

ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΑ ΗΜΕΡΗΣΙΑ 2014

ΘΕΜΑ Α

1. γ
2. β
3. β
4. δ
5. α

ΘΕΜΑ Β

1. Η αλληλουχία των βάσεων του mRNA καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες με βάση έναν κώδικα αντιστοίχισης νουκλεοτιδίων mRNA με αμινοξέα πρωτεϊνών, ο οποίος ονομάζεται **γενετικός κώδικας**.

Μία από τις ιδιότητες του γενετικού κώδικα είναι το γεγονός ότι είναι σχεδόν **καθολικός**. Όλοι οι οργανισμοί έχουν τον ίδιο γενετικό κώδικα. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το mRNA από οποιονδήποτε οργανισμό μπορεί να μεταφραστεί σε εκχυλίσματα φυτικών, ζωικών ή βακτηριακών κυττάρων *in vitro* και να παραγάγει την ίδια πρωτεΐνη.

2. Η σωστή σειρά των βημάτων που ακολουθούνται για την εργαστηριακή καλλιέργεια μικροοργανισμών είναι η εξής:

3 → 1 → 5 → 2 → 4

3. Τα αντισώματα είναι πρωτεϊνικά μόρια, που παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού μας συστήματος, όταν ένα αντιγόνο (παθογόνος μικροοργανισμός, ιός ή ξένο υλικό) προσβάλει τον οργανισμό. Τα αντισώματα αντιδρούν με το αντιγόνο και το εξουδετερώνουν.

Ο οργανισμός μας είναι ικανός να παράγει αντισώματα εναντίον κάθε ξένου αντιγόνου. Στην πραγματικότητα, ένα αντίσωμα αναγνωρίζει μόνο μία περιοχή του αντιγόνου, η οποία ονομάζεται αντιγονικός καθοριστής. Ένα μεγάλο αντιγόνο, π.χ. ένας μικροοργανισμός, έχει πολλούς αντιγονικούς καθοριστές γι' αυτό παράγονται πολλά είδη αντισωμάτων εναντίον του.

Κάθε είδος αντισώματος που αναγνωρίζει έναν αντιγονικό καθοριστή παράγεται από μια ομάδα όμοιων Β-λεμφοκυττάρων, που αποτελούν έναν κλώνο. Τα αντισώματα που παράγονται από έναν κλώνο Β-λεμφοκυττάρων ονομάζονται μονοκλωνικά.

Τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά. Η πιο ενδιαφέρουσα εφαρμογή τους αφορά τη **θεραπεία του καρκίνου**. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν στην εξωτερική επιφάνεια τους μεγάλη ποικιλία αντιγόνων που δεν υπάρχουν στα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού, και ονομάζονται καρκινικά αντιγόνα. Έτσι μπορούν να κατασκευαστούν μονοκλωνικά

αντισώματα εναντίον αυτών των αντιγόνων. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πολύ ειδικά μόνο για τα καρκινικά κύτταρα και μπορούν να «γίνουν μεταφορείς» ισχυρών αντικαρκινικών φαρμάκων. Όταν εισαχθούν στον οργανισμό, βρίσκουν και προσβάλλουν τους καρκίνους-στόχους. Τα αντικαρκινικά φάρμακα, που είναι συνδεδεμένα με τα αντισώματα, δρουν κατευθείαν στα καρκινικά κύτταρα και τα καταστρέφουν. Επιτρέπουν έτσι τη θεραπεία με αποφυγή της χειρουργικής επέμβασης και των δυσάρεστων επιπτώσεων της χημειοθεραπείας.

3. Ένας τρόπος βελτίωσης της φυτικής και ζωικής παραγωγής είναι οι **ελεγχόμενες από τον άνθρωπο διασταυρώσεις φυτών και ζώων**. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται επιλογή φυτών και ζώων που έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως φυτά με μεγάλο μέγεθος καρπών, με ανθεκτικότητα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες ή ζώα που παράγουν μεγάλη ποσότητα κρέατος. Οι οργανισμοί αυτοί διασταυρώνονται με σκοπό τη δημιουργία απογόνων με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Αυτός ο τρόπος βελτίωσης της παραγωγής είναι χρονοβόρος και επίπονος, επειδή απαιτούνται συνεχείς διασταυρώσεις. Επιπλέον οι απόγονοι που προκύπτουν φέρουν συνήθως ορισμένους μόνο από τους επιθυμητούς χαρακτήρες μαζί με άλλες μη επιθυμητές ιδιότητες.

ΘΕΜΑ Γ

1.

Από τα αποτελέσματα των διασταυρώσεων παρατηρούμε ότι προκύπτουν διαφορετικοί φαινότυποι μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων, οπότε μπορούμε να υποθέσουμε πως το γονίδιο το οποίο ελέγχει το χαρακτήρα χρώμα τριχώματος σε αυτό το είδος τρωκτικών **είναι φυλοσύνδετο** και δεδομένου ότι προκύπτει φαινότυπος και με τους δύο χρωματισμούς (ασπροκίτρινο) θα υπάρχει σχέση συνεπικράτειας (αν το ασπροκίτρινο είναι με τμήματα άσπρα και κίτρινα κατά τόπους στο τρίχωμα του ζώου) ή ατελούς επικράτειας μεταξύ των αλληλομόρφων του γονιδίου (αν πρόκειται για ενιαίο χρωματισμό τριχώματος).

Έστω λοιπόν το γονίδιο A που ελέγχει το χαρακτήρα χρώμα τριχώματος και που εδράζεται σε γενετικό τόπο φυλετικού χρωμοσώματος με αλληλομόρφους (A^1 , A^2) με σχέση συνεπικράτειας ή ατελούς επικράτειας μεταξύ τους. Το αλληλόμορφο A^1 συνεπικρατές ή ατελώς επικρατές του A^2 και αντιστρόφως. Θηλυκά ζώα με γονότυπο $X^{A^1}X^{A^1}$ είναι με άσπρο τρίχωμα, ζώα με γονότυπο $X^{A^1}X^{A^2}$ είναι ασπροκίτρινα και ζώα με γονότυπο $X^{A^2}X^{A^2}$ είναι με κίτρινο τρίχωμα. Αρσενικά ζώα με γονότυπο $X^{A^1}Y$ είναι άσπρα και με γονότυπο $X^{A^2}Y$ είναι κίτρινα

Στη διασταύρωση έχουμε:

P: $X^{A1} X^{A2} X^{A1} Y$

Γαμέτες: $X^{A1}, X^{A2} / X^{A1}, Y$

F₁: $X^{A1} X^{A1} : X^{A1} X^{A2} : X^{A1} Y : X^{A2} Y$

♀ ♀ [άσπρα] : ♀ ♀ [ασπροκίτρινα] : ♂ ♂ [άσπρα] : ♂ ♂ [κίτρινα]

Τα δεδομένα της άσκησης επαληθεύουν την υπόθεση μας, δηλαδή ο χαρακτήρας χρώμα τριχώματος ελέγχεται από ένα φυλοσύνδετο γονίδιο με δύο αλληλομόρφους που έχουν σχέση συνεπικράτειας ή ατελούς επικρατείας μεταξύ τους. Είναι προφανές ότι τα αρσενικά μπορεί να είναι μόνο άσπρα ή μόνο κίτρινα, ενώ τα θηλυκά ζώα μπορούν να έχουν τρεις διαφορετικούς χρωματισμούς: άσπρες, κίτρινες ή ασπροκίτρινες, δηλαδή τα ασπροκίτρινα ζώα είναι πάντα θηλυκού γένους.

Θεωρούμε ότι δεν συμβαίνουν καινοφανείς μεταλλάξεις και ότι το δείγμα μας, είναι στατιστικώς αξιόπιστο.

2. Οι ζητούμενοι γονότυποι είναι:

$X^{A1} X^{A1} : X^{A1} X^{A2} : X^{A1} Y : X^{A2} Y$

3. Το σχήμα των αυτιών στο συγκεκριμένο ζωικό είδος κληρονομείται με **αυτοσωμικό τρόπο.**

Αιτιολόγηση:

Σύμφωνα με τα δεδομένα μας, τα δυο γνωρίσματα που συνεξετάζονται στο συγκεκριμένο ζωικό είδος εδράζονται σε διαφορετικά ζεύγη ομολόγων χρωμοσωμάτων. Με δεδομένο λοιπόν, ότι αποδείξαμε πως το γνώρισμα του χρώματος του τριχώματος ελέγχεται από φυλοσύνδετο γονίδιο, συνάγουμε ευλόγως, ότι το γνώρισμα για το σχήμα των αυτιών θα ελέγχεται από γενετικό τόπο που εδράζεται σε αυτοσωμικό χρωμόσωμα.

4. Έστω ο γενετικός τόπος ζεύγους ομολόγων αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων του συγκεκριμένου ζωικού είδους στον οποίο εδράζεται το γονίδιο M (M,μ), με το αλληλόμορφο M επικρατές του αλληλομόρφου μ. Το γονίδιο M ελέγχει το σχήμα των αυτιών στο είδος αυτό των ζώων.

Έχουμε λοιπόν τη διασταύρωση:

P: Mμ x μμ

Γαμέτες: M, μ / μ, μ

Οι ζητούμενοι γονότυποι λοιπόν των απογόνων σύμφωνα με τα δεδομένα μας, είναι:

♀ ♀ Mμ : ♀ ♀ μμ : ♂ ♂ Mμ : ♂ ♂ μμ

5. Σύμφωνα με όσα αποδείχθηκαν στα προηγούμενα ερωτήματα, μπορούμε να συνάγουμε ευκολά τους γονοτύπους των γονέων της πατρικής γενεάς, στην οποία αναφερόμαστε. Πράγματι αυτοί είναι:

Πατέρας: $Mm X^{A1}Y$ και μητέρα: $mm X^{A1} X^{A2}$

αλλιώς

Πατέρας: $mm X^{A1}Y$ και μητέρα: $Mm X^{A1} X^{A2}$

ΘΕΜΑ Δ

1. Η κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση για τη χρήση του συγκεκριμένου πλασμιδίου που δίνεται ως φορές κλωνοποίησης είναι η **δ**.

Αιτιολόγηση: Από το 1953, που οι Watson και Crick πρότειναν το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής του DNA, μέχρι σήμερα, η πρόοδος της επιστήμης της Βιολογίας ήταν αλματώδης. Η απομόνωση και χρήση πολυάριθμων ενζύμων, έδωσε στους ερευνητές τη δυνατότητα «αναπαραγωγής» των διαδικασιών της αντιγραφής, αντίστροφης μεταγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης in vitro. Ειδικότερα η απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών, ενζύμων που κόβουν το DNA σε κομμάτια με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων, καθώς και ειδικών φορέων που μεταφέρουν DNA από κύτταρο σε κύτταρο, επέτρεψε την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA και έδωσε στον άνθρωπο την ικανότητα όχι μόνο να ερευνά, αλλά να επεμβαίνει και να τροποποιεί το γενετικό υλικό των οργανισμών.

Σήμερα μπορούμε να κατασκευάζουμε στο δοκιμαστικό σωλήνα ένα «ανασυνδυασμένο» μόριο DNA, δηλαδή ένα τεχνητό μόριο DNA, που περιέχει γονίδια από δύο ή και περισσότερους οργανισμούς.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA. Μία από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η EcoRI που απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*. Το ένζυμο αυτό όποτε συναντά την αλληλουχία:

5'-G A A T T C-3'

3'-C T T A A G-5'

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

Στη συνέχεια τα κομμάτια του DNA που προκύπτουν από τη δράση του περιοριστικού ενζύμου που διαθέτουν τα χαρακτηριστικά μονόκλινα άκρα ενσωματώνονται σε ειδικούς φορείς κλωνοποίησης. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης έχουν τη συγκεκριμένη αλληλουχία

που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο μία μόνο φορά. Έτσι τα πλασμίδια κόβονται από το ένζυμο σε αυτή τη θέση και δημιουργείται ένα γραμμικό μόριο DNA με μονόκλινα άκρα. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού (εδώ του ανθρώπου), επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση ενός ενζύμου, της DNA δεσμάσης. Η DNA δεσμάση είναι φυσιολογικά ένα από τα ένζυμα της αντιγραφής που συνδέει τμήματα του DNA. Έτσι δημιουργούνται ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Μερικά πλασμίδια ξαναγίνονται κυκλικά, χωρίς να προσλάβουν DNA του οργανισμού.

Ο μηχανισμός της μεταγραφής είναι ο ίδιος στους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η μεταγραφή καταλύεται από ένα ένζυμο, την RNA πολυμεράση.

Η RNA πολυμεράση προσδέεται σε ειδικές περιοχές του DNA, που ονομάζονται υποκινητές, με τη βοήθεια πρωτεϊνών που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες. Οι υποκινητές και οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν τα ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής του DNA και επιτρέπουν στην RNA πολυμεράση να αρχίσει σωστά τη μεταγραφή. Οι υποκινητές βρίσκονται πάντοτε πριν από την αρχή κάθε γονιδίου. Κατά την έναρξη της μεταγραφής ενός γονιδίου η RNA πολυμεράση προσδέεται στον υποκινητή και προκαλεί τοπικό ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA. Στη συνέχεια, τοποθετεί τα ριβονουκλεοτίδια απέναντι από τα δεοξυριβονουκλεοτίδια μίας αλυσίδας του DNA σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων, όπως και στην αντιγραφή, με τη διαφορά ότι εδώ απέναντι από την αδενίνη τοποθετείται το ριβονουκλεοτίδιο που περιέχει ουρακίλη. Η RNA πολυμεράση συνδέει τα ριβονουκλεοτίδια που προστίθενται το ένα μετά το άλλο, με 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό. Η μεταγραφή έχει προσανατολισμό 5'→3' όπως και η αντιγραφή. Η σύνθεση του RNA σταματά στο τέλος του γονιδίου, όπου ειδικές αλληλουχίες οι οποίες ονομάζονται αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής, επιτρέπουν την απελευθέρωσή του.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω και με βάση τα δεδομένα της άσκησης, η περιοριστική ενδονουκλεάση δ είναι η κατάλληλη, διότι υπάρχει μία μοναδική θέση αναγνώρισής της (θέση Δ) στο πλασμίδιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης.

Επιπλέον, η θέση Δ βρίσκεται ακριβώς μετά από αλληλουχία υποκινητή που αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες του βακτηρίου-ξενιστή, δηλαδή το μετασχηματισμένο βακτήριο-ξενιστής θα μπορεί να ξεκινήσει σωστά τη μεταγραφή του ενσωματωμένου στο πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης ανθρώπινου γονιδίου, και ακόμη, η θέση Δ βρίσκεται ακριβώς πριν από αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής στο πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης, δηλαδή θα είναι δυνατόν να τερματιστεί η μεταγραφή του ανασυνδυασμένου

ανθρώπινου γονιδίου στο πλασμίδιο αυτό, όταν το πλασμίδιο αυτό έχει μετασχηματίσει το βακτήριο-ξενιστή.

2. Για να επιλέξουμε τους βακτηριακούς κλώνους που έχουν προσλάβει πλασμίδιο (ανασυνδυσμένο ή μη) από τους κλώνους που δεν έχουν προσλάβει, θα ακολουθήσουμε την εξής διαδικασία: Θα αναπτύξουμε τη βακτηριακή καλλιέργεια που μετασχηματίσαμε σε θρεπτικό υλικό, το οποίο εκτός από τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά για τα βακτήρια θα περιέχει και ένα τουλάχιστον από τα δύο αντιβιοτικά (Αμπικιλίνη, Στρεπτομυκίνη) για τα οποία διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας το πλασμίδιο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε.

Αιτιολόγηση:

Γνωρίζουμε ότι τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης έχουν τη συγκεκριμένη αλληλουχία μία μόνο φορά. Έτσι τα πλασμίδια κόβονται από την EcoRI σε αυτή τη θέση και δημιουργείται ένα γραμμικό μόριο DNA με μονόκλινα άκρα. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού, αναμιγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση ενός ενζύμου, της DNA δεσμάσης. Όπως θυμάστε η DNA δεσμάση φυσιολογικά είναι ένα από τα ένζυμα της αντιγραφής που συνδέει κομμάτια του DNA. Έτσι δημιουργούνται ανασυνδυσμένα πλασμίδια. Μερικά πλασμίδια ξαναγίνονται κυκλικά, χωρίς να προσλάβουν DNA του οργανισμού.

Βακτήρια - ξενιστές δέχονται σε μικρό ποσοστό πλασμίδια, μερικά από τα οποία είναι ανασυνδυσμένο. Συνήθως χρησιμοποιούνται ως ξενιστές, βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά. Για να μπει ένα πλασμίδιο μέσα στο βακτήριο, τα τοιχώματα του βακτηρίου γίνονται παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια, μετά από κατάλληλη κατεργασία (μετασχηματισμός).

Η επιλογή των βακτηρίων που δέχτηκαν ανασυνδυσμένο πλασμίδιο στηρίζεται στην ικανότητα ανάπτυξής τους παρουσία αντιβιοτικού, επειδή το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Κάθε βακτήριο που προσέλαβε ένα ανασυνδυσμένο πλασμίδιο πολλαπλασιάζεται και δίνει ένα κλώνο. Η διαδικασία δημιουργίας κλώνων βακτηρίων ονομάζεται κλωνοποίηση.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, εάν η βακτηριακή καλλιέργεια που χρησιμοποιήσαμε για το μετασχηματισμό των βακτηρίων με το δοθέν πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης αναπτυχθεί σε θρεπτικό υλικό που διαθέτει τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά για τη θρέψη των κυττάρων και ένα τουλάχιστον από τα δύο αντιβιοτικά Αμπικιλίνη ή/και Στρεπτομυκίνη για τα οποία το πλασμίδιο φορέας κλωνοποίησης διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας, τότε εφόσον τα βακτήρια-ξενιστές πριν το μετασχηματισμό δεν διέθεταν κανένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο από τα δύο αυτά αντιβιοτικά, όσα από αυτά δεν δέχθηκαν το πλασμίδιο (δηλαδή η πλειοψηφία τους), ανασυνδυσμένα ή μη, θα αδυνατούν να αναπτυχθούν σε αυτό το θρεπτικό υλικό. Αντίθετα, όσα βακτήρια της καλλιέργειας μετασχηματίστηκαν, ανεξάρτητα με το αν το πλασμίδιο που δέχθηκαν ήταν ή όχι ανασυνδυσμένο, θα διαθέτουν πλέον γονίδια ανθεκτικότητας στο/στα αντιβιοτικά αυτά και θα μπορούν να

αναπτυχθούν σε αυτό το θρεπτικό υλικό. Αυτό είναι δυνατό καθώς η θέση ανασυνδυασμού Δ που επιλέξαμε εκτός του ότι επιτρέπει τη σωστή μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδίου, δεν καταστρέφει καμία από τις δύο αλληλουχίες γονιδίων ανθεκτικότητας που φέρει ο φορέας κλωνοποίησης.

3. Η κωδική αλυσίδα του γονιδίου που δίνεται είναι η αλυσίδα Ι. Το παραγόμενο από τη μεταγραφή μόριο mRNA αυτού του γονιδίου είναι το παρακάτω:

5' **GGCUUAUAAGG****AUG**CCGUACGAG**UAA**AUUUAUAACCG 3'

κωδικόνιο
έναρξης

κωδικόνιο
λήξης

Αιτιολόγηση: «Γνωρίζουμε ότι με τη μεταγραφή ... 5' άκρου της γονικής αλυσίδας του γονιδίου» ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΣΗ ΘΕΜΑΤΑ ΗΜΕΡΗΣΙΑ 2012 ΘΕΜΑ 4^ο .1 . Βλέπε « Τα βιβλία μου » «Τα θέματα των εξετάσεων».

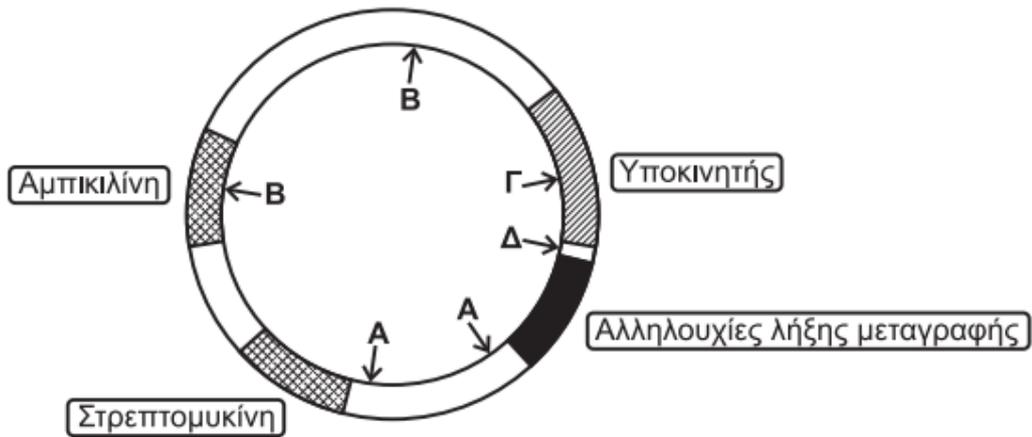
Τις παραπάνω προϋποθέσεις πληροί μόνο η αλυσίδα Ι η οποία όταν διαβάζεται από τα δεξιά (5' άκρο) προς τα αριστερά (3' άκρο) διαθέτει κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης 5' ATG 3' μετά από έντεκα νουκλεοτίδια από την αρχή της και διαθέτει και κωδικόνιο λήξης (5' TAA₃), ενώ μεταξύ κωδικονίου έναρξης και λήξης παρεμβάλλεται πλήθος εννέα νουκλεοτιδίων, δηλαδή το mRNA αυτού του γονιδίου οδηγεί αμέσως μετά τη μετάφρασή του σε ένα ολιγοπεπτίδιο τεσσάρων αμινοξέων.

4. Η περιοριστική ενδονουκλεάση δ αναγνωρίζει την αλληλουχία Δ μήκους έξι ζευγών βάσεων, η οποία αλληλουχία αυτή είναι η εξής:

5' **TTATAA** 3'
3' **AATATT** 5'

Η αλληλουχία αυτή είναι η μόνη κοινή αλληλουχία που εντοπίζεται εκατέρωθεν της μεταφραζόμενης (κωδικής) περιοχής του γονιδίου που μας δίνεται. Έτσι κατά την απομόνωση του γονιδίου αυτού από το ανθρώπινο DNA χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση Δ, η οποία μετά τη δράση της άφησε μονόκλωνα άκρα, από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα του (κολλώδη άκρα) τμήματος DNA που περιέχει ακέραιο το ανθρώπινο γονίδιο που ζητάμε να κλωνοποιήσουμε. Η κοπή του πλασμιδίου φορέα κλωνοποίησης που μας δίνεται με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση στη θέση Δ οδηγεί σε ένα γραμμικό μόριο DNA με κολλώδη άκρα συμπληρωματικά προς τα κολλώδη άκρα του τμήματος DNA του ανθρώπου που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Έτσι είναι δυνατός ο ανασυνδυασμός του φορέα κλωνοποίησης στη θέση Δ με το συνεχές ανθρώπινο γονίδιο χάρη στη συμπληρωματικότητα των κολλωδών άκρων τους και τη βοήθεια της DNA δεσμάσης που θα δημιουργήσει την 3' → 5' φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ τους.

5.

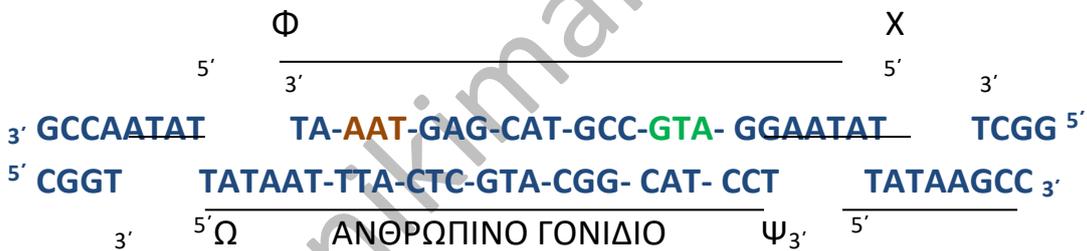


ΘΕΣΗ Δ

ΘΕΣΗ Δ



δράση περιοριστικής ενδονουκλεάσης



Σύμφωνα με όσα προκύπτουν από τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης Δ, τόσο στο πλασμίδιο στη θέση Δ όσο και κατά την απομόνωση του ανθρώπινου γονιδίου στις θέσης Δ, μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι υπάρχουν δύο τρόποι ανασυνδυασμού των δύο DNA. Οι δύο αυτοί τρόποι είναι δυνατοί, εξαιτίας του τρόπου δράσης του ενζύμου DNA δεσμάση, το οποίο είναι ικανό να δημιουργεί μόνο 3' - 5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των άκρων των δύο DNA που πρόκειται να ανασυνδυαστούν καθώς επίσης και εξαιτίας του κανόνα της συμπληρωματικότητας μεταξύ των βάσεων των μονόκλωνων άκρων των δύο DNA. Οι δύο αυτοί δυνατοί τρόποι ανασυνδυασμού είναι:



ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ Μ 3' - 5' Χ ΑΝΘΡ. ΓΟΝΙΔΙΟ Φ 3' - 5' Ν ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ
 ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ Ο 5' - 3' Ψ ΑΝΘΡ. ΓΟΝΙΔΙΟ Ω 5' - 3' Ξ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ

ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ → ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΛΗΞΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Δηλαδή:



ή εναλλακτικά



ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ Μ^{3'}-^{5'}Ω ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΓΟΝΙΔΙΟ Ψ_{3'}-^{5'}Ν ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ
ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ Ο^{5'}-^{3'}Φ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΓΟΝΙΔΙΟ Χ^{5'}-^{3'}Ξ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ

ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ → ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΛΗΞΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Δηλαδή:



Υπόμνημα:

Τα άκρα Μ και Ν συνιστούν τα κολλώδη άκρα που δημιουργεί η περιοριστική ενδονουκλεάση Δ στον εξωτερικό (πάνω) κλώνο του πλασμιδίου, όταν δρα επι αυτού. Ομοίως, τα άκρα Ο και Ξ για τον εσωτερικό (κάτω) κλώνο του πλασμιδίου.

Τα άκρα Φ, Χ, Ψ, Ω αποτελούν τα κολλώδη άκρα που αφήνει εκατέρωθεν του πλαισίου ανάγνωσης του ανθρώπινου γονιδίου η περιοριστική ενδονουκλεάση Δ ή κάποιο ισοσχιζομερές αυτής περιοριστικό ένζυμο, όταν δρα επι του ανθρώπινου γονιδίου.

Όπως φαίνεται από τους δύο πιθανούς συνδυασμούς μεταξύ των DNA του πλασμιδίου και του ανθρώπινου γονιδίου, που αμφότερα έχουν κολλώδη άκρα τα οποία δημιουργεί η περιοριστική ενδονουκλεάση Δ, μόνο ο πρώτος τρόπος ανασυνδυασμού οδηγεί στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων, που παράγουν το ανθρώπινο ολιγοπεπτίδιο.

Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι κατά τον ανασυνδυασμό Α, η κωδική αλυσίδα του γονιδίου, που είναι η αλυσίδα Ι και η μη-κωδική αλυσίδα του γονιδίου, που είναι η αλυσίδα ΙΙ ανασυνδυάζονται με τέτοιο τρόπο με το πλασμίδιο, ώστε ο υποκινητής που διαθέτει το πλασμίδιο και αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες του βακτηρίου-ξενιστή να βρίσκεται προς το 5' άκρο της κωδικής αλυσίδας του γονιδίου και φυσικά προς το 3' άκρο της μη-κωδικής αλυσίδας του γονιδίου. Έτσι κατά τη μεταγραφή του γονιδίου προκύπτει ένα μόριο mRNA που έχει την ίδια αλληλουχία βάσεων (μόνο που αντί για Τ διαθέτει U) και τον ίδιο προσανατολισμό με την κωδική αλυσίδα του γονιδίου, αυτό γίνεται εφικτό επειδή κατά τη μεταγραφή ανασυνδυασμένου γονιδίου με αυτόν τον τρόπο (τρόπο Α) χρησιμοποιείται από την RNA πολυμεράση ως καλούπι για τη δημιουργία του mRNA η ίδια αλυσίδα που χρησιμοποιείται και κατά τη μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδίου στα ανθρώπινα κύτταρα.

ii) Αντίθετα κατά τον ανασυνδυασμό Β δημιουργούνται βακτηριακοί κλώνοι που αδυνατούν να παράγουν το ανθρώπινο ολιγοπεπτίδιο, διότι κατά αυτόν τον τρόπο ανασυνδυασμού χρησιμοποιείται για τη μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδίου από τη βακτηριακή RNA πολυμεράση η αλυσίδα του ανθρώπινου γονιδίου που φυσιολογικά συνιστά την κωδική

του αλυσίδα κατά τη μεταγραφή του γονιδίου στα ανθρώπινα κύτταρα. Με αυτόν δηλαδή τον τρόπο ανασυνδυασμού (τρόπος Β), το ανθρώπινο γονίδιο ενσωματώνεται με τέτοιο τρόπο στο πλασμίδιο ώστε η φυσιολογική κωδική αλυσίδα του να αποτελεί τώρα μη-κωδική αλυσίδα και η φυσιολογική μη-κωδική αλυσίδα του να συνιστά τώρα κωδική αλυσίδα. Έτσι το παραγόμενο από τη μεταγραφή μόριο mRNA εντός του βακτηριακού κυττάρου-ξενιστή δεν έχει την ίδια αλληλουχία ριβονουκλεσιδίων με το φυσιολογικό mRNA του γονιδίου, δηλαδή μεταφέρει εντελώς διαφορετικό μήνυμα και συγκεκριμένα επειδή δεν διαθέτει κωδικόνιο έναρξης ($5' \text{AUG}_3'$) δεν κωδικοποιεί για κάποιο πεπτίδιο.