ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Ομάδας Προσανατολισμού Θετικών Σπουδών & Σπουδών Υγείας

Τεύχος Β΄

Γ΄ τάξης Γενικού Λυκείου

Τόμος 3ος

l_c_biologia_thk_bm_179-206_28b.indd 1 31/3/2022 10:23:02 πμ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΡΧΙΚΗΣ ΕΚΔΟΣΗΣ

ΟΜΑΔΑ ΣΥΓΓΡΑΦΗΣ

Δρ Βασιλική Αλεπόρου-Μαρίνου, Βιολόγος, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών. Δρ Αλέξανδρος Αργυροκαστρίτης, Βιολόγος, εκτ. Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Δρ Αικατερίνη Κομητοπούλου, Βιολόγος, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών. Δρ Περικλής Πιαλόγλου, Βιολόγος, Πειραματικό Γυμνάσιο Αγίων Αναργύρων. Βασιλική Σγουρίτσα, Βιολόγος, Λύκειο Αγίας Τριάδας Αργολίδας.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΓΙΑ ΤΟ ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ

Δρ Βασιλική Περάκη, Βιολόγος, Σύμβουλος Π.Ι.

ΟΜΑΔΑ ΚΡΙΣΗΣ

Δρ Βασίλειος Γαλανόπουλος, Βιολόγος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Δρ Αντώνης Καστορίνης, Βιολόγος, Διευθυντής, 1ο Γυμνάσιο Κηφισιάς. Αναστασία Καμπούρη, Βιολόγος, Γυμνάσιο Νέας Χαλκηδόνας.

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ ΕΞΩΦΥΛΛΟΥ

Αλυσίδες DNA (TSI, ΑΠΕΙΡΟΝ ΕΠΕ)

ΣΧΕΔΙΑ ΠΡΩΤΟΣΕΛΙΔΩΝ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ 2 (σελ. 29), 4 (σελ. 59) και ΕΝΘΕΤΟΥ (σελ. 179).

Λία Γαλάνη

ΠΗΓΕΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ

ΑΠΕΙΡΟΝ ΕΠΕ Diplococcus pneumoniae σελ. 15, Ιός της γρίπης σελ. 49, Καθαρισμός μονοκλωνικών αντισωμάτων σελ.119, Διαγονιδιακές αγελάδες σελ. 135 και Καθαρισμός παραλίας από πετρελαιοκηλίδα από το ναυάγιο του Exxon Valdez σελ. 157.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΜΑΙΕΥΤΗΡΙΟ ΜΗΤΕΡΑ.

Καρυότυπος ατόμου που πάσχει από σύνδρομο Klinefelter σελ. 100 και καρυότυπος ατόμου που πά-

σχει από σύνδρομο Turner σελ. 100.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΡΧΙΚΗΣ ΕΚΔΟΣΗΣ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΑΝΕΚΔΟΣΗΣ

Η επανέκδοση του παρόντος βιβλίου πραγματοποιήθηκε από το Ινστιτούτο Τεχνολογίας Υπολογιστών & Εκδόσεων «Διόφαντος» μέσω ψηφιακής μακέτας, η οποία δημιουργήθηκε με χρηματοδότηση από το ΕΣΠΑ / ΕΠ «Εκπαίδευση & Διά Βίου Μάθηση» / Πράξη «ΣΤΗΡΙΖΩ».



Οι αλλαγές που ενσωματώθηκαν στην παρούσα επανέκδοση έγιναν με βάση τις διορθώσεις του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου.

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ,
ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΤΙΚΗΣ

Η συγγραφή και η επιστημονική επιμέλεια του βιβλίου πραγματοποιήθηκε υπό την αιγίδα του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Ομάδας Προσανατολισμού
Θετικών Σπουδών
& Σπουδών Υγείας
Τεύχος Β΄

Γ΄ τάξης Γενικού Λυκείου

Τόμος 3ος

Ι.Τ.Υ.Ε. «ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ»

I_c_biologia_thk_bm_179-206_28b.indd 7 31/3/2022 10:23:20 πμ

ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΒΙΒΛΙΟΥ ΓΙΑ ΜΑΘΗΤΕΣ ΜΕ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΟΡΑΣΗ

Ομάδα εργασίας για το Ινστιτούτου Εκπαιδευτικής Πολιτικής

Προσαρμογή: Σμαΐλη Δέσποινα, Εκπαιδευτικός

Επιμέλεια: Γιουμούκη Μαρία, Εκπαιδευτικός

Επιστημονικός υπεύθυνος: Βασίλης Κουρμπέτης, Σύμβουλος Α΄ του ΥΠ.Π.Ε.Θ

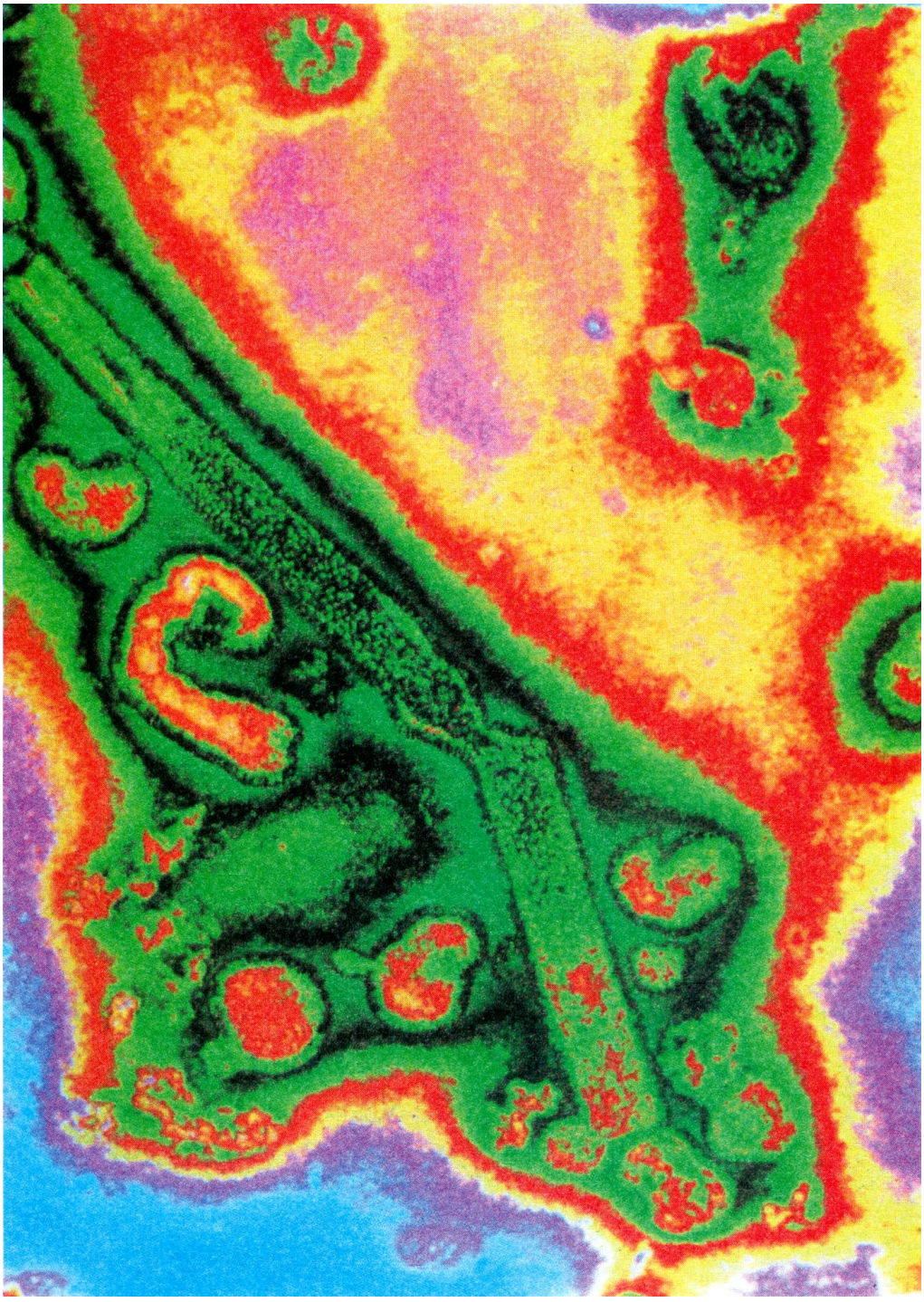
Υπεύθυνη του έργου: Μαρία Γελαστοπούλου, M.Ed. Ειδικής Αγωγής

Τεχνική υποστήριξη:Κωνσταντίνος Γκυρτής, Δρ. Πληροφορικής

Συγγραφείς Προδιαγραφών προσαρμογής των βιβλίων για το Ινστιτούτο Εκπαιδευτικής Πολιτικής:
Γιώργος Βουγιουκλίδης, Δάσκαλος Ειδικής Αγωγής
Γελαστοπούλου Μαρία, Εκπαιδευτικός Ειδικής Αγωγής
Γκυρτής Κωνσταντίνος, Καθηγητής Πληροφορικής

Αξιολόγηση και τελικός έλεγχος των προσαρμογών:
Γελαστοπούλου Μαρία, Εκπαιδευτικός Ειδικής Αγωγής
Γκυρτής Κωνσταντίνος, Καθηγητής Πληροφορικής

Ιοί



Κεφά-λαιο 3

Ιός της γρίπης

3.Ιοί

Οι ιοί και τα βακτήρια είναι οι απλούστερες μορφές ζωής. Έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη διερεύνηση των θεμελιωδών μηχανισμών της ζωής και έχουν βοηθήσει πολύ στην κατανόηση της λειτουργίας των πολύπλοκων οργανισμών σε μοριακό επίπεδο. Επίσης η μελέτη τους παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη μεθόδων για τη θεραπεία των ασθενειών τις οποίες προκαλούν. Παράλληλα, έχουν χρησιμοποιηθεί ως «ζωντανά» εργαλεία για την ανάπτυξη των νέων τεχνολογιών, που δίνουν στους ερευνητές τη δυνατότητα του χειρισμού και της μεταφοράς του γενετικού υλικού, και έχουν συνεισφέρει σημαντικά τόσο στη βασική έρευνα όσο και στις εφαρμογές της.

Οι ιοί ανακαλύφθηκαν το 1883 από τον Mayer, αλλά θεωρήθηκαν ότι είναι οι μυστηριώδεις παράγοντες που προκαλούν την ασθένεια «μωσαϊκή του καπνού». Η ασθένεια αυτή ονομάστηκε έτσι επειδή τα φύλλα του καπνού, που έχουν προσβληθεί από τον ιό, είναι γεμάτα κηλίδες. Αρχικά, οι ιοί χαρακτηρίστηκαν ως πολύ μικρά μολυσματικά βακτήρια, που δεν είναι ορατά στο μικροσκόπιο. Δέκα χρόνια αργότερα ο Ρώσος φυσιοδίφης Ivanowski διαπίστωσε ότι οι παθογόνοι αυτοί παράγοντες περνούσαν από πολύ λεπτούς ηθμούς, που μπορούσαν να συγκρατούν όλα τα βακτήρια. Διαπιστώθηκε επίσης ότι είναι ικανοί να πολλαπλασιάζονται μόνο μέσα σε ζωντανά κύτταρα και όχι σε θρεπτικά υλικά, όπως συμβαίνει με τα βακτήρια.

Τελικά, το 1935, ο ιός της μωσαϊκής του καπνού απομονώθηκε και μελετήθηκε από το Stanley. Τότε διαπιστώθηκε ότι είναι ένα αναπαραγόμενο σωματίδιο, πολύ απλούστερο από τα βακτήρια, και ότι αποτελείται από RNA και πρωτεΐνες.

Σε αντίθεση με το κύτταρο, που είναι η θεμελιώδης μονάδα της ζωής, ο ιός δεν είναι τίποτε περισσότερο από νουκλεϊκό οξύ και πρωτεΐνες. Μόνο όταν βρεθεί μέσα σε ένα κύτταρο-ξενιστή, ο ιός «ξυπνά» και εκφράζει τη χαρακτηριστικότερη ιδιότητα των ζωντανών οργανισμών, δηλαδή την αναπαραγωγή. Οι ιοί έχουν τις εξής ιδιότητες:

• Είναι ενδοκυτταρικά παράσιτα και χρειάζονται υποχρεωτικά ένα κύτταρο - ξενιστή, για να πραγματοποιήσουν όλες τις βιολογικές λει-

τουργίες τους που είναι απαραί-
τητες για την αναπαραγωγή τους.

- Είναι μικρότεροι και από τα πιο μικρά βακτήρια και είναι ορατοί μόνο με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.
- Έχουν ένα μόνο τύπο νουκλεϊκών οξέων, είτε DNA είτε RNA, αλλά ποτέ και τα δύο. Το νουκλεϊκό οξύ του ιού «υποχρεώνει» το κύτταρο-ξενιστή να το αναπαράγει με ακρίβεια, όπως ακριβώς κάνει και με το δικό του γονιδίωμα.
- Δεν ανιχνεύονται αμέσως μετά την είσοδό τους στο κύτταρο-ξενιστή, επειδή μεσολαβεί κάποιο χρονικό διάστημα κατά το οποίο αντιγράφεται το γενετικό τους υλικό και παράγονται οι πρωτεΐνες τους. Η φάση αυτή τελειώνει όταν συγκροτηθούν οι νέοι ιοί.

Δομή των ιών

Οι ιοί είναι μολυσματικά σωματίδια, που αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα μέσα στο οποίο υπάρχει νουκλεϊκό οξύ, που αποτελεί το γενετικό υλικό τους. Το γενετικό υλικό τους είναι DNA ή RNA, μονόκλωνο ή δίκλωνο ανάλογα με το είδος του ιού. Το πρωτεϊνικό περίβλημα είναι ένα καψίδιο ποικίλου σχήματος (ελικοειδές - ραβδοειδές, πολυεδρικό ή συνδυασμός και των δύο) και αποτελείται από πολλά μόρια της ίδιας πρωτεΐνης (υπομονάδες). Μερικοί ζωικοί ιοί έχουν έξω από το καψίδιο ένα μεμβρανώδη φάκελο, που αποτελείται από υλικό τόσο του κυττάρου ξενιστή όσο και του ιού (Εικόνα 3.1). Οι ιοί, ανάλογα με το είδος του ξενιστή, ταξινομούνται στους ιούς των βακτηρίων που

ονομάζονται **βακτηριοφάγοι** ή **φάγοι, στους ιούς των ζώων** και στους **ιούς των φυτών.**

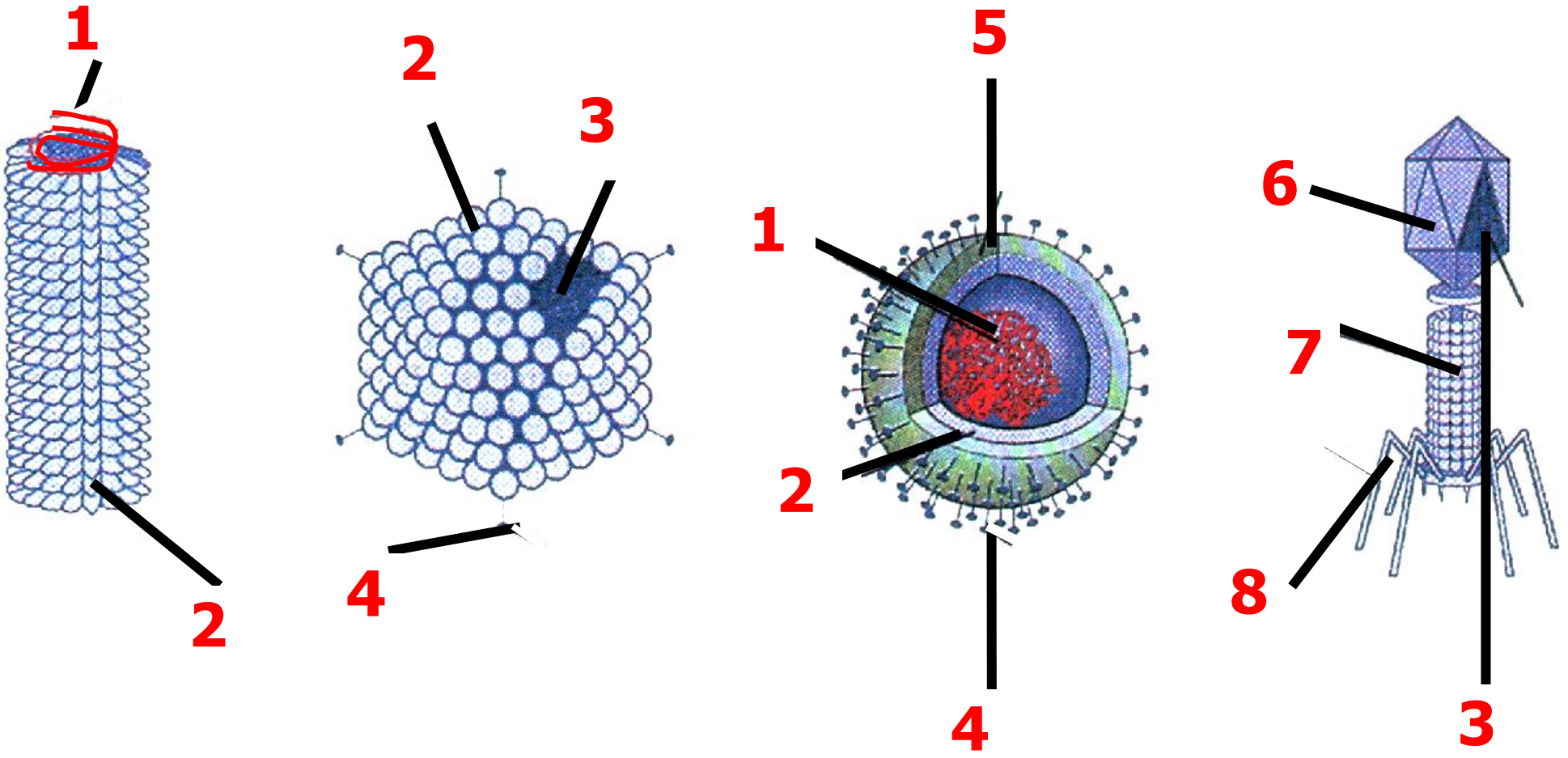
Εικόνα 3. 1 Οι ιοί αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα μέσα στο οποίο βρίσκεται το γενετικό υλικό (DNA ή RNA), και μερικές φορές περιβάλλονται από μεμβρανώδη φάκελο. Οι ιοί διαφέρουν σημαντικά στο μέγεθος και στο σχήμα. Οι πιο κοινοί τύποι ιών παρουσιάζονται στην εικόνα.

