



# **Βιολογία**

**Θετικής Κατεύθυνσης**

# Κεφάλαιο 4ο



**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ  
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA**

Είναι ο κλάδος της Βιολογίας που περιλαμβάνει τις τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο **γενετικό υλικό**.

- Άνοιξε τον δρόμο για την κατανόηση των μυστηρίων της ζωής και της εξέλιξης στη γη.
- Συμβάλλει στη βελτίωση της υγείας και του τρόπου διαβίωσής του ανθρώπου μέσω των εφαρμογών στην Ιατρική, Γεωργία και Κτηνοτροφία.

# Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA περιλαμβάνει τις τεχνικές εκείνες που οδηγούν σε μεταφορά του γενετικού υλικού από ένα οργανισμό στον άλλο.

- Κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA
- Μεταφορά του ανασυνδυασμένου μορίου DNA σε ένα κύτταρο-ξενιστή.
- Επιλογή και απομόνωση των κυττάρων ξενιστών.
- Επιλογή του βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA.

# 1. Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA

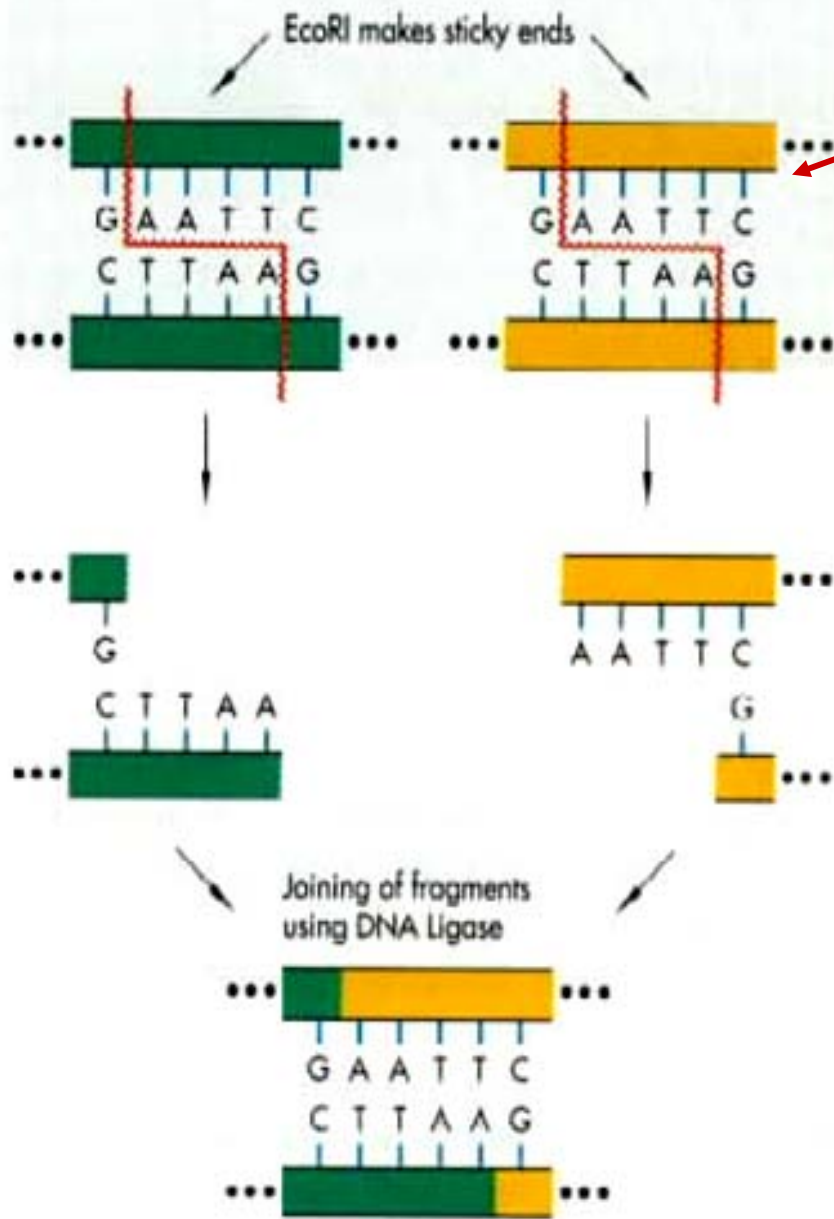
1. Απομόνωση **ολικού** DNA ενός οργανισμού.
2. Ενζυματικό «κόψιμο» με ειδικά ένζυμα που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες.



