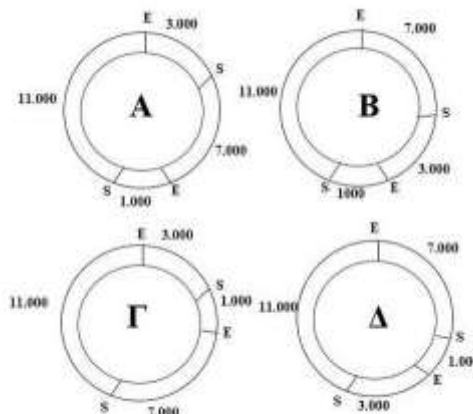


Δίνονται τα τμήματα που προκύπτουν από τη μεμονωμένη ή ταυτόχρονη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών EcoRI (E) και SalI (S) σε ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA

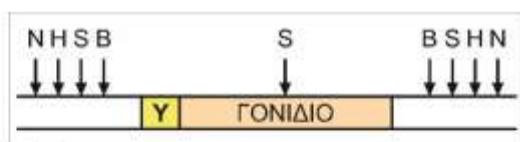
ΠΕ	Μήκος τμημάτων
EcoRI	10.000 + 12.000
SalI	8.000 + 14.000
EcoRI+SalI	1.000 + 2.000 + 7.000 + 11.000



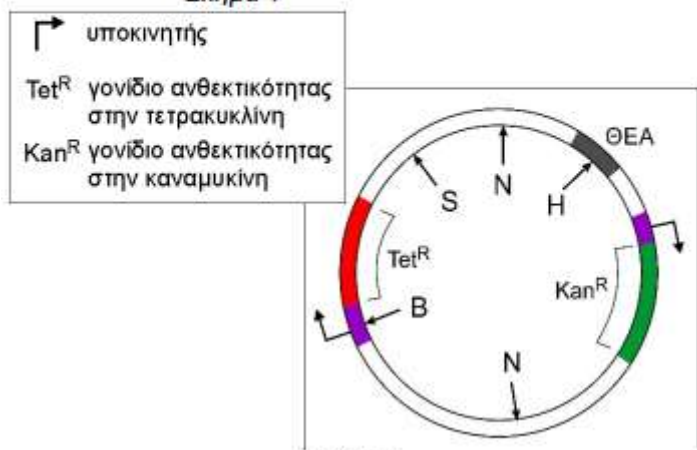
1. Αν επιθυμούσατε να εισαγάγατε σε πλασμίδιο οποιοδήποτε από τα τέσσερα τμήματα που προκύπτουν από την ταυτόχρονη δράση των δύο ενζύμων, με ποιο/ποια ένζυμο/α θα κόβατε τα πλασμίδια; Α. μόνο με τη SalI. Β. μόνο με την EcoRI. Γ. με την EcoRI για κάποια πλασμίδια και την SalI για κάποια άλλα. Δ. και με τις δύο
2. Ποια εικόνα αποδίδει σωστά το αποτέλεσμα της ταυτόχρονης δράσης και με τα δύο ένζυμα; Α

3. Η PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) είναι μια εξαιρετική μέθοδος δημιουργίας αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας (στόχου) που περιέχεται σε ένα πολύ μεγαλύτερο τμήμα DNA. Αν τοποθετηθεί ένα μόνο τέτοιο τμήμα δίκλωνου DNA με την αλληλουχία στόχο σε μια συσκευή PCR, πόσα τμήματα δίκλωνου DNA θα υπάρχουν μετά από 3 γύρους αντιγραφής; Α. 8 τμήματα DNA όπου όλα έχουν μονόκλωνα άκρα. Β. 8 τμήματα DNA όπου τα 6 έχουν μονόκλωνα άκρα και 2 τμήματα δεν έχουν μονόκλωνα άκρα και περιέχουν την αλληλουχία στόχο. Γ. 16 τμήματα DNA όπου όλα έχουν μονόκλωνα άκρα. Δ. 16 τμήματα DNA όπου τα 14 έχουν μονόκλωνα άκρα και 2 τμήματα δεν έχουν μονόκλωνα άκρα και περιέχουν την αλληλουχία στόχο.

Θέλετε να κλωνοποιήσετε το γονίδιο του σχήματος 1. Στο ίδιο σχήμα υποδεικνύονται και οι θέσεις που μπορούν να δράσουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσεις N, H, S και B. Πρόκειται να χρησιμοποιήσετε ως φορέα κλωνοποίησης το πλασμίδιο του σχήματος 2 και ως κύτταρα ξενιστές βακτήρια με γονίδιο ανθεκτικότητας στη στρεπτομυκίνη. Στο πλασμίδιο υποδεικνύεται η θέση έναρξης αντιγραφής, δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά με τους υποκινητές τους και οι θέσεις όπου τέμνουν το πλασμίδιο οι περιοριστικές ενδονουκλεάσεις N, H, S και B.



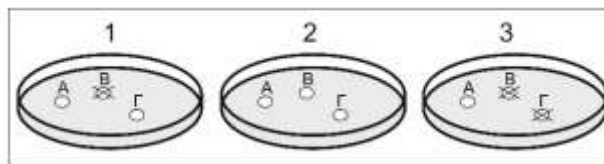
Σχήμα 1



Σχήμα 2

4. Ποια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσεις N, H, S και B είναι κατάλληλη για την κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου;
5. Με ποιο από τα αντιβιοτικά καναμυκίνη, στρεπτομυκίνη και τετρακυκλίνη θα επιλέξετε τα μετασχηματισμένα από τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια;
6. Μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού του ερωτήματος 5, χρησιμοποιείτε και δεύτερο αντιβιοτικό, προκειμένου να επιλέξετε τα βακτήρια που περιέχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από αυτά που περιέχουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ποιο αντιβιοτικό χρησιμοποιείτε αυτή τη φορά;

7. Αν τα βακτήρια Α είναι μετασχηματισμένα με το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο του ερωτήματος 44, τα Β είναι μη μετασχηματισμένα και τα Γ είναι μετασχηματισμένα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο του ως άνω ερωτήματος, να αντιστοιχίσετε καθένα από τα τρυβλία 1, 2 και 3 με το αντιβιοτικό που έχει προστεθεί στο θρεπτικό υλικό του κάθε τρυβλίου.



8. Σκοπεύετε να ενθέσετε το βακτηριακό γονίδιο *PhoQ* σε ένα πλασμίδιο που περιέχει έναν τεχνητό υποκινητή ακολουθούμενο από μια θέση που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση *NcoI* (5' C/CATGG 3') και μία θέση της ενδονουκλεάσης *EcoRI*. Θέλετε το γονίδιο *PhoQ* να μπορεί να εκφραστεί σε βακτήριο το οποίο θα μετασχηματιστεί από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Η κωδική περιοχή του γονιδίου *PhoQ* έχει μήκος 561 νουκλεοτίδια και τμήμα αυτής δίνεται παρακάτω:

5'-ATGCGACAGTTCATCACCGA...GCGGGACCGGACTGGGGTAA-3'

Να προσδιορίσετε εάν οι παρακάτω προτάσεις είναι σωστές (Σ) ή λανθασμένες (Λ).

- Α. Η χρήση δύο διαφορετικών θέσεων που αναγνωρίζουν διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες αποφεύγει τον λανθασμένο προσανατολισμό του παρεμβαλλόμενου θραύσματος.
 Β. Ένα πιθανό εμπρόσθιο πρωταρχικό τμήμα DNA (primer) για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό και την εισαγωγή του γονιδίου *PhoQ* στο πλασμίδιο θα έχει την ακόλουθη αλληλουχία:
 5'-GATCCCATGGATGCGACAGTTC-3'.
 Γ. Ένα πιθανό οπίσθιο πρωταρχικό τμήμα DNA (primer) για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό και εισαγωγή του γονιδίου *PhoQ* στο πλασμίδιο θα έχει την ακόλουθη αλληλουχία:
 5'-GATCGAATTCAATGGGGTCAGGCC-3'.
 Δ. Το τελικό γονιδιακό προϊόν θα αποτελείται από τουλάχιστον 186 αμινοξέα.



9. Για να πολλαπλασιάσετε το τμήμα DNA που βρίσκεται στο πλαίσιο του μορίου της εικόνας με τη βοήθεια της τεχνικής PCR προμηθεύσετε τα δύο πρωταρχικά τμήματα του πίνακα. Ποια από τις παρακάτω προτάσεις περιγράφει σωστά το αποτέλεσμα της προσπάθειάς σας;

ΠΡΩΤΑΡΧΙΚΑ ΤΜΗΜΑΤΑ	
1.	5' - ATAGAC - 3'
2.	5' - ACTTAC - 3'

5' - ACGACCGATAGACGACGTAGGACTTACTTACTTACGTAGGCA - 3'
 3' - TGCTGGCTATCTGCTGCATCCTGAATGAATGAATGCATCCGT - 5'

- Α. Η PCR θα εξελιχθεί ομαλά αφού και τα δύο πρωταρχικά τμήματα βρίσκουν συμπληρωματικές και αντιπαράλληλες αλληλουχίες. Β. Η PCR δεν θα προχωρήσει γιατί και τα δύο πρωταρχικά τμήματα έχουν συμπληρωματικές και αντιπαράλληλες αλληλουχίες στην ίδια αλυσίδα. Γ. Η PCR δεν θα προχωρήσει γιατί το πρωταρχικό τμήμα 2 επεκτείνεται έξω από το πλαίσιο. Δ. Η PCR θα προχωρήσει αφού και τα δύο πρωταρχικά τμήματα έχουν τον ίδιο προσανατολισμό.
 10. Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI*, *XbaI* και *BglII* είναι οι 5'G[↓]GATCC 3' 5'T[↓]CTAGA 3' και 5'A[↓]GATCT 3' αντίστοιχα. Ποια ένζυμα αφήνουν συμβατά άκρα που μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους; Α. Κανένα από τα ένζυμα δεν παράγει συμβατά άκρα. Β. Μόνο τα θραύσματα *BamHI* και *BglII* είναι συμβατά. Γ. Μόνο τα θραύσματα *BamHI* και *XbaI* είναι συμβατά. Δ. Μόνο τα θραύσματα *BglII* και *XbaI* είναι συμβατά.

