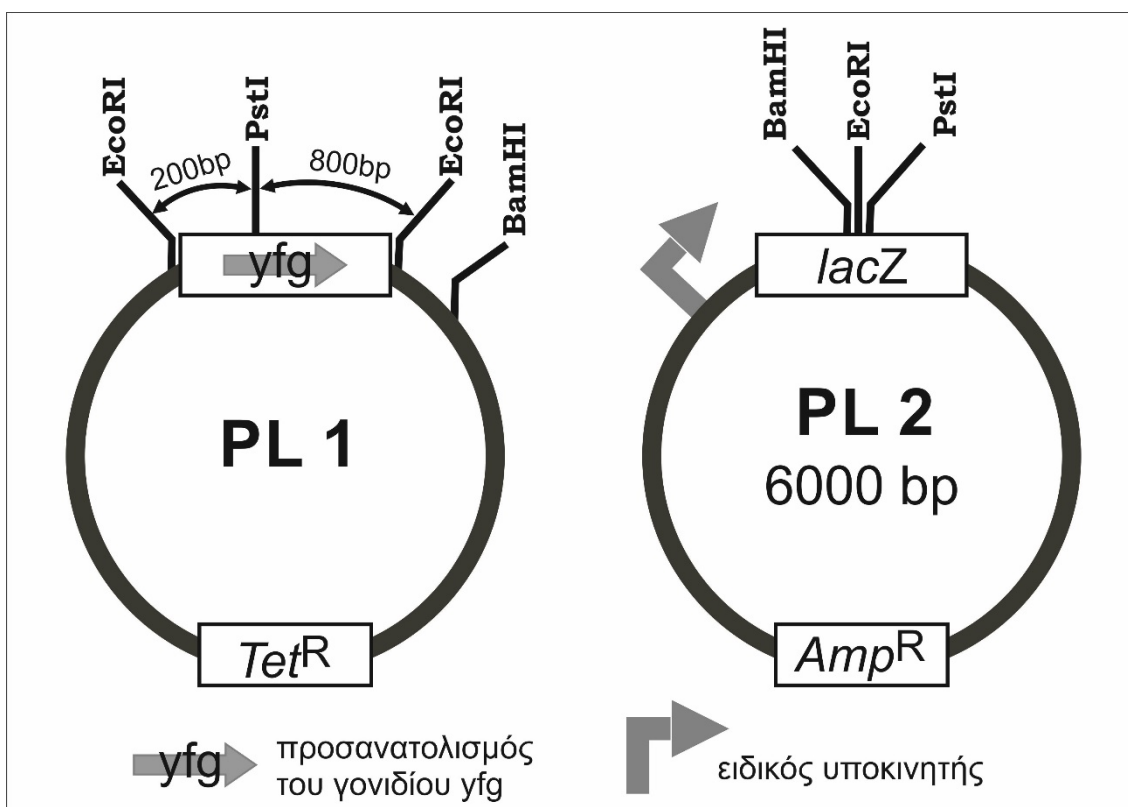


Το γονίδιο yfg

Αποφασίζετε να μεταφέρετε το γονίδιο **yfg** από το πλασμίδιο PL1 στο πλασμίδιο PL2 μήκους 6000 bp στο οποίο υπάρχει ο ειδικός υποκινητής για την έκφραση του γονιδίου εφαρμόζοντας την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA. Προκειμένου να εκφραστεί το γονίδιο yfg θα πρέπει να τοποθετηθεί κατάλληλα στο πλασμίδιο (τα βέλη του γονιδίου και του ειδικού υποκινητή θα πρέπει να δείχνουν την ίδια κατεύθυνση). Το πλασμίδιο PL2 διαθέτει ήδη θέσεις αναγνώρισης τριών περιοριστικών ενδονουκλεασών με μονόκλωνα άκρα οι οποίες απέχουν πολύ λίγο μεταξύ τους και βρίσκονται μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου lacZ.



Στα άκρα του γονιδίου yfg στο πλασμίδιο PL1 βρίσκονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης **EcoRI** και μέσα στο γονίδιο yfg βρίσκεται η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης **PstI**. Όταν στο πλασμίδιο PL2 επιδρούν οι ενδονουκλεάσες **EcoRI** και **PstI** τότε το γονίδιο yfg κόβεται σε δύο τμήματα, ένα των 200 και ένα των 800 ζευγών βάσεων.

1. Ποιο ή ποια από τα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά του γονιδίου yfg από το πλασμίδιο PL1 στο πλασμίδιο PL2; Εξηγήστε την απάντησή σας.

2. Εφαρμόζοντας τη διαδικασία που έχετε επιλέξει για τη μεταφορά του γονιδίου, το γονίδιο θα τοποθετηθεί στο πλασμίδιο PL2 με τον ίδιο προσανατολισμό όπως ο υποκινητής του πάντα, μερικές φορές ή ποτέ; Εξηγήστε την απάντησή σας.

3. Ποια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιώσει οριστικά ότι το γονίδιο yfg έχει εισαχθεί με τον σωστό προσανατολισμό στο πλασμίδιο PL2. Εξηγήστε τα αποτελέσματα που περιμένετε να πάρετε αν το γονίδιο yfg έχει εισαχθεί με τον σωστό ή με τον εσφαλμένο τρόπο.