



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΑΝΟΙΚΤΑ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ

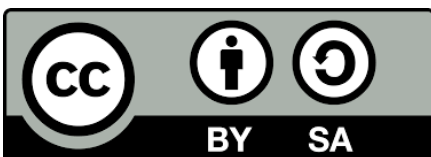


Τίτλος Μαθήματος: Μοριακή Βιολογία Νουκλεϊνικών
Οξέων

Ενότητα: Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

Διδάσκων: Επίκ. Καθ. Άγγελος Περισυνάκης

Τμήμα: Χημείας



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τμήμα Χημείας,

**Μοριακή Βιολογία
Νουκλεϊνικών Οξέων**

Άγγελος Περισυνάκης

Επίκουρος καθηγητής

Ιούνιος 2013, Ιωάννινα

4. Τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA (ή γενετική μηχανική)

Αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων του DNA μπορεί να γίνουν και στοχευμένα. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναπτυχθεί ένας κλάδος της μοριακής βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας που είναι γνωστός ως **Τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA ή γενετική μηχανική** και αποτελεί τη βάση της βιοτεχνολογίας. Μόρια DNA κατασκευάζονται κατά βούληση στο εργαστήριο και τοποθετούνται στα κύτταρα, στα οποία προσδίδουν τώρα ποια νέες ιδιότητες. Η γενετική μηχανική χρησιμοποιεί ως βασικά εργαλεία, **τεχνικές της χημείας** (πχ σύνθεση ανιχνευτών σε στερεά φάση) και της βιοχημείας (πχ τεχνικές αποτύπωσης, όπως κατά **Southern**, Northern, Western, ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μέσω **μικροσυστοιχιών DNA**), σύγχρονη **μεθοδολογία** της μοριακής βιολογίας (πχ **γονιδιακή εκμηδένιση**), αλλά και μόρια πρωτεϊνών ή νουκλεϊνικών οξέων, όπως: **τα περιοριστικά ένζυμα (ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες), το πολυμεριστικό ένζυμο DNA-πολυμεράση I, οι DNA-λιγάσες, η αντίστροφη μεταγραφάση και οι φορείς DNA [πλασμίδια και (βακτηριο)φάγοι].**

4.1. Σύγχρονες τεχνικές της βιοχημείας

Μερικές από τις βασικότερες σύγχρονες τεχνικές της βιοχημείας είναι εκείνες της αποτύπωσης (blotting), όπως **Southern blotting**, Northern blotting, Western blotting, της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης μέσω **μικροσυστοιχιών DNA** και της **γονιδιακής εκμηδένισης**, οι οποίες (εκτός του Western blotting), βασίζονται στην ικανότητα των αλυσίδων των νουκλεϊνικών οξέων να υβριδίζουν μεταξύ τους.

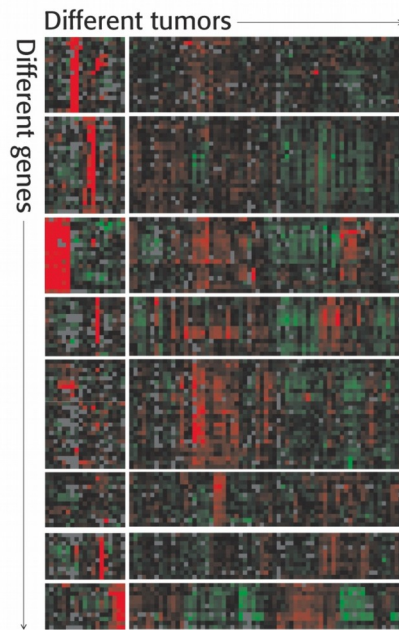
4.1.1. Αποτύπωση κατά Southern

(Βλέπε σε παράγραφο 4.4. Περιοριστικά ένζυμα)

4.1.2. Μικροσυστοιχίες DNA [5]

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην υβριδοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων και αφορά την ανάλυση της έκφρασης του γονιδιώματος ενός κυττάρου στο σημαντικότερο επίπεδο έκφρασής του που είναι εκείνο της μεταγραφής, δηλαδή εξετάζονται τα επίπεδα mRNA των κυττάρων. Διαφορά ή μεταβολή σημαίνει και διαφορετική έκφραση των γονιδίων του κυττάρου. Διαφορετικά κύτταρα είναι αναμενόμενο να έχουν άλλα επίπεδα του mRNA τους, ακόμη και γονιδίων ίδιων λειτουργιών. Επίσης κύτταρα του ίδιου οργανισμού (που έχουν το ίδιο DNA) αλλά έχουν διαφοροποιηθεί (πχ ανθρώπινα κύτταρα παγκρέατος, συγκριτικά με ήπατος). Ομοίως ανάλογα αναμένεται να ισχύουν και για πανομοιότυπα κύτταρα, τα οποία βρίσκονται δε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, ή ακόμη και για το ίδιο κύτταρο κάθε φορά που ανταποκρίνεται σε αλλαγές που συμβαίνουν σε αυτό κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

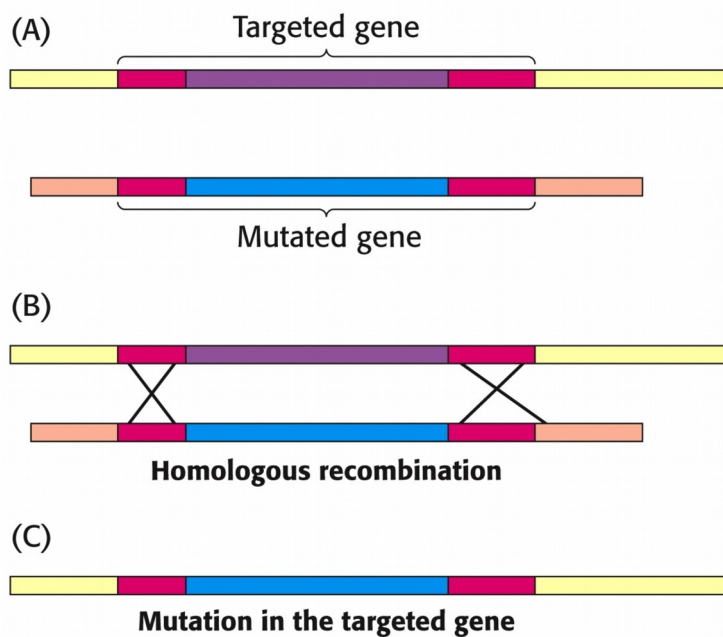
Αν για ένα κύτταρο είναι γνωστή η αλληλουχία του γονιδιώματός του, τότε μπορούν να κατασκευαστούν μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων, που ονομάζονται **μικροσυστοιχίες DNA** ή γονιδιακά τσιπ (DNA micro-arrays ή gene chips) πχ με την τοποθέτηση πολύ μικρών κηλίδων ολιγονουκλεοτιδίων ή cDNA σε σταθερό υπόστρωμα, όπως είναι μια πλάκα μικροσκοπίου. Ακολούθως σημασμένο με φθορισμό cDNA, προερχόμενο από mRNA του υπό μελέτη ή έλεγχο κυττάρου, υβριδοποιείται στη μικροσυστοιχία και έτσι αποκαλύπτονται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων από την ένταση του φθορισμού, ο οποίος είναι ανάλογος του επιπέδου μεταγραφής (Σχήμα 4.1.).



Σχήμα 4.1.: Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων με μικρυσυστοιχίες DNA. Το κόκκινο αντιστοιχεί σε επαγωγή ενώ το πράσινο σε καταστολή γονιδίων. [5]

4.1.3. Γονιδιακή εκμηδένιση [5]

Η λειτουργία ενός γονιδίου μπορεί να αποκαλυφθεί με την παρατήρηση των ανωμαλιών που προκαλούνται από την απενεργοποίησή του. Η καταστροφή των γονιδίων ονομάζεται **γονιδιακή εκμηδένιση** (gene knock out). Αυτό επιτυγχάνεται με αντικατάσταση του λειτουργικού γονιδίου-στόχο με ένα μεταλλαγμένο (το οποίο θα έχει καταστεί μη λειτουργικό) δια του ομόλογου ανασυνδυασμού, δοθέντος ότι τα δυο γονίδια έχουν τουλάχιστο μερική ομολογία (Σχήμα 4.2.). Η αντικατάσταση ή μη μπορεί να διαπιστωθεί από την λειτουργία ή μη του γονιδίου, στο τελικό αποτέλεσμα (αν δηλαδή έχει εκφραστεί ή όχι η ιδιότητα του υπό μελέτη γονιδίου).



Σχήμα 4.2.: Μετά από γενετικό ανασυνδυασμό, προκύπτει αντικατάσταση λειτουργικού γονιδίου-στόχου με ένα μεταλλαγμένο μη λειτουργικό. [5]

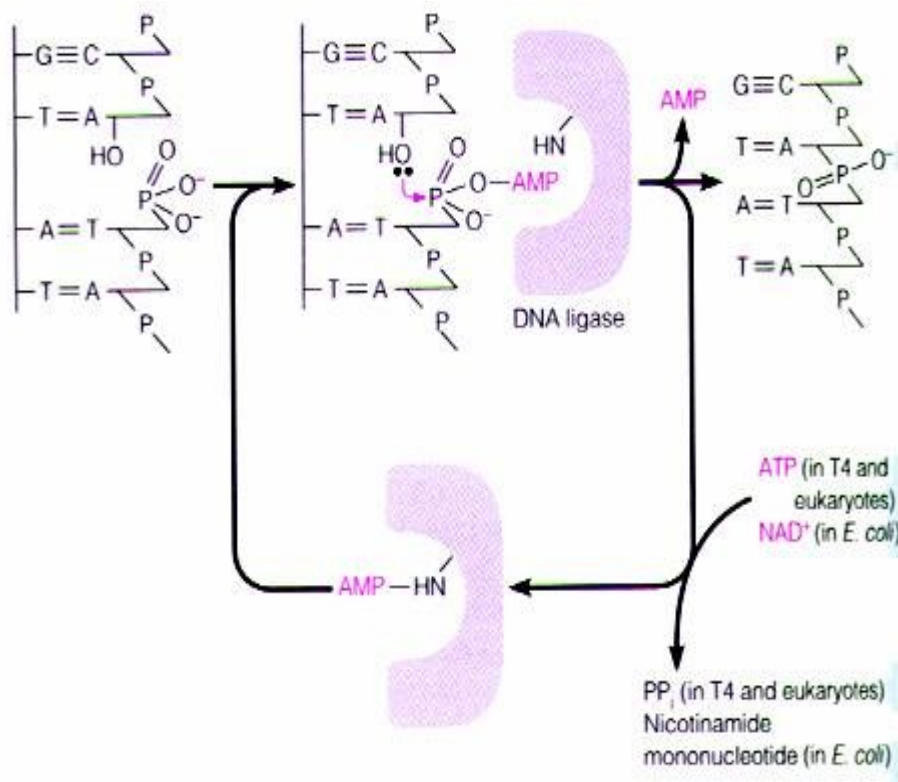
4.2. DNA-λιγάσες

4.2.1. Γενικά περί DNA-λιγασών [9, 10]

Οι DNA-λιγάσες είναι ένζυμα που κλείνουν φωσφοδιεστερικά ανοίγματα στις διπλοελικωμένες αλυσίδες του DNA. Από βιολογικής πλευράς οι DNA-λιγάσες είναι απαραίτητες για να κλείνουν τα ανοίγματα ανάμεσα στα τμήματα Okazaki κατά την αντιγραφή και κατά την σύνθεση μικρών τμημάτων DNA μετά από επισκευή του. Είναι γνωστές δυο κατηγορίες DNA-λιγασών. Η πρώτη βρίσκεται στα βακτήρια και χρησιμοποιεί ως συμπαραγόνο NAD^+ . Η δεύτερη βρίσκεται στα ευκάρια τους ιούς και τους βακτηριοφάγους και χρησιμοποιεί ως συμπαραγόνο ATP. Η μικρότερη γνωστή ATP-εξαρτώμενη DNA-λιγάση είναι του βακτηριοφάγου T4 (41 kd). Οι ευκαρυωτικές DNA-λιγάσες ίσως είναι πολύ μεγαλύτερες (η ανθρώπινη DNA-λιγάση I είναι >100 kd) αλλά φαίνεται ότι μοιράζονται κάποιες κοινές αλληλουχίες και πιθανώς δομικά στοιχεία.

Αναφορικά με τον μηχανισμό δράσης του ενζύμου, η αντίδραση γίνεται σε τρία βήματα σε όλες τις DNA-λιγάσες:

1. Σχηματισμός ενδιάμεσου μορίου μετά από σύνδεση του AMP με ομοιοπολικό δεσμό σε μια λυσίνη του ενζύμου. Το AMP παράγεται από το ATP ή το NAD^+ , μετά από απόσπαση πυροφωσφορικού ή νικοτιναμιδομονοφωσφορικού νουκλεοτιδίου (NMN) αντίστοιχα.
2. Μετακίνηση του AMP προς το 5' φωσφορικό άκρο της ανοιγμένης αλυσίδας του DNA.
3. Πυρηνόφιλη προσβολή του δεσμού AMP-DNA από το 3'-OH του ανοιγμένου DNA, κλείνοντας το άνοιγμα και απελευθερώνοντας το AMP (Σχήμα 4.3.).



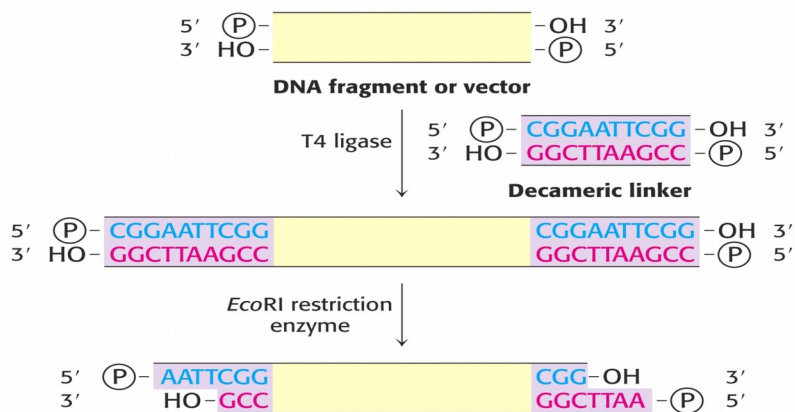
Σχήμα 4.3.: Μηχανισμός δράσης του ενζύμου DNA-λιγάση. [10]

4.2.2. Η DNA-λιγάση T4

Η DNA-λιγάση T4 καταλύει την σύνδεση δυο διπλοελικομένων μορίων DNA με μονόκλιωνα άκρα (συνεκτικά ή κολλώδη, cohesive ή sticky ends) ή με απότομα άκρα (blunt ή flush ends). Η σύνδεση των απότομων άκρων είναι λίγο αργότερη. Τα άκρα των μορίων DNA πρέπει να είναι

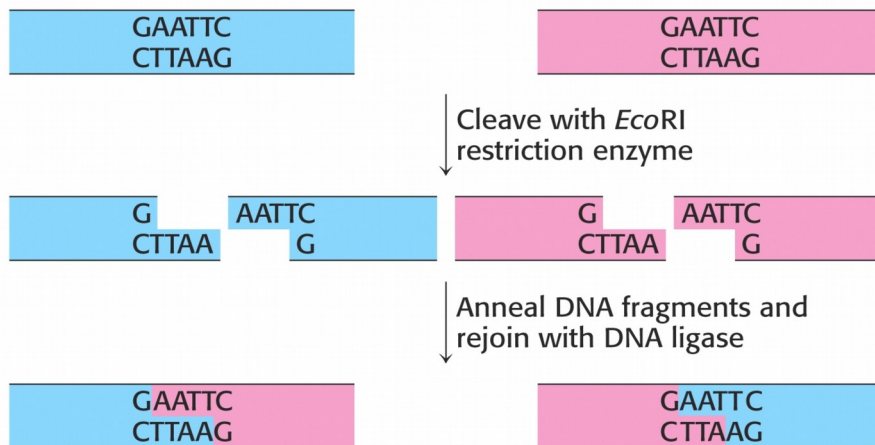
φωσφοριλιωμένα. Αν δεν είναι, τότε προηγείται φωσφοριλίωση με το ένζυμο κινάση των πολυνουκλεοτιδίων. Στα μόρια DNA που μπορούν να συνδεθούν περιλαμβάνονται και τα χημικώς κατασκευαζόμενα [9, 11].

Με τη βοήθεια του ενζύμου DNA-λιγάση T4 μπορούμε να κατασκευάσουμε στο εργαστήριο μόρια DNA με συνεκτικά άκρα της επιθυμίας μας, συνδέοντας χημικώς προκατασκευασμένα (με συγκεκριμένη αλληλουχία) μικρά μόρια με άλλα μεγαλύτερα ή πολύ μεγαλύτερα που έχουν ληφθεί από κάποια άλλη πηγή – πχ από κύτταρο. Επίδραση σε αυτή την ενδιάμεση κατασκευή με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο λαμβάνεται η κατασκευή με τα επιθυμητά συνεκτικά άκρα (Σχήμα 4.4.). Τα άκρα αυτά είναι πολύ χρήσιμα στις κατασκευές μορίων DNA, διότι έτσι μπορεί να γίνει επιλογή των τμημάτων που θέλομε να συνδεθούν μεταξύ τους.



Σχήμα 4.4.: Κατασκευή συνεκτικών άκρων σε μόριο DNA. [5]

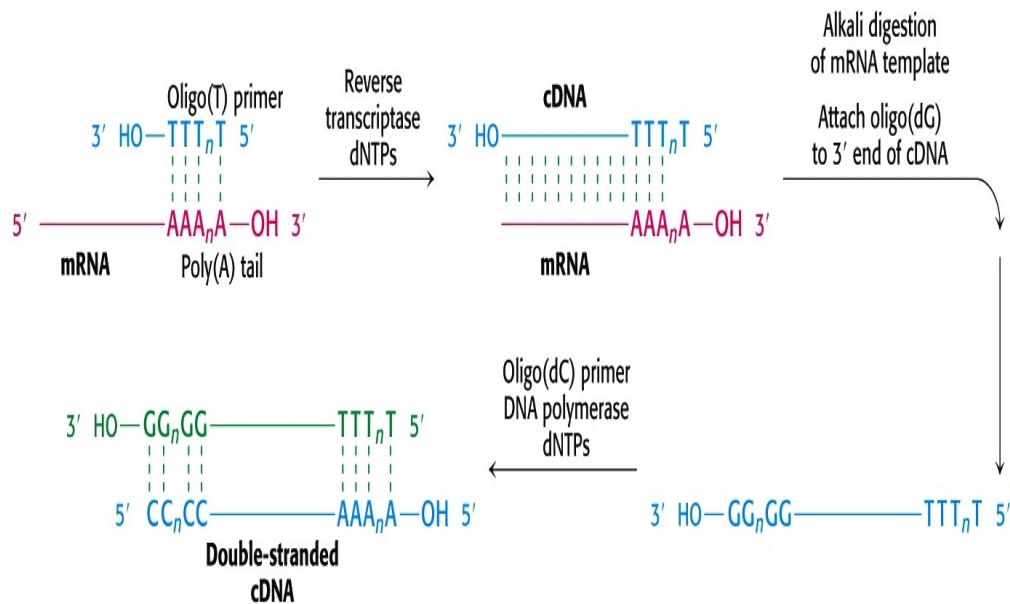
Δυο τέτοιες κατασκευές με διαφορετικά DNA αλλά ίδια συνεκτικά άκρα μπορούν να ενωθούν μεταξύ τους (Σχήμα 4.5.).



Σχήμα 4.5.: Κατασκευή συνεκτικών άκρων σε δυο μόρια DNA και σύνδεση μεταξύ τους. [5]

4.3. Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση [5]

Οι ρετροϊοί χρησιμοποιούν το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση για να συνθέσουν, με εκμαγείο το γονιδιώμα τους (RNA), συμπληρωματικό ως προς αυτό DNA (cDNA). Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για την σύνθεση cDNA με εκμαγείο mRNA. Επειδή το σύνολο σχεδόν των ευκαρυωτικών mRNA έχει 3' ουρά από αδενοσίνες [poly(A)], αρκεί να κατασκευαστεί εκκινήτης από θυμιδίνες [poly(T)], για να αρχίσει η σύνθεση συμπληρωματικού DNA ως προς mRNA. Ως αποτέλεσμα προκύπτει υβρίδιο mRNA-cDNA, υπό την κατάλυση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Σχήμα 4.6.).



