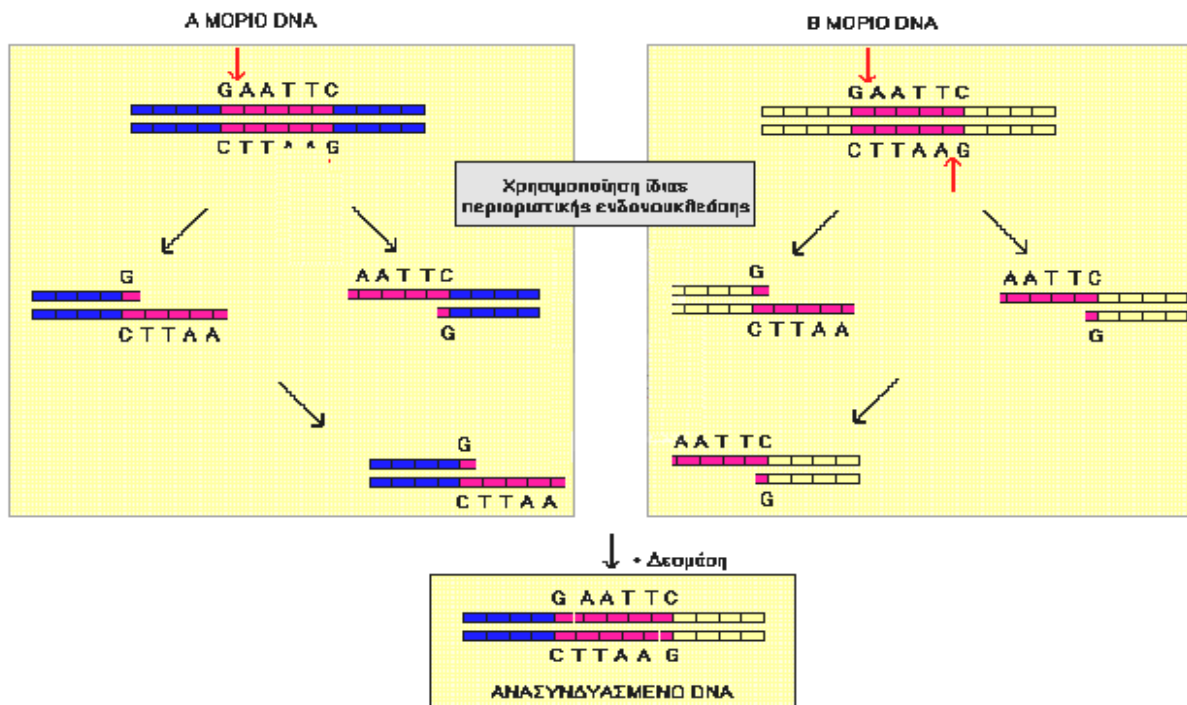


- Πώς δρουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες;

Οι περισσότερες από αυτές αναγνωρίζουν αλληλουχίες μήκους 4 ως 8 ζευγών βάσεων που παρουσιάζουν σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις ένα είδος συμμετρίας (η μισή αλληλουχία στον ένα κλώνο έχει σχέση αντικειμένου-ειδώλου με τη μισή αλληλουχία στον άλλο κλώνο) και αποτελούν παλίνδρομα, δηλαδή διαβάζονται με τον ίδιο τρόπο και προς τις δύο κατευθύνσεις. Τα σημεία κοπής του DNA σε κάθε κλώνο είναι επίσης συμμετρικά μεταξύ τους. Η πιο διαδεδομένη περιοριστική ενδονουκλεάση είναι η EcoRI που απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*.

Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI.

Αν χρησιμοποιηθεί η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, σε δύο διαφορετικά μόρια DNA, θα αναγνωρίσει και στα δύο την καθορισμένη γι' αυτήν αλληλουχία νουκλεοτιδίων και θα κόψει τα δύο μόρια, έτσι ώστε να έχουν συμπληρωματικά άκρα (χαρακτηρίζονται κολλώδη άκρα). Η σύνδεση των δύο άκρων που θα γίνει στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του ενζύμου δεσμάση DNA θα οδηγήσει στην παραγωγή ενός μορίου ανασυνδυασμένου DNA.



Εικόνα 2.

Διαδικασία παραγωγής μορίου ανασυνδυασμένου μορίου DNA. Εφ' όσον και τα δύο μόρια DNA A και B κοπούν από την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, τα 2 τμήματα που θα προκύψουν από κάθε είδος μορίου θα έχουν, τα ίδια άκρα μεταξύ τους.

- Πώς δρα η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI ;

1) Αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GAATTC-3'.

2) Κόβει και τις δύο αλυσίδες του DNA μεταξύ G και A, δηλ θραύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των νουκλεοτιδίων που έχουν G και των νουκλεοτιδίων που έχουν A.

- Ποιά είναι η σχέση του μήκους των θραυσμάτων του DNA μετά από δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης ;

Ο αριθμός των ζευγών νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζεται από κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση επηρεάζει τη συχνότητα με την οποία δρα το ένζυμο και συνεπώς το κατά μέσο όρο μήκος των θραυσμάτων που αποκόπτει σε ένα μόριο DNA. Η EcoRI για παράδειγμα δρα όπου αναγνωρίζει την αλληλουχία GAATTC. Επειδή κάθε νουκλεοτίδιο

μπορεί να υπάρχει σε ένα μόριο DNA με πιθανότητα $\frac{1}{4}$, η συγκεκριμένη αλληλουχία μπορεί να υπάρχει με πιθανότητα:

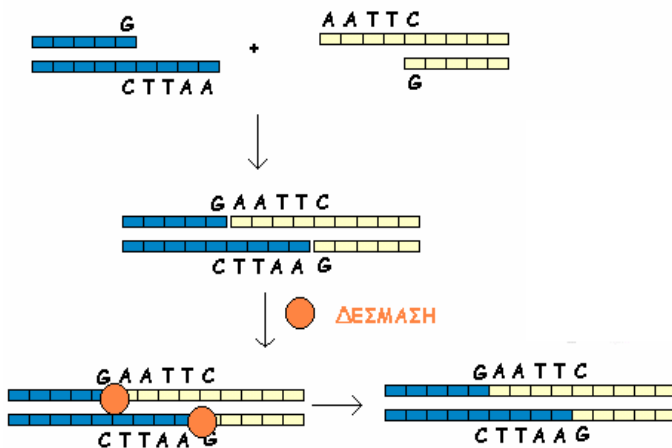
$\frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4}$ ή $\frac{1}{4096}$. Αυτό σημαίνει ότι η αλληλουχία αυτή υπάρχει κάθε 4096 νουκλεοτίδια, οπότε και η EcoRI θα δρα κατά μέσο όρο κάθε 4096 νουκλεοτίδια, οπότε αυτό θα είναι και κατά μέσο όρο το μήκος ενός θραύσματος που αποκόπτεται από ένα μόριο DNA όταν υποστεί την επίδραση της EcoRI. Αντίθετα μια άλλη περιοριστική ενδονουκλεάση που αναγνωρίζει μια αλληλουχία 4 ζευγών νουκλεοτιδίων θα δρα πολύ συχνότερα (με πιθανότητα $\frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4} = \frac{1}{256}$), οπότε θα αποκόπτε και τμήματα DNA μικρότερου μήκους.

- **Ποιά είναι η σημασία των περιοριστικών ενδονουκλεασών ;**

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες λόγω της ικανότητάς τους να κόβουν με εξαιρετική ακρίβεια τα μόρια του DNA σε καθορισμένα σημεία, έχουν γίνει τα αναντικατάστατα εργαλεία για την ανάλυση των χρωμοσωμάτων, την εύρεση των αλληλουχιών μεγάλων μορίων DNA, την απομόνωση γονιδίων και την σύνθεση νέων μορίων DNA που στη συνέχεια κλωνοποιούνται.

- **Πώς δρα η DNA δεσμάση;**

Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται αυθόρμητα μεταξύ των κολληδών άκρων δύο θραυσμάτων DNA, δεν είναι αρκετά ισχυροί, ώστε το ανασυνδυασμένο DNA να είναι σταθερό. Για το λόγο αυτό χρειάζεται η συνδρομή των δεσμασών, που θα ενώσουν με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς τα άκρα των κλώνων κάθε θραύσματος.



Εικόνα 3.

Δράση DNA δεσμάσης.

- **Ποιά είναι η διαφορά μεταξύ περιοριστικών ενδονουκλεασών και DNA δεσμάσης;**

Οι δύο κατηγορίες ενζύμων (περιοριστικές ενδονουκλεάσες και DNA δεσμάσες) που χρησιμοποιούνται μαζί για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μορίων DNA, εκτελούν την ακριβώς αντίθετη διαδικασία. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες σπάζουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, ενώ οι DNA δεσμάσες δημιουργούν

2^ο στάδιο: μεταφορά ανασυνδυασμένου DNA σε κύτταρο -ξενιστή

- **Ποια μόρια DNA χαρακτηρίζονται φορείς κλωνοποίησης;**

Φορέας απλώς ή φορέας κλωνοποίησης χαρακτηρίζεται κάθε μόριο DNA που μπορεί να ενσωματώσει ένα γονίδιο, ώστε να το μεταφέρει σε ένα κύτταρο ή οργανισμό δέκτη. Φορείς κλωνοποίησης είναι:

- 1) τα πλασμίδια των βακτηρίων
- 2) το DNA των ιών (φάγοι ³, αδενοϊοί ⁴).

³. Φάγος ή βακτηριοφάγος: ιός που έχει ως ξενιστή βακτήριο.

⁴. Αδενοϊός: ιός που έχει DNA ως γενετικό υλικό.

- Πού οφείλεται η ανάγκη χρησιμοποίησης φορέων κλωνοποίησης;

Η ανάγκη της χρησιμοποίησης φορέων πηγάζει από την ανικανότητα ενός γονιδίου που έχει εισαχθεί σε ένα κύτταρο να κάνει ο,τιδήποτε «από μόνο του»: Επειδή το γονίδιο δεν είναι μέρος του γονιδιώματος του κυττάρου στο οποίο εισάγεται:

Δεν μπορεί να διπλασιαστεί.
 Δεν μπορεί να εκφραστεί,
 και συνήθως διασπάται γρήγορα από τα ένζυμα του δέκτη.

- Ποιές είναι οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των φορέων κλωνοποίησης;

Όλα τα παραπάνω προβλήματα, αλλά και πολλά άλλα που σχετίζονται με τη δυνατότητα αναγνώρισης και εντοπισμού των κυττάρων που έχουν δεχτεί το ξένο γονίδιο ξεπερνιούνται με τη χρήση των φορέων, χάρη στις ακόλουθες ιδιότητες που έχουν:

1) Οι φορείς κόβονται από μια συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση σε μια μόνο θέση.

2) Οι φορείς είναι αρκετά μεγάλοι ώστε να μπορούν να ενσωματώνουν προς μεταφορά γονίδια.

3) Συνήθως είναι κυκλικά μόρια, ώστε η πιθανότητα διάσπασής τους από τα ένζυμα του δέκτη να περιορίζεται.

4) Γενικώς περιέχουν ρυθμιστικές αλληλουχίες όπως σημεία έναρξης της αντιγραφής, υποκινητές κ.α. ώστε να μπορούν να αντιγράφονται και να εκφράζονται.

5) Περιέχουν γονίδια δείκτες (π.χ. γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά), ώστε να διευκολύνεται ο εντοπισμός των κυττάρων που τους έχουν προσλάβει.

- Ποιές είναι οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των φορέων κλωνοποίησης;

| Τύπος φορέα | Μέγιστο μήκος DNA που μπορεί να ενσωματώσει |
|-------------------------------|---|
| Πλασμίδιο | 10 kbp |
| Ιός (Αδενοϊός, Βακτηριοφάγος) | 30kbp |

Ο όρος «διαμόλυνση» δεν υπάρχει στο βιβλίο, αλλά χρησιμοποιείται εδώ για να τονιστεί η χρησιμοποίηση των ιών ως φορέων κλωνοποίησης.

- Τι ονομάζεται μετασηματισμός και τι διαμόλυνση*;

Οι όροι μετασηματισμός και διαμόλυνση χρησιμοποιούνται για να αποδώσουν την μεταφορά ξένου γενετικού υλικού στο δέκτη

Μετασηματισμός είναι το αποτέλεσμα της μεταφοράς του ξένου γενετικού υλικού με τη χρησιμοποίηση πλασμιδίων ως φορέων σε βακτήρια. πλασμίδια → βακτήρια

Διαμόλυνση είναι το αποτέλεσμα της μεταφοράς του ξένου γενετικού υλικού με τη χρησιμοποίηση ιών ως φορέων σε ευκαρυωτικά κύτταρα. ιοί → ευκαρυωτικά κύτταρα

Η διαδικασία της διαμόλυνσης χρησιμοποιείται στην γονιδιακή θεραπεία γενετικών ασθενειών του ανθρώπου.

- Σε ποιές περιπτώσεις γονιδιακής θεραπείας βρίσκει εφαρμογή η χρήση ιών ως φορέων κλωνοποίησης (η διαμόλυνση) ;

Οι ιοί- φορείς έχουν ενσωματωμένο το φυσιολογικό ανθρώπινο γονίδιο.

| | Όνομασία ασθένειας | αίτιο | φορέας | κύτταρα-στόχοι | τύπος γονιδιακής θεραπείας |
|---|---|---|------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | Μορφή ανεπάρκειας του ανοσοποιητικού συστήματος | ενζύμο ADA (απαμινάση της αδενοσίνης) που παίρνει μέρος στον μεταβολισμό των πουρινών | ιός-φορέας | λεμφοκύτταρα | <i>ex vivo</i> ⁵ |
| 2 | Κυστική ίνωση | πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για την σωστή λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων των πνευμόνων | αδενοϊός | κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος | <i>in vivo</i> ⁶ |

- Ποιές είναι οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των ιών που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης;
Οι ιοί πριν τη χρησιμοποίησή τους ως φορείς γενετικού υλικού έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση ώστε να είναι ακίνδυνοι. Δύο κυρίως τύποι ιών χρησιμοποιούνται ως φορείς:

| Τύπος ιού | Λεπτομέρειες της δράσης τους |
|----------------------|---|
| Βακτηριοφάγοι | Οι ιοί των βακτηρίων. Είναι κατάλληλοι για τη μεταφορά μεγάλων γονιδίων σε καλλιέργειες βακτηρίων. |
| Αδενοϊοί | Ιοί που παρασιτούν στον άνθρωπο και προκαλούν αναπνευστικά νοσήματα όπως το κοινό κρυολόγημα. Είναι κατάλληλοι για τη μεταφορά γενετικού υλικού με τη μέθοδο της γονιδιακής θεραπείας . Πριν τη χρησιμοποίησή τους ως φορείς έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση ώστε να καταστούν ακίνδυνοι. Το γενετικό υλικό των αδενοϊών : είναι δίκλωνο γραμμικό μόριο DNA, δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου στο οποίο εισέρχονται, δεν αυτοδιπλασιάζεται, μπορεί όμως να εκφράζεται, (εκτός των γονιδίων που καθορίζουν την παραγωγή των πρωτεϊνών του καψιδίου τους, λόγω της γενετικής τροποποίησης που έχουν υποστεί). Συνεπώς μετά την εισαγωγή τους στο κύτταρο δέκτη δεν γίνεται συναρμολόγηση νέων ιών και το κύτταρο που τους έχει δεχτεί δεν λύεται, ενώ εκφράζει το ξένο γενετικό υλικό που μεταφέρουν. |

⁵ . *ex vivo*: επειδή τα κύτταρα-στόχοι τροποποιούνται έξω από τον οργανισμό και εισάγονται πάλι σ' αυτόν.

⁶ . *in vivo*: επειδή τα κύτταρα-στόχοι τροποποιούνται μέσα στον ζωντανό οργανισμό. Συγκεκριμένα η τροποποίηση πραγματοποιείται με ψεκασμό με τη βοήθεια βρογχοσκοπίου.

Βλέπε 9^ο Κεφάλαιο του σχολικού βιβλίου

- Δώστε ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πλασμιδίου που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης στην Βιοτεχνολογία

Το πλασμίδιο Ti, που φυσιολογικά υπάρχει στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*, χρησιμοποιείται για μεταφέρει διάφορα γονίδια σε φυτικά κύτταρα. Ένα από τα γονίδια αυτά είναι και το γονίδιο το υπεύθυνο για την παραγωγή μιας εντομοκτόνου τοξίνης που φυσιολογικά παράγεται από το εδαφόβιο βακτήριο *Bacillus thuringiensis*.

Τα μετασηματισμένα πλασμίδια Ti εισάγονται σε καλλιέργεια φυτικών κυττάρων, όπου και ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό των φυτών. Έτσι, τα φυτά μπορούν να παράγουν μόνα τους την εντομοκτόνο τοξίνη και να είναι ανθεκτικά στα διάφορα έντομα. Τα γενετικά τροποποιημένα αυτά φυτά αποτελούν τις ποικιλίες Bt.

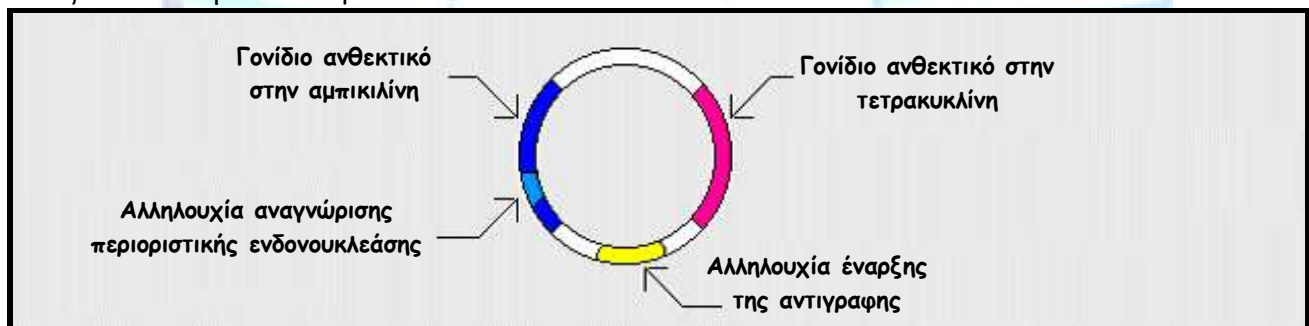
Σχηματικά έχουμε:

γονίδιο υπεύθυνο για παραγωγή τοξίνης του Bt → πλασμίδιο Ti → *φυτικά κύτταρα

ΠΡΟΣΟΧΗ . Το πλασμίδιο Ti εισάγεται σε φυτικά κύτταρα με τη βοήθεια του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* που μολύνει τα φυτά.

- Γιατί τα κύτταρα που πρόκειται να δεχθούν τους φορείς πρέπει προηγουμένως να υποστούν κατάλληλη επεξεργασία;

Το σχετικά μεγάλο μέγεθος των φορέων εμποδίζει τη διέλευση τους μέσω της μεμβράνης του κυττάρου που θα τους δεχτεί. Πρέπει συνεπώς η μεμβράνη των δεκτών να γίνει με κάποιο τρόπο διαπερατή στους φορείς. Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορες μεθόδους που εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου-δέκτη.



Εικόνα 4.

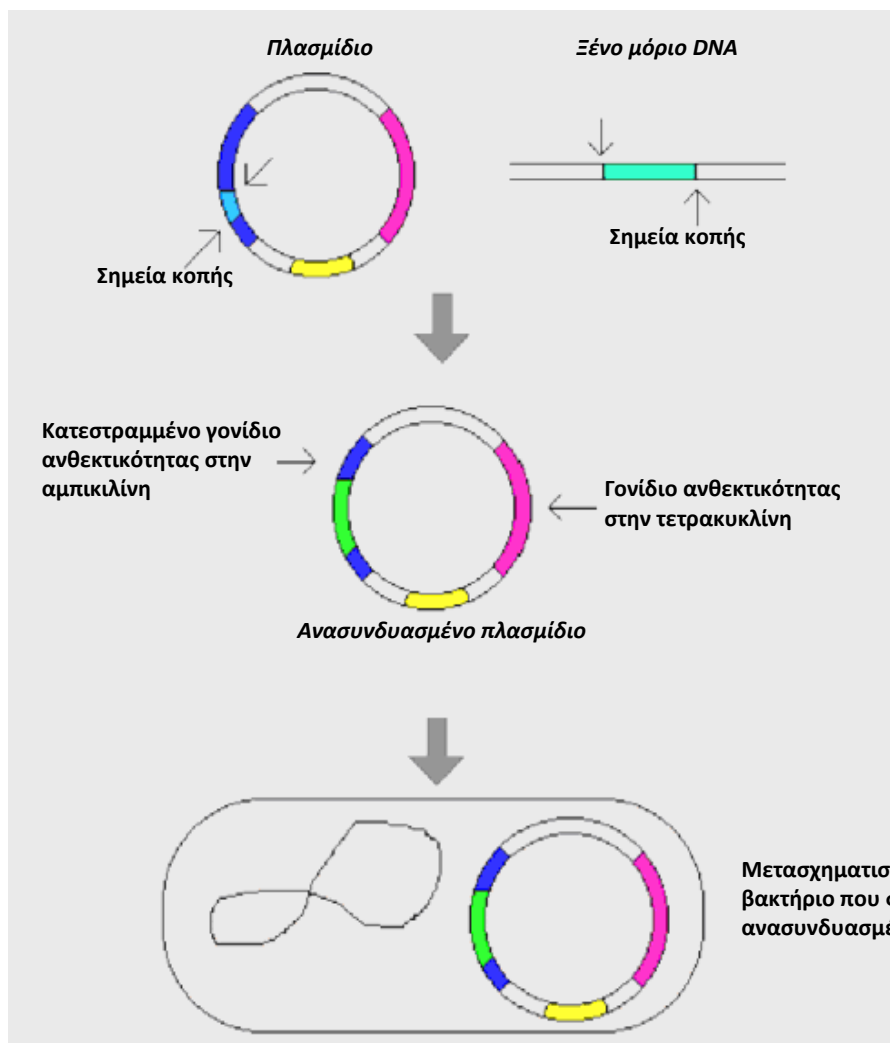
Πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για τον μετασηματισμό βακτηρίων. Περιέχει: 1) γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη και 2) γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, στο οποίο όμως υπάρχει αλληλουχία αναγνώρισης περιοριστικής ενδονουκλεάσης.

3^ο στάδιο: επιλογή και απομόνωση κύτταρων – ξενιστών που έχουν δεχθεί το ανασυνδυασμένο DNA

- Ποιά είναι η σημασία χρησιμοποίησης γενετικών δεικτών;

Η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA μέσω των φορέων (πλασμίδια, ιοί) στα κύτταρα ξενιστές, για διάφορους λόγους δεν είναι μια διαδικασία με 100% επιτυχία. Σε πολλά κύτταρα δεν εισάγεται καν ο φορέας, αλλά ακόμη και από αυτά στα οποία εισάγεται, ένα μικρό μόνο μέρος φέρει τελικώς το προς μεταφορά γενετικό υλικό. Είναι συνεπώς απαραίτητη η ύπαρξη δεικτών ώστε να εντοπίζονται

- α. τα κύτταρα που έχουν δεχθεί το φορέα και
- β. από αυτά όσα έχουν δεχθεί και το ξένο γενετικό υλικό.



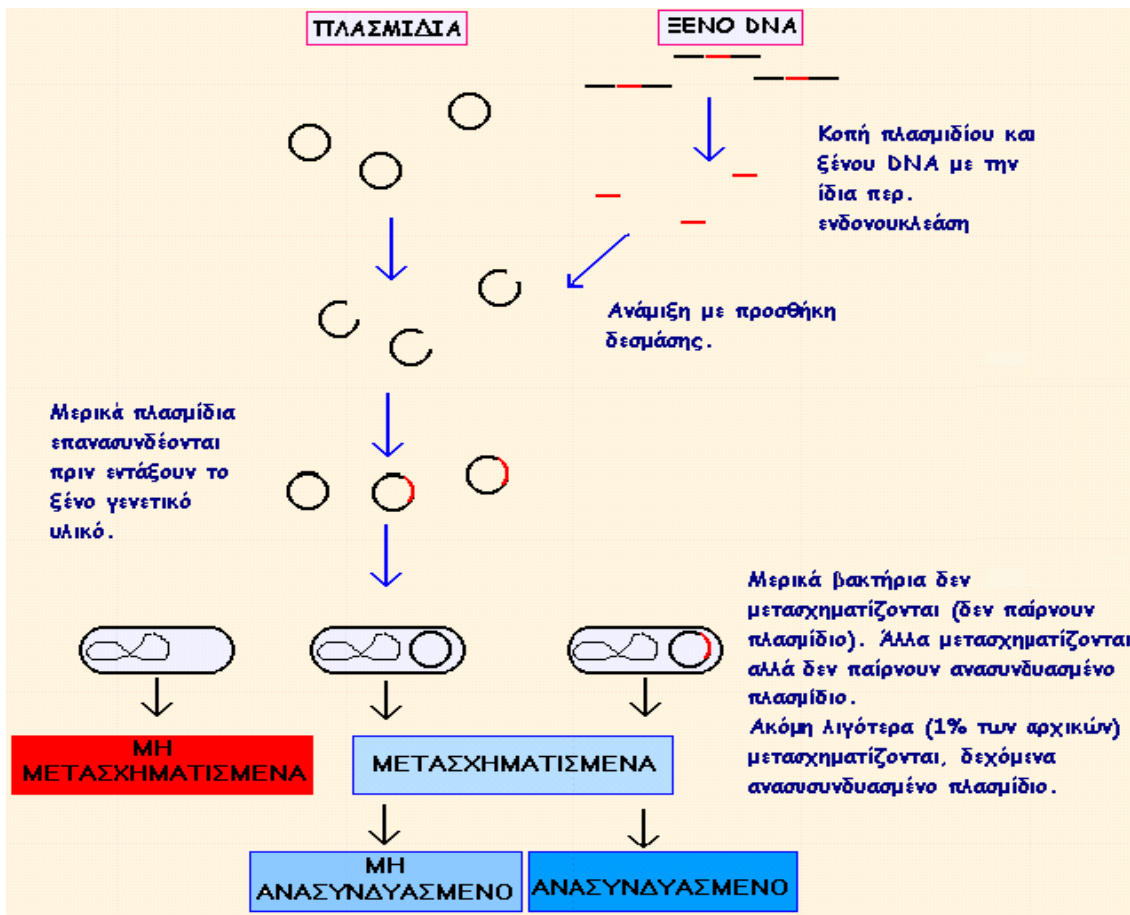
Εικόνα 5.