Εικόνα 3. 1 1. RNA 2. Καψίδιο

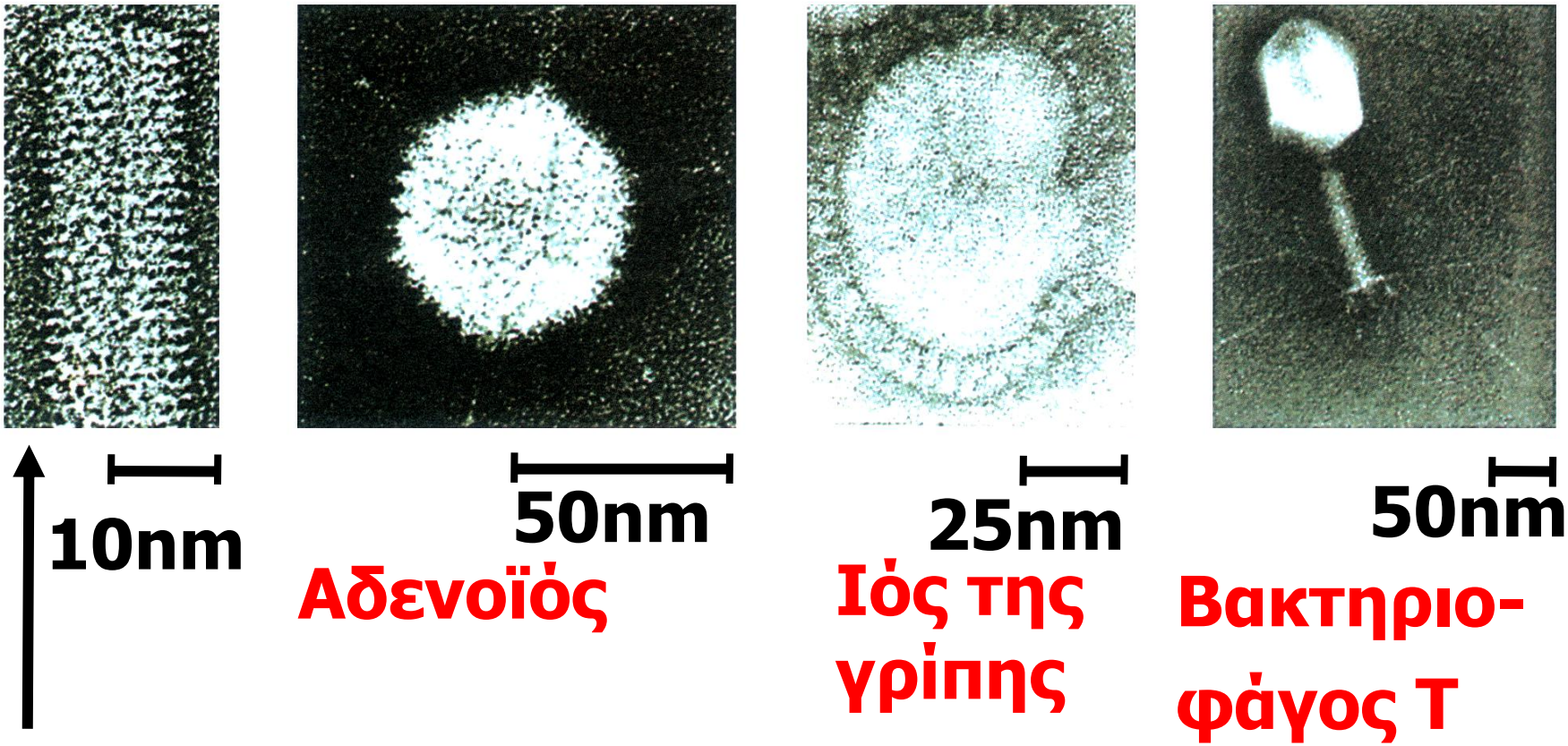
3. DNA 4. Γλυκοπρωτεΐνη

5. Μεμβρανώδης φάκελος 6. Κεφαλή 7. Ουρά 8. Ινίδια ουράς

Εικόνα 3.1



Εικόνα 3. 1


10nm
50nm
25nm
50nm
Αδενοϊός
Ιός της γρίπης
Βακτηριο-φάγος Τ
Ιός της μωσαϊκής του καπνού

Κύκλος ζωής των βακτηριοφάγων

Όπως όλοι οι ιοί, οι φάγοι έχουν ένα εξωτερικό πρωτεϊνικό κάλυμμα, την κεφαλή, το οποίο περιβάλλει το γενετικό υλικό τους που είναι δίκλωνο DNA (σε ορισμένες περιπτώσεις μονόκλωνο DNA ή RNA). Οι φάγοι έχουν επίσης μια ουρά, με την οποία προσκολλώνται στο κύτταρο-ξενιστή. Η ουρά έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει το κατάλληλο βακτήριο από τους υποδοχείς που έχει στην επιφάνεια της μεμβράνης του. Αρχικά, μια πρωτεΐνη της ουράς αντιδρά με τον υποδοχέα. Μέρος της ουράς διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου και το DNA του φάγου εισχωρεί μέσα στο βακτήριο. Το DNA αρχίζει να

χρησιμοποιεί τα υλικά του βακτηρίου, όπως τα ένζυμα, το ATP και διάφορα κυτταρικά συστατικά, για την αναπαραγωγή του. Αρχικά, συντίθενται αντίγραφα του DNA του φάγου και πρωτεΐνες του περιβλήματός του, τα οποία στη συνέχεια συνενώνονται και σχηματίζουν πολλούς ιούς.

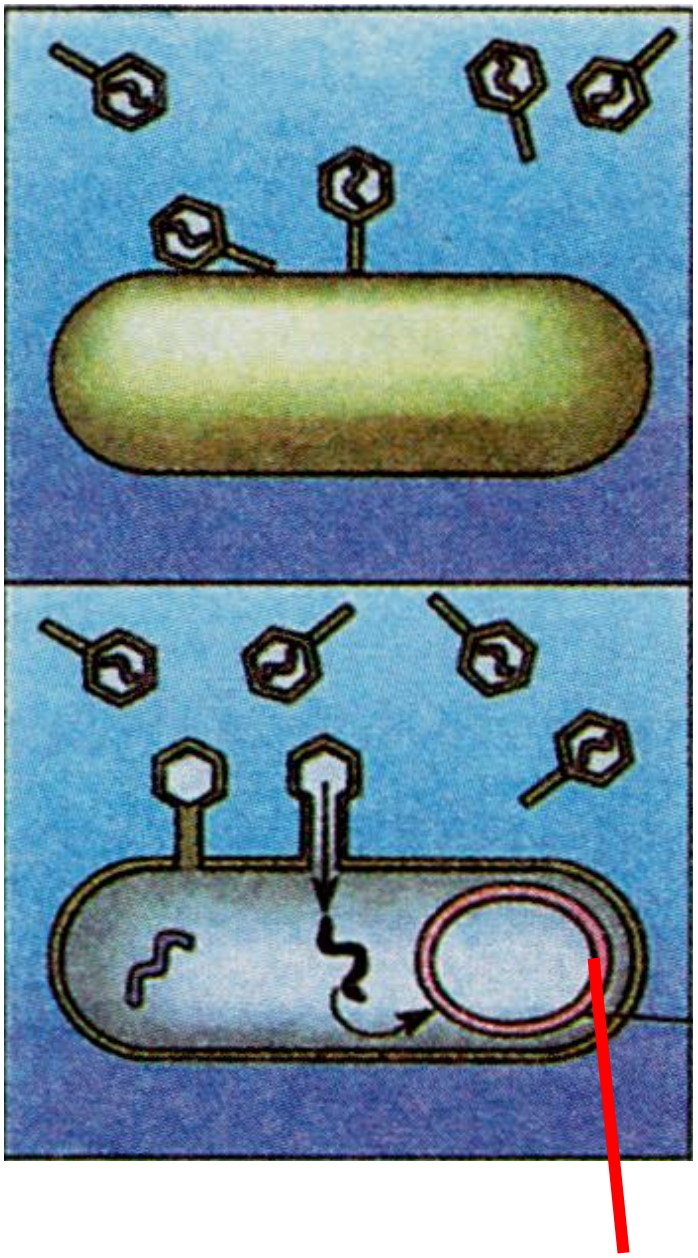
Όταν τα χημικά μόρια του κυττάρου που χρησιμοποιεί ο ιός για την αναπαραγωγή του τελειώσουν, τότε ένα από τα γονίδια του φάγου παράγει το ένζυμο λυσοζύμη, η οποία διασπά το κυτταρικό τοίχωμα αφήνοντας ελεύθερους διακόσιους περίπου νέους φάγους. Το άνοιγμα των βακτηρίων από τους φάγους ονομάζεται λύση, και ο κύκλος ζωής του φάγου λυτικός κύκλος (**Εικόνα**

3. 2α). Στη συνέχεια, οι νέοι φάγοι συνεχίζουν τον αναπαραγωγικό τους κύκλο προσβάλλοντας και άλλα βακτήρια.

Μερικές φορές ο φάγος μολύνει τον ξενιστή χωρίς να τον καταστρέφει. Το DNA του φάγου ενσωματώνεται στο βακτηριακό DNA και όταν το βακτήριο αναπαράγεται, αντιγράφεται μαζί του. Αυτός ο κύκλος ζωής του φάγου ονομάζεται λυσιγονικός κύκλος (Εικόνα 3. 2β). Κάτω από ορισμένες συνθήκες, για παράδειγμα με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, ο λυσιγονικός κύκλος μπορεί να μετατραπεί σε λυτικό.

Εικόνα 3. 2 Κύκλος ζωής βακτηριοφάγου.

Εικόνα 3. 2α. Λυτικός κύκλος

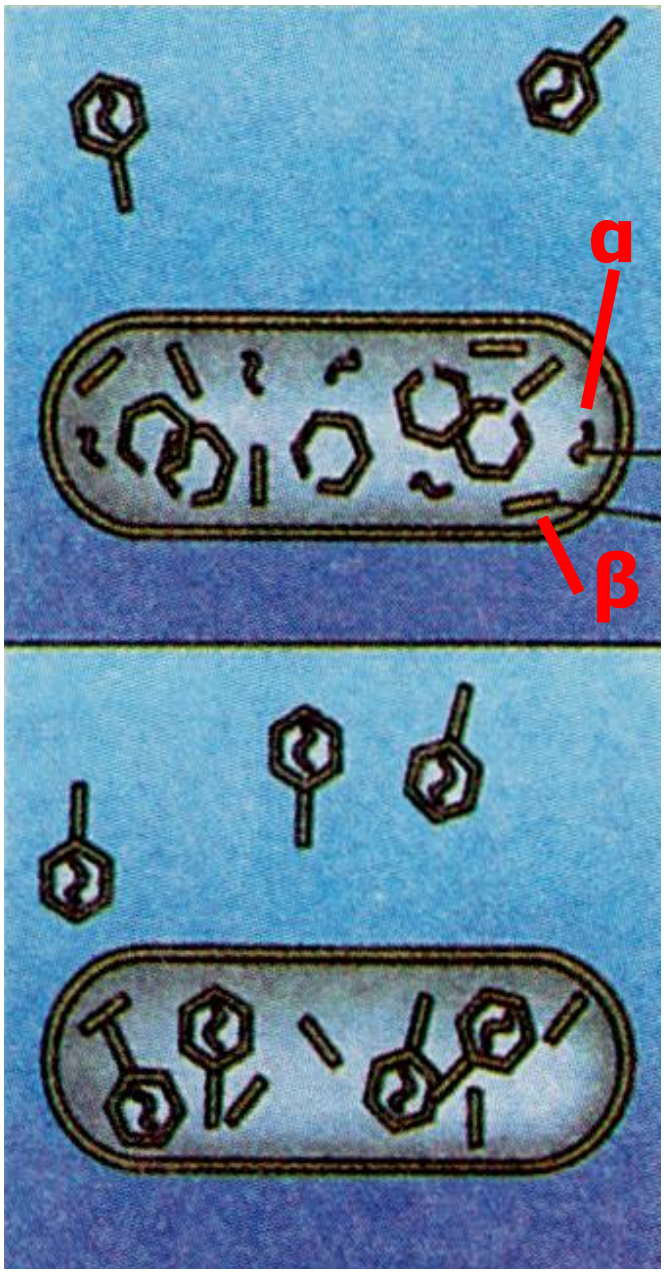


1. Προσκόλληση: Οι φάγοι προσκολλώνται στο βακτηριακό κύτταρο

2. Διείσδυση: Το DNA του φάγου εισέρχεται στο βακτηριακό κύτταρο.

Βακτηριακό DNA

Εικόνα 3. 2α. Λυτικός κύκλος



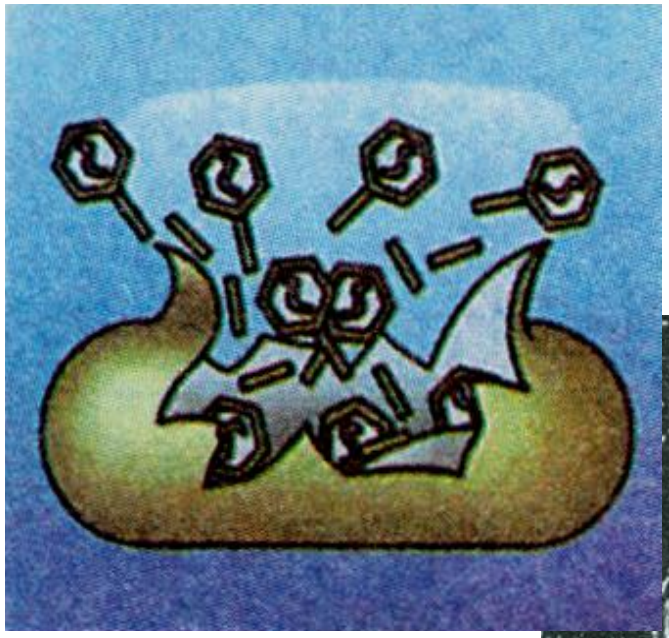
3. Πολλαπλασιασμός Το DNA του φάγου πολλαπλασιάζεται και συντίθενται πρωτεΐνες του περιβλήματος

4. Συγκρότηση Τα τμήματα του φάγου σχηματίζουν νέους φάγους

α. DNA φάγου

β. Πρωτεϊνικό περίβλημα φάγου

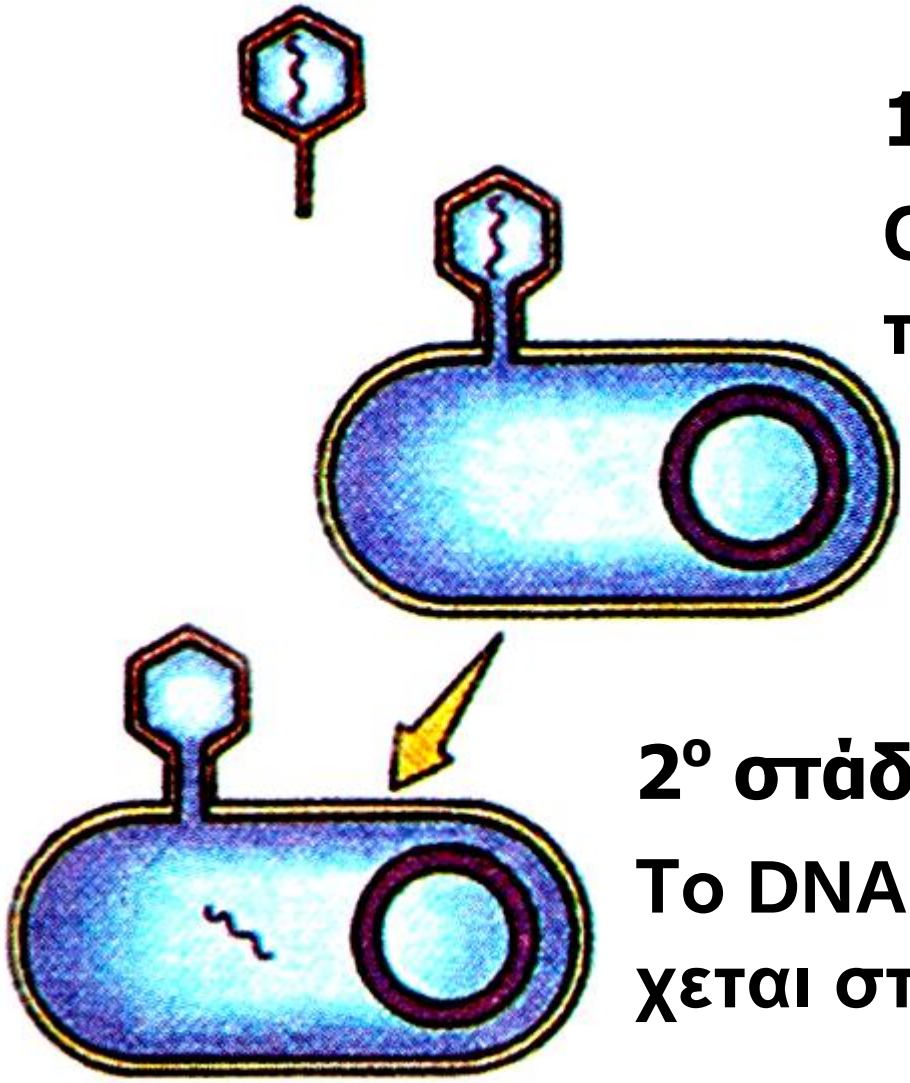
Εικόνα 3. 2α. Λυτικός κύκλος



5. Απελευθέρωση Λύση των βακτηρίων και απελευθέρωση των φάγων



Εικόνα 3. 2 β. Λυσιγονικός κύκλος.



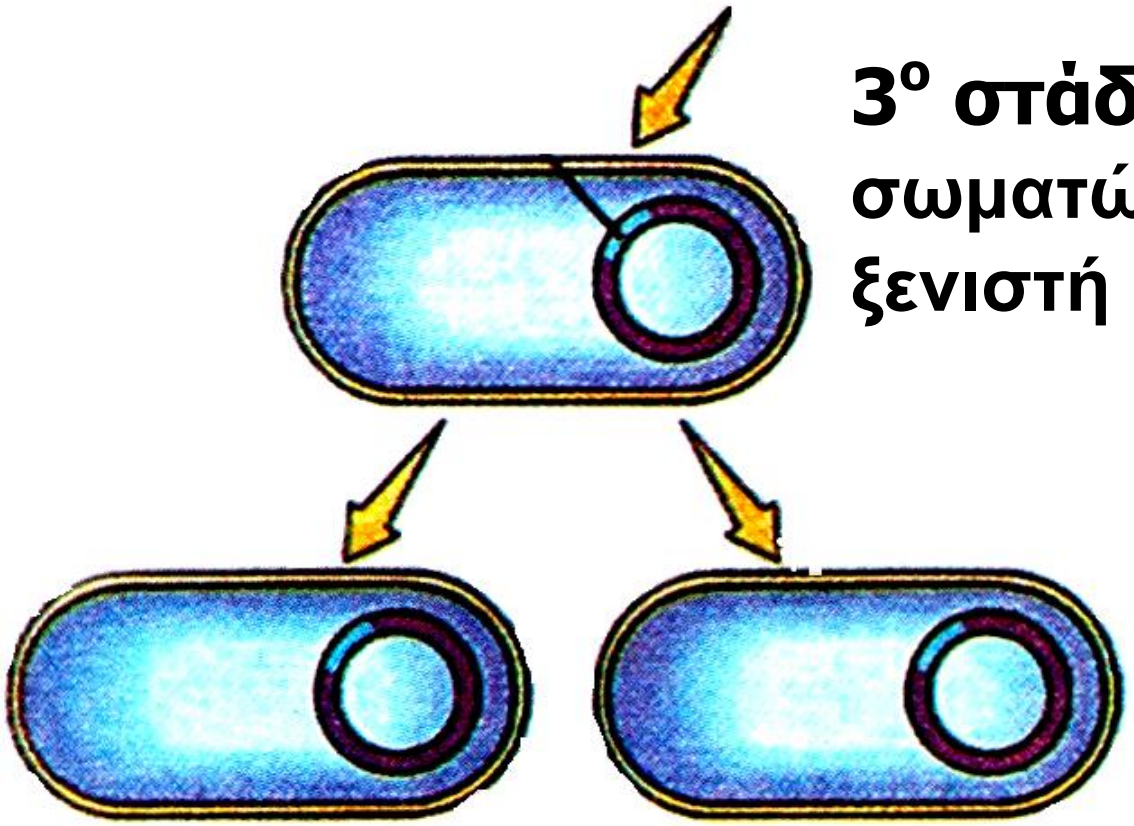
1ο στάδιο

Ο φάγος συνδέεται με τον ξενιστή

2ο στάδιο

Το DNA του φάγου εισέρχεται στον ξενιστή

Εικόνα 3. 2 β. Λυσιγονικός κύκλος.



