



# ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

## Ενότητα 5<sup>η</sup>: Κλωνοποίηση σε ευκαρυωτικά συστήματα-ζύμες

Δροσοπούλου Ε.  
Σκούρας Ζ.

Τμήμα Βιολογίας



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



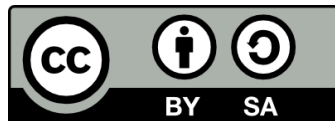
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



# Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



# Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



# Περιεχόμενα ενότητας

- Κλωνοποίηση σε ευκαρυωτικά συστήματα
- ΖΥΜΗ: Μοντέλο Μοριακής Γενετικής και Γενετικής Μηχανικής
  - Κύκλος ζωής
  - Συζευκτικοί τύποι
  - Πλεονεκτήματα
  - Πλασμίδιο 2μ
- ΖΥΜΗ: Φορείς κλωνοποίησης
  - Yeast Episomal plasmids-YEps (Επισωματικά πλασμίδια ζύμης)
  - Yeast Integrative plasmids-YIps (Πλασμίδια Ενσωμάτωσης ζύμης)
  - Yeast Replicative plasmids-YRps (Ανεξάρτητα αντιγραφόμενα πλασμίδια ζύμης)
  - Yeast Centromere plasmids-Ycps (Κεντρομερικά πλασμίδια ζύμης)
  - Yeast Artificial Chromosomes-YACs (Τεχνητά χρωμοσώματα ζύμης)



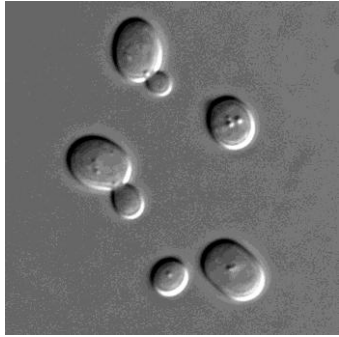
# Κλωνοποίηση σε ευκαρυωτικά συστήματα

## Γιατί κλωνοποίηση σε ευκαρυωτικά κύτταρα;

- Μελέτη κλωνοποιημένων γονιδίων σε περιβάλλον πιο κοντινό-όμοιο με την προέλευσή τους
- Μελέτη επίδρασης στο κύτταρο δέκτη
- Τροποποίηση κυττάρου δέκτη
- Παραγωγή προϊόντος-Βιοτεχνολογία



# ΖΥΜΗ: Μοντέλο Μοριακής Γενετικής και Γενετικής Μηχανικής (1/6)



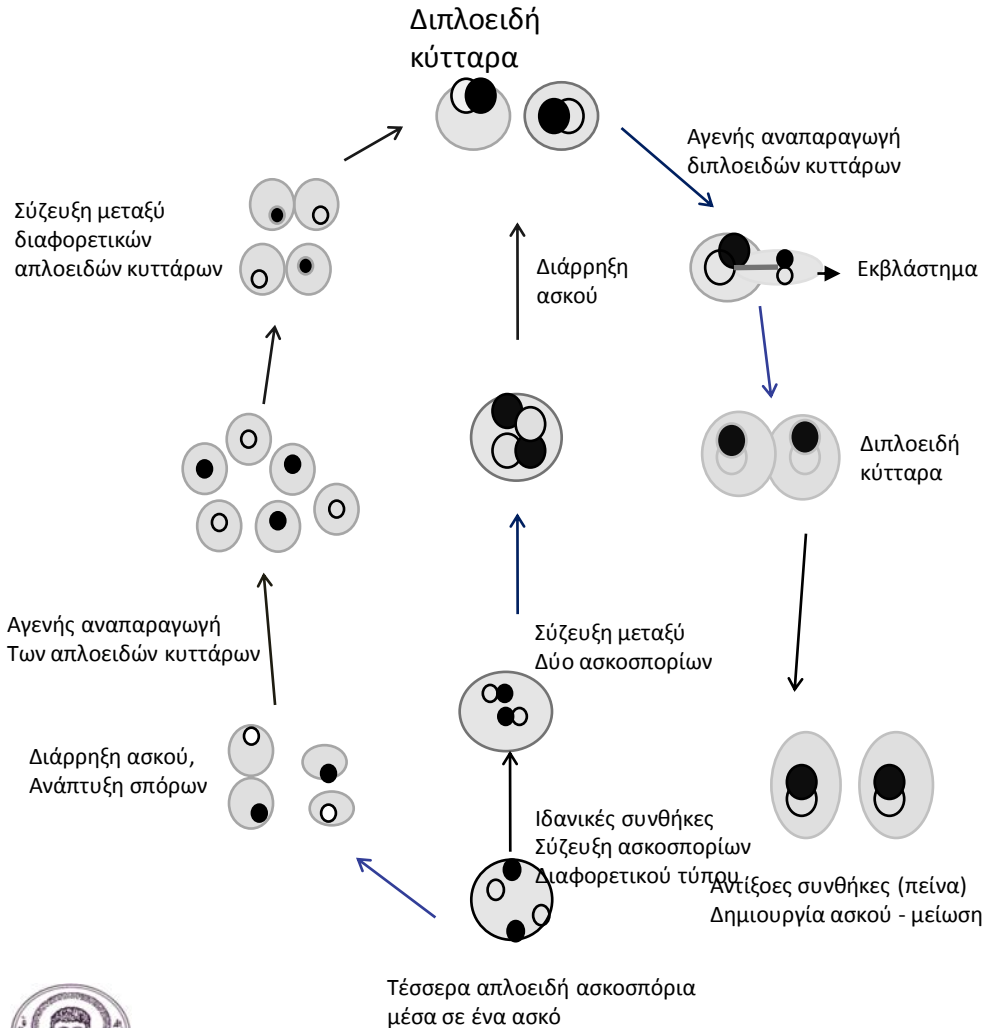
Εικόνα 1: *S. cerevisiae*

## *Saccharomyces cerevisiae*

- Ζει σε λουλούδια και άλλα υποστρώματα που περιέχουν σάκχαρα
- Περιβαλλοντικές συνθήκες:
  - Θερμοκρασία : 0-55°C (ανάπτυξη από 12 έως 40°C)**
  - pH: 2.8-8.0**
  - Αντοχή σε πλήρη ξήρανση**
  - Ανάπτυξη σε συγκεντρώσεις σακχάρων μέχρι 3M**
  - Αντοχή σε αλκοόλη μέχρι 20%**
- Χρήσεις: παραγωγή κρασιού, μπύρας, παραγωγή ψωμιού και προϊόντα αρτοποιίας, παραγωγή πρωτεϊνών και φαρμακευτικών ουσιών (Ινσουλίνη: >50% της παγκόσμιας παραγωγής, εμβόλια)



# ΖΥΜΗ: Μοντέλο Μοριακής Γενετικής και Γενετικής Μηχανικής (2/6)



Εικόνα 2: *Saccharomyces cerevisiae* Κύκλος ζωής

Διπλοειδής και απλοειδής μορφή

Αναπαραγωγή με εκβλάστηση



# ΖΥΜΗ: Μοντέλο Μοριακής Γενετικής και Γενετικής Μηχανικής (3/6)

## *Saccharomyces cerevisiae* Συζευκτικοί τύποι

- Δύο συζευκτικοί τύποι: **a** και **α**
- Ο συζευκτικός τύπος καθορίζεται από το αλληλόμορφο στον τόπο MAT, ο οποίος κωδικοποιεί για μεταγραφικούς παράγοντες
- MATa τόπος: a1 μεταγραφικός ενεργοποιητής, a2 χωρίς γνωστή λειτουργία
- MATα τόπος: α1 μεταγραφικός ενεργοποιητής, α2 καταστολέας
  
- Στον καθορισμό του συζευκτικού τύπου συμμετέχουν 3 γενετικοί τόποι
- Τόπος MAT: ενεργός μεταγραφικά
- Τόποι HML, HMR: μεταγραφικά ανενεργοί.
- Στην αποσιώπηση των HML, HMR τόπων συμμετέχει η πρωτεΐνη SIR- δομή χρωματίνης

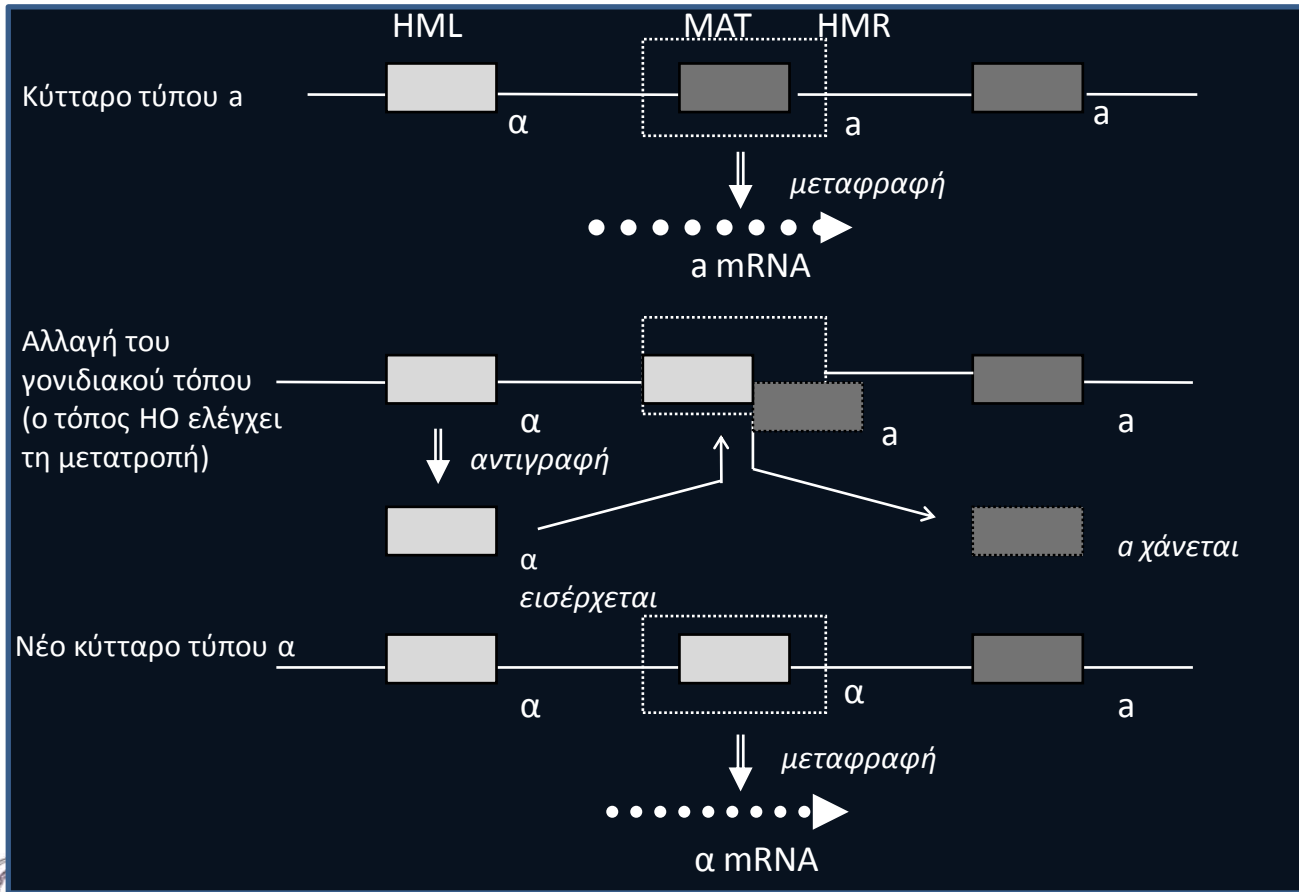




# ΖΥΜΗ: Μοντέλο Μοριακής Γενετικής και Γενετικής Μηχανικής (4/6)

*Saccharomyces cerevisiae*

Εικόνα 3: Αλλαγή συζευκτικού τύπου-Μοντέλο κασέτας



Ενδονουκλεάση HO

Ενδομετατροπή



# ΖΥΜΗ: Μοντέλο Μοριακής Γενετικής και Γενετικής Μηχανικής (5/6)

## ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- ✓ Καλή γνώση γενετικής, βιοχημείας και κυτταρικής βιολογίας-ομοιότητες με ανώτερους ευκαρυώτες
- ✓ Ολοκλήρωση του γονιδιώματος το 1996- μικρό γονιδίωμα (12,5 Mbp), ομόλογα γονίδια μεταξύ ζύμης και ανθρώπου
- ✓ Γρήγορη ανάπτυξη σε απλά θρεπτικά
- ✓ Αναγνώριση ισχυρών υποκινητών
- ✓ Μεγάλος αριθμός μεταλλαγμάτων
- ✓ Φυσική παρουσία πλασμίδιου (πλασμίδιο 2μ)
- ✓ Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
- ✓ Εύκολη απομόνωση εκκρινόμενων ουσιών



# ΖΥΜΗ: Μοντέλο Μοριακής Γενετικής και Γενετικής Μηχανικής (6/6)

## Πλασμίδιο 2μ

- Παρουσία σχεδόν σε όλα τα στελέχη *S. cerevisiae* (70 έως 200 αντίγραφα ανά απλοειδές κύτταρο).
- Συνολικό μήκος: 6.318 bp.
- Περίπου 2 - 3% του συνολικού πυρηνικού DNA.
- Αντιγράφεται μέσα στον πυρήνα.
- Περιέχει δύο πανομοιότυπες ανάστροφες επαναλήψεις μήκους 589 bp που χωρίζουν το πλασμίδιο σε δύο ευρύτερες περιοχές των 2.774 και 2.364 bp.
- Ενδο- ή δια-μοριακός γενετικός ανασυνδυασμός μεταξύ των επαναλήψεων (FLP)
- Ύπαρξη μέσα σε ένα πληθυσμό πλασμιδίων ίσων ποσοτήτων δύο τύπων μορίων, A και B, που διαφέρουν μόνο στον προσανατολισμό των μοναδικών τους αλληλουχιών.
- Το πλασμίδιο εύκολα μεταφέρεται από κύτταρο σε κύτταρο.



# ΖΥΜΗ-Φορείς κλωνοποίησης (1/6)

- **Yeast Episomal plasmids-YEps**  
(Επισωματικά πλασμίδια ζύμης)
- **Yeast Integrative plasmids-YIps**  
(Πλασμίδια Ενσωμάτωσης ζύμης)
- **Yeast Replicative plasmids-YRps**  
(Ανεξάρτητα αντιγραφόμενα πλασμίδια ζύμης)
- **Yeast Centromere plasmids-YCps**  
(Κεντρομερικά πλασμίδια ζύμης)
- **Yeast Artificial Chromosomes-YACs**  
(Τεχνητά χρωμοσώματα ζύμης)



# ΖΥΜΗ-Φορείς κλωνοποίησης (2/6)

**Γονίδια επιλογής:** γονίδια που συμμετέχουν σε βιοσυνθετικά μονοπάτια π.χ. LEU2, LEU3, TRP1

**Φορείς που λειτουργούν σε περισσότερα βιολογικά συστήματα:** *Shuttle vectors* - Αναπαράγονται σε *E. coli* και σε ζύμη



# ΖΥΜΗ-Φορείς κλωνοποίησης (3/6)

## Yeast Episomal plasmids-YEps

Περιέχουν ολόκληρο το πλασμίδιο 2μ ή μόνο το ori.

Περιέχουν επίσης αλληλουχίες βακτηριακών πλασμιδιακών φορέων

Μπορούν να ενσωματωθούν στα χρωμοσώματα

Αντίγραφα/κύτταρο: 20-50

## Yeast Integrative plasmids-YIps

Περιέχουν επίσης αλληλουχίες βακτηριακών πλασμιδιακών φορέων (pBR322, pUC19, pBluescript).

Δεν περιέχουν αλληλουχίες από το πλασμίδιο 2μ.

Αντιγράφονται μόνο μετά από ενσωμάτωση στο γονιδίωμα

Πολύ σταθερά-Χαμηλός μετασχηματισμός



# ΖΥΜΗ-Φορείς κλωνοποίησης (4/6)

## Yeast Replicative plasmids-YRps

Περιέχουν αλληλουχίες βακτηριακών πλασμιδιακών φορέων (pBR322, pUC19, pBluescript).

Περιέχουν αλληλουχίες ARS (autonomously replicating seqs) από τη ζύμη.

Αντίγραφα/κύτταρο: 5-100

Μη σταθερά- τάση να χάνονται στα θυγατρικά κύτταρα

## Yeast Centromere plasmids-YCps

Περιέχουν όλες τις αλληλουχίες των YRps και επιπλέον φέρουν και κεντρομερικές αλληλουχίες (CEN) ζύμης

Αντίγραφα/κύτταρο: 1-2

Πολύ σταθερά – Διατηρούνται στα θυγατρικά κύτταρα



# ΖΥΜΗ-Φορείς κλωνοποίησης (5/6)

## Επιλογή πλασμιδιακών φορέων κλωνοποίησης στη ζύμη

- ❑ YEps, YRps πλασμίδια πολλαπλών αντιγράφων: Παραγωγή προϊόντος του κλωνοποιημένου γονιδίου

Μειονέκτημα: μικρή σταθερότητα-απώλεια

- ❑ YIps, YCps πλασμίδια λίγων αντιγράφων: Βλαβερό προϊόν για το κύτταρο, επίδραση στη φυσιολογία, μελέτη ρύθμισης

Πλεονέκτημα: μεγάλη σταθερότητα





# ΖΥΜΗ-Φορείς κλωνοποίησης (6/6)

## Τεχνητά Χρωμοσώματα Ζύμης-YACs

Γραμμικά μόρια DNA που εισέρχονται σε κύτταρα ζύμης και διατηρούνται ως χρωμοσώματα

Αποτελούνται από:

- Κεντρομέρος
- Τελομερή
- Αυτόνομες αλληλουχίες αντιγραφής (ARS)
- Δείκτες επιλογής (πχ για Ουρακίλη)

Μπορούν να κλωνοποιηθούν μεγάλες γονιδιωματικές αλληλουχίες (από 50 έως 500 kb)

## Μειονέκτημα: Ανασυνδυασμός



# Σημείωμα χρήσης έργων τρίτων

---

**Εικόνα 1:** under DIC microscopy,

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:S\\_cerevisiae\\_under\\_DIC\\_microscopy.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg), by Masur.



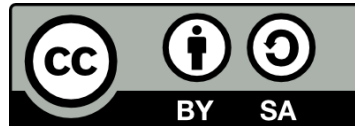
# Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Δροσοπούλου Ελένη.  
«Γενετική Μηχανική. Ζύμες – Φορείς κλωνοποίησης». Έκδοση: 1.0.  
Θεσσαλονίκη 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:  
[http://opencourses.auth.gr/eclass\\_courses](http://opencourses.auth.gr/eclass_courses).



# Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά - Παρόμοια Διανομή [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>





# Τέλος ενότητας

Επεξεργασία: Μηνούδη Στυλιανή  
Θεσσαλονίκη, Χειμερινό εξάμηνο 2013-2014



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

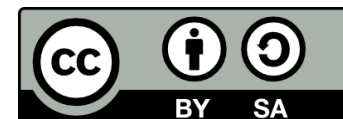


ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ  
2007-2013  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



# Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα χρήσης έργων τρίτων

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