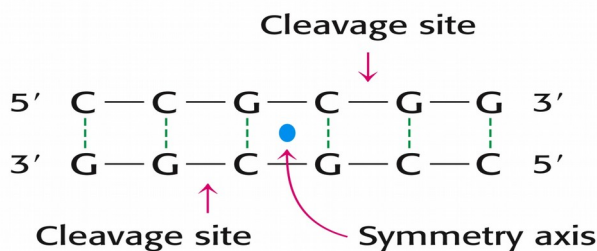
Σχήμα 4.6.: Σύνθεση cDNA με βασικό ένζυμο την αντίστροφη μεταγραφάση. [5]

Με αλκαλική πέψη αποικοδομείται η αλυσίδα του mRNA (το DNA παραμένει άθικτο ως λιγότερο ευαίσθητο από το RNA). Το ένζυμο RNAάση μπορεί επίσης να αποικοδομήσει το RNA. Το ένζυμο τελική μεταφοράση συνδέει στο 3' άκρο της μονής αλυσίδας του νεοσυντιθέμενου DNA μια ουρά πχ από [poly(G)]. Το ένζυμο DNA πολυμεράση συνθέτει μια δεύτερη αλυσίδα DNA, με εκμαγείο την υπάρχουσα μονή και εκκινητή [poly(C)]. Έτσι προκύπτει διπλή αλυσίδα DNA (cDNA), του οποίου η μία από τις δυο μονές είναι συμπληρωματική του mRNA που χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως εκμαγείο.

4.4. Περιοριστικά ένζυμα (ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες)

Από τα περισσότερο βασικά εργαλεία για την επεξεργασία των μορίων του DNA είναι τα περιοριστικά ένζυμα (ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες). Τα ένζυμα αυτά απομονώνονται από βακτήρια, τα οποία τα χρησιμοποιούν για άμυνα, καταστρέφοντας το ξένο DNA (π.χ. των ιών) που εισέρχεται εντός αυτών. Τα ένζυμα αυτά κόβουν τη διπλή έλικα του DNA σε εξειδικευμένες θέσεις και στις δυο αλυσίδες. Δεν κόβουν το δικό τους DNA (του βακτηρίου που τα περιέχει), διότι τα ίδια αυτά ένζυμα το μεθυλιώνουν και επομένως ως διαφορετικό το διακρίνουν από το ξένο.

Υπάρχουν τριών ειδών περιοριστικά ένζυμα, τα τύπου I, τύπου II και τύπου III. Πολύ χρήσιμα για τη γενετική μηχανική είναι τα τύπου II, διότι κόβουν το DNA εντός της αλληλουχίας που αναγνωρίζουν. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν συμμετρία άξονα δευτέρας τάξεως, όπως ακριβώς και το τμήμα του DNA που αναγνωρίζουν, δηλαδή αν το τμήμα του DNA, περί του οποίου γίνεται λόγος, περιστραφεί περί φανταστικό άξονα κάθετο προς αυτό, κατά 180°, τότε προκύπτει το ίδιο ακριβώς μόριο (της αλληλουχίας του DNA ή του αντιστοίχου ενζύμου). Παραδείγματα τέτοιων αλληλουχιών φαίνονται στα δυο επόμενα Σχήματα 4.7 και 4.8.

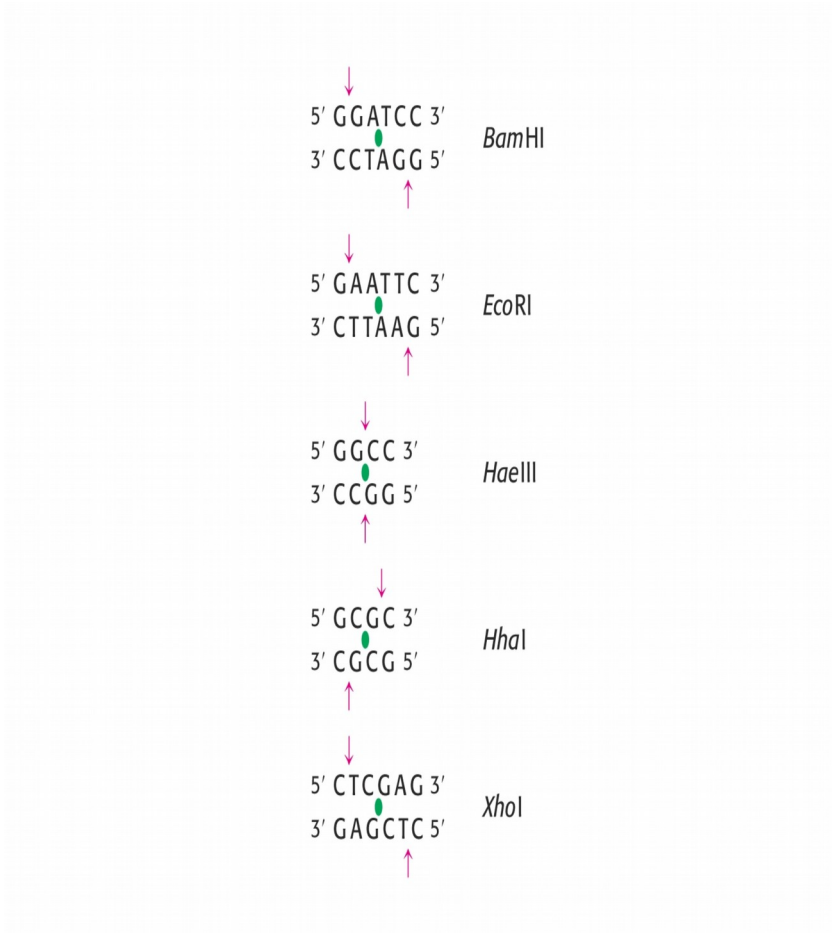


Σχήμα 4.7.: Η αλληλουχία DNA εικονίζει την συμμετρία άξονα δευτέρας τάξεως και τις θέσεις διάσπασης. Ο κάθετος άξονας προς το μόριο συμβολίζεται με την μπλε κουκίδα [5]

Το όνομα κάθε ενζύμου δυνητικά περιέχει τρία συστατικά. Το πρώτο αποτελείται από τρία γράμματα και προέρχεται από το είδος του κυττάρου από το οποίο έχει απομονωθεί, πχ **Eco**, από το βακτήριο *Escherichia coli*. Το δεύτερο από τον χαρακτηρισμό του στελέχους (αν είναι απαραίτητο) και το τρίτο από ένα λατινικό αριθμό (αν έχουν απομονωθεί περισσότερα από ένα περιοριστικά ένζυμα από το ίδιο μικροβιακό στέλεχος) πχ **EcoRI**.

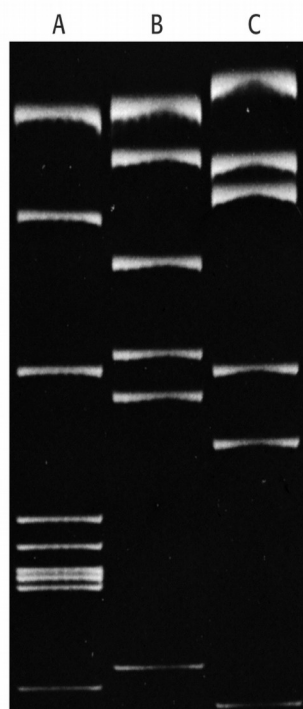
Τα βέλη δείχνουν τα σημεία στα οποία κόβονται οι δυο φωσφοδιεστερικοί δεσμοί (ένας από κάθε μονή αλυσίδα της διπλής έλικας). Αν οι δυο φωσφοδιεστερικοί δεσμοί που κόβονται είναι ο ένας απέναντι του άλλου (όπως πχ στο ένζυμο *HaeIII*) τότε δημιουργούνται απότομα άκρα (blunt ή flush ends), ενώ αν δεν είναι απέναντι δημιουργούνται μονόκλωνα άκρα (συνεκτικά ή κολλώδη, cohesive ή sticky ends).

Αν μόριο DNA κοπεί με κάποιο περιοριστικό ένζυμο, τότε σχηματίζονται συγκεκριμένων μηκών τμήματα (θραύσματα) χαρακτηριστικά τόσο του DNA όσο και του περιοριστικού ενζύμου.



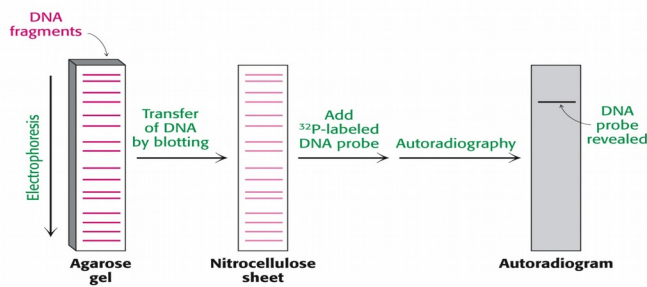
Σχήμα 4.8.: Αλληλουχίες DNA με συμμετρία άξονα δευτέρας τάξεως. [5]

Στο επόμενο Σχήμα 4.9. φαίνεται μόριο DNA που έχει κοπεί με τρία διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα.



Σχήμα 4.9.: Μόριο DNA (του ιού SV40) που έχει κοπεί με τρία διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα και έχει ηλεκτοφορηθεί σε πήγμα αγαρόζης. A, B, C είναι οι τρεις διαδρομές, η κάθε μια αντιστοιχεί σε δείγμα που έχει κοπεί με ένα περιοριστικό ένζυμο. [5]

Κάποιο θραύσμα που περιέχει μια ειδική αλληλουχία μπορεί να ανιχνευθεί, μετά από αντιγραφική μεταφορά σε ειδική μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αποδιάταξη, στερέωση και υβριδοποίηση με σημασμένο συμπληρωματικό μόριο (ανιχνευτή) και στη συνέχεια μπορεί να απομονωθεί από το πήγμα (Σχήμα 4.10.). Η τεχνική αυτή που βασίζεται στην ικανότητα των αλυσίδων DNA να υβριδίζουν μεταξύ τους, όταν έχουν υψηλό βαθμό συμπληρωματικότητας είναι γνωστή ως αποτύπωση Southern (Southern blotting) (προς τιμή του Edwin Southern, που την επινόησε). Ανάλογες τεχνικές υπάρχουν για ανίχνευση του RNA και των πρωτεϊνών και (παίζοντας με τις λέξεις) είναι γνωστές ως Northern blotting και Western blotting αντίστοιχα.



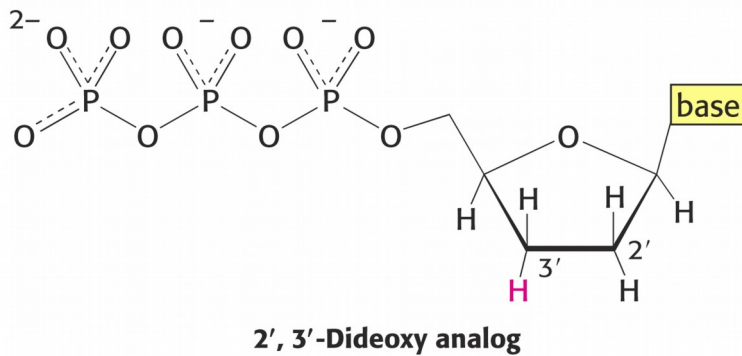
Σχήμα 4.10.: Μόριο DNA έχει κοπεί με περιοριστικό ένζυμο, έχει ηλεκτοφορηθεί σε πήγμα αγαρόζης, έχει γίνει αντιγραφική μεταφορά σε ειδική μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ακολούθησε αποδιάταξη, στερέωση, υβριδοποίηση με σημασμένο συμπληρωματικό μόριο και έγινε λήψη αυτοραδιογραφίας. [5]

4.5. Οι DNA-πολυμεράσες

4.5.1. Εύρεση της αλληλουχίας μορίου DNA (αλληλούχηση)

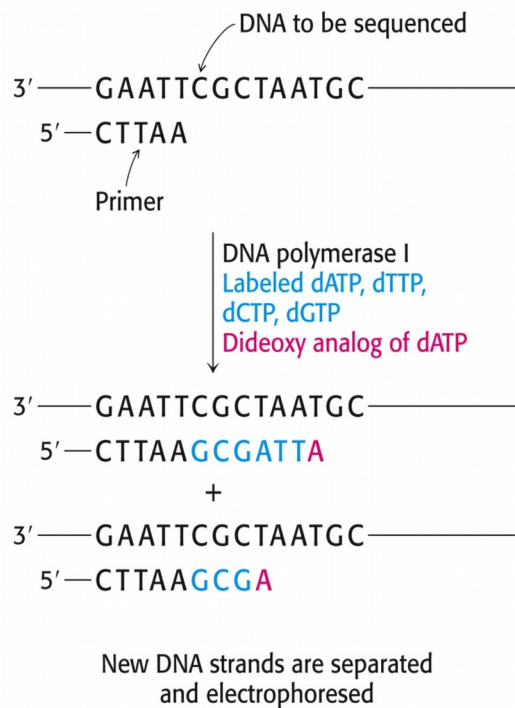
(μέθοδος διδεοξυαναλόγων του Sanger)

Σύμφωνα με την μέθοδο, η συγκεκριμένη αλληλουχία μονόκλωνου μορίου DNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο, σε τυχαίως ρυθμιζόμενη διακοπή αντίδρασης ενζυμικής αντιγραφής του DNA, έτσι ώστε να δημιουργούνται όλων των δυνατών μηκών νεοσυντιθέμενα τμήματα DNA, τα οποία μπορεί να διαφέρουν σε μέγεθος έως και κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Ως πολυμεριστικό ένζυμο χρησιμοποιείται η **DNA-πολυμεράση I** και ως εκκινητής μικρό μόριο DNA συμπληρωματικό μικρού τμήματος του προς αλληλούχηση DNA, ή άλλου εκτός αυτού και κοντά σε αυτό και συνδεδεμένο μαζί του ομοιοπολικά. Διεξάγονται παράλληλα τέσσερις αντιδράσεις που εκτός από τους τέσσερις τριφωσφορικούς δεοξυριβονουκλεοζίτες περιλαμβάνεται με φθορίζουσα σήμανση ανά αντίδραση ένα διαφορετικού είδους διδεοξυανάλογο (βλέπε τα δυο επόμενα Σχήματα 4.11. και 4.12.).



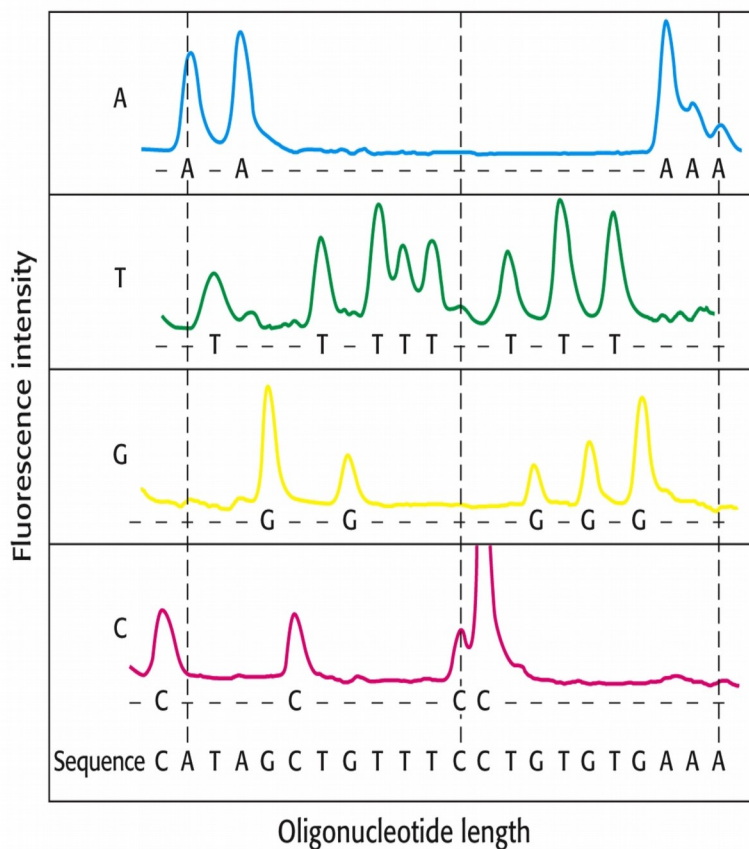
Σχήμα 4.11.: 2',3'-διδεοξυανάλογο. [5]

Λόγω της απουσίας υδροξυλίου της 3' θέσης του διδεοξυαναλόγου, αν εισαχθεί το διδεοξυανάλογο στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA, τότε η σύνθεση του DNA τερματίζεται. Με αυτό τον τρόπο και επειδή είναι τυχαία η είσοδος δεόξυ ή διδεοξυαναλόγου επιτυγχάνεται σύνθεση



Σχήμα 4.12.: Σχέδιο της μεθόδου αλληλούχησης DNA, του Sanger. [5]

όλων των δυνατών μεγεθών νέου DNA. Ηλεκτροφόρηση (μετά από αποδιάταξη) αυτού του δείγματος σε πήγμα αγαρόζης δίνει ζώνες που αντιστοιχούν σε όλα τα μήκη του νεοσυντιθέμενου DNA. Επειδή τα μικρότερου μεγέθους μόρια κινούνται ταχύτερα στην πηκτή και επειδή φέρουν φθορίζουσα σήμανση, η χρονική καταγραφή (από κατάλληλους ανιχνευτές), ουσιαστικά καταγράφει την σειρά με την οποία είναι τοποθετημένα τα διαφόρων ειδών δεοξυνουκλεοτίδια στην αλυσίδα του DNA. Αν η σήμανση του διαφορετικού διδεοξυαναλόγου είναι διαφορετικού χρώματος, τότε και οι τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις μπορούν να γίνουν στον ίδιο σωλήνα και τα αποτελέσματα να συγκαταγράφονται (Αυτοματοποιημένη μέθοδος, Σχήμα 4.13.).



Σχήμα 4.13.: Ανίχνευση θραυσμάτων DNA μέσω φθορισμού (Αυτοματοποιημένη μέθοδος αλληλούχησης, του Sanger). [5]

4.5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) [5]

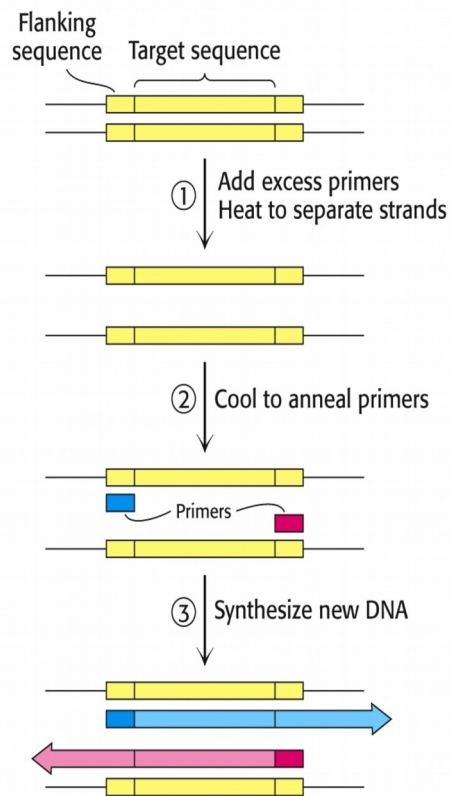
(απλή PCR, πολλαπλασιασμός τμημάτων DNA)

Ο Kary Mullis (1984) επινόησε ευφύεστατη και απλή μέθοδο ενίσχυσης ειδικών αλληλουχιών DNA, που ονομάστηκε **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)** και τιμήθηκε για αυτό με το βραβείο Nobel το έτος 1993. Από την αλυσίδα DNA που περιέχει το προς ενίσχυση τμήμα (αλληλουχία-στόχος), απαραίτητη προϋπόθεση είναι να γνωρίζουμε τις αλληλουχίες μικρών τμημάτων (μεγέθους 20 – 30 νουκλεοτιδίων) των δυο άκρων της (της αλληλουχίας-στόχου).

Το μίγμα της **αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης** πρέπει να περιέχει: **α)** το δείγμα του DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο. **β)** ζεύγος εκκινητών (συμπληρωματικών των δύο άκρων του προς ενίσχυση μορίου DNA), **γ)** τεσσάρων ειδών τριφωσφορικούς δεοξυριβονουκλεοζίτες, **δ)** αναγκαία ποσότητα **θερμοανθεκτικής** (λόγω της υψηλής θερμοκρασίας λειτουργίας) **DNA-πολυμεράσης** (πχ Taq, από το βακτήριο *Thermus aquaticus*).

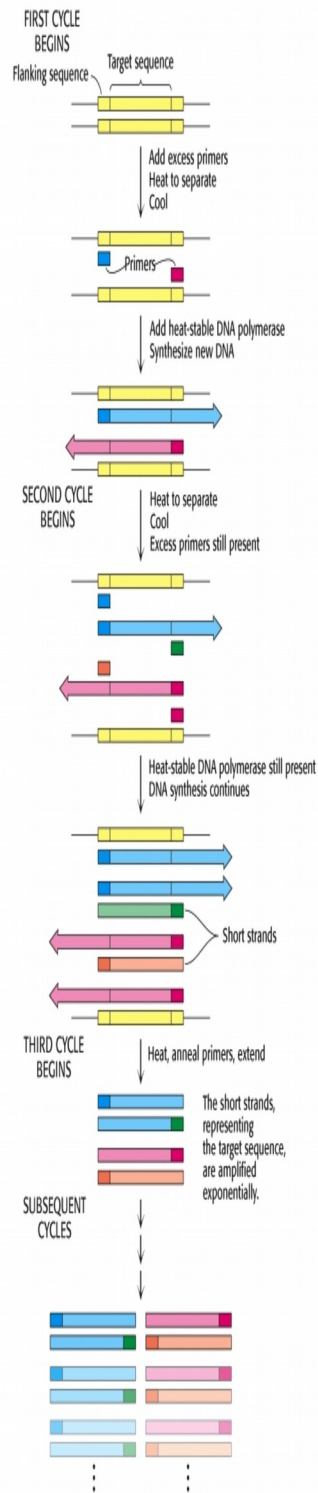
Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικό μηχάνημα (θερμοκυκλοποιητή). Η τεχνολογία της **PCR** περιλαμβάνει (για κάθε κύκλο), τρία στάδια τα εξής:

1. Διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται έως τους 95 °C και διατηρείται για 30 δευτερόλεπτα σε αυτή την θερμοκρασία. Έτσι διαχωρίζονται οι δυο αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών. Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται απότομα έως τους 54 °C και διατηρείται για 30 δευτερόλεπτα στην ίδια θερμοκρασία.. Έτσι υβριδοποιούνται οι δυο εκκινητές στις δυο 3' πλευρές των μονών αλυσίδων της διπλής έλικας του DNA.
3. Σύνθεση νέου DNA. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται έως τους 72 °C και διατηρείται για 30 δευτερόλεπτα σε αυτή τη θερμοκρασία.. Δίδεται η δυνατότητα στη θερμοανθεκτική **DNA-πολυμεράση** να συνθέσει νέο DNA από 5' προς 3' κατεύθυνση (Σχήμα 4.14.).



Σχήμα 4.14.: Πρώτος κύκλος PCR. [5]

Τα τρία προηγούμενα στάδια επαναλαμβάνονται από 20 έως 40 φορές, ανάλογα με την επιδιωκόμενη ποσότητα νεοσυντιθέμενου DNA (Σχήμα 4.15.).



Σχήμα 4.15.: Αποτέλεσμα πολλών κύκλων στην PCR. [5]

Υπολογισμός του πληθυσμού του συνόλου των μορίων του DNA του δείγματος της PCR

Ας υποθέσουμε ότι αρχίζουμε με ένα (1) μόριο DNA (μία διπλή αλυσίδα = δυο μονές αλυσίδες) και ας υπολογίσουμε το σύνολο των μονών αλυσίδων που θα υπάρχουν στο τέλος του υποθετικά διεξαγόμενου πειράματος.

Πριν την έναρξη του πολλαπλασιασμού των μορίων του DNA (στην **αρχή του πρώτου κύκλου**) έχουμε 2 μονές αλυσίδες της διπλής έλικας που περιέχουν το τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει να πολλαπλασιάσουμε (αλληλουχία στόχο) και το μήκος τους επεκτείνεται εκατέρωθεν του τμήματος αυτού. Συμβολίζουμε με A το μήκος κάθε ενός από αυτά τα μόρια του DNA. Ο πληθυσμός τους είναι $2_A = 2 = 2^1$.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου (ή το αυτό, στην **αρχή του δεύτερου κύκλου**) θα έχουμε (εκτός από τα μήκους A) δύο νέα μόρια DNA μικρότερου μήκους από A, τα οποία προκύπτουν με εκμαγεία τα δυο μήκους A. Το καθένα (από τα δυο νέα μόρια) είναι μικρότερου μήκους από A, διότι δεν αρχίζει η σύνθεσή του από το άκρο του εκμαγείου μήκους A αλλά από το σημείο υβριδοποίησης του ενός εκκινητή (πχ του forward = του προς τα εμπρός) της αλληλουχίας στόχου. Το μήκος του κάθε ενός από αυτά τα μόρια του DNA συμβολίζουμε με B. Επομένως ο πληθυσμός του συνόλου των μορίων του DNA είναι $2_A + 2_B = 4 = 2^2$.

Στο τέλος του δεύτερου κύκλου (ή το αυτό, στην **αρχή του τρίτου κύκλου**) θα έχουμε τα δυο μήκους A, δύο νέα μόρια μήκους $\beta (=B)$ που προκύπτουν με εκμαγεία τα δυο μήκους A, συν 2 μήκους B από τον προηγούμενο κύκλο, συν δυο μικρότερου μήκους, τα οποία προκύπτουν με εκμαγεία τα δυο μήκους B του προηγούμενου κύκλου. Το μήκος του κάθε ενός από αυτά που είναι η αλληλουχία στόχος συμβολίζουμε με Γ.

Τα μήκους Γ αρχίζουν τη σύνθεσή τους από την 3' θέση του εκμαγείου τους (ένα από τα μήκους B), στο οποίο προσκολλάται (πχ) ο forward εκκινητής και την τερματίζουν στο 5' άκρο του που είναι το τμήμα του άλλου εκκινητή (reverse) που άρχισε η σύνθεση του εκμαγείου μήκους B. Σύνολο $2_A + 2_\beta + 2_B + 2_\Gamma = 8 = 2^3$ (αύξηση με γεωμετρική πρόοδο).

Επαγωγικά προκύπτει για τον πληθυσμό του συνόλου των μονών αλυσίδων του DNA ότι:

Στο τέλος του 19^{ου} κύκλου (αρχή του 20^{ου}), σύνολο = $2^{20} = 1,05 \times 10^6$.

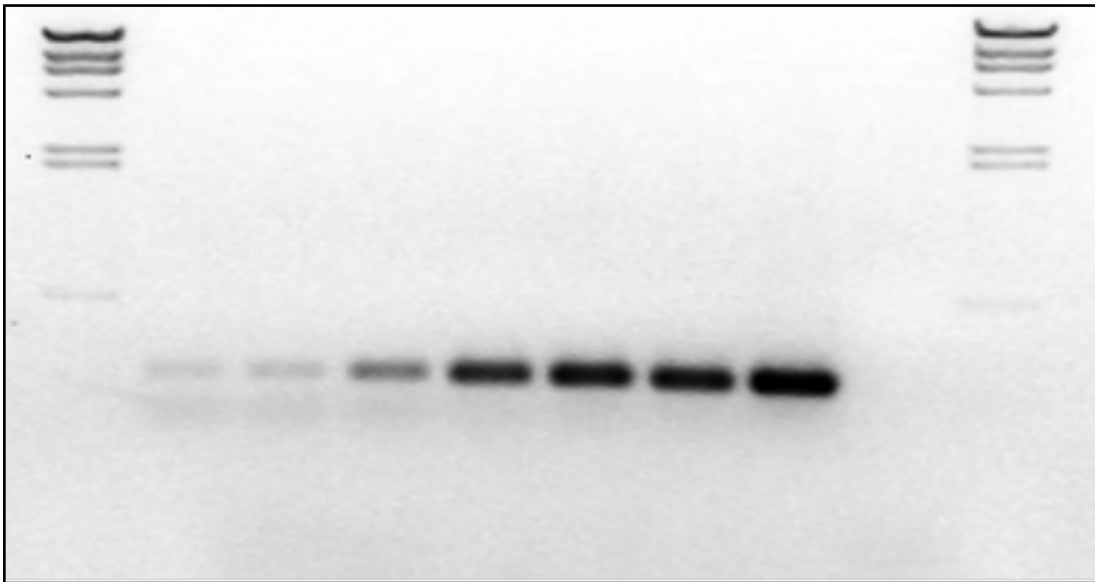
Στο τέλος του 29^{ου} κύκλου (αρχή του 30^{ου}), σύνολο = $2^{30} = 1,07 \times 10^9$

Στο τέλος του 39^{ου} κύκλου (αρχή του 40^{ου}), σύνολο = $2^{40} = 1,1 \times 10^{12}$

Σε αυτούς τους πληθυσμούς υπάρχουν 2 ($\alpha_1=2$) μήκους A και μικρός αριθμός μήκους B μορίων DNA, διότι αυξάνονται με αριθμητική πρόοδο. Σε κάθε κύκλο προστίθενται 2_B ($\omega=2$) και σε σύνολο $\text{πχ } 2^{40}$ μορίων DNA [στο τέλος του 39^{ου} κύκλου ($v=39$)], τα μήκους B είναι μόνο $1.560 = [2\alpha_1+(v-1)\omega]v/2$. Επομένως το σύνολο σχεδόν των μορίων DNA είναι μήκους Γ.

Ηλεκτροφόρηση του παρασκευάσματος σε πηκτή αγαρόζης δίνει μια **έντονη** ζώνη που αντιστοιχεί στο μήκος Γ των τμημάτων DNA (Σχήμα 4.16.). Τα μήκους A και B, αν και δεν είναι ορατά στην πηκτή αγαρόζης λόγω του πολύ μικρού πληθυσμού τους, είναι βέβαιο ότι δεν είναι στην ζώνη των μήκους Γ, ως μεγαλύτερου μήκους μόρια. Έτσι μπορούμε να διαχωρίσουμε και να παραλάβουμε καθαρό το τμήμα του DNA που είχε σχεδιασθεί να ενισχυθεί.

λ DNA ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ λ DNA



Σχήμα 4.16.: 7 ζώνες του ίδιου μορίου DNA σε 7 διαδρομές (↓), Γ μήκους αλληλουχίας στόχου αυξανόμενης ποσότητας ανά διαδρομή που έχει ενισχυθεί με PCR, πρότυπο λ DNA. [12]

Η τεχνική της PCR (απλής PCR) έχει συμπληρωθεί και εξελιχθεί στην **ποσοτική PCR** (Quantitative PCR, Q-PCR). Η ποσοτική PCR εν πολλοίς βασίζεται τόσο στην σύνθεση *in vitro* cDNA με την χρησιμοποίηση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, όσο και στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR που δίνει την δυνατότητα άμεσης μέτρησης της εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού κατά την διάρκεια της αντίδρασης (**σε πραγματικό χρόνο**).

Έχει την δυνατότητα σχετικά ακριβούς προσδιορισμού των παραγομένων ποσοτήτων των μορίων mRNA συγκεκριμένου γονιδίου, σε σύγκριση με την τεχνική των μικρο-συστοιχιών DNA που δίνει αποτέλεσμα μικρής ακρίβειας αλλά για πολλά γονίδια συγχρόνως.

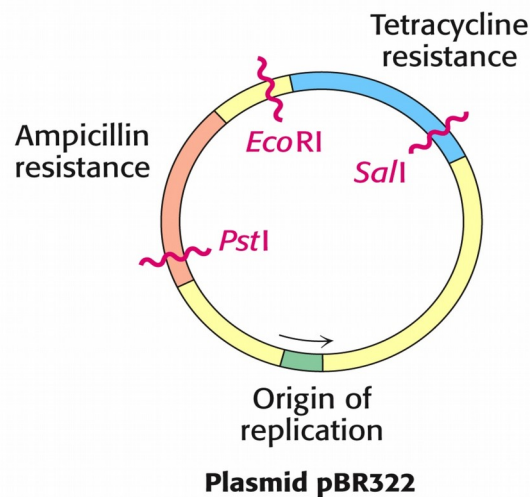
Η περαιτέρω ενασχόληση με το αντικείμενο της ποσοτικής PCR ξεφεύγει των στόχων του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών.

4.6. Φορείς DNA

4.6.1. Πλασμίδια [5]

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά (κλειστά, χωρίς άκρα) μόρια DNA που περιέχονται σε βακτήρια ή και κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (πχ ζύμες). Από πολλούς έχουν χαρακτηριστεί ως μικρά ή βοηθητικά χρωμοσώματα. Έχουν μέγεθος από μια ή δυο χιλιάδες ζεύγη βάσεων έως μερικές εκατοντάδες χιλιάδες. Φέρουν δική τους αρχή αντιγραφής και επομένως μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να λειτουργούν αυτόνομα. Φέρουν γενετικές πληροφορίες (γονίδια) για σύνθεση πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για απενεργοποίηση αντιβιοτικών (και επομένως προσδίδουν στα βακτήρια που τα φέρουν αντοχή έναντι αυτών των αντιβιοτικών), παραγωγή τοξινών, κλπ. Δεν είναι απαραίτητα για τους μικροοργανισμούς, πλην όμως κάτω από ορισμένες συνθήκες τους προσδίδουν πλεονεκτήματα, πχ τα καθιστούν ανθεκτικά έναντι αντιβιοτικών.

Ένα από τα πιο χρήσιμα πλασμίδια, για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, είναι το πλασμίδιο **pBR322** (Σχήμα 4.17.).



Σχήμα 4.17.: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου **pBR322**. [5]

Το πλασμίδιο αυτό εκτός από την αρχή αντιγραφής, έχει γονίδια αντοχής έναντι των αντιβιοτικών αμικιλίνη και τετρακυκλίνη και περιοριστικές θέσεις για τα ένζυμα *EcoRI*, *PstI*, *Sall*, *HindIII* και *BamHI*, οι τρεις τελευταίες από τις οποίες βρίσκονται εντός του γονιδίου αντοχής στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη. Αν σε μια από τις τρεις αυτές θέσεις εισαχθεί ξένο DNA, τότε απενεργοποιείται το γονίδιο αντοχής στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη και επομένως είναι δυνατό να επιλεγεί κάθε κύτταρο που περιέχει αυτό το πλασμίδιο, ως ανθεκτικό μόνο στην αμικιλίνη. Κύτταρα που δεν φέρουν το πλασμίδιο pBR322 είναι ευαίσθητα και στα δυο αντιβιοτικά, ενώ αν το φέρουν χωρίς ξένο DNA είναι ανθεκτικά και στα δυο αντιβιοτικά (βλέπε στην παράγραφο 4.7. Εφαρμογές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA). Τα πλασμίδια (και οι φάγοι) χαρακτηρίζονται ως φορείς (ξένου DNA), διότι έχουν την ικανότητα να φέρουν ξένο DNA (το οποίο εμείς προσθέτομε τεχνητά) και εισερχόμενοι σε βακτήρια να εκφράζουν τις ιδιότητες αυτού του DNA .

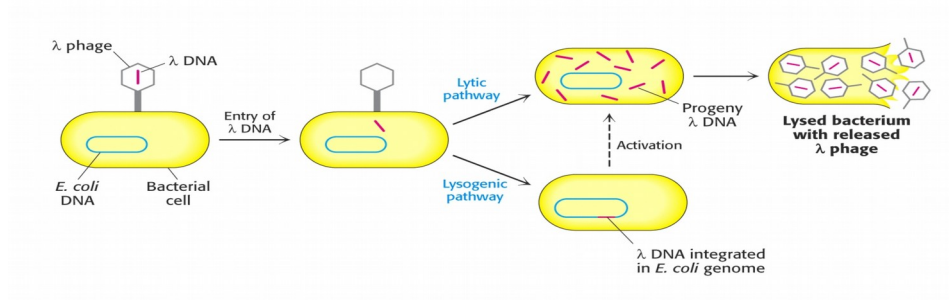
4.6.2. Φάγοι

Οι φάγοι (ή βακτηριοφάγοι = ιοί των βακτηρίων) πλεονεκτούν έναντι των πλασμιδίων ως προς την ικανότητά τους να εισέρχονται ευκολότερα στα βακτήρια (διαδικασία που είναι γνωστή ως μόλυνση), διότι διαθέτουν ο καθένας δικό τους φυσικό μηχανισμό εισόδου, ενώ τα βακτήρια πρέπει να εισαχθούν στα κύτταρα τεχνητά (διαδικασία που είναι γνωστή ως βακτηριακός μετασχηματισμός). Οι φάγοι λ και M13 που μπορούν να εισέρχονται στο βακτήριο *Escherichia coli* (*E.coli*) είναι από του περισσότερο γνωστούς από εκείνους που χρησιμοποιούνται ως φορείς DNA.

4.6.2.1 Ο φάγος λ [5]

Ο φάγος λ έχει την επιλογή δυο τρόπων – διαδικασιών διαίωσισης του γενετικού του υλικού (DNA). α. Αφού εισάγει το DNA του στο βακτήριο (*E.coli*) να το ενσωματώσει στο DNA του βακτηρίου, στο οποίο το DNA του φάγου παραμένει ανενεργό και ενώ το βακτήριο

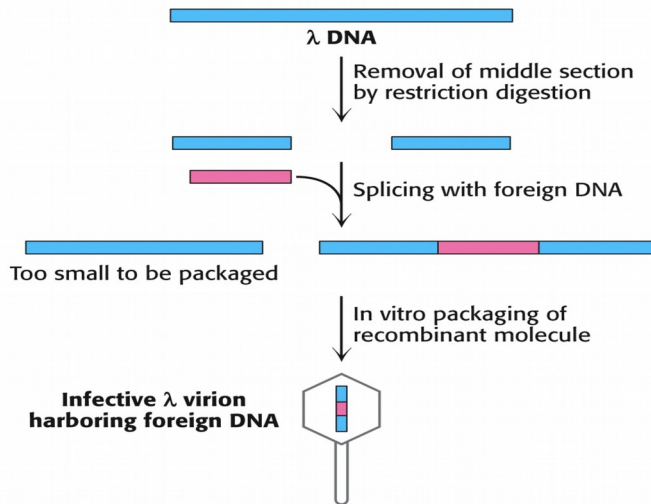
πολλαπλασιάζεται να πολλαπλασιάζεται και το DNA του φάγου (λυσογονική πορεία) για πολλές γενεές, έως ότου ενεργοποιηθεί. **β.** Να το πολλαπλασιάσει σε πολλά αντίγραφα, τα οποία θα εγκλειστούν σε περίβλημα πρωτεΐνης (ιοσωμάτια-virions) και θα εξέλθουν του κυττάρου καταστρέφοντας το (λυτική πορεία) (Σχήμα 4.18.).



Σχήμα 4.18.: Μόλυνση του βακτηρίου *E.coli* από τον φάγο λ. [5]

Περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να ενεργοποιήσουν το ιικό DNA που είναι ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα του βακτηρίου, το οποίο τότε θα ακολουθήσει την λυτική πορεία.

Μια από τις μεταλλάξεις του φάγου λ που φέρει μόνο δυο περιοριστικές θέσεις *EcoRI* μπορεί να δεχθεί μεγάλο τμήμα ξένου DNA (≈ 10 kb), μετά την αφαίρεση του τμήματος μεταξύ των δυο θέσεων περιορισμού *EcoRI*, το οποίο είναι της τάξεως των 13,5 kb (Σχήμα 4.19.).



Σχήμα 4.19.: DNA του μεταλλαγμένου φάγου λ και ένθεση ξένου DNA. [5]

Μια άλλη μετάλλαξη του φάγου λ, η οποία ονομάζεται κοσμίδιο (cosmid), μπορεί να δεχθεί ξένο DNA τάξεως μεγέθους των 45 kb.

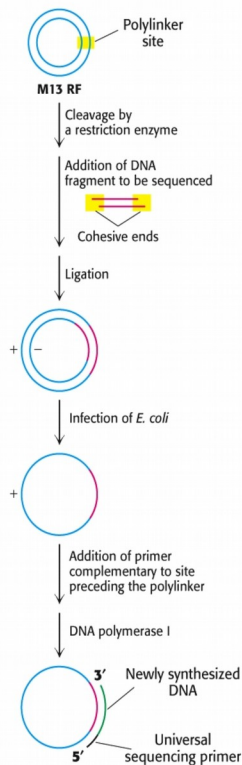
4.6.2.2. Ο φάγος M13 [5]

Ο φάγος M13 είναι νηματοειδής (Σχήμα 4.20.) με μήκος 900 nm, πάχος μόλις 9 nm, του οποίου το μονόκλωνο κυκλικό DNA [θετική (+) αλυσίδα μήκους 6,4 kb], προστατεύεται από περίβλημα 2.710 πανομοιότυπων μονάδων πρωτεΐνης. Μπαίνει στο κύτταρο *E.coli* από τη βακτηριακή φυλοσύνδετη πύλη. Η θετική (+) αλυσίδα αντιγράφεται σχηματίζοντας διπλή αλυσίδα DNA (replicative form, RF), μέσω της οποίας πολλαπλασιάζεται. Στη διπλή κυκλική αλυσίδα DNA (RF) προστίθεται πολυσυνδέτης (multilinker = τμήμα DNA, το οποίο μπορεί να κοπεί με πολλά διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα). Η διπλή κυκλική αλυσίδα DNA (RF) ανοίγεται στον πολυσυνδέτη με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο, το οποίο χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό συνεκτικών άκρων στο ξένο DNA (ένθεμα) που θα κλωνοποιηθεί (θα πολλαπλασιασθεί σε πολλά αντίγραφα) και θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για την εύρεση



Σχήμα 4.20.: Ο νηματοειδής φάγος M13 (ηλεκτρονιομικρογραφία). [5]

της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του (Σχήμα 4.21.).

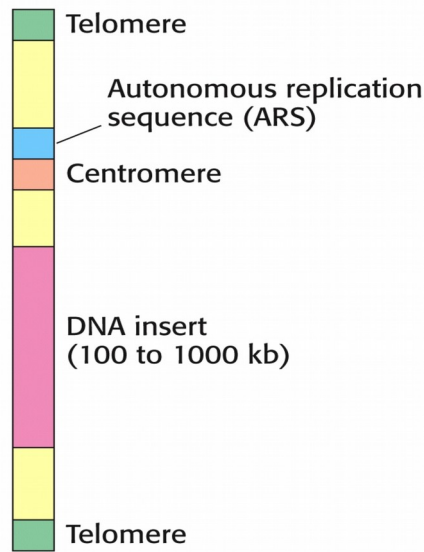


Σχήμα 4.21.: Ο νηματοειδής φάγος M13 ως φορέας κλωνοποίησης τμήματος DNA, του οποίου (τμήματ. DNA) θα βρεθεί η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του.[5]

Το ξένο DNA και ο φορέας αναμιγνύονται για υβριδισμό των συνεκτικών άκρων τους και ακολουθεί κλείσιμο των ανοιγμάτων με DNA λιγάση. Το ξένο DNA μπορεί να ενσωματωθεί με δυο προσανατολισμούς. Επομένως, οι μισές νέες αλυσίδες (+) που θα συσκευασθούν στα ιοσωμάτια θα περιέχουν τη μια αλυσίδα ξένου DNA και οι άλλες μισές την άλλη. Μόλυνση του βακτηρίου *Escherichia coli* με ένα ιοσωμάτιο θα δώσει μεγάλες ποσότητες του φάγου M13 που περιέχει την ίδια αλυσίδα ξένου DNA. Ακολουθεί η εύρεση της αλληλουχίας του ξένου DNA με την μέθοδο Sanger εφόσον κατασκευαστεί εκκινητής συμπληρωματικός ως προς την αλληλουχία του πολυσυνδέτη. Η μέθοδος αλληλούχησης DNA μέσω του φάγου M13 έχει το πλεονέκτημα της ταυτόχρονης παρασκευής των απαιτούμενων για την αλληλούχηση ποσοτήτων DNA και την διεξαγωγή της αλληλούχησης. Ο φάγος M13 έχει χρησιμοποιηθεί στο πρόσφατο παρελθόν κυρίως για αλληλούχηση ξένου DNA. Σήμερα έχει υποκατασταθεί για τον πολλαπλασιασμό του DNA από την τεχνολογία της PCR, η οποία ακολουθείται από την μέθοδο αλληλούχησης του Sanger.

4.6.3. Τεχνητά χρωμοσώματα [5]

Οι πλασμιδιακοί φορείς και οι φάγοι χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση σχετικά μικρών τμημάτων DNA έως 15 kb, ενώ έως 45 kb κάποιες ειδικές κατασκευές του φάγου λ, που είναι γνωστές ως κοσμίδια. Σε τεχνητά βακτηριακά χρωμοσώματα (bacterial artificial chromosomes, BAC) ή τεχνητά χρωμοσώματα ζύμης (yeast artificial chromosomes, YAC) μπορούν να κλωνοποιηθούν τμήματα DNA από 100 έως 1.000 kb. Τα YAC περιέχουν μια αρχή αντιγραφής (autonomous replicating sequence, ARS), ένα κεντρομέρος (περιοχή υπεύθυνη για τον χωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση), δύο τελομερή (φυσιολογικά άκρα ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων), γονίδια για επιλογή (πχ αντοχή σε αντιβιοτικά) και μια θέση για κλωνοποίηση του ενθέματος (Σχήμα 4.22.). Ένα τέτοιο τεχνητό χρωμόσωμα πολλαπλασιάζεται αποτελεσματικά σε κύτταρα ζύμης.



Σχήμα 4.22.: Τεχνητό χρωμόσωμα ζύμης (YAC) ως φορέας κλωνοποίησης μεγάλου τμήματος DNA, του οποίου (DNA) θα βρεθεί η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. [5]

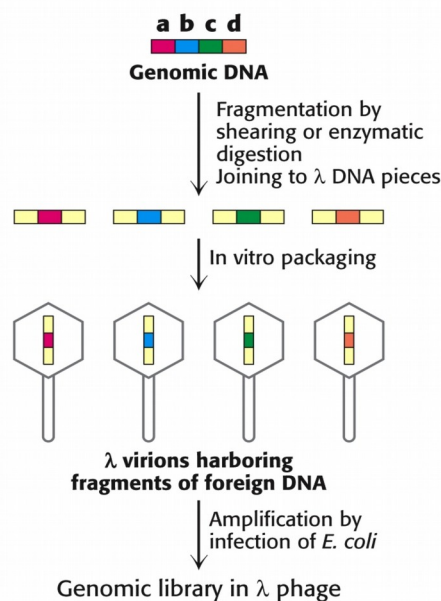
4.7. Κλωνοποίηση γονιδίων (κλωνοποίηση DNA)

Η εισαγωγή μορίου DNA (ένθεμα=insert, πχ γονίδιο ή ομάδα γονιδίων) σε φορέα (πλασμίδιο, φάγο, τεχνητό χρωμόσωμα), ο οποίος εισάγεται σε μικρόβιο (συνήθως βακτήριο ή ζυμομύκητα) και ο πολλαπλασιασμός του φορέα (μαζί με το εισαγόμενο σε αυτόν DNA) μέσω πολλαπλασιασμού του μικροβίου, ονομάζεται **κλωνοποίηση DNA** ή μοριακή κλωνοποίηση ή απλά κλωνοποίηση. Μετά από κατεργασία του επίμαχου μορίου DNA με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο ή κατάλληλα

περιοριστικά ένζυμα, το DNA αυτό εισάγεται στον κατάλληλο φορέα (γνωστές τεχνικές ως ανωτέρω αναφερόμενες).

Αν το εισαγόμενο DNA (insert) δεν είναι μόνο ένα μικρό τμήμα αλλά είναι το σύνολο του γονιδιώματος ενός οργανισμού (του οποίου το DNA επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε, από το γονιδίωμα ενός βακτηρίου έως και το ανθρώπινο), τότε η μοριακή κλωνοποίηση επιτυγχάνεται με τεμαχισμό του ολικού DNA σε στατιστικά ισομεγέθη τμήματα των 15 kb με την βοήθεια περιοριστικών ενζύμων. Τοποθετούνται σε αυτά συνδετικά άκρα που επεξεργάζονται με το ίδιο περιοριστικό με το οποίο έχει επεξεργαστεί ο φορέας (όπως πχ ο φάγος λ) και εισάγονται σε

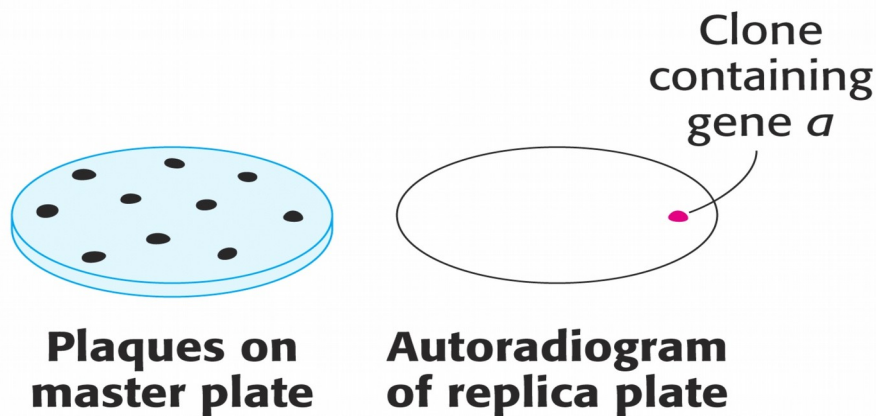
αυτόν. Ακολούθως με τους ανασυνδυασμένους φάγους μολύνεται το βακτήριο *Escherichia coli*. Λύση των βακτηριακών κυττάρων παρέχει ισοσώματα που περιέχουν ως ένθεμα το σύνολο του γονιδιώματος του οργανισμού (Σχήμα 4.23.). Το σύνολο αυτό του ολικού DNA ενός οργανισμού εντός φορέα (εδώ του φάγου λ), αποτελεί μια **γονιδιωμακή βιβλιοθήκη ή γονιδιωμακή τράπεζα**. Αν αντί για το σύνολο του γονιδιώματος του οργανισμού χρησιμοποιηθεί το σύνολο του mRNA του και από κατασκευασθεί το αντίστοιχο cDNA, τότε η βιβλιοθήκη είναι γνωστή ως βιβλιοθήκη cDNA.



Σχήμα 4.23.: Γονιδιωματική βιβλιοθήκη στο φορέα κλωνοποίησης φάγο λ. [5]

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση συγκεκριμένου γονιδίου του οποίου επιθυμούμε την μελέτη. Στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου, εντός τρυβλίου Πετρί, επί του οποίου έχει αναπτυχθεί ένας τάπητας από το βακτήριο *Escherichia coli*, επιστρώνεται σχετικά μικρός αριθμός φάγων (μέσω αραιού αιωρήματος αυτών) της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Οι φάγοι εισέρχονται σε κύτταρα, πολλαπλασιάζονται εντός αυτών, τα λύουν και εξέρχονται αυτών δημιουργώντας πλάκες λυμένων βακτηρίων που περιέχουν σχετικά μεγάλο αριθμό φάγων που περιέχουν όλοι το ίδιο ένθεμα (όσον αφορά τους φάγους της ίδιας πλάκας). Ακολούθως δημιουργείται ένα αντίγραφο του τρυβλίου σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης, επί του οποίου μεταφέρεται το DNA τόσο λυμένων βακτηρίων όσο και φάγων. Το DNA αυτό μονιμοποιείται αποδιαταγμένο (ως μονές αλυσίδες) επί της μεμβράνης

και αποκαλύπτεται η θέση της πλάκας που φέρει τους φάγους με το επίμαχο γονίδιο, μέσω ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή από συμπληρωματικό DNA ή RNA (Σχήμα 4.24.). Σύγκριση της μεμβράνης και του αρχικού τρυβλίου επιτρέπει την επιλογή φάγων της αντίστοιχης



Σχήμα 4.24.: Έλεγχος μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης για την απομόνωση συγκεκριμένου γονιδίου, με ανιχνευτή DNA). [5]
πλάκας από το τρυβλίο.

Η ανωτέρω αναφερόμενη διαδικασία προϋποθέτει την ύπαρξη κατάλληλου ανιχνευτή. Είναι γνωστοί τρόποι κατασκευής ανιχνευτών.

