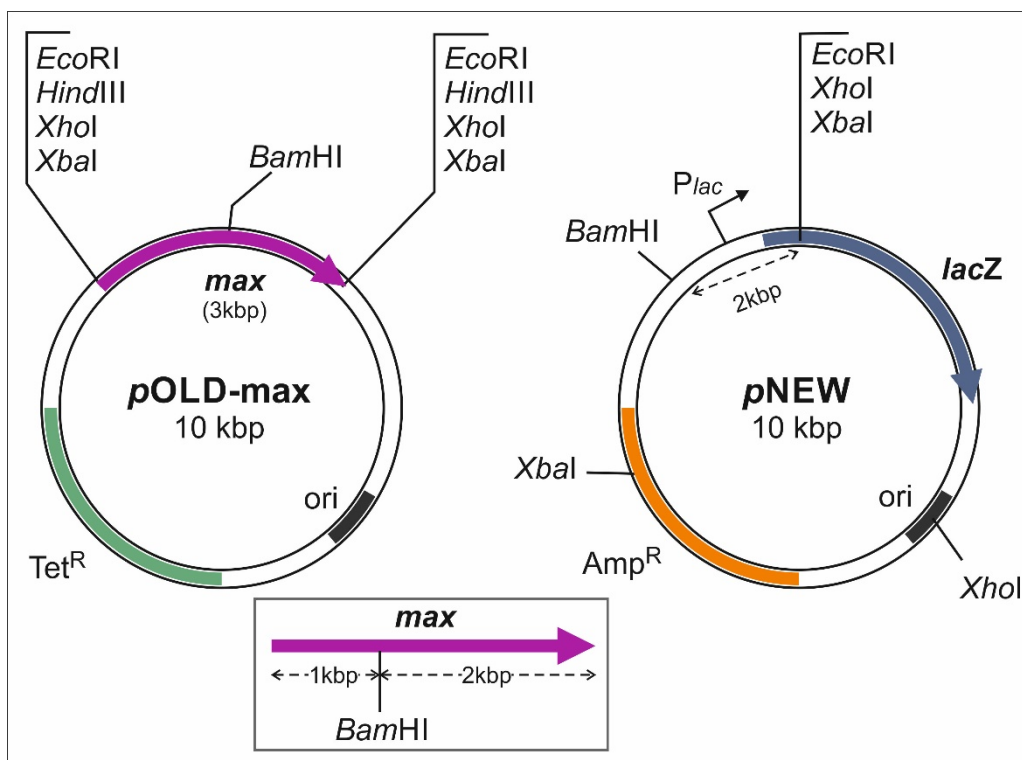


Κλωνοποίηση γονιδίου *max*

Θέλετε να κλωνοποιήσετε το γονίδιο *max*, μήκους 3kbp, από το πλασμίδιο *pOLD-max* στο πλασμίδιο *pNEW*. Το πλασμίδιο *pNEW* φέρει το γονίδιο *lacZ* το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση που διασπά το υπόστρωμα X-gal σε ένα προϊόν μπλε χρώματος. Όταν στο θρεπτικό μέσο υπάρχει X-gal, τα κύτταρα που δεν παράγουν β-γαλακτοζιδάση σχηματίζουν λευκές αποικίες ενώ τα κύτταρα που παράγουν β-γαλακτοζιδάση σχηματίζουν μπλε αποικίες.

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα διαγράμματα των δύο πλασμιδίων, η γραμμική μορφή του γονιδίου *max* και η θέση του υποκινητή *Plac* του γονιδίου *lacZ*.



1. Στον πίνακα των περιοριστικών ενδονουκλεασών που ακολουθεί, να σημειώσετε δίπλα σε κάθε ένζυμο με ΝΑΙ ή ΟΧΙ αν το ένζυμο μπορεί να φανεί χρήσιμο στην κλωνοποίηση του γονιδίου *max* από το πλασμίδιο *pOLD-max* στο πλασμίδιο *pNEW*. Σε κάθε περίπτωση να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

<i>EcoRI</i>	
<i>HindIII</i>	
<i>BamHI</i>	

<i>Xho</i> I	
<i>Xba</i> I	

Με κατάλληλες τεχνικές απομακρύνετε τις αποικίες των μετασχηματισμένων βακτηρίων που περιέχουν τις αλληλουχίες του πλασμιδίου *pOLD* και συνειδητοποιείτε ότι στις αποικίες που έμειναν, το γονίδιο *max* μπορεί να τοποθετήθηκε με οποιονδήποτε προσανατολισμό στο πλασμίδιο *pNEW* ή και καθόλου.

Επιλέγουμε 7 τυχαία μετασχηματισμένα βακτήρια, απομονώνουμε τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια τους και επιδρούμε σε αυτά με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Bam*HI.

Μετά τη δράση της *Bam*HI στα πλασμίδια παίρνουμε τα γραμμικά τμήματα DNA του διπλανού πίνακα.

Πλασμίδια επεξεργασμένα με <i>Bam</i> HI							
	1	2	3	4	5	6	7
DNA (kbp)	10	9	10	10	9	10	9
	0	4	3	3	4	0	4

2. Ποια από τα πλασμίδια του πίνακα ΔΕΝ περιέχουν ένθεμα;

3. Ποια από τα πλασμίδια του πίνακα περιέχουν ως ένθεμα το γονίδιο **max**;

4. Ποια από τα πλασμίδια του πίνακα έχουν το γονίδιο *max* με τέτοιο προσανατολισμό ώστε να μπορεί να εκφραστεί από τον υποκινητή *P_{lac}*; Να αιτιολογήσετε την απάντηση.

5. Πώς θα μπορούσατε να ξεχωρίσετε τις αποικίες που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια με το γονίδιο *max* από τις αποικίες που περιέχουν μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια;