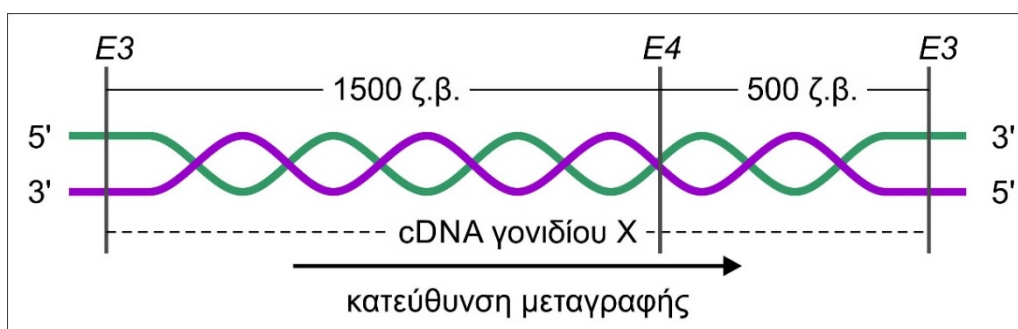


Γονίδιο X

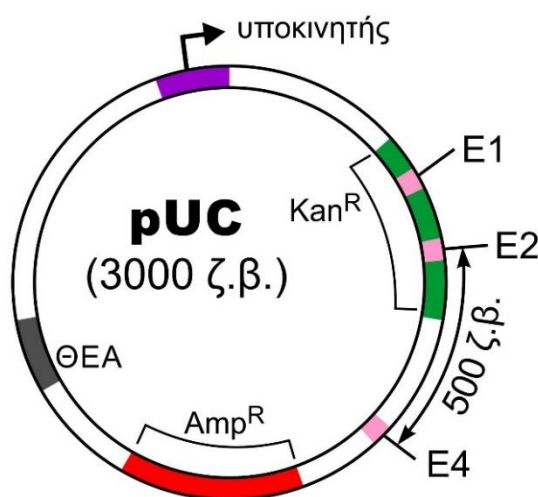
Στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, όπου εργάζεστε, έχετε χαρτογραφήσει το ασυνεχές γονίδιο X, το οποίο εκφράζεται στα κύτταρα του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου, παράγοντας ένα ένζυμο με σημαντικό βιολογικό ρόλο στη διαδικασία της πέψης. Στόχος σας είναι η παραγωγή του ενζύμου από βακτηριακά κύτταρα *E. coli* και η επακόλουθη απομόνωση και ο καθαρισμός του, προκειμένου να προσδιορίσετε την πρωτοταγή δομή του. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάζετε το cDNA του γονιδίου X, που φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:



Σημειώστε ότι το cDNA του γονιδίου X, μεγέθους 2000 ζευγών βάσεων, φέρει τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών E3 και E4.

Στη συνέχεια, κλωνοποιείτε το cDNA του γονιδίου X στο πλασμίδιο *pUC*, ο χάρτης του οποίου παρουσιάζεται στο διπλανό διάγραμμα.

Στο χάρτη του πλασμιδίου *pUC*, μεγέθους 3000 ζευγών βάσεων, εμφανίζονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών E1, E2 και E4, η Θέση Έναρξης της Αντιγραφής (ΘΕΑ) και τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (*Amp^R*) και καναμικίνη (*Kan^R*).



E1 5' T A A T T A 3'
3' A T T A A T 5'

E2 5' G A A T T C 3'
3' C T T A A G 5'

E3 5' C A A T T G 3'
3' G T T A A C 5'

E4 5' G C C T T C 3'
3' C G G A A G 5'

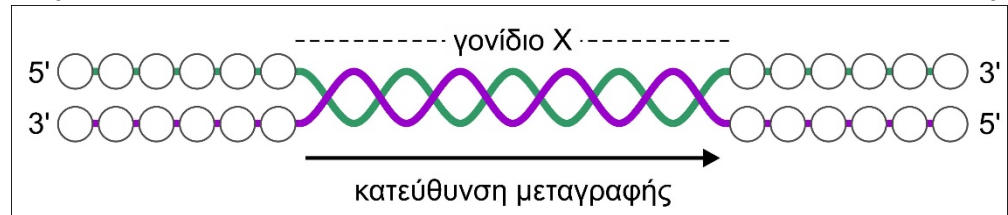
Στον πίνακα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες ανα-

γνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών E1, E2, E3 και E4, με τις κάθετες γραμμές να υποδεικνύουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που διασπώνται σε κάθε περίπτωση.

1. Με ποια περιοριστική ενδονουκλεάση θα προετοιμάσετε το cDNA του γονιδίου X;

2. Με ποιο/α ένζυμο/α θα κατεργαστείτε το πλασμίδιο *pUC*, προκειμένου να εισαχθεί σ' αυτό το cDNA του γονιδίου X; Εξηγήστε.

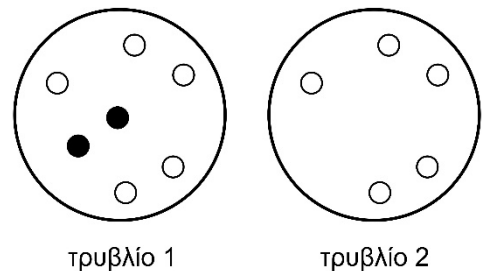
3. Στο σχήμα που ακολουθεί, να γράψετε την αλληλουχία των 6 ζευγών βάσεων (δεξιά και αριστερά) του τμήματος του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου που θα προκύψει από τη δράση της DNA δεσμάσης στα σημεία της ένωσης του πλασμιδίου με το cDNA του γονιδίου X.



Στη συνέχεια, μετασχηματίζετε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pUC*. Απλώνετε υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό υλικό για βακτήρια χωρίς αντιβιοτικά. Κατόπιν, μεταφέρετε κατάλληλα τα «αποτυπώματα» των αποικιών που σχηματίστηκαν στο αρχικό τρυβλίο, σε δύο άλλα τριβλία καλλιέργειας:

- στο τρυβλίο 1, που περιέχει θρεπτικό υλικό για βακτήρια και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, και
- στο τρυβλίο 2, που περιέχει θρεπτικό υλικό για βακτήρια και τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη.

Από τη διαδικασία αυτή παίρνετε τα αποτελέσματα της διπλής εικόνας.



4. Σε τι διαφέρουν οι δύο επιπλέον αποικίες του τρυβλίου 1 (μαύρο χρώμα) από τις υπόλοιπες αποικίες των τρυβλίων 1 και 2;

Απομονώνετε τα πλασμίδια από τις δύο επιπλέον αποικίες *E.coli*. Κόβετε και τα δύο πλασμίδια με την περιοριστική ενδονουκλεάση *E4* και παίρνετε τα θραύσματα του διπλανού πίνακα:

5. Ποια από τις δύο αποικίες (#1 ή #2) περιέχει πλασμίδια που μπορούν να εκφράσουν το cDNA του γονιδίου X; Εξηγήστε.

Πλασμίδια αποικίας	Μέγεθος θραυσμάτων (σε ζ. β.)
#1	3000, 2000
#2	4000, 1000