

Γενικά

Η απομόνωση ενζύμων (περιοριστικές ενδονουκλεάσες) που κόβουν το DNA σε κομμάτια με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων καθώς και ειδικών φορέων που μεταφέρουν DNA από κύτταρο σε κύτταρο, έδωσε τη δυνατότητα «αναπαραγωγής» διαδικασιών αντιγραφής-μεταγραφής-μετάφρασης και επέτρεψε την ανάπτυξη της **τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA**. Έτσι αποκτούμε ικανότητα έρευνας, επέμβασης και τροποποίησης του γενετικού υλικού των οργανισμών με σκοπό την παραγωγή σειράς χρήσιμων προϊόντων και τη δημιουργία φυτών και ζώων με βελτιωμένες ιδιότητες.

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA περιλαμβάνει την κατασκευή in vitro ενός τεχνητού μορίου DNA (ανασυνδυασμένο μόριο DNA) που περιέχει γονίδια από 2 ή περισσότερους οργανισμούς. Στη συνέχεια το μόριο αυτό εισάγεται σε ένα βακτήριο ή σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Τα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια ή ευκαρυωτικά κύτταρα ζουν και αναπαράγονται μεταφέροντας στους απογόνους τις καινούργιες ιδιότητες.

Οι τεχνικές επέμβασης στο γενετικό υλικό αποτελούν τη **Γενετική Μηχανική**, με στόχο:

- * Κατανόηση μυστηρίων ζωής και εξέλιξης
- * Βελτίωση υγείας και τρόπου διαβίωσης (εφαρμογές στην Ιατρική, Γεωργία, Κτηνοτροφία)

Τα στάδια της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA είναι :

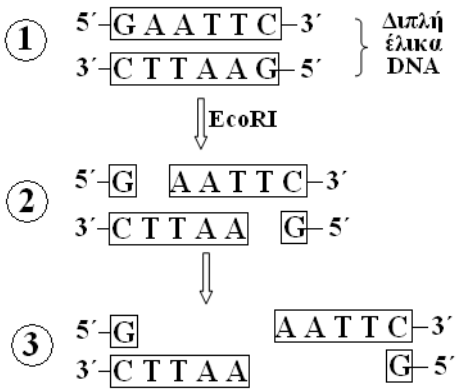
- A. **Κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA**. Το ολικό DNA από έναν οργανισμό απομονώνεται, κόβεται με ειδικά ένζυμα (περιοριστικές ενδονουκλεάσες) και ενώνεται με φορέα κλωνοποίησης. Ο **φορέας κλωνοποίησης** είναι ένα μόριο DNA (πλασμίδιο ή DNA φάγων) το οποίο μπορεί να αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα μέσα σε κύτταρο-ξενιστή οπότε δημιουργείται ανασυνδυασμένο DNA
- B. **Μεταφορά ανασυνδυασμένου DNA σε κύτταρο-ξενιστή**. Η εισαγωγή του DNA σε βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή ονομάζεται **μετασηματισμός**.
- C. **Επιλογή απομόνωση κυττάρων-ξενιστών**. Τα κύτταρα-ξενιστές που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο DNA επιλέγονται από όσα δεν το έχουν προσλάβει. Κάθε βακτήριο που έχει προσλάβει ένα μόριο ανασυνδυασμένου DNA πολλαπλασιάζεται και παράγει μια αποικία που αποτελεί ένα βακτηριακό κλώνο. Με τον τρόπο αυτό παράγονται χιλιάδες κλώνοι που ο καθένας περιέχει ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA διαφορετικό από τους άλλους κλώνους. **Κλώνος** είναι μια ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών και **κλωνοποίηση** η κατασκευή μεγάλου αριθμού πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων, οργανισμών.
- D. **Επιλογή βακτηριακού κλώνου με επιθυμητό τμήμα DNA**. Πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών μορίων ανιχνευτών.

Γονιδιοματική βιβλιοθήκη

A. Οι **περιοριστικές ενδονουκλεάσες** παράγονται από βακτήρια και φυσιολογικά τα προστατεύουν από εισβολή «ξένου» DNA. Αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA. Η πλέον χρησιμοποιούμενη είναι η **EcoRI** που απομονώθηκε από την E. coli και αναγνωρίζει την αλληλουχία

$$\begin{array}{l} 5' - \text{GAATTC} - 3' \\ 3' - \text{CTTAAG} - 5' \end{array}$$

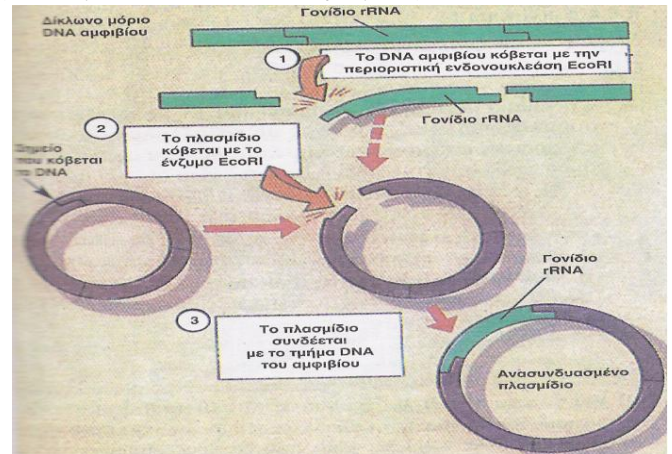
γονιδίωμα κόβοντας κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A με κατεύθυνση 5'→3' οπότε



αφήνει μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα. Αυτά τα άκρα μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς H με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA που κόπηκαν με το ίδιο ένζυμο. Η αλληλουχία GAATTC υπάρχει διάσπαρτη στα γονιδιώματα των οργανισμών κι έτσι το γονιδίωμα ευκαρυωτικού οργανισμού μπορεί να κοπεί σε χιλιάδες κομμάτια μ' αυτή την ενδονουκλεάση. Κατόπιν τα κομμάτια αυτά ενσωματώνονται σε ειδικούς φορείς (πλασμίδια και DNA φάγων).

Τα πλασμίδια

που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης έχουν την αλληλουχία αυτή μία μόνο φορά οπότε η EcoRI τα κόβει δημιουργώντας ένα γραμμικό μόριο DNA με μονόκλωνα άκρα. Τα δύο είδη DNA – πλασμιδίου και οργανισμού – αναμιγνύονται και ενώνονται μεταξύ τους με τη βοήθεια της DNA δεσμάσης, έτσι δημιουργούνται ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Μερικά πλασμίδια ξαναγίνονται κυκλικά χωρίς πρόσληψη DNA του οργανισμού.

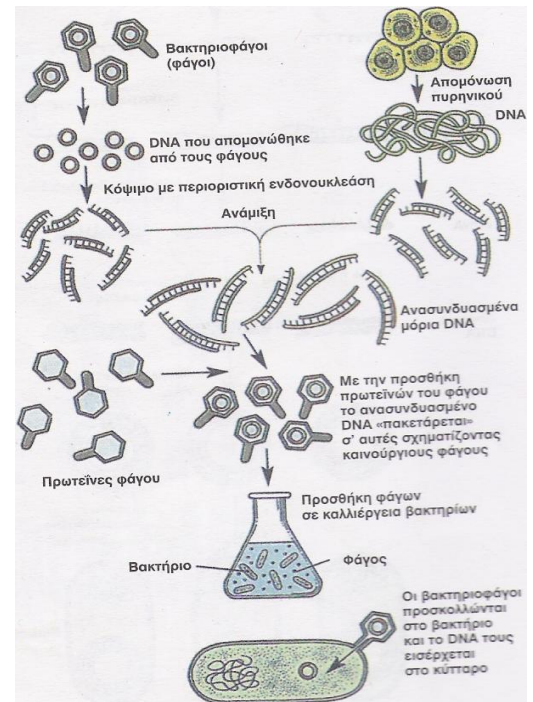


B. Βακτήρια-ξενιστές δέχονται σε μικρό ποσοστό πλασμίδια, μερικά από αυτά είναι ανασυνδυασμένα. Συνήθως χρησιμοποιούνται σαν ξενιστές, βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια άρα είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά. Για να μπει ένα πλασμίδιο στο βακτήριο, τα τοιχώματα του βακτηρίου γίνονται παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια μετά από κατάλληλη επεξεργασία (**μετασχηματισμός**).

C. Η επιλογή των βακτηρίων που δέχτηκαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στηρίζεται στην ικανότητα ανάπτυξης παρουσία αντιβιοτικού, διότι το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο που τους προσδίνει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Κάθε βακτήριο που προσέλαβε ένα ανασυνδυασμένο βακτήριο πολλαπλασιάζεται και δίνει ένα κλώνο. Η διαδικασία δημιουργίας κλώνων βακτηρίων ονομάζεται **κλωνοποίηση**. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού δότη και αποτελεί μια **γονιδιωματική βιβλιοθήκη**.

