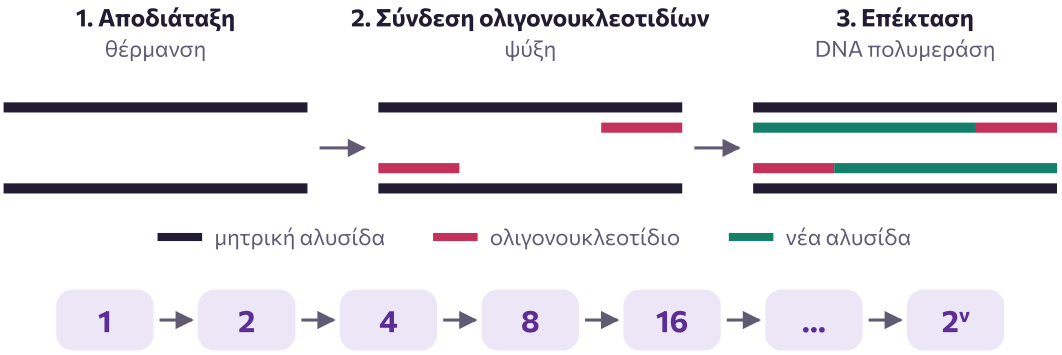
Μελέτη απολιθωμάτων
ανάλυση DNA από απολιθώματα

Πώς γίνεται

Πρέπει να γνωρίζουμε την αλληλουχία στα άκρα του τμήματος που θέλουμε να αντιγράψουμε. Με βάση αυτήν συντίθενται δύο μικρά **ολιγονουκλεοτίδια**, συμπληρωματικά προς τα άκρα κάθε αλυσίδας. Στον δοκιμαστικό σωλήνα μπαίνουν το DNA, τα ολιγονουκλεοτίδια, ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια και μια DNA πολυμεράση ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες.

1. **Αποδιάταξη.** Ο σωλήνας θερμαίνεται και οι δύο αλυσίδες του DNA αποχωρίζονται.
2. **Σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδίων.** Ο σωλήνας ψύχεται και τα ολιγονουκλεοτίδια ζευγαρώνουν με τις συμπληρωματικές περιοχές κάθε αλυσίδας.
3. **Επέκταση.** Η DNA πολυμεράση ξεκινά από τα ολιγονουκλεοτίδια και συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα.

Τα τρία βήματα είναι ένας κύκλος και διαρκούν λίγα λεπτά. Σε κάθε κύκλο ο αριθμός των μορίων διπλασιάζεται.



μόρια DNA μετά από κάθε κύκλο (ξεκινώντας από ένα μόριο)

Μετά από ν κύκλους, από κάθε αρχικό μόριο υπάρχουν 2^{ν} μόρια.

Κόλπο για τις ασκήσεις

Μόρια μετά από ν κύκλους = αρχικά μόρια × 2^{ν}. Τα νέα μόρια είναι $2^{\nu} - 1$ για κάθε αρχικό, άρα νουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν = $(2^{\nu} - 1)$ × νουκλεοτίδια του μορίου. Οι βάσεις του αρχικού μορίου βρίσκονται διαιρώντας τις βάσεις του τελικού προϊόντος με 2^{ν}.

Προσοχή

Η PCR χρειάζεται καλούπι **DNA**. Για να μελετηθεί το γενετικό υλικό ενός RNA ιού πρέπει πρώτα να συντεθεί cDNA με αντίστροφη μεταγραφάση και μετά να εφαρμοστεί η PCR. Στον σωλήνα δεν υπάρχουν επιδιορθωτικά ένζυμα, οπότε ένα λάθος της πολυμεράσης παραμένει στα αντίγραφα.

9 Συγκρίσεις

Γονιδιωματική και cDNA βιβλιοθήκη

Κριτήριο	Γονιδιωματική	cDNA
Τι περιέχει	Το συνολικό DNA του οργανισμού-δότη.	Αντίγραφα των mRNA των γονιδίων που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα.
Αρχικό υλικό	Το DNA του δότη.	Το ολικό ώριμο mRNA των κυττάρων.
Αριθμός κλώνων	Πολύ μεγάλος.	Μικρότερος, γι' αυτό είναι πιο εύχρηστη.

Κριτήριο	Γονιδιωματική	cDNA
Τι υπάρχει σε κάθε κλώνο	Ολόκληρα γονίδια, τμήματα γονιδίων ή DNA που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες.	Η πληροφορία ενός γονιδίου που εκφράζεται.
Εσώνια, υποκινητές	Υπάρχουν.	Δεν υπάρχουν. Μόνο εξώνια.
Ένζυμα	Περιοριστική ενδονουκλεάση και DNA δεσμάση.	Επιπλέον αντίστροφη μεταγραφάση και DNA πολυμεράση.
Από κύτταρο σε κύτταρο	Ίδια για όλα τα σωματικά κύτταρα του οργανισμού.	Διαφορετική σε κάθε κυτταρικό τύπο.
Παραγωγή ευκαρυωτικής πρωτεΐνης σε βακτήρια	Ακατάλληλη, λόγω εσωνίων.	Κατάλληλη.

Πλασμίδια και DNA φάγου λ ως φορείς κλωνοποίησης

Κριτήριο	Πλασμίδιο	DNA φάγου λ
Τι είναι	Κυκλικό δίκλωνο DNA βακτηρίων.	Το DNA ενός ιού που προσβάλλει βακτήρια.
Μέγεθος ξένου DNA	Μικρότερα κομμάτια.	Μεγαλύτερα κομμάτια.
Πού ταιριάζει	Οργανισμοί με μικρό γονιδίωμα.	Οργανισμοί με μεγάλο γονιδίωμα.
Είσοδος στο βακτήριο	Με μετασχηματισμό.	Ο φάγος μολύνει το βακτήριο.
Διαδικασία	Κοπή με το ίδιο ένζυμο, DNA δεσμάση, εισαγωγή σε ξενιστή.	Παρόμοια.

Κλωνοποίηση σε βακτήρια και PCR

Κριτήριο	Κλωνοποίηση	PCR
Πού γίνεται	Μέσα σε ζωντανά κύτταρα-ξενιστές.	Σε δοκιμαστικό σωλήνα.
Τι χρειάζεται	Φορέα, περιοριστική ενδονουκλεάση, DNA δεσμάση, ξενιστές.	Ολιγονουκλεοτίδια, θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, νουκλεοτίδια.
Τι πρέπει να ξέρουμε	Τίποτα για την αλληλουχία. Ο κλώνος βρίσκεται μετά με ανιχνευτή.	Την αλληλουχία στα άκρα του τμήματος.
Χρόνος	Ημέρες.	Λίγες ώρες.
Διόρθωση λαθών	Λειτουργούν τα επιδιορθωτικά ένζυμα του κυττάρου.	Δεν υπάρχουν επιδιορθωτικά ένζυμα.

Τα ένζυμα του κεφαλαίου

Ένζυμο	Τι κάνει	Πού χρησιμοποιείται
Περιοριστική ενδονουκλεάση	Κόβει το δίκλωνο DNA σε ειδική αλληλουχία. Σπάει φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.	Κοπή του DNA του δότη και του φορέα.
DNA δεσμάση	Σχηματίζει φωσφοδιεστερικούς δεσμούς ανάμεσα σε τμήματα DNA.	Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA.
Αντίστροφη μεταγραφάση	Συνθέτει DNA με καλούπι RNA.	Σύνθεση cDNA από ώριμο mRNA.
DNA πολυμεράση	Συνθέτει DNA με καλούπι DNA.	Δεύτερη αλυσίδα του cDNA, PCR.

10 Αυτοέλεγχος

1. Η EcoRI κόβει κάθε αλυσίδα της αλληλουχίας 5΄-GAATTC-3΄ ανάμεσα:

α) στο A και το T
β) στο G και το A
γ) στο T και το C
δ) στα δύο T

2. Ο φυσιολογικός ρόλος των περιοριστικών ενδονουκλεασών είναι:

α) η αντιγραφή του DNA του βακτηρίου
β) η προστασία του βακτηρίου από ξένο DNA
γ) η σύνθεση πλασμιδίων
δ) η επιδιόρθωση του DNA

3. Ποιο ένζυμο ενώνει το DNA του δότη με το πλασμίδιο;

α) Η περιοριστική ενδονουκλεάση
β) Η DNA πολυμεράση
γ) Η DNA δεσμάση
δ) Η αντίστροφη μεταγραφάση

