

Πρόλογος

Το βιβλίο που κρατάς στα χέρια σου πιστεύουμε ότι θα σε βοηθήσει να ανταποκριθείς στις πολλαπλές και υψηλές απαιτήσεις του μαθήματος της Βιολογίας Προσανατολισμού Θετικών Σπουδών και να αριστεύσεις στις Πανελλήνιες Εξετάσεις.

Η ύλη έχει οργανωθεί σε διδακτικές **ενότητες**, ώστε να εμβαθύνεις σε ένα θέμα πριν προχωρήσεις στο επόμενο.

Κάθε ενότητα περιλαμβάνει:

- ✓ Αναλυτική **παρουσίαση** της θεωρίας, εμπλουτισμένη με **σχήματα** που βοηθούν στην κατανόηση ιδιαίτερα απαιτητικών σημείων της.
- ✓ Παραθέματα που είναι εκτός ύλης αλλά βοηθούν στην κατανόηση της θεωρίας και στην αποφυγή της μπχανιστικής αποστήθισης. Τα παραθέματα αυτά σηματοδοτούνται με μια γκρι γραμμή στο πλαϊνό μέρος της σελίδας.
- ✓ Σημαντικούς **ορισμούς** μέσα σε έγχρωμο πλαίσιο.
- ✓ **Μεθοδολογία** για την επίλυση των ασκήσεων. Εύκολα θα την εντοπίσεις στις ασκήσεις, από την παρουσία μιας ροζ γραμμής στο πλαϊνό μέρος της σελίδας.
- ✓ Αναλυτικά **λυμένες ασκήσεις** και **προτεινόμενες ασκήσεις**. Έχουν συμπεριληφθεί οι ασκήσεις που αποτέλεσαν θέματα στις εξετάσεις έως και το 2017, καθώς και ορισμένα θέματα από τον ΟΕΦΕ. Αρκετές ασκήσεις δομήθηκαν με έναυσμα θέματα από τον **Πανελλήνιο Διαγωνισμό Βιολογίας**, μια και τα τελευταία τέσσερα χρόνια αρκετά θέματα των εξετάσεων βασίστηκαν στον διαγωνισμό αυτόν.
- ✓ **Ερωτήσεις ανάπτυξης**, καθώς και **ερωτήσεις κρίσεως – συνδυαστικές**.
- ✓ **Ερωτήσεις σωστού-λάθους** και πολλαπλής επιλογής, που αποσκοπούν στην εμπέδωση λεπτομερειών της θεωρίας.

Στο τέλος των ενοτήτων που αντιστοιχούν σε ένα κεφάλαιο του σχολικού βιβλίου υπάρχουν **κριτήρια αξιολόγησης**, προκειμένου να ελέγξεις τις γνώσεις που απέκτησες.

Στο τέλος του βιβλίου υπάρχουν **κριτήρια αξιολόγησης** για όλη την ύλη, οι απαντήσεις στις ερωτήσεις του σχολικού βιβλίου, καθώς και αναλυτικές απαντήσεις σε όλες τις ερωτήσεις, τις ασκήσεις και τα κριτήρια αξιολόγησης που περιλαμβάνει.

Θα ήταν παράλειψη να μην αναφέρουμε την ουσιαστική συμβολή του συναδέλφου Δημοσθένη Αυγερίνου στην άρτια έκδοση του βιβλίου.

Δ. Καρυοφύλλης
Διδάκτωρ Βιολογίας

Π. Λ. Σωτηρίου
Διδάκτωρ Βιολογίας

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

| | |
|--|----|
| Ενότητα 1: Φύση, δομή και λειτουργία του γενετικού υλικού..... | 11 |
| Ενότητα 2: Το γενετικό υλικό στις διάφορες κατηγορίες οργανισμών | 33 |
| Επαναληπτικό κριτήριο αξιολόγησης..... | 60 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ, ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ

| | |
|---|-----|
| Ενότητα 3: Αντιγραφή του DNA | 63 |
| Ενότητα 4: Ροή της γενετικής πληροφορίας..... | 90 |
| Ενότητα 5: Μεταγραφή του DNA – Γενετικός κώδικας | 97 |
| Ενότητα 6: Μετάφραση | 123 |
| Ενότητα 7: Γονιδιακή ρύθμιση: ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης | 151 |
| Επαναληπτικό κριτήριο αξιολόγησης..... | 168 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA

| | |
|---|-----|
| Ενότητα 8: Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA | 172 |
| Ενότητα 9: Κλωνοποίηση DNA..... | 205 |
| Επαναληπτικό κριτήριο αξιολόγησης..... | 238 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΝΔΕΛΙΚΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ

| | |
|---|-----|
| Ενότητα 10: 1ος Νόμος του Mendel – Επικρατή-Υπολειπόμενα αλληλόμορφα γονίδια | 242 |
| Ενότητα 11: Ατελώς επικρατή και συνεπικρατή αλληλόμορφα γονίδια | 269 |
| Ενότητα 12: Πολλαπλά αλληλόμορφα γονίδια – Ομάδες αίματος..... | 276 |
| Ενότητα 13: Θυντιγόνα αλληλόμορφα γονίδια | 289 |
| Ενότητα 14: Φυλοσύνδετη κληρονομικότητα..... | 294 |
| Ενότητα 15: Μενδελική κληρονομικότητα και άνθρωπος | 307 |
| Ενότητα 16: Διυβριδισμός – 2ος Νόμος του Mendel..... | 346 |
| Ενότητα 17: Επαναληπτικά θέματα στη Μενδελική κληρονομικότητα..... | 368 |
| Επαναληπτικά κριτήρια αξιολόγησης..... | 384 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

