

Το γονίδιο της EcoRI μεθυλάσης

Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI είναι ένα ένζυμο που απομονώθηκε από το βακτήριο *E. coli* στο οποίο το ένζυμο αυτό λειτουργεί ως μηχανισμός αυτοάμυνας. Η προσπάθειά σας είναι να κλωνοποιήσετε το ένζυμο EcoRI-μεθυλάση το οποίο προκαλεί μεθυλίωση στις αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζει η EcoRI. Η μεθυλίωση αυτή προστατεύει το DNA της *E. coli* από τη δράση της EcoRI.

Ξεκινάτε με την απομόνωση του DNA του στελέχους *E. coli* RY13 για τη δημιουργία γονιδιωματικής DNA βιβλιοθήκης. Στη συνέχεια θα πρέπει να επεξεργαστείτε το DNA με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση ώστε να δημιουργηθούν μικρά τμήματα τα οποία θα ενσωματώσετε σε κατάλληλα πλασμίδια.

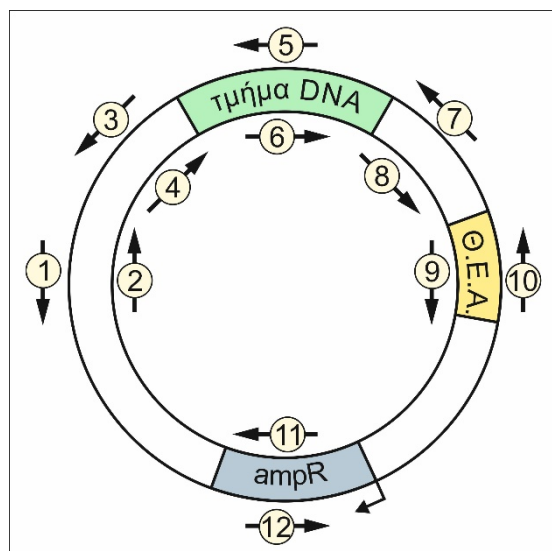
- Έχετε στη διάθεσή σας τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και BamHI. Ποια ενδονουκλεάση είναι η καταλληλότερη; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

- Στον παρακάτω πίνακα βρίσκονται οι μισές αλληλουχίες αναγνώρισης των δύο ενδονουκλεασών. Συμπληρώστε την αλληλουχία που λείπει για την ενδονουκλεάση που επιλέξατε στο προηγούμενο ερώτημα.

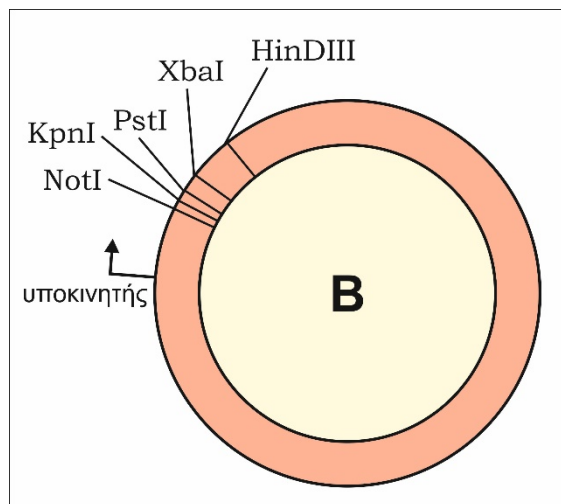
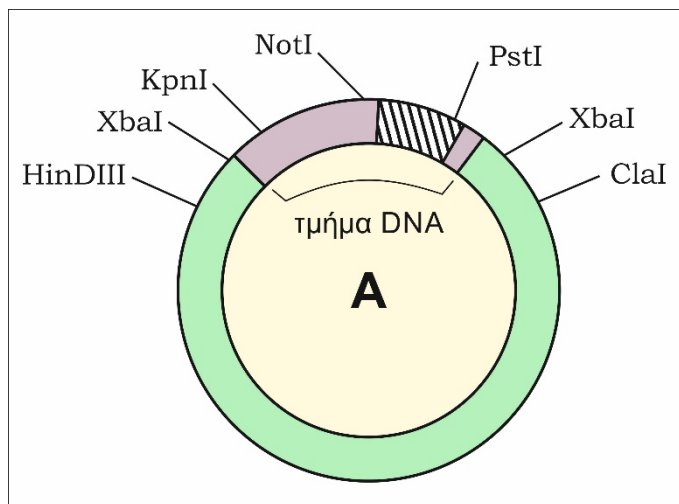
EcoRI	BamHI
5 ' G A A _ _ _ 3 '	5 ' G G A _ _ _ 3 '
3 ' C T T _ _ _ 5 '	3 ' C C T _ _ _ 5 '

- Στη συνέχεια θέλετε να πολλαπλασιάσετε τα τμήματα DNA της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με τη βοήθεια της PCR. Μπορείτε να έχετε στη διάθεσή σας ένα μόνο ζευγάρι πρωταρχικών τμημάτων για όλα τα πλασμίδια της βιβλιοθήκης. Επιλέξτε τα κατάλληλα πρωταρχικά τμήματα από το διάγραμμα του πλασμιδίου που ακολουθεί. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της σύνθεσης.

πρώτο πρωταρχικό τμήμα	
δεύτερο πρωταρχικό τμήμα	



Πρόκειται να εισάγετε το νέο DNA που προέκυψε από την PCR σε πλασμίδια τα οποία θα έχουν τη δυνατότητα να εκφράσουν το γονίδιο της EcoRI-μεθυλάσης σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Παρακάτω έχουμε δύο πλασμίδια, το πλασμίδιο A που φέρει το τμήμα DNA με το γονίδιο της EcoRI-μεθυλάσης και το πλασμίδιο B στο οποίο θα μεταφερθεί το γονίδιο.



4. Το πλασμίδιο A δεν έχει υποκινητή, έχει δώσει όμως αποικίες. Αυτό σημαίνει ότι το τμήμα DNA από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει και τη γενετική πληροφορία και τον υποκινητή για το γονίδιο της EcoRI-μεθυλάσης. Αν χρησιμοποιούσατε μια cDNA βιβλιοθήκη αντί της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, θα περιμένατε στο cDNA τμήμα του πλασμιδίου να υπάρχουν και η γενετική πληροφορία και ο υποκινητής; Εξηγήστε την απάντησή σας.

5. Το διαγραμμισμένο τμήμα στο πλασμίδιο A αντιστοιχεί στο τμήμα της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης που περιέχει το γονίδιο της EcoRI-μεθυλάσης. Ποιες από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που σημειώνονται στους χάρτες των πλασμιδίων A και B είναι κατάλληλες για τη μεταφορά του γονιδίου από το πλασμίδιο A στο πλασμίδιο B (επιλέξτε μία ή περισσότερες);