Σημασία των γενετικών δεικτών για τον εντοπισμό:

- 1) των μετασηματισμένων βακτηρίων (δείκτης ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνη)
- 2) των μετασηματισμένων και ανασυνδυασμένων βακτηρίων (δείκτης ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη).

• Πώς εντοπίζονται τα βακτήρια που έχουν μετασηματιστεί (δηλαδή έχουν δεχτεί ένα πλασμίδιο-φορέα);

Ένας κοινός γενετικός δείκτης για τον εντοπισμό των βακτηρίων που έχουν δεχτεί ένα πλασμίδιο-φορέα είναι ένα γονίδιο του πλασμιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη. Έτσι τα βακτήρια στα οποία εισάγεται το πλασμίδιο, «εισάγεται» και η ιδιότητα να επιβιώνουν παρουσία τετρακυκλίνης. Από την καλλιέργεια λοιπόν όλων των βακτηρίων στα οποία έγινε απόπειρα μετασηματισμού σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν τετρακυκλίνη, όσα επιβιώνουν είναι εκείνα στα οποία η εισαγωγή του πλασμιδίου ήταν επιτυχής.



Εικόνα 6.

Ποικιλομορφία του πληθυσμού των βακτηρίων που έχουν υποστεί την διαδικασία μεταφοράς ανασυνδυασμένου DNA.

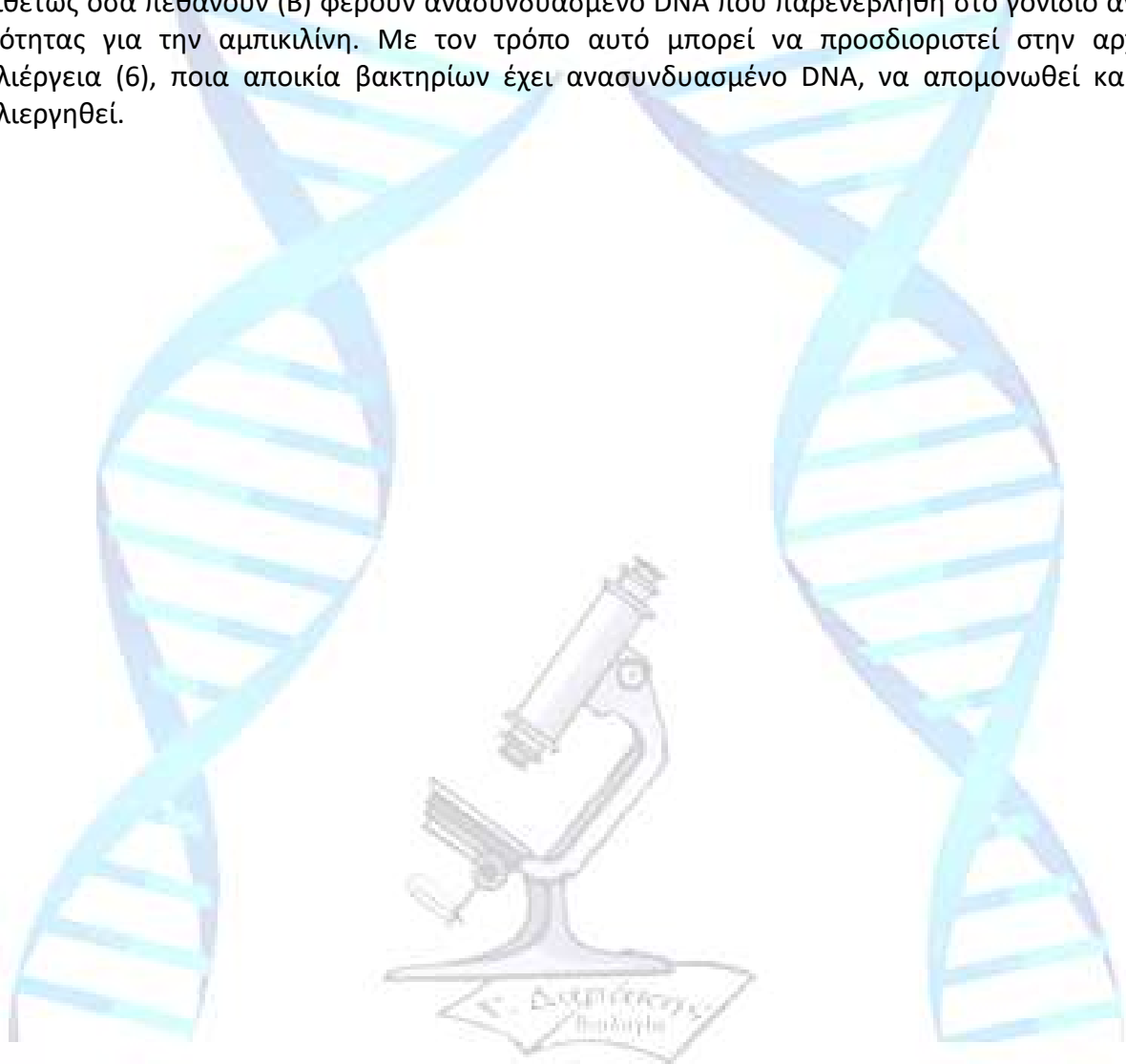
- Πώς εντοπίζονται τα βακτήρια που έχουν δεχτεί το πλασμίδιο-φορέα με το ξένο γενετικό υλικό; Σύμφωνα με τα παραπάνω, εντοπίζονται τα βακτήρια τα οποία μετασχηματίστηκαν και όχι εκείνα στα οποία το πλασμίδιο εισήγαγε το ξένο γενετικό υλικό. Για τον εντοπισμό αυτών των βακτηρίων απαιτείται η ύπαρξη ενός δεύτερου γενετικού δείκτη που είναι το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Το γονίδιο αυτό όμως περιέχει αλληλουχία αναγνώρισης περιοριστικής ενδονουκλεάσης.

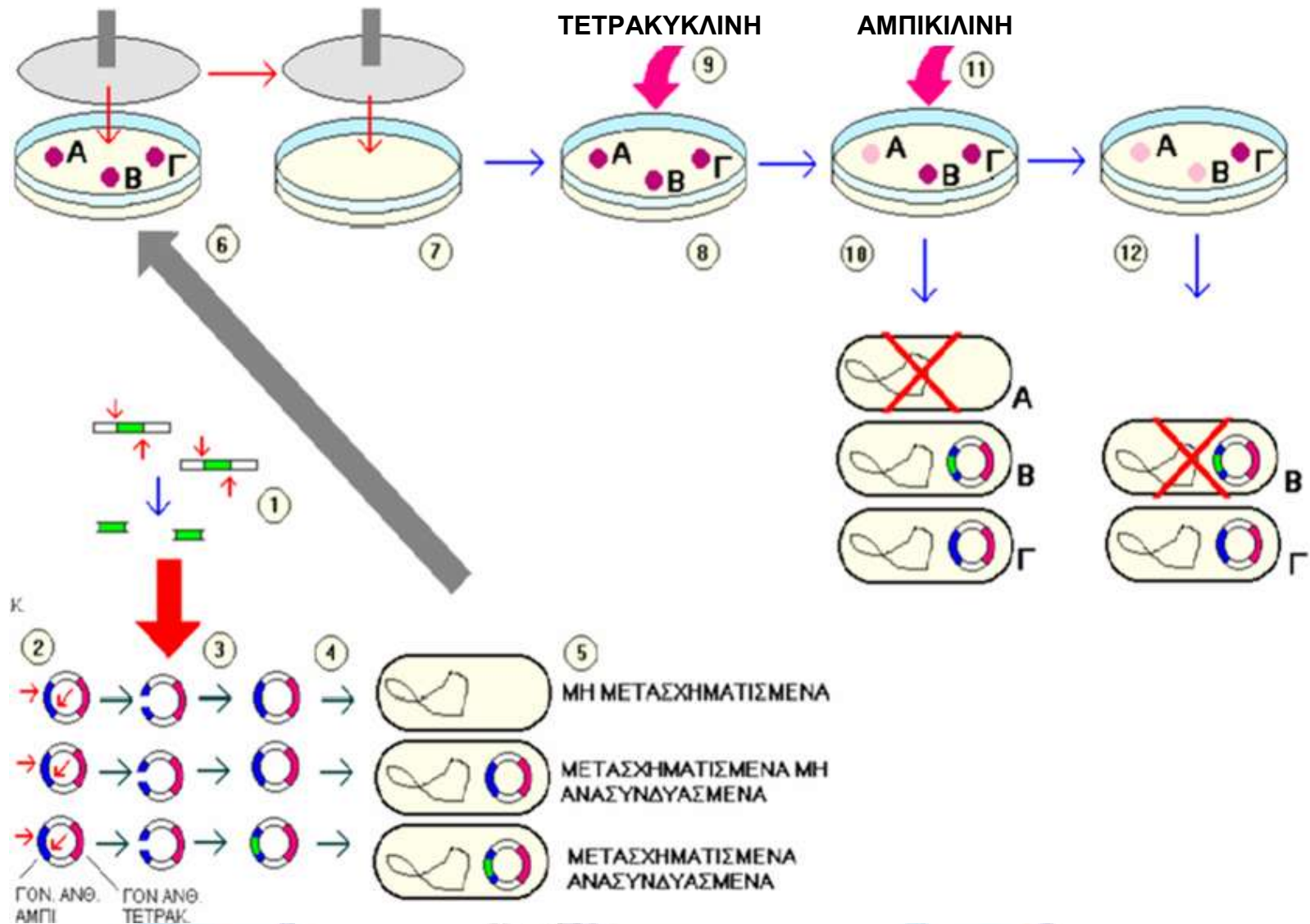
Καθώς το ξένο γενετικό υλικό εισάγεται μεταξύ των αλληλουχιών του γονιδίου για την ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, το γονίδιο καταστρέφεται, οπότε τα βακτήρια που έχουν προσλάβει ένα τέτοιο πλασμίδιο (ανασυνδυασμένο) δεν μπορούν να επιβιώσουν σε περιβάλλον με αμπικιλίνη και έτσι διακρίνονται απ' όσα μετασχηματίστηκαν (πήραν δηλ. πλασμίδιο αλλά όχι ανασυνδυασμένο) που επιβιώνουν, μια και σε αυτά το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη έχει παραμείνει άθικτο.

- Πώς γίνεται γενικά η επιλογή και απομόνωση κύτταρων-ξενιστών που έχουν δεχτεί το ανασυνδυασμένο DNA; **(Βλέπε εικόνα 7)**

Αν λοιπόν ακολουθηθούν οι διαδικασίες (1), (2), (3), (4), (5) του σχήματος (κοπή των δύο μορίων DNA με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, σύνδεση των τμημάτων που προκύπτουν με δεσμάση, εισαγωγή των πλασμιδίων στα βακτήρια) και τα βακτήρια καλλιεργηθούν (6) είναι δυνατή η παραγωγή μιας νέας καλλιέργειας που αποτελεί αντίγραφο της αρχικής. Η νέα καλλιέργεια μεταφέρεται ένα θρεπτικό υπόστρωμα που δεν έχει μικρόβια (7).

Αν στη νέα καλλιέργεια που έχει δημιουργηθεί (8) προστεθεί το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (9), τα βακτήρια που θα πεθάνουν (στο σχήμα επισημαίνονται με το γράμμα Α) θα είναι όσα δεν έχουν μετασηματιστεί ώστε να διαθέτουν γονίδιο ανθεκτικότητας για την τετρακυκλίνη (10). Αντίθετα αυτά που θα επιβιώσουν (Β, Γ) θα έχουν μετασηματιστεί και θα είναι δύο κατηγοριών: Όσα έχουν ανασυνδυασμένο DNA (έχουν κατεστραμμένο γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη) και όσα δεν έχουν ανασυνδυασμένο DNA (αν και πήραν πλασμίδιο δεν πήραν το ξένο γενετικό υλικό, οπότε έχουν άθικτο το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη). Προσθέτοντας στη καλλιέργεια αυτή αμπικιλίνη (11) μπορούμε να διακρίνουμε ποια αποικία βακτηρίων έχει ανασυνδυασμένο DNA. Τα βακτήρια που επιβιώνουν (Γ) δεν φέρουν ανασυνδυασμένο DNA καθώς το άθικτο γονίδιο ανθεκτικότητας για την αμπικιλίνη τους επιτρέπει να επιβιώσουν. Αντιθέτως όσα πεθάνουν (Β) φέρουν ανασυνδυασμένο DNA που παρενεβλήθη στο γονίδιο ανθεκτικότητας για την αμπικιλίνη. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσδιοριστεί στην αρχική καλλιέργεια (6), ποια αποικία βακτηρίων έχει ανασυνδυασμένο DNA, να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί.





Εικόνα 7.

Πως γίνεται η επιλογή και η απομόνωση των κυττάρων-ξενιστών (βακτηρίων) που έχουν δεχθεί το ανασυνδυασμένο DNA. Στα στάδια 6 και 7 γίνεται τοποθέτηση φίλτρου νιτροκυτταρίνης στην καλλιέργεια. Το φίλτρο παίρνει τα βακτήρια από τις διάφορες αποικίες και έτσι αντιγράφεται η καλλιέργεια.

4^ο στάδιο: Επιλογή και απομόνωση ξενιστών που περιέχουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA

- Τι είναι η αποδιάταξη και τι η υβριδοποίηση των ν. οξέων;

Η έκθεση του DNA σε υψηλή θερμοκρασία (100° C) ή σε πολύ ψηλό pH (≥ 13) προκαλεί την θραύση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τους δύο συμπληρωματικούς κλώνους και συνεπώς τον διαχωρισμό τους. Η διαδικασία αυτή που ονομάζεται αποδιάταξη είναι αντιστρεπτή. Συγκεκριμένα, οι δύο αποχωρισμένοι κλώνοι του DNA μπορούν να επανασυνδεθούν σε κατάλληλες συνθήκες ⁷. Παρόμοια σύνδεση μπορεί να γίνει μεταξύ οποιουδήποτε ζεύγους μονόκλωνων μορίων νουκλεϊκών οξέων (DNA/DNA, RNA/RNA, ή RNA/DNA), με την προϋπόθεση ότι οι κλώνοι τους είναι συμπληρωματικοί. Η παραγωγή τέτοιων δίκλωνων μορίων χαρακτηρίζεται υβριδοποίηση και έχει μεγάλη εφαρμογή στον εντοπισμό και την ανάλυση συγκεκριμένων αλληλουχιών σε μόρια DNA ή RNA.

- Τι είναι τα μόρια cDNA;

Τα μόρια cDNA είναι τα μόρια DNA που παράγονται με τη χρησιμοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης και ποσότητας δεοξυριβονουκλεοτιδίων, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο ένα συγκεκριμένο μόριο mRNA.

- Πώς κατασκευάζονται τα μόρια cDNA;

Βλέπε επίσης εικόνα 14

- 1) Στην αρχή με πρότυπο τον κλώνο ενός μορίου mRNA και με την αντίστροφη μεταγραφάση συντίθεται *in vitro*, ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA, το cDNA.
- 2) Το δίκλωνο υβριδικό μόριο που σχηματίζεται αποδιατάσσεται (με θέρμανση ή χρήση χημικών ουσιών) και προκύπτει μονόκλωνο cDNA.
- 3) Ο κλώνος του cDNA που προκύπτει χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού κλώνου DNA. Έτσι παράγεται ένα δίκλωνο μόριο cDNA, που δεν είναι το γονίδιο με βάση το οποίο παράχθηκε το αρχικό μόριο του mRNA, αλλά μόνο το τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί ένταξη αμινοξέων.

- Τι είναι τα μόρια ανιχνευτές και ποια η λειτουργία τους;

Τα μόρια ανιχνευτές είναι μονόκλιωνα μόρια DNA ή RNA μικρού σχετικά μήκους ⁸ που έχουν επισημανθεί ραδιενεργά ή τροποποιηθεί χημικά ώστε να εντοπίζονται με τεχνικές φθορισμού. Χάρη στη δυνατότητά τους να υβριδοποιούν κάθε άλλο μονόκλωνο μόριο που έχει συμπληρωματική αλληλουχία ως προς αυτούς, μπορούν να συνδέονται μαζί του και έτσι να «προδίδουν» την ύπαρξή του.

Μια ειδική κατηγορία μορίων ανιχνευτών DNA είναι τα μόρια cDNA που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές του μορίου mRNA που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για τη σύνθεσή του.

Η αντίδραση υβριδισμού μεταξύ των ανιχνευτών και των μορίων που ανιχνεύουν είναι τόσο ευαίσθητη και ειδική, έτσι ώστε, είναι δυνατός ο εντοπισμός ενός μορίου με συμπληρωματική αλληλουχία ακόμη και αν η συγκέντρωσή του είναι 1 μόριο ανά κύτταρο.

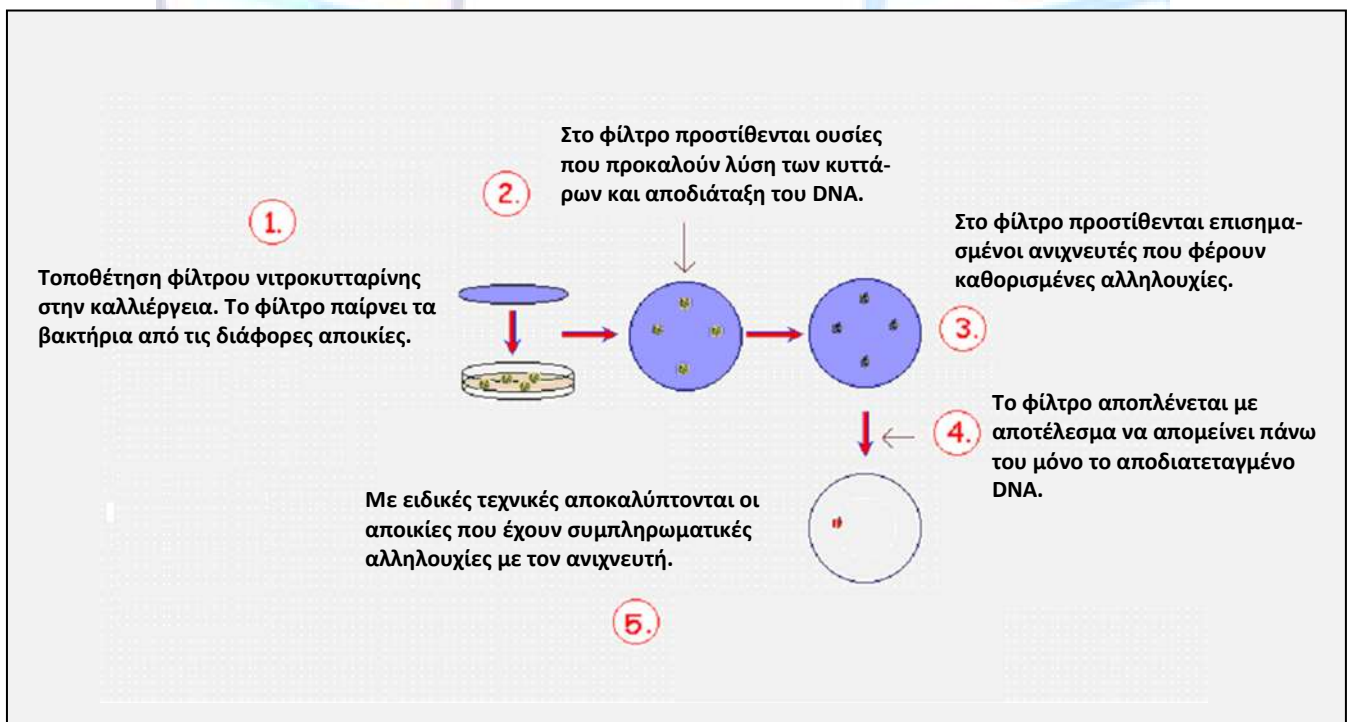
⁷ Το 1961 ανακαλύφθηκε ότι οι δύο αποχωρισμένοι κλώνοι του DNA μπορούν να επανασυνδεθούν, αν εκτεθούν για αρκετό χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία 65° C.

⁸ 20 έως 100 νουκλεοτίδια.

- Ποιά είναι η χρησιμότητα των μορίων ανιχνευτών;

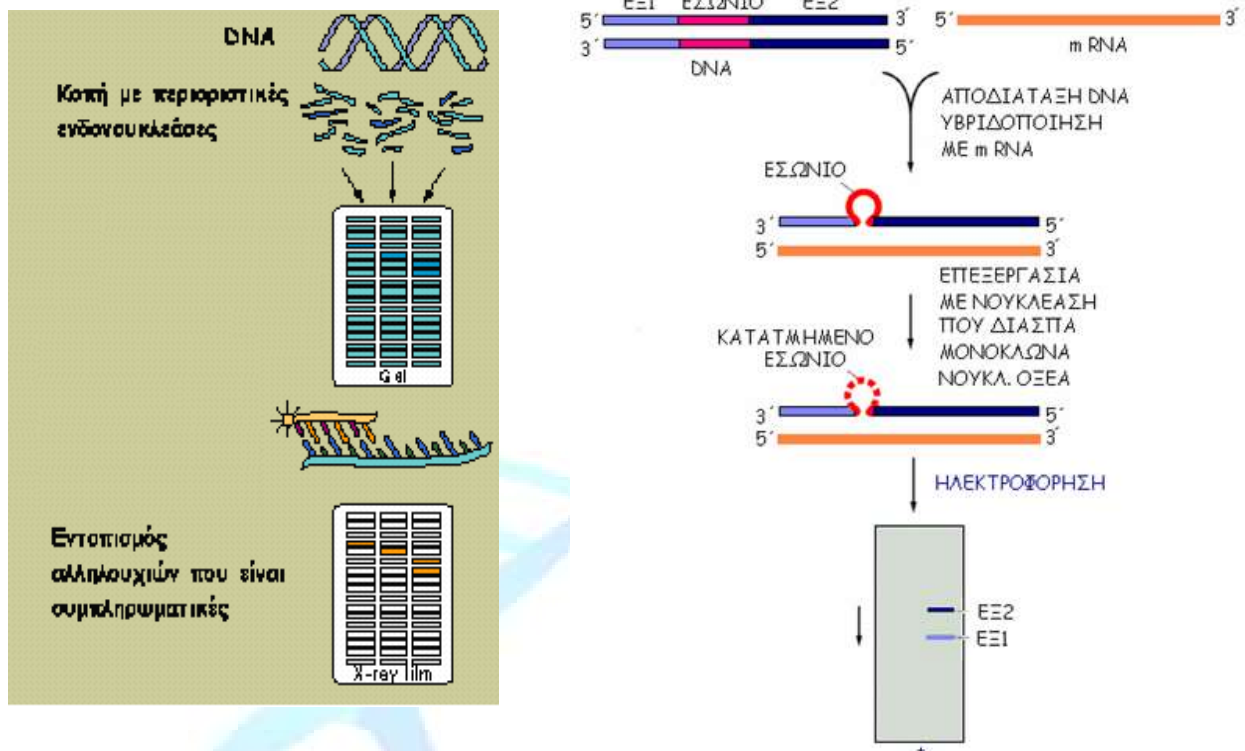
Χάρη στους ανιχνευτές είναι δυνατή:

- 1) Η εύρεση ενός συγκεκριμένου γονιδίου ανάμεσα στα χιλιάδες που υπάρχουν σε μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη.
- 2) Ο εντοπισμός μικρών αλληλουχιών DNA σε μια μεγάλη ποσότητα DNA.
- 3) Ο εντοπισμός των γονιδίων που είναι παρόμοια σε διαφορετικά είδη οργανισμών.
- 4) Η συσχέτιση των γονιδίων μεταξύ διαφορετικών οργανισμών. (Αν ο ανιχνευτής έχει συντεθεί ώστε να αποτελείται από τμήμα της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του ενός κλώνου ενός γονιδίου, μπορεί να εντοπίσει αν υπάρχει αντίστοιχο τμήμα σε ένα άλλο γονίδιο ενός άλλου οργανισμού).
- 5) Η αποσαφήνιση αν ένα γονίδιο μεταγράφεται σε ένα κύτταρο και σε ποιό βαθμό. (Ο ανιχνευτής που έχει συντεθεί ώστε να περιέχει τμήμα της αλληλουχίας ενός γονιδίου, αναμιγνύεται με το mRNA του κυττάρου. Από την ύπαρξη υβριδοποιημένων μορίων ή όχι, διαπιστώνεται αν το γονίδιο μεταγράφεται, ενώ από τον αριθμό των υβριδοποιημένων μορίων διαπιστώνεται ο βαθμός μεταγραφής του γονιδίου στο συγκεκριμένο κύτταρο.)
- 6) Η εύρεση των υποκινητών, των αλληλουχιών έναρξης και λήξης της μεταγραφής, τα εσώνια κ.α.. (Μετά την υβριδοποίηση ο ανιχνευτής υφίσταται την επίδραση ειδικών νουκλεασών, ώστε να απομονωθούν τα τμήματα του που υβριδοποιούν το ώριμο mRNA, από τα τμήματα που δεν το υβριδοποιούν, όπως τα εσώνια, κ.α.)
- 7) Η έγκαιρη διάγνωση γενετικών ασθενειών, καθώς έχουν παραχθεί ανιχνευτές που είναι συμπληρωματικοί με τις αλληλουχίες των γονιδίων που ευθύνονται για νοσήματα όπως η κυστική ίνωση, η μυική δυστροφία κ.α.



Εικόνα 8.

Χρήση ανιχνευτών για τον εντοπισμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA στο συνολικό βακτηριακό DNA.



Εικόνα 9.

Εντοπισμός αλληλουχιών σε μόριο DNA και εύρεση εξωνίων σε μόριο mRNA.

• Πώς γίνεται η σύνθεση των μορίων ανιχνευτών;

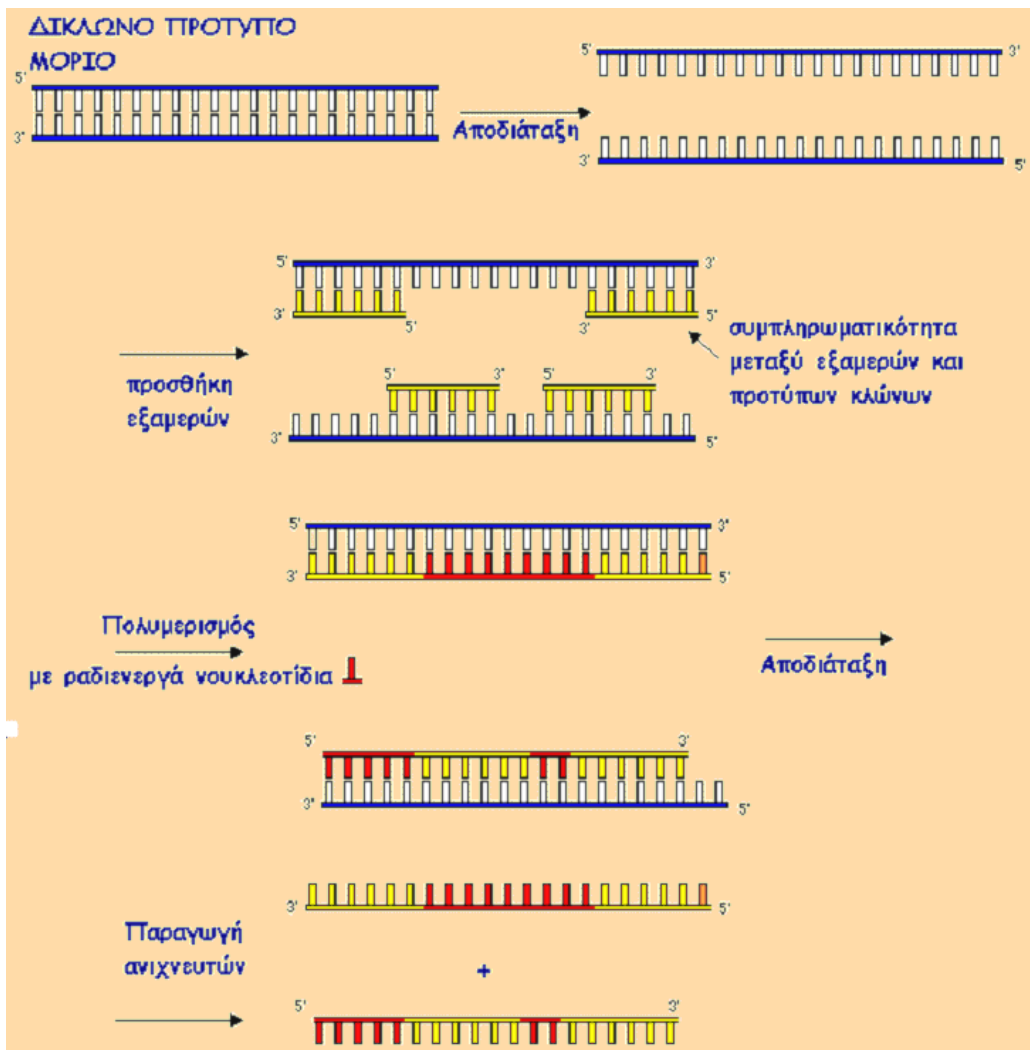
Οι ανιχνευτές είναι μονόκλινα μόρια DNA ή RNA τα οποία έχουν καθορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και είναι επισημασμένα (με ραδιενεργά ισότοπα ή φθορίζουσες χρωστικές) ώστε να μπορούν να εντοπίζονται. Χρησιμοποιούνται στον εντοπισμό αλληλουχιών νουκλεοτιδίων (π.χ γονιδίων) που είναι συμπληρωματικές ως προς αυτούς. Οι ανιχνευτές «μαρτυρούν» τη θέση των αλληλουχιών αυτών στο DNA του γονιδιώματος, καθώς συνδέονται μαζί τους με δεσμούς υδρογόνου (υβριδοποίηση) μετά την αποδιάταξη του DNA στο οποίο αναζητείται το συγκεκριμένο γονίδιο ή αλληλουχία.

Οι ανιχνευτές παράγονται με τη βοήθεια πολυμερασών και επισημασμένων νουκλεοτιδίων, σε in vitro αντιγραφή, μεταγραφή ή αντίστροφη μεταγραφή.

Μια γνωστή αλληλουχία νουκλεοτιδίων του DNA μπορεί να αντιγραφεί με τη χρήση DNA πολυμερασών και επισημασμένων νουκλεοτιδίων, ώστε να παραχθούν δίκλινα θυγατρικά μόρια των οποίων ο ένας κλώνος έχει επισημανθεί. Από την αποδιάταξη αυτών των θυγατρικών μορίων προκύπτουν επισημασμένα μονόκλινα DNA που χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές της συγκεκριμένης αλληλουχίας στο γονιδίωμα ή τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη.

Επίσης με τη βοήθεια της RNA πολυμεράσης και επισημασμένων νουκλεοτιδίων, μια γνωστή αλληλουχία νουκλεοτιδίων του DNA μεταγράφεται ώστε να παραχθούν επισημασμένα μόρια RNA-ανιχνευτές της αλληλουχίας αυτής, στο γονιδίωμα.

Η μεγάλη εξειδίκευση της αντίδρασης υβριδοποίησης ανάμεσα στο μόριο ανιχνευτή και τις αναζητούμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων επιτρέπει την εύρεσή τους ακόμη και αν στο κύτταρο ή το διάλυμα περιέχονται εκατομμύρια διαφορετικών αλληλουχιών DNA ή RNA.



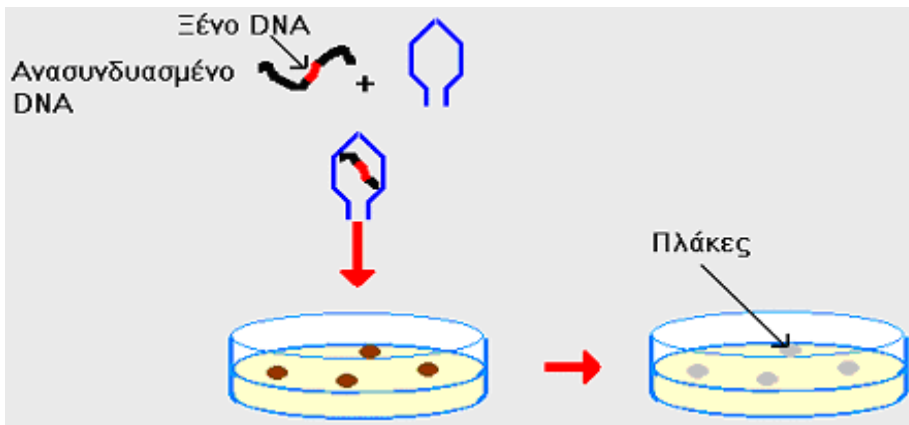
Εικόνα 10.
Διαδικασία παραγωγής ανιχνευτών.

Μέθοδοι κλωνοποίησης γονιδίων

- Τι είναι η Γονιδιωματική Βιβλιοθήκη;

Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA επιτρέπει την κοπή του γονιδιώματος ενός οργανισμού και την εισαγωγή καθενός από τα τμήματα που προκύπτουν σε βακτήρια με τη μεσολάβηση πλασμιδίων ή βακτηριοφάγων. Με την καλλιέργεια αυτών των βακτηρίων προκύπτουν αποικίες πανομοιότυπων βακτηρίων (κλώνοι) κάθε μια από τις οποίες έχει και ένα τμήμα από το γονιδίωμα του οργανισμού δότη. Το σύνολο των αποικιών που παράγονται, που όπως είναι φυσικό περιέχουν το σύνολο του γονιδιώματος του οργανισμού δότη, αποτελεί μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη.

- Ποιοί φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιούνται για τη κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών;
 - 1) βακτηριοφάγοι: Για τη κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιούνται συνήθως οι βακτηριοφάγοι, (κυρίως ο βακτηριοφάγος λ) λόγω των συγκριτικών πλεονεκτημάτων τους ως προς τα πλασμίδια (ενσωματώνουν μεγαλύτερα τμήματα DNA, και είναι αποτελεσματικότεροι στη μεταφορά ξένου DNA στα βακτήρια, διότι τα μολύνουν με μεγαλύτερη πιθανότητα από τα πλασμίδια). Με τη χρήση των βακτηριοφάγων δεν προκύπτουν αποικίες βακτηρίων, αλλά κλώνοι βακτηριοφάγων.

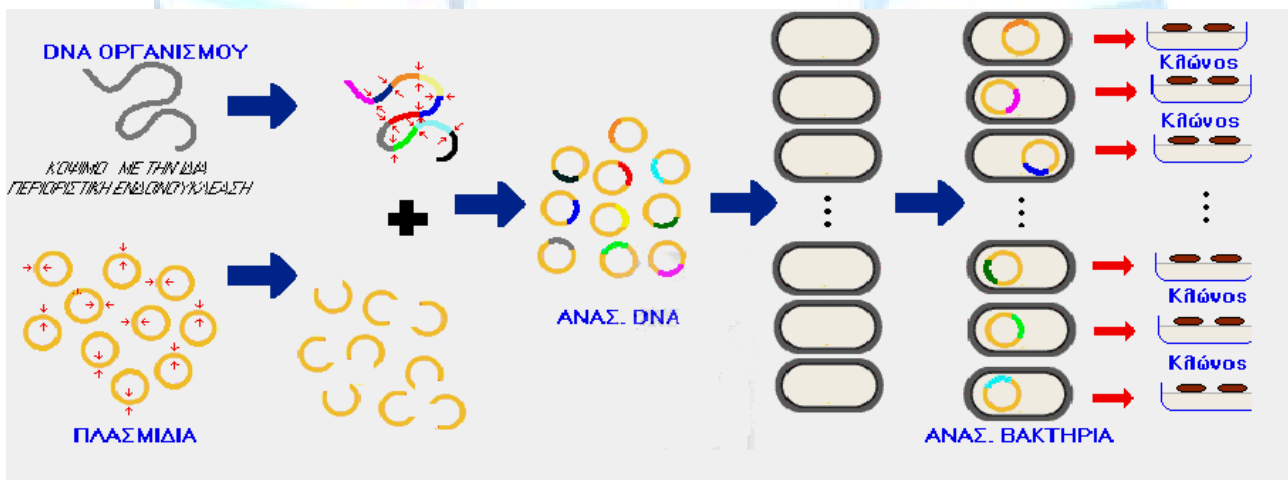


Εικόνα 11.
Χρήση βακτηριοφάγων για την μεταφορά ανασυνδυασμένου DNA.

