

Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

Στον ζυμομύκητα υπάρχει ένα γονίδιο (***fruR***) το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη **FruR** που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και λειτουργεί ως υποδοχέας της φρουκτόζης. Για τη μελέτη του γονιδίου αυτού επιχειρούμε να δημιουργήσουμε ένα στέλεχος ζυμομύκητα στο οποίο θα κλωνοποιήσουμε το γονίδιο ***fruR*** και θα το συντήσουμε με το γονίδιο ***gfp*** που κωδικοποιεί μία πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (**GFP**).

Το πρώτο μας βήμα είναι η κατασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης από τον ζυμομύκητα ο οποίος μπορεί να αναπτυχθεί σε θρεπτικό υλικό που περιέχει φρουκτόζη. Για την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης χρησιμοποιούμε το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση για να κατασκευάσουμε ένα αντίγραφο DNA από κάθε mRNA μόριο του ζυμομύκητα της καλλιέργειας που έχουμε αναπτύξει. Η αντίστροφη μεταγραφάση, όπως όλες οι DNA πολυμεράσες, χρειάζονται ένα μικρό πρωταρχικό τμήμα για να ξεκινήσουν την επιμήκυνση της αλυσίδας.

1. Στο παρακάτω μόριο του ώριμου mRNA ...

mRNA	5' - GCGAUCAAUUC...AAAAAAAAAAAAA - 3'
------	---------------------------------------

...το πρωταρχικό τμήμα που πρέπει να συνδέσουμε για να δράσει το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση είναι:

- A. 5' - GCGATC - 3'
B. 3' - CGCTAG - 5'
Γ. 5' - UUUUUU - 3'
Δ. 3' - TTTTTT - 5'
2. Εξετάζουμε την έκφραση του γονιδίου σε βακτηριακά κύτταρα. Γιατί πρέπει να κατασκευάσουμε μία cDNA βιβλιοθήκη αντί της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης;

Ο επόμενος στόχος μας είναι να δημιουργήσουμε μία χιμαιρική πρωτεΐνη στην οποία το αμινοτικό άκρο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) θα έχει αντικατασταθεί από τον υποδοχέα φρουκτόζης (FruR). Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη απομονώ-

θηκε από μέδουσες οι οποίες φθορίζουν πράσινα όταν δέχονται μπλε φως. Έχει αποδειχθεί ότι ορισμένες πρωτεΐνες δεν απαιτούν το καρβοξυλικό άκρο ή το αμινικό άκρο τους για να λειτουργήσουν. Στην περίπτωση αυτή, το πρώτο μισό της χιμαιρικής πρωτεΐνης (NH₂ άκρο) θα είναι μία πλήρως λειτουργική FruR πρωτεΐνη και το δεύτερο μισό (COOH άκρο) θα είναι μία πλήρως λειτουργική GFP πρωτεΐνη.

Στον παρακάτω πίνακα αποτυπώνονται οι αλληλουχίες του τέλους του γονιδίου *fruR* και της αρχής του γονιδίου *gfp*. Το τελευταίο αμινοξύ για την πρωτεΐνη FruR είναι η λευκίνη που κωδικοποιείται από το κωδικόνιο CTT (υπογραμμισμένο) και το πρώτο αμινοξύ για την πρωτεΐνη GFP είναι η μεθειονίνη που κωδικοποιείται από το κωδικόνιο ATG (υπογραμμισμένο).

το τέλος του <i>fruR</i>	5' . . . <u>C T T</u> A A G G C C T A G G T A C C . . . 3' 3' . . . G A A T T C C G G A T C C A T G G . . . 5'
η αρχή του <i>gfp</i>	5' . . . A G G C C T T A A G C C T A G G C T A G C A <u>A T G</u> G T A C C . . . 3' 3' . . . T C C G G A A T T C G G A T C C G A T C G T T A C C A T G G . . . 5'

3. Ποια ή ποιες από τις παρακάτω περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να συνδεθεί το τέλος του γονιδίου *fruR* με την αρχή του γονιδίου *gfp*, έτσι ώστε να προκύψει ένα χιμαιρικό γονίδιο το οποίο θα είναι σε θέση να εκφράσει την υβριδική πρωτεΐνη; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

<i>Afl</i> II	<i>Avr</i> II	<i>Stu</i> I	<i>Kpn</i> I
5' C T T A A G 3' 3' G A A T T C 5'	5' C C T A G G 3' 3' G G A T C C 5'	5' A G G C C T 3' 3' T C C G G A 5'	5' G G T A C C 3' 3' C C A T G G 5'