

Φύλλο Εργασίας
[επανάληψη rDNA]

Κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Η διαδικασία του **ανασυνδυασμού** των πλασμιδίων μας αφήνει και ένα μεγάλο ποσοστό μη ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Προχωράμε λοιπόν στη φάση του **μετασχηματισμού** με πλασμίδια δυο ειδών: Ανασυνδυασμένα και μη.

Σε επόμενο βήμα καλείστε να κάνετε την **επιλογή των μετασχηματισμένων** βακτηρίων, γνωρίζοντας επίσης ότι η διαδικασία του μετασχηματισμού τους, άφησε βακτήρια μετασχηματισμένα και βακτήρια που δεν μετασχηματίστηκαν.

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε σαν **φορέας κλωνοποίησης** περιείχε δυο γονίδια:

- Ένα **γονίδιο ανθεκτικότητας** στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη,
- και το γονίδιο **lacZ *** του οπερονίου της λακτόζης που κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, υπεύθυνο για την αποικοδόμηση της λακτόζης. Το ίδιο ένζυμο αποικοδομεί και μια συνθετική ουσία Χ, η οποία αποδομούμενη δίνει προϊόντα με μπλε χρώμα.
(* το πρώτο από τα δομικά γονίδια του οπερονίου της λακτόζης)

Η **περιοριστική ενδονουκλεάση** που χρησιμοποιήθηκε στον ανασυνδυασμό των πλασμιδίων, αναγνωρίζει σαν **θέση εγκοπής** μια αλληλουχία που βρίσκεται μέσα στο γονίδιο lacZ.

[Θεωρείστε αυτονόητο ότι η παρεμβολή μιας άλλης αλληλουχίας διακόπτει την αλληλουχία των κωδικών του γονιδίου lacZ καθιστώντας αυτό μη λειτουργικό.]

1. Στις (στερεές) καλλιέργειες των υπό επιλογή βακτηρίων προσθέσατε αμπικιλίνη. Τι αντιπροσωπεύουν οι αποικίες που θα αναπτυχθούν μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού;
2. Στις καλλιέργειες των αποικιών αυτών προσθέσατε την ουσία Χ και κάποιες από τις αποικίες χρωματίζονται με μπλε χρώμα, ενώ οι υπόλοιπες παραμένουν λευκές. Τι είδους βακτήρια αντιπροσωπεύουν οι μπλε αποικίες;
3. Ποιες είναι οι αποικίες που αποτελούν τη **γονιδιωματική βιβλιοθήκη** που κατασκευάσατε; ...οι λευκές ή οι μπλε;
4. Γιατί σαν **κύτταρα ξενιστές** χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια στα οποία το γονίδιο lacZ του βακτηριακού χρωμοσώματος δεν λειτουργούσε;

(δικαιολογείτε τις απαντήσεις σας)