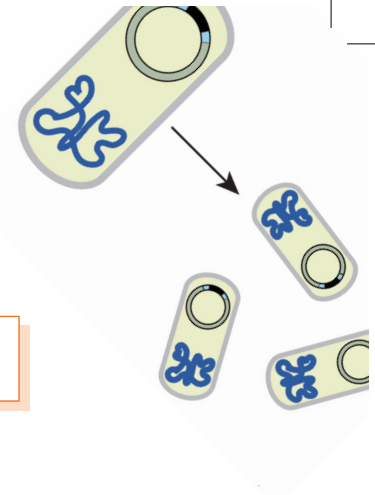
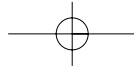
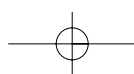
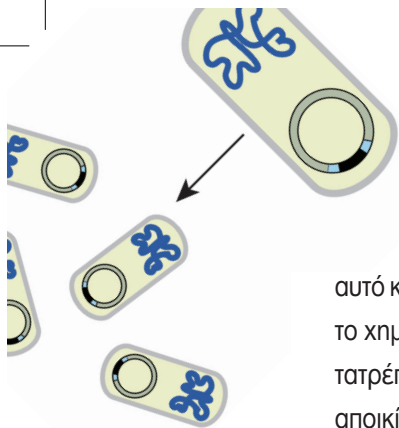




ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗΣ

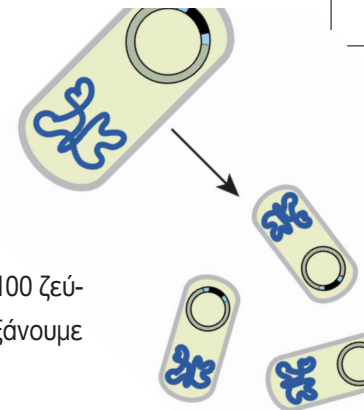
1. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες προστατεύουν το βακτήριο από την εισβολή ετερόλογου DNA. Τι θα μπορούσε να είναι το τελευταίο;
2. Τα πλασμίδια φορείς κλωνοποίησης πρέπει να διαθέτουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό;
3. Τα πλασμίδια φορείς κλωνοποίησης πρέπει να διαθέτουν μοναδική θέση αναγνώρισης περιοριστικής ενδονουκλεάσης;
4. Ποιες ιδιότητες μπορούμε να διακρίνουμε σε ένα πλασμίδιο;
5. Ποιος είναι ο ρόλος των περιοριστικών ενδονουκλεασών στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;
6. Τι ονομάζεται μετασχηματισμός και πώς επιτυγχάνεται;
7. Τι ιδιότητες θα πρέπει να έχουν τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται στο μετασχηματισμό;
8. Με τη DNA δεσμάση ενώνονται -επανακυκλοποιούνται- τα πλασμίδια που δεν ανασυνδυάστηκαν και πλασμίδια που ανασυνδυάστηκαν με το ετερόλογο DNA. Πως διαχωρίζονται αυτά, για να πάρουμε αποκλειστικά τα μόρια με ανασυνδυασμένο DNA;
9. Μπορείτε να σκεφτείτε πως γίνεται η επιλογή των φάγων με ανασυνδυασμένο DNA; (Οι φάγοι δεν περιέχουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά).
10. Στα πρώτα τεχνητά πλασμίδια, υπήρχαν δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (π.χ αμπικιλίνη-τετρακυκλίνη) και οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών ήταν μέσα σε αυτά. Μπορείτε να σκεφτείτε πως αυτή η διάταξη βοηθούσε να διαχωριστούν τα βακτήρια που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένα πλασμίδια από αυτά που έχουν προσλάβει τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια;
11. Στα πλασμίδια φορείς κλωνοποίησης της επόμενης γενιάς, ενσωματώθηκε το γονίδιο lacZ, μέσα στο οποίο υπήρχαν οι θέσεις αναγνώρισης διαφορετικών περιοριστικών ενδονουκλεασών. Το γονίδιο





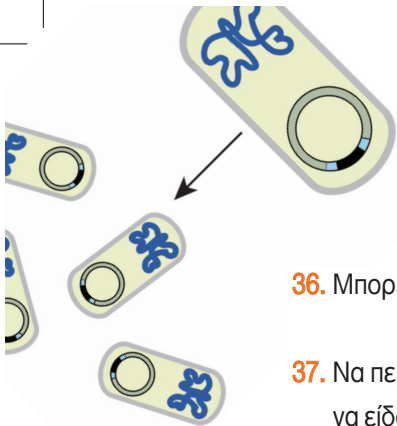
αυτό κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση. Στο θρεπτικό υλικό, εκτός από το αντιβιοτικό προσθέτουμε το χημικό X-gal. Όταν το γονίδιο λειτουργεί, η β-γαλακτοσιδάση διασπά το άχρωμο X-gal και το μετατρέπει σε μπλε χρωστική. Από το μετασχηματισμό παράγονται μπλε και άσπρες αποικίες. Ποιες αποικίες έχουν προσλάβει μόνο πλασμίδια και ποιες ανασυνδυασμένο DNA;

12. Τι είδους βιβλιοθήκη θα κατασκευάσουμε για να μελετήσουμε τα εσώνια ενός γονιδίου; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.
13. Ποια είναι η σημασία των βιβλιοθηκών;
14. Συγκρίνετε τη γονιδιωματική με την cDNA βιβλιοθήκη με φορέα κλωνοποίησης πλασμίδιο, ως προς την κατασκευή και τις εφαρμογές τους.
15. Το γονίδιο της β-αλυσίδας είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό μιας υπομονάδας της αιμοσφαιρίνης Α. Αν το ίδιο γονίδιο κλωνοποιηθεί σε ένα βακτηριακό πληθυσμό, θα παραχθεί η ακριβής πολυπεπτιδική αλυσίδα; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.
16. Πιστεύετε ότι χωράει ένας ελέφαντας (*Elephas maximus*) στο ψυγείο σας;
17. Σε ποια βιβλιοθήκη, στη γονιδιωματική ή σε μια cDNA αντιπροσωπεύονται περισσότερα γονίδια ενός ανθρώπου;
18. Ποιες περιοχές του γενετικού υλικού δεν περιμένετε ποτέ να βρείτε σε cDNA βιβλιοθήκη;
19. Πώς η DNA πολυμεράση φτιάχνει το δίκλωνο DNA με μήτρα το cDNA, χωρίς την παρουσία πριμοσώματος;
20. Χρησιμοποιούνται περιοριστικές ενδονουκλεάσες στην κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης;
21. Σε τι χρησιμεύει η υβριδοποίηση *in vitro*;
22. Τι είναι το μόριο ανιχνευτής; Που χρησιμοποιείται;
23. Διαθέτουμε DNA από δύο οργανισμούς. Το ένα αποτελείται κατά 49% από ζεύγη A-T και το άλλο κατά 59% από ζεύγη G-C και έχουν περίπου το ίδιο μήκος. Αν στο διάλυμα στο οποίο βρίσκεται το καθένα αρχίζουμε να αυξάνουμε τη θερμοκρασία, ποιο από τα δύο θα αποδιαταχθεί πρώτο;
24. Διαθέτουμε τρία τμήματα DNA. Το πρώτο αποτελείται από 30 ζεύγη αζωτούχων βάσεων εκ των ο-



ποιών το 90% είναι G-C, το δεύτερο από 80 ζεύγη βάσεων και 70% G-C, το δε τρίτο από 100 ζεύγη βάσεων και 72% A - T. Αν στο διάλυμα στο οποίο βρίσκεται το καθένα αρχίζουμε να αυξάνουμε τη θερμοκρασία, με ποια σειρά θα αποδιαταχθούν;

25. Ξεκινώντας από ένα μόριο στόχο, σε 5 κύκλους PCR, πόσα μόρια θα έχουν προκύψει;
26. Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος PCR διαγνωστικά για να διαγνώσουμε σε άνθρωπο μόλυνση από κάποιο βακτήριο ή κάποιο ιό, όπως ο ιός της γρίπης;
27. Γνωρίζουμε ότι η DNA πολυμεράση απαιτεί την ύπαρξη ελεύθερου 3' - OH για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό της νεοσυντιθέμενης πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Ωστόσο στη μέθοδο PCR, στα αντιδραστήρια δεν προστίθεται πριμόσωμα. Πώς η DNA πολυμεράση ξεκινάει την επιλεκτική αντιγραφή ενός ορισμένου τμήματος DNA, στο σύνολο του γενετικού υλικού που υπάρχει στην αντίδραση;
28. Η PCR μπορεί να πολλαπλασιάσει και RNA στόχο; Πώς θα μπορούσε να γίνει αυτό;
29. Ένα τμήμα DNA στόχος ενισχύεται με PCR. Το τμήμα αυτό διαθέτει 4 θέσεις αναγνώρισης της *EcoRI* και μια για την περιοριστική ενδονουκλεάση *HindIII*. Πόσα τμήματα θα δημιουργηθούν μετά το κόψιμο με *EcoRI*, πόσα με *HindIII* και πόσα αν χρησιμοποιήσουμε και τις δύο ενδονουκλεάσες ταυτόχρονα; Αν θέλατε να εισάγετε αυτά τα τμήματα σε πλασμίδια, μπορείτε να σκεφτείτε τι ενέργειες θα κάνατε;
30. Σε ποιο στάδιο κατασκευής μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης χρησιμοποιείται υπότονο διάλυμα;
31. Προκειμένου να κλωνοποιηθεί και να εκφραστεί από τα βακτήρια ξενιστές το γονίδιο που κωδικοποιεί την αυξητική ορμόνη του ανθρώπου που απομονώθηκε από ανθρώπινα κύτταρα που την εκφράζουν, τι αλληλουχίες είναι απαραίτητο να προστεθούν στα άκρα του δίκλωνου μορίου DNA που προέκυψε;
32. Αν συμβεί μια μετάλλαξη σε ένα πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης, τότε αυτός κρίνεται ακατάλληλος;
33. Όταν θέλουμε να κόψουμε σε πολλά κομμάτια το γονιδίωμα ενός οργανισμού, τι είδους περιοριστικές ενδονουκλεάσες θα χρησιμοποιήσουμε; Αυτές που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες μήκους 4 νουκλεοτιδίων ή 8 νουκλεοτιδίων;
34. Θεωρητικά θα μπορούσε το μιτοχονδριακό DNA να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης;
35. Μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων έχει 5' ελεύθερο OH - άκρο και 3' ελεύθερο φωσφορικό άκρο. Μπορούμε να την πολλαπλασιάσουμε με PCR;

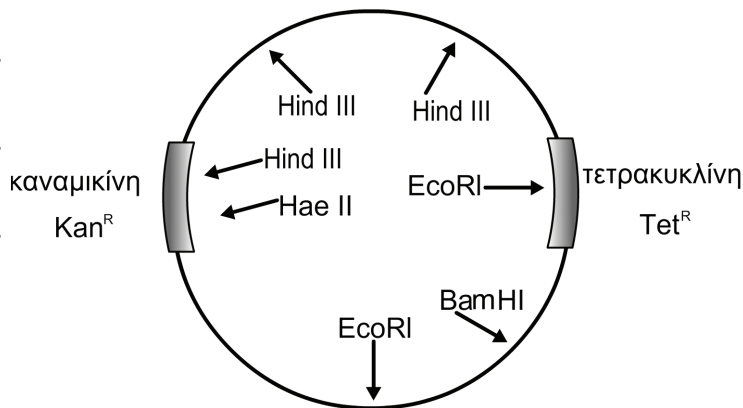


36. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί γονιδιωματική βιβλιοθήκη για τη σύνθεση πρωτεϊνών;
37. Να περιγράψετε τη διαδικασία κλωνοποίησης του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης από ένα είδος μυκήτων, χρησιμοποιώντας ως φορέα κλωνοποίησης το παρακάτω πλασμίδιο. Ποιά ή ποιές περιοριστικές ενδονουκλεάσες θα χρησιμοποιήσετε;

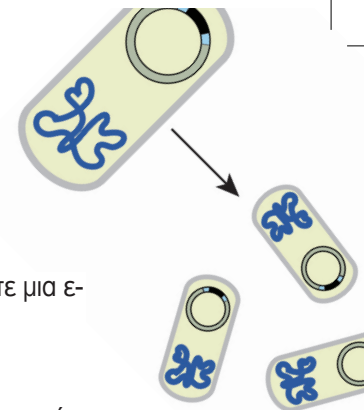
HindIII, EcoRI, BamHI και

HaeII: περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα βέλη δείχνουν τα σημεία όπου βρίσκονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τις ενδονουκλεάσες αυτές.

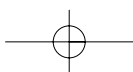
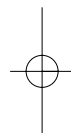
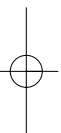
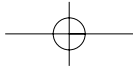
Kan^R και Tet^R: γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

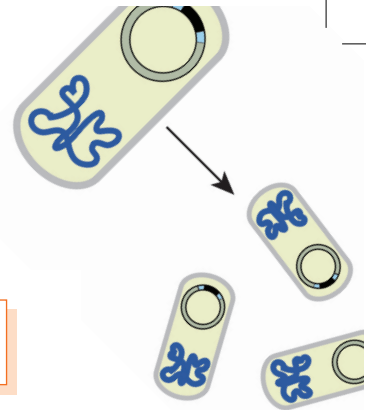
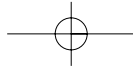


38. Εξηγήστε το λόγο που είναι απαραίτητο κατά την κατασκευή μιας βιβλιοθήκης να μεταφέρουμε τα κύτταρα από υγρή σε στερεή καλλιέργεια.
39. Πραγματοποιώντας μια σειρά από πειράματα έγινε δυνατή η απομόνωση τριών τμημάτων DNA. Το πρώτο περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου της ανθρώπινης μυοσίνης, το δεύτερο ένα εσώνιο αυτού του γονιδίου και το τρίτο την 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου. Ποιο από τα παραπάνω τμήματα θα επιλέγατε ως ανιχνευτή προκειμένου να εντοπίσετε ένα κλώνο που περιέχει το γονίδιο της μυοσίνης σε μια cDNA βιβλιοθήκη;
40. Για ποιους λόγους ένα βακτήριο στο οποίο έχει εισαχθεί ένα γονίδιο ενός μύκητα δεν θα παράγει την ίδια ακριβώς πρωτεΐνη, που θα παρήγαγε ο μύκητας; Πώς μπορούμε να ξεπεράσουμε αυτό το πρόβλημα;
41. Με ποιες μεθόδους μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι ένα φυτό έχει μολυνθεί από ιό με μονόκλωνο RNA ως γενετικό υλικό;
42. Με ποιες μεθόδους μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι ένα ζώο έχει μολυνθεί από ιό με μονόκλωνο RNA ως γενετικό υλικό;



43. Ένας βακτηριοφάγος μόλυνε ένα βακτήριο αλλά δεν κατάφερε να πολλαπλασιαστεί. Δώστε μια εξήγηση.
44. Μια ομάδα ερευνητών κατασκεύασε τις cDNA βιβλιοθήκες για τα κύτταρα των πετάλων και τα κύτταρα των φύλλων της τουλίπας. Μελετώντας τις αποικίες των βακτηρίων των δυο βιβλιοθηκών, διαπίστωσαν ότι υπήρχαν αρκετοί όμοιοι κλώνοι στις δυο βιβλιοθήκες. Πώς δικαιολογείται η παρουσία όμοιων κλώνων και στις δυο βιβλιοθήκες; Αν κατασκεύαζαν γονιδιωματικές βιβλιοθήκες από τα ίδια μέρη του φυτού, θα υπήρχαν διαφορετικοί κλώνοι στις δύο βιβλιοθήκες;
45. Ένας επιστήμονας ενδιαφέρεται να κλωνοποιήσει το γονίδιο για τον παράγοντα πήξης αίματος VIII σε βακτήρια, ώστε να παράγει μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης για τη θεραπεία των αιμορροφιλικών. Γνωρίζοντας ότι τα βακτήρια δεν μπορούν να ωριμάσουν το RNA, χρησιμοποίησε συμπληρωματικό DNA του mRNA του παράγοντα VIII αλλά αυτό δεν μπόρεσε να μεταγραφεί. Τι θα κάνει ο μοριακός βιολόγος για να καταστήσει το γονίδιο μεταγράψιμο από τη βακτηριακή RNA πολυμεράση;
46. Τα βακτηριακά στελέχη που μετασχηματίζονται με ετερόλογο γενετικό υλικό ονομάζονται επιδεκτικά. Αντίθετα πολλά στελέχη ενός είδους μπορεί να μην είναι επιδεκτικά στον μετασχηματισμό. Πού πιστεύετε ότι μπορεί να διαφέρουν τα επιδεκτικά στελέχη ενός είδους στον μετασχηματισμό από τα μη επιδεκτικά;
47. Στα πειράματα του ο Griffith αφού σκότωσε τα λεία στελέχη του πνευμονιόκκοκου με θέρμανση, τα ανέμειξε στη συνέχεια με αδρά ζωντανά σε κανονική θερμοκρασία ώστε να μην πεθάνουν και τα αδρά βακτήρια. Κατόπιν εμβολίασε με αυτά τα ποντίκια, τα οποία ως γνωστόν πέθαναν από πνευμονία. Δεδομένου ότι το DNA σε υψηλές θερμοκρασίες αποδιατάσσεται και σε αυτή την κατάσταση δεν είναι λειτουργικό, πως πέτυχε το πείραμα του Griffith;
48. Υπάρχουν κυρίως δύο τρόποι για να μεταφερθεί το επιθυμητό γονίδιο στο κύτταρο ξενιστή. Ποιοι είναι αυτοί; (Επιτρέπονται μέχρι έξι λέξεις για την περιγραφή του καθενός).
49. Πρέπει να παράγετε μια ανθρώπινη πρωτεΐνη σε βακτήρια. Δεν γνωρίζετε την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης. Περιμένετε όμως να υπάρχουν εσώνια. Ποια μέθοδο θα χρησιμοποιήσετε για να πάρετε το DNA που σας ενδιαφέρει;
50. Ποια είναι τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;





ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΣΧΟΛΙΚΟΥ ΒΙΒΛΙΟΥ

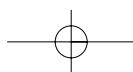
1. Γιατί οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες και οι φορείς κλωνοποίησης είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική;

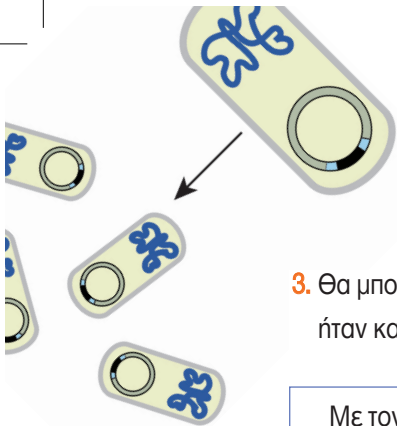
- Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Μπορούν να διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στο εσωτερικό του μορίου του DNA και είναι απαραίτητα εργαλεία της Γενετικής Μηχανικής, καθώς αναγνωρίζουν και κόβουν τις ίδιες πάντα ειδικές αλληλουχίες μήκους 4 με 8 ζευγών νουκλεοτιδίων, αφήνοντας μονόκλωνα αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα. Έτσι, τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές βάσεις του φορέα κλωνοποίησης που έχει κοπή επίσης με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση. Ακόμη, η συχνότητα της παρουσίας των θέσεων αναγνώρισης στο DNA επιτρέπει το κόψιμο του σε σχετικά μικρά τμήματα. Όταν τα δύο τμήματα DNA (DNA δότη και φορέα κλωνοποίησης) αναμειχθούν, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυασμένα μόρια DNA. Επομένως, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες μας επιτρέπουν το κόψιμο του DNA σε τμήματα τέτοιου μεγέθους και με τέτοια άκρα ώστε να είναι ικανά να ενθεθούν σε πλασμίδια ή DNA φάγων με σκοπό την κλωνοποίηση.
- Οι φορείς κλωνοποίησης είναι μόρια DNA όπως πλασμίδια ή DNA φάγων, που μπορούν να αυτοδιπλασιάζονται μέσα σε ένα κύτταρο ξενιστή όπως ένα βακτήριο γι' αυτό είναι και απαραίτητα εργαλεία της Γενετικής Μηχανικής. Το DNA απομονώνεται από έναν οργανισμό - δότη, κόβεται ενζυματικά με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ενώνεται με το φορέα κλωνοποίησης και δημιουργείται ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA, το οποίο μετασχηματίζει ένα κύτταρο ξενιστή μέσα στο οποίο δημιουργεί πολλά αντίγραφα και μπορεί να μεταβιβάζεται στις επόμενες γενεές των κυττάρων του ξενιστή.

2. Τι είναι μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη;

- Ένα κλώνος βακτηρίων που περιέχει ένα τμήμα DNA ενός οργανισμού
 - Μια συλλογή βιβλίων για κλώνους
 - Ένα σύνολο από κλώνους βακτηρίων που ο καθένας έχει ένα πλασμίδιο με διαφορετικό τμήμα DNA ενός οργανισμού
 - Ένα σύνολο από περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται για να παράγουν διαφορετικούς κλώνους
 - Τίποτε από τα παραπάνω
- Ποια είναι η σωστή απάντηση;

Σωστή είναι η γ.



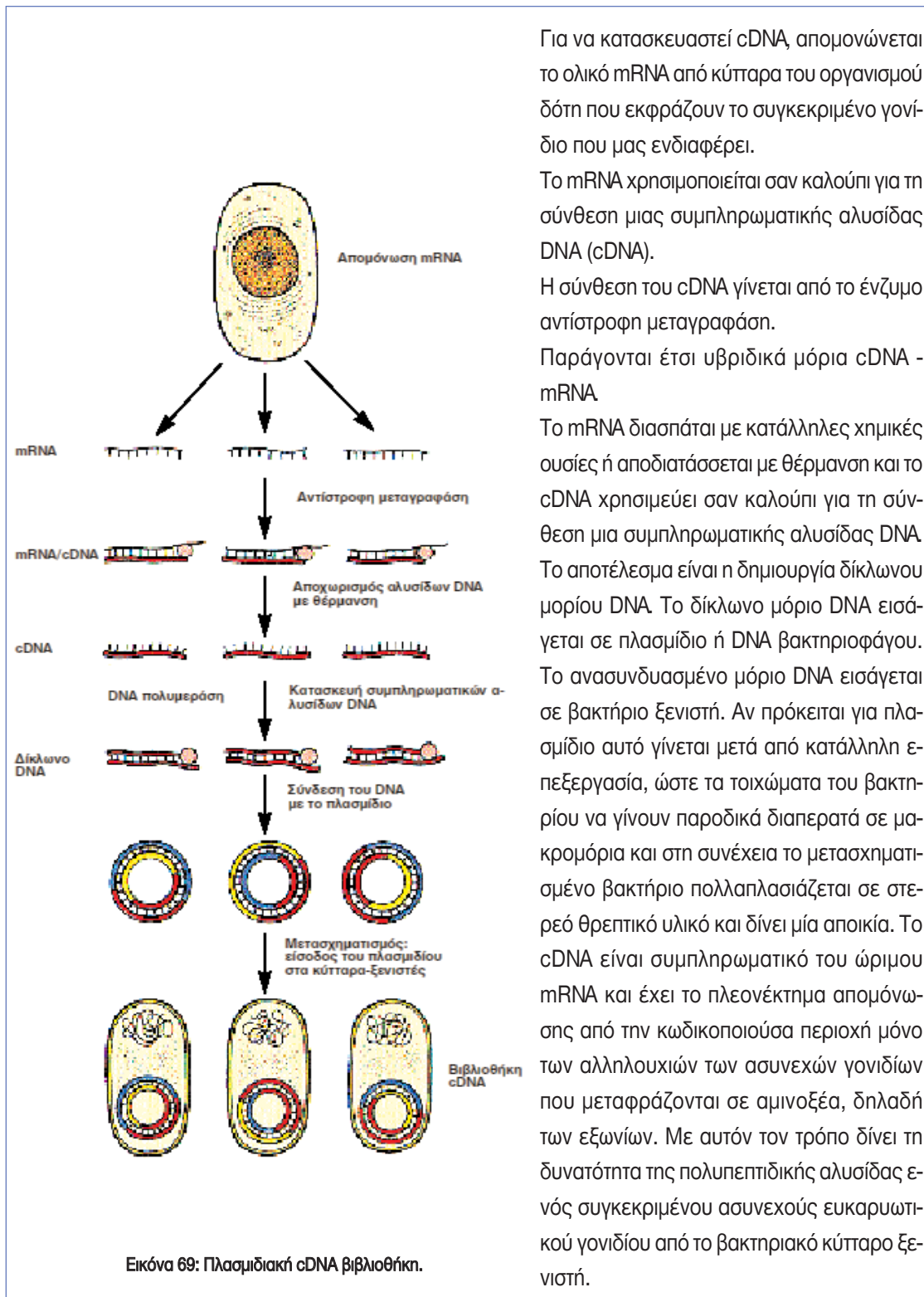


3. Θα μπορούσε να αναπτυχθεί η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, αν ο γενετικός κώδικας δεν ήταν καθολικός; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

Με τον όρο τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA εννοούμε όλες τις τεχνικές που επιτρέπουν την τροποποίηση της αλληλουχίας του και τη μεταφορά τμήματος DNA από έναν οργανισμό σε έναν άλλο. Το DNA που μεταφέρθηκε συνήθως θέλουμε να μπορεί να παράγει στον οργανισμό δέκτη την ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα που παρήγαγε στον οργανισμό δότη. Αυτό είναι δυνατό να συμβεί, μόνο αν η ίδια τριπλέτα DNA της κωδικής αλυσίδας του γονιδίου, κωδικοποιεί το ίδιο αμινοξύ στην πολυπεπτιδική αλυσίδα και στους δύο οργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται, επειδή ο γενετικός κώδικας είναι καθολικός.

Βεβαίως, ακόμη και αν ο γενετικός κώδικας δεν ήταν καθολικός, η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA θα ήταν δυνατή ως τεχνολογία λόγω της ανακάλυψης των ενζύμων περιορισμού και των φορέων κλωνοποίησης, αλλά δεν θα μας προσέφερε την δυνατότητα να παράγουμε ένα όμοιο πολυπεπτίδιο που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο ενός είδους, μεταφέροντας αυτό το γονίδιο σε ένα άλλο είδος. Θα μας ήταν χρήσιμη όμως για την κατασκευή βιβλιοθηκών και για την ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας (βλέπε κεφ. 8).

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



Για να κατασκευαστεί cDNA, απομονώνεται το ολικό mRNA από κύτταρα του οργανισμού δότη που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο που μας ενδιαφέρει.

Το mRNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA).

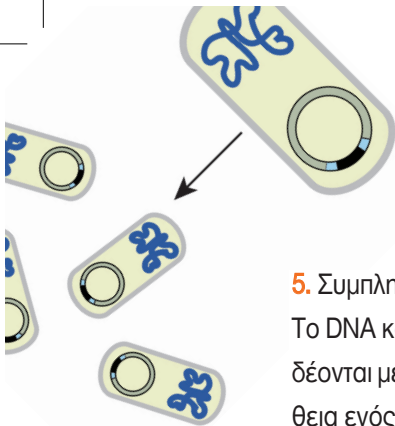
Η σύνθεση του cDNA γίνεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.

Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA - mRNA.

Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αποδιατάσσεται με θέρμανση και το cDNA χρησιμεύει σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δίκλωνου μορίου DNA. Το δίκλωνο μόριο DNA εισάγεται σε πλασμιδίο ή DNA βακτηριοφάγου.

Το ανασυνδυασμένο μόριο DNA εισάγεται σε βακτήριο ξενιστή. Αν πρόκειται για πλασμιδίο αυτό γίνεται μετά από κατάλληλη επεξεργασία, ώστε τα τοιχώματα του βακτηρίου να γίνουν παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια και στη συνέχεια το μετασχηματισμένο βακτήριο πολλαπλασιάζεται σε στερεό θρεπτικό υλικό και δίνει μία αποικία. Το cDNA είναι συμπληρωματικό του ώριμου mRNA και έχει το πλεονέκτημα απομόνωσης από την κωδικοποιούσα περιοχή μόνο των αλληλουχιών των ασυνεχών γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των εξωνίων. Με αυτόν τον τρόπο δίνει τη δυνατότητα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ενός συγκεκριμένου ασυνεχούς ευκαρυωτικού γονιδίου από το βακτηριακό κύτταρο ξενιστή.



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

Το DNA κόβεται μεσε κομμάτια με γνωστό άκρα. Τα κομμάτια συνδέονται με ένα, που έχει συμπληρωματικό άκρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που λέγεται

Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί από το με τη βοήθεια του ενζύμου που ονομάζεται και να συνδεθεί με ένα Το ανασυνδυασμένο μόριο εισάγεται κατόπιν σε

Το DNA κόβεται με **περιοριστικές ενδονουκλεάσες** σε κομμάτια με γνωστά άκρα. Τα κομμάτια συνδέονται με ένα **φορέα κλωνοποίησης**, που έχει συμπληρωματικά άκρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που λέγεται **DNA δεσμάση**.

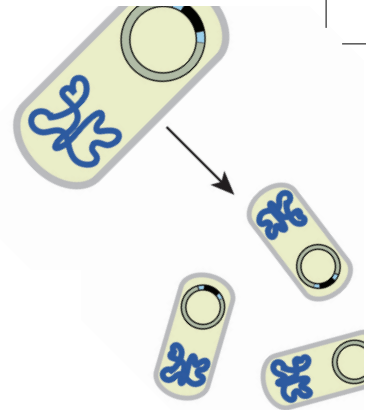
Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί από το **mRNA** με τη βοήθεια του ενζύμου, που ονομάζεται **αντίστροφη μεταγραφάση** και να συνδεθεί με ένα **φορέα κλωνοποίησης**. Το ανασυνδυασμένο μόριο εισάγεται κατόπιν σε **βακτήριο**.

6. Ποια κύτταρα θα χρησιμοποιούσατε, για να κατασκευάσετε μία cDNA βιβλιοθήκη, εάν θα θέλατε να απομονώσετε το γονίδιο για την:

- | | | |
|-----------------|---|---|
| α. Ινσουλίνη | ⇒ | Κύτταρα παγκρέατος. |
| β. Αιμοσφαιρίνη | ⇒ | Πρόδρομα ερυθροκύτταρα (τα ώριμα είναι απύρρινα). |
| γ. Αντισώματα | ⇒ | B λεμφοκύτταρα. |
| δ. Μυοσίνη | ⇒ | Μυϊκά κύτταρα. |

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

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια και αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA, μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί πολλές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες, όποτε συναντούν την ειδική αλληλουχία που αναγνωρίζουν στο γονιδίωμα ενός οργανισμού, κόβουν κάθε αλυσίδα σε συγκεκριμένη θέση αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν αυθόρμητα υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές αζωτούχες βάσεις άλλων τμημάτων DNA, που έχουν κοπεί με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο. Επομένως, η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση έχει τη δυνατότητα και κόβει το πλασμίδιο και το DNA του οργανισμού δότη στις ίδιες συγκεκριμένες θέσεις δημιουργώντας σ' αυτά άκρα με συμπληρωματικές αλληλουχίες αζωτούχων βάσεων. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού δότη, αναμειγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους αυθόρμητα με υδρογονικούς δεσμούς και στη συνέχεια με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς παρουσία της DNA δεσμάσης. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυασμένα πλασμίδια.



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

- α. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες.
- β. Πλασμίδια.
- γ. Βακτήρια.

- α. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα προκαρυωτικών οργανισμών, που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4 με 8 νουκλεοτιδίων του δίκλωνου DNA και κόβουν κάθε αλυσίδα του σε συγκεκριμένη θέση, αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια, σε τμήματα μεγέθους ικανού για κλωνοποίηση.
- β. Τα πλασμίδια είναι οι φορείς κλωνοποίησης, με τους οποίους ενώνονται τα τμήματα του DNA από τον οργανισμό - δότη, ώστε να δημιουργηθεί το ανασυνδυασμένο μόριο DNA.
- γ. Τα βακτήρια λειτουργούν ως κύτταρα ξενιστές. Σε αυτά μεταφέρονται τα ανασυνδυασμένα μόρια DNA και τα μετασχηματίζουν. Κάθε βακτήριο που προσλαμβάνει ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA, μετά τον πολλαπλασιασμό του, δημιουργεί ένα βακτηριακό κλώνο. Επίσης τα βακτήρια χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων όπως φαρμακευτικών πρωτεϊνών (βλέπε κεφ. 7 και 8) και τέλος από αυτά απομονώνουμε τα πλασμίδια και τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που είναι εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική.

9. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

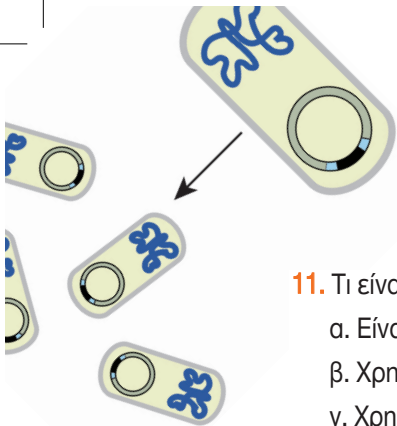
- α. Παράγονται φυσιολογικά από ευκαρυωτικά κύτταρα
 - β. Κόβουν μονόκλωνο μόριο DNA
 - γ. Κόβουν το DNA σε πολύ εξειδικευμένες θέσεις
 - δ. Εισάγονται στα βακτήρια από τους βακτηριοφάγους
- Ποια από τις προτάσεις αυτές είναι σωστή;

Σωστή είναι η γ.

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 πολυπεπίδια

Λανθασμένη είναι η ε.



11. Τι είναι ή σε τι χρησιμοποιείται η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR);
- Είναι μέθοδος εύρεσης της ακολουθίας βάσεων του DNA
 - Χρησιμοποιείται για να ανιχνεύει ένα ειδικό τμήμα DNA
 - Χρησιμοποιείται για να παράγει μεγάλες ποσότητες ενός ειδικού τμήματος DNA
 - Χρησιμοποιείται για την χαρτογράφηση γονιδίων

Σωστή είναι η γ.

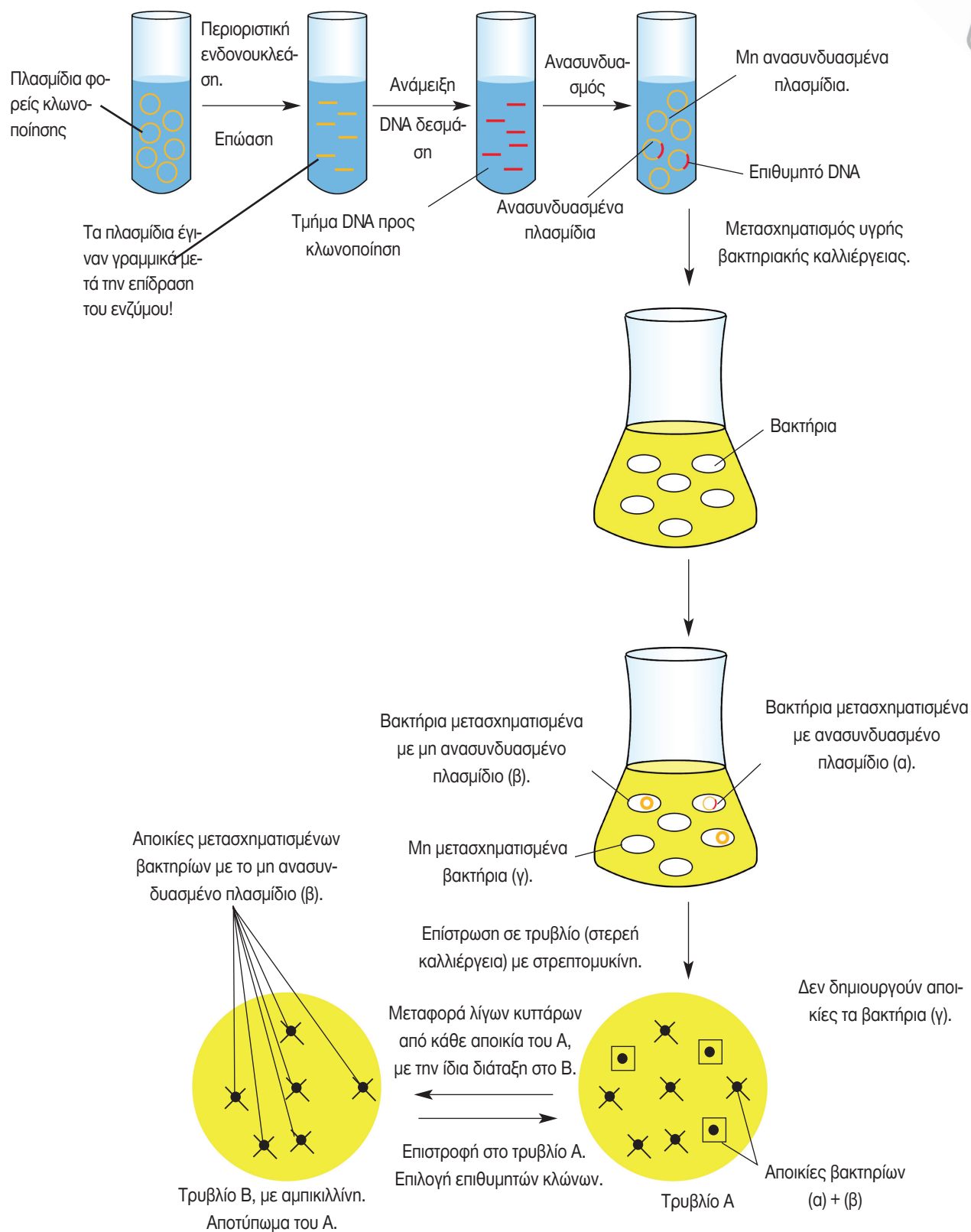
Η παραπάνω επιλογή στηρίζεται στην διδακτέα ύλη του σχ. βιβλίου μέχρι το κεφ. 4. Πάντως πρέπει να αναφέρουμε ότι επιστημονικά είναι σωστές όλες οι επιλογές! (βλέπε κεφ. 6 και 8).

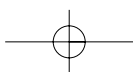
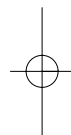
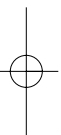
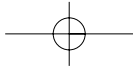
12. Σε πείραμα Γενετικής Μηχανικής χρησιμοποιείται πλασμίδιο που έχει δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντίστοιχα αντιβιοτικά: το ένα γονίδιο προσδίδει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη και το άλλο σε στρεπτομυκίνη. Στο πλασμίδιο αυτό εισάγεται τμήμα DNA μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας της αμπικιλίνης. Στη συνέχεια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μετασχηματίζονται κύτταρα *Escherichia coli*, που δεν είναι ανθεκτικά και στα δύο αντιβιοτικά. Αναλύστε τον τρόπο με τον οποίο μπορούν να επιλεγούν τα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

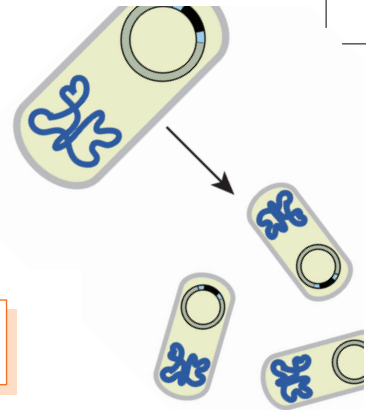
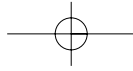
Το διάλυμα των πλασμιδίων επωάζεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία αναγνωρίζει μια μοναδική θέση εντός του γονιδίου της αμπικιλίνης. Μετά τη δράση του περιοριστικού ένζυμου τα πλασμίδια γίνονται γραμμικά. Σε αυτά προστίθεται το διάλυμα με τα τμήματα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε και DNA δεσμάση. Κάποια πλασμίδια ανασυνδυάστηκαν με το τμήμα DNA ενώ κάποια αλλά επανακυκλοποιήθηκαν χωρίς να ανασυνδυαστούν. Τα τελευταία είναι και τα περισσότερα. Στη συνέχεια με τα παραπάνω πλασμίδια επιχειρείται μετασχηματισμός των βακτηρίων υγρής καλλιέργειας, τα οποία προηγούμενος έχουν υποστεί ειδική κατεργασία ώστε τα τοιχώματά τους να γίνουν παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια. Από τα βακτήρια αυτά κάποια μετασχηματίζονται με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια (α), κάποια μετασχηματίζονται από τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια (β) και σε κάποια δεν επιτυγχάνεται ο μετασχηματισμός (γ). Τα τελευταία είναι και τα περισσότερα. Η υγρή βακτηριακή καλλιέργεια επιστρώνεται σε στέρεο θρεπτικό υλικό που περιέχει στρεπτομυκίνη (τρυβλίο Α), όπου σε αυτό δεν αναπτύσσονται τα βακτήρια (γ) αφού δεν έχουν προσλάβει το πλασμίδιο. Αντίθετα αναπτύσσονται αποικίες των βακτηρίων (β) και (α).

Η διάκριση μεταξύ των βακτηρίων (β) και (α) γίνεται ως εξής: σε ένα άλλο στέρεο θρεπτικό υλικό που περιέχει αμπικιλίνη (τρυβλίο Β) μεταφέρονται με την ίδια διάταξη αποικιών που υπήρχε στο προηγούμενο τρυβλίο, λίγα κύτταρα από κάθε αποικία. Σε αυτό το δεύτερο τρυβλίο αναπτύσσονται βέβαια μόνο τα βακτήρια (β) στα οποία το γονίδιο της αμπικιλίνης δεν έχει καταστραφεί. Οπότε επιστρέφουμε στο τρυβλίο Α και επιλέγουμε τις αποικίες εκείνες που αποτελούνται από κύτταρα που δεν αναπτύχθηκαν στο δεύτερο τρυβλίο.

Εικόνα 70: Επιλογή βακτηρίων-ξενιστών του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης από βιβλιοθήκη.







ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ

Για τη λύση των ασκήσεων αυτού του κεφαλαίου θα πρέπει να έχουμε κατά νου τα εξής:

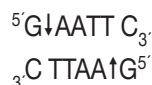
- ✓ Ο αριθμός των τμημάτων που προκύπτουν από την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση ενός **κυκλικού μορίου DNA**, είναι ίσος με τον αριθμό των θέσεων αναγνώρισης από τη συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση στο μόριο αυτό.

Δηλαδή, αν σε ένα πλασμίδιο υπάρχει κ φορές η χαρακτηριστική αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την *EcoRI*, τότε αν το πλασμίδιο αυτό επωαστεί σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με την *EcoRI*, θα προκύψουν κ δίκλωνα και γραμμικά τμήματα, που όλα θα φέρουν τα χαρακτηριστικά μονόκλωνα άκρα (κολλώδη άκρα) της *EcoRI*, και κατά συνέπεια είναι και τα κ αμέσως ικανά για ανασυνδυασμό.

- ✓ Ο αριθμός των τμημάτων που προκύπτουν από την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση, ενός **γραμμικού μορίου DNA**, είναι κατά ένα περισσότερα από τον αριθμό των θέσεων αναγνώρισης από την συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση στο μόριο αυτό.

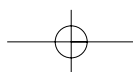
Δηλαδή, αν σε ένα ευκαριωτικό χρωμόσωμα υπάρχει κ φορές η χαρακτηριστική αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την *EcoRI*, τότε αν το χρωμόσωμα αυτό επωαστεί σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με την *EcoRI*, θα προκύψουν κ+1 δίκλωνα και γραμμικά τμήματα, που όλα εκτός από τα ακραία, θα φέρουν τα χαρακτηριστικά μονόκλωνα άκρα (κολλώδη άκρα) της *EcoRI*. Κατά συνέπεια είναι τα κ-2 ενδιάμεσα τμήματα αμέσως ικανά για ανασυνδυασμό. Τα δυο ακραία τμήματα όμως, φέρουν μόνο στο ένα άκρο τους κολλώδη άκρα και ο ανασυνδυασμός τους είναι εφικτός μόνο κατόπιν ειδικής κατεργασίας, κατά την οποία θα προστεθούν κολλώδη άκρα και στην πλευρά του ακραίου τμήματος που δεν υπάρχουν.

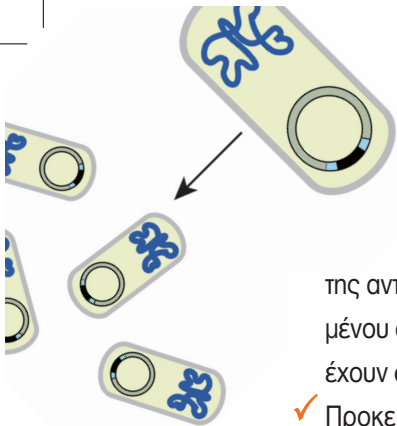
- ✓ Κάθε φορά που μια περιοριστική ενδονουκλεάση αναγνωρίζει και πέπτει ένα μόριο DNA, σπάζουν 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί. Ενώ κάθε φορά που ένα τμήμα DNA με κολλώδη άκρα ενθέτεται σε έναν φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο ή λ-φάγο), που και αυτός έχει κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, δημιουργούνται 4 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί.
- ✓ Κάθε φορά που η περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* αναγνωρίζει και πέπτει την αλληλουχία



διασπώνται 8 δεσμοί υδρογόνου, δηλαδή σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των 4 ζευγών νουκλεοτιδίων A=T. Ενώ κάθε φορά που ένα τμήμα DNA με κολλώδη άκρα *EcoRI* ενθέτεται σε ένα φορέα κλωνοποίησης, σχηματίζονται 16 δεσμοί υδρογόνου, 8 για κάθε ένα από τα δυο κολλώδη άκρα του τμήματος DNA.

- ✓ Με την μέθοδο PCR, ενισχύονται επιλεκτικά (παράγονται σε πολλά αντίγραφα) δίκλωνα γραμμικά τμήματα DNA. Η αύξηση του αριθμού των σχηματιζόμενων αντιγράφων σε κάθε κύκλο αντιγραφής αυξάνει με το ρυθμό της γεωμετρικής προόδου $N_t = N_0 \times 2^k$, όπου N_t ο τελικός αριθμός των αντιγράφων μετά από κ κύκλους, N_0 ο αρχικός αριθμός των τμημάτων που θέλουμε να ενισχύσουμε και κ οι κύκλοι





της αντιγραφής που έχουν πραγματοποιηθεί. Ο ρυθμός αύξησης των αντιγράφων είναι αυτός, δεδομένου ότι μετά τον πρώτο κύκλο αντιγραφής έχουν σχηματιστεί 2 αντίγραφα, μετά τον δεύτερο κύκλο έχουν σχηματιστεί 4 αντίγραφα κ.ο.κ. Όλα τα αντίγραφα αποτελούν ένα κλώνο τμημάτων DNA.

✓ Προκειμένου να κατασκευάσουμε τον περιοριστικό χάρτη ενός μορίου DNA, ακολουθούμε τα εξής βήματα:

Έστω ότι έχουμε ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA και το επωάζουμε με δύο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα. Το καθένα ένζυμο επωάζεται μόνο του με το μόριο DNA και επίσης επωάζεται το μόριο DNA με το μίγμα και των δύο περιοριστικών ενζύμων μαζί.

Αρχικά φτιάχνουμε τον χάρτη για το πρώτο ένζυμο, δηλαδή προσδιορίζουμε την θέση αναγνώρισης του ενός περιοριστικού ενζύμου πάνω στο μόριο του DNA σε όλες τις πιθανές διατάξεις. Στη συνέχεια κάνουμε τον χάρτη του αλλού περιοριστικού ενζύμου και προσδιορίζουμε και πάλι όλες τις πιθανές διατάξεις, πάνω στο μόριο του DNA. Τέλος, συγκρίνουμε τους παραπάνω χάρτες μεταξύ τους και φτιάχνουμε τον ολοκληρωμένο περιοριστικό χάρτη του μορίου, στον οποίο υπάρχουν όλες οι θέσεις αναγνώρισης από όλα τα περιοριστικά ένζυμα. Πρέπει οι αποστάσεις μεταξύ των θέσεων περιορισμού πάνω στο μόριο του DNA, να συμφωνούν με τον αριθμό και το μήκος των τμημάτων, που προκύπτουν από την πέψη του μορίου DNA και με τα δυο περιοριστικά ένζυμα μαζί.

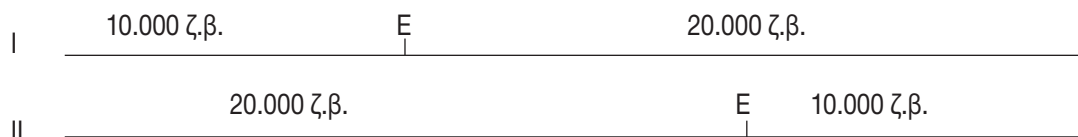
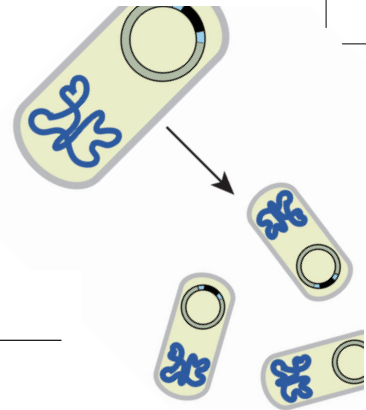
ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Έστω ένα γραμμικό μόριο DNA με μήκος 30.000 ζεύγη νουκλεοτιδίων, το οποίο επωάζεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*, οπότε παίρνουμε δύο θραύσματα. Το ίδιο μόριο DNA επωάζεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BamHI* και παίρνουμε πάλι δύο θραύσματα διαφορετικού μήκους από τα προηγούμενα. Τέλος το μόριο DNA επωάζεται παρουσία και των δύο περιοριστικών ενζύμων, οπότε προκύπτουν τρία θραύσματα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα από την επίδραση των δύο περιοριστικών ενζύμων στο συγκεκριμένο μόριο DNA. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά να κατασκευαστεί ο περιοριστικός χάρτης του μορίου DNA.

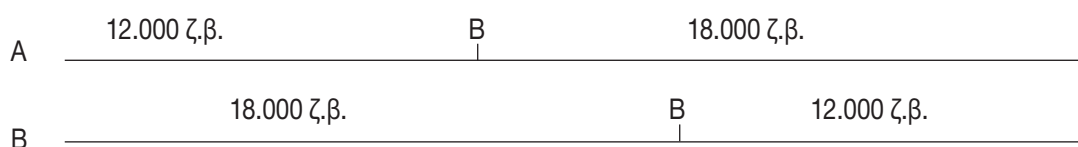
Περιοριστικό ένζυμο	Θραύσματα σε ζεύγη βάσεων
<i>EcoRI</i>	20.000, 10.000
<i>BamHI</i>	12.000, 18.000
<i>EcoRI + BamHI</i>	12.000, 8.000, 10.000

ΛΥΣΗ:

Επειδή μετά τη δράση της *EcoRI* προκύπτουν δύο θραύσματα, αυτό σημαίνει ότι το μόριο του DNA, διαθέτει μία θέση αναγνώριστης για την *EcoRI*. Ο χάρτης του μορίου DNA για την *EcoRI* μπορεί να είναι είτε ο I είτε ο II.

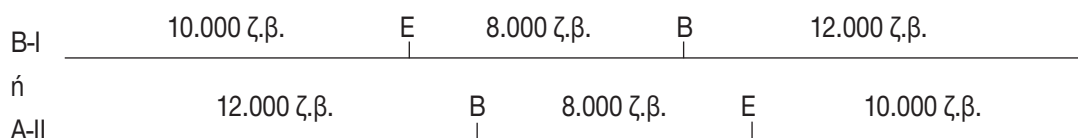


Ομοίως, η περιοριστική ενδονουκλεάση *Bam*HI αναγνωρίζει μία θέση πάνω στο μόριο του DNA. Ο χάρτης του μορίου για την *Bam*HI μπορεί να είναι είτε ο A είτε ο B.

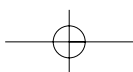
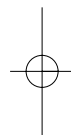
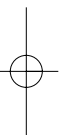
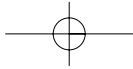


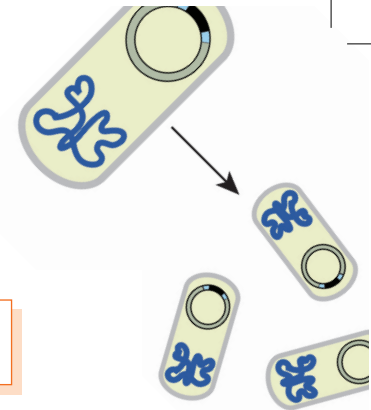
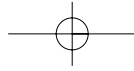
Συνδυάζοντας τους πιθανούς χάρτες του μορίου DNA για την *Eco*RI με τους πιθανούς χάρτες του μορίου για την *Bam*HI ανά δύο, διαπιστώνουμε ότι αποκλείονται οι συνδυασμοί A-I και B-II, διότι στον χάρτη που θα προέκυπτε θα σχηματίζονταν θραύσματα μήκους 2.000 ζ.β. Από την άλλη πλευρά οι συνδυασμοί A-II και B-I δίνουν ο καθένας από ένα χάρτη με μία θέση αναγνώρισης για κάθε περιοριστικό ένζυμο και με μήκος θραυσμάτων 12.000, 8.000 και 10.000 ζ.β. που συμφωνούν με το μήκος των τριών θραυσμάτων που προκύπτουν από την επώαση του μορίου DNA και με τα δύο περιοριστικά ένζυμα μαζί.

Επομένως, ο περιοριστικός χάρτης του μορίου DNA είναι:



Δηλαδή σε κάθε περίπτωση το τμήμα των 8.000 ζ.β. βρίσκεται ανάμεσα στις δύο θέσεις αναγνώρισης του μορίου DNA από τις συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.



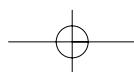


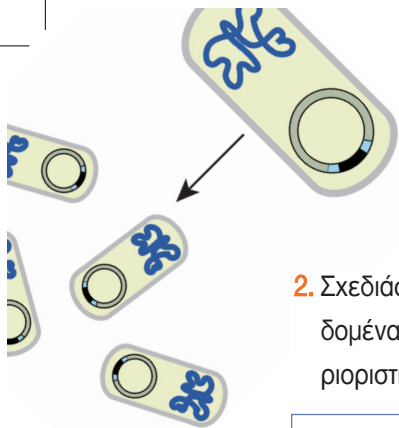
ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΙΚΑ ΛΥΜΕΝΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

1. Σε ένα ανθρώπινο χρωμόσωμα εντοπίστηκε η δίκλωνη αλληλουχία (για λόγους ευκολίας αναφέρεται μόνο ο ένας κλώνος) $5'GAATTC_3'$, δύο φορές μεταξύ μιας παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας 2.500 ζευγών βάσεων. Ένα τεχνητό πλασμίδιο έχει μήκος 5.000 ζευγών βάσεων και σε αυτό υπάρχει η ίδια αλληλουχία μια φορά.
 - α. Το ανθρώπινο χρωμόσωμα απομονώνεται κατά τη δημιουργία καρυότυπου και επωάζεται με *EcoRI*. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου θα σπάσουν κατά τη δημιουργία των θραυσμάτων που περιέχουν την παραπάνω αλληλουχία;
 - β. Το πλασμίδιο επωάζεται με *EcoRI*. Πόσα θραύσματα προκύπτουν από το πλασμίδιο; Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου σπάζουν από το πλασμίδιο κατά τη δημιουργία των θραυσμάτων αυτών;
 - γ. Αναμειγνύονται πλασμίδια με τα προαναφερόμενα θραύσματα από το ανθρώπινο χρωμόσωμα παρουσία DNA δεσμάσης. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου δημιουργούνται ανά πλασμίδιο; Από πόσα νουκλεοτίδια είναι δυνατόν να αποτελείται κάθε πλασμίδιο;

ΛΥΣΗ:

- α. Εφόσον το ανθρώπινο χρωμόσωμα απομονώθηκε από κύτταρο που βρίσκεται στη μετάφαση της μίτωσης, θα διαθέτει δύο αδελφές χρωματίδες. Έτσι σπάνε 8 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί (αφού υπάρχουν 2 θέσεις αναγνώρισης της *EcoRI* στην κάθε χρωματίδα). Κάθε θέση αναγνώρισης διαθέτει τέσσερα ζεύγη A = T τα οποία καθίστανται μονόκλινα. Συνεπώς σε κάθε θέση αναγνώρισης σπάνε οκτώ δεσμοί υδρογόνου και επειδή υπάρχουν συνολικά τέσσερις θέσεις αναγνώρισης, σπάνε συνολικά 32 δεσμοί υδρογόνου.
- β. Επειδή το πλασμίδιο αυτό έχει μία μόνο θέση αναγνώρισης της *EcoRI*, από κάθε θραύση του προκύπτει ένα μοναδικό γραμμικό θραύσμα, ενώ σπάζουν δύο φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και $4 \times 2 = 8$ δεσμοί υδρογόνου.
- γ. Σε κάθε πλασμίδιο που δεν προσλαμβάνει το ανθρώπινο γενετικό υλικό, δημιουργούνται δύο φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου.
Για κάθε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο δημιουργούνται 4 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 16 δεσμοί υδρογόνου.
Το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αποτελείται από 25.000 ζεύγη βάσεων δηλαδή 50.000 νουκλεοτίδια, αφού απλώς το γραμμικό μόριο επανακυκλοποιήθηκε δίχως να δεχθεί κάποιο θραύσμα του ανθρώπινου DNA. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από την άλλη πλευρά, αποτελείται από $(5.000 \times 2) + (2.500 \times 2) + (6 \times 2) = 15.012$ νουκλεοτίδια ή 7.506 ζεύγη νουκλεοτιδίων.
Τα τελευταία 12 νουκλεοτίδια αποτελούν τα 4 αζευγάρωτα νουκλεοτίδια (κολλώδη άκρα) συν ένα ζεύγος $G \equiv C$, που φέρει σε κάθε άκρο του κάθε θραύσμα του ανθρώπινου DNA, μετά την δράση της *EcoRI*.





2. Σχεδιάστε ένα περιοριστικό χάρτη ενός γραμμικού μορίου DNA, χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα δεδομένα. Στον χάρτη πρέπει να προσδιορίζονται οι θέσεις αναγνώρισης του μορίου DNA από τα περιοριστικά ένζυμα.

Περιοριστικό Ένζυμο	Μήκος τμημάτων DNA σε ζεύγη βάσεων
Χωρίς την δράση περιοριστικού ένζυμου	900
<i>EcoRI</i>	700, 200
<i>HindIII</i>	600, 300
<i>BamHI</i>	500, 350, 50
<i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	600, 200, 100
<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>	500, 200, 150, 50
<i>BamHI</i> + <i>HindIII</i>	500, 250, 100, 50

ΛΥΣΗ:

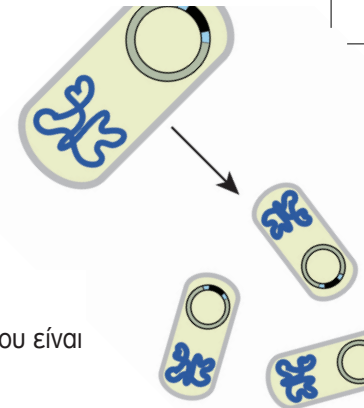
Με βάση τα δεδομένα του πίνακα συμπεραίνουμε ότι για το ένζυμο *EcoRI* υπάρχει μια θέση αναγνώρισης στο συγκεκριμένο γραμμικό μόριο DNA, όποτε με την δράση του σχηματίζονται δύο τμήματα. Ομοίως για το ένζυμο *HindIII*. Ενώ για το ένζυμο *BamHI* υπάρχουν δύο θέσεις αναγνώρισης στο μόριο του DNA, όποτε σχηματίζονται τρία τμήματα μετά την δράση του ένζυμου στο μόριο.

Έτσι λοιπόν, ο περιοριστικός χάρτης του μορίου DNA για τις συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι:



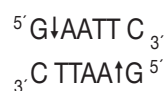
Βλέπε σελ. 246

3. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες Α και Β έχουμε απομονώσει το μιτοχονδριακό (mtDNA) και το χλωροπλαστικό (cpDNA) γενετικό υλικό του φυτού *Mentha viridis* (δυόσμος) αντίστοιχα.
- Σε ποιον από τους δύο σωλήνες αναμένετε να υπάρχουν μεγαλύτερου μεγέθους μόρια DNA;
 - Κάθε ένα από τα μόρια DNA, επωάζεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*, προκειμένου να κατασκευάσουμε την βιβλιοθήκη του γενετικού υλικού των οργανιδίων του φυτού. Στην ανάλυση, βρέθηκε ότι το mtDNA κόπηκε σε 9 τμήματα, ενώ το cpDNA σε 16 τμήματα.
Πόσες θέσεις αναγνώρισης για την *EcoRI* φέρει κάθε είδος μορίου DNA;
 - Ποιος είναι ο ελάχιστος αριθμός φορέων κλωνοποίησης που απαιτούνται ώστε να κατασκευαστούν οι βιβλιοθήκες των οργανιδίων;
 - Πόσοι δεσμοί υδρογόνου διασπάστηκαν κατά την πέψη των μορίων mtDNA και cpDNA;
 - Πόσοι δεσμοί υδρογόνου δημιουργήθηκαν κατά τον ανασυνδυασμό των φορέων κλωνοποίησης με τα τμήματα DNA των οργανιδίων;



ΛΥΣΗ:

- α. Στον δοκιμαστικό σωλήνα Β περιέχεται το γενετικό υλικό των χλωροπλαστών του φυτού, που είναι μεγαλύτερο από το μιτοχονδριακό γενετικό του υλικό, που βρίσκεται στον σωλήνα Α.
- β. Τόσο το mtDNA όσο και το cpDNA είναι κυκλικά μόρια, επομένως στο mtDNA υπάρχουν 9 θέσεις αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* και στο cpDNA υπάρχουν 16 θέσεις.
- γ. Για την κατασκευή της βιβλιοθήκης του mtDNA, απαιτούνται τουλάχιστον 9 φορείς κλωνοποίησης, δεδομένου ότι όλα τα τμήματα που προκύπτουν από την δράση της *EcoRI* είναι άμεσα κλωνοποιήσιμα (φέρουν στα άκρα τους κολλώδη άκρα *EcoRI*). Για τους ίδιους λόγους απαιτούνται τουλάχιστον 16 φορείς κλωνοποίησης για την κατασκευή της βιβλιοθήκης του cpDNA.
- δ. Κάθε φορά που η περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* αναγνωρίζει και πέπτει την αλληλουχία



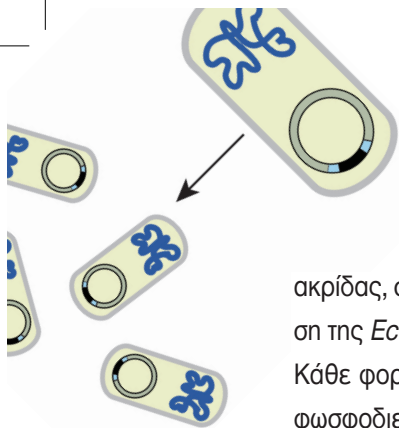
διασπώνται 8 δεσμοί υδρογόνου, δηλαδή σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των 4 ζευγών νουκλεοτιδίων A = T. Άρα για κάθε μόριο mtDNA του φυτού που πέπτεται από την *EcoRI* διασπώνται $9 \times 8 = 72$ δεσμοί υδρογόνου. Αντίστοιχα για κάθε μόριο cpDNA του φυτού που πέττει από την *EcoRI*, διασπώνται $16 \times 8 = 128$ δεσμοί υδρογόνου.

- ε. Κάθε τμήμα mtDNA ή cpDNA που προκύπτει από την δράση της *EcoRI* φέρει κολλώδη άκρα AATT- από την μια πλευρά του τμήματος και -TTAA από την άλλη πλευρά του τμήματος. Επομένως όταν ένα τέτοιο τμήμα συνδέεται με ένα φορέα κλωνοποίησης που έχει κοπεί από την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, σχηματίζονται 16 δεσμοί υδρογόνου. Συνεπώς όταν τα 9 τμήματα του κάθε μορίου mtDNA ανασυνδυάσουν 9 φορείς κλωνοποίησης, σχηματίζονται συνολικά $9 \times 16 = 144$ δεσμοί υδρογόνου. Για τους ίδιους λόγους σχηματίζονται $16 \times 16 = 256$ δεσμοί υδρογόνου για την κατασκευή της βιβλιοθήκης ενός μορίου cpDNA.

4. Θέλουμε να μελετήσουμε το γεωργικής σημασίας έντομο *Calliptamus italicus* (ακρίδα). Έχουμε απομονώσει το πρώτο χρωμόσωμα του εντόμου, το οποίο επωάζεται με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *HpaII* (αναγνωρίζει ακολουθία 4 ζευγών βάσεων), *PstI* (αναγνωρίζει αλληλουχία 6 ζευγών βάσεων) και *EcoRII* (αναγνωρίζει αλληλουχία 7 ζευγών βάσεων). Κάθε ενδονουκλεάση δρα σε ακέραιο χρωμόσωμα. Ποιο ένζυμο αναμένεται να δράσει περισσότερες φορές πάνω στο χρωμόσωμα; Πόσοι 3'-5' φωσφοδιεστερικοί δεσμοί δημιουργήθηκαν με την ένθεση ενός θραύσματος με κολλώδη άκρα *EcoRII*, σε φορέα κλωνοποίησης λ-φάγο;

ΛΥΣΗ:

Όσο μικρότερος είναι ο αριθμός των ζευγών βάσεων που αποτελούν την χαρακτηριστική αλληλουχία αναγνώρισης μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης, τόσο πιθανότερη είναι η ύπαρξη μιας τέτοιας ορισμένης ακολουθίας ζευγών νουκλεοτιδίων σε ένα μόριο DNA. Επομένως, η περιοριστική ενδονουκλεάση *HpaII* αναμένεται να δημιουργεί μεγαλύτερο αριθμό θραυσμάτων του πρώτου χρωμοσώματος της



ακρίδας, σε σχέση με την δράση της *PstI* στο χρωμόσωμα και ακόμη μεγαλύτερο σε σχέση με την δράση της *EcoRII*.

Κάθε φορά που μια περιοριστική ενδονουκλεάση αναγνωρίζει και πέπτει ένα μόριο DNA, σπάζουν 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί. Ενώ κάθε φορά που ένα τμήμα DNA με κολλώδη άκρα ενθέτεται σε έναν φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο ή λ-φάγο), που και αυτός έχει κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, δημιουργούνται 4 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί. Επομένως κατά την ένθεση ενός θραύσματος με κολλώδη άκρα *EcoRII* σε φορέα κλωνοποίησης λ-φάγο σχηματίζονται 4 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί.

5. Θέλουμε να συνθέσουμε τουλάχιστον 250 αντίγραφα ενός τμήματος DNA, το οποίο αποτελείται από 1.200 ζεύγη νουκλεοτιδίων.

- Αν η αντιγραφή του παραπάνω τμήματος διαρκεί 5 min, πόσος συνολικός χρόνος θα χρειαστεί;
- Ποιος είναι ο αριθμός των ελευθέρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν;
- Πόσοι 3' - 5' φωσφοδιεστερικοί δεσμοί πρέπει να σχηματιστούν;

ΛΥΣΗ:

α. Με τη μέθοδο PCR, ενισχύονται επιλεκτικά (παράγονται σε πολλά αντίγραφα) δίκλινα γραμμικά τμήματα DNA. Η αύξηση του αριθμού των σχηματιζόμενων αντιγράφων σε κάθε κύκλο αντιγραφής αυξάνει με τον ρυθμό της γεωμετρικής προόδου $N_t = N_0 \times 2^k$, όπου N_t ο τελικός αριθμός των αντιγράφων μετά από k κύκλους, N_0 ο αρχικός αριθμός των τμημάτων που θέλουμε να ενισχύσουμε και k οι κύκλοι της αντιγραφής που έχουν πραγματοποιηθεί. Ο ρυθμός αύξησης των αντιγράφων είναι εκθετικός, δεδομένου ότι μετά τον πρώτο κύκλο αντιγραφής έχουν σχηματιστεί 2 αντίγραφα, μετά τον δεύτερο κύκλο έχουν σχηματιστεί 4 αντίγραφα κ.ο.κ. Όλα τα αντίγραφα αποτελούν ένα κλώνο τμημάτων DNA.

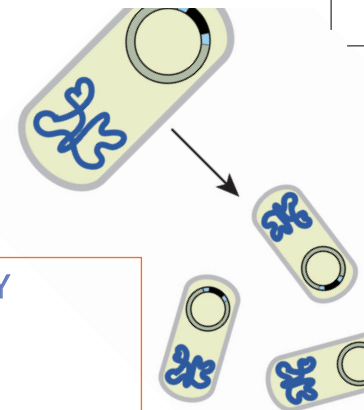
Επομένως εφόσον θέλουμε να συνθέσουμε τουλάχιστον 250 αντίγραφα ενός τμήματος DNA, θα πρέπει να ολοκληρωθούν 8 κύκλοι αντιγραφής ($2^8 = 256$), δηλαδή θα χρειαστούν $8 \times 5 = 40$ min.

β. Εφόσον το δίκλινο τμήμα DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε αποτελείται από 1.200 ζεύγη νουκλεοτιδίων, δηλαδή από 2.400 νουκλεοτίδια, θα χρησιμοποιηθούν τουλάχιστον $(2.400 \times 256) - 2.400 = 612.000$ ελευθέρων νουκλεοτιδίων για την σύνθεση των 255 νέων κλώνων του μορίου DNA που σχηματίζονται με την μέθοδο PCR.

Αφαιρούμε τα 2.400 νουκλεοτίδια που συνιστούσαν το αρχικό μόριο DNA, αφού αυτά δεν ήταν ελεύθερα.

γ. Σε κάθε γραμμική μονόκλινη αλυσίδα DNA μήκους 1.200 νουκλεοτιδίων που κατασκευάζεται δημιουργούνται $1.200 - 1 = 1.199$ 3' - 5' φωσφοδιεστερικοί δεσμοί. Άρα εφόσον σχηματίζονται $255 \times 2 = 510$ νέες αλυσίδες DNA του επιθυμητού τμήματος, θα σχηματιστούν και $510 \times 1.199 = 611.490$, 3' - 5' φωσφοδιεστερικοί δεσμοί.

Στους παραπάνω υπολογισμούς δεν λήφθηκε υπόψη το γεγονός ότι ένας αριθμός 3' - 5' φωσφοδιεστερικών δεσμών δε σχηματίστηκαν κατά τη διάρκεια της PCR, αλλά προϋπήρχαν στις εκκινητικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

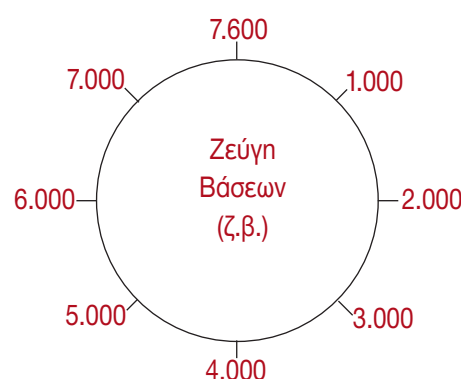


ΑΣΚΗΣΗ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΥ ΧΑΡΤΗ ΕΝΟΣ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΜΟΡΙΟΥ DNA

Υποθέτουμε ότι διαθέτουμε ένα κυκλικό μόριο DNA, π.χ. το υποθετικό πλασμίδιο pNMZ, το οποίο έχει μήκος 7.600 ζεύγη βάσεων (ζ.β.). Θέλουμε να σχεδιάσουμε τον περιοριστικό του χάρτη, όταν αυτό επωαστεί με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Pst*I, *Bam*HI και *Eco*RI.

Τα πειραματικά βήματα που θα ακολουθήσουμε είναι τα εξής:

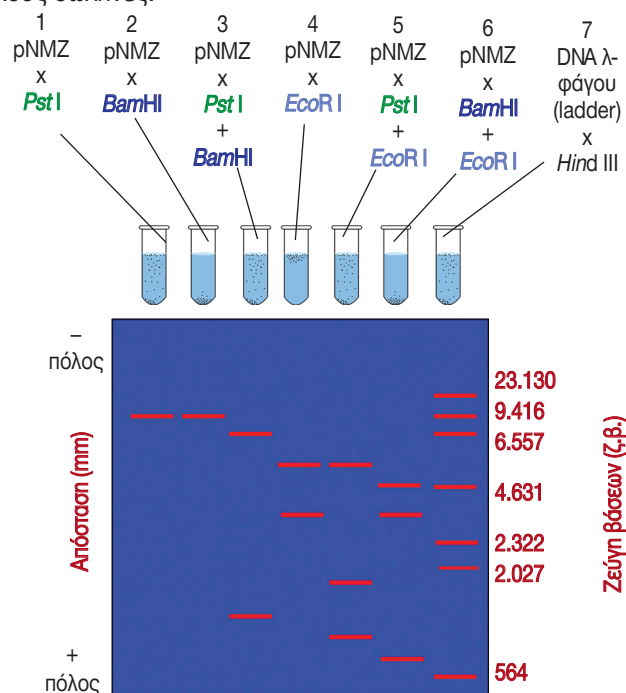
pNMZ



1^ο: ΠΕΨΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΤΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ.

Επωάζουμε το μόριο του DNA με κάθε περιοριστικό ένζυμο ξεχωριστά και με κάθε πιθανό συνδυασμό αυτών. Όποτε παίρνουμε 7 δοκιμαστικούς σωλήνες:

1. pNMZ με *Pst*I
2. pNMZ με *Bam*HI
3. pNMZ με *Pst*I + *Bam*HI
4. pNMZ με *Eco*RI
5. pNMZ με *Pst*I + *Eco*RI
6. pNMZ με *Bam*HI + *Eco*RI
7. ladder (DNA λ φάγου + *Hind*III)



2°: ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (Gel).

Το DNA μπορεί να αναλυθεί (να προσδιοριστεί δηλαδή το μήκος του κάθε θραύσματος που προκύπτει από την πέψη) με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Αυτή η διαδικασία στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο. Σε αυτήν τη διαδικασία τα θραύσματα του DNA μετακινούνται προς το θετικό πόλο, που βρίσκεται στο τέλος της διαδρομής του gel και διαχωρίζονται καθώς τα μικρότερου μήκους θραύσματα της πέψης κινούνται ταχύτερα προς τον θετικό πόλο, σε σχέση με τα μεγαλύτερου μήκους (βλέπε ένθετο σχολικού βιβλίου σελ. 188-189).

Βρίσκουμε το μήκος του κάθε τμήματος που προέκυψε από τις πέψεις, συγκρίνοντας το με τα γνωστού μεγέθους τμήματα του DNA του φάγου, που έχει επωαστεί με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HindIII*.

3°: ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΖΩΝΩΝ ΤΟΥ DNA.

Βυθίζουμε το gel σε διάλυμα που περιέχει κατάλληλο αντιδραστήριο για μερικά λεπτά και στη συνέχεια παρατηρούμε το πήκτωμα υπό υπεριώδες φως, όπου γίνονται εμφανείς οι ζώνες με τα τμήματα του DNA (βλέπε σελ. 253).

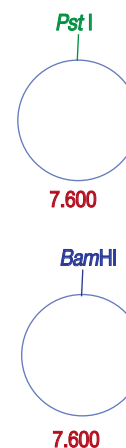
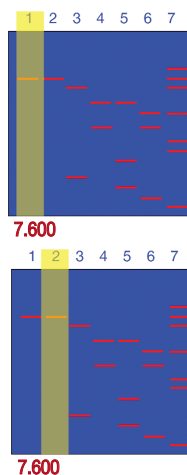
4°: ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ DNA.

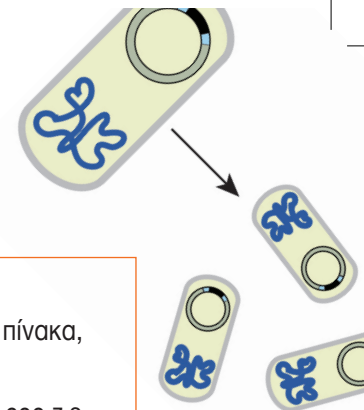
Αποτελέσματα των πέψεων					
1	2	3	4	5	6
<i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I + <i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Pst</i> I + <i>Eco</i> RI	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI
7.600	7.600	6.000	4.700	4.700	4.000
		1.600	2.900	1.990	2.900
				910	700

ΑΝΑΛΥΣΗ:

1. Ο ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ pNMZ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ *Pst*I και *Bam*HI ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ.

Το αποτέλεσμα σε κάθε περίπτωση είναι ένα τμήμα μήκους 7.600 ζ.β. Έτσι εμείς μπορούμε να σχεδιάσουμε έναν απλό χάρτη για καθένα από τα δυο ένζυμα, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι οι θέσεις περιορισμού είναι στο ίδιο σημείο του πλασμιδίου και για τα δυο ένζυμα.





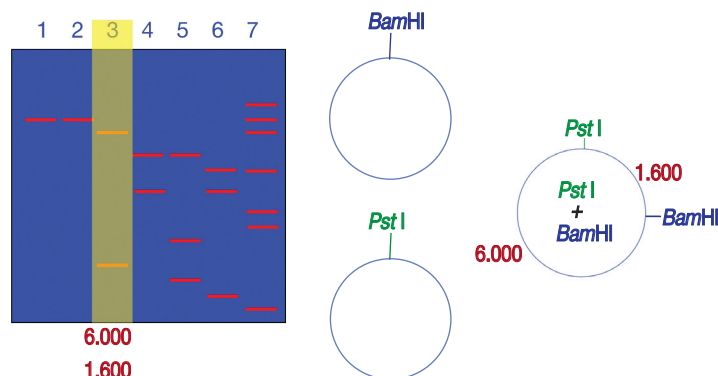
2. Ο ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ ρNMZ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ *Pst*I + *Bam*HI.

Η δράση και των δυο ένζυμων μαζί δημιουργεί δυο τμήματα, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, ένα των 6.000 ζ.β και ένα των 1.600 ζ.β.

Τοποθετούμε τις θέσεις των δυο ένζυμων πάνω στο πλασμίδιο ώστε να απέχουν μεταξύ τους 1.600 ζ.β και 6.000 ζ.β.

Τοποθετώντας τον ένα κύκλο πάνω στον άλλο και περιστρέφοντας τον έναν από τους δυο πάνω στον άλλο, τοποθετούμε τις δυο θέσεις περιορισμού έτσι ώστε αν κοπεί το πλασμίδιο να σχηματίζονται δυο τμήματα ένα με μήκος 6.000 ζ.β και ένα άλλο με μήκος 1.600 ζ.β.

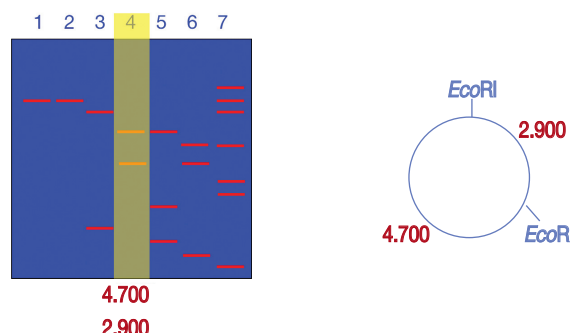
Παρατηρήστε ότι υπάρχουν δυο δυνατοί συνδυασμοί!



3. Ο ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ ρNMZ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ *Eco*RI.

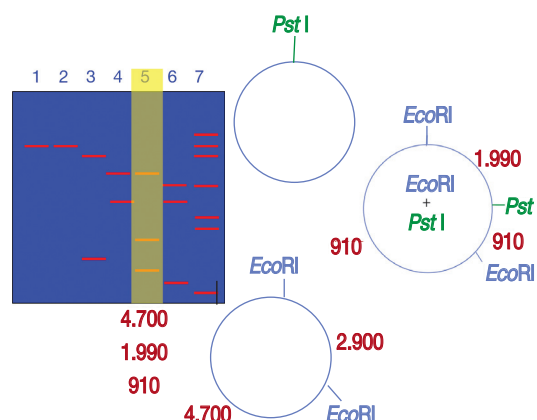
Η *Eco*RI κόβει το πλασμίδιο δυο φορές σχηματίζοντας τμήματα των 4.700 και 2.900 ζ.β.

Στο χάρτη αυτό παριστάνεται ο ένας από τους δυο δυνατούς τρόπους τοποθετήσεως των σημείων αναγνώρισης της *Eco*RI.



4. Ο ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ ρNMZ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ *Pst*I + *Eco*RI.

Τα δυο ένζυμα μαζί παράγουν τρία τμήματα των 4.700, 1.990 και 910 ζ.β. Συγκρίνοντας αυτό το αποτέλεσμα με το αμέσως προηγούμενο της *Eco*RI, όταν είναι μόνη της συμπεραίνουμε εύκολα ότι η θέση αναγνώρισης της *Pst*I στο ρNMZ, πρέπει να είναι μέσα στο τμήμα των 2.900 ζ.β. μεταξύ των δυο θέσεων της *Eco*RI, κόβοντας αυτό σε δυο τμήματα, ένα των 1.990 ζ.β και ένα των 910 ζ.β.

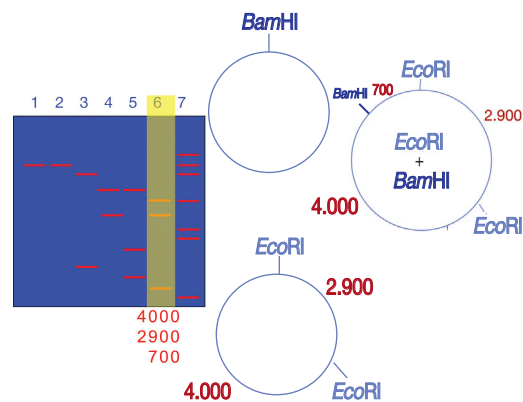


Τοποθετώντας τον ένα κύκλο πάνω στον άλλο και περιστρέφοντας τον έναν από τους δύο, πάνω στον άλλο, τοποθετούμε τις θέσεις περιορισμού έτσι ώστε αν κοπεί το πλασμίδιο να σχηματίζονται τρία τμήματα ένα με μήκος 1.990 ζ.β, ένα άλλο με μήκος 910 ζ.β. και ένα με μήκος 4.700 ζ.β.

5. Ο ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ pNMZ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ *Bam*HI + *Eco*RI.

Τα δυο ένζυμα μαζί παράγουν τρία τμήματα των 4.000, 2.900 και 700 ζ.β. Συγκρίνοντας αυτό το αποτέλεσμα με το προηγούμενο της *Eco*RI όταν είναι μόνη της, συμπεραίνουμε εύκολα ότι η θέση αναγνώρισης της *Bam*HI στο pNMZ, πρέπει να είναι μέσα στο τμήμα των 4.700 ζ.β. μεταξύ των δυο θέσεων της *Eco*RI, κόβοντας αυτό σε δυο τμήματα, ένα των 4.000 ζ.β και ένα των 700 ζ.β.

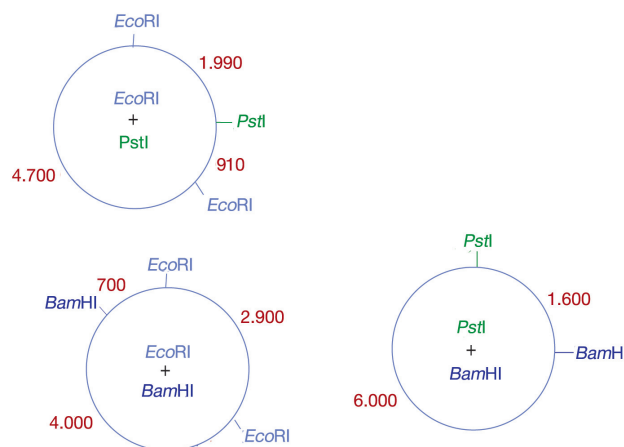
Τοποθετώντας τον ένα κύκλο πάνω στον άλλο και περιστρέφοντας τον έναν από τους δυο πάνω στον άλλο, τοποθετούμε τις θέσεις περιορισμού έτσι ώστε αν κοπεί το πλασμίδιο να σχηματίζονται τρία τμήματα ένα με μήκος 2.900 ζ.β, ένα άλλο με μήκος 4.000 ζ.β. και ένα με μήκος 700 ζ.β. Παρατηρήστε ότι υπάρχουν δυο δυνατοί συνδυασμοί!

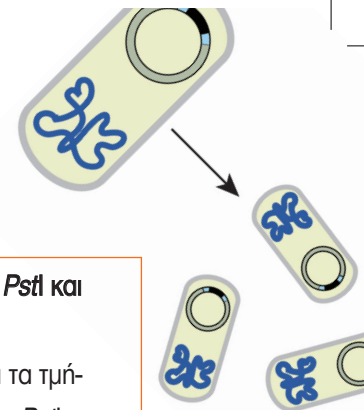


6. Ο ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ pNMZ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ *Bam*HI ΚΑΙ *Pst*I ΚΑΙ *Eco*RI.

Τελευταίο πράγμα που έχουμε να κάνουμε είναι να προσέξουμε τους χάρτες των *Pst*I + *Eco*RI καθώς και των *Bam*HI + *Eco*RI, ώστε να τοποθετήσουμε τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *Bam*HI + *Pst*I πάνω στο πλασμίδιο σωστά.

Αν κοιτάξουμε ξανά τα δεδομένα της πέψης *Bam*HI + *Pst*I, παρατηρούμε ότι τα τμήματα που παράγονται είναι 6.000 ζ.β και 1.600 ζ.β. Έτσι συγκρίνοντας τους δύο χάρτες των *Pst*I + *Eco*RI καθώς και των *Bam*HI + *Eco*RI, μπορούμε να δούμε ότι έτσι όπως έχουμε σχεδιάσει τον χάρτη *Bam*HI + *Eco*RI, δεν μας εξυπηρετεί.

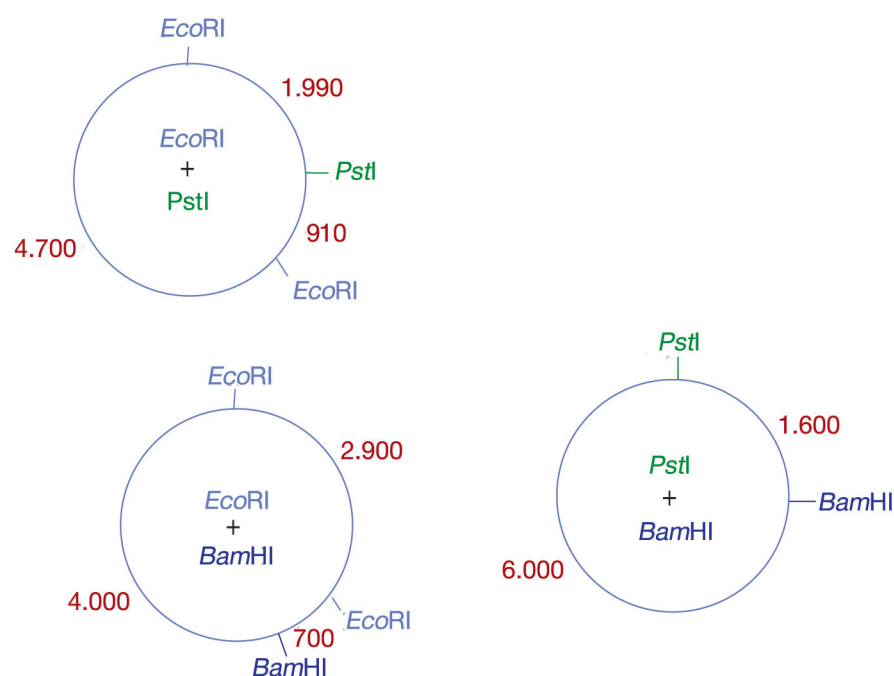




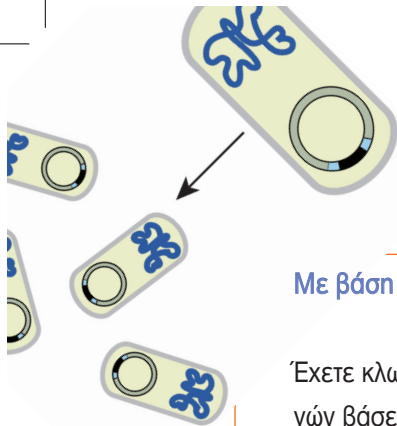
7. Ο ΤΕΛΙΚΟΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ pNMZ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ *Bam*HI και *Pst*I και *Eco*RI.

Αν ξανακοιτάξουμε τα δεδομένα της πέψης των *Bam*HI + *Pst*I παρατηρούμε ότι σχηματίζονται τα τμήματα των 6.000 και 1.600 ζ.β. έτσι πρέπει να συγκρίνουμε τους χάρτες των *Bam*HI + *Eco*RI και *Pst*I + *Eco*RI, για να φτιάξουμε τον τελικό χάρτη. Δουλεύοντας με τους χάρτες που έχουμε σχεδιάσει δεν μπορούμε να βρούμε τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων πάνω στο πλασμίδιο. Έτσι πρέπει να σχεδιάσουμε έναν εναλλακτικό χάρτη των *Bam*HI + *Eco*RI.

Συνεπώς ο τελικός περιοριστικός χάρτης του πλασμίδιο pNMZ για τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *Bam*HI και *Pst*I και *Eco*RI, είναι:



Τώρα πλέον είναι πολύ εύκολο να σχεδιάσετε τον σωστό χάρτη!!!



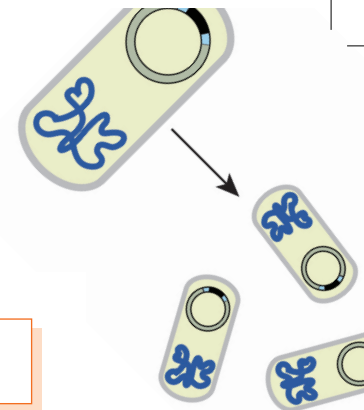
Με βάση την παραπάνω ανάλυση σκεφτείτε για να λύσετε την παρακάτω άσκηση.

Έχετε κλωνοποιήσει σε ένα πλασμίδιο ένα θραύσμα DNA με άκρα *EcoRI* που έχει μέγεθος 1.650 ζευγών βάσεων (bp), που περιέχει το γονίδιο για την ορμόνη λεπτίνη. Η πρώτη σας δουλειά είναι η κατασκευή ενός περιοριστικού χάρτη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Γνωρίζετε ότι κλωνοποιήσατε το θραύσμα DNA σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης 850 ζευγών βάσεων, που έχει μόνο μια *EcoRI* θέση (αυτή στην οποία έγινε η κλωνοποίηση). Υπάρχουν άλλες δύο περιοριστικές θέσεις στο πλασμίδιο. Ο ακόλουθος πίνακας δείχνει τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν και τα μεγέθη των DNA θραυσμάτων που προκύπτουν. Σχεδιάστε τον χάρτη του κυκλικού ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.

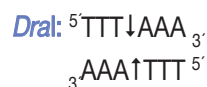
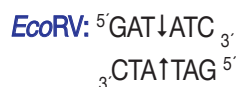
Περιοριστική ενδονουκλεάση	Μέγεθος θραυσμάτων (ζ.β.)
<i>EcoRI</i>	850, 1650
<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>	450, 850, 1200
<i>EcoRI</i> + <i>SalI</i>	200, 850, 1450
<i>BamHI</i> + <i>SalI</i> + <i>EcoRI</i>	200, 250, 850, 1200

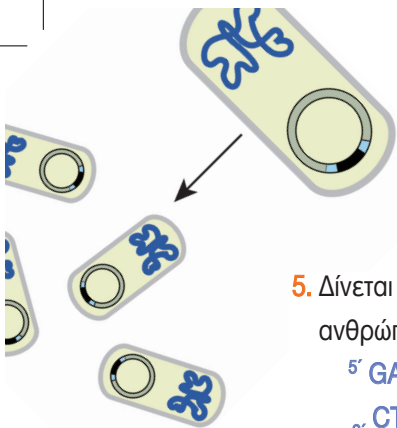


ΑΣΚΗΣΕΙΣ - ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΛΥΣΗ



- Με τη δράση της *EcoRI* ένα μόριο DNA ευκαρυωτικού κυττάρου κόπηκε σε 50 τμήματα.
 - Πόσες φορές βρισκόταν η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής αυτής ενδονουκλεάσης στο μόριο DNA;
 - Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί έσπασαν στο DNA;
 - Για να κλωνοποιήσουμε τα παραπάνω τμήματα πόσα τουλάχιστον πλασμίδια θα χρειαστούμε;
 - Σε κάθε πλασμίδιο που κόβεται με *EcoRI* πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί διασπάστηκαν; Πόσοι δεσμοί υδρογόνου διασπάστηκαν;
 - Για να σχηματιστεί ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με τη DNA δεσμάση πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί θα σχηματιστούν;
 - Αν η επιτυχία του μετασχηματισμού είναι 10% πόσα τουλάχιστον βακτήρια θα χρειαστούν για το μετασχηματισμό;
- Με τη PCR μέθοδο κλωνοποιούμε ένα τμήμα DNA που αποτελείται από 2.000 νουκλεοτίδια. Κάθε κύκλος αντιγραφής αποτελείται από τρία στάδια. Ένα με διάρκεια 1 λεπτό όπου η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 94°C και το DNA αποδιατάσσεται, στο δεύτερο στάδιο διάρκειας 1 λεπτού, η θερμοκρασία κατεβαίνει στους 55°C και υβριδίζουν τα ειδικά ολιγονουκλεοτίδια εκατέρωθεν της προς ενίσχυση αλληλουχίας, στο τρίτο στάδιο διάρκειας 2 λεπτών, η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 74°C και η θερμοαντοχή DNA πολυμεράση αντιγράφει το DNA. Μετά από 2 ώρες πόσα αντίγραφα του γονιδίου θα έχουν δημιουργηθεί, διαθέτοντας μόνο ένα αρχικό αντίγραφο;
- Θέλουμε να αναπαράγουμε *in vitro* (με PCR) τουλάχιστον 100 αντίγραφα ενός μορίου DNA, το οποίο συνίσταται από 50.000 νουκλεοτίδια. Η διάρκεια της αντιγραφής αυτού του τμήματος είναι 5 λεπτά.
 - Μετά από πόσο χρόνο θα έχουμε τον επιθυμητό αριθμό αντιγράφων, αρχίζοντας με 2 αντίγραφα;
 - Πόσα νουκλεοτίδια θα υπάρχουν σε όλα συνολικά τα αντίγραφα και πόσα νουκλεοτίδια θα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεσή τους;
- Το γονίδιο που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε έχει εσωτερική θέση αναγνώρισης από την *EcoRI*. Παρατηρούμε όμως ότι δεξιά και αριστερά από το γονιδιό μας υπάρχουν δύο θέσεις *DraI*. Το πλασμίδιο που έχουμε στη διάθεσή μας δεν έχει μοναδική θέση αναγνώρισης *DraI* αλλά μιας άλλης περιοριστικής ενδονουκλεάσης, της *EcoRV*. Μπορεί να γίνει κλωνοποίηση; Σχεδιάστε το σημείο ανασυνδυασμού στο πλασμίδιο που θα προκύψει.





5. Δίνεται το παρακάτω τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε προκειμένου να παράγουμε ένα ανθρώπινο πεπτίδιο σε βακτήρια.

5' GAATTC AAGCTT CCGGAAATCATGTTTCTTATTGTGAATTC TAAGATATCAAGCTT 3'
3' CTTAAGTTCGAAGGCCTTTAGTACAAAGAATAACACTTAAGATTCTATAGTTCGAA 5'

Το πλασμίδιο που έχετε στη διάθεσή σας είναι το pBluescript που διαθέτει μοναδικές θέσεις αναγνώρισης για *EcoRI*, *EcoRV* και *HindIII*. Ποιο περιοριστικό ένζυμο θα επιλέξετε;

EcoRV: 5' GAT↓ATC_{3'}
3' CTA↑TAG_{5'}

HindIII: 5' A↓AGCTT_{3'}
3' TTCGA↑A_{5'}

6. Δίνεται το παρακάτω τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε για να παραχθεί ένα πεπτίδιο θηλαστικού σε βακτήρια. Το τμήμα με τα μικρά γράμματα είναι εσώνιο.

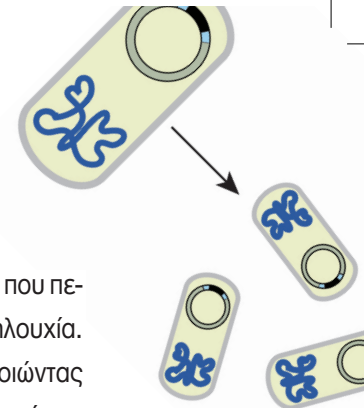
5' CCCGAATTCATGTTTCTTATCCTAATgaagAATAAATGACGCGAATTCCTC 3'
3' GGGCTTAAGTACAAAAGAATAGGATTacttCTATTACTGCGCTTAAGGAG 5'

Δημιουργούμε γονιδιωματική βιβλιοθήκη του οργανισμού - δότη με φορείς κλωνοποίησης πλασμίδια που διαθέτουν μοναδική θέση *EcoRI* και επιλέγουμε με υβριδοποίηση τον βακτηριακό κλώνο που περιέχει το αντίστοιχο γονίδιο. Με τη χρήση του γενετικού κώδικα να γράψετε το πεπτίδιο που δημιουργείται από τα βακτήρια ξενιστές.

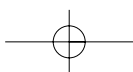
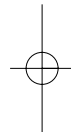
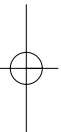
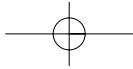
7. Από τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνταν τη δεκαετία του 80', ιδιαίτερα δημοφιλές ήταν το πλασμίδιο pBR325. Περιείχε γονίδια ανθεκτικότητας για τρία αντιβιοτικά και μέσα σε αυτά μοναδικές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών. Έτσι το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη περιείχε θέση για την *PstI*, το γονίδιο της ανθεκτικότητας της χλωραμφαινικόλης για την *EcoRI* και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη για την *BamHI*. Σχεδιάστε ένα πείραμα για την δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ενός μύκητα σε *Escherichia coli* με χρήση της *EcoRI* χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο πλασμίδιο. Υπάρχει τρόπος να ξεχωρίσετε τα βακτήρια με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια από τα βακτήρια με τα μη ανασυνδυασμένα, μετά το μετασχηματισμό;

8. Από τα πλασμίδια τελευταίας γενιάς που χρησιμοποιούνται στην κλωνοποίηση είναι και το pZero2. Το πλασμίδιο αυτό φέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και έχει τις θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών μέσα στο γονίδιο *ccdB*, που το προϊόν του είναι μια πρωτεΐνη θανατηφόρα για τα βακτήρια. Ποια πλεονεκτήματα προσφέρει αυτό το γεγονός σε σχέση με τα κλασικά πλασμίδια προηγούμενης γενιάς;

9. Διαθέτουμε στελέχη *Escherichia coli* που λόγω μετάλλαξης έχουν χάσει την ικανότητα να μεταβολίζουν τη λακτόζη, στελέχη *Escherichia coli* που διαθέτουν κανονικά το οπερόνιο και μεταβολίζουν λακτόζη, πλασμίδια φορείς με ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη, *EcoRI* η οποία δεν αναγνωρίζει καμιά θέση μέσα στο οπερόνιο, DNA δεσμάση, χημικά για μετασχηματισμό και θρεπτικό υλικό με μόνη πηγή σακχάρων τη λακτόζη. Μπορείτε να σχεδιάσετε πείραμα με σκοπό να μεταφέρετε το οπερόνιο στα ανίκανα να συνθέσουν λακτόζη βακτήρια;

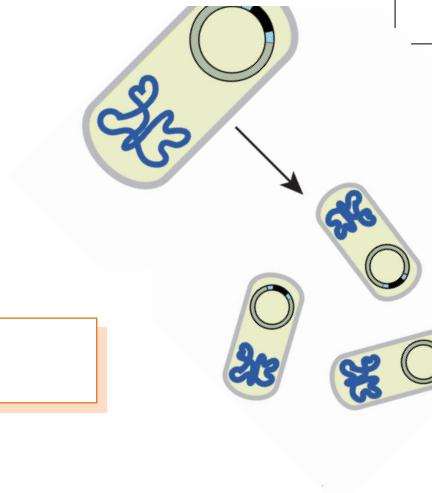


10. Δίνεται ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (pBluescript) με μέγεθος 6.000 ζεύγη βάσεων (ζ.β.) που περιέχει ένα ετερόλογο γονίδιο του οποίου θέλουμε να αναλύσουμε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Για αυτό το σκοπό πρέπει να κόψουμε το μόριο του DNA σε μικρότερα τμήματα, χρησιμοποιώντας περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Ο φορέας κλωνοποίησης (pBluescript) πριν τον ανασυνδυασμό του από το γονίδιο, σε θέση *EcoRI*, είχε μέγεθος 3.000 ζεύγη βάσεων. Οι μοναδικές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών στο πλασμίδιο είναι: *HindIII-EcoRV-EcoRI* που βρίσκονται σε σειρά. Χρησιμοποιώντας την *EcoRI*, παίρνουμε 2 τμήματα των 3.000 ζ. β., χρησιμοποιώντας την *HindIII* παίρνουμε 2 τμήματα μήκους 1.800 και 4.200 ζ.β., τέλος με την χρήση της *EcoRV* προκύπτουν δύο τμήματα μήκους 800 και 5.200 ζ.β.. Σε πόσες θέσεις το κόβει κάθε ένζυμο το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο; Να σχεδιάσετε τις θέσεις αναγνώρισης κάθε ενζύμου και τις μεταξύ τους αποστάσεις.
11. Έστω ένα χρωμόσωμα ευκαρυωτικού οργανισμού που συνίσταται από ίσες αναλογίες των τεσσάρων διαφορετικών νουκλεοτιδίων, A,T, C, G. Αν το μήκος του είναι 163.840 ζ.β. και η κατανομή των βάσεων εντελώς τυχαία, να υπολογίσετε πόσες θέσεις αναγνώρισης της *EcoRI* περιμένετε να βρεθούν σε αυτό.
12. Διαθέτουμε δύο είδη βακτηρίων, το *Acetobacter sp.* και το *Escherichia coli*. Το πρώτο καταβολίζει μόνο σακχαρόζη και παράγει οξικό οξύ ενώ το δεύτερο καταβολίζει ραφινόζη, σακχαρόζη, γλυκόζη κ.α. σάκχαρα. Τα γονίδια καταβολισμού της ραφινόζης είναι επτά, οργανωμένα σε δύο οπερόνια. Το ένα οπερόνιο, αποτελούμενο από 4 γονίδια (*raf 1 - 4*) βρίσκεται σε ένα πλασμίδιο που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφαινικόλη ενώ το δεύτερο οπερόνιο με τα γονίδια *raf 5 - 7* εδράζεται στο χρωμόσωμα της *E. coli*. Πώς θα μπορούσαμε να κατασκευάσουμε με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA ένα βακτήριο που να καταβολίζει ραφινόζη και να παράγει οξικό οξύ;
13. Δίκλωνο και γραμμικό μόριο DNA επωάζεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BamHI*. Αποτέλεσμα είναι να προκύπτουν δύο τμήματα των 15 kb και 25 kb (kb = χιλιάδες ζεύγη νουκλεοτιδίων). Αντίγραφο του ακέραιου μορίου υποβάλλεται σε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, ώστε να παραχθούν τουλάχιστον 1.000 νέα αντίγραφα. Στο προϊόν της αντίδρασης επιδρά η περιοριστική ενδονουκλεάση *BamHI* και ταυτόχρονα η *EcoRI*, οπότε προκύπτουν 4.096 θραύσματα, μεταξύ των οποίων και 1.024 θραύσματα μήκους 8 kb, το καθένα εκ των οποίων φέρει διαφορετικές αλληλουχίες στα μονόκλωνα άκρα του και άλλα 1.024 θραύσματα μήκους 7 kb που έχουν εκατέρωθεν τα ίδια μονόκλωνα άκρα. Πόσες θέσεις αναγνώρισης έχει η *EcoRI* στο μόριο και τι μήκος έχουν τα υπόλοιπα θραύσματα;





ΔΙΑΓΩΝΙΣΜΑ



Ζήτημα 1ο

A. Να σημειώσετε την σωστή απάντηση.

1. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται σαν ξενιστές ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πρέπει να μη διαθέτουν:

- α. Πλασμίδια.
- β. Ενδονουκλεάσες που μπορεί να κόψουν το ετερόλογο DNA
- γ. DNA πολυμεράση.
- δ. Πλασμίδια και ενδονουκλεάσες που μπορεί να κόψουν το ξένο DNA

2. Με τη PCR μέθοδο μπορούμε:

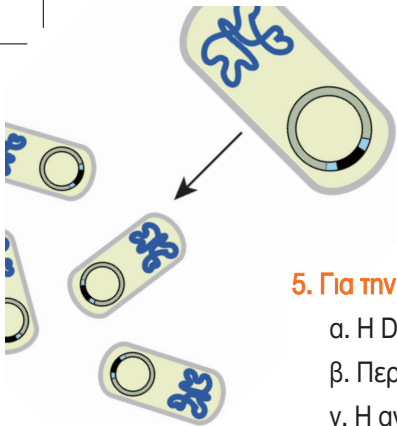
- α. Να παράγουμε ένα γονιδιακό προϊόν, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου.
- β. Να πετύχουμε το ίδιο αποτέλεσμα με τις cDNA βιβλιοθήκες, χωρίς κλωνοποίηση σε βακτήρια.
- γ. Να μελετήσουμε τον υποκινητή ενός γονιδίου.
- δ. Ότι περιγράφεται στα β. και γ.

3. Τι διαδικασία θα ακολουθήσουμε προκειμένου να μελετήσουμε τις αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής ενός γονιδίου;

- α. Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.
- β. Μέθοδο PCR.
- γ. Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης.
- δ. Όλα τα παραπάνω.
- ε. Ότι περιγράφεται στα α. και β.

4. Τι διαδικασία θα ακολουθήσουμε προκειμένου να μελετήσουμε τις 3' και 5' αμετάφραστες περιοχές ενός γονιδίου;

- α. Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.
- β. Μέθοδο PCR.
- γ. Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης.
- δ. Όλα τα παραπάνω.
- ε. Τίποτα από τα παραπάνω, αφού οι περιοχές αυτές του γονιδίου δε μεταφράζονται.



5. Για την κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης χρησιμοποιείται:

- α. Η DNA πολυμεράση.
- β. Περιοριστική ενδονουκλεάση.
- γ. Η αντίστροφη μεταγραφάση.
- δ. Ότι περιγράφεται στα α. και β.

(Μόρια 15)

B. Να χαρακτηρίσετε με σωστό (Σ) ή λάθος (Λ) τις παρακάτω προτάσεις:

- A.** Είναι προϋπόθεση για την επιλογή ενός βακτηριακού κλώνου από μια cDNA βιβλιοθήκη η ύπαρξη μορίου DNA ή RNA, συμπληρωματικού του τμήματος DNA, που θα χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής.
- B.** Αν ακολουθήσουμε την διαδικασία κατασκευής cDNA βιβλιοθήκης, θα έχουμε δύο κατηγορίες βακτηρίων, αυτά που δεν έχουν μετασχηματιστεί και εκείνα που έχουν μετασχηματιστεί από πλασμίδια με ανασυνδιασμένο DNA.
- Γ.** Ο όρος κλώνος μπορεί να αναφέρεται σε μια ομάδα πανομοιότυπων μορίων.
- Δ.** Υπό την επίδραση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI* σε ένα τμήμα DNA δημιουργούνται μονόκλινα άκρα, που έχουν την εξής ακολουθία νουκλεοτιδίων: AATT
- E.** Η πρωτεΐνη που θα παραχθεί από ένα βακτηριακό κλώνο cDNA βιβλιοθήκης ενός ευκαρυωτικού κυττάρου, θα είναι λειτουργική όπως και η πρωτεΐνη που θα παρήγαγε ο ευκαρυωτικός οργανισμός.

(Μόρια 10)

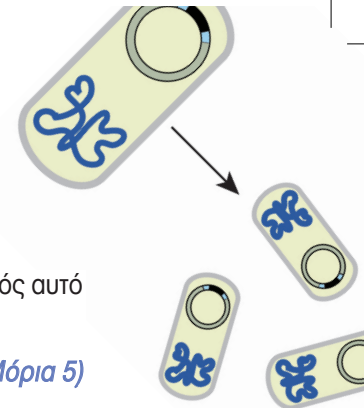
Ζήτημα 2ο

A. Ποιες ιδιότητες πρέπει να έχει ένα πλασμίδιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης;

(Μόρια 15)

B. Να συμπληρώσετε με τους κατάλληλους όρους τα κενά στις παρακάτω προτάσεις

- A.** Για την κατασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης απομονώνουμε αρχικά ολικό Από αυτό, με τη βοήθεια του ενζύμου, δημιουργούμε υβριδικά μόρια
- B.** Στη συνέχεια είτε αποδιατάσσουμε τα παραπάνω υβριδικά μόρια με θέρμανση είτε διασπούμε το με κατάλληλες χημικές ουσίες, ώστε να μπορέσει το να χρησιμοποιηθεί σαν μήτρα για τη σύνθεση του συμπληρωματικού του κλώνου από το ένζυμο
- Γ.** Έτσι σχηματίζονται δίκλινα μόρια DNA τα οποία ενθέτουμε σε κάποιο φορέα κλωνοποίησης, ο οποίος μπορεί να είναι είτε είτε..... . Το μεγάλο πλεονέκτημα των cDNA βιβλιοθηκών



είναι πως περιέχουν αντίγραφα γονιδίων από τα οποία λείπουν τα Το γεγονός αυτό επιτρέπει την περαιτέρω παραγωγή των αντίστοιχων στα βακτήρια ξενιστές.

(Μόρια 5)

Γ. Πόσα τμήματα DNA θα προκύψουν από το κόψιμο με *EcoRI*;

- Ενός δίκλωνου γραμμικού μορίου που φέρει μια θέση αναγνώρισης της *EcoRI*;
- Ενός δίκλωνου γραμμικού μορίου που φέρει δύο θέσεις αναγνώρισης της *EcoRI*;
- Ενός πλασμιδίου που φέρει μια θέση αναγνώρισης της *EcoRI*;
- Ενός πλασμιδίου που φέρει δύο θέσεις αναγνώρισης της *EcoRI*;
- Ενός μονόκλωνου μορίου DNA που φέρει την αλληλουχία $5'GAATTC_3'$;

(Μόρια 5)

Ζήτημα 3ο

A. Αναλύστε σε μια μικρή παράγραφο τους παρακάτω όρους: Γενετική Μηχανική, φορέας κλωνοποίησης, περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ανασυνδυασμένο DNA, μετασχηματισμός.

(Μόρια 10)

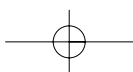
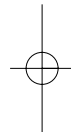
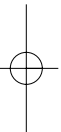
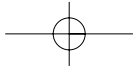
B. Να αναφέρετε τα στάδια κατασκευής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με φορέα κλωνοποίησης βακτηριοφάγο λ.

(Μόρια 15)

Ζήτημα 4ο

Υποθέστε ότι θέλετε να κλωνοποιήσετε ένα γονίδιο ενός μύκητα, το οποίο κωδικοποιεί ένα ορισμένο tRNA. Διαθέτετε κύτταρα του μύκητα, ένα δείγμα από καθαρό tRNA και ένα πλασμίδιο του βακτηρίου *E. coli*. Το πλασμίδιο περιλαμβάνει, μια θέση αναγνώρισης από την *EcoRI* μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας της τετρακυκλίνης (tet^R) καθώς και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (amp^R). Ποια βήματα θα ακολουθήσετε για να κλωνοποιήσετε το τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει;

(Μόρια 25)



ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

