

ΓΕΝΙΚΑ

1. Κλωνοποίηση γίνεται και με τις βιβλιοθήκες και με την PCR. Στην πρώτη περίπτωση το κλωνοποιημένο τμήμα βρίσκεται μέσα σε ζωντανό κύτταρο και αν είναι γονίδιο (στη cDNA βιβλιοθήκη) **μπορεί να εκφραστεί**. Η κλωνοποίηση είναι απαραίτητη για τη μελέτη ενός μορίου DNA (π.χ. τον προσδιορισμό της αλληλουχίας βάσεων του)



"...and these soya beans were engineered using human DNA."

2. Το προς κλωνοποίηση τμήμα καθώς και ο φορέας κλωνοποίησης πρέπει να κοπούν με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση

3. Το γονίδιο ή το επιθυμητό τμήμα DNA που προορίζεται δεν πρέπει να κόβεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση στο

εσωτερικό του ή στον υποκινητή του (εκτός και αν υπάρχει άλλος υποκινητής στο πλασμίδιο φορέα)

4. Υπάρχουν πολλές περιοριστικές ενδονουκλεάσες και όχι μόνο η EcoRI. Όλες οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες «σπάζουν» **2 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς** αλλά ο **αριθμός των δεσμών υδρογόνου ποικίλει** ανάλογα με την περιοριστική. Υπολογίζουμε τα ζεύγη αζωτούχων βάσεων που σπάζουν. Ειδικά για την EcoRI σπάζουν 8 δεσμοί υδρογόνου (4 ζεύγη A-T) βιβλιοθήκης είναι:
5. Όταν το προς κλωνοποίηση τμήμα συνδέεται με το φορέα σχηματίζονται **διπλάσιοι** φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και δεσμοί υδρογόνου αντίστοιχα.
6. Όταν ένα **κυκλικό** τμήμα κόβεται **n φορές** από μία περιοριστική ενδονουκλεάση προκύπτουν **n κομμάτια**. Αν το τμήμα είναι **γραμμικό** προκύπτουν **n+1 κομμάτια**
7. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης είναι: η αντίστροφη μεταγραφάση, η DNA πολυμεράση, περιοριστικές ενδονουκλεάσες, DNA δεσμάση
8. Καλό είναι να κάνουμε σχήματα που διευκολύνουν τη λύση της άσκησης. Γράφουμε το προς κλωνοποίηση τμήμα μετά τη δράση της περιοριστικής και μετά τη σύνδεσή του με το φορέα π.χ.

Με EcoRI: αρχικά

| | | |
|----|---|----|
| 5' | AATTCGGGGGAGAGTGTG.....CCC ACTG | 3' |
| 3' | GC CCCC TCTC AC AC.....GGGTGACTTAA | 5' |

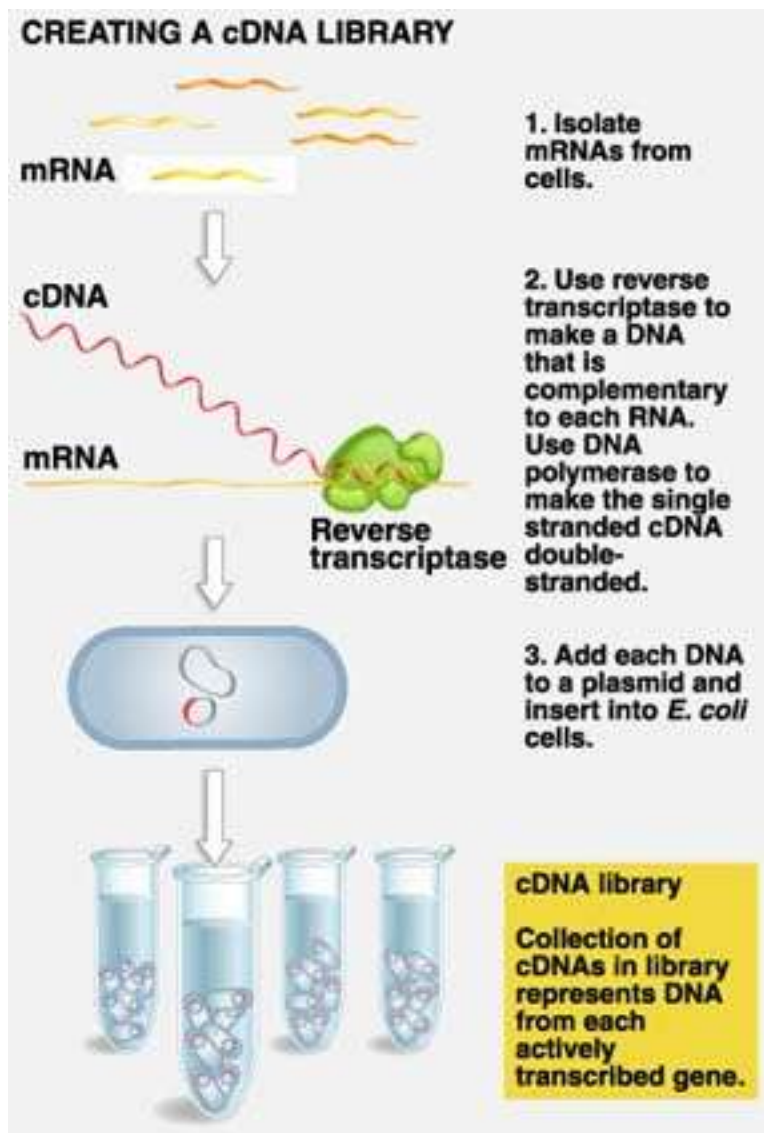
μετά τη σύνδεση με το φορέα

| | | |
|----|--|----|
| 5' | ..GAATTCGGGGGAGAGTGTG.....CCC ACTGAATTC .. | 3' |
| 3' | ..CTT AAGC CCCC TCTC AC AC.....GGGTGACTTAAAG .. | 5' |

προσοχή:

1. Στο βιβλίο λέει ότι με το αντιβιοτικό επιλέγουμε τα βακτήρια που περιέχουν ανασυνδυασμένο DNA. Στην πραγματικότητα επιλέγουμε τα βακτήρια που μετασηματίστηκαν και φέρουν είτε σκέτο πλασμίδιο είτε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο
2. Προσοχή στη λάθος έκφραση «τα πλασμίδια είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά». **Τα πλασμίδια δεν είναι ευαίσθητα ή ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, απλά φέρουν** γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά καθιστώντας τα βακτήρια που τα φέρουν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.

3. Πολλές φορές σε ασκήσεις με αλληλουχία βάσεων μας δίνουν έμμεσα τον προσανατολισμό της λέγοντάς μας ότι το συγκεκριμένο τμήμα κόβεται με EcoRI. Το **5' άκρο** βρίσκεται από τη μεριά του **G** (5' GAATTC 3' / 3' CTTAAG 5')



ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ

ΦΟΡΕΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

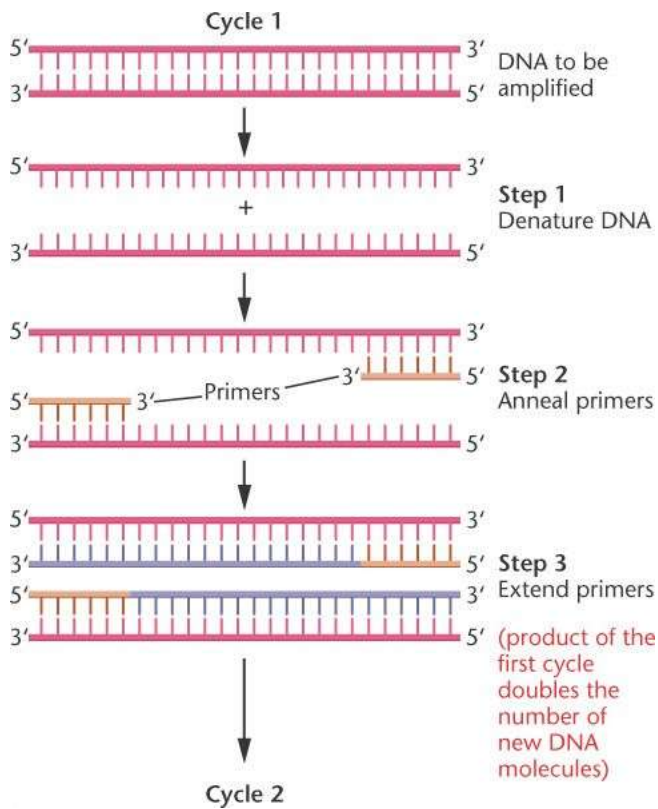
1. Το πλασμίδιο φορέας πρέπει να κόβεται μόνο μια φορά από την περιοριστική ενδονουκλεάση
2. Το πλασμίδιο φορέας πρέπει να φέρει ένα τουλάχιστον γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό
3. Το πλασμίδιο φορέας δεν πρέπει να κόβεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση στη θέση έναρξης της αντιγραφής γιατί τότε χάνει την ικανότητά του να αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα μέσα στον ξενιστή
4. Το πλασμίδιο φορέας δεν πρέπει να κόβεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό (γιατί τότε αυτό απενεργοποιείται) ΕΚΤΟΣ και αν υπάρχει και 2^ο γονίδιο ανθεκτικότητας. Σ' αυτή μάλιστα την περίπτωση μπορούμε να επιλέξουμε ευκολότερα τα μετασηματισμένα βακτήρια με ανασυνδυασμένο

πλασμίδιο, από αυτά με ΜΗ ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. (τελευταία άσκηση σχολικού στο κεφάλαιο 4)

ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ ΞΕΝΙΣΤΗ

1. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές δεν πρέπει να διαθέτουν πλασμίδια. Βασικά δεν ενδιαφέρει τόσο να μην έχουν πλασμίδια, αλλά να μην έχουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό για το οποίο φέρει το πλασμίδιο φορέας γονίδιο ανθεκτικότητας
2. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές δεν πρέπει να φέρουν περιοριστικές ενδονουκλεάσες που να κόβουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

PCR



1. Είναι και αυτή μια μέθοδος κλωνοποίησης *in vitro* χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου και με διαφορετικές εφαρμογές. Περιλαμβάνει 3 διαφορετικά στάδια (ένας κύκλος) που επαναλαμβάνονται n φορές (n κύκλοι αντιγραφής). Το **πρώτο στάδιο** περιλαμβάνει την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA με κατάλληλη θερμοκρασία, το **δεύτερο στάδιο** περιλαμβάνει την σύνδεση των **έτοιμων πρωταρχικών τμημάτων** (που τοποθετούνται στο σωληνάκι και επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να πολλαπλασιαστεί μόνο το επιθυμητό τμήμα) και το **τρίτο στάδιο** που είναι το στάδιο αντιγραφής του επιθυμητού τμήματος. Για να γίνει αντιγραφή έχει προστεθεί στο σωληνάκι επαρκής ποσότητα της θερμοανθεκτικής **DNA πολυμεράσης** Taq.

2. Ο αριθμός των αντιγράφων μετά από ένα αριθμό κύκλων είναι συγκεκριμένος και δίνεται από τον τύπο: $N_t = N_0 \cdot 2^n$

όπου N_t : ο τελικός αριθμός αντιγράφων μετά από χρόνο t

N_0 : ο αρχικός αριθμός αντιγράφων (συνήθως 1)

n : οι κύκλοι αντιγραφής

t : ο συνολικός χρόνος (= n **επί** το χρόνο του κάθε κύκλου)

π.χ. αν θέλω από 1 δίκλωνο DNA 90 αντίγραφα και κάθε κύκλος διαρκεί 30min θα πάρω αναγκαστικά 128 αντίγραφα γιατί $2^5=64$ και $2^6=128$ άρα θα χρειαστούν 6 κύκλοι άρα $6 \times 30=180$ λεπτά

