

Εργαστηριακή άσκηση: Κατασκευάζοντας Ανασυνδυασμένο DNA

Μάθημα: Βιολογία Γ΄ Λυκείου

Προβλεπόμενος Χρόνος: 3 διδακτικές ώρες (1 διδακτική ώρα για καθένα φύλλο εργασίας)

Σκοπός

Οι μαθητές αντιμετωπίζουν δυσκολίες στην κατανόηση των διεργασιών ανασυνδυασμού, τόσο λόγω της ιδιαιτερότητας των τεχνικών αυτών σε μοριακό επίπεδο, όσο και της αδυναμίας υλοποίησης σχετικών πειραματικών δραστηριοτήτων στο σχολικό εργαστήριο. Επιπλέον, τα τελευταία έτη, παρατηρείται αναντιστοιχία ανάμεσα στο περιεχόμενο του σχολικού και στα σχετικά θέματα των πανελληνίων. Με αφορμή τα παραπάνω σχεδιάσαμε 3 φύλλα εργασίας, κλιμακωτής δυσκολίας, όπου οι μαθητές καλούνται να κατασκευάσουν μοντέλα ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από χαρτόνι. Η κατασκευή των ίδιων των μοντέλων από τους μαθητές και κυρίως οι διαδικασίες στις οποίες αυτοί θα προβούν για να πραγματοποιήσουν τον ανασυνδυασμό τους, αναμένεται να συνεισφέρουν, με εποπτικό τρόπο, στη βαθύτερη κατανόηση των σχετικών διεργασιών και να βοηθήσουν στην αποσαφήνιση λεπτομερειών που δε σχολιάζονται στο σχολικό βιβλίο. Οπτικοποιώντας τη διαδικασία του ανασυνδυασμού στις συγκεκριμένες δραστηριότητες, οι μαθητές αναμένεται να ανταποκριθούν αποτελεσματικότερα όταν κληθούν να απαντήσουν σε σχετικά ερωτήματα των πανελληνίων.

Διδακτικοί Στόχοι- οι μαθητές:

- Να αντιληφθούν επίμαχα σημεία τα οποία δεν αναλύονται επαρκώς στο σχολικό βιβλίο και σε κάποιες περιπτώσεις δημιουργούν σύγχυση στους μαθητές. Ωστόσο ζητούνται επανειλημμένα στα θέματα των πανελληνίων.
- Να εξασκηθούν με βιωματικό τρόπο και εποπτικά σε συγκεκριμένα ζητήματα πανελληνίων τα οποία ξεπερνούν την ύλη του σχολικού βιβλίου, για παράδειγμα πέψη πλασμιδίου με 2 διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ανασυνδυασμός του με τμήμα DNA που έχει κοπεί με 2 άλλες περιοριστικές (3^ο φύλλο εργασίας).
- Να εφαρμόσουν τις γνώσεις τους πάνω σε βασικές έννοιες όπως η συμπληρωματικότητα των βάσεων, η υβριδοποίηση και η «πέψη» με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Περιγραφή φύλλων εργασίας:

Στην 1^η δραστηριότητα γίνεται ανασυνδυασμός ενός μοντέλου πλασμιδίου με μία περιοριστική ενδονουκλεάση (Π.Ε.). Με αφορμή το Δ θέμα των επαναληπτικών πανελληνίων 2014, οι μαθητές καλούνται να ανακαλύψουν τους δύο διαφορετικούς τύπους ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που προκύπτουν. Ως εκ τούτου αναμένεται να κατανοήσουν το γεγονός ότι σε ορισμένα μετασχηματισμένα βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο δεν παράγεται το επιθυμητό πεπτίδιο, λόγω του τρόπου με τον οποίο εισήχθει το γονίδιο σε σχέση με τη θέση του υποκινητή και του κωδικονίου έναρξης.

Στην 2^η δραστηριότητα, με αφορμή το θέμα Δ των επαναληπτικών του 2022, γίνεται πάλι ανασυνδυασμός πλασμιδίων με μία Π.Ε., κατασκευή των διαφορετικών τύπων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και οι μαθητές καλούνται να ανακαλύψουν το αν παράγεται το πεπτίδιο ή όχι, με μια άλλη τεχνική που είναι κοινή στην εργαστηριακή πρακτική. Σε αυτήν την περίπτωση, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια πέπτονται με μια δεύτερη Π.Ε., που κόβει τόσο το γονίδιο όσο και το πλασμίδιο, και η επιλογή των αποικιών που παράγουν το πεπτίδιο γίνεται με βάση τα μήκη των θραυσμάτων που προκύπτουν ανάλογα με τον τρόπο που έχει εισαχθεί το γονίδιο.

Η 3^η δραστηριότητα στηρίζεται στο θέμα Δ των Επαναληπτικών Πανελληνίων 2017 και αφορά σε μια διαφορετική διεργασία ανασυνδυασμού η οποία εξασφαλίζει τη δημιουργία ενός μόνο τύπου ανασυνδυασμένων πλασμιδίων τα οποία φέρουν το ξένο γονίδιο με το σωστό προσανατολισμό. Επιπλέον, επειδή τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια παραμένουν γραμμικά, μιας και δεν έχουν μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα, όλα τα μετασχηματισμένα βακτήρια φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ο ανασυνδυασμός σ' αυτήν την περίπτωση γίνεται με τη χρήση 4 διαφορετικών Π.Ε., 2 για το γονίδιο και 2 για το πλασμίδιο και δεν αναφέρεται στη διδακτέα ύλη.

Μοντελοποίηση 1^{ης} Δραστηριότητας

Οι μαθητές καλούνται να κατασκευάσουν ένα πλασμίδιο από χαρτόνι, να το ανασυνδυάσουν με προσθήκη ξένου DNA και να απαντήσουν σε ερωτήσεις που στηρίζονται στο θέμα Δ των Επαναληπτικών Πανελληνίων 2014.

Ειδικότερα, στους μαθητές δίνονται σε παράρτημα 4 αλληλουχίες πλασμιδιακού DNA, μια αλληλουχία γονιδίου δότη και οι αλληλουχίες αναγνώρισης 4 Π.Ε. Οι αλληλουχίες του πλασμιδίου περιλαμβάνουν τη θέση έναρξης αντιγραφής (Θ.Ε.Α.), 2 γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά με τους υποκινητές τους και ένα τυχαίο τμήμα. Οι μαθητές καλούνται:

- να κατασκευάσουν το πλασμίδιο ενώνοντας τα επιμέρους τμήματά του
- να εντοπίσουν τις θέσεις αναγνώρισης των Π.Ε. πάνω στο πλασμίδιο και το ξένο γονίδιο

- να επιλέξουν την κατάλληλη Π.Ε. για τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου
- να κατασκευάσουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο
- να απαντήσουν τις ερωτήσεις του Φύλλου Εργασίας.

Οι Π.Ε. που δίνονται είναι: η BamHI η οποία κόβει μέσα στο ξένο γονίδιο, η HindIII η οποία κόβει 2 φορές το πλασμίδιο, η EcoRI η οποία κόβει εκατέρωθεν του ξένου γονιδίου και μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας της αμπικιλίνης και η SacI η οποία κόβει στη Θ.Ε.Α. Οι μαθητές, θα κατασκευάσουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και θα ελέγξουν τη δυνατότητα παραγωγής του ολιγοπεπτιδίου σε καλλιέργειες μετασχηματισμένων, με το συγκεκριμένο πλασμίδιο, βακτηρίων. Έτσι, θα διερευνήσουν βιωματικά τους διαφορετικούς τρόπους ανασυνδυασμού σε σχέση με τη θέση του υποκινητή του βακτηρίου και του κωδικωνίου έναρξης του γονιδίου και θα καταλήξουν στα ανάλογα συμπεράσματα.

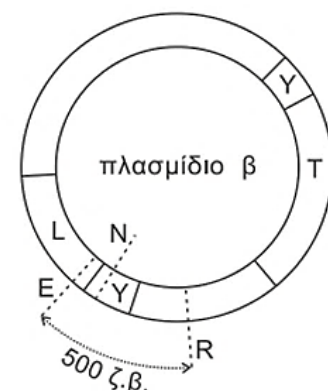
Μοντελοποίηση 2^{ης} Δραστηριότητας

Οι μαθητές καλούνται να επιλύσουν το θέμα Δ των Επαναληπτικών Πανελληνίων του 2022, κατασκευάζοντας ένα μοντέλο πλασμιδίου από χαρτόνι, το οποίο και θα ανασυνδυάσουν με προσθήκη ξένου DNA, για την παραγωγή πεπτιδίου για φαρμακευτική χρήση. Το πλασμίδιο που δόθηκε στις πανελλήνιες ως σχήμα φαίνεται στην εικόνα 1.

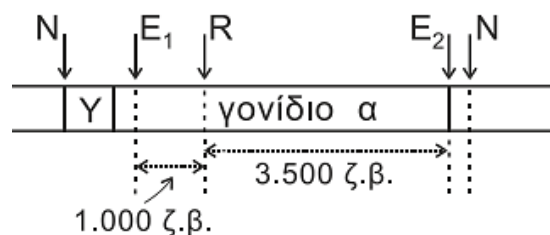
Στους μαθητές δίνονται σε παράρτημα εις διπλούν 4 αλληλουχίες πλασμιδιακού DNA και μια αλληλουχία ξένου γονιδίου. Οι αλληλουχίες του πλασμιδίου περιλαμβάνουν τη Θ.Ε.Α., ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (T) και το γονίδιο L, υπεύθυνο για την παραγωγή γαλάζιας χρωστικής, με τους υποκινητές τους και ένα τυχαίο τμήμα. Στο πλασμίδιο και στο γονίδιο δίνονται οι θέσεις που αναγνωρίζουν 3 περιοριστικές ενδονουκλεάσες (E, N, R) καθώς και οι αποστάσεις, σε ζεύγη βάσεων, μεταξύ τους. Η αντίστοιχη εικόνα του γονιδίου που δόθηκε στις πανελλήνιες ως σχήμα φαίνεται στην εικόνα 2.

Οι μαθητές καλούνται:

- να κατασκευάσουν το μοντέλο του πλασμιδίου ενώνοντας τα επιμέρους τμήματά του
- να ανασυνδυάσουν το εν λόγω πλασμίδιο με 2 διαφορετικούς τρόπους



Εικόνα 1

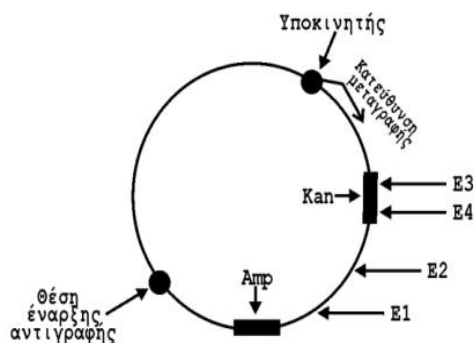


Εικόνα 2

- να αναγνωρίσουν τους διαφορετικούς τύπους μετασχηματισμένων βακτηρίων στις αποικίες που δίνονται στο θέμα Δ, με βάση το χρώμα τους
- να διακρίνουν σε ποιες από αυτές τις αποικίες θα εκφράζεται το ξένο γονίδιο, με βάση τα δεδομένα των αποστάσεων που δίνονται, και μετά την επίδραση της Π.Ε. R
- να απαντήσουν τις ερωτήσεις του Φύλλου Εργασίας.

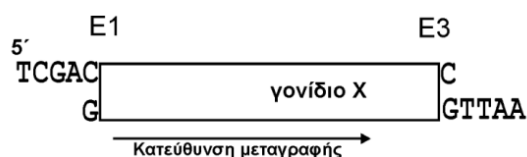
Μοντελοποίηση 3^{ης} Δραστηριότητας

Οι μαθητές καλούνται να κατασκευάσουν από χαρτόνι το μοντέλο πλασμιδίου που δόθηκε ως σχήμα στο θέμα Δ των Επαναληπτικών Πανελληνίων 2017 (εικόνα 3) και να το ανασυνδυάσουν με προσθήκη ξένου DNA (εικόνα 4) χρησιμοποιώντας όχι μία, αλλά 4 διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Με βάση το μοντέλο αυτό, αναμένεται οι μαθητές να κατανοήσουν εποπτικά τις διεργασίες ανασυνδυασμού με χρήση 4 διαφορετικών Π.Ε., 2 για το γονίδιο και 2 για το πλασμίδιο και να απαντήσουν στις αντίστοιχες ερωτήσεις του



Εικόνα 3

θέματος αυτού καθώς και σε υποερωτήματα του Δ θέματος πανελληνίων 2020. Ειδικότερα στους μαθητές δίνονται 4 αλληλουχίες πλασμιδιακού DNA και μια αλληλουχία γονιδίου δότη κόμμενο με δύο διαφορετικές περιοριστικές, τις E1 και E3, σε χαρτόνι. Οι αλληλουχίες του πλασμιδίου περιλαμβάνουν τη Θ.Ε.Α., 2 γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και ένα τυχαίο τμήμα. Στο πλασμίδιο δίνονται οι θέσεις που κόβουν οι Π.Ε. E1, E2, E3 και E4 και οι αλληλουχίες αναγνώρισης 2 εξ' αυτών. Οι μαθητές καλούνται:



Εικόνα 4

- να κατασκευάσουν το πλασμίδιο ενώνοντας τα επιμέρους τμήματά του
- να επιλέξουν τις κατάλληλες Π.Ε. για τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου για την παραγωγή της φαρμακευτικής πρωτεΐνης
- να κατασκευάσουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο
- να απαντήσουν τις ερωτήσεις του Φύλλου Εργασίας.

ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 1^{ης} ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

Υλικά

- Αλληλουχίες DNA (δίνονται στο παράρτημα Ι)
- Ψαλίδι
- Κολλητική ταινία
- Μολύβι

Κατασκευή πλασμιδίου και ανασυνδυασμός

Στη δραστηριότητα αυτή καλείστε να κατασκευάσετε ένα μοντέλο πλασμιδίου στο οποίο θα ενσωματώσετε ένα ευκαρυωτικό γονίδιο το οποίο θέλουμε στη συνέχεια να εκφραστεί σε βακτηριακούς κλώνους για την παραγωγή ολιγοπεπτιδίου. Η μοντελοποίηση της διαδικασίας αυτής αναμένεται να αναδείξει με εποπτικό τρόπο τον λόγο για τον οποίο σε κάποιες αποικίες μετασχηματισμένων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια βακτηρίων δεν παράγεται το επιθυμητό ολιγοπεπτίδιο. Η κατασκευή του μοντέλου και οι ερωτήσεις που ακολουθούν στηρίζονται στο Δ θέμα των επαναληπτικών πανελληνίων του 2014.

Στο Παράρτημα Ι σας δίνονται 4 αλληλουχίες πλασμιδιακού DNA για την κατασκευή του μοντέλου, μια αλληλουχία συνεχούς ευκαρυωτικού γονιδίου για τον ανασυνδυασμό, και οι αλληλουχίες αναγνώρισης 4 περιοριστικών ενδονουκλεασών (Π.Ε.). Οι αλληλουχίες του πλασμιδίου περιλαμβάνουν τη θέση έναρξης της αντιγραφής (Θ.Ε.Α.), 2 γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά με τους υποκινητές τους και ένα τυχαίο τμήμα. Οι αγκύλες στις αλληλουχίες που δίνονται υποδηλώνουν τα άκρα των γονιδίων και της Θ.Ε.Α., ενώ τα γράμματα Χ αντιπροσωπεύουν τυχαία νουκλεοτίδια.

Για την κατασκευή σας, ακολουθείστε τα παρακάτω βήματα:

- Κόψτε τα 4 πρώτα τμήματα DNA που σας δίνονται στο Παράρτημα Ι, τα οποία προσομοιώνουν διαφορετικές αλληλουχίες πλασμιδιακού DNA. Ενώστε τα με τη σειρά χρησιμοποιώντας την κολλητική ταινία που σας δίνεται. Στο τέλος ενώστε το τμήμα 4 με το 1 ώστε να δημιουργηθεί κυκλικό πλασμίδιο.
- Στη συνέχεια, κόψτε το τμήμα 5 που αντιστοιχεί στο συνεχές ευκαρυωτικό γονίδιο που θέλουμε να κλωνοποιηθεί, καθώς και τα τμήματα που αντιστοιχούν στις αλληλουχίες αναγνώρισης των 4 Π.Ε.
- Κρατώντας στο χέρι τα τμήματα με τις αλληλουχίες αναγνώρισης των 4 Π.Ε., βρείτε και σημειώστε με μολύβι πάνω στο πλασμίδιο και στο ευκαρυωτικό γονίδιο τις θέσεις που δρα η καθεμιά.

1. Ποια από τις 4 Π.Ε. που διαθέτετε είναι η κατάλληλη για τη χρήση του πλασμιδίου αυτού ως φορέα κλωνοποίησης για το ξένο γονίδιο που σας δίνεται; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

.....

.....

.....

➤ Με βάση τις θέσεις αναγνώρισης της Π.Ε. που θα χρησιμοποιήσετε, κόψτε με το ψαλίδι σας το πλασμίδιο και το ευκαρυωτικό γονίδιο και κατασκευάστε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

2. Υποθέστε ότι το ανασυνδυασμένο σας πλασμίδιο μετασχηματίζει βακτήρια. Με ποιο αντιβιοτικό θα επιλέγατε τα μετασχηματισμένα από τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια και γιατί;

.....

.....

.....

3. Πώς θα απομονώνατε τα βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από αυτά με το μη ανασυνδυασμένο;

.....

.....

.....

4. Να δείξετε με χρήση του μοντέλου σας και να εξηγήσετε γιατί η κλωνοποίηση του ξένου γονιδίου στο πλασμίδιο 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.

.....

.....

.....

.....

ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 2^{ης} ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

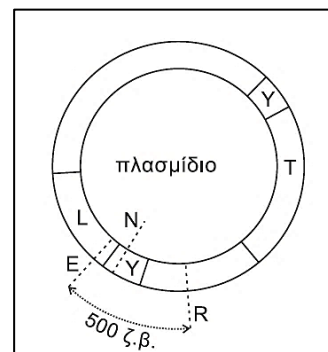
Υλικά

- Αλληλουχίες DNA (δίνονται στο παράρτημα ΙΙ)
- Ψαλίδι
- Κολλητική ταινία
- Μολύβι

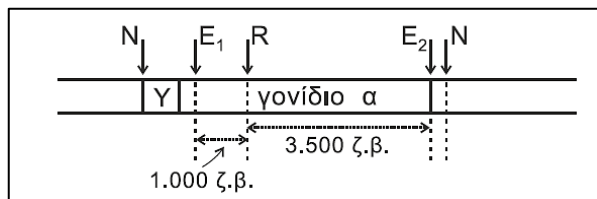
Κατασκευή πλασμιδίου και ανασυνδυασμός

Στη δραστηριότητα αυτή καλείστε να κατασκευάσετε ένα μοντέλο πλασμιδίου στο οποίο θα ενσωματώσετε ένα ευκαρυωτικό γονίδιο (α) το οποίο θέλουμε στη συνέχεια να εκφραστεί σε βακτηριακούς κλώνους για την παραγωγή ολιγοπεπτιδίου. Με τη μοντελοποίηση της διαδικασίας που θα ακολουθήσετε θα προσομοιώσετε μια τεχνική που είναι κοινή στην εργαστηριακή πρακτική για τον διαχωρισμό των μετασχηματισμένων βακτηρίων που παράγουν το επιθυμητό ολιγοπεπτίδιο από αυτά που δεν το παράγουν. Η κατασκευή του μοντέλου και οι ερωτήσεις που ακολουθούν στηρίζονται στο Δ θέμα των επαναληπτικών πανελληνίων του 2022.

Στο Παράρτημα ΙΙ σας δίνονται εις διπλούν 4 αλληλουχίες πλασμιδιακού DNA για την κατασκευή του μοντέλου και η αλληλουχία ενός συνεχούς ευκαρυωτικού γονιδίου με τον υποκινητή του (Υ). Οι αλληλουχίες του πλασμιδίου περιλαμβάνουν 2 γονίδια με τους υποκινητές τους, το γονίδιο ανθεκτικότητας για το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (Τ) και το γονίδιο L που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας γαλάζιας χρωστικής, τη θέση έναρξης της αντιγραφής (Θ.Ε.Α.) και ένα τυχαίο τμήμα. **Σκιασμένες** απεικονίζονται οι θέσεις αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Π.Ε.) N, E και R. Σχηματικά, το πλασμίδιο που θα κατασκευάσετε φαίνεται στη διπλανή εικόνα.



Στην αλληλουχία του ευκαρυωτικού γονιδίου α που δίνεται απεικονίζονται **σκιασμένες** οι θέσεις αναγνώρισης των Π.Ε. N, E (θέσεις E1 και E2) και R. Σχηματικά, το γονίδιο που θα κλωνοποιήσετε φαίνεται στη διπλανή εικόνα.



Δίνεται ότι όλες οι Π.Ε. κόβουν την αλληλουχία

αναγνώρισής τους στη μέση και δεν αφήνουν μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα. Οι αγκύλες στις αλληλουχίες που δίνονται υποδηλώνουν τα άκρα των γονιδίων και της Θ.Ε.Α., ενώ τα γράμματα Χ αντιπροσωπεύουν τυχαία νουκλεοτίδια.

Για την κατασκευή σας, ακολουθείστε τα παρακάτω βήματα:

- Κόψτε τα 4 πρώτα τμήματα DNA που σας δίνονται στο Παράρτημα ΙΙ, τα οποία προσομοιώνουν διαφορετικές αλληλουχίες πλασμιδιακού DNA. Ενώστε τα με τη σειρά χρησιμοποιώντας την κολλητική ταινία που σας δίνεται. Στο τέλος ενώστε το 4^ο τμήμα με το 1^ο ώστε να δημιουργηθεί κυκλικό πλασμίδιο. Επαναλάβετε την παραπάνω διαδικασία για την κατασκευή και του δεύτερου πλασμιδίου.

1. Να εξηγήσετε γιατί δε θα χρησιμοποιήσετε την Π.Ε. Ν για την κλωνοποίηση του ευκαρυωτικού γονιδίου.

.....

.....

2. Να εξηγήσετε ποια Π.Ε. θα χρησιμοποιήσετε για τον ανασυνδυασμό.

.....

.....

.....

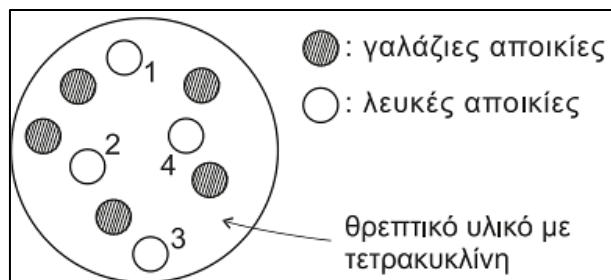
- Με βάση τις θέσεις αναγνώρισης της Π.Ε. που θα χρησιμοποιήσετε, κόψτε με το ψαλίδι σας το καθένα πλασμίδιο και το καθένα ξένο γονίδιο και κατασκευάστε τους 2 δυνατούς τύπους των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που μπορούν να προκύψουν. Σε τι διαφέρουν μεταξύ τους;

.....

.....

.....

3. Όταν οι αντίστοιχες διαδικασίες ανασυνδυασμού εφαρμόστηκαν στο εργαστήριο, το σύνολο των πλασμιδίων που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό βακτηρίων, ευαίσθητων στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη. Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με τετρακυκλίνη και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη γαλάζιων και λευκών αποικιών όπως φαίνεται στο διπλανό σχήμα. Να αιτιολογήσετε γιατί επιλέγονται οι λευκές αποικίες για την παραγωγή του πεπτιδίου.



.....

.....

.....

.....

- Στο ευκαρυωτικό γονίδιο οι σχετικές αποστάσεις μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης των Π.Ε. Ε και R είναι: E1 – R : 1.000 ζ.β. και R – E2 : 3.500 ζ.β. ενώ στο πλασμίδιο, οι θέσεις αναγνώρισης των Ε και R απέχουν 500 ζ.β.

Στο εργαστήριο, οι ερευνητές απομόνωσαν πλασμίδια από τα βακτήρια των λευκών αποικιών 1, 2, 3, 4 και σε αυτά επέδρασαν με την Π.Ε. R. Τα τμήματα DNA που προέκυψαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πλασμίδια/ Αποικίες	Τμήματα DNA
1	1.500 ζ.β. και 18.500 ζ.β.
2	4.000 ζ.β. και 16.000 ζ.β.
3	4.000 ζ.β. και 16.000 ζ.β.
4	1.500 β. και 18.500 ζ.β.

4. Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του πίνακα, να βρείτε το μήκος που αντιστοιχεί στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

.....

- Με βάση τη θέση αναγνώρισης της Π.Ε. R, κόψτε με το ψαλίδι σας και τα δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάσατε. Λαμβάνοντας υπόψη την απάντησή σας στο προηγούμενο ερώτημα, υπολογίστε για καθένα από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδιά σας τα μήκη των τμημάτων DNA που προκύπτουν. Συγκρίνετε τα αποτελέσματά σας με αυτά του πίνακα. Βάσει των αποτελεσμάτων σας, απαντήστε στις παρακάτω ερωτήσεις:

5. Ποιο είναι το μήκος του μη ανασυνδυασμένου πλασμιδίου; Αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

.....

6. Ποια ή ποιες από τις αποικίες 1, 2, 3, 4 μπορεί/μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή του πεπτιδίου; Αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

.....

7. Το πεπτίδιο που παράγεται από τα βακτήρια που επιλέξατε στο προηγούμενο ερώτημα βρέθηκε ότι δεν είναι βιολογικά λειτουργικό. Να δώσετε μια πιθανή εξήγηση. Να μη ληφθεί υπόψιν η περίπτωση μετάλλαξης.

.....

.....

.....

.....

.....

ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 3^{ης} ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

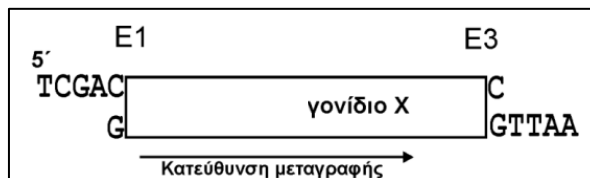
Υλικά

- Αλληλουχίες DNA (δίνονται στο παράρτημα III)
- Ψαλίδι
- Κολλητική ταινία
- Μολύβι

Κατασκευή πλασμιδίου και ανασυνδυασμός

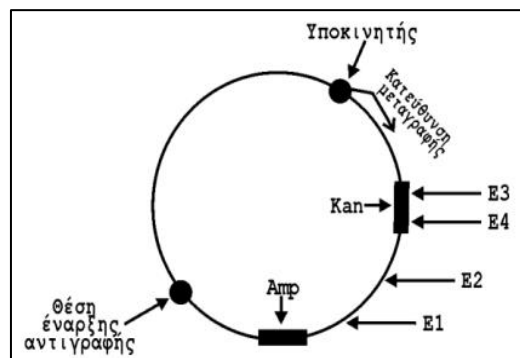
Στη δραστηριότητα αυτή καλείστε να κατασκευάσετε ένα μοντέλο πλασμιδίου στο οποίο θα ενσωματώσετε ένα ευκαρυωτικό γονίδιο (X) το οποίο θέλουμε στη συνέχεια να εκφραστεί σε βακτηριακούς κλώνους για την παραγωγή ολιγοπεπτιδίου. Η μοντελοποίηση της διαδικασίας αυτής αφορά σε μια διαφορετική διεργασία ανασυνδυασμού η οποία απαιτεί τη χρήση περισσότερων από μια περιοριστικών ενδονουκλεασών (Π.Ε.) και εξασφαλίζει τη δημιουργία ενός μόνο τύπου ανασυνδυασμένων πλασμιδίων τα οποία φέρουν το ξένο γονίδιο με τον σωστό προσανατολισμό. Η κατασκευή του μοντέλου και οι ερωτήσεις που ακολουθούν στηρίζονται στο Δ Θέμα των επαναληπτικών πανελληνίων του 2017 και στο Δ Θέμα των πανελληνίων του 2020.

Στο παράρτημα III σας δίνονται 4 αλληλουχίες πλασμιδιακού DNA για την κατασκευή του μοντέλου, μια αλληλουχία συνεχούς ευκαρυωτικού γονιδίου X με μονόκλωνα άκρα η οποία έχει προκύψει μετά από πέψη με δύο διαφορετικές Π.Ε., τις E1 και E3 (όπως



φαίνεται σχηματικά στο διπλανό σχήμα) και οι αλληλουχίες αναγνώρισης 2 Π.Ε., των E2 και E4.

Οι αλληλουχίες του πλασμιδίου περιλαμβάνουν τη θέση έναρξης της αντιγραφής (Θ.Ε.Α.), 2 γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά με τους υποκινητές τους και ένα τυχαίο τμήμα. Σχηματικά, το πλασμίδιο που θα κατασκευάσετε φαίνεται στη διπλανή εικόνα. Στις αλληλουχίες του πλασμιδιακού DNA που σας δίνονται απεικονίζονται **σκιασμένες** οι θέσεις αναγνώρισης για τις 4 Π.Ε., οι αγκύλες υποδηλώνουν τα άκρα των γονιδίων και της Θ.Ε.Α., ενώ τα γράμματα X αντιπροσωπεύουν τυχαία νουκλεοτίδια.



Για την κατασκευή σας, ακολουθείστε τα παρακάτω βήματα:

➤ Κόψτε τα 4 πρώτα τμήματα DNA που σας δίνονται στο Παράρτημα ΙΙΙ, τα οποία προσομοιώνουν διαφορετικές αλληλουχίες πλασμιδιακού DNA. Ενώστε τα με τη σειρά χρησιμοποιώντας την κολλητική ταινία που σας δίνεται. Στο τέλος ενώστε το τμήμα 4 με το 1 ώστε να δημιουργηθεί κυκλικό πλασμίδιο.

➤ Στη συνέχεια, κόψτε το τμήμα 5 που αντιστοιχεί στο τμήμα DNA του ευκαρυωτικού γονιδίου που θέλουμε να κλωνοποιηθεί.

1. Γράψτε τις αλληλουχίες των 6 ζευγών βάσεων που αναγνωρίζει η κάθε μια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (E1 και E3) που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του γονιδίου.

.....
.....

2. Αιτιολογήστε ποιά ή ποιές περιοριστικές από τις E1, E2, E3, και E4 θα χρησιμοποιήσετε για να κόψετε το πλασμίδιο έτσι ώστε να ενσωματώθει το DNA του δότη και να επιτύχουμε την έκφρασή του από τον υποκινητή του πλασμιδίου.

.....
.....
.....
.....
.....

➤ Με βάση τις θέσεις αναγνώρισης των Π.Ε. που θα χρησιμοποιήσετε, κόψτε με το ψαλίδι σας το πλασμίδιο και ανασυνδυάστε το.

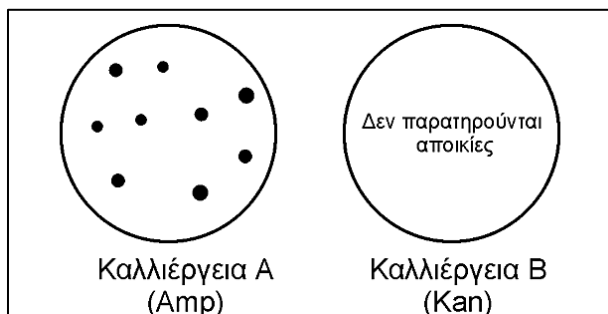
3. Ποια/ποιες είναι η/οι αλληλουχία/ες έξι ζευγών βάσεων που εμφανίζεται/εμφανίζονται εκατέρωθεν του τμήματος του γονιδίου, στην περιοχή σύνδεσης των μονόκλωνων άκρων του μετά την ενσωμάτωσή του στο πλασμίδιο με τη δράση της DNA δεσμάσης;

.....
.....

4. Ποιο είναι θα είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης και των τεσσάρων Π.Ε. στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο; Δικαιολογήστε την απάντησή σας.

.....
.....
.....
.....

5. Σε συνέχεια της διαδικασίας κλωνοποίησης του γονιδίου μετασχηματίζουμε κύτταρα του βακτηρίου *E. coli*. Τα μισά από αυτά τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (καλλιέργεια Α) και τα άλλα μισά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το αντιβιοτικό καναμυκίνη (καλλιέργεια Β). Να εξηγήσετε τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των καλλιεργειών Α και Β όπως αυτά απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα.



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

1ο τμήμα

γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη

Υποκινητής

5' → 3' 3' → 5'
 5' ATAATTCTATATTCGG (XXXXXXXXXXGAATTCXXXXXXXXXXXXXXXXXX) AATCTGAAGGTTTCGAATATATAT
 3' TATTTTGGTATTTTGGC (XXXXXXXXXXCTTAATGXXXXXXXXXXXXXXXXXX) TTGATCTTCCAACTTCTATATATAT
 3' ← 5'

Κολλήστε το 2°

2ο τμήμα

5' → 3'
 5' GATCCAGATCCGAAGCTTCTCTAGGACCTTGCGAAGCCACGTAGTTCAGATTAATGCCTGAT
 3' ← 5'
 ATCAGGCTTAATCTAAGTCTAAGGCTCCTAGAGAGAGGCTTCTCTAGGACCTTGCGAAGCCACGTAGTTCAGATTAATGCCTGAT

Κολλήστε το 3°

3ο τμήμα

O.E.A.

5' → 3' G.E.A.

5' CGCTACAAGCTTATAGCGGCC (XXXXXXXXGAGCTCXXXXXXXXXX) AATATTGCGCAGTCTTAGCAC

3' GCGGATGTTGATGAATAGCGCGCGG (XXXXXXXXCTCGAGXXXXXXXXXX) TTATATGCGGTCGAGATGCTGTC

3' ← 5'

κολληστε το 4^ο

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II (φωτοτυπήστε εις διπλούν)

Υποκινητής 1ο τμήμα γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη

5' → 3' 5' → 3'

5' ΑΤΑΤΑΤCΤΑΤΑΤTCGG (XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX) ΑΑΤCΤGΤΑGΓTTCGAΑΤΑΤΑΤΑΤ

3' ← 5' 3' ← 5'

Κολλήστε το 2°

2ο τμήμα

5' → 3' 5' → 3'

5' GTC...TCCAGATATGCAGCTTCTCTAGGACCTTGCGAAGCTATAGCGTTCAGATTAATGCCT

3' ← 5' 3' ← 5'

Κολλήστε το 3°

3ο τμήμα 500 ζ.β. Υποκινητής γονίδιο γαλάζιας χρωστικής (L)

5' → 3' 5' → 3'

5' TACAAGCTTAT XXX XXX CGG TATA XXXX AT (XXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX) TCC

3' ← 5' 3' ← 5'

R N E

Κολλήστε το 4°

O.E.A.

Κολλήστε στο 1°

1000 ζ.β.

3500 ζ.β.

γονίδιο α

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

1ο τμήμα

Υποκινητής

γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη

5' → 3'

3' ← 5'

Ε3

Ε4

Κολλήστε το 2°

2ο τμήμα

Ε2

Ε1

5' → 3'

3' ← 5'

Κολλήστε το 3°

3ο τμήμα

Υποκινητής

γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη

5' → 3'

3' ← 5'

Κολλήστε το 4°

O.E.A.

Κολλήστε στο 1^ο

ευκαρυωτικό γονίδιο X

$5' \rightarrow 3'$
E1 TCGACAATTCCTTATAAATGTTGCGAAGGATCCGTCAGCGCTAGCACTCCTTAAAAATTGCGCC **E3**
 $3' \leftarrow 5'$
E3 AATTGGCGAATTTTAAAGGAGTGCTAGCGGCTGACGGATCCTTCGCCAACATTTATAGGAATTG **E1**

E2: 5' G A A T T C
3' C T T A A G

E4: 5' C T C G A G
3' G A G C T C