3ο στάδιο DNA του φάγου ενσωματώνεται στο DNA του ξενιστή

4ο στάδιο Ο προφάγος διπλασιάζεται μαζί με το DNA του βακτηρίου

Τα κύτταρα που παράγονται μπορεί να έχουν νέες ιδιότητες.

Ιοί των ζώων

Οι ιοί των ζώων διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το είδος του γενετικού υλικού τους, τους **DNA ιούς** και τους **RNA ιούς**. Οι ιοί των ζώων συχνά περιβάλλονται από ένα μεμβρανώδη φάκελο, που βρίσκεται έξω από το καψίδιο και τους επιτρέπει να μπουν στο ζωικό κύτταρο. Ο φάκελος αυτός έχει σύσταση και δομή μεμβράνης ζωικού κυττάρου όπως η κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή, και έχει στην εξωτερική του επιφάνεια γλυκοπρωτεΐνες ιικής προέλευσης.

Οι πιο πολύπλοκοι από τους RNA ιούς είναι οι **ρετροϊοί** που θεωρούνται υπεύθυνοι για την πρόκληση

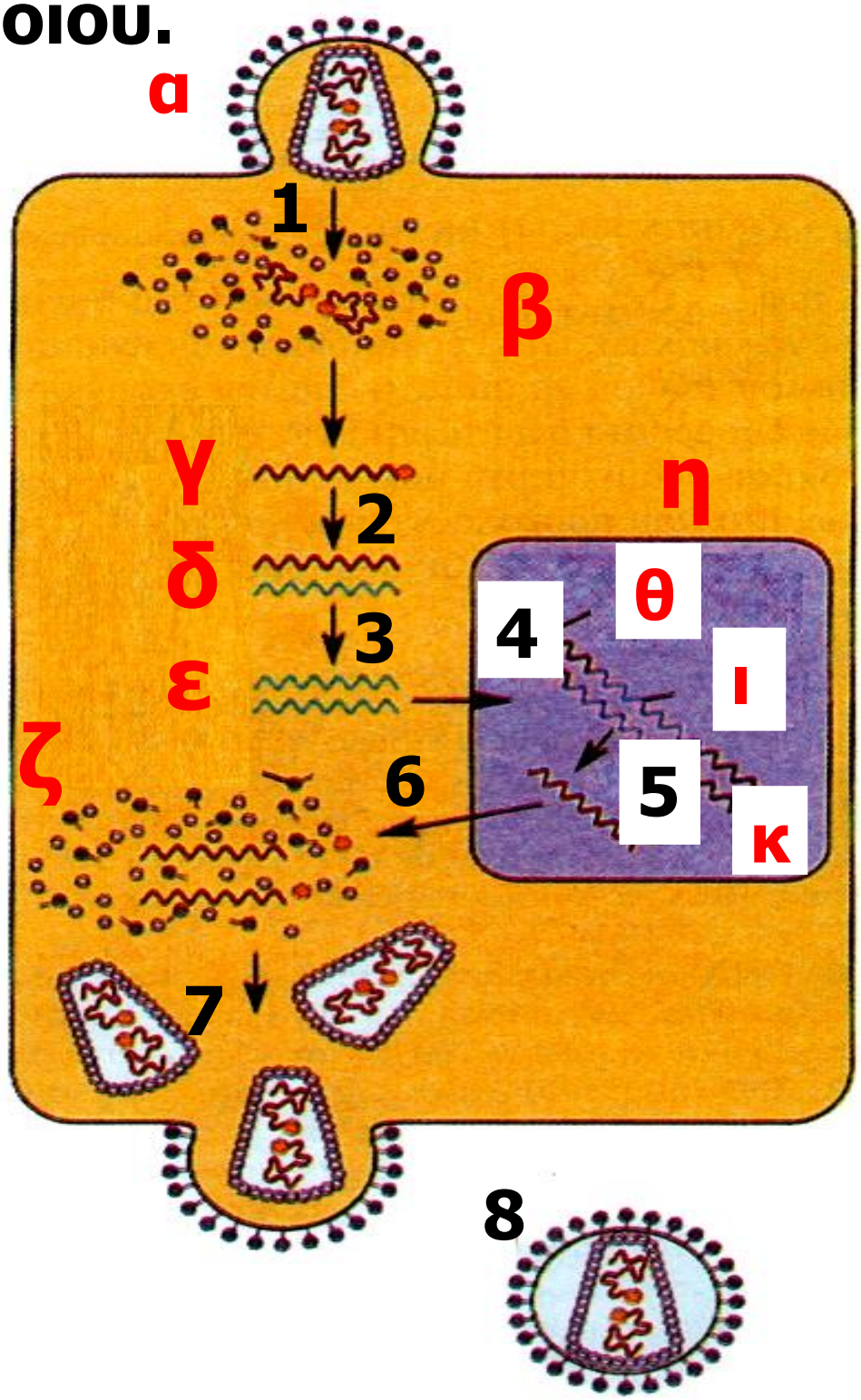
καρκίνου στα ζώα και στον άνθρωπο. Οι ιοί αυτοί έχουν ένα ένζυμο, την **αντίστροφη μεταγραφάση**, που μπορεί να συνθέσει DNA χρησιμοποιώντας ως καλούπι το RNA του ιού. Όταν ο ρετροϊός μολύνει το κύτταρο γίνεται συγχώνευση του μεμβρανώδους φακέλου του με τη μεμβράνη του κυττάρου (ενδοκύπωση). Έτσι το καψίδιο μαζί με το γονιδίωμα του ιού εισέρχεται στο κύτταρο. Το καψίδιο αποικοδομείται με τη δράση κυτταρικών ενζύμων και το RNA του ιού χρησιμεύει ως καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA από την αντίστροφη μεταγραφάση. Δημιουργείται έτσι ένα υβρίδιο DNA-RNA. Το RNA διασπάται με ειδικό ένζυμο και

με καλούπι το DNA παράγεται η δεύτερη αλυσίδα του DNA. Το δίκλωνο αυτό DNA ενσωματώνεται σε κάποιο σημείο του γονιδιώματος του κυττάρου-ξενιστή και μεταγράφεται σε mRNA, το οποίο λειτουργεί αφ'ενός μεν ως ιικό mRNA και συνθέτει τις ιικές πρωτεΐνες και αφ' ετέρου αποτελεί το γενετικό υλικό ενός νέου ιού (**Εικόνα 3. 3**).

Εικόνα 3. 3 Κύκλος ζωής ρετρο-ϊού.

α. Είσοδος του HIV στο κύτταρο
β. Κύτταρο - ξενιστής
γ. Ιικό RNA
δ. Υβρίδιο RNA - DNA
ε. Δίκλωνο DNA
ζ. Πρωτεΐνες ιού
η. Πυρήνας
θ. Χρωμοσωμικό DNA
ι. Προϊός
κ. RNA

Εικόνα 3. 3 Κύκλος ζωής ρετροϊού.

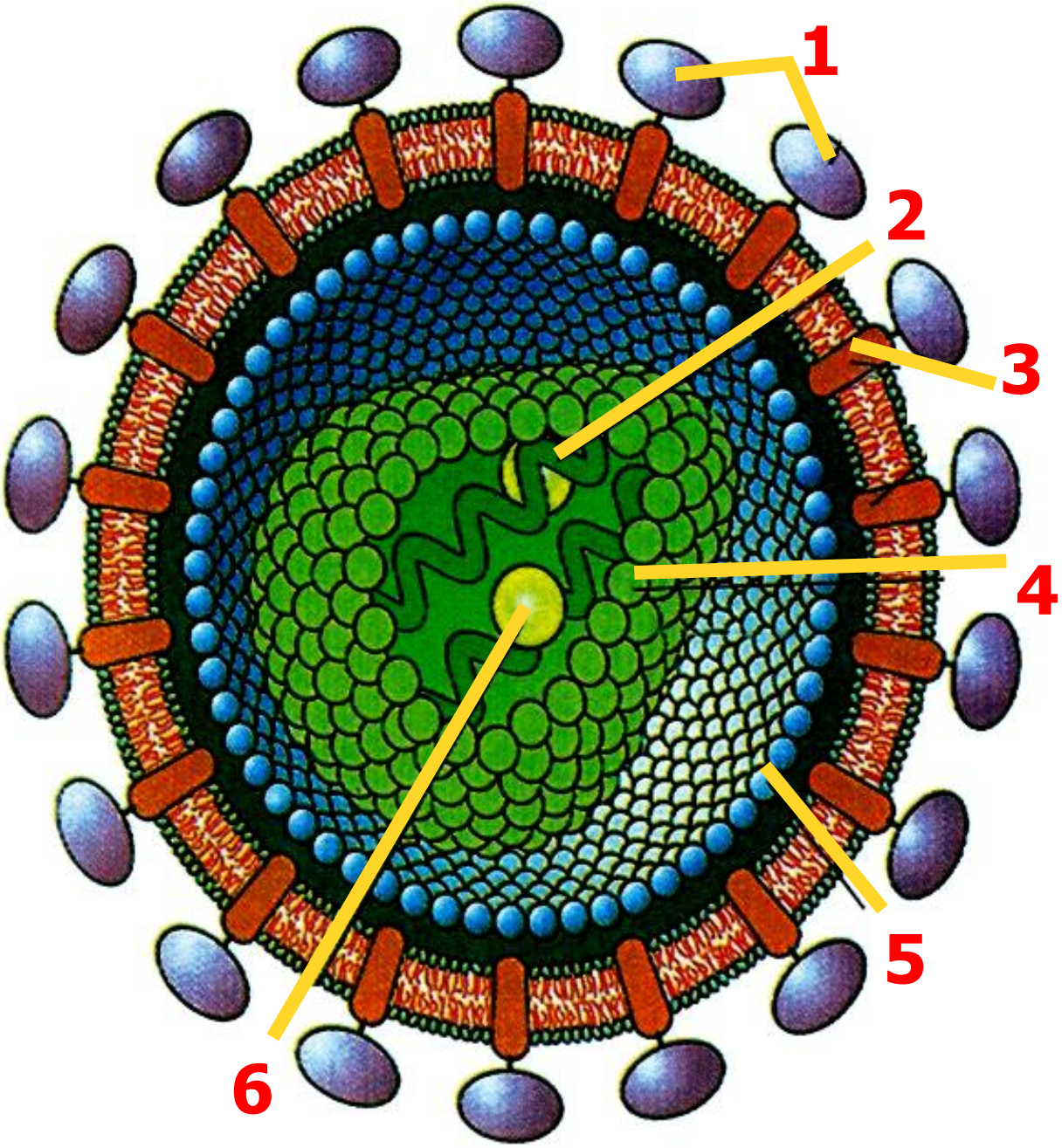


Στην κατηγορία των ρετροϊών ανήκει και ο HIV, ο ιός του AIDS. Ο ιός αυτός καταστρέφει τα Τ-λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Επειδή έτσι εξασθενίζει το ανοσοποιητικό σύστημα, αυξάνεται η ευαισθησία του οργανισμού σε διάφορες μολύνσεις, και σε πολλές περιπτώσεις οδηγεί σε καρκινογένεση (Εικόνα 3.4).

Εικόνα 3. 4 Ο ιός του AIDS (HIV: Human Immunodeficiency Virus).

1. Πρωτεϊνες φακέλου
2. Γενωμικό RNA (γονιδίωμα ιού)
3. Πρωτεϊνες φακέλου
4. Καψίδιο
5. Πρωτεϊνες περιβλήματος
6. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι ένζυμο που μπορεί να συνθέσει DNA από RNA.

Εικόνα 3.4 Ο ιός του AIDS (HIV: Human Immunodeficiency Virus).



Μερικοί ιοί, που το γενετικό υλικό τους είναι δίκλωνο DNA, όπως ο ιός του έρπητος, αναπαράγονται μέσα στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή και το DNA τους μπορεί να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου, όπως συμβαίνει με το DNA των βακτηριοφάγων στο λυσιγονικό κύκλο, και να παραμείνει σε λανθάνουσα κατάσταση. Κατά καιρούς, η φυσική ή ψυχική καταπόνηση του οργανισμού μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση του αναπαραγωγικού κύκλου του ιού με αποτέλεσμα την εμφάνιση μολύνσεων με δυσάρεστα συμπτώματα για τον οργανισμό.

Η σχέση ανάμεσα στη μόλυνση από έναν ιό και στα συμπτώματα που προκαλούνται από αυτήν στον οργανισμό είναι συχνά ασαφής. Οι ιοί μπορεί να καταστρέφουν τα κύτ-

ταρα-ξενιστές, επειδή προκαλούν α-πελευθέρωση υδρολυτικών ενζύ-μων από τα λυσοσώματα του κυτ-τάρου. Επίσης, τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα μπορεί να παράγουν τοξίνες. Το μέγεθος της βλάβης που προκαλεί ένας ιός εξαρτάται εν μέρει από την ικανότητα του ιστού που μο-λύνεται από αυτόν να αναγεννηθεί με κυτταρική διαίρεση. Για παράδειγμα, στο κοινό κρυολόγημα οι ιοί μολύ-νουν τα επιθηλιακά κύτταρα της ανα-πνευστικής οδού χωρίς να δημιουρ-γούν μόνιμη βλάβη, επειδή τα κύτ-ταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα ανα-παραγωγής. Αντίθετα, ο ιός της πο-λιομυελίτιδας προσβάλλει τα νευρικά κύτταρα, τα οποία δεν έχουν την ικα-νότητα διαίρεσης. Επομένως, η βλά-βη που προκαλεί ο ιός αυτός είναι μόνιμη.

Περισσότερα είδη ιών:

DNA ιοί

Οι DNA ιοί είναι δύο ειδών: α. αυτοί που έχουν ως γενετικό υλικό ένα μόριο δίκλωνου DNA, όπως οι αδενοϊοί, οι ερπητοϊοί, οι ιοί της ευλογιάς, ο ιός της δαμαλίτιδας, και β. αυτοί που έχουν ως γενετικό υλικό ένα μόριο μονόκλωνου DNA. Το μονόκλωνο DNA λειτουργεί ως καλούπι για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του. Έτσι, το μονόκλωνο DNA μετατρέπεται σε δίκλωνο. Το δίκλωνο DNA αντιγράφεται και μεταγράφεται σε mRNA, το οποίο παράγει τις πρωτεΐνες του ιού.

RNA ιοί

Οι RNA ιοί διακρίνονται σε: α. RNA ιούς που έχουν ως γενετικό υλικό δίκλωνο RNA. Οι δύο αλυσίδες του RNA χαρακτηρίζονται ως (+) και (-). Η (-) αλυσίδα RNA λειτουργεί ως καλούπι για η σύνθεση των (+) αλυσίδων, που είναι το mRNA. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ρετροϊοί που προκαλούν συνήθως διάρροια, β. RNA ιούς, που έχουν ως γενετικό υλικό μονόκλωνο RNA (+), το οποίο είναι ταυτόχρονα το mRNA του ιού, το RNA του ιού όταν εισέλθει στο κύτταρο, αντιγράφεται σε μια (-) αλυσίδα, που λειτουργεί ως καλούπι για τη σύνθεση περισσότερων (+) αλυσίδων. Στους ιούς αυτούς ανήκει ο ιός της πολιομυελίτιδας,

γ. RNA ιούς, που έχουν ως γενετικό υλικό μονόκλωνο RNA (-), το οποίο λειτουργεί ως καλούπι για τη σύνθεση του mRNA. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ιοί που προκαλούν ιλαρά και μαγουλάδες, ο ιός της γρίπης και ο ιός Embola. δ. RNA ιούς, που είναι γνωστοί ως ρετροϊοί επειδή το μονόκλωνο RNA (+) είναι καλούπι για το σχηματισμό ενός μορίου DNA.

Αναπαραγωγή των RNA ιών με μονόκλωνο RNA

Οι ιοί, με τη βοήθεια των γλυκοπρωτεϊνών, που υπάρχουν στο φάκελό τους και αναγνωρίζονται από ειδικούς υποδοχείς των κυττάρων-ξενιστών, προσδένονται σ' αυτά και

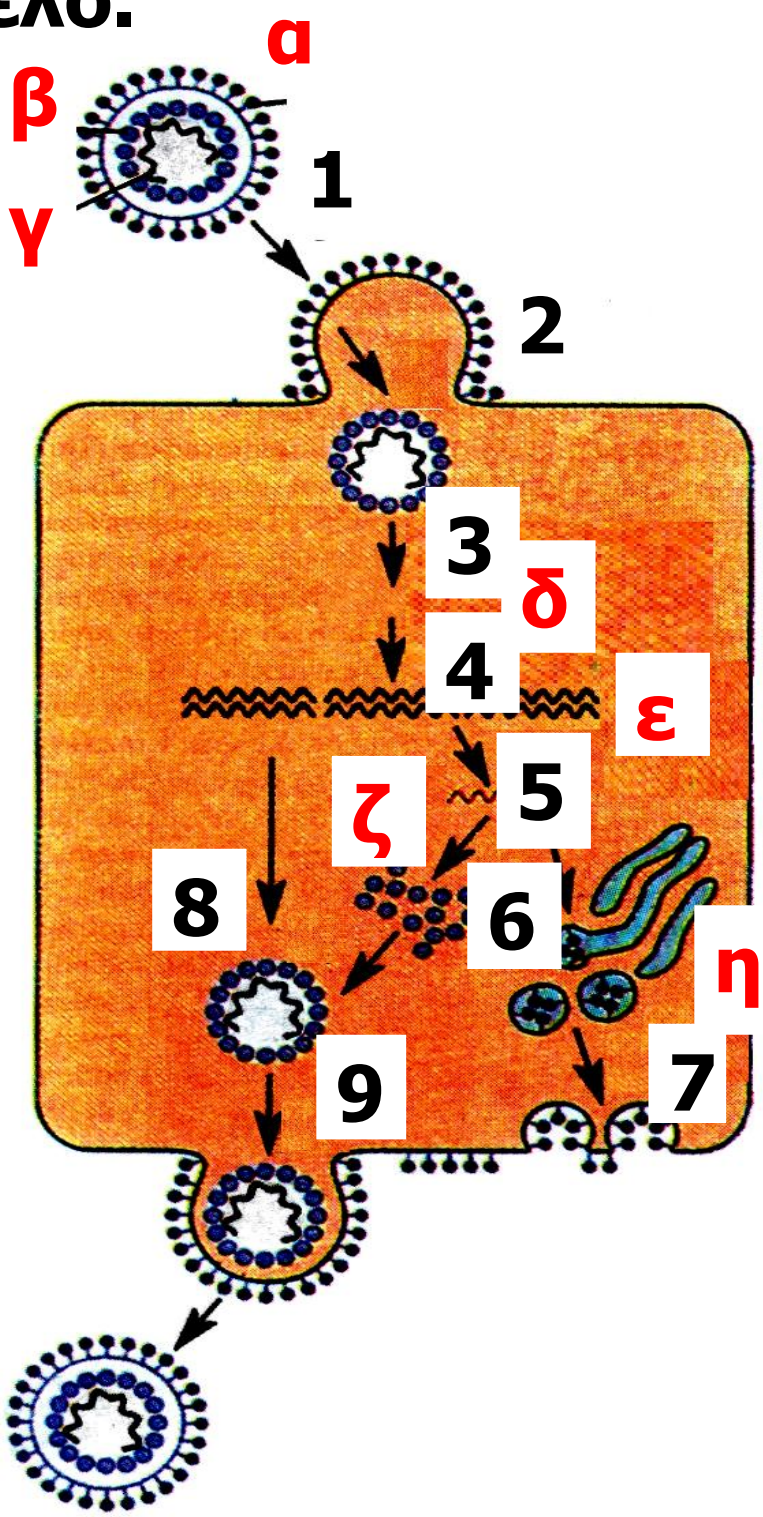
γίνεται συγχώνευση του μεμβρανώδους φακέλου τους με τη μεμβράνη του κυττάρου (ενδοκύττωση). Έτσι, το καψίδιο με το γονιδίωμα του ιού εισέρχεται στο κύτταρο. Το καψίδιο αποικοδομείται από τη δράση κυτταρικών ενζύμων και το RNA του ιού (-) λειτουργεί ως καλούπι για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας RNA (+). Το συμπληρωματικό αυτό RNA λειτουργεί ως mRNA για την παραγωγή των πρωτεϊνών του καψιδίου του ιού και των γλυκοπρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Λειτουργεί επίσης και ως καλούπι για τη σύνθεση του RNA του ιού. Οι πρωτεΐνες του καψιδίου περιβάλλουν το RNA, ενώ οι γλυκοπρωτεΐνες μεταφέρονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου στη μεμβράνη του κυττάρου. Οι ιοί εξέρχονται με

εκβλάστηση από τα κύτταρα, αφού περιβληθούν με τμήμα της μεμβράνης του κυττάρου, που έχει τις ιικές πρωτεΐνες. Διαπιστώνεται ότι τα ζωικά κύτταρα δεν καταστρέφονται όπως τα βακτήρια κατά το λυτικό κύκλο των φάγων.

Αναπαραγωγικός κύκλος RNA ιού με φάκελο.

α. Μεμβρανώδης φάκελος
β. Καψίδιο
γ. Νουκλεϊκό οξύ
δ. Ιικό γονιδίωμα
ε. Αντίγραφα του γονιδιώματος του ιού
ζ. mRNA
η. Ενδοπλασματικό δίκτυο

Αναπαραγωγικός κύκλος RNA ιού με φάκελο.



Ιοί φυτών και ιοειδή

Οι περισσότεροι ιοί των φυτών είναι RNA ιοί και αποτελούν σημαντικό πρόβλημα στην ανάπτυξη και στην απόδοση των φυτών. Οι ιοί μεταδίδονται στα φυτά από έντομα μέσω πληγών στην επιδερμίδα ή από μολυσμένους σπόρους και μοσχεύματα.

Καταστροφικές ασθένειες προκαλούνται στα φυτά από πολύ μικρά κυκλικά μόρια γυμνού μονόκλωνου RNA, μήκους μερικών μόνο εκατοντάδων βάσεων που ονομάζονται **ιοειδή**. Πιστεύεται ότι τα ιοειδή απορρυθμίζουν τη λειτουργία των κυττάρων. Τα ιοειδή δεν έχουν γονίδια, άρα δεν παράγουν πρωτεΐνες και εξαρτώνται ολοκληρωτικά για τη

διαιώνισή τους από τα ένζυμα του κυττάρου-ξενιστή. Φαίνεται ότι «αντιγράφονται» από την κυτταρική RNA πολυμεράση.

Μια ασθένεια που προκαλείται από ιοειδή κατέστρεψε περισσότερους από δέκα εκατομμύρια κοκκοφοίνικες στις Φιλιππίνες καθώς και την παραγωγή χρυσανθέμων στην Αμερική. Τα ιοειδή απειλούν επίσης καλλιέργειες ντομάτας και πατάτας.

Οι ιοί είναι το αίτιο δημιουργίας διάφορων μορφών καρκίνου

Σε αρκετές περιπτώσεις τόσο οι DNA ιοί όσο και οι ρετροϊοί προκαλούν καρκίνο στα ζώα και στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, ο ιός της ηπατίτιδας

Β είναι υπεύθυνος για την πρόκληση καρκίνου στο ήπαρ σε άτομα με χρόνιες μολύνσεις. Ο ιός Epstein-Barr, που προκαλεί τη μολυσματική μονοπυρήνωση, θεωρείται ύποπτος για αρκετούς καρκίνους που εμφανίζονται σε διάφορα μέρη της Αφρικής, όπως το λέμφωμα του Burkitt. Ένας από τους ρετροϊούς ο HTLV-1 (Human T-lymphocytes Virus-1), προκαλεί λευχαιμία στα ενήλικα άτομα. Όλοι οι ογκογόνοι ιοί μετασχηματίζουν τα κανονικά κύτταρα σε καρκινικά μέσω της ενσωμάτωσής τους στο γονιδίωμα των κυττάρων.

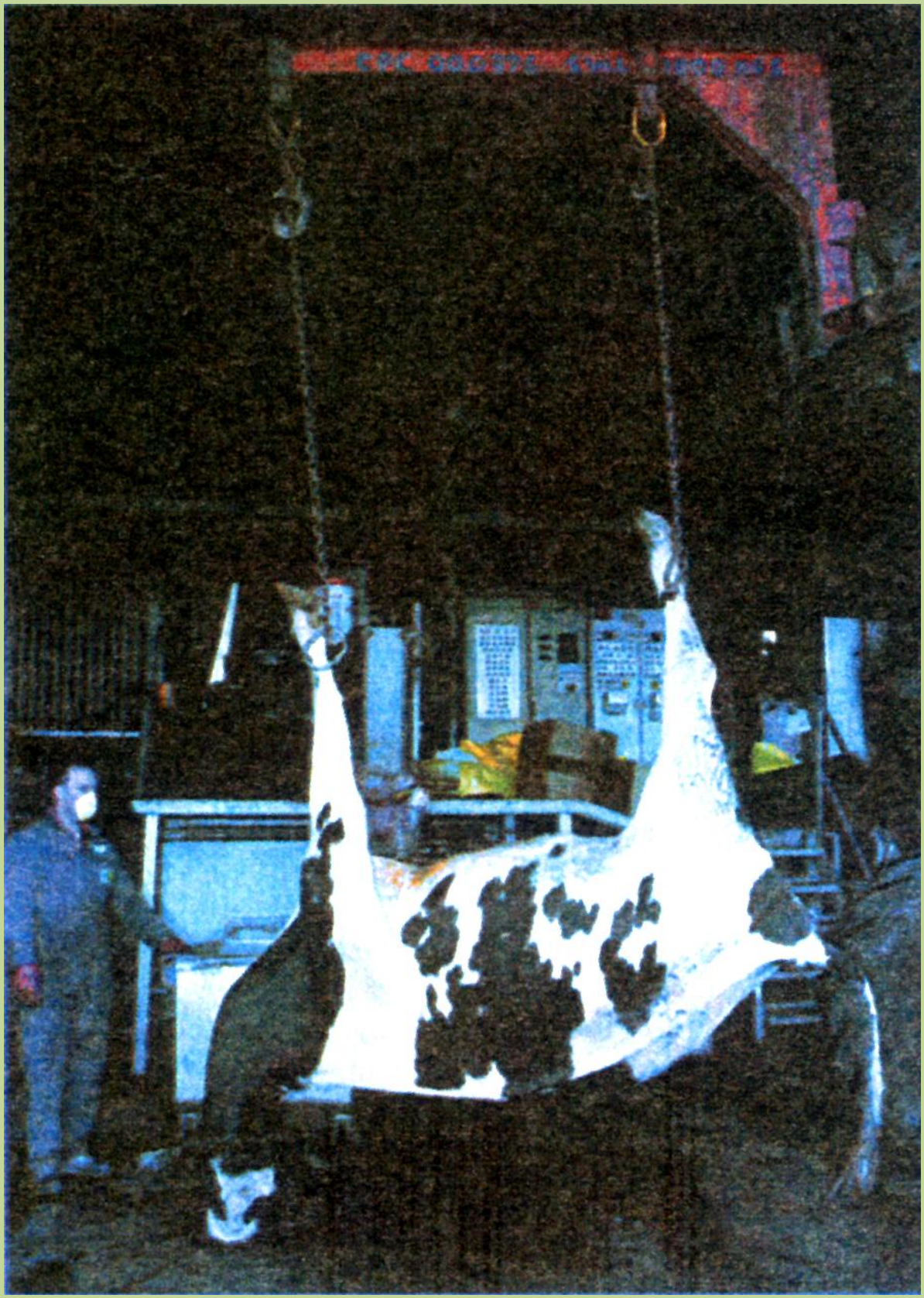
Prions

Βρίσκονται στον αντίποδα των ιοειδών, γιατί είναι «μολυσματικά» σω-

ματίδια που πιστεύεται ότι αποτελούνται μόνο από πρωτεΐνες. Είναι υπεύθυνα για ένα σύνολο ασθενειών, σε διάφορους οργανισμούς, που ονομάζονται σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες, όπως η ασθένεια των τρελών αγελάδων στα βοοειδή και το σύνδρομο Creutzfeldt-Jacobs στον άνθρωπο. Πιστεύεται ότι το prion όταν μπαίνει στα κύτταρα του εγκεφάλου, τροποποιεί τις πρωτεΐνες του ξενιστή. Αυτό προκαλεί την ασθένεια. Πιστεύεται ότι τα «prions» είναι μεταλλαγμένες μορφές μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης του οργανισμού που βρίσκεται στον εγκέφαλο και άλλα όργανα, και της οποίας ο ρόλος δεν είναι γνωστός. Η μετάλλαξη που συμβαίνει τυχαία στο γονίδιο που την κωδικοποιεί, τροποποιεί την παραγόμενη πρωτεΐνη με τέτοιο τρό-

πο, ώστε να μην καταστρέφεται σε υψηλές θερμοκρασίες και να μην πέπτεται από πρωτεολυτικά ένζυμα. Η τροποποιημένη πρωτεΐνη καταλύει τη μετατροπή των φυσιολογικών πρωτεϊνών, αλλάζοντας τη δομή τους, σε μη φυσιολογικές. Η αυξημένη συγκέντρωση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών προκαλεί βλάβη στα κύτταρα του εγκεφάλου. Όταν ένα ασθενές ζώο χρησιμοποιηθεί ως τροφή από άλλο ζώο, οι μη φυσιολογικές πρωτεΐνες του επάγουν την τροποποίηση των φυσιολογικών πρωτεϊνών του οργανισμού από τον οποίο καταναλώθηκε. Έτσι ο οργανισμός προσβάλλεται από την ασθένεια.

Prions



Περίληψη

Οι ιοί αποτελούνται από DNA ή RNA, που περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο. Είναι ενδοκυτταρικά παράσιτα, αναπαράγονται μέσα σε κύτταρα-ξενιστές και χρησιμοποιούν τα ένζυμα των ξενιστών, για να αναπαραχθούν. Οι βακτηριοφάγοι είναι ιοί που μολύνουν μόνο βακτήρια και αναπαράγονται μέσω του λυτικού ή του λυσιγονικού κύκλου. Οι ιοί των ζώων διακρίνονται σε DNA και RNA ιούς, ανάλογα με το είδος του γενετικού υλικού τους, που περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο και εξωτερικά από ένα μεμβρανώδη φάκελο. Στους ιούς που προσβάλλουν τα ζώα και τον άνθρωπο ανήκουν ο ιός της πολιομυελίτιδας, ο ιός της

γρίπης, ο ιός της ηπατίτιδας, ο ιός του AIDS, καθώς και ιοί που προκαλούν καρκίνο. Οι περισσότεροι ιοί των φυτών είναι RNA ιοί και προσβάλλουν τα φυτά μέσω κυρίως των εντόμων. Τα ιοειδή είναι μικρά γυμνά μόρια RNA με μεγάλη μολυσματική ικανότητα.

Ερωτήσεις

1. Σε μερικούς ιούς το DNA είναι μονόκλωνο δηλαδή αποτελείται από μία μόνο πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Ποια από τις παρακάτω προτάσεις, που αφορούν το DNA των ιών αυτών, είναι σωστή;
α. Η αναλογία βάσεων μεταξύ γουανίνης και κυτοσίνης πρέπει να είναι 1:1.

β. Οπωσδήποτε υπάρχει ίση αναλογία μεταξύ των τεσσάρων βάσεων.
γ. Δεν υπάρχει συγκεκριμένη αναλογία μεταξύ των τεσσάρων βάσεων.
Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.
2. Να αναφέρετε τα γενικά χαρακτηριστικά των ιών.
3. Ποιος είναι ο κύκλος ζωής των βακτηριοφάγων;
4. Ένας ασθενής πάσχει από μια άγνωστη ασθένεια. Προκειμένου να εντοπιστεί το αίτιο, γίνεται απομόνωση προσβεβλημένων κυττάρων του ασθενούς τα οποία καλλιεργούνται. Από αυτά απομονώνεται DNA. Διαπιστώνεται ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά είδη: το ένα είναι του ασθενούς και το άλλο ενός ιού. Ανάλυση της σύστασης των δύο DNA έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Σωλήνας 1 (DNA 1): 22,1% A, 27,9% C, 27,9% G, 22,1% T
Σωλήνας 2 (DNA 2): 31,3% A, 31,3% C, 18,7% G, 18,7% T
Ποιος από τους δύο σωλήνες περιέχει το DNA του ιού και ποιος αυτό του ασθενή; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.
5. Έχει βρεθεί ότι ορισμένοι ιοί ζώων έχουν κάποια δικά τους ένζυμα. Αυτό συμβαίνει επειδή:
α. οι ιοί καταστρέφονται γρήγορα από βλάβες στα κύτταρα-ξενιστές
β. τα κύτταρα-ξενιστές δεν έχουν ένζυμα που να καταλύουν τις πορείες RNA → RNA , RNA → DNA
γ. τα ένζυμα μεταφράζουν ιικό mRNA σε πρωτεΐνες

δ. οι ιοί χρησιμοποιούν αυτά τα ένζυ-
μα για να εισέρχονται στις μεμβράνες
των ζωικών κυττάρων.

Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA



Κεφάλαιο 4

Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA

4. Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

Από το 1953, που οι Watson και Crick πρότειναν το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής του DNA, μέχρι σήμερα, η πρόοδος της επιστήμης της Βιολογίας ήταν αλματώδης. Η απομόνωση και χρήση πολυάριθμων ενζύμων έδωσαν στους ερευνητές τη δυνατότητα «αναπαραγωγής» των διαδικασιών της αντιγραφής, αντίστροφης μεταγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης in vitro. Ειδικότερα η απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών, ενζύμων που κόβουν το DNA σε κομμάτια με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων, καθώς

και ειδικών φορέων που μεταφέρουν DNA από κύτταρο σε κύτταρο, επέτρεψε την ανάπτυξη της **τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA** και έδωσε στον άνθρωπο την ικανότητα όχι μόνο να ερευνά, αλλά να επεμβαίνει και να τροποποιεί το γενετικό υλικό των οργανισμών. Η τεχνολογία αυτή βρίσκει εφαρμογή στην παραγωγή σειράς προϊόντων και τη δημιουργία φυτών και ζώων με «βελτιωμένες» ιδιότητες, όπως θα παρουσιαστεί σε επόμενα κεφάλαια. Με την ανάπτυξη της υψηλής αυτής τεχνολογίας, το γενετικό υλικό, το DNA, που ήταν τόσο δύσκολο να μελετηθεί, έγινε «παιχνίδι» στα ανθρώπινα χέρια.

Σήμερα μπορούμε να κατασκευάζουμε στο δοκιμαστικό σωλήνα ένα «ανασυνδυασμένο» μόριο DNA, δηλαδή ένα τεχνητό μόριο DNA, που περιέχει γονίδια από δύο ή και περισσότερους οργανισμούς. Το DNA αυτό μπορεί να μπει σε ένα βακτήριο ή σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Τα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια ή ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ικανά να ζουν και να αναπαράγονται μεταφέροντας στους απογόνους τους τις καινούργιες ιδιότητες.

Οι τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό αποτελούν τη Γενετική Μηχανική. Η Γενετική Μηχανική άνοιξε το δρόμο για νέες, εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ερευνητικές και παραγωγικές

δυνατότητες, αλλά και για την επίτευξη δύο θεμελιωδών στόχων του ανθρώπου:

α. την κατανόηση των μυστηρίων της ζωής και της εξέλιξης πάνω στη Γη και,

β. τη βελτίωση της υγείας και του τρόπου διαβίωσής του. Η βελτίωση αυτή επιτυγχάνεται με τις εφαρμογές της Γενετικής Μηχανικής τόσο στην Ιατρική όσο και στη γεωργία και την κτηνοτροφία.

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA περιλαμβάνει όλες τις τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά του γενετικού υλικού από τον ένα οργανισμό στον άλλο. Τα στάδια της διαδικασίας αυτής είναι (Εικόνα 4. 1):

• **Η κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA.** Για το σκοπό αυτό το ολικό DNA από έναν οργανισμό δότη απομονώνεται, κόβεται ενζυματικά με ειδικά ένζυμα, τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, και ενώνεται με ένα φορέα κλωνοποίησης. Ο **φορέας κλωνοποίησης** είναι ένα μόριο DNA, π.χ. πλασμίδιο ή DNA φάγων, το οποίο μπορεί να αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα μέσα σε ένα κύτταρο-ξενιστή όπως ένα βακτήριο. Το DNA που δημιουργείται είναι ανασυνδυασμένο.

● **Η μεταφορά του ανασυνδυασμένου μορίου DNA σε ένα κύτταρο-ξενιστή.** Η εισαγωγή του DNA

σε βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή ονομάζεται **μετασχηματισμός.**

- **Η επιλογή και απομόνωση των κυττάρων-ξενιστών.** Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα-ξενιστές που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο DNA επιλέγονται από εκείνα που δεν το έχουν προσλάβει. Κάθε βακτήριο που προσλαμβάνει ένα μόνο μόριο ανασυνδυασμένου DNA πολλαπλασιάζεται και παράγει μια αποικία που αποτελεί ένα βακτηριακό κλώνο. Είναι φανερό ότι με την παραπάνω διαδικασία παράγονται χιλιάδες κλώνοι, που ο καθένας περιέχει ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA διαφορετικό από τους υπόλοιπους κλώνους.