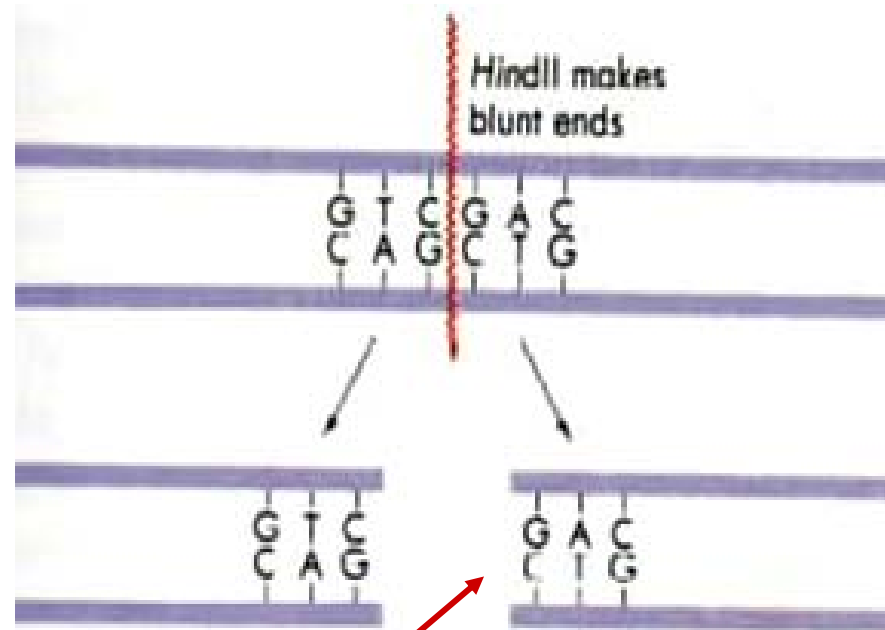
# Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- Είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από **εισβολή** «ξένου» DNA.
- Αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες δίκλωνου DNA 4 – 8 ή περισσότερων νουκλεοτιδίων. Χαρακτηριστικό ένζυμο είναι η *EcoRI* που «κόβει» αλληλουχίες GAATTC, μεταξύ G και A.





*EcoR 1*



*Hind II*

# Σειρά περιοριστικών ενδονουκλεασών και οι περιοχές στις οποίες «κόβουν» τις αλυσίδες DNA.

*EcoR I*            G | AATTC

*EcoR V*    GAT ↓ ATC    σε «τυφλά» άκρα

*Hind III*    A | AGCTT

*Sac I*            GAGGCT | C

*Sac II*            CCGC | GG

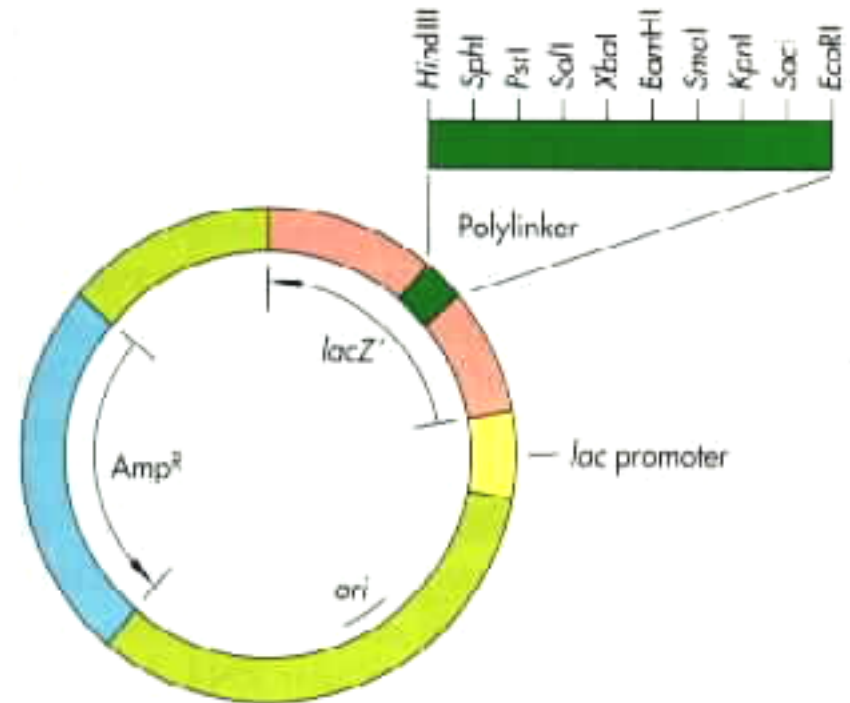
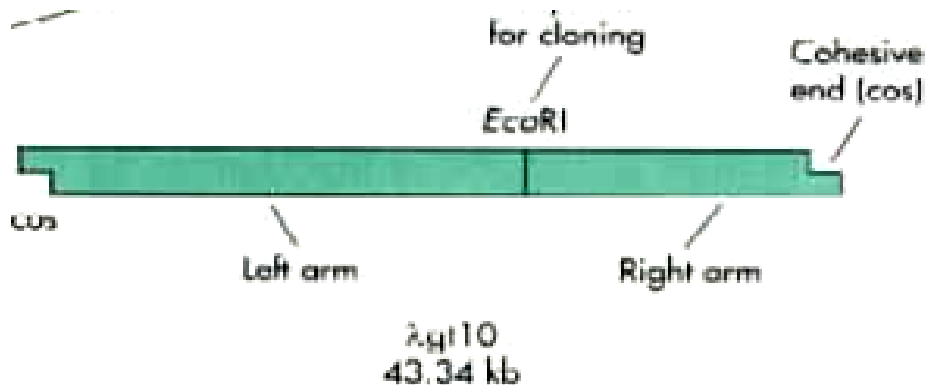
*Sal I*            G | TCGAC