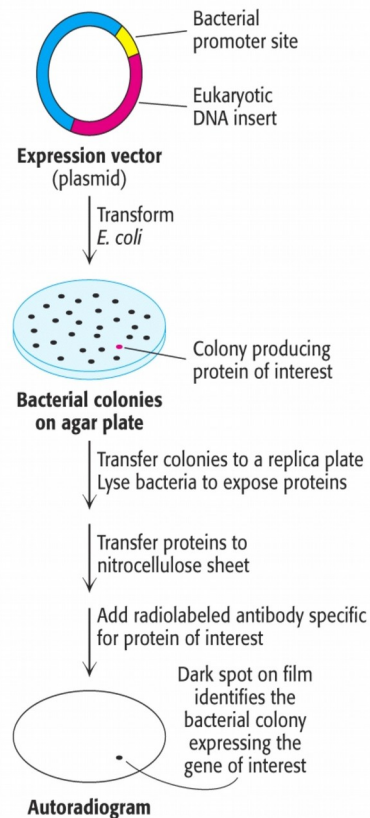
- Απομόνωση του αντίστοιχου mRNA. Από δείγμα απομονωμένου RNA του κυττάρου, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης, απομονώνεται το mRNA του αντιστοίχου γονιδίου με κριτήριο το μέγεθός του και από αυτό κατασκευάζεται το συμπληρωματικό σε αυτό DNA (cDNA), το οποίο χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής.
- Αν διαθέτομε γονίδιο της ίδιας λειτουργίας από άλλο συγγενή οργανισμό, επειδή αναμένεται αν έχουν τοπικά τουλάχιστον παραπλήσια αλληλουχία, το χρησιμοποιούμε ως ανιχνευτή
- Αν από άλλο συγγενή οργανισμό γνωρίζουμε τμήμα της αλληλουχίας του αντιστοίχου γονιδίου, μπορούμε να κατασκευάσουμε τεχνητά τον ανιχνευτή του ενδιαφέροντος.
- Αν είναι γνωστή μέρος της αλληλουχίας των αμινοξέων της πρωτεΐνης του επίμαχου γονιδίου. Εδώ υπάρχει μια δυσκολία που προέρχεται από τον εκφυλισμό του γενετικού

κώδικα. Για αυτό επιλέγεται τμήμα της αλληλουχίας που περιέχει σχετικά πολλά αμινοξέα που κωδικεύονται από ένα κωδίκιο, όπως είναι η θρυπτοφάνη και η μεθειονίνη (Σχήμα 4.25.).

Amino acid sequence ...	Cys	Pro	Asn	Lys	Trp	Thr	His	...
Potential oligonucleotide sequences	TG ^C _T	CG ^C _G A T	AA ^C _T	AA ^A _G	TGG	AC ^C _G A T	CA ^C _T	

Σχήμα 4.25.: Πρωτεϊνική αλληλουχία ως αναφορά για την κατασκευή ανιχνευτή. [5]

Με ανάλογο τρόπο μπορεί να απομονωθεί (από γωνιδιωματική βιβλιοθήκη) αποικία μικροβίου (πχ βακτηρίου ή ζυμομύκητα) που έχει μολυνθεί με φάγο ή έχει μετασηματιστεί από πλασμιδιακό ή άλλο φορέα, ο οποίος φέρει ένθεμα που περιέχει κάποιο γονίδιο του ενδιαφέροντος, ακόμη και αν εν διατίθεται ανιχνευτής αρκεί να εκφράζεται το γονίδιο και να υπάρχει αντίσωμα για το προϊόν του (έναντι της πρωτεΐνης που το γονίδιο βιοσυνθέτει) (Σχήμα 4.26.).



Σχήμα 4.26.: Έλεγχος μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης για την απομόνωση συγκεκριμένου γονιδίου, με ανιχνευτή αντίσωμα. [5]

Η προσέγγιση αυτή είναι περισσότερο πρόσφορη για βιβλιοθήκη cDNA, διότι περιέχονται μόνο τμήματα του γονιδιώματος που έχουν γενετική πληροφορία για πρωτεΐνες.

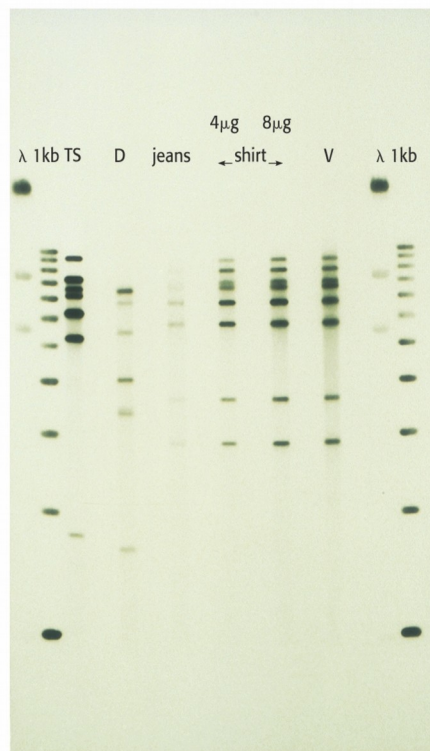
4.8. Εφαρμογές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA

4.8.1. Εφαρμογές της PCR (αναφέρονται ενδεικτικά μερικές) [5]

Η τεχνολογία της PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην διαγνωστική ιατρική και να ανιχνευτούν εύκολα και γρήγορα ιοί (πχ ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας - HIV - **H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus), βακτήρια (πχ ο βάκιλος *Mycobacterium tuberculosis*, υπεύθυνος για την φυματίωση), μεταλλάξεις σε γονίδια-ρυθμιστές της ανάπτυξης καρκίνου,

ακόμη και όταν ο καρκίνος είναι σε πρώιμα στάδια – όπως είναι το γονίδιο *ras*, λευχαιμίες που προκύπτουν λόγω χρωμοσωμικών ανακατατάξεων, κλπ. Μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί στον οικογενειακό προγραμματισμό, προκειμένου να αποφεύγονται γεννήσεις παιδιών με γενετικές κληρονομικές ασθένειες. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην ιατροδικαστική και να ανιχνευτούν σε δείγματα μόρια DNA που αποκαλύπτουν την ταυτότητα πχ του δολοφόνου (Σχήμα 4.27.).

Μπορεί επίσης η PCR να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση αρχαίου DNA (οργανισμών που είναι εδώ και χιλιάδες έτη κάτω από τους πάγους) ή DNA μικροοργανισμών που έχουν ή και εκείνων που δεν έχουν ακόμη απομονωθεί και καλλιεργηθεί. Αυτές οι αλληλουχίες μπορεί να φανούν χρήσιμες για την μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών.



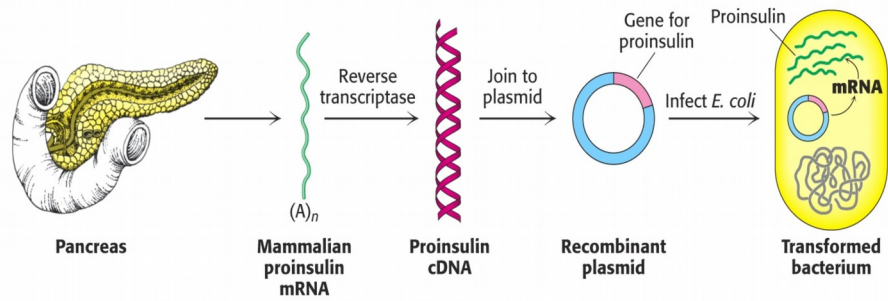
Σχήμα 4.27.: Δείγματα DNA που ενισχύθηκαν με PCR, επεξεργάστηκαν με κάποιο περιοριστικό ένζυμο και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. D = δείγμα από αίμα υπόπτου, jeans = δείγμα από αίμα στο παντελόνι του ύποπτου, shirt = δείγμα από αίμα στο πουκάμισο του ύποπτου, V = δείγμα από αίμα του θύματος. λ, 1kb, TS είναι δείγματα αναφοράς. Η εικόνα δείχνει (μετά από σύγκριση των ζωνών στις διάφορες διαδρομές) ότι το μόνο διαφορετικό από τα άγνωστα δείγματα είναι εκείνο του υπόπτου. Η πιθανότητα σφάλματος είναι περίπου $1/33 \times 10^9$. [5]

4.8.2. Άλλες εφαρμογές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA [5]

Εκτός από ένα πλήθος αναφερόμενων εφαρμογών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (παράγραφος 4.8.1.), οι οποίες βασίζονται αποκλειστικά στην αποκάλυψη και γνώση συγκεκριμένων αλληλουχιών, υπάρχει μεγάλος αριθμός άλλων εφαρμογών της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA όπως:

4.8.2.1. Έκφραση cDNA, προερχόμενο τόσο από προκαρυωτικό όσο και από ευκαρυωτικό mRNA, σε βακτηριακά κύτταρα

Αν το ευκαρυωτικό DNA χρησιμοποιηθεί ως έχει για κλωνοποίηση και έκφραση, δεν είναι δυνατόν να εκφραστεί σε βακτήρια, διότι δεν μπορεί να γίνει η απομάκρυνση των ιντρονίων. Από ευκαρυωτικό mRNA χρησιμοποιείται cDNA, το οποίο είναι απαλλαγμένο από ιντρόνια. Ο μετασχηματισμός βακτηρίου από πλασμιδιακό φορέα που φέρει ευκαρυωτικό γονίδιο από cDNA, μπορεί να οδηγήσει μέχρι την σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Αν πχ τοποθετηθεί σε πλασμιδιακό φορέα το γονίδιο της προϊνσουλίνης (το πρόδρομο μόριο της ινσουλίνης) θηλαστικού και μετασχηματισθεί το βακτήριο *Escherichia coli* με αυτό τον φορέα, τότε θα παραχθεί από το βακτήριο η πρωτεΐνη προϊνσουλίνη (Σχήμα 4.28.).



Σχήμα 4.28.: Σύνθεση προϊνσουλίνης σε βακτήρια. [5]

**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**

Τέλος Ενότητας

Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Σημειώματα

Σημείωμα Αναφοράς

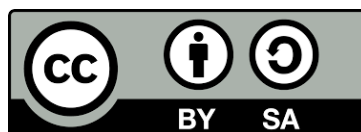
Copyright Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Διδάσκων: Επίκ. Καθ. Άγγελος Περισυνάκης. «Μοριακή Βιολογία Νουκλεϊνικών Οξέων. Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA». Έκδοση: 1.0. Ιωάννινα 2014.

Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:

<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1276>.

Σημείωμα Αδειοδότησης

- Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά Δημιουργού - Παρόμοια Διανομή, Διεθνής Έκδοση 4.0 [1] ή μεταγενέστερη.



[1] <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.