• **Η επιλογή ενός βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA.** Αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών μορίων ανιχνευτών, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.

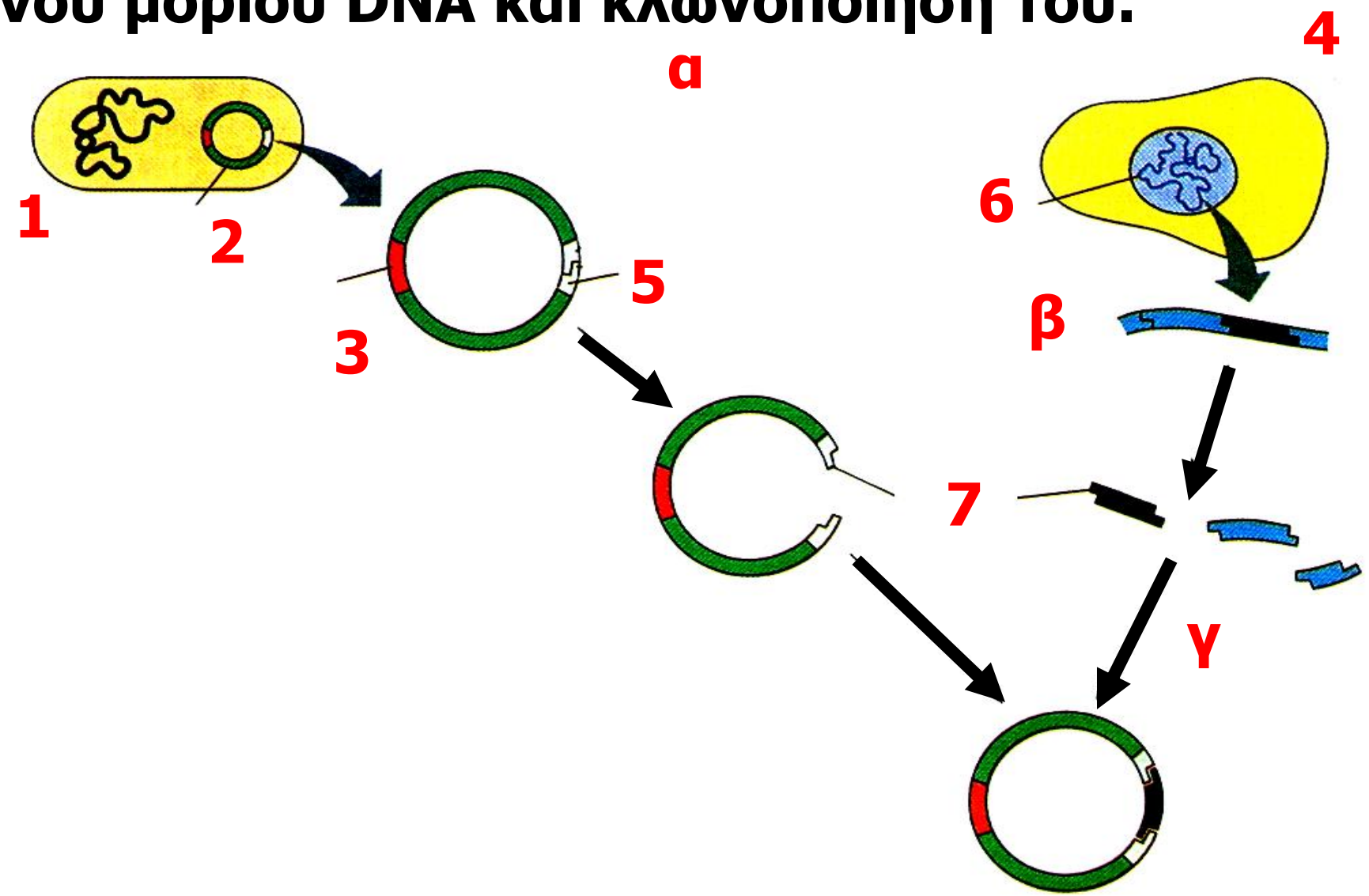
Ο όρος **κλώνος** αναφέρεται σε μια ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών. Ο όρος κλωνοποίηση αναφέρεται στην κατασκευή, κατά προτίμηση μεγάλου αριθμού, πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών.

Εικόνα 4. 1 Στάδια παραγωγής ανασυνδυασμένου μορίου DNA και κλωνοποίησή του.

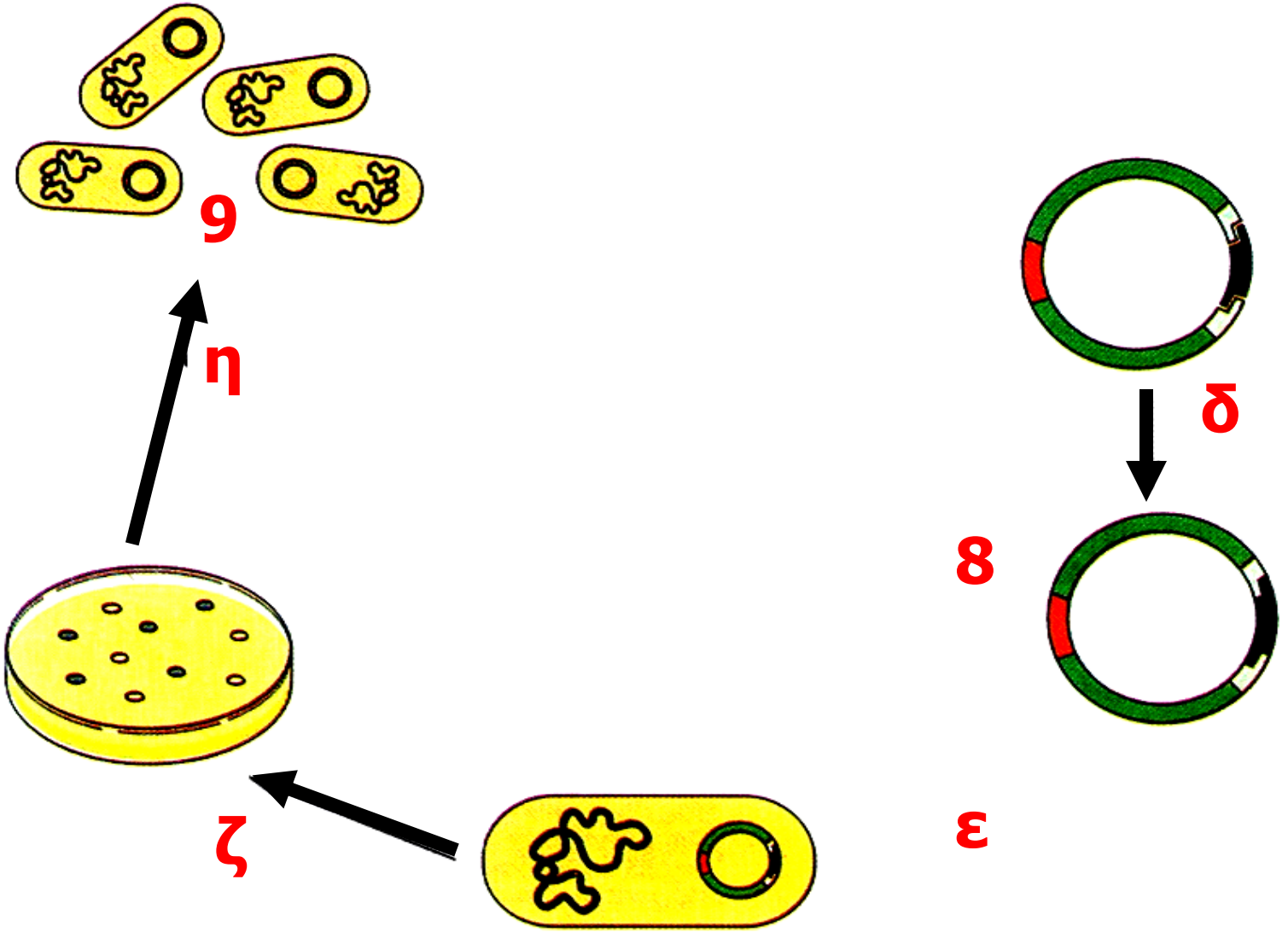
α. Απομόνωση DNA β. Κόψιμο του DNA με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση γ. Ανάμιξη των μορίων DNA δ. Η DNA δεσμάση ενώνει τα δύο κομμάτια DNA ε. Μεταφορά του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου στο βακτήριο - ξενιστή ζ. Καλλιέργεια βακτηρίων σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αμπικιλίνη η. Προσδιορισμός και απομόνωση αποικιών (λευκό χρώμα) βακτηρίων που περιέχουν το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο, λόγω της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται

σε θρεπτικό υλικό που περιέχει α-μπικιλίνη 1. E.coli 2. Πλασμίδιο 3. Γονίδιο ανθεκτικότητας 4. Κύτταρο ευκαρυωτικού οργανισμού 5. Θέση που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση 6. DNA 7. Μονόκλωνα άκρα 8. Ανασυνδυασμένο DNA 9. Βακτηριακός κλώνος που περιέχει αντίγραφα ευκαρυωτικού γονιδίου

Εικόνα 4. 1α Στάδια παραγωγής ανασυνδυασμέ-νου μορίου DNA και κλωνοποίησή του.



Εικόνα 4. 1β Στάδια παραγωγής ανασυνδυασμέ-νου μορίου DNA και κλωνοποίησή του.



Μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει όλο το γονιδίωμα ενός οργανισμού

Η ανακάλυψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών έθεσε το θεμέλιο για τη δημιουργία των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την εισβολή «ξένου» DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA. Μία από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η EcoRI που απομονώθηκε από το βακτήριο

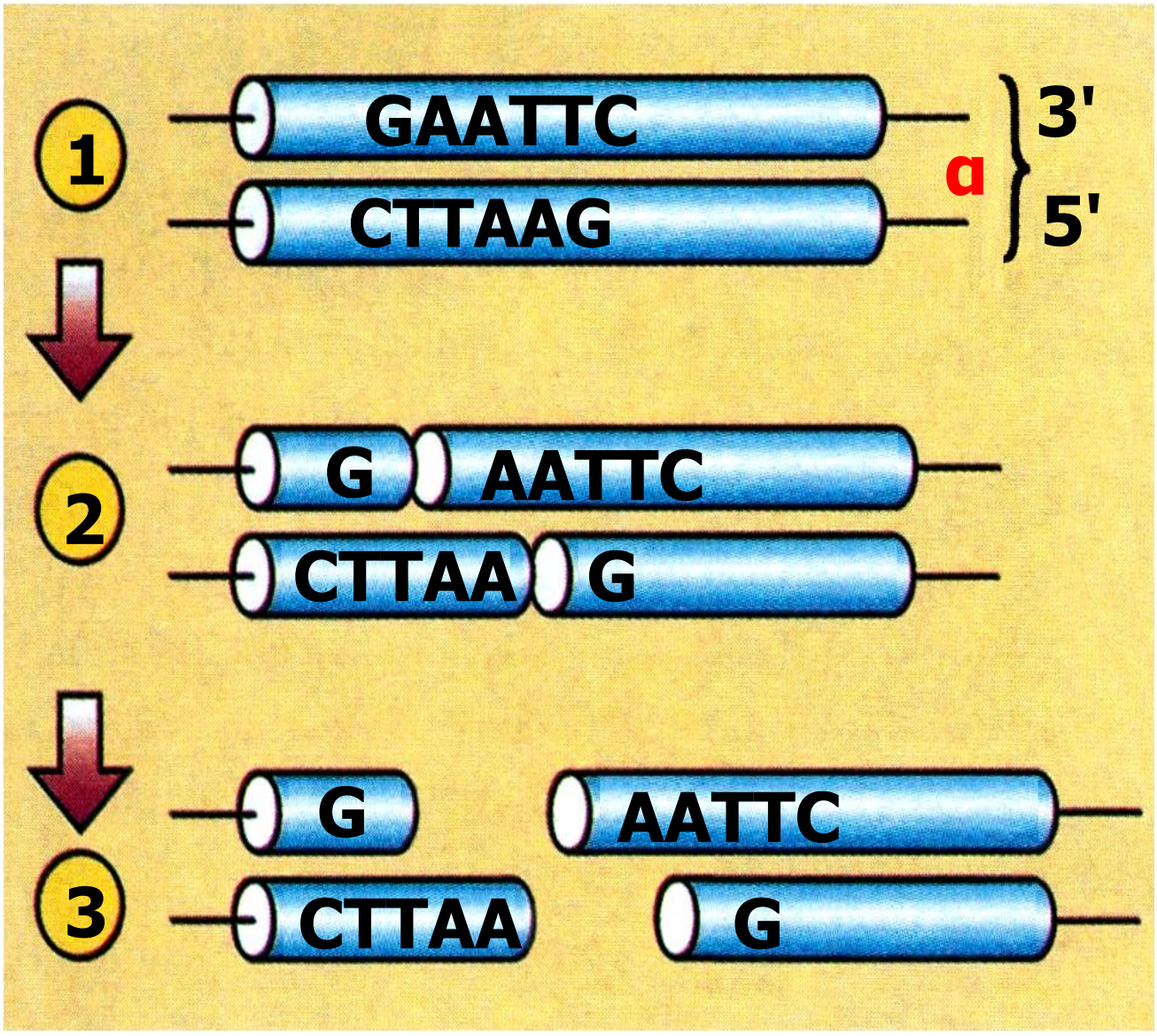
Escherichia coli (Εικόνα 4. 2). Το ένζυμο αυτό όποτε συναντά την αλληλουχία:

5’-G A A T T C-3’

3’-C T T A A G-5’

στο γονιδίωμα, κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A (με κατεύθυνση 5’→3’) αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο.

Εικόνα 4. 2 Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI αναγνωρίζει την αλληλουχία GAATTC στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA και την κόβει. α Διπλή έλικα DNA



Η αλληλουχία GAATTC υπάρχει διάσπαρτη στα γονιδιώματα των οργανισμών. Έτσι το γονιδίωμα ενός ανώτερου ευκαρυωτικού οργανισμού μπορεί να κοπεί σε χιλιάδες κομμάτια με την περιοριστική αυτή ενδονουκλεάση. Στη συνέχεια τα κομμάτια αυτά ενσωματώνονται σε ειδικούς φορείς. Οι πιο χαρακτηριστικοί τύποι φορέων είναι τα πλασμίδια και το DNA φάγων. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης έχουν τη συγκεκριμένη αλληλουχία μία μόνο φορά. Έτσι τα πλασμίδια κόβονται από την EcoRI σε αυτή τη θέση και δημιουργείται ένα γραμμικό μόριο DNA με μονόκλωνα άκρα. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού, αναμιγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά ά-

κρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση ενός ενζύμου, της DNA δεσμάσης. Όπως θυμάστε η DNA δεσμάση φυσιολογικά είναι έ-να από τα ένζυμα της αντιγραφής που συνδέει κομμάτια του DNA. Έ-τσι δημιουργούνται ανασυνδυα-σμένα πλασμίδια (Εικόνα 4. 3).

Μερικά πλασμίδια ξαναγίνονται κυκλικά, χωρίς να προσλάβουν DNA του οργανισμού.

Βακτήρια - ξενιστές δέχονται σε μικρό ποσοστό πλασμίδια, μερικά από τα οποία είναι ανασυνδυασμένα. Συνήθως χρησιμοποιούνται ως ξενιστές, βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά (βλ. Τόμος 1ος σελ. 69 / 18, 70 / 18, 71 / 18, 72 / 18, 73 / 18, 79 / 18, 80 / 18, 83 / 18, 82 / 18, 83 / 18 και 84 / 18).

Εικόνα 4. 3 Κατασκευή ανασυν-δυασμένου μορίου DNA.

1. Το DNA αμφιβίου κόβεται με την περιοριστική ενδονουκλέαση EcoRI

2. Το πλασμίδιο κόβεται με το έν-ζυμο EcoRI

3. Το πλασμίδιο συνδέεται με το τμήμα DNA του αμφιβίου

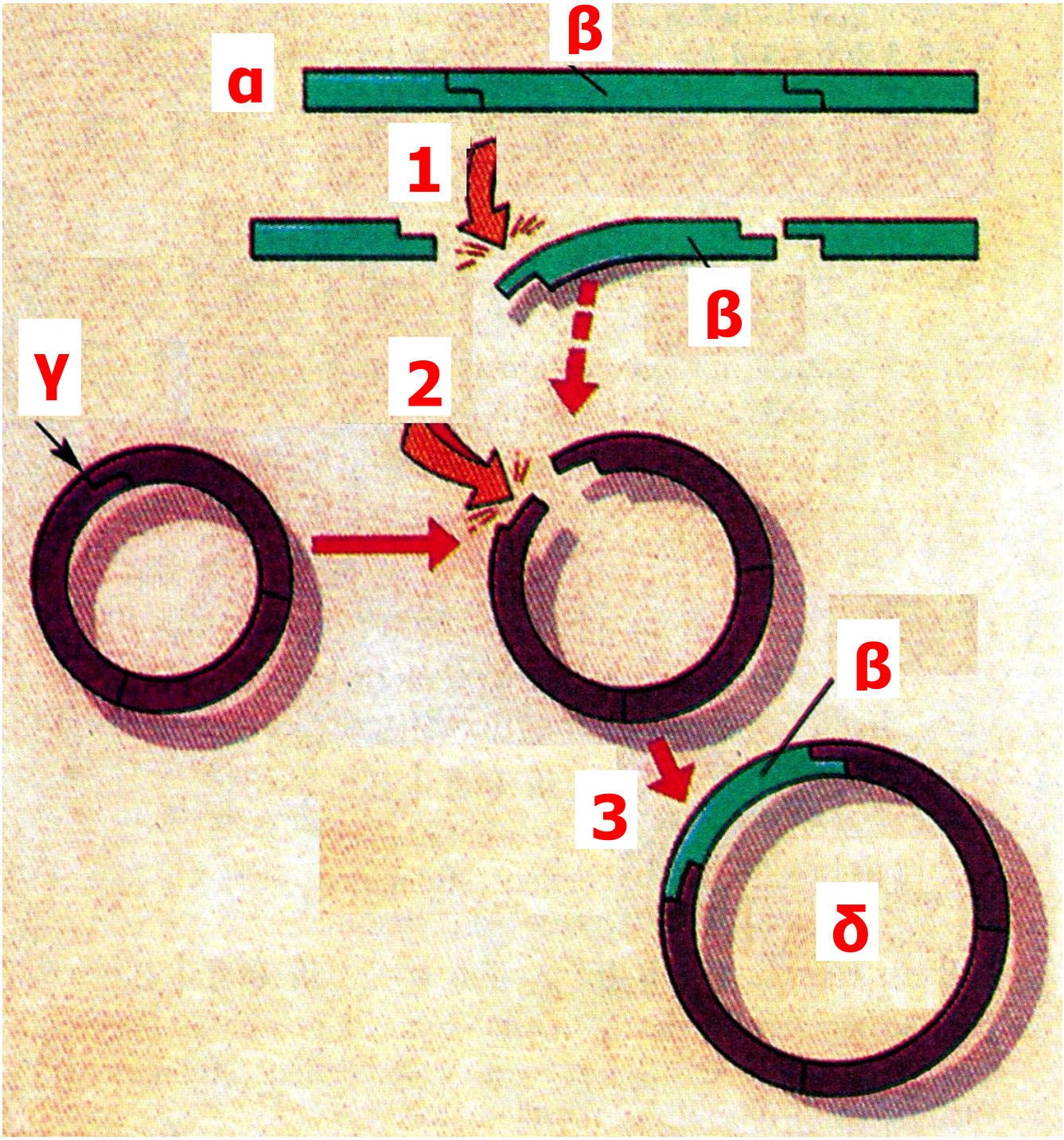
α. Δίκλωνο μόριο DNA αμφιβίου

β. Γονίδιο rRNA

γ. Σημείο που κόβεται το DNA

δ. Ανασυνδιασμένο πλασμίδιο

Εικόνα 4. 3 Κατασκευή ανασυν-δυασμένου μορίου DNA.