### **3. Εισαγωγή σε «φορέα κλωνοποίησης».**

**Το DNA που δημιουργείται ονομάζεται  
*ανασυνδυασμένο.***

# Φορείς κλωνοποίησης

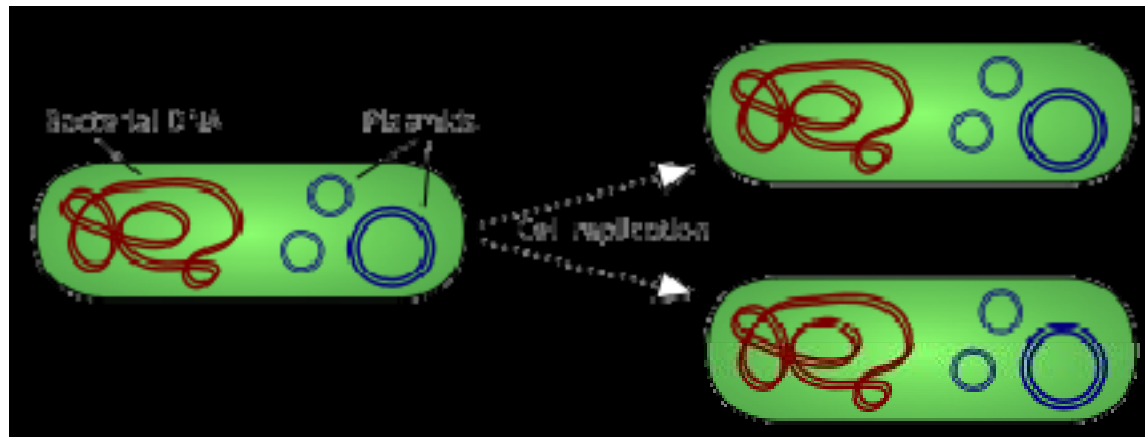
1. Το πλασμίδιο
2. Το DNA των φάγων, όπως ο φάγος λ.



