

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ – ΑΣΚΗΣΕΙΣ 4^{ΟΥ} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Ερωτήσεις πολλαπλής επιλογής: επιλέξτε το γράμμα που αντιστοιχεί στη σωστή συνέχεια της πρότασης.

- 1. Μετασχηματισμός είναι:**
 - α. η αλλαγή στη μορφή ενός βακτηρίου.
 - β. η εισαγωγή ιχνηθετημένων ανιχνευτών μορίων DNA ή RNA σε βακτήριο.
 - γ. η κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA.
 - δ. η εισαγωγή ανασυνδυασμένου DNA σε βακτήριο.
- 2. Πώς ονομάζονται τα κυκλικά μόρια DNA που αναπαράγονται ανεξάρτητα;**
 - α. Ρυθμιστικά γονίδια.
 - β. Πλασμίδια.
 - γ. Διακεκομμένα γονίδια.
 - δ. Εσώνια.
- 3. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες:**
 - α. είναι απαραίτητες για την έναρξη της μεταγραφής.
 - β. είναι απαραίτητες για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής.
 - γ. κόβουν τις πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του RNA σε ειδικές θέσεις.
 - δ. κόβουν το DNA σε ειδικές θέσεις.
- 4. Μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει:**
 - α. αντίγραφα ενός μόνο ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.
 - β. αντίγραφα του συνολικού γονιδιώματος ενός οργανισμού.
 - γ. αντίγραφα του mRNA του οργανισμού δότη.
 - δ. τα απαραίτητα ένζυμα για την παραγωγή ανασυνδυασμένου DNA.
- 5. Μία cDNA βιβλιοθήκη περιέχει:**
 - α. το σύνολο του DNA ενός οργανισμού.
 - β. αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα.
 - γ. αντίγραφα του mRNA ενός μόνο γονιδίου.
 - δ. αντίγραφα που περιέχουν κομμάτια γονιδίων και άλλα τμήματα DNA.
- 6. Ινίδιο χρωματίνης τέμνεται από την EcoRI σε 6 θραύσματα. Η EcoRI έσπασε σε αυτό:**
 - α. 40 δεσμούς υδρογόνου.
 - β. 48 δεσμούς υδρογόνου.
 - γ. 12 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.
 - δ. 60 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.
- 7. Στους κλώνους cDNA βιβλιοθήκης παγκρεατικού κυττάρου δεν είναι δυνατό να περιέχονται γονίδια που:**
 - α. κωδικοποιούν τις RNA πολυμεράσες.
 - β. κωδικοποιούν τις αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης.
 - γ. κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για τη λειτουργία των μιτοχονδρίων.
 - δ. προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.

8. Αποδιάταξη είναι το φαινόμενο κατά το οποίο:

- α. κόβεται το DNA.
- β. αποχωρίζονται οι συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA.
- γ. συνδέονται μεταξύ τους οι συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA.
- δ. ιχνηθετείται το DNA.

9. Η αποδιάταξη του DNA γίνεται με:

- α. τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών.
- β. αύξηση της θερμοκρασίας.
- γ. ραδιενεργά σημασμένα μόρια, τους ανιχνευτές.
- δ. το ένζυμο DNA δεσμάση.

10. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR χρησιμοποιεί:

- α. πλασμίδια.
- β. βακτηριοφάγους λ.
- γ. περιοριστικές ενδονουκλεάσες.
- δ. DNA πολυμεράση.

Πίνακας συμπλήρωσης

Ο πίνακας αφορά στις cDNA και τις γονιδιωματικές βιβλιοθήκες. Να συμπληρώσετε με (+) τις στήλες ανάλογα με το αν παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά που αναφέρονται ή ανάλογα με το αν επιτελούνται οι διαδικασίες που αναγράφονται κατά την κατασκευή των βιβλιοθηκών.

Χαρακτηριστικά/Διαδικασίες	cDNA βιβλιοθήκη	Γονιδιωματική βιβλιοθήκη
Απομόνωση ολικού DNA		
Απομόνωση ολικού RNA		
Αντίστροφη μεταγραφή		
Αντιγραφή		
Αποδιάταξη RNA - DNA		
Αποδιάταξη δίκλωνων DNA		
Περιλαμβάνονται υποκινητές		
Μεγαλύτερος αριθμός κλώνων		
Υβριδοποίηση με ανιχνευτή		
Προσθήκη αντιβιοτικού		
Δεν περιέχονται εσώνια		

Δυνατή η μελέτη όλου του γονιδιώματος		
Δυνατή η παραγωγή πρωτεϊνών του δότη στα κύτταρα ξενιστές		

Θεωρητικές εφαρμογές

1. Το τμήμα DNA που απεικονίζεται στην εικόνα 2 έχει προκύψει μετά την επίδραση της EcoRI. Να σημειώσετε τα 3' και 5' άκρα του αιτιολογώντας την απάντησή σας.

**AATTCCGCAAAATTA
GGCGTTTAATT**

Εικόνα 2

Να εξηγήσετε αν είναι δυνατό το συγκεκριμένο τμήμα να κλωνοποιηθεί με τη βοήθεια πλασμιδίου χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA.

(Πανελλαδικές Εξετάσεις 2017)

2. Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI αναγνωρίζει μία συγκεκριμένη αλληλουχία 6 ζεύγη βάσεων στο DNA. Η περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII αναγνωρίζει μια αλληλουχία 4 ζεύγη βάσεων στο DNA. Απομονώνεται το DNA ενός ευκαρυωτικού κυττάρου και δημιουργούνται δύο δείγματα ενός καθαρού παρασκευάσματος DNA σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στο καθένα επιδρούμε με διαφορετική περιοριστική ενδονουκλεάση. Ποιος δοκιμαστικός σωλήνας αναμένεται να περιέχει περισσότερα κομμάτια DNA;
3. Ένα πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης για την κατασκευή μίας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης διαθέτει τρία γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, για στρεπτομυκίνη, αμπικιλίνη και πενικιλίνη. Η αλληλουχία βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση βρίσκεται μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας στη πενικιλίνη. Να εξηγήσετε με ποιο τρόπο θα επιλέξετε τα **μετασχηματισμένα** από τα **μη μετασχηματισμένα** βακτήρια ώστε να προχωρήσετε στη φάση της κλωνοποίησης. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως κύτταρα-ξενιστές φέρουν στο κύριο μόριο DNA ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.
4. Ένα πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης διαθέτει δύο γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη. Η αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση P1 βρίσκεται μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας για την καναμυκίνη. Μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού, τα βακτήρια που προέκυψαν διαμοιράζονται σε τρία τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υλικό ως εξής: στο 1^ο τρυβλίο έχει προστεθεί επιπλέον η αμπικιλίνη, στο 2^ο τρυβλίο η καναμυκίνη, ενώ στο 3^ο τρυβλίο προστίθενται και τα δύο αντιβιοτικά, αμπικιλίνη και καναμυκίνη.
 - A. Να εξηγήσετε τι αποικίες θα αναπτυχθούν σε καθένα από τα τρία τρυβλία.
 - B. Να εξηγήσετε πώς θα γίνει η επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων στους οποίους βρίσκεται το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

5. Προκειμένου να κλωνοποιήσουμε ένα επιλεγμένο τμήμα DNA, κατασκευάσαμε ένα τεχνητό πλασμίδιο που περιλαμβάνει:

- I. γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη,
- II. γονίδιο που κωδικοποιεί ένζυμο, το οποίο μετατρέπει μία άχρωμη ουσία σε έγχρωμη. Το γονίδιο αυτό περιλαμβάνει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από μία περιοριστική ενδονουκλεάση.

Αφού πραγματοποιήθηκαν όλα τα στάδια παραγωγής ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και εισαγωγής στα βακτήρια – ξενιστές, προέκυψαν:

A. Βακτήρια που δεν είναι ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη.

B. Άχρωμες αποικίες ανθεκτικές στη στρεπτομυκίνη.

Γ. Αποικίες μπλε χρώματος ανθεκτικές στη στρεπτομυκίνη.

Από ποια αποικία θα επιλεγούν τα βακτήρια που περιέχουν το επιθυμητό τμήμα DNA; Εξηγείστε.

