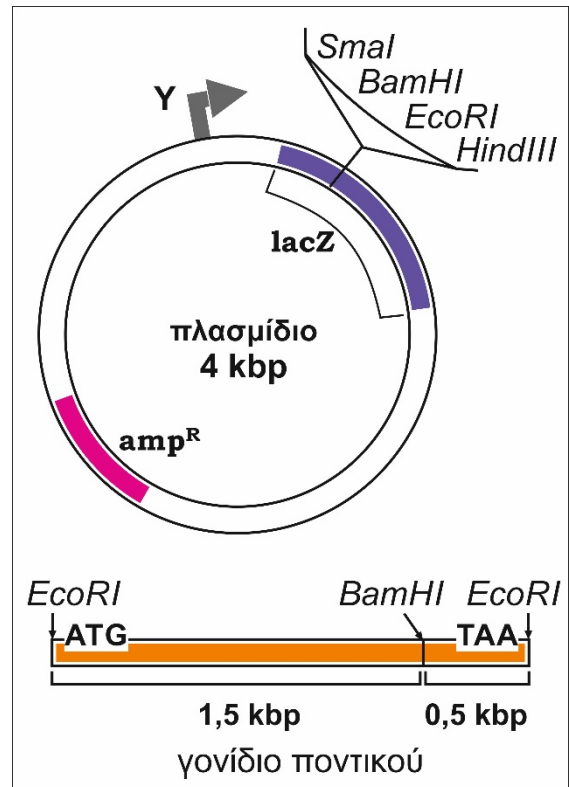


κλωνοποίηση γονιδίου *mrg*

Σχετικά με την κλωνοποίηση γονιδίων, έχετε στη διάθεσή σας αντίγραφο κατάλληλου πλασμιδίου ως φορέα κλωνοποίησης με τις αλληλουχίες αναγνώρισης των ενδονουκλεασών *SmaI*, *BamHI*, *EcoRI* και *HindIII*, όλες στην ίδια περιοχή του πλασμιδίου και πολύ κοντά μεταξύ τους. Το πλασμίδιο είναι εφοδιασμένο και με ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, ένα γονίδιο (*lacZ*) που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοζιδάση και τον υποκινητή *Y*. Από τη cDNA βιβλιοθήκη του ποντικού έχετε απομονώσει το υποθετικό γονίδιο ***mrg*** που πρόκειται να κλωνοποιηθεί στα πλασμίδια τα οποία στη συνέχεια θα μετασχηματίσουν βακτήρια *E. coli*.



1. Ποια από τις ενδονουκλεάσες είναι κατάλληλη για την ενσωμάτωση του γονιδίου ***mrg*** στο πλασμίδιο.

2. Γιατί είναι απαραίτητο να πολλαπλασιαστεί το γονίδιο ***mrg*** με τη μέθοδο PCR πριν την κλωνοποίηση;

3. Μετά τον μετασχηματισμό των *E. coli* απομονώνετε πλασμίδια από μερικούς κλώνους *E. coli* εφαρμόζετε μια διαγνωστική δοκιμασία. Με ποια περιοριστική ενδονουκλεάση πρέπει να επιδράσετε για να πάρετε πληροφορίες ως προς την επιτυχία του ανασυνδυασμού των πλασμιδίων και τον προσανατολισμό των ενθεμάτων;

4. Πόσα τμήματα DNA θα προκύψουν μετά την επίδραση με το ένζυμο που επιλέξατε στο προηγούμενο ερώτημα και τι μέγεθος, σε kbp, θα έχει το καθένα;

5. Το υπόστρωμα της καλλιέργειας των μετασχηματισμένων *E. coli* περιέχει τον πολυσακχαρίτη X-gal ο οποίος χρωματίζεται μπλε με την επίδραση του γονιδιακού προϊόντος β-γαλακτοζιδάση που παράγει το γονίδιο lacZ. Γιατί δεν μπορούν όλες οι καλλιέργειες βακτηρίων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια να χρωματίζουν το υπόστρωμά τους μπλε;