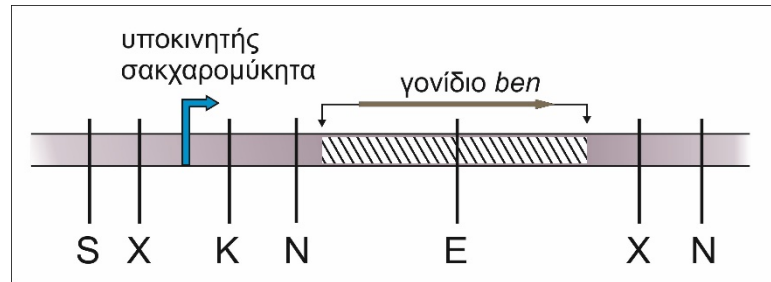


Κλωνοποίηση γονιδίου *ben*

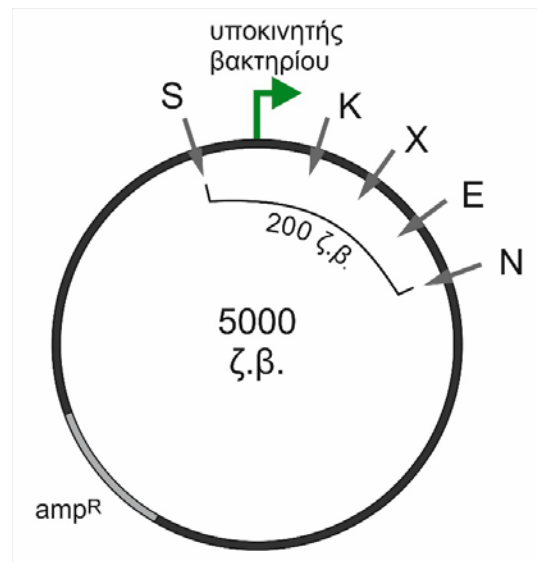
Στον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* υπάρχει ένα ιδιαίτερο γονίδιο (*ben*) το οποίο θα θέλατε να μεταφέρετε στην *E. coli* για την παραγωγή μίας πρωτεΐνης.

Στην εικόνα 1 απεικονίζεται ο χρωμοσωμικός χάρτης της περιοχής του γονιδίου *ben* καθώς και τα σημεία στα οποία επιδρούν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Xba*I (X), *Nde*I (N), *Sal*I (S), *Eco*RI (E), και *Kpn*I (K).



Εικόνα 1

Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται ο χάρτης του πλασμιδίου-φορέα. Το πλασμίδιο έχει μήκος 5000 ζ.β. και οι δύο πιο απομακρυσμένες θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών απέχουν μόλις 200 ζ.β.



Εικόνα 2

1. Ποιο από τα παραπάνω περιοριστικά ένζυμα είναι η καλύτερη επιλογή για την εισαγωγή του γονιδίου *ben* στο πλασμίδιο-φορέα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί **ένα και μόνο** ένζυμο; Στόχος είναι να έχει το γονίδιο *ben* τη δυνατότητα έκφρασης σε βακτηριακά κύτταρα. Αιτιολογήστε την απάντησή.

2. Αναμιγνύουμε τα απομονωμένα και πολλαπλασιασμένα γονίδια *ben* με τα πλασμίδια της εικόνας 1 για τη δημιουργία των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων τα οποία εισάγουμε σε βακτήρια. Με την επίδραση της αμπικιλίνης επιλέγουμε τα μετασχηματισμένα βακτήρια τα οποία παρουσιάζονται σε τρεις διαφορετικές αποικίες. Απομονώνουμε τα πλασμίδια κάθε αποικίας και επιδρούμε σε αυτά με την περιοριστική ενδονουκlease *Xba*I. Στον πίνακα 1 καταγράφονται τα τμήματα DNA που προέκυψαν μετά την επίδραση της *Xba*I στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

Πίνακας 1

	τμήματα DNA σε ζ.β.
αποικία 1	5000 + 1000
αποικία 2	5000
αποικία 3	5800 + 200

- α) Πώς εξηγείται το περιεχόμενο του πλασμιδίου της αποικίας 1;

- β) Πώς εξηγείται το περιεχόμενο του πλασμιδίου της αποικίας 2;

- γ) Πώς εξηγείται το περιεχόμενο του πλασμιδίου της αποικίας 3;

3. Ποιας αποικίας το πλασμίδιο είναι κατάλληλο για την παραγωγή της πρωτεΐνης στο βακτήριο;

4. Ποιες είναι οι δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες τις οποίες μπορείτε να χρησιμοποιήσετε για την εισαγωγή του γονιδίου *ben* στο πλασμίδιο-φορέα, αν έχετε τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσετε ταυτόχρονα δύο από τα ένζυμα αυτά;

5. Για ποιο λόγο χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων;