

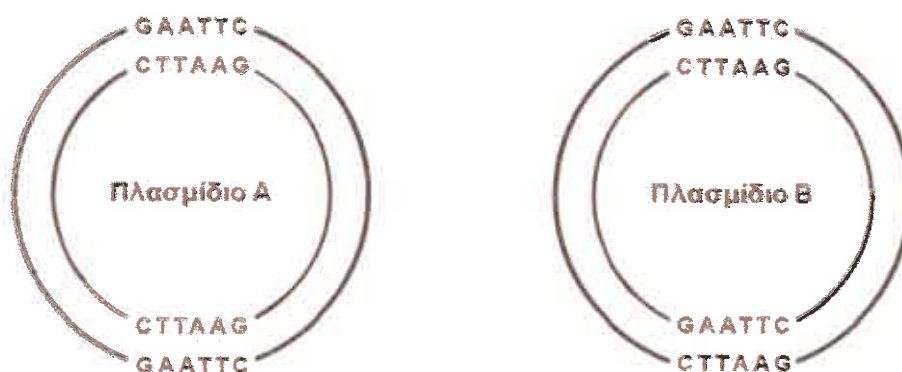
Βιολογία Προσανατολισμού Γ' Λυκείου

Ερωτήσεις για επανάληψη της θεωρίας - Κεφάλαιο 4

1. Τι ονομάζουμε ανασυνδυασμένο DNA; Τι είναι η γενετική μηχανική;
2. Να δώσετε ένα ορισμό για το φορέα κλωνοποίησης.
3. Να εξηγήσετε το ρόλο καθενός από τα ακόλουθα, κατά τη διαδικασία της δημιουργίας ανασυνδυασμένου DNA: α. οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, β. η DNA δεσμάση, γ. το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό
4. Τι ονομάζουμε κλώνο, κλωνοποίηση και μετασχηματισμό;
5. Οι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες 2 διαφορετικών σωματικών κυττάρων ενός οργανισμού είναι όμοιες ή διαφορετικές; Εξηγείστε.
6. Τι είναι η γονιδιωματική βιβλιοθήκη; Να περιγράψετε τη διαδικασία δημιουργίας της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.
7. Τι είναι ο βακτηριοφάγος λ και πώς χρησιμοποιείται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;
8. Με ποιους τρόπους ενισχύεται η ποσότητα ενός γονιδίου;
9. Τι είναι οι cDNA βιβλιοθήκες; Να περιγράψετε τη διαδικασία δημιουργίας της cDNA βιβλιοθήκης.
10. Θέλουμε να μελετήσουμε το γενετικό υλικό ενός ρετροϊού. Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη μέθοδο της PCR;
11. Τι ονομάζουμε αποδιάταξη και τι υβριδοποίηση;
12. Πώς μπορούμε να εντοπίσουμε το κομμάτι DNA που επιθυμούμε από μία γονιδιωματική ή από μία cDNA βιβλιοθήκη;
13. Τι είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης; Να αναφέρετε μερικές από τις εφαρμογές αυτής της μεθοδολογίας.
14. Ποια χαρακτηριστικά έχουν τα μόρια που χρησιμοποιούμε ως ανιχνευτές;
15. Ποια χαρακτηριστικά έχουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούμε στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;
16. Ποιες ιδιότητες έχουν τα πλασμίδια που χρησιμοποιούμε στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;
17. Ποιες κατηγορίες γονιδίων που υπάρχουν στο γονιδίωμα ενός κυτταρικού τύπου δεν κλωνοποιούνται σε cDNA βιβλιοθήκη;
18. Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη για τη δημιουργία ανθρώπινης πρωτεΐνης μέσω προκαρυωτικών οργανισμών; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.
19. Ποιες είναι οι βασικότερες διαφορές μεταξύ της γονιδιωματικής και της cDNA βιβλιοθήκης;
20. Τι είδους βιβλιοθήκη θα χρησιμοποιούσατε για να μελετήσετε ένα εσώνιο του γονιδίου της ακτίνης και τον υποκινητή του γονιδίου της αιμοσφαιρίνης;
21. Ποια είναι η διαφορά μεταξύ του κλώνου και της αποικίας;
22. Οι cDNA βιβλιοθήκες δύο διαφορετικών σωματικών κυττάρων ενός οργανισμού είναι όμοιες ή διαφορετικές; Εξηγείστε.
23. Να συγκρίνετε την κλωνοποίηση όταν φορέας είναι το πλασμίδιο με την κλωνοποίηση όταν φορέας είναι το DNA του βακτηριοφάγου λ.

Ασκήσεις για το 4^ο κεφάλαιο

1. Ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA κόβεται από μια περιοριστική ενδονουκλεάση οπότε δημιουργούνται δύο κομμάτια. Το ένα από αυτά περιέχει 280 ζεύγη νουκλεοτιδίων, από τα οποία τα 60 νουκλεοτίδια έχουν ως αζωτούχο βάση C, ενώ το δεύτερο κομμάτι περιέχει 388 3'-5' φ.δ. και 500 δΗ.
α) πόσες φορές υπάρχει στο μόριο αυτό η αλληλουχία που αναγνωρίζει η συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση (=ΠΕ);
β) πόσες A, T, C και G περιέχει το παραπάνω μόριο DNA.
Να θεωρήσετε ότι: i) κάθε φορά που κόβει η ΠΕ δημιουργούνται δίκλωνα άκρα, ii) η ΠΕ είναι η EcoRI.
2. Δίνεται το παρακάτω μόριο DNA
5' TTAGAATTCCAGATGGAGGTGTAACCGCATAGAATTCAAACCG 3'
3' AATCTTAAGGTCTACCTCCACATTGGCGTATCTTAAGTTTGGC 5'
Το μόριο αυτό κόβεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI και εισάγεται σε κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης με σκοπό να παραχθεί σε ένα βακτήριο το ολιγοπεπτίδιο που κωδικοποιεί. Να βρείτε από ποια αμινοξέα αποτελείται αυτό το ολιγοπεπτίδιο.
3. Ένα τμήμα DNA ενισχύεται με τη μέθοδο της PCR. Κάθε κύκλος της PCR διαρκεί 4 λεπτά και αντιστοιχεί σε ένα διπλασιασμό του DNA. Να βρείτε
α) πόσα αντίγραφα από το τμήμα του DNA θα υπάρχουν μετά από 48 λεπτά, εάν υποθέσουμε ότι η αντίδραση ξεκίνησε από ένα μόνο μόριο;
β) εάν το αρχικό τμήμα DNA έχει μήκος 250 ζεύγη βάσεων, πόσα νουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια αυτών των 48 λεπτών;
4. Δίνονται τα πλασμίδια Α και Β. Να γράψετε ποιο πλασμίδιο είναι κατάλληλο ως φορέας κλωνοποίησης και να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.



Εικόνα 2

5. Δίνεται τμήμα μορίου DNA ευκαρυωτικού κυττάρου που περιέχει ένα μικρό γονίδιο.

GAATTCATGTTTCCTCCCAGGTTTAAGAATTC
CTTAAGTACAAAGGAGGGTCCAAATTCTTAAG

Το μικρό αυτό γονίδιο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του παρακάτω ολιγοπεπτιδίου, το οποίο δεν έχει υποστεί καμιά τροποποίηση:

H₂N – Μεθειονίνη – φαινυλαλανίνη – βαλίνη – COOH

Να γράψετε την κωδική αλυσίδα του γονιδίου, το πρόδρομο και το ώριμο mRNA και να ορίσετε τα 3' και 5' άκρα των παραπάνω νουκλεοτιδικών αλυσίδων, αιτιολογώντας την απάντησή σας. Να αναφέρετε τις διαδικασίες κατά την πορεία από το γονίδιο στο πεπτιδίο και τις περιοχές του κυττάρου στις οποίες πραγματοποιούνται αυτές οι διαδικασίες. Πως μπορούμε να δημιουργήσουμε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, που να περιέχει το συγκεκριμένο γονίδιο, χρησιμοποιώντας την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI; Στόχος πρέπει να είναι το μετασχηματισμένο βακτήριο να παράγει το ολιγοπεπτιδίο.

Δίνονται οι παρακάτω αντιστοιχίσεις αμινοξέων και κωδικονίων από το γενετικό κώδικα: met → AUG, phe → UUU, val → GUU.

6. Στην **Εικόνα 1** δίνεται ένα πλασμίδιο που φέρει γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και στρεπτομυκίνη, έναν υποκινητή και αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής. Στις θέσεις **A**, **B**, **Γ** και **Δ** βρίσκονται αλληλουχίες, οι οποίες αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες **α**, **β**, **γ** και **δ** αντίστοιχα. Το πλασμίδιο αυτό το χρησιμοποιούμε ως φορέα για την κλωνοποίηση ενός ανθρώπινου συνεχούς γονιδίου με σκοπό να παράγουμε ένα ολιγοπεπτιδίο 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.

1. Ποια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες **α**, **β**, **γ** ή **δ** είναι η πιο κατάλληλη για τη χρήση του πλασμιδίου αυτού ως φορέα κλωνοποίησης; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

2. Με ποιον τρόπο μπορούμε να επιλέξουμε τους βακτηριακούς κλώνους που έχουν προσλάβει κάποιο πλασμίδιο, από τους κλώνους που δεν έχουν προσλάβει πλασμίδιο; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

Παρακάτω δίνεται τμήμα DNA το οποίο περιέχει το συνεχές ανθρώπινο γονίδιο που επιθυμούμε να εισάγουμε στο πλασμίδιο της **Εικόνας 1**.

αλυσίδα I OH - GCCAATATTTAAATGAGCATGCCGTAGGAATATTCGG

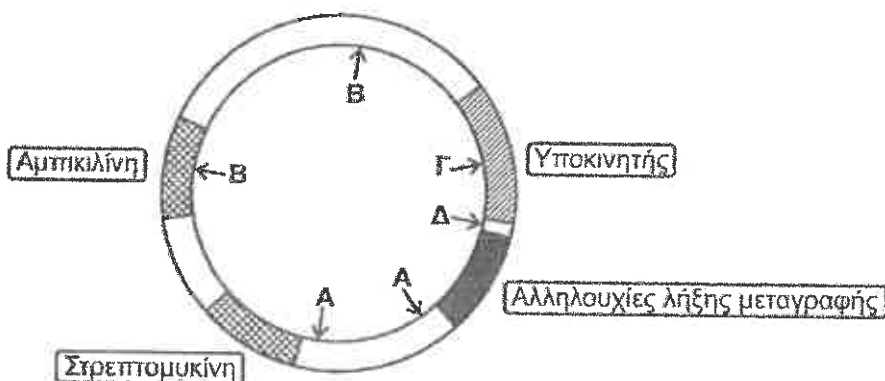
αλυσίδα II CGGTTATAATTTACTCGTACGGCATCCTTATAAGCC

3. Να εντοπίσετε την κωδική αλυσίδα του γονιδίου. Να γράψετε το mRNA και να σημειώσετε τον προσανατολισμό του. Να αιτιολογήσετε.

4. Να γράψετε την αλληλουχία μήκους 6 ζευγών βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση, την οποία προσδιορίσατε στο ερώτημα 1, για την κλωνοποίηση του γονιδίου.

5. Να εξηγήσετε γιατί η κλωνοποίηση του παραπάνω γονιδίου στο πλασμίδιο της **Εικόνας 1** μπορεί να οδηγήσει

- i) στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων που παράγουν το ολιγοπεπτιδίο, ή
- ii) στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων που δεν παράγουν το ολιγοπεπτιδίο παρόλο που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.



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

Πίνακας Α

Βακτήριο	Α	Β	Γ
ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά	αμπικιλίνη στρεπτομυκίνη	καναμυκίνη	αμπικιλίνη καναμυκίνη

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

Πίνακας Β

Πλασμίδιο	1	2	3	4
ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη	+	-	+	-
ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη	-	-	+	+
ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη	-	+	-	-

Να εξηγήσετε ποιος ή ποιοι συνδυασμοί πλασμιδίων και βακτηρίων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων.

8. Έχουμε στην διάθεσή μας την γονιδιωματική βιβλιοθήκη ενός ανθρώπου καθώς και την cDNA βιβλιοθήκη ενός πρόδρομου ερυθροκυττάρου του ανθρώπου. Σημειώστε με το σύμβολο (+) ή (-) στις στήλες II και III το θετικό ή αρνητικό σήμα υβριδοποίησης αντίστοιχα, των μορίων ανιχνευτών της στήλης I.

Στήλη I	Στήλη II	Στήλη III
Ανιχνευτής	Γονιδιωματική βιβλιοθήκη ανθρώπου	cDNA βιβλιοθήκη πρόδρομου ερυθροκυττάρου
Γονιδίου της RNA πολυμεράσης		
Γονιδίου αλυσίδων – β της HbA		
Γονιδίου σύνθεσης του αντιγόνου A		
1ου εσωνίου γονιδίου αλυσίδων – α της HbA		
Υποκινητή γονιδίου αλυσίδων – β της HbA		
Αλληλ. λήξης μεταγραφής γονιδίου αλυσίδων β της HbA		
5' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου μιας ιστόνης		
Ανθρώπινου γονιδίου του tRNA σερίνης		
Γονιδίου rRNA μικρής υπομονάδας ριβοσώματος		
Γονιδίου της βακτηριακής RNA πολυμεράσης		

Απαντήσεις για τις ασκήσεις του 4^{ου} κεφαλαίου

1. α) Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν και κόβουν το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων. Το DNA της άσκησης είναι κυκλικό και κόβεται από τη συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση σε δύο σημεία. Την πρώτη φορά που κόβεται μετατρέπεται σε γραμμικό, ενώ τη δεύτερη φορά τεμαχίζεται στα δύο τμήματα που αναφέρονται. Επομένως, η αλληλουχία που αναγνωρίζει αυτή η περιοριστική ενδονουκλεάση υπάρχει δύο φορές στο μόριο του DNA

β) Σύμφωνα με το μοντέλο της διπλής έλικας, σε κάθε δίκλωνο μόριο DNA οι αζωτούχες βάσεις της μιας αλυσίδας συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου με τις αζωτούχες βάσεις της απέναντι αλυσίδας με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, οπότε $A=T$ και $C=G$ και αντίστροφα.

ι) Στο πρώτο κομμάτι υπάρχουν 280 ζεύγη νουκλεοτιδίων, επομένως, 560 νουκλεοτίδια και άρα 560 αζωτούχες βάσεις. Αφού υπάρχουν 60 κυτοσίνες θα υπάρχουν και 60 γουανίνες, ενώ οι υπόλοιπες 440 ($=560-120$) θα είναι οι αδερίνες με τις θυμίνες. Επομένως $A=T=220$.

Τα νουκλεοτίδια κάθε πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας ενώνονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό. Ο δεσμός αυτός δημιουργείται μεταξύ του υδροξυλίου του 3' άνθρακα της πεντόζης του πρώτου νουκλεοτιδίου και της φωσφορικής ομάδας που είναι συνδεδεμένη στον 5' άνθρακα της πεντόζης του επόμενου νουκλεοτιδίου. Ο δεσμός αυτός ονομάζεται 3'-5' φωσφοδιεστερικός δεσμός. Σε μια γραμμική πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί είναι κατά ένας λιγότεροι από τον αριθμό των νουκλεοτιδίων, αφού το πρώτο και το τελευταίο νουκλεοτίδιο της αλυσίδας δεν είναι ενωμένα μεταξύ τους. Κατά συνέπεια, στο δίκλωνο τμήμα DNA, αφού αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, θα υπάρχουν δύο περισσότερα νουκλεοτίδια από τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Επομένως οι 388 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί του δεύτερου κομματιού, αντιστοιχούν σε 390 νουκλεοτίδια και σε 390 αζωτούχες βάσεις. Άρα $A+T+C+G=390$ και επειδή ισχύει η συμπληρωματικότητα των βάσεων, η εξίσωση αυτή γίνεται

$$2A+2G=390 \quad (1)$$

Σε ένα δίκλωνο μόριο DNA ανάμεσα στην αδερίνη και τη θυμίνη σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου, ενώ ανάμεσα στη γουανίνη και την κυτοσίνη τρεις. Όμως σύμφωνα με τα δεδομένα της άσκησης για το τμήμα αυτό του DNA ισχύει

$$2A+3G=500 \quad (2)$$

Από τις εξισώσεις (1) και (2) προκύπτει ότι $A=T=85$ και $C=G=110$

Ο αριθμός κάθε αζωτούχου βάσης στο αρχικό δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA είναι ίσος με το άθροισμα της βάσης αυτής και στα δύο κομμάτια DNA που δημιουργήθηκαν μετά τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Άρα

$$A=T=220+85=305 \text{ και } G=C=110+60=170$$

ii) όταν ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA κόβεται από την EcoRI δύο φορές, προκύπτουν 2 γραμμικά μόρια DNA με δύο μονόκλωνα άκρα 5' AATT 3' (εκατέρωθεν). Σε κάθε θραύσμα η συμπληρωματικότητα ανάμεσα σε A,T και C,G όπως και οι δεσμοί H υφίστανται **μόνο στο δίκλωνο τμήμα τους**.

Για το 1^ο θραύσμα ισχύει:

τα 280 ζεύγη βάσεων (560 νουκλεοτίδια) υπάρχουν **μόνο στο δίκλωνο τμήμα του**. Άρα $C=G=60$ και $A=T=220$ για το **δίκλωνο τμήμα**, στο οποίο ισχύει η συμπληρωματικότητα των βάσεων.

Συνολικά $C=G=60$ και $A=T=224$, καθώς στα μονόκλωνα άκρα υπάρχουν συνολικά 4A και 4T, ενώ C και G υπάρχουν **μόνο στο δίκλωνο τμήμα**.

Για το 2^ο θραύσμα ισχύει:

δεσμοί H υπάρχουν **μόνο στο δίκλωνο τμήμα** του θραύσματος. Χρειάζεται να υπολογίσω τα νουκλεοτίδια του **δίκλωνου** τμήματος, ώστε να προκύψει ένα σύστημα εξισώσεων με δύο αγνώστους.

Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί είναι 388, από τους οποίους οι 8 βρίσκονται στα δύο μονόκλωνα άκρα. Άρα στο δίκλωνο τμήμα υπάρχουν 380 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί. Σε αυτό το τμήμα ισχύει $\phi\delta=n-2$, καθώς είναι δίκλωνο γραμμικό και το τελευταίο νουκλεοτίδιο κάθε αλυσίδας δεν συνδέεται με φωσφοδιεστερικό δεσμό με κάποιο άλλο νουκλεοτίδιο. Άρα $n=382$, όπου n είναι τα νουκλεοτίδια του δίκλωνου τμήματος του 2^{ου} θραύσματος, για το οποίο ισχύει ο κανόνας της συμπληρωματικότητας των βάσεων.

Δηλαδή για το **δίκλωνο τμήμα** ισχύει: $2A+3G=500$ και $2A+2G=382$

Από τις εξισώσεις αυτές προκύπτει $A=T=73$ και $G=C=118$

Όμως στα μονόκλωνα άκρα υπάρχουν συνολικά 4A και 4T.

Άρα για το **2^ο θραύσμα** ισχύει: $A=T=77$ και $C=G=118$, καθώς οι G και οι C υπάρχουν **μόνο στο δίκλωνο τμήμα** του 2^{ου} θραύσματος.

Συνολικά: $A=T=224+77=301$ και $C=G=60+118=178$ στο αρχικό DNA

2. Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI όποτε συναντήσει την αλληλουχία

5'-GAATTC-3'

3'-CTTAAG-5'

κόβει κάθε αλυσίδα του δίκλωνου DNA μεταξύ του G και του A με κατεύθυνση 5'→3'. Στο μόριο DNA της άσκησης η παραπάνω αλληλουχία υπάρχει δύο φορές, οπότε μετά την επίδραση της EcoRI το τμήμα του DNA που θα κλωνοποιηθεί θα είναι το ακόλουθο

5'...AATTCCAGATGGAGGTGTAACCGCATAG... 3'

3' ...GGTCTACCTCCACATTGGCGTATCTTAA...5'

Κατά τη μεταγραφή ενός γονιδίου, το μόριο mRNA που συντίθεται είναι συμπληρωματικό προς τη μία αλυσίδα της διπλής έλικας του DNA του γονιδίου. Η αλυσίδα αυτή είναι η μεταγραφόμενη και ονομάζεται μη κωδική. Η συμπληρωματική αλυσίδα του DNA του γονιδίου ονομάζεται κωδική. Επομένως αφού η μη κωδική αλυσίδα είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη τόσο με το mRNA όσο και με την κωδική αλυσίδα του DNA, το mRNA και η κωδική αλυσίδα είναι μεταξύ τους όμοιες, με τη διαφορά ότι όπου υπάρχει ουρακίλη στο mRNA, υπάρχει θυμίνη στην κωδική αλυσίδα. Σύμφωνα με το γενετικό κώδικα, η μετάφραση όλων των mRNA αρχίζει από το κωδικόνιο έναρξης 5'AUG^{3'} και τελειώνει σε ένα από τα τρία κωδικόνια λήξης 5'UAG^{3'}, 5'UGA^{3'} ή 5'UAA^{3'}. Επιπλέον, ο γενετικός κώδικας:

- i) είναι κώδικας τριπλέτας, δηλαδή μια τριπλέτα νουκλεοτιδίων, το κωδικόνιο, κωδικοποιεί ένα αμινοξύ
- ii) είναι συνεχής, δηλαδή το mRNA διαβάζεται συνεχώς ανά τρία νουκλεοτίδια χωρίς να παραλείπεται κάποιο νουκλεοτίδιο και
- iii) είναι μη επικαλυπτόμενος, δηλαδή κάθε νουκλεοτίδιο ανήκει σε ένα μόνο κωδικόνιο.

Από το συνδυασμό των παραπάνω χαρακτηριστικών του γενετικού κώδικα συνεπάγεται ότι τα κωδικόνια έναρξης και λήξης του mRNA πρέπει να διαχωρίζονται από ακέραιο αριθμό τριάδων νουκλεοτιδίων.

Για να βρούμε την κωδική αλυσίδα του DNA ψάχνουμε και στις δύο αλυσίδες με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, το κωδικόνιο $5'ATG^3'$, που αντιστοιχεί στο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης $5'AUG^3'$ του mRNA και ένα από τα $5'TAG^3'$, $5'TGA^3'$ ή $5'TAA^3'$ που αντιστοιχούν στα τρία κωδικόνια λήξης της μετάφρασης $5'UAG^3'$, $5'UGA^3'$ ή $5'UAA^3'$. Τα δύο αυτά κωδικόνια, όπως αναφέρθηκε, πρέπει να διαχωρίζονται μεταξύ τους με ακέραιο αριθμό κωδικονίων. Η αλυσίδα η οποία εκπληρώνει τις προϋποθέσεις αυτές είναι η επάνω, η οποία περιέχει τα κωδικόνια $5'ATG^3'$ και $5'TAA^3'$ χωρισμένα από ακέραιο αριθμό κωδικονίων. Επομένως η επάνω αλυσίδα είναι η κωδική.

Από τη μεταγραφή της μη κωδικής αλυσίδας του τμήματος DNA προκύπτει το παρακάτω mRNA

$5' \dots AAU UCC AGA UGG AGG UGU AACC GCA UAGA AUU \dots 3'$

η μετάφραση του οποίου αρχίζει από το κωδικόνιο $5'AUG^3'$. Σύμφωνα με το γενετικό κώδικα, ισχύει η εξής αντιστοίχιση: $5'AUG^3' \rightarrow$ μεθειονίνη, $5'GAG^3' \rightarrow$ γλουταμινικό οξύ, $5'GUG^3' \rightarrow$ βαλίνη, $5'UAA^3' \rightarrow$ λήξη της μετάφρασης. Επομένως, το ολιγοπεπτίδιο που θα παραχθεί στο βακτήριο είναι το:

$H_2N - \text{μεθειονίνη} - \text{γλουταμινικό οξύ} - \text{βαλίνη} - COOH$

Παρατήρηση: στη συγκεκριμένη άσκηση δεν είναι απαραίτητο να δοθεί ο πίνακας με το γενετικό κώδικα, επειδή για τα κωδικόνια $5'GAG^3'$ και $5'GTG^3'$ της κωδικής αλυσίδας είναι γνωστό ότι κωδικοποιούν το γλουταμινικό οξύ και τη βαλίνη αντίστοιχα από τη θεωρία του 6^{ου} κεφαλαίου (σελ. 89-90)

3. α) Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει την επιλεκτική αντιγραφή, για εκατομμύρια φορές, ειδικών αλληλουχιών DNA, από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Αφού κάθε κύκλος της PCR διαρκεί 4 λεπτά, μετά από 48 λεπτά θα έχουν πραγματοποιηθεί $48/4=12$ κύκλοι. Επειδή ο κάθε κύκλος της PCR αντιστοιχεί σε ένα διπλασιασμό του DNA, ο πολλαπλασιασμός του τμήματος DNA ακολουθεί τη γεωμετρική πρόοδο που δίνεται από τη σχέση

$$N_t = N_o \times 2^v$$

όπου

N_t = ο αριθμός των αντιγράφων του DNA μετά από χρόνο t ,

N_o = ο αριθμός των αντιγράφων που υπήρχαν αρχικά ($N_o = 1$) και

v = ο αριθμός των κύκλων της PCR που ολοκληρώθηκαν σε χρόνο t ($v=12$)

επομένως

$$N_t = 1 \times 2^{12} = 4096 \text{ αντίγραφα}$$

β) Αφού συνολικά υπάρχουν 4096 αντίγραφα του DNA μετά από 48 λεπτά, θα υπάρχουν συνολικά $4096 \times 250 = 1024000$ ζεύγη νουκλεοτιδίων ή διαφορετικά 2048000 νουκλεοτίδια. Από αυτά τα νουκλεοτίδια, τα 500 υπήρχαν στο αρχικό μόριο DNA, οπότε χρησιμοποιήθηκαν $2048000 - 500 = 2047500$ νουκλεοτίδια.

4. Για να θεωρηθεί ένα πλασμίδιο ιδανικός φορέας κλωνοποίησης πρέπει να κόβεται μόνο μία φορά από την περιοριστική ενδονουκλεάση. Το πλασμίδιο B κόβεται δύο φορές, εάν ο προσανατολισμός της εξωτερικής αλυσίδας είναι 5'→3' δεξιόστροφα και δεν κόβεται στην αντίθετη περίπτωση.

Το πλασμίδιο A είναι ο κατάλληλος φορέας κλωνοποίησης, καθώς κόβεται μία μόνο φορά, όποιος και να είναι ο προσανατολισμός των αλυσίδων.

5. **Κωδική αλυσίδα:** 5' GAATTCATGTTTCCCCAGGTTTAAGAATTC 3'
Μη κωδική αλυσίδα: 3' CTTAAGTACAAAGGGGTCCAAATTCTTAAG 5'
Πρόδρομο mRNA: 5' GAAUUCAUGUUUCCCCAGGUUAAGAAUUC 3'
Ωριμο mRNA: 5' GAAUUCAUGUUUGUUUAAGAAUUC 3'

Διαδικασίες:

1. Η μεταγραφή που λαμβάνει χώρα στον πυρήνα, στα μιτοχόνδρια, στο χλωροπλάστη (φυτικό κύτταρο), στο κυτταρόπλασμα (προκαρυωτικό)

2. η ωρίμανση που λαμβάνει χώρα στον πυρήνα

3. η μετάφραση που λαμβάνει χώρα:

α) στα ριβοσώματα του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου

β) στα ελεύθερα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος

γ) στα ριβοσώματα του μιτοχονδρίου φυτικού ή ζωικού κυττάρου

δ) στα ριβοσώματα του χλωροπλάστη φυτικού κυττάρου

ε) στα ελεύθερα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος του προκαρυωτικού κυττάρου.

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου με σκοπό την παραγωγή ολιγοπεπτιδίου σε προκαρυωτικό κύτταρο, θα πρέπει...

1. να απαλλάξουμε το γονίδιο από το εσώνιο. Θα χρησιμοποιήσουμε ως καλούπι το παραπάνω ώριμο mRNA και με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή θα κατασκευάσουμε αλυσίδα cDNA.

2. θα αποδιατάξουμε το υβρίδιο mRNA-cDNA αυξάνοντας τη θερμοκρασία ή θα απομακρύνουμε το mRNA χρησιμοποιώντας κατάλληλες χημικές ουσίες

3. η αλυσίδα cDNA θα μετατραπεί σε δίκλωνο DNA με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση.

4. παρατηρούμε ότι το δίκλωνο DNA που προκύπτει κόβεται στα άκρα του (εκτός γονιδίου) από την EcoRI και μπορεί να ενσωματωθεί με δύο τρόπους σε πλασμίδιο-φορέα κλωνοποίησης που έχει κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση.

7. Κάθε φορά επιλέγουμε πλασμίδιο με γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά τα οποία δεν διαθέτει το βακτήριο ξενιστής στο κύριο DNA του.

Το βακτήριο A συνδυάζεται με το πλασμίδιο 2.

Το βακτήριο B συνδυάζεται με τα πλασμίδια 1, 3, 4.

Το βακτήριο Γ συνδυάζεται με τα πλασμίδια 3, 4.

Να σημειωθεί ότι το πλασμίδιο 3 είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το βακτήριο Γ μόνο με τη χρήση του αντιβιοτικού της στρεπτομυκίνης.

6.1 Το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης πρέπει να έχει τη συγκεκριμένη αλληλουχία που αναγνωρίζει και κόβει μια περιοριστική ενδονουκλεάση μόνο μια φορά. Έτσι το πλασμίδιο μετατρέπεται σε γραμμικό μόριο DNA με μονόκλωνα άκρα το οποίο ξαναγίνεται δίκλωνο με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης, όταν

αναμιγνύεται με το κομμάτι DNA του οργανισμού δότη που έχει προκύψει από τη δράση της ίδιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης επειδή αυτά έχουν συμπληρωματικά άκρα.

Επομένως, η κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση για το συγκεκριμένο πλασμίδιο είναι η δ, απορρίπτοντας την γ γιατί κόβει το DNA μέσα περιοχή του υποκινητή ενώ οι α και β κόβουν το πλασμίδιο σε δύο διαφορετικά σημεία.

2. Σχολικό βιβλίο, σελ. 59:

Συνήθως χρησιμοποιούνται ως ξενιστές, βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά. Για να μπει ένα πλασμίδιο μέσα στο βακτήριο, τα τοίχωματά του βακτηρίου γίνονται παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια, μετά από κατάλληλη κατεργασία (μετασχηματισμός).

Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων δηλαδή αυτών που δέχτηκαν κάποιο πλασμίδιο στηρίζεται στην ικανότητα ανάπτυξής τους παρουσία αντιβιοτικού, επειδή το πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο που προσδίδει στα βακτήρια ξενιστές ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας όπου έχουμε προσθέσει το αντιβιοτικό αμπικιλίνη ή στρεπτομυκίνη, αναπτύσσονται μόνο τα μετασχηματισμένα βακτήρια, δηλαδή αυτά που φέρουν το συγκεκριμένο πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη, δημιουργώντας κλώνο βακτηρίων. Όσα βακτήρια δεν μετασχηματίστηκαν είναι ευαίσθητα στην παρουσία του αντιβιοτικού και συνεπώς δεν πολλαπλασιάζονται.

3. Αλυσίδα I → κωδική

3' GCCAATATTAATGAGCATGCCGTAGGAATATTCGG 5'

κωδικόνιο
λήξης

κωδικόνιο
έναρξης

Αλυσίδα II → μη κωδική

5' CGGTTATAATTACTCGTACGGCATCCTTATAAGCC 3'

Στην αλυσίδα I, με προσανατολισμό 5' → 3' εντοπίζω το κωδικόνιο έναρξης ATG και με βήμα τριπλέτας, συνεχή και μη επικαλυπτόμενα το κωδικόνιο λήξης TAA. Άρα η αλυσίδα αυτή είναι η κωδική.

Η αλυσίδα II, η μη κωδική, είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη ως την αλυσίδα I, την κωδική του γονιδίου.

Η μεταγραφή γίνεται με προσανατολισμό 5' → 3'. Το mRNA είναι συμπληρωματικό και αντιπαράλληλο με τη μη κωδική αλυσίδα του

γονιδίου, τη μεταγραφόμενη αλυσίδα του γονιδίου. Στο mRNA που σχηματίζεται με προσανατολισμό $5' \rightarrow 3'$ εντοπίζω κωδικόνιο έναρξης και με βήμα τριπλέτας, συνεχή και μη επικαλυπτόμενα, κωδικόνιο λήξης.

Έτσι λοιπόν το mRNA που προκύπτει είναι:

mRNA: $3' \text{ GCCAAUAUUA AAAUGAGCAU GCGUAGGAUAU UCGG } 5'$

4. Η αλληλουχία μήκους έξι ζευγών βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση είναι: $3' \text{ AATATT } 5'$
 $5' \text{ TTATAA } 3'$

η οποία εντοπίζεται και στις πλευρές (άκρων) του γονιδίου.

5. Ένα γονίδιο για να εκφραστεί πρέπει να φέρει κατά σειρά την περιοχή του υποκινητή, πάνω στην οποία προσδένεται η RNA πολυμεράση για να ξεκινήσει η μεταγραφή του γονιδίου, το κωδικόνιο έναρξης, το κωδικόνιο λήξης και την αλληλουχία λήξης της μεταγραφής.

Με τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης προκύπτουν τα ίδια μονόκλωνα άκρα με αζευγάρωτες βάσεις:

$3' \text{ GCCAATATT TAAATGAGCATGCCGTAGGAATATTTCGG } 5'$

$5' \text{ CGGTTATAA TTTACTCGTACGGCATCTTATAAGCC } 3'$

- i) Οι βακτηριακοί κλώνοι παράγουν το ολιγοπεπτίδιο:

$3' \text{ GCCAATATT TAAATGAGCATGCCGTAGGAATATTTCGG } 5'$

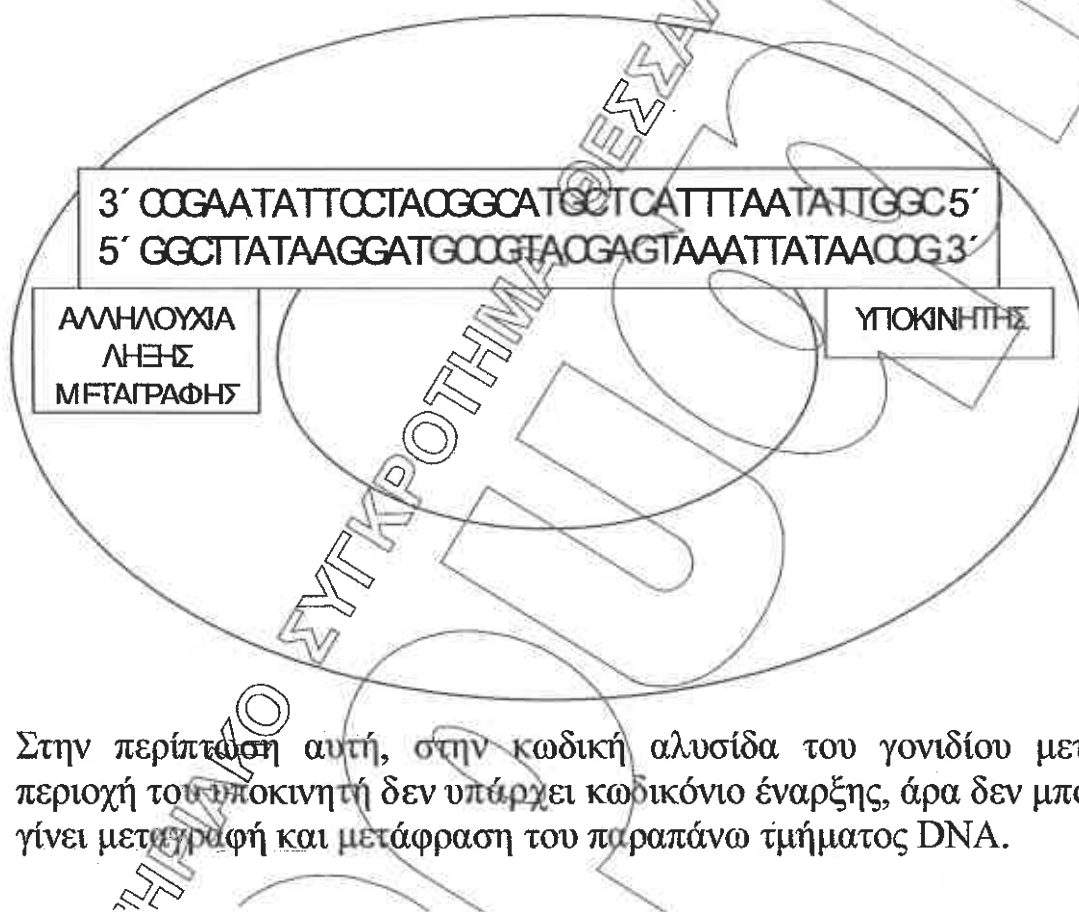
$5' \text{ CGGTTATAA TTTACTCGTACGGCATCTTATAAGCC } 3'$

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
ΛΗΞΗΣ
ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ

Στην περίπτωση αυτή, στην κωδική αλυσίδα του γονιδίου μετά την περιοχή του υποκινητή υπάρχει κωδικόνιο έναρξης και με βήμα τριπλέτας κωδικόνιο λήξης, άρα μπορεί να γίνει μεταγραφή και μετάφραση του παραπάνω τμήματος DNA.

ii) Οι βακτηριακοί κλώνοι δεν παράγουν το ολιγοπεπτίδιο:



Στην περίπτωση αυτή, στην κωδική αλυσίδα του γονιδίου μετά την περιοχή του υποκινητή δεν υπάρχει κωδικόνιο έναρξης, άρα δεν μπορεί να γίνει μεταγραφή και μετάφραση του παραπάνω τμήματος DNA.