Στην περίπτωση των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών που αποτελούνται από κλώνους βακτηριοφάγων ισχύουν τα ακόλουθα:

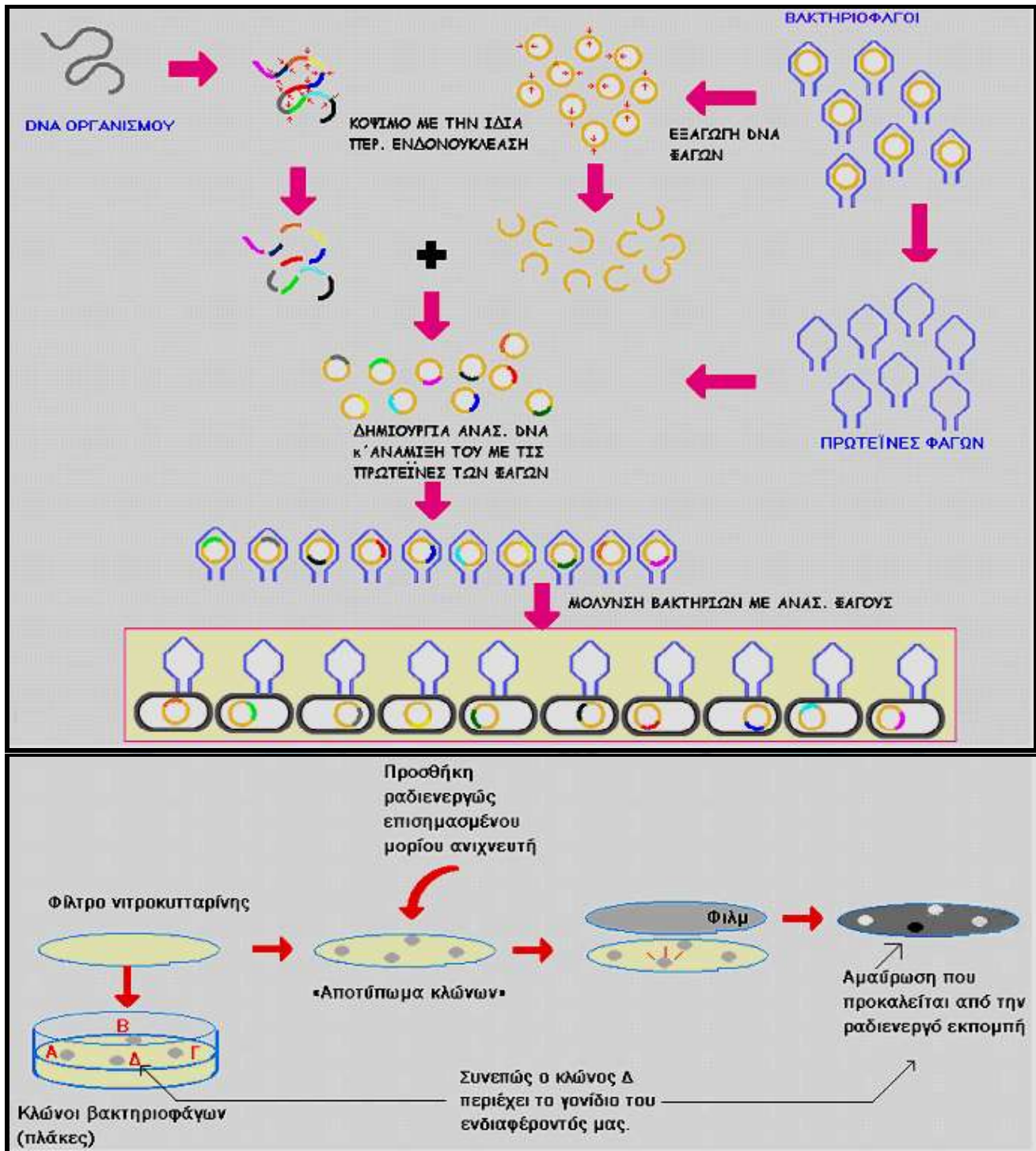
Όταν ένας βακτηριοφάγος μολύνει ένα βακτήριο, το λύει και απελευθερώνονται νέοι φάγοι που μολύνουν τα γειτονικά του. Έτσι στα βακτήρια μιας αποικίας που έχουν μολυνθεί από βακτηριοφάγους δεν αργούν να δημιουργηθούν στις θέσεις των αποικιών, «μπαλώματα» από νεκρά βακτήρια. Τα «μπαλώματα» αυτά ονομάζονται πλάκες και αποτελούν κλώνους πανομοιότυπων βακτηριοφάγων.

2) πλασμίδια: Με τη μεσολάβηση πλασμιδίων πραγματοποιείται η εισαγωγή καθενός από τα τμήματα DNA του γονιδιώματος ενός οργανισμού σε βακτήρια. Με την καλλιέργεια αυτών των βακτηρίων προκύπτουν αποικίες πανομοιότυπων βακτηρίων (κλώνοι βακτηρίων) κάθε μια από τις οποίες έχει και ένα τμήμα από το γονιδίωμα του οργανισμού δότη.



Εικόνα 12.
Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με την βοήθεια πλασμιδίων ως φορέων.

Στην περίπτωση των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών που αποτελούνται από κλώνους βακτηρίων η ανίχνευση της αποικίας που φέρει ένα γονίδιο του ενδιαφέροντός μας γίνεται με τις μεθόδους που εκτίθενται στους γενετικούς δείκτες. (Βλέπε σελίδες 7, 8 και 9)



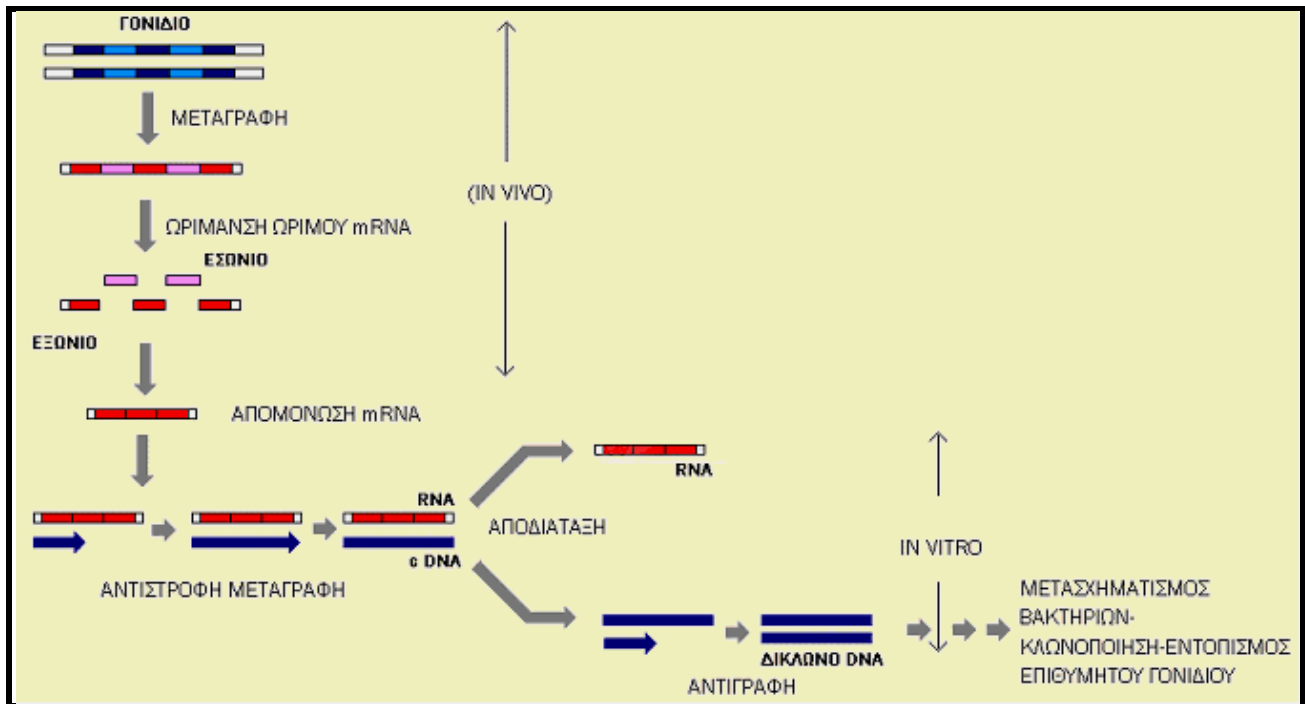
Εικόνα 13.

Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με την βοήθεια φάγων ως φορέων και εντοπισμός συγκεκριμένου γονιδίου ανάμεσα σε κλώνους βακτηριοφάγων με την χρήση επισημασμένου μορίου ανιχνευτή.

Στη καλλιέργεια των βακτηρίων τοποθετείται ένα φίλτρο νιτροκυτταρίνης που είναι ένα υλικό το οποίο δεσμεύει το DNA. Έτσι ένα μέρος του DNA των κλώνων μεταφέρεται στο φίλτρο και αφού προστεθούν κατάλληλες χημικές ουσίες ώστε να αποδιαταχθεί υβριδοποιείται με μόρια ανιχνευτές. Με την έκθεση ενός φωτογραφικού φιλμ στο φίλτρο αυτό, μπορούμε να διαπιστώσουμε από τη θέση της μαύρης κηλίδας ποιος από τους κλώνους περιέχει το γονίδιο του ενδιαφέροντός μας.

- Τι είναι η cDNA βιβλιοθήκη;

Με την εισαγωγή μορίων cDNA σε πλασμίδια ή βακτηριοφάγους και την επακόλουθη διαδικασία της κλωνοποίησης προκύπτουν κλώνοι που περιέχουν από το συνολικό γονιδίωμα του κυττάρου μόνο το τμήμα του που κωδικοποιεί την σύνθεση πρωτεϊνών. Το σύνολο των κλώνων των βακτηρίων ή των βακτηριοφάγων που έχουν δημιουργηθεί με τη μέθοδο αυτή αποτελεί μια cDNA βιβλιοθήκη.



Εικόνα 14.
Κατασκευή μορίου cDNA.

- Πώς κατασκευάζεται μια cDNA βιβλιοθήκη;

Ο εντοπισμός ενός συγκεκριμένου γονιδίου με τη βοήθεια του mRNA στο οποίο μεταγράφεται, γίνεται ευχερέστερη, καθώς περιορίζει σημαντικά το τμήμα του γονιδιώματος που πρέπει να ερευνηθεί.

Κατ' αρχάς απομονώνεται το ολικό mRNA του κυττάρου και με την αντίστροφη μεταγραφάση συντίθεται *in vitro*, ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA, το cDNA. Το δίκλωνο υβριδικό μόριο που σχηματίζεται αποδιατάσσεται (με θέρμανση ή χρήση χημικών ουσιών) και ο κλώνος του cDNA που προκύπτει χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού κλώνου DNA.

Έτσι, παράγεται ένα δίκλωνο μόριο DNA, που δεν είναι το γονίδιο με βάση το οποίο παράχθηκε το αρχικό μόριο του mRNA, αλλά μόνο το τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί ένταξη αμινοξέων (στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το ώριμο mRNA, εκτός του ότι δεν περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες που δεν μεταγράφονται -υποκινητές κ.α.- δεν περιέχει λόγω της διαδικασίας της ωρίμανσης και τα εσώνια).

Με την εισαγωγή αυτών των μορίων DNA σε πλασμίδια ή βακτηριοφάγους και την επακόλουθη διαδικασία της κλωνοποίησης προκύπτουν κλώνοι που περιέχουν από το συνολικό γονιδίωμα του κυττάρου μόνο το τμήμα του που κωδικοποιεί την σύνθεση πρωτεϊνών. Το σύνολο των κλώνων των βακτηρίων ή των βακτηριοφάγων που έχουν δημιουργηθεί με τη μέθοδο αυτή αποτελεί μια cDNA βιβλιοθήκη.

- *Ποιά είναι τα πλεονεκτήματα της cDNA βιβλιοθήκης;*

Η cDNA βιβλιοθήκη πλεονεκτεί της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης στην κλωνοποίηση των γονιδίων ενός ανώτερου ευκαρυωτικού οργανισμού:

1) επειδή περιορίζει το σύνολο των κλώνων ανάμεσα στους οποίους αναζητείται ένα συγκεκριμένο γονίδιο και,

2) διότι η εισαγωγή του cDNA σε βακτήρια καθιστά δυνατή τη μετάφρασή του ⁹. Έτσι, μπορεί να ερευνηθεί το είδος των πρωτεϊνών που παράγει ένα συγκεκριμένο κύτταρο σε ένα συγκεκριμένο στάδιο της ανάπτυξής του και επίσης καθιστά δυνατή την παραγωγή πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα για ερευνητικούς, βιομηχανικούς ή άλλους σκοπούς.

- *Ποιά είναι η ουσιώδης διαφορά μεταξύ γονιδιωματικής βιβλιοθήκης και cDNA βιβλιοθήκης;*

Τα γονίδια, και ειδικότερα αυτά που κωδικοποιούν την παραγωγή πρωτεϊνών, αποτελούν μια μειονότητα στο γονιδίωμα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Συνεπώς ο εντοπισμός ενός συγκεκριμένου γονιδίου στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη των οργανισμών αυτών είναι μια εξαιρετικά επίπονη διαδικασία, καθώς η πλειονότητα των κλώνων περιέχει μη κωδικοποιούσες περιοχές του DNA.

Αντιθέτως, το συνολικό ώριμο mRNA που παράγεται από ένα συγκεκριμένο ευκαρυωτικό κύτταρο, αντανakλά μόνο εκείνο το τμήμα του γονιδιώματος που κωδικοποιεί την παραγωγή πρωτεϊνών στο κύτταρο αυτό, και μάλιστα τις αλληλουχίες που μεταφράζονται δηλαδή τα εξώνια.

- *Ποιές είναι γενικά οι διαφορές μεταξύ γονιδιωματικής βιβλιοθήκης και cDNA βιβλιοθήκης;*

| Γονιδιωματική βιβλιοθήκη | cDNA βιβλιοθήκη |
|--|---|
| 1. Απομονώνεται όλο το DNA ενός οργανισμού δότη. | 1. Απομονώνεται το ολικό mRNA (ώριμο) από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο που μας ενδιαφέρει. |
| 2. Δεν χρησιμοποιούνται τα ένζυμα: αντίστροφη μεταγραφάση και DNA πολυμεράση. | 2. Χρησιμοποιούνται τα ένζυμα: i) αντίστροφη μεταγραφάση : mRNA → - cDNA ii) DNA πολυμεράση: μονόκλωνο cDNA → δίκλωνο DNA ¹⁰ |
| 3. Το απομονωμένο DNA κόβεται με περιοριστική ενδονουκλεάση σε κομμάτια ποικίλου μεγέθους. | 3. Στο δίκλωνο προστίθενται: άκρα συμπληρωματικά με εκείνα που άφησε η περιοριστική ενδονουκλεάση την οποία χρησιμοποιήσαμε για να κόψουμε τον φορέα κλωνοποίησης (+ βοήθεια DNA δεσμάσης) |
| 4. Περιέχει ολόκληρη την ποσότητα του γενετικού υλικού (π.χ. υποκινητές τμήμα ή τμήματα γονιδίων, αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής, κ.α). Έτσι, μας δίνεται το πλεονέκτημα απομόνωσης και μελέτης των παραπάνω αλληλουχιών ή τμημάτων που μας ενδιαφέρουν (με χρήση ανιχνευτών). | 4. Περιέχει αντίγραφα των mRNA (σε δίκλωνο cDNA) όλων των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά που μας ενδιαφέρουν και μελετάμε. Έχει το πλεονέκτημα της απομόνωσης μόνο των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλ. των εξωνίων. |
| 5. Δεν χρησιμοποιείται για τη παραγωγή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης ¹¹ . | 5. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, π.χ. μιας ιντερφερόνης. |

⁹ Αφού βεβαίως του προστεθεί υποκινητής και άλλες χρήσιμες αλληλουχίες.

¹⁰ Δίκλωνο cDNA με μήκος, το ελάχιστο μήκος γονιδίου (εξώνια + αμετάφραστες περιοχές 5' και 3')

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

- Πώς γίνεται η παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων μορίου DNA;

Παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων ενός γονιδίου (κλωνοποίηση του γονιδίου) μπορεί να γίνει με την εισαγωγή του σε ένα βακτήριο και εν συνεχεία την κλωνοποίηση του βακτηρίου. Η διαδικασία αυτή πέραν του ότι είναι επίπονη απαιτεί την ύπαρξη πολλών αρχικών αντιγράφων του γονιδίου, ώστε να μεγιστοποιηθεί και η πιθανότητα ενσωμάτωσής τους στα βακτήρια.

- Ποια είναι η χρησιμότητα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ;

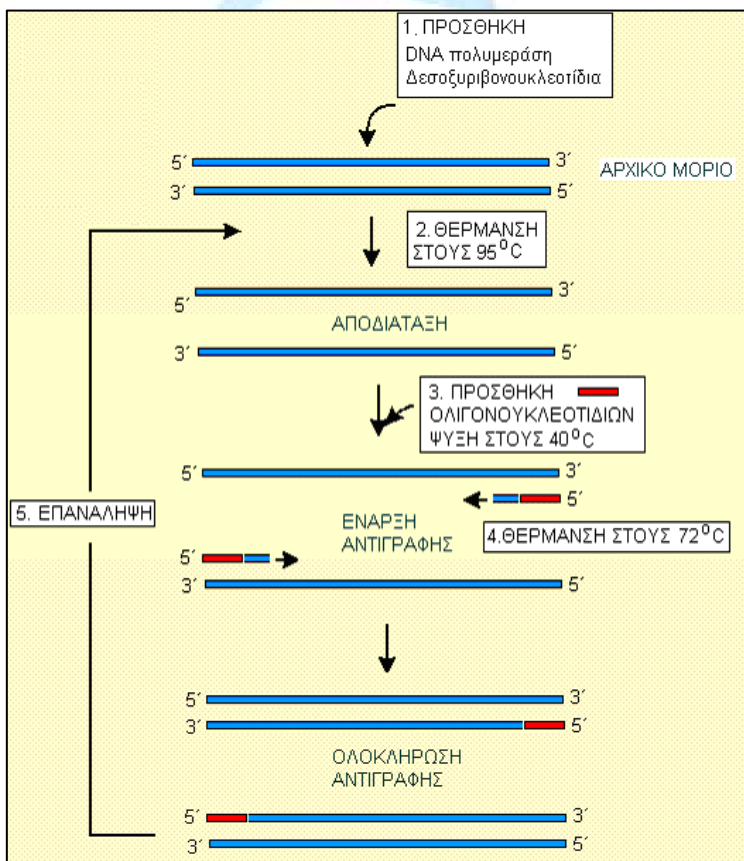
Με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι δυνατή η παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων ενός μορίου DNA (π.χ., γονιδίου) σε σύντομο χρονικό διάστημα, ακόμη και αν υπάρχει στη διάθεσή μας ένα μόνο αρχικό μόριο DNA. Η μέθοδος απεκλήθη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης διότι κάνει δυνατή την διαδοχική παραγωγή πολυάριθμων μορίων DNA *in vitro* με τη χρησιμοποίηση της DNA πολυμεράσης, χωρίς την παρουσία ζωντανού κυττάρου.

- Πού βρίσκει εφαρμογή η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ;

- 1) στην Ιατρική για τη διάγνωση ασθενειών όπως του AIDS,
- 2) στην εγκληματολογία για τη διαλεύκανση υποθέσεων και
- 3) στη μελέτη DNA από απολιθώματα.

- Ποιά είναι η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ;

Η διαδικασία έχει ως εξής:



1. Το αρχικό δείγμα DNA που θέλουμε να το αντιγράψουμε αναμιγνύεται με δεσοξυριβονουκλεοτίδια και των 4 βάσεων, DNA πολυμεράση και ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα (20 ζ. β) που είναι συμπληρωματικά των 3' άκρων των κλώνων του DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε (οπότε η αλληλουχία στα άκρα πρέπει να είναι γνωστή). Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια παίζουν ρόλο πρωταρχικών τμημάτων, καθώς στην *in vitro* διαδικασία δεν μπορούν να συντεθούν.

2. Ο δοκιμαστικός σωλήνας στον οποίο υπάρχει το μίγμα θερμαίνεται στους 95° C, ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου (*in vivo* την εργασία αυτή θα την ανελάμβανε η ελικάση). Έτσι το DNA αποδιατάσσεται. Στη θερμοκρασία αυτή φυσιολογικά η DNA πολυμεράση θα υφίστατο μετουσίωση. Αυτό αποφεύγεται με τη χρησιμοποίηση ενός είδους πολυμεράσης που είναι θερμοανθεκτική. Η πολυμεράση αυτή προέρχεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* που επιβιώνει σε θερμοκρασία 90° C στις θερμοπηγές.

3. Στη συνέχεια το μίγμα ψύχεται στους 40° C ώστε να γίνει υβριδοποίηση μεταξύ των ολιγονουκλεοτιδίων και των συμπληρωματικών ως προς αυτά άκρων των δύο κλώνων. Το μίγμα όμως πρέπει να θερμανθεί εκ νέου στη θερμο-

κρασία των 72° C καθώς στη θερμοκρασία αυτή το ένζυμο λειτουργεί άριστα.

4. Έτσι το αρχικό μόριο έχει αντιγραφεί σε δύο θυγατρικά. Η διαδικασία από το 2° ως και το 3° βήμα επαναλαμβάνεται για 20 με 30 φορές με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλών αντιγράφων του αρχικού μορίου.

¹¹ .Επειδή το γονίδιο που τυχόν υπάρχει στον κλώνο περιέχει εσώνια (τα βακτήρια δεν διαθέτουν μηχανισμούς ωρίμανσης). Επίσης τα τμήματα τα ενσωματωμένα στο φορέα μπορεί να μην κωδικοποιούν γονίδια.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

•Παράρτημα 1

Ποιες είναι οι τεχνικές εισαγωγής του φορέα στο κύτταρο ή τον οργανισμό δέκτη;

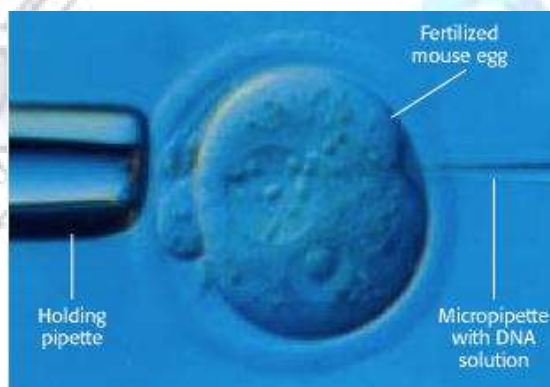
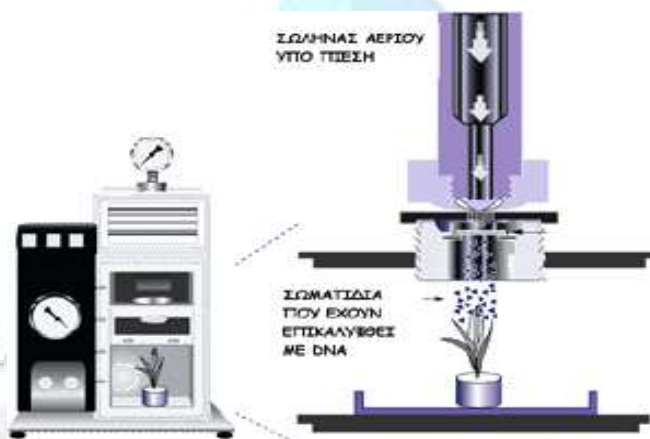
Θερμικό σοκ (Heat shock): Τα κύτταρα δέκτες επωάζονται σε ένα διάλυμα που περιέχει ιόντα K^+ , και το διάλυμα θερμαίνεται απότομα στους $40\text{ }^\circ\text{C}$. Το σοκ αυτό αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης για το φορέα (αν και ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι γνωστός) με αποτέλεσμα αρκετά από τα κύτταρα δέκτες να δέχονται το φορέα. Η τεχνική αυτή είναι αποτελεσματική έναντι φυτικών κυττάρων και βακτηρίων.

Ηλεκτροδιαπόρηση (Electroporation): Τα κύτταρα δέχονται την επίδραση υψηλής τάσης με αποτέλεσμα την παροδική διακοπή της συνέχειας της μεμβράνης τους και την εισαγωγή του φορέα στο εσωτερικό τους, μέσω των ανοιγμάτων που έχουν δημιουργηθεί. Αποτελεί την πλέον αποτελεσματική μέθοδο για την εισαγωγή φορέων σε βακτήρια.

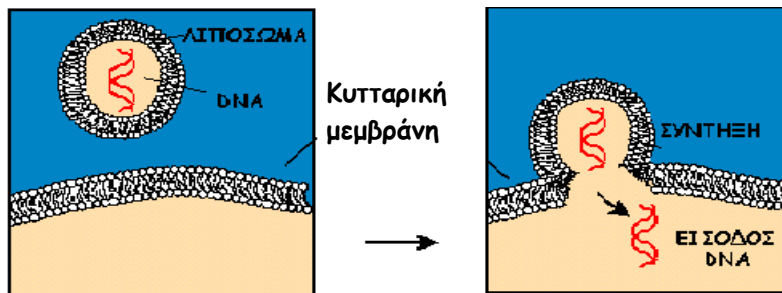
(Gene gun): Με την τεχνική αυτή κύτταρα «πυροβολούνται» με μικροσκοπικά σωματίδια χρυσού που έχουν επικαλυφθεί με το προς μεταφορά DNA. Τα σωματίδια αυτά βάλλονται από ειδικό όπλο που λειτουργεί με πεπιεσμένο αέριο. Η μέθοδος αρχικά χρησιμοποιείτο για τη μεταφορά γενετικού υλικού σε φυτικά κύτταρα προκειμένου να καμφθεί η αντίσταση του ανθεκτικού κυτταρικού τοιχώματός τους. Χρησιμοποιείται όμως και σε ζωικά κύτταρα

Μικροέγχυση: Το κύτταρο δέκτης σταθεροποιείται τοποθετούμενο στο στόμιο μιας πιπέτας. Ταυτόχρονα με μια άλλη πιπέττα που είναι ιδιαίτερα λεπτή (μικροπιπέττα) το ξένο γενετικό υλικό διοχετεύεται κατ' ευθείαν στον πυρήνα του κυττάρου δέκτη. Η όλη διαδικασία που διεξάγεται με τη βοήθεια μικροσκοπίου χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις στις οποίες ο αριθμός των κυττάρων δεκτών είναι μικρός (π.χ. γονιμοποιημένα ωάρια) ώστε να μεγιστοποιείται η πιθανότητα επιτυχούς εισαγωγής του ξένου γενετικού υλικού.

Λιπώματα: Το προς μεταφορά γενετικό υλικό καλύπτεται από λιπίδια οπότε σχηματίζεται ένα μικρό μεμβρανώδες κυστίδιο, το λιπόσωμα. Το λιπόσωμα συντήκεται με τη μεμβράνη του κυττά-



ρου δέκτη (μερικές φορές και με την ίδια την πυρηνική μεμβράνη) και έτσι εισάγεται το ξένο γενετικό υλικό στο εσωτερικό του κυττάρου. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται σε πολλά είδη κυττάρων κυρίως όμως στην *in vivo* εισαγωγή γονιδίων σε κύτταρα, όπως στην περίπτωση της γονιδιακής θεραπείας.



•Παράρτημα 2

Ποιες οι είναι οι τεχνικές που στηρίζονται στην υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων;

Το φαινόμενο της **υβριδοποίησης**, δηλαδή της δυνατότητας ενός μονόκλωνου μορίου νουκλεϊκού οξέος να σχηματίζει δίκλωνη έλικα με ένα άλλο μονόκλωνο μόριο, αποτελεί τη βάση για πολλές τεχνικές που χρησιμοποιούνται τόσο στη Μοριακή Βιολογία, όσο και στη Γενετική Μηχανική. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται οι τεχνικές Southern και Northern blot αλλά και η τεχνική που ανέπτυξε ο Sanger για την εύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων, όπως επίσης και οι τεχνικές που κάνουν δυνατό τον εντοπισμό μιας αλληλουχίας με τη βοήθεια ενός ανιχνευτή, οι οποίες εξετάζονται χωριστά.

α) Η τεχνική Southern blot και οι εφαρμογές της

Πολλά γονίδια ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελούν μέρη μιας ευρύτερης οικογένειας παρόμοιων γονιδίων. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατή η εύρεση του αριθμού των παρόμοιων γονιδίων αν υπάρχει στη διάθεσή μας, ένα μόνο γονίδιο (ακόμη και στη μορφή c DNA- βλέπε σχετικά στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη Γενετική Μηχανική) που έχει κλωνοποιηθεί.

1. Κατ' αρχάς χρησιμοποιούνται περιοριστικές ενδονουκλεάσες με σκοπό την κοπή του γονιδιωματικού DNA στο οποίο θέλουμε να εντοπίσουμε τον αριθμό των παρόμοιων γονιδίων που περιέχει.

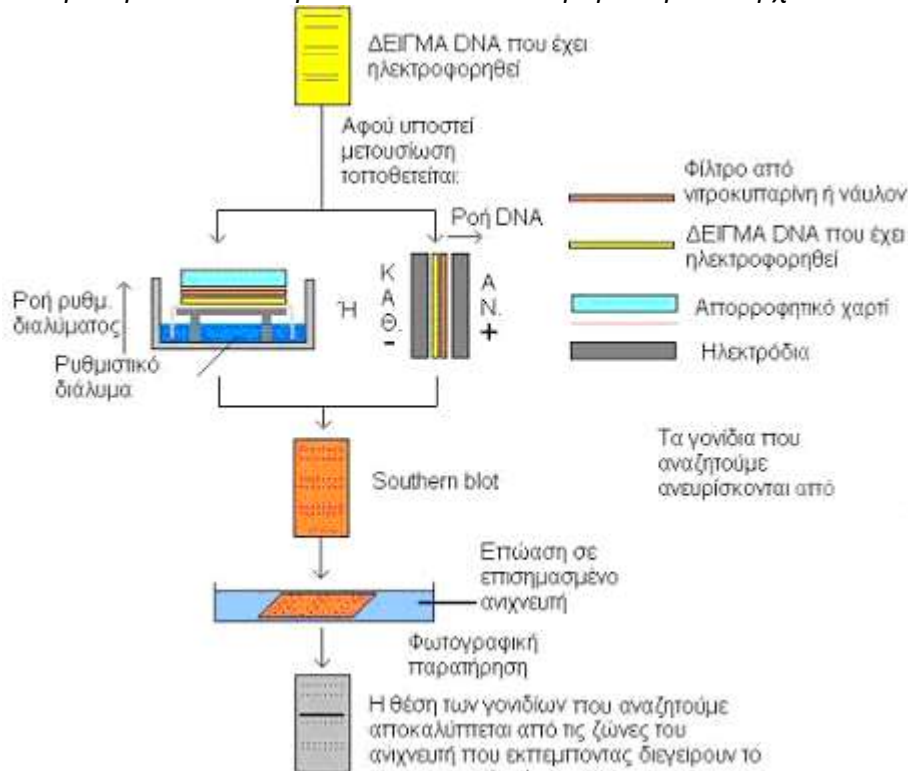
2. Στη συνέχεια τα θραύσματα που έχουν προκύψει υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση με αποτέλεσμα να παίρνουμε χιλιάδες ζώνες (αφού γίνουν ορατές με χρώση) που αντιστοιχούν στα θραύσματα του DNA, οι οποίες φυσικά δεν μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Για να διακριθούν αρχικά αποδιατάσσονται ώστε να καταστούν μονόκλωνα και στη συνέχεια μεταφέρονται σε ένα φίλτρο από νιτροκυτταρίνη ή νάυλον. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με τη χρησιμοποίηση ενός ρυθμιστικού διαλύματος είτε με ηλεκτροφόρηση. Στην 1^η περίπτωση το ρυθμιστικό διάλυμα περνώντας με διάχυση μέσω της πλάκας από το πήκτωμα που έχει το DNA, το μεταφέρει στο φίλτρο. Στην 2^η περίπτωση την δουλειά αυτή την κάνει η τάση που εφαρμόζεται δεξιά και αριστερά του πηκτώματος.

3. Έτσι λαμβάνεται το φίλτρο (Southern blot) που περιέχει μη ορατές ζώνες DNA.

4. Το φίλτρο στη συνέχεια υφίσταται επεξεργασία με επισημασμένους ανιχνευτές που φέρουν αλληλουχίες του γονιδίου που αναζητούμε.

5. Με τον τρόπο αυτό σε όποια ζώνη (θραύσμα) τα μόρια ανιχνευτές βρουν συμπληρωματικές αλληλουχίες, συνδέονται μαζί τους, δηλαδή τις υβριδοποιούν.

6. Τελικώς η φωτογράφιση με φιλμ ακτίνων Χ αποκαλύπτει τα θραύσματα που εκπέμπουν και έτσι φανερώνονται τα γονίδια που είναι παρόμοια με το αρχικό.



Η τεχνική βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην εγκληματολογία και όπου γενικώς χρειάζεται να αποκαλυφθεί η ταυτότητα ενός ατόμου από ένα ίχνος βιολογικού υλικού όπως αίμα ή οποιοσδήποτε ιστός που περιέχει DNA. Η απαρχή της εφαρμογής αυτής βρίσκεται στα 1985 οπότε ο Alec Jeffreys ανακάλυψε ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν περιοχές με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βάσεων (μικροδορυφόροι). Επειδή το πρότυπο με το οποίο επαναλαμβάνονται οι βάσεις αυτές είναι χαρακτηριστικό για κάθε άτομο, μπορεί να χρησιμοποιείται όπως ένα δακτυλικό αποτύπωμα (**Αποτύπωμα DNA**). Από τη σύγκριση του DNA που έχει ανευρεθεί λ.χ. στον τόπο ενός εγκλήματος και του DNA ενός υπόπτου, ως προς τις αλληλουχίες αυτές, μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την ενοχή του ή όχι.

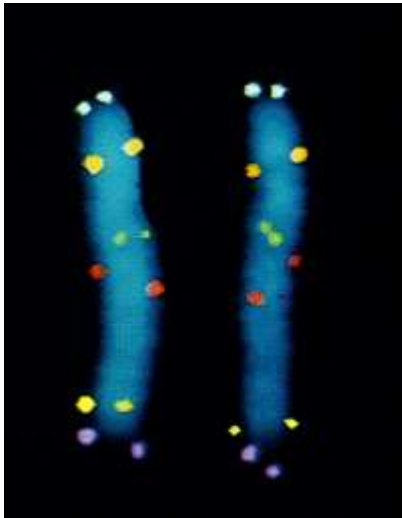
β) Η τεχνική Northern blot

Η τεχνική αυτή αποτελεί παραλλαγή της Southern blot. (Η ονομασία της επιλέχτηκε για να αντιδιασταλλεί από την Southern blot, ονομασία που προέρχεται από το επώνυμο του ερευνητή που την επινόησε. Αντιστοίχως η διαδικασία διαχωρισμού πρωτεϊνών με παρόμοια μέθοδο, ονομάζεται Western blot). Η τεχνική χρησιμοποιείται στην επιμέτρηση της δραστηριότητας ενός γονιδίου σε διαφορετικούς ιστούς.

Αν λοιπόν έχουμε στη διάθεσή μας ένα μόριο c DNA (ένα δηλαδή «αντίγραφο» του m RNA) και παρασκευάσουμε ένα μόριο ανιχνευτή με τις αλληλουχίες του, μπορούμε λαμβάνοντας m RNA από διαφορετικούς ιστούς να τα υποβάλλουμε στην ίδια δοκιμασία με την Southern blot. Τα μόρια m RNA που θα υβριδοποιηθούν από το μόριο ανιχνευτή, θα εντοπιστούν από την εκπομπή των επισημασμένων νουκλεοτιδίων του ανιχνευτή και έτσι θα προσδιοριστούν και οι στους οποίους το γονίδιο αυτό είναι ενεργό. Παράλληλα από το βαθμό αμαύρωσης του φιλμ μπορούμε να καταλάβουμε πόσο ενεργό είναι το γονίδιο σε καθένα από αυτούς (όσα περισσότερα μόρια m RNA παράγονται από τα κύτταρα ενός ιστού, με τόσους περισσότερους ανιχνευτές θα υβριδοποιούνται, οπότε τόσο μεγαλύτερη εκπομπή ακτινοβολίας θα έχουμε.).

γ) Η τεχνική FISH (Flouorescence in situ hibridization)

Η απόσπαση των νουκλεϊκών οξέων από τα κύτταρα μπορεί να διευκολύνει το χειρισμό τους ώστε να μελετηθούν αλλά αφαιρεί μια σημαντική πληροφορία, που αφορά τον τρόπο δράσης τους στην συγκεκριμένη κυτταρική περιοχή στην οποία βρίσκονται. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί τεχνικές στις οποίες τα μόρια παραμένουν στην κυτταρική δομή στην οποία βρίσκονται και παρατηρούνται επιτόπου (*in situ*). Με τις τεχνικές αυτές είναι δυνατός ο εντοπισμός μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA (λ.χ ενός γονιδίου) στο χρωμόσωμα στο οποίο βρίσκεται ή ο εντοπισμός ενός συγκεκριμένου μορίου RNA σε ένα κύτταρο.



Στην περίπτωση του επιτόπου εντοπισμού ενός γονιδίου στα χρωμοσώματα η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

1. Μεταφασικά χρωμοσώματα τοποθετούνται για λίγο σε διαλύματα με πολύ υψηλές τιμές pH ώστε να θραυστούν οι δ. Η.
2. Στη συνέχεια υβριδοποιούνται με **μόρια ανιχνευτές** που

έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες ως προς το γονίδιο που αναζητείται. Στο παρελθόν οι ανιχνευτές έφεραν ραδιενεργά ισότοπα, τώρα όμως χρησιμοποιούνται κυρίως ανιχνευτές που έχουν τροποποιηθεί χημικά ώστε να αναγνωρίζονται από ειδικά αντισώματα στα οποία έχει προστεθεί μια φθορίζουσα χρωστική.

3. Στην περίπτωση των ανιχνευτών που είναι επισημασμένοι ραδιενεργά ο εντοπισμός τους στο χρωμόσωμα (άρα και ο εντοπισμός του γονιδίου που αναζητείται) γίνεται με **αυτοραδιογραφία** . Στην περίπτωση των τροποποιημένων χημικά ανιχνευτών εντοπισμός των γονιδίων γίνεται με τη βοήθεια των φθορίζοντων αντισωμάτων με τα οποία συνδέονται.

* Οι εικόνες, τα σχήματα και αρκετά από τα κείμενα αυτού του αρχείου προέρχονται από τις διαδικτυακές σημειώσεις του εξαιρετου συναδέλφου **Θ. Καψάλη** .