

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Πώς ξεχωρίζουμε τα βακτήρια που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από αυτά που προσέλαβαν μη ανασυνδυασμένο κύτταρο;

Η εικόνα 4.1 στη σελίδα 58 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, μιας και δεν εξηγείται στο κείμενο του σχολικού βιβλίου ο σχηματισμός αποικιών με λευκό και με μπλε χρώμα που φαίνεται στην εικόνα.

Στο δεύτερο κεφάλαιο αναφέρθηκε ότι το βακτήριο *Escherichia coli* παράγει, παρουσία λακτόζης, β-γαλακτοζιδάση λόγω της έκφρασης του δομικού γονιδίου Z που βρίσκεται στο οπερόνιο της λακτόζης στο κύριο μόριο DNA του. Κατά την κατασκευή βιβλιοθήκης, ως κύτταρα-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 επιλογή των βακτηρίων που 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 μια θέση αναγνώρισης από τη χρησιμοποιούμενη περιοριστική ενδονουκλεάση, η 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 μια 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 υδρολύσουν 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.