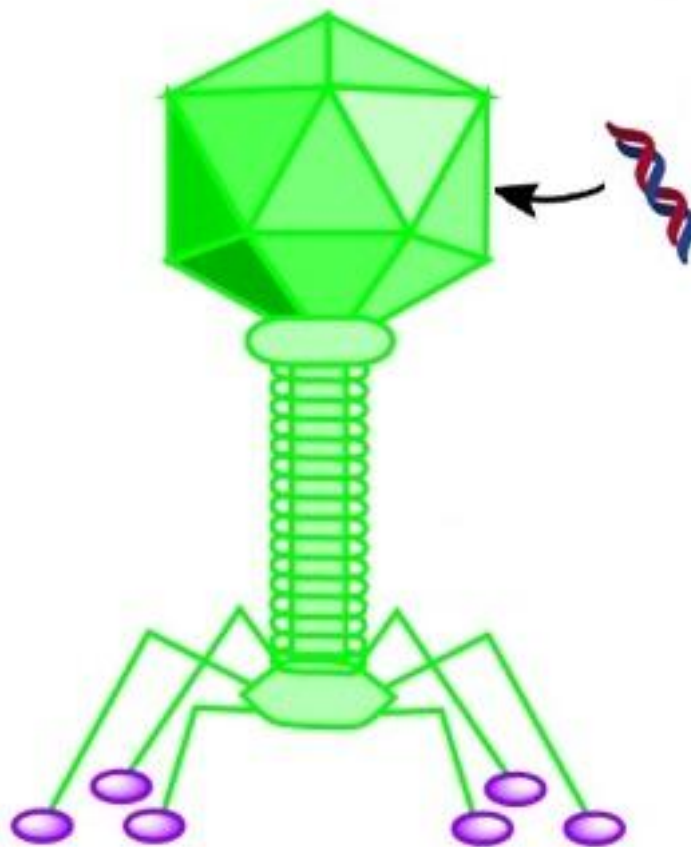


Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA



4ο κεφάλαιο

Περιεχόμενα

	από σελίδα
• Απαντήσεις στις ερωτήσεις του σχολικού βιβλίου	131
• Μεθοδολογία ασκήσεων	135
• Ερωτήσεις κλειστού τύπου:	139
→ πολλαπλής επιλογής, σωστού - λάθους, αντιστοίχισης, ταξινόμησης	
• Ερωτήσεις ανοικτού τύπου:	152
→ ανάκλησης, κρίσης - συνδυασμού - σύγκρισης	
• Ασκήσεις - προβλήματα	159

Σύμβολα για τη διαχείριση των ερωτήσεων-ασκήσεων:

👁 Διαβάζεις προσεκτικά, για να κατανοήσεις τα δεδομένα και τα ζητούμενα.

ΔΕΝ απαντάς γραπτά!!!

☞ Απαντάς **ΣΥΝΤΟΜΑ!!!** επάνω στο **ΒΙΒΛΙΟ**

📍 Απαντάς **ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΙΚΑ!!!** στο **ΤΕΤΡΑΔΙΟ**

💡 **ΠΡΟΣΟΧΗ ΑΠΑΙΤΗΤΙΚΗ!!!**

Απαντήσεις των ερωτήσεων του σχολικού βιβλίου

Οι εκφωνήσεις των ερωτήσεων βρίσκονται στο σχολικό βιβλίο, στη σελίδα 69.

Οι απαντήσεις δίνονται όπως ακριβώς είναι γραμμένες στο επίσημο βιβλίο του καθηγητή,
στις σελίδες 60 έως και 64.

1. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική, επειδή αναγνωρίζουν και κόβουν τις ίδιες πάντα ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA, αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα. (Υπάρχουν ορισμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που κόβουν το DNA χωρίς να δημιουργούν μονόκλωνες ουρές). Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές βάσεις του φορέα κλωνοποίησης που έχει κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Τα δύο είδη DNA μπορεί να αναμειχθούν, και επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυασμένο μόρια DNA. Οι φορείς κλωνοποίησης είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική, επειδή είναι μόρια αυτόνομα, που μπορούν να αναπαράγονται ανεξάρτητα. Οι φορείς κλωνοποίησης είναι μόρια DNA όπως πλασμίδια, DNA φάγων, που μπορούν να αυτοδιπλασιάζονται μέσα σε ένα κύτταρο-ξενιστή όπως ένα βακτήριο. Το DNA απομονώνεται από έναν οργανισμό-δότη, κόβεται ενζυματικά με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ενώνεται με το φορέα κλωνοποίησης και δημιουργείται ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA.
2. Η σωστή απάντηση είναι η γ.
3. Με τον όρο τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA εννοούμε όλες τις τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά τμήματος DNA από έναν οργανισμό σε έναν άλλο. Το DNA που μεταφέρθηκε θέλουμε να μπορεί να παράγει στο νέο οργανισμό την ίδια πρωτεΐνη. Αυτό μπορεί να συμβεί, μόνο αν η ίδια τριπλέτα DNA καθορίζει (μέσω των κωδικονίων του mRNA) την ένταξη του ίδιου αμινοξέος στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αυτό επιτυγχάνεται, μόνο επειδή ο γενετικός κώδικας είναι καθολικός.
4. Χρησιμοποιείτε το σχήμα της εικόνας 4.5 από τη σελίδα 60 του σχολικού βιβλίου.
Για να κατασκευαστεί cDNA, απομονώνεται το ολικό mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Το mRNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA). Η σύνθεση του cDNA γίνεται από το

ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA-mRNA. Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή θέρμανση και το cDNA χρησιμεύει σαν καλούπι για την σύνθεση μια συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δίκλωνου μορίου DNA. Το δίκλωνο μόριο DNA εισάγεται σε πλασμίδιο ή βακτηριοφάγο και κλωνοποιείται. Το cDNA περιέχει αντίγραφο του mRNA και έχει το πλεονέκτημα απομόνωσης μόνο των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των εξωνίων. Με αυτό τον τρόπο δίνει τη δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο-ξενιστή.

5. Το DNA κόβεται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε κομμάτια με γνωστά άκρα. Τα κομμάτια συνδέονται με ένα φορέα κλωνοποίησης, που έχει συμπληρωματικά άκρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που λέγεται DNA δεσμάση.

Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί από το mRNA με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση και να συνδεθεί με ένα φορέα κλωνοποίησης. Το ανασυνδυασμένο μόριο εισάγεται κατόπιν σε βακτήριο.

6.

- α. κύτταρα παγκρέατος
- β. πρόδρομα ερυθροκύτταρα
- γ. Β-λεμφοκύτταρα
- δ. μυϊκά κύτταρα

7. Όπως γνωρίζουμε, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA. Έχουν απομονωθεί πολλές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες, όποτε συναντούν την ειδική αλληλουχία στο γονιδίωμα, κόβουν κάθε αλυσίδα σε συγκεκριμένη θέση αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA, που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Επομένως, η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση μπορεί και κόβει το πλασμίδιο και το DNA του οργανισμού στις ίδιες συγκεκριμένες θέσεις και έτσι δημιουργούνται σ' αυτά άκρα με συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού, αναμειγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

8.

- α. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα, που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA και κόβουν κάθε αλυσίδα του σε συγκεκριμένη θέση αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα.
- β. Τα πλασμίδια είναι οι φορείς κλωνοποίησης, με τους οποίους ενώνονται τα κομμάτια του DNA από τον οργανισμό-δότη, ώστε να δημιουργηθεί το ανασυνδυασμένο μόριο DNA.
- γ. Στα βακτήρια μεταφέρονται τα ανασυνδυασμένο μόρια DNA και τα μετασχηματίζουν. Κάθε βακτήριο που προσλαμβάνει ένα μόνο μόριο DNA, μετά τον πολλαπλασιασμό του, δημιουργεί ένα βακτηριακό κλώνο.

9. Η σωστή πρόταση είναι η γ.

10. Η λανθασμένη πρόταση είναι η ε.

11. Η σωστή πρόταση είναι η γ.

12. Τα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα έχουν ανθεκτικότητα μόνο στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, παρουσία του οποίου αναπτύσσονται. Τα βακτήρια που δεν περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο δεν αναπτύσσονται παρουσία ενός ή και των δύο αντιβιοτικών και τα βακτήρια που πιθανόν περιέχουν το πλασμίδιο χωρίς το ξένο DNA θα είναι ανθεκτικά και στα δύο αντιβιοτικά*.

* το τμήμα της απάντησης που είναι υπογραμμισμένο είναι πληροφορία που αφορά τους καθηγητές αλλά δεν απαιτείται να το γνωρίζουν οι μαθητές.

Μεθοδολογία ασκήσεων στο 4ο κεφάλαιο

Στις ασκήσεις του 4ου κεφαλαίου πρέπει να γνωρίζετε:

A. Ασκήσεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

- Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που **κόβουν** το **δίκλωνο DNA** σε **συγκεκριμένες αλληλουχίες**, οι οποίες έχουν αλληλουχία «**παλίνδρομου**», δηλαδή ίδια σειρά αζωτούχων βάσεων με αντιπαράλληλη διάταξη.
- Όταν ένα **κυκλικό δίκλωνο** μόριο DNA κόβεται από μια περιοριστική ενδονουκλεάση, τα **τμήματα** που δημιουργούνται είναι **ίσα** με τον **αριθμό** των **αλληλουχιών** που υπάρχει στο μόριο του DNA και αναγνωρίζει αυτή η περιοριστική ενδονουκλεάση.
- Όταν ένα **γραμμικό δίκλωνο** μόριο DNA κόβεται από μια περιοριστική ενδονουκλεάση, τα **τμήματα** που δημιουργούνται είναι **κατά ένα περισσότερα** από τον **αριθμό** των **αλληλουχιών** που υπάρχει στο μόριο του DNA και αναγνωρίζει αυτή η περιοριστική ενδονουκλεάση.
- Ένα **τμήμα** δίκλωνου DNA (π.χ. ένα γονίδιο) που πρόκειται να **κλωνοποιηθεί**, πρέπει να **κόβεται** από μια περιοριστική ενδονουκλεάση στα **δύο άκρα** του και επιπλέον να **μην** **κόβεται** στο **εσωτερικό** του, ώστε να μεταφέρεται άθικτο.

B. Ασκήσεις με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI.

- Η περιοριστική ενδονουκλεάση **EcoRI**, όποτε συναντά στο δίκλωνο DNA τη δίκλωνη αλληλουχία $5' - \text{GAATTC} - 3'$, $3' - \text{CTTAAG} - 5'$, **κόβει** κάθε αλυσίδα **μεταξύ του G και του A** (με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$), αφήνοντας **μονόκλωνα άκρα** από αζευγάρωτες άκρες.
→ Κάθε φορά που δρα, **καταλύει τη διάσπαση δύο (2) φωσφοδιεστερικών δεσμών $3' - 5'$ και διασπώνται οκτώ (8) δεσμοί υδρογόνου**, μεταξύ των ζευγών αδερίνης-θυμίνης.
- Ένα τμήμα DNA (π.χ. ένα γονίδιο), που έχει κοπεί με την EcoRI και έχει ενσωματωθεί σε φορέα κλωνοποίησης (π.χ. πλασμίδιο) για να **κλωνοποιηθεί**, μπορεί στη συνέχεια να **μεταγραφεί** και να **μεταφραστεί**, για την παραγωγή του αντίστοιχου πολυπεπτιδίου (συνδυασμός με τις ασκήσεις του 2^{ου} κεφαλαίου).

→ Στην περίπτωση αυτή, **πρώτα** βρίσκετε τις **αλληλουχίες** που αναγνωρίζει η **EcoRI** και στη **συνέχεια**, στο τμήμα του DNA που έχει **απομείνει**, αναζητούνται τα **κωδικόνια έναρξης** και **λήξης** της μετάφρασης, για την εύρεση της **κωδικής αλυσίδας** (σύμφωνα με τη μεθοδολογία των ασκήσεων του 2^{ου} κεφαλαίου).

Γ Ασκήσεις με ανασυνδυασμό τμήματος DNA και φορέα κλωνοποίησης.

- Σύμφωνα με το βιβλίο, το τμήμα DNA και ο φορέας κλωνοποίησης «**κόβονται**» με την **ίδια** περιοριστική **ενδονουκλεάση**, οπότε **σχηματίζονται ίδιες μονόκλωνες ουρές** από **αζευγάρωτες βάσεις**. Όταν αναμιγνύονται τα μονόκλωνα άκρα τους **συνδέονται συμπληρωματικά** (υβριδοποιούνται) και μετά τη δράση της **DNA δεσμάσης** προκύπτει ο **ανασυνδυασμένος φορέας κλωνοποίησης**.
- Μπορεί όμως, η παραπάνω διαδικασία (ο ανασυνδυασμός), να πραγματοποιηθεί ακόμα και αν **έχουμε «κόψει»** τόσο το τμήμα DNA όσο και το φορέα κλωνοποίησης **με δύο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες**, αρκεί τα άκρα που σχηματίζονται να υβριδοποιούνται (συνδέονται συμπληρωματικά).

Δ. Ασκήσεις με μόρια ανιχνευτές.

- Οι ανιχνευτές είναι **ιχνηθετημένα μονόκλωνα μόρια DNA ή RNA**. Ένας ανιχνευτής συνδέεται συμπληρωματικά (**υβριδοποιεί**) ένα μόριο DNA (το οποίο έχει προηγουμένως αποδιαταχθεί) μόνο όταν είναι **συμπληρωματικό και αντιπαράλληλο** με αυτό.
→ Στην περίπτωση αυτή, **πρώτα** γράφετε τις συμπληρωματικές και αντιπαράλληλες **αλληλουχίες** που **υβριδοποιεί** ο ανιχνευτής και μετά τις **αναζητάτε** σε κάποιο από τους δύο κλώνους του δίκλωνου μορίου DNA.

Ε. Έκφραση ευκαρυωτικού γονιδίου από βακτηριακό κλώνο γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

Έστω ότι καταφέραμε να δημιουργήσουμε μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη για τον άνθρωπο μέσα σε κλώνους του βακτηρίου *E.coli*. Ο κλώνος που φέρει το γονίδιο π.χ. Α για τη σύνθεση της πρωτεΐνης Α, θα παράγει τελικά αυτή την πρωτεΐνη;

- Τα βακτήρια διαθέτουν **παρόμοιους μηχανισμούς μεταγραφής** και μετάφρασης με τα ευκαρυωτικά κύτταρα, καθώς και τον **ίδιο γενετικό κώδικα**. Θεωρητικά, θα μπορούσαν να συνθέσουν πράγματι το ίδιο πρωτεϊνικό προϊόν που κωδικοποιεί το ανθρώπινο γονίδιο.
- Πρακτικά όμως, υπάρχουν αρκετά **προβλήματα**, που θα εμποδίζουν την ολοκλήρωση της πρωτεϊνοσύνθεσης.

1. Καταρχήν, υπάρχει πιθανότητα **το γονίδιο Α να μην έχει απομονωθεί ακέραιο**. Δηλαδή, μπορεί στο εσωτερικό του να περιείχε μία θέση αναγνώρισης, για την περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιήθηκε, και κόπηκε.

Λύση: Φροντίζουμε να **επιλέγουμε τη σωστή περιοριστική ενδονουκλεάση**, έτσι ώστε να μην αναγνωρίζει και κόβει θέση αναγνώρισης μέσα στο γονίδιο Α, αλλά εκατέρωθεν.

2. Τα περισσότερα ευκαρυωτικά **γονίδια** του πυρήνα είναι **ασυνεχή** και περιέχουν **εσώνια**, ενώ τα προκαρυωτικά κύτταρα δεν διαθέτουν μηχανισμούς ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA και δεν έχουν τα μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια. Έτσι, τα προκαρυωτικά κύτταρα θα μεταγράψουν το γονίδιο Α σε πρόδρομο mRNA, αλλά δεν θα μπορέσουν να πραγματοποιήσουν την ωρίμανση του πρόδρομου mRNA. Σαν αποτέλεσμα, θα μεταφράσουν το πρόδρομο mRNA σε πρωτεΐνη, που όμως θα είναι μη λειτουργική.

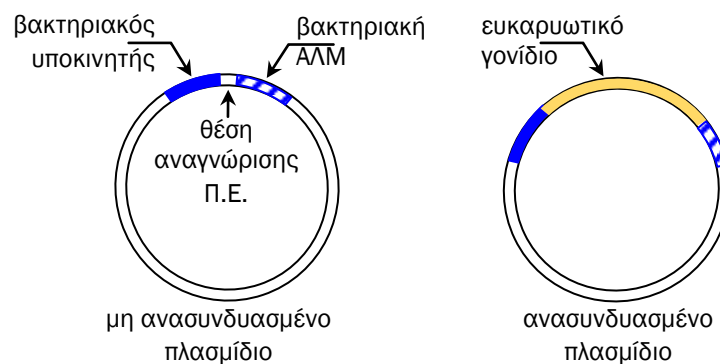
Λύση: cDNA βιβλιοθήκη.

3. Επιπλέον, τα βακτήρια **δεν έχουν μηχανισμούς** (ένζυμα) για την **τροποποίηση** των πρωτεϊνών μετά τη μετάφραση. Οπότε, εάν η πρωτεΐνη χρειάζεται τροποποίηση (όπως π.χ. αποκοπή αμινοξέος, -ων από το αρχικό αμινικό άκρο ή αφαίρεση ενδιάμεσου πεπτιδίου), τότε τα βακτήρια δεν θα μπορούν να την παράγουν στην τελική βιολογικά λειτουργική μορφή της.

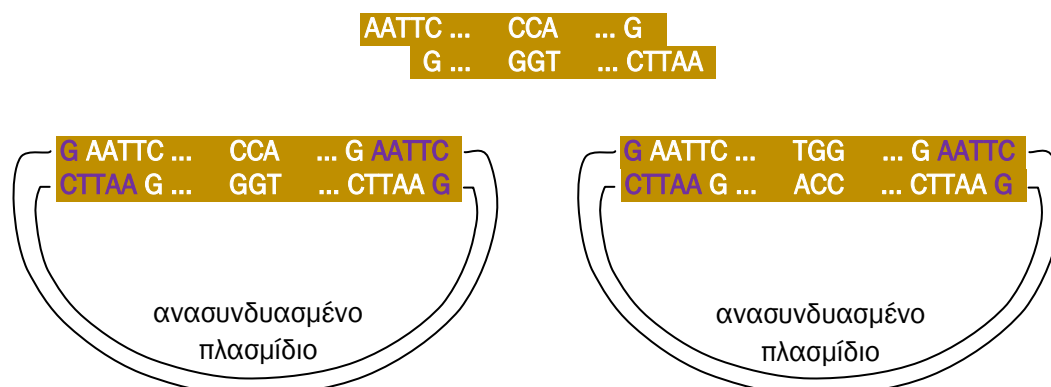
Λύση: *in vitro* αποκοπή του περιττού τμήματος, όπως κατά τη μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη, με ενζυμική απομάκρυνση ενδιάμεσου πεπτιδίου.

4. Τα ευκαρυωτικά γονίδια απαιτούν για τη μεταγραφή τους ένα **συγκεκριμένο συνδυασμό μεταγραφικών παραγόντων**, τον οποίο τον διαθέτουν μόνο τα κύτταρα εκείνα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο, όπως τα ειδικά παγκρεατικά κύτταρα για το γονίδιο της ινσουλίνης. Φυσικά, τα βακτήρια αποκλείεται να τον διαθέτουν, οπότε και είναι αδύνατο να μεταγράψουν το γονίδιο.

Λύση: Χρησιμοποιούνται πλασμίδια που διαθέτουν τη θέση αναγνώρισης, της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (Π.Ε.) που έχει επιλεγεί, ανάμεσα σε ένα βακτηριακό υποκινητή και βακτηριακή αλληλουχία λήξης της μεταγραφής (ΑΛΜ), όπως φαίνεται στο σχήμα.



5. Τέλος, **κάθε τμήμα DNA**, που ενσωματώνεται σε ένα φορέα κλωνοποίησης, **μπορεί να ενσωματωθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους** (περιστροφή κατά 180° στο επίπεδο). Όμως, για να εκφραστεί το γονίδιο, θα πρέπει **η μεταγραφόμενη αλυσίδα του να έχει το άκρο 3' προς τον υποκινητή**. Άρα, μόνο στη μία από τις δύο αυτές περιπτώσεις το γονίδιο θα μεταγραφεί σωστά.



Λύση: Ενσωματώνουμε στο ευκαρυωτικό γονίδιο βακτηριακό υποκινητή και βακτηριακή ΑΛΜ, οπότε θα μεταγραφεί σωστά, όπως και να ενσωματωθεί κατά τον ανασυνδυασμό.

Ερωτήσεις – ασκήσεις

A. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΚΛΕΙΣΤΟΥ ΤΥΠΟΥ

✚ Να βάλετε σε κύκλο το γράμμα που αντιστοιχεί στη σωστή απάντηση ή στη φράση που συμπληρώνει σωστά την πρόταση:

1. ΠΕ εσπ. '15

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

- α. παράγονται φυσιολογικά από ευκαρυωτικά κύτταρα.
- β. αναγνωρίζουν και κόβουν μόρια DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες.
- γ. παράγονται από ιούς.
- δ. εισάγονται στα βακτήρια από βακτηριοφάγους.

2. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες καταλύουν:

- α. τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ G και C.
- β. τη διάσπαση 3' – 5' φωσφοδιεστερικών δεσμών.
- γ. τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ G και A.
- δ. το σχηματισμό 3' – 5' φωσφοδιεστερικών δεσμών.

3. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

- α. κόβουν τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων A και G.
- β. κόβουν τις πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του μορίου του DNA σε ειδικές θέσεις.
- γ. ενώνουν τμήματα ανασυνδυασμένου DNA.
- δ. ενσωματώνουν το DNA του δότη σε ειδική θέση του φορέα κλωνοποίησης.

4. ΠΔΒ Α '18

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιούνται για την ενσωμάτωση:

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| α. τμημάτων DNA σε μόρια DNA. | β. τμημάτων DNA σε μόρια RNA. |
| γ. τμημάτων RNA σε μόρια DNA. | δ. τμημάτων RNA σε μόρια RNA. |

5. ΠΔΒ Α '18

Σε ποια από τις παρακάτω αλληλουχίες DNA μπορεί να δράσει μια περιοριστική ενδονουκλεάση η οποία κόβει το DNA αφήνοντας μονόκλωνα άκρα σε κάθε πλευρά;

- | | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| α. GCATCG | β. CCCAAA | γ. ACATGT | δ. TCTATT |
| CGTAGC | GGGT T T | TGTACA | AAGTAA |

6. ΠΔΒ Α '20

Μία περιοριστική ενδονουκλεάση Z λειτουργεί με τον ίδιο μηχανισμό όπως και η EcoRI αλλά αναγνωρίζει διαφορετική αλληλουχία βάσεων στο δίκλωνο DNA. Ποια από τις αλληλουχίες στο δίκλωνο DNA είναι πιο πιθανό να αναγνωριστεί ως θέση κοπής για αυτή την περιοριστική ενδονουκλεάση; χρωμοσωμάτων.

- | | | | |
|---------|---------|---------|---------|
| α. AAGG | β. AGTC | γ. GGCC | δ. ACCA |
| TTCC | TCAG | CCGG | TGGT |

7. ΠΔΒ Β '17

Ποια από τις παρακάτω αλληλουχίες μπορεί να βρεθεί στη θέση αναγνώρισης μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης 6 ζευγών βάσεων;

- | | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| α. ACTTCA | β. AGCGCT | γ. TGGCCT | δ. AACCGG |
|-----------|-----------|-----------|-----------|

8. Το ένζυμο EcoRI δρα στο γονιδίωμα ενός ευκαρυωτικού κυττάρου και προκύπτουν:

- α. πολλά τμήματα του DNA με τον ίδιο αριθμό νουκλεοτιδίων, που μπορούν να συνδεθούν με το πλασμίδιο φορέα.
- β. πολλά τμήματα DNA, αλλά μόνο το ένα μπορεί να συνδεθεί με το πλασμίδιο φορέα.
- γ. πολλά διαφορετικά τμήματα του DNA, που μπορούν να συνδεθούν με το πλασμίδιο φορέα.
- δ. δυο τμήματα του DNA με διαφορετικό αριθμό νουκλεοτιδίων, από τα οποία μόνο ένα μπορεί να συνδεθεί με το πλασμίδιο φορέα.

9. ΠΕ επαν. '17

Το ένζυμο EcoRI παράγεται από την έκφραση γονιδίου που:

- α. είναι ασυνεχές
- β. εντοπίζεται σε κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA
- γ. υπάρχει σε όλα τα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα
- δ. εντοπίζεται φυσιολογικά σε διπλοειδές κύτταρο.

10. ΠΕ επαν. '19

Σε δίκλωνο γραμμικό μόριο DNA η αλληλουχία αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI υπάρχει πέντε φορές. Πόσα τμήματα DNA είναι κατάλληλα για ενσωμάτωση σε πλασμίδια χωρίς περαιτέρω τροποποίηση μετά τη δράση της;

- $\alpha.$ 3 $\beta.$ 4 $\gamma.$ 5 $\delta.$ 6

11. ПАВ В '15

Ποιο από τα παρακάτω τμήματα DNA θα μπορούσε να συνδεθεί σε ένα άκρο που θα είχε προκύψει με το ένζυμο EcoRI;

- α . ..CG β . AATTCG.. γ . ..TGAATT δ . GT..
 ..GCAATT GC.. ..AC TTAACA..

12. ΠΔΒ Α '16

Σε κομμάτι δίκλωνου DNA, που σχηματίστηκε με τη δράση της EcoRI, ανιχνεύτηκαν 160 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί. Τα νουκλεοτίδια σε αυτό το DNA είναι:

- α. 160 β. 158 γ. 162 δ. 80

13. ΠΔΒ Α '17

Σε ποια από τα θραύσματα, που έχουν προκύψει από την επίδραση της EcoRI σε τυχαίας μορφολογίας μόρια δίκλωνου DNA, ισχύει $(A+G)/(C+T) = 1$;

- α. Σε όλα.
- β. Μόνο σε αυτά που διαθέτουν δύο μονόκλωνα άκρα.
- γ. Μόνο σε αυτά που διαθέτουν ένα μονόκλωνο άκρο.
- δ. Σε κανένα.

14. ΠΕ ΕΠΑΝ. '06

Για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA ενώνονται τμήματα DNA διαφορετικών οργανισμών, τα οποία κόπηκαν από την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση.

Η ένωση αυτή γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου:

- α. DNA ελικάση. β. DNA πολυμεράση.
γ. RNA πολυμεράση. δ. DNA δεσμάση.

15. Σε κάθε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιήθηκε κατά τον ανασυνδυασμό του υπάρχει:

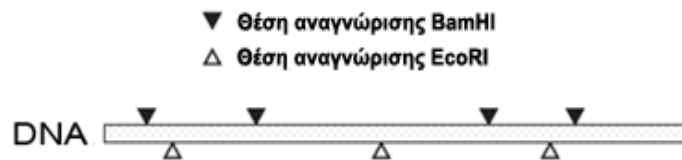
α. καμία φορά. β. μία φορά.
γ. δύο φορές. δ. τρεις φορές.

- | | |
|----------------|-----------------|
| α. καμία φορά. | β. μία φορά. |
| γ. δύο φορές. | δ. τρεις φορές. |

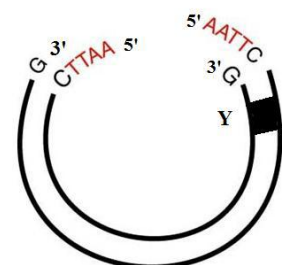
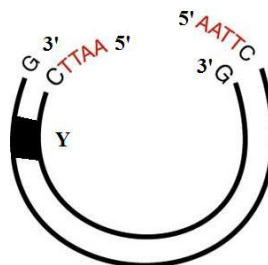
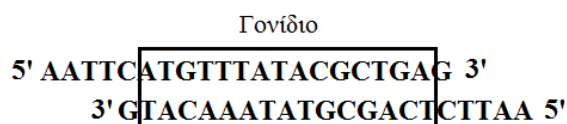
16. Ένα μόριο DNA κόβεται σε τμήματα από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI και EcoRI.

Ποια από τις παρακάτω επιλογές απεικονίζει το σωστό αριθμό των τμημάτων που δημιουργήθηκαν μετά την επίδραση των ενδονουκλεασών;

	Επίδραση		
	BamHI	EcoRI	EcoRI + BamHI
α.	5	4	8
β.	4	5	8
γ.	5	4	9
δ.	4	5	9



17. ☼ Το παρακάτω τμήμα DNA έχει κοπεί με το ένζυμο EcoRI και περιέχει γονίδιο προκαρυωτικού οργανισμού.

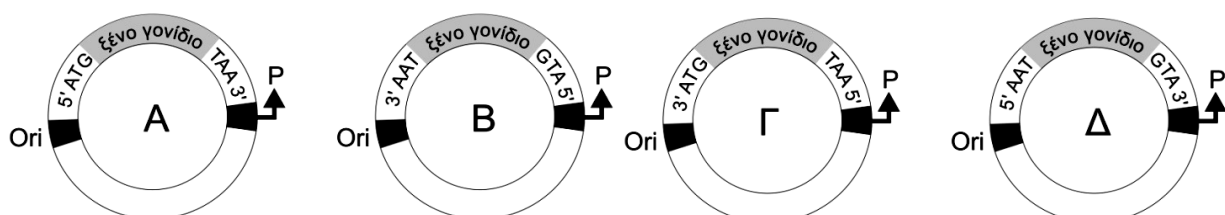


Πρόκειται να το εισάγουμε σε φορέα κλωνοποίησης - πλασμίδιο προκειμένου να εκφραστεί και να παράγει ένα ολιγοπεπτίδιο. Το γράμμα Y αντιστοιχεί σε υποκινητή.

Ως φορέας κλωνοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί:

- α. μόνο το A.
- β. μόνο το B.
- γ. οποιοδήποτε από τα δύο.
- δ. κανένα από τα δύο.

18. Το διάγραμμα περιλαμβάνει τέσσερα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Σε καθένα από τα πλασμίδια αυτά σημειώνεται η θέση έναρξης της αντιγραφής (Ori) και η θέση του υποκινητή (P) για την έκφραση του ξένου γονιδίου. Σε ποιο από τα τέσσερα πλασμίδια είναι δυνατή η έκφραση του ξένου γονιδίου;



19. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες έχουν τη δυνατότητα να κόβουν:

- α. το πλασμίδιο σε κατάλληλη θέση.
- β. το ανασυνδυασμένο DNA σε κατάλληλες θέσεις.
- γ. το γονιδίωμα του ευκαρυωτικού κυττάρου σε κατάλληλες θέσεις.
- δ. σε όλες τις θέσεις που περιγράφονται στο α, β, γ.

20. ΠΔΒ Α '18

Για να γίνει κλωνοποίηση ενός γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν: περιοριστική ενδονουκλεάση Α για τον τεμαχισμό του DNA εκατέρωθεν του γονιδίου, περιοριστική ενδονουκλεάση Β για τον τεμαχισμό του πλασμιδιακού DNA σε μία θέση, DNA δεσμάση και άλλα αντιδραστήρια που ευνοούν το σχηματισμό ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Τελικά η διαδικασία δεν στέφθηκε με επιτυχία διότι:

- α. δεν χρησιμοποιήθηκε αρκετή ποσότητα DNA δεσμάσης.
- β. το πλασμίδιο δεν περιείχε γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό.
- γ. τα δύο μόρια δεν είχαν συμπληρωματικά άκρα.
- δ. τα βακτήρια ξενιστές δεν περιείχαν πλασμίδια.

21. ☛ Δίνονται οι παρακάτω αλληλουχίες βάσεων δύο τμημάτων DNA τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικά πλασμίδια και περιέχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε διαφορετικά αντιβιοτικά το καθένα, στα βακτήρια που ανήκουν. Τα πλασμίδια αυτά πρόκειται να κατεργαστούν με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI για την προσθήκη ξένου DNA και στη συνέχεια να μπουν σε βακτήρια *E. coli*, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως ξενιστές.

Πλασμίδιο 1

3' – TTT TAC CTT AAG TCT TGC ACG CGC ACT GAG CCG GCA – 5'
5' – AAA ATG GAA TTC AGA ACG TGC GCG TGA CTC GGC CGT – 3'

Πλασμίδιο 2

3' – TTT GAC TTA AGA CAA TAC TCT TGC ACG CGC ATT GCA – 5'
5' – AAA CTG AAT TCT GTT ATG AGA ACG TGC GCG TAA CGT – 3'

Ανθεκτικότητα στο αντίστοιχο αντιβιοτικό προσφέρει στον ξενιστή του:

- α. το πλασμίδιο 1.
- β. το πλασμίδιο 2.
- γ. οποιοδήποτε από τα δύο πλασμίδια.
- δ. κανένα από τα δύο πλασμίδια.

22. Μετασχηματισμός είναι:

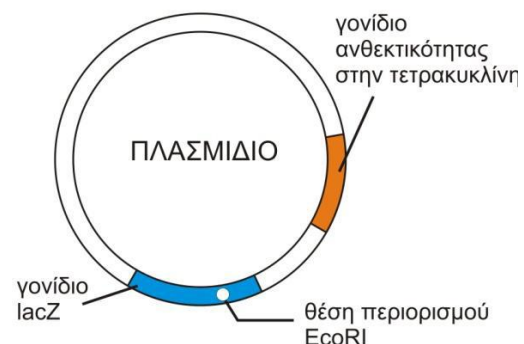
- α. η διάσπαση του DNA ενός βακτηρίου.
- β. η εισαγωγή ιχνηθετημένων ανιχνευτών μορίων DNA ή RNA σε φορέα.
- γ. η είσοδος του DNA του φάγου σε βακτήριο.
- δ. η εισαγωγή ανασυνδυασμένου DNA σε βακτήριο.

23. ΠΕ '09

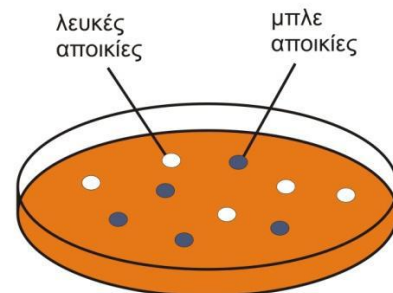
Μετασχηματισμός βακτηριακού κυττάρου ξενιστή είναι:

- α. η εισαγωγή αντισώματος.
- β. η εισαγωγή DNA πλασμιδίου.
- γ. η εισαγωγή αντίστροφης μεταγραφάσης.
- δ. η εισαγωγή θρεπτικών συστατικών.

24. * Ένας ερευνητής κατασκευάζει τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη του ζώου *Parhyale hawaiiensis* (γαρίδα). Για την επιλογή των κλώνων που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιεί την τεχνική της X-gal. Στο πλασμίδιο που χρησιμοποιεί υπάρχει το γονίδιο LacZ της β-γαλακτοσιδάσης, «εντός» του οποίου βρίσκεται το σημείο κοπής της EcoRI.



Η β-γαλακτοσιδάση μετατρέπει τη λευκή ουσία του υποστρώματος X-gal σε μπλε, «βάφοντας» ολόκληρη τη βακτηριακή αποικία. Ο ερευνητής προσθέτει στο θρεπτικό υλικό των βακτηρίων κλώνων τετρακυκλίνη και X-gal. Στο τρυβλίο του, μετά από λίγες ημέρες, έχει την κάτωθι εικόνα:



Ποιες τελικά αποικίες θα επιλέξει για να φτιάξει τη γονιδιωματική του βιβλιοθήκη;

- α. Αυτές που επιβίωσαν της τετρακυκλίνης και είναι μπλε.
- β. Αυτές που επιβίωσαν της τετρακυκλίνης και είναι λευκές.
- γ. Τόσο τις λευκές, όσο και τις μπλε αποικίες που επιβίωσαν της τετρακυκλίνης.
- δ. Κάποιες από τις μπλε και κάποιες από τις λευκές αποικίες, με τη βοήθεια μορίων ανιχνευτών.

25. Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει:

- α. αντίγραφα ενός μορίου ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.
- β. αντίγραφα του συνολικού γονιδιώματος ενός οργανισμού.
- γ. αντίγραφα του mRNA του οργανισμού του δότη.
- δ. τα απαραίτητα ένζυμα για την παραγωγή ανασυνδυασμένου DNA.

26. ΠΔΒ Α '16

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη ενός ηπατικού κυττάρου περιλαμβάνει 5000 κλώνους, ενώ η γονιδιωματική βιβλιοθήκη ενός παγκρεατικού κυττάρου περιλαμβάνει 15000 κλώνους. Η διαφορά αυτή οφείλεται:

- α. στο ότι στα παγκρεατικά κύτταρα εκφράζονται περισσότερα γονίδια.
- β. οι δύο βιβλιοθήκες κατασκευάστηκαν με τη χρήση διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων.
- γ. στη διαφορετική ποσότητα DNA στις δύο αυτές κατηγορίες κυττάρων.
- δ. στη διαφορετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

27. ΠΔΒ Α '19

Αν ένα ξένο γονίδιο ενσωματωθεί στο DNA βακτηριακού κυττάρου, τότε κάθε κύτταρο που παράγεται από αυτό θα έχει:

- α. DNA διαφορετικό από αυτό των άλλων θυγατρικών κυττάρων.
- β. κατά 50% πιθανότητα να περιέχει αντίγραφο του ξένου γονιδίου.
- γ. κατά 100% πιθανότητα να περιέχει αντίγραφο του ξένου γονιδίου.
- δ. πρωτεΐνες διαφορετικές από αυτές του αρχικού κυττάρου.

28. Για την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης, το ολικό mRNA απομονώνεται:

- α. από τον πυρήνα του κυττάρου.
- β. από το κυτταρόπλασμα.
- γ. από τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα.
- δ. από τα μιτοχόνδρια.

29. ΠΕ '04

Μια 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.

30. ΠΔΒ Α '16

Ο σχεδόν καθολικός χαρακτήρας του γενετικού κώδικα βρίσκει σήμερα εφαρμογή:

- α. στη χρήση προκαρυωτικών υποκινητών στη γενετική μηχανική.
- β. στην κατασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης.
- γ. στην κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.
- δ. στη χρήση που μπορεί να έχει μια cDNA βιβλιοθήκη.

31. Το μόριο του DNA που συντίθεται με μήτρα το mRNA και την παρουσία της αντίστροφης μεταγραφάσης ονομάζεται:

- α. ανασυνδυασμένο DNA.
- β. cDNA.
- γ. γονιδιωματικό DNA.
- δ. χρωμοσωμικό DNA.

32. ΠΔΒ Α '16

Ποια από τις αλληλουχίες DNA του πίνακα **δεν** μπορεί να βρεθεί σε αλληλουχία συμπληρωματικού DNA (cDNA);

- α. I και II
- β. I και IV
- γ. II και IV
- δ. IV μόνο

I	Εσώνια
II	Εξώνια
III	3' αμετάφραστη περιοχή
IV	Υποκινητής

33. Τμήμα ενός γονιδίου, που κωδικοποιεί την 5' αμετάφραστη περιοχή ενός mRNA, μπορεί να βρεθεί:

- α. μόνο σε γονιδιωματικές βιβλιοθήκες.
- β. μόνο σε cDNA βιβλιοθήκες.
- γ. και σε γονιδιωματικές και σε cDNA βιβλιοθήκες.
- δ. σε καμιά από τις δύο βιβλιοθήκες .

34. ΠΔΒ Α '18

Αμέσως μετά τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης το cDNA του γονιδίου της β-αλυσίδας της HbA μπορεί να υβριδοποιήσει:

- α. τμήματα της κωδικής αλυσίδας του αντίστοιχου γονιδίου.
- β. τμήματα της μεταγραφόμενης αλυσίδας του αντίστοιχου γονιδίου.
- γ. το πρόδρομο mRNA σε όλο το μήκος του.
- δ. αποκλειστικά και μόνο την αλληλουχία των κωδικονίων του ώριμου mRNA.

35. Το επιθυμητό ανθρώπινο κλωνοποιημένο γονίδιο που περιέχεται σε μια cDNA βιβλιοθήκη **δεν** εκφράζεται στο βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή. Αυτό οφείλεται στο ότι:

- α. το βακτήριο ξενιστής δεν αναγνωρίζει το cDNA.
- β. δεν υπάρχουν οι κατάλληλοι μεταγραφικοί παράγοντες για την έκφραση του γονιδίου.
- γ. το βακτήριο ξενιστής δεν διαθέτει μηχανισμούς ωρίμανσης.
- δ. το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, που περιέχει ο φορέας κλωνοποίησης, εμποδίζει την έκφραση του επιθυμητού γονιδίου.

36. ΠΔΒ Β '16

Συνθέτουμε cDNA χρησιμοποιώντας ανθρώπινα εγκεφαλικά κύτταρα. Σε ό,τι αφορά το cDNA, ποιο από τα παρακάτω είναι **εσφαλμένο**;

- α. Μπορεί να πολλαπλασιαστεί με PCR.
- β. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία ανθρώπινης γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.
- γ. Παράγεται από mRNA με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής.
- δ. Τα cDNA αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές για την εύρεση των γονιδίων που εκφράζονται στον εγκέφαλο.

37. ΠΕ ομογ. '15

Η σύνδεση μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ονομάζεται:

- α. μετασχηματισμός. β. κλωνοποίηση. γ. υβριδοποίηση. δ. αποδιάταξη.

38. 🍷 Χκου '20

Σε μόριο ανιχνευτή υπάρχουν 4 αζωτούχες βάσεις U και 4 T. Κατά τη διαδικασία της υβριδοποίησης, με τον αντίστοιχο κλώνο του DNA του τμήματος που θέλουμε να εντοπίσουμε, θα υπάρχουν στο υβριδικό μόριο:

- α. 4 αζωτούχες βάσεις A και 4 T. β. 8 ζεύγη αζωτούχων βάσεων A και T.
- γ. 8 ζεύγη αζωτούχων βάσεων A και U. δ. 8 αζωτούχες βάσεις A.

39. ΠΕ '06

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης PCR μας επιτρέπει:

- α. τη δημιουργία αντιγράφων των πολυπεπτιδικών αλυσίδων ενός οργανισμού.
- β. την αντιγραφή συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών κυττάρων.
- γ. τον προσδιορισμό όλων των σωματικών κυττάρων ενός οργανισμού.
- δ. τον ανασυνδυασμό πολλών πλασμιδίων από διαφορετικά βακτήρια.

40. ΠΔΒ Α '19

Σε ποια από τις παρακάτω μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται πρωταρχικά τμήματα;

- α. Υβριδοποίηση β. Ιχνηθέτηση γ. PCR δ. Μεταγραφή

41. ΠΔΒ Β '18

Το αποτύπωμα DNA είναι μια τεχνική που ταυτόχρονα ανιχνεύει πολλά μικρά τμήματα DNA στο γονιδίωμα (10 - 60 ζεύγη βάσεων) για να παράγει ένα μοτίβο μοναδικό για κάθε άτομο. Συγκρίσεις αυτών των διαφορών χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση ατόμων.

Στο διάγραμμα της εικόνας καταγράφονται τα αποτυπώματα των DNA της μητέρας, του παιδιού και των τεσσάρων πιθανών πατέρων.

Ποιος είναι ο πιο πιθανός;

- $\alpha.$ 1 $\beta.$ 2 $\gamma.$ 3 $\delta.$ 4

[illegible]

Να χαρακτηρίσετε με Σ (σωστό) ή με Λ (λάθος) τις παρακάτω προτάσεις:

1. Με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA μπορούμε να ερευνήσουμε αλλά και να τροποποιήσουμε το γενετικό υλικό. ()
2. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία κόβουν το DNA σε ορισμένες περιοχές. ()
3. ΠΕ '03
Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται από ευκαρυωτικά κύτταρα. ()
4. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες κόβουν το DNA σε ειδικές θέσεις που πάντοτε εντοπίζονται ανάμεσα στα γονίδια. ()
5. Το ένζυμο EcoRI κόβει την αλληλουχία βάσεων GAATTC μεταξύ A και G. ()
6. Οι φορείς κλωνοποίησης πρέπει να διαθέτουν ένα τουλάχιστον γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό. ()
7. Ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιείται DNA ευκαρυωτικών κυττάρων. ()

8. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης περιέχουν μία θέση αναγνώρισης από κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση. ()
9. Ένα μόριο DNA έχει κοπεί σε μία θέση αναγνώρισης της EcoRI και έχουν ληφθεί δύο τμήματα. Άρα το μόριο είναι κυκλικό. ()
10. Κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού, το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηρίων δέχεται το ανασυνδυασμένο μόριο DNA. ()
11. ΟΕΦΕ '08
Με τη βοήθεια των αντιβιοτικών σε μια βιβλιοθήκη επιλέγονται οι μετασχηματισμένοι κλώνοι από τους μη μετασχηματισμένους. ()
12. Η χρήση αντιβιοτικού μας βοηθά να εντοπίσουμε τους μετασχηματισμένους κλώνους βακτηρίων. ()
-
13. Οι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες, που δημιουργούνται από οποιοδήποτε κύτταρο ενός οργανισμού, είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους. ()
14. Οποιαδήποτε αλληλουχία DNA ενός οργανισμού υπάρχει στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη του. ()
15. Σε μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη ενός οργανισμού, οι κλώνοι των βακτηρίων, που δέχθηκαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, διαφέρουν μόνο ως προς το τμήμα του DNA του οργανισμού που έχουν ενσωματώσει. ()
16. Δύο γονιδιωματικές βιβλιοθήκες που έχουν κατασκευαστεί από έναν οργανισμό με τη χρήση διαφορετικών περιοριστικών ενδονουκλεασών θα περιέχουν διαφορετικούς βακτηριακούς κλώνους. ()
17. Με τη βοήθεια της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης κλωνοποιούμε και γονίδια tRNA. ()
-
18. Οι cDNA βιβλιοθήκες περιέχουν μόνο τα εξώνια των γονιδίων που εκφράζονται σε ένα κύτταρο. ()
19. Το ολικό mRNA που απομονώνουμε για την κατασκευή μιας cDNA είναι όλο ώριμο. ()
20. Το cDNA είναι συμπληρωματικό του ώριμου mRNA. ()
21. Με τη βοήθεια της cDNA βιβλιοθήκης κλωνοποιούμε ταυτόχρονα όλα τα γονίδια που εκφράζονται σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο και κωδικοποιούν πρωτεΐνες. ()
22. Ένα επιθηλιακό και ένα μυϊκό κύτταρο του ανθρώπου έχουν όμοιες cDNA βιβλιοθήκες. ()
23. Από τα διαφοροποιημένα κύτταρα ενός πολυκύτταρου ευκαρυωτικού οργανισμού προκύπτουν διαφορετικές cDNA βιβλιοθήκες. ()
24. Οι κλώνοι ενός γονιδίου που απομονώνονται από cDNA βιβλιοθήκες περιέχουν αλληλουχίες υποκινητών και αμετάφραστων περιοχών. ()

25. Με τη βοήθεια της cDNA βιβλιοθήκης κλωνοποιούμε μόνο τα εξώνια, από τα γονίδια ενός ευκαρυωτικού κυττάρου που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. ()

26. Τα ανθρώπινα γονίδια που κλωνοποιούνται σε μια cDNA βιβλιοθήκη **δεν** είναι ακριβώς ίδια με αυτά που υπάρχουν στο ανθρώπινο γονιδίωμα. ()

27. ΠΔΒ Β '15

Μια cDNA βιβλιοθήκη περιέχει το σύνολο όλων των mRNA, τα οποία προκύπτουν από τη μεταγραφή των γονιδίων που εκφράζονται σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο μια δεδομένη χρονική στιγμή, υπό μορφή δίκλωνων cDNA συνδεδεμένων σε φορείς κλωνοποίησης πλασμίδια ή DNA φάγων. ()

28. Με τη βοήθεια της cDNA βιβλιοθήκης κλωνοποιούμε ταυτόχρονα όλα τα γονίδια που εκφράζονται σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. ()

29. Αποδιάταξη του DNA επιτυγχάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας. ()

30. Η υβριδοποίηση είναι απαραίτητη και στα δύο είδη βιβλιοθηκών. ()

31. Η δράση των ανιχνευτών είναι δυνατή μόνο όταν το DNA είναι αποδιαταγμένο. ()

32. Με την PCR αντιγράφουμε ειδικές περιοχές DNA *in vitro*. ()

33. ΠΕ '03

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει την επιλεκτική αντιγραφή μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωικών κυττάρων. ()

34. Η μέθοδος PCR έχει ως αποτέλεσμα την κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA. ()

✚ Να αντιστοιχίσετε τους όρους που αναγράφονται στη στήλη I με τις έννοιες ή τις φράσεις που αναγράφονται στη στήλη II. Για το σκοπό αυτό να γράψετε, δίπλα από κάθε γράμμα της στήλης I, τον αριθμό που ταιριάζει από τη στήλη II (π.χ. Α. 1):

1.

I	II
A. Ανασυνδυασμένο DNA	1. Συνδέει κομμάτια DNA με συμπληρωματικά άκρα
B. Πλασμίδια	2. Ένζυμο EcoRI
Γ. Περιοριστική ενδονουκλεάση	3. Υβριδοποιεί DNA – RNA
E. DNA δεσμάση	4. Φορείς κλωνοποίησης
	5. Μόριο με γονίδια από δυο ή περισσότερους οργανισμούς

2.

I	II
A. Γονιδιωματική βιβλιοθήκη	1. Είσοδος ανασυνδυασμένου DNA στα βακτήρια
B. cDNA βιβλιοθήκη	2. Περιέχει τα «αντίγραφα» του ώριμου mRNA
Γ. Μετασχηματισμός	3. Αντίγραφα υβριδίων DNA – RNA
	4. Περιέχει το συνολικό DNA του δότη

3. ΠΕ επαν. '12

(Ένα στοιχείο της Στήλης II περισσεύει.)

I	II
A. Αντιγραφή	1. Πολύσωμα
B. Μεταγραφή	2. DNA πολυμεράση
Γ. Ωρίμανση	3. EcoRI
Δ. Μετάφραση	4. Απαμινάση της αδενοσίνης
Ε. Κόψιμο του DNA	5. RNA πολυμεράση
	6. Μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια

Ερωτήσεις ταξινόμησης:

Θέλετε να μελετήσετε τη γ-κρυστάλλίνη του ανθρώπου, μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο φακό του ματιού. Για να αποκτήσετε επαρκή ποσότητα της πρωτεΐνης αποφασίζετε να κλωνοποιήσετε το γονίδιο της γ-κρυστάλλινης με την τεχνική της cDNA βιβλιοθήκης.

Σχετικά με τη διαδικασία της τεχνικής αυτής, να τοποθετήσετε τα παρακάτω βήματα στη σωστή σειρά:

- Ανασυνδυασμός σε φορέα κλωνοποίησης.
- Λύση των βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πρωτεΐνης.
- Επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης.
- Απομόνωση του ολικού ώριμου mRNA από κύτταρα του φακού.
- Δημιουργία δίκλωνου DNA.
- Αντίστροφη μεταγραφή.
- Επιλογή του επιθυμητού κλώνου.
- Μετασχηματισμός σε κύτταρα *Escherichia coli*.

_____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, _____

B. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΑΝΟΙΚΤΟΥ ΤΥΠΟΥ

Ανάκλησης:

1. ΠΕ εσπ. '17 Γ3
Τι είναι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ποιος ο φυσιολογικός τους ρόλος;
Μονάδες 4
2. ΠΕ '15
Σήμερα μπορούμε να κατασκευάσουμε στο δοκιμαστικό σωλήνα ένα «ανασυνδυασμένο» μόριο DNA. Τι είναι το ανασυνδυασμένο μόριο DNA;
Μονάδες 4
3. Ποιος είναι ο ρόλος της DNA δεσμάσης στη διαδικασία σχηματισμού του ανασυνδυασμένου DNA;
4. ΠΕ εσπ. '16 B5
Σε τι αναφέρονται οι όροι «κλώνος» και «κλωνοποίηση»;
Μονάδες 4
5. ΠΕ επαν. '16 B5
Να ορίσετε τα ακόλουθα:
α. Μετασχηματισμός βακτηρίων (μονάδες 2)
β. Γονιδιωματική βιβλιοθήκη (μονάδες 3)
Μονάδες 5
6. ΠΕ '01 & επαν. '06
Να περιγράψετε τον τρόπο κατασκευής μιας cDNA βιβλιοθήκης.
7. Με ποιον τρόπο γίνεται η ανίχνευση κλώνων από γονιδιωματική βιβλιοθήκη;
8. Πώς απομονώνονται τα βακτήρια, στα οποία έχει εισχωρήσει ανασυνδυασμένο DNA από τα υπόλοιπα βακτήρια;
9. ΠΕ επαν. '03
Ποια διαδικασία ονομάζεται αποδιάταξη νουκλεϊκών οξέων;
10. ΠΕ '07
Τι επιτρέπει η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR);
Να αναφέρετε τρεις πρακτικές εφαρμογές της.

✚ Κρίσης – συνδυασμού – σύγκρισης:

1. 👁 Να αναφέρετε δύο είδη μορίων, των οποίων η ύπαρξη είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA.

2. ☞ ΠΔΒ Β '18

Η περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI αναγνωρίζει μια παλίνδρομη αλληλουχία έξι ζευγών βάσεων στο δίκλωνο DNA. Με δεδομένες τις τρεις πρώτες βάσεις του ενός κλώνου, συμπληρώστε τις υπόλοιπες βάσεις της θέσης αναγνώρισης για την BamHI.

BamHI: 5' G G A _ _ _ 3'
3' _ _ _ _ _ 5'

3. ☞ Από τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης Hind III, σε ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA, προέκυψαν οκτώ τμήματα.
 - α. Σε πόσα σημεία υπάρχει η κατάλληλη αλληλουχία για τη δράση της στο μόριο του DNA;
 - β. Πόσων δεσμών τη διάσπαση προκάλεσε η δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης;
4. 👁 Γιατί χρησιμοποιούμε την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση για να κόψουμε το DNA του πλασμιδίου φορέα και το DNA του δότη;

5. 🍷 ΠΕ επαν. '01

Να εξηγήσετε τους λόγους για τους οποίους τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης.

📝 Απάντηση:

- Περιέχουν **γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά**.
 - Κατά το μετασχηματισμό βακτηρίων, ως ξενιστές χρησιμοποιούνται συνήθως βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά.
 - Στο 3ο στάδιο κατασκευής DNA βιβλιοθήκης πραγματοποιείται η **επιλογή και απομόνωση των κυττάρων-ξενιστών**.
 - Η επιλογή των βακτηρίων που δέχτηκαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στηρίζεται στην ικανότητα ανάπτυξής τους παρουσία αντιβιοτικού, επειδή το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.
- Περιέχουν **γονίδια σχετικά με τη μεταφορά γενετικού υλικού από ένα βακτήριο σε άλλο**.
 - Μεταφέρονται από ένα βακτήριο σε άλλο και έτσι μετασχηματίζουν το βακτήριο, στο οποίο εισέρχονται και του **προσδίδουν καινούργιες ιδιότητες**.

- **Αντιγράφονται ανεξάρτητα** από το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου.
 → Αυτό στηρίζεται στη **θέση έναρξης της αντιγραφής** που διαθέτουν.
 → Οι **αποικίες** είναι σύνολο μικροοργανισμών, που έχει προέλθει από διαδοχικές διαιρέσεις ενός κυττάρου, όταν αυτό αναπτύσσεται σε στερεό θρεπτικό υλικό.
 → Κάθε βακτήριο που προσέλαβε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πολλαπλασιάζεται και δίνει ένα **βακτηριακό κλώνο**.
- Κάθε πλασμίδιο επιλέγεται ως φορέας κλωνοποίησης, εκτός των άλλων, και για τη **μοναδική θέση αναγνώρισης** που διαθέτουν και αναγνωρίζεται μοναδικά από μια συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση.

6. 👁 Να αναφέρετε τρία χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένα μόριο DNA, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης.

7. Τόσο στη γονιδιωματική όσο και στη cDNA βιβλιοθήκη είναι απαραίτητη η χρήση ενός φορέα κλωνοποίησης. Γιατί είναι απαραίτητη η χρήση ενός φορέα κλωνοποίησης, δηλαδή γιατί δεν εισάγουμε το επιθυμητό τμήμα DNA μόνο του μέσα στο βακτήριο;

👉 **Απάντηση:**

- Μέσω του φορέα εξασφαλίζεται η κλωνοποίηση του επιθυμητού τμήματος DNA, αφού ο φορέας έχει την ικανότητα να αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα από το κύριο γενετικό υλικό του κυττάρου-ξενιστή, λόγω της θέσης έναρξης που διαθέτουν.

8. ☪ '20

Η περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' - AAGCTT - 3'$ και $3' - TTCGAA - 5'$ και δρα μεταξύ των A και A, ενώ η περιοριστική ενδονουκλεάση TaqI αναγνωρίζει την αλληλουχία $3' - TCGA - 5'$ και $5' - AGCT - 3'$ και δρα μεταξύ των T και C.

Ένα πλασμίδιο διαθέτει από μία φορά μόνο την καθεμία από τις παραπάνω αλληλουχίες.

Εάν επιδράσουμε στο πλασμίδιο και με τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες,, πόσα τμήματα DNA θα προκύψουν και πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και δεσμοί υδρογόνου θα σπάσουν από τη δράση τους;

9. 👁 Γιατί τα πλασμίδια φορείς του DNA του δότη εισάγονται σε βακτήρια ξενιστές, τα οποία δεν έχουν πλασμίδια και είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά;

10. ☪ Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και ποια είναι τα μειονεκτήματα της χρησιμοποίησης των πλασμιδίων και των ιών στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;

11. ΠΕ '17 B4

Να συγκρίνετε μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη από ηπατικό κύτταρο με μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη από μυϊκό κύτταρο του ίδιου οργανισμού για την κατασκευή των οποίων χρησιμοποιήθηκαν η ίδια μέθοδος και τα ίδια ένζυμα. (μονάδες 3) Να συγκρίνετε τις αντίστοιχες cDNA βιβλιοθήκες. (μονάδες 3) Μονάδες 6

☛ **Ενδεικτική απάντηση** (σύμφωνα με τις ενδεικτικές απαντήσεις της ΚΕΕ ΓΕΛ 2017):

«Όλα τα (σωματικά) κύτταρα ενός οργανισμού έχουν το ίδιο γονιδίωμα. Αφού χρησιμοποιώ τα ίδια ένζυμα και την ίδια μέθοδο, **τα θραύσματα από κάθε κύτταρο θα έχουν το ίδιο μέγεθος και αριθμό**. Άρα, γονιδιωματικές βιβλιοθήκες ίδιες.»

Οι cDNA βιβλιοθήκες **δημιουργούνται από διαφορετικά mRNAs**, που προέρχονται **από την έκφραση διαφορετικών γονιδίων** στους δύο κυτταρικούς τύπους. Άρα, διαφορετικές cDNA βιβλιοθήκες.»

12. ☞ Να περιγράψετε το 1ο στάδιο κλωνοποίησης του βακτηριοφάγου λ.

13. ☞ ΠΕ '18 B4

Να προσδιορίσετε σε ποιες από τις παρακάτω περιπτώσεις θα προκύψουν θραύσματα ίσου μήκους και σε ποιες διαφορετικού μήκους, μετά τη δράση της EcoRI σε:

- α. Δύο αδελφές χρωματίδες.
 - β. Δύο γονίδια, που κωδικοποιούν δύο διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες.
 - γ. Δύο διαφορετικά πλασμίδια από δύο διαφορετικά βακτήρια.
 - δ. Δύο μορίων κύριου DNA από δύο βακτήρια ενός βακτηριακού κλώνου. (μονάδες 4)
- Να αιτιολογήσετε τις απαντήσεις σας. (μονάδες 4)

14. ☛ Ποιες περιοχές του γενετικού υλικού ενός κυττάρου **δεν** υπάρχουν στη cDNA βιβλιοθήκη του κυττάρου αυτού;

☛ **Απάντηση:**

- Οι **μη μεταγραφόμενες περιοχές του DNA**:
 - Το 62 – 75% του γενετικού υλικού ενός ευκαρυωτικού κυττάρου.
 - Οι υποκινητές.
 - Ο χειριστής των οπερονίων των προκαρυωτικών κυττάρων.
- Τα γονίδια που δεν εκφράζονται στα διαφοροποιημένα κύτταρα ενός ευκαρυωτικού πολυκύτταρου οργανισμού.

- Τα εσώνια.
- Τα γονίδια για t, r ή και snRNA.
- Τα μιτοχονδριακά και χλωροπλαστικά γονίδια
- Τα γονίδια που δεν εκφράζονται λόγω μετάλλαξης στον υποκινητή τους.

15. ☼ Ένα γονίδιο ενσωματώθηκε σε ένα πλασμίδιο και στο μετασχηματισμένο βακτήριο **δεν** εκφραζόταν το γονίδιο. Μπορείτε να σκεφθείτε μερικούς λόγους γι' αυτό το γεγονός;

☞ **Απάντηση:**

Το γονίδιο δεν εκφραζόταν, πιθανόν διότι:

- **ήταν ασυνεχές**, οπότε δεν μπορούσε να γίνει ωρίμανση του πρόδρομου mRNA σε ώριμο, αφού τα βακτήρια δεν διαθέτουν μηχανισμούς ωρίμανσης όπως τα ευκαρυωτικά κύτταρα.
- **δεν διέθετε κατάλληλο υποκινητή**, ώστε να αναγνωρισθεί από τους μεταγραφικούς παράγοντες του βακτηρίου, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μικρότερη ποικιλία από αυτή των ευκαρυωτικών.
- **δεν διέθετε κατάλληλες αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής**, με αποτέλεσμα να μην ολοκληρωθεί σωστά η μεταγραφή του γονιδίου.
- **το γονιδιακό προϊόν να απαιτούσε τροποποιήσεις μετά τη μετάφραση**, ώστε να γίνει βιολογικά λειτουργικό, επειδή τα βακτήρια δεν διαθέτουν τους μηχανισμούς τροποποίησης των πρωτεϊνών που διαθέτουν οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί.
- **είχε υποστεί μετάλλαξη** στην αλληλουχία που υπάρχει στην 5' αμετάφραστη του γονιδίου, με αποτέλεσμα να επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης του mRNA στη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος.
- **είχε υποστεί μετάλλαξη** στην αλληλουχία του, όπως ένα νέο κωδικόνιο λήξης στα αρχικά κωδικόνια, το οποίο προκαλούσε πρόωρο τερματισμό της σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.
- **είχε ενσωματωθεί ανεστραμμένο** στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, οπότε μεταγραφόταν η κωδική αλυσίδα αντί της μη κωδικής.

16. ☹ Ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, που περιείχε ένα διακεκομμένο γονίδιο, χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό ενός βακτηρίου, χωρίς τελικά να διαπιστωθεί έκφραση του γονιδίου. Γιατί μπορεί να συνέβη αυτό;

17. 📌 ΠΔΒ Α '20

Κλωνοποιήσατε ένα μόριο cDNA που κωδικοποιεί μια ανθρώπινη ορμόνη, με στόχο την παραγωγή της ορμόνης σε βακτήρια για να θεραπεύσετε μια σπάνια γενετική διαταραχή.

Όταν ενθέσατε αυτό το DNA μέσα σε ένα πλασμίδιο μετά από κατάλληλο υποκινητή και με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μετασχηματίσατε βακτήρια δεν είχατε παραγωγή λειτουργικής ορμόνης.

Εξηγήστε με δύο τρόπους το λόγο για τον οποίο δεν παράχθηκε και προτείνετε μία λύση σε κάθε περίπτωση. (μέχρι 80 λέξεις)

18. ☞ Στο ίδιο βακτήριο εισάγονται ταυτόχρονα δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια: το πλασμίδιο Α και το πλασμίδιο Β. Στο πλασμίδιο Α έχει εισαχθεί το ευκαρυωτικό συνεχές γονίδιο α, μαζί με τον υποκινητή του, σε θέση που βρίσκεται μακριά από υποκινητές γονιδίων του πλασμιδίου. Το πλασμίδιο Β φέρει το ευκαρυωτικό συνεχές γονίδιο β, χωρίς υποκινητή, το οποίο όμως έχει εισαχθεί δίπλα στον υποκινητή ενός γονιδίου του πλασμιδίου. Θεωρώντας ότι τα γονίδια αποτελούνται μόνο από εξώνια, ποια από τις προτάσεις που ακολουθούν είναι η σωστή;

- α. Στο βακτήριο θα παραχθούν και οι δύο πρωτεΐνες.
- β. Στο βακτήριο θα παραχθεί μόνο η πρωτεΐνη α.
- γ. Στο βακτήριο θα παραχθεί μόνο η πρωτεΐνη β.
- δ. Δεν θα παραχθεί καμία από τις δύο πρωτεΐνες.

Να αιτιολογήσετε την επιλογή που κάνατε.

19. ☞ Να εξηγήσετε, τι είδους βιβλιοθήκη θα κατασκευάζατε προκειμένου να:

- α. συνθέσετε την πρωτεΐνη Χ, η οποία κωδικοποιείται από διακεκομμένο γονίδιο.
- β. κλωνοποιήσετε τον υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Χ.
- γ. κλωνοποιήσετε τα εσώνια του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Χ.
- δ. κλωνοποιήσετε ένα γονίδιο που περιέχει την πληροφορία για τη σύνθεση ενός tRNA.

20. ☞ Ένας ερευνητής επιθυμεί να μελετήσει την αλληλουχία αζωτούχων βάσεων σε ένα γονίδιο, όπως αυτή εκφράζεται για τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης. Ένας άλλος ερευνητής επιθυμεί να μελετήσει την αλληλουχία αζωτούχων βάσεων του υποκινητή του ίδιου γονιδίου. Τι είδους βιβλιοθήκη πρέπει να κατασκευάσει κάθε ερευνητής;

21. 👁 ΠΕ ομογ. '04

Τι περιέχει:

- α. μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη;
- β. μια cDNA βιβλιοθήκη;

22. 👁 Ποια είναι η διαφορά μεταξύ μιας γονιδιωματικής και μιας cDNA βιβλιοθήκης;

23. ☹🌟 ‘20

Έστω ένας ερευνητής βιολόγος δημιούργησε cDNA βιβλιοθήκη κυττάρων ήπατος και cDNA βιβλιοθήκη κυττάρων παγκρέατος. Διαπίστωσε ότι στους βακτηριακούς κλώνους των δύο βιβλιοθηκών υπάρχουν ορισμένοι που περιέχουν τα ίδια γονίδια.

α. Πώς θα μπορούσε να ερμηνευθεί το παραπάνω γεγονός;

β. Να ονομάσετε τα κοινά γονίδια των βακτηριακών κλώνων των δύο cDNA βιβλιοθηκών.

24. ① Κατά την κατασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης και την απομόνωση ενός κλώνου από αυτή πραγματοποιείται δύο φορές η διαδικασία της αποδιάταξης μορίων νουκλεϊκών οξέων. Σε ποια στάδια της τεχνικής συμβαίνουν αποδιατάξεις και από ποια διαφορά χαρακτηρίζονται;

25. 👁 Ποιος είναι ο ρόλος των αντιβιοτικών και ποιος των ανιχνευτών στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;

26. ☹ Να γράψετε δυο μεθόδους παραγωγής αντιγράφων μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων ενός μορίου DNA. Σε τι πλεονεκτεί η μια έναντι της άλλης;

27. ☹ Θέλουμε να μελετήσουμε το γενετικό υλικό ενός RNA ιού. Μπορούμε να εφαρμόσουμε τη μέθοδο PCR; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

Γ. ΑΣΚΗΣΕΙΣ - ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

1. Σε ένα μόριο DNA δρουν δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Από τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης A στο μόριο του DNA δημιουργούνται 3 τμήματα, ενώ από τη δράση της B δημιουργούνται 2 τμήματα. Από τη δράση και των δυο μαζί στο ίδιο μόριο DNA δημιουργούνται 4 τμήματα. Τι συμπεραίνετε για τη μορφή του μορίου;
2. Το DNA ενός βακτηρίου αποτελείται από 9.000 ζεύγη βάσεων. Όταν επιδράσουμε με την περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII προκύπτουν δύο τμήματα 4.000 και 5.000 ζευγών αντίστοιχα, ενώ με την BamHI προκύπτουν δύο τμήματα 2.000 και 7.000 ζευγών αντίστοιχα.
 - α. Εάν επιδράσουμε ταυτόχρονα και με τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες, πόσα θραύσματα αναμένετε να προκύψουν;
 - β. Εάν κανένα από τα θραύσματα δεν είναι ίδιο με τα αρχικά, να δείξετε επάνω σε ένα σχήμα (μία εκδοχή) τις θέσεις που αναγνώρισαν και έκοψαν οι δύο ενδονουκλεάσες.
3. Δίνεται ένα θραύσμα DNA, το οποίο προέρχεται από την επίδραση της EcoRI σε ένα μόριο DNA ανθρώπινου κυττάρου.

A A T T C G A A C T A G C T G
G C T T G A T C G A C T T A A

Να σημειώσετε τα 5' και 3' ελεύθερα άκρα του θραύσματος.

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

4. Η αλληλουχία βάσεων ενός τμήματος της κωδικής αλυσίδας του πρώτου εξωνίου ενός γονιδίου, είναι:

5' ...AAGCTTCCATGAAGTTCAAAGAATTCTTTCCC... 3'

- α. Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η EcoRI για την κλωνοποίηση του γονιδίου αυτού σε βακτήριο – ξενιστή;
- β. Ποια θα ήταν η απάντηση, αν τα άκρα της παραπάνω αλυσίδας ήταν 3' αριστερά και 5' δεξιά;
- γ. Ποια θα ήταν η απάντηση, αν το παραπάνω τμήμα ήταν εσώνιο;

 Απάντηση

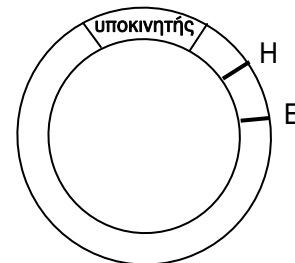
Η EcoRI, όποτε συναντά την αλληλουχία $5' - \text{GAATTC} - 3'$ στο γονιδίωμα, κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A (με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$), αφήνοντας **μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις** στα κομμένα άκρα. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν **δεσμούς υδρογόνου** με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA, που **έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο**.

Επιπλέον, για την κλωνοποίηση ενός τμήματος (γονιδίου) DNA χρησιμοποιούμε κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες πρέπει να κόβουν το τμήμα σε δύο θέσεις εκατέρωθεν και όχι στο εσωτερικό.

- α. Η αλληλουχία αυτή υπάρχει στο εσωτερικό του τμήματος που δόθηκε και άρα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί η EcoRI για την κλωνοποίηση του γονιδίου.
- β. Αν τα άκρα της παραπάνω αλυσίδας ήταν 3' αριστερά και 5' δεξιά, τότε η αλληλουχία που αναγνωρίζει η EcoRI δεν υπάρχει και επομένως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, αρκεί να μην υπάρχει η αλληλουχία αυτή ούτε στο υπόλοιπο τμήμα του γονιδίου.
- γ. Αν το παραπάνω τμήμα ήταν εσώνιο θα κοβόταν και πάλι και επομένως δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η EcoRI για την κλωνοποίηση του γονιδίου.

5. ΠΔΒ Α '19

Ένας πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιείται για τη μεταφορά ενός γραμμικού δίκλωνου τμήματος DNA σε βακτηριακά κύτταρα. Οι θέσεις αναγνώρισης δύο περιοριστικών ενδονουκλεασών, των HindIII και EcoRI, φαίνονται στην εικόνα με τα αναγνωριστικά H και E αντίστοιχα.



Η HindIII αναγνωρίζει την αλληλουχία $5'-AAGCTT-3'$ και σπάει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς ανάμεσα στα νουκλεοτίδια με αζωτούχο βάση την Αδενίνη και στους δύο κλώνους.

Το πλασμίδιο ανασυνδυάζεται, αφού σε αυτό επιδράσουν και οι δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Το δίκλωνο DNA που θα μπορούσε να εκφραστεί με επιτυχία στα βακτήρια μετά τη μεταφορά του με φορέα το συγκεκριμένο πλασμίδιο είναι το:

A.	κωδική μη κωδική	$5' \text{ AGCTTACCAT} \dots \text{TTGCCCTG} 3'$ $3' \text{ ATGGTA} \dots \text{AACGGGACTTAA} 5'$
B.	κωδική μη κωδική	$3' \text{ AGCTTACCAT} \dots \text{TTGCCCTG} 5'$ $5' \text{ ATGGTA} \dots \text{AACGGGACTTAA} 3'$
Γ.	μη κωδική κωδική	$3' \text{ AGCTTACCAT} \dots \text{TTGCCCTG} 5'$ $5' \text{ ATGGTA} \dots \text{AACGGGACTTAA} 3'$
Δ.	μη κωδική κωδική	$5' \text{ AGCTTACCAT} \dots \text{TTGCCCTG} 3'$ $3' \text{ ATGGTA} \dots \text{AACGGGACTTAA} 5'$

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (έως 40 λέξεις)

6. ☼ Δεχόμαστε ότι ένας υποθετικός βακτηριοφάγος έχει RNA ως γενετικό υλικό και το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Η ακολουθία νουκλεοτιδίων σε ένα τμήμα του RNA του ιού είναι η παρακάτω:

5' ... G C C G A A U U C A U U A ... 3'

Ο ιός μολύνει ένα βακτήριο *E.coli* και με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, με καλούπι το RNA του, συνθέτει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA. Στη συνέχεια, αφού απομακρυνθεί το RNA του ιού, η αλυσίδα του DNA αντιγράφεται και έτσι το DNA γίνεται δίκλωνο. Στη συνέχεια μπορεί να αρχίσει ο πολλαπλασιασμός του ιού.

- Να γράψετε την ακολουθία νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA του ιού.
- Να προτείνετε έναν πιθανό μηχανισμό με τον οποίο το βακτήριο θα μπορούσε να σταματήσει τον πολλαπλασιασμό του ιού, αφού αυτός σχηματίσει το DNA του.

☛ **Απάντηση:**

- Το μονόκλωνο DNA που θα παραχθεί με καλούπι το RNA του ιού θα έχει την παρακάτω ακολουθία νουκλεοτιδίων 3' ... CGGCTTAAGTAAT ... 5'

Όταν θα αντιγραφεί αυτή η αλυσίδα θα προκύψει ένα δίκλωνο μόριο με την παρακάτω ακολουθία νουκλεοτιδίων 3' ... CGGCTTAAGTAAT ... 5'

5' ... GCCGAATTCATTA ... 3'

- Όπως παρατηρείται στο παραπάνω DNA υπάρχει η ακολουθία νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζεται από την EcoRI που φυσιολογικά υπάρχει στο βακτήριο. Έτσι η περιοριστική ενδονουκλεάση θα μπορούσε να κόψει το DNA του ιού στη θέση αυτή και να σταματήσει με αυτόν τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό του ιού.

7. ☼ ΠΕ '17 Γ2

Το τμήμα DNA, που απεικονίζεται στην **Εικόνα 2**, έχει προκύψει μετά από επίδραση με ενδονουκλεάση EcoRI.

A A T T C C G C A A A T T A A
G G C G T T T A A T T

Εικόνα 2

Να σημειώσετε τα 5' και 3' άκρα του, αιτιολογώντας την απάντησή σας. (μονάδες 4)

Να εξηγήσετε αν είναι δυνατόν το συγκεκριμένο τμήμα να κλωνοποιηθεί με τη βοήθεια πλασμιδίου χρησιμοποιώντας τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. (μονάδες 2)

Μονάδες 6

☛ **Ενδεικτική απάντηση** (σύμφωνα με τις ενδεικτικές απαντήσεις της ΚΕΕ ΓΕΛ 2017):

«Η EcoRI αναγνωρίζει την ειδική αλληλουχία 5' G ▼AATTC 3' και ... (θεωρία)
3' CTTAA ▲G 5'

Άρα, στο τμήμα DNA που έχει προκύψει από τη δράση της EcoRI, ο προσανατολισμός είναι:

5' AATTCCGCAAATTAA 3'

3' GGCGTTTAATT 5'

Δεν μπορεί να κλωνοποιηθεί, όπως είναι αυτό το τμήμα, γιατί δεν διαθέτει μονόκλωνα άκρα με αζευγάρωτες βάσεις και από τις 2 πλευρές.»

«Εάν ο μαθητής αναφέρει επιπλέον προσθήκη τεχνητού άκρου, ώστε να δημιουργηθεί μονόκλωνο άκρο, να ληφθεί ως σωστό.»

8. ① Η περιοριστική ενδονουκλεάση MspI αναγνωρίζει την αλληλουχία $\begin{matrix} 5' \text{C} \blacktriangledown \text{CGG} 3' \\ 3' \text{GGC} \blacktriangle \text{C} 5' \end{matrix}$ και κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ C και C, με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$.

Η περιοριστική ενδονουκλεάση TaqI αναγνωρίζει την αλληλουχία $\begin{matrix} 5' \text{T} \blacktriangledown \text{CGA} 3' \\ 3' \text{AGC} \blacktriangle \text{T} 5' \end{matrix}$ και κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ T και C, με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$.

Δίνεται η ακόλουθη αλληλουχία βάσεων DNA:

5' ATTCTGAGCCGGTT [GATTAAGTACCGGATATC] GCGTCGACCGG 3'

3' TAAGCTCGGCCAA [CTAATTGACTGGCCTATAG] CGCAGCTGGCC 5'

Το τμήμα μεταξύ των αγκυλών πρόκειται να κλωνοποιηθεί.

- Ποια περιοριστική ενδονουκλεάση είναι η κατάλληλη;
- Ποια αλληλουχία πρέπει να διαθέτει ο φορέας κλωνοποίησης;
- Πόσους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και πόσους δεσμούς υδρογόνου θα σπάσει συνολικά η κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση, στην παραπάνω αλληλουχία βάσεων DNA;

9. ① ΠΕ επαν. '19

Στο **σχήμα 2** δίνεται η αλληλουχία ενός υποθετικού γονιδίου προκαρυωτικού οργανισμού, το οποίο κωδικοποιεί ένα μικρό πεπτίδιο.

A | ...GAATTCGAATCCTAGCGCACGACAACCATTTTGAATTCGCGC... | B
...CTTAAGCTTAGGATCGCGTGTGTTGGTAAAGCTTAAGCGCG...
Σχήμα 2

- Γ1. 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 (μονάδες 2) και να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 5).

Μονάδες 7

- Γ2. Αν υποθέσουμε ότι κατά την αντιγραφή του 16ου νουκλεοτιδίου της δεδομένης αλληλουχίας η DNA-πολυμεράση ενσωματώνει κατά λάθος, χωρίς να διορθώνεται, απέναντι

από το νουκλεοτίδιο της κυτοσίνης το νουκλεοτίδιο της θυμίνης, να γράψετε τις αλληλουχίες των δίκλωνων τμημάτων που θα προκύψουν μετά το τέλος της αντιγραφής.

Μονάδες 6

Γ3. Θεωρώντας ότι το σφάλμα δεν έχει επιδιορθωθεί μετά το τέλος της αντιγραφής και ότι το κύτταρο διαιρείται, να διερευνήσετε την πιθανή επίπτωση του σφάλματος στο παραγόμενο πεπτίδιο σε καθένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα.

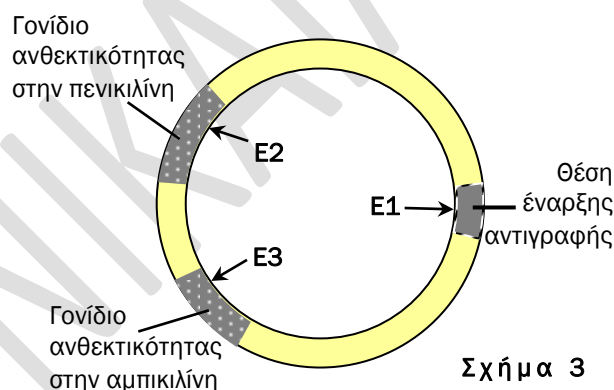
Μονάδες 6

Γ4. Στο **σχήμα 3** 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'

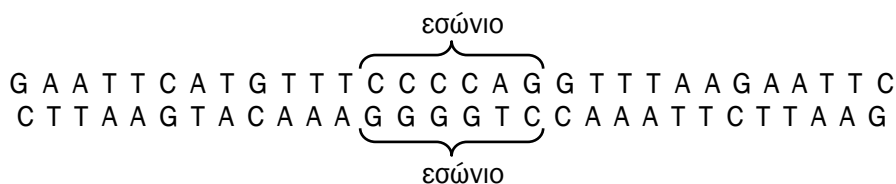
Να εξηγήσετε ποιο από τα τρία ένζυμα (E1, E2, E3) είναι κατάλληλο για την κλωνοποίηση του γονιδίου με σκοπό την παραγωγή πεπτιδίου σε βακτήρια ξενιστές.

Μονάδες 6



10. ΠΕ '05

Δίνεται τμήμα μορίου DNA ευκαρυωτικού κυττάρου που περιέχει ασυνεχές γονίδιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του παρακάτω πεπτιδίου, που δεν έχει υποστεί καμιά τροποποίηση:



H₂N – Μεθειονίνη – φαινυλαλανίνη – βαλίνη – COOH

- α. Να γράψετε την κωδική και τη μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου, το πρόδρομο m-RNA και το ώριμο m-RNA. (Μονάδες 4)
- β. Να ορίσετε τα 3' και 5' άκρα των παραπάνω νουκλεοτιδικών αλυσίδων, αιτιολογώντας την απάντησή σας. (Μονάδες 8)
- γ. Να αναφέρετε τις διαδικασίες, κατά την πορεία από το γονίδιο στο πεπτίδιο, και τις περιοχές του κυττάρου στις οποίες πραγματοποιούνται. (Μονάδες 6)

- δ. Πώς μπορούμε να δημιουργήσουμε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, που να περιέχει το συγκεκριμένο γονίδιο, χρησιμοποιώντας την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI;

(Μονάδες 7)

Δίνονται οι παρακάτω αντιστοιχίσεις αμινοξέων και κωδικονίων από το γενετικό κώδικα:

Μεθειονίνη → AUG, Φαινυλαλανίνη → UUU, Βαλίνη → GUU

☛ **Απάντηση:**

- α. Κωδική: 5' GAATTC - ATG - TTT - **CCCCAG** - GTT - TAA - GAATTC 3'
 Μη κωδική: 3' CTTAAG - TAC - AAA - **GGGGTC** - CAA - ATT - CTTAAG 5'
 Πρόδρομο m-RNA: 5' GAAUUC - AUG - UUU - **CCCCAG** - GUU - UAA - GAATTC 3'
 Ώριμο m-RNA: 5' GAAUUC - AUG - UUU - **GUU** - UAA - GAATTC 3'

- β. Τα 3' και 5' άκρα των νουκλεοτιδικών αλυσίδων φαίνονται παραπάνω.

Σύμφωνα με τα κωδικόνια του mRNA που δίνονται, ο κωδικός κλώνος θα περιέχει τα κωδικόνια που κωδικοποιούν τα αμινοξέα του πεπτιδίου.

→ Διαβάζοντας τον πάνω κλώνο, από αριστερά προς τα δεξιά, συναντώ κωδικόνιο έναρξης κωδικού κλώνου 5' -ATG-3' , το οποίο κωδικοποιεί το αμινοξύ **μεθειονίνη**.

→ Συνεχίζοντας με βήμα τριπλέτας, συνεχώς και μη επικαλυπτόμενα ακολουθεί το κωδικόνιο 5' -TTT-3' , το οποίο κωδικοποιεί το **2ο αμινοξύ** του πεπτιδίου, τη **φαινυλαλανίνη**.

→ Στη συνέχεια συναντώ **εσώνιο** 5' -**CCCCAG**-3' , που δεν κωδικοποιεί κανένα αμινοξύ.

→ Ακολουθεί το 3ο κωδικόνιο 5' -GTT-3' , το οποίο κωδικοποιεί το **3ο αμινοξύ** του πεπτιδίου, τη **βαλίνη**, και μετά το κωδικόνιο λήξης κωδικού κλώνου 5' -TAA-3' , το οποίο δεν κωδικοποιεί αμινοξύ.

→ Άρα, η κωδική αλυσίδα είναι η πάνω αλυσίδα και η συμπληρωματική της μη κωδική η κάτω.

→ Σύμφωνα με το μοντέλο της διπλής έλικας, οι δυο αλυσίδες είναι αντιπαράλληλες, δηλαδή το 3' άκρο της μιας είναι απέναντι από το 5' άκρο της άλλης.

→ Η **μεταγραφή** γίνεται με κατεύθυνση 5' → 3' , **συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα** προς τη μεταγραφόμενη αλυσίδα, η οποία ονομάζεται μη κωδική.

→ Το ώριμο mRNA προκύπτει από το πρόδρομο mRNA, κατά την ωρίμαση, με αφαίρεση του εσωνίου.

- γ. **Διαδικασία:** **Περιοχή του κυττάρου:**

Μεταγραφή Πυρήνας

Ωρίμαση Πυρήνας

Μετάφραση Κυτταρόπλασμα – ριβοσώματα

- δ. Σχολικό βιβλίο, σελ. 58, με προσαρμογή στα δεδομένα.

11. ☞ ΠΕ ομογ. '06

Δίνεται το παρακάτω τμήμα DNA ενός προκαρυωτικού οργανισμού:

5' C C A G A A T T C A A T T C A G G A C G A A A G A A T T C A A C 3'
3' G G T C T T A A G T T A A G T C C T G C T T T T C T T A A G T T G 5'

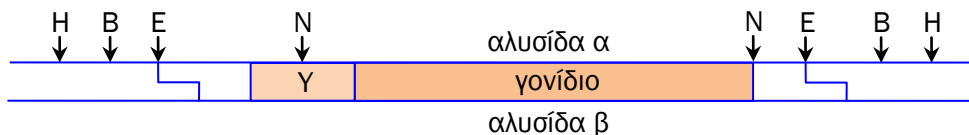
Το παραπάνω τμήμα DNA κόβεται με περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI.

- Να γράψετε το τμήμα DNA που προκύπτει μετά από τη δράση της EcoRI και να δικαιολογήσετε την απάντησή σας. (Μονάδες 8)
- Το τμήμα του DNA που προέκυψε μετά τη δράση της EcoRI μεταγράφεται. Ποια αλυσίδα από αυτό το DNA μεταγράφεται και γιατί; (Μονάδες 6)
- Να γράψετε την αλληλουχία του mRNA που προκύπτει από αυτή τη μεταγραφή και να σημειώσετε το 5' και το 3' άκρο της. (Μονάδες 6)
- Ποιοι οργανισμοί διαθέτουν περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ποιος είναι ο φυσιολογικός τους ρόλος; (Μονάδες 5)

12. ☛ ΟΕΦΕ '04

Στα ακόλουθα σχήματα παριστάνονται:

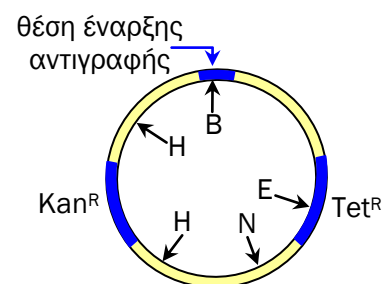
Τμήμα DNA προκαρυωτικού κυττάρου, στο οποίο περιέχεται ένα γονίδιο και ο υποκινητής του.



Πλασμίδιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης του παραπάνω γονιδίου, για την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί.

Το σημείο E δείχνει τη θέση αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Στο τμήμα DNA απεικονίζονται τα μονόκλωνα άκρα που αναγνωρίζει και κόβει η EcoRI. Τα

σημεία B, N και H δείχνουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών BamHI, NotI και HindIII αντίστοιχα. Τα γονίδια Kan^R και Tet^R προσφέρουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και τετρακυκλίνη αντίστοιχα.



- Ποια από τις δύο αλυσίδες είναι η μη κωδική;
- Ποιο από τα τέσσερα ένζυμα είναι το καταλληλότερο για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA;

Να αιτιολογήσετε τις απαντήσεις σας.

☛ Απάντηση:

α. Η EcoRI είναι μια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται ευρέως.

→ Απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*.

→ Όποτε συναντά την αλληλουχία $5' - \text{GAATTC} - 3'$
 $3' - \text{CTTAAG} - 5'$ στο γονιδίωμα, κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A (με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$), αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα.

Η κωδική αλυσίδα είναι η α, διότι αυτή έχει $5'$ άκρο προς τον υποκινητή, σύμφωνα με τον τρόπο που κόβει η EcoRI την αλληλουχία που αναγνωρίζει, όπως δείχνει και το σχήμα.

β. Η EcoRI είναι το καταλληλότερο ένζυμο για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA και την κλωνοποίηση του παραπάνω γονιδίου μαζί με τον υποκινητή του, για την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί, αφού κόβει το βακτηριακό DNA μπροστά από τον υποκινητή και πίσω από το γονίδιο, χωρίς να το επηρεάζει. Επιπλέον αναγνωρίζει στο πλασμίδιο μια μόνο χαρακτηριστική αλληλουχία μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη και το κάνει γραμμικό, αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα.

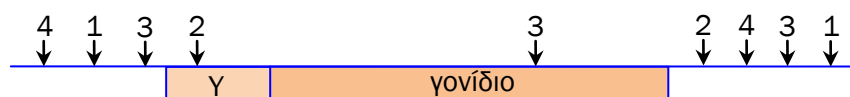
Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τις συμπληρωματικές βάσεις του γονιδίου, που έχει κοπεί με το ίδιο ένζυμο.

→ Η **BamHI** κόβει το ίδιο σωστά, όπως και η EcoRI, το γονίδιο, αλλά κόβει το πλασμίδιο στη θέση έναρξης της αντιγραφής και καταστρέφει την ικανότητά του να αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα. Έτσι, ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μέσα σε ένα μετασχηματισμένο βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή, δεν θα μπορεί να αυτοδιπλασιαστεί και τα νέα βακτήρια δεν θα περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και δεν θα ήταν μετασχηματισμένα. Έτσι, κρίνεται **ακατάλληλη**.

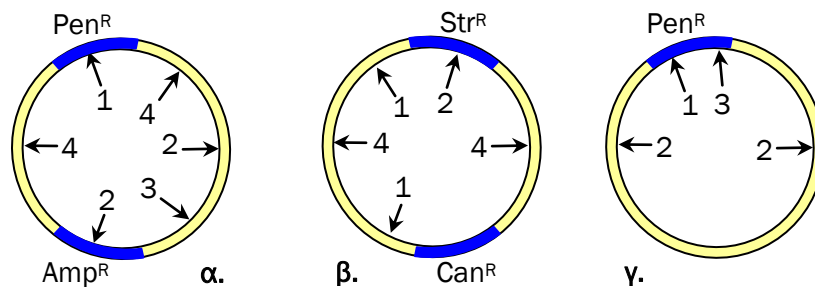
→ Η **NotI** κόβει τον υποκινητή του γονιδίου, οπότε το γονίδιο καθίσταται μη λειτουργικό, αφού δεν θα τον «βρίσκουν» οι μεταγραφικοί παράγοντες και έτσι κρίνεται **ακατάλληλη**.

→ Η **HindIII** κόβει το ίδιο σωστά, όπως και η EcoRI, το γονίδιο, αλλά κόβει το πλασμίδιο σε δύο θέσεις και το καταστρέφει, οπότε κρίνεται **ακατάλληλη**.

13. ☞ Διαθέτουμε ένα τμήμα βακτηριακού DNA, στο οποίο περιέχεται ένα γονίδιο και ο υποκινητής του.



Διαθέτουμε επίσης τρία διαφορετικά πλασμίδια, στα οποία έχουν σημειωθεί τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.



Στο γονίδιο και στα πλασμίδια έχουν σημειωθεί οι θέσεις αναγνώρισης τεσσάρων περιοριστικών ενδονουκλεασών.

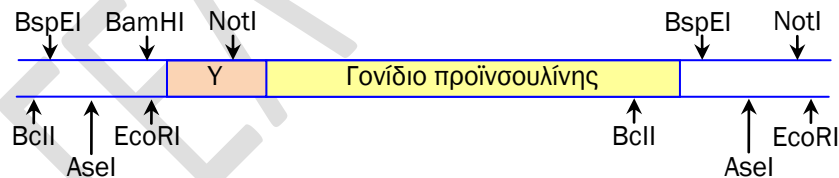
Ποιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες (ΠΕ), ποια πλασμίδια και ποια αντιβιοτικά θα επιλέξουμε προκειμένου:

	ΠΕ	Πλασμίδιο	Αντιβιοτικό
α.			
β.			
γ.			

- να κλωνοποιήσουμε μόνο την αλληλουχία βάσεων του γονιδίου;
- να παράγουμε την πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο;
- να κλωνοποιήσουμε μόνο τον υποκινητή του γονιδίου;

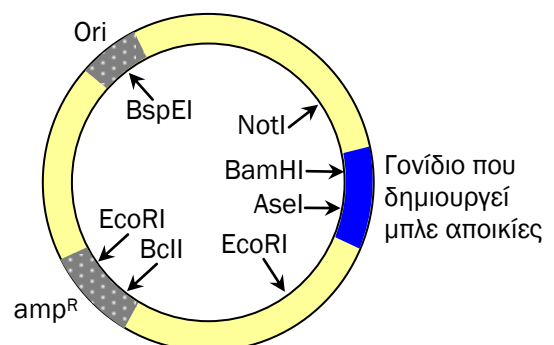
14. ☞ Μαυροματίδης, Χατζημόσχου

Δίνεται ένα τμήμα DNA, που περιέχει το γονίδιο της ανθρώπινης προΐνσουλίνης (από cDNA βιβλιοθήκη) και κατάλληλο υποκινητή (Y), και



ένα πλασμίδιο που φέρει:

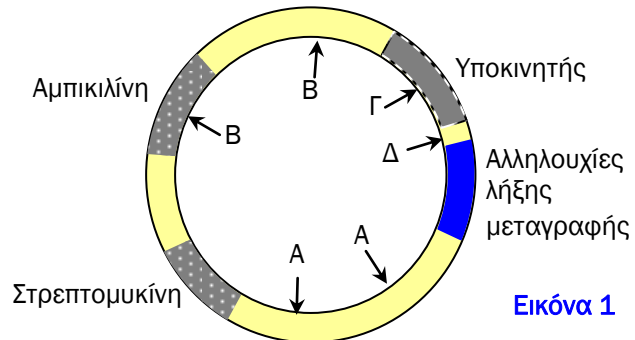
- μία θέση έναρξης της αντιγραφής (Ori),
- ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (amp^R) και
- ένα γονίδιο που δημιουργεί μπλε χρώμα στις αποικίες του βακτηρίου, στο οποίο εισέρχεται.



Να βρείτε ποια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI, BclI, AseI, BamHI, BspEI ή NotI, πρέπει να χρησιμοποιήσετε, έτσι ώστε να απομονώσετε βακτήρια που παράγουν ανθρώπινη προΐνσουλίνη.

15. ① ΠΕ επαν. '14 ΘΕΜΑ Δ

Στην **Εικόνα 1** 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.



Εικόνα 1

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.

Δ1. Ποια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες α, β, γ ή δ είναι η κατάλληλη για τη χρήση του πλασμιδίου αυτού ως φορέα κλωνοποίησης; (μονάδα 1) Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας. (μονάδες 3)

Μονάδες 4

Δ2. 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.

Μονάδες 3

Στην **Εικόνα 2** δίνεται τμήμα DNA το οποίο περιέχει το συνεχές ανθρώπινο γονίδιο που επιθυμούμε να εισαγάγουμε στο πλασμίδιο της **Εικόνας 1**.

Αλυσίδα I ΟΗ-GCCAATATTTAAATGAGCATGCCGTAGGAATATTCTGG
Αλυσίδα II CGGTTATAATTTACTCGTACGGCATCCTTATAAGCC

Εικόνα 2

Δ3. Να εντοπίσετε την κωδική αλυσίδα του γονιδίου της **Εικόνας 2**. (μονάδα 1) Να γράψετε το mRNA και να σημειώσετε τον προσανατολισμό του. (μονάδες 2) Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας. (μονάδες 4)

Μονάδες 7

Δ4. Σύμφωνα με την **Εικόνα 2**, να γράψετε την αλληλουχία μήκους έξι ζευγών βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση, την οποία προσδιορίσατε στο ερώτημα Δ1, για την κλωνοποίηση του γονιδίου.

Μονάδες 5

Δ5. Να εξηγήσετε γιατί η κλωνοποίηση του γονιδίου της **Εικόνας 2** στο πλασμίδιο της **Εικόνας 1** 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.

Μονάδες 6

16. ☒ ΠΕ εσπ. '17 Γ1

Προκειμένου να κλωνοποιήσουμε επιλεγμένο τμήμα DNA, κατασκευάσαμε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, το οποίο περιλαμβάνει:

- α) γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη
- β) γονίδιο που κωδικοποιεί ένζυμο, το οποίο μετατρέπει την άχρωμη ουσία Α σε έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο Β. Το γονίδιο αυτό περιλαμβάνει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI.

Αφού πραγματοποιήθηκαν όλα τα στάδια παραγωγής ανασυνδυασμένου μορίου DNA (πλασμιδίου) και εισαγωγής του σε βακτήρια-ξενιστές, προέκυψαν:

- i) βακτήρια χωρίς ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.
- ii) άχρωμες αποικίες με βακτήρια ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη.
- iii) αποικίες μπλε χρώματος με βακτήρια ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη.

Από ποια αποικία θα επιλεγούν τα βακτήρια που περιέχουν το επιλεγμένο τμήμα DNA; (μονάδες 3)

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας. (μονάδες 6)

(Χρησιμοποιήσαμε ως ξενιστές βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια και είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά).

Μονάδες 9

17. ☒ Επιθυμούμε να κατασκευάσουμε μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη, για το γονιδίωμα της φρουτόμυγας *Drosophila melanogaster*. Το πλασμίδιο, που θα χρησιμοποιήσουμε ως φορέα κλωνοποίησης, διαθέτει τρία γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη και πενικιλίνη. Δημιουργούμε ανασυνδυασμένα πλασμίδια με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI. Η αλληλουχία βάσεων, που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση, βρίσκεται μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας στην πενικιλίνη. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό βακτηρίων που δεν είχαν πλασμίδιο, αλλά έφεραν στο κύριο DNA ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Στη συνέχεια τα βακτήρια καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό.

- α. Πόσες και ποιες κατηγορίες βακτηρίων θα δημιουργηθούν σε αυτή τη βιβλιοθήκη;
- β. Με ποια μέθοδο θα επιλέξετε τα βακτήρια που περιέχουν πλασμίδιο;
- γ. Με ποια μέθοδο θα επιλέξετε τα βακτήρια που έχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, ώστε να προχωρήσετε στη φάση της κλωνοποίησής τους;

18. 🌟 ΠΕ '18

Προκειμένου να εντοπισθεί ένα από τα γονίδια tRNA της γλυκίνης (Gly), εργαζόμαστε με τη βοήθεια βιβλιοθήκης που έχει προκύψει από ευκαρυωτικό γενετικό υλικό.

Γ1. Με ποιο είδος βιβλιοθήκης πρέπει να εργαστούμε; (μονάδες 2)

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 5).

Μονάδες 7

Γ2. Το αντικωδικόνιο του tRNA που μελετάμε είναι το 3' CCC 5'. Το γονίδιο αυτού του tRNA υφίσταται μετάλλαξη ώστε το αντικωδικόνιό του τώρα να μετατραπεί σε 3' ACC 5' χωρίς περαιτέρω επιπτώσεις στην λειτουργικότητα του tRNA. Το μεταλλαγμένο γονίδιο χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό ενός βακτηρίου. Το βακτήριο δεν διαθέτει το αντίστοιχο φυσιολογικό γονίδιο και εκφράζει το μεταλλαγμένο γονίδιο του tRNA που του έχει εισαχθεί. Δίνονται οι κωδικές αλυσίδες δύο γονιδίων (α και β) του βακτηρίου που κωδικοποιούν δύο πολυπεπτίδια.

Γονίδιο α Α Τ Α Α Γ Τ Α C C Γ Γ Γ C C Γ Τ Α Τ Α Α

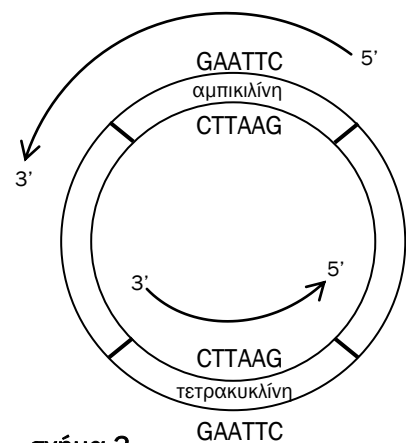
Γονίδιο β Α Τ Α Α Γ Τ Α C C Γ Γ Τ Γ C C Γ Τ Α Τ Α Α

Θα παραχθούν πεπτίδια από την έκφραση και των δύο γονιδίων; (μονάδες 2) Να γράψετε την αλληλουχία όσων πεπτιδίων θα παραχθούν (μονάδες 4) Να αιτιολογήσετε τις απαντήσεις σας. (μονάδες 7). Δίνεται ο γενετικός κώδικας:

Μονάδες 13

Γ3. Στο **σχήμα 3** απεικονίζεται πλασμίδιο που διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας σε δύο αντιβιοτικά, την αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη και αναγράφονται εσωτερικές αλληλουχίες των δύο γονιδίων ανθεκτικότητας. Αφού το πλασμίδιο κοπεί με την EcoRI και εισαχθεί ένα γονίδιο ξένου οργανισμού σε αυτό να εξηγήσετε ποιο από τα δύο αντιβιοτικά θα χρησιμοποιούσατε για τη διάκριση των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Μονάδες 5



σχήμα 3

☛ **Ενδεικτική απάντηση** (σύμφωνα με τις ενδεικτικές απαντήσεις της ΚΕΕ ΓΕΛ 2018):

Γ1. σελ. 59.

Γονιδιωματική βιβλιοθήκη, γιατί περιέχει το συνολικό DNA, άρα και τα γονίδια που μεταγράφονται σε tRNA.

Γ2. Μόνο από το γονίδιο Β θα παραχθεί πεπτίδιο, από το γονίδιο Α όχι.

Το πεπτίδιο είναι μεθειονίνη-προλίνη-γλυκίνη-προλίνη.

Αιτιολόγηση: Στο γονίδιο B υπάρχουν κωδικόνια έναρξης και λήξης και όλα τα tRNA που αντιστοιχούν στα ενδιάμεσα κωδικόνια. Στο γονίδιο A δεν υπάρχει tRNA με αντικωδικόνιο 3'CCC5'.

☛ οδηγία βαθμολόγησης 21-6-2018:

Γονίδιο α – όχι φυσιολογικό πεπτίδιο (καθόλου ή διπεπτίδιο).

Γονίδιο β – παράγονται δύο διαφορετικά πεπτίδια

i. $\text{H}_2\text{N-Met-Pro-Gly-Pro-COOH}$

ii. $\text{H}_2\text{N-Met-Pro-Trp-Pro-COOH}$

Γ3. Η τετρακυκλίνη. Η EcoRI κόβει την αλληλουχία 5'GAATTC3' μέσα στο γονίδιο της τετρακυκλίνης οπότε τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια δεν είναι ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη.

«Διευκρίνιση: Στο σχήμα το επάνω βέλος αφορά τον προσανατολισμό της εξωτερικής αλυσίδας και το κάτω βέλος της εσωτερικής αλυσίδας του πλασμιδίου»

19. ☞ ΠΕ '10

Δίνεται μείγμα μορίων DNA και ένας ανιχνευτής RNA.



Ανιχνευτής: 5' U A C G G A U U G A 3'

Να εξηγήσετε τι είναι ανιχνευτής, (μονάδες 2)

να περιγράψετε τις διαδικασίες που θα ακολουθηθούν προκειμένου ο ανιχνευτής να υβριδοποιήσει την κατάλληλη αλληλουχία (μονάδες 4)

και να εξηγήσετε ποιος είναι ο κλώνος του DNA που θα υβριδοποιηθεί. (μονάδες 4)

20. ☛ Στο πρόδρομο mRNA του ενζύμου της τυροσινάσης, το μεταλλαγμένο γονίδιο του οποίου σχετίζεται με τον αλφισμό, περιλαμβάνονται εσώνια που αποτελούν το 60% του πρόδρομου mRNA. Κατά την απομόνωση του φυσιολογικού γονιδίου της τυροσινάσης από μία cDNA βιβλιοθήκη, την αποδιάταξη του και την υβριδοποίηση του με το κυτταροπλασματικό mRNA που παράγει την τυροσινάση, να βρείτε και να εξηγήσετε:

α. ποια αλυσίδα του γονιδίου θα υβριδοποιηθεί με το mRNA;

- β. ποιο είναι το ποσοστό υβριδοποίησης μεταξύ του mRNA και του γονιδίου της τυροσινάσης (δεχόμαστε ότι η υβριδοποίηση μεταξύ των συμπληρωματικών περιοχών των μορίων είναι πλήρης);

☛ Απάντηση:

- α. Κατά την υβριδοποίηση ενώνονται με δεσμούς υδρογόνου συμπληρωματικές και αντιπαράλληλες αλυσίδες DNA μεταξύ τους ή RNA με DNA. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η υβριδοποίηση θα πραγματοποιηθεί μεταξύ της μη κωδικής αλυσίδας του γονιδίου, η οποία χρησιμοποιείται κατά τη μεταγραφή για τη δημιουργία του πρόδρομου mRNA και επομένως είναι αντιπαράλληλη και συμπληρωματική με αυτό, με το κυτταροπλασματικό mRNA που αναφέρεται στην άσκηση. Βέβαια το κυτταροπλασματικό mRNA είναι το ώριμο mRNA που έχει υποστεί στον πυρήνα την διαδικασία της ωρίμανσης και αποτελείται πλέον μόνο από τα εξώνια. Μέσω αυτών των εξωνίων του θα ενωθεί με την μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου στις αντίστοιχες περιοχές των εξωνίων της.
- β. Εφόσον το κυτταροπλασματικό mRNA, δηλαδή το ώριμο mRNA, υβριδοποιείται μόνο με τα εξώνια της μη κωδικής αλυσίδας του γονιδίου, και το γονίδιο της τυροσινάσης προέρχεται από cDNA βιβλιοθήκη και επίσης δεν περιέχει εσώνια, το ποσοστό υβριδοποίησης μεταξύ των δύο αυτών μορίων θα είναι 100%.

- 21. ☞** Δίνεται ένας ανιχνευτής RNA με την ακόλουθη αλληλουχία βάσεων:

5' C U A G U C A G G U G U 3'

Ο ανιχνευτής υβριδοποιεί μια αλληλουχία του μεταφραζόμενου τμήματος της κωδικής ενός γονιδίου, που απομονώθηκε από βακτηριακό κλώνο μιας cDNA βιβλιοθήκης.

Να χρησιμοποιήσετε το γενετικό κώδικα και να γράψετε την αλληλουχία των αμινοξέων που κωδικοποιούνται από το τμήμα του γονιδίου που υβριδοποιείται. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

- 22. ☞** Μαυροματίδης, Χατζημόσχου

Έχετε στη διάθεσή σας τους παρακάτω δύο ανιχνευτές:

Ανιχνευτής A: 5' CAU U U G A G C 3'

Ανιχνευτής B: 5' G T A A A C T C G 3'

Ποιον από τους δύο ανιχνευτές θα χρησιμοποιούσατε για να ανιχνεύσετε ένα γονίδιο, του οποίου η κωδική αλυσίδα περιέχει την παρακάτω αλληλουχία βάσεων;

5' ...G C C C A T T T T G A G C T C G A A A G ...3'

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

23. ① ΠΕ '12 ΘΕΜΑ Δ

Δίνεται το παρακάτω τμήμα βακτηριακού DNA, το οποίο κωδικοποιεί ένα ολιγοπεπτίδιο.

Αλυσίδα 1: G T T G A A T T C T T A G C T T A A G T C G G G C A T G A A T T C T C

Αλυσίδα 2: C A A C T T A A G A A T C G A A T T C A G C C C G T A C T T A A G A G

Δ1. Να προσδιορίσετε την κωδική και τη μη κωδική αλυσίδα του παραπάνω τμήματος DNA, επισημαίνοντας τα 5' και 3' άκρα των αλυσίδων του (μονάδες 1).

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 5).

Μονάδες 6

Δ2. Το παραπάνω τμήμα DNA αντιγράφεται, και κατά τη διαδικασία της αντιγραφής δημιουργούνται τα παρακάτω πρωταρχικά τμήματα:

i) 5' - G A G A A U U C -3'

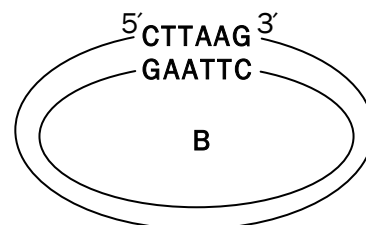
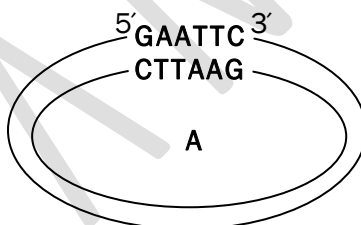
ii) 5' - U U A A G C U A -3'

iii) 5' - G U U G A A U U -3'

Να προσδιορίσετε ποια αλυσίδα αντιγράφεται, με συνεχή και ποια με ασυνεχή τρόπο (μονάδες 1). Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 5).

Μονάδες 6

Δ3. 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 επιλέξετε για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (μονάδα 1); Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 4). Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί θα διασπαστούν στο πλασμίδιο που επιλέξατε και πόσοι θα δημιουργηθούν κατά το σχηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (μονάδες 2);

Μονάδες 7

24. ① ΠΕ '13 ΘΕΜΑ Δ

Παρακάτω σας δίνονται τέσσερις μονόκλωνες αλυσίδες DNA:

1. 5' - A A A T G A A A C C A G G A T A A G - 3'

2. 5' - A A T T C G G G G G G C - 3'

3. 5' - A A T T C T T A T C C T G G T T T C A T T T - 3'

4. 5' - A A T T G C C C C C C G - 3'

Οι αλυσίδες αυτές τοποθετούνται σε κατάλληλο περιβάλλον υβριδοποίησης.

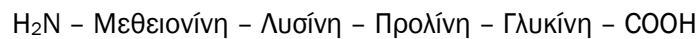
Δ1. Να γράψετε τα μόρια DNA που θα προκύψουν μετά την υβριδοποίηση, τα οποία θα ονομάσετε υβριδοποιημένο μόριο 1 και υβριδοποιημένο μόριο 2.

Μονάδες 2

Δ2. Στο ένα από τα δύο υβριδοποιημένα μόρια DNA που θα προκύψουν εμπεριέχεται γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί ένα ολιγοπεπτίδιο. Να γράψετε το mRNA που θα προκύψει (μονάδα 1) και να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 2).

Μονάδες 3

Δ3. Το πεπτίδιο που προκύπτει από τη μετάφραση του παραπάνω mRNA είναι:



Ποιο είναι το αντικωδικόνιο του tRNA που θα τοποθετηθεί στο ριβόσωμα μετά την αποσύνδεση του tRNA, το οποίο μεταφέρει το αμινοξύ λυσίνη (μονάδες 2); Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 6).

Μονάδες 8

Δ4. Στα υβριδοποιημένα μόρια 1 και 2 προστίθεται το ένζυμο DNA δεσμάση. Να γράψετε τα πιθανά ανασυνδυασμένα μόρια DNA που θα προκύψουν από τη δράση της DNA δεσμάσης, σημειώνοντας τους προσανατολισμούς των αλυσίδων (μονάδες 4) και αιτιολογώντας την απάντησή σας (μονάδες 4). Εάν στη συνέχεια προστεθεί η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, να εξηγήσετε πόσα τμήματα DNA θα προκύψουν (μονάδες 4).

Μονάδες 12

☛ Απάντηση:

Δ1.

υβριδοποιημένο μόριο 1

3. Ανεστραμμένο: 3' - TTTACTTTGGTCCTATTCTTAA - 5'

1. 5' - AAATGAAACCAGGATAAG - 3'

υβριδοποιημένο μόριο 2

2. 5' - AATTCGGGGGGC - 3'

4. Ανεστραμμένο: 3' - G C C C C C C G T T A A - 5'

Δ2. Το mRNA που θα προκύψει είναι:

5' - AA AUG AAA CCA GGA UAA GAAUU - 3'

Στην κάτω αλυσίδα του υβριδοποιημένου μορίου 1, διαβάζοντας από αριστερά προς τα δεξιά και με κατεύθυνση 5' → 3', συναντώ κωδικόνιο έναρξης κωδικού κλώνου 5' -ATG- 3' και μετά, διαβάζοντας με βήμα τριπλέτας, συνεχώς και μη επικαλυπτόμενα συναντώ το κωδικόνιο λήξης κωδικού κλώνου 5' -TAA- 3'

Η μεταγραφή γίνεται με κατεύθυνση 5' → 3', συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα προς τη μεταγραφόμενη αλυσίδα, η οποία ονομάζεται μη κωδική, δηλαδή την πάνω αλυσίδα του υβριδοποιημένου μορίου 1.

Δ3. Το αντικωδικόνιο του tRNA που θα τοποθετηθεί στο ριβόσωμα μετά την αποσύνδεση του tRNA, το οποίο μεταφέρει το αμινοξύ λυσίνη, είναι το 3' **CCU** 5', το οποίο μεταφέρει το αμινοξύ **γλυκίνη**.

Αιτιολόγηση:

- Ένα 2ο μόριο tRNA, με αντικωδικόνιο συμπληρωματικό με το 2ο κωδικόνιο του mRNA, τοποθετείται στην κατάλληλη **θέση εισδοχής** του ριβοσώματος, μεταφέροντας το αμινοξύ λυσίνη.
- Μεταξύ της μεθειονίνης και λυσίνης σχηματίζεται **πεπτιδικός δεσμός**.
 - ✓ Αμέσως μετά, το 1ο tRNA **αποσυνδέεται από το ριβόσωμα**, ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα όπου συνδέεται πάλι με **μεθειονίνη**, για επόμενη χρήση.
 - ✓ Το ριβόσωμα και το mRNA έχουν ένα tRNA, πάνω στο οποίο είναι προσδεμένα δυο αμινοξέα, τη μεθειονίνη και τη **λυσίνη**. Έτσι αρχίζει η επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.
- Στη συνέχεια το ριβόσωμα κινείται κατά μήκος του mRNA **κατά ένα κωδικόνιο**.
- Ένα 3ο tRNA προσδένεται μεταφέροντας το αμινοξύ **προλίνη**. Ανάμεσα στο 2ο (λυσίνη) και στο 3ο αμινοξύ (προλίνη) σχηματίζεται πεπτιδικός δεσμός.
 - ✓ Αμέσως μετά, το 2ο tRNA **αποσυνδέεται από το ριβόσωμα**, ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα όπου συνδέεται πάλι με **λυσίνη**, για επόμενη χρήση.
- Στη συνέχεια το ριβόσωμα κινείται κατά μήκος του mRNA **κατά ένα κωδικόνιο**. Ένα 4ο tRNA με αντικωδικόνιο $3' \text{CCU} 5'$ προσδένεται συμπληρωματικά με το 4ο κωδικόνιο $3' \text{GGA} 5'$, μεταφέροντας το αμινοξύ **γλυκίνη**.

Δ4. υβριδοποιημένο μόριο 1 υβριδοποιημένο μόριο 2
μετά από κάθετη αναστροφή

3'-TTTACTTTGGTCCTATTCTTAA-5' 3'-GCCCCCGTTAA-5'
5'-AAATGAAACCAGGATAAG-3' 5'-AATTCGGGGGGGC-3'

πιθανό ανασυνδυασμένο μόριο DNA 1

3'-TTTACTTTGGTCCTATTCTTAAGCCCCCGTTAA-5'
5'-AAATGAAACCAGGATAAGAAATTCGGGGGGGC-3'

υβριδοποιημένο μόριο 1

υβριδοποιημένο μόριο 2

μετά από οριζόντια αναστροφή

3'-TTTACTTTGGTCCTATTCTTAA-5' 3'-CGGGGGGCTTAA-5'
5'-AAATGAAACCAGGATAAG-3' 5'-AATTGCCCCCG-3'

πιθανό ανασυνδυασμένο μόριο DNA 2

3'-TTTACTTTGGTCCTATTCTTAACGGGGGGCTTAA-5'
5'-AAATGAAACCAGGATAAGAAATTGCCCCCCG-3'

Αιτιολόγηση:

Τα νουκλεοτίδια ενώνονται με ομοιοπολικό δεσμό και σχηματίζουν μία πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Ο ομοιοπολικός δεσμός ονομάζεται φωσφοδιεστερικός δεσμός 3'–5' και δημιουργείται μεταξύ του υδροξυλίου (-OH), του 3' άνθρακα της πεντόζης του πρώτου νουκλεοτιδίου και της φωσφορικής ομάδας, του 5' άνθρακα της πεντόζης του επόμενου νουκλεοτιδίου. Τη δημιουργία του φωσφοδιεστερικού δεσμού καταλύει το ένζυμο DNA δεσμάση.

Τα πιθανά ανασυνδυασμένα μόρια DNA 1 και 2 θα προκύψουν από τη δράση της DNA δεσμάσης, αφού πρώτα υβριδοποιηθούν (ενωθούν συμπληρωματικά) τα άκρα τους με δεσμούς υδρογόνου, με κάθε δυνατό συνδυασμό, αρκεί να βρίσκεται το 3' άκρο κάθε αλυσίδας δίπλα στο 5' άκρο της άλλης, για να σχηματιστεί φωσφοδιεστερικός δεσμός 3' – 5' .

Εάν στη συνέχεια προστεθεί, στο μίγμα των πιθανά ανασυνδυασμένων μορίων DNA 1 και 2, η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI θα προκύψουν συνολικά **τρία τμήματα DNA**.

πιθανό ανασυνδυασμένο μόριο DNA 1

3' -TTTACTTTGGTCCTATTCTTAAGCCCCCGTTAA-5'
5' -AAATGAAACCAGGATAAGGAATTCGGGGGGC-3'

πιθανό ανασυνδυασμένο μόριο DNA 2

3' -TTTACTTTGGTCCTATTCTTAACGGGGGGCTTAA-5'
5' -AAATGAAACCAGGATAAGGAATTCCCCCCG-3'

Η EcoRI είναι μια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται ευρέως.

→ Απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*.

→ Όποτε συναντά την αλληλουχία $\begin{matrix} 5' - \text{GAATTC} - 3' \\ 3' - \text{CTTAAG} - 5' \end{matrix}$ στο γονιδίωμα, κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A (με κατεύθυνση 5' → 3'), αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα.

Στο πιθανό ανασυνδυασμένο μόριο DNA 1 συναντά την αλληλουχία που αναγνωρίζει και κόβει μία φορά και δημιουργεί **δύο τμήματα**.

3' -TTTACTTTGGTCCTATTCTTAA-5' 3' -GCCCCCGTTAA-5'
5' -AAATGAAACCAGGATAAG-3' 5' -AATTCGGGGGGC-3'

Στο πιθανό ανασυνδυασμένο μόριο DNA 2 δεν συναντά την αλληλουχία που αναγνωρίζει και κόβει και έτσι αυτό παραμένει **ένα ενιαίο τμήμα**.

πιθανό ανασυνδυασμένο μόριο DNA 2

3' - TTTACTTTGGTCCTATTCTTAACGGGGGGCTTAA - 5'

5' - AAATGAAACCGAGGATAAGAATTGCCCCCG - 3'

Έτσι συνολικά θα προκύψουν συνολικά **τρία τμήματα DNA**.

25. Έχουμε ένα δίκλωνο γραμμικό τμήμα DNA σε πολλά αντίγραφα. Στο ένα αντίγραφο επιδρά η EcoRI, στο άλλο η Hind III και σε ένα τρίτο τόσο η EcoRI όσο και η Hind III.

Από τη δράση των περιοριστικών ενζύμων προέκυψαν τμήματα με μήκος σε ζεύγη βάσεων, που φαίνονται στον επόμενο πίνακα:

Hind III	EcoRI	Hind III και EcoRI
15.000	18.000	18.000
18.000	22.000	15.000
7.000		3.000
		4.000

- α. Σε πόσα σημεία υπάρχουν οι κατάλληλες αλληλουχίες βάσεων για κάθε ενδονουκλεάση;
- β. Να τοποθετήσετε στη σειρά (σε μια ευθεία) τις περιοχές που αναγνωρίζονται από τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες;
26. Ένα τμήμα βακτηριακού DNA αποτελείται από 1000 νουκλεοτίδια, εκ των οποίων τα 210 έχουν ως βάση τη θυμίνη. Το τμήμα αυτό σπάει σε δύο τμήματα υπό την επίδραση του ενζύμου EcoRI. Το ένα από αυτά έχει 610 νουκλεοτίδια, εκ των οποίων τα 108 έχουν ως βάση την αδενίνη. Να βρεθεί ο αριθμός:
- α. των φωσφοδιεστερικών δεσμών και
- β. των δεσμών υδρογόνου σε κάθε τμήμα του βακτηριακού DNA, που προέκυψε από τη δράση της EcoRI.

