

E/4

2. Γα ακόλουθα μόρια DNA υποβάλλονται στην επίδραση της *EcoRI* και τα τμήματα προκύπτουν υποβάλλονται στην επίδραση της δεσμάσης.

A.

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

B.

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

Νο

προσδιορίσετε τους διαφορετικούς συνδυασμούς ανασυνδυασμένων μορίων που μπορεί να προκύψουν.

ΔΕΙΞΗ για τη λύση

ζητήστε όλους τους συνδυασμούς μορίων τα οποία, εκτός από τα πληρωματικά άκρα, έχουν και άκρα στα οποία μπορεί να αποκαταστεί ο δεσμός 3'-5'.

3. Σε 1 πείραμα έγιναν απόπειρες να εισαχθεί ένα ευκαρυωτικό γονίδιο σε πλασμίδι το φέρει γονίδια ανθεκτικότητας για την αμικικιλίνη και την τετρακυκλίνη.

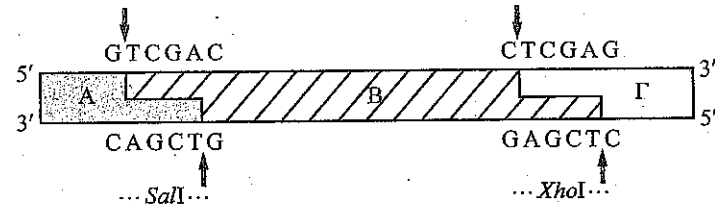
Σε 2ο, το γονίδιο ανθεκτικότητας για την τετρακυκλίνη διαθέτει αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου (ενδονουκλεάσης) με το οποίο αποκόπτεται το ευκαρυωτικό γονίδιο.

Το μόριο βακτηριδίων που προέκυψε μετά από όλες τις διαδικασίες (χρήση περιοριστικού ενζύμου, δεσμάσης, προπαρασκευή των βακτηριδίων για μετασχηματισμό) χωρίστηκε σε 4 μέρη, καθένα από τα οποία αφέθηκε να αναπτυχθεί σε 4 διαφορετικά υποστρώματα:

- Ένα που περιείχε και τα δύο είδη αντιβιοτικών.
- Ένα που δεν περιείχε κανένα αντιβιοτικό.
- Ένα που περιείχε μόνο αμικικιλίνη.
- Ένα που περιείχε μόνο τετρακυκλίνη.

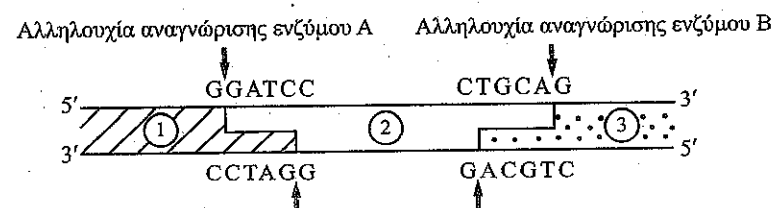
Από τις διαφορετικές κατηγορίες βακτηριδίων που έχουν προκύψει, δηλαδή βακτηρίδια που δεν έχουν υποστεί μετασχηματισμό, βακτηρίδια που υπέστησαν μετασχηματισμό και έλαβαν το ευκαρυωτικό γονίδιο και βακτηρίδια που υπέστησαν μετασχηματισμό, χωρίς να λάβουν το ευκαρυωτικό γονίδιο, να προσδιορίσετε ποιο ή ποια θα αναπτυχθεί/αναπτυχθούν σε καθένα από τα θρεπτικά υποστρώματα.

4. Το εικονιζόμενο μόριο DNA υφίσταται επεξεργασία με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *SaI* και *XhoI*, οι οποίες κόβουν στα σημεία που επισημαίνονται στο σχήμα.



Αν τα τμήματα που έχουν προκύψει συνδεθούν ανά δύο με τη χρήση δεσμάσης, να προσδιορίσετε τα διαφορετικά είδη συνδυασμών που προκύπτουν.

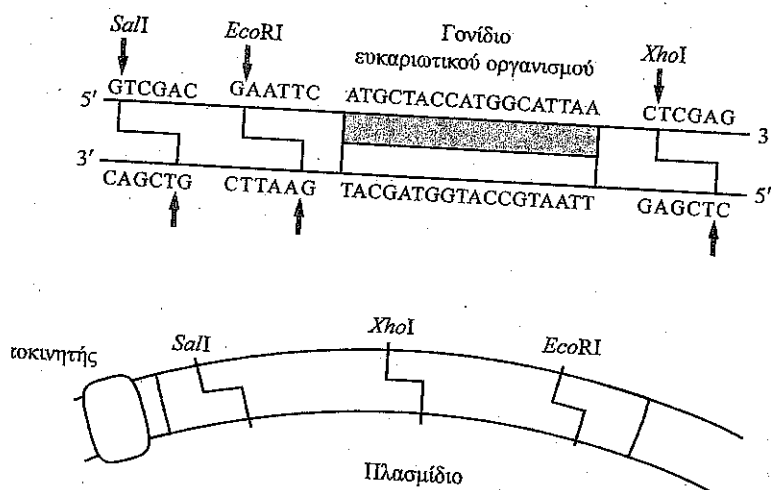
5. Το εικονιζόμενο μόριο DNA περιλαμβάνει αλληλουχίες αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα Α και Β τα οποία το αποκόπτεται στις θέσεις που επισημαίνονται.



- α. Αν το μόριο υποστεί την επίδραση των δύο ενζύμων και τα τμήματα που δημιουργηθούν (1, 2, 3) τοποθετηθούν εντός συστήματος αντιγραφής που περιέχει DNA πολυμεράση και δεσοξυριβονουκλεοτίδια, να προσδιορίσετε τα τμήματα που θα προκύψουν τελικά.
- β. Αν χρησιμοποιηθεί μια δεσμάση που είναι ικανή να συνδέει και τμήματα που δεν έχουν μονόκλινα άκρα, να προσδιορίσετε τα τμήματα που θα δημιουργηθούν από τη συνένωση των τμημάτων τα οποία προέκυψαν στο ερώτημα α.

6

Δίνεται ένα μόριο DNA το οποίο περιέχει ένα μικρό ευκαρυωτικό γονίδιο και τρεις (3) αλληλουχίες αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *SalI*, *EcoRI*, *XhoI*. Δίνονται, επιπλέον, πλασμίδια τα οποία εντός γονιδίου ανθεκτικότητας για κάποιο αντιβιοτικό περιέχουν επίσης τις αλληλουχίες αναγνώρισης για τις τρεις (3) περιοριστικές ενδονουκλεάσες, σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα:



Να προσδιορίσετε το/τα ολιγοπεπτιδιο/-α που ενδέχεται να παραλάβουμε από βακτήρια στα οποία εντάχθηκε:

- α. Πλασμίδιο που κόπηκε από την *SalI* και την *XhoI* και ενέταξε στο εσωτερικό του γονιδίου ανθεκτικότητας το τμήμα το οποίο προέκυψε μετά την επεξεργασία τού μορίου του DNA με τα ίδια ένζυμα.
- β. Πλασμίδιο που κόπηκε από την *EcoRI* και την *XhoI* και ενέταξε στο εσωτερικό του γονιδίου ανθεκτικότητας το τμήμα το οποίο προέκυψε μετά την επεξεργασία τού μορίου του DNA με τα ίδια ένζυμα.

ΥΠΟΔΕΙΞΗ για τη λύση

Προσέξτε τα άκρα που απομένουν μετά την κοπή του πλασμιδίου με τις *SalI* και *XhoI*. Τι παρατηρείτε;

7. Ένα τμήμα ανθρώπινου χρωμοσώματος διαθέτει δύο διαδοχικές θέσεις αναγνώρισης της *EcoRI*, ώστε όταν χρησιμοποιείται το ένζυμο αυτό να κόβεται σε τρία τμήματα, που έχουν μήκη 5, 2 και 4 χιλιάδων ζευγών βάσεων (kb), χωρίς όμως να είναι γνωστή η ακριβής σειρά τους.

Για το τμήμα αυτό έχουν εντοπιστεί δύο διαφορετικές μεταλλάξεις, οι οποίες αλλοιώνουν την αλληλουχία αναγνώρισης της *EcoRI* σε καθεμία από τις διαδοχικές θέσεις της.

Η μία μετάλλαξη προκαλεί την παραγωγή δύο τμημάτων (αντί για τρία), μήκους 2 και 9 χιλιάδων ζευγών βάσεων. Η δεύτερη μετάλλαξη προκαλεί την παραγωγή δύο τμημάτων (αντί για τρία), μήκους 6 και 5 χιλιάδων ζευγών βάσεων.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα:

- α. Να καθορίσετε τη σειρά των τμημάτων (5, 2, και 4) στο κανονικό τμήμα του ανθρώπινου χρωμοσώματος.

- β. Ονομάζοντας A, B τις σωστές αλληλουχίες αναγνώρισης της *EcoRI* και A', B' τις μεταλλαγμένες, να βρείτε ποια είναι τα διαφορετικά τμήματα κάθε είδους που ενδέχεται να προκύψουν, μετά την επεξεργασία του συγκεκριμένου τμήματος με την *EcoRI*, στους απογόνους ενός γάμου μεταξύ ενός άνδρα που έχει τις αλληλουχίες αναγνώρισης AA'B'B' και μιας γυναίκας που έχει τις αλληλουχίες αναγνώρισης A'A'B'B'.

ΥΠΟΔΕΙΞΗ για τη λύση

Δοκιμάστε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς θέσεων των σημείων στα οποία δρουν τα ένζυμα.

Ποιος ή ποιοι από αυτούς μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή των τμημάτων της εκφώνησης;

Δοκιμάστε να χειριστείτε τις συγκεκριμένες αλληλουχίες αναγνώρισης σαν να είναι γονίδια (προφανώς δεν είναι γονίδια, είναι όμως αλληλουχίες όπως αυτά).

Ποιοι γαμέτες παράγονται από τα δύο άτομα του ζευγαριού σε σχέση με αυτές; Τι είδους απόγονοι προκύπτουν;

8. Ερευνητής επιχειρεί να εντοπίσει σε μια cDNA βιβλιοθήκη την αλληλουχία που είναι υπεύθυνη για την κωδικοποίηση ενός ολιγοπεπτιδίου. Ο ερευνητής, επιδρώντας με ένζυμα στο ολιγοπεπτίδιο, κατόρθωσε να το διασπάσει στα ακόλουθα τρία μικρότερα πεπτίδια:

I. N-His-Ser-Arg-Phe-C, II. N-Gln-Trp-His-Ser-C, III. N-Met-Val-Gln-Trp-C.

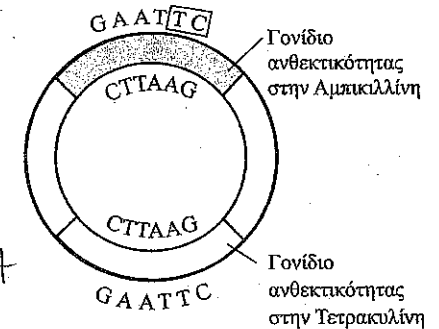
α. Με βάση ποιο από τα τετραπεπτίδια είναι καλύτερο να εργαστεί ο ερευνητής να συνθέσει RNA ανιχνευτές, ώστε να εντοπίσει στη cDNA βιβλιοθήκη την αλληλουχία που κωδικοποιεί το ολιγοπεπτίδιο;

- β. Από τη σύγκριση του μορίου DNA της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με το μόριο DNA της cDNA βιβλιοθήκης ο ερευνητής ανακάλυψε πως το μικρό γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση του ολιγοπεπτιδίου είναι ασυνεχές· συγκεκριμένα, μετά το 5ο κατά σειρά νουκλεοτίδιο του κωδικού κλώνου του γονιδίου στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη ακολουθεί εσώνιο με αλληλουχία: 5' CTCA 3'.

Χρησιμοποιώντας έναν από τους πιθανούς συνδυασμούς κωδικονίων που κωδικοποιούν τη σύνθεση του ολιγοπεπτιδίου, να γράψετε την αλληλουχία του κωδικού κλώνου του γονιδίου στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη.

9. Σας ανατέθηκε η δημιουργία ενός μορίου ανασυνδυασμένου DNA το οποίο προέκυψε από την εισαγωγή ενός ευκαρυωτικού γονιδίου στο πλασμίδιο της διπλανής εικόνας.

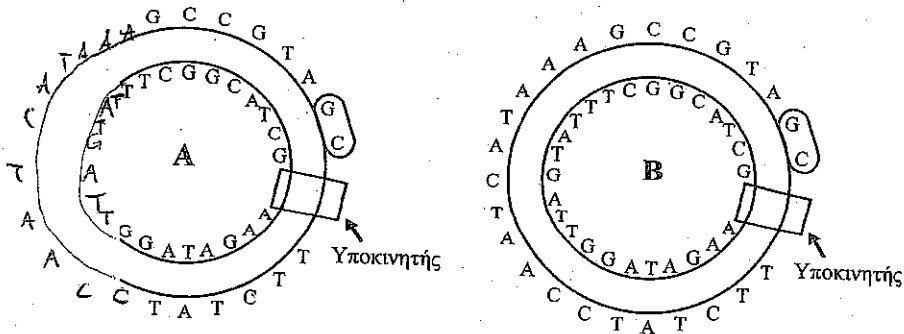
Λαμβάνοντας υπόψη ότι η C του πλασιδίου συνδέεται με 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό με την T, να προσδιορίσετε το είδος αντιβιοτικού που θα επιλέξετε για να εντοπίσετε ποια από τις καλλιέργειες βακτηρίων που δημιουργήσατε είναι εκείνη που φέρει το ανασυνδυασμένο DNA.



ΥΠΟΔΕΙΞΗ για τη λύση

GAATTC δεν σημαίνει τίποτα. 5' GAATTC 3' μπορεί να σημαίνει κάτι... Επομένως, βρείτε τον προσανατολισμό του εξωτερικού και του εσωτερικού κλώνου, αξιοποιώντας την πληροφορία για τον δεσμό που συνδέει την C και την T.

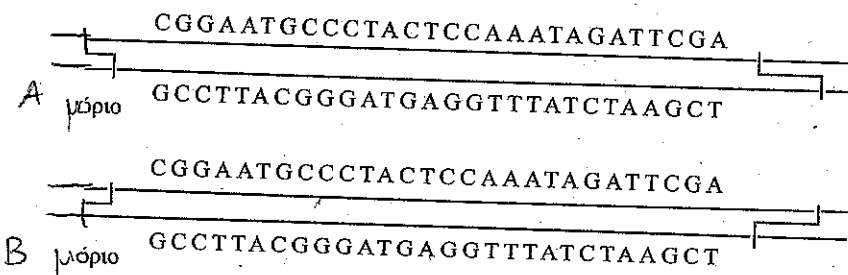
10. Δίνονται δύο παρόμοια πλασμίδια, με την εξής όμως διαφορά: Στο πλασμίδιο A το 5' άτομο άνθρακα της G συνδέεται με το 3' άτομο άνθρακα της C, ενώ στο πλασμίδιο B το 3' άτομο άνθρακα της G συνδέεται με το 5' άτομο άνθρακα της C. Ποιο είναι το ολιγοπεπτίδιο που κωδικοποιείται από κάθε πλασμίδιο;



ΠΟΔΕΙΞΗ για τη λύση

είτε την υπόδειξη της άσκησης 9:

11. 2 μόρια, τα A και B, που περιέχουν ένα μικρό γονίδιο, υπέστησαν την επίδραση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI στα σημεία που επισημαίνονται στο ακόλουθο σχήμα.



Αφού εντάχθηκαν σε πλασμίδια και στη συνέχεια μετασχημάτισαν βακτήρια, αφήθηκαν να εκφραστούν.

Να προσδιορίσετε το ολιγοπεπτίδιο που κωδικοποιεί το καθένα από τα μόρια A και B.

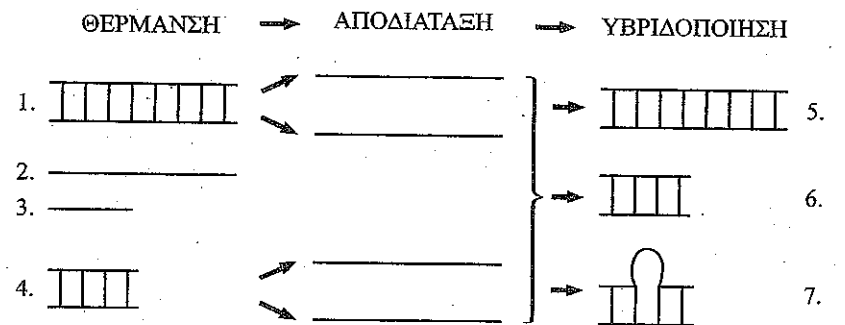
ΥΠΟΔΕΙΞΗ για τη λύση

Να εξετάσετε ποια συνέπεια μπορεί να έχει ο διαφορετικός προσανατολισμός της τεθλασμένης γραμμής στο μόριο A και στο μόριο B.

12. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκαν:

- Αντίγραφα του ίδιου μορίου DNA που περιέχει ένα μικρό γονίδιο,
 - μόρια mRNA που αποσπάστηκαν από τον πυρήνα ενός κυττάρου,
 - μόρια mRNA που αποσπάστηκαν από το κυτταρόπλασμα του ίδιου κυττάρου,
 - μόρια cDNA που αντιστοιχούν στο μικρό γονίδιο,
- σύμφωνα με το σχήμα.

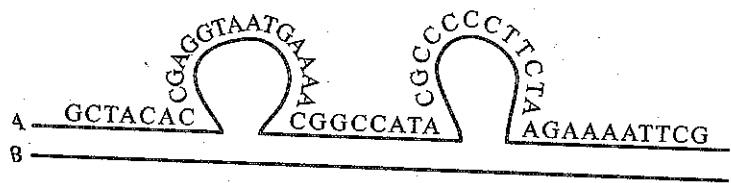
Το διάλυμα θερμάνθηκε, ώστε να προκληθεί μετουσίωση και στη συνέχεια αφήθηκε να επιστρέψει στη θερμοκρασία δωματίου, ώστε μόριά του να υβριδοποιηθούν σύμφωνα με το σχήμα:



Να απαντήσετε στις ακόλουθες ερωτήσεις:

- α. Ποια από τα μόρια 1, 2, 3, 4, αντιστοιχούν σε καθένα από τα είδη μορίων που περιείχε ο δοκιμαστικός σαλιήνας πριν από την υποβολή του διαλύματος σε θέρμανση;
- β. Ποιοι είναι οι εναλλακτικοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να εξηγηθεί η δημιουργία των μορίων 5, 6, 7 τα οποία προκύπτουν, όταν οι αποδιαταγμένοι κλώνοι του μορίου 1, του μορίου 4 και οι κλώνοι 2 και 3 αναμειχθούν μεταξύ τους;

13. Το μόριο 7 της άσκησης 12 αποδείχθηκε πως είναι το εικονιζόμενο.



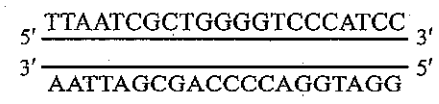
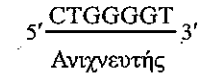
Να απαντήσετε στις ακόλουθες ερωτήσεις:

- α. Ποιοι μπορεί να είναι οι κλώνοι Α και Β;
- β. Ποια είναι η αλληλουχία των αμινοξέων του ολιγοπεπτιδίου που κωδικοποιείται από κάποια από τις δύο αλληλουχίες;

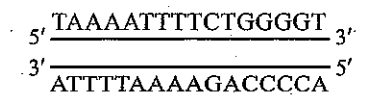
14. Δίνεται ο εικονιζόμενος ανιχνευτής καθώς και 4 (Α, Β, Γ, Δ) μόρια δίκλωνου DNA. Αφού υποβάλετε τα μόρια αυτά σε θέρμανση, ώστε να μετουσιωθούν, και αναμείξετε ό,τι προέκυψε με τον ανιχνευτή, να απαντήσετε στις ακόλουθες ερωτήσεις:

- α. Με ποια μόρια από τα Α, Β, Γ, Δ ο ανιχνευτής θα υβριδοποιηθεί;
- β. Ποια από αυτά τα υβριδοποιημένα μόρια που θα προκύψουν μπορούν να συνουν DNA, αν στο διάλυμα στο οποίο βρίσκονται προστεθούν δεσοξυριβοκλεοτίδια και DNA πολυμεράσες;

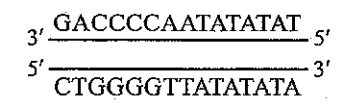
Να αιτιολογήσετε τις απαντήσεις σας, δείχνοντας τις κατευθύνσεις με τις οποίες, ενδεχομένως, θα γίνει η σύνθεση DNA.



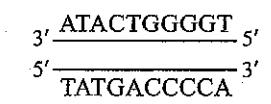
Μόριο Α



Μόριο Β



Μόριο Γ



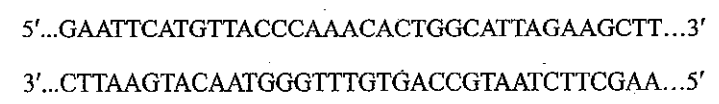
Μόριο Δ

ΥΠΟΔΕΙΞΗ για τη λύση

Αναγκαίες προϋποθέσεις για την υβριδοποίηση είναι η συμπληρωματικότητα και η αντιπαράλληλία.

Και μία από τις αναγκαίες προϋποθέσεις για τη σύνθεση DNA είναι η ύπαρξη κατάλληλου άκρου...

15. Επιθυμείτε να κλωνοποιήσετε μικρό συνεχές ευκαρυωτικό γονίδιο με αλληλουχία:

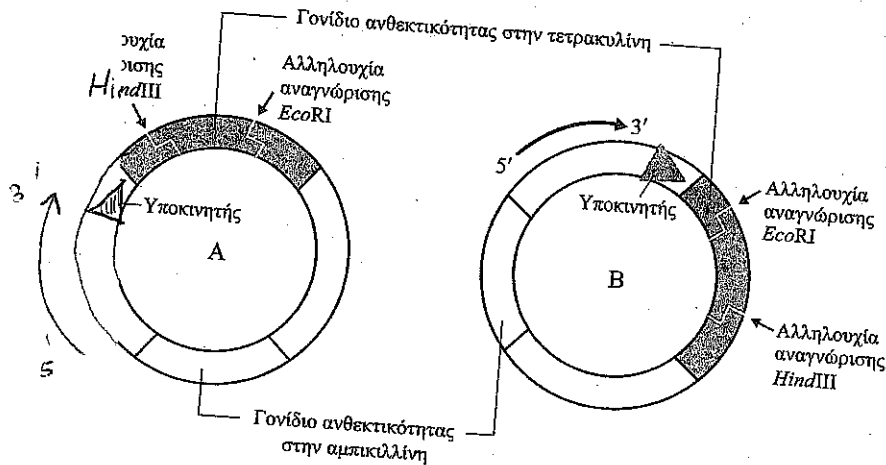


Έχοντας στη διάθεσή σας τα εικονιζόμενα πλασμίδια, τα οποία διαθέτουν θέσεις αναγνώρισης για την *EcoRI* και την *HindIII*, που αντίστοιχα έχουν αλληλουχίες αναγνώρισης:

<i>EcoRI</i>							
5'	G	A	A	T	T	C	3'
3'	C	T	T	A	A	G	5'

<i>HindIII</i>							
5'	A	A	G	C	T	T	3'
3'	T	T	C	G	A	A	5'

δακτύρια και ό,τι άλλο είναι απαραίτητο για την επίτευξη του σκοπού σας, να απαντήσετε στις ακόλουθες ερωτήσεις:



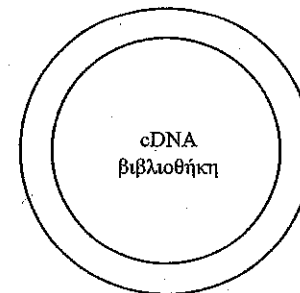
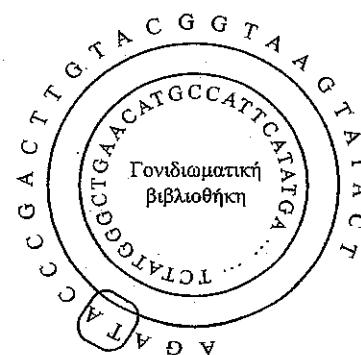
α. Για να τα δύο είδη πλασμιδίων (A, B) μπορούν να αξιοποιηθούν στην παραγωγή ενός ανασυνδυασμένου μορίου DNA;

β. Αν τα πλασμίδια που θα μπορέσουν να αξιοποιηθούν στην παραγωγή ενός ανασυνδυασμένου μορίου DNA σε ποιο ολιγοπεπτίδιο θα εκφραστούν, μετά την εισαγωγή τους στα βκτήρια-δέκτες;

16. Το εικονιζόμενο πλασμίδιο προέρχεται από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη ενός υποθετικού ευκαρυωτικού οργανισμού και περιέχει την αλληλουχία ενός μικρού γονιδίου το οποίο εκφράζεται σε ηπατικά κύτταρα.

Το γονίδιο αυτό στη cDNA βιβλιοθήκη του οργανισμού κωδικοποιεί τη σύνθεση του ολιγοπεπτιδίου:

N-Met-Gly-Trp-Pro-Phe-Ile-C.




α. Να προσδιορίσετε την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της cDNA βιβλιοθήκης για το μικρό ευκαρυωτικό γονίδιο. Να τοποθετήσετε τα νουκλεοτιδιά της στους δακτυλίους του διπλανού σχήματος, που αντιπροσωπεύει το πλασμίδιο της cDNA βιβλιοθήκης, εξηγώντας την επιλογή σας.

β. Όταν συντίθεται ο εξωτερικός κλώνος του πλασμιδίου της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, να προσδιορίσετε ποιο από τα δύο νουκλεοτιδία (A, T) που βρίσκονται πλαίσιο (βλέπε σχήμα) τοποθετήθηκε πρώτο, με δεδομένο ότι το τμήμα αυτό συντέθηκε συνεχώς.

γ. Αφού αποσπάσατε το τμήμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο του ηπατικού κυττάρου και περιέχεται στη cDNA βιβλιοθήκη, το αντιγράψατε και τα αντίγραφα του τα αναμείξατε σε διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, με ένα mRNA που προερχόταν από μυϊκά κύτταρα, ένα mRNA που προερχόταν από αδενικά κύτταρα και ένα mRNA που προερχόταν από παγκρεατικά κύτταρα. Υποβάλατε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε θέρμανση και αφήσατε στη συνέχεια τα διαλύματά τους να ψυχθούν.

Η εικόνα που πήρατε παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα:

		mRNA		
		Μυϊκού κυττάρου	Αδενικού κυττάρου	Παγκρεατικού κυττάρου
cDNA βιβλιοθήκη Γονίδιο ηπατικού κυττάρου	_____	_____	-----
		_____	-----

Με βάση τις πληροφορίες του πίνακα, να απαντήσετε στις ερωτήσεις:

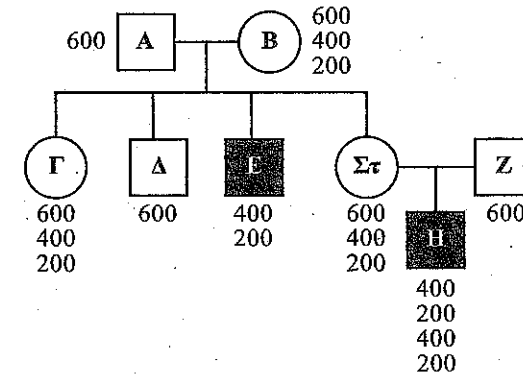
- Σε ποια άλλα κύτταρα, πέραν του ηπατικού, εκφράζεται το γονίδιο του ενδιαφέροντός μας;
- Πώς μπορεί να εξηγηθεί η διαφορετική μορφή των υβριδοποιημένων μορίων που προκύπτουν από την ανάμειξη του mRNA του μυϊκού και του αδενικού κυττάρου με το γονίδιο του ηπατικού κυττάρου που αποσπάστηκε από τη cDNA βιβλιοθήκη;

ΟΔΕΙΞΗ για τη λύση

αλληλουχία του ολιγοπεπτιδίου θα σας καθοδηγήσει να εντοπίσετε αλληλουχία του κωδικού κλώνου, επομένως και την αλληλουχία ώριμου mRNA και από εκεί την αλληλουχία του cDNA. Όλα αυτά, όμως, θα έχετε προσδιορίσει και τον 3'-5' προσανατολισμό εσωτερικού και του εξωτερικού δακτυλίου, ώστε να απαντήσετε και ερώτημα β.

17. Σε μια οικογένεια έχει καταγραφεί η ύπαρξη ενός νοσήματος που οφείλεται σε γονιδιακή μετάλλαξη. Είναι γνωστό πως η μετάλλαξη αυτή, εκτός του ότι προκαλεί το νόσημα, κάνει δυνατή την κοπή του αλληλόμορφου από μια περιοριστική ενδονουκλεάση σε δύο τμήματα. Το ένα έχει μήκος 400 ζευγών βάσεων και το άλλο μήκος 200 ζευγών βάσεων. Αντίθετα, το φυσιολογικό αλληλόμορφο δεν κόβεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση, διατηρώντας το ακέραιο μήκος του, των 600 ζευγών βάσεων.

Στο γενεαλογικό δένδρο που ακολουθεί έχουν επισημανθεί με μαύρο τα άτομα που πάσχουν και έχουν τοποθετηθεί τα τμήματα σε ζεύγη βάσεων που προκύπτουν από την επίδραση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης σε κάθε άτομο.



Με βάση τις πληροφορίες που σας παρέχει το γενεαλογικό δένδρο:

- Να παραθέσετε τους γενότυπους των ατόμων Α, Β, Γ, Δ, Ε, Στ, Ζ της οικογένειας για το συγκεκριμένο γονίδιο, αιτιολογώντας την απάντησή σας.
- Να εξηγήσετε την ύπαρξη του συγκεκριμένου προτύπου με το οποίο η περιοριστική ενδονουκλεάση κόβει τα σχετικά γονίδια στο άτομο Η.
- Να προσδιορίσετε τον αριθμό των τμημάτων μήκους 200 και 400 ζευγών βάσεων σε σωματικά κύτταρα του ατόμου Η που βρίσκονται στην αρχή της Μεσόφασης, στο τέλος της και κατά τη διάρκεια της Μετάφασης της μιτωτικής διαίρεσης.

ΟΔΕΙΞΗ για τη λύση

ρατηρείτε κάποια διαφορά στα μήκη που προκύπτουν στα αρσενικά στα θηλυκά άτομα; ναι, σκαφτείτε τι μπορεί να σημαίνει για τον τρόπο με τον οποίο ροδοτείται το νόσημα.

10. Σ είτε να εντοπίσετε το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA της τρυπτοφάνης μενοι με μια βιβλιοθήκη ευκαρυωτικού οργανισμού.

Χρησιμοποιήστε στις ακόλουθες ερωτήσεις:

α. Σε ποιο είδος βιβλιοθήκης θα εργαστείτε; Να αιτιολογήσετε την επιλογή σας.

β. Σε βιβλιοθήκη στην οποία επιλέξατε να εργαστείτε δύο είναι οι αλληλουχίες που πιθανώς κωδικοποιούν τη σύνθεση του tRNA για την τρυπτοφάνη, καθένα από τις οποίες αντιπροσωπεύεται από τα δύο ακόλουθα χαρακτηριστικά τμήματα:

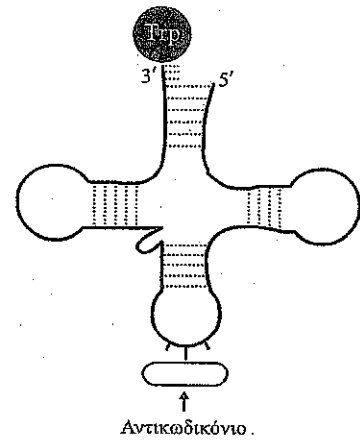
H J είναι η:

5'	T	G	C	A	T	G	C	C	T	A	G	C	A	A	G	C	C	G	A	G	C	C	G	A	G	C	C	G	A	G	C	T	A	G	C	T	A	G	A	...	3'
3'	G	A	C	G	T	A	C	G	G	A	T	C	G	T	T	C	G	G	G	C	T	C	G	G	T	C	G	G	C	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	...	5'

Και η II είναι η:

5'	T	G	C	A	T	G	C	C	T	A	G	C	A	A	G	C	C	G	A	G	C	C	G	A	G	C	C	T	A	G	C	T	A	G	C	T	A	G	A	...	3'
3'	G	A	C	G	T	A	C	G	G	A	T	C	G	T	T	C	G	G	G	C	T	C	G	G	T	C	G	G	C	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	...	5'

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η θέση του αντικωδικονίου στο tRNA είναι η εικονιζόμενη στο διπλανό σχήμα και ότι το κωδικόνιο για την τρυπτοφάνη είναι το: 5' TGG 3', να υποδείξετε έναν ανιχνευτή αποτελούμενο από 25 ριβονουκλεοτίδια που υβριδοποιούμενος με τα 25 πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικού κλώνου του γονιδίου της τρυπτοφάνης —μετρώοντας από το 5' άκρο του— θα οδηγήσει στον εντοπισμό του.



- γ. Να τοποθετήσετε στο πλαίσιο του διπλανού σχήματος το αντικωδικόνιο για την τρυπτοφάνη, εξηγώντας τον προσανατολισμό του.
- δ. Αφού εντοπίσατε το γονίδιο, το εντάξατε με μεθόδους γενετικής μηχανικής στη θέση του γονιδίου που κωδικοποιεί το tRNA της τρυπτοφάνης σε βακτήριο, για να διαπιστώσετε αν λειτουργεί όπως και στον ευκαρυωτικό οργανισμό. Ωστόσο, κατά την αντιγραφή του γονιδίου συνέβη μια γονιδιακή μετάλλαξη αντικατάστασης. Η μετάλλαξη αυτή μετάβαλε το 1ο ζευγάρι νουκλεοτιδίων C/G της τριάδας η οποία αντιστοιχεί στο αντικωδικόνιο από αυτό που φυσιολογικά ήταν σε: T/A, όπου η T βρίσκεται στον κωδικό κλώνο του μεταλλαγμένου γονιδίου του tRNA και η A στον μη κωδικό. Αν στο βακτήριο υπάρχει το γονίδιο:

5' CTATGCCCAAAGGATGACATTAA 3'
3' GATACGGGTTTCTACTGTAATT 5'

να εξηγήσετε ποια είναι η συνέπεια της μετάλλαξης στην έκφρασή του.

ΠΟΔΕΙΞΗ για τη λύση

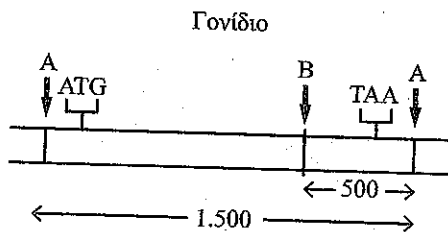
Είναι προφανές ποια βιβλιοθήκη μπορεί να περιέχει το γονίδιο για tRNA της Trp.

Για να εντοπίσετε το γονίδιο, εξετάστε ποια αλληλουχία του είναι τόσο χαρακτηριστική, ώστε να το προσδιορίζει.

19. Έχετε στη διάθεσή σας ένα γονίδιο ευκαρυωτικού οργανισμού που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας φαρμακευτικής πρωτεΐνης.

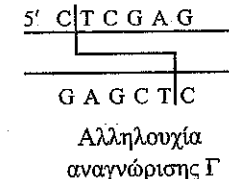
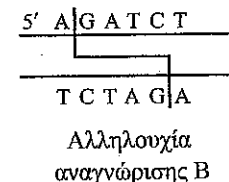
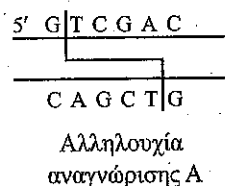
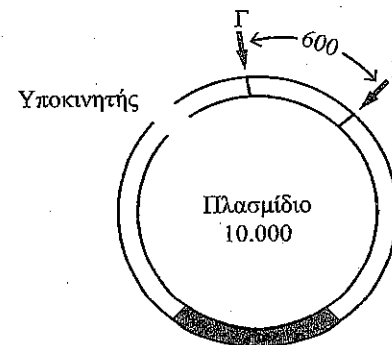
Το γονίδιο, σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα, έχει μήκος 1.500 ζευγών βάσεων και περιέχει τρεις αλληλουχίες αναγνώρισης για περιοριστικές ενδονουκλεάσες, δύο τις οποίες οι δύο αναγνωρίζονται από την περιοριστική ενδονουκλεάση A και η μία από την περιοριστική ενδονουκλεάση B.

Οι αλληλουχίες αναγνώρισης για κάθε ένζυμο, οι θέσεις τους στο γονίδιο, καθώς και οι σχετικές θέσεις του κωδικονίου έναρξης και λήξης του γονιδίου εικονίζονται στο ακόλουθο σχήμα.



Έχετε στη διάθεσή σας, επίσης, ένα πλασμίδιο μήκους 10.000 ζευγών βάσεων που φέρει αλληλουχίες αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση Γ και την περιοριστική ενδονουκλεάση Β.

Η αλληλουχία για την περιοριστική ενδονουκλεάση Γ εικονίζεται στο σχήμα.



Να απαντήσετε στις ακόλουθες ερωτήσεις:

- Ποια «στρατηγική» θα ακολουθήσετε, προκειμένου το ευκαρυωτικό γονίδιο να ενταχθεί στο πλασμίδιο;
- Μετά την εφαρμογή της «στρατηγικής» που αποφασίσατε, λάβατε 3 διαφορετικές κατηγορίες πλασμιδίων (1, 2, 3) τα οποία επεξεργαστήκατε με το ένζυμο Β, ώστε να δώσει το καθένα από αυτά τα επιμέρους τμήματα που περιλαμβάνονται στον πίνακα:

	Πλασμίδιο 1	Πλασμίδιο 2	Πλασμίδιο 3
Τμήματα μετά την επεξεργασία των πλασμιδίων με το ένζυμο Β.	10.000 ζ.β.	1.100 ζ.β.	1.600 ζ.β.
		10.400 ζ.β.	9.900 ζ.β.

Ποιο από τα τρία πλασμίδια, αν ενταχθεί σε βακτήριο –πριν φυσικά την επεξεργασία του με το ένζυμο B– θα οδηγήσει στην παραγωγή της φαρμακευτικής πρωτεΐνης του ευκαρυωτικού οργανισμού;

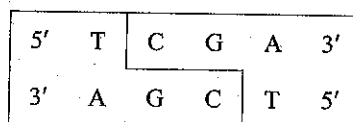
ΥΠΟΔΕΙΞΗ για τη λύση

- Προσέξτε ότι δύο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες έχουν κάτι κοινό στον τρόπο με τον οποίο κόβουν.
- Στη συνέχεια, είναι αρκετό να ενταχθεί το ευκαρυωτικό γονίδιο όπως όπως στο πλασμίδιο, για να οδηγήσει στην παραγωγή της φαρμακευτικής πρωτεΐνης;

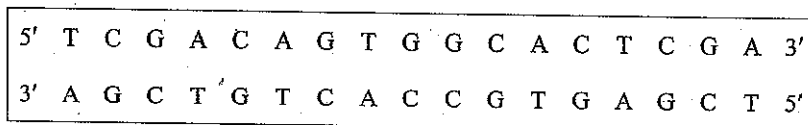
20 1. Γονίδιο που κωδικοποιεί αλληλουχία αμινοξέων η οποία περιλαμβάνει το τμήμα:

N...	Trp	Ser	Met	Pro	Lys	Val	Arg	C
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

υπέστη την επίδραση περιοριστικής ενδονουκλεάσης η οποία αναγνωρίζει την ακόλουθη αλληλουχία και κόβει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ 5'-T-C-3'.



Την επίδραση της ίδιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης υπέστη και το μόριο DNA με αλληλουχία:



Το τμήμα που αποκόπηκε αφέθηκε να συνδεθεί κατά τα γνωστά (χρήση δεσμάσης) με τα τμήματα που προέκυψαν από την κοπή του γονιδίου.

Το ανασυνδυσμένο DNA που προέκυψε, μετά την εισαγωγή του σε ένα σύστημα μετάφρασης κωδικοποίησε την παραγωγή της ακόλουθης αλληλουχίας αμινοξέων:

...Trp	Ser	Thr	Val	Ala	Leu	Asp	Ala	Lys	Gly	Thr	Met	C
--------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

Με βάση τις πληροφορίες αυτές, ποια μπορεί να είναι η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του τμήματος του γονιδίου;