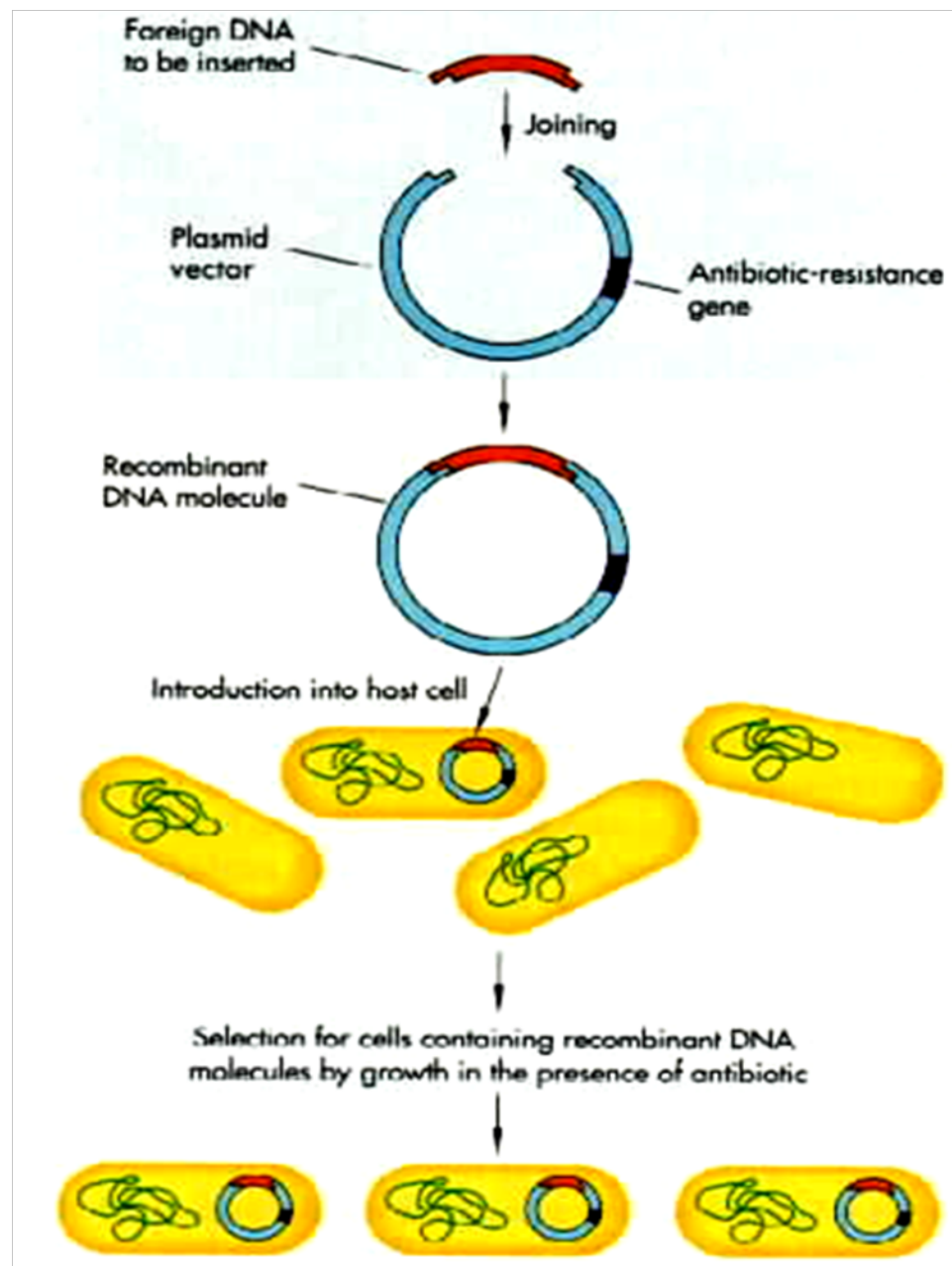
3. Σαν φορείς επίσης χρησιμοποιούνται τα κοσμίδια και τα YACS (τεχνητές μορφές φορέων για να μπορούν να δέχονται τμήματα DNA αρκετών εκατοντάδων χιλιάδων βάσεων).

## 2. Μεταφορά του ανασυνδυασμένου μορίου DNA σε ένα κύτταρο-ξενιστή

Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **μετασχηματισμός** και επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των κατάλληλων γονιδίων που υπάρχουν στο πλασμίδιο, ή μέσω διαμόλυνσης των βακτηρίων με φάγους.



# Μετασχηματισμός βακτηρίων .



### 3. Επιλογή και απομόνωση των κυττάρων ξενιστών.

- Επιλογή των κυττάρων-ξενιστών που έχουν μετασχηματιστεί από το ανασυνδυασμένο DNA.
- Η επιλογή γίνεται εκμεταλλευόμενοι την ανθεκτικότητα των κυττάρων-ξενιστών στα αντιβιοτικά που τους προσδίδουν τα πλασμίδια-φορείς.

Κάθε βακτήριο που θέλουμε να αναπτύξουμε σε αποικία θα πρέπει να είναι μετασχηματισμένο με ένα μόριο ανασυνδυασμένου DNA.

Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **κλωνοποίηση**. Ο όρος **κλώνος** αναφέρεται σε μια ομάδα πανομοιότυπων μορίων, ή κυττάρων, ή οργανισμών.



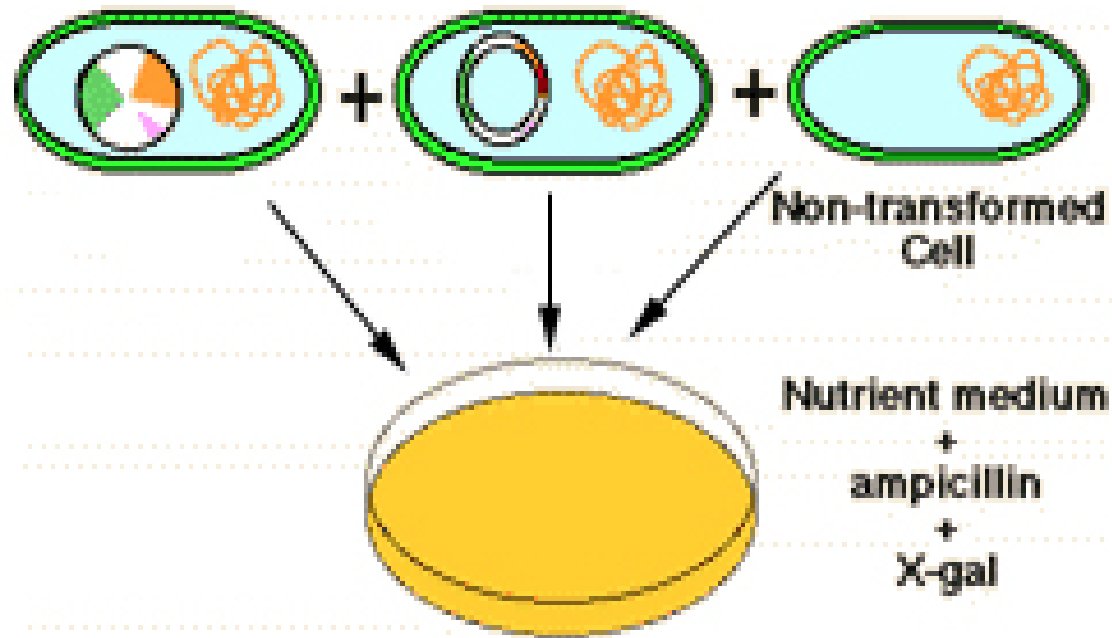
## 4. Επιλογή ενός βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA

Χρησιμοποιώντας ειδικά **μόρια-ανιχνευτές** κατάλληλα **ιχνηθετημένα**, επιλέγουμε τον κλώνο που περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία του DNA μέσω της τεχνικής της **υβριδοποίησης**.

# I. Γονιδιωματική Βιβλιοθήκη

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη δημιουργείται όταν κλωνοποιηθεί το **συνολικό DNA** ενός οργανισμού μέσα σε κύτταρα-ξενιστές.

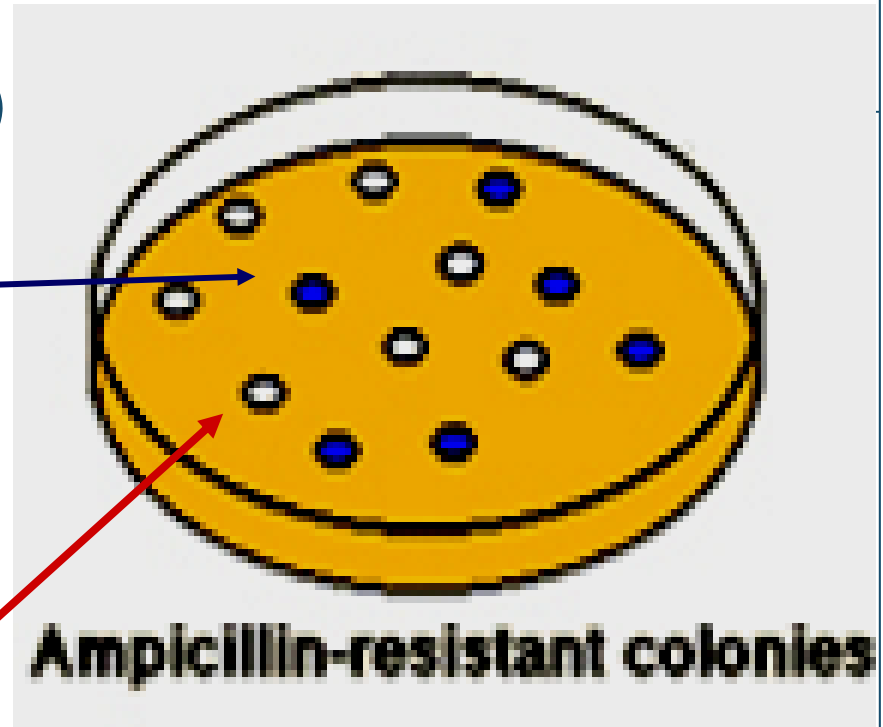
# Επιλογή μετασχηματισμένων κλώνων με το ανασυνδυασμένο DNA, μέσω β-γαλακτοσιδάσης.