4. Η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στο βακτήριο λέγεται:

α) κλωνοποίηση
β) υβριδοποίηση
γ) αποδιάταξη
δ) μετασχηματισμός

5. Τα βακτήρια-ξενιστές πριν από τον μετασχηματισμό πρέπει:

α) να έχουν πλασμίδια και να είναι ανθεκτικά
β) να μην έχουν πλασμίδια και να είναι ευαίσθητα στο αντιβιοτικό
γ) να έχουν περιοριστικές ενδονουκλεάσες
δ) να περιέχουν το γονίδιο που ψάχνουμε

6. Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει:

α) μόνο τα γονίδια που εκφράζονται
β) μόνο τα εξώνια
γ) το συνολικό DNA του οργανισμού-δότη
δ) μόνο τα mRNA ενός ιστού

7. Το cDNA συντίθεται με καλούπι:

α) το πρόδρομο mRNA
β) το ώριμο mRNA
γ) τη μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου
δ) ένα πλασμίδιο

8. Για να παραχθεί ανθρώπινη πρωτεΐνη από βακτήρια προτιμάμε cDNA βιβλιοθήκη, γιατί:

α) είναι φθηνότερη
β) τα βακτήρια δεν κάνουν ωρίμανση και το cDNA δεν έχει εσώνια
γ) το cDNA είναι μονόκλωνο
δ) το cDNA έχει δικό του υποκινητή

9. Η αποδιάταξη του DNA σπάει:

α) φωσφοδιεστερικούς δεσμούς
β) πεπτιδικούς δεσμούς
γ) δεσμούς υδρογόνου
δ) όλους τους δεσμούς του μορίου

10. Ένας ανιχνευτής υβριδοποιεί μια αλυσίδα DNA όταν είναι:

α) ίδιος με αυτήν
β) συμπληρωματικός και αντιπαράλληλος με αυτήν
γ) συμπληρωματικός και παράλληλος με αυτήν
δ) μεγαλύτερος από αυτήν

11. Η PCR γίνεται:

α) μέσα σε βακτήρια
β) μέσα σε ευκαρυωτικά κύτταρα
γ) σε δοκιμαστικό σωλήνα, χωρίς ζωντανά κύτταρα
δ) μόνο με RNA ως καλούπι

12. Από ένα δίκλωνο μόριο DNA, μετά από 6 κύκλους PCR, υπάρχουν:

α) 12 μόρια
β) 32 μόρια
γ) 36 μόρια
δ) 64 μόρια

Απαντήσεις

1. **β)** Κόβει μεταξύ G και A, με κατεύθυνση 5΄→3΄, και αφήνει μονόκλωνα άκρα AATT.
2. **β)** Παράγονται από βακτήρια και κόβουν το DNA που εισβάλλει, π.χ. το DNA φάγων.

3. **γ)** Η DNA δεσμάση σχηματίζει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς αφού ζευγαρώσουν τα μονόκλωνα άκρα.
4. **δ)** Τα τοιχώματα του βακτηρίου γίνονται παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια.
5. **β)** Έτσι στο αντιβιοτικό επιβιώνουν μόνο όσα πήραν πλασμίδιο.
6. **γ)** Είναι το σύνολο των βακτηριακών κλώνων με όλο το DNA του δότη, κομμένο σε τμήματα.
7. **β)** Γι' αυτό δεν έχει εσώνια. Η σύνθεση γίνεται από την αντίστροφη μεταγραφάση.
8. **β)** Ένα γονίδιο με εσώνια δεν θα έδινε σωστή πρωτεΐνη σε βακτήριο.
9. **γ)** Οι αλυσίδες αποχωρίζονται αλλά μένουν ανέπαφες.
10. **β)** Η συμπληρωματικότητα δεν αρκεί. Χρειάζεται και αντίθετος προσανατολισμός.
11. **γ)** Αυτή είναι η βασική διαφορά της από την κλωνοποίηση σε βακτήρια.
12. **δ)** Σε κάθε κύκλο τα μόρια διπλασιάζονται: $2^6 = 64$.

Σημειώσεις Βιολογίας Προσανατολισμού Γ΄ Λυκείου. Κεφάλαιο 4.