

ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΟ 2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1

Έστω ότι προσπαθούμε να αποδιατάξουμε, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δύο μόρια DNA. Στο πρώτο μόριο (α), η σύσταση σε G-C είναι 23%, ενώ στο δεύτερο (β) η σύσταση σε A-T 54%. Ποιο από τα δύο περιμένετε ότι θα αποδιαταχθεί πρώτο; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

2

Στο πρόδρομο mRNA της τυροσινάσης, ενζύμου 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);

3

Σ' ένα πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης, υπάρχουν δύο γονίδια: ένα A που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και ένα B που επιφέρει το θάνατο στα βακτήρια. Τα ένζυμο EcoRI που χρησιμοποιείται για τον συνδυασμό του πλασμιδίου κόβει μέσα στο γονίδιο B. Με το ίδιο ένζυμο κόβουμε από το ανθρώπινο γονιδίωμα το γονίδιο της ινσουλίνης και το συνδέουμε με το πλασμίδιο. Στη συνέχεια ακολουθεί ο μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli*. Εξηγήστε πώς θα διαχωρίσετε τα μετασχηματισμένα βακτήρια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από τα μη μετασχηματισμένα και από αυτά που έχουν προσλάβει μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο; Θα παραχθεί η ινσουλίνη σε βακτηριακή καλλιέργεια στη συνέχεια. Να εξηγήσετε;

4

Σε ένα γραμμικό μόριο DNA που έχει 2500 ζεύγη νουκλεοτιδίων επιδρούμε με την ECORI και προκύπτουν δύο κομμάτια, το πρώτο (A) έχει 1800 νουκλεοτίδια από τα οποία το 18% είναι νουκλεοτίδια με κυτοσίνη. Αν ο συνολικός αριθμός των νουκλεοτιδίων με αδερίνη είναι 800, να βρεθούν:

- α. η αριθμητική σύσταση των νουκλεοτιδίων και οι δεσμοί υδρογόνου στο κομμάτι (A).
- β. η αριθμητική σύσταση των νουκλεοτιδίων στο άλλο κομμάτι.
- γ. μπορεί το κομμάτι (A) να κλωνοποιηθεί;

5

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' GCCGAAUUCAUUA 3'

Ο ιός μολύνει ένα βακτήριο E.coli. Ο ιός, 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 προτείνετε έναν πιθανό μηχανισμό με τον οποίο το βακτήριο θα μπορούσε να σταματήσει τον πολλαπλασιασμό του ιού, αφού αυτός σχηματίσει το DNA του.

Να γράψετε την ακολουθία νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA του ιού.

6

Ένα ινίδιο χρωματίνης του ανθρώπου στην αρχή της μεσόφασης, έχει $5 \cdot 10^4$ ζεύγη βάσεων.

Σε αυτό υπάρχει το παρακάτω γονίδιο:

5' ...ΤΤΑΑΤΓΑΑΤΤCCCGACATAACCC...3'

3' ...ΑΑΤΤΑΚΤΤΑΑΓΓΓΚΤΓΤΑΤΤΓΓΓ...5'

α. Πόσοι Φ.Δ. θα υπάρχουν στο χρωμόσωμα στο στάδιο της μετάφασης;

β. Αν η EcoRI κόβει το ινίδιο χρωματίνης μόνο στη θέση που φαίνεται στο παραπάνω γονίδιο πόσοι Φ.Δ. θα υπάρχουν συνολικά στα τμήματα που θα προκύψουν αν κόψουμε με την EcoRI;

γ. Πόσοι πεπτιδικοί δεσμοί θα υπάρχουν στο ολιγοπεπτίδιο που κωδικοποιείται;

δ. Θα χρησιμοποιούσατε την EcoRI για να απομονώσετε και να κλωνοποιήσετε το γονίδιο;

7

α) Να εξηγήσετε γιατί η EcoRI του βακτηρίου E.coli δεν αναγνωρίζει και δεν κόβει την παρακάτω ακολουθία νουκλεοτιδίων.

3' -- CACGAATTCAGA -- 5'

5' -- GTGCTTAAGTCT -- 3'

β) Γιατί δεν υπάρχει περιοριστική ενδονουκλεάση που να κόβει την παρακάτω ακολουθία νουκλεοτιδίων;

-- CAAUCAGGUA --

-- GUUAGUCCAU --

γ) Γιατί δεν υπάρχει περιοριστική ενδονουκλεάση που να κόβει την παρακάτω ακολουθία νουκλεοτιδίων;

-- GATTCAGACTA --

8

Δίνεται το παρακάτω τμήμα μορίου DNA, το οποίο απομονώθηκε από προκαρυωτικό κύτταρο.

5' CCGGAATTCATAAATGCCGGTGTACTAAGAATTCGG 3'

3' GGCCTTAAGTATTTACGGCCACATGATTCTTAAGGCC 5'

Το παραπάνω μόριο DNA τέμνεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, προκειμένου να ενσωματωθεί σε κατάλληλο πλασμίδιο που έχει κοπεί με το ίδιο ένζυμο, με σκοπό να εισαχθεί στο βακτήριο E.coli για την παραγωγή ενός ολιγοπεπτιδίου σε μεγάλες ποσότητες.

Πόσοι δεσμοί υδρογόνου και πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί δημιουργούνται κατά την ένωση του τμήματος DNA με το πλασμίδιο;

Να βρείτε τη σειρά των αμινοξέων στο παραγόμενο ολιγοπεπτίδιο .
Δίνεται ο γενετικός κώδικας.

9

Τμήμα DNA περιέχει ένα γονίδιο με την ακόλουθη αλληλουχία βάσεων:

AAGGATCCATGAAGCTTCA ...302 βάσεις ... TAAAGCTTATATAGGATCC

TTCTAGGTACTTCGAAGT ...302 βάσεις ... ATTCGAATATATCCTAGG

Στην περιοχή αυτή υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες
HindIII

AAGCTT

TTCGAA

που κόβει μεταξύ των δύο A και HambIII

GGATCC

CCTAGG

που κόβει μεταξύ των δύο G.

Να βρείτε:

- πόσα νουκλεοτίδια έχει το mRNA που μεταφράζεται και να σημειώσετε τη φορά της μεταγραφής και τα 3' και 5' άκρα στο τμήμα DNA που δίνεται
- πόσα αμινοξέα έχει η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται
- ποιο ένζυμο πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να κλωνοποιήσουμε το γονίδιο
- ποια αλληλουχία πρέπει να περιέχει ο φορέας κλωνοποίησης.

10

Θέλετε να απομονώσετε ένα γονίδιο που εκφράζεται στο ήπαρ. Έχετε στη διάθεσή σας μια γονιδιωματική και μια βιβλιοθήκη ήπατος (cDNA).

α. ποια από τις δύο θα προτιμούσατε και γιατί;

β. από τη βιβλιοθήκη που επιλέξατε θέλετε να εντοπίσετε ένα κλώνο που θα περιέχει ένα γονίδιο. Στη διάθεσή σας έχετε τρία κομμάτια DNA:

- το 1ο περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου,
- το 2ο ένα εσώνιο του γονιδίου και
- το 3ο τη 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου.

Ποιο από τα παραπάνω κομμάτια μπορείτε να χρησιμοποιήσετε σαν ανιχνευτή;

γ. να γράψετε τα βήματα που θα ακολουθήσετε για την απομόνωση του επιθυμητού γονιδίου χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή που επιλέξατε.

Πόσες φορές θα κάνετε αποδιάταξη κατά τη διαδικασία αυτή;

11

Δίνεται η παρακάτω αλληλουχία ευκαρυωτικού DNA που περιέχει γονίδιο και κωδικοποιεί ένα ολιγοπεπτίδιο:

5' ATTCGACTATAGCCTATGCACCGGTACGAACATGATCCATTTCTCGAACCGG3'

3' TAAGCTGATATCGGATACGTGGCCATGCTTGTACTAGGTAAAGAGCTTGGCC5'

περιέχει υποκινητή με αλληλουχία

5' TATA 3'

3' ATAT 5'

και αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής με αλληλουχία

5' ΑΤΤΤ 3'

3' ΤΑΑΑ 5'

α. Ποια αλυσίδα είναι η μη κωδική; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

β. Να γράψετε την αλληλουχία του mRNA που προκύπτει.

γ. Τα αντικωδικόνια με τη σειρά που έλαβαν μέρος κατά τη σύνθεση του ολιγοπεπτιδίου είναι: UAC, GUG, GCC, UGU. Με δεδομένο ότι μεσολαβεί στάδιο ωρίμανσης να γραφεί η αλληλουχία βάσεων του mRNA που αποτελεί το εσώνιο, τις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές.

δ. Έχετε στη διάθεσή σας δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες: την MspI που αναγνωρίζει την αλληλουχία

5' CCGG 3'

3' GGCC 5'

και κόβει μεταξύ των 2 C και την TaqI που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' TCGA 3'

3' AGCT 5'

και κόβει μεταξύ των βάσεων T και C. Ποια περιοριστική ενδονουκλεάση είναι καταλληλότερη για την κλωνοποίηση του παραπάνω γονιδίου; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

ε. Ποιο θα είναι το αποτέλεσμα στην έκφραση αυτού του γονιδίου αν η 21η βάση της κωδικής αλυσίδας αντικατασταθεί με G (ή T) και μετά την 8η βάση της κωδικής αλυσίδας γίνει προσθήκη C.

12

Με την επίδραση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης HindIII ένα μόριο DNA από πυρήνα ευκαρυωτικού κυττάρου κόπηκε σε 9 κομμάτια. (η HindIII αναγνωρίζει την αλληλουχία

AAGCTT-

TTCGAA-

και διασπά 3'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των δυο νουκλεοτιδίων της

A) σε πόσα σημεία έκοψε η HindIII το DNA αυτό;

B) πόσους 3'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς έσπασε η περιοριστική ενδονουκλεάση;

Γ) πόσοι διαφορετικοί φορείς χρειάζονται για την κλωνοποίηση αυτού του μορίου DNA;

Δ) πόσους 3'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς θα σχηματίσει η DNA δεσμάση στους φορείς κλωνοποίησης;

13

Η περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI κόβει μεταξύ των 2 G, όταν συναντά την αλληλουχία:

5' GGATCC 3'

3' CCTAGG 5'

Ένα πλασμίδιο με μοριακό βάρος 100.000 και 120.000 δεσμούς υδρογόνου υποβάλλεται σε κατεργασία με την BamHI. Η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση επιδρά σε ένα μόριο DNA με αποτέλεσμα να το κόψει σε 3 τμήματα. Το τμήμα που αξιοποιείται για τη σύνθεση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου έχει μοριακό βάρος 10.000 και περιέχει 14.000 δεσμούς υδρογόνου μετά την επεξεργασία μετά την επεξεργασία του με την περιοριστική ενδονουκλεάση. Στη συνέχεια τα δύο τμήματα DNA αναμειγνύονται και σχηματίζεται το

ανασυνδυσμένο πλασμίδιο.

Να υπολογιστεί το μοριακό βάρος και ο συνολικός αριθμός των δεσμών υδρογόνου στο ανασυνδυσμένο πλασμίδιο. Δίνεται $M.B.νερού=18$

14

Η παρακάτω αλληλουχία βάσεων κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο.

5'-GAATTCATCATGCGCGAATTCTATTAAAGCAGAATTC-3'

- Να βρείτε τον αριθμό των αμινοξέων που αποτελούν το πεπτίδιο το οποίο κωδικοποιείται από το παραπάνω τμήμα DNA.
- Αν το τμήμα αυτό του DNA κοπεί με EcoRI και κλωνοποιηθεί σ' ένα βακτήριο, πιστεύετε ότι θα εκφραστεί;

15

Δίνεται το ακόλουθο τμήμα DNA που περιέχει την πληροφορία για την σύνθεση ενός ολιγοπεπτιδίου: AAAGAATTCATGAATAACAAGATAATTTAAGAATTCCTTT

- Ποιο είναι το ολιγοπεπτίδιο που παράγεται;
- Ποιος είναι ο αριθμός των φωσφοδιεστερικών δεσμών στο δίκλωνο αρχικό DNA και ποιος στο mRNA που παράγεται;
- Ποιος είναι ο αριθμός των φωσφοδιεστερικών δεσμών που θα διασπάσει η EcoRI;

16

Σε ένα πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης υπάρχουν δύο γονίδια: το A που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και το B που επιφέρει τον θάνατο στα βακτήρια. Το ένζυμο EcoRI που χρησιμοποιείται για τον ανασυνδυασμό του πλασμίδιου κόβει μέσα στο γονίδιο B. Με το ίδιο ένζυμο κόβουμε από το ανθρώπινο γονιδίωμα το γονίδιο της ινσουλίνης και το συνδέουμε με το πλασμίδιο. Στην συνέχεια ακολουθεί ο μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli.

- Να εξηγήσετε πως θα διαχωρίσετε τα μετασχηματισμένα βακτήρια με το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο από τα μη μετασχηματισμένα και από αυτά που έχουν προσλάβει μη ανασυνδυσμένο πλασμίδιο.
- Θα παραχθεί η ινσουλίνη σε βακτηριακή καλλιέργεια στην συνέχεια; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

17

Δίνεται η παρακάτω πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα DNA η οποία περιέχει την γενετική πληροφορία για τη σύνθεση ενός ολιγοπεπτιδίου A που ανιχνεύεται στα φύλλα της ελιάς:

5' AAAGAATTCATGAATAACAAGATAATTTAAGAATTCCTTT 3'

- Βρείτε τη συμπληρωματική της.
- Θέλετε να κλωνοποιήσετε το αντίστοιχο δίκλωνο DNA σε ένα βακτήριο ξενιστή και σας διατίθεται περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Τι άλλα υλικά θα απαιτούσατε ώστε να επιτύχετε κάτι τέτοιο; (απλή αναφορά)
- Δεδομένου ότι διαθέτετε ως αντιβιοτικά μόνο καναμυκίνη και αμπικιλίνη, με ποιά κριτήρια θα επιλέγατε τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης;

δ)Σας διατίθενται 3 cDNA βιβλιοθήκες : από κύτταρα φύλλων πεύκου, από κύτταρα ρίζας ελιάς και από κύτταρα φύλλων ελιάς. Θέλετε να ανιχνεύσετε τον βακτηριακό κλώνο που περιέχει τη γενετική πληροφορία για τη σύνθεση του ολιγοπεπτιδίου A.

Ποια cDNA βιβλιοθήκη θα χρησιμοποιούσατε και ποιά διαδικασία θα ακολουθούσατε

ε)Βρείτε τον αριθμό των φωσφοδιεστερικών δεσμών στο δίκλωνο αρχικό μόριο DNA που σας παρατίθεται, τον αριθμό των φωσφοδιεστερικών δεσμών που θα διασπάσει η EcoRI, καθώς και τους αντίστοιχους δεσμούς στο mRNA που προκύπτει από τη μεταγραφή αυτού του DNA

στ) Ποιο θα είναι το τμήμα DNA που θα προκύψει μετά από την επίδραση της EcoRI; Ποιο είναι το ολιγοπεπτίδιο A; (Να γίνει χρήση του γενετικού κώδικα)

18

Τμήμα DNA που έχει κοπεί στα άκρα του με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI περιέχει 408 νουκλεοτίδια με αζωτούχο βάση την A και 1558 δεσμούς υδρογόνου. Να υπολογίσετε τον αριθμό των υπόλοιπων βάσεων και των φωσφοδιεστερικών δεσμών του τμήματος.

19

Η επίδραση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI σε μόριο DNA προκάλεσε το σπάσιμο 32 φωσφοδιεστερικών δεσμών.

α. Πόσοι δεσμοί υδρογόνου έσπασαν;

β. Πόσα θραύσματα προέκυψαν;

γ. Πόσα θραύσματα είναι έτοιμα για ανασυνδυασμό;

20

Το τμήμα DNA που ακολουθεί εισάγεται στο βακτήριο E. coli:

5' CCATGAATTCTCACTTAAAAGAATTCGAATGAGAATTCACGA 3'

3' GGTACTTAAGAGTGAATTTTCTTAAGCTTA CTCTTAAGTGCT 5'

α. Ποια είναι τα θραύσματα που προκύπτουν από τη δράση της EcoRI;

β. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου έσπασαν;

γ. Εάν το 2ο θραύσμα που προκύπτει από αριστερά προς τα δεξιά ανασυνδυαστεί με πλασμίδιο που έχει 1 θέση αναγνώρισης για την EcoRI, μοριακό βάρος (M.B)=80.000 και 100.000 δεσμούς υδρογόνου να βρεθεί το μοριακό βάρος και οι δεσμοί υδρογόνου του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Δίνεται M.B. νουκλεοτιδίου=200 και M.B H₂O=18

21

Δύο πανομοιότυπα μόρια DNA απομονώνονται από πυρήνα ευκαρυωτικού οργανισμού και στη συνέχεια υποβάλλονται με τη μέθοδο PCR σε 6 κύκλους αντιγραφής. Το προϊόν αναλύεται ως προς τη σύσταση των βάσεων του και προκύπτει ότι περιέχει 76.800 βάσεις T και 89.600 βάσεις C. Να βρείτε:

α. Από πόσους κλώνους μορίων αποτελείται το δείγμα

β. Τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου στο αρχικό μόριο.

22

Ένα διάλυμα περιέχει τα ακόλουθα 3 μόρια DNA (δίνεται μόνο ο ένας κλώνος):

1ο μόριο: 5' CGACGTGGCTTG 3'

2ο μόριο: 5' AAGCTATGGGTACA 3'

3ο μόριο: 5' AATTACATAGTCCCA 3'

Αν αυξηθεί η θερμοκρασία του διαλύματος με ποια σειρά πιστεύετε ότι θα γίνει η αποδιάταξη των κλώνων τους;

23

Γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA μήκους 20kb (kb=χιλιάδες ζεύγη βάσεων) υπόκειται στη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης A, οπότε προκαλούνται 2 θραύσματα των 14kb και 6kb. Όταν επιδράσει σε αυτό η περιοριστική ενδονουκλεάση B, προκαλούνται 2 θραύσματα των 2kb και 18kb. Πόσα θραύσματα θα προκληθούν αν επιδράσουν ταυτόχρονα στο μόριο τα ένζυμα A και B;

24

Με