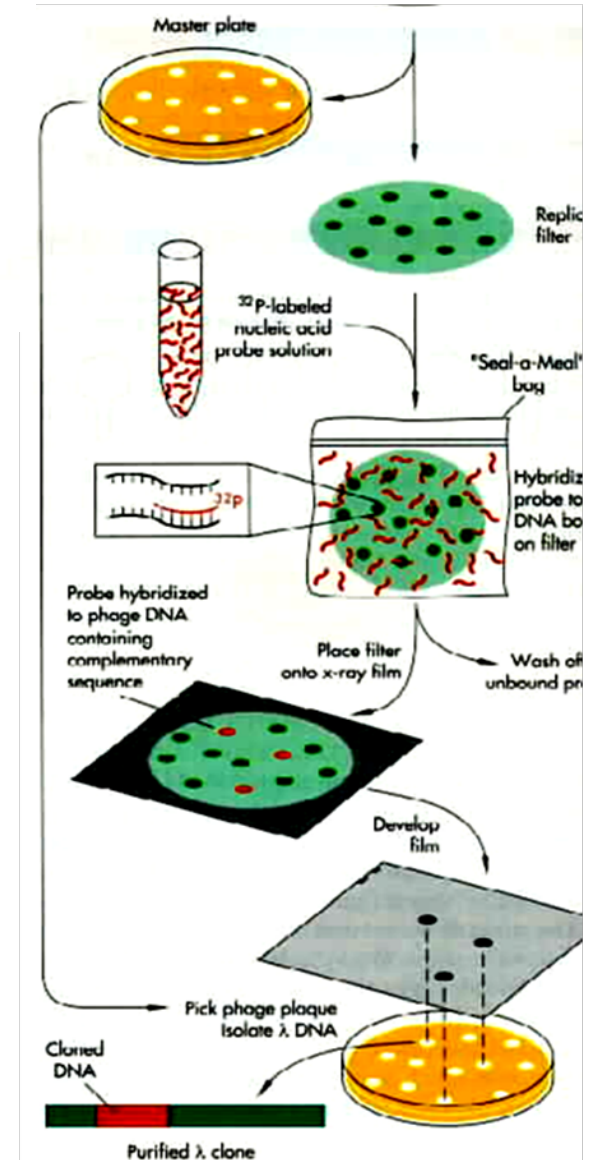
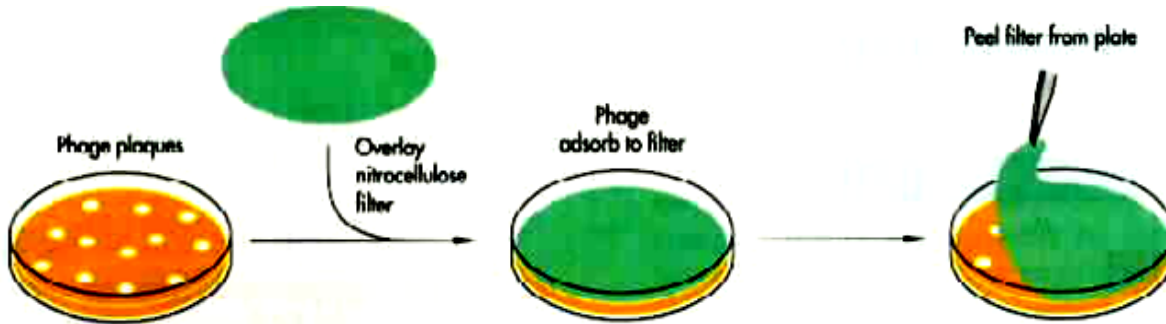


1. Η εμφάνιση **μπλε** αποικιών δείχνει τους μετασηματισμένους κλώνους **χωρίς ανασυνδυασμένο DNA**

2. Οι **λευκές** αποικίες δείχνουν τους κλώνους με το ανασυνδυασμένο DNA.



