

## Κεφάλαιο 4

### Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

#### 1. Γιατί οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες και οι φορείς κλωνοποίησης είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική;

- Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική, επειδή αναγνωρίζουν και κόβουν τις ίδιες πάντα ειδικές αλληλουχίες του δικλωνου DNA, αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα. (Υπάρχουν ορισμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που κόβουν το DNA χωρίς να δημιουργούν μονόκλωνες ουρές). Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές βάσεις του φορέα κλωνοποίησης που έχει κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Τα δύο είδη DNA μπορεί να αναμειχθούν, και επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυασμένα μόρια DNA.
- Οι φορείς κλωνοποίησης είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική, επειδή είναι μόρια αυτόνομα, που μπορούν να αναπαράγονται ανεξάρτητα. Οι φορείς κλωνοποίησης είναι μόρια DNA όπως πλασμίδια, DNA φάγων, που μπορούν να αυτοδιπλασιάζονται μέσα σε ένα κύτταρο-ξενιστή όπως ένα βακτήριο. Το DNA απομονώνεται από έναν οργανισμό-δότη, κόβεται ενζυματικά με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ενώνεται με το φορέα κλωνοποίησης και δημιουργείται ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA.

#### 2. Τι είναι μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη;

- α. ένα κλώνος βακτηρίων που περιέχει ένα τμήμα DNA ενός οργανισμού
- β. μια συλλογή βιβλίων για κλώνους
- γ. ένα σύνολο από κλώνους βακτηρίων που ο καθένας έχει ένα πλασμίδιο με διαφορετικό τμήμα DNA ενός οργανισμού
- δ. ένα σύνολο από περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται για να παράγουν διαφορετικούς κλώνους
- ε. τίποτε από τα παραπάνω.

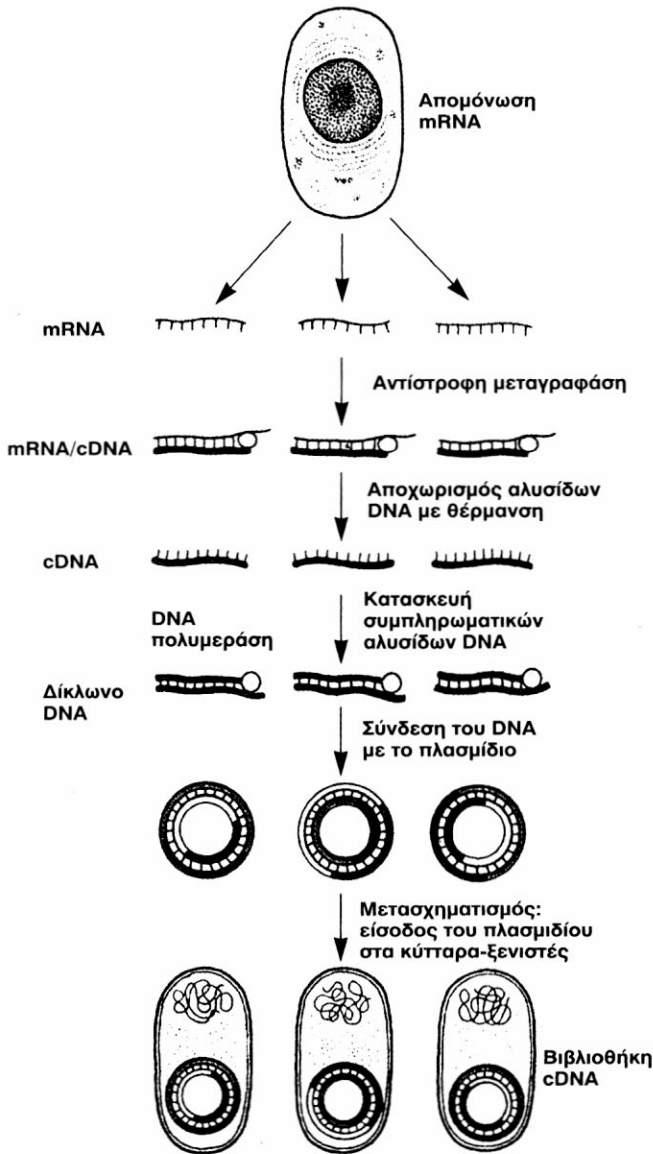
Ποια είναι η σωστή απάντηση;

Η σωστή απάντηση είναι η γ.

#### 3. Θα μπορούσε να αναπτυχθεί η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, αν ο γενετικός κώδικας δεν ήταν καθολικός; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

Με τον όρο τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA εννοούμε όλες τις τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά τμήματος DNA από έναν οργανισμό σε έναν άλλο. Το DNA που μεταφέρθηκε θέλουμε να μπορεί να παράγει στο νέο οργανισμό την ίδια πρωτεΐνη. Αυτό μπορεί να συμβεί, μόνο αν η ίδια τριπλέτα DNA καθορίζει (μέσω των κωδικονίων του mRNA) την ένταξη του ίδιου αμινοξέος στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αυτό επιτυγχάνεται, μόνο επειδή ο γενετικός κώδικας είναι καθολικός.

**4. Εξηγήστε με σχήματα το πώς παράγεται το cDNA και το πώς χρησιμοποιείται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA.**



Για να κατασκευαστεί cDNA, απομονώνεται το ολικό mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Το mRNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για την σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA). Η σύνθεση του cDNA γίνεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή. Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA-mRNA. Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή θέρμανση και το cDNA χρησιμεύει σαν καλούπι για την σύνθεση μια συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δίκλωνου μορίου DNA. Το δίκλωνο μόριο DNA εισάγεται σε πλασμίδιο ή βακτηριοφάγο και κλωνοποιείται. Το cDNA περιέχει αντίγραφο του mRNA και έχει το πλεονέκτημα απομόνωσης μόνο των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δη-

λαδή των εξωνίων. Με αυτό τον τρόπο δίνει τη δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο-ξενιστή.

**5. Συμπληρώστε με τις κατάλληλες λέξεις τα κενά στο κείμενο:**

Το DNA κόβεται με ..... σε κομμάτια με γνωστά άκρα. Τα κομμάτια συνδέονται με ένα ..... που έχει συμπληρωματικά άκρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου που λέγεται .....

Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί από το ..... με τη βοήθεια του ενζύμου που ονομάζεται ..... και να συνδεθεί με ένα ..... Το ανασυνδυσασμένο μόριο εισάγεται κατόπιν σε .....

Το DNA κόβεται με *περιοριστικές ενδονουκλεάσες* σε κομμάτια με γνωστά άκρα. Τα κομμάτια συνδέονται με ένα *φορέα κλωνοποίησης*, που έχει συμπληρωματικά άκρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που λέγεται *DNA δεσμάση*.

Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί από το *mRNA* με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που ονομάζεται *αντίστροφη μεταγραφή* και να συνδεθεί με ένα *φορέα κλωνοποίησης*. Το ανασυνδυσασμένο μόριο εισάγεται κατόπιν σε *βακτήριο*.

**6. Ποια κύτταρα θα χρησιμοποιούσατε, για να κατασκευάσετε μια cDNA βιβλιοθήκη, εάν θα θέλατε να συνθέσετε με τη μέθοδο αυτή:**

α. Ινσουλίνη

β. Αιμοσφαιρίνη

γ. Αντισώματα

δ. Μυοσίνη

α. κύτταρα παγκρέατος

β. πρόδρομα ερυθροκύτταρα

γ. Β-λεμφοκύτταρα

δ. μυϊκά κύτταρα

**7. Για ποιο λόγο κατά την ενσωμάτωση DNA ευκαρυωτικού οργανισμού σε πλασμίδιο χρησιμοποιείται η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, για να κόψει το πλασμίδιο και το DNA του οργανισμού;**

Όπως γνωρίζουμε, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA. Έχουν απομονωθεί πολλές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες, όποτε συναντούν την ειδική αλληλουχία στο γονιδίωμα, κόβουν κάθε αλυσίδα σε συγκεκριμένη θέση αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA, που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Επομένως, η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση μπορεί και κόβει το πλασμίδιο και το DNA του οργανισμού στις ίδιες συγκεκριμένες θέσεις και έτσι δημιουργούνται σ' αυτά άκρα με συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού, αναμειγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυσασμένα πλασμίδια.

**8. Ποιος είναι ο ρόλος των παρακάτω στις τεχνικές Γενετικής Μηχανικής;**

**α. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες**

**β. Πλασμίδια**

**γ. Βακτήρια**

α. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα, που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA και κόβουν κάθε αλυσίδα του σε συγκεκριμένη θέση αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα.

β. Τα πλασμίδια είναι οι φορείς κλωνοποίησης, με τους οποίους ενώνονται τα κομμάτια του DNA από τον οργανισμό-δότη, ώστε να δημιουργηθεί το ανασυνδυσασμένο μόριο DNA.

γ. Στα βακτήρια μεταφέρονται τα ανασυνδυσασμένα μόρια DNA και τα μετασχηματίζουν. Κάθε βακτήριο που προσλαμβάνει ένα μόνο μόριο DNA, μετά τον πολλαπλασιασμό του, δημιουργεί ένα βακτηριακό κλώνο.

**9. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες:**

**α. παράγονται φυσιολογικά από ευκαρυωτικά κύτταρα**

**β. κόβουν μονόκλωνα μόρια DNA**

**γ. κόβουν το DNA σε πολύ εξειδικευμένες θέσεις**

**δ. εισάγονται στα βακτήρια από τους βακτηριοφάγους.**

**Ποια από τις προτάσεις αυτές είναι σωστή;**

Η σωστή πρόταση είναι η γ.

**10. Ποια από τις παρακάτω προτάσεις που αφορούν την DNA δεσμάση είναι λανθασμένη;**

**α. είναι ένζυμο**

**β. είναι φυσιολογικό συστατικό των κυττάρων**

**γ. μπορεί να ενώνει κομμάτια στο ανασυνδυσασμένο DNA**

**δ. παίρνει μέρος στην αντιγραφή του DNA**

**ε. ενώνει πολυπεπίδια.**

Η λανθασμένη πρόταση είναι η ε.

**11. Τι είναι ή σε τι χρησιμοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR):**

**α. Είναι μέθοδος εύρεσης της ακολουθίας βάσεων του DNA.**

**β. Χρησιμοποιείται για να ανιχνεύει ένα ειδικό τμήμα DNA.**

**γ. Χρησιμοποιείται για να παράγει μεγάλες ποσότητες ενός ειδικού τμήματος DNA.**

**δ. Χρησιμοποιείται για τη χαρτογράφηση γονιδίων.**

Η σωστή πρόταση είναι η γ.

**12. Σε πείραμα Γενετικής Μηχανικής χρησιμοποιείται πλασμίδιο το οποίο έχει δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντίστοιχα αντιβιοτικά: το ένα γονίδιο προσδίδει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη και το άλλο σε στρεπτομυκίνη. Στο πλασμί-**

**διο αυτό εισάγεται τμήμα DNA μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας της αμικιλίνης. Στη συνέχεια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μετασχηματίζονται κύτταρα *Escherichia coli*, που δεν είναι ανθεκτικά σε κανένα από τα αντιβιοτικά. Αναλύστε τον τρόπο με τον οποίο μπορούν να επιλεγούν τα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.**

Τα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα έχουν ανθεκτικότητα μόνο στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, παρουσία του οποίου αναπτύσσονται. Τα βακτήρια που δεν περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο δεν αναπτύσσονται παρουσία ενός ή και των δύο αντιβιοτικών και τα βακτήρια που πιθανόν περιέχουν το πλασμίδιο χωρίς το ξένο DNA θα είναι ανθεκτικά και στα δύο αντιβιοτικά\*.

\* το τμήμα της απάντησης που είναι υπογραμμισμένο είναι πληροφορία που αφορά τους καθηγητές αλλά δεν απαιτείται να το γνωρίζουν οι μαθητές.