6. Τι είδους βιβλιοθήκη θα κατασκευάζατε προκειμένου να κλωνοποιήσετε:

- I. το γονίδιο που κωδικοποιεί το rRNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας;
- II. το ρυθμιστικό γονίδιο του οπερονίου της λακτόζης;
- III. το γονίδιο (ασυνεχές) που κωδικοποιεί την α-πολυπεπτιδική αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης HbA, ώστε να γίνει η παραγωγή της α αλυσίδας σε μεγάλη ποσότητα;
- IV. τις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές του γονιδίου που κωδικοποιεί τη β-πολυπεπτιδική αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης HbA;
- V. τα εσώνια του γονιδίου που κωδικοποιεί την ινσουλίνη;

7. Για τη δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης διαθέτουμε τέσσερα (4) διαφορετικά είδη πλασμιδίων και τρία (3) διαφορετικά είδη βακτηρίων. Τα βακτήρια που θα χρησιμοποιηθούν ως ξενιστές δεν περιέχουν πλασμίδια, φέρουν όμως στο κυρίως γενετικό υλικό τους γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα Α:

Πίνακας Α

Βακτήριο	A	B	Γ
Ανθεκτικότητα σε Αντιβιοτικά	αμπικιλίνη στρεπτομυκίνη	καναμυκίνη	αμπικιλίνη καναμυκίνη

Τα πλασμίδια που θα χρησιμοποιηθούν διαθέτουν μια θέση αναγνώρισης για κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση και γονίδιο/γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Στον Πίνακα Β σημειώνεται με (+) η παρουσία και με (-) η απουσία γονιδίου ανθεκτικότητας σε αντίστοιχο αντιβιοτικό:

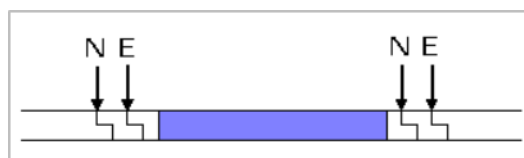
Πίνακας Β

Πλασμίδιο	1	2	3	4
Ανθεκτικότητα στην Αμπικικιλίνη	+	-	+	-
Ανθεκτικότητα στη Στρεπτομυκίνη	-	-	+	+
Ανθεκτικότητα στην Καναμυκίνη	-	+	-	-

Να εξηγήσετε ποιοι συνδυασμοί πλασμιδίων-βακτηρίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων. (Πανελλαδικές Εξετάσεις 2022)

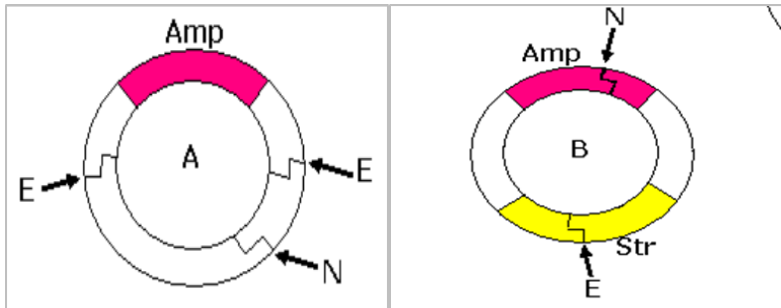
Ασκήσεις προς λύση

- Με τη δράση της EcoRI ένα μόριο DNA από ευκαρυωτικό κύτταρο κόπηκε σε 5 κομμάτια.
Α. Σε πόσα σημεία κόπηκε το μόριο;
Β. Πόσων δεσμών τη διάσπαση προκάλεσε η EcoRI;
Γ. Σε ένα από τα θραύσματα περιέχονται 204 νουκλεοτίδια με τη βάση αδενίνη και 1300 δεσμοί υδρογόνου. Πόσα νουκλεοτίδια με τη βάση γουανίνη υπάρχουν στο θραύσμα;
Δ. Πόσα πλασμίδια χρειάζονται για την κατασκευή μίας «βιβλιοθήκης» του συγκεκριμένου μορίου DNA;
Ε. Πόσων δεσμών τη διάσπαση θα προκαλέσει η EcoRI στα πλασμίδια αυτά;
Στ. Όταν ένα θραύσμα ενσωματώνεται επιτυχώς σε ένα πλασμίδιο πόσοι φωσφοδιεστερικοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου δημιουργούνται;
- Στο ακόλουθο τμήμα DNA προκαρυωτικού κυττάρου περιέχεται γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός τριπεπτιδίου.
3' GAATTCTTAAGAGTATGAAGGTACTTAAGAATTTC5'
5' CT TAAGAATTCTCATACTTC CATGAATTCTTAAG3'
Α. Να γράψετε την αλληλουχία βάσεων του θραύσματος που προκύπτει μετά την επίδραση της EcoRI, στο οποίο περιέχεται το γονίδιο.
Β. Να γράψετε την αλληλουχία του μεταφραζόμενου τμήματος του mRNA.
Γ. Να χρησιμοποιήσετε τον γενετικό κώδικα και να γράψετε την αλληλουχία των αμινοξέων του τριπεπτιδίου.
- Στο σχήμα Ι παριστάνεται χρωμοσωμικό τμήμα που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και οι θέσεις που τέμνεται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI (θέση Ε) και NotI (θέση Ν).



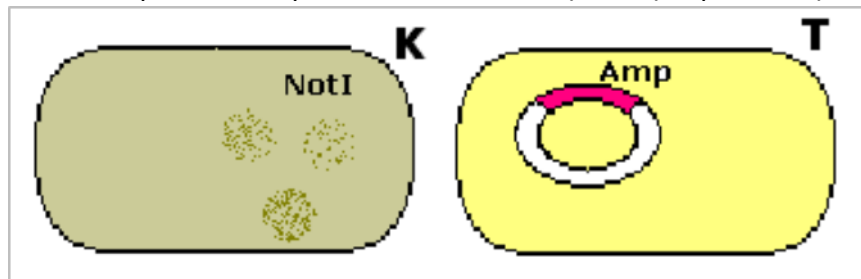
Σχήμα Ι

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



Σχήμα ΙΙ

Στο σχήμα ΙΙΙ απεικονίζονται τα βακτήρια Κ και Τ που είναι πιθανά κύτταρα-ξενιστές για την κλωνοποίηση του χρωμοσωμικού τμήματος. Στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου Κ ανιχνεύονται ίχνη της περιοριστικής ενδονουκλεάσης NotI, ενώ στο βακτήριο Τ προϋπάρχει ένα πλασμίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.



Σχήμα ΙΙΙ

A. Ποιος συνδυασμός περιοριστικής ενδονουκλεάσης–πλασμιδίου αποκλείεται να χρησιμοποιηθεί για την κλωνοποίηση του τμήματος, ανεξαρτήτως κυττάρου-ξενιστή; Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.

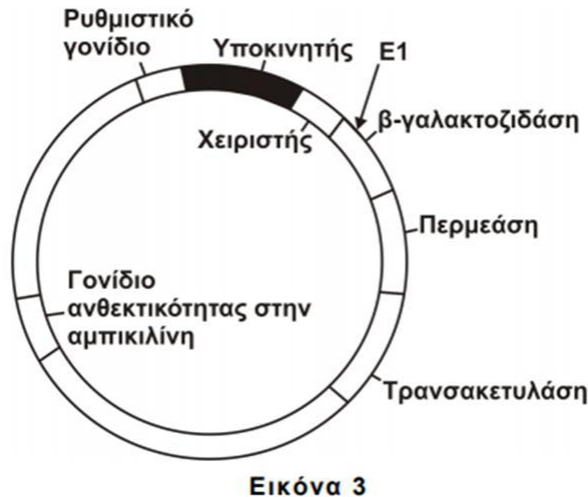
B. Είναι δυνατή η κλωνοποίηση του χρωμοσωμικού τμήματος με τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου Α με τη βοήθεια της NotI και το μετασχηματισμό του βακτηρίου Κ; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

Γ. Είναι δυνατή η κλωνοποίηση του χρωμοσωμικού τμήματος με τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου Β με τη βοήθεια της EcoRI και το μετασχηματισμό του βακτηρίου Τ; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

Δ. Πώς είναι δυνατός ο μετασχηματισμός του βακτηρίου Τ; Με ποιο αντιβιοτικό θα γίνει στην περίπτωση αυτή η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων;

Ε. Το χρωμοσωμικό τμήμα πρόκειται να κλωνοποιηθεί με σκοπό τη μελέτη της αλληλουχίας των βάσεων του. Ποια άλλη εναλλακτική μέθοδος κλωνοποίησης, εκτός από το μετασχηματισμό βακτηρίων, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ποιο είναι το πλεονέκτημά της;

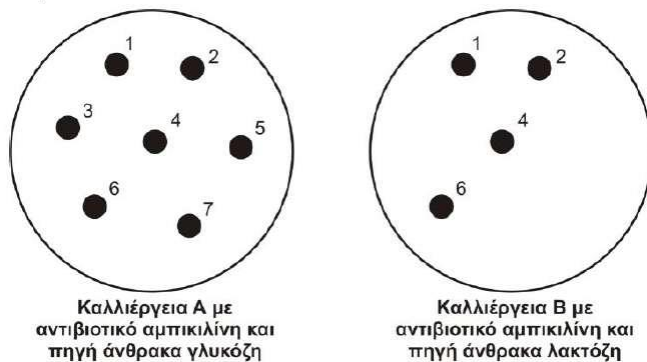
4. Προκειμένου να μελετήσουμε το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Α, το κλωνοποιούμε σε κατάλληλο πλασμίδιο φορέα (Εικόνα 3) που φέρει την αλληλουχία του οπερονίου της λακτόζης. Το γονίδιο εισάγεται στο σημείο που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση E1. Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιούμε ως βακτήρια ξενιστές στελέχη E.coli στα οποία δεν λειτουργεί το οπερόνιο της λακτόζης και είναι ευαίσθητα στην αμπικιλίνη.



Εικόνα 3

Μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού, τα βακτήρια μεταφέρονται σε στερεό θρεπτικό υλικό με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και αντιβιοτικό αμπικιλίνη (καλλιέργεια Α, Εικόνα 4). Στη συνέχεια μεταφέρουμε δείγματα από όλες τις αριθμημένες αποικίες σε νέο στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει λακτόζη και αμπικιλίνη, οπότε αναπτύσσεται η καλλιέργεια Β (Εικόνα 4). Να αναφέρετε τα είδη

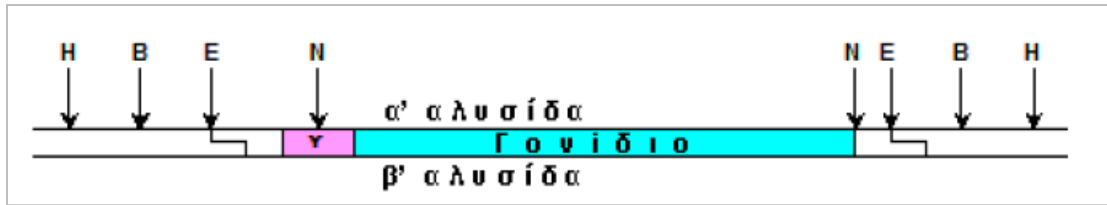
των βακτηρίων που αναπτύσσονται στις δύο παραπάνω καλλιέργειες Α και Β. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.



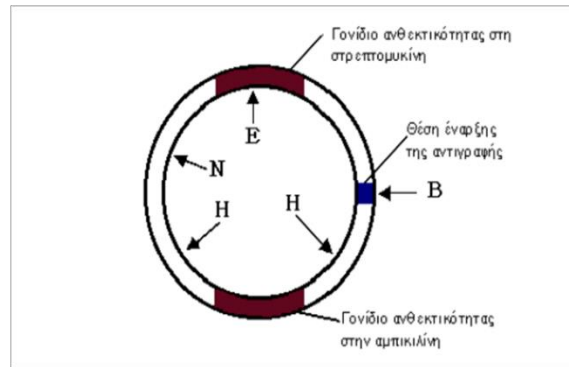
Εικόνα 4

5. Στα ακόλουθα σχήματα παριστάνονται:

- τμήμα DNA προκαρυωτικού κυττάρου, στο οποίο περιέχεται ένα γονίδιο και ο υποκινητής του. (Σχήμα Ι)
- πλασμίδιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης του συγκεκριμένου γονιδίου για την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί στο κυτταρόπλασμα βακτηρίου – ξενιστή. (Σχήμα ΙΙ)



Σχήμα Ι



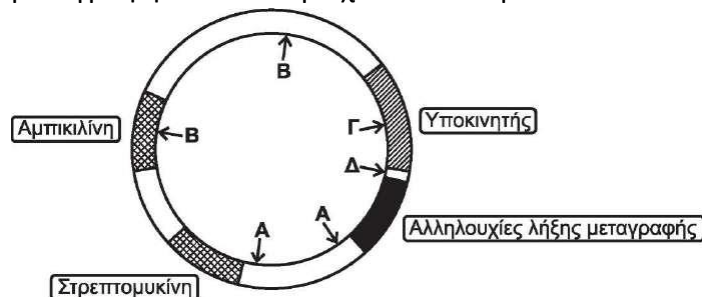
Σχήμα ΙΙ

Τα σημεία E, B, N και H υποδηλώνουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών EcoRI, BamHI, NotI και HindIII αντίστοιχα.

A) Ποια από τις δύο αλυσίδες του γονιδίου είναι η μη κωδική;

B) Ποιο από τα τέσσερα ένζυμα είναι το καταλληλότερο για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA με στόχο την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο στο βακτήριο ξενιστή;

6. Στην Εικόνα 1 δίνεται ένα πλασμίδιο που φέρει γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και στρεπτομυκίνη, έναν υποκινητή και αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής. Στις θέσεις A, B, 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.



A. Ποια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες α, β, γ ή δ είναι η κατάλληλη για τη χρήση του πλασμιδίου αυτού ως φορέα κλωνοποίησης;

B. 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 αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

Παρακάτω δίνεται τμήμα DNA το οποίο περιέχει το συνεχές ανθρώπινο γονίδιο που επιθυμούμε να εισαγάγουμε στο πλασμίδιο του σχήματος.

Αλυσίδα I **OH-GCCAATATTTAAATGAGCATGCCGTAGGAATATTCGG**

Αλυσίδα II **CGGTTATAATTTACTCGTACGGCATCCTTATAAGCC**

Εικόνα 2

Γ. Να εντοπίσετε την κωδική αλυσίδα του παραπάνω γονιδίου. Να γράψετε το mRNA και να σημειώσετε τον προσανατολισμό του. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

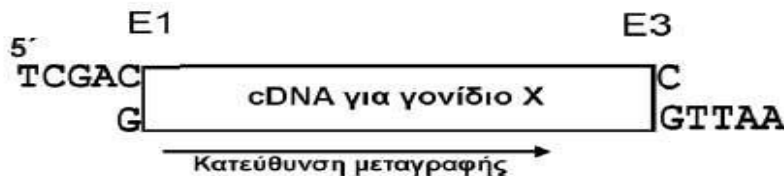
Δ. Με βάση το παραπάνω γονίδιο, να γράψετε την αλληλουχία μήκους έξι ζευγών βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση, την οποία προσδιορίσατε στο ερώτημα I, για την κλωνοποίηση του γονιδίου.

E. Να εξηγήσετε γιατί η κλωνοποίηση του παραπάνω γονιδίου στο πλασμίδιο του σχήματος μπορεί να οδηγήσει:

- I. στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων που παράγουν το ολιγοπεπτίδιο και
- II. στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων που δεν παράγουν το ολιγοπεπτίδιο παρόλο που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

(Πανελλήνιες Επαναληπτικές Εξετάσεις 2014)

- 7.** Έστω γονίδιο X (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 Εικόνα 2. 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 στην Εικόνα 2.



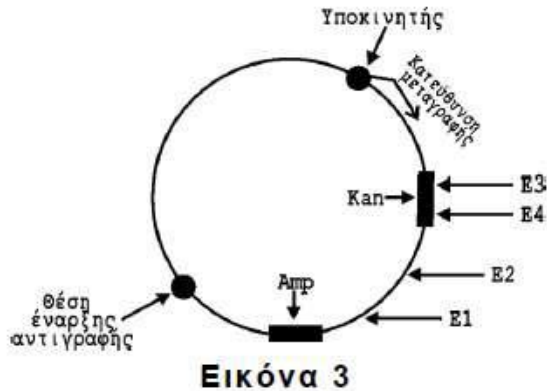
Εικόνα 2

A. Ποιες είναι οι αλληλουχίες των 6 ζευγών βάσεων που αναγνωρίζει η καθεμιά από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες E1 και E3 που χρησιμοποιήθηκαν;

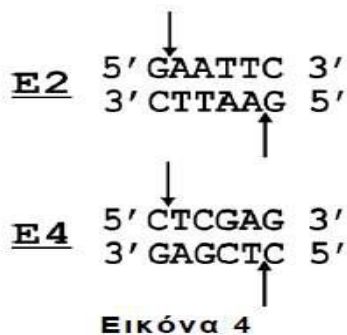
B. Ποια από τα παρακάτω δεν υπάρχουν στο cDNA του γονιδίου X;

- I. Υποκινητής,
- II. Εξώνια,
- III. Εσώνια,
- IV. 5' αμετάφραστη περιοχή,
- V. 3' αμετάφραστη περιοχή.

Γ. Θέλουμε να ενσωματώσουμε το cDNA του γονιδίου X στο πλασμίδιο της Εικόνας 3. 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 αμικικίνη και καναμυκίνη, αντίστοιχα.

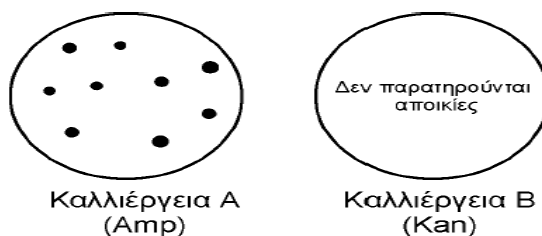


Στην Εικόνα 4 που ακολουθεί απεικονίζονται οι ειδικές αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες E2 και E4 και με τα βέλη υποδηλώνονται οι θέσεις που κόβονται οι αλυσίδες.



Ποιο ή ποια ένζυμο θα χρησιμοποιήσουμε για να κόψουμε το πλασμίδιο έτσι ώστε να ενσωματώσει το cDNA με το γονίδιο X και να επιτύχουμε την έκφρασή του από τον υποκινητή του πλασμιδίου; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

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 αμικικίνη (Εικόνα 5, καλλιέργεια Α) και τα άλλα μισά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το αντιβιοτικό καναμυκίνη (Εικόνα 5, καλλιέργεια Β). Να εξηγήσετε τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των καλλιεργειών Α και Β όπως αυτά απεικονίζονται στην Εικόνα 5.



(Πανελλαδικές Επαναληπτικές Εξετάσεις 2017)

DNA μόριο I $\left[\begin{array}{l} \text{Κλώνος I}\alpha \text{ } 5' \text{ TACCTCAATCCGTATTA } 3' \\ \text{Κλώνος I}\beta \text{ } 3' \text{ ATGGAGTTAGGCATAAT } 5' \end{array} \right.$

DNA μόριο II $\left[\begin{array}{l} \text{Κλώνος II}\alpha \text{ } 3' \text{ CCGTACGGATTGAGGAA } 5' \\ \text{Κλώνος II}\beta \text{ } 5' \text{ GGCATGCCTAACTCCTT } 3' \end{array} \right.$

Ανιχνευτής: $5' \text{ UACGGAUUGA } 3'$

DNA που θα υβριδοποιηθεί.

8. Δίνεται μείγμα μορίων DNA και ένας ανιχνευτής RNA.

Να εξηγήσετε τι είναι ανιχνευτής, να περιγράψετε τις διαδικασίες που θα ακολουθηθούν προκειμένου ο ανιχνευτής να υβριδοποιήσει την κατάλληλη αλληλουχία DNA και να εξηγήσετε ποιος είναι ο κλώνος του

(Πανελλήνιες Εξετάσεις 2010)

9. Η αλληλουχία $3' \dots \text{AAGCUGACGUCG} \dots 5'$ αποτελεί μέρος μεταφραζόμενου τμήματος ώριμου mRNA που απομονώθηκε από σωματικό κύτταρο ανθρώπου και πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης.
 - A. Να γράψετε την αλληλουχία βάσεων στο τμήμα του cDNA που σχηματίζεται.
 - B. Πόσοι δεσμοί υδρογόνου θα σπάσουν από το συγκεκριμένο τμήμα κατά την αποδιάταξη του υβριδικού μορίου mRNA/cDNA ;
 - Γ. Ο ανιχνευτής με αλληλουχία $5' \text{CTAGCTGCAGTCGAAGCAT } 3'$ υβριδοποιεί την κωδική ή τη μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου;
 - Δ. Πόσοι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται κατά την υβριδοποίηση του ανιχνευτή με το γονίδιο;
10. Προκειμένου να ανιχνευτεί σε cDNA βιβλιοθήκη ο βακτηριακός κλώνος που παράγει την ανθρώπινη ινσουλίνη, πρωτεΐνη που εκκρίνεται από το πάγκρεας και σχετίζεται με τον μεταβολισμό της γλυκόζης, παράχθηκε RNA σύμφωνα με μέρος της αλληλουχίας της αλυσίδας της ινσουλίνης που αποτελείται από τα αμινοξέα:
HOOC-...trp-met-met-trp-his-met-trp-trp...NH₂
 - A. Ποιο είναι το πλεονέκτημα της επιλογής της συγκεκριμένης αλληλουχίας αμινοξέων;
 - B. Ποιες είναι οι πιθανές αλληλουχίες του ανιχνευτή;
 - Γ. Ποιος είναι ο ελάχιστος αριθμός δεσμών υδρογόνου που αναπτύχθηκαν κατά την υβριδοποίηση του ανιχνευτή με 60 αποδιατεταγμένα πλασμίδια που απομονώθηκαν από 6 βακτήρια ενός κλώνου που περιείχε το εν λόγω γονίδιο; (συμβουλευτείτε τον γενετικό κώδικα)
 - Δ. Πώς ερμηνεύετε την απομόνωση τόσο μεγάλου αριθμού πλασμιδίων από 6 μόνο μετασχηματισμένα βακτήρια;
11. Ένα δίκλωνο γραμμικό μόριο DNA κόβεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII και δίνει τμήματα 15 kb, 18 kb, 7 kb. Όταν το ίδιο μόριο κόβεται μόνο από την EcoRI προκύπτουν δύο τμήματα, 18 και 22 kb. Όταν κόβουμε ταυτόχρονα και με τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες, προκύπτουν 4 τμήματα με τα εξής μεγέθη: 18, 15, 4, 3 kb. Να δείξετε πού βρίσκονται στο μόριο DNA οι αλληλουχίες τις οποίες αναγνωρίζουν τα δύο ένζυμα.

- 12.** Δίνεται ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA με μέγεθος 6×10^3 ζεύγη βάσεων (6 kbp) το οποίο έχει αλληλουχίες αναγνώρισης για δύο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, την EcoRI και τη BamHI. Στο παραπάνω τμήμα την πρώτη φορά επιδρούμε μόνο με την EcoRI, τη δεύτερη φορά μόνο με τη BamHI, ενώ την τρίτη φορά επιδρούμε ταυτόχρονα και με τα δύο ένζυμα. Τα αποτελέσματα δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Περιοριστική ενδονουκλεάση	Τμήματα DNA σε kb
EcoRI	2,3 και 3,7
BamHI	0,5 και 1,2 και 4,3
EcoRI και BamHI	0,5 και 1,2 και 1,8 και 2,5

Με βάση τις πληροφορίες του πίνακα, να σχεδιάσετε πού βρίσκονται στο αρχικό τμήμα DNA οι αλληλουχίες αναγνώρισης των δύο περιοριστικών ενζύμων (κατασκευή περιοριστικού χάρτη).

- 13.** Ένα πλασμίδιο υπόκειται στη δράση της EcoRI, οπότε παράγονται δύο τμήματα των 1,5 kb και 6,5kb αντίστοιχα (kb=χιλιάδες ζεύγη βάσεων). Όταν το ίδιο πλασμίδιο υπόκειται στη δράση της HindIII, παράγονται δύο τμήματα των 2 kb και 6 kb. Από την ταυτόχρονη επώαση του πλασμιδίου με τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται τέσσερα τμήματα των 0.5 kb, 1 kb, 1,5 kb και 5kb. Να απεικονίσετε στο πλασμίδιο τις σχετικές θέσεις αναγνώρισης των δύο ενδονουκλεασών.
- 14.** Με τη μέθοδο PCR κλωνοποιούμε ένα τμήμα δίκλωνου DNA που αποτελείται από 2.000 νουκλεοτίδια. Η διάρκεια κάθε κύκλου αντιγραφής είναι 5 min και σταματάμε τη διαδικασία όταν πάρουμε 16 αντίγραφα του παραπάνω τμήματος DNA.
- A.** Σε πόσο χρόνο παρήχθησαν τα 16 αντίγραφα του παραπάνω τμήματος DNA;
- B.** Πόσα νουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των παραπάνω αντιγράφων;
- Γ.** Πόσα είδη κλώνων συνιστούν τα 16 αντίγραφα; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.
- Σημείωση:** να θεωρηθεί ότι δεν έγινε λάθος κατά την αντιγραφή.