



ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

10

Για να κατανοήσουμε έναν οργανισμό όσον αφορά την αύξηση, τη διαφοροποίηση, και την αναπαραγωγή, είναι απαραίτητη η κατανόηση του συνόλου των γονιδίων του, καθώς και των λειτουργιών τους. Βασική προϋπόθεση για τα παραπάνω αποτελεί η δυνατότητα χειρισμού του γενετικού υλικού του οργανισμού. Για τη γενετική μελέτη των προκαρυωτικών οργανισμών υπάρχει μια πληθώρα τεχνικών, που εκτελούνται τόσο εντός του οργανισμού (*in vivo*), όσο και στον δοκιμαστικό σωλήνα (*in vitro*). Μεταλλάξεις στα γονίδια ενός οργανισμού οδηγούν σε ποικιλία φαινοτύπων. Κάποιες από τις μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε ευδιάκριτες αλλαγές στα χαρακτηριστικά του οργανισμού, όπως εκείνες που καθορίζουν το χρώμα των αποικιών του *Halobacterium*, μέλους των *Αρχαίων*, που διακρίνονται στην παρακάτω εικόνα.

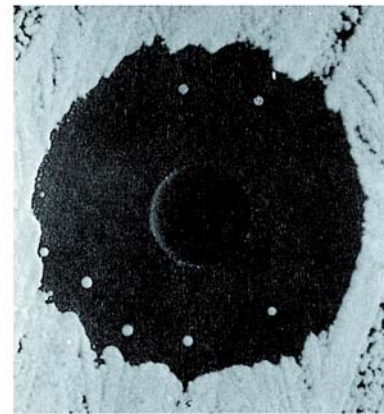
Μετάλλαξη και Ανασυνδυασμός

- **Μετάλλαξη ή μεταλλαγή** είναι οποιαδήποτε **κληρονομήσιμη** αλλαγή της αλληλουχίας των βάσεων του νουκλεϊκού οξέος, που αποτελεί το γονιδίωμα (σύνολο των γονιδίων) ενός οργανισμού ή ιού.
- **Γενετικός ανασυνδυασμός** είναι η διαδικασία μέσω της οποίας γενετικά στοιχεία από διαφορετικά μέρη ενός γονιδιώματος (ή μέρη διαφορετικών γονιδιωμάτων) συνενώνονται σε ένα νέο γενετικό στοιχείο
- Για να διαπιστωθεί πειραματικά η γενετική ανταλλαγή μεταξύ δύο οργανισμών χρησιμοποιούμε **γενετικούς δείκτες** (δηλ γονίδια που συνδέονται με εύκολα αναγνωρίσιμα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά)
- Στελέχη μικροοργανισμών που φέρουν μεταλλάξεις ονομάζονται **μεταλλαγμένα** ενώ τα αρχικά στελέχη (συνήθως απομονωμένα από την φύση) ονομάζονται **άγριου ή φυσικού τύπου**

Απομόνωση μεταλλαγμάτων

- Θεωρητικά κάθε χαρακτηριστικό ενός οργανισμού μπορεί να τροποποιηθεί μέσω μετάλλαξης. Κάποιες αλλαγές χαρακτηριστικών είναι **επιλέξιμες** (προσδίδουν πλεονέκτημα στους οργανισμούς) ενώ άλλες **μη επιλέξιμες** (δεν προσδίδουν προφανές πλεονέκτημα σε κάποιες συνθήκες)
- Οι μεταλλάξεις που μας ενδιαφέρουν μπορούν να εντοπιστούν μέσω της **διαλογής** (screening) μεγάλου αριθμού αποικιών μικροοργανισμών ή της **επιλογής** (εφαρμογή συγκεκριμένου περιβάλλοντος)

Εικόνα 10.1 Διάφορα είδη μεταλλαγμένων στελεχών. (α) Ανάπτυξη μεταλλαγμάτων ανθεκτικών σε αντιβιοτικό εντός της ζώνης αναστολής αντιβιογράμματος δισκίου. (β) Έγχρωμα και άχρωμα μεταλλαγμένα στελέχη του μύκητα *Aspergillus nidulans*. Ο άγριος τύπος έχει πράσινη χρωστική. Οι άσπρες αποικίες δεν σχηματίζουν χρωστική, ενώ οι κίτρινες δεν μπορούν να μετατρέψουν την κίτρινη χρωστική που παράγουν στο φυσιολογικό πράσινο χρώμα. (γ) Μεταλλαγμένες αποικίες ενός είδους *Archaei*, του *Halobacterium*. Οι άσπρες αποικίες είναι άγριου τύπου. Οι καστανοπορτοκαλόχρωμες αποικίες είναι μεταλλαγμένες ως προς τον σχηματισμό αεροκυστιδίων (🔗 Τμήμα 4.14). Οι αποικίες με διακριτούς τομείς είναι το αποτέλεσμα της μεταλλαγμένης δράσης μεταθετών στοιχείων (βλ. Τμήμα 10.11).



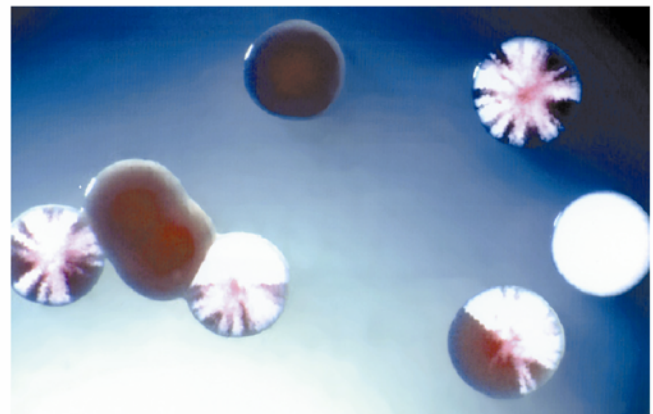
T. D. Brock

(α)



Peter T. Bergia

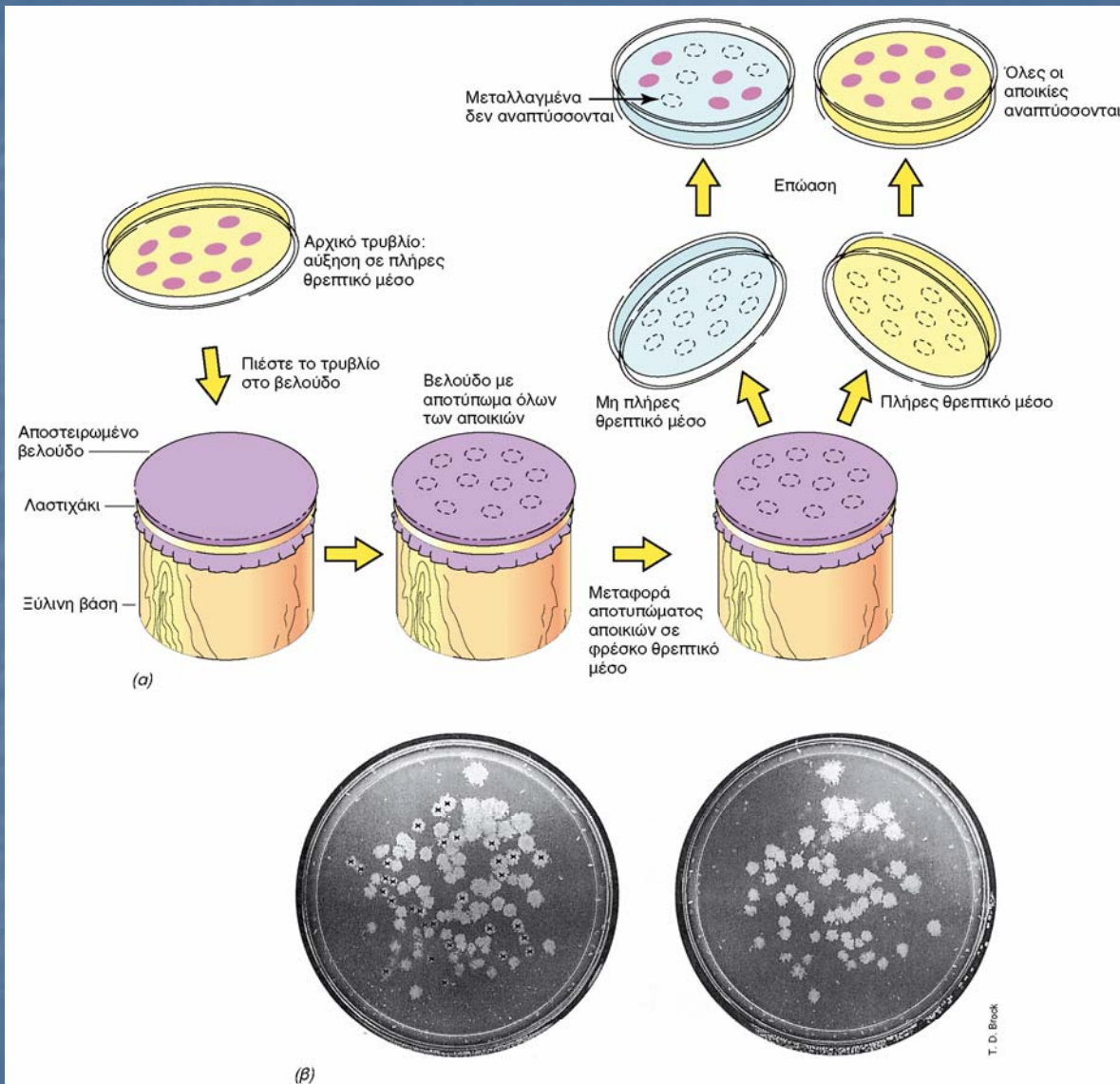
(β)



Shiladitya DasSarma, Priya Arora, Lone Simonsen

(γ)

Τεχνική αποτυπωτικής επίστρωσης σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα

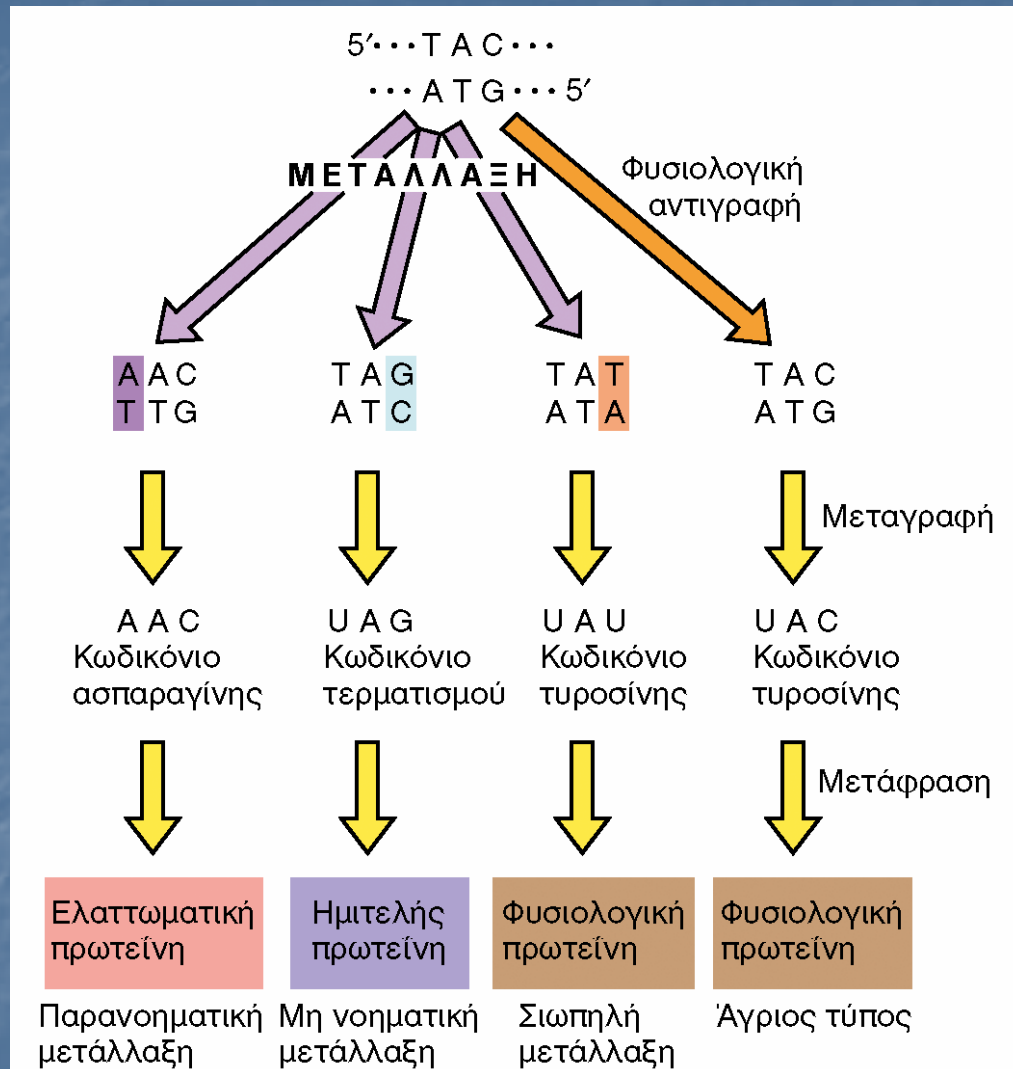


Εικόνα 10.2 (α) Μέθοδος αποτυπωτικής επίστρωσης σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο για τον εντοπισμό διατροφικών μεταλλάξεων. (β) Στελέχη με διατροφικές μεταλλάξεις, όπως αυτές αποκαλύπτονται με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Η φωτογραφία δεξιά δείχνει το αρχικό τρυβλίο. Οι αποικίες που δεν αναπτύσσονται στο τρυβλίο αναπαραγωγής σημειώνονται με x. Το τρυβλίο αναπαραγωγής δεν περιέχει μία θρεπτική ουσία (λευκίνη) την οποία περιέχει το αρχικό τρυβλίο. Άρα, οι αποικίες που σημειώνονται με x σχηματίζονται από κύτταρα που είναι αυξήτροφα λευκίνης.

Μοριακή βάση των μεταλλάξεων

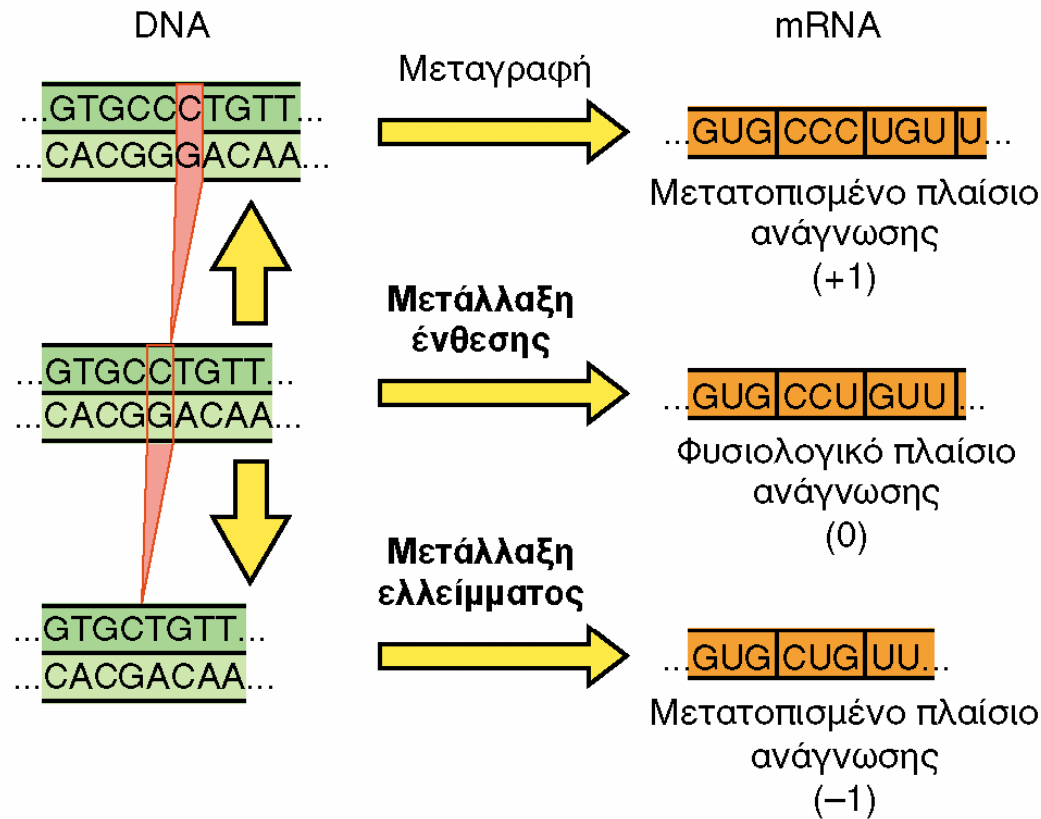
- Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι είτε αυθόρμητες (λάθη στην αντιγραφή του DNA, φυσική ραδιενέργεια) είτε επαγόμενες (χημικά, ακτινοβολία, μεταθετά γενετικά στοιχεία)
- Οι μεταλλάξεις που αφορούν ένα ή λίγα ζεύγη βάσεων ονομάζονται **σημειακές μεταλλάξεις (point mutations)**
- Αντικατάσταση βάσεων, μικροένθεση, μικροέλλειμμα
- Η αντικατάσταση βάσεων οδηγεί σε **παρανοηματική, μη νοηματική ή σιωπηλή μετάλλαξη**


Συνέπειες αντικατάστασης βάσεων σε γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη



Εικόνα 10.3 Πιθανές συνέπειες από την αντικατάσταση ζευγών βάσεων σε γονίδιο που κωδικεύει πρωτεΐνη: τρία διαφορετικά πρωτεϊνικά προϊόντα που προκύπτουν από αλλαγές σε ένα μόνο κωδικόνιο στο DNA.

Μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης



Εικόνα 10.4 Μετατοπίσεις στο πλαίσιο ανάγνωσης του mRNA, που προκαλούνται από ενθέσεις ή ελλείμματα βάσεων στο DNA. Το πλαίσιο ανάγνωσης στο mRNA καθορίζεται από το ριβόσωμα στο άκρο 5' (προς τα αριστερά της εικόνας) και προάγεται ανά ομάδα τριών βάσεων (κωδικόνια:  Τμήματα 7.13 και 7.15). Το φυσιολογικό πλαίσιο ανάγνωσης αναφέρεται ως πλαίσιο 0, αυτό στο οποίο λείπει μία βάση ως πλαίσιο -1, και αυτό με μία επιπλέον βάση ως πλαίσιο +1. Για να καθορίσετε τις συνέπειες μιας μετάλλαξης μετατόπισης πλαισίου, μεταφράστε τα κωδικόνια χρησιμοποιώντας τον Πίνακα 7.3.

Οπισθόδρομες μεταλλάξεις

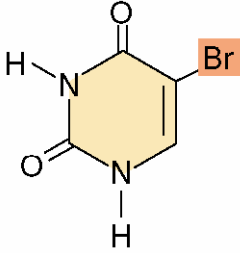
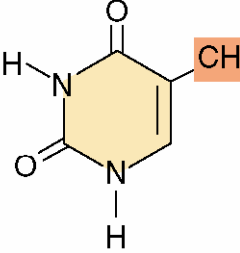
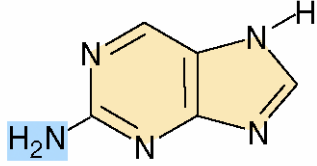
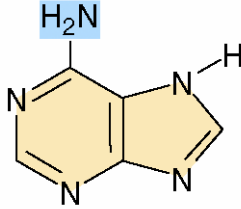
- Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι κάποιες φορές αναστρέψιμες και επαναφέρουν το φαινότυπο άγριου τύπου σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος. Οι μεταλλάξεις αυτές ονομάζονται **οπισθόδρομες ή αναστροφές**.
- Οι αναστροφές είναι δύο ειδών: αναστροφές ίδιας θέσης (τροποποίηση της ίδιας βάσης) ή αναστροφές δεύτερης θέσης (σε νέα θέση στο DNA).
- Οι μεταλλάξεις δεύτερης θέσης μπορούν και αυτές να επαναφέρουν τον αρχικό φαινότυπο (στην περίπτωση αυτή ονομάζονται **κατασταλτικές μεταλλάξεις**)

Συχνότητα μεταλλάξεων

- Η συχνότητα των διάφορων τύπων μεταλλάξεων ποικίλει σημαντικά
- Σφάλματα στην αντιγραφή του DNA συμβαίνουν με συχνότητα 10^{-7} - 10^{-11} ανα ζεύγος βάσεων. Ένα τυπικό γονίδιο έχει περίπου 1000 ζεύγη βάσεων, άρα η συχνότητα σφαλμάτων είναι 10^{-4} με 10^{-8} ανα γενεά. Μια πλήρως ανεπτυγμένη βακτηριακή καλλιέργεια μπορεί να έχει 10^8 με 10^9 κύτταρα ανα ml άρα υπάρχουν πιθανώς αρκετές διαφορετικές μεταλλάξεις σε μια καλλιέργεια
- Η συχνότητα των μεταλλάξεων επηρεάζεται από την παρουσία μικρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο γονιδίωμα. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται **σημεία υψηλής ενεργότητας (hot spots)** και σε αυτές τις περιοχές η πιθανότητα σφάλματος από την DNA πολυμεράση είναι αυξημένη
- Το RNA μεταλλάσσεται πιο γρήγορα από το DNA

Μεταλλαξιγένεση-Χημικά μεταλλαξιγόνα

- Ανάλογα βάσεων (δομή όμοια με τις πουρίνες ή τις πυριμιδίνες) πχ 5-βρωμοουρακίλη, 2-αμινοπουρίνη
- Παράγοντες αλκυλίωσης (πρόκληση άμεσων χημικών μεταβολών) πχ νιτροζογουανιδίνη
- Παρεμβαλλόμενοι παράγοντες (εισχωρούν ανάμεσα σε 2 ζεύγη βάσεων και τα απωθούν με αποτέλεσμα κατά την αντιγραφή να δημιουργούνται μικροενθέσεις ή μικροελλείμματα) πχ ακριδίνες, βρωμιούχο αιθίδιο.

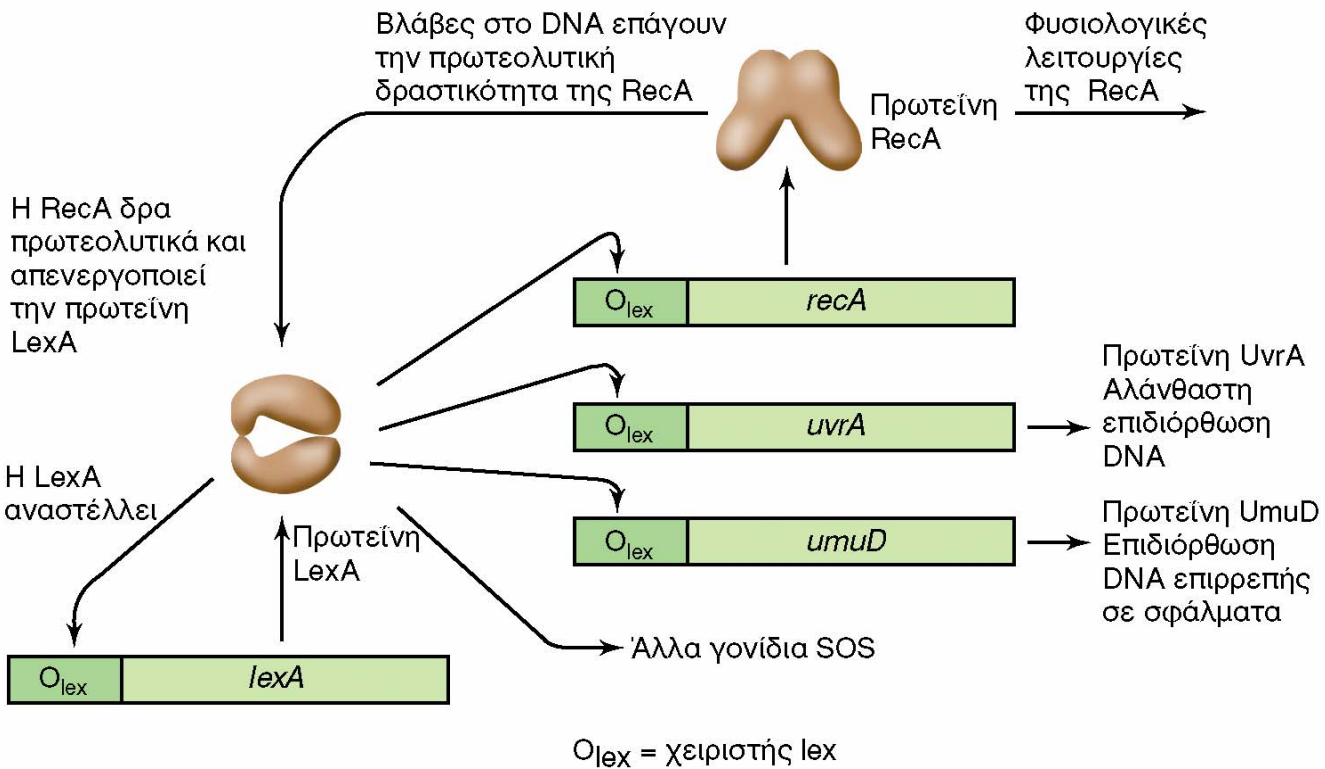
Ανάλογο	Αντικαθιστά
<div style="text-align: center;">  <p>5-Βρωμοουρακίλη</p> </div> <p>(α)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Θυμίνη</p> </div>
<div style="text-align: center;">  <p>2-Αμινοπουρίνη</p> </div> <p>(β)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Αδερίνη</p> </div>

Εικόνα 10.5 Δομή δύο κοινών αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων που χρησιμοποιούνται ως μεταλλαξιγόνα, και οι φυσικές νουκλεοτιδικές βάσεις που αντικαθιστούν. (α) Η 5-βρωμοουρακίλη μπορεί να συζευχθεί με γουανίνη προκαλώντας αντικαταστάσεις από A + T σε G + C· (β) Η 2-αμινοπουρίνη μπορεί να συζευχθεί με κυτοσίνη, προκαλώντας αντικαταστάσεις από A + T σε G + C.

Μεταλλαξιγένεση-Ακτινοβολία

- Υπεριώδης ακτινοβολία (μέγιστη απορρόφηση των νουκλεϊκών οξέων στα 260 nm). Προκαλεί την δημιουργία **διμερών πυριμιδίνης** (κυτοσίνη, θυμίνη) ανάμεσα σε γειτονικές βάσεις με αποτέλεσμα την αύξηση σφαλμάτων κατά την αντιγραφή του DNA. Η υπεριώδης ακτινοβολία χρησιμοποιείται για την απολύμανση επιφανειών από βακτήρια άλλα και εργαστηριακά για την ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων
- Ιοντίζουσα ακτινοβολία (ακτίνες Χ, γ, κοσμική ακτινοβολία). Δημιουργεί ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες καταστρέφουν το DNA. Σε αντίθεση με την υπεριώδη η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι εξαιρετικά διεισδυτική και άρα πιο επικίνδυνη.

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA (απόκριση SOS)

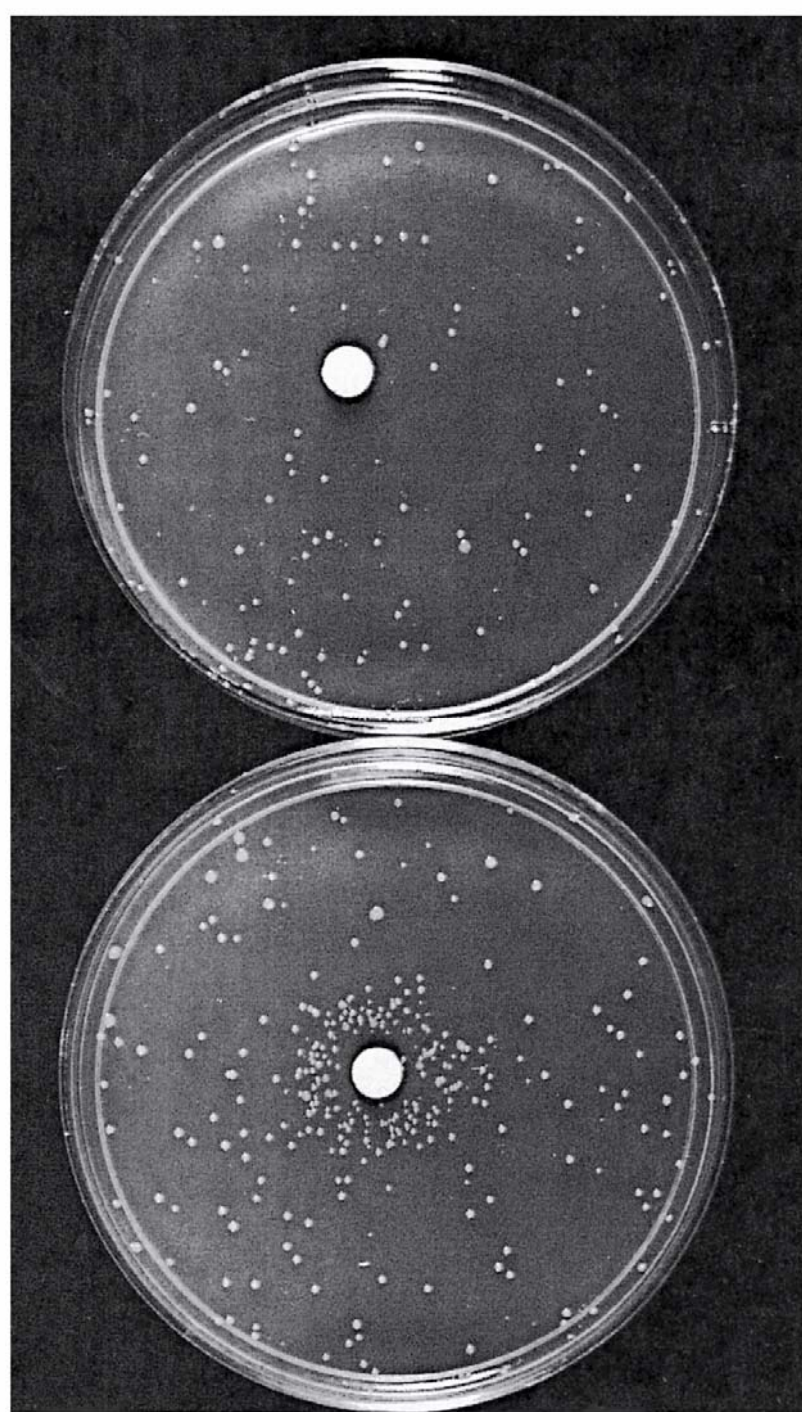


Εικόνα 10.7 Μηχανισμός της απόκρισης SOS. Βλάβες του DNA οδηγούν στην ενεργοποίηση της πρωτεολυτικής δραστικότητας της RecA, η οποία κατόπιν αποκόπτει την πρωτεΐνη LexA. Η πρωτεΐνη LexA, υπό φυσιολογικές συνθήκες, αναστέλλει τη λειτουργία των επιδιορθωτικών γονιδίων *recA*, *uvrA*, και *umuD* (η πρωτεΐνη UmuD είναι τμήμα της DNA πολυμεράσης V). Προσέξτε, όμως, ότι η αναστολή δεν είναι πλήρης. Χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης RecA παράγονται έστω και παρουσία της πρωτεΐνης LexA. Με την απενεργοποίηση της LexA, τα γονίδια αυτά ενεργοποιούνται. Η πρωτεΐνη RecA, δρώντας ως πρωτεάση, αποκόπτει επίσης τις κατασταλτικές πρωτεΐνες του φάγου λ (🦠 Τμήμα 9.10).

Μεταλλαξιγένεση και καρκινογένεση

Έλεγχος Ames

Εικόνα 10.8 Ο έλεγχος Ames χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μεταλλαξιγόνου δράσης μιας χημικής ένωσης. Τα δύο τρυβλία εμβολιάστηκαν με καλλιέργεια μεταλλαγμένων στελεχών *Salmonella enterica* αυξοτρόφων για την ιστοδίνη. Το θρεπτικό μέσο δεν περιέχει ιστοδίνη, συνεπώς οι αποικίες που αναπτύσσονται αντιστοιχούν σε μεταλλάξεις αναστροφής της αυξοτροφίας ιστοδίνης. Αυθόρμητες αναστροφές εμφανίζονται και στα δύο τρυβλία. Ωστόσο, η χημική ένωση του χάρτινου δισκίου στο «κάτω» τρυβλίο έχει αυξήσει τη συχνότητα μεταλλάξεων, όπως αποκαλύπτεται από τον μεγάλο αριθμό αποικιών γύρω από αυτήν. Αναστροφές δεν παρατηρούνται πολύ κοντά στο δισκίο, καθώς η ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση του μεταλλαξιγόνου είναι θανατηφόρα.

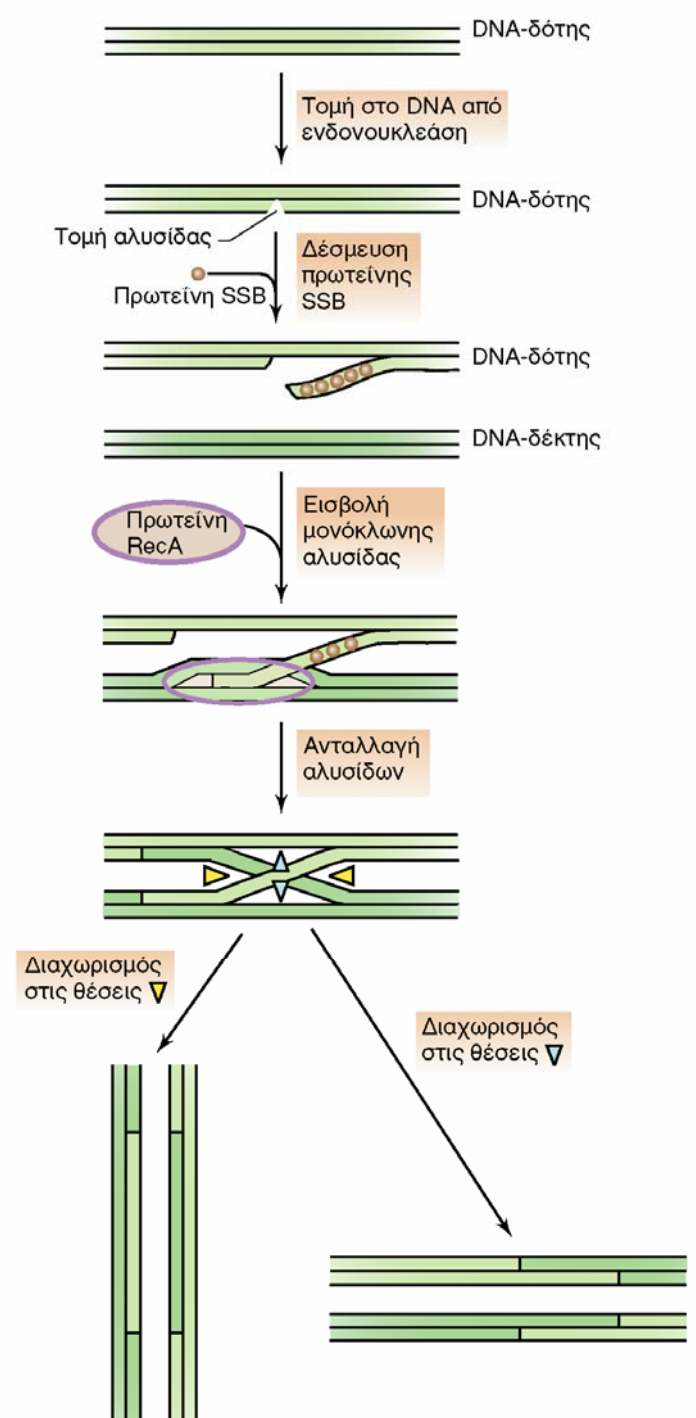


Γενετικός ανασυνδυασμός

- Ομόλογος ανασυνδυασμός είναι η φυσική ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ γενετικών τόπων του ίδιου ή διαφορετικών γονιδιωμάτων. Η ανταλλαγή αυτή γίνεται ανάμεσα σε ομόλογες (παρόμοια πρωτοταγή δομή) περιοχές μέσω εκτεταμένης σύζευξης των νουκλεοτιδικών βάσεων τους.
- Ομόλογος ανασυνδυασμός παρατηρείται τόσο στους ευκαρυωτικούς (επιχιασμός στα χρωμοσώματα) όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι πολύπλοκος μηχανισμός και έχει μελετηθεί με λεπτομέρεια στην *E. coli* (τουλάχιστον 25 γονίδια εμπλέκονται σε αυτόν)

Μοριακή βάση του ομόλογου ανασυνδυασμού

RecBCD, RecA, SSB



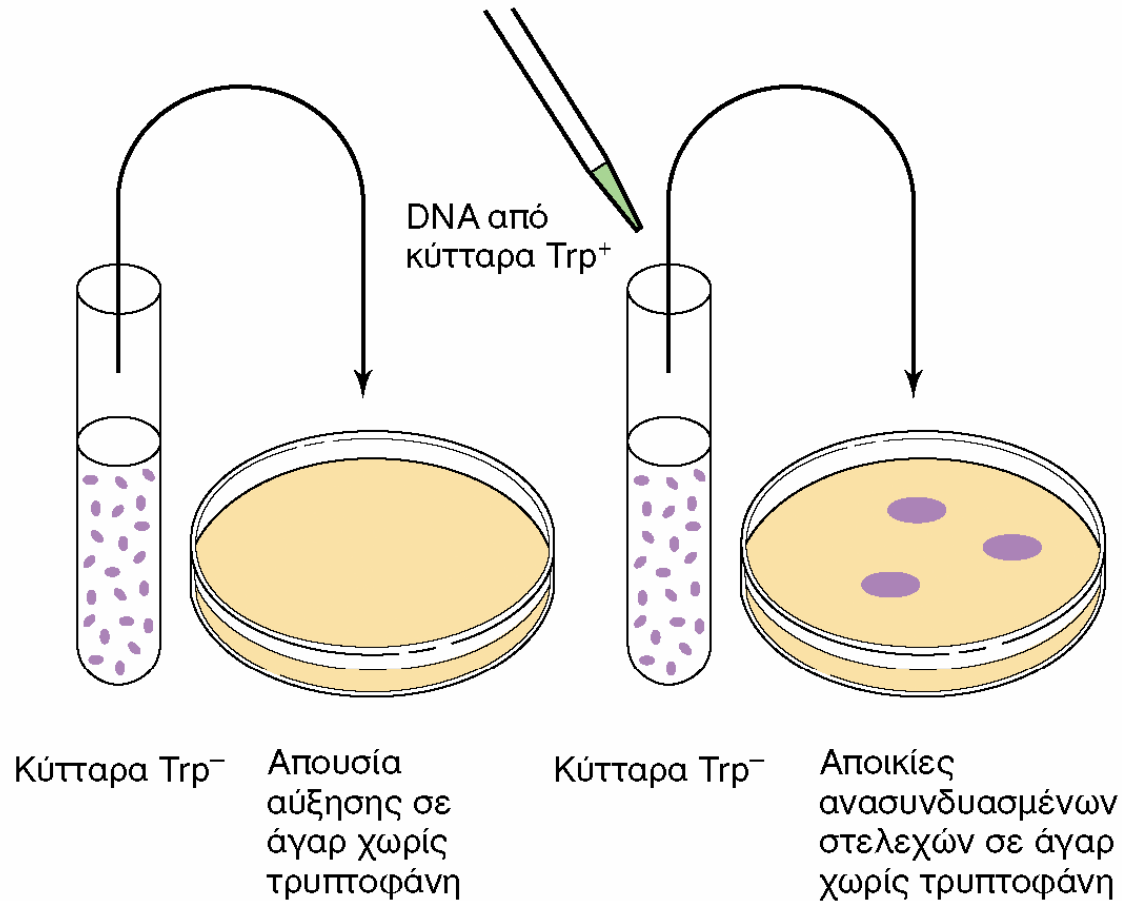
Εικόνα 10.9 Απλοποιημένη εκδοχή του μηχανισμού γενετικού ανασυνδυασμού. Ομόλογα μόρια DNA σχηματίζουν ζεύγη και ανταλλάσσουν τμήματα. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει τη «διάσπαση» και την επανένωση των συζευγμένων τμημάτων. Δύο από τις εμπλεκόμενες πρωτεΐνες είναι η SSB (πρωτεΐνη δέσμευσης μονόκλωνου DNA) και η RecA· οι υπόλοιπες πρωτεΐνες δεν παρατίθενται. Το διάγραμμα δεν αντικατοπτρίζει τα πραγματικά σχετικά μεγέθη των μορίων. Η σύζευξη των ομόλογων τμημάτων μπορεί να αφορά εκατοντάδες χιλιάδες βάσεις. Η διαδικασία τερματίζεται με την αποκοπή και τη σύνδεση των επικιασμένων μορίων DNA. Προσέξτε ότι υπάρχουν δύο πιθανά αποτελέσματα, ανάλογα με την αλυσίδα που αποκόπτεται κατά τη διαδικασία τερματισμού του ανασυνδυασμού. Στη μία περίπτωση, τα ανασυνδυασμένα μόρια έχουν ανταλλάξει τμήματα μιας αλυσίδας που ενεπλάκη στη διαδικασία. Στην άλλη περίπτωση, τα δύο μόρια έχουν ανασυνδυαστεί και ως προς αλληλουχίες εκτός των τμημάτων που ενεπλάκησαν στον ανασυνδυασμό.

Ανίχνευση Ανασυνδυασμού

Μεταφορά γενετικού υλικού
Από δότη σε δέκτη

Διαφοροποίηση φαινότυπου

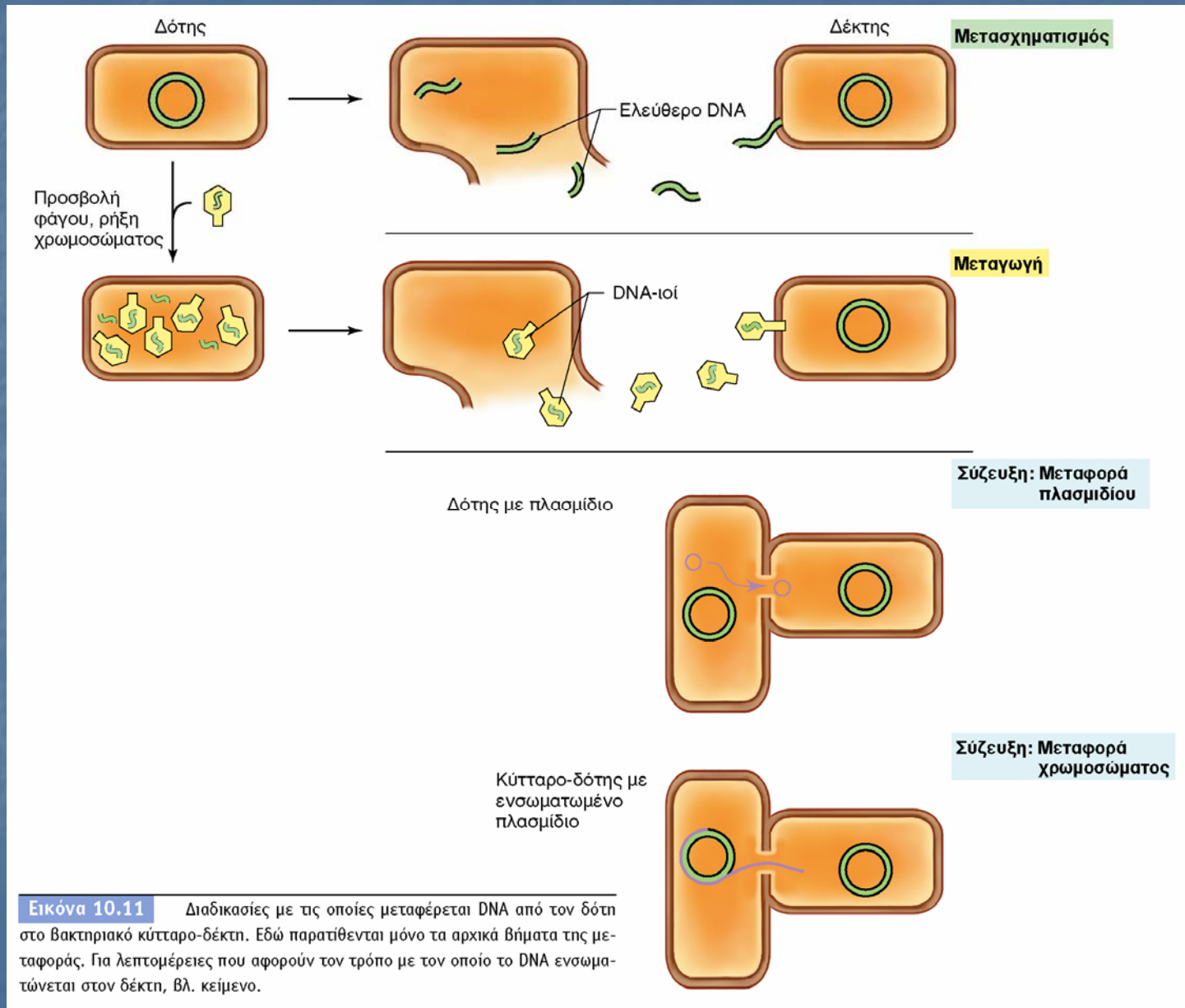
Επιλογή σε εκλεκτικά
θρεπτικά μέσα.



Εικόνα 10.10

Διαδικασία επιλογής σπάνιων γενετικά ανασυνδυασμένων στελεχών από ένα αρχικό πλήθος μη ανασυνδυασμένων κυττάρων. Στο εκλεκτικό θρεπτικό μέσο σχηματίζονται αποικίες μόνο εφόσον σε κάποια κύτταρα λάβει χώρα ο συγκεκριμένος ανασυνδυασμός. Παρόμοιες γενετικές διαδικασίες «υψηλής ανάλυσης», μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο σε μικροοργανισμούς. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο ανασυνδυασμός προκύπτει μέσω διαδικασίας γενετικού μετασχηματισμού, η οποία εξετάζεται στο Τμήμα 10.6.

Ανταλλαγή γενετικού υλικού ανάμεσα σε βακτήρια



Εικόνα 10.11 Διαδικασίες με τις οποίες μεταφέρεται DNA από τον δότη στο βακτηριακό κύτταρο-δέκτη. Εδώ παρατίθενται μόνο τα αρχικά βήματα της μεταφοράς. Για λεπτομέρειες που αφορούν τον τρόπο με τον οποίο το DNA ενσωματώνεται στον δέκτη, βλ. κείμενο.

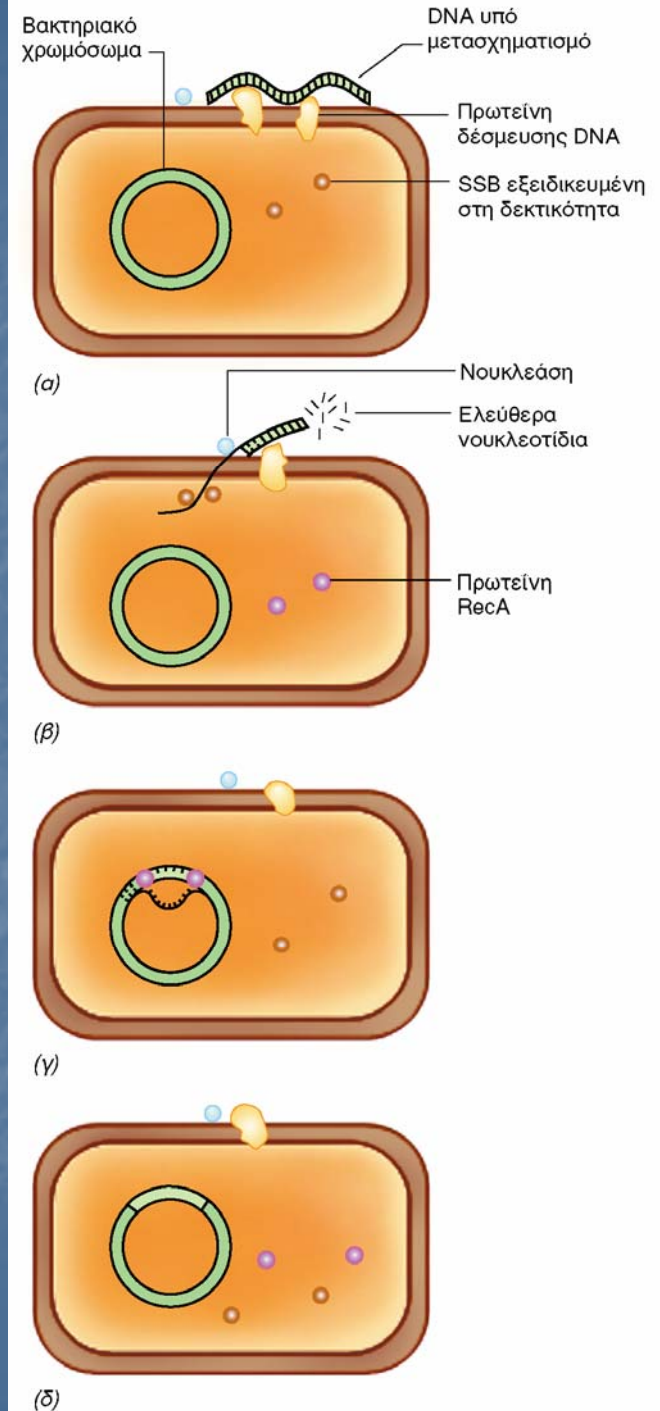
Μετασχηματισμός

Ενσωμάτωση ελεύθερου DNA στο χρωμόσωμα ενός κυττάρου-δέκτη με αποτέλεσμα την αλλαγή της γενετικής σύστασης.

Δεκτικό ονομάζεται το κύτταρο που είναι ικανό να δεχθεί εξωγενές DNA

Gram⁻ βακτήρια: προσλαμβάνουν **δίκλωνο DNA**

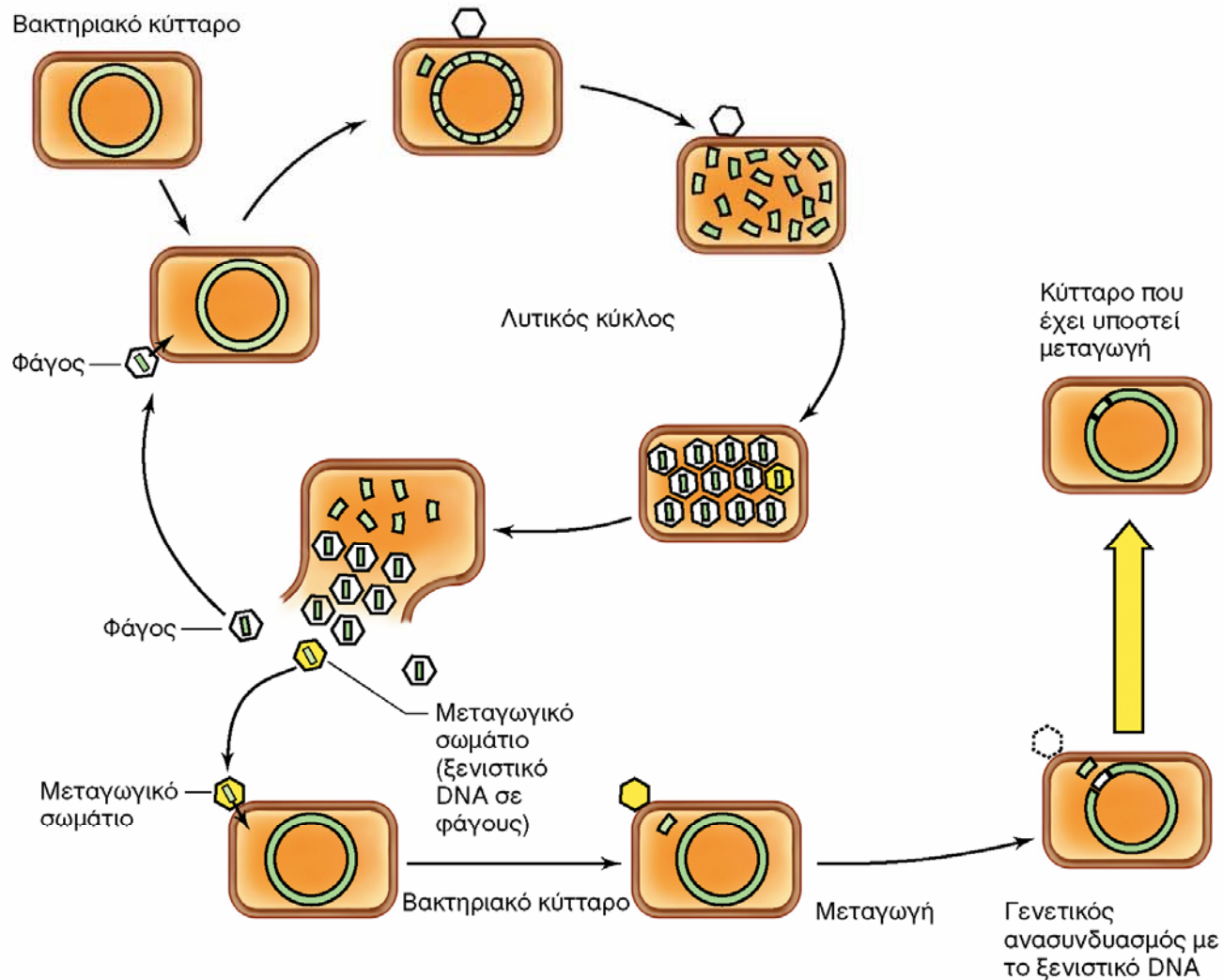
Gram⁺ βακτήρια: προσλαμβάνουν **μονόκλωνο DNA**



Εικόνα 10.13

Μηχανισμός μεταφοράς DNA μέσω μετασχηματισμού σε ένα θετικό κατά Gram βακτήριο. (α) Δέσμευση του ελεύθερου δίκλωνου DNA από μια μεμβρανική πρωτεΐνη. (β) Είσοδος του ενός από τους δύο κλώνους μέσα στο κύτταρο, ενώ με τη δράση της νουκλεάσης αποδομείται ο άλλος κλώνος. (γ) Μέσα στο κύτταρο, το μονόκλωνο DNA ενώνεται με ειδικές πρωτεΐνες, και ακολουθεί ο ανασυνδυασμός με ομόλογες περιοχές του βακτηριακού χρωμοσώματος, στον οποίο μεσολαβεί η πρωτεΐνη RecA. (δ) Μετασχηματισμένο κύτταρο. Παρατηρήστε ότι εάν δεν λάβει χώρα ανασχηματισμός, το εισαχθέν DNA δεν μπορεί να αντιγραφεί και κατά συνέπεια χάνεται. SSB = πρωτεΐνη δέσμευσης μονόκλωνου DNA (single-strand binding protein).

Γενικευμένη μεταγωγή: Μεταφορά DNA από οποιοδήποτε τμήμα του γονιδιώματος στον φάγο

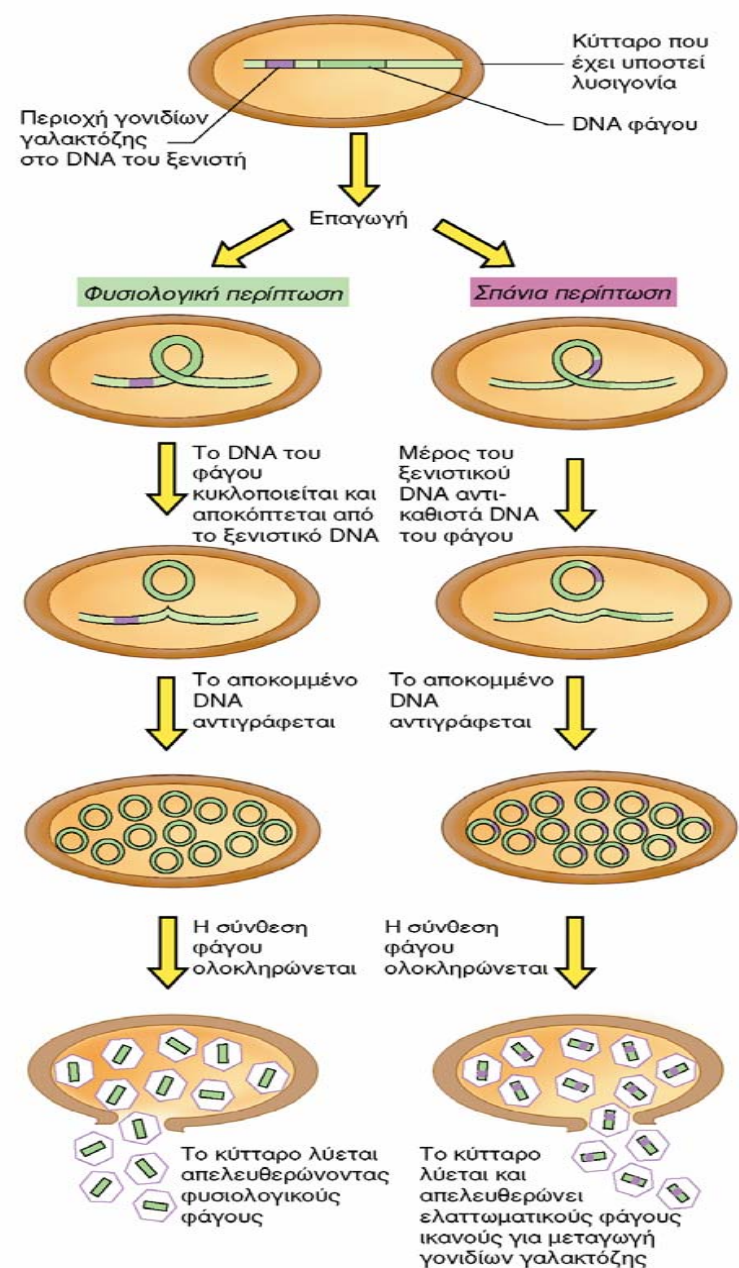


Εικόνα 10.14

του ξενιστή.

Γενικευμένη μεταγωγή: ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο μπορούν να σχηματιστούν ισοώματα (σωμάτια φάγων) που περιέχουν DNA

Εξειδικευμένη Μεταγωγή: Μεταφορά DNA από ειδική περιοχή του γονιδιώματος. Παρατηρείται μόνο σε κάποιους ήπιους φάγους



Εικόνα 10.15 Φυσιολογική λύση και παραγωγή μεταγωγικών σωμάτων που φέρουν τα γονίδια της γαλακτόζης, σε κύτταρο *Escherichia coli* που περιέχει έναν προφάγο λ.

Πλασμίδια-Φυσικές ιδιότητες πλασμιδίων

- Πλασμίδια: Γενετικά στοιχεία που αντιγράφονται ανεξάρτητα από χρωμόσωμα του ξενιστή
- Τα πλασμίδια **δεν φέρουν γονίδια απαραίτητα** για την βασική λειτουργία του ξενιστή (βοηθά στην διάκριση τους από το χρωμόσωμα)
- Όλα σχεδόν είναι κυκλικά (υπάρχουν και κάποια γραμμικά). Το μέγεθός τους ποικίλει σημαντικά. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι βρίσκονται πολύ συχνά σε **υπερελικωμένη** στεροδιαμόρφωση
- Η ιδιότητα αυτή βοηθά στην απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με την χρήση τεχνικών όπως η **υπερφυγοκέντρωση** και η **ηλεκτροφόρηση** σε πήκτωμα αγαρόζης

Αντιγραφή Πλασμιδίων

- Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αντιγραφή πλασμιδίων είναι τα ίδια με αυτά για την αντιγραφή του χρωμοσώματος. Στα πλασμίδια βρίσκονται κάποια γονίδια που ελέγχουν τον **χρόνο έναρξης** της αντιγραφής και τον **αριθμό αντιγράφων** των πλασμιδίων.
- Κάποια βακτηριακά κύτταρα περιέχουν διαφορετικούς τύπους πλασμιδίων τα οποία μπορούν να διατηρούνται και να αντιγράφονται μαζί (**συμβατά**), Σε κάποιες περιπτώσεις 2 διαφορετικά πλασμίδια μπορεί να **μην είναι συμβατά** οπότε το ένα από τα δυο χάνεται καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί. Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των πλασμιδίων σε **ομάδες ασυμβατότητας**.
- Ορισμένα πλασμίδια που ονομάζονται **επισώματα** μπορούν να ενσωματωθούν στο χρωμόσωμα του ξενιστή και να αντιγράφονται μαζί με αυτό
- **Εκδίωξη πλασμιδίου** είναι η διαδικασία (φυσική ή τεχνητή) κατά την οποία ένα πλασμίδιο «χάνεται» από το κύτταρο-ξενιστή λόγω αδυναμίας της αντιγραφής του

Τύποι πλασμιδίων και βιολογική σημασία τους

- Για κάποια πλασμίδια γνωρίζουμε τι γονίδια περιέχουν και τι φαινοτυπικά γνωρίσματα προσδίδουν στον ξενιστή, ενώ για άλλα όχι (**κρυπτικά πλασμίδια**)
- Πλασμίδια περιέχουν γονίδια που βιοσυνθέτουν **αντιβιοτικά**, καταβολίζουν **ξενοβιοτικά** (ασυνήθιστες οργανικές ενώσεις), συνθέτουν **μολυσματικούς παράγοντες** και προσδίδουν **ανθεκτικότητα** σε αντιβιοτικά.
- Πλασμίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (πλασμίδια R) ή συνθέτουν παράγοντες μολυσματικότητας έχουν μεγάλη ιατρική σημασία
- Τέλος ορισμένα πλασμίδια έχουν γονίδια υπεύθυνα για την σύνθεση **βακτηριοσινών**

Βακτηριοσίνες

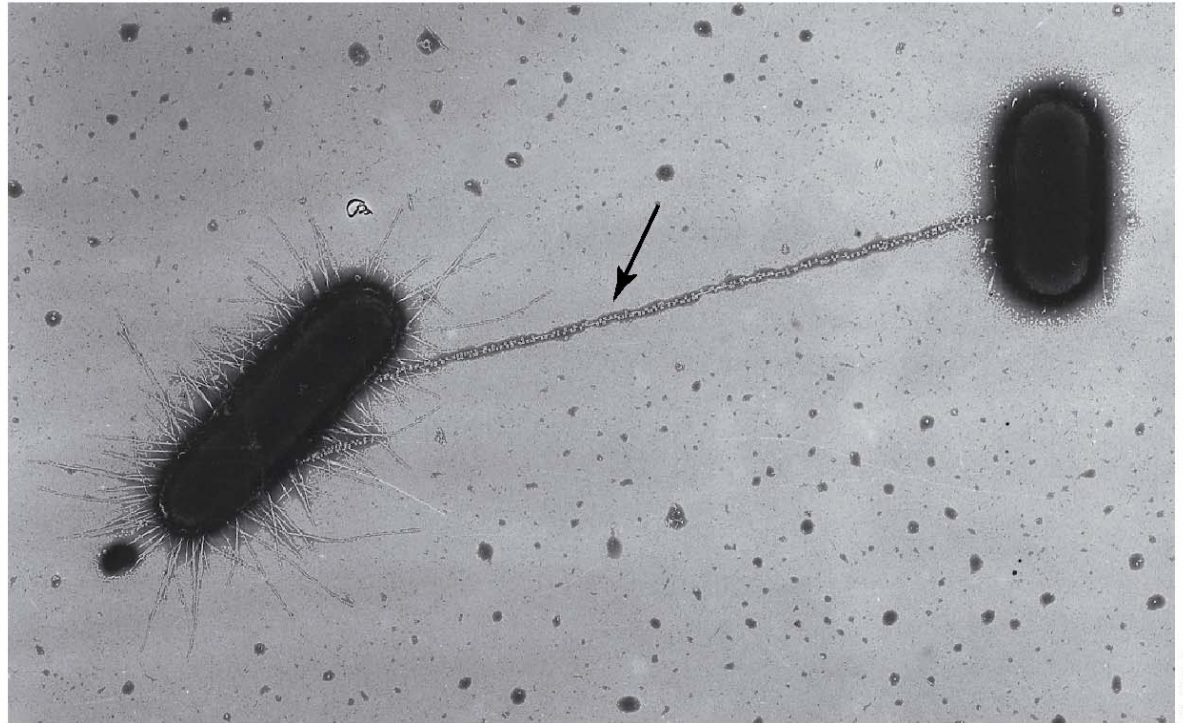
- Οι βακτηριοσίνες είναι μια ετερογενής ομάδα μικρών πρωτεϊνών ή ολιγοπεπτιδίων που συντίθενται ριβοσωματικά από Gram-θετικά και αρνητικά βακτήρια και δρουν συνήθως ενάντια σε στενά συγγενικά είδη ή στελέχη του ίδιου είδους. Ο όρος βακτηριοσίνες είναι γενικός. Βακτηριοσίνες που παράγονται από την *E. coli* ονομάζονται κολισίνες, ή από *Pseudomonas spp.* πτυοσίνες.
- Το ενδιαφέρον για την χρήση βακτηριοσίνων στην βιομηχανία τροφίμων έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία 15 χρόνια, κυρίως για αυτές που παράγονται από διάφορα είδη λακτοβακίλλων.
- Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από λακτοβάκιλλους ταξινομούνται σε 4 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται βακτηριοσίνες που περιέχουν ασυνήθιστα αμινοξέα και κάποιες είναι κυκλικές. Οι κυκλικές βακτηριοσίνες ονομάζονται και **λαντιβιοτικά**. Η καλύτερα μελετημένη βακτηριοσίνη της ομάδας αυτής είναι η νισίνη A

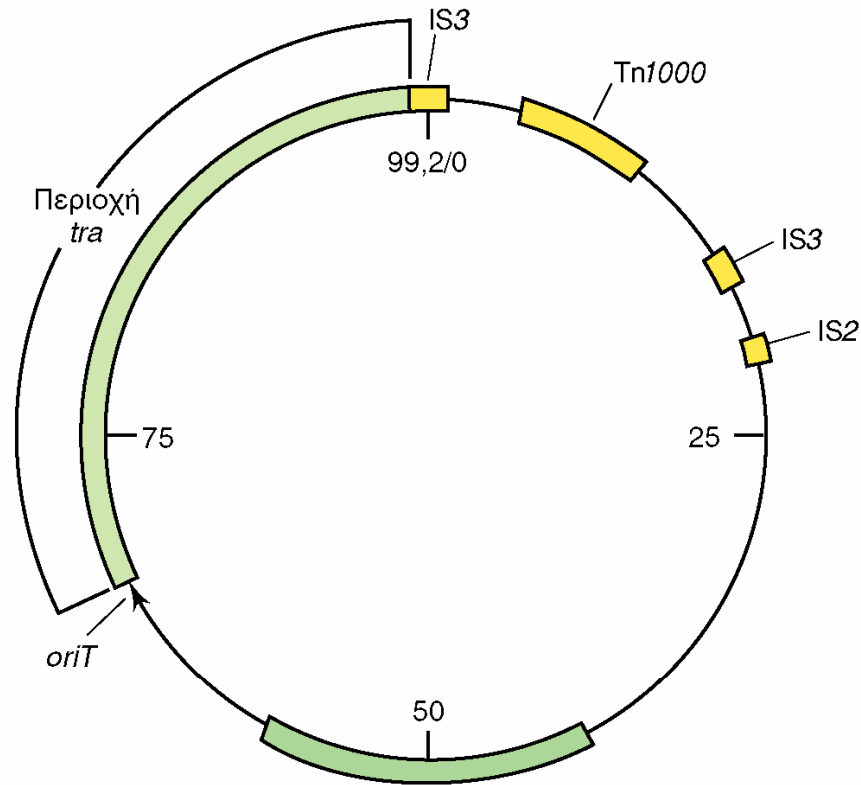
Βακτηριακή σύζευξη-Χρωμοσωματική κινητοποίηση

- Βακτηριακή σύζευξη: Μεταφορά γενετικού υλικού με άμεση επαφή 2 κυττάρων
- Βασίζεται σε μηχανισμό που κωδικοποιείται από το **πλασμίδιο F**
- Κατά την σύζευξη μεταφέρεται εκτός από το πλασμίδιο F από τον δότη (κατά σύμβαση αρσενικό) στον δέκτη (κατά σύμβαση θηλυκό) και μέρος του χρωμοσώματος ή άλλα πλασμίδια.
- Η σύζευξη ελέγχεται από τα γονίδια της περιοχής tra του πλασμιδίου F
- Τα γονίδια tra κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προάγουν την άμεση επαφή κυττάρων μέσω της δημιουργίας μιας επιφανειακής δομής που ονομάζεται **συζευκτικό τριχίδιο (sex pilus)**
- Μια κατηγορία φάγων (RNA φάγοι)προσβάλλουν μόνο βακτήρια που περιέχουν το πλασμίδιο F.

Εικόνα 10.20

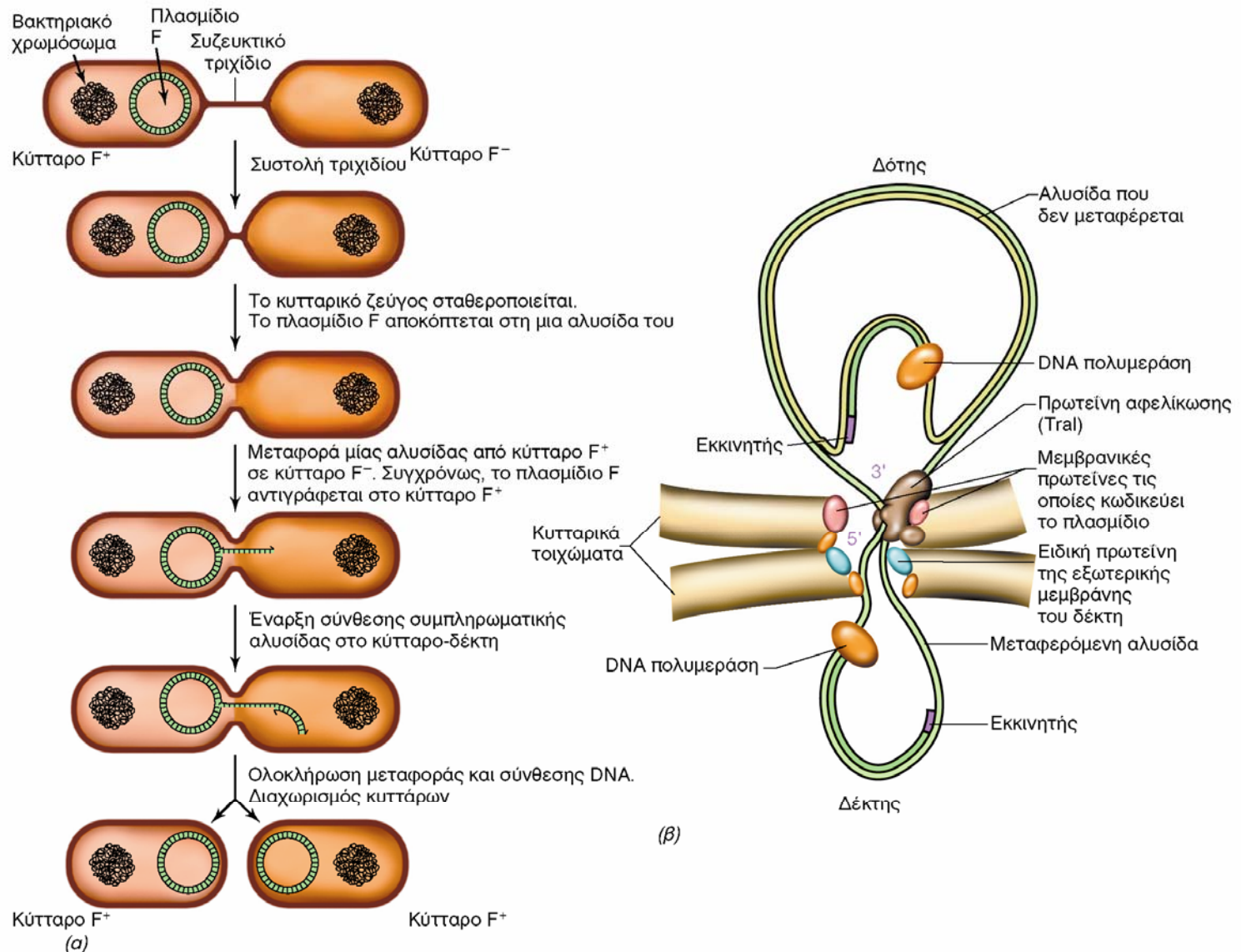
Η άμεση επαφή δύο βακτηρίων που βρίσκονται σε διαδικασία σύζευξης επιτυγχάνεται αρχικά μέσω του συζευκτικού τριχιδίου (βέλος). Κατόπιν τα κύτταρα προσεγγίζουν το ένα το άλλο και έρχονται σε επαφή, σχηματίζοντας ένα ζεύγος που επιτρέπει τη μεταφορά DNA. Αυτό πραγματοποιείται με τον αποπολυμερισμό του τριχιδίου στο κύτταρο-δότη. Στην εικόνα, το συζευκτικό τριχίδιο είναι καλυμμένο με F-ειδικούς βακτηριοφάγους (🦠 Τμήμα 16.1).





Εικόνα 10.17 Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου F (από τη λέξη fertility, γονιμότητα) της *Escherichia coli*. Οι αριθμοί στο εσωτερικό υποδεικνύουν το μέγεθος του πλασμιδίου σε κιλοβάσεις ζευγών (το ακριβές μέγεθος είναι 99.159 bp). Η σκούρα πράσινη περιοχή στο κάτω μέρος του χάρτη περιλαμβάνει γονίδια που είναι αρχικά υπεύθυνα για την αντιγραφή και ανακατανομή του πλασμιδίου F σε κύτταρα που αυξάνονται φυσιολογικά. Η ανοικτή πράσινη περιοχή, η περιοχή *tra*, περιέχει τα γονίδια που συμμετέχουν στη συζευκτική μεταφορά. Η αλληλουχία *oriT* είναι η αφετηρία της μεταφοράς κατά τη σύζευξη. Το βέλος υποδεικνύει την κατεύθυνση της μεταφοράς (η περιοχή *tra* θα μεταφερθεί τελευταία). Οι κίτρινες περιοχές του F είναι μεταθετά στοιχεία τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν σε όμοια στοιχεία του βακτηριακού χρωμοσώματος, κάτι που θα οδηγήσει στον σχηματισμό διαφορετικών στελεχών *Hfr* (βλ. Τμήμα 10.9).

Μηχανισμός μεταφοράς DNA κατά την σύζευξη

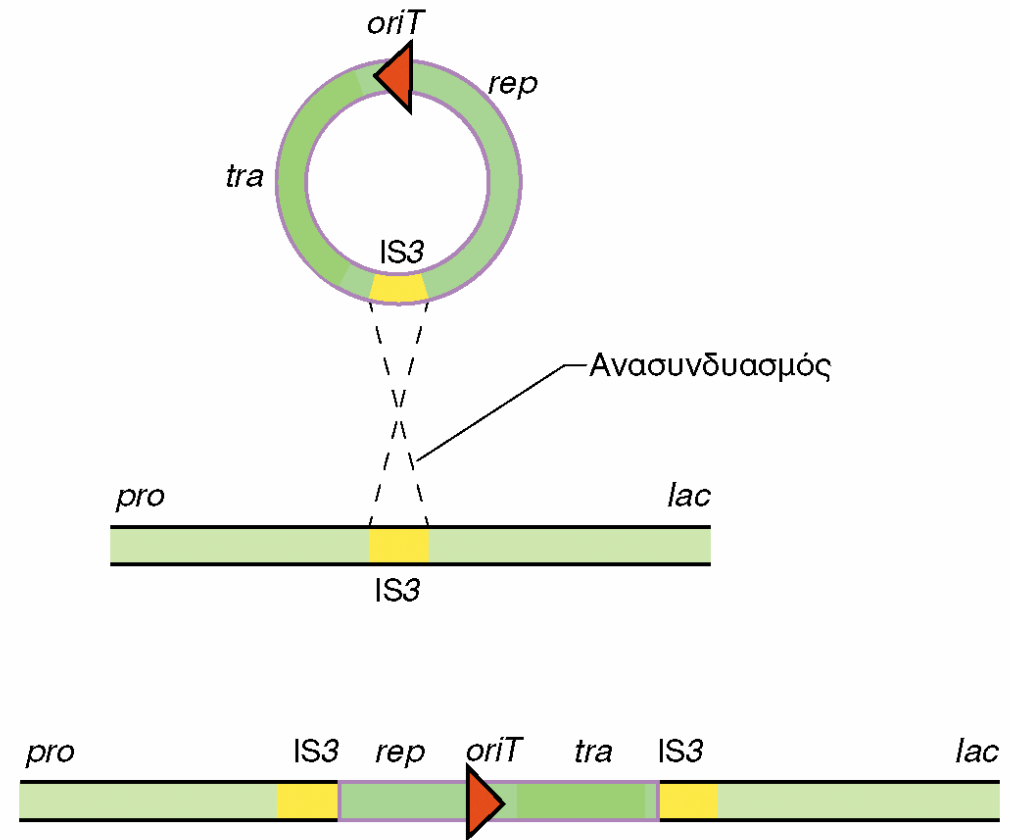


Εικόνα 10.21 Μεταφορά πλασμιδιακού DNA με σύζευξη. (α) Στο παράδειγμα αυτό, το πλασμίδιο F ενός κυττάρου F⁺ μεταφέρεται σε ένα κύτταρο-δέκτη F⁻. Παρατηρήστε τον μηχανισμό της αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου (Eικόνα 9.20 και Eικόνα 16.4). (β) Λεπτομέρειες των διαδικασιών αντιγραφής και μεταφοράς.

Δημιουργία στελεχών Hfr και κινητοποίηση χρωμοσώματος

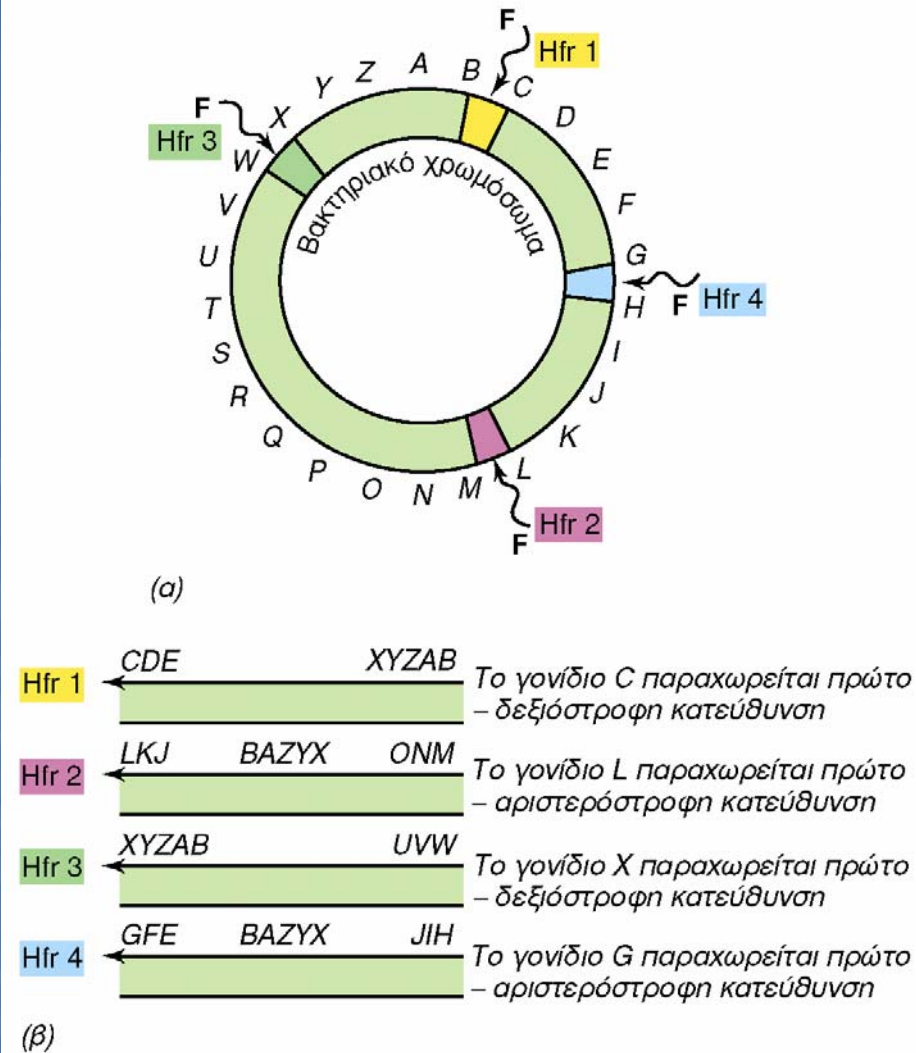
- Το πλασμίδιο F δεν είναι μόνο συζευκτικό αλλά μπορεί να μεταφέρει τμήματα το χρωμοσώματος από το κύτταρο-δότη στο κύτταρο δέκτη. Αυτό συμβαίνει γιατί κάποιες φορές το πλασμίδιο F είναι **επισωματικό**
- Τα κύτταρα που έχουν το πλασμίδιο F επισωματικά ονομάζονται Hfr (High Frequency of recombination). Τα κύτταρα δότες που έχουν το πλασμίδιο F μη επισωματικά ονομάζονται F⁺ (κύτταρα-δότες) ενώ αυτά που δεν έχουν το πλασμίδιο F ονομάζονται F⁻ (κύτταρα-δέκτες).
- Η παρουσία του πλασμιδίου F έχει αποτέλεσμα τρεις μεταβολές στις ιδιότητες ενός κυττάρου: α) Ικανότητα σύνθεσης συζευκτικού τριχιδίου β) Μεταφορά γενετικού υλικού σε άλλο κύτταρο γ) τροποποίηση των επιφανειακών υποδοχέων ώστε το κύτταρο να μην λειτουργεί ως δέκτης κατά την σύζευξη.

Η ενσωμάτωση του πλασμιδίου F στο χρωμόσωμα γίνεται σε ειδικές θέσεις που ονομάζονται αλληλουχίες ένθεσης (IS)



Εικόνα 10.22 Η ενσωμάτωση ενός πλασμιδίου F στο χρωμόσωμα και ο σχηματισμός ενός Hfr. Η ένθεση του πλασμιδίου F γίνεται σε διάφορες ειδικές θέσεις στις οποίες εντοπίζονται στοιχεία IS. Αυτό που απεικονίζεται εδώ είναι ένα IS3 μεταξύ των χρωμοσωματικών γονιδίων *pro* και *lac*. Επίσης, απεικονίζονται ορισμένα από τα γονίδια του πλασμιδίου F. Το βέλος υποδεικνύει το σημείο έναρξης της μεταφοράς, *oriT*. Έτσι, σε αυτό το Hfr, η *pro* θα είναι το πρώτο γονίδιο του χρωμοσώματος που θα μεταφερθεί, ενώ η *lac* θα είναι ένα από τα τελευταία.

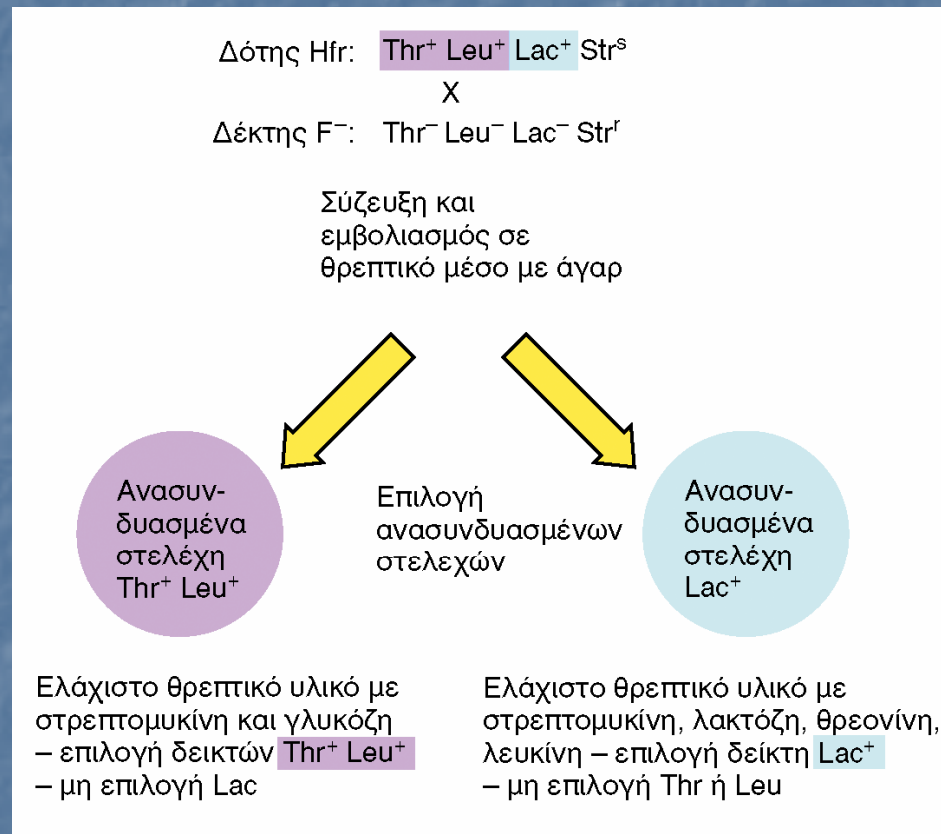
Υπάρχει συγκεκριμένος αριθμός διαφορετικών θέσεων ένθεσης με αποτέλεσμα την δημιουργία διαφορετικών στελεχών Hfr. Αυτό με σειρά του έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά διαφορετικών χρωμοσωμικών περιοχών μέσω σύζευξης



Εικόνα 10.24 Τρόπος σχηματισμού διαφόρων στελεχών Hfr, τα οποία παραχωρούν γονίδια με διαφορετική σειρά και από διαφορετικά σημεία έναρξης. Το βακτηριακό χρωμόσωμα είναι κυκλικό (α) και μπορεί να διανοιχτεί σε διάφορες αλληλουχίες ένθεσης, από τις οποίες διεισδύουν τα πλασμίδια F. Η σειρά των γονιδίων απεικονίζεται στο (β).

Ανίχνευση βακτηριακής σύζευξης στο εργαστήριο

Χρήση εκλεκτικών θρεπτικών μέσων που αναπτύσσονται τα ανασυνδυασμένα στελέχη αλλά όχι τα μητρικά. Τυπικά χρησιμοποιείται δέκτης ανθεκτικός σε αντιβιοτικό αλλά αυξοτροφικός και δότης ευαίσθητος σε αντιβιοτικό και πρωτοτροφικός



Εικόνα 10.25 Εργαστηριακή διαδικασία για την ανίχνευση γενετικής σύζευξης. Thr: θρεονίνη, Leu: λευκίνη, Lac: λακτόζη, Str: στρεπτομυκίνη. Ας σημειωθεί ότι κάθε θρεπτικό μέσο εμφανίζει εκλεκτικότητα για συγκεκριμένα ανασυνδυασμένα στελέχη. Ως μάρτυρες του πειράματος χρησιμοποιούνται δείγματα δότη και δέκτη πριν αυτοί αναμειχθούν. Κανένας δεν μπορεί να αναπτυχθεί στα χρησιμοποιούμενα εκλεκτικά μέσα.

Δοκιμασία συμπληρωματικότητας

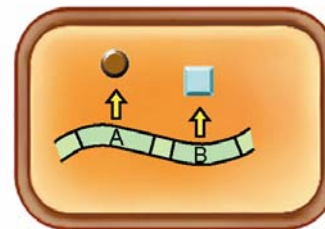
Χρησιμοποιείται για την απομόνωση γονιδίων και για την χαρτογράφηση μεταλλάξεων

Μεταφορά γονιδίου ή ολόκληρου σπερονίου (ομάδα συνεχόμενων γονιδίων που εκφράζονται όλα μαζί) μπορεί να συμπληρώσει ένα μετάλλαγμα (να αποκτήσει τον φαινότυπο άγριου τύπου)

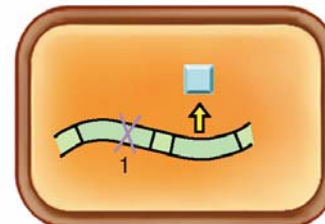
Η δοκιμασία μπορεί να γίνει είτε με σύζευξη είτε με μεταφορά γονιδίων μέσω πλασμιδίων (μετασχηματισμός)

Εικόνα 10.27

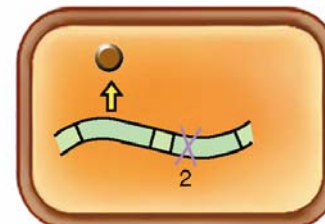
Ανάλυση συμπληρωματικότητας. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των γονιδίων A και B είναι απαραίτητα για τη σύνθεση τρυπτοφάνης. Οι μεταλλάξεις 1, 2, και 3 οδηγούν στον ίδιο φαινότυπο, που είναι η ανικανότητα ανάπτυξης απουσία τρυπτοφάνης. Η ανάλυση συμπληρωματικότητας έδειξε ότι οι μεταλλάξεις 2 και 3 βρίσκονται στο ίδιο γονίδιο, ενώ η μετάλλαξη 1 βρίσκεται σε άλλο.



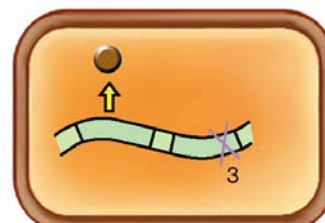
Κύτταρο άγριου τύπου: λειτουργικά και τα δύο γονίδια: το κύτταρο είναι Trp^+



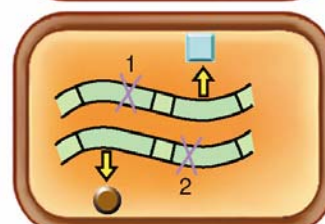
Μεταλλαγμένο X: το κύτταρο περιέχει τη μετάλλαξη 1 και είναι Trp^-



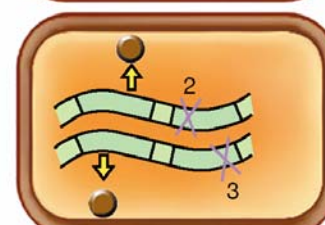
Μεταλλαγμένο Y: το κύτταρο περιέχει τη μετάλλαξη 2 και είναι Trp^-



Μεταλλαγμένο Z: το κύτταρο περιέχει τη μετάλλαξη 3 και είναι Trp^-



Δοκιμασία *trans* για τις μεταλλάξεις 1 και 2: συμπληρωματικότητα (κύτταρο Trp^+), άρα οι μεταλλάξεις αφορούν διαφορετικά γονίδια



Δοκιμασία *trans* για τις μεταλλάξεις 2 και 3: απουσία συμπληρωματικότητας (κύτταρο Trp^-), άρα οι μεταλλάξεις αφορούν το ίδιο γονίδιο

Γενετικά μεταθετά στοιχεία

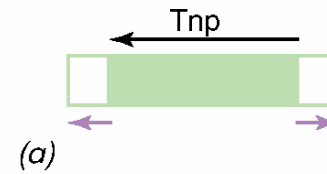
- Μερικά γονίδια του βακτηριακού χρωμοσώματος μπορεί να αλλάζουν θέση. Η διαδικασία με την οποία ένα γονίδιο μετακινείται από μία θέση του γονιδιώματος σε άλλη ονομάζεται **μετάθεση** και οφείλεται στην παρουσία γενετικών μεταθετών στοιχείων.
- Στα βακτήρια υπάρχουν 3 τύποι τέτοιων στοιχείων: **αλληλουχίες ένθεσης (IS)**, **μεταθετόνια (Transposons)** και κάποιοι ειδικοί **φάγοι**.
- Τα μεταθετόνια και οι αλληλουχίες ένθεσης έχουν κοινές ιδιότητες: κωδικοποιούν ένα ένζυμο την **μεταθετάση** απαραίτητο για την μετάθεση και διαθέτουν **αντίστροφες ακραίες επαναλήψεις** στο DNA επίσης απαραίτητες για την μετάθεση
- Οι αλληλουχίες ένθεσης είναι μικρότερου μεγέθους και περιέχουν μόνο την απαραίτητη γενετική πληροφορία για την μετάθεση. Τα μεταθετόνια είναι μεγαλύτερα και περιέχουν γονίδια που προσδίδουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες στους οργανισμούς (πχ ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά)

Χαρακτηριστικά μεταθετά στοιχεία

Αλληλουχία ένθεσης (IS2)

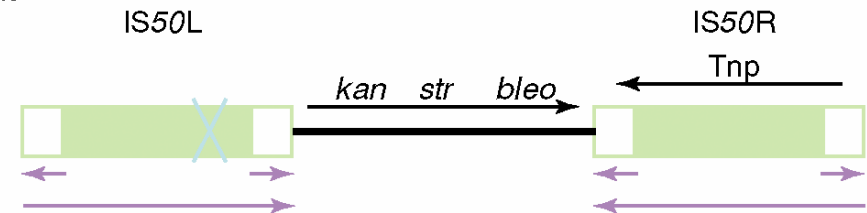
Μεταθετόνιο (Tn5)

IS2



(α)

Tn5



(β)

Εικόνα 10.28 Χάρτες των μεταθετών στοιχείων IS2 και Tn5. Τα κόκκινα βέλη κάτω από κάθε χάρτη υποδεικνύουν τις αντίστροφες επαναλήψεις. Τα βέλη πάνω από τους χάρτες υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μεταγραφής κάθε γονιδίου των στοιχείων. Το Tnp είναι το γονίδιο που κωδικεύει τη μεταθετάση. Τα γονίδια της μεταθετάσης των δύο αυτών στοιχείων δεν είναι όμοια. (α) Η IS2 είναι μια αλληλουχία ένθεσης 1327 ζευγών βάσεων με αντίστροφες επαναλήψεις των 41 βάσεων ζευγών, στα άκρα της. (β) Το Tn5 είναι ένα σύνθετο μεταθετόνιο 5,7 κιλοβάσεων ζευγών με τις αλληλουχίες ένθεσης IS50L και IS50R στο αριστερό και δεξιό άκρο του, αντίστοιχα. Το IS50L δεν είναι ικανό για ανεξάρτητη μετάθεση, επειδή περιέχει μια μη νοηματική μετάλλαξη (βλ. Τμήμα 10.2) που σημειώνεται με μπλε X στο γονίδιο της μεταθετάσης. Κατά τα άλλα, οι αλληλουχίες των δύο στοιχείων IS50 είναι σχεδόν πανομοιότυπες, αλλά σε αντίστροφη διάταξη. Τα γονίδια *kan*, *str*, και *bleo* προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμικίνη (και νεομικίνη), στρεπτομικίνη, και βλεομικίνη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι η ανθεκτικότητα στη στρεπτομικίνη δεν εκφράζεται στην *Escherichia coli*.

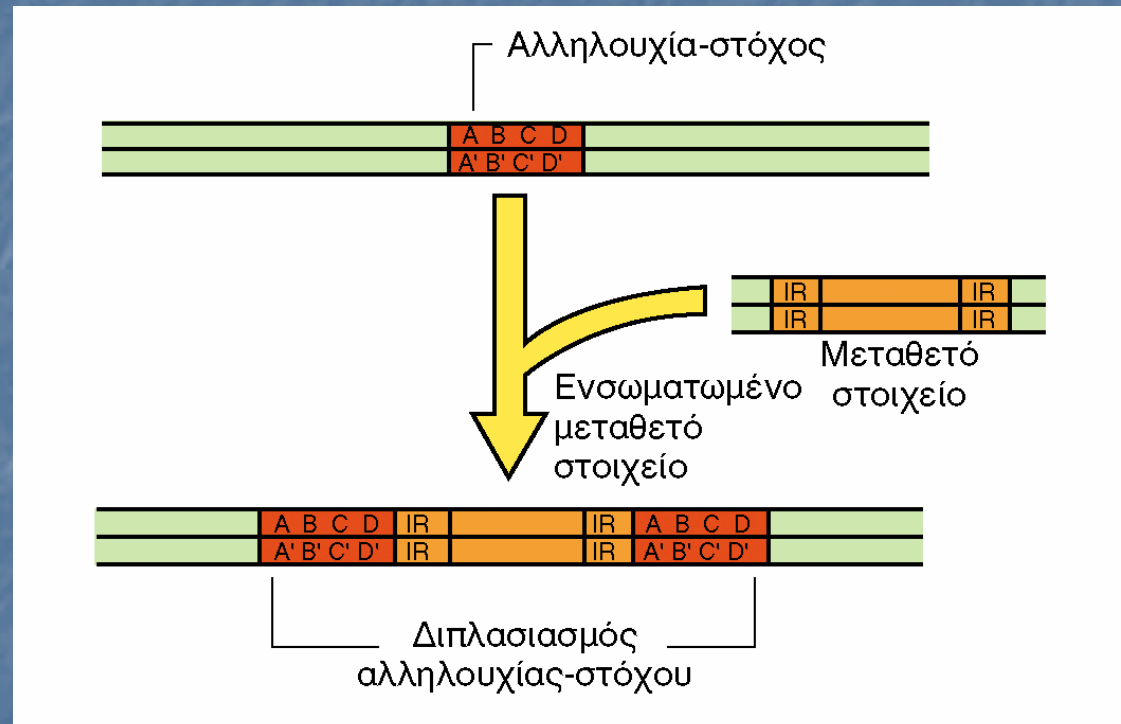
Μηχανισμός Μετάθεσης

Η μεταθέταση αναγνωρίζει της αντίστροφες ακραίες επαναλήψεις

Ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου δεν είναι απόλυτα γνωστός

Η ενσωμάτωση του στοιχείου στο DNA-στόχο οδηγεί στον διπλασιασμό μιας μικρής αλληλουχίας.

2 μηχανισμοί μετάθεσης είναι γνωστοί: ο *συντηρητικός* και ο *αντιγραφικός*.



Εικόνα 10.29

Μετάθεση. Η ενσωμάτωση ενός μεταθετού στοιχείου διπλασιάζει την αλληλουχία-στόχο. Ας σημειωθεί η παρουσία αντίστροφων επαναλήψεων (IR) στα άκρα του μεταθετού στοιχείου. Στην Εικόνα 10.30 παρατίθενται λεπτομερέστερα μοντέλα του μηχανισμού της μετάθεσης.

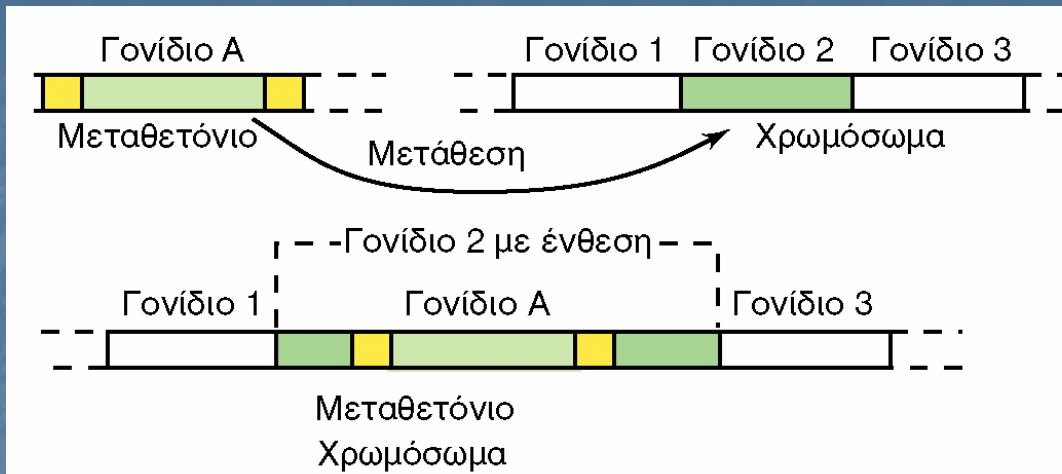
Μεταλλαξιγένεση μεταθετονίου (Transposon mutagenesis)

Εξαιρετικό εργαλείο δημιουργίας μεταλλαγμάτων σχεδόν σε κάθε γονίδιο του γονιδιώματος. Δημιουργία βιβλιοθήξης μεταλλαγμάτων

Προσοχή! Τα μεταλλάγματα είναι τυχαία.

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά χρησιμοποιείται στην επιλογή κλώνων

Σε συνδυασμό με την δοκιμασία συμπληρωματικότητας βοηθά στην ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό των γονιδίων που εμπλέκονται σε βιοχημικά μονοπάτια και διάφορες άλλες λειτουργίες των βακτηρίων



Εικόνα 10.32

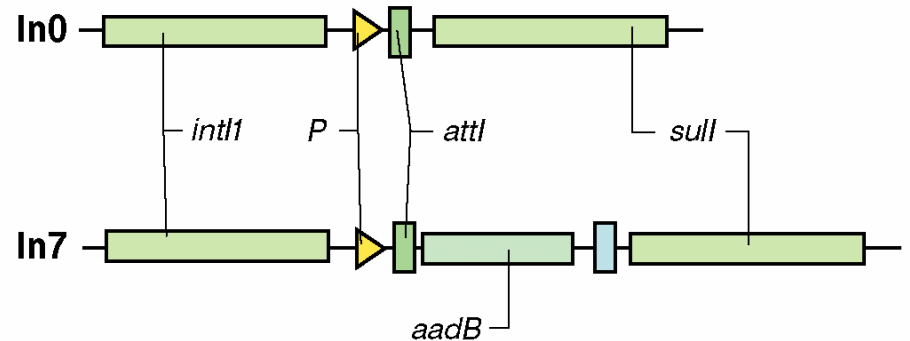
Μεταλλαξιγένεση μεταθετονίου. Το μεταθετόνιο ενσωματώνεται στο γονίδιο 2. Η αλληλουχία του γονιδίου 2 «διακόπτεται» λόγω της παρεμβολής του μεταθετονίου. Έτσι, το γονίδιο 2 απενεργοποιείται. Το γονίδιο A του μεταθετονίου θα εκφραστεί βεβαίως και στις δύο περιπτώσεις.

Ενσωματώνια (Integrans)

Ενσωματώνια: Γενετικά στοιχεία που μπορούν να προσλάβουν και να εκφράσουν γονίδια από άλλες πηγές. Αυτό γίνεται γιατί περιέχουν ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την ενσωματάση (ένζυμο). Έχουν βρεθεί σε πολλά βακτήρια κλινικής σημασίας. Στα ενσωματώνια έχει βρεθεί ότι ενσωματώνονται γονίδια ανθεκτικότητας σε πολλά αντιβιοτικά. Τα ενσωματώνια δεν μπορούν να μετατεθούν παρά μόνο αν είναι τμήμα μεταθετόνιου.

Βρίσκονται ακόμα και σε πλασμίδια ή το βακτηριακό χρωμόσωμα.

Τις περισσότερες φορές η προέλευση των γονιδιακών κασετών (γονίδια που ενσωματώνονται) δεν είναι ξεκάθαρη. σίγουρα όμως είναι αποτέλεσμα οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς



Εικόνα 10.33 Δομή δύο φυσικών ενσωματωρίων της *Pseudomonas*. Το ενσωματόνιο In0 έχει τα ακόλουθα βασικά γονίδια-αλληλουχίες: το γονίδιο *intI1*, που κωδικοποιεί την ενσωματάση· την περιοχή *attI*, η οποία αποτελεί την ειδική θέση ενσωμάτωσης· τον υποκινητή *P*· το γονίδιο ανθεκτικότητας στη σουλφοναμίδη *sull*. Το ενσωματόνιο In7 περιέχει εκτός από όλα τα παραπάνω γονίδια μία επιπλέον γονιδιακή κασέτα, η οποία εμπεριέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμινογλυκοζιτικά αντιβιοτικά, *aadB*. Αυτή η γονιδιακή κασέτα περιέχει επίσης μια θέση (μπλε τετράγωνο) για ανασυνδυασμό ειδικής θέσης.

Τεχνικές βακτηριακής γενετικής: *in vitro*

- Βασικά εργαλεία και τεχνικές
- Περιοριστικά ένζυμα (περιοριστικές ενδονουκλεάσες)
- Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης
- Τεχνικές υβριδοποίησης (Southern blot, Northern blot)
- Αλληλούχιση του DNA
- Σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων
- Μοριακή κλωνοποίηση (πλασμίδια, φάγοι, κοσμίδια ως φορείς κλωνοποίησης)
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
- Μεταλλαξιγένεση *in vitro* (θεσηκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, μεταλλαξιγένεση κασέτας)

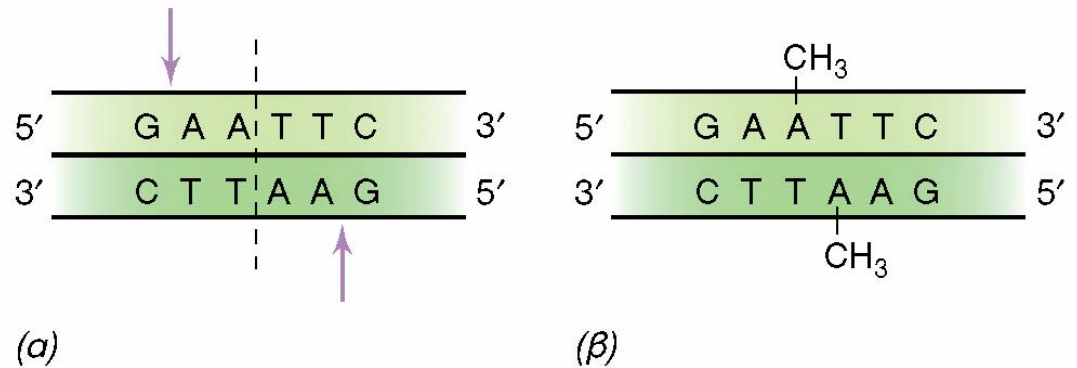
Περιοριστικά Ένζυμα

- Προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί (βακτήρια και Αρχαία) έχουν την ικανότητα πέψης ξένου DNA που εισέρχεται μέσα στο κύτταρο. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε την δεκαετία του 60 και ονομάζεται **φαινόμενο περιορισμού**
- Μερικά χρόνια αργότερα βρέθηκε ότι το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ύπαρξη κάποιων ένζυμων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA (μήκους 4-8 ζεύγη βάσεων) και το κόβουν. Τα ένζυμα ονομάστηκαν **ένζυμα περιορισμού**
- Πολλές από τις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν είναι **παλινδρομικές** (χαρακτηρίζονται από έναν εσωτερικό άξονα συμμετρίας). Τα ένζυμα κόβουν **δίκλωνο** DNA και ανάλογα με το που κόβουν δημιουργούν «κολλώδη» (sticky) ή «τυφλά» (blund) άκρα
- Περιοριστικά ένζυμα που προέρχονται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς μπορεί να αναγνωρίζουν την ίδια αλληλουχία οπότε ονομάζονται **ισοσκιζομερή (isoschizomers)**. Προσοχή! Το ότι αναγνωρίζουν την ίδια αλληλουχία δεν σημαίνει ότι κόβουν πάντοτε στο ίδιο σημείο

Πως οι μικροοργανισμοί που παράγουν περιοριστικά ένζυμα προστατεύουν το DNA τους?

- Το γενετικό υλικό των μικροοργανισμών που παράγουν περιοριστικά ένζυμα περιλαμβάνει αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα που τα ίδια παράγουν.
- Προκειμένου να προστατεύσουν το γενετικό τους υλικό και να μην «αυτοκτονήσουν» διαθέτουν κάποια άλλα ένζυμα που ονομάζονται **ένζυμα τροποποίησης**
- Τα ένζυμα αυτά τροποποιούν χημικά (συνήθως με μεθυλίωση) το DNA μέσα στις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να κόψουν το DNA

Το περιοριστικό ένζυμο EcoRI παράγεται από την *Escherichia coli* και είναι ένα από τα 5 διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα που παράγει αυτό το βακτήριο. προσέξτε ότι κόβει με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργεί «κολλώδη» άκρα



Εικόνα 10.34 Πέψη και τροποποίηση του DNA. (a) Η αλληλουχία-στόχος της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI*. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τους δεσμούς που αποκόπτει το ένζυμο. Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει τον άξονα συμμετρίας της αλληλουχίας. (b) Η ίδια αλληλουχία μετά από τροποποίηση με τη μεθυλάση *EcoRI*. Υποδεικνύονται οι μεθυλομάδες που προστίθενται από το ένζυμο.

Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης

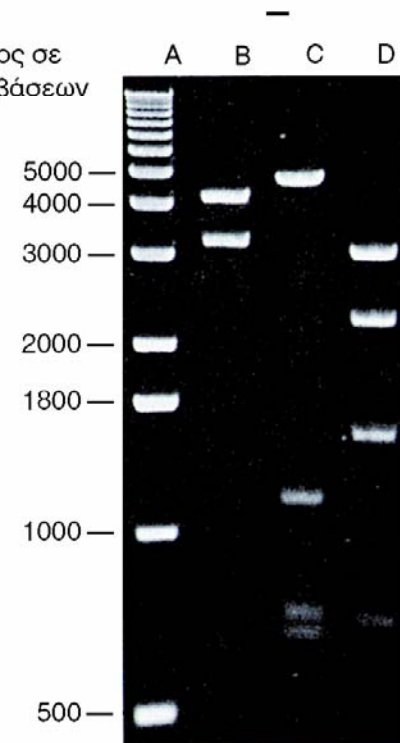
Τεχνική διαχωρισμού νουκλεϊκών οξέων με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που παράγεται από φύκη. Το πήκτωμα (ανάλογα με την συγκέντρωση της αγαρόζης) περιέχει πόρους διαφορετικού μεγέθους που επιτρέπουν την διέλευση του νουκλεϊκού οξέος. Μικρά ή συμπαγή μόρια κινούνται γρηγορότερα. Το βρωμιούχο αιθίδιο «βάφει» τα μόρια ώστε να φαίνονται κάτω από UV ακτινοβολία



Elizabeth Parker

(α)

Μέγεθος σε ζεύγη βάσεων



Jack Parker

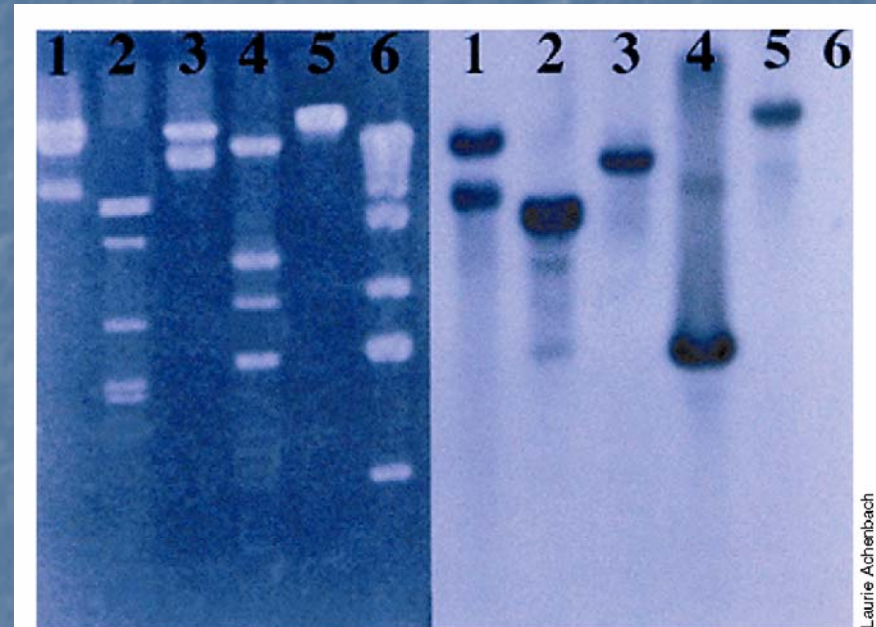
(β)

Εικόνα 10.35

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. (α) Δείγματα DNA τοποθετούνται σε «υποδοχείς» ενός εν μέρει εμβαπτισμένου πηκτώματος αγαρόζης. (β) Φωτογραφία ενός χρωματισμένου πηκτώματος αγαρόζης. Το DNA έχει τοποθετηθεί μέσα σε υποδοχείς στην κορυφή του πηκτώματος (όπως απεικονίζεται), ενώ ο θετικός πόλος του ηλεκτρικού πεδίου βρίσκεται στο αντίθετο άκρο. Το δείγμα στη στήλη A χρησιμοποιείται ως «μάρτυρας», έχοντας μόρια DNA γνωστού μοριακού βάρους. Με τη χρήση των μαρτύρων μπορούμε να προσδιορίσουμε τα μεγέθη των τεμαχίων που υπάρχουν στις άλλες στήλες. Αν και κάθε ζώνη μιας στήλης θα περιέχει τον ίδιο αριθμό τεμαχισμένων μορίων, οι ζώνες χρωματίζονται λιγότερο έντονα στο κάτω άκρο του πηκτώματος, επειδή τα τεμάχια είναι μικρότερα, και από χημικής πλευράς υπάρχει λιγότερο DNA για χρωματισμό.

Τεχνικές υβριδοποίησης

Χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση (ταυτοποίηση) γονιδίων πχ γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά Βασίζονται στην υβριδοποίηση συμπληρωματικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων (DNA-DNA ή DNA-RNA) *Ανιχνευτές* είναι σημασμένα (πχ με ραδιενεργό P^{32}) μόρια νουκλεϊκών οξέων. Τα προς ανίχνευση γονίδια διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση, αποδιατάσσονται και μεταφέρονται σε ειδική μεμβράνη πριν υβριδιστούν με τους ανιχνευτές.



Laurie Acherbach

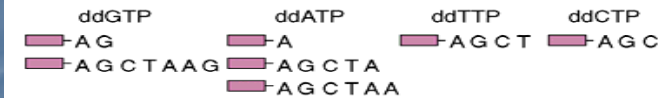
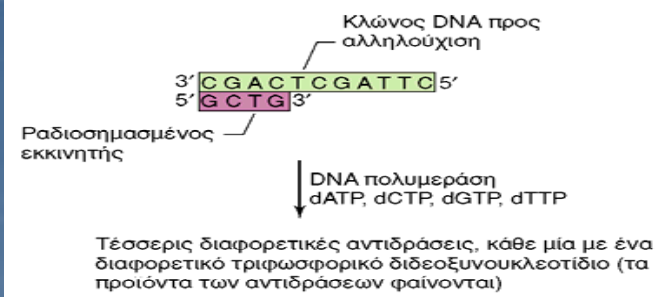
Εικόνα 10.37

Στύπωμα κατά Southern. (Αριστερά) Ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πύκτωμα αγαρόζης. Καθαρά μόρια DNA προερχόμενα από διάφορα πλασμίδια υπέστησαν επεξεργασία με περιοριστικά ένζυμα και έπειτα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση. (Δεξιά) Στύπωμα κατά Southern του πηκτώματος DNA που φαίνεται στα αριστερά. Η υβριδοποίηση του στυπώματος έγινε με ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή. Η ανίχνευση της θέσης των ζωνών πραγματοποιείται με αυτοραδιογραφία ακτίνων Χ. Ας σημειωθεί πως μόνο μερικά από τα μόρια DNA έχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές με αυτές του σημασμένου ανιχνευτή. Η στήλη 6 περιείχε DNA που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μεγέθους, ενώ καμία από τις ζώνες στον ανιχνευτή δεν υβριδοποιήθηκε.

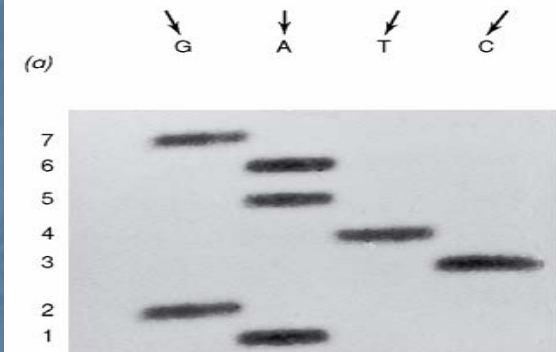
Καθορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (αλληλούχιση) του DNA

Βασίζεται στην *in vitro* αντιγραφή του DNA από την DNA πολυμεράση.

Η μέθοδος Sanger στηρίζεται στο γεγονός ότι διδεόξυνουκλεοτίδια μπλοκάρουν την DNA πολυμεράση

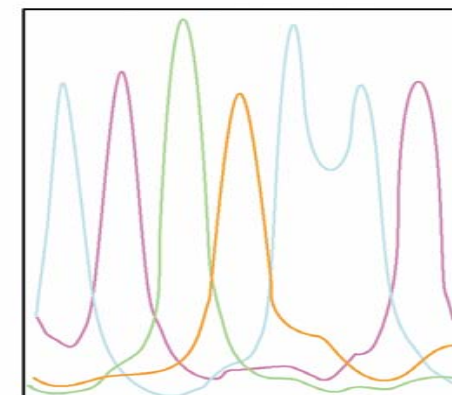


Τα προϊόντα των αντιδράσεων διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ταυτοποιούνται με αυτοραδιογραφία.



Ανάγνωση αλληλουχίας από τη βάση του πηκτώματος ως A G C T A A G. Η άγνωστη αλληλουχία είναι 3' T C G A T T C.

(β)



(γ)

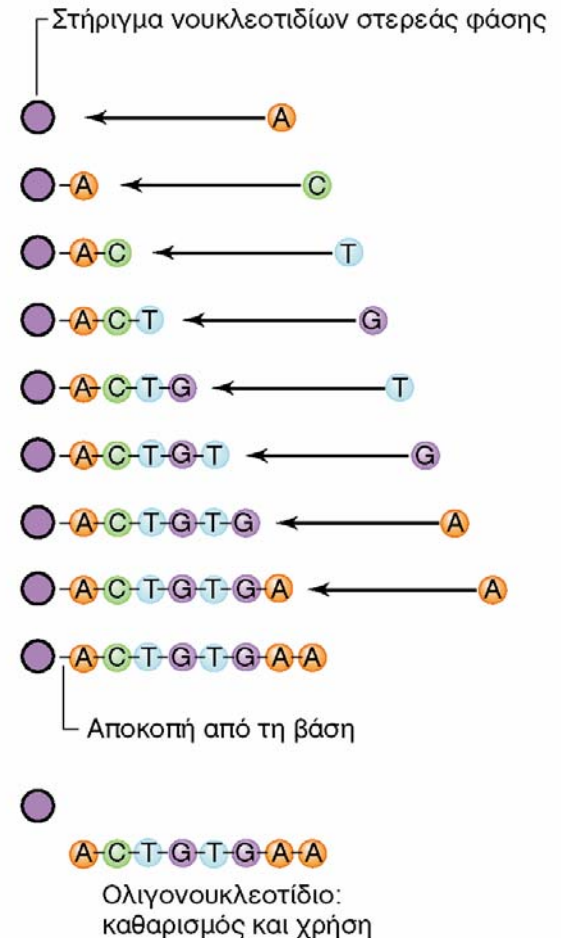
Εικόνα 10.39

Αλληλούχιση DNA με τη μέθοδο Sanger. (α) Η αλυσίδα DNA που λειτουργεί ως εκμαγείο είναι το DNA του οποίου την αλληλουχία θέλουμε να προσδιορίσουμε. Ας σημειωθεί πως πρέπει να αναλυθούν τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις, μία για κάθε διδεοξυνουκλεοτίδιο. (β) Ένα τμήμα του πηκτώματος που περιέχει τα προϊόντα των αντιδράσεων του (α). (γ) Αποτελέσματα της αυτοματοποιημένης φασματοσκοπικής ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA.

Σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων

Ολιγονουκλεοτίδια μήκους 20-100 νουκλεοτιδίων χρησιμοποιούνται ως *εκκινητές* ή *ανιχνευτές* και παρασκευάζονται *in vitro* (χημεία στερεής φάσης)
Η διαδικασία είναι αυτοματοποιημένη και διαρκεί λίγες ώρες.

Βρίσκουν εφαρμογή σε πληθώρα τεχνικών



Εικόνα 10.40

Διαδικασία στερεάς φάσης για τη σύνθεση ενός μορίου DNA δεδομένης αλληλουχίας. Η χημική σύνθεση επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου κάθε φορά στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα.

Μοριακή κλωνοποίηση: Η αρχή της Γενετικής Μηχανικής

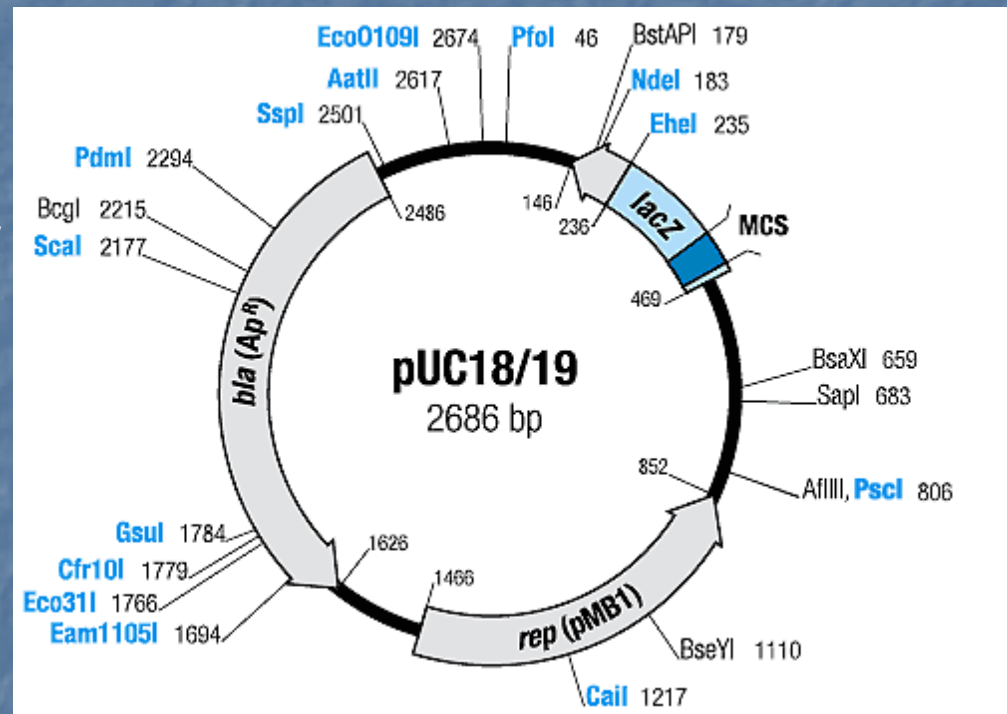
- Σκοπός: Απομόνωση σε καθαρή μορφή μεγάλων ποσοτήτων γονιδίων ή χρωμοσωμικών τμημάτων. Αυτό διευκολύνει την ανάλυση γονιδιωμάτων και γονιδιακών λειτουργιών. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές βασίζονται στην διαδικασία αυτή (πχ παραγωγή ινσουλίνης σε βακτήρια).

Βασικά βήματα της διαδικασίας

- Φορέας κλωνοποίησης (πλασμίδιο, κοσμίδιο, φάγος)
- Ένθεμα (το γονίδιο που μας ενδιαφέρει)
- In vitro τοποθέτηση του γονιδίου στο φορέα (περιοριστικά ένζυμα, λιγάση)
- Μετασχηματισμός
- Εύρεση του κλώνου που περιέχει το ένθεμα

Πλασμίδια ως φορείς κλωνοποίησης

Ιδανικός φορέας: Μικρό μέγεθος
 Μεγάλος αριθμός αντιγράφων
 Μεγάλος αριθμός θέσεων ενζύμων
 περιορισμού. Εύκολος προσδιορισμός
 κλώνων που περιέχουν το ένθεμα
 (επιλέξιμοι δείκτες)



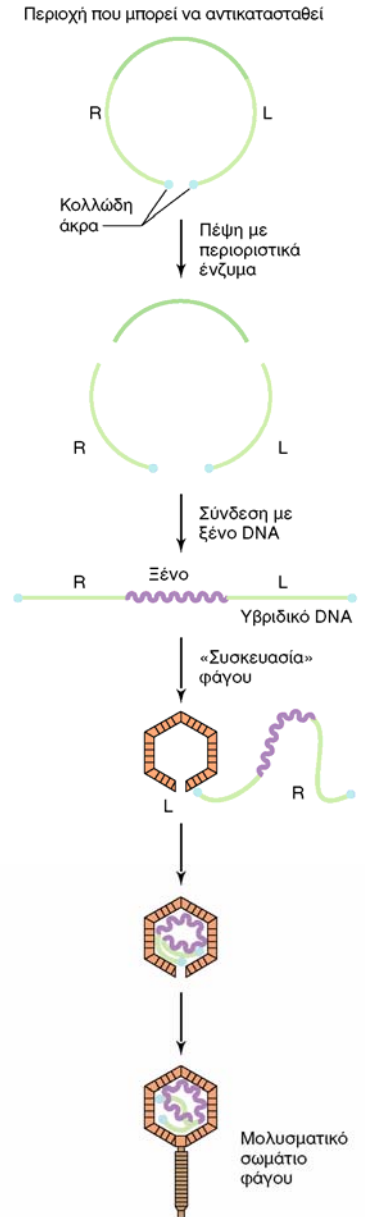
M13/pUC sequencing primer (-20), 17-mer		399	HindIII	PaeI	SdaI	BveI	PstI	HincII	Sall	XmiI	XbaI	BamHI	Cfr9I	Eco88I	SmaI	Acc65I	KpnI	Ecl136II	Eco24I	SacI	EcoRI	XapI	455							
5'	G TAA AAC GAC GGC CAG TGC	CAA	GCT	TGC	ATG	CCT	GCA	GGT	CGA	CTC	TAG	AGG	ATC	CCC	GGG	TAC	CGA	GCT	CGA	ATT	CGT	AAT	CAT	GGT	CAT	AGC	TGT	TTC	CTG	3'
3'	C ATT TTG CTG CCG GTC ACG	GTT	CGA	ACG	TAC	GGA	CGT	CCA	GCT	GAG	ATC	TCC	TAG	GGG	CCC	ATG	GCT	CGA	GCT	TAA	GCA	TTA	GTA	CCA	GTA	TCG	ACA	AAG	GAC	5'
LacZ ← Val Val Ala Leu Ala		Leu	Ser	Ala	His	Arg	Cys	Thr	Ser	Glu	Leu	Pro	Asp	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Ser	Asn	Thr	Ile	Met	Thr	Met					

M13/pUC reverse sequencing primer (-28), 17-mer

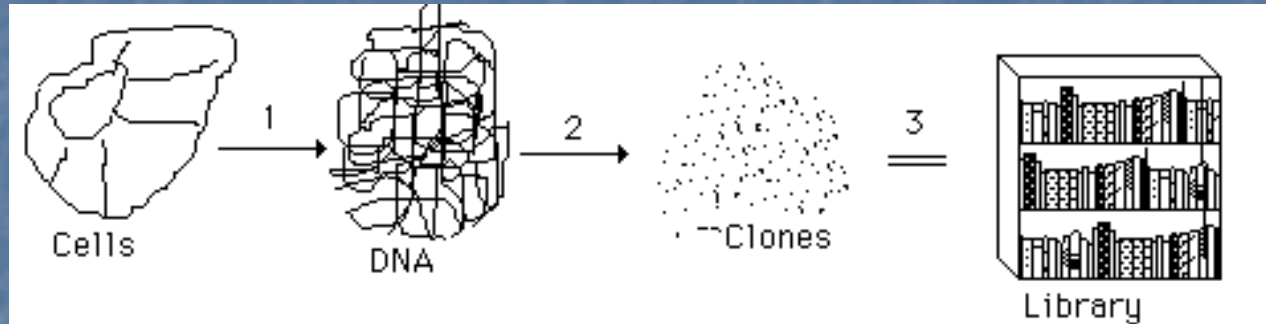
Τροποποιημένος λ φάγος ως φορέας κλωνοποίησης

λ φάγοι που περιέχουν 1 ή 2 θέσεις περιοριστικών ενζύμων χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση μεγάλων τμημάτων DNA (40-45 kb)

Το κοσμίδιο είναι υβριδικός φορέας (έχει χαρακτηριστικά πλασμιδίου και λ φάγου)
Χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση μεγάλων τμημάτων DNA. Δημιουργία Γενωματικών Βιβλιοθηκών



Τι είναι μια Γονιδιωματική Βιβλιοθήκη?



Βήματα για την κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

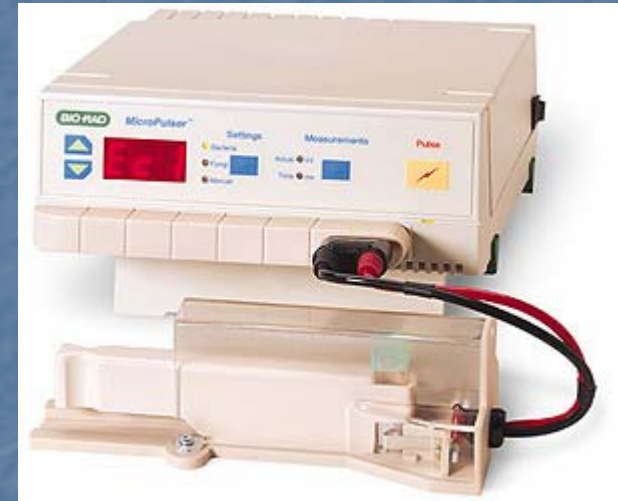
1. Απομόνωση DNA
2. Τυχαία δημιουργία μεγάλων κομματιών του DNA (μερική πέψη, μηχανικό σπάσιμο)
3. Κλωνοποίηση των κομματιών σε κατάλληλο φορέα (κοσμίδιο)
4. Συλλογή μεγάλου αριθμού κλώνων (κάλυψη του γονιδιώματος) και φύλαξη τους

Μετασχηματισμός στο εργαστήριο (Χημικός)

- Τα περισσότερα βακτήρια δεν είναι «ικανά» να προσλάβουν αυθόρμητα ξένο DNA παρά μόνο μετά από επεξεργασία
- Έχει μεγάλη σημασία τα εργαστηριακά στελέχη (DH5α, HB101, JM109) που χρησιμοποιούνται για μετασχηματισμό να μην διαθέτουν ενεργό σύστημα περιορισμού.
- Βακτήρια που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης επεξεργάζονται με CaCl_2 ή RbCl σε χαμηλή θερμοκρασία
- Τα βακτήρια προς μετασχηματισμό επωάζονται με το DNA σε χαμηλή θερμοκρασία και στην συνέχεια υποβάλλονται σε σύντομο θερμικό σοκ.
- Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επωάζονται σε βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (φαινοτυπική έκφραση) και επιστρώνονται σε θρεπτικά μέσα επιλογής

Μετασχηματισμός στο εργαστήριο (Ηλεκτροδιάτρηση)

Σύντομοι (msec) ηλεκτρικοί παλμοί υψηλής τάσης δημιουργούν στιγμιαία πόρους στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων με αποτέλεσμα την είσοδο ή έξοδο DNA
Πλεονέκτημα: πολύ καλύτερη απόδοση μετασχηματισμού
Μειονέκτημα : Μεγάλο κόστος



Εύρεση του κλώνου που περιέχει το ένθεμα

Θρεπτικά μέσα περιέχουν αντιβιοτικά, IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοζίνη), X-gal (χρωμοφόρο υπόστρωμα). Οι άσπρες αποικίες περιέχουν τον φορέα με ένθεμα.

Οι μπλε μόνο τον φορέα

Παρατηρήστε τις πολύ μικρές άσπρες αποικίες (satellite colonies).

Πως ελέγχουμε αν οι άσπρες αποικίες περιέχουν σίγουρα το ένθεμα?

Αν επαναλαμβανόμενα πειράματα μετασχηματισμού μας δίνουν μόνο μπλε αποικίες τι μπορεί να συμβαίνει?



Figure 9.8 Blue-white screening on medium with ampicillin, X-gal, and IPTG. Blue colonies contain nonrecombinant plasmids. White colonies contain recombinant plasmids and can be isolated directly from this plate.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

- Με την μοριακή κλωνοποίηση ουσιαστικά πολλαπλασιάζουμε ένα γονίδιο *in vivo* καθώς είναι απαραίτητη η χρήση βακτηρίων. Επανάσταση στην γενετική μηχανική έφερε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που πολλαπλασιάζει το DNA με εξαιρετική απόδοση *in vitro* (μπορούμε να πολλαπλασιάσουμε το DNA έως και 10^9 φορές)
- Απαραίτητα συστατικά της PCR: Το DNA που μας ενδιαφέρει να πολλαπλασιάσουμε (ελάχιστη ποσότητα αρκεί). Τα 4 δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), μια θερμοανθεκτική πολυμεράση (Taq, Pfu), ιόντα Mg απαραίτητα για την ενζυμική λειτουργία της πολυμεράσης, συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (συνήθως 18-21 βάσεις) που λειτουργούν ως *εκκινητές*

Τα στάδια ενός κύκλου της PCR

A) Αποδιάταξη του DNA-στόχου

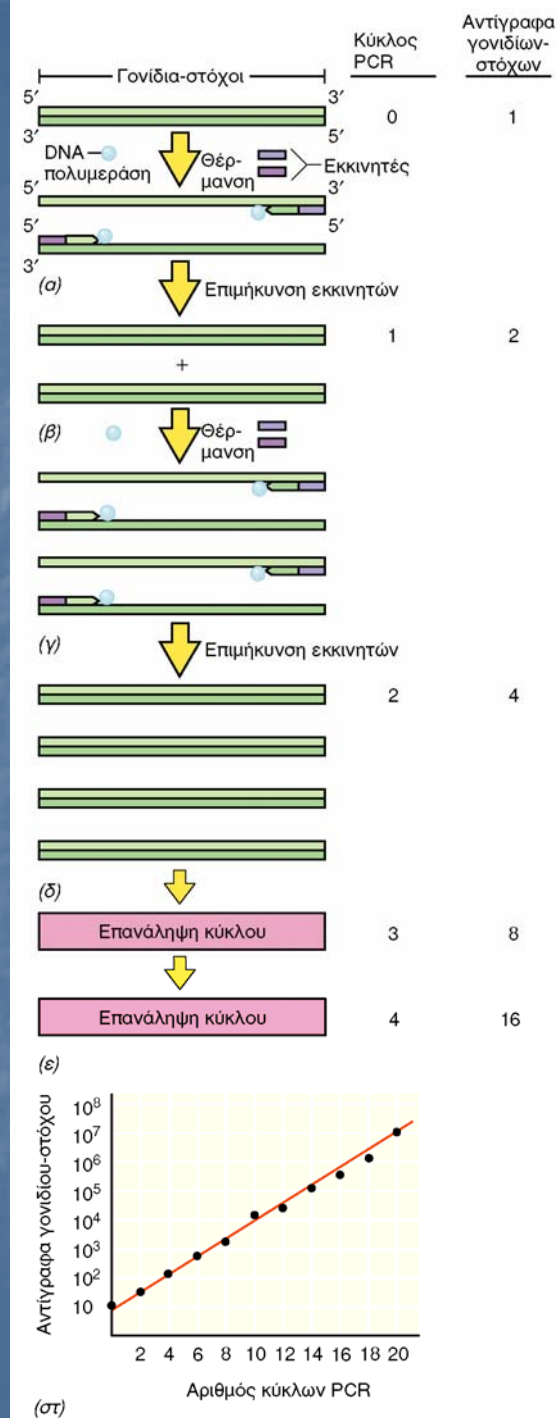
B) Υβριδισμός των εκκινητών

Γ) Επιμήκυνση των δύο κλώνων του DNA από την DNA πολυμεράση

Προσέξτε την εκθετική αύξηση των αντιγράφων του DNA-στόχου

Εικόνα 10.45

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. (α) Το DNA-στόχος θερμαίνεται ώστε να διαχωριστούν οι αλυσίδες, και προστίθεται σε αυτό DNA πολυμεράση και περίσσεια δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, ο ένας εκ των οποίων είναι συμπληρωματικός στη μία αλυσίδα και ο άλλος στη συμπληρωματική της. (β) Μετά την επαναδιάταξη των εκκινητών, η διαδικασία της επιμήκυνσης οδηγεί στη δημιουργία ενός αντιγράφου του αρχικού δίκλωνου DNA. (γ) Περαιτέρω θέρμανση, επαναδιάταξη εκκινητών, και επιμήκυνση δίνει ένα δεύτερο δίκλωνο DNA. (δ) Το δεύτερο δίκλωνο DNA. (ε) Δύο ακόμη κύκλοι PCR δίδουν αντίστοιχα 8 και 16 αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας DNA. (στ) Αποτέλεσμα 20 κύκλων PCR σε ένα παρασκεύασμα DNA που αρχικά περιείχε 10 αντίγραφα του γονιδίου-στόχου. Σημειώστε ότι το διάγραμμα είναι ημιλογαριθμικό.



Θερμοκυκλοποιητές-Εφαρμογές της PCR

Θερμοκυκλοποιητές είναι
μηχανήματα για PCR
Αυτοματοποιημένες συνθήκες,
μεγάλο κόστος

Εφαρμογές PCR

Κλωνοποίηση

Αλληλούχιση

Μελέτη έκφρασης γονιδίων (RT-
PCR)

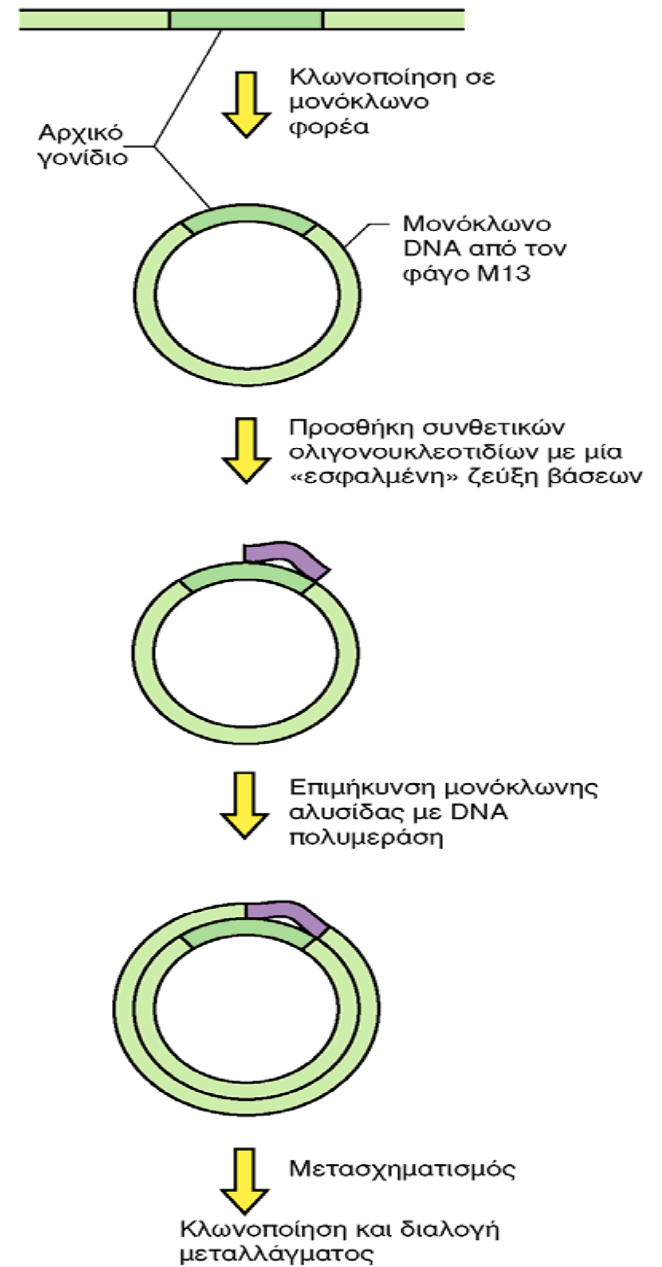
Μεταλλαξιγένεση

Διάγνωση ασθενειών (βακτήρια,
ιοί)



Θεσηκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

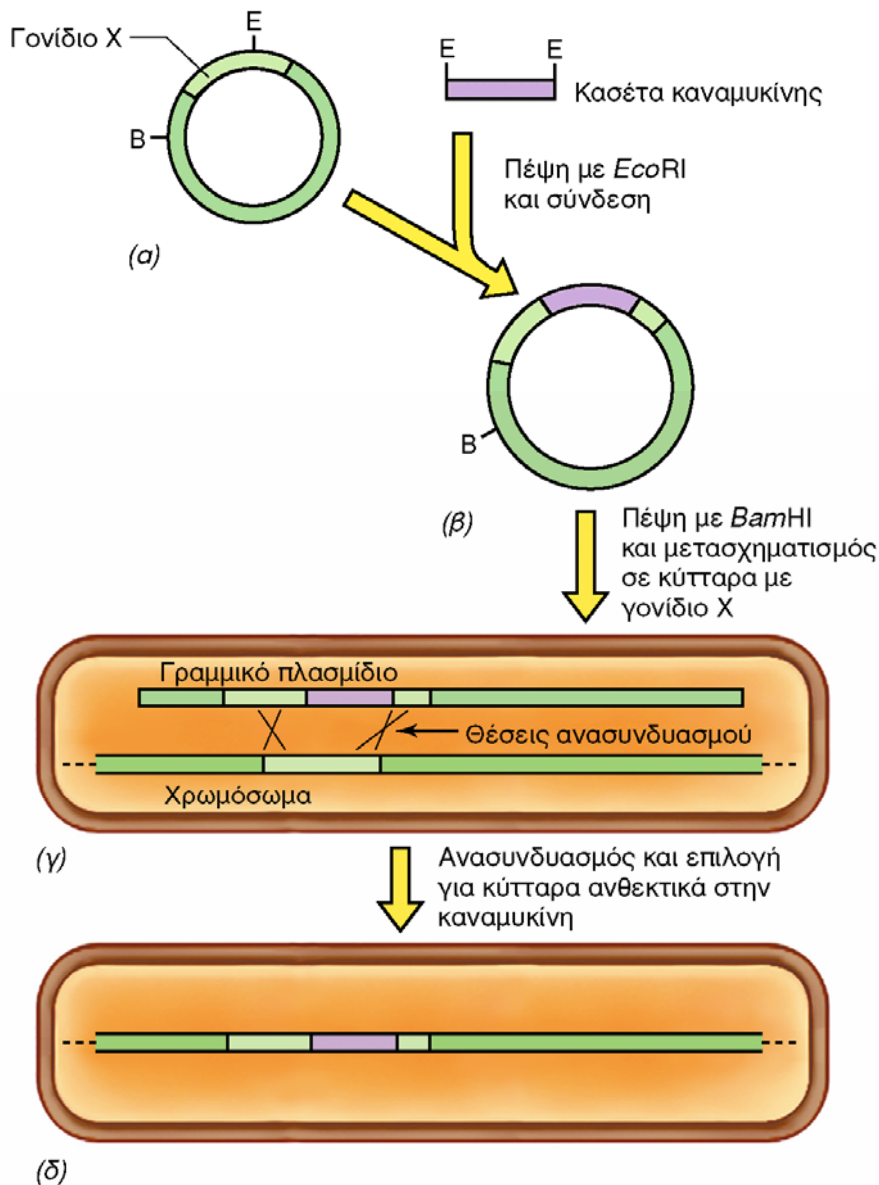
(site-directed mutagenesis)



Εικόνα 10.46

θεσηκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση με τη χρήση μικρών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών θραυσμάτων.

Μεταλλαξιγένεση κασέτας και διάρρηξη γονιδίου



Εικόνα 10.47

Διάρρηξη γονιδίου με τη χρήση μεταλλαξιγένεσης κασέτας. (α) Ένα πλασμίδιο που περιέχει κλωνοποιημένο αντίγραφο άγριου τύπου του γονιδίου X τέμνεται με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI* και αναμειγνύεται με θραύσμα DNA (την κασέτα καναμυκίνης) που περιέχει ένα γονίδιο ικανό να προσδώσει σε κάποιο κύτταρο ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη· το κύτταρο έχει απομονωθεί με τη χρήση του ίδιου περιοριστικού ενζύμου. Γίνεται σύνδεση του πλασμιδίου που έχει κοπεί και της κασέτας. (β) Το προϊόν της σύνδεσης περιέχει την κασέτα καναμυκίνης ως μετάλλαξη ένθεσης στο γονίδιο X. Το νέο πλασμίδιο τέμνεται με ένα άλλο περιοριστικό ένζυμο, το *BamHI*, και μετασχηματίζεται σε κύτταρο που περιέχει ένα γονίδιο X άγριου τύπου. (γ) Το μετασχηματισμένο κύτταρο περιέχει τόσο το γραμμικό πλασμίδιο με το διαρρηχθέν γονίδιο X όσο και ένα χρωμοσωματικό αντίγραφο άγριου τύπου του γονιδίου X. Σε ορισμένα κύτταρα, σημειώνονται ομόλογοι ανασυνδυασμοί μεταξύ του άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών του γονιδίου X. (δ) Τα κύτταρα που μπορούν να αυξηθούν παρουσία καναμυκίνης σημαίνει ότι έχουν την ανασυνδυασμένη κασέτα καναμυκίνης στο χρωμόσωμά τους, επειδή το πλασμίδιο που έγινε γραμμικό δεν μπορεί να αντιγραφεί αυτόνομα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν τώρα ένα μόνο διαρρηχθέν αντίγραφο του γονιδίου X. Τυπικά, η διάρρηξη απενεργοποιεί πλήρως το γονίδιο X.