| | |
|--|-----|
| Ενότητα 18: Γονιδιακές μεταλλάξεις..... | 388 |
| Ενότητα 19: Ασθένειες στον άνθρωπο που είναι αποτέλεσμα γονιδιακών μεταλλάξεων..... | 411 |

| | |
|--|-----|
| Ενότητα 20: Αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες | 426 |
| Ενότητα 21: Δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες..... | 442 |
| Ενότητα 22: Διάγνωση των γενετικών ασθενειών – Προγεννητικός έλεγχος..... | 458 |
| Ενότητα 23: Καρκίνος..... | 462 |
| Ενότητα 24: Επαναληπτικά θέματα στις μεταλλάξεις..... | 465 |
| <i>Επαναληπτικά κριτήρια αξιολόγησης.....</i> | 483 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

| | |
|---|-----|
| Ενότητα 25: Αρχές και μεθοδολογία της Βιοτεχνολογίας | 487 |
| <i>Επαναληπτικό κριτήριο αξιολόγησης.....</i> | 516 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

| | |
|---|-----|
| Ενότητα 26: Εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στην Ιατρική..... | 520 |
| <i>Επαναληπτικό κριτήριο αξιολόγησης.....</i> | 547 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗ ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ

| | |
|---|-----|
| Ενότητα 27: Εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στη γεωργία και την κτηνοτροφία | 549 |
| <i>Επαναληπτικό κριτήριο αξιολόγησης.....</i> | 572 |
| <i>Θέματα Πανελλαδικών Εξετάσεων 2017</i> | 576 |
| <i>Επαναληπτικά κριτήρια αξιολόγησης σε όλη την ύλη</i> | 581 |
| <i>Απαντήσεις</i> | 589 |
| <i>Απαντήσεις στις ερωτήσεις του σχολικού βιβλίου</i> | 883 |



8 Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

ΘΕΩΡΙΑ

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA περιλαμβάνει όλες τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA και για τη μεταφορά γενετικού υλικού από κύτταρο σε κύτταρο ή από οργανισμό σε οργανισμό. Βρίσκει εφαρμογή:

- στην παραγωγή σειράς προϊόντων
- στη δημιουργία φυτών και ζώων με «βελτιωμένες» ιδιότητες.

Ανασυνδυασμένο DNA είναι ένα τεχνητό μόριο DNA που περιέχει γονίδια από δύο ή περισσότερους οργανισμούς. Αυτό το DNA μπορεί να εισαχθεί σε ένα βακτηριακό ή σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα μπορούν να ζουν και να αναπαράγονται κληροδοτώντας στους απογόνους τους τις νέες ιδιότητες.

Οι τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό αποτελούν τη Γενετική Μηχανική¹.

Συνεισφορά της Γενετικής Μηχανικής στην επίτευξη δύο θεμελιωδών στόχων του ανθρώπου:

- στην κατανόηση των μυστηρίων της ζωής και της εξέλιξης πάνω στη Γη·
- στη βελτίωση της υγείας και του τρόπου διαβίωσης (π.χ. παραγωγή φαρμάκων, τροφίμων κ.ά.).

Τα στάδια μεταφοράς γενετικού υλικού από έναν οργανισμό σε άλλον είναι τα ακόλουθα:

- κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA·
- μεταφορά του ανασυνδυασμένου DNA σε ένα κύτταρο-ξενιστή·
- επιλογή και απομόνωση των κυττάρων-ξενιστών·
- επιλογή του κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA.

1. Στην πραγματικότητα οι έννοιες «Γενετική Μηχανική» και «τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA» δύσκολα διακρίνονται η μία από την άλλη. Αναφέρονται και οι δύο, με διαφορετικό τρόπο, στις ίδιες ακριβώς τεχνικές. Ο όρος «Γενετική Μηχανική» («genetic engineering») πλάστηκε από τον συγγραφέα επιστημονικής φαντασίας Jack Williamson και πρωτοεμφανίστηκε στο μυθιστόρημά του *Dragon's Island*, που δημοσιεύτηκε το 1951, έναν χρόνο πριν επιβεβαιωθεί οριστικά ότι το DNA είναι το γενετικό υλικό από τους Alfred Hershey και Martha Chase.

κλωνοποίηση: η παραγωγή κλώνων, δηλαδή πολλών αντιγράφων ενός μορίου (π.χ. γονιδίου ή άλλου τμήματος DNA), ενός κυττάρου ή ενός οργανισμού.

κλώνος: ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών. Κλώνοι μορίων DNA παράγονται με την κατασκευή βιβλιοθηκών (γονιδιωματικών ή cDNA) και με τη μέθοδο PCR (βλ. επόμενη ενότητα). Κλώνοι κυττάρων ή οργανισμών παράγονται από επαναλαμβανόμενες διαιρέσεις ενός μόνο κυττάρου ή οργανισμού.

Απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA

Για να αναπτυχθεί η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, ήταν απαραίτητο να απομονωθούν:

- ▶ **ένζυμα** που συμμετέχουν σε διάφορες διαδικασίες, όπως
 - οι **περιοριστικές ενδονουκλεάσεις**, οι οποίες:
 - παράγονται από βακτήρια.
 - έχουν ως φυσιολογικό ρόλο την προστασία από εισβολή ξένου DNA².
 - αναγνωρίζουν αλληλουχίες δίκλωνου DNA μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων.
 - κόβουν³ το DNA σε συγκεκριμένο σημείο και αφίνουν μονόκλωνα άκρα (ουρές) από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα. Οι βάσεις αυτές μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Μία από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσεις είναι και η EcoRI, η οποία:
 - απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*.
 - αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GAATTC-3' στο γονιδίωμα.
 - κόβει κάθε αλυσίδα ανάμεσα στο G και το A (κόκκινα βέλη), οπότε δημιουργεί μονόκλωνα άκρα («ουρές») με αλληλουχία 5'-AATT-3', αφού καταστρέφονται δύο φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και οκτώ δεσμοί υδρογόνου:
- | | |
|-----------------|---------------|
| 5'-....G-3' | 5'-AATT...-3' |
| 3'-....CTTAA-5' | 3'-G....-5' |

2. Τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούν κατά κάποιον τρόπο το «ανοσοποιητικό σύστημα» των βακτηρίων ενάντια στους ιούς.
3. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσεις δεν κόβουν το DNA του ίδιου του βακτηρίου, διότι ένα ένζυμο (μια μεθυλομεταφοράσσων) τροποποιεί το βακτηριακό DNA, και συγκεκριμένα μεθυλιώνει τις αλληλουχίες που κόβουν τα περιοριστικά ένζυμα.

- Η DNA δεσμάση, η οποία:
 - έχει ως φυσιολογικό ρόλο τη σύνδεση κομματιών DNA κατά την αντιγραφή (βλ. ενότητα 3).
 - χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για να συνδέσει σταθερά το DNA του οργανισμού δότη με τον φορέα κλωνοποίησης.
- ▶ και παράγοντες που θα μπορούσαν να μεταφέρουν το DNA από έναν οργανισμό σε έναν άλλον. Αυτοί οι παράγοντες ονομάζονται **φορείς κλωνοποίησης** και τέτοιοι είναι:
 - **πλασμίδια**, τα οποία:
 - έχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.
 - έχουν μία φορά την αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιήσουμε.
 - στα φυτικά ευκαρυωτικά κύτταρα ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιείται συγκεκριμένο πλασμίδιο, το Ti (θα το μάθεις στην ενότητα 27).
 - **βακτηριοφάγοι**, όπως ο λ φάγος, οι οποίοι:
 - μπορούν να ενσωματώσουν μεγαλύτερα κομμάτια DNA.

πλασμίδιο: μικρό δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA, ανεξάρτητο από το χρωμοσωματικό DNA, το οποίο φέρει γονίδια για σημαντικές εξειδικευμένες λειτουργίες του ξενιστή του και αναπαράγεται αυτόνομα. Τα πλασμίδια απαντούν κυρίως στα βακτήρια.

Χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας φορέας κλωνοποίησης:

- Να είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA.
- Να μπορεί να δέχεται ξένο DNA στην αλληλουχία του.
- Να έχει την ικανότητα να αντιγράφεται ανεξάρτητα από το γενετικό υλικό του ξενιστή (δηλαδή να διαθέτει θέση έναρξης της αντιγραφής).
- Να δίνει τη δυνατότητα να ξεχωρίσουν τα μετασχηματισμένα κύτταρα-ξενιστές από τα μη μετασχηματισμένα.
- Να έχει μία φορά την αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιηθεί.

Εάν ο φορέας κλωνοποίησης είναι **DNA φάγος**, το DNA του φάγου (ανασυνδυασμένο ή μη) εισάγεται στα βακτήρια μετά από μόλυνση των βακτηρίων από τους φάγους (βλέπε παρακάτω).

Εάν ο φορέας κλωνοποίησης είναι **πλασμίδιο**, τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων καθίστανται, μετά από κατάλληλη επεξεργασία, παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια προκειμένου να εισαχθούν τα πλασμίδια στα βακτήρια. Η τεχνική έχει μικρά ποσοστά επιτυχίας. Δηλαδή μικρό ποσοστό των βακτηρίων δέχεται πλασμίδιο, που μπορεί να είναι είτε ανασυνδυασμένο είτε μη ανασυνδυασμένο.

Διαδικασία μεταφοράς γενετικού υλικού από οργανισμό σε οργανισμό

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- **Κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA.** Όλο το DNA ενός οργανισμού (οργανισμός δότης) απομονώνεται, κόβεται με μία περιοριστική ενδονουκλεάση και ενώνεται με επιλεγμένο φορέα κλωνοποίησης (ανασυνδυασμένο DNA).
- **Μεταφορά του ανασυνδυασμένου DNA σε ένα κύτταρο-ξενιστή.** Αν το κύτταρο-ξενιστής είναι βακτηριακό, η μεταφορά του ανασυνδυασμένου DNA σε αυτό λέγεται **μετασχηματισμός**.
- **Επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων-ξενιστών από τα μη μετασχηματισμένα.** Επιλέγονται όσα κύτταρα-ξενιστές έχουν προσλάβει μόριο ανασυνδυασμένου DNA. Καθένα τους πολλαπλασιάζεται και δημιουργεί αποικία (κλώνο).
- **Επιλογή βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA.** Η επιλογή γίνεται με μόρια-ανιχνευτές.

κύτταρο-ξενιστής: στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, το κύτταρο στο οποίο εισάγεται και μπορεί να εκφραστεί το ανασυνδυασμένο DNA.

Αρχικά τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές ήταν **βακτήρια**. Πλέον χρησιμοποιούνται και **ευκαρυωτικά κύτταρα** (φυτικά και ζωικά, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων).

Σημείωση: Τα ευκαρυωτικά κύτταρα-ξενιστές, όταν εισαχθεί σε αυτά ένα ξένο τμήμα DNA, δεν ονομάζονται μετασχηματισμένα αλλά γενετικά τροποποιημένα.

μετασχηματισμός: η γενετική αλλαγή των ιδιοτήτων ενός βακτηριακού κυττάρου μετά από εισαγωγή (είτε *in vivo* είτε *in vitro*) DNA στο εσωτερικό του.

Σημειώσεις: 1. Στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική οι επιστήμονες με τον όρο «**μετασχηματισμός**» αναφέρονται και στη διαδικασία εισαγωγής του DNA σε ένα βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή.

2. Ο όρος «**μετασχηματισμός**» χρησιμοποιείται και για να περιγράψει τη μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων ενός οργανισμού σε καρκινικά.

οργανισμός δότης: ο οργανισμός από τον οποίο χρησιμοποιούμε κύτταρα προκειμένου να απομονώσουμε είτε το γονιδίωμά του (για την κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης) είτε το ολικό ώριμο mRNA (για την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης).

Επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων από τα μη μετασχηματισμένα

Τα πλασμίδια περιέχουν γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (για παράδειγμα, στην αμπικιλίνη). Έτσι, αν ένα βακτήριο μετασχηματιστεί προσλαμβάνοντας ένα τέτοιο πλασμίδιο, θα αποκτήσει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Αν όχι, θα είναι ευαίσθητο στην αμπικιλίνη (αρκεί να μην περιέχει το βακτήριο από πριν δικό του πλασμίδιο με γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη). Παρουσία του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό

ανάπτυξης των βακτηρίων θα έχει ως αποτέλεσμα να επιβιώνουν μόνο τα μετασχηματισμένα βακτήρια, δηλαδή αυτά που προσέλαβαν πλασμίδιο.

Επιλογή των μετασχηματισμένων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βακτηρίων από τα μετασχηματισμένα με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βακτήρια

Μερικά πλασμίδια, αφού γίνουν γραμμικά (με τη δράση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης), ξαναγίνονται κυκλικά (αφού τα μονόκλωνα άκρα του πλασμίδιου είναι μεταξύ τους συμπληρωματικά) χωρίς να προλάβουν να ενσωματώσουν ξένο DNA. Κάποια από αυτά τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται στα βακτήρια κατά τη διαδικασία του μετασχηματισμού. Τα μετασχηματισμένα από τέτοια πλασμίδια βακτήρια επιβιώνουν παρουσία αντιβιοτικού, αλλά δεν είναι χρήσιμα στο πλαίσιο της Γενετικής Μηχανικής.

Ένας τρόπος προκειμένου να διαχωρίσουμε τα βακτήρια που έχουν προσλάβει μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από τα επιθυμητά, δηλαδή αυτά που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, είναι να χρησιμοποιήσουμε **πλασμίδιο που διαθέτει δύο γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διαφορετικά αντιβιοτικά** (π.χ. στην αμπικιλίνη και στη στρεπτομυκίνη, όπως στην άσκηση 12 του κεφαλαίου 4 του σχολικού βιβλίου). Μάλιστα η αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιήσουμε θα πρέπει να βρίσκεται στο εσωτερικό του ενός από τα δύο γονίδια ανθεκτικότητας (έστω στο εσωτερικό του γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη). Έτσι, αν το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο, το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη θα είναι ανθεκτικό στη στρεπτομυκίνη αλλά ευαίσθητο στην αμπικιλίνη. Αρχικά με τη χρήση στρεπτομυκίνης επιλέγονται τα μετασχηματισμένα βακτήρια. Σε μία «δίδυμη καλλιέργεια» τοποθετείται αμπικιλίνη στο θρεπτικό υλικό. Τα βακτήρια που πεθαίνουν είναι τα μετασχηματισμένα με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Υπάρχουν και άλλοι τρόποι για να γίνει διάκριση των μετασχηματισμένων από τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια (δες άσκηση 8.31). Ένας από αυτούς τους τρόπους φαίνεται στην εικόνα 4.1 του σχολικού βιβλίου και περιγράφεται στο κείμενο που ακολουθεί (που είναι εκτός ύλης).

Πώς ξεχωρίζουμε τα βακτήρια που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από αυτά που προσέλαβαν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με τη βοήθεια της X-gal;

Η εικόνα 4.1 του σχολικού βιβλίου περιγράφει τα στάδια παραγωγής ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, την κλωνοποίησή του και την επιλογή των αποικιών που περιέχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Θα εστιάσουμε στο θέμα της επιλογής, μια και δεν εξηγείται στο κείμενο του σχολικού βιβλίου ο σχηματισμός αποικιών με λευκό και μπλε χρώμα που φαίνεται στην εικόνα.

Στο δεύτερο κεφάλαιο του σχολικού βιβλίου (ενότητα 7 του παρόντος) αναφέρθηκε ότι

το βακτήριο *Escherichia coli* παράγει, παρουσία λακτόζης, β-γαλακτοζιδάση λόγω της έκφρασης του δομικού γονίδιου Z που βρίσκεται στο οπερόνιο της λακτόζης στο κύριο μόριο DNA του. Ως κύπαρα-ξενιστές χρησιμοποιούνται βακτήρια που φέρουν στο δομικό γονίδιο Z του οπερονίου της λακτόζης μια μετάλλαξη που τα καθιστά ανίκανα να υδρολύουν τη λακτόζη, εκτός κι αν έχουν και άλλο λειτουργικό γονίδιο Z πέρα από αυτό του οπερονίου.

Το πλασμίδιο το οποίο χρησιμοποιούμε ως φορέα κλωνοποίησης περιέχει δύο γονίδια που είναι χρήσιμα για την επίλογή των βακτηρίων τα οποία περιέχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο: ένα γονίδιο (*amp^R*) που προσδίδει στο βακτήριο ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και ένα γονίδιο (*lacZ*) που κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση, το οποίο υδρολύει το σάκχαρο λακτόζη. Το πλασμίδιο διαθέτει μία θέση αναγνώρισης από τη χρησιμοποιούμενη περιοριστική ενδονουκλεάση, π οποία βρίσκεται μέσα στο γονίδιο *lacZ*. Έτσι, στο βακτήριο που φέρει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, επειδή στο γονίδιο *lacZ* παρεμβάλλεται ξένο DNA, δεν παράγεται το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση.

