

■ Ασκήσεις με απάντηση

Η αλληλουχία τέμνεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, μεταφέρεται σε πλασμίδιο και κατόπιν σε βακτήριο, όπου παράγεται το ολιγοπεπτίδιο που φυσιολογικά κωδικοποιεί στο κύτταρο από το οποίο προήλθε.

i) 5' GCGTTAGAATTCATGGGGCACGCGAGACCTCATTAGAAGAATTCTGAGAAT 3'

ii) 3' GCCAATCTTAAGTACCCCGTGCCTCTGGAGTAATCTTCTTAAGACTCTTA 5'

- α) Πόσοι δεσμοί υδρογόνου υπάρχουν στο θραύσμα που δημιουργείται από την επίδραση της EcoRI στην αλληλουχία;
- β) Πόσοι δεσμοί –φωσφοδιεστερικοί και υδρογόνου– σχηματίζονται κατά τη σύνδεση της αλληλουχίας με τον φορέα κλωνοποίησης; Ποιο ένζυμο συμβάλλει στη σύνδεση αυτή;
- γ) Να εξηγήσετε ποια από τις δύο αλυσίδες του τμήματος είναι μη κωδική.
- δ) Ο υποκινητής του γονιδίου βρίσκεται αριστερά ή δεξιά από την αλληλουχία που σας δίνεται; Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.
- ε) Ποιο είναι το πεπτίδιο που παράγεται στο βακτήριο από τη μεταγραφή και τη μετάφραση του τμήματος;

Απάντηση

- α) Η αλληλουχία τέμνεται από την EcoRI σε δύο θέσεις, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:

5' GCGTTAG | AATTCATGGGGCACGCGAGACCTCATTAGAAG | AATTCTGAGAAT 3'
3' GCCAATCTTAA | GTACCCCGTGCCTCTGGAGTAATCTTCTTAA | GACTCTTA 5'

οπότε προκύπτει το τμήμα με μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις:

5' AATTCATGGGGCACGCGAGACCTCATTAGAAG 3'

3' GTACCCCGTGTCTGCTCTGGAGTAATCTTCTTAA 5'

Η αλληλουχία συνολικά περιέχει 16 A και 16 G, εκ των οποίων όμως δεσμούς υδρογόνου αναπτύσσουν οι 12 A και οι 16 G, καθώς 4 από τις A βρίσκονται στα άκρα. Συνεπώς, οι δεσμοί υδρογόνου είναι $2 \cdot 12 + 3 \cdot 16 = 24 + 48 = 72$.

- β) Τα άκρα του πλασμιδίου φέρουν τις συμπληρωματικές βάσεις, καθώς έχουν κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση και για το λόγο αυτό αναφέρονται και ως «κολλώδη» άκρα. Μεταξύ αυτών θα σχηματιστούν 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου ($2 \cdot 4$) σε κάθε σύνδεση, άρα 4 φωσφοδιεστερικοί και 16 δεσμοί υδρογόνου. Το ένζυμο που καταλύει τη σύνδεση του φορέα κλωνοποίησης με το DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί είναι η DNA δεσμάση.

- γ) Πριν από τη θραύση του τμήματος, φαίνεται ότι τις προϋποθέσεις της μη κωδικής αλυσίδας πληρούν και οι δυο, καθώς φέρουν εξίσου 3' TAC 5' και ένα κωδικόνιο λήξης, όπως φαίνεται στο σχήμα:

5' GCG**TT**AGAATTCATGGGGCACGCGAGACCT**CATT**AGAAAGAATTCGAGAAT 3'
3' CGCAAATCTTAAG**TAC**CCCGTGCGCTCTGGAGTA**ATCT**TTCTTAAGACTCTTA 5'

Η αλληλουχία όμως, μετά τη μεταφορά της στο πλασμίδιο, είναι ως ακολούθως:

5' ...GAATTCATGGGGCACGCGAGACCTCATTAGAAAGAATTC... 3'
3' ...CTTAAG**TAC**CCCGTGCGCTCTGGAGTA**ATCT**TTCTTAAG... 5'

Δεδομένου όμως ότι το φυσιολογικό πεπτίδιο εξακολουθεί να παράγεται και μετά την κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, τις προϋποθέσεις για τη μη κωδική αλυσίδα πληροί μόνο η αλυσίδα (ii). Από τη σύνθεση του πεπτιδίου στο βακτήριο συμπεραίνουμε, επιπλέον, ότι δεν υπάρχουν εσώνια στο συγκεκριμένο γονίδιο.

- δ) Ο υποκινητής βρίσκεται πριν από την αρχή κάθε γονιδίου. Αρχή κάθε γονιδίου αποτελεί το σημείο έναρξης της μεταγραφής, και μεταγραφόμενη είναι η μη κωδική αλυσίδα, η οποία έχει πάντα 3' άκρο στον υποκινητή. Δεδομένου ότι η μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου είναι η αλυσίδα (ii), ο υποκινητής βρίσκεται πριν από αυτή, συνεπώς στο φυσιολογικό γονιδίωμα του οργανισμού από τον οποίο προήλθε η αλληλουχία βρίσκεται αριστερά αυτής.

- ε) Το μεταγραφόμενο τμήμα στο mRNA που παράγεται είναι:

5' ...AUG GGG CAC GCG AGA CCU CAU UAG... 3'

Το πεπτίδιο που παράγεται είναι:

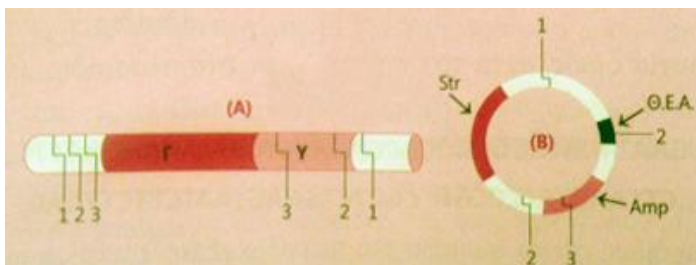
H₂N – met – gly – his – ala- arg – pro – his – COOH

Το πλασμίδιο (B) του σχήματος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης τμήματος DNA (A) που προέρχεται από βακτήριο και περιέχει γονίδιο (Γ) και τον υποκινητή του (Υ). Τα σημεία 1, 2 και 3 υποδεικνύουν τις θέσεις αναγνώρισης 3 περιοριστικών ενδονουκλεασών στο πλασμίδιο και το γονίδιο αντίστοιχα, τα Amp και Str γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και τη στρεπτομυκίνη αντίστοιχα, ενώ υποδεικνύεται και η θέση έναρξης (Θ.Ε.Α.) αντιγραφής του πλασμιδίου.

α) Ποια από τις ενδονουκλεάσες 1, 2, 3 είναι κατάλληλη για την κλωνοποίηση του γονιδίου και τη μελέτη αποκλειστικά της αλληλουχίας του;

β) Ποια από τις ενδονουκλεάσες 1, 2, 3 είναι κατάλληλη για την κλωνοποίηση του γονιδίου και την παραγωγή της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί;

γ) Ποιο αντιβιοτικό θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων;



Απάντηση

Πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης πρέπει να διαθέτουν ένα τουλάχιστον γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, προϋπόθεση που το συγκεκριμένο πλασμίδιο πληροί, και επιπλέον να τέμνονται μία φορά από την περιοριστική ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιηθεί. Επιπλέον, η κλωνοποίηση ενός γονιδίου και η μελέτη της αλληλουχίας του δεν επιβάλλει την ταυτόχρονη μεταφορά και κλωνοποίηση του υποκινητή του, όπως συμβαίνει με την περίπτωση που είναι επιθυμητή η έκφραση ενός γονιδίου σε βακτηριακό κύτταρο και η σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης (θεωρώντας ότι οι υποκινητές των βακτηριακών γονιδίων είναι ενεργοί σε κάθε περίπτωση). Συνεπώς:

α) Η περιοριστική ενδονουκλεάση 2 απορρίπτεται, διότι τέμνει το πλασμίδιο σε δύο σημεία, το ένα εκ των οποίων είναι η θέση έναρξης αντιγραφής. Αξίζει να σημειωθεί ότι και μόνο στη θέση έναρξης να το έτεμνε θα αποκλειόταν επίσης, διότι θα του στερούσε τη θεμελιώδη ιδιότητα των φορέων κλωνοποίησης να αντιγράφονται ανεξάρτητα μέσα στα κύτταρα-ξενιστές. Η 3 τέμνει το γονίδιο από την αρχή και μετά το πέρας του και το πλασμίδιο σε μια θέση, οπότε είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί προς αυτό το σκοπό.

β) Για την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο είναι κατάλληλη η 1, που δεν καταστρέφει την αλληλουχία του υποκινητή.

γ) Στην περίπτωση Α θα χρησιμοποιηθεί η στρεπτομυκίνη για την απομόνωση των μετασχηματισμένων βακτηρίων, διότι η θραύση του πλασμιδίου από την 3 και η ενσωμάτωση του γονιδίου σε αυτό έχει καταστρέψει την αλληλουχία του γονιδίου της αμπικιλίνης. Αντίθετα, στην περίπτωση Β είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε από τα δύο αντιβιοτικά, καθώς η περιοριστική ενδονουκλεάση 1 τέμνει το πλασμίδιο εκτός αυτών.