# Ανίχνευση κλώνου με ανιχνευτή νουκλεϊκό οξύ.



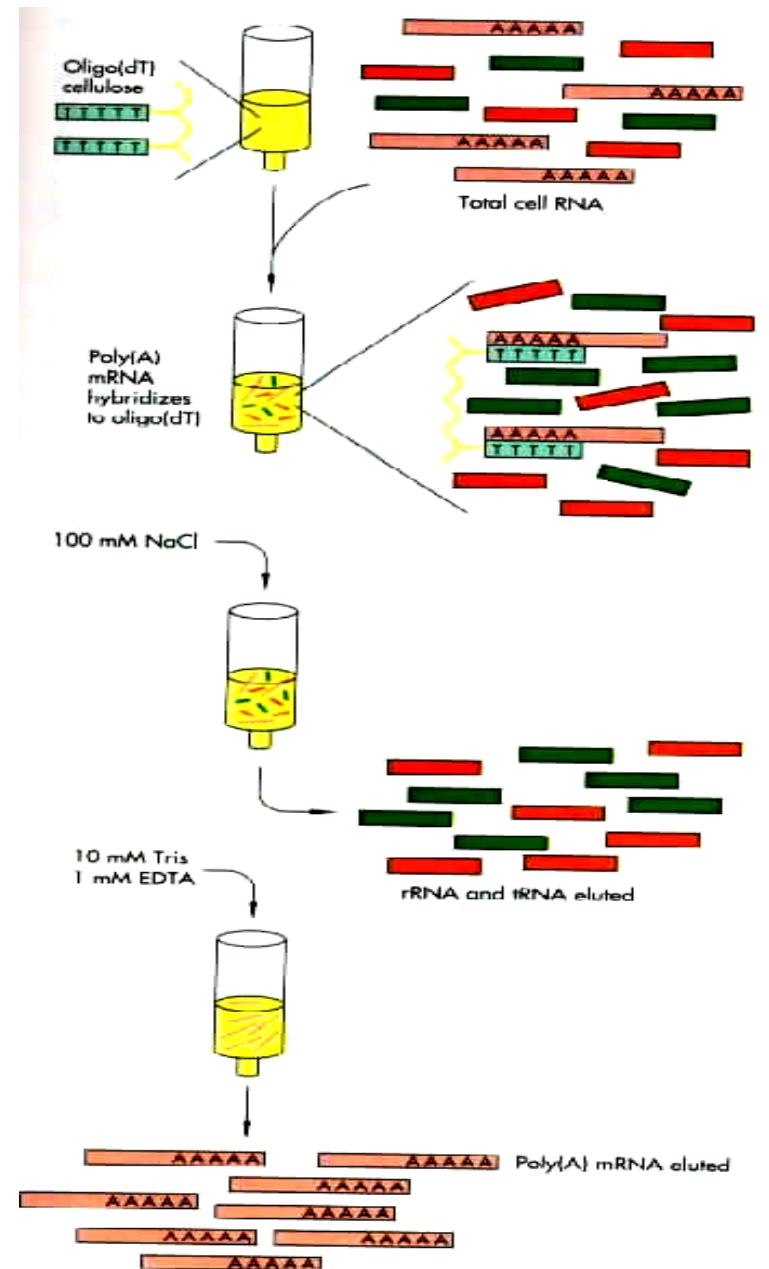
## II. Κλωνοποίηση του mRNA: κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης

Η cDNA βιβλιοθήκη κατασκευάζεται όταν θέλουμε να κλωνοποιήσουμε μόνο τα γονίδια τα οποία **εκφράζονται** σε συγκεκριμένα κύτταρα.

Οι cDNA βιβλιοθήκες περιέχουν αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά.

Με την διαδικασία αυτή απομονώνονται οι αλληλουχίες εκείνες του γενετικού υλικού οι οποίες εκφράζονται σε αμινοξέα (**εξώνια**).

Απομόνωση των *poly(A)*-RNA με  
χρήση ολιγονουκλεοτιδίων  
TTTTTT (σε χρωματογραφία  
στήλης), για την απομόνωση του  
ολικού mRNA.



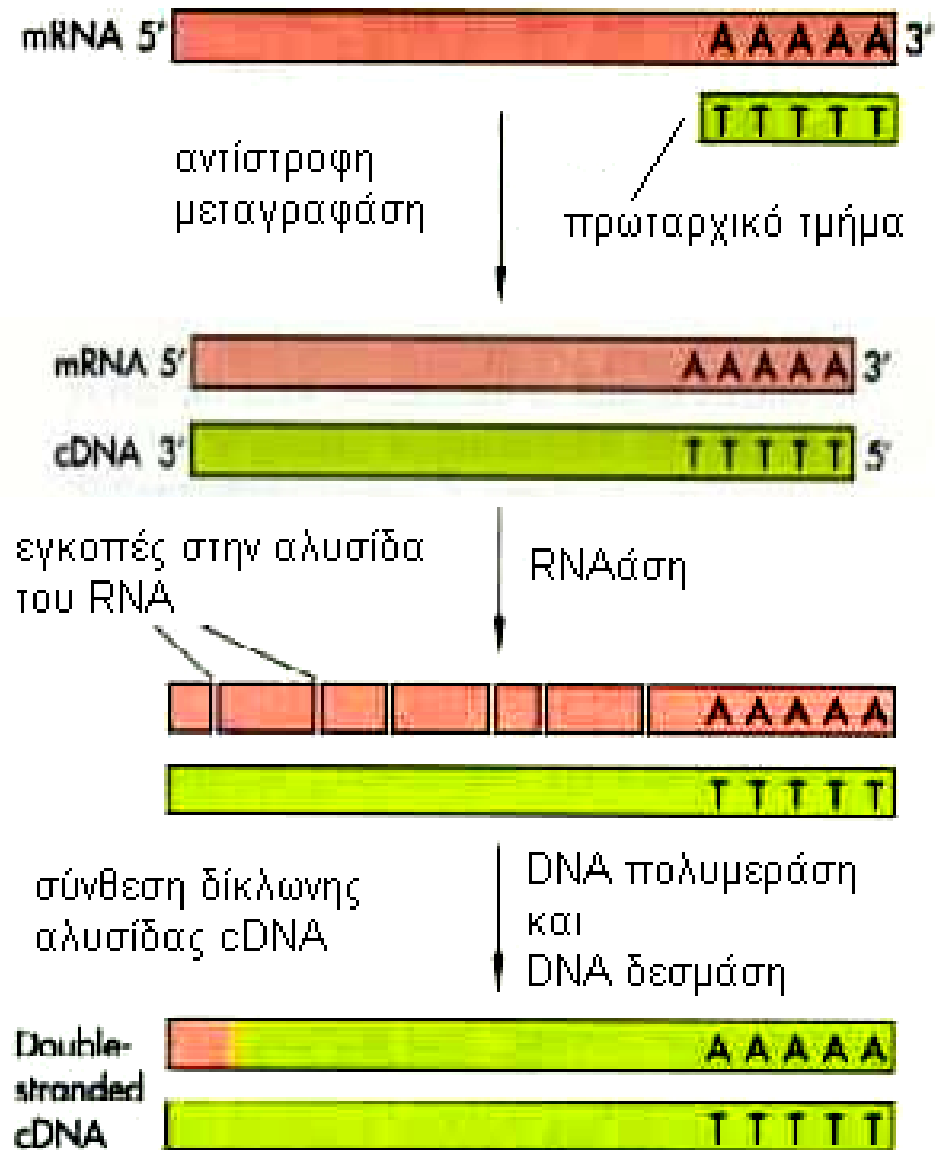


# Διαδικασία σχηματισμού της cDNA βιβλιοθήκης

- Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα που εκφράζουν το επιθυμητό γονίδιο και από αυτό απομονώνουμε το mRNA.

# Μέθοδος μετατροπής mRNA σε δίκλωνο cDNA

- Μέσω του ενζύμου **αντίστροφη μεταγραφάση** και με πρότυπο την αλυσίδα mRNA σχηματίζεται υβρίδιο μόριο *mRNA-cDNA*.
- Το mRNA του υβριδικού μορίου *mRNA-cDNA* διασπάται με χρήση κατάλληλων χημικών ουσιών (π.χ. ένζυμο *RNAάση H*) ή αποδιατάσσεται με θέρμανση και «κρατάμε» τις αλυσίδες cDNA.
- Με πρότυπο το cDNA και χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράσης δημιουργείται δίκλωνο cDNA.



- Στο δίκλωνο cDNA δημιουργούμε κατάλληλα μονόκλιωνα άκρα ώστε να «κολλήσουν» με τον κατάλληλο φορέα.
- Τα ανασυνδυασμένα μόρια κλωνοποιούνται σε κύτταρα-ξενιστές κατά τα γνωστά και δημιουργούμε την cDNA βιβλιοθήκη.

### III. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της PCR: (*polymerase chain reaction*) μας επιτρέπει να αντιγράψουμε **επιλεκτικά**, εκατομμύρια φορές, ειδικές αλληλουχίες DNA, μέσα από ένα σύνθετο μίγμα μορίων DNA χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου και αντίστοιχα την επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία της κλωνοποίησης.

## ΣΥΣΚΕΥΗ PCR



Πρωταρχικά τμήματα



Συμπληρωματικές αλυσίδες



Νέα πρωταρχικά τμήματα



Αλυσίδες DNA μεταβλητού μήκους



Νέα πρωταρχικά τμήματα



Επιθυμητά τμήματα μεταβλητού μήκους