Καλλιεργούμε τα βακτήρια που έχουν υποστεί τη διαδικασία του μετασχηματισμού σε στερεό θρεπτικό υλικό το οποίο περιέχει αμπικιλίνη και ένα σάκχαρο που ονομάζεται X-gal. Κάθε βακτήριο που πολλαπλασιάζεται δημιουργεί έναν κλώνο βακτηριακών κυττάρων ο οποίος αποτελεί μία αποικία ορατή με γυμνό μάτι. **Η παρουσία αμπικιλίνης στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας εξασφαλίζει ότι μόνο τα βακτήρια που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο θα αναπτυχθούν.** Η X-gal στο μέσο καλλιέργειας κάνει εύκολο τον εντοπισμό των βακτηρίων που φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια (και όχι πλασμίδια που ξαναέγιναν κυκλικά χωρίς να προσλάβουν ξένο DNA). Το σάκχαρο X-gal υδρολύεται από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση και ελευθερώνει ένα μπλε προϊόν. Έτσι, **οι βακτηριακές αποικίες οι οποίες περιέχουν μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, δηλαδή οι αποικίες με ανέπαφα γονίδια β-γαλακτοζιδάσης, θα είναι μπλε.** Αν όμως ένα πλασμίδιο φέρει ξένο DNA μέσα στο *lacZ* γονίδιο, τότε η αποικία των βακτηρίων που το φέρει θα είναι λευκή, μια και τα βακτήρια δεν μπορούν να παράγουν β-γαλακτοζιδάση και να υδρολύουν το σάκχαρο X-gal δίνοντας το μπλε προϊόν.

Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι **τα βακτήρια που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σχηματίζουν λευκές αποικίες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αμπικιλίνη και X-gal.**

ΑΣΚΗΣΕΙΣ*

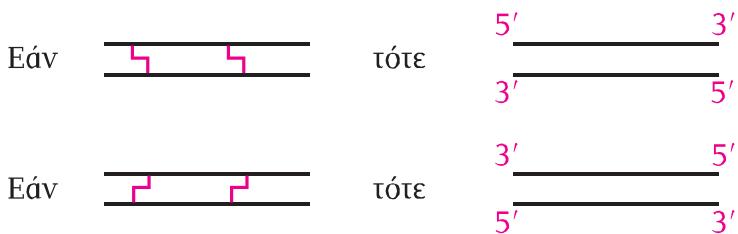
8.1 Ποια είναι τα βασικά στοιχεία για την επίλυση των ασκήσεων που αφορούν την τεχνολογία του ανασυρθεμένου DNA;

Απάντηση

κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A (με κατεύθυνση 5'→3') αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα. Επομένως μετά την επίδρασή της παίρνουμε:



Αν, λοιπόν, δίνεται ένα τμήμα DNA που έχει προκύψει από τη δράση της πολυμεράσης αυτής, εκεί που είναι το μονόκλωνο άκρο, εκεί βρίσκεται το 5' άκρο της αλυσίδας (δες άσκηση 8.17). Επίσης, αν δίνεται στο σχήμα πού κόβει η EcoRI, μπορείς να βρεις τον προσανατολισμό των αλυσίδων (δες άσκηση 8.18).



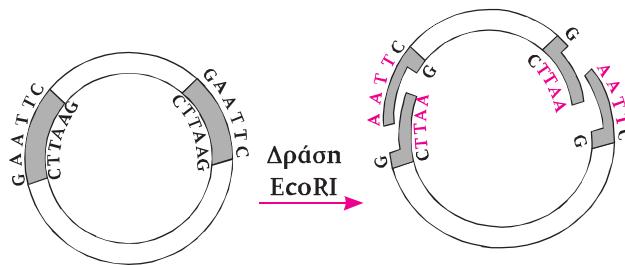
- Κάθε φορά που η EcoRI συναντά την αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει καταστρέφονται 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου.
 - Το πλασμίδιο πρέπει να διαθέτει μία μόνο φορά την αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιήσουμε. Αν η αλληλουχία υπάρχει περισσότερες από μία φορές, το πλασμίδιο θα κοπεί σε περισσότερα γραμμικά τμήματα, τα οποία θα είναι εξαιρετικά σπάνιο να επανασυνδεθούν.
 - Ο φορέας κλωνοποίησης και το ξένο DNA πρέπει να κοπούν με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, προκειμένου να αποκτήσουν συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα ώστε να μπορούν να συνδεθούν.
 - Όταν ένα τμήμα DNA με μονόκλωνα άκρα (που προκύπτει από τη δράση της EcoRI) συνδέεται με ένα πλασμίδιο (που έχει κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεά-

* Οι απαντήσεις βρίσκονται στο τέλος του βιβλίου.

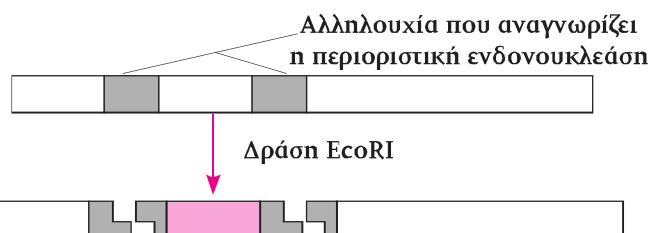
σο), δημιουργούνται 4 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 16 δεσμοί υδρογόνου. Ενώ το αρχικό πλασμίδιο είχε μία φορά την αλληλουχία που αναγνωρίζει η EcoRI, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο διαθέτει δύο φορές την εν λόγω αλληλουχία.

