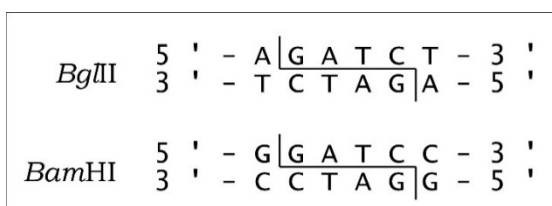


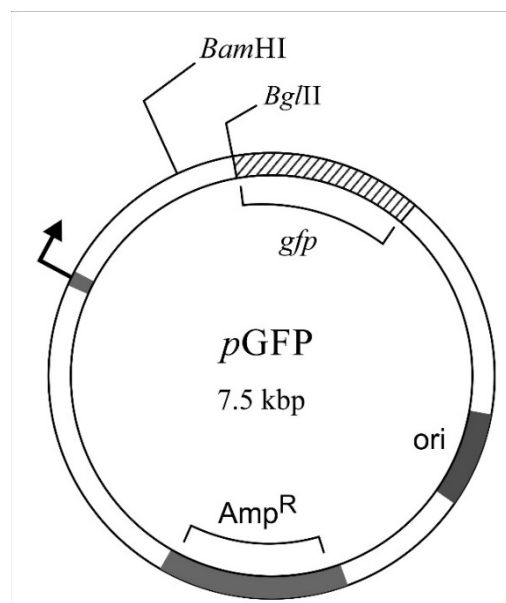
Πρωτεΐνη σύντηξης (χιμαιρική)

Στο μικροβιολογικό εργαστήριο πραγματοποιείται έρευνα για τον εντοπισμό του ενζυμικού προϊόντος του γονιδίου **bio701** μέσα στο κύτταρο. Η τεχνική περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης η οποία αποτελείται από το ενζυμικό προϊόν του γονιδίου **bio701** και μία πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, την GFP. Η χιμαιρική πρωτεΐνη που προκύπτει φθορίζει πράσινα όταν διεγείρεται στο κατάλληλο μήκος κύματος. Για τη δημιουργία της χιμαιρικής πρωτεΐνης θα πρέπει να συνδεθούν κατάλληλα τα γονίδια **bio701** και **gfp** μεταξύ τους. Υπάρχουν κατάλληλοι φορείς, όπως το πλασμίδιο της εικόνας 1, που απλοποιούν τη διαδικασία επιτρέποντας την τοποθέτηση του γονιδίου **bio701** στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το γονίδιο **gfp**,

Οι θέσεις αναγνώρισης των δύο περιοριστικών ενδονουκλεασών παρουσιάζονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2



Εικόνα 1

Γνωρίζουμε ότι στο πλασμίδιο **pGFP**, η θέση αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης *Bgl*III βρίσκεται μέσα στο πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου **gfp**, έτσι ώστε η αλληλουχία AGA κωδικοποιεί το αμινοξύ αργινίνη και η αλληλουχία TCT κωδικοποιεί το αμινοξύ σερίνη (εικόνα 2).

Η κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου **bio701** έχει μήκος 1500 ζεύγη βάσεων. Τα τρία πρώτα νουκλεοτίδια ATG αντιστοιχούν στο κωδικόνιο έναρξης και τα τρία τελευταία νουκλεοτίδια TGA αντιστοιχούν στο κωδικόνιο λήξης του γονιδίου **bio701**.

5' ATGACCATGGGCGACAAGAAGAGCCCGACCAGGCC...
 (περίπου 1.4kb ενδιάμεσες βάσεις)
 ...GGGCGACATGTCAGCAGTCAATGATGAATCTTTGA 3'

Δεδομένου ότι ο στόχος είναι η δημιουργία μιας πρωτεΐνης σύντηξης στην οποία το N άκρο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, έχει αντικατασταθεί από την πρωτεΐνη Bio701, θα πρέπει να κατασκευαστεί μία αλληλουχία DNA που συνδυάζει την αλληλουχία νουκλεοτιδίων του γονιδίου **bio701** με την αλληλουχία νουκλεοτιδίων του γονιδίου **gfp** σε ένα κοινό πλαίσιο ανάγνωσης.

Στη συνέχεια πρέπει να σχεδιάσετε εκκινητές (πρωταρχικά τμήματα) μήκους 20 νουλεοτιδίων το καθένα για να πολλαπλασιάσετε το γονίδιο *bio701* από το γονιδίωμα του ζυμομύκητα. Αποφασίζετε να δημιουργήσετε στα άκρα αυτών των εκκινητών ειδικές θέσεις αναγνώρισης οι οποίες θα σας επιτρέψουν να κόψετε τα αντίγραφα του γονιδίου *bio701* με τις ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Bgl*II και να εισάγετε τα τμήματα ανάμεσα στις θέσεις *Bam*HI και *Bgl*II στο πλασμίδιο *pGFP*. Έχετε ελέγξει ότι δεν υπάρχουν *Bam*HI και *Bgl*II θέσεις μέσα στο γονίδιο *bio701*.

Πρώτα σχεδιάστε έναν εκκινητή για να πολλαπλασιάσετε με PCR το γονίδιο *bio701* προς τη μία κατεύθυνση με την αλληλουχία αναγνώρισης της *Bam*HI προσαρμοσμένη στο 5' άκρο του, έτσι ώστε να είναι δυνατή η εισαγωγή του στο πλασμίδιο *pGFP*. Ο εκκινητής σας θα πρέπει να είναι:

πρόσθιος εκκινητής:

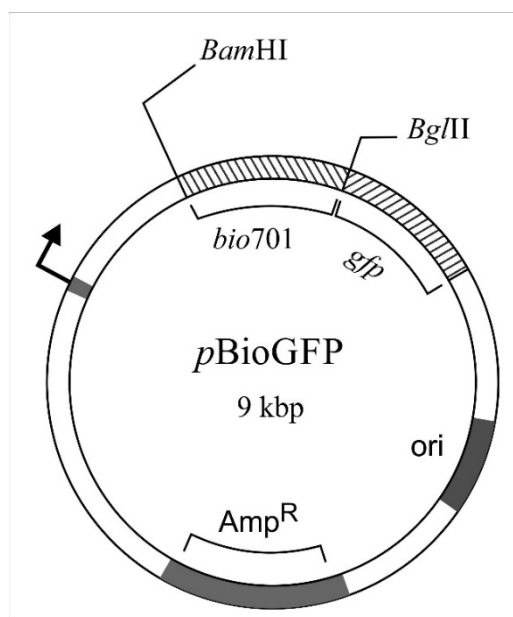
Σχεδιάστε τώρα έναν εκκινητή για να πολλαπλασιάσετε το γονίδιο *bio701* προς την αντίθετη κατεύθυνση με την αλληλουχία αναγνώρισης της *Bgl*II, έτσι ώστε να συνδέσετε το γονίδιο στη θέση αναγνώρισης της *Bgl*II του γονιδίου *gfp*.

αντίστροφος εκκινητής:

Το πλασμίδιο που θα δημιουργήσετε πρέπει να είναι αυτό της εικόνας 3.

Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηρίων και την επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών με την επίδραση της αμπικιλίνης, απομονώνετε πλασμίδια από 4 τυχαίες βακτηριακές αποικίες. Μετά την επεξεργασία των πλασμιδίων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Bgl*II πήρατε τα παρακάτω αποτελέσματα:

	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	<i>Bam</i> HI + <i>Bgl</i> II
κλώνος 1	7,5 kb	7,5 kb	7,5 kb
κλώνος 2	9,0 kb	9,0 kb	9,0 kb
κλώνος3	9,0 kb	9,0 kb	7,5 kb, 1,5 kb
κλώνος4	10,5 kb	10,5 kb	7,5 kb, 3,0 kb



Εικόνα 3

Υπάρχει κάποιος κλώνος στον πίνακα ο οποίος έχει τα γονίδια για τη σύνθεση της χιμαιρικής πρωτεΐνης;