

Κεφάλαιο 4

– Τεχνολογία του
ανασυνδυασμένου DNA



Τρυβλίο petri με αποικίες
μετασηματισμένων βακτηρίων
(Λευκές αποικίες – ανασυνδυασμένο πλασμίδιο,
Μαύρες αποικίες – μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο)

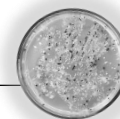
ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗΣ

για τη διδασκαλία της Βιολογίας Γ' Λυκείου
Προσανατολισμού Σπουδών Υγείας

Επιμέλεια: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΒΙΛΛΙΑΣ
Βιολόγος, M.Sc., Υποψήφιος Διδάκτωρ
gvillias.wixsite.com/education

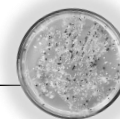


2021



Επισκόπηση της θεωρίας

- ☐ Έννοιες και χρήση όρων **κλώνου, κλωνοποίησης**
- ☐ **Περιοριστικές ενδονουκλεάσες**, χαρακτηριστικά και ιδιότητες
- ☐ Αλληλουχία αναγνώρισης της **περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI**
- ☐ **Φορείς κλωνοποίησης**, χαρακτηριστικά και ιδιότητες
- ☐ Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA: **Δημιουργία ανασυνδυασμένων μορίων DNA**
- ☐ Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA: **Επιλεκτική ανάπτυξη μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων**
- ☐ Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA: **Διάκριση ανασυνδυασμένων και μη ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης**
- ☐ **Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης**
- ☐ **Κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης**
- ☐ **Πλεονεκτήματα, μειονεκτήματα & χρησιμότητα** των παραπάνω βιβλιοθηκών (γονιδιωματικής ή cDNA)
- ☐ Προϋποθέσεις και συνθήκες **υβριδοποίησης & αποδιάταξης νουκλεϊκών οξέων**
- ☐ **Χρήση ιχνηθετημένων ανιχνευτών** για εντοπισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών
- ☐ **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**



Κατηγορίες ασκήσεων & μεθοδολογία επίλυσης αυτών (29 ασκήσεις)

1. Θραύσματα και χημικοί δεσμοί

A

Ένα δίκλωνο μόριο DNA τέμνεται από την *EcoRI* σε 10 σημεία.

- Πόσοι φωσφοδιεστερικοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου έσπασαν;
- Πόσα θραύσματα DNA προέκυψαν και πόσα από αυτά είναι κατάλληλα για ενσωμάτωση σε πλασμίδια;
- Σε ένα από τα θραύσματα μετρήθηκαν 500 νουκλεοτίδια με τη βάση κυτοσίνη και 2500 δεσμοί υδρογόνου. Πόσες βάσεις αδεΐνης περιέχονται σε αυτό;
- Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί υπάρχουν στο θραύσμα;



B

Η περιοριστική ενδονουκλεάση *KpnI* αναγνωρίζει και τέμνει (από 5' προς 3') μεταξύ G και G την αλληλουχία:



Γραμμικό μόριο DNA, που περιέχει τη συγκεκριμένη αλληλουχία τέσσερις φορές, αναμιγνύεται με *KpnI* και επωάζεται.

- Πόσα θραύσματα προκύπτουν από την επίδραση της *KpnI* στο τμήμα DNA; Να σχεδιάσετε τα άκρα των θραυσμάτων που προκύπτουν από την επίδραση της *KpnI* στο τμήμα.
- Σε ένα θραύσμα με μονόκλωνα άκρα, που προέκυψε από το συγκεκριμένο μόριο, περιέχονται 100 βάσεις A και 50 G. Πόσοι δεσμοί υδρογόνου περιέχονται στο θραύσμα;
- Πόσοι δεσμοί υδρογόνου και πόσοι φωσφοδιεστερικοί θα σπάσουν στην περίπτωση που σε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με ένα από τα θραύσματα του τμήματος DNA επιδράσει πάλι η *KpnI*; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

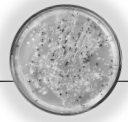


Γ

Στο παρακάτω γραμμικό τμήμα DNA επιδρούμε με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*.



- Ποια θα είναι τα θραύσματα (κομμάτια DNA) που θα δημιουργηθούν από τη δράση του ενζύμου; Πόσα από αυτά είναι κατάλληλα για την ενσωμάτωση σε πλασμίδιο που έχει κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση;



- β. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί υδρολύθηκαν (έσπασαν) ;
 γ. Να γράψεις τα θραύσματα που θα προκύψουν μετά την επίδραση της *EcoRI* εάν το μόριο είναι κυκλικό.



Η περιοριστική ενδονουκλεάση *NotI* αναγνωρίζει και τέμνει την αλληλουχία:

5' GCGGCCGC 3'
 3' CGCCGGCG 5'

Η περιοριστική ενδονουκλεάση *HgaI* αναγνωρίζει και τέμνει την αλληλουχία:

5' GACGC 3'
 3' CTGCG 5'

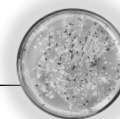
Σε τρία αντίγραφα ενός ινιδίου χρωματίνης επιδρά ξεχωριστά η *NotI*, η *HgaI* και η *EcoRI*.

- α. Ποια από τις τρεις περιοριστικές ενδονουκλεάσες θα δημιουργήσει τον μεγαλύτερο και ποια τον μικρότερο αριθμό θραυσμάτων στο ινίδιο που τέμνει και γιατί;
 β. Ποια θραύσματα θα έχουν μεγαλύτερο μήκος;



- Ελέγχουμε τι μορφή έχει το μόριο DNA που θα κοπεί από την περιοριστική ενδονουκλεάση, εάν δηλαδή αυτό είναι κυκλικό ή γραμμικό. Στα κυκλικά μόρια ο αριθμός των θραυσμάτων συμπίπτει με τον αριθμό των θέσεων αναγνώρισης και κοπής της περιοριστικής ενδονουκλεάσης πάνω στο μόριο DNA, ενώ στα γραμμικά, υπάρχει ένα θραύσμα παραπάνω.
- Λαμβάνουμε υπόψιν ότι όταν κόβουμε γραμμικά μόρια DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, προκύπτουν και ακριανά θραύσματα στα οποία οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες έχουν επιδράσει μόνο από τη μία τους πλευρά.
- Όσο μεγαλύτερη σε μήκος είναι η αλληλουχία αναγνώρισης μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης, τόσο πιο σπάνια αναμένεται να είναι από στατιστικής πλευράς και η εμφάνισή της σε ένα τυχαίο μόριο DNA,



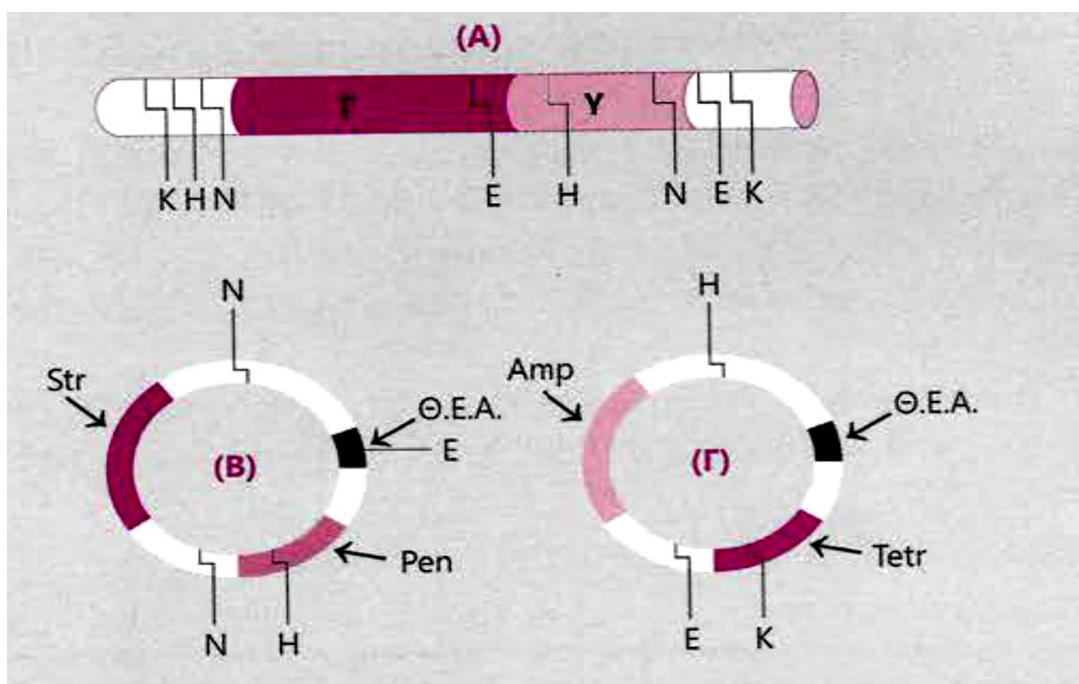


2. Επιλογή περιοριστικής ενδονουκλεάσης, φορέα κλωνοποίησης, και αντιβιοτικού για επιλογή βακτηριακών κλώνων

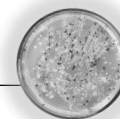
A

Τέσσερα είδη περιοριστικών ενδονουκλεασών (K, H, N, E) τέμνουν τμήμα DNA προκαρυωτικού κυττάρου (A) και τα πλασμίδια Β και Γ, όπως απεικονίζεται στο σχήμα. Τα πλασμίδια φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας στη στρεπτομυκίνη (*Str*), πενικιλίνη (*Pen*), αμπικιλίνη (*Amp*), τετρακυκλίνη (*Tetr*) και μία θέση έναρξης αντιγραφής (Θ.Ε.Α.). Ποιοι συνδυασμοί πλασμιδίων, ενδονουκλεασών και αντιβιοτικών είναι κατάλληλοι για:

- την κλωνοποίηση αποκλειστικά των αλληλουχιών του γονιδίου;
- την κλωνοποίηση αποκλειστικά του υποκινητή του γονιδίου;
- την παραγωγή της πρωτεΐνης σε βακτήρια – ξενιστές;



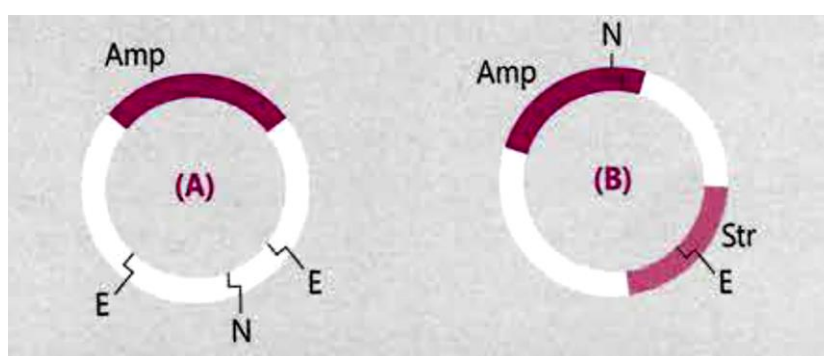
-----∞-----

**B**

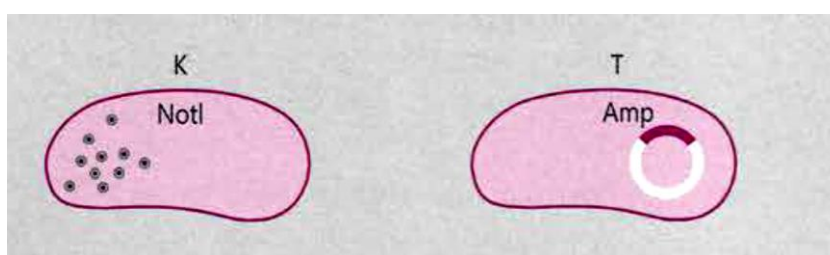
Στο σχήμα παριστάνεται τμήμα που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και οι θέσεις που τέμνεται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* (θέση E) και *NotI* (θέση N):



Στο επόμενο σχήμα παριστάνονται δύο πλασμίδια που είναι πιθανοί φορείς κλωνοποίησης του τμήματος, τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που φέρουν (*Amp* και *Str*) και οι θέσεις που οι *EcoRI* και *NotI* τα τέμνουν:



Επίσης, απεικονίζονται τα βακτήρια K και T που είναι πιθανοί ξενιστές για την κλωνοποίηση του τμήματος. Στο κυτταρόπλασμα του K ανιχνεύονται ίχνη της ενδονουκλεάσης *NotI*, ενώ στο T προϋπάρχει πλασμίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.



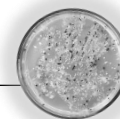
α. Ποιος συνδυασμός περιοριστικής ενδονουκλεάσης – πλασμιδίου αποκλείεται να χρησιμοποιηθεί για την κλωνοποίηση του τμήματος, ανεξαρτήτως κυττάρου – ξενιστή;

β. Είναι δυνατή η κλωνοποίηση του τμήματος με τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου A με τη *NotI* και τον μετασχηματισμό του βακτηρίου K;

γ. Είναι δυνατή η κλωνοποίηση του τμήματος με τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου B με τη βοήθεια της *EcoRI* και τον μετασχηματισμό του βακτηρίου T;

δ. Πώς είναι δυνατός ο μετασχηματισμός του βακτηρίου T; Με ποιο αντιβιοτικό θα γίνει, στην περίπτωση αυτή, η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων; Σε κάθε περίπτωση να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.

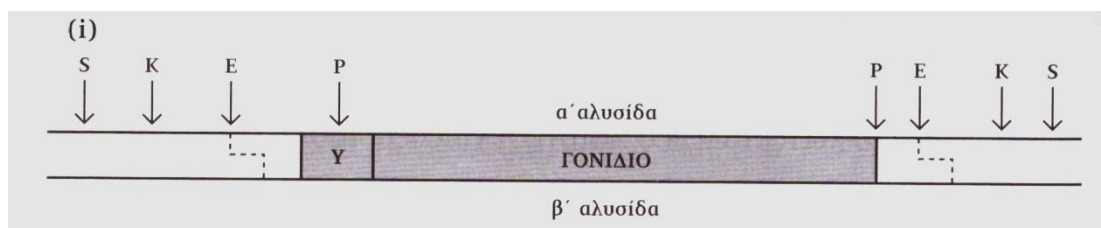
-----∞-----



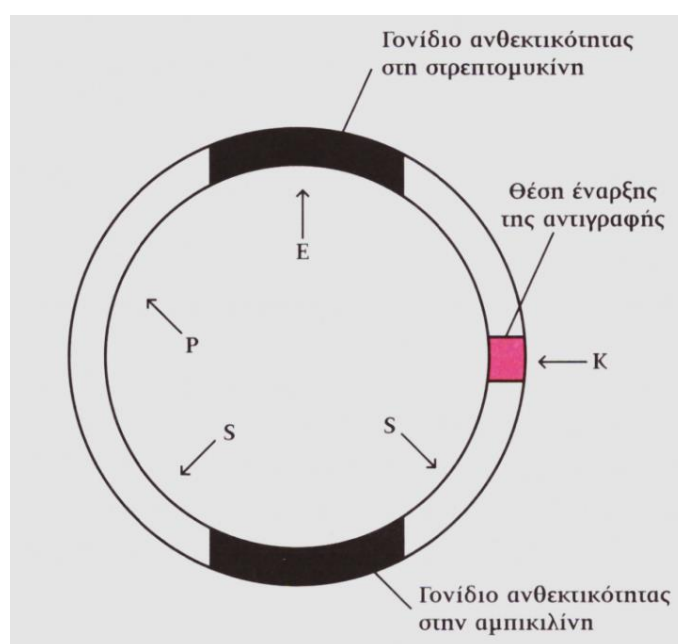
Γ

Στα ακόλουθα σχήματα παριστάνονται:

Στο 1ο σχήμα, τμήμα DNA στο οποίο περιέχεται ένα συνεχές γονίδιο και ο υποκινητής του Y.



Στο 2ο σχήμα, πλασμίδιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης του εν λόγω γονιδίου με σκοπό την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί σε βακτήριο-ξενιστή.



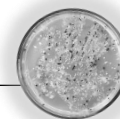
Το σημείο E υποδηλώνει τη θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI*.

Στο σχήμα (i) με διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται το κόψιμο από την *EcoRI*. Τα σημεία K, P, και S υποδεικνύουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *KpnI*, *PstI* και *SacI* αντίστοιχα.

α. Ποια από τις δύο αλυσίδες του γονιδίου είναι η μη κωδική; Να δικαιολογήσεις την απάντησή σου.

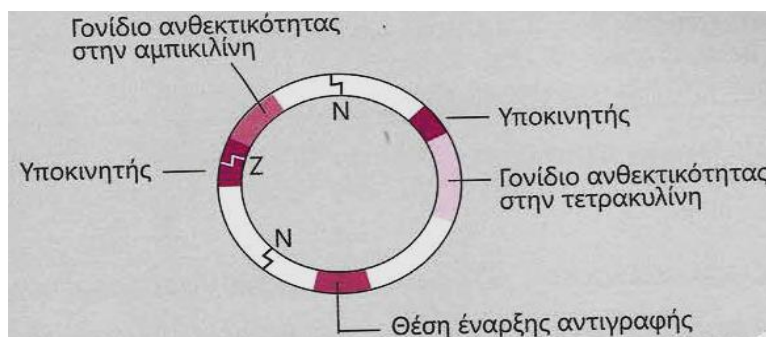
β. Ποιο από τα τέσσερα ένζυμα είναι καταλληλότερο για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA; Να δικαιολογήσεις την απάντησή σου.

-----ΩΩ-----



Δ

Το πλασμίδιο που απεικονίζεται στο σχήμα χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης με τη χρήση μίας περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Στο σχήμα απεικονίζονται επίσης δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που φέρει το πλασμίδιο, οι υποκινητές τους, η θέση έναρξης αντιγραφής του και οι θέσεις που τέμνουν το πλασμίδιο οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες N και Z.



Αντλώντας πληροφορίες από το σχήμα, να εξηγήσετε ποια περιοριστική ενδονουκλεάση (N ή Z) είναι κατάλληλη για την κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Επίσης, να εξηγήσετε τον τρόπο με τον οποίο επιλέγονται τα βακτήρια που μετασχηματίζονται με το εν λόγω πλασμίδιο από εκείνα που δεν δέχθηκαν πλασμίδιο.

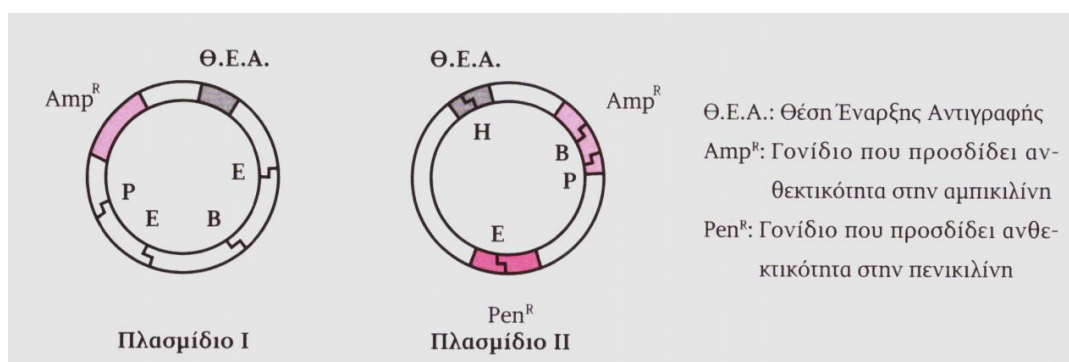


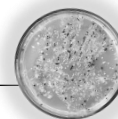
Ε

Η αλληλουχία III της εικόνας 4 είναι τμήμα ενός μορίου DNA, που αντιγράφεται σε Στο σχήμα που ακολουθεί παριστάνεται μόριο DNA από το οποίο θέλουμε να κλωνοποιήσουμε το κόκκινο τμήμα.



Έχουμε στη διάθεσή μας τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* που αναγνωρίζει την αλληλουχία E, την *BamHI* που αναγνωρίζει την αλληλουχία B, την *HindIII* που αναγνωρίζει την αλληλουχία H και την *PstI* που αναγνωρίζει την αλληλουχία P. Έχουμε επίσης στη διάθεσή μας τα ακόλουθα δύο πλασμίδια, καθώς και το βακτήριο A που παράγει την περιοριστική ενδονουκλεάση *BamHI* και το βακτήριο B που εμφανίζει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.



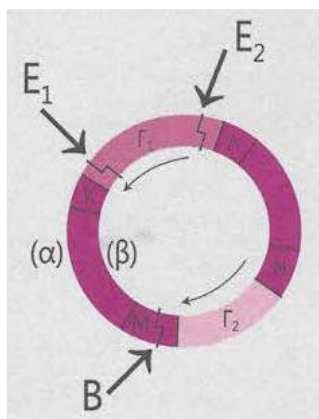


- α. Ποιος (ποιοι) συνδυασμός (συνδυασμοί) περιοριστικής ενδονουκλεάσης και πλασμιδίου δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί (χρησιμοποιηθούν) για την κλωνοποίηση του τμήματος DNA;
- β. Είναι δυνατή η κλωνοποίηση του τμήματος DNA με τη χρησιμοποίηση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *BamHI*, του πλασμιδίου I και του βακτηρίου A;
- γ. Είναι δυνατή η κλωνοποίηση του τμήματος DNA με τη χρησιμοποίηση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI*, του πλασμιδίου II και του βακτηρίου B;
- δ. Ποιος συνδυασμός περιοριστικής ενδονουκλεάσης, πλασμιδίου, βακτηρίου και αντιβιοτικού είναι ο κατάλληλος για την κλωνοποίηση του τμήματος DNA και την επιλογή των βακτηρίων που έχουν μετασχηματιστεί;



ΣΤ

Στο πλασμίδιο του σχήματος απεικονίζονται δύο γονίδια (Γ_1 , Γ_2) και οι αλληλουχίες K, Λ, Μ, Ν που βρίσκονται εκατέρωθεν των γονιδίων. Το γονίδιο Γ_1 ευθύνεται για τη μεταφορά του πλασμιδίου στα βακτήρια, ενώ το Γ_2 είναι το μόνο γονίδιό του που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό. Οι θέσεις E_1 , E_2 αποτελούν θέσεις αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI* στο πλασμίδιο και Β η θέση αναγνώρισης της *BamHI*.

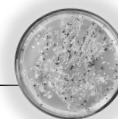


- α. Να εξηγήσετε ποια γονίδια και ποιες ρυθμιστικές αλληλουχίες του πλασμιδίου πρέπει απαραίτητα να είναι ενεργές προκειμένου αυτό να αποτελέσει κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης.
- β. Δεδομένου ότι τα βέλη υποδεικνύουν τη φορά της μεταγραφής, να εξηγήσετε ποια αλυσίδα (α ή β) είναι σε κάθε περίπτωση η κωδική αλυσίδα των γονιδίων Γ_1 και Γ_2 .
- γ. Ποιες από τις αλληλουχίες K, Λ, Μ, Ν αντιστοιχούν στους υποκινητές των γονιδίων;
- δ. Να εξηγήσετε γιατί δεν επιλέγεται η *EcoRI* ή η *BamHI* για τον ανασυνδυασμό αυτού του πλασμιδίου.



- Στην περίπτωση που επιθυμούμε να εκφραστεί το γονίδιο που εισάγουμε στον φορέα κλωνοποίησης και να παράγουμε την όποια πρωτεΐνη / ολιγοπεπτίδιο κωδικοποιείται από αυτό, θα πρέπει απαραίτητα το γονίδιο να συνοδεύεται από υποκινητή στο 5' άκρο της κωδικής του αλυσίδας.
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες που κόβουν τη θέση έναρξης της αντιγραφής (Θ.Ε.Α.) του πλασμιδίου, κατακερματίζουν το φορέα κλωνοποίησης σε δύο ή περισσότερα θραύσματα, ή εντοπίζονται στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων-ξενιστών, δεν είναι επιλέξιμες.
- Σε φορείς κλωνοποίησης που περιέχουν δύο γονίδια επιλογής (π.χ. γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά), «θυσιάζουμε» συνήθως το ένα από αυτά για την ενσωμάτωση του επιθυμητού ξένου τμήματος DNA.





3. Χάρτες κοπής περιοριστικών ενδονουκλεασών.

A

Ένα πλασμίδιο υπόκειται στη δράση της *EcoRI*, οπότε παράγονται δύο τμήματα των 2kb και 6kb αντίστοιχα (kb = χιλιάδες ζεύγη βάσεων). Όταν το ίδιο πλασμίδιο υπόκειται στη δράση της *Hind III*, παράγονται δύο τμήματα των 1,5kb και 6,5kb. Από την ταυτόχρονη επώαση του πλασμιδίου με τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται τέσσερα τμήματα των 0,5kb, 1kb, 1,5kb και 5kb. Απεικονίστε στο πλασμίδιο τις σχετικές θέσεις αναγνώρισης των δύο ενδονουκλεασών.

B

Γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA μήκους 16kb (kb = χιλιάδες ζεύγη βάσεων) υπόκειται στη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης A, οπότε δημιουργούνται 2 θραύσματα των 10 και 6kb. Όταν επιδράσει σε αυτό η περιοριστική ενδονουκλεάση B, δημιουργούνται 2 θραύσματα των 4 και 12kb. Πόσα θραύσματα θα δημιουργηθούν αν επιδράσουν ταυτόχρονα στο μόριο τα ένζυμα A και B;

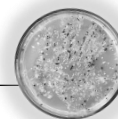
Γ

Ένα δίκλωνο μόριο DNA κόβεται από τη *Hind III* και δίνει τμήματα 15kb, 18kb, 7kb. Όταν το ίδιο μόριο DNA κόβεται μόνο από την *EcoRI*, προκύπτουν δύο τμήματα, 18kb και 22kb. Όταν κόβουμε ταυτόχρονα και με τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες, προκύπτουν 4 τμήματα με τα εξής μεγέθη: 18kb, 15kb, 4kb, 3kb. Να δείξεις πού βρίσκονται στο μόριο DNA οι αλληλουχίες τις οποίες αναγνωρίζουν τα δύο ένζυμα.



- Πριν από το σχεδιασμό του χάρτη κοπής των περιοριστικών ενδονουκλεασών ενός δίκλωνου μορίου DNA, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε εάν το μόριό μας είναι γραμμικό ή κυκλικό.
- Ξεκινάμε την αποτύπωση του χάρτη με την τοποθέτηση σε αυτόν όλων των θέσεων κοπής της μίας περιοριστικής ενδονουκλεάσης και στη συνέχεια ολοκληρώνουμε το χάρτη εισάγοντας τις θέσεις κοπής της δεύτερης περιοριστικής ενδονουκλεάσης, μετά από κατάλληλες δοκιμές.
- Σχεδιάζουμε το χάρτη αυτό υπό κλίμακα, τοποθετώντας τις θέσεις κοπής των περιοριστικών ενδονουκλεασών με τέτοιο τρόπο ώστε το μήκος των διαφορετικών θραυσμάτων που προκύπτουν να είναι αναλογικά σωστό μεταξύ τους.

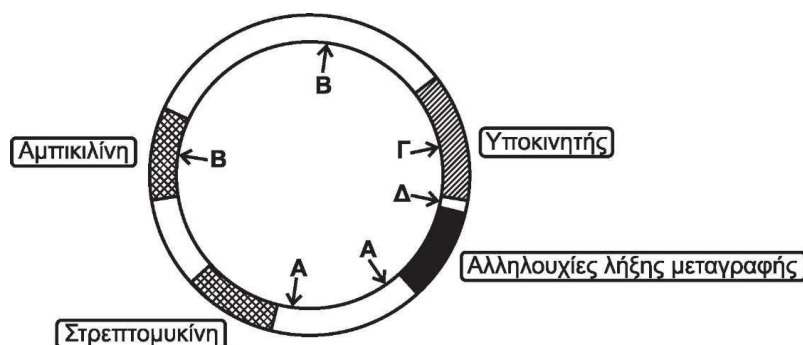




4. Αλληλουχίες γονιδίων και ενσωμάτωση σε φορείς κλωνοποίησης

A

Στην παρακάτω εικόνα δίνεται ένα πλασμίδιο που φέρει γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και στρεπτομυκίνη, έναν υποκινητή και αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής. Στις θέσεις Α, Β, Γ και Δ βρίσκονται αλληλουχίες οι οποίες αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες α, β, γ και δ αντίστοιχα. Το πλασμίδιο αυτό το χρησιμοποιούμε ως φορέα για την κλωνοποίηση ενός ανθρώπινου συνεχούς γονιδίου με σκοπό να παράγουμε ένα ολιγοπεπτίδιο σε καλλιέργειες *in vitro*. Στα βακτήρια που θα χρησιμοποιηθούν για τον μετασχηματισμό περιέχονται όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες που απαιτούνται για τη μεταγραφή και δεν περιέχονται πλασμίδια.



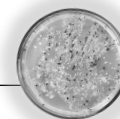
- α. Ποια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες α, β, γ ή δ είναι η κατάλληλη για τη χρήση του πλασμιδίου αυτού ως φορέα κλωνοποίησης; Να αιτιολογήσεις την απάντησή σου.
- β. Με ποιον τρόπο μπορούμε να επιλέξουμε τους βακτηριακούς κλώνους που έχουν προσλάβει πλασμίδιο (ανασυνδυασμένο ή μη) από τους κλώνους που δεν έχουν προσλάβει πλασμίδιο; Να αιτιολογήσεις την απάντησή σου.

Στο παραπάνω πλασμίδιο επιθυμούμε να εισαγάγουμε το τμήμα DNA που ακολουθεί και το οποίο περιέχει ένα συνεχές ανθρώπινο γονίδιο.

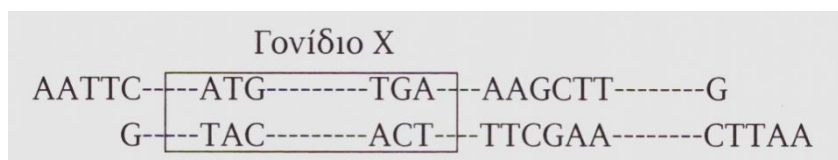
Αλυσίδα I	OH-GCCAATATTTAAATGAGCATGCCGTAGGAATATTCGG
Αλυσίδα II	CGGTTATAATTTACTCGTACGGCATCCTTATAAGCC

- γ. Να εντοπίσεις την κωδική αλυσίδα του παραπάνω γονιδίου. Να γράψεις το mRNA και να σημειώσεις τον προσανατολισμό του. Να αιτιολογήσεις την απάντησή σου.
- δ. Να γράψεις την αλληλουχία μήκους έξι ζευγών βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση στο παραπάνω τμήμα DNA, και την οποία προσδιόρισες στο ερώτημα α για την κλωνοποίηση του γονιδίου.
- ε. Να εξηγήσεις γιατί η κλωνοποίηση του παραπάνω γονιδίου στο δοθέν πλασμίδιο μπορεί να οδηγήσει
- στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων που παράγουν το ολιγοπεπτίδιο και
 - στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων που δεν παράγουν το ολιγοπεπτίδιο παρόλο που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

-----ΩΩ-----

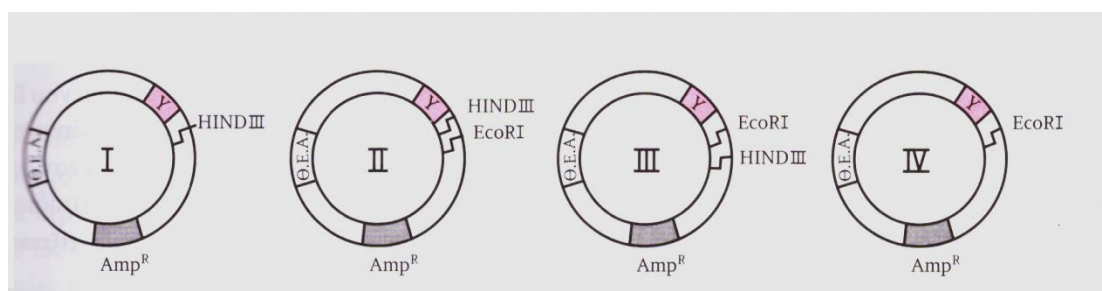
**B**

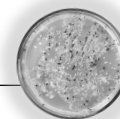
Το παρακάτω τμήμα DNA 3.500 βάσεων προέρχεται από την επίδραση της *EcoRI* στο ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA. Το τμήμα αυτό επωάζεται σε διάλυμα που περιέχει την περιοριστική ενδονουκλεάση *Hind III*, η οποία αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-AAGCTT-3' (και τη συμπληρωματική της) και κόβει μεταξύ των νουκλεοτιδίων που φέρουν αδενίνη. Μετά το κόψιμο προκύπτουν δύο τμήματα, το Β και το Γ. Το τμήμα Β που περιέχει γονίδιο Χ χωρίς τον υποκινητή του αποτελείται από 1.408 βάσεις, από τις οποίες οι 403 είναι αδενίνες.



Το γονίδιο Χ είναι ένα συνεχές γονίδιο υπεύθυνο για τη σύνθεση ενός ενζύμου που λαμβάνει μέρος (χωρίς να έχει υποστεί κάποια τροποποίηση μετά τη βιοσύνθεσή του) στην οξειδωτική φωσφορυλίωση.

- α.** Πόσοι δεσμοί υδρογόνου και πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί υπάρχουν στο τμήμα Β;
- β.** Ποιο ή ποια από τα ακόλουθα πλασμίδια και ποια /ποιες ενδονουκλεάση /-σες θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί /-ούν κατά τη δημιουργία ανασυνδυασμένου με το τμήμα Β μορίου ώστε να εξασφαλιστεί ότι το ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο Χ θα παράγεται από τα βακτήρια τα οποία θα δεχθούν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;

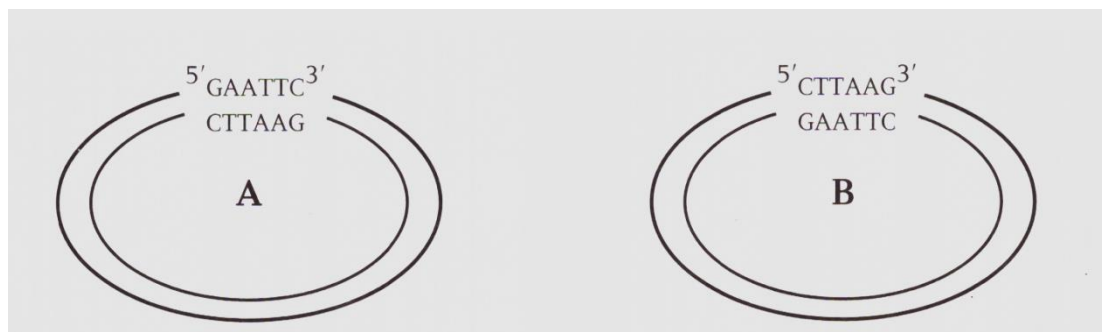




Γ Δίνεται το παρακάτω τμήμα βακτηριακού DNA, το οποίο κωδικοποιεί ένα ολιγοπεπτίδιο:

Αλυσίδα 1: GTTGAATTCTTAGCTTAAGTCGGGCATGAATTCTC
Αλυσίδα 2: CAACTTAAGAATCGAATTCAGCCCGTACTTAAGAG

Το παραπάνω τμήμα DNA κόβεται με το ένζυμο *EcoRI*, προκειμένου να ενσωματωθεί σε ένα από τα δύο πλασμίδια Α και Β που δίνονται παρακάτω.



Ποιο από τα δύο πλασμίδια θα επιλέξεις για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου πλασμιδίου; Να αιτιολογήσεις την απάντησή σου. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί (φ.δ.) θα διασπαστούν στο πλασμίδιο που επέλεξες και πόσοι θα δημιουργηθούν κατά τον σχηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου;



Δ Δίνονται τρία γονίδια Α, Β, Γ, το καθένα από τα οποία κωδικοποιεί ένα μόριο RNA. Ένα από τα γονίδια κωδικοποιεί mRNA, είναι συνεχές και από την μετάφρασή του παράγεται ένα ολιγοπεπτίδιο. Το άλλο γονίδιο κωδικοποιεί το tRNA που μεταφέρει τη μεθειονίνη. Το γονίδιο που απομένει κωδικοποιεί το rRNA της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος, το οποίο rRNA συνδέεται με πέντε νουκλεοτίδια στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του mRNA από την μετάφραση του οποίου παράγεται το ολιγοπεπτίδιο.

Γονίδιο Α

αλυσίδα 1 GAATTCGGAACATGCCCCGGGTCAGCCTGAGAGAATTCCC
αλυσίδα 2 CTTAAGCCTTGTACGGGCCAGTCGGACTCTCTTAAGGG

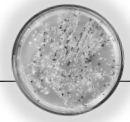
Γονίδιο Β

αλυσίδα 1 CTTATACGCAATGTTCTTAAA
αλυσίδα 2 GAATATGCGTTACAAGGATT

Γονίδιο Γ

αλυσίδα 1 ACTATGCACTTCCGGCCAA
αλυσίδα 2 TGATACGTGAAGGCCGTT

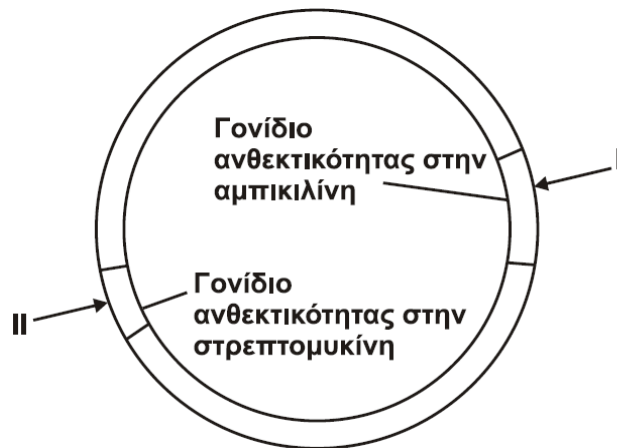
α. Να γράψετε ποιο από τα τρία γονίδια κωδικοποιεί το mRNA. Να γράψετε το mRNA που προκύπτει από την μεταγραφή του γονιδίου και να σημειώσετε τα άκρα του.



β. Να γράψετε ποιο από τα τρία γονίδια κωδικοποιεί το tRNA και να εξηγήσετε ποια από τις δύο αλυσίδες του γονιδίου είναι η μεταγραφόμενη.

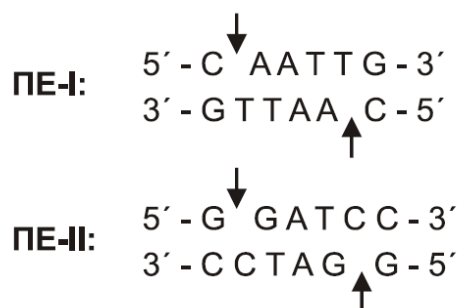
γ. Να γράψετε ποιο από τα τρία γονίδια κωδικοποιεί το rRNA και να εξηγήσετε ποια από τις δύο αλυσίδες του γονιδίου είναι η μεταγραφόμενη.

Επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε το γονίδιο A, χρησιμοποιώντας ως φορέα κλωνοποίησης το πλασμίδιο του Σχήματος 1. Διαθέτουμε τρεις διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες τις I, II και *EcoRI*.



Σχήμα 1

Το πλασμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γονίδιο ανθεκτικότητας στην στρεπτομυκίνη και δύο θέσεις αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες ΠΕ-I και ΠΕ-II. Η περιοριστική ενδονουκλεάση I διαθέτει θέση αναγνώρισης μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας της αμπικιλίνης, ενώ η περιοριστική ενδονουκλεάση II διαθέτει θέση αναγνώρισης μέσα στο γονίδιο της στρεπτομυκίνης. Δίνονται οι αλληλουχίες έξι ζευγών βάσεων που αναγνωρίζουν και επιδρούν οι ΠΕ-I και ΠΕ-II. Τα βέλη υποδεικνύουν τη θέση που δρα η κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση (ΠΕ) στην αλληλουχία αναγνώρισης.

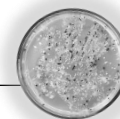


δ. i) Να γράψετε ποια ή ποιες ΠΕ θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμίδιου.

ii) Ποια/ποιες είναι η/οι αλληλουχία/-ες έξι ζευγών βάσεων που εμφανίζεται/-ονται εκατέρωθεν του τμήματος του γονιδίου, στην περιοχή σύνδεσης των μονόκλωνων άκρων μετά την ενσωμάτωσή του στο πλασμίδιο με τη δράση της DNA δεσμάσης;

iii) Ποιο είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης της ΠΕ-I στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο; Δικαιολογήστε την απάντησή σας.

-----∞-----

**E**

Παρακάτω δίνεται η αλληλουχία ενός υποθετικού γονιδίου προκαρυωτικού οργανισμού, το οποίο κωδικοποιεί ένα μικρό πεπτιδίο.

A

...GAATTTCGAATCCTAGCGCACGACAACCATTTTCGAATTCGCGC...
 ...CTTAAGCTTAGGATCGCGTGCTGTTGGTAAAGCTTAAGCGCG...

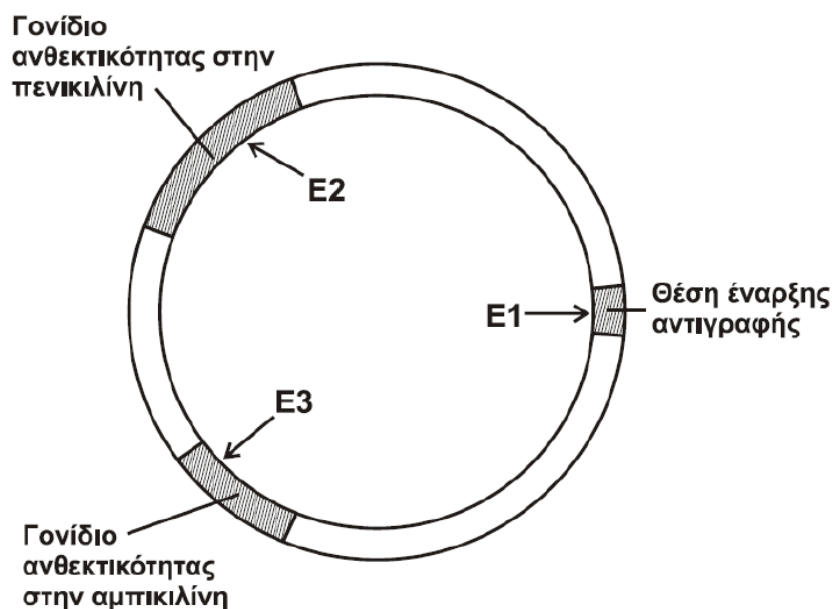
B

α. Να προσδιορίσετε την κωδική και την μη κωδική αλυσίδα του παραπάνω γονιδίου και να σημειώσετε τους προσανατολισμούς των άκρων του.

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

β. Να γράψετε το m-RNA που παράγεται από τη μεταγραφή του παραπάνω γονιδίου και τον αριθμό των αμινοξέων του πεπτιδίου που προκύπτει από τη μετάφρασή του. Δεν απαιτείται αιτιολόγηση.

γ. Αν η μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου αντιγράφεται με συνεχή τρόπο, να βρείτε σε ποια από τις δύο θέσεις (A ή B) βρίσκεται η θέση έναρξης της αντιγραφής και να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

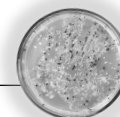


Στο παραπάνω σχήμα απεικονίζεται ένα πλασμίδιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης. Το πλασμίδιο αυτό περιέχει τις θέσεις που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες E1, E2 και E3, των οποίων οι αλληλουχίες αναγνώρισης είναι:

E1: 5' GAATTC 3' **E2:** 5' GCGC 3' **E3:** 5' TTCGAA 3'
 3' CTTAAG 5' 3' CGCG 5' 3' AAGCTT 5'

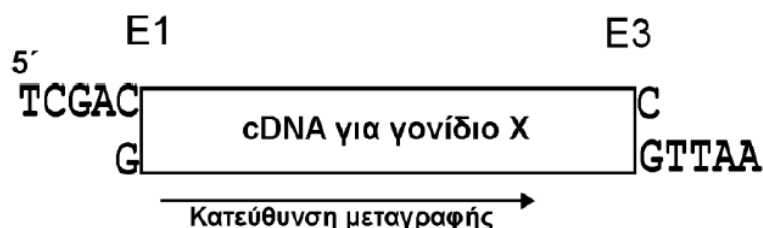
δ. Να εξηγήσετε ποιο από τα τρία ένζυμα (E1, E2, E3) είναι κατάλληλο για την κλωνοποίηση του γονιδίου με σκοπό την παραγωγή πεπτιδίου σε βακτήρια ξενιστές.

-----∞-----



ΣΤ

Έστω γονίδιο Χ (ασυνεχές) που κωδικοποιεί μια φαρμακευτική πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται σε ένα ανθρώπινο κυτταρικό τύπο. Επιδιώκοντας την κλωνοποίηση του γονιδίου αυτού, συνθέτουμε το δίκλωνο cDNA του γονιδίου όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 1.



Εικόνα 1

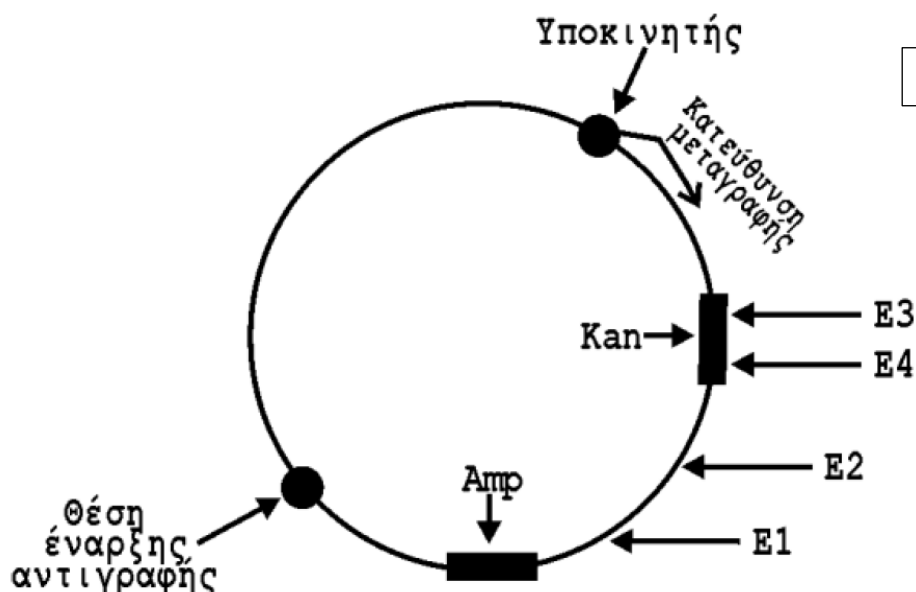
Το δίκλωνο cDNA φέρει στα άκρα του και εκτός των περιοχών του γονιδίου, θέσεις που αναγνωρίζουν δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες (E1 και E3), οι οποίες, όταν επιδράσουν στο δίκλωνο cDNA, αφήνουν τα μονόκλωνα άκρα που φαίνονται παραπάνω.

α. Ποιες είναι οι αλληλουχίες των 6 ζευγών βάσεων που αναγνωρίζει η κάθε μια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (E1 και E3) που χρησιμοποιήθηκαν;

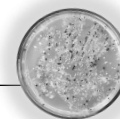
β. Ποια από τα παρακάτω δεν υπάρχουν στο cDNA του γονιδίου Χ;

- 1) υποκινητής, 2) εξώνια, 3) εσώνια, 4) 5' αμετάφραστη περιοχή,
- 5) 3' αμετάφραστη περιοχή.

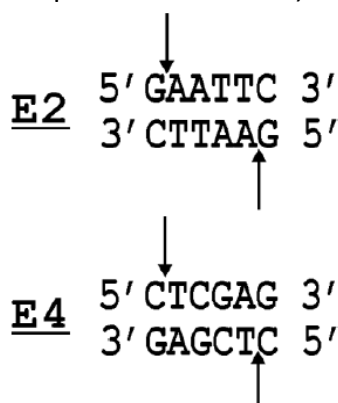
γ. Θέλουμε να ενσωματώσουμε το cDNA του γονιδίου Χ στο πλασμίδιο της παρακάτω Εικόνας 2. Το πλασμίδιο περιέχει τις θέσεις που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες E1, E2, E3 και E4. Στις θέσεις *Amp* και *Kan* του πλασμιδίου βρίσκονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη, αντίστοιχα.



Εικόνα 2

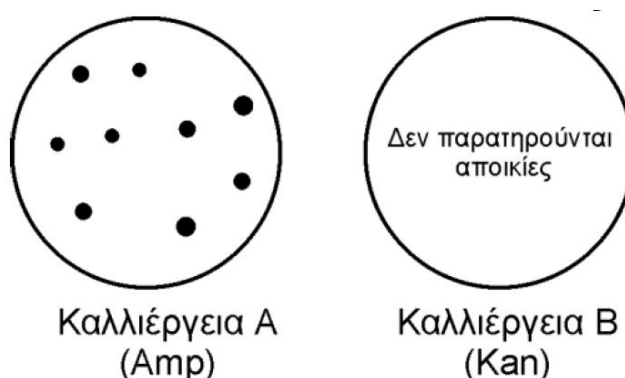


Στην Εικόνα 3 που ακολουθεί απεικονίζονται οι ειδικές αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες E2 και E4 και με τα βέλη υποδηλώνονται οι θέσεις που κόβονται οι αλυσίδες.



Εικόνα 3

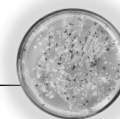
- δ. Ποιο ή ποια ένζυμο θα χρησιμοποιήσουμε για να κόψουμε το πλασμίδιο έτσι ώστε να ενσωματώσει το DNA της Εικόνας 1 και να επιτύχουμε την έκφραση του από τον υποκινητή του πλασμιδίου της Εικόνας 2; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.
- ε. Στη συνέχεια της διαδικασίας κλωνοποίησης του γονιδίου μετασχηματίζουμε κύτταρα του βακτηρίου *E. coli* (*Escherichia coli*). Τα μισά από αυτά τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (Εικόνα 4, καλλιέργεια Α) και τα άλλα μισά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το αντιβιοτικό καναμυκίνη (Εικόνα 4, καλλιέργεια Β). Να εξηγήσετε τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των καλλιεργειών Α και Β όπως αυτά απεικονίζονται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4

- Ένα τμήμα DNA το οποίο είναι κομμένο και στα δυο του άκρα με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, κατά την εισαγωγή του σε φορέα κλωνοποίησης που έχει προηγουμένως κοπεί σε μοναδική θέση με το ίδιο ένζυμο, μπορεί να ενσωματωθεί με 2 διαφορετικούς τρόπους: «κανονικά» και «ανεστραμμένα».
- Υπάρχουν περιοριστικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν και κόβουν διαφορετικές αλληλουχίες, αλλά σχηματίζουν τα ίδια μονόκλωνα άκρα. Στις περιπτώσεις αυτές, αν και κομμένα με διαφορετικό ένζυμο, τα θραύσματα αυτά μπορούν να ενωθούν μεταξύ τους.

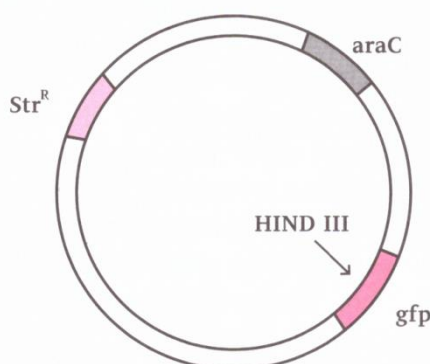




5. Εναλλακτικοί τρόποι επιλογής βακτηριακών κλώνων

A

Ένας ερευνητής θέλει να κλωνοποιήσει μία αλληλουχία μήκους 500 ζευγών βάσεων η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ δύο αλληλουχιών τις οποίες αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση *Hind III*. Για την κλωνοποίηση της αλληλουχίας αυτής, το πλασμίδιο που εικονίζεται παρακάτω κόβεται με τη *Hind III*, η αλληλουχία εισάγεται στο πλασμίδιο και τα πλασμίδια εισάγονται σε βακτήρια που είναι ευαίσθητα στη στρεπτομυκίνη. Η περιοριστική αυτή ενδονουκλεάση αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-AAGCTT-3' σε δίκλωνο DNA και κόβει μεταξύ των νουκλεοτιδίων που έχουν ως αζωτούχο βάση αδερίνη. Στο πλασμίδιο υπάρχει γονίδιο (*Str^R*) το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γονίδιο (*gfp*) που κωδικοποιεί μια πράσινη φθορίζουσα χρωστική η οποία φθορίζει σε υπεριώδη ακτινοβολία, και το γονίδιο *araC* που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που απαιτείται για να προκληθεί η έκφραση του *gfp* όταν υπάρχει το σάκχαρο αραβινόζη στο θρεπτικό υλικό.

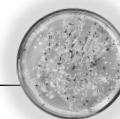


α. Πώς θα κάνεις την επιλογή των βακτηρίων που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;

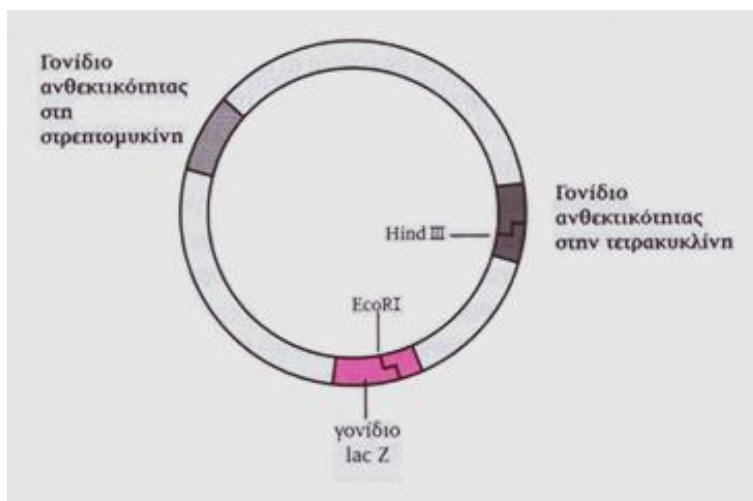
β. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου δημιουργήθηκαν κατά τον σχηματισμό ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και πόσες βάσεις φέρει αυτό εάν το αρχικό του μήκος ήταν 20.000 ζεύγη βάσεων και προσέλαβε ένα κομμάτι ξένου DNA;

γ. Έστω ότι το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο επωάζεται με *Hind III*. Πόσα θραύσματα θα προκύψουν; Σε ένα από τα θραύσματα περιέχονται 202 νουκλεοτίδια με τη βάση αδερίνη και 1.300 δεσμοί υδρογόνου. Πόσα νουκλεοτίδια με τη βάση γουανίνη υπάρχουν στο θραύσμα;

-----∞-----

**B**

Ένας ερευνητής κατασκευάζει γονιδιωματική βιβλιοθήκη από έναν συγκεκριμένο σκύλο χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο που φαίνεται στο σχήμα.

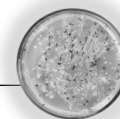


Στο πλασμίδιο, εκτός από δύο γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και τετρακυκλίνη, υπάρχει το γονίδιο lacZ, το οποίο κωδικοποιεί τη β-γαλακτοζιδάση. Όταν στο θρεπτικό υλικό υπάρχει η ουσία X-gal, η β-γαλακτοζιδάση μετατρέπει τη λευκή ουσία X-gal σε μπλε, με αποτέλεσμα ολόκληρη η αποικία να «χρωματίζεται» μπλε.

α. Να περιγράψεις δύο τρόπους με τους οποίους ο ερευνητής μπορεί να κατασκευάσει τη βιβλιοθήκη και να επιλέξει στη συνέχεια τους κλώνους που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

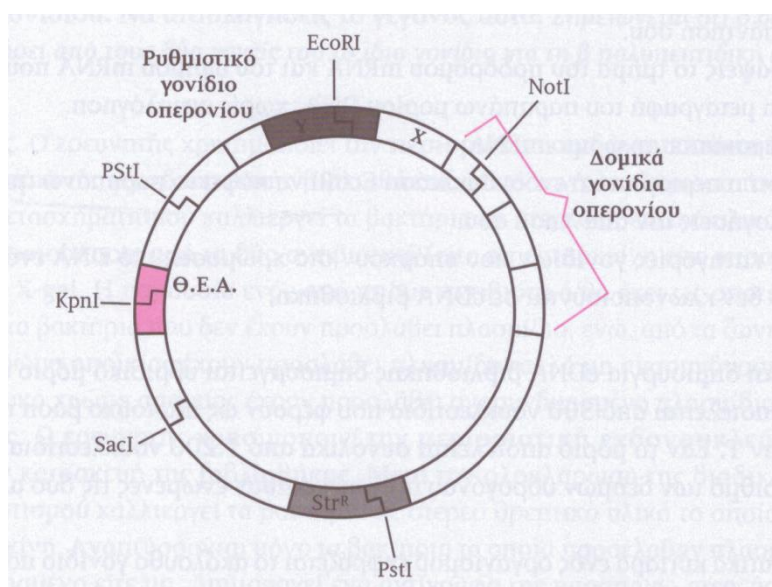
β. Ο ερευνητής ακολούθησε και τους δύο τρόπους και εντόπισε στη μία περίπτωση κλώνους που περιείχαν ολόκληρο το γονίδιο για τη β πολυπεπτιδική αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης του σκύλου και στην άλλη κλώνους που περιείχαν τμήματα του εν λόγω γονιδίου. Να αιτιολογήσεις το γεγονός αυτό. *Σημειώνεται ότι ο σκύλος έχει κληρονομήσει από τους δύο γονείς του το ίδιο γονίδιο για τη β πολυπεπτιδική αλυσίδα.*

-----∞-----



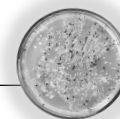
Γ

Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζεται ένα πλασμίδιο το οποίο έχει κατασκευαστεί στο εργαστήριο. Το πλασμίδιο διαθέτει ένα μόνο γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό (συγκεκριμένα στη στρεπτομυκίνη, το οποίο συμβολίζεται Str^R), καθώς και το οπερόνιο της λακτόζης (με Υ συμβολίζεται ο υποκινητής και με Χ ο χειριστής του οπερονίου). Με Θ.Ε.Α. σημειώνεται η θέση έναρξης αντιγραφής του πλασμιδίου. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο φέρει αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τις ακόλουθες περιοριστικές ενδονουκλεάσες: EcoRI, NotI, SacI, PstI, KpnI. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο θα χρησιμοποιηθεί από έναν ερευνητή ως φορέας κλωνοποίησης για την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης από έναν συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο του ανθρώπου, με στόχο την παραγωγή μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας ενός αντισώματος. Σημειώνεται ότι τα βακτήρια που θα χρησιμοποιηθούν ως δέκτες του πλασμιδίου δεν μεταβολίζουν τη λακτόζη.

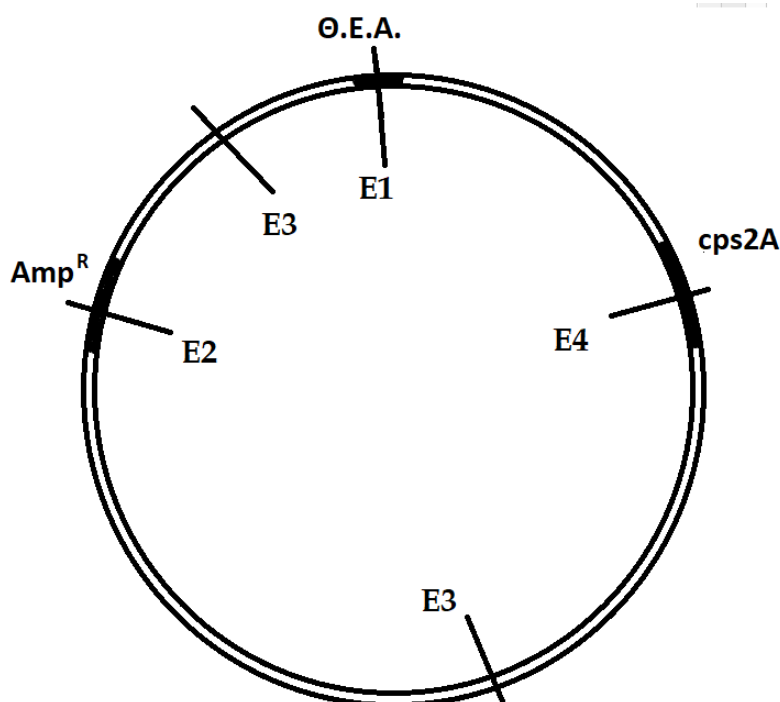


- α.** Ποιος κυτταρικός τύπος του ανθρώπου θα χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή της συγκεκριμένης cDNA βιβλιοθήκης; Να αιτιολογήσεις την απάντησή σου.
- β.** Γιατί η περιοριστική ενδονουκλεάση που είναι καταλληλότερη να χρησιμοποιηθεί είναι η NotI;
- γ.** Πώς μπορεί ο ερευνητής να επιλέξει από τα βακτήρια που έχουν λάβει πλασμίδιο αυτά που έχουν λάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;



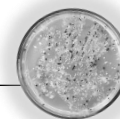


Στο πλασμίδιο που δίνεται υπάρχει γονίδιο (Amp^R) που προκαλεί ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και ένα γονίδιο ($cps2A$) το οποίο συμμετέχει στον έλεγχο της βιοσύνθεσης κάψας στο βακτήριο πνευμονιόκοκκο (παλιά ονομασία *Diplococcus pneumoniae*, νέα ονομασία *Streptococcus pneumoniae*). Τα βακτήρια με κάψα σχηματίζουν λείες αποικίες ενώ τα βακτήρια χωρίς κάψα σχηματίζουν αδρές αποικίες. Τα σημεία E1, E2, E3, και E4 είναι τα σημεία που αναγνωρίζουν αντίστοιχα οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI*, *EcoRI*, *Hind III* και *PstI* και κόβουν το πλασμίδιο. Στο πλασμίδιο θέλουμε να εισάγουμε συνεχές γονίδιο το οποίο φέρει υποκινητή που αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες του πνευμονιοκόκκου και αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής, ώστε αυτό να εκφραστεί στα μετασχηματισμένα βακτήρια. Ως βακτήρια ξενιστές θα χρησιμοποιήσουμε πνευμονιοκόκκους που τους λείπει το γονίδιο $cps2A$ και είναι ευαίσθητα στην αμπικιλίνη.

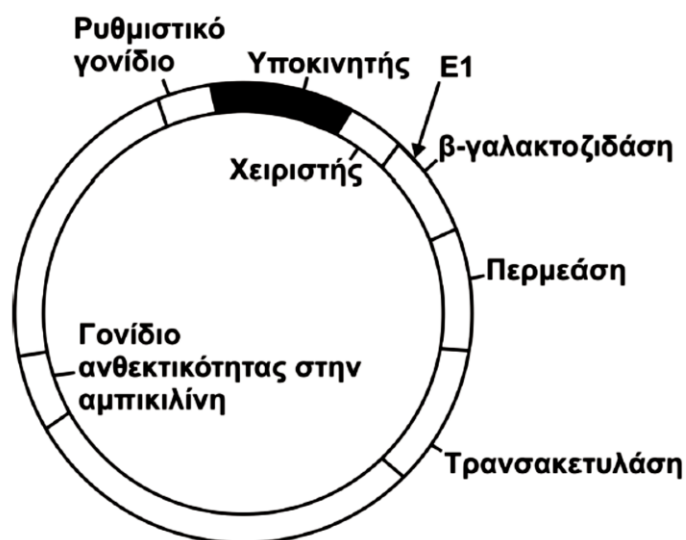


- α. Να εξηγήσετε ποια περιοριστική ενδονουκλεάση θα χρησιμοποιηθεί για τον ανασυνδυασμό.
- β. Να εξηγήσετε πως θα ξεχωρίσουμε τα μετασχηματισμένα βακτήρια από τα μη μετασχηματισμένα.
- γ. Με ποιο τρόπο θα ξεχωρίσουμε τα βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από εκείνα με μη ανασυνδυασμένο; Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.
- δ. Στο παραπάνω πλασμίδιο, κατά την αντιγραφή, ο εξωτερικός κλώνος DNA αντιγράφεται ασυνεχώς αριστερά της Θ.Ε.Α. Να βρείτε τους προσανατολισμούς των αλυσίδων του πλασμιδίου και να δικαιολογήσετε την απάντησή σας

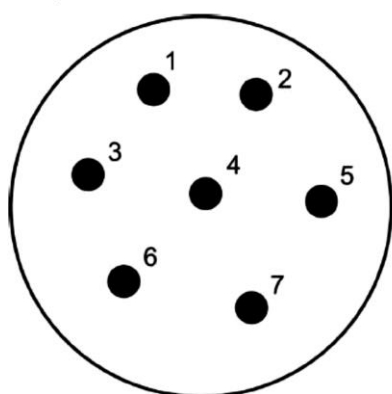
-----∞-----

**E**

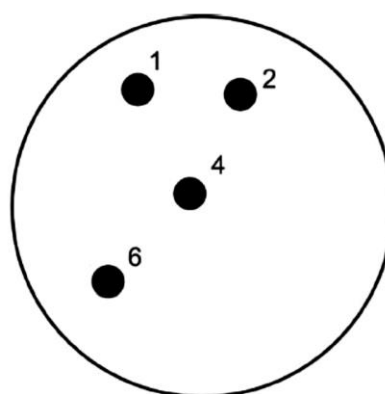
Προκειμένου να μελετήσουμε το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Α, το κλωνοποιούμε στο παρακάτω πλασμίδιο που φέρει την αλληλουχία του οπερονίου της λακτόζης. Το γονίδιο εισάγεται στο σημείο που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση E1.



Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιούμε ως βακτήρια ξενιστές στελέχη *E. coli* στα οποία δεν λειτουργεί το οπερόνιο της λακτόζης και είναι ευαίσθητα στην αμπικιλίνη. Μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού, τα βακτήρια μεταφέρονται σε στερεό θρεπτικό υλικό με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και αντιβιοτικό αμπικιλίνη (καλλιέργεια Α). Στη συνέχεια μεταφέρουμε δείγματα από όλες τις αριθμημένες αποικίες σε νέο στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει λακτόζη και αμπικιλίνη, οπότε αναπτύσσεται η καλλιέργεια Β.

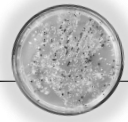


Καλλιέργεια Α με
αντιβιοτικό αμπικιλίνη και
πηγή άνθρακα γλυκόζη



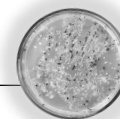
Καλλιέργεια Β με
αντιβιοτικό αμπικιλίνη και
πηγή άνθρακα λακτόζη

α. Να αναφέρετε τα είδη των βακτηρίων που αναπτύσσονται στις δύο παραπάνω καλλιέργειες Α και Β. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.



- Για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων, ή την διάκριση εκείνων που φέρουν ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από αυτούς που έχουν τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, δεν είναι πάντα απαραίτητη η χρήση αντιβιοτικών. Η επιλογή μπορεί να γίνει και με βάση μορφολογικά κριτήρια της δομής των αποικιών, π.χ.
 - φθορίζουσες-μη φθορίζουσες αποικίες (γονίδιο *gfp*)
 - λείες-αδρές αποικίες (γονίδιο *crs2A*),
 - λευκές-μπλε αποικίες (γονίδιο *β-γαλακτοζιδάσης* και *X-gal*)
- Ο τρόπος χειρισμού αυτών των ασκήσεων είναι ίδιος με τις περιπτώσεις εκείνες που ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιούμε διαθέτει δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.
- Εάν διαθέτουμε ως γονίδια επιλογής, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας και ένα «εναλλακτικό» γονίδιο μορφολογικών χαρακτηριστικών, προτιμάμε να αφήσουμε ακέραιο το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό, προκειμένου όλα τα μετασχηματισμένα βακτήρια να αποκτήσουν αυτή την ιδιότητα. Σε πρακτικό επίπεδο, εισάγοντας το αντίστοιχο αντιβιοτικό στο θρεπτικό μας μέσο, γίνεται πολύ πιο εύκολη για εμάς η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριών (ζουν και αναπτύσσονται σε αποικίες) από τα εκατοντάδες φορές περισσότερα, μη μετασχηματισμένα βακτήρια-ξενιστές (πεθαίνουν παρουσία του αντιβιοτικού). Ο διαχωρισμός εκείνων που φέρουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια από εκείνα που φέρουν τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια γίνεται στη συνέχεια με τα κατάλληλα μορφολογικά κριτήρια ανά περίπτωση.





6. Γονιδιωματικές & cDNA βιβλιοθήκες

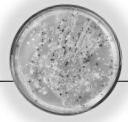
A

Έχεις στη διάθεσή σου τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη ενός ανθρώπου και τη cDNA βιβλιοθήκη ενός πρόδρομου ερυθροκυττάρου του ανθρώπου. Σημείωσε με το σύμβολο (+) ή (-) στις στήλες II και III το θετικό ή αρνητικό σήμα υβριδοποίησης αντίστοιχα των μορίων-ανιχνευτών της στήλης I. Δίνεται ότι μία από τις αιμοσφαιρίνες, η αιμοσφαιρίνη A (HbA), αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες α και από δύο β. Επίσης, το αντιγόνο A υπάρχει στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων ατόμων με ομάδα αίματος A.

Στήλη I	Στήλη II	Στήλη III
Ανιχνευτής	Γονιδιωματική βιβλιοθήκη ανθρώπου	cDNA βιβλιοθήκη πρόδρομου ερυθροκυττάρου
1. Γονίδιο της RNA πολυμεράσης		
2. Γονιδίου αλυσίδας β της HbA		
3. Γονιδίου ενζύμου που σχηματίζει το αντιγόνο B (ανθρώπου με ομάδα αίματος A)		
4. 1ου εσωνίου γονιδίου αλυσίδας α της HbA		
5. Υποκινητή γονιδίου αλυσίδας β της HbA		
6. Αλληλουχίας λήξης μεταγραφής του γονιδίου αλυσίδας β της HbA		
7. 5' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου μιας ιστόνης		
8. Γονιδίου του tRNA τρυπτοφάνης		
9. Γονιδίου rRNA		
10. Γονιδίου της βακτηριακής RNA πολυμεράσης		

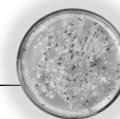


- Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει στους κλώνους της το σύνολο του «ακατέργαστου» γονιδιώματος ενός οργανισμού. Σε αυτό, συγκαταλέγονται όχι μόνο οι κωδικές αλληλουχίες όλων των γονιδίων ενός οργανισμού, αλλά και οι υποκινητές τους, τα εσώνιά τους, άλλες απομακρυσμένες περιοχές που ρυθμίζουν την έκφρασή τους, αλλά και πολλά μη γονιδιακά τμήματα DNA, άγνωστης λειτουργίας.
- Σε μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη, οι αλληλουχίες των γονιδίων που περιέχονται στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια των βακτηριακών της κλώνων, σε ορισμένους από αυτούς βρίσκονται ολόκληρα, ενώ σε άλλους βρίσκονται μόνο κάποια τμήματά τους. Αυτό προκύπτει από την ίδια τη διαδικασία κατασκευής της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, και οφείλεται σε περιπτώσεις ατελούς πέψης του γονιδιώματος από τη χρησιμοποιούμενη περιοριστική ενδονουκλεάση.
- Δεδομένου ότι η κατασκευή μίας cDNA βιβλιοθήκης ξεκινά από την απομόνωση του ολικού ώριμου mRNA, μιας ομάδας κυττάρων συγκεκριμένου



κυτταρικού ιστού, γίνεται αντιληπτό ότι δε μπορεί να περιέχει tRNA, rRNA, και snRNA γονίδια, παρά το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται σε αυτά τα κύτταρα, όπως άλλωστε και σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα γενικά.





7. Υβριδοποίηση και χρήση ιχνηθετημένων ανιχνευτών

A

Κατασκευάζεται cDNA βιβλιοθήκη από κύτταρα τα οποία παράγουν το εξής олиγοπεπτίδιο το οποίο δεν υφίσταται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις:



Δίνεται ότι met: μεθειονίνη, phe: φαινυλαλανίνη, trp: τρυπτοφάνη, gly: γλυκίνη και οι αντιστοιχίσεις αμινοξέων και κωδικονίων είναι: gly: 5'-GGU-3' ή 5'-GGC-3' ή 5'-GGG-3' ή 5'-GGA-3', phe: 5'-UUU-3' ή 5'-UUC-3' και trp: 5'-UGG-3'. Για την επιλογή του βακτηριακού κλώνου που περιέχει το υπεύθυνο για το олиγοπεπτίδιο γονίδιο σχεδιάστηκε ανιχνευτής με την αλληλουχία 5'-CCACAT-3'.

- α. Με ποια αλυσίδα του γονιδίου θα υβριδοποιηθεί ο ανιχνευτής;
- β. Πόσοι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται κατά την υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή;
- γ. Ένας νεαρός ερευνητής, βασιζόμενος στην αμινοξική αλληλουχία, κατασκευάζει έναν άλλον ανιχνευτή για το εν λόγω γονίδιο. Ο ανιχνευτής του, που αποτελείται από 6 νουκλεοτίδια, αποτυγχάνει να επιτελέσει τον ρόλο του. Μπορείς να δώσεις έναν λόγο;

-----∞-----

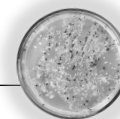
B

Παρακάτω δίνονται τέσσερις μονόκλωνες αλυσίδες DNA:

1. 5' -AAATGAAACCAGGATAAG-3'
2. 5' -AATTCGGGGGGC-3'
3. 5' -AATTCCTTATCCTGGTTCATTT-3'
4. 5' -AATTGCCCCCG-3'

Οι αλυσίδες αυτές τοποθετούνται σε κατάλληλο περιβάλλον υβριδοποίησης.

- α. Να γράψεις τα μόρια DNA που θα προκύψουν μετά την υβριδοποίηση, τα οποία θα ονομάσεις *υβριδοποιημένο μόριο 1* και *υβριδοποιημένο μόριο 2*.
- β. Στο ένα από τα δύο υβριδοποιημένα μόρια DNA που θα προκύψουν εμπεριέχεται γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί ένα олиγοπεπτίδιο. Να γράψεις το mRNA που θα προκύψει και να αιτιολογήσεις την απάντησή σου.



γ. Το πεπτίδιο που προκύπτει από τη μετάφραση του παραπάνω mRNA είναι:

H₂N – Μεθειονίνη – Λυσίνη – Προλίνη – Γλυκίνη – COOH.

Ποιο είναι το αντικωδικόνιο του tRNA που θα τοποθετηθεί στο ριβόσωμα μετά την αποσύνδεση του tRNA, το οποίο μεταφέρει το αμινοξύ λυσίνη; Να αιτιολογήσεις την απάντησή σου.

δ. Στα υβριδοποιημένα μόρια 1 και 2 προστίθεται το ένζυμο DNA δεσμάση. Να γράψεις τα πιθανά ανασυνδυασμένα μόρια DNA που θα προκύψουν από τη δράση της DNA δεσμάσης, σημειώνοντας τους προσανατολισμούς των αλυσίδων και αιτιολογώντας την απάντησή σου. Εάν στη συνέχεια προστεθεί η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, να εξηγήσεις πόσα τμήματα DNA θα προκύψουν.

-----ΩΩ-----

Γ

Από γονιδιωματική βιβλιοθήκη απομονώθηκαν τρεις αλληλουχίες που αποδιατάχθηκαν με θέρμανση, προκειμένου να εντοπιστεί μέσω ανιχνευτή συγκεκριμένο γονίδιο που περιέχεται σε μία από αυτές. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε περιείχε την αλληλουχία βάσεων 2

3' UAAAAUAUAUGGGCUUG 5'

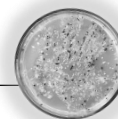
α. Ποια διαδικασία ονομάζεται αποδιάταξη, τι είναι οι ανιχνευτές και ποιος είναι ο ρόλος τους στην απομόνωση επιθυμητών αλληλουχιών από βιβλιοθήκες ανασυνδυασμένου DNA;

β. Με ποια χρονική σειρά αποδιατάχθηκαν οι τρεις αλληλουχίες; Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.

γ. Ποια αλληλουχία υβριδοποιεί ο ανιχνευτής;

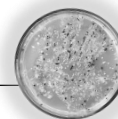
δ. Η αλληλουχία που υβριδοποιεί ο ανιχνευτής είναι η κωδική ή μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου;

Αλληλουχίες	
1 ^η	3' GAGAGTACATTTTATATACCCGAAC TCCGACTCCGAG 5' 5' CTCTCATGGTAAAATATATGGGCTTGAGGCTGAGGCTC 3'
2 ^η	3' CCCCAGAGAATTTTAAAATATATGGGCTTG TAGGGCAA 5' 5' GGGGCTCTTAAAATTTTATATACCCGAACATCCCGTT 3'
3 ^η	3' CATCCGAGGATATATTTATATATCCCCTTG TAGGCC 5' 5' GTAGGCTCCTATATATATATAGGGGAACATCCGGG 3'



- Οι ιχνηθετημένοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό συγκεκριμένων βακτηριακών κλώνων στις γονιδιωματικές και στις cDNA βιβλιοθήκες, σχεδιάζονται με βάση τις αλληλουχίες των γονιδίων-στόχων τους και έχουν μήκος που κυμαίνεται μέχρι και αρκετές δεκάδες νουκλεοτίδια. Όσο μεγαλύτερη και σπάνια είναι η αλληλουχία τους, τόσο πιο εξειδικευμένα εντοπίζουν το στόχο τους.
- Στην υβριδοποίηση μπορεί να δημιουργηθούν δίκλωνα μόρια DNA ή RNA, αλλά και υβρίδια DNA-RNA, τα οποία μπορεί να έχουν «απότομα» δίκλωνα άκρα ή μονόκλωνα άκρα σας αυτά που δημιουργούν περιοριστικές ενδονουκλεάσες όπως η *EcoRI*.





8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

A

Ένα τμήμα DNA αντιγράφεται με PCR. Κάθε κύκλος της PCR διαρκεί μία ώρα. Μετά από πόσες ώρες θα υπάρχουν τουλάχιστον 60 αντίγραφα του τμήματος DNA; Αν το τμήμα αυτό έχει μήκος 1.000 ζεύγη βάσεων, πόσα νουκλεοτίδια θα υπάρχουν τότε;



B

Η PCR μας επιτρέπει να αντιγράψουμε επιλεκτικά εκατομμύρια φορές ένα μόριο DNA χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Αρχικά το τμήμα αυτό αποδιατάσσεται με θέρμανση και στη συνέχεια προστίθενται στον δοκιμαστικό σωλήνα κατάλληλα πρωταρχικά τμήματα, συμπληρωματικά προς τα άκρα των δύο αλυσίδων του αρχικού DNA. Έτσι, η DNA πολυμεράση πραγματοποιεί σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων DNA επιμηκύνοντας τα πρωταρχικά τμήματα. Δίνεται η μία από τις δύο αλυσίδες ενός μορίου DNA το οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί με PCR:

5'-GCGTTGACGGTATCAAAACGTTATTTTACCCTGGTGGGCTGTTCTAATC-3'

Ποιο από τα παρακάτω είναι το κατάλληλο ζευγάρι πρωταρχικών τμημάτων που πρέπει να τοποθετηθεί στον δοκιμαστικό σωλήνα ώστε να επιτευχθεί η κλωνοποίηση του παραπάνω τμήματος DNA;

- i. 5'-GCGTTGACGGTATCA-3' και 5'-TGGGCTGTTCTAATC-3'
- ii. 5'-CGCAACTGCCATAGT-3' και 5'-TGGGCTGTTCTAATC-3'
- iii. 5'-GCGTTGACGGTATCA-3' και 5'-GATTAGAACAGCCCA-3'
- iv. 5'-TGATACCGTCAACGC-3' και 5'-GATTAGAACAGCCCA-3'

Να αιτιολογήσεις την επιλογή σου.



- Κατά τη διάρκεια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR), κάθε δίκλωνο μόριο DNA που κλωνοποιείται, θα πρέπει να διαθέτει ένα ζευγάρι πρωταρχικών τμημάτων που διευκολύνει την πρόσδεση της Taq DNA πολυμεράσης σε κάθε αλυσίδα και τη επιτρέπει τη χρησιμοποίησή τους ως καλούπι για τη σύνθεση των συμπληρωματικών τους.
- Τα πρωταρχικά αυτά τμήματα θα πρέπει να είναι συμπληρωματικά με τα 3' άκρα των αλυσίδων του αρχικού μορίου, ώστε με την επιμήκυνσή τους να συντίθενται ολόκληροι οι δύο κλώνοι του αρχικού μορίου DNA.