- Ο αριθμός των τμημάτων (θραυσμάτων) που προκύπτουν από τη δράση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης σε ένα μόριο εξαρτάται από το εάν το μόριο είναι κυκλικό ή γραμμικό.

- **Εάν το μόριο DNA είναι κυκλικό**, όσες φορές υπάρχει η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση (έστω E) τόσα είναι και τα τμήματα που προκύπτουν. Τα τμήματα που προκύπτουν φέρουν όλα μονόκλωνα άκρα και είναι δυνατόν, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, να ενσωματωθούν σε φορέα κλωνοποίησης. Για παράδειγμα (βλέπε τη διπλανή εικόνα), επίδραση με την EcoRI σε ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA που διαθέτει 2 φορές την αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση έχει ως αποτέλεσμα να προκύψουν 2 θραύσματα, από τα οποία είναι δυνατόν και τα δύο, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, να ενσωματωθούν σε πλασμίδιο.



- **Εάν το μόριο DNA είναι γραμμικό**, τα τμήματα που προκύπτουν είναι $E+1$ ($E=$ πόσες φορές υπάρχει η αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση στο μόριο). Από αυτά, τα δύο άκρα δεν μπορούν να ενσωματωθούν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία σε κομμένο φορέα κλωνοποίησης, αφού δεν διαθέτουν δύο μονόκλωνα άκρα αλλά ένα. Για παράδειγμα (βλέπε την παραπάνω εικόνα), επίδραση με την EcoRI σε ένα δίκλωνο γραμμικό μόριο DNA που διαθέτει 2 φορές την αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση έχει ως αποτέλεσμα να προκύψουν 3 θραύσματα, από τα οποία είναι δυνατόν το ένα (ροζ χρώμα), χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, να ενσωματωθεί σε πλασμίδιο.



(Σημείωση: Η περαιτέρω επεξεργασία περιλαμβάνει προσθήκη μονόκλων άκρου.)

- Η αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση περιέχει την ίδια σειρά βάσεων στις δύο αλυσίδες αν αυτές διαβαστούν με κατεύθυνση 5' → 3'. (Οι αλληλουχίες με το παραπάνω χαρακτηριστικό ονομάζονται παλίνδρομες, όρος που είναι εκτός ύλης.) Για παράδειγμα, η αλληλουχία που αναγνωρίζει η EcoRI, διαβάζοντας από

το 5' άκρο προς το 3' άκρο και τη μία και την άλλη αλυσίδα της, είναι GAATTC. Άλλο παράδειγμα: η περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-AAGCTT-3' και κόβει μεταξύ των δύο A,
3'-TTCGAA-5'
η BamH1 αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GGATCC-3' και κόβει μεταξύ των δύο G.
3'-CCTAGG-5'

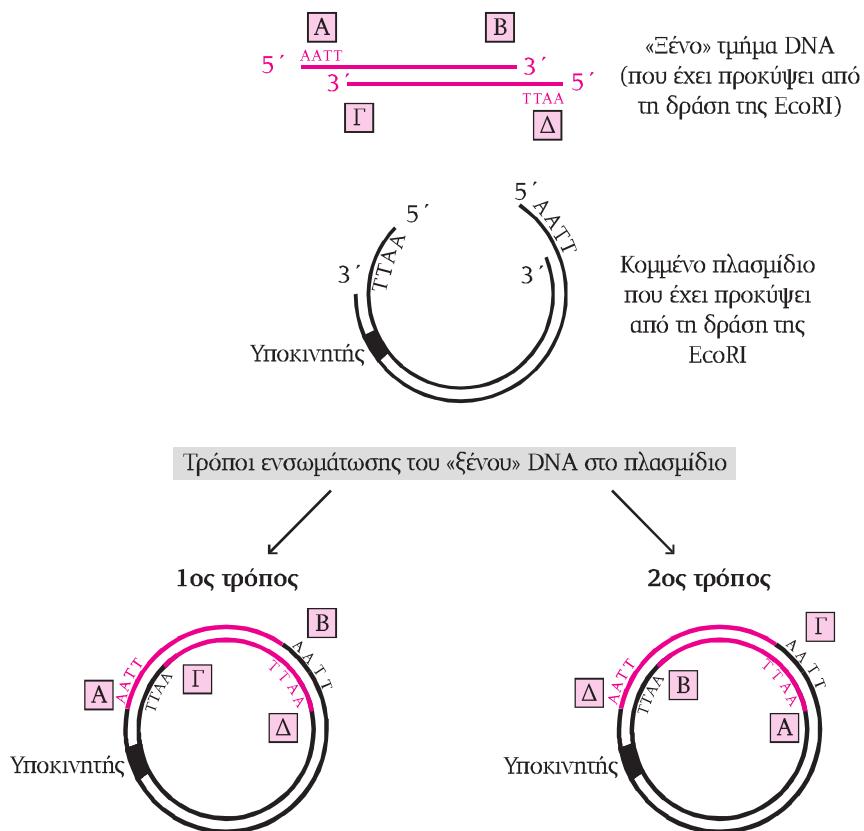
Η αλληλουχία 5'-TTCTA-3'

3'-AAGAT-5' δεν μπορεί να αναγνωριστεί και να κοπεί από περιοριστική ενδονουκλεάση, αφού δεν έχει το παραπάνω χαρακτηριστικό (δεν είναι παλίνδρομη) (βλέπε άσκηση 8.12).

- Μετασχηματισμένα είναι τα βακτήρια που έχουν δεχθεί πλασμίδιο, είτε ανασυνδυασμένο είτε μη ανασυνδυασμένο. Στην περίπτωση που θέλουμε να διαχωρίσουμε τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια από τα μετασχηματισμένα, θα πρέπει το πλασμίδιο να διαθέτει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό και δεν θα πρέπει η περιοριστική ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιήσουμε να κόβει το γονίδιο αυτό ή τον υποκινητά του.
- Εάν θέλουμε να κλωνοποιήσουμε ένα συγκεκριμένο κομμάτι DNA (π.χ. ένα γονίδιο), πρέπει εκατέρωθεν του κομματιού να υπάρχει αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση και να μην υπάρχει η αλληλουχία αυτή στο εσωτερικό του κομματιού.
- Ένα κομμάτι DNA που αντιστοιχεί σε γονίδιο και έχει ενσωματωθεί σε πλασμίδιο για να εισαχθεί σε βακτηριακό κύτταρο μπορεί να μεταγραφεί και να μεταφραστεί (συνδυασμός με τις ασκήσεις του 2ου κεφαλαίου του σχολικού. Βλέπε 8.3, 8.7, 8.17, 8.21). Στην περίπτωση αυτή, για να βρεις την κωδική αλυσίδα, πρέπει να εντοπίσεις αλληλουχίες που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση και να αναζητήσεις τα κωδικόνια έναρξης και λήξης της μετάφρασης στο κομμάτι που μένει μετά το κόψιμο.
- **Στην περίπτωση που θέλουμε να διακρίνουμε ποια από τα μετασχηματισμένα βακτήρια έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και ποια μη ανασυνδυασμένο, θα πρέπει το πλασμίδιο να περιέχει κάποια άλλα γονίδια, όπως γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα και σε δεύτερο αντιβιοτικό (βλ. άσκηση 12, κεφάλαιο 4 σχολικού βιβλίου), γονίδιο που «χρωματίζει» μπλε τις αποικίες οι οποίες προσέλαβαν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (δες άσκηση 9.4), γονίδιο που κάνει τις αποικίες αυτές να φθορίζουν (δες άσκηση 8.31) κτλ. Σε αυτή την περίπτωση όμως θα πρέπει η περιοριστική ενδονουκλεάση να κόβει μέσα σε ένα από τα δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό ή μέσα στο γονίδιο που ευθύνεται για το μπλε χρώμα ή τον φθορισμό.**
- Η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιηθεί δεν θα πρέπει να βρίσκεται στο εσωτερικό της μοναδικής θέσης έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου (δες ασκήσεις 8.15, 8.27), γιατί τότε θα ξάσει την ικανότητά του να αυτοδιπλασιάζεται.
- Εάν το βακτήριο που θα χρησιμοποιηθεί ως ξενιστής παράγει κάποιες περιοριστικές

ενδονουκλεάσες, οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τις ενδονουκλεάσες αυτές δεν θα πρέπει να απαντούν στο ανασυνδυασμένο μόριο DNA, γιατί θα το καταστρέψουν (δες άσκηση 8.23).

- Εάν το βακτήριο που θα χρησιμοποιηθεί ως ξενιστής διαθέτει κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, θα πρέπει να είναι διαφορετικό από αυτό του φορέα κλωνοποίησης για να μπορεί να γίνει η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων (δες άσκηση 8.23).
- Ένα κομμάτι DNA που έχει προκύψει από τη δράση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης μπορεί να ενσωματωθεί σε ένα πλασμίδιο που έχει κοπεί με τη δράση της ίδιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης με δύο τρόπους (βλέπε ασκήσεις 8.3, 8.22, 8.32, 9.22).



- Εάν θέλουμε να κατευθύνουμε την ενσωμάτωση του «ξένου» DNA με έναν συγκεκριμένο τρόπο, χρησιμοποιούμε δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες (τεχνική που δεν αναφέρεται στο σχολικό). (Βλέπε ασκήσεις 8.33 και 27.7.)

8.2 Στο παρακάτω γραμμικό τμήμα DNA επιδρούμε με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Ποια θα είναι τα θραύσματα που θα δημιουργηθούν από τη δράση του ενζύμου; Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου καταστράφηκαν; Ποιο ή ποια από τα θραύσματα μπορούν να ενσωματωθούν σε πλασμίδιο που κόπηκε με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση;

5'-GGGATCGAATTCAATAC-3'

3'-CCCTAGCTTAAGTATA-5'

Απάντηση

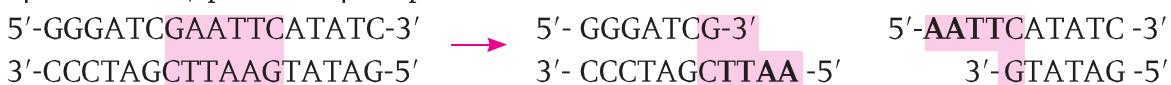
Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI όποτε συναντά την αλληλουχία

5'-GAATT-3'

3'-CTTAA-5'

στο γονιδίωμα, κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A (με κατεύθυνση 5'→3').

Στο γραμμικό τμήμα DNA που δίνεται, η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI υπάρχει μία φορά (ροζ φόντο), οπότε θα δημιουργηθούν από τη δράση του ενζύμου δύο θραύσματα:



Η EcoRI έκοψε τον φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ του νουκλεοτιδίου που περιέχει γουανίν και του νουκλεοτιδίου που περιέχει αδενίνη σε κάθε αλυσίδα της αλληλουχίας την οποία αναγνωρίζει, δηλαδή καταστράφηκαν δύο φωσφοδιεστερικοί δεσμοί.

Με έντονους χαρακτήρες σημειώνονται τα μονόκλωνα άκρα που προκύπτουν μετά τη δράση της EcoRI. Καταστράφηκαν οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα σε τέσσερα ζευγάρια A-T, δηλαδή καταστράφηκαν $2 \times 4 = 8$ δεσμοί υδρογόνου, αφού γνωρίζουμε ότι μεταξύ ενός ζεύγους A-T υπάρχουν δύο δεσμοί υδρογόνου.

Κανένα από τα δύο θραύσματα δεν μπορεί (χωρίς περαιτέρω επεξεργασία) να ενσωματωθεί σε πλασμίδιο, αφού διαθέτει το καθένα ένα μονόκλωνο άκρο και όχι δύο.

8.3 Δίνεται το ακόλουθο τμήμα βακτηριακού DNA το οποίο περιέχει γονίδιο για τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης A. Δίνεται ότι το κωδικόνιο έναρξης και το κωδικόνιο λήξης του συγκεκριμένου γονιδίου δεν βρίσκονται στην αλληλουχία των 300 νουκλεοτιδίων:

AACTGGATCCTCGAAAATGAACAGAACATCGG 300 νουκλεοτίδια TAAATGAATTCCATTAAAAGGATCCCATTGAA
TTGACCTAGGAAGCTTTACTTGTCTTAAGGCC 300 νουκλεοτίδια ATTTACTTAAGGTAAATTTCCTAGGGTAAGCTT

Έχεις στη διάθεσή σου τρεις περιοριστικές ενδονουκλεάσες: την EcoRI, την BamHI, που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GGATCC-3' και κόβει μεταξύ των δύο G, και 3'-CCTAGG-5'

την HindIII, που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-AAGCTT-3' και κόβει μεταξύ των δύο A.
3'-TTCGAA-5'

Επίσης διαθέτεις πλασμίδιο που φέρει μία φορά την αλληλουχία που αναγνωρίζει η EcoRI, μία φορά την αλληλουχία που αναγνωρίζει η BamHI και δύο φορές την αλληλουχία που αναγνωρίζει η HindIII.

a. Ποια από τις τρεις περιοριστικές ενδονουκλεάσες θα χρησιμοποιήσεις προκειμένου να κλωνοποιήσεις το εν λόγω γονίδιο;

- β. Να αιτιολογήσεις την απάντησή σου.
- γ. Πόσοι δεσμοί υδρογόνου και πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί σχηματίζονται κατά τη δημιουργία του ανασυνδυασμένου μορίου DNA;
- δ. Πόσοι τρόποι υπάρχουν για την ενσωμάτωση του τμήματος που περιέχει το γονίδιο στο πλασμίδιο;

Απάντηση

- α. Θα επιλέξω την περιοριστική ενδονουκλεάση **BamHI**.
- β. Δεν θα χρησιμοποιήσω τη **HindIII**, γιατί κόβει το πλασμίδιο-φορέα σε δύο σημεία και επομένως το πλασμίδιο καταστρέφεται, μια και θα προκύψουν δύο τμήματα τα οποία θα «χαθούν» στο διάλυμα εργασίας.

Από τη μελέτη της αλληλουχίας του τμήματος του βακτηριακού DNA διαπιστώνων ότι η αλυσίδα (I) είναι η κωδική, γιατί με ανάγνωσή της από αριστερά προς τα δεξιά υπάρχει κωδικόνιο έναρξης ATG, το οποίο σημειώνεται με (1), και με βήμα τριπλέτας ακολουθεί κωδικόνιο λήξης, που σημειώνεται με (2). Αφού το ATG είναι 5'-ATG-3', βρίσκω τα άκρα των δύο αλυσίδων.

(1)

(2)

- (I) AACTGGATCCTTCGAAAATGAACAGAATTCTGG....300 νουκλεοτίδια....TAAATGAATTCCATTAAAAGGATCCCATTCTGAA
- (II) TTGACCTAGGAAGCTTTACTTGTCTTAAGCC....300 νουκλεοτίδια....ATTTACTTAAGGTAAATTTCCTAGGGTAAGCTT

Η περιοριστική ενδονουκλεάση **EcoRI**, που αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία 5'-GAATTC-3' και τη συμπλορωματική της στην απέναντι αλυσίδα, κόβει μετά το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου, στο εσωτερικό της αλληλουχίας του γονιδίου. Επομένως το γονίδιο δεν κλωνοποιείται ολόκληρο και αυτή η περιοριστική ενδονουκλεάση δεν επιλέγεται για την εργασία.

Η περιοριστική ενδονουκλεάση **BamHI**, που αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία 5'-GGATCC-3' και τη συμπλορωματική της στην απέναντι αλυσίδα, κόβει πριν από το κωδικόνιο έναρξης και μετά το κωδικόνιο λήξης, στις θέσεις που σημειώνονται, και επομένως προκύπτει θραύσμα που περιέχει ολόκληρο το γονίδιο. Άρα αυτή η περιοριστική ενδονουκλεάση επιλέγεται για την εργασία.



- γ. Η **BamHI** κόβει την αλληλουχία 5'-GGATCC-3' και τη συμπλορωματική της στην απέναντι αλυσίδα του δίκλωνου DNA ανάμεσα στις δύο G (βλέπε κόκκινα βέλη) και προκύπτει το ακόλουθο θραύσμα (τμήμα) DNA, που περιέχει το γονίδιο:

5'-**GATC**CTTCGAAAATGAACAGAATTCTGG....300 νουκλεοτίδια....TAAATGAATTCCATTAAAAG-3'
3'-GAAGCTTTACTTGTCTTAAGCC....300 νουκλεοτίδια....ATTTACTTAAGGTAAATTTCCTAG-5'