

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

Αφού μελετήσετε το βιβλίο σας να προσπαθήσετε να απαντήσετε τις παρακάτω ερωτήσεις και να μπορείτε:

- να περιγράφετε τη μεθοδολογία κατασκευής του ανασυνδυασμένου DNA
- να περιγράφετε τη διαδικασία κλωνοποίησης των γονιδίων.
- να περιγράφετε τα στάδια κατασκευής της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.
- να περιγράφετε τα στάδια κατασκευής της c DNA βιβλιοθήκης.
- να διακρίνετε τις ομοιότητες και τις διαφορές της γονιδιωματικής και της c DNA βιβλιοθήκης.
- να περιγράφετε την απομόνωση ενός γονιδίου από μία βιβλιοθήκη.

1. Ποια πειραματικά γεγονότα συνέβαλλαν στην ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA;
2. Τι περιλαμβάνει η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;
3. Τι είναι το ανασυνδυασμένο DNA και γιατί είναι σημαντικό; Σε ποια κύτταρα είναι δυνατόν να εισάγεται ανασυνδυασμένο DNA και ποιο είναι το αποτέλεσμα της εισαγωγής του;
4. Γνωρίζετε ανασυνδυασμένο DNA που δεν δημιουργείται με τεχνητό τρόπο; Να αιτιολογήσετε με ένα παράδειγμα.
5. Τι είναι τα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια ή ευκαρυωτικά κύτταρα;
6. Ποια στάδια ακολουθούμε ώστε να μεταφέρουμε γενετικό υλικό από τον ένα οργανισμό στον άλλο;
7. Πώς κατασκευάζεται το ανασυνδυασμένο DNA;
8. Τι είναι ο φορέας κλωνοποίησης; Να αναφέρετε παραδείγματα ανασυνδυασμένου DNA.
9. Να αναφέρετε παραδείγματα φορέων κλωνοποίησης.
10. Τι εννοούμε με τον όρο μετασχηματισμός;
11. Πώς επιλέγονται και πως απομονώνονται τα κύτταρα (βακτήρια) που θα δεχτούν το ανασυνδυασμένο DNA (κύτταρα – ξενιστές); (βλέπε σελ.57, 59).
12. Τι είναι ο βακτηριακός κλώνος;
13. Πως επιλέγεται ένας βακτηριακός κλώνος που περιέχει επιθυμητό τμήμα (γονίδιο) DNA;
14. Που αναφέρεται ο όρος κλώνος και που ο όρος κλωνοποίηση; (βλέπε σελ. 57 , 59)

15. Τι είναι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες; Που παράγονται; Ποιος είναι ο φυσιολογικός τους ρόλος;
16. Πώς λειτουργεί η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI;
17. Μπορεί να λειτουργήσει η EcoRI σε ένα τμήμα DNA με την αλληλουχία 3' GAATTC 5';
18. Γιατί η παρουσία της αλληλουχίας 5' GAATTC 3' στο γενετικό υλικό των ζωντανών οργανισμών είναι σημαντική για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;
19. Ποιες ιδιότητες έχουν τα πλασμίδια που τα καθιστούν κατάλληλα ως φορείς κλωνοποίησης;
20. Να αναφέρετε τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της χρήσης των πλασμιδίων ως φορέων κλωνοποίησης.
21. Ποια είναι τα στάδια παραγωγής ανασυνδυασμένου μορίου DNA και κλωνοποίησης του; (βλέπε εικόνα 4.1).
22. Αν αναμίξουμε τμήματα ανθρώπινου DNA και πλασμίδια, όπου και τα δύο έχουν προέλθει από επεξεργασία με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση (την EcoRI), τι θα συμβεί αν στα μίγματα προσθέσουμε το ένζυμο DNA δεσμάση και γιατί;
23. Πώς μπορεί τεχνητά ένα πλασμίδιο να εισέλθει σε ένα βακτήριο; Ποιο είναι το ποσοστό εισόδου πλασμιδίων στα βακτήρια;
24. Τι είναι η βακτηριακή κλωνοποίηση;
25. Τι είναι η γονιδιωματική βιβλιοθήκη;
26. Ποιες κατηγορίες βακτηρίων δημιουργούνται μετά τον μετασχηματισμό τους από φορείς κλωνοποίησης-πλασμίδια;
27. Πώς επιλέγουμε ένα κλώνο που φέρει ένα επιθυμητό γονίδιο;
28. Να περιγράψετε την κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με την χρησιμοποίηση ως φορέα κλωνοποίησης το DNA του φάγου λ. (βλέπε εικόνα 4.4).
29. Πώς αποφασίζουμε, ποιόν συγκεκριμένο φορέα κλωνοποίησης θα χρησιμοποιήσουμε όταν μελετάμε το γενετικό υλικό ενός ευκαρυωτικού οργανισμού;
30. Τι εννοούμε με τον όρο κλωνοποίηση γονιδίου;
31. Αν θέλουμε να κλωνοποιήσουμε μόνο τα γονίδια που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα, ποια τεχνική θα χρησιμοποιήσουμε και γιατί ;
32. Τι είναι η c DNA βιβλιοθήκη;
33. Να περιγραφεί ο τρόπος κατασκευής μιας c DNA βιβλιοθήκης;
34. Ποια μόρια χαρακτηρίζονται υβριδικά μόρια DNA-RNA ; (βλέπε σελ. 32,60)
35. Να συγκρίνετε τον τρόπο κατασκευής μιας γονιδιωματικής και μιας c DNA βιβλιοθήκης .
36. Να αποδώσετε σχηματικά την κατασκευή μιας c DNA βιβλιοθήκης . (βλέπε εικόνα 4.5)
37. Πως απομονώνεται συνολικό DNA από προκαρυωτικά ή ευκαρυωτικά κύτταρα; (βλέπε σελ. 20).
38. Ποια διαδικασία ονομάζεται αποδιάταξη;

39. Τι είναι η υβριδοποίηση; Σε ποια ιδιότητα στηρίζεται; Ποια χρησιμότητα έχει;
40. Πώς μπορούμε να απομονώσουμε ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή τμήματα γονιδίων ή τμήματα DNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες από μια c DNA βιβλιοθήκη ή μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη;
41. Τι είναι οι ιχνηθετημένοι ανιχνευτές μορίων DNA ή RNA και πως χρησιμοποιούνται;
42. Γιατί κατασκευάζουμε βιβλιοθήκες (γονιδιωματικές ή c DNA);
43. Γιατί είναι σημαντική η δημιουργία πολλών αντιγράφων ενός γονιδίου μέσω μιας βιβλιοθήκης;
44. Με ποιους τρόπους μπορούμε πειραματικά in vivo ή in vitro να δημιουργήσουμε πολλά αντίγραφα ενός γονιδίου;
45. Τι είναι η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και πότε χρησιμοποιείται; (βλέπε εικόνα 4.6).