

ΘΕΤΙΚΗΣ  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

## ΒΙΟΛΟΓΙΑ

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ:  
ΝΟΤΑ ΛΑΖΑΡΑΚΗ  
ΜΑΤΙΝΑ ΜΑΝΙΑΤΗ  
ΠΑΝΑΪΛΑ ΚΕΛΙΔΟΥ  
ΒΑΓΓΕΛΗΣ ΚΑΡΟΥΣΗΣ



Η τεχνική της PCR είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη και χρήσιμη για την Ιατρική μέθοδος, διότι μέσω αυτής επιτυγχάνεται η ανίχνευση ποικίλων παθολογικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων και καρκινικών κυττάρων. Η διαγνωστική μέθοδος χρησιμοποιείται σήμερα για τον εντοπισμό καρκινικών κυττάρων σε συμπαγείς όγκους, όπως το μελάνωμα, ο καρκίνος μαστού και ο προστάτης, καθώς είναι μέσω αυτής δυνατή η ανίχνευση ακόμη και ενός μόνον καρκινικού κυττάρου ανάμεσα σε 10-100 εκατομμύρια υγιή κύτταρα...

## PCR ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ



Είναι γνωστό ότι η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) προσφέρει πλήθος εφαρμογών, μεταξύ των οποίων η διάγνωση της μόλυνσης του ανθρώπου από τον HIV, τον ιό που προκαλεί το AIDS. Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή μόλυνση ενός ατόμου από κάποιο στέλεχος του ιού απομονώνεται τμήμα του γονιδιώματος λεμφοκυττάρων του ατόμου, το οποίο κλωνοποιείται με τη μέθοδο PCR. Στη συνέχεια αναζητείται σε αυτό η πιθανή παρουσία της ακόλουθης αλληλουχίας που αποτελεί μέρος του γενετικού υλικού του εν λόγω ιού:

3' AAGGGCGTAACCGAAATCGGT 5'  
5' TTCCCGCATTGGCTTTAGCCA 3'

- A.** Για ποιο λόγο είναι απαραίτητη η κλωνοποίηση των τμημάτων που απομονώνονται από το γονιδίωμα των διαφόρων οργανισμών προκειμένου να μελετηθεί η αλληλουχία τους;  
**B.** Με ποιες άλλες μεθόδους είναι δυνατό να κλωνοποιηθεί τμήμα του γενετικού υλικού ενός οργανισμού; Ποια είναι τα κύρια χαρακτηριστικά των μεθόδων αυτών και οι διαφορές τους;  
**Γ.** Ποιο πλεονέκτημα χαρακτηρίζει τη μέθοδο PCR έναντι των άλλων μεθόδων κλωνοποίησης του DNA;

**Δ.** Δεδομένου ότι σε τμήμα DNA που απομονώθηκε από ένα λεμφοκύτταρο ανθρώπου είχε πράγματι ενσωματωθεί μία φορά η ική αλληλουχία, πόσα αντίγραφα της αλληλουχίας θα προκύψουν από ένα αρχικό τμήμα μετά από 20 επαναλαμβανόμενους κύκλους;

**Ε.** Η τεχνική κλωνοποίησης με PCR περιλαμβάνει διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης των δίκλωνων τμημάτων DNA που απομονώνονται και αντιγραφής των μονόκλωνων αλυσίδων DNA με τη βοήθεια μίας ειδικής DNA πολυμεράσης, η οποία ως γνωστό συνδέει νουκλεοτίδια με φωσφοδιεστερικό δεσμό.

**i)** Τι είναι η αποδιάταξη και με ποιους τρόπους γνωρίζετε ότι αυτή είναι δυνατή;

**ii)** Πόσοι δεσμοί υδρογόνου σπάζουν και πόσοι φωσφοδιεστερικοί δημιουργούνται κατά τον 1ο κύκλο αντιγραφής της συγκεκριμένης ικής αλληλουχίας;

**iii)** Ποια άλλα ένζυμα γνωρίζετε ότι συνδέουν νουκλεοτίδια με φωσφοδιεστερικό δεσμό και ποιος είναι ο ρόλος τους στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και τις σύγχρονες τεχνικές της Γενετικής Μηχανικής;

## ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

**A.** Η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA των διαφόρων οργανισμών είναι σήμερα τεχνική ρουτίνας στα βιολογικά εργαστήρια του κόσμου. Όμως τόσο η ανάλυση και η μελέτη των αλληλουχιών αυτών όσο και η παραγωγή επαρκών ποσοτήτων πρωτεϊνών που αυτά κωδικοποιούν **απαιτούν την ύπαρξη μεγάλου αριθμού αντιγράφων των τμημάτων του DNA.** Η δημιουργία μεγάλου αριθμού αντιγράφων από ένα DNA ονομάζεται κλωνοποίηση και το σύνολο των πανομοιότυπων αυτών αντιγράφων αποτελεί έναν κλώνο.

**B.** Η κλωνοποίηση του DNA ενός οργανισμού είναι σήμερα εφικτή, εκτός της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με τη μέθοδο της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης και της cDNA βιβλιοθήκης.

Με τη **γονιδιωματική βιβλιοθήκη** κλωνοποιείται όλο το γονιδίωμα ενός οργανισμού, αφού προηγουμένως αυτό έχει κοπεί σε μικρότερα τμήματα με τη βοήθεια μίας περιοριστικής ενδονουκλεάσης και μέσω των φορέων κλωνοποίησης εισέρχεται σε βακτηριακά κύτταρα ξενιστές όπου και αντιγράφεται πολλές φορές. Τα τμήματα αυτά είναι δυνατό να περιέχουν γονίδια, τμήματα γονιδίων, αλλά και περιοχές του γονιδιώματος που δεν αποτελούν γενετική πληροφορία. Επιπλέον, στο εσωτερικό των γονιδίων που περιέχονται σε μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη υπάρχουν οι περιοχές που δεν μεταφράζονται σε αμινοξέα, τα εσώνια. Η **cDNA βιβλιοθήκη** αποτελεί ένα σύνολο βακτηριακών κλώνων στους οποίους περιέχεται μέρος του γονιδιώματος ενός οργανισμού και συγκεκριμένα μόνον εκείνο που εκφράζεται σε έναν κυτταρικό τύπο. Εξαιτίας του μηχανισμού κατασκευής της cDNA βιβλιοθήκης (με την απομόνωση του ολικού ώριμου mRNA από ένα κύτταρο του οργανισμού), στα κλωνοποιημένα τμήματά της περιέχονται οι αλληλουχίες που αποτελούν τα γονίδια που εκφράζονται σε αυτό χωρίς τα εσώνιά τους. Για τον λόγο αυτό, η cDNA βιβλιοθήκη αποτελεί επιπλέον έναν πρόσφορο μηχανισμό για την παραγωγή βιολογικών ενεργών πρωτεϊνών από τα βακτήρια.

**Γ.** Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι τεχνική επιλεκτικής αντιγραφής ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA που απομονώνεται από ένα σύνολο τμημάτων που συμβαίνει στο δοκιμαστικό σωλήνα (in vitro), χωρίς δηλαδή τη διαμεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Το γεγονός αυτό αποτελεί πλεονέκτημα της μεθόδου έναντι των άλλων δύο όταν πρόκειται να μελετηθεί η αλληλουχία βάσεων του εν λόγω τμήματος, καθώς η διαδικασία είναι απλούστερη και λιγότερο χρονοβόρα.

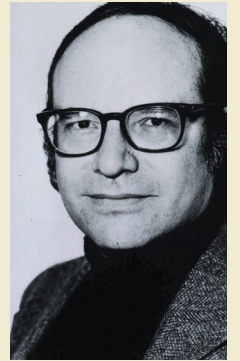
www.poukamisas.gr

# 20 ΧΡΟΝΙΑ

φροντιστήρια  
**ΠΟΥΚΑΜΙΣΑΣ**

ΑΓ. ΒΑΡΒΑΡΑ • ΑΓ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ  
(ΝΕΟ) ΑΓ. Ι. ΡΕΝΤΗΣ • ΑΙΓΑΛΕΩ  
ΑΜΦΙΑΛΗ • ΓΑΛΑΤΣΙ • ΓΛΥΦΑΔΑ  
ΔΡΑΠΕΤΣΩΝΑ • ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΚΑΛΛΙΘΕΑ • ΚΟΡΥΔΑΛΛΟΣ  
ΛΑΡΙΣΑ • ΜΕΓΑΡΑ • ΜΟΣΧΑΤΟ  
ΝΕΑ ΣΜΥΡΝΗ • ΝΙΚΑΙΑ • ΠΕΙΡΑΙΑΣ  
ΠΕΡΑΜΑ • ΠΕΡΙΣΤΕΡΙ

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΓΟΥΟΛΤΕΡ ΤΖΙΛΜΠΕΡΤ  
(1932)

Από λάτρη της ανόργανης χημείας και από μεταπτυχιακός απόφοιτος του Χάρβαρντ και του Κέιμπριτζ στη φυσική έγινε ένας από τους κορυφαίους καθηγητές μοριακής βιολογίας, βιοχημείας και βιοφυσικής. Δίδαξε στο αγαπημένο του Χάρβαρντ - γέννημα θρέμμα γαρ της Βοστώνης - και από το 1974 προσφέρει υπηρεσίες στην Αντικαρκινική Εταιρεία των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής. Η μεγαλύτερη στιγμή της επιστημονικής του σταδιοδρομίας καταγράφηκε το 1980 όταν μοιράστηκε μαζί με τον Βρετανό φρέντερικ Σάνγκερ το Νόμπελ Χημείας «για τις συνεισφορές τους στην επιστήμη σχετικά με τον προσδιορισμό των αλληλουχιών των βάσεων στα νουκλεϊνικά οξέα». Στη βιολογία και συγκεκριμένα στις εργασίες για ανακάλυψη αγγελιοφόρου του RNA και μελέτη της σύνθεσης των πρωτεϊνών τον μύση από το τέλος της δεκαετίας του 1950 ο ήδη τότε διάσημος μελετητής του DNA Τζέιμς Γουότσον. Ο Τζιλμπέρτ γνώρισε τον Γουότσον στην Αγγλία όταν τελείωσε τα μεταπτυχιακά στο Κέιμπριτζ και συμμετείχε σε πειράματα για αντίγραφο γονιδίων. Έτσι πήρε το «μικρόβιο» της Μοριακής Βιολογίας και παρότι καθηγητής φυσικής με τάσεις προς την αστρονομία έστρεψε τα μικροσκόπιά του στα έγκατα των γενετικών κωδίκων.

www.poukamisas.gr

**Δ.** Κατά την αντιγραφή του τμήματος που απομονώθηκε αρχικά από το λεμφοκύτταρο προκύπτουν 2 (2<sup>1</sup>) αντίγραφα στον 1ο κύκλο. Κατά τον 2ο κύκλο αντιγραφής θα προκύψουν 2<sup>2</sup> αντίγραφα, στον 3ο κύκλο 2<sup>3</sup>, στον 4ο κύκλο 2<sup>4</sup> αντίγραφα κ.ο.κ. Συνεπώς, από τους 20 κύκλους αντιγραφής θα προκύψουν 2<sup>20</sup> αντίγραφα της αλληλουχίας του ιού. (Να σημειωθεί ότι 20 κύκλοι αντιγραφής ολοκληρώνονται μόλις σε 1,5 ώρα!)

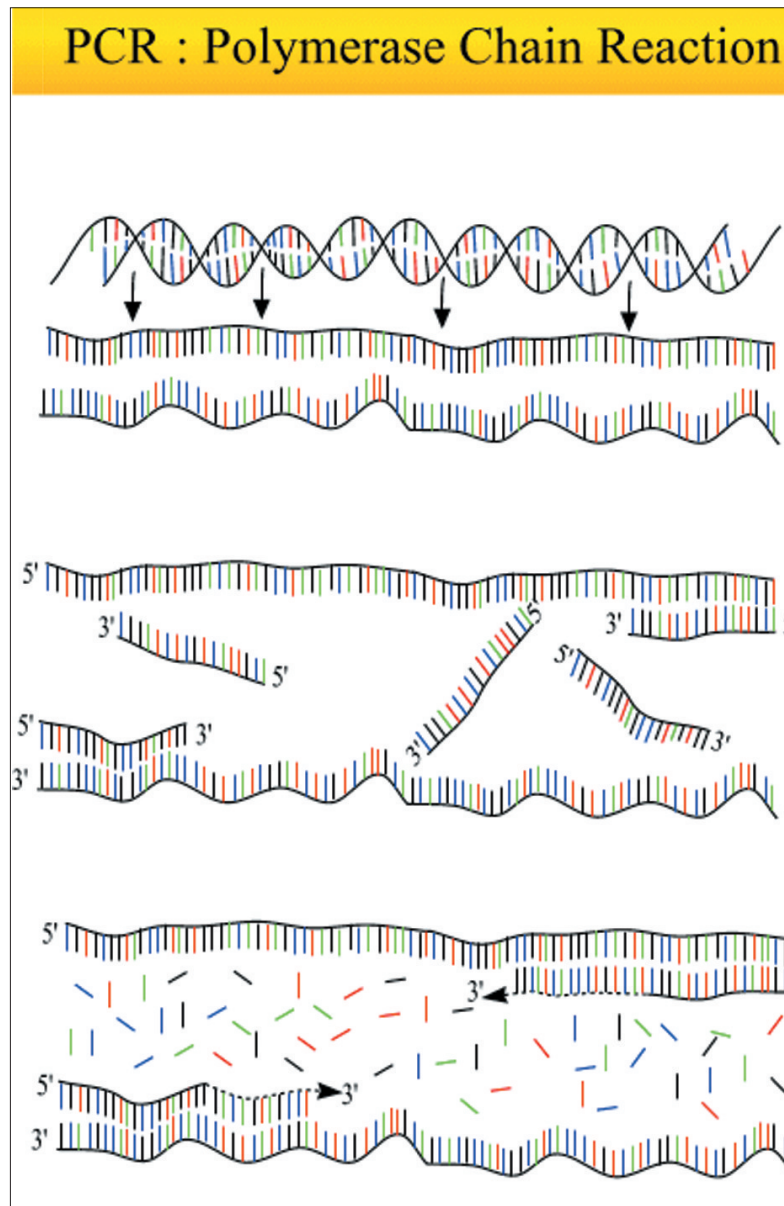
**Ε. i)** Αποδιάταξη ονομάζεται ο αποχωρισμός των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων ενός δίκλωμου μορίου DNA ή υβριδικού μορίου DNA-RNA. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει επειδή σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν ενωμένες τις δύο αλυσίδες και αυτό επιτυγχάνεται με την επίδραση κατάλληλων χημικών ουσιών ή αύξηση της θερμοκρασίας σε κατάλληλες τιμές.

**ii)** Κατά την αποδιάταξη της ικής αλληλουχίας σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν ενωμένες τις δύο αλυσίδες, ο αριθμός των οποίων καθορίζεται από τον αριθμό βάσεων αδενίνης (A) – θυμίνης (T) και γουανίνης (G) – κυτοσίνης (C). Δεδομένου ότι μεταξύ μίας A και μίας T αναπτύσσονται 2 δεσμοί υδρογόνου ενώ μεταξύ μίας G και μίας C αναπτύσσονται τρεις, το σύνολο των δεσμών που σπάζουν κατά την αποδιάταξη της αλληλουχίας είναι  $2 \cdot 10 + 3 \cdot 11 = 53$  δεσμοί υδρογόνου.

Μετά την αποδιάταξη κάθε μία από τις αρχικές αλυσίδες λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων. Δεδομένου ότι κάθε αρχική αποτελείται από 21 νουκλεοτίδια, κάθε νέα θα αποτελείται επίσης από 21 νουκλεοτίδια που θα συγκρατούνται ενωμένα με 20 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Συνεπώς, συνολικά σχηματίζονται 40 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί.

**iii)** Ένζυμα που καταλύουν τη σύνδεση νουκλεοτιδίων με φωσφοδιεστερικό δεσμό, εκτός της DNA πολυμεράσης, αποτελούν τα ακόλουθα:

- **Πριμόσωμα:** πρόκειται για σύμπλοκο ενζύμων που καταλύει τη σύνδεση ριβονουκλεοτιδίων και τον σχηματισμό των πρωταρχικών τμημάτων RNA προκειμένου να αρχίσει η σύνθεση των νέων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων κατά την αντιγραφή.
- **DNA δεσμάση:** είναι το ένζυμο που συνδέει με φωσφοδιεστερικό δεσμό τμήματα DNA. Ο ρόλος του είναι σημαντικός κατά την αντιγραφή, καθώς συνδέει τα τμήματα των αλυσίδων που συντίθενται ασυνεχώς αλλά και τα τμήματα που προκύπτουν από τις διάφορες θέσεις έναρξης αντιγραφής. Επιπλέον, το ένζυμο είναι χρήσιμο και στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, όπου και συνδέει τον φορέα κλωνοποίησης με το DNA του οργανισμού δότη.
- **Επιδιορθωτικά ένζυμα:** τα οποία αποτελούν μέρος των κυτταρικών επιδιορθωτικών μηχανισμών των λαθών της αντιγραφής, καθώς αντικαθιστούν δεοξυριβονουκλεοτίδια που έχουν τοποθετηθεί κατά παράβαση του κανόνα της συμπληρωματικότητας με τα σωστά.
- **Αντίστροφη μεταγραφάση:** είναι ένζυμο που διαθέτουν οι ρετροϊοί ώστε να επιτυγχάνουν με τη βοήθειά του τη σύνθεση αλυσίδων DNA με πρότυπο το RNA γενετικό τους υλικό. Το ίδιο ένζυμο χρησιμοποιείται για την εργαστηριακή σύνθεση αλυσίδων DNA με πρότυπο το ολικό ώριμο mRNA που απομονώνεται από έναν κυτταρικό τύπο με σκοπό τη δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης.
- **RNA πολυμεράση:** ένζυμο απαραίτητο σε κάθε κύτταρο καθώς μέσω αυτού επιτυγχάνεται η μεταγραφή των γονιδίων και η σύνθεση όλων των ειδών RNA.
- **Ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια:** πρόκειται για σωματίδια που αποτελούνται από snRNA και πρωτεΐνες και δρουν ως ένζυμα κατά την ωρίμανση του mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα σωματίδια αυτά κόβουν τα εσώνια και συρράπτουν τα εξώνια συνδέοντάς τα με φωσφοδιεστερικό δεσμό.



εδώ και **20 χρόνια**,  
στα Φροντιστήρια Πουκαμισάς,  
πάνω από **12.500 μαθητές**  
έκαναν το όνειρό τους πραγματικότητα...

**κάν'το κι εσύ !**

φροντιστήρια  
**ΠΟΥΚΑΜΙΣΑΣ**