

Βιολογία Θετικής Κατεύθυνσης Γ' Λυκείου
Ασκήσεις επανάληψης - Κεφάλαιο 4^ο και 7^ο

1. Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τέσσερις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που έχουν απομονωθεί από τα αντίστοιχα βακτήρια και ο τρόπος δράσης της κάθε μιας. Ποιες από αυτές πιστεύετε ότι είναι περισσότερο κατάλληλες για να χρησιμοποιηθούν στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και γιατί;

Ενδονουκλεάση	Προέλευση	τρόπος δράσης
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> R13	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{G-A-A-T-T-C} \\ \text{C-T-T-A-A-G} \\ \uparrow \end{array}$
HhaI	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{G-C-G-C} \\ \text{C-G-C-G} \\ \uparrow \end{array}$
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{C-C-C-G-G-G} \\ \text{G-G-G-C-C-C} \\ \uparrow \end{array}$
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{G-G-C-C} \\ \text{C-C-G-G} \\ \uparrow \end{array}$

2. Σε δοκιμαστικό σωλήνα βρίσκονται δύο είδη DNA, το Α και το Β. Αν θερμά-
 νουμε τον σωλήνα, ποιο από τα δύο μόρια πιστεύετε ότι θα αποδιαταχθεί
 πρώτο και γιατί;

A: 5' GCTAAGTAGCCGATCGGATTCGCCCCGCATGGCCGAT 3'
 3' CGATTCATCGGCTAGCCTAAGCGGGCGTACCGGCTA 5'

B: 5' GCTAAGTAATTATCGTATTCGCCAATATTATGAT 3'
 3' CGATTCATTAATAGCATAAGCGGTTATAATACTA 5'

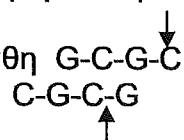
3. Με την τεχνική PCR θέλουμε να κλωνοποιήσουμε το ακόλουθο τμήμα DNA

5' GCTAAGTAGCCGATCGG....ATTCGCCCCGCATGGCCGAT 3'
 3' CGATTCATCGGCTAGCC.....TAAGCGGGCGTACCGGCTA 5'

Ποια από τα πρωταρχικά τμήματα RNA που ακολουθούν θα πρέπει να χρησι-
 μοποιήσουμε και γιατί;

- α. 3' CGAUUCAUCGGCUAGCC 5' β. 3' UAAGCGGGCGUACCGGCUA 5'
 γ. 5' GCUAAGUAGCCGAUCGG 3' δ. 5' AUUCGCCCCGCAUGGCCGAU 3'

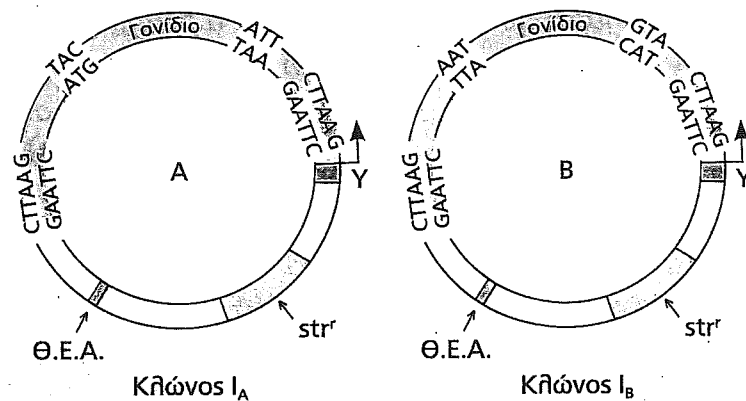
4. Το πρόδρομο mRNA για την ωαλβουμίνη της κότας περιέχει 7 εσώνια και 8 εξώνια. Τα εσώνια καταλαμβάνουν το 70% του mRNA. Αν απομονωθεί το γονίδιο της ωαλβουμίνης, υποστεί αποδιάταξη και υβριδοποιηθεί με το κυτταροπλασματικό mRNA που παράγει την ωαλβουμίνη, να εξηγηθεί:
- Ποια αλυσίδα του DNA συμμετέχει στην υβριδοποίηση;
 - Ποιο είναι το ποσοστό υβριδοποίησης σε mRNA και στην DNA αλυσίδα;
5. Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία 6 ζευγών βάσεων στο DNA. Η περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII αναγνωρίζει μια αλληλουχία 4 ζεύγη βάσεων στο DNA. Απομονώνεται το DNA ενός ευκαρυωτικού κυττάρου και δημιουργούνται δύο δείγματα ενός καθαρού παρασκευάσματος DNA σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στο κάθε δείγμα DNA επιδρούμε με διαφορετική περιοριστική ενδονουκλεάση. Ποιος δοκιμαστικός σωλήνας αναμένεται να περιέχει περισσότερα κομμάτια DNA;
6. Ένα γραμμικό μόριο DNA χωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση HhaI σε 3 κομμάτια. Το ίδιο μόριο χωρίζεται από την EcoRI σε 2 κομμάτια.
- Πόσες θέσεις αναγνωρίζει σε αυτό η HhaI και πόσες η EcoRI;
 - Σε πόσα κομμάτια θα κοπεί αυτό το DNA αν χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα και οι δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες;
- Η αλληλουχία που αναγνωρίζει η HhaI είναι η ακόλουθη



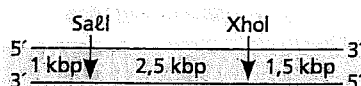
7. Ένα δίκλωνο τμήμα DNA με μέγεθος $12 \cdot 10^3$ ζβ (12 kbp) έχει αλληλουχίες αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI και TaqI. Εάν επιδράσουμε σε αυτό μόνο με την BamHI, στη συνέχεια μόνο με την TaqI και τέλος και με τις 2 ενδονουκλεάσες, παίρνουμε τα παρακάτω θραύσματα

Περιοριστική ενδονουκλεάση	Μέγεθος θραυσμάτων (kbp)
BamHI	7.5 και 4.5
TaqI	6.0, 2.4, και 3.6
BamHI και TaqI	6.0, 3.6, 1.5 και 0.9

- Με βάση τις πληροφορίες του πίνακα, να σχεδιάσετε που βρίσκονται στο αρχικό τμήμα DNA οι αλληλουχίες αναγνώρισης των δύο περιοριστικών ενδονουκλεασών (κατασκευή περιοριστικού χάρτη)
 - πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί διασπώνται από την ταυτόχρονη επίδραση των 2 ενδονουκλεασών στο αρχικό μόριο DNA; Να αιτιολογήσετε.
8. Το ένζυμο EcoRI κόβει μικρό δίκλωνο μόριο DNA σε 2 κομμάτια A και B. Το κομμάτι A αποτελείται από 212 νουκλεοτίδια 40 από τα οποία περιέχουν A. Ποιος είναι ο αριθμός των άλλων βάσεων του κομματιού A; Ποιος είναι ο αριθμός των φωσφοδιεστερικών δεσμών στο κομμάτι A; Πόσοι δεσμοί υδρογόνου συγκρατούν τις συμπληρωματικές αλυσίδες του κομματιού A; Ποιος είναι ο αριθμός του κάθε είδους βάσεων στο κομμάτι B, αν το αρχικό μόριο περιείχε 400 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και 85 A;



9. Η πρωτεΐνη ωαλβουμίνη της κότας αποτελείται από 386 αμινοξέα, ενώ το γονίδιο που την κωδικοποιεί έχει μήκος 7700 ζβ. Τα πλασμίδια A και B της εικόνας, απομονώθηκαν από δύο βακτηριακούς κλώνους, τους I_A και I_B αντίστοιχα. Να εξηγήσετε ποιος κλώνος ήταν ο καταλληλότερος για την παραγωγή της ωαλβουμίνης. Το γονίδιο της ωαλβουμίνης ενσωματώθηκε μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη χρησιμοποιώντας την EcoRI. Να περιγράψετε τη διαδικασία επιλογής των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
10. Σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο ένα γονίδιο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης 148 αμινοξέων. Εφόσον το γονίδιο αυτό κλωνοποιηθεί σε έναν βακτηριακό πληθυσμό, να εξηγήσετε εάν θα παραχθεί η πρωτεΐνη;
11. Όταν το ένζυμο EcoRI κόβει ένα γραμμικό μόριο DNA, διασπώνται 40 δεσμοί υδρογόνου. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί διασπώνται;
12. Δίκλωνο μόριο DNA περιέχει 6 φορές την αλληλουχία που αναγνωρίζει η EcoRI. Εάν αυτό το μόριο κοπεί με EcoRI, πόσα κομμάτια θα προκύψουν; Πόσα κομμάτια μπορούν να ενσωματωθούν, χωρίς κάποια προεπεξεργασία, σε πλασμίδιο και να δώσουν ανασυνδυασμένα μόρια DNA;
13. Κατά τη δημιουργία μιας cDNA βιβλιοθήκης σχηματίζονται υβριδικά μόρια mRNA-cDNA. Ένα τέτοιο μόριο, περιέχει U στο 6% των συνολικών νουκλεοτιδίων, ενώ τη G στο 20%. Ποιο το ποσοστό των νουκλεοτιδίων με T;
14. Δίνεται παρακάτω, γραμμικό μόριο DNA μήκους 5000 ζβ (5kbp) καθώς και οι θέσεις αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες Sall και XhoI. Η αλληλουχία αναγνώρισης της Sall είναι 5'GTCGAC3'/3'CAGCTG 5' και κόβει μεταξύ G και T σε κάθε αλυσίδα, ενώ η XhoI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'CTCGAG 3'/ 3'GAGCTC 5' και κόβει μεταξύ C και T σε κάθε αλυσίδα. Επιδρούμε στο τμήμα DNA ξεχωριστά με κάθε ενδονουκλεάση. Το τμήμα μήκους 3.5 kbp που προκύπτει από τη δράση της XhoI υβριδοποιείται και ενώνεται παρουσία DNA δεσμάσης με το τμήμα μήκους 1 kbp που προκύπτει από τη δράση της Sall. Στο τμήμα DNA που προκύπτει θα επιδράσουμε και με τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες ταυτόχρονα. Να γράψετε τα τμήματα DNA που προκύπτουν από τη δράση καθεμιάς ενδονουκλεάσης στο αρχικό μόριο DNA. Να γράψετε τα διαφορετικού μήκους τμήματα DNA που προκύπτουν μετά την ταυτόχρονη επίδραση και των δύο ενζύμων στο τμήμα DNA μήκους 4.5 kbp.



15. Σε πείραμα PCR επιχειρείται η κατασκευή τουλάχιστο 32 αντιγράφων ενός αρχικού κομματιού DNA. Το κομμάτι αυτό αποτελείται από 8000 νουκλεοτίδια και η αντιγραφή του διαρκεί δύο ώρες. Πόσος χρόνος απαιτείται για την παραγωγή του επιθυμητού αριθμού αντιγράφων; Πόσα νουκλεοτίδια χρειάστηκαν για την κατασκευή 32 αντιγράφων; Πόσες αλυσίδες συντέθηκαν;

16. Δίνεται το παρακάτω τμήμα DNA που περιέχει γονίδιο Z και έχει κλωνοποιηθεί με την PCR.

5'CGGAATTCCGGATCCT....ATG (=KE) γονίδιο ZCGTCGACTCCGGC 3'

3'GCCTTAAGGCCTAGGA...TAC..... γονίδιο Z ...GCAGCTGAGGCCG 5'

Επιπλέον δίνονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης για 3 ενδονουκλεάσες:

BamHI: 5' GGATCC 3' Sall: 5' GTCGAC 3' EcoRI: 5' GAATTC 3'

3' CCTAGG 5'

3' CAGCTG 5'

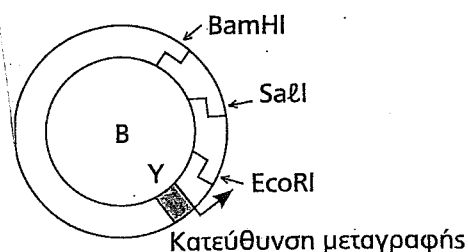
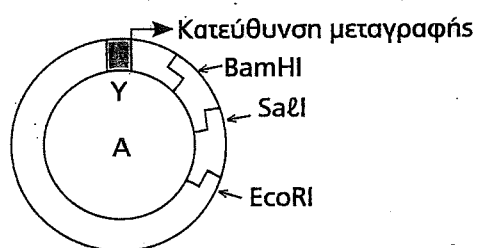
3'CTTAAG 5'

Η BamHI κόβει μεταξύ G και G σε κάθε αλυσίδα, η Sall κόβει μεταξύ G και T σε κάθε αλυσίδα ενώ η EcoRI κόβει μεταξύ G και A σε κάθε αλυσίδα. Προκειμένου να εκφραστεί το γονίδιο Z χρησιμοποιούμε το πλασμίδιο A, στο οποίο φαίνεται η θέση του υποκινητή (Y) και οι θέσεις αναγνώρισης των 3 ενζύμων. Υπάρχουν 2 διαφορετικοί τρόποι εισαγωγής του γονιδίου Z στο πλασμίδιο A.

Να αναφέρετε τα ένζυμα που θα χρησιμοποιούσατε για να κόψετε τόσο το πλασμίδιο όσο και το γονίδιο για καθένα από τους 2 παραπάνω τρόπους.

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που σχηματίζονται με τους 2 παραπάνω τρόπους μετασχηματίζουν βακτήρια ξενιστές, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται 2 διαφορετικοί βακτηριακοί κλώνοι μετασχηματισμένων βακτηρίων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στο οποίο έχει ενσωματωθεί το γονίδιο Z. Να εξηγήσετε εάν το γονίδιο θα εκφράζεται και στα δύο είδη κλώνων.

Εάν στη θέση του πλασμιδίου A είχαμε το πλασμίδιο B, να εξηγήσετε εάν ισχύουν οι 2 τρόποι ενσωμάτωσης του γονιδίου Z που αναφέρατε παραπάνω και κατά πόσο το γονίδιο Z θα εκφράζεται με αυτούς.



17. Επιδρούμε με το ένζυμο EcoRI σε ένα δίκλωνο μόριο DNA και προκύπτουν 3 θραύσματα. Πόσες αλληλουχίες αναγνώρισης για τη συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση περιείχε το μόριο του DNA; Πόσοι δεσμοί H και φωσφοδιεστερικοί δεσμοί υδρολύθηκαν;

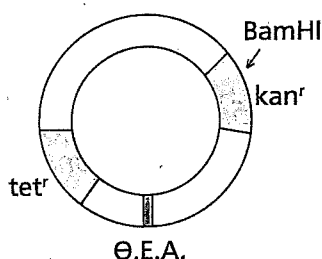
18. Με την επίδραση του ενζύμου EcoRI σε ένα γραμμικό μόριο DNA προέκυψαν 2 θραύσματα. Το ένα περιείχε 200 και το άλλο 250 νουκλεοτίδια. Εάν το πρώτο θραύσμα περιέχει 10% A, ενώ το δεύτερο περιέχει 30% A, να υπολογίσεις τον αριθμό των δεσμών H και των φωσφοδιεστερικών δεσμών σε κάθε θραύσμα.

19. Ένας ιός διαθέτει ως γενετικό υλικό RNA, τμήμα του οποίου είναι το εξής:
... UUAACGGAUGCGAGCUAGGGCUUAAGGGGGAUCAUCCAG ...

Ο ιός αυτός εισβάλλει σε ένα βακτήριο *E. coli*. Θα καταφέρει ο ιός αυτός να πολλαπλασιαστεί μέσα στο βακτήριο;

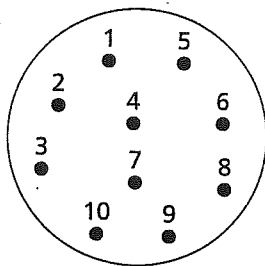
20. Στο οπερόνιο της τρυπτοφάνης (*trp*) συμμετέχουν 5 δομικά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πέντε πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Αυτές συνδυάζονται και συνθέτουν 3 ένζυμα που παίρνουν μέρος στη μεταβολική οδό βιοσύνθεσης της *trp*, όταν το αμινοξύ απουσιάζει από το θρεπτικό υλικό των βακτηρίων. Μερικά βακτήρια φέρουν μεταλλάξεις στο οπερόνιο της *trp* και δεν μπορούν να βιοσυνθέσουν *trp* όταν απουσιάζει από το περιβάλλον τους, με συνέπεια να πεθαίνουν. Μια τέτοια περίπτωση είναι τα βακτήρια που φέρουν μετάλλαξη στο πρώτο δομικό γονίδιο, *trpE*, που κωδικοποιεί το πρώτο ένζυμο αυτής της μεταβολικής οδού. Προκειμένου να μελετήσουμε το φυσιολογικό γονίδιο *trpE*, το κλωνοποιούμε κατασκευάζοντας γονιδιωματική βιβλιοθήκη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε:

- α. τα φυσιολογικά βακτήρια από τα οποία απομονώνεται το συνολικό DNA
- β. το πλασμίδιο της εικόνας, ως φορέα κλωνοποίησης
- γ. την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI, με την οποία κόβουμε το DNA του βακτηρίου και τον φορέα κλωνοποίησης
- δ. βακτήρια ξενιστές, τα παραπάνω μεταλλαγμένα βακτηριακά στελέχη που φέρουν τη μετάλλαξη στο γονίδιο *trpE* και τα οποία δεν φέρουν πλασμίδιο.

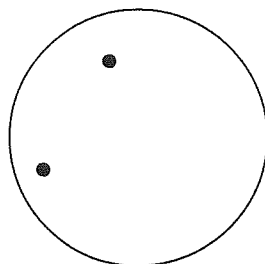


Μετά την κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και το μετασχηματισμό των βακτηρίων ξενιστών, αναπτύσσουμε το εναιώρημά τους σε στερεό θρεπτικό υλικό υπό κατάλληλες συνθήκες. Στη συνέχεια, λαμβάνουμε τρία αντίγραφα των αποικιών της αρχικής καλλιέργειας και τα αναπτύσσουμε σε 3 νέα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας Α, Β και Γ με τον ίδιο προσανατολισμό, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Ποια ή ποιες από τις αποικίες 1 έως 10:

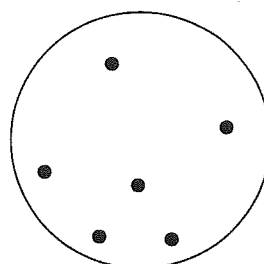
- α. περιέχουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;
- β. περιέχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;



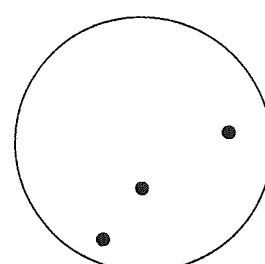
Αρχική καλλιέργεια
(παρουσία trp)



A
(έλλειψη trp)



B
(παρουσία tet + trp)



Γ
(παρουσία kan + trp)

γ. Θα επιλέγατε για την περαιτέρω μελέτη του γονιδίου trpE;
δ. αποτελούνται από βακτήρια που δεν μετασχηματίστηκαν;
Για κάθε ερώτηση, να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

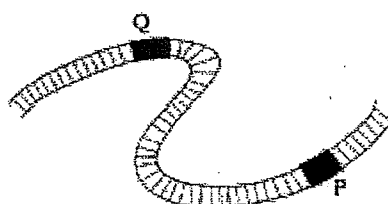
21. Ένα δίκλωνο μόριο DNA τέμνεται από την EcoRI σε 5 σημεία. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί H θα σπάσουν; Πόσα θραύσματα DNA προκύπτουν και πόσα από αυτά είναι κατάλληλα για ενσωμάτωση σε πλασμίδια που έχουν κοπεί από την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση; Σε ένα από τα θραύσματα περιέχονται 204 νουκλεοτίδια με τη βάση αδενίνη και 1300 δεσμοί υδρογόνου. Πόσα νουκλεοτίδια G υπάρχουν σε αυτό το τμήμα; Όταν ένα θραύσμα ενσωματώνεται επιτυχώς σε ένα πλασμίδιο, πόσοι δεσμοί H και πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί δημιουργούνται;

22. Μόριο DNA απομονώνεται από πυρήνα ευκαρυωτικού οργανισμού και στη συνέχεια υποβάλλεται με τη μέθοδο PCR σε 8 κύκλους αντιγραφής. Το προϊόν αναλύεται ως προς τη σύσταση των βάσεων του και προκύπτει ότι περιέχει 102400 βάσεις A και 76800 βάσεις C. Από πόσους κλώνους μορίων αποτελείται το δείγμα; Πόσοι είναι οι δεσμοί H στο αρχικό μόριο;

23. Μια περιοριστική ενδονουκλεάση έχει 65 θέσεις αναγνώρισης στο γονιδίωμα ενός βακτηρίου και 3000 θέσεις αναγνώρισης στο απλοειδές γονιδίωμα του ανθρώπου. Πόσα τμήματα DNA θα προκύψουν μετά την επίδραση του βακτηριακού γονιδιώματος με την ενδονουκλεάση; Πόσα τμήματα DNA θα προκύψουν μετά την επίδραση του απλοειδούς ανθρώπινου γονιδιώματος με την ενδονουκλεάση; (Να θεωρήσετε ότι σε κάθε μόριο DNA του ανθρώπινου γονιδιώματος υπάρχει τουλάχιστον 1 θέση αναγνώρισης, η οποία κόβεται από τη συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση)

24. Το γονιδίωμα ενός μικρού ιού παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα, στο οποίο απεικονίζονται οι θέσεις κοπής για δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες (P και Q). Χρησιμοποιώντας τα ένζυμα αυτά παρατηρήθηκαν θραύσματα DNA των οποίων το μήκος φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί. Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθούν και οι δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες ταυτόχρονα, να προσδιορίσετε τον αριθμό αλλά και το μήκος των θραυσμάτων DNA που θα προκύψουν.

Θέση κοπής	Περιοριστική ενδονουκλεάση	Μήκος παρατηρούμενου θραύσματος DNA (Kb)
Q	EcoRI	3 Kb και 7 Kb
P	BamHI	8 Kb και 2 Kb



25. Ασχολείστε με τη μελέτη ενός βακτηρίου που αναπτύσσεται σε θερμές πηγές. Προσπαθείτε να κλωνοποιήσετε ένα γονίδιο X που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών σε υψηλές θερμοκρασίες. Μετά την πέψη του γονιδιώματος με δύο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες (EcoRI και BamHI) βλέπετε στην ηλεκτροφόρηση αгарόζης τα αποτελέσματα της παρακάτω εικόνας. Να σχεδιάσετε το χάρτη DNA του γονιδιώματος του βακτηρίου σημειώνοντας 1) τις θέσεις των περιοριστικών ενδονουκλεασών, 2) τις μεταξύ τους αποστάσεις και 3) το συνολικό μέγεθος του γονιδιώματος του βακτηρίου.

BamHI	EcoRI	BamHI + EcoRI	μήκος θραυσμάτων
	—		20 kb
—			11 kb
		—	8 kb
—		—	6 kb
—		— —	3 kb

26. Τα παρακάτω δίκλινα μόρια DNA περιέχουν μικρό γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί ένα ολιγοπεπτίδιο 7 αμινοξέων. Να προσδιορίσετε εάν το γονίδιο είναι συνεχές ή ασυνεχές. Ποιο από τα μόρια μπορεί να χρησιμοποιηθεί με κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση για να μπορέσει το γονίδιο να ενσωματωθεί σε πλασμίδιο, με σκοπό την παραγωγή πρωτεΐνης σε βακτήριο;

Να εξηγηθεί ο λόγος για τον οποίο απορρίπτεται κάθε μόριο DNA.

Μόριο Α: 5' AGCTAATATGGGGCCCAAATTTAAATTTTGATCAAGCC 3'
3' TCGATTATACCCCGGGTTTAAATTTAAACTAGTTCGG 5'

Μόριο Β: 5' AAGGAATATGGGGCCCAAATTTAAATTTTGATCAAAGG 3'
3' TTCCTTATACCCCGGGTTTAAATTTAAACTAGTTTCC 5'

Μόριο Γ: 5' AATTAATATGGGGCCCAAATTTAAATTTTGATCAAATT 3'
3' TTAATTATACCCCGGGTTTAAATTTAAACTAGTTTAA 5'

Μόριο Δ: 5' TCGAAATATGGGGCCCAAATTTAAATTTTGATCATCGA 3'
3' AGCTTTATACCCCGGGTTTAAATTTAAACTAGTAGCT 5'

[illegible]

5' GGTATACC 3'

5' CGTATACG 3'

3' GTTAAC 5'

3' GAATTC 5'

και την κόβει μεταξύ κυτοσίνης και θυμίνης. Η ενδονουκλεάση E είναι η EcoRI. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες δεν επηρεάζουν τον υποκινητή.

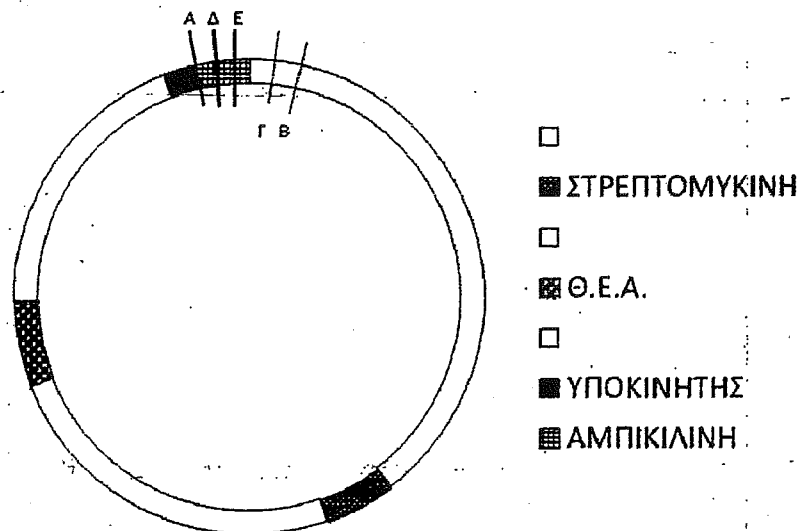
Έχετε στη διάθεσή σας 4 διαφορετικά συνεχή γονίδια, καθένα από τα οποία παράγει από ένα ολιγοπεπτίδιο. Οι αλληλουχίες των γονιδίων είναι:

Γονίδιο 1: CTTAAGGCACGATGGTAAACCCGTACCGAGCATATGC
GAATTCCTGTGCTACCATTTGGGCATGGCTCGTATACG

Γονίδιο 2: CTTAAGCCAGCATGTGGAGATTTCATAACCGCAATTG
GAATTCGGTCGTACACCTCTAAAGGTATTGGCGTTAAC

Γονίδιο 3: GAATTCCTCGCGATGATGCCCGAGGTGTGACCGCGGTATACC
CTTAAGGGCGCTACTACGGGCTCCACACTGGCGCCATATGG

Γονίδιο 4: GGTATACCGCGGACTAGGGCCATGGCGCTATCATGCTTCCTTAAG
CCATATGGCGCCTGATCCCGGTACCGCGATAGTACGAAGGAATTC



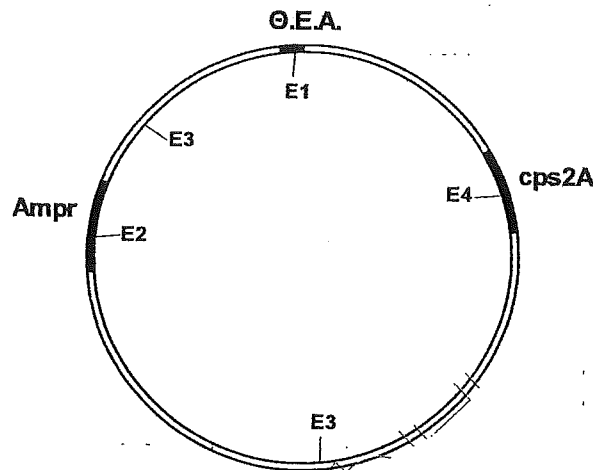
α. Να προσδιορίσετε τον προσανατολισμό των αλυσίδων στα παραπάνω γονίδια και να αιτιολογήσετε τα ολιγοπεπτίδια που παράγονται από αυτά.

β. Να εξηγήσετε ποια ή ποιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες θα χρησιμοποιήσετε ώστε να ανασυνδυάσετε τα γονίδια με το παρακάτω πλασμίδιο, με στόχο να παράγεται σε κάθε περίπτωση το αντίστοιχο ολιγοπεπτίδιο.

29. Στο παρακάτω πλασμίδιο υπάρχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Amp^r) και ένα γονίδιο *cps2A* το οποίο συμμετέχει στον έλεγχο βιοσύνθεσης κάψας στο *Diplococcus pneumoniae*. Τα σημεία E1, E2, E3 και E4 αποτελούν τα σημεία που αναγνωρίζουν και κόβουν το πλασμίδιο, αντίστοιχα, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI, EcoRI, HindIII και PstI. Στο πλασμίδιο θέλουμε να εισάγουμε συνεχές γονίδιο το οποίο φέρει υποκινητή που αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες του βακτηρίου και αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής, ώστε το γονίδιο να εκφραστεί στα μετασχηματισμένα βακτήρια. Ως βακτήρια ξενιστές θα χρησιμοποιηθούν πνευμονιόκοκκοι που τους λείπει το γονίδιο *cps2A* και είναι ευαίσθητα στην αμπικιλίνη.

α. Να αιτιολογήσετε ποια περιοριστική ενδονουκλεάση θα χρησιμοποιηθεί για τον ανασυνδυασμό. Με ποιο τρόπο θα διαχωρίσουμε τα επιθυμητά βακτήρια;

β. Κατά την αντιγραφή του πλασμιδίου, ο εξωτερικός κλώνος αντιγράφεται με ασυνεχή τρόπο, αριστερά της ΘΕΑ. Να αιτιολογήσετε τους προσανατολισμούς των αλυσίδων του πλασμιδίου.



30. Δίνεται η αλληλουχία νουκλεοτιδίων στον ένα από τους δύο κλώνους ενός συνεχούς γονιδίου.

5'...GAATTCGGAACACTATGATC ..(254 βάσεις).. ACGTAGGTAACCAGAATTCAA ...3'

α. εάν η αλυσίδα αυτή είναι η μη μεταγραφόμενη και περιέχει την πληροφορία για τη σύνθεση πρωτεΐνης, να βρεθεί ο αριθμός των αμινοξέων της. Πόσα tRNA συνδέθηκαν στη 2^η θέση σύνδεσης του ριβοσώματος κατά την επιμήκυνση; Η περιοχή των 254 νουκλεοτιδίων δεν περιέχει αδενίνες και δεν φέρει αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Δίνεται ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης (εικόνα 1), στον οποίο θέλουμε να ανασυνδυάσουμε το παραπάνω γονίδιο. Το πλασμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR), γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (tetR), υποκινητή (Y), ΘΕΑ, ΑΛΜ. Τα σημεία Α, Β, Γ αντιστοιχούν στις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών E1, E2 και E3 αντίστοιχα, οι αλληλουχίες των οποίων δίνονται παρακάτω. Η κάθετη γαμμή υποδηλώνει τη θέση στην οποία κόβουν. Στη διαδικασία συμμετέχει και η EcoRI.

E1: 5' T/AATTA 3'

E2: 5' CAATT/G 3'

E3: 5' GCCTT/C 3'

3' A TTAAT 5'

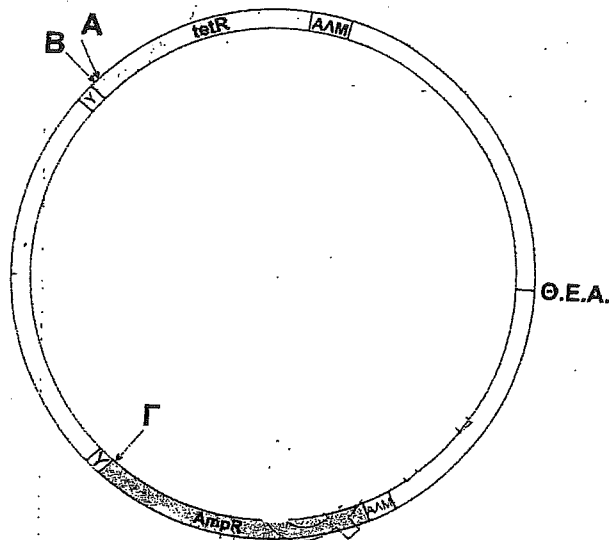
3' G/TTAAC 5'

3' C/GGAAG 5'

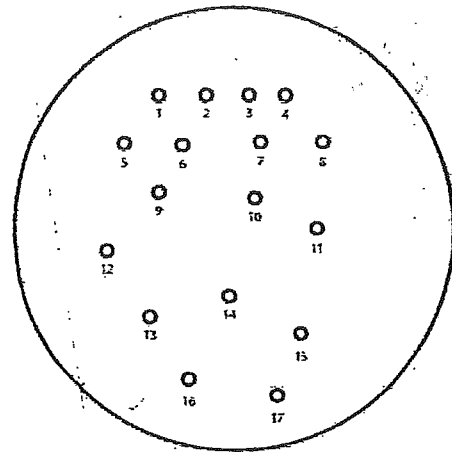
Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια *E. coli* ευαίσθητα στην τετρακυκλίνη και στην αμπικιλίνη. Μετά το μετασχηματισμό των ξενιστών και τις διαδικασίες εντοπισμού των κλώνων που μετασχηματίστηκαν, ακολούθησε ο εντοπισμός των επιθυμητών κλώνων που θα χρησιμοποιηθούν για τη βιομηχανική παραγωγή του επιθυμητού βιοτεχνολογικού προϊόντος.

β. ποια ή ποιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες θα χρησιμοποιηθούν για τον ανασυνδυασμό του φορέα κλωνοποίησης; Ποια θα είναι η μήκος έξι ζευγών βάσεων αλληλουχία που θα προκύψει εκατέρωθεν του ζητούμενου γονιδίου στο φορέα κλωνοποίησης, μετά τη δράση της DNA δεσμάσης;

γ. με ποιο τρόπο θα διαχωριστούν τα μετασχηματισμένα από τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια; Ποια περιοριστική ενδονουκλεάση θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση του επιθυμητού γονιδίου από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;



Εικόνα 1



Εικόνα 2

Δίνεται στην εικόνα 2 η στερεή καλλιέργεια των ξενιστών και στους πίνακες 1 και 2 τα αποτελέσματα 2 τεχνικών εντοπισμού της επιθυμητής αποικίας. Στον πίνακα 1 δίνονται τα αποτελέσματα από τη χρήση ειδικού για το γονίδιο ιχνηθετημένου ανιχνευτή, ενώ στον πίνακα 2 δίνονται τα αποτελέσματα από τη χρήση ειδικών για την πρωτεΐνη ιχνηθετημένων αντισωμάτων. Ποια ή ποιες αποικίες της εικόνας 2 θα απομονώσετε, ώστε να παραχθεί σε βιομηχανική κλίμακα η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το παραπάνω γονίδιο;

Πίνακας 1				Πίνακας 2			
Αποικία		Υβριδισμός		Αποικία		Υβριδισμός	
1	9	-	+	1	9	-	+
2	10	-	+	2	10	-	+
3	11	-	-	3	11	-	-
4	12	+	-	4	12	+	-
5	13	-	+	5	13	-	-
6	14	+	-	6	14	-	-
7	15	-	-	7	15	-	-
8	16	-	+	8	16	-	-
	17		-		17		-

31. Παρακάτω δίνεται τμήμα DNA, το οποίο θέλουμε να απομονώσουμε από ένα μίγμα διαφορετικών αλληλουχιών DNA.

3' ATTGTCAATCCCCCTATATATATATATAAACTGGGCTAAGGGCATCGGCTATTTA 5'

5' TAACAGTTAGGGGGATATATATATATATATTTTGACCCGATTCCCGTAGCCGATAAAT 3'

Επίσης, δίνεται και η αλληλουχία 4 πιθανών ανιχνευτών για τη συγκεκριμένη αλληλουχία.

Ανιχνευτής 1: 5' TAACAGTTAGGGGGAT 3'

Ανιχνευτής 2: 5' ATTGTCAATCCCCCTATA 3'

Ανιχνευτής 3: 5' ATAGTCTATCCCACTATTT 3'

Ανιχνευτής 4: 5' TATATATAATGACGAAACCC 3'

Ποιο ή ποια από τα μόρια ανιχνευτών είναι κατάλληλο/α για την υβριδοποίηση της παραπάνω αλληλουχίας; Εάν θέλετε να πολλαπλασιάσετε επιλεκτικά το παραπάνω μόριο DNA, ποιο από τα μόρια ανιχνευτών θα χρησιμοποιούσατε και με ποιο τρόπο (μέθοδο);

32. Παρακάτω δίνεται τμήμα της μεταγραφόμενης αλυσίδας του γονιδίου που κωδικοποιεί το rRNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας ριβοσωμάτων, τα οποία συμμετέχουν στη μετάφραση πεπτιδίων σε ηπατικά κύτταρα ανθρώπου

3' ...AACGATAGTTAATGCAAATTAGGATGCT ... 5'

Το επισημασμένο τμήμα αντιστοιχεί στην αλληλουχία του rRNA που θα συνδεθεί με την 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA το οποίο κωδικοποιεί λειτουργικό ολιγοπεπτίδιο που παράγεται σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα.

Δίνεται η αλληλουχία λειτουργικού πεπτιδίου το οποίο παράγεται σε ηπατικά κύτταρα ανθρώπου. Από το πεπτίδιο έχουν αποκοπεί 3 αμινοξέα από το αμινικό άκρο του.

HOOC – met – met – trp – met – trp – NH₂

Δίνεται, επίσης, η αλληλουχία του εσωνίου το οποίο υπάρχει στο πρόδρομο mRNA που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του παραπάνω ολιγοπεπτιδίου. Η αλληλουχία του εσωνίου εντοπίζεται 2 φορές στο mRNA, αμέσως μετά το 3^ο κωδικόνιο και άλλη μια φορά 5 νουκλεοτίδια μετά το τέλος της 1^{ης} αλληλουχίας GUUAAGCA – OH, ενώ η αλληλουχία της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA είναι 3' CUUAAUAAUA.

α. Συμβολίζοντας με X1 έως X6 τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν το 2^ο και το 3^ο αμινοξύ του ολιγοπεπτιδίου κατά τη σύνθεσή του, να προσδιορίσετε την αλληλουχία του πρόδρομου mRNA που κωδικοποιεί το πεπτίδιο.

Η αλληλουχία του υποκινητή του συγκεκριμένου γονιδίου (στην κωδική αλυσίδα) είναι 5' TATATTTAAATAT και βρίσκεται ακριβώς πριν την 5' αμετάφραστη περιοχή. Σε μίγμα νουκλεϊκών οξέων μεταξύ άλλων περιέχονται:

- αντίγραφο του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ολιγοπεπτιδίου και προέρχεται από cDNA βιβλιοθήκη (μόριο 1)

- αντίγραφο του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ολιγοπεπτιδίου μαζί με την αλληλουχία του υποκινητή του και προέρχεται από γονιδιωματική βιβλιοθήκη (μόριο 2)
- αντίγραφο του γονιδίου που κωδικοποιεί το rRNA (μόριο 3)

β. να γράψετε την αλληλουχία των μορίων 1,2 και 3

γ. να γράψετε και να αιτιολογήσετε την αλληλουχία κατάλληλων συνθετικών ολιγοριβονουκλεοτιδίων μήκους 6 και 5 νουκλεοτιδίων αντίστοιχα, έτσι ώστε να πολλαπλασιάσετε επιλεκτικά τις κωδικές αλυσίδες των μορίων 1 και 2

δ. να γράψετε και να αιτιολογήσετε την αλληλουχία δύο διαφορετικών κατάλληλων συνθετικών ολιγοριβονουκλεοτιδίων μήκους 6 νουκλεοτιδίων για να απομονώσετε μέσω υβριδοποίησης τις δύο αλυσίδες του μορίου 3.

33. Επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε το γονίδιο A, χρησιμοποιώντας ως φορέα κλωνοποίησης το παρακάτω πλασμίδιο. Διαθέτουμε 3 διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες τις I, II και την EcoRI.

Γονίδιο A

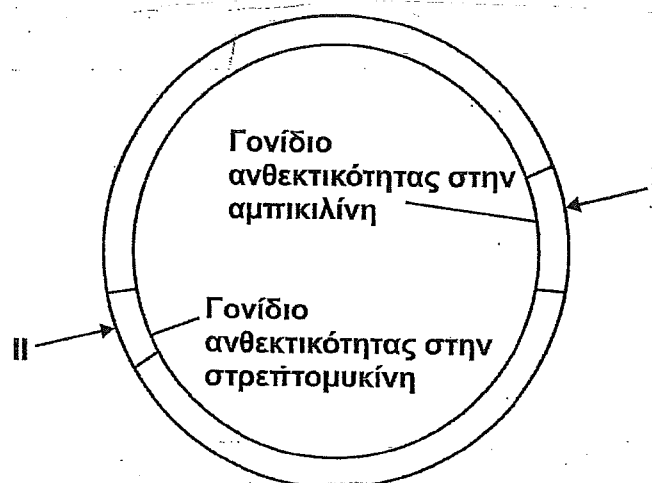
αλυσίδα 1: GAATTCGGGAACATGCCCGGGTCAGCCTGAGAGAATTCCC
αλυσίδα 2: CTTAAGCCCTTGTACGGGCCCCAGTCGGACTCTCTTAAGGG

Το πλασμίδιο φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην στρεπτομυκίνη και δύο θέσεις αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PE I και PE II. Η PE I διαθέτει θέση αναγνώρισης μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας της αμπικιλίνης, ενώ η PE II διαθέτει θέση αναγνώρισης μέσα στο γονίδιο της στρεπτομυκίνης. Δίνονται οι αλληλουχίες έξι ζευγών βάσεων που αναγνωρίζουν και επιδρούν οι PE I και PE II.

↓
PE I: 5'CAATTG 3'
3'GTTAAC5'

↓
PE II: 5'GGATCC 3'
3'CCTAGG 5'

↑
Τα βέλη υποδεικνύουν τη θέση που δρα η κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση στην αλληλουχία αναγνώρισης.



α. να γράψετε ποια ή ποιες ΠΕ θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.

β. ποια/ποιες είναι η/οι αλληλουχίες των έξι ζευγών βάσεων που εμφανίζεται/εμφανίζονται εκατέρωθεν του τμήματος του γονιδίου, στην περιοχή σύνδεσης των μονόκλωνων άκρων μετά την ενσωμάτωσή του στο πλασμίδιο μετά τη δράση της DNA δεσμάσης; Ποιο θα είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης της ΠΕ I στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

34. Το γονίδιο T κωδικοποιεί μια τοξίνη και κλωνοποιήθηκε σε γονιδιωματική βιβλιοθήκη. Το παρακάτω ανασυνδυασμένο πλασμίδιο A περιέχει το γονίδιο T και βρίσκεται στα μετασχηματισμένα βακτήρια του αντίστοιχου βακτηριακού κλώνου της βιβλιοθήκης. Το γονίδιο T έχει ενσωματωθεί στο γονίδιο *lacZ*, αλλά δεν εκφράζεται. Προκειμένου το γονίδιο T να εκφραστεί, μεταφέρεται από το πλασμίδιο A στο πλασμίδιο B που έχει μέγεθος 8900 ζβ (bp).

Δίνονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης για την BglII και την BamHI:

BglII: 5'AGATCT 3'

BamHI: 5'GGATCC 3'

3'TCTAGA 5'

3'CCTAGG 5'

Η BglII κόβει μεταξύ A και G σε κάθε αλυσίδα, ενώ η BamHI κόβει μεταξύ G και G σε κάθε αλυσίδα. Να εξηγήσετε ποια ένζυμα θα χρησιμοποιήσετε για να κόψετε τα πλασμίδια A και B προκειμένου να μεταφέρετε το γονίδιο T από το πλασμίδιο A και να το ενσωματώσετε στο πλασμίδιο B.

Κατά την παραπάνω μεταφορά προκύπτουν 3 κατηγορίες πλασμιδίων B:

α. πλασμίδια B1 που δεν προσέλαβαν το γονίδιο T

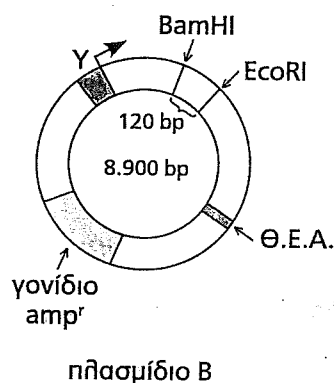
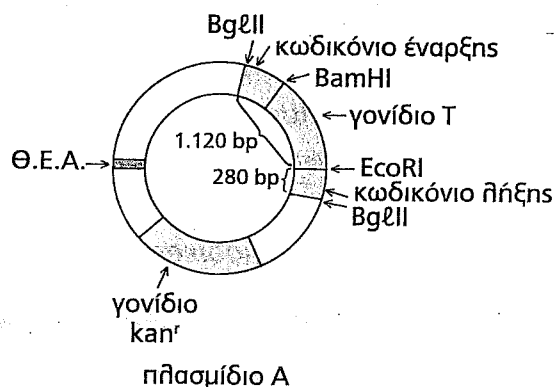
β. πλασμίδια B2 που προσέλαβαν το γονίδιο T με λάθος προσανατολισμό

γ. πλασμίδια B3 που προσέλαβαν το γονίδιο T με κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να εκφράζεται.

Να σχεδιάσετε τις 3 κατηγορίες πλασμιδίων, λαμβάνοντας υπόψη τις αποστάσεις σε ζεύγη βάσεων ανάμεσα στις θέσεις αναγνώρισης για τις ΠΕ καθώς και το μέγεθος του γονιδίου T. Ποιο θα είναι το μέγεθος του κάθε πλασμιδίου σε ζεύγη βάσεων;

Εάν στα πλασμίδια B1, B2 και B3 επιδράσουμε με την EcoRI, να γράψετε τα τμήματα DNA που θα προκύψουν με βάση το μέγεθός τους σε ζεύγη βάσεων.

Εάν τα πλασμίδια B1, B2 και B3 χρησιμοποιηθούν για το μετασχηματισμό βακτηρίων ξενιστών, πόσα είδη βακτηρίων θα προκύψουν; Να εξηγήσετε με ποιο τρόπο θα γίνει η επιλογή του κλώνου μέσα στον οποίο θα εκφράζεται το γονίδιο T.

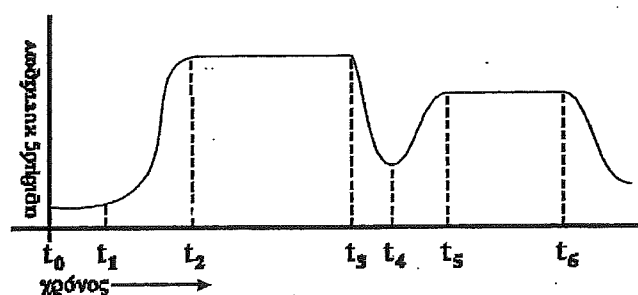


35. Η παρακάτω καμπύλη αποδίδει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών του είδους *Escherichia coli* σε κάποια κλειστή καλλιέργεια.

α. πώς ονομάζεται η φάση από τη χρονική στιγμή t_0 έως τη χρονική στιγμή t_1 , και τι συμβαίνει με τον πληθυσμό των μικροοργανισμών;

β. που οφείλεται η αύξηση του αριθμού των μικροοργανισμών που παρατηρείται στο χρονικό διάστημα t_1 έως t_2 και πώς ονομάζεται η φάση αυτή;

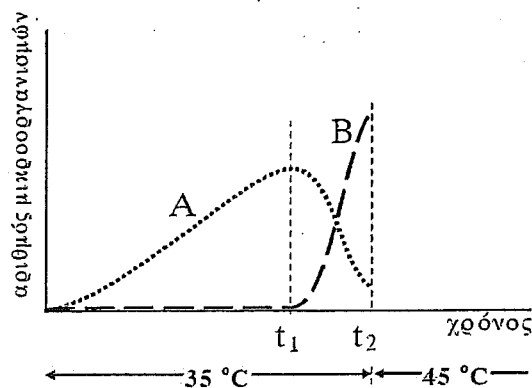
γ. τη χρονική στιγμή t_3 και ενώ η σταθερή φάση είναι σχεδόν στο μέσο της, από βλάβη στο βιοαντιδραστήρα η θερμοκρασία ανεβαίνει απότομα στους 80°C . Η βλάβη αποκαθίσταται ταχύτατα. Να ερμηνεύσετε τις μεταβολές του πληθυσμού των μικροοργανισμών από τη χρονική στιγμή t_3 και μετά, όπως αυτές περιγράφονται από την καμπύλη ανάπτυξης.



36. Σε αποστειρωμένο θάλαμο καλλιέργειών που η θερμοκρασία έχει ρυθμιστεί στους 35°C έχουν τοποθετηθεί δύο φιάλες με καλλιέργειες μικροοργανισμών. Στη μία φιάλη καλλιεργείται ο μικροοργανισμός A και στην άλλη ο μικροοργανισμός B. Από τις φιάλες έχει απομακρυνθεί ο αέρας. Ο μικροοργανισμός A έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 35°C , ενώ ο μικροοργανισμός B τους 45°C . Τη χρονική στιγμή t_1 , για κάποιο λόγο, απομακρύνονται τα πώματα από τις φιάλες των καλλιέργειών και οι μικροοργανισμοί έρχονται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα.

α. με βάση το παρακάτω διάγραμμα, ποια είναι η αλλαγή που παρατηρείται στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών A και B; Να εξηγήσετε γιατί συμβαίνει η αλλαγή αυτή στον καθένα από τους δύο πληθυσμούς.

β. στη χρονική στιγμή t_2 η θερμοκρασία του θαλάμου καλλιέργειας αλλάζει στους 45°C . Ποια θα είναι η επίδραση της αλλαγής αυτής στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών A και B;



37. Το διάγραμμα που ακολουθεί (καμπύλες 1, 2, 3 και 4) αναφέρεται στην ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium* σε κλειστή καλλιέργεια και απεικονίζει τη μεταβολή της βιομάζας του, της παραγόμενης πενικιλίνης, της πηγής αζώτου και της πηγής άνθρακα.

Να αντιστοιχίσετε τις καμπύλες 1, 2, 3 και 4 με τη βιομάζα, την πενικιλίνη, την πηγή αζώτου και την πηγή άνθρακα αιτιολογώντας την απάντησή σας.

Ποια συστατικά μπορεί να αποτελούν πηγή αζώτου και πηγή άνθρακα για τον παραπάνω μύκητα;

