

Β' ΤΕΥΧΟΣ – ΚΕΦ. 4^ο

ΘΕΜΑ Α: Να συμπληρώσετε σωστά τις επόμενες προτάσεις:

1. Η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Bam*HI είναι:

5' G | GATCC 3'
3' CCTAG | G 5'

Η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Bcl*I είναι:

5' T | GATCA 3'
3' ACTAG | T 5'

Ένα γραμμικό μόριο DNA διαθέτει μοναδική θέση αναγνώρισης *Bam*HI και ένα άλλο μόριο επίσης γραμμικό, με την ίδια κατά τα άλλα, ακριβώς αλληλουχία διαθέτει μοναδική θέση *Bcl*I, στη θέση της *Bam*HI. Τα δυο μόρια πέπτονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση το καθένα. Τα προϊόντα της πέψης, αναμιγνύονται και προστίθεται το ένζυμο DNA δεσμάση. Στο τελικό μείγμα προστίθενται και οι δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Bcl*I.

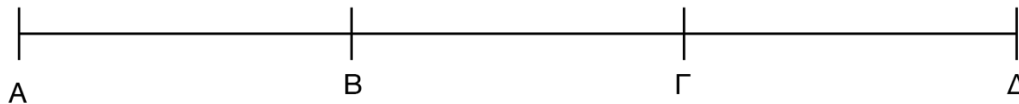
Δημιουργούνται:

- α. 4 διαφορετικά μόρια DNA
 - β. 2 διαφορετικά μόρια DNA
 - γ. 1 μόριο DNA
 - δ. 2 όμοια μόρια DNA
2. Στο παραπάνω μείγμα:
- α. δρουν και οι δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες πάντα
 - β. δρα μόνο η μια από τις δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες πάντα
 - γ. μπορεί να δράσει ή η μια ή άλλη περιοριστική ενδονουκλεάση
 - δ. μπορεί να μην δράσει καμιά από τις δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες.
3. Ποια από τις παρακάτω αλληλουχίες αποτελεί πιθανή θέση αναγνώρισης κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης;

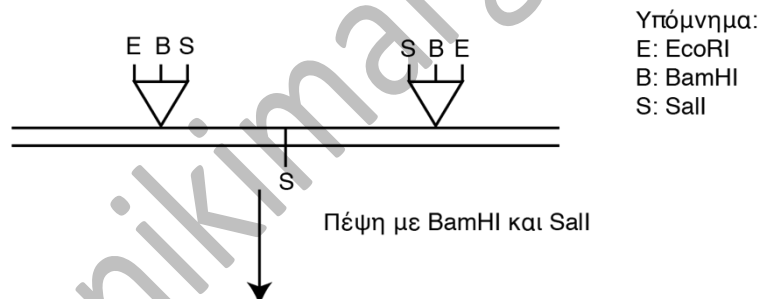
α.	5' A CTGC 3' 3' TGAC G 5'	γ.	5' G GATCA 3' 3' CCTAG T 5'
β.	5' T TAAA 3' 3' AAATT T 5'	δ.	5' G AATTC 3'

- 4. Μπορούμε να δημιουργήσουμε cDNA βιβλιοθήκη:**
- Για το γονίδιο της *EcoRI*,
 - Για το γονίδιο του tRNA της Αργινίνης των λευκοκυττάρων μας
 - Για το οπερόνιο της λακτόζης,
 - Για το γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV.
- 5. Ένας φορέας κλωνοποίησης διαθέτει εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (αντιβιοτικό) και το γονίδιο $LeuI^+$, που κωδικοποιεί το ένζυμο το οποίο απαιτείται για την σύνθεση του αμινοξέος Λευκίνη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο, για την επιλογή των μετασχηματισμένων ξενιστών με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.**
Ποιο γονότυπο και ποιο φαινότυπο, πρέπει να εμφανίζουν τα επιθυμητά κύτταρα ξενιστές;
- Πριν το μετασχηματισμό ήταν $LeuI^-$ και μετά τον μετασχηματισμό αυξάνονται σε περιβάλλον δίχως Λευκίνη.
 - Πριν το μετασχηματισμό ήταν $LeuI^+$ και μετά το μετασχηματισμό δεν αυξάνεται σε περιβάλλον δίχως Λευκίνη
 - Μετά το μετασχηματισμό ήταν $LeuI^-$ και αυξάνεται σε περιβάλλον δίχως Λευκίνη
 - Μετά το μετασχηματισμό ήταν $LeuI^+$ και δεν αυξάνεται σε περιβάλλον δίχως Λευκίνη
- 6. Το γονιδίωμα του ζυμομύκητα *S. cerevisiae* έχει μέγεθος 12×10^6 ζ.β. Εάν τα θραύσματα που προκύπτουν από την πέψη του με την *EcoRI* είναι της τάξεως 100-200 χιλιάδων ζ.β., τότε από πόσους κλώνους θα αποτελείται η βιβλιοθήκη του;**
- περίπου 60-120
 - περίπου 20-60
 - περίπου 700-1300
 - περίπου 220-350.
- 7. Η αντίστροφη μεταγραφάση *in vivo*:**
- δεν χρειάζεται 3'-OH άκρο για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό του cDNA.
 - χρειάζεται 3'-OH άκρο για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό. Αυτό το OH- προσφέρεται από ένα μόριο tRNA.
 - χρειάζεται 5'-PO₄³⁻ άκρο για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό. Αυτό προσφέρεται από ένα DNA πρωταρχικό τμήμα που προστίθεται *in vitro*.
 - είναι ένα ιικό ένζυμο που λειτουργεί, είτε υπάρχει είτε όχι πρωταρχικό τμήμα με 3' ή 5' ελεύθερο άκρο.
- 8. Το κεντρομερίδιο και τα άκρα των χρωμοσωμάτων, είναι περιοχές του DNA που:**
- δεν αντιπροσωπεύονται σε καμία βιβλιοθήκη ούτε ενισχύονται με PCR
 - δεν αντιπροσωπεύονται στην cDNA βιβλιοθήκη αλλά ενισχύονται με PCR
 - κλωνοποιούνται μονάχα στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη
 - αντιπροσωπεύονται σε κάθε βιβλιοθήκη αλλά και στα προϊόντα του PCR.

9. Στη μοριακή Βιολογία χρησιμοποιείται ο όρος πλήρης ή ολική πέψη του γονιδιώματος και ο όρος μερική πέψη. Στην μερική πέψη αναφερόμαστε μόνο όταν ένα ποσοστό των μορίων του DNA έχει κοπεί. Αυτό μπορεί να γίνει εφικτό όταν έχει γίνει προσθήκη μικρής ποσότητας περιοριστικών ενζύμων σε σχέση με το πλήθος των μορίων DNA που πρόκειται να κοπεί. Δίνεται το μόριο DNA:



- α. κατά την ολική πέψη θα προκύψουν 3 διαφορετικά θραύσματα ενώ κατά την μερική 6 διαφορετικά.
 β. κατά την ολική πέψη θα προκύψουν 2 διαφορετικά θραύσματα ενώ κατά την μερική 7 διαφορετικά.
 γ. κατά την ολική πέψη θα προκύψει 1 μόνο θραύσμα ενώ κατά την μερική 8 διαφορετικά.
 δ. κατά την ολική πέψη θα προκύψουν 3 διαφορετικά θραύσματα ενώ κατά την μερική 7 διαφορετικά.
10. Δίνεται το γονιδίωμα του φάγου λΕΜΒL4 (μήκους περίπου 44.000 ζ.β.) που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης για τη δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.



Σημείωση: Αν και το σχήμα δεν είναι υπό κλίμακα, θεωρούμε ότι οι πιο κοντινές θέσεις από αυτές που παρουσιάζονται είναι παρατηρήσιμες σε πήκτωμα αγαρόζης.

Προκύπτουν:

- α. 5 θραύσματα
 β. 6 θραύσματα
 γ. 7 θραύσματα
 δ. 2 θραύσματα.

11. Στη στήλη II του παρακάτω πίνακα, εμφανίζονται οι πιθανές λειτουργίες ενός πλασμιδικού φορέα κλωνοποίησης και στην στήλη I εμφανίζονται οι ιδιότητες του. Αντιστοιχήστε τις ιδιότητες με τις λειτουργίες.

Στήλη I

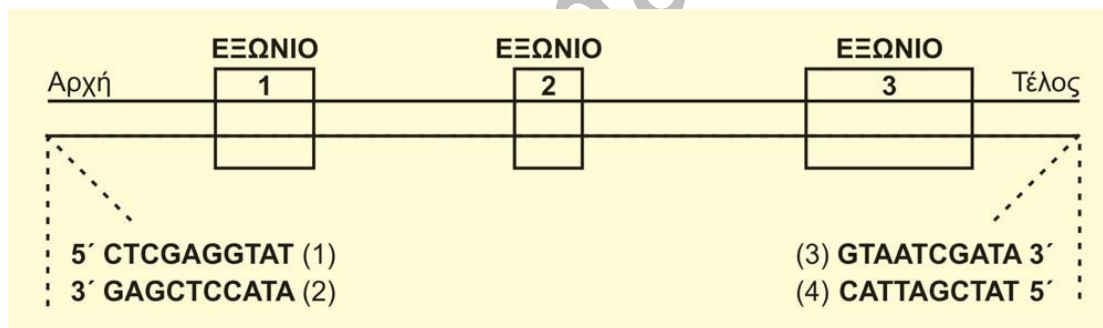
- α. Θέση Περιορισμού
- β. Θέση Έναρξης της Αντιγραφής
- γ. Υποκινητής
- δ. Γονίδιο Ανθεκτικότητας σε ορισμένο αντιβιοτικό

Στήλη II

- i. Για την έκφραση του ετερόλογου γονιδίου
- ii. Επιτρέπει την ένθεση του ετερόλογου γονιδίου
- iii. Κωδικοποιεί για ένζυμο που κόβει DNA
- iv. Επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων ξενιστών
- v. Επιτρέπει τον διπλασιασμό του πλασμιδίου
- vi. Επιτρέπει τον διπλασιασμό του ξενιστή
- vii. Θέση σύνδεσης του ριβοσώματος

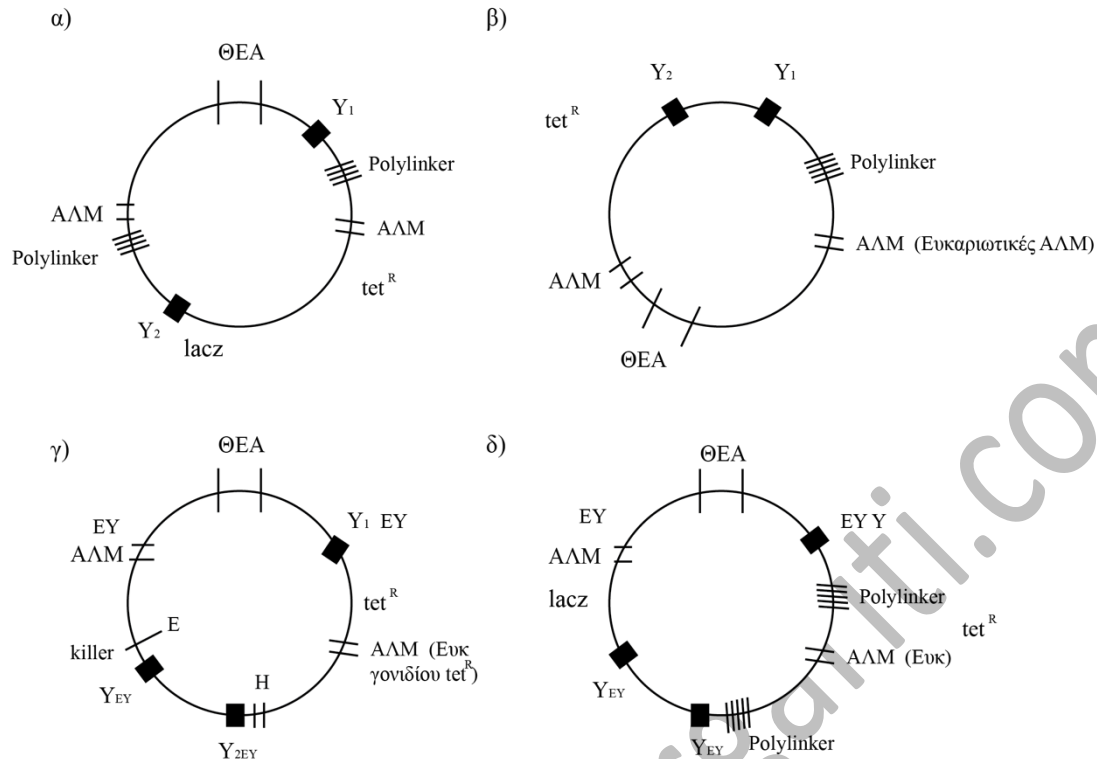
12. Διαθέτετε το παρακάτω γονίδιο: Το οποίο θέλετε να ενισχύσετε *in vitro*, ποιες θα είναι οι τεχνητές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που θα σχεδιάζατε;

- α. 1 και 3. β. 2 και 4. γ. 1 και 4. δ. 2 και 3.



13. Ποιο από τα παρακάτω πλασμίδια είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης σε ζυμομύκητα, για μια cDNA βιβλιοθήκη του αλόγου;

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B



nikimargariti.com

Υπόμνημα: όπου:

Y = Υποκινητής, **ΑΛΜ** = Αλληλουχίες Λήξης της Μεταγραφής, **ΘΕΑ** = Θέση Έναρξης της Αντιγραφής, **Tet^R** = γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, **Killer** = γονίδιο που κωδικοποιεί για μια τοξική πρωτεΐνη για τον ξενιστή, **lacZ** = γονίδιο που κωδικοποιεί για την β-γαλακτοζιδαση, **Polylinker** = πολλές διαφορετικές μοναδικές διαδοχικές αλληλεπικαλυπτόμενες θέσεις περιορισμού.

Κάθε polylinker εδώ είναι διαφορετικός από τους άλλους.

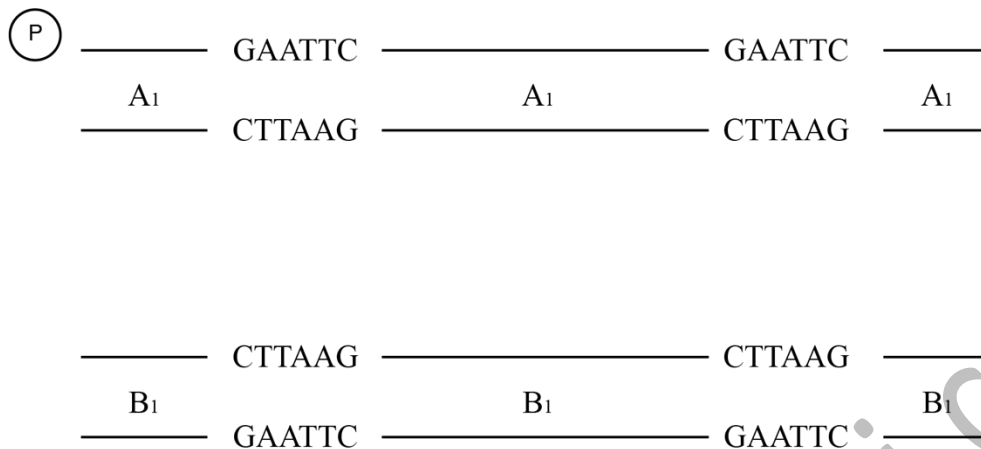
1^ο πλασμίδιο: οι υποκινητές είναι οι φυσικοί υποκινητές των αναφερομένων γονιδίων.

2^ο πλασμίδιο: ο πρώτος υποκινητής είναι γονιδίου της ζύμης, ο δεύτερος υποκινητής είναι ο φυσικός υποκινητής του γονιδίου lacZ.

3^ο πλασμίδιο: όλοι οι υποκινητές και οι ΑΛΜ ανήκουν στη ζύμη.

4^ο πλασμίδιο: οι ΑΛΜ στα δεξιά ανήκουν στο γονίδιο της ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη.

14. Δίνονται τα παρακάτω δύο γραμμικά μόρια DNA:



Σημείωση: Τα τμήματα που φαίνονται στο σχήμα εκατέρωθεν και ενδιάμεσα των θέσεων περιορισμού είναι με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: $\text{A}_1\text{-A}_2\text{-A}_3$ και $\text{B}_1\text{-B}_2\text{-B}_3$.

Τα μόρια DNA πέπτονται από δύο διαφορετικές Π.Ε την *EcoRI* και ένα περιοριστικό ένζυμο που αναγνωρίζει την αλληλουχία:



και κόβει μεταξύ του C και T σε κάθε κλώνο.

Εν συνεχεία τα δύο αυτά κομμένα μόρια αναμειγνύονται παρουσία του ενζύμου DNA δεσμάση. Μπορούν να δημιουργηθούν οι συνδυασμοί:

- α. $\text{A}_1 + \text{A}_3, \text{B}_1 + \text{B}_3, \text{A}_2 + \text{B}_2$
- β. $\text{A}_1 + \text{B}_3, \text{B}_1 + \text{A}_3, \text{A}_2 + \text{B}_2$
- γ. $\text{A}_1 + \text{B}_1, \text{A}_3 + \text{B}_3, \text{A}_2 + \text{B}_2$
- δ. $\text{A}_1 + \text{A}_3, \text{B}_1 + \text{B}_3$

15. Δίνεται η παρακάτω αλληλουχία που περιέχει μικρό γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί μικρό ολιγοπεπτίδιο. Με δεδομένο ότι ο φορέας κλωνοποίησης που θα χρησιμοποιηθεί φέρει μοναδική θέση ανασυνδυασμού για περιοριστική ενδονουκλεάση που αφήνει μονόκλωνα άκρα και είναι όμοια με αυτή που θα χρησιμοποιηθεί για την πέψη του μορίου DNA που δίνεται, να προσδιοριστεί η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης.

ATCGACTGCTCTAGAAGCTTATGCCAGGTATGTGAAAGCTTATCGACTGAACCTT
 TAGCTGACGAGATCTTCGAATACGGTCCATACACTTTCGAATAGCTGACTTGGAA

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

α. 5' ATCGAC
TAGCTG

β. CCAGG 5'
GGTCC

γ. 5' AAGCTT
TTCGAA

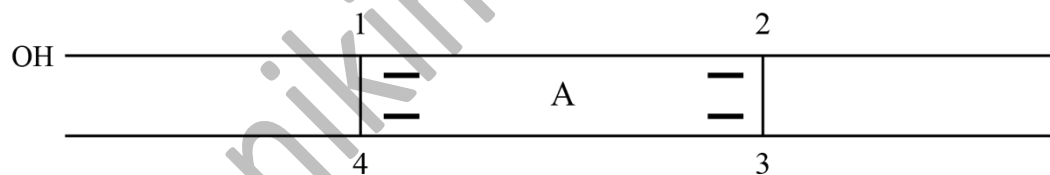
δ. δεν υπάρχει κάποια κατάλληλη θέση περιορισμού.

16. Ερωτήσεις Σωστού – Λάθους:

1. Για να κατασκευαστεί μια cDNA βιβλιοθήκη απομονώνεται το ολικό mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο που θέλουμε να μελετήσουμε.
2. Κατά την πέψη ενός κυκλικού μορίου DNA από την *EcoRI*, ανά θέση περιορισμού, σπάζουν περισσότεροι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί, από ότι ενός γραμμικού μορίου DNA, με τον ίδιο αριθμό θραυσμάτων.

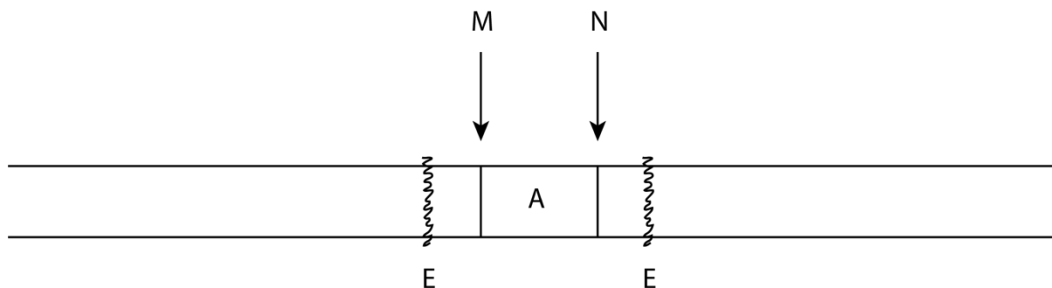
Δίνεται ότι το κάθε μόριο διαθέτει 4 θέσεις αναγνώρισης της *EcoRI*.

3. Στο παρακάτω σχήμα, για την ενίσχυση του τμήματος A με PCR, τα κατάλληλα τεχνητά ολιγονουκλεοτίδια είναι το ζευγάρι 1-3.



nikimargariti.com

17. Δίνεται το παρακάτω σχήμα που αναπαριστά ένα χρωμόσωμα. Το τμήμα A θέλουμε να κλωνοποιηθεί *in vitro*. Η αντιγραφή τελειώνει κάθε φορά στο τέλος του μητρικού κλώνου που λειτουργεί ως καλούπι. Μετά από πόσους κύκλους αντιγραφής θα υπάρχει στον δοκιμαστικό σωλήνα για πρώτη φορά το επιθυμητό τμήμα A.



nikimargariti.com

- α. $N_0 \times 2^k$
- β. 2^k
- γ. k
- δ. 2
- ε. 3

18. Η θέση E που φαίνεται στο σχήμα έχει την αλληλουχία:

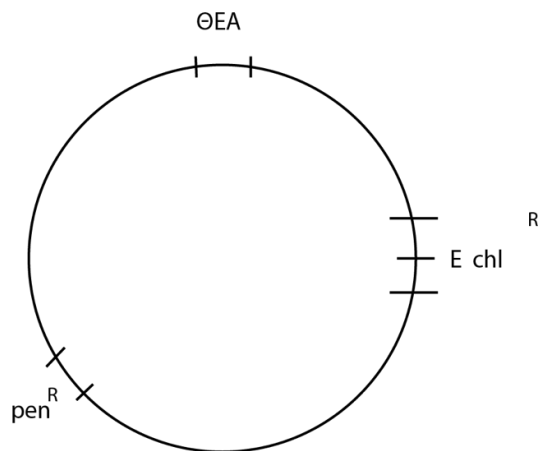


I. Υπάρχει η περιοριστική ενδονουκλεάση *Mdl*, η οποία αναγνωρίζει την παραπάνω αλληλουχία οκτώ νουκλεοτιδίων και πέμπει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς 5'-G-G-3' καθώς και τους 14 δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των παρεμβαλλόμενων ζευγών βάσεων. Η ενδονουκλεάση *Mdl* θεωρούμε ότι δρα άριστα στις ίδιες ακριβώς συνθήκες που δρα άριστα και η *EcoRI* ενώ έχει και την ίδια συγγένεια με την θέση περιορισμού της, όση έχει και η *EcoRI*.

Πόσα διαφορετικά τμήματα που περιέχουν το γονίδιο A προκύπτουν μετά την πέψη του παραπάνω χρωμοσώματος με τα ένζυμα *EcoRI* και *Mdl*, ταυτόχρονα και ενώ το μόριο DNA, του χρωμοσώματος βρίσκεται σε 100 χιλιάδες αντίγραφα κατά την αντίδραση πέψης;

- α. 100.000
- β. 2
- γ. 300.000
- δ. 4
- ε. Κανένα.

II. Το παρακάτω πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε ως φορέας κλωνοποίησης του τμήματος A. Πόσα διαφορετικά ανασυνδυασμένα πλασμίδια μπορούν να προκύψουν;



nikimargariti.com

- α. 1 ή 4 β. 2 ή 3 γ. 3 ή 4 δ. 5 ή κανένα ε. 1 ή κανένα.

19. Δεν μπορούμε να δημιουργήσουμε cDNA βιβλιοθήκη, για:

- α. τα γονίδια του ιού HIV (ρετροϊός)
- β. τα γονίδια του λ-φάγου
- γ. το *Pisum sativum*
- δ. τη ζύμη αρτοποιίας

20. Για να δημιουργήσουμε cDNA βιβλιοθήκη πρέπει:

- α. να χρησιμοποιήσουμε και S₁ νουκλεάση, τρανσφεράση και DNA δεσμάση
- β. να χρησιμοποιήσουμε μόνο περιοριστική ενδονουκλεάση και DNA δεσμάση
- γ. να χρησιμοποιήσουμε απαραίτητως πλασμίδιο ως φορέα κλωνοποίησης
- δ. να χρησιμοποιήσουμε το γονιδιωματικό DNA του οργανισμού δότη

21. Η cDNA βιβλιοθήκη:

- α. Δημιουργείται μόνο με φορέα κλωνοποίησης πλασμίδιο για να είναι και βιβλιοθήκη έκφρασης
- β. Δημιουργείται και με φορέα κλωνοποίησης πλασμίδιο και με φορέα κλωνοποίησης DNA λ φαγού, αφού σε κάθε περίπτωση μπορεί να είναι και βιβλιοθήκη έκφρασης
- γ. Διαθέτει πάντα και γονίδια οργανιδίων
- δ. Δημιουργείται αποκλειστικά από μόρια του ολικού mRNA του κυττάρου

ΘΕΜΑ Β: Να απαντήσετε στις παρακάτω ερωτήσεις:

1. Διαθέτετε το γονίδιο Ψ_2 και θέλετε να το ενθέσετε εντός του φορέα κλωνοποίησης B_2 , οποίος διαθέτει τις εξής θέσεις περιορισμού (οι αλληλουχίες είναι δίκλωνες αλλά δίνονται μόνο ο ένας από τους δυο κλώνους):

StuI : 5' AGG|CCT_{3'}

SalI: 5'G|TCGAC_{3'}

Ψ_2 : 5' TCCGGCGGAATTCCAAGGCCT[ATG...κωδική περιοχή]CGTCGACTCCGGC 3'
 3' AGGCCGCCTTAAGGTTCCGGA[TAC...κωδική περιοχή]GCAGCTGAGGCCG 5'

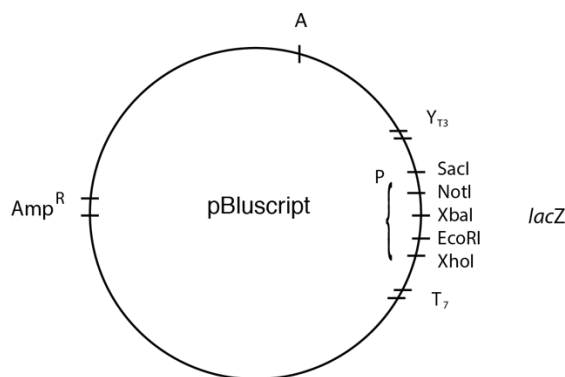
Τμήμα του πλασμιδιακού φορέα B_2 :

_____ Διεύθυνσης μεταγραφής > _____ *StuI* _____ *SalI* _____ *EcoRI* _____

- α. Υπάρχουν δυο διαφορετικοί τρόποι ένθεσης του γονιδίου Ψ_2 (κωδική περιοχή του) στο πλασμίδιο B_2 . Ποιο είναι αυτοί;
 Ποιο περιοριστικό ένζυμο θα χρησιμοποιήσετε για να πέψετε το πλασμίδιο και το γονίδιο, ώστε να απομονώσετε μόνο την κωδική περιοχή του γονιδίου;
 - β. Ποιος από τους δυο αυτούς τρόπους είναι ο κατάλληλος για να είναι δυνατή η έκφραση του γονιδίου Ψ_2 στο κύτταρο ξενιστή;
 Αιτιολογήστε την απάντησή σας.
2. Εξηγήστε τη διαφορά μεταξύ ενός ανιχνευτή και ενός τεχνητού ολιγονουκλεοτιδίου, που λειτουργεί ως εκκινητική αλληλουχία στο PCR.
 3. Τοποθετήστε τις παρακάτω προτάσεις στη σωστή σειρά, ώστε να παράγεται λειτουργική ανθρώπινη ινσουλίνη από cDNA βιβλιοθήκη λ-φάγου (λZAPII). Στο γονιδίωμα του λ-φάγου αυτού, έχει ενθεθεί το πλασμίδιο φορέας κλωνοποίησης pBluescript, χωρίς να έχουν απομακρυνθεί τα γονίδια του λυσιγόνου κύκλου ζωής του φάγου.

Το πλασμίδιο αυτό έχει τις εξής αλληλουχίες:

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

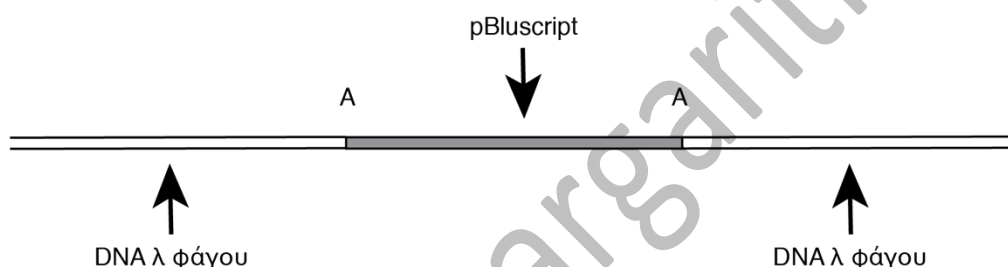


Όπου: P=Polylinker με θέσεις περιορισμού *SacI*, *NotI*, *XbaI*, *SpeI*, *EcoRI*, *XhoI*.



Η φορά του βέλους δεικνύει τη σειρά των περιοριστικών θέσεων του πλασμιδίου από πάνω προς τα κάτω. Ο Y_{T3} και Y_{T7} είναι Υποκινητές ισχυροί, διότι είναι ικοί.

Το γονιδίωμα του φάγου είναι:



1. Επιλογή βακτηριακών αποικιών ανθεκτικών σε Amp και άχρωμες.
 2. Ενζυμική *in vitro* μετα-μεταφραστική τροποποίηση της προϊνσουλίνης.
 3. Παραγωγή από τα βακτήρια της προϊνσουλίνης.
 4. Ανασυνδυασμός με δεσμάση του γονιδιώματος του ανασυνδυασμένου λ-φάγου με το ετερόλογο dscDNA.
 5. Δημιουργία χιμαιρικού ιικού DNA, με τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης.
 6. Μόλυνση βακτηριακής υγρής καλλιέργειας με ιούς και κατόπιν επίστρωση σε τρυβλίο.
 7. Καλλιέργεια βακτηρίων που παράγουν προϊνσουλίνη σε βιομηχανικό επίπεδο.
 8. Δημιουργία cDNA προϊνσουλίνης με αντίστροφη μεταγραφάση από παγκρεατικά κύτταρα.
 9. Ανάπτυξη αποικιών cDNA βιβλιοθήκης ανθρώπινης ινσουλίνης σε ιικό DNA σε βακτήρια.
 10. Απομόνωση ολικού ώριμου mRNA από παγκρεατικά κύτταρα.
4. Εξηγήστε ποια είναι η χρησιμότητα της παραμονής των γονιδίων του λυσιγόνου κύκλου ζωής του φάγου, στο γονιδίωμα του φαγικού φορέα κλωνοποίησης.
 5. Εξηγήστε για ποιο λόγο το dscDNA της ινσουλίνης εκφράζεται με οποιοδήποτε τρόπο και αν ενθεθεί στον Polylinker του pBluescript στο ιικό γονιδίωμα.
 6. Σε μία άσκηση ενός πανεπιστημιακού εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, μία ομάδα φοιτητών προσπαθεί να δημιουργήσει τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη του βακτηρίου *Lactobacillus sp.*

Οι φοιτητές διαθέτουν ένα φορέα κλωνοποίησης πλασμίδιο, που φέρει γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά Στρεπτομυκίνη (Str^R) και Αμπικιλίνη (Amp^R). Το τελευταίο φέρει και τη μοναδική θέση ανασυνδυασμού. Τα βακτήρια-ξενιστές είναι ένα κατάλληλο στέλεχος *E.coli*.

Στην εργασία τους οι φοιτητές έγραψαν:

«Μετά τον ανασυνδυασμό των φορέων κλωνοποίησης από τα θραύσματα του DNA του *Lactobacillus sp.*, επακολούθησε ο μετασχηματισμός των βακτηρίων-ξενιστών. Μετά τον μετασχηματισμό, υπήρχαν 3 κατηγορίες βακτηρίων *E.coli*.

α) Τα μη μετασχηματισμένα που δεν φέρουν ανθεκτικότητα ούτε σε Str , ούτε σε Amp .

β) Τα μετασχηματισμένα

1. Με το μη ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης που έχουν ανθεκτικότητα και στα δύο αντιβιοτικά.
2. Με τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης που φέρουν ανθεκτικότητα μόνο στο αντιβιοτικό Str .

Τα ζητούμενα βακτήρια *E.coli* είναι τα μετασχηματισμένα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Ο διαχωρισμός των βακτηρίων που αποτελούν τη βιβλιοθήκη από τα υπόλοιπα κύτταρα *E.coli* θα γίνει ως εξής:

Μετά τον μετασχηματισμό, στην υγρή βακτηριακή καλλιέργεια των ξενιστών προστέθηκε Str , οπότε τα μόνα βακτήρια που επέζησαν ήταν τα μετασχηματισμένα. Από αυτή την υγρή καλλιέργεια επιλέγουμε κάποια βακτήρια και τα καλλιεργούμε μεμονωμένα σε υγρό θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια χωρίζουμε τους απογόνους σε δύο ίσα μέρη και σε κάποια βακτήρια από τα δύο αυτά μέρη, χορηγούμε αμπικιλίνη. Αν πεθάνουν κάποια, συμπεραίνουμε ότι προέρχονται από την ομάδα που μας ενδιαφέρει, δηλαδή τα μετασχηματισμένα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.»

Εξηγήστε γιατί οι φοιτητές μηδενίστηκαν από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

7. Εργάζεστε σε μία φαρμακευτική βιομηχανία και ενδιαφέρεστε να δημιουργήσετε το εμβόλιο κατά ενός νέου ιού με γενετικό υλικό δίκλωνο DNA. Ξεκινάτε ψάχνοντας στο γονιδίωμα του ιού, ώστε να βρείτε τα/το γονίδιο που κωδικοποιεί για μία κατάλληλη πρωτεΐνη αντιγονικό καθοριστή του ιού.

Εξηγήστε με συντομία το είδος της βιβλιοθήκης του ιικού DNA που θα δημιουργήσετε, γονιδιωματική ή cDNA;

8. Ένα τμήμα χρωμοσωμικού DNA του μύκητα *Aspergillus niger* επωάζεται με $EcoRI$ αρχικά και προκύπτουν δυο θραύσματα, μήκους 1.000 και 3.000 ζ.β.

Ένα όμοιο τμήμα επωάστηκε με $PstI$ και αποδίδει πάλι δύο θραύσματα, μήκους 1500 και 2500 ζ.β.

Όταν ένα όμοιο τμήμα DNA επωάστηκε με $EcoRI$ και $PstI$ ταυτοχρόνως, αποδόθηκαν τρία θραύσματα μήκους 500 ζ.β., 1.000 ζ.β. και 2.500 ζ.β.

Σχεδιάστε ένα απλό σχήμα που να παρουσιάζει τις θέσεις αναγνώρισης των δύο ενζύμων και την σχετική τους απόσταση, μεταξύ τους.

9. Γνωρίζουμε ότι κάθε αποικία της βιβλιοθήκης αποτελείται από 1 δις κύτταρα και κάθε κύτταρο, κλωνοποιεί τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης (μεγέθους 4.000 ζ.β.) τρεις φορές. Ακόμη γνωρίζουμε ότι μια φαγική πλάκα αποτελείται από 3×10^{11} φαγούς σε μια βιβλιοθήκη, με φορέα κλωνοποίησης DNA λ-φάγου.

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

Να απαντήσετε σε ποια βιβλιοθήκη, από τις παρακάτω, θα βρούμε περισσότερα αντίγραφα της μεταφράσιμης περιοχής του ανθρώπινου γονιδίου του κολλαγόνου (COL I), με μήκος περίπου 100.000 ζεύγη βάσεων στο γονιδίωμα μας;

Το γονίδιο αυτό διαθέτει 52 εξώνια και για την πλασμιδιακή βιβλιοθήκη χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*. Το γονίδιο όταν εκφράζεται απαντάται σε μέγιστη ποσότητα 100 αντίγραφα μορίων mRNA του/ κύτταρο.

Η *EcoRI* πέπτει το γονίδιο, σε 21 τμήματα διάφορων μεγεθών το καθένα.

Γονιδιωματική βιβλιοθήκη του γαμέτη μας.

Γονιδιωματική βιβλιοθήκη του ιστού που εκφράζει το γονίδιο αυτό.

Γονιδιωματική βιβλιοθήκη ενός ιστού που δεν εκφράζει αυτό το γονίδιο.

cDNA βιβλιοθήκη από ιστό που εκφράζει το γονίδιο.

cDNA βιβλιοθήκη από ιστό που δεν εκφράζει το γονίδιο.

cDNA βιβλιοθήκη γαμέτη μας.

Γονιδιωματική βιβλιοθήκη γαμέτη μας, με φορέα κλωνοποίησης DNA λ-φάγου.

- i. Να τοποθετηθούν οι παραπάνω βιβλιοθήκες με αύξουσα σειρά, σε πλήθος αντιγράφων του μελετώμενου γονιδίου. Να αιτιολογηθεί με συντομία η απάντησή σας.
- ii. Σε πόσες αποικίες ή φαγικές πλάκες θα βρίσκεται το γονίδιο σε κάθε βιβλιοθήκη;
- iii. Πόσα εσώνια περιέχει το γονίδιο του ανθρώπινου κολλαγόνου;
- iv. Πόσα μόρια νερού ξοδεύτηκαν από το κύτταρο για την αφαίρεση των εσωνίων του; Ποιο ήταν το ισοζύγιο του νερού για το κύτταρο, κατά την δημιουργία του μορίου του ώριμου mRNA του γονιδίου αυτού.
- v. Πόσες φορές κόπηκε το γονίδιο του κολλαγόνου κατά την δημιουργία των παραπάνω βιβλιοθηκών;

10. Δίνεται το παρακάτω τμήμα βακτηριακού DNA που κωδικοποιεί για ένα ολιγοπεπτίδιο

Αλυσίδα 1: GTTGAATTCTTAGCTTAAGTCGGGCATGAATTCTC

Αλυσίδα 2: CAACTTAAGAATCGAATTCAGCCCGTACTTAAGAG

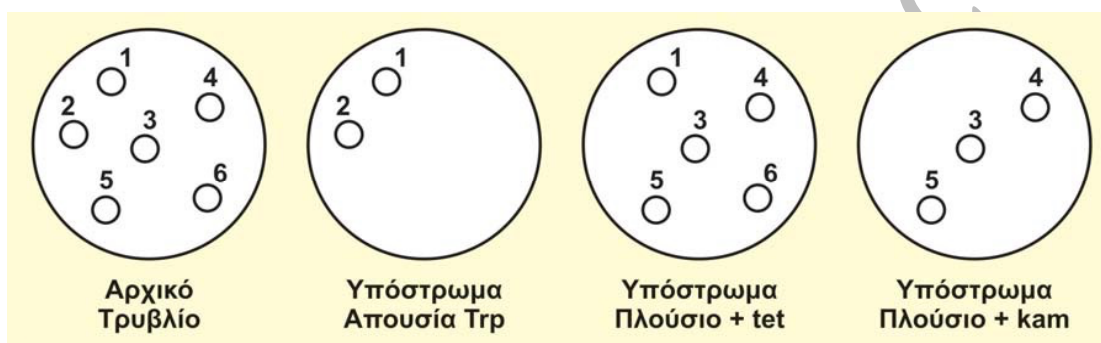
α. Να προσδιορίσετε τα 5' και 3' άκρα των αλυσίδων. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

β. Το παραπάνω γονίδιο θέλουμε να το κλωνοποιήσουμε *in vitro*. Ποιο από τα παρακάτω πρωταρχικά τμήματα είναι τα κατάλληλα για αυτή την κλωνοποίηση; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

- i. 5' TTAAGTCTA 3'
- ii. 5' GAGAATTC 3'
- iii. 5' GTTGAATT 3'
- iv. 3' CAACTTAA 5'
- v. 3' GTTGAATT 5'
- vi. 3' CTCTTAAG 5'

11. Δημιουργήσατε την γονιδιωματική βιβλιοθήκη του *E.coli*. Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήσατε περιλαμβάνει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε tet^R και ένα άλλο σε kam^R . Το γονίδιο kam^R διαθέτει μοναδική θέση $BamHI$. Αναζητάτε να εντοπίσετε την αποικία με ακέραιο το οπερόνιο βιοσύνθεσης της Trp. Ως ξενιστής χρησιμοποιήθηκε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος *E.coli*, το οποίο αδυνατεί να αυξηθεί απουσία τρυπτοφάνης.

Η υγρή βακτηριακή καλλιέργεια που μετασχηματίστηκε, αρχικά αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υλικό (στέρεο) πλούσιο σε όλα τα θρεπτικά συστατικά. Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν τα παρακάτω αντίγραφα τρυβλίου.



Να απαντήσετε τις παρακάτω ερωτήσεις:

- Ποια/ες αποικία/ες διαθέτουν τον μη ανασυνδυασμένο φορέα;
- Ποια/ες αποικία/ες διαθέτουν τον ανασυνδυασμένο φορέα;
- Ποια/ες αποικία/ες θα επέλεγες για να μελετήσεις περαιτέρω το οπερόνιο Trp;
- Εξηγήστε την μη αναμενομένη εμφάνιση των δυο αποικιών, στο δεύτερο κατά σειρά τρυβλίο.

ΘΕΜΑ Γ: Να απαντήσετε στις παρακάτω ερωτήσεις:

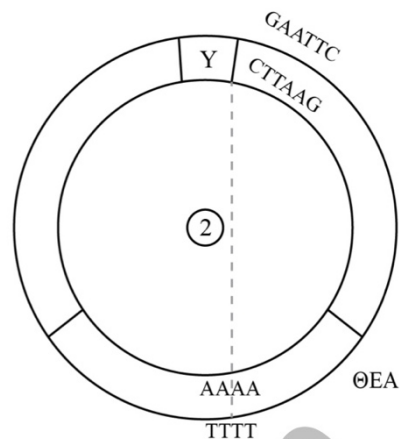
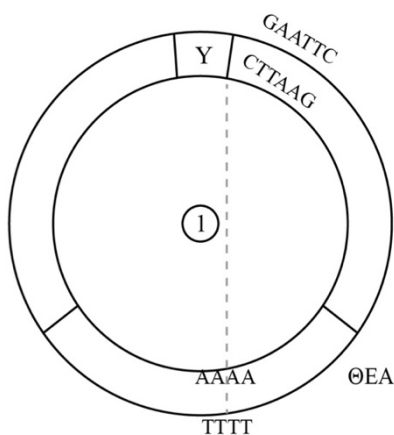
- Εξηγήστε πως θα μπορούσαμε να παράξουμε την αιμοσφαιρίνη Α, που αποτελείται από 2α και 2β πολυπεπτιδικές αλυσίδες, από βακτήρια με την τεχνολογία της cDNA βιβλιοθήκης.
- Δίνεται το παρακάτω υποθετικό γονίδιο του λ φάγου, που κωδικοποιεί για ένα ολιγοπεπτίδιο. Το γονίδιο αυτό θέλουμε να το κλωνοποιήσουμε σε ζυμομύκητα, με σκοπό την παραγωγή του ολιγοπεπτιδίου που κωδικοποιεί.

...Y...ATTGCGTAATTAAAATGCCAGTTCATGAATAATTAAAGCGC...

...Y...TAACGCATTAATTTACGGGTCAAGTACTTATTAATTCGCG...

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

Για την κλωνοποίηση του συγκεκριμένου γονιδίου θα επιλέξετε μεταξύ των παρακάτω φορέων κλωνοποίησης.



nikimargariti.com

Στο πλασμίδιο 1, ο εσωτερικός μητρικός κλώνος όταν αντιγράφεται στη διχάλα που εξελίσσεται προς τα αριστερά (όπως φαίνεται στο δοθέν σχήμα του πλασμιδίου), ο νεοσυντιθέμενος συμπληρωματικός κλώνος συντίθεται συνεχώς.

Στο πλασμίδιο 2, ο αντίστοιχος μητρικός κλώνος στη διχάλα που εξελίσσεται προς τα δεξιά (όπως φαίνεται στο δοθέν σχήμα του πλασμιδίου), ο νεοσυντιθέμενος συμπληρωματικός κλώνος συντίθεται συνεχώς.

Τα πλασμίδια έχουν μέγεθος 2.000 ζευγών βάσεων το καθένα και ισχύει ότι, το πρώτο νουκλεοτίδιο του μητρικού κλώνου που αντιγράφεται συνεχώς σε κάθε πλασμίδιο, βρίσκεται για το πρώτο πλασμίδιο 1001 νουκλεοτίδια και για το δεύτερο πλασμίδιο ακριβώς 1000 νουκλεοτίδια, από το πρώτο νουκλεοτίδιο, αμέσως μετά τον υποκινητή του γονιδίου που δίνεται.

α. Ποια είναι κωδική και ποια μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου του λ-φάγου;

β. Ποιο ολιγοπεπτίδιο κωδικοποιεί αυτό το γονίδιο;

γ. Ποιο από τα πλασμίδια θα χρησιμοποιήσετε για την κλωνοποίηση του γονιδίου; Για ποιο λόγο θα χρειαστείτε δυο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα για τον ανασυνδυασμό;

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

δ. Μετά την επιτυχή έκφραση του γονιδίου στα κύτταρα ξενιστές, απομονώθηκαν δυο διαφορετικά ολιγοπεπτίδια, που παράγονται από τα μετασχηματισμένα κύτταρα ζυμών με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Τα δυο αυτά ολιγοπεπτίδια παράγονται από διαφορετικά μετασχηματισμένα μυκητιακά κύτταρα. Δηλαδή το ίδιο κύτταρο δεν παράγει και τα δυο ολιγοπεπτίδια. Και τα δυο είναι προϊόντα έκφρασης του ετερόλογου γονιδίου που ανασυνδυάστηκε με τον φορέα κλωνοποίησης.

Εξηγήστε το φαινόμενο.

ε. Είναι δυνατόν το κύτταρο ζύμης ξενιστής, να παράγει το λειτουργικό ολιγοπεπτίδιο του λ-φάγου, δεδομένου ότι ο λ-φάγος προσβάλλει βακτήρια;

3. Δίνονται τα παρακάτω τμήματα ολικής πέψης ενός ιικού γονιδιώματος που είναι με μορφή dsDNA.

AC=28 kbp, AD=25 kbp, BC=20 kbp και BD=33 kbp
όπου kbp=χιλιάδες ζεύγη βάσεων.

Να σχεδιαστεί ο περιοριστικός χάρτης του μορίου.

4. Οι θέσεις περιορισμού της *Bam*HI είναι: $5' \overline{\text{G}}\text{GATCC} 3'$ ενώ η θέση περιορισμού

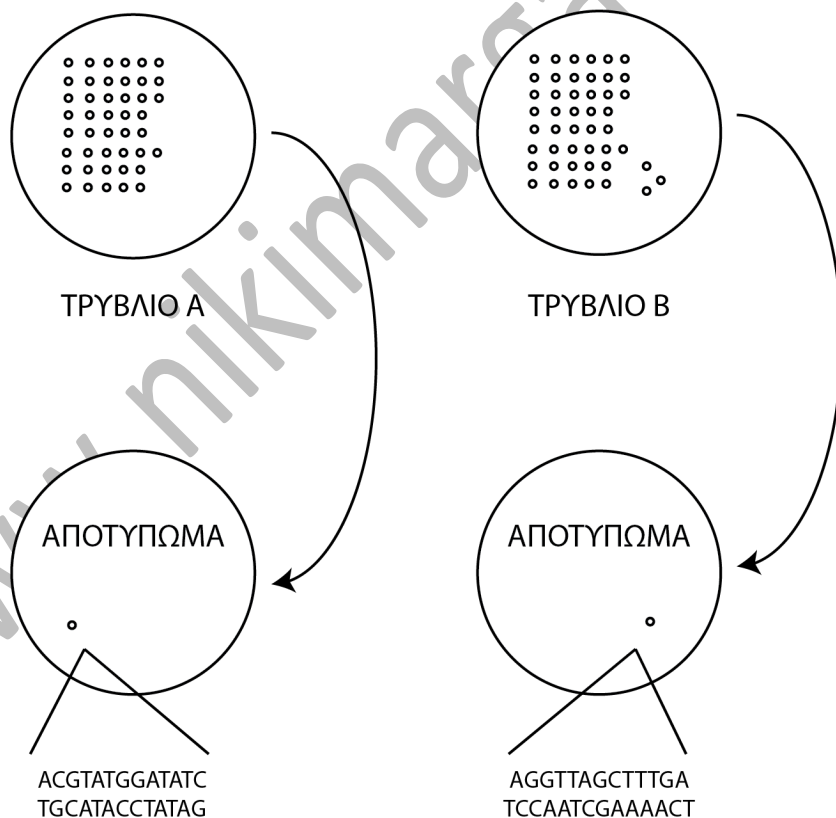
της *Pst*I είναι: $5' \overline{\text{CTGCA}}\text{G} 3'$
 $\text{GACGTC} 3'$

Για ποιο λόγο το πλασμίδιο φορέας κλωνοποίησης για την cDNA βιβλιοθήκη φέρει θέση *Pst*I και όχι *Bam*HI ή οποιαδήποτε άλλη ως θέση ένθεσης του ετερόλογου *dscDNA*;

5. Δίνεται ο ανιχνευτής **AGCTAAGCATTGA** και οι βιβλιοθήκες δύο διαφορετικών ειδών οργανισμών. Ο ανιχνευτής προέρχεται από το είδος φυτού *Solanum tuberosum*.

Ποιο από τα δύο φυτά που εξετάζονται, είναι το *Solanum lycopersicum* και ποιο το *Lens culinaris*;

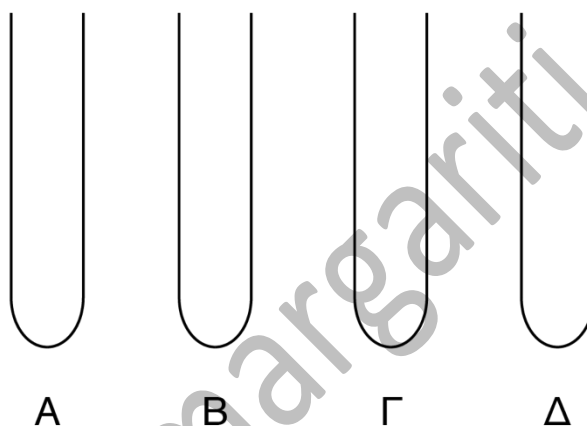
Αιτιολογήστε την απάντησή σας.



6. Από μία cDNA βιβλιοθήκη ενός ανθρώπου που νοσεί με οικογενή υπερχοληστερολαιμία, απομονώθηκε το προς αναζήτηση μόριο dscDNA και αφού υπέστη ολική πέψη, προσδιορίστηκε η αλληλουχία του ενός κλώνου του, με τη μέθοδο της λήξης πολυμερισμού με διδεοξυ - νουκλεοτίδια. Εδώ αναλύουμε την αλληλουχία ολόκληρου του πρώτου εξωνίου, δίχως την 5' αμετάφραστη περιοχή.

Μέθοδος λήξης πολυμερισμού με διδεοξυ - νουκλεοτίδια.

Σε 4 διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν μόρια μονόκλωνου DNA (ίδια) από το dscDNA και συγκεκριμένα η μη κωδική αλυσίδα, που απομονώθηκαν από τη βιβλιοθήκη.



Στο σωλήνα Α προστίθενται πολλά μόρια μονόκλωνου DNA (μη κωδικής αλυσίδας του γονίδιου) και πολλά ελεύθερα δεοξυνουκλεοτίδια, κάποια από τα οποία είναι διδεοξυ αδενίνες.

Στο σωλήνα Β, ομοίως με τον δοκιμαστικό σωλήνα Α αλλά υπάρχουν διδεοξυ νουκλεοτίδια με τις βάσεις Α και Γ (πουρίνες).

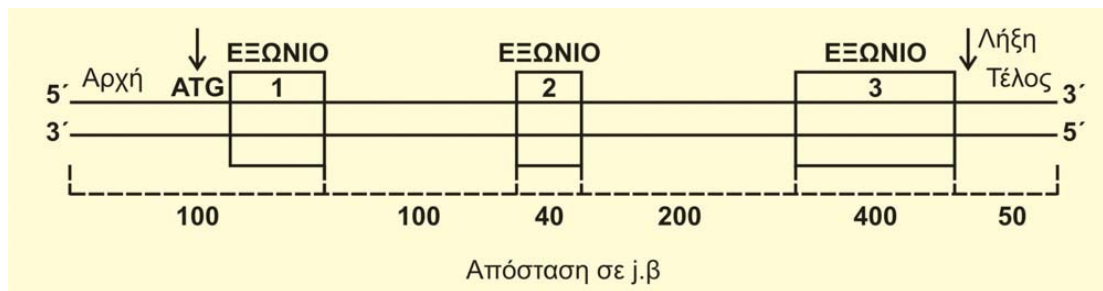
Στο σωλήνα Γ, ομοίως με τον δοκιμαστικό σωλήνα Α αλλά υπάρχουν διδεοξυ νουκλεοτίδια με τις πυριμιδίνες Τ, C.

Στο σωλήνα Δ, ομοίως με τον δοκιμαστικό σωλήνα Α αλλά υπάρχουν διδεοξυ νουκλεοτίδια με τις βάσεις C.

Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα υπάρχουν μόρια DNA πολυμερασών και ένα είδος (σε πολλά αντίγραφα) ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA, που λειτουργεί ως πρωταρχικό τμήμα για την πολυμεράση.

Στη συνέχεια γίνεται ηλεκτροφόρηση σε gel ακρυλαμίδης και έκθεση σε φιλμ, για τα προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων πολυμερισμού των παραπάνω δοκιμαστικών σωλήνων.

Δίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρακάτω:



- I. Με τη χρήση ραδιοσημασμένου ανιχνευτή, ο ερευνητής θέλει να εντοπίσει την αποικία, σε κάθε βιβλιοθήκη, που φέρει το επιθυμητό γονίδιο. Με ποιο κριτήριο, θα σχεδιάσει τον ανιχνευτή του;
- II. Ο ανιχνευτής υβρίδισε με τους κατάλληλους κλώνους και στις δύο βιβλιοθήκες. Ο ερευνητής αφού απομόνωσε τα πλασμίδια φορείς και τα επώασε με το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποίησε για τον ανασυνδυασμό, στη συνέχεια «έτρεξε» τα δείγματά του, σε πήκτωμα αгарόζης και πήρε τα παρακάτω αποτελέσματα:



Ποια είναι η πιο πιθανή εξήγηση των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων της πέψης;

8. Δίνεται το παρακάτω δίκλωνο τμήμα DNA, το οποίο αντιγράφεται *in vitro*.

5' TAA GTA TAC TAA ACG AAT TCA TAT TAT 3' 3' ATT CAT ATG ATT TGC TTA AGT ATA ATA 5'

α. Εξηγήστε ποια υλικά είναι αυτά που απαιτούνται για την *in vitro* αντιγραφή αυτού του μορίου DNA.

β. Εάν μπορείτε να συνδέσετε *in vitro* μέχρι 5 ελεύθερα δεοξονουκλεοτίδια σε μία αλυσίδα μονόκλωνου DNA. Πόσες διαφορετικές τέτοιες αλυσίδες σχηματίζονται και πόσες από αυτές απαιτούνται για την παραπάνω αντιγραφή; Ποιες θα είναι αυτές οι αλυσίδες;

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

- γ. Πόσα μόρια DNA θα προκύψουν, εάν η διαδικασία της αντιγραφής λάβει χώρα 10 φορές;
- δ. Πόσοι ομοιοπολικοί δεσμοί θα δημιουργηθούν κατά τη διαδικασία της αντιγραφής αυτής;
- ε. Πόσα τμήματα DNA θα προκύψουν, αν μετά το τέλος των 10 κύκλων αντιγραφής προσθέσουμε στο μίγμα το ένζυμο *EcoRI*;
- στ. Αν ακολουθήσουμε την ίδια διαδικασία για το μόριο DNA που υπάρχει παρακάτω:

3' TAA GTA TAC TAA ACG AAT TCA TAT TAT 5'

5' ATT CAT ATG ATT TGC TTA AGT ATA ATA 3'

Πόσα τμήματα DNA θα προκύψουν, αν μετά το τέλος των 10 κύκλων αντιγραφής, προσθέσουμε στο μίγμα το ένζυμο *EcoRI*;

9. Οι επιστήμονες ενδιαφέρονται να απαντήσουν στα παρακάτω ερωτήματα:

A. Η περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* προκαλεί ενζυμικά:

- α. διάσπαση 2 δ.Η και 8 P-δ
- β. διάσπαση 2 P-δ και 8 δ.Η
- γ. διάσπαση μόνο P-δ
- δ. διάσπαση μόνο δ.Η.

Για τον σκοπό αυτό σχεδίασαν ένα απλό πείραμα. Πραγματοποίησαν δυο όμοια πειράματα με μονή μεταβλητή την θερμοκρασία (44° C και 14° C). Σε κάθε πείραμα επώασαν πλασμίδια pBR322 με μοναδική θέση αναγνώρισης *EcoRI* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*. Στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα τα πλασμίδια έγιναν γραμμικά στον δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα τα πλασμίδια έμειναν κυκλικά αλλά ήταν εύθραυστα σε ένα σημείο τους.

Σε ποια από τις παραπάνω επιλογές κατέληξαν οι επιστήμονες μετά από τα αποτελέσματα των πειραμάτων τους; Αιτιολογείστε την επιλογή που κάνατε.

B. Γίνεται ενίσχυση με μέθοδο PCR σε κυκλικό μόριο, όπως ένα πλασμίδιο;

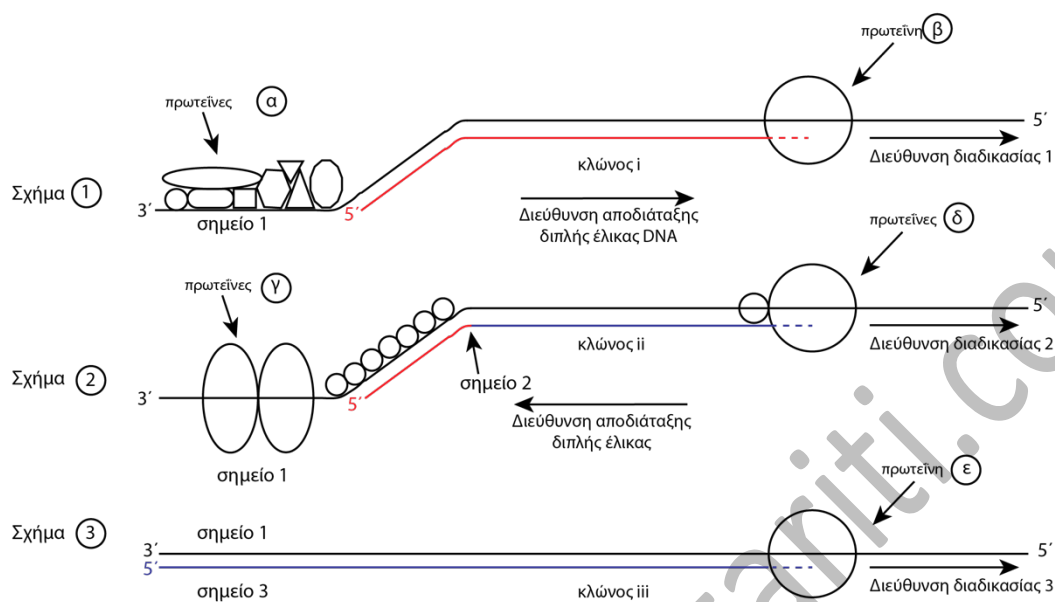
Για τον σκοπό αυτό σχεδίασαν ένα απλό πείραμα. Πραγματοποίησαν PCR στο pUC το οποίο έχει μέγεθος 3.200 ζ.β. μετά από 5 κύκλους αντιγραφής, έλαβαν 32 μόρια DNA μεγέθους 3.200 ζ.β., τα οποία στην συνέχεια επώασαν με *EcoRI*, οπότε προέκυψαν 63 μόρια DNA εκ των οποίων μόνο ένα είχε μήκος 3.200 ζ.β.

Σε ποια συμπεράσματα κατέληξαν οι επιστήμονες ως προς το PCR κυκλικών μορίων;

10. Δίνονται τα παρακάτω τρία σχήματα, δυο από αυτά αφορούν ακριβώς το ίδιο τμήμα ενός κλώνου ενός μορίου DNA σε διαφορετικές χρονικές στιγμές του κυτταρικού κύκλου ενός ευκαρυωτικού κυττάρου, στο οποίο ανήκει αυτός ο κλώνος DNA. Το τρίτο σχήμα αφορά την ίδια ακριβώς

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

διαδικασία, με μια από τις δυο διαδικασίες *in vivo* που δίνονται. Η διαδικασία που παριστάνεται στο τρίτο σχήμα πραγματοποιείται *in vitro*.



nikimargariti.com

α. Ποιες διαδικασίες αφορούν τα σχήματα 1, 2 και 3;

β. Να ονομάσετε τις πρωτεΐνες α, β, γ, δ και ε.

γ. Ποια είναι η λειτουργία του σημείου 1 στο μόριο του DNA;

- Ποιες διαφορές γνωρίζετε μεταξύ των σημείων 1 στο μόριο του DNA ανάμεσα στους προκαρυωτικούς και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς;
- Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δυο κατηγοριών οργανισμών που αναφέρθηκαν και για τις πρωτεΐνες α, που αναγνωρίζουν τα σημεία όπως το 1;

δ. Τι είδους βιολογικά μακρομόρια είναι οι κλώνοι i και ii καθώς και iii;

Ποια δομική διαφορά εντοπίζεται μεταξύ των κλώνων i και iii;

ε. Ποιες πρωτεΐνες έδρασαν και ποιες πρόκειται να δράσουν ακόμη εκατέρωθεν του σημείου 2;

στ. Πόσες πρωτεΐνες έδρασαν στο σημείο 3; Ονομάστε τις πρωτεΐνες αυτές.

ζ. Ποιες από τις πρωτεΐνες που εμφανίζονται στα σχήματα εκτελούν εργασίες που έχουν το ίδιο τελικό αποτέλεσμα;

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

η. Σε ποιο από τα τρία σχήματα γνωρίζετε ότι ένα προκαρυωτικό ένζυμο «διαβάζει» ευκαρυωτικό γενετικό υλικό;

θ. Ποια από τις διαδικασίες που φαίνονται στα σχήματα εκτελείται μια φορά στο δεδομένο τμήμα DNA, στην ζωή του κυττάρου;

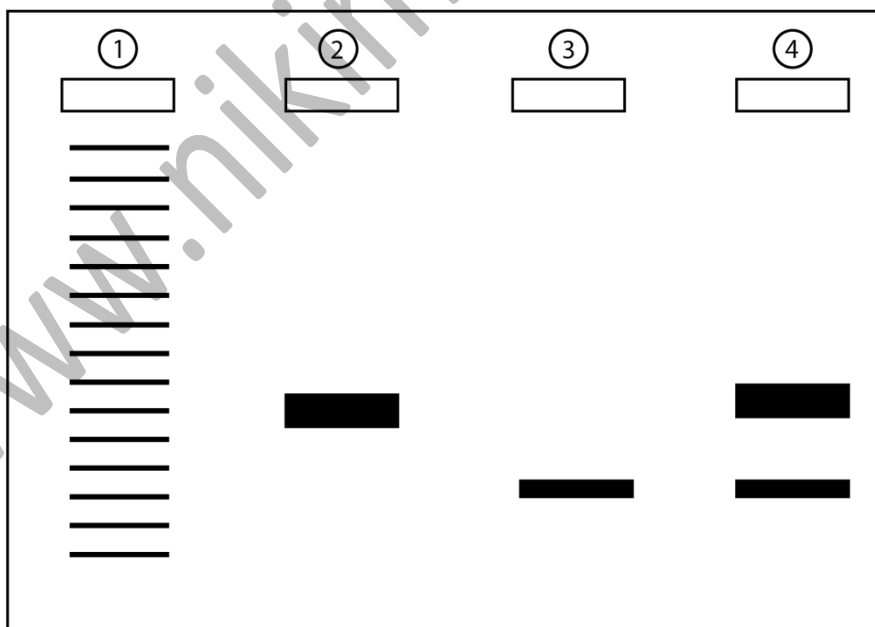
ι. Εξηγήστε τις πρακτικές εφαρμογές που βρίσκει η διαδικασία η οποία εκτελείται *in vitro*.

11. Σε ένα εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, επαναλήφθηκαν τα πειράματα που απέδειξαν τον μετασχηματισμό των προκαρυωτικών κυττάρων.

Οι οργανισμοί μελετήθηκαν με σύγχρονα μέσα και τεχνικές που μας παρέχει η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA.

Οι επιστήμονες δημιούργησαν την γονιδιωματική βιβλιοθήκη των δυο στελεχών του βακτηρίου *D. pneumoniae* και απομόνωσαν το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη που ευθύνεται για την δημιουργία του καλύμματος στα λεία στελέχη.

Στην συνέχεια με τεχνικές γενετικής μηχανικής μετασχημάτισαν ένα πληθυσμό από αδρά στελέχη του βακτηρίου. Από τον πληθυσμό που μετασχηματίστηκε και τον αρχικό πληθυσμό των λείων βακτηρίων, λήφθηκε δείγμα κυττάρων, στο οποίο πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου που ελέγχει για το κάλυμμα, από το γονιδίωμα των βακτηρίων. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και πήραμε τα εξής:

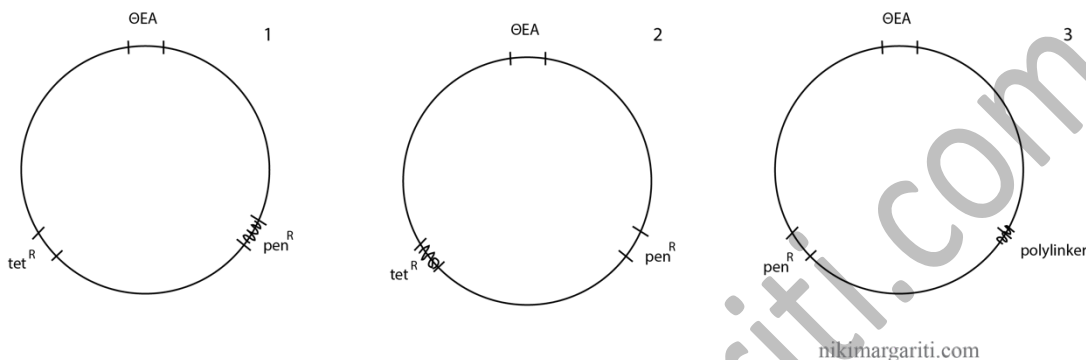


nikimargariti.com

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

α. Ποιο από τα βακτήρια που αναλύθηκαν είναι το αδρό, ποιο το λείο και ποιο το μετασχηματισμένο αδρό σε λείο;

β. Τα αδρά στελέχη του *D. pneumoniae*, που χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματιστούν δεν διαθέτουν πλασμίδια και είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (tet). Οι ερευνητές είχαν στην διάθεσή τους, τους παρακάτω φορείς κλωνοποίησης.



Ποιον μπορούν να επιλέξουν για να επιτύχουν τον μετασχηματισμό;

Αιτιολογείστε την απάντησή σας.

Όπου: Polylinker: Πολλές, διαδοχικές, αλληλεπικαλυπτόμενες, μοναδικές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών. Τουλάχιστον μια από αυτές είναι κατάλληλη για την ένθεση του επιθυμητού γονιδίου.

- 12.** Για την κλωνοποίηση του γονιδίου της λυσοζύμης σε cDNA βιβλιοθήκη που απομονώθηκε από υγιή κύτταρα των δακρυϊκών αδένων του ανθρώπου στην φάση του κυτταρικού κύκλου πριν την αντιγραφή του DNA, χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης που φέρει ένα γονίδιο πενικιλινάσης (Pen^R) που προσφέρει στο βακτήριο ξενιστή, όταν εκφράζεται, ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη και το γονίδιο $lacZ^+$ του οπερονίου της λακτόζης, το οποίο όταν εκφράζεται δίνει σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό έγχρωμες (μπλε) αποικίες (τα γονίδια Pen^R και $lacZ^+$ αποτελούν τα γονίδια αναφοράς του πλασμιδίου). Ο φορέας κλωνοποίησης διαθέτει ακόμη μοναδική ΘΕΑ και μοναδικές ξεχωριστές θέσεις περιορισμού για ένα πλήθος διαφορετικών περιοριστικών ενδονουκλεασών εντός και των δυο γονιδίων που αναφέρθηκαν. Οι θέσεις αυτές είναι μοναδικές για ολόκληρο το πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης.

Να απαντήσετε στις παρακάτω ερωτήσεις:

A. Η ένθεση του ανθρώπινου γονιδίου έγινε (κυκλώστε την/τις σωστές επιλογές):

α. Στον υποκινητή του γονιδίου αναφοράς.

β. Στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου αναφοράς.

γ. Μεταξύ 5' αμετάφραστης περιοχής και κωδικονίου έναρξης του γονιδίου αναφοράς.

- δ. Αμέσως μετά το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου αναφοράς.
- ε. Εντός του μεταφράσιμου τμήματος του γονιδίου αναφοράς, σε οποιοδήποτε σημείο, αλλά όχι πολύ κοντά στο κωδικόνιο έναρξης ή το λήξης του γονιδίου αναφοράς.
- στ. Στο μεταφράσιμο τμήμα του γονιδίου, κοντά στο κωδικόνιο λήξης του γονιδίου αναφοράς.
- ζ. Μετά το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου αναφοράς, αλλά όχι εντός των αλληλουχιών λήξης της μεταγραφής.
- η. Εντός των αλληλουχιών λήξης της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς.

Β. Εξηγήστε σε ποιο από τα δυο παραπάνω γονίδια θα πρέπει να γίνει η ένθεση του γονιδίου του ανθρώπου;

Γ. Εξηγήστε ποιοι βακτηριακοί κλώνοι ανήκουν στην βιβλιοθήκη, οι λευκοί ή οι έγχρωμοι;

Δ. Εξηγήστε με ποιους δυο τρόπους επιλέγονται οι κλώνοι της βιβλιοθήκης που διαθέτουν μεταξύ των υπολοίπων κλώνων της, το επιθυμητό γονίδιο.

Ε. Θα υπάρχουν στην βιβλιοθήκη, δυο οι περισσότεροι κλώνοι με το επιθυμητό γονίδιο;

**13. CTGCAGGCTACATGCCAGGGCCTAAGTGACTGCAG
GACGTCCGATGTACGGTAAAGGATTCACTGACGTC**

Το παραπάνω τμήμα DNA θέλουμε να κλωνοποιηθεί σε φορέα έκφρασης.

Ποια είναι η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης που χρησιμοποιήθηκε για τον ανασυνδυασμό;

ΘΕΜΑ Δ:

1. Δίνεται η παρακάτω αλληλουχία του γονιδίου Φ₁ (εδώ εμφανίζεται μονόκλωνη ενώ είναι δίκλωνη), που κωδικοποιεί για το ένζυμο του βακτηρίου *Lactobacillus arabinosus* το οποίο σχηματίζει την βιταμίνη Β₉ (φολικό οξύ).

Από την γονιδιωματική βιβλιοθήκη του βακτηρίου, απομονώθηκε το γονίδιο Φ₁ με στόχο την εισαγωγή του σε κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης, που θα μετασχηματίσει κύτταρα ζυμών αρτοποιίας, ώστε να εμπλουτίζεται το ψωμί με φολικό οξύ.

Στο δοθέν γονίδιο δεν περιλαμβάνεται η αλληλουχία του υποκινητή του. Υποδεικνύονται τα κωδικόνια έναρξης και λήξης του Φ₁ και εντός των 1500 ζ. β. που παρεμβάλλονται μεταξύ των κωδικονίων έναρξης και λήξης, δεν υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων:

*Xba*I : (5' TCTAGA 3')

*Sac*I : (5' GAGCTC 3')

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

*Bam*HI : (5' GGATCC3')

*Bgl*II : (5' AGATCT3')

*Nde*I : (5' CATATG3')

5'GTCTAGAAGAGCTCCTTGGATCCAAAGATCTACCATATGTCTCGCCTA

....1500nt συνέχεια του γονιδίου...

GTCTAGAAGAGCTCTGGATCCAAGATCTACCATATGTAAGCG3'

Δίνεται επίσης ο φορέας κλωνοποίησης που θα χρησιμοποιηθεί για την κλωνοποίηση του γονιδίου Φ₁ στη ζύμη αρτοποιίας. Δίνεται ακόμη, η αλληλουχία του φορέα κλωνοποίησης (εδώ εμφανίζεται μονόκλωνη ενώ είναι δίκλωνη) από τη θέση *Bgl*II μέχρι τη θέση *Sac*I, όπου περιλαμβάνεται και ο υποκινητής που θα είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή του γονιδίου Φ₁.

Τμήμα του φορέα κλωνοποίησης:

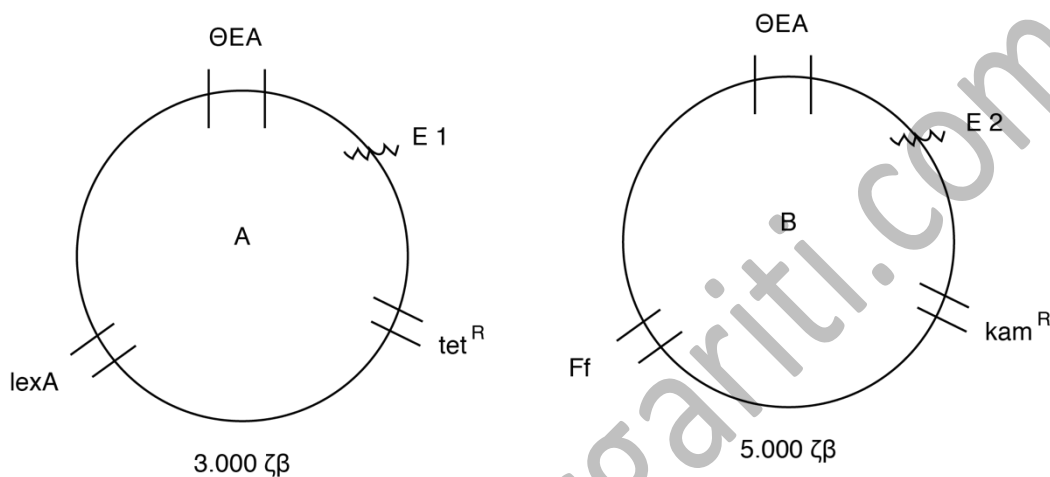
Διεύθυνση μεταγραφής → *Xba*I *Nde*I *Bam*HI *Sac*I

Υποκινητής ----->
5' <u>AGATCTCGATCCCCGAAATTAATACGACTCACTATACGGGAATTGTCACCGCATAACAATCCCC</u> CTAGAAATAATT...
...5' TTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT <u>ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAA</u> Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Glu
5' <u>TCGAGCTCCGTCGAC</u> 3' Leu Arg Arg Gln Ala

- α. Για την έκφραση του γονιδίου Φ₁ στη ζύμη, ποιες πρωτεΐνες και από ποιον οργανισμό θα πρέπει να συνδεθούν με τον υποκινητή του φορέα κλωνοποίησης που θα χρησιμοποιηθεί;
- β. Αν υποθέσουμε ότι, τα επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το Φ₁ γονίδιο, δεν επηρεάζουν την λειτουργικότητά της, απαντήστε στις παρακάτω ερωτήσεις:
 - I. Εάν δημιουργούσατε τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης με πέψη με *Bam*HI:
 - i. Θα αναμέναμε το κύτταρο ζύμης, που δέχθηκε τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης, να δημιουργεί μόριο mRNA από το γονίδιο Φ₁;
 - ii. Το μετασχηματισμένο κύτταρο ζύμης, θα συνθέτει λειτουργική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο Φ₁;
 - II. Εάν δημιουργούσατε τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης, με πέψη με το ένζυμο *Sac*I:
 - i. Θα αναμένατε το κύτταρο ζύμης, που δέχθηκε τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης, να δημιουργεί μόριο mRNA από το γονίδιο Φ₁;

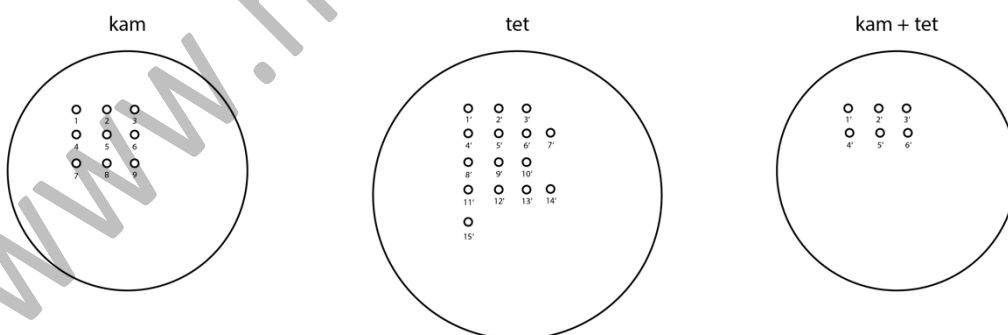
Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

- ii. Το μετασχηματισμένο κύτταρο ζύμης, θα συνθέτει λειτουργική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο Φ₁;
2. Σε δύο διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες βρίσκονται δύο διαφορετικά πλασμίδια, σε χιλιάδες αντίγραφα το καθένα. Στο πλασμίδιο B, το γονίδιο F^f επιτρέπει την μεταφορά του πλασμιδίου B από βακτήριο σε βακτήριο.



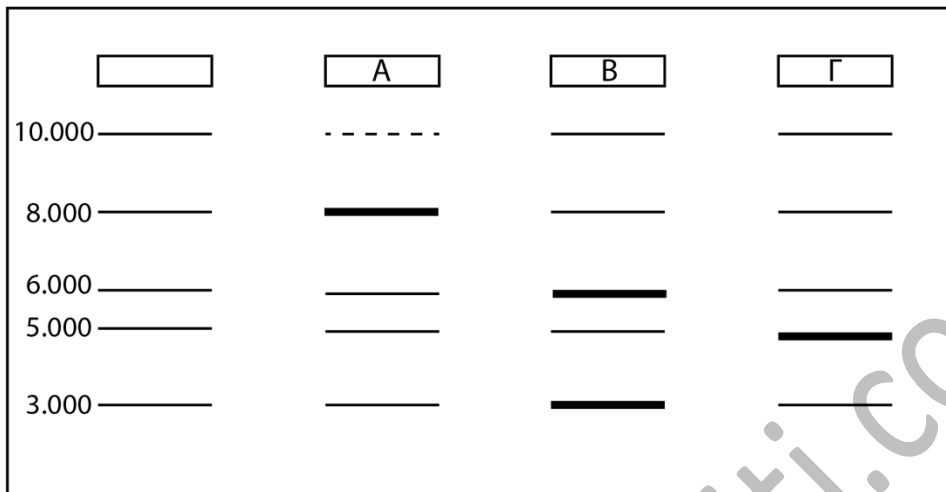
Και τα δύο πέπτονται, ξεχωριστά το καθένα με κάθε Π.Ε., από δύο διαφορετικές Π.Ε. που είναι όμως ισοσχιζομερή, δηλαδή αφήνουν τα ίδια κολλώδη άκρα, αλλά αναγνωρίζουν διαφορετικές θέσεις αναγνώρισης.

Μετά την πέψη τους αναμιγνύονται τα κομμένα πλασμίδια και επιδρά η DNA δεσμάση. Ακολουθεί μετασχηματισμός *E.coli* ξενιστών και ανάπτυξή τους στα παρακάτω τρυβλία.



Απομονώθηκαν τα πλασμίδια από τα κύτταρα των τρυβλίων και «έτρεξαν» σε gel.

Λάβετε υπόψη σας, ότι θεωρούμε πως ένα πλασμίδιο που δεν πεπτετε «τρέχει» στο πήκτωμα όπως ακριβώς και ένα πλασμίδιο κομμένο σε ένα σημείο ιδίου μήκους με αυτό που δεν κόπηκε.



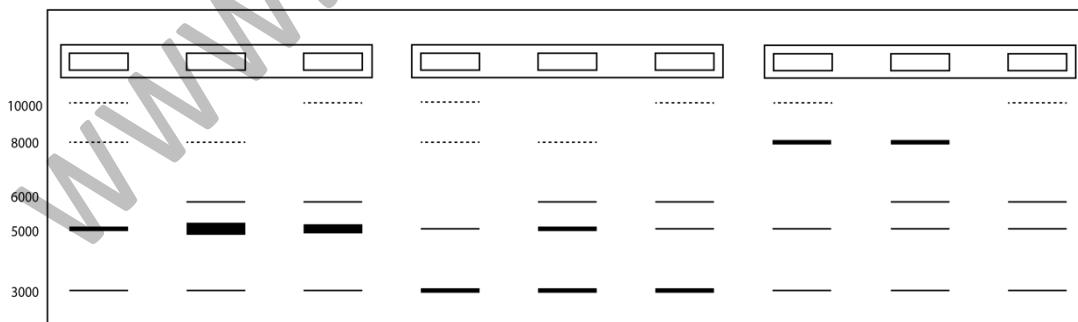
α. Ποιο τρυβλίο αντιστοιχίζεται σε ποιο «πηγαδάκι» του gel;

β. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

3. Σε ένα επόμενο στάδιο του πειράματος μετά την απομόνωση των πλασμιδίων από τα κύτταρα των τριών τρυβλίων, ακολούθησε κατεργασία τους με τις Π.Ε. E_1 και E_2 , E_3 , δηλαδή το δείγμα κάθε τρυβλίου κατεργάζεται ξεχωριστά με E_1 , E_2 και E_3 . Το τρίτο ένζυμο αναγνωρίζει και πέπτει την χιμαιρική θέση περιορισμού που δημιουργείται με τον ανασυνδυασμό των κολλωδών άκρων των δυο άλλων περιοριστικών ενζύμων. Τα προϊόντα «τρέχουν» εν συνεχεία σε gel.

Σημείωση: Θεωρούμε ότι είναι απίθανος ο ανασυνδυασμός περισσότερων από δυο θραυσμάτων.

Να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα.



4. Ένα τμήμα δίκλωνου DNA μήκους 5.000 ζ.β., που αποτελεί το ενδιάμεσο τμήμα ενός μεγαλύτερου μορίου μήκους 10.000 ζ.β., το οποίο το χωρίζει σε δυο βραχίονες ίσου μήκους, ενισχύθηκε με PCR. Το ζεύγος των primers που χρησιμοποιήθηκε είχε κάθε μέλος του μήκος 20 νουκλεοτίδια.

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

Μετά από 4 κύκλους να υπολογιστούν:

- α. Πόσα μόρια από τα ζητούμενα έχουν δημιουργηθεί.
- β. Πόσα νουκλεοτίδια έχει προσθέσει η θερμοάντοχη πολυμεράση.
- γ. Πόσοι είναι όλοι οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί που υπάρχουν μεταξύ των νουκλεοτιδίων σε όλα τα υπάρχοντα μόρια, εξαιρούμενων των ελεύθερων primer.
- δ. Πόσα είναι τα μονόκλωνα νουκλεοτίδια, που δεν είναι όμως ελεύθερα ή ανήκουν σε ελεύθερους primers.
- ε. Η ιδανική θερμοκρασία όπου επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των primers με τα αναδιατεταγμένα μόρια DNA, πώς σχετίζεται με το ποσοστό G + C των primers;

5. Σας δίνεται το θραύσμα ενός μικρού ιικού γονιδίου που κωδικοποιεί για ένα ολιγοπεπτίδιο, το οποίο έχει κοπεί με ένα ένζυμο περιορισμού κατά την κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης .

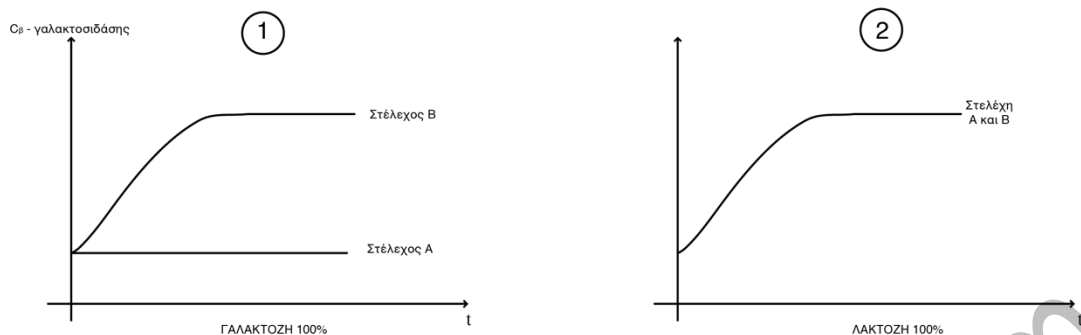
AAGGTTGAGAATGGGGCCCTTAATTGGCT

AACTCTTACCCCGGGAATTAACCGATTCC

- α. Να βρεθεί ο προσανατολισμός και η θέση του υποκινητή.
 - β. Να βρεθεί η αλληλουχία της περιοριστικής ενδονουκλεάσης που χρησιμοποιήθηκε κατά την κατασκευή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης αυτού του ιού, που διαθέτει το παραπάνω γονίδιο. Το ένζυμο δρα με προσανατολισμό 5' προς 3', αναγνωρίζοντας μια αλληλουχία έξι ζευγών νουκλεοτιδίων.
 - γ. Να γραφεί το μόριο του RNA που θα προκύψει, αν υποθέσουμε ότι είναι δυνατό το παραπάνω μόριο, να μεταγραφεί σε εκχύλισμα μιτοχονδρίων του ανθρώπου, όπως ακριβώς σας δίνεται.
6. Ένα βακτήριο *E. coli* με φυσιολογικό μέγεθος χρωμοσωμικού DNA, έχει μετασχηματιστεί μ' ένα πλασμίδιο, πάνω στο οποίο φέρεται ολόκληρο το φυσιολογικό οπερόνιο της λακτόζης, αλλά απουσιάζει το ρυθμιστικό του γονίδιο. Το βακτήριο αυτό ωστόσο, δεν μπορεί ν' αναπτυχθεί σε περιβάλλον με μοναδική πηγή C τη λακτόζη.

Εξηγήστε δύο λόγους για τους οποίους είναι δυνατόν να γίνεται αυτό.
 7. Σε δύο διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *E.coli* μελετήθηκε η κινητική της παραγωγής της β-γαλακτοσιδάσης, παρουσία και απουσία λακτόζης. Όταν δεν υπήρχε λακτόζη, τα βακτήρια αναπτύσσονταν σε γαλακτόζη.

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B



nikimargariti.com

Για την ερμηνεία της καμπύλης ① δημιουργήθηκαν οι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες των δύο στελεχών.

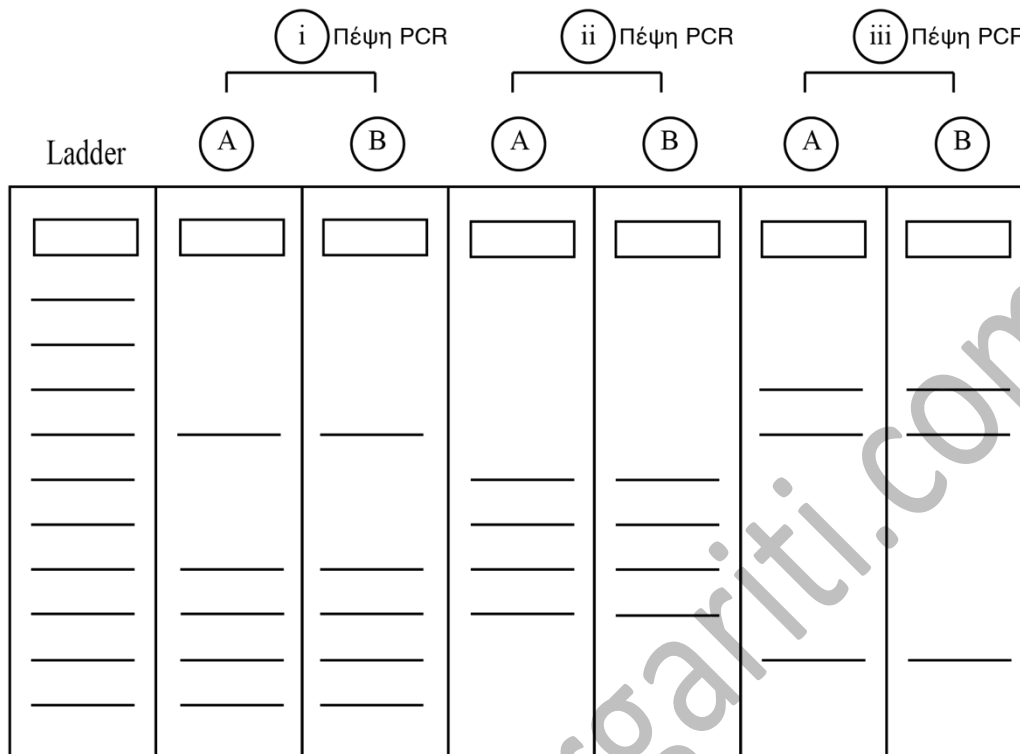
Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και για την δημιουργία των βιβλιοθηκών και για τα δύο στελέχη. Η χρήση αυτών των Π.Ε. επιτρέπει την κοπή του γονιδιώματος του *E.coli*, με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται θραύσμα με ακέραιο το τμήμα που περιλαμβάνει, από τον υποκινητή του ρυθμιστικού γονιδίου μέχρι και τις αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής των δομικών γονιδίων.

Στη συνέχεια απομονώθηκαν οι κλώνοι των βιβλιοθηκών που περιέχουν το τμήμα του οπερονίου για κάθε στέλεχος και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών τους. Από τη σύγκριση των αλληλουχιών των οπερονίων των δύο στελεχών, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ τους. Η σύγκριση έγινε με πέψη με ορισμένο πλήθος και είδος περιοριστικών ενδονουκλεάσεων, που πέπτουν εντός του απομονωμένου τμήματος. Έγιναν τρεις διαφορετικές πέψεις με διαφορετικό κάθε φορά σύνολο Π.Ε.

Κάθε μια από τις τρεις αυτές πέψεις i, ii, iii, φαίνονται παρακάτω.

Το αμέσως παρακάτω παρατιθέμενο πηκτωμα αγαρόζης αφορά τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη για τους κλώνους που περιέχουν το οπερόνιο στις βιβλιοθήκες των στελεχών Α και Β.

(**Σημείωση:** Να αγνοηθεί η λέξη PCR στο σχήμα).



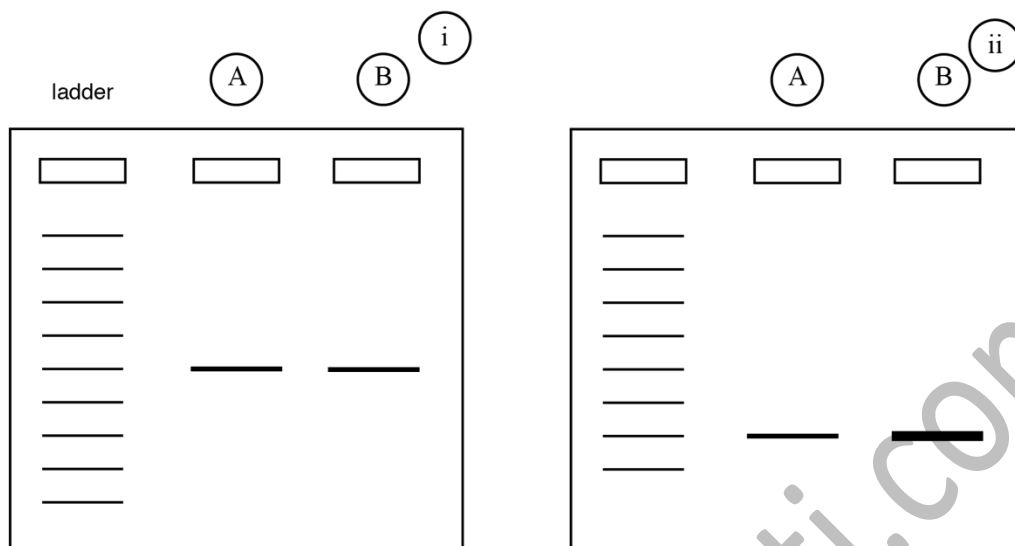
nikimargariti.com

Σε μια **δεύτερη σειρά πειραμάτων** πραγματοποιήθηκε PCR μέθοδος, στα γονιδιώματα των στελεχών A και B:

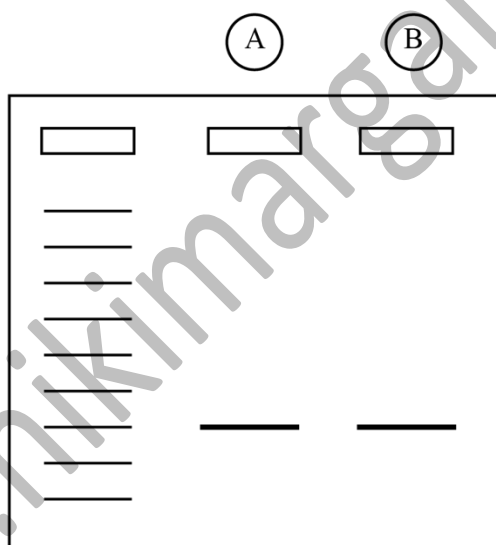
- i. PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης.
- ii. PCR για την ενίσχυση του χειριστή.
- iii. PCR για την ενίσχυση του ρυθμιστικού γονιδίου.

Κατόπιν επακολούθησε πέψη των προϊόντων της PCR για τη σύγκριση των αλληλουχιών αυτών, των δύο στελεχών.

Τα αποτελέσματα του PCR είναι: Για την ενίσχυση των περιοχών DNA: i, ii, iii αντιστοίχως.



nikimargariti.com



nikimargariti.com

Τέλος, στην τελευταία σειρά πειραμάτων, έγινε υβριδοποίηση των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών των δύο στελεχών, για τον εντοπισμό των αποικιών των παραπάνω περιοχών του οπερονίου. Τα αποτελέσματα της υβριδοποίησης είναι:

	ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ	
	A	B
i. Για το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης	1 ΑΠΟΙΚΙΑ	1 ΑΠΟΙΚΙΑ
ii. Για το χειριστή του οπερονίου	1 ΑΠΟΙΚΙΑ	13 ΑΠΟΙΚΙΕΣ
iii. Για το ρυθμιστικό γονίδιο του οπερονίου	1 ΑΠΟΙΚΙΑ	1 ΑΠΟΙΚΙΑ

Σύμφωνα με το σύνολο όλων των παραπάνω πειραμάτων, να απαντήσετε στα εξής:

α. Για ποιο λόγο οι επιστήμονες δημιούργησαν γονιδιωματικές και όχι cDNA βιβλιοθήκες των δύο στελεχών;

β. Για ποιο λόγο δημιούργησαν τις δύο διαφορετικές βιβλιοθήκες χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα;

γ. Για ποιο λόγο συνέκριναν τις αλληλουχίες των δύο οπερονίων των δύο στελεχών; Πώς γίνεται η σύγκριση με την πέψη;

δ. Για ποιο λόγο έγινε PCR των συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος που ανήκουν στο οπερόνιο των δύο στελεχών από ολόκληρο το γονιδίωμα;

ε. Για ποιο λόγο συνέκριναν ως προς την αλληλουχία τα προϊόντα του PCR, που έγινε για στοχευμένα τμήματα του οπερονίου, αφού είχαν συγκρίνει ήδη αυτές τις περιοχές εντός των βιβλιοθηκών;

στ. Για ποιο λόγο μετά το πρώτο PCR έγινε υβριδοποίηση των βιβλιοθηκών των δύο στελεχών για τον εντοπισμό των συγκεκριμένων αλληλουχιών;

ζ. Ερμηνεύστε για ποιο λόγο το στέλεχος B εμφανίζει αυτή τη συμπεριφορά παρουσία γαλακτόζης.

- 8.** Ένα φυσιολογικό στέλεχος *E. coli* μετασχηματίζεται με ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης με το ανθρώπινο cDNA του γονιδίου της H_1 των νουκλεοσωμάτων. Το γονίδιο έχει υποστεί κατάλληλη τροποποίηση ώστε το γονιδιακό προϊόν να είναι η λειτουργική ανθρώπινη H_1 ιστόνη. Το γονίδιο της H_1 βρισκόταν υπό τον υποκινητή του ρυθμιστικού γονιδίου του *lac operon*, με αποτέλεσμα να υπάρχουν συνεχώς στο μετασχηματισμένο βακτηριακό κύτταρο 12-15 H_1 στο DNA του. Τα κύτταρα της αποικίας των μετασχηματισμένων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζουν ετερογενή φαινότυπο. Κάποια πεθαίνουν, κάποια άλλα δεν μπορούν να εκφράσουν το *lac operon*, κάποια ακόμη δεν μπορούν να εκφράσουν το *Trp operon*, κ.ά.

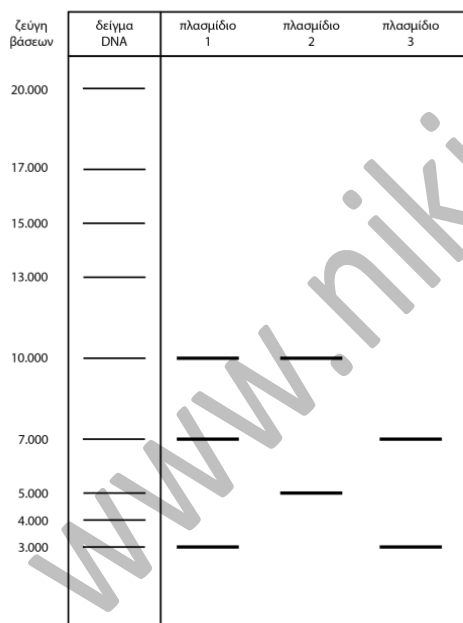
Σε περαιτέρω μοριακές και βιοχημικές αναλύσεις που έγιναν διαπιστώθηκε ότι οι H_1 πρωτεΐνες βρίσκονταν όλες συνδεδεμένες στη σειρά σε απόσταση 54 ζ.β. μεταξύ τους. Ποιο συμπέρασμα βγαίνει από τα παραπάνω;

- 9.** Σε ανθρώπινο γονιδίωμα T_4 λεμφοκυττάρου πραγματοποιείται PCR για την διάγνωση της μόλυνσης του ατόμου από τον ιό HIV που προκαλεί το AIDS.

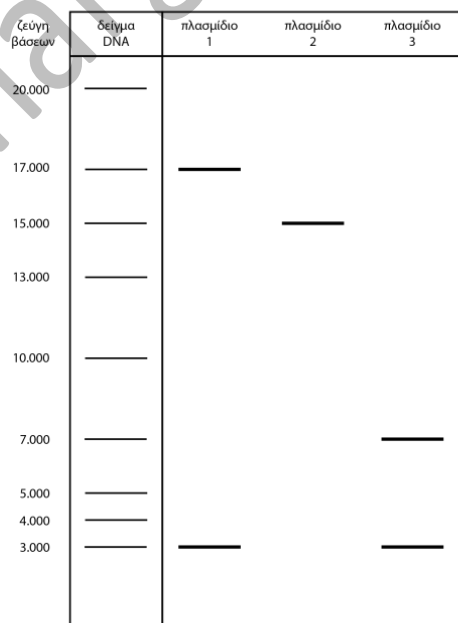
Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B

- α. Τι είδους συστατικά απαιτούνται για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR αυτή;
 - β. Τα primers σε ποια σημεία πρέπει να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα ώστε να ενισχύσουν το τμήμα του γονιδιώματος;
 - γ. Μετά από πόσους κύκλους PCR θα λάβουμε τα πρώτα ζητούμενα μόρια και πόσα θα είναι αυτά; Πόσοι θα είναι οι κλώνοι που δεν μας έδωσαν ζητούμενα μόρια;
 - δ. Στον επόμενο κύκλο από τον κύκλο που αναφέρεται το ερώτημα πόσα θα είναι τα ζητούμενα μόρια και πόσοι οι κλώνοι που υπάρχουν αλλά δεν μετέχουν σε αυτά τα ζητούμενα μόρια;
 - ε. Μετά από 30 κύκλους που ολοκληρώνεται η αντίδραση PCR πόσα θα είναι τα ζητούμενα μόρια και πόσοι οι κλώνοι που δεν συμμετέχουν σε αυτά;
 - στ. Από τους κλώνους του ερωτήματος ε, που δεν ανήκουν στα ζητούμενα μόρια, πόσοι είναι μητρικοί; Πόσοι είναι άμεσα συνδεδεμένοι με μητρικούς; Πόσοι έχουν μήκος μικρότερο από τους μητρικούς και μεγαλύτερο από τους ζητούμενους και δεν είναι συνδεδεμένοι με μητρικούς; Πόσοι έχουν μήκος όσο και οι ζητούμενοι αλλά δεν συμμετέχουν άμεσα σε ζητούμενο μόριο;
10. Τρία δείγματα πλασμιδιακού DNA, πέτονται με διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και στη συνέχεια αναλύονται σε πήκτωμα αгарόζης. Τα αποτελέσματα είναι αυτά που φαίνονται στις εικόνες. Γνωρίζετε ότι κανένα πλασμίδιο δεν έχει δυο ίδιες θέσεις αναγνώρισης. Επίσης, είναι γνωστό, ότι το πλασμίδιο 1 έχει μήκος 20.000 ζεύγη βάσεων, το πλασμίδιο 2 έχει μήκος 15.000 ζεύγη βάσεων και το πλασμίδιο 3 έχει μήκος 10.000 ζεύγη βάσεων.

• Πέψη από EcoRI, PstI, BamHI

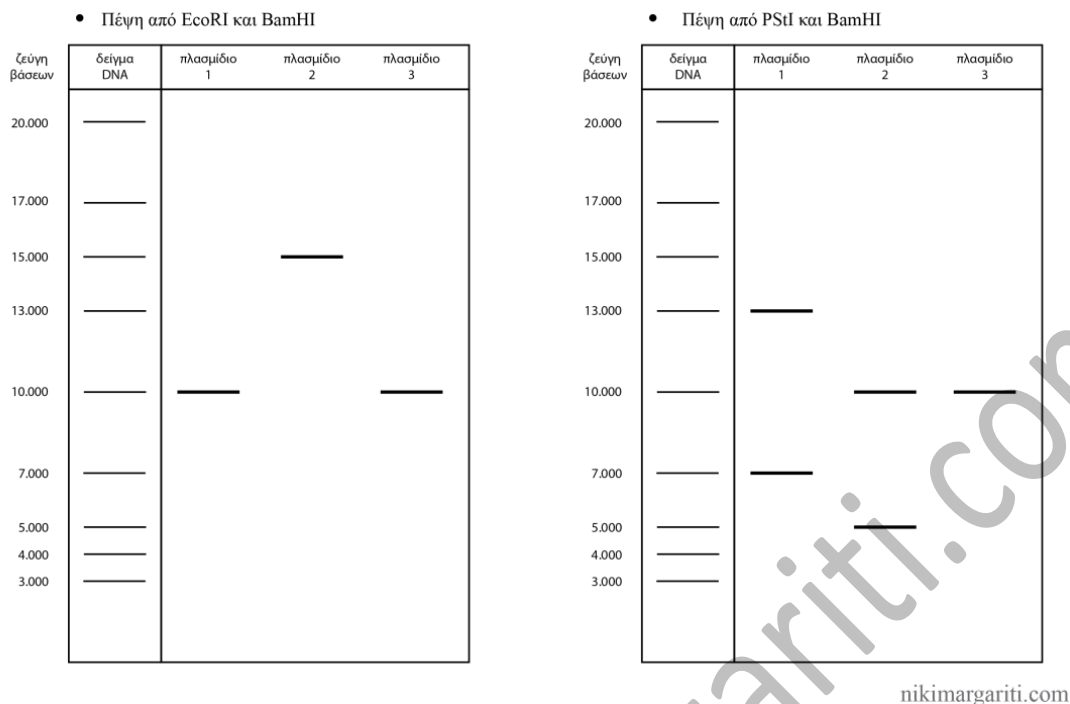


• Πέψη από EcoRI και PstI



nikimargariti.com

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B



Σημείωση: Στο τρίτο πήκτωμα αγαρόζης, με την σειρά που δίνονται, στο πρώτο πλασμίδιο, η ζώνη στα 10.000 ζεύγη νουκλεοτιδίων, είναι διπλάσια σε πάχος από όλες τις υπόλοιπες των τεσσάρων πηκτωμάτων αγαρόζης.

α. Σχεδιάστε τον περιοριστικό χάρτη κάθε πλασμιδίου (για το πλασμίδιο 1 αρκεί μια εκδοχή). Δεν απαιτείται αιτιολόγηση.

β. Δίνεται η αλληλουχία ενός υποθετικού γονίδιου του πλασμιδίου 2, που κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης.

Αλυσίδα 1. ...TCGACGGGTACGCTATGCGCCGTTTTGTAAAAACGAGGACTTTG...

Αλυσίδα 2. ...AGCTGCCCATGCGATACGCGGCAAAACATTTTTGCTCCTGAAAC...

Σημείωση: Η υπογράμμιση δηλώνει την 5'αμετάφραστη περιοχή.

ι. Ποια αλυσίδα είναι η κωδική και ποια η μη κωδική και σημειώστε τα 5' και 3' άκρα της κάθε αλυσίδας.

Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

ii. Ο υποκινητής του παραπάνω γονίδιου αποτελείται από 120 βάσεις. Από αυτές, το 15% είναι αδενίνης. Να βρείτε τα ποσοστά και το πλήθος των υπολοίπων.

γ. Δίνεται το ακόλουθο γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης του ανθρώπου:

5' AGCGAATTCGCTCTGCAG...GGATCC...GCTAT...ATG...GAATTC...TAGCTGCAG...GGATCC3'
3' TCGCTTAAGCGAGACGTC...CCTAGG...CGATA...TAC...CTTAAG...ATCGACGTC...CCTAGG5'

3' ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗ... ΑΛΜ

Σημείωση: ΑΛΜ= Αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής.

Οι ΑΛΜ βρίσκονται στις αλληλουχίες που ακολουθούν αμέσως μετά την 3' αμετάφραστη περιοχή του δοθέντος γονιδίου. Η αλληλουχία του υποκινητή, είναι η υπογραμμισμένη στα αριστερά αλληλουχία του γονιδίου που δίνεται.

Να προσδιορίσετε ποια/ποιες περιοριστική/ες ενδονουκλεάση/ες μπορεί/ουν να χρησιμοποιηθεί/ουν για την πέψη του γονιδίου, ώστε στη συνέχεια να ενθεθεί ακέραιο σε κάποιο από τα πλασμίδια του προηγούμενου ερωτήματος και να μπορεί να εκφράζεται επιτυχώς.

Να αιτιολογηθεί η απάντησή σας.

- δ. Να προσδιορίσετε ποιο/α πλασμίδιο/α θα μπορούσε/αν να χρησιμοποιηθεί/ουν ως φορέας/εις κλωνοποίησης για το γονίδιο του προηγούμενου ερωτήματος, με βάση την απάντησή σας στο προηγούμενο ερώτημα. Να εξηγήσετε επίσης, ποιες άλλες προϋποθέσεις θα πρέπει να πληροί/ουν αυτό/α το/τα πλασμίδιο/α ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως φορέας κλωνοποίησης.

Δίνονται οι θέσεις αναγνώρισης:

της PstI.....της BamHI

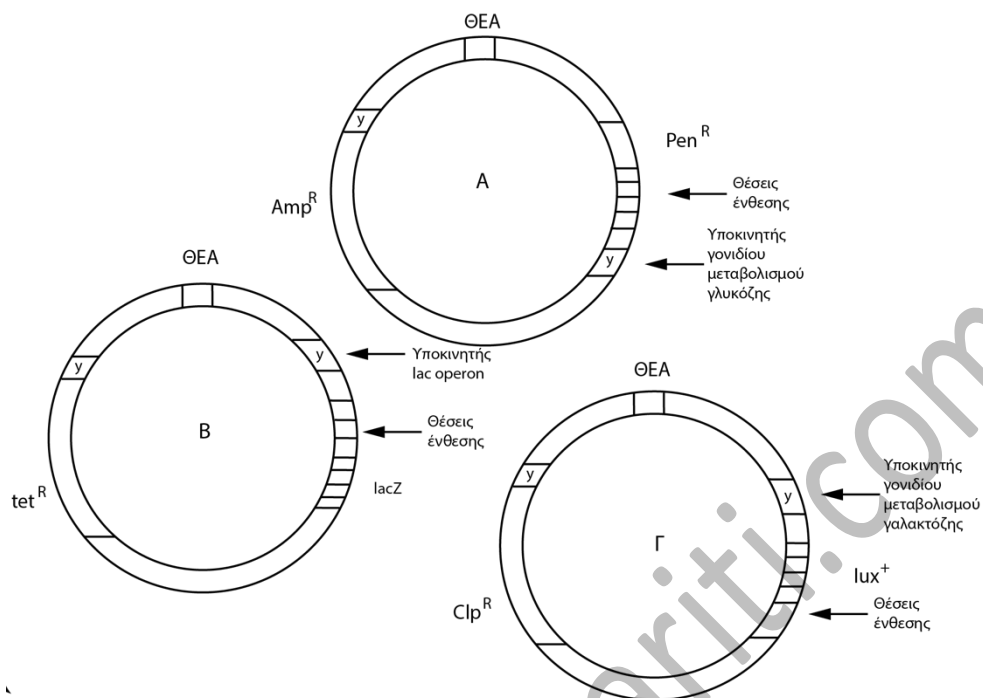
5' CTGCAG3'.....5'GGATCC3'

3' GACGTC5'.....3'CCTAGG5'

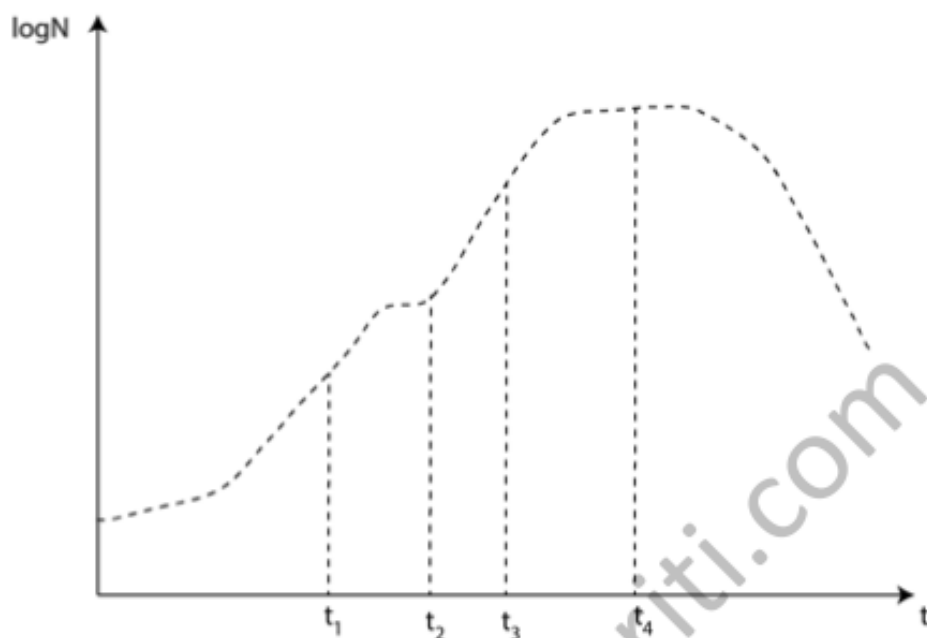
Δημιουργημένο από την φοιτήτρια της Ιατρικής Κωνσταντίνα Ραουζαίου

12. Ένα στέλεχος *E. coli*, μετασχηματίζεται με το γονίδιο που ευθύνεται για το κάλυμμα (κάψα) του λείου στελέχους του πνευμονόκοκκου. Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί φορείς κλωνοποίησης, όπως φαίνονται παρακάτω και δημιουργήθηκαν τρεις διαφορετικές υγρές καλλιέργειες των μετασχηματισμένων κυττάρων, που η καθεμιά έχει μετασχηματιστεί με διαφορετικό φορέα κλωνοποίησης.
- Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται αρχικά σε γλυκόζη και μετά την εξάντληση της, η αύξηση της κάθε καλλιέργειας συνεχίζεται με λακτόζη. Σε ποια χρονική στιγμή αναμένεται να εκφράζεται η ετερόλογη πρωτεΐνη σε καθεμιά από τις τρεις καλλιέργειες, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα διαύξησης;

Ασκήσεις για λύση: Κεφάλαιο 4B



nikimargariti.com



nikimargariti.com

13. Στο εργαστήριο φυσιολογίας φυτών - Τομέας Φωτοσύνθεσης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών εξετάζονται οι βιβλιοθήκες του ιδίου χλωροπλαστικού DNA (cpDNA) του ίδιου ατόμου ενός φυτού *Jasminus officinalis*. Μετά από υβριδοποίηση του ίδιου ανιχνευτή στις δυο βιβλιοθήκες διαπιστώθηκε ότι το μήκος του θραύσματος που υβριδοποιήθηκε με τον ανιχνευτή ήταν όμοιο, αλλά το συνολικό μήκος των δυο θραυσμάτων διέφερε σημαντικά όπως αποδείχθηκε μετά από ηλεκτροφορητική εξέταση των θραυσμάτων.

A. Να εξηγηθούν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα.

Σε μια δεύτερη σειρά πειραμάτων ένας δεύτερος ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό ενός άλλου τμήματος του cpDNA αυτού, στις δυο αυτές βιβλιοθήκες. Πάλι ο ανιχνευτής υβρίδισε σε αλληλουχία ίσου μήκους και στις δυο βιβλιοθήκες και επιπλέον η ηλεκτροφορητική εξέταση έδειξε, ότι τα δυο θραύσματα που ανιχνευτήκαν διέφεραν μόνο 12 ζεύγη βάσεων.

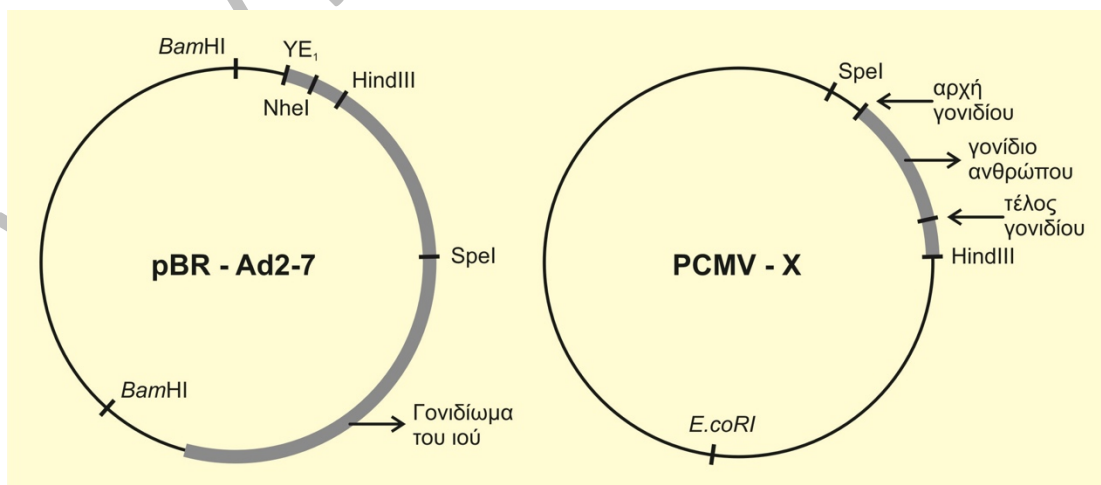
B. Να εξηγηθούν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα και της δεύτερης σειράς πειραμάτων.

Σημείωση: Όλα τα cpDNA είναι μεταξύ τους κλώνοι και σε περαιτέρω πειράματα σάρωσης των βιβλιοθηκών, αποδείχθηκε ότι κατά κανόνα εμφανιζόταν στις βιβλιοθήκες αυτές, η εικόνα που παρατηρήθηκε στην πρώτη σειρά πειραμάτων.

15. Έχετε στην διάθεσή σας τα παρακάτω πλασμίδια και τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Περιγράψτε τη διαδικασία ανασυνδυασμού, με την οποία θα δημιουργήσετε ένα δίκλωνο μόριο DNA, το οποίο θα αποτελέσει το ανασυνδυασμένο μόριο του γενετικού υλικού του αδενοϊού, με τον οποίο θα πραγματοποιηθεί η γονιδιακή θεραπεία μίας αυτοσωμικής υπολειπόμενης νόσου.

Το τελικό μόριο δίκλωνου DNA, θα πρέπει να είναι γραμμικό, να περιλαμβάνει το πλείστον του γονιδιώματος του ιού και να έχει το επικρατές αλληλόμορφο του γονιδίου για την ασθένεια υπό τον έλεγχο του υποκινητή E_1 (YE_1).

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NheI* και *SpeI* δημιουργούν τα ίδια κολλώδη άκρα. Όλες οι υπόλοιπες περιοριστικές ενδονουκλεάσες δημιουργούν μοναδικά κολλώδη άκρα.



www.nikimargariti.com