D. Η επιλογή ενός κλώνου που έχει ένα επιθυμητό γονίδιο θα γίνει χρησιμοποιώντας ειδικούς **ανιχνευτές**.

Τα πλασμίδια είναι συνηθισμένοι φορείς κλωνοποίησης για οργανισμούς με μικρό γονιδίωμα. Άλλος φορέας που ενσωματώνει μεγαλύτερα κομμάτια ξένου DNA, είναι ο βακτηριοφάγος λ. Η στρατηγική κλωνοποίησης είναι ίδια με αυτή στα πλασμίδια.



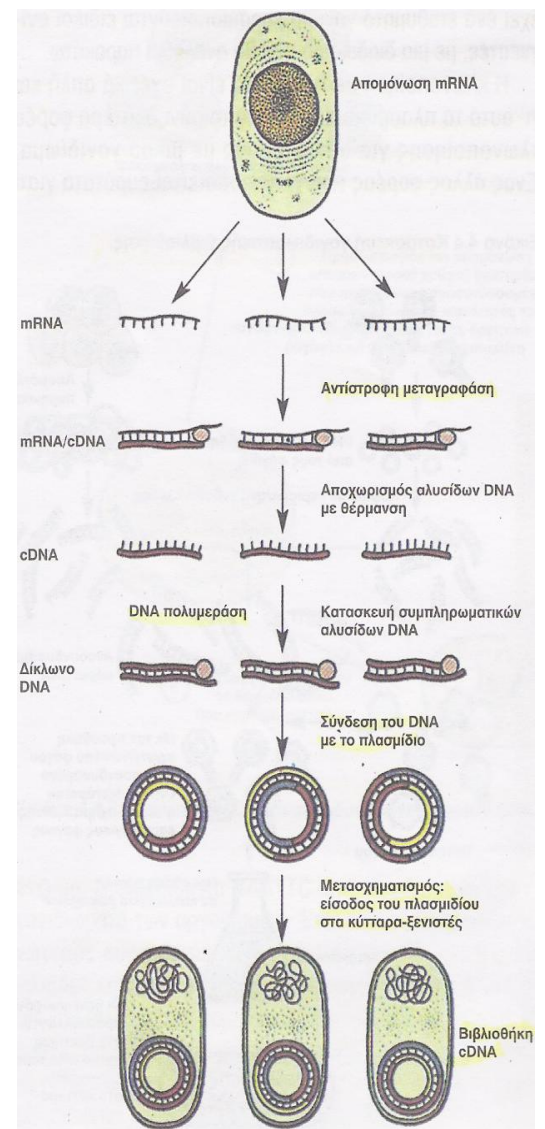
Κλωνοποίηση mRNA: Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς πολλά γονίδια μεταγράφονται μόνο σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους (γονίδια αλυσίδων αιμοσφαιρινών στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα). Όταν κλωνοποιούμε μόνο τα γονίδια που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα, κατασκευάζουμε τις cDNA βιβλιοθήκες οι οποίες περιέχουν αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά και έχουν το πλεονέκτημα απομόνωσης μόνο των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των εξονίων. Για να κατασκευαστεί μια **cDNA βιβλιοθήκη** απομονώνεται το ολικό ώριμο mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο. Το mRNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (complementary DNA). Η σύνθεση αυτή γίνεται με την αντίστροφη μεταγραφάση οπότε παράγονται υβριδικά μόρια cDNA- mRNA. Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αναδιατάσσεται με θέρμανση και τα cDNA χρησιμεύουν σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA για να δημιουργηθούν δίκλινα μόρια DNA τα οποία εισάγονται σε πλασμίδια ή βακτηριοφάγους και κλωνοποιούνται δίνοντας έτσι δυνατότητα σύνθεσης πρωτεΐνης συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο-ξενιστή.

Ανίχνευση κλώνων γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης

Η απομόνωση του συνολικού DNA από κύτταρα προκαρυωτικού ή ευκαρυωτικού οργανισμού είναι απλή. Αν επιδράσουμε στο DNA χημικά ή με θέρμανση τότε σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων και αποχωρίζονται η μία από την άλλη, διαδικασία γνωστή σαν **αποδιάταξη**. Οι 2 μονόκλωνες συμπληρωματικές αλυσίδες μπορούν σε κατάλληλες συνθήκες να επανασυνδεθούν με τη διαδικασία της **υβριδοποίησης** που είναι η σύνδεση μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ή συμπληρωματικών DNA-RNA. Η σημαντική αυτή ιδιότητα του DNA μας δίνει δυνατότητα να το χρησιμοποιήσουμε σαν ανιχνευτή για να εντοπίσουμε το συμπληρωματικό του που βρίσκεται μεταξύ χιλιάδων άλλων κομματιών.

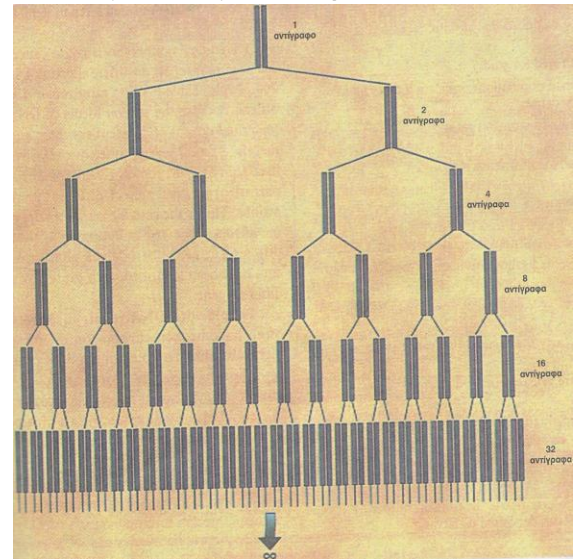
Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει τεράστιο αριθμό κλωνοποιημένων κομματιών χρωμοσωμικού DNA που έχουν παραχθεί με τη δράση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Ορισμένα κομμάτια περιέχουν ολόκληρα γονίδια, άλλα περιέχουν κομμάτια γονιδίων και άλλα τμήματα DNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Για να εντοπίσουμε αυτό που θέλουμε χρησιμοποιούμε ιχνηθετημένους ανιχνευτές μορίων DNA ή RNA που περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές προς το κλωνοποιημένο DNA. Οι ανιχνευτές αναμιγνύονται με το DNA της βιβλιοθήκης που έχει αποδιαταχθεί οπότε υβριδοποιούν μόνο το



συμπληρωματικό τους DNA. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για απομόνωση συγκεκριμένου γονιδίου από cDNA βιβλιοθήκη.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η κατασκευή βιβλιοθηκών μας δίνει δυνατότητα απομόνωσης βακτηριακών κλώνων με το επιθυμητό γονίδιο. Κατόπιν πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια του κλώνου και δημιουργούνται πολλά αντίγραφα του γονιδίου που περιέχει. Η **μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)** επιτρέπει την αντιγραφή επιλεκτικά, εκατομμύρια φορές, ειδικών αλληλουχιών DNA από σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου και έχει πολλές πρακτικές εφαρμογές.



Σύνθεση προϊνσουλίνης ποντικού

mRNA που απομονώθηκε από κύτταρα ποντικού με την αντίστροφη μεταγραφή μεταφέρει την πληροφορία σε μονόκλωνο cDNA. Το καλούπι mRNA καταστρέφεται με επίδραση βάσης και η DNA πολυμεράση συνθέτει συμπληρωματικό κλώνο συνέχεια του πρώτου. Η S₁ νουκλεάση διασπά τη φουρκέτα που ενώνει τους συμπληρωματικούς κλώνους δημιουργώντας δίκλωνο μόριο. Το δίκλωνο DNA θα ενσωματωθεί σε ένα πλασμίδιο ως εξής : μια τρανσφεράση επιμηκύνει τα 3' άκρα προσθέτοντας 4 νουκλεοτίδια κυτοσίνης και επιμηκύνει τα 3' άκρα του DNA του πλασμιδίου με προσθήκη 4 νουκλεοτιδίων γουανίνης. Οι συμπληρωματικές βάσεις σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και τα 2 μόρια DNA ενώνονται. Τέλος ένζυμα του βακτηρίου συμπληρώνουν τα κενά ενσωματώνοντας πλήρως το ξένο DNA μέσα στο πλασμίδιο που θα χρησιμεύσει σαν φορέας εισαγωγής μέσα σε βακτήριο ξενιστή. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε περιέχει 2 γονίδια ανθεκτικότητας στην πενικιλίνη και την τετρακυκλίνη. **Το πλασμίδιο κόβεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση Pst σε αλληλουχία αναγνώρισης στη μέση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πενικιλινάση οπότε η ενσωμάτωση του ξένου DNA καταστρέφει τη δράση της πενικιλινάσης ενώ η ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη παραμένει και χρησιμεύει στην επιλογή των βακτηρίων που έχουν δεχθεί το ανασυνδυασμένο DNA.**

