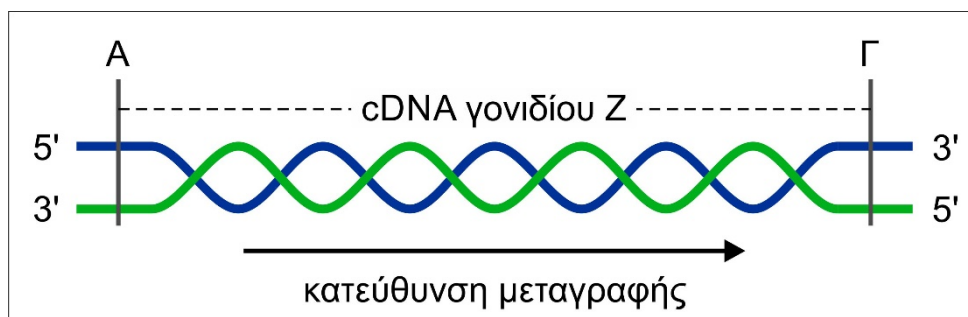


Γονίδιο Z

Στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, όπου εργάζεστε, έχετε χαρτογραφήσει το ασυνεχές γονίδιο Z, το οποίο εκφράζεται τόσο στα λεία μυϊκά κύτταρα όσο και στα κύτταρα του μυοκαρδίου στον άνθρωπο, παράγοντας μια πρωτεΐνη με σημαντικό βιολογικό ρόλο στη διαδικασία της μυϊκής σύσπασης. Στόχος σας είναι η παραγωγή αυτής της πρωτεΐνης από βακτηριακά κύτταρα *E.coli* και η επακόλουθη απομόνωση και ο καθαρισμός της, προκειμένου να προσδιορίσετε την πρωτοταγή δομή της. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάζετε το cDNA του γονιδίου Z, που φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:



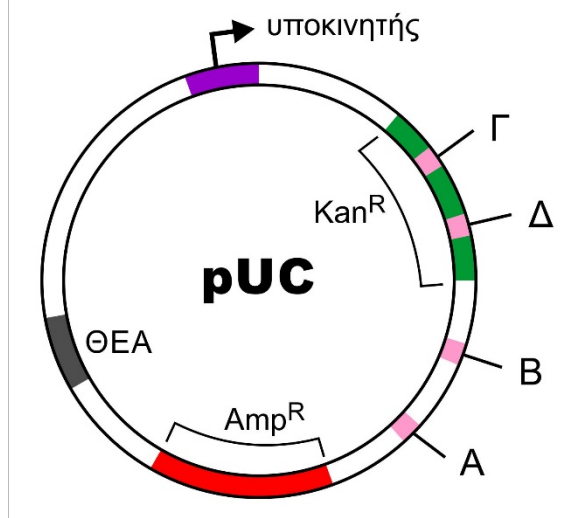
Σημειώστε ότι το cDNA του γονιδίου Z φέρει τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών A και Γ.

1. Ποιες αλληλουχίες του γονιδίου Z δεν περιλαμβάνονται στο cDNA του;

Στη συνέχεια, κλωνοποιείτε το cDNA του γονιδίου Z στο πλασμίδιο *pUC*, ο χάρτης του οποίου παρουσιάζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί:

Στο χάρτη του πλασμιδίου *pUC* εμφανίζονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών A, B, Γ και Δ, η Θέση Έναρξης της Αντιγραφής (ΘΕΑ) και τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (*Amp^R*) και καναμικίνη (*Kan^R*).

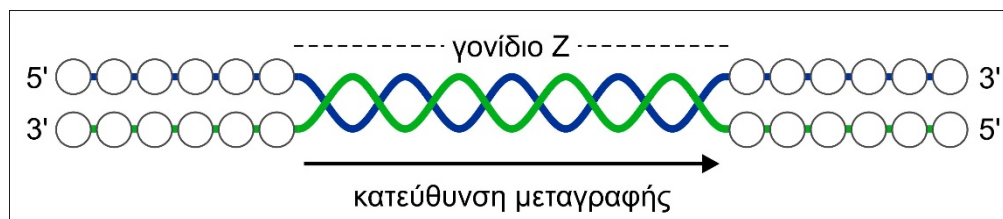
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών A, B, Γ και Δ, με τις κάθετες γραμμές να υποδεικνύουν το φωσφοδιεστερικό δεσμό που διασπάται σε κάθε περίπτωση:



2. Με ποιο/α ένζυμο/α θα προετοιμάσετε το cDNA του γονιδίου Z και το πλασμίδιο *pUC*, προκειμένου να εισαχθεί σ' αυτό με το σωστό προσανατολισμό το cDNA του γονιδίου Z και να εκφραστεί; Εξηγήστε γιατί.

A	5' G T C G A C 3'
	3' C A G C T G 5'
B	5' G A A T T C 3'
	3' C T T A A G 5'
Γ	5' C A A T T G 3'
	3' G T T A A C 5'
Δ	5' C T C G A G 3'
	3' G A G C T C 5'

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

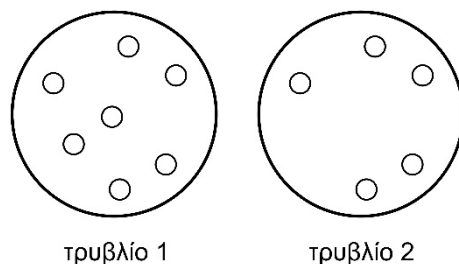


Στη συνέχεια, μετασχηματίζετε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pUC*. Απλώνετε υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό υλικό για βακτήρια χωρίς αντιβιοτικά. Κατόπιν, μεταφέρετε κατάλληλα τα «αποτυπώματα» των αποικιών που σχηματίστηκαν στο αρχικό τρυβλίο,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

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

Από τη διαδικασία αυτή παίρνετε τα αποτελέσματα της διπλής εικόνας.

(Θεωρούμε ότι αρκετά από τα ανοιχτά πλασμίδια θα ξαναγίνουν κυκλικά χωρίς να προσλάβουν ξένο γενετικό υλικό, παρόλο που έχουν υποστεί κατεργασία με δύο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες.)



5. Γιατί διαφέρει το πλήθος των αποικιών στα δύο δοχεία καλλιέργειας; Εξηγήστε.

6. Να σημειώσετε με βέλος πάνω στο κατάλληλο τρυβλίο καλλιέργειας (1 ή 2) τις αποικίες των βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pUC*.