Για να μπει ένα πλασμίδιο μέσα στο βακτήριο, τα τοιχώματα του βακτηρίου γίνονται παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια, μετά από κατάλληλη κατεργασία (μετασχηματισμός). Η επιλογή των βακτηρίων που δέχτηκαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στηρίζεται στην ικανότητα ανάπτυξής τους παρουσία αντιβιοτικού, επειδή το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Κάθε βακτήριο που προσέλαβε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πολλαπλασιάζεται και δίνει έναν κλώνο. Η διαδικασία δημιουργίας κλώνων βακτηρίων ονομάζεται **κλωνοποίηση**. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων περιέχει το συνολικό

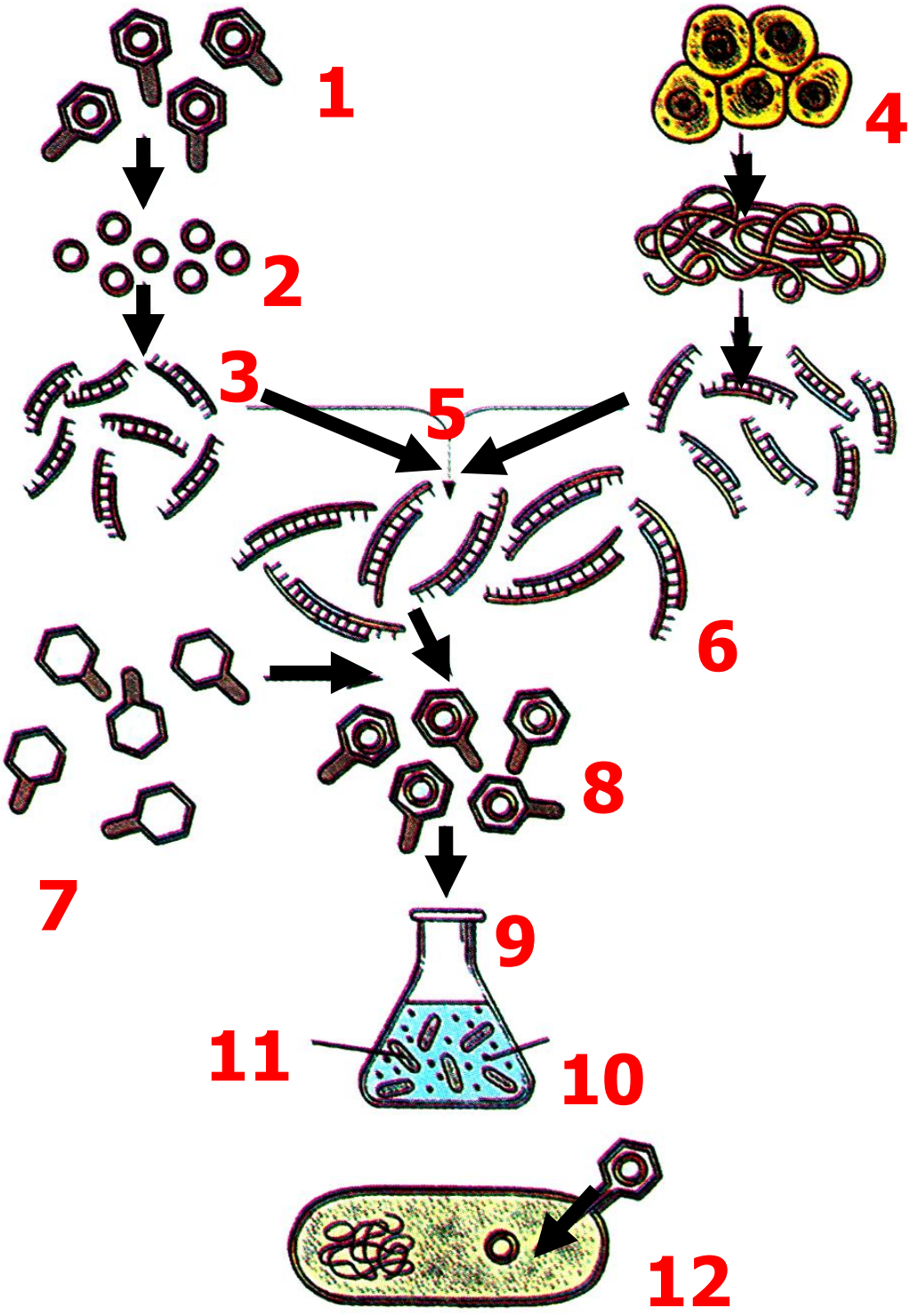
DNA του οργανισμού δότη και απότελεί μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη (Εικόνα 4. 1). Για να γίνει επιλογή ενός κλώνου που έχει ένα επιθυμητό γονίδιο χρησιμοποιούνται ειδικοί ανιχνευτές, με μια διαδικασία που θα αναλυθεί παρακάτω.

Η κλωνοποίηση σε πλασμίδια είναι σχετικά απλή και γι' αυτό τα πλασμίδια αποτελούν το συνηθέστερο φορέα κλωνοποίησης για οργανισμούς με μικρό γονιδίωμα. Ένας άλλος φορέας που χρησιμοποιείται ευρύτατα γιατί μπορεί να ενσωματώσει μεγαλύτερα κομμάτια ξένου DNA, είναι ο βακτηριοφάγος. Η στρατηγική της κλωνοποίησης είναι η ίδια με αυτήν που χρησιμοποιείται και στα πλασμίδια. (Εικόνα 4. 4).

Εικόνα 4. 4 Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

1. Βακτηριοφάγοι (φάγοι) 2. DNA που απομονώθηκε από τους φάγους 3. Κόψιμο με περιοριστική ενδονουκλεάση 4. Απομόνωση πυρηνικού DNA 5. Ανάμιξη 6. Ανασυνδιασμένα μόρια DNA 7. Πρωτεΐνες φάγου 8. Με την προσθήκη πρωτεϊνών του φάγου το ανασυνδυασμένο DNA "πακετάρεται" σ' αυτές σχηματίζοντας καινούριους φάγους 9. Προσθήκη φάγων στην καλλιέργεια βακτηρίων 10. Φάγος 11. Βακτήριο 12. Οι βακτηριοφάγοι προσκολλώνται στο βακτήριο και το DNA τους εισέρχεται στο κύτταρο

Εικόνα 4.4 Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.



Κλωνοποίηση του mRNA: Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης

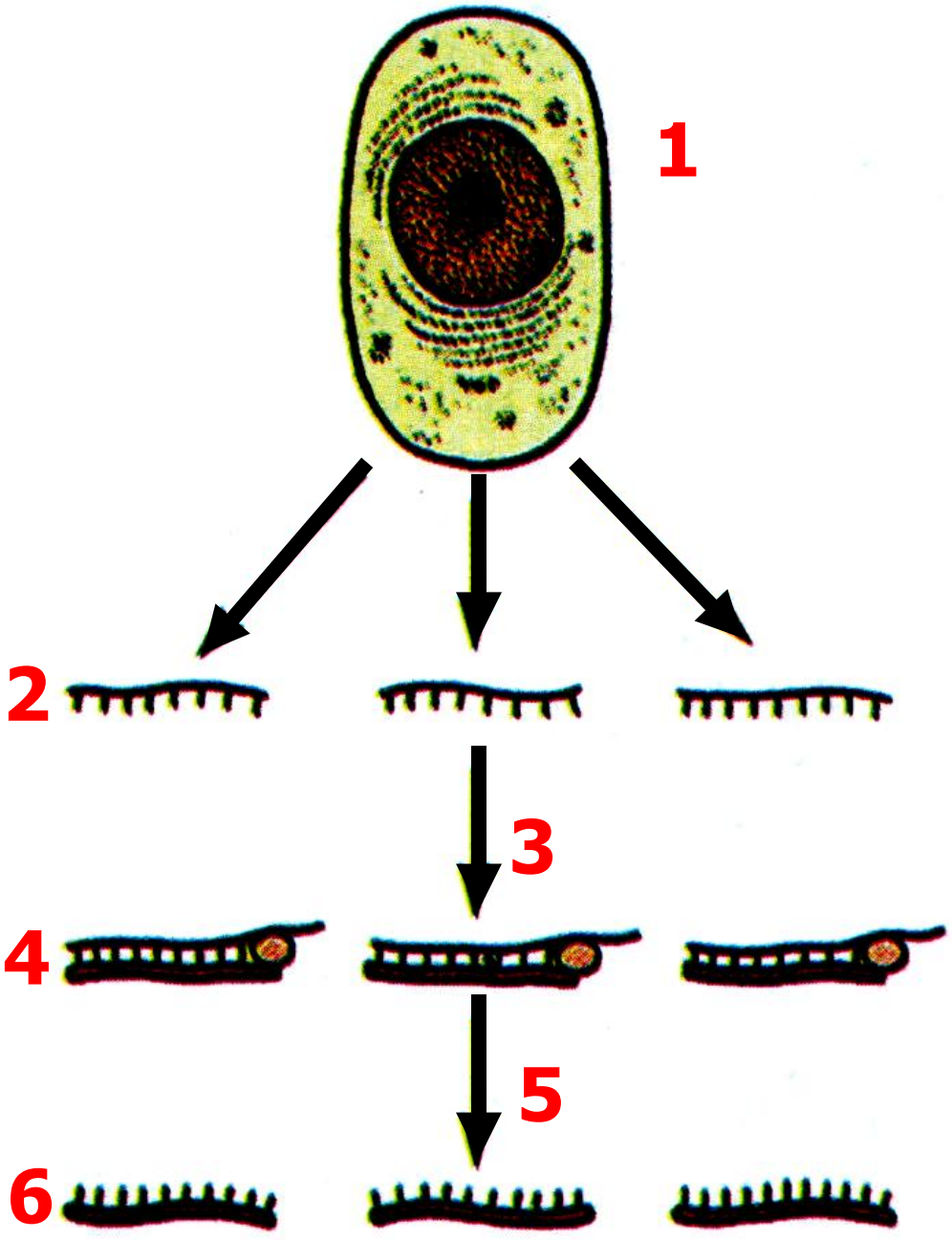
Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς πολλά γονίδια μεταγράφονται σε ορισμένους μόνο κυτταρικούς τύπους, όπως για παράδειγμα τα γονίδια των αλυσίδων των αιμοσφαιρινών που εκφράζονται μόνο στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα του ανεκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα, τότε κατασκευάζουμε τις cDNA βιβλιοθήκες. Οι cDNA βιβλιοθήκες περιέχουν αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά και έχουν το πλεονέκτημα απομόνωσης μόνο των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των εξωνίων.

Για να κατασκευαστεί μία cDNA βιβλιοθήκη, απομονώνεται το ολικό «ώριμο» mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο. Το mRNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA: complementary DNA). Η σύνθεση του cDNA γίνεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA-mRNA. Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αποδιατάσσεται με θέρμανση και τα cDNA χρησιμεύουν σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA. Τα δίκλωνα μόρια DNA εισάγονται σε πλασμίδια ή

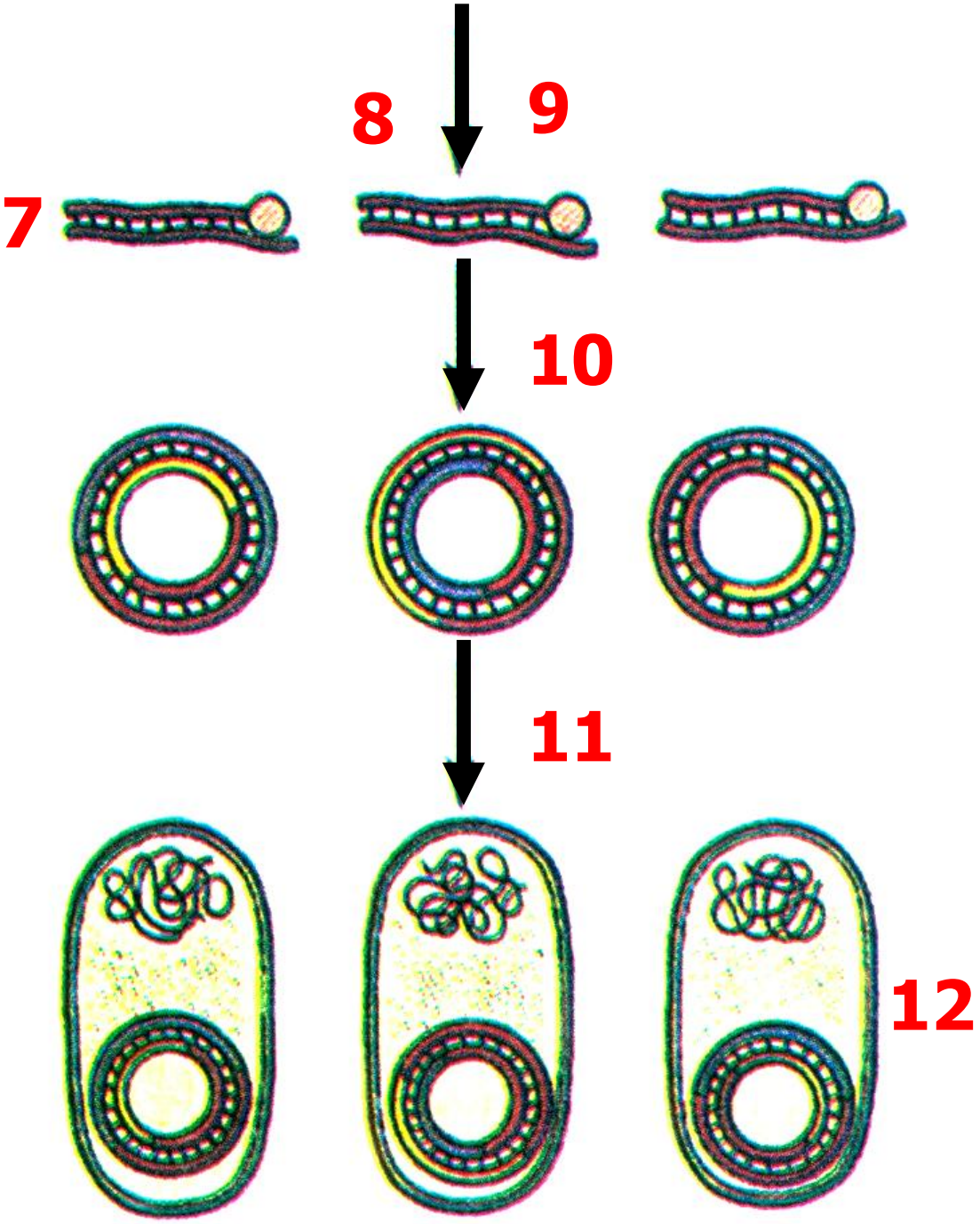
βακτηριοφάγους και κλωνοποιούνται με τη διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως. Με αυτό τον τρόπο δίνουν τη δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο-ξενιστή. (Εικόνα 4. 5).

Εικόνα 4.5 Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης.1. Απομόνωση mRNA 2. mRNA 3. Αντίστροφη μεταγραφάση 4. mRNA / cDNA 5. Αποχωρισμός αλυσίδων DNA με θέρμανση 6. cDNA 7. Δίκλωνο DNA 8. DNA πολυμεράση 9. Κατασκευή συμπληρωματικών αλυσίδων DNA 10. Σύνδεση του cDNA με το πλασμίδιο 11. Μετασχηματισμός: είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα-ξενιστές 12. Βιβλιοθήκη cDNA

Εικόνα 4. 5α Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης.



Εικόνα 4. 5β Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης.



Η υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κλώνων γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης

Η απομόνωση του συνολικού DNA από κύτταρα ενός προκαρυωτικού ή ευκαρυωτικού οργανισμού στο δοκιμαστικό σωλήνα είναι υπόθεση ρουτίνας. Αν επιδράσουμε στο DNA που απομονώθηκε με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αυξήσουμε τη θερμοκρασία τότε σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων και οι δύο αλυσίδες αποχωρίζονται η μία από την άλλη. Η διαδικασία αυτή λέγεται **αποδιάταξη**. Οι δύο μονόκλωνες συμπληρωματικές αλυσίδες σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν

να επανασυνδεθούν. Στην ιδιότητα αυτή στηρίζεται η διαδικασία της υβριδοποίησης που είναι η σύνδεση μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ή συμπληρωματικών DNA-RNA. Η **υβριδοποίηση** είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα του DNA που μας δίνει τη δυνατότητα αν έχουμε ένα γνωστό μόριο DNA, να το χρησιμοποιήσουμε ως ανιχνευτή για τον εντοπισμό του συμπληρωματικού του όταν το τελευταίο βρίσκεται μαζί με χιλιάδες άλλα κομμάτια.

Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει έναν τεράστιο αριθμό από κλωνοποιημένα κομμάτια χρωμοσωμικού DNA, τα οποία έχουν παραχθεί με δράση κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Ορισμένα

από τα κομμάτια αυτά περιέχουν ολόκληρα γονίδια, άλλα περιέχουν κομμάτια γονιδίων και άλλα τμήματα DNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Έτσι πρέπει μέσα από όλα αυτά τα κομμάτια να εντοπίσουμε αυτό που θέλουμε να μελετήσουμε. Η τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως περιλαμβάνει τη χρήση ιχνηθετημένων ανιχνευτών μορίων DNA ή RNA που περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές προς το κλωνοποιημένο DNA. Οι ανιχνευτές αναμειγνύονται με το DNA της βιβλιοθήκης (το οποίο έχει αποδιαταχθεί) και υβριδοποιούν μόνο το συμπληρωματικό τους DNA.

Η διαδικασία της υβριδοποίησης ακολουθείται και για την απομόνω-

ση ενός συγκεκριμένου γονιδίου από μια cDNA βιβλιοθήκη.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA

Η κατασκευή βιβλιοθηκών μας δίνει τη δυνατότητα να απομονώσουμε το βακτηριακό κλώνο που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια του κλώνου και δημιουργούνται πολλά αντίγραφα του γονιδίου που περιέχει. Η δημιουργία πολλών αντιγράφων είναι απαραίτητη προϋπόθεση τόσο για τη μελέτη του συγκεκριμένου γονιδίου όσο

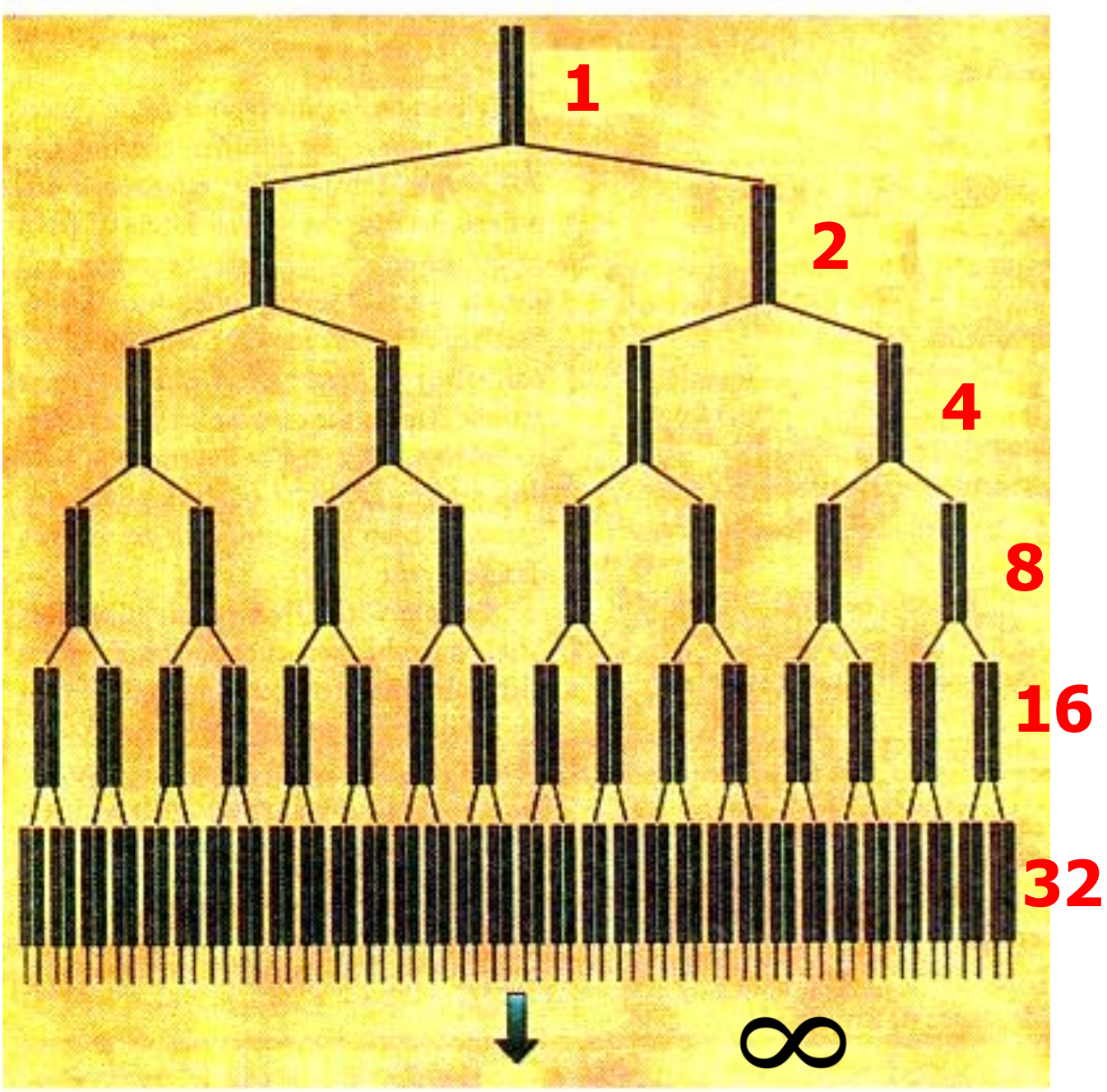
και για την παραγωγή της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί.

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR:Polymerase Chain Reaction) μας επιτρέπει να αντιγράψουμε επιλεκτικά, εκατομμύρια φορές, ειδικές αλληλουχίες DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου (Εικόνα 4. 6). Η τεχνική αυτή που άρχισε να εφαρμόζεται ευρέως από το 1985 έχει αυξήσει την ευαισθησία των γενετικών αναλύσεων και έχει πολλές πρακτικές εφαρμογές.

Για παράδειγμα χρησιμοποιείται στην Ιατρική για τη διάγνωση ασθενειών όπως του AIDS, στην εγκληματολογία για τη διαλεύκανση υποθέσεων και στη μελέτη DNA από απολιθώματα.

Εικόνα 4. 6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Οι αριθμοί δεξιά της εικόνας φανερώνουν το πλήθος των αντιγράφων.



Χρήσιμες πρωτεΐνες από ανασυνδυασμένα βακτήρια

Η κατασκευή του cDNA δίνει τη δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης ενός συγκεκριμένου γονιδίου, που ανήκει σε ευκαρυωτικό οργανισμό, μέσα σε βακτήρια.

Οι ερευνητές Walter Gilbert και Lydia Villa-Komaroff κατόρθωσαν να συνθέσουν προϊνσουλίνη ποντικού με την παρακάτω διαδικασία: Αρχικά χρησιμοποιείται το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση για να μεταφέρει τη γενετική πληροφορία για τη σύνθεση της πρωτεΐνης, από το mRNA που έχει απομονωθεί από κύτταρα ποντικού, σε ένα μονόκλωνο cDNA. Το «καλούπι» mRNA στη συνέχεια καταστρέφεται (με την επί-

δραση βάσης) και, με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση, συντίθεται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA, ο οποίος είναι συνέχεια του πρώτου. Ένα τρίτο ένζυμο, η S1 νουκλεάση, διασπά τη «φουρκέτα» που ενώνει τους δύο συμπληρωματικούς κλώνους δημιουργώντας ένα δίκλωνο μόριο.

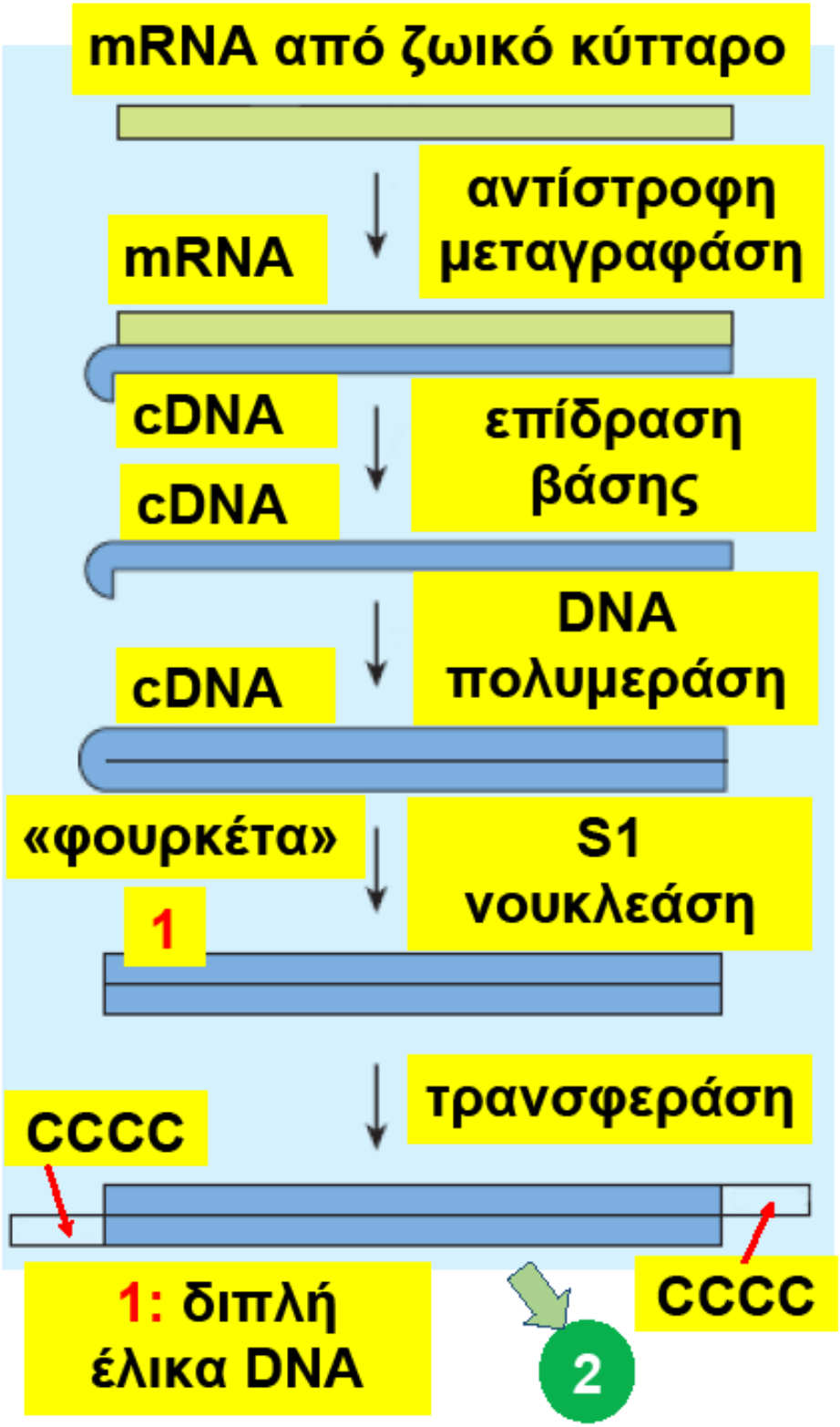
Στο επόμενο βήμα το δίκλωνο «ξένο» DNA ενώνεται με ένα πλασμίδιο ως εξής: Μια τρανσφεράση επιμηκύνει τα 3’ άκρα του προσθέτοντας μια μικρή αλληλουχία όμοιων νουκλεοτιδίων (στην περίπτωση αυτή 4 νουκλεοτίδια κυτοσίνης). Ομοίως επιμηκύνονται τα κομμένα 3’ άκρα του DNA του πλασμιδίου, με την προσθήκη μιας αλληλουχίας συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων

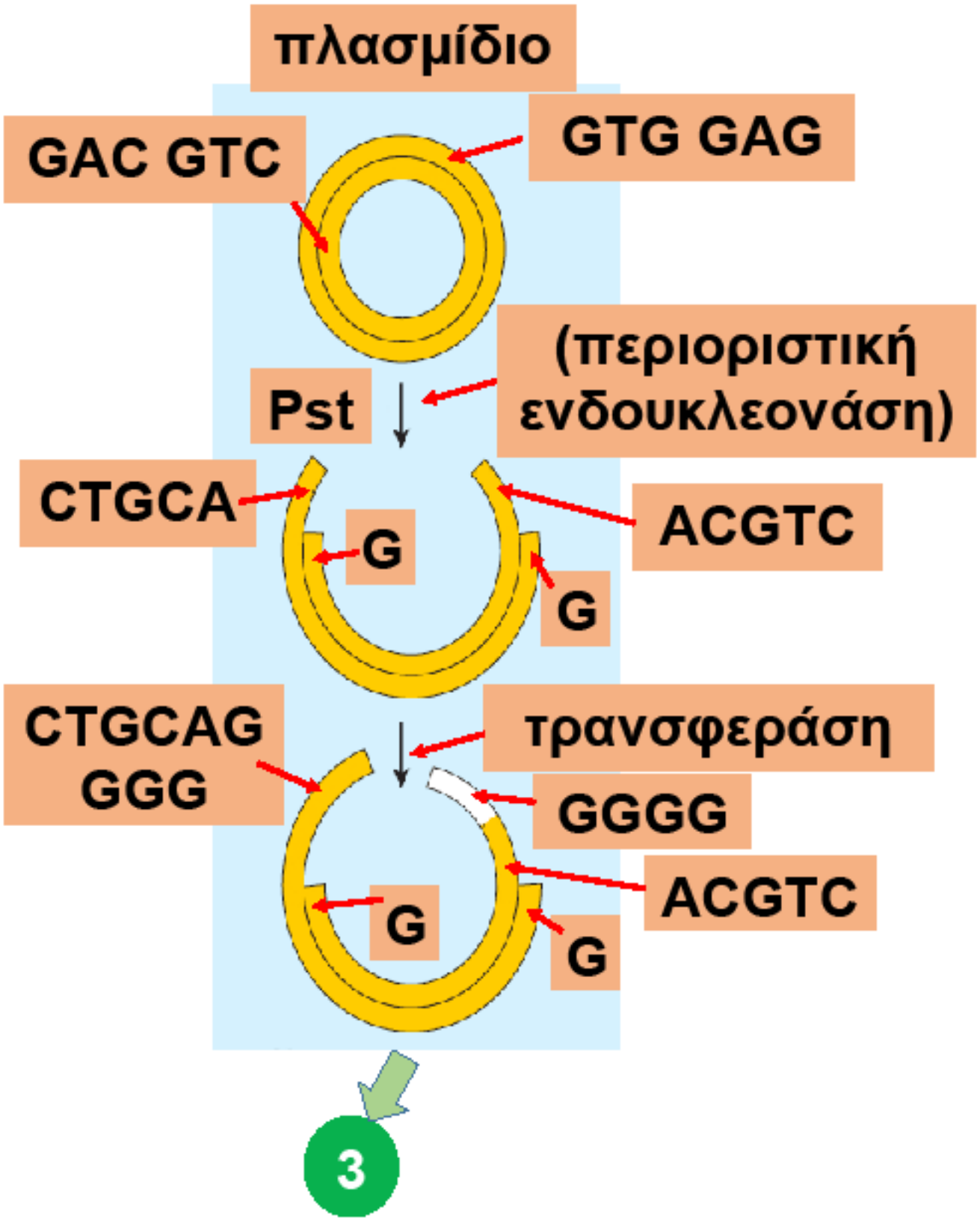
(4 νουκλεοτίδια γουανίνης). Οι συμπληρωματικές βάσεις των μονόκλωνων άκρων σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και τα δύο μόρια DNA ενώνονται. Τέλος, ένζυμα του βακτηρίου συμπληρώνουν τα κενά ενσωματώνοντας πλήρως το «ξένο» DNA μέσα στο DNA του πλασμιδίου, το οποίο με τη σειρά του χρησιμεύει σαν φορέας εισαγωγής του DNA αυτού μέσα σε βακτήριο-ξενιστή.

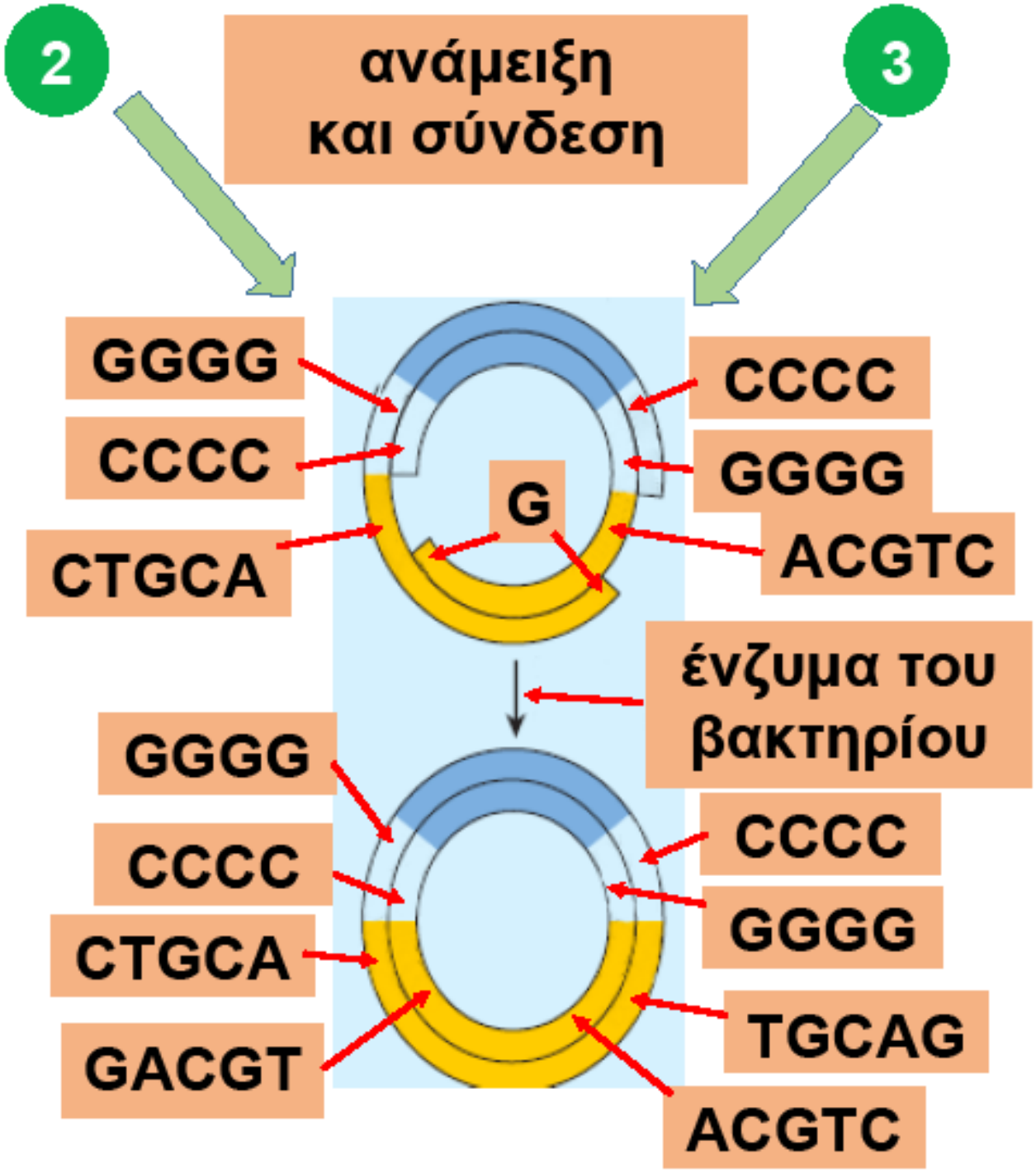
Το συγκεκριμένο πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε από τους Walter Gilbert και Lydia Villa-Komaroff προσδιορίζεται ως pBR322 και περιέχει δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (την πενικιλίνη και την τετρακυκλίνη). Το πλασμίδιο κόβεται με την περιοριστική ενδο-

νουκλεάση Pst σε μια αλληλουχία αναγνώρισης που βρίσκεται στη μέση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πενικιλινάση (ένζυμο που διασπά την πενικιλίνη). Η ενσωμάτωση του «ξένου» DNA καταστρέφει την ενζυμική δράση της πενικιλινάσης, ενώ η ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη παραμένει και χρησιμοποιείται για να επιλεγούν τα βακτήρια που έχουν δεχθεί το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Χρήσιμες πρωτεΐνες από ανασυν-δυασμένα βακτήρια




πλασμίδιο
GAC GTC
GTG GAG
(περιοριστική ενδουκλεονάση)
Pst
CTGCA
ACGTC
G
G
CTGCAG GGG
τρανσφεράση
GGGG
ACGTC
G
G
3


2
ανάμειξη
και σύνδεση
3
GGGG
CCCC
CTGCA
CCCC
GGGG
ACGTC
G
ένζυμα του
βακτηρίου
GGGG
CCCC
CTGCA
GACGT
CCCC
GGGG
TGCAG
ACGTC

Αποτυπώματα DNA (DNA fingerprinting)

Μια επαναστατική μέθοδος που ονομάζεται μέθοδος αποτυπωμάτων DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν άτομα, με εξαίρεση τους μονοζυγωτικούς διδύμους, που να έχουν το ίδιο ακριβώς DNA. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη διαλεύκανση εγκλημάτων και την αναγνώριση της ταυτότητας ατόμων. Σύμφωνα με αυτή το DNA ενός ατόμου, π.χ. του υπόπτου, συγκρίνεται με το DNA που απομονώνεται από βιολογικό υλικό, όπως εκριζωμένες τρίχες, ή κηλίδα σπέρματος, το οποίο βρέθηκε στο χώρο του εγκλήματος. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης του DNA μας δίνουν

τη δυνατότητα να συμπεράνουμε αν τα δύο δείγματα προέρχονται από το ίδιο άτομο ή όχι.

Πατέρας της μεθόδου αυτής είναι ο Άλεκ Τζέφρις, ο οποίος ανακάλυψε έναν τρόπο εντοπισμού ορισμένων περιοχών του DNA, που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στον ανθρώπινο πληθυσμό. Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου έγινε στη Μεγάλη Βρετανία. Στις 21 Νοεμβρίου 1985, η 15χρονη Λίντα Μαν βρέθηκε δολοφονημένη μετά από βιασμό σε ένα ερημικό δρόμο στο Λεϊσεστερσάιρ. Στις 31 Ιουλίου 1986 σε γειτονικό χωριό βρέθηκε επίσης δολοφονημένη μετά από βιασμό η 15χρονη Ντον Άσγουορθ. Η τοπική Αστυνομία αποφάσισε να υποβάλει σε ανάλυση DNA, από δείγμα αίματος, όλους τους άρρενες κατοίκους

τριών χωριών της περιοχής, ηλικίας 13-30 χρονών. Πεντέμισι χιλιάδες άτομα πέρασαν από το τεστ προκειμένου να συγκριθεί το DNA τους με το DNA του βιαστή που απομονώθηκε από τα ίχνη σπέρματος στα θύματά του. Στα τέλη Σεπτεμβρίου και ενώ οι αναλύσεις δεν είχαν ακόμη τελειώσει, ο 27χρονος Κόλιν Πίτσφορκ, διέφυγε από τη δειγματοληψία αίματος. Το γεγονός αυτό έγινε γνωστό και η Αστυνομία υπέβαλε σε υποχρεωτική εξέταση τον Κ. Πίτσφορκ και έστειλε δείγμα αίματός του για ανάλυση DNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το DNA του υπόπτου ήταν το ίδιο με το DNA που απομονώθηκε από τα θύματα.

Ο δράστης παραπέμφθηκε στη δικαιοσύνη και του επιβλήθηκε ποινή κάθειρξης είκοσι ετών. Τα λόγια που είπε ο δικαστής ήταν ότι, χωρίς τα αποτελέσματα της ανάλυσης DNA, ο δράστης ίσως να κυκλοφορούσε ακόμη ελεύθερος. Η μέθοδος ανάλυσης αποτυπωμάτων DNA χρησιμοποιείται επίσης και για την εξακρίβωση ταυτότητας πτωμάτων σε περιπτώσεις που αυτά είναι παραμορφωμένα από σεισμούς, πυρκαγιές, αεροπορικά δυστυχήματα κτλ. Χρήση της μεθόδου αυτής γίνεται επίσης στις περιπτώσεις όπου αμφισβητείται η πατρότητα ενός παιδιού.

Στην περίπτωση αυτή DNA που απομονώνεται από το αίμα του παιδιού, συγκρίνεται με το DNA από το αίμα του υπό αμφισβήτηση πατέρα και με το DNA της μητέρας.

Το γεγονός ότι το γενετικό αποτύπωμα του παιδιού είναι αποτέλεσμα συνδυασμού του γενετικού αποτυπώματος της μητέρας και αυτό του πατέρα, μας επιτρέπει την ταυτοποίηση του πατέρα.

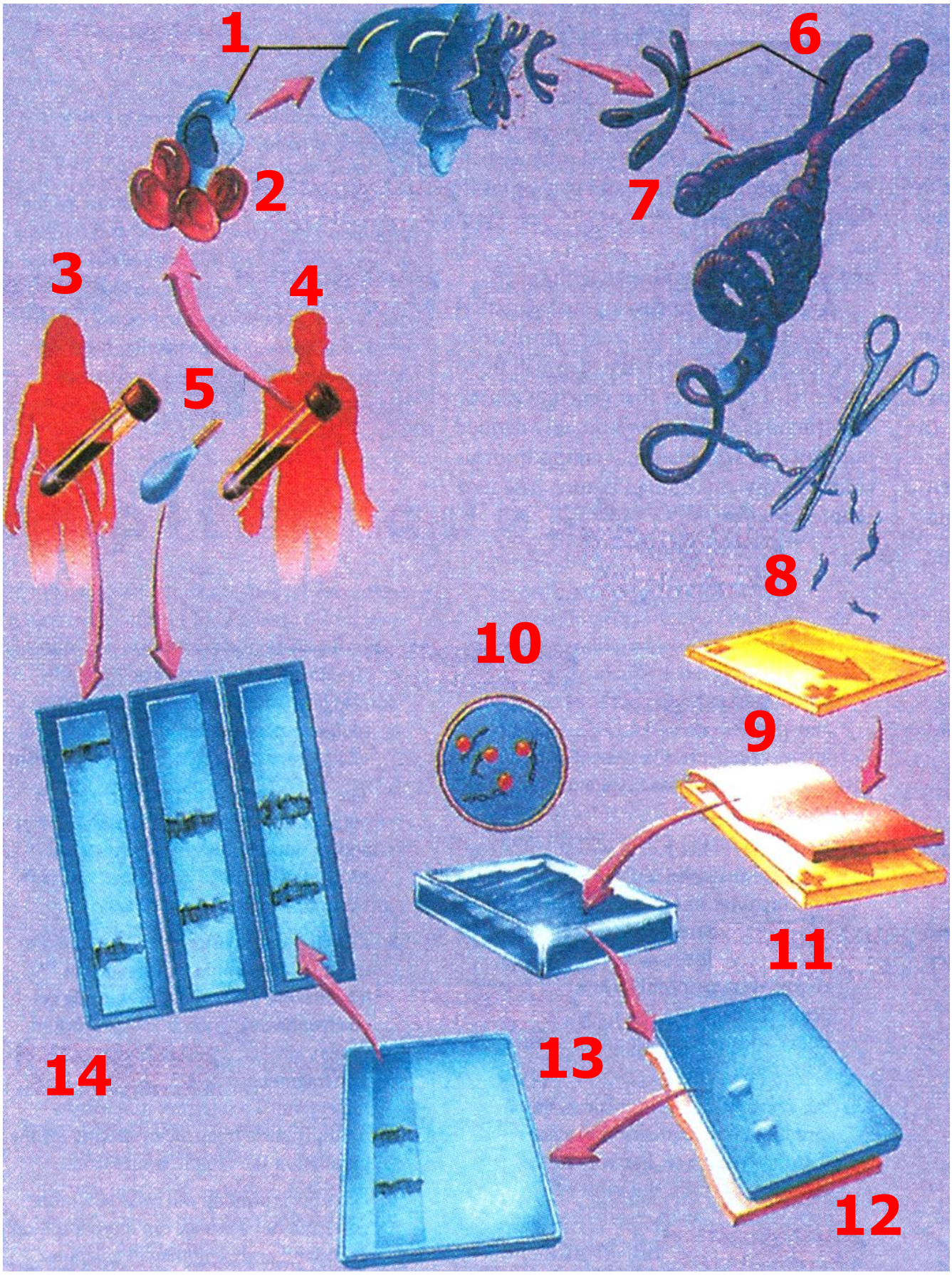
Στην Ελλάδα η εξέταση του DNA γίνεται από το 1994 και ως σήμερα έχουν διερευνηθεί πάνω από 650 περιπτώσεις. Πολλές από αυτές αφορούν πολύκροτες υποθέσεις που έχουν δει τα φώτα της δημοσιότητας όπως αυτή της διπλής δολοφονίας του επιχειρηματία Γ. Νικολαΐδη και της φίλης του Σ. Καλαθάκη, καθώς και την αναγνώριση της ταυτότητας των δύο θυμάτων που είχαν βρεθεί σε κατάσταση αποσύνθεσης στη θέση Κρόνιζα Λεονταρίου στη Βοιωτία. Τα δύο πτώματα, όπως διαπιστώθηκε, ήταν του δραπέτη των φυλακών της Κέρκυρας Μ. Αδαμαντίδη και της φίλης του Α. Βλαχοστεργίου.

Τα στάδια που ακολουθεί η μέθοδος αποτυπωμάτων DNA είναι τα εξής:

- **Απομόνωση του DNA από τον ύποπτο και από το βιολογικό υλικό.**
- **Πολλαπλασιασμός πολυμορφικών περιοχών του μορίου DNA με τη μέθοδο PCR.**
- **Διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση των συγκεκριμένων περιοχών (βλ. ένθετο).**
- **Ανάλυση αποτελεσμάτων.**

Εικόνα

1. Λευκά αιμοσφαίρια
2. Δείγμα αίματος υπόπτου
3. Θύμα
4. Ύποπτος
5. Σπέρμα βιαστή
6. Χρωμοσώματα
7. Απομόνωση DNA
8. Κόψιμο της αλυσίδας του DNA
9. Ηλεκτροφόρηση
10. Ραδιενεργός ανιχνευτής
11. Μεταφορά σε φίλτρο
12. Αυτοραδιογραφία
13. Υβριδισμός
14. Αποτυπώματα DNA


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

Περίληψη

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA έχει ως στόχο την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό ειδικών αλληλουχιών DNA μετά από ενσωμάτωσή τους σε μόρια φορείς. Τα ανασυνδυασμένα μόρια που προκύπτουν εισάγονται σε βακτήρια E.coli και πολλαπλασιάζονται.

Οι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες κατασκευάζονται μετά από κόψιμο του ολικού DNA ενός οργανισμού με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ενσωμάτωση των κομματιών σε μόρια φορείς όπως πλασμίδια ή φάγους, και εισαγωγή τους, μετά από μετασχηματισμό, σε βακτήρια E.coli. Κάθε βακτήριο περιέχει ένα

μόνο τμήμα DNA και δίνει γένεση σε έναν κλώνο. Η διαδικασία ονομάζεται κλωνοποίηση. Κάθε γονιδιωματική βιβλιοθήκη αποτελείται από χιλιάδες κλώνους που αντιπροσωπεύουν όλο το γονιδίωμα του οργανισμού. Ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA ή γονίδιο επιλέγεται με τη βοήθεια DNA ανιχνευτών.

Οι cDNA βιβλιοθήκες κατασκευάζονται από mRNA που απομονώνεται από διαφοροποιημένα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αρχικά από το mRNA παράγεται δίκλωνο DNA, μέσω του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, το οποίο ενσωματώνεται σε μόρια φορείς και στη συνέχεια εισάγεται σε βακτήρια. Από τις cDNA βιβλιοθήκες μπορεί να επιλεγεί ένα γονίδιο που αποτελείται μό-

νο από τις περιοχές που κωδικοποιούν αμινοξέα. Το γονίδιο, μετά από κάποιες τροποποιήσεις, μπορεί να παράγει μια πρωτεΐνη σε μεγάλη ποσότητα. Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ένα τμήμα DNA πολλαπλασιάζεται μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα απουσία κυττάρων.

Ταξίδι στο χρόνο

1972 Δημιουργείται το πρώτο ανασυνδυασμένο μόριο DNA σε εργαστηριακές συνθήκες (in vitro).

1974 Επιτυγχάνεται η κλωνοποίηση ευκαρυωτικών γονιδίων σε βακτηριακά πλασμίδια.

1977 Επιτυγχάνεται η ανάπτυξη τεχνικών προσδιορισμού της αλληλουχίας βάσεων του DNA.

1981 Επιτυγχάνεται η παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών και μυγών.

1982 Παράγεται ανθρώπινη ινσουλίνη με χρήση τεχνικών της Γενετικής Μηχανικής και παίρνει άδεια χρήσης για διαβητικούς. «Απελευθερώνεται» στο φυσικό περιβάλλον το πρώτο γενετικά τροποποιημένο φυτό, ο καπνός.

1987 Αναπτύσσεται η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction) που χρησιμοποιείται στον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA.

Εργασίες - Δραστηριότητες

Κάνετε έναν κατάλογο των φαινομένων και τεχνικών που συζητούνται στο κεφάλαιο αυτό και εξαρτώνται από τη συμπληρωματικότητα των βάσεων.

Ερωτήσεις

1. Γιατί οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες και οι φορείς κλωνοποίησης είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική;

2. Τι είναι μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη:

α. ένας κλώνος βακτηρίων που περιέχει ένα τμήμα DNA ενός οργανισμού

β. μια συλλογή βιβλίων για κλώνους

γ. ένα σύνολο από κλώνους βακτηρίων που ο καθένας έχει ένα πλασμίδιο με διαφορετικό τμήμα DNA ενός οργανισμού

δ. ένα σύνολο από περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται

για να παράγουν διαφορετικούς κλώνους

ε. τίποτε από τα παραπάνω.

Ποια είναι η σωστή απάντηση;

3. Θα μπορούσε να αναπτυχθεί η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA αν ο γενετικός κώδικας δεν ήταν καθολικός;

Αιτιολογείστε την απάντησή σας.

4. Εξηγείστε με σχήματα το πώς παράγεται το cDNA και το πώς χρησιμοποιείται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA.

5. Συμπληρώστε με τις κατάλληλες λέξεις τα κενά στο κείμενο:

Το DNA κόβεται με .....

.....

σε κομμάτια με γνωστά άκρα. Τα κομμάτια συνδέονται με ένα

....
που έχει συμπληρωματικά άκρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου που λέγεται .....
Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί από το .....
με τη βοήθεια ενζύμου που ονομάζεται .....
και να συνδεθεί με ένα.....
.....
Το ανασυνδυασμένο μόριο εισάγεται κατόπιν σε .....
6.Ποια κύτταρα θα χρησιμοποιούσατε για να κατασκευάσετε μία cDNA βιβλιοθήκη, εάν θα θέλατε να συνθέσετε με τη μέθοδο αυτή:

α. Ινσουλίνη

β. Αιμοσφαιρίνη

γ. Αντισώματα

δ. Μυοσίνη.

7. Για ποιο λόγο, κατά την ενσωμάτωση DNA ευκαρυωτικού οργανισμού σε πλασμίδιο, χρησιμοποιείται η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση για να κόψει το πλασμίδιο και το DNA του οργανισμού;

8. Ποιος είναι ο ρόλος των παρακάτω στις τεχνικές Γενετικής Μηχανικής;

α. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

β. Πλασμίδια

γ. Βακτήρια.

9. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

α. παράγονται φυσιολογικά από ευκαρυωτικά κύτταρα

β. κόβουν μονόκλωνα μόρια DNA

γ. κόβουν το DNA σε πολύ εξειδικευμένες θέσεις

δ. εισάγονται στα βακτήρια από τους βακτηριοφάγους.

Ποια από τις προτάσεις αυτές είναι σωστή;

10. Ποια από τις παρακάτω προτάσεις που αφορούν την DNA δεσμάση είναι λανθασμένη;

α. είναι ένζυμο

β. είναι φυσιολογικό συστατικό των κυττάρων

γ. μπορεί να ενώνει κομμάτια στο ανασυνδυασμένο DNA

δ. παίρνει μέρος στην αντιγραφή του DNA

ε. ενώνει πολυπεπτίδια.

11. Τι είναι ή σε τι χρησιμοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR);

α. Είναι μέθοδος εύρεσης της ακολουθίας βάσεων του DNA.

β. Χρησιμοποιείται για να ανιχνεύει ένα ειδικό τμήμα DNA.

γ. Χρησιμοποιείται για να παράγει μεγάλες ποσότητες ενός ειδικού τμήματος DNA.

δ. Χρησιμοποιείται για τη χαρτογράφηση γονιδίων.

12. Σε πείραμα Γενετικής Μηχανικής χρησιμοποιείται πλασμίδιο το οποίο έχει δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντίστοιχα αντιβιοτικά: το ένα γονίδιο προσδίδει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη και το άλλο σε στρεπτομυκίνη. Στο πλασμίδιο αυτό εισάγε-

ται τμήμα DNA μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας της αμπικιλίνης. Στη συνέχεια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μετασχηματίζονται κύτταρα Escherichia coli που δεν είναι ανθεκτικά σε κανένα από τα δύο αντιβιοτικά. Αναλύστε τον τρόπο με τον οποίο μπορούν να επιλεγούν τα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ 3ου ΤΟΜΟΥ

3 Ιοί..... 11

- Δομή των ιών..... 17
- Κύκλος ζωής των βακτηριοφάγων..... 21
- Ιοί ζώων..... 29
- Ιοί φυτών και ιοειδή..... 44
- Περίληψη 50
- Ερωτήσεις 51

4 Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA..... 55

- Μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει όλο το γονιδίωμα ενός οργανισμού..... 68
- Κλωνοποίηση του mRNA: Κατασκευή cDNA Βιβλιοθήκης..... 80

- **Η υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κλώνων γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης..... 85**
- **Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA..... 88**
- **Περίληψη 108**
- **Ερωτήσεις 113**

Βάσει του ν. 3966/2011 τα διδακτικά βιβλία του Δημοτικού, του Γυμνασίου, του Λυκείου, των ΕΠΑ.Λ. και των ΕΠΑ.Σ. τυπώνονται από το ΙΤΥΕ - ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ και διανέμονται δωρεάν στα Δημόσια Σχολεία. Τα βιβλία μπορεί να διατίθενται προς πώληση, όταν φέρουν στη δεξιά κάτω γωνία του εμπροσθόφυλλου ένδειξη «ΔΙΑΤΙΘΕΤΑΙ ΜΕ ΤΙΜΗ ΠΩΛΗΣΗΣ». Κάθε αντίτυπο που διατίθεται προς πώληση και δεν φέρει την παραπάνω ένδειξη θεωρείται κλεψίτυπο και ο παραβάτης διώκεται σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 7 του νόμου 1129 της 15/21 Μαρτίου 1946 (ΦΕΚ 1946,108, Α΄).

Απαγορεύεται η αναπαραγωγή οποιουδήποτε τμήματος αυτού του βιβλίου, που καλύπτεται από δικαιώματα (copyright), ή η χρήση του σε οποιαδήποτε μορφή, χωρίς τη γραπτή άδεια του Υπουργείου Παιδείας, Θρησκευμάτων και Αθλητισμού / ΙΤΥΕ - ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ.