

ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΙΚΑ ΛΥΜΕΝΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΚΕΦ. 4ο

1. Τμήμα DNA που έχει κοπεί στα άκρα του με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI περιέχει 408 νουκλεοτίδια με αζωτούχο βάση την A και 1558 δεσμούς υδρογόνου. Να υπολογίσετε τον αριθμό των υπόλοιπων βάσεων και των φωσφοδιεστερικών δεσμών του τμήματος.

Λύση

Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI δημιουργεί 2 μονόκλωνα άκρα που αποτελούνται από συνολικά 4A και 4T. Κατά συνέπεια στο δίκλωνο τμήμα του DNA θα υπάρχουν 408-4=404A και 404T.

Οι δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται μόνο σε δίκλωνο τμήμα. Κατά συνέπεια ισχύει: $2A+3G=\text{δεσμοί υδρογόνου} \rightarrow 2 \cdot 404+3G=1558 \rightarrow G=250=C$.

Ο συνολικός αριθμός νουκλεοτιδίων σε όλο το τμήμα του DNA (δίκλωνο και μονόκλωνο άκρα) δίνεται από τη σχέση: $2A+2G=\text{νουκλεοτίδια} \rightarrow 2 \cdot 408+2 \cdot 250=1316$ νουκλεοτίδια.

Επειδή το τμήμα που εξετάζουμε είναι δίκλωνο γραμμικό οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί θα είναι κατά 2 λιγότεροι σε σχέση με τον συνολικό αριθμό νουκλεοτιδίων δηλαδή θα είναι σε αριθμό 1314.

2. Η επίδραση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI σε μόριο DNA προκάλεσε το σπάσιμο 32 φωσφοδιεστερικών δεσμών.

α. Πόσοι δεσμοί υδρογόνου έσπασαν;

β. Πόσα θραύσματα προέκυψαν;

γ. Πόσα θραύσματα είναι έτοιμα για ανασυνδυασμό;

Λύση

α. Σε κάθε θέση αναγνώρισης της EcoRI σπάνε 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου. Κατά συνέπεια οι θέσεις αναγνώρισης της EcoRI στο συγκεκριμένο μόριο DNA θα είναι $32:2=16$. Οι δεσμοί υδρογόνου που σπάνε σε 16 θέσεις αναγνώρισης της EcoRI θα είναι: $16 \cdot 8=128$.

β. Διακρίνουμε δύο περιπτώσεις:

- Εάν το μόριο είναι κυκλικό τότε προέκυψαν 16 θραύσματα όσες είναι και οι θέσεις αναγνώρισης.
- Εάν το μόριο είναι γραμμικό τότε προέκυψαν 17 θραύσματα ένα παραπάνω από τις θέσεις αναγνώρισης.

γ. Στην περίπτωση που το μόριο του DNA είναι κυκλικό τότε όλα τα θραύσματα έχουν μονόκλωνα άκρα και επομένως μπορούν να ανασυνδυαστούν. Στην περίπτωση που το μόριο του DNA είναι γραμμικό τότε τα 15 από τα 17 θραύσματα έχουν μονόκλωνα άκρα και επομένως μπορούν να ανασυνδυαστούν άμεσα. Τα 2 ακραία τμήματα έχουν το καθένα από ένα μονόκλωνο και ένα δίκλωνο άκρο και επομένως δεν μπορούν να ανασυνδυαστούν άμεσα εκτός και αν το δίκλωνο άκρο τους μετατραπεί μετά από ειδική κατεργασία σε μονόκλωνο.

3. Το τμήμα DNA που ακολουθεί εισάγεται στο βακτήριο E. coli:

5'CCATGAATTCTCACTTAAAAGAATTCGAATGAGAATTCACGA 3'

3'GGTACTTAAGAGTGAATTTTCTTAAGCTTA CTCTTAAGTGCT 5'

α. Ποια είναι τα θραύσματα που προκύπτουν από τη δράση της EcoRI;

β. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου έσπασαν;

γ. Εάν το 2^ο θραύσμα που προκύπτει από αριστερά προς τα δεξιά ανασυνδυαστεί με πλασμίδιο που έχει 1 θέση αναγνώρισης για την EcoRI, μοριακό βάρος (M.B)=80.000 και 100.000 δεσμούς υδρογόνου να βρεθεί το μοριακό βάρος και οι δεσμοί υδρογόνου του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.

Δίνεται M.B. νουκλεοτιδίου=200 και M.B H₂O=18

Λύση

α. Υπάρχουν 3 θέσεις αναγνώρισης της EcoRI και επειδή το τμήμα DNA είναι δίκλωνο γραμμικό θα υπάρξουν 4 θραύσματα. Τα θραύσματα που προκύπτουν είναι τα εξής:

1^ο θραύσμα

5'CCATG 3'

3'GGTACTTAA 5'

2^ο θραύσμα

5'AATTCTCACTTAAAAG 3'

3' GAGTGAATTTTCTTAA 5'

3° θραύσμα

5' AATT CGAATGAG 3'

3' GCTTACTCTTAA 5'

4° θραύσμα

5' AATTCACGA 3'

3' GTGCT 5'

β. Όπως είναι γνωστό σε κάθε θέση αναγνώρισης της EcoRI σπάνε 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου. Κατά συνέπεια για το συγκεκριμένο τμήμα DNA η επίδραση της EcoRI θα έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση $3 \cdot 2 = 6$ φωσφοδιεστερικών δεσμών και $3 \cdot 8 = 24$ δεσμών υδρογόνου.

γ.

➤ Το 2° τμήμα έχει 32 νουκλεοτίδια τα οποία έχουν συνολικό μοριακό βάρος $32 \cdot 200 = 6.400$.

➤ Στο δίκλωνο τμήμα του 2ου τμήματος υπάρχουν συνολικά 28 δεσμοί υδρογόνου.

➤ Όπως είναι γνωστό σε κάθε θέση αναγνώρισης της EcoRI σπάνε 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου, ενώ η ένωση ενός θραύσματος και ενός πλασμιδίου που έχουν προκύψει από τη δράση της EcoRI, έχει σαν συνέπεια τη δημιουργία τεσσάρων (4) φωσφοδιεστερικών δεσμών και δεκαέξι (16) δεσμών υδρογόνου.

➤ Επίσης είναι γνωστό ότι κατά τη διάσπαση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού προσλαμβάνεται 1 μόριο νερού ενώ κατά τη δημιουργία αποβάλλεται 1 μόριο νερού.

Κατά συνέπεια η δημιουργία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου έχει σαν αποτέλεσμα την αποβολή 2 μορίων νερού. Οπότε:

M.B. ανασυνδυασμένου πλασμιδίου $= 80.000 + 6.400 - 2 \cdot 18 = 86.364$

δ.Η ανασυνδυασμένου πλασμιδίου $= 100.000 - 8 + 16 + 28 = 100.036$

4. Δύο πανομοιότυπα μόρια DNA απομονώνονται από πυρήνα ευκαρυωτικού οργανισμού και στη συνέχεια υποβάλλονται με τη μέθοδο PCR σε 6 κύκλους αντιγραφής. Το προϊόν αναλύεται ως προς τη σύσταση των βάσεων του και προκύπτει ότι περιέχει 76.800 βάσεις T και 89.600 βάσεις C. Να βρείτε:

α. Από πόσους κλώνους μορίων αποτελείται το δείγμα

β. Τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου στο αρχικό μόριο.

Λύση

α. Εάν γίνουν κ κύκλοι αντιγραφής θα προκύψουν $a \cdot 2^k$ μόρια DNA, όπου α ο αριθμός των αρχικών μορίων DNA. Στη συγκεκριμένη περίπτωση θα ισχύει:

$2 \cdot 2^6 = 128$ μόρια DNA

β. Οι 76.800 βάσεις T θα υπάρχουν στα 128 μόρια DNA, οπότε στο αρχικό μόριο ο αριθμός των T θα είναι: $76.800 / 128 = 600 = A$. Ο αριθμός των C στο αρχικό μόριο θα είναι: $89.600 / 128 = 700 = G$

Ισχύει η σχέση: $2A + 3C = \delta.H \rightarrow 2 \cdot 600 + 3 \cdot 700 = 3.300$ δεσμοί υδρογόνου στο αρχικό μόριο.

5. Ένα διάλυμα περιέχει τα ακόλουθα 3 μόρια DNA (δίνεται μόνο ο ένας κλώνος):

1° μόριο: 5' CGACGTGGCTTG 3'

2° μόριο: 5' AAGCTATGGGTACA 3'

3° μόριο: 5' AATTACATAGTCCCA 3'

Αν αυξηθεί η θερμοκρασία του διαλύματος με ποια σειρά πιστεύετε ότι θα γίνει η αποδιάταξη των κλώνων τους;

Λύση

Ένα μόριο DNA είναι σταθερότερο όσο περισσότερους δεσμούς υδρογόνου έχει. Επιπλέον για τη σταθερότητα του μορίου σημαντικός είναι και ο αριθμός των νουκλεοτιδίων. Για τα 3 παραπάνω μόρια ισχύει:

1° μόριο: 12 ζεύγη βάσεων, 32 δ.Η.

2° μόριο: 14 ζεύγη βάσεων, 34 δ.Η.

3° μόριο: 15 ζεύγη βάσεων, 35 δ.Η.

Άρα με την αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος η αποδιάταξη των κλώνων θα γίνει με την εξής σειρά: 1° μόριο-2° μόριο-3° μόριο

6. Γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA μήκους 20kb (kb = χιλιάδες ζεύγη βάσεων) υπόκειται στη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης A, οπότε προκαλούνται 2 θραύσματα των 14kb και 6kb. Όταν επιδράσει σε αυτό η περιοριστική ενδονουκλεάση B, προκαλούνται 2 θραύσματα των 2kb και 18kb. Πόσα θραύσματα θα προκληθούν αν επιδράσουν ταυτόχρονα στο μόριο τα ένζυμα A και B;

Λύση

Η περιοριστική ενδονουκλεάση A έχει 1 θέση αναγνώρισης στο δίκλωνο μόριο DNA με αποτέλεσμα την εμφάνιση 2 θραυσμάτων, 6 και 14kb αντίστοιχα.

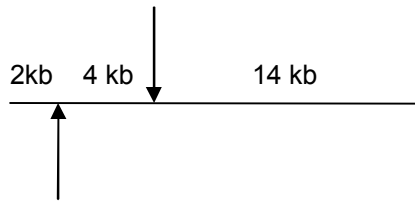


Η περιοριστική ενδονουκλεάση B έχει 1 θέση αναγνώρισης στο δίκλωνο μόριο DNA με αποτέλεσμα την εμφάνιση 2 θραυσμάτων, 2 και 18kb αντίστοιχα.



Η επεξεργασία του δίκλωνου μορίου DNA και με τις 2 περιοριστικές ενδονουκλεάσες έχει σαν τις 2 παρακάτω περιπτώσεις:

1^η περίπτωση:



2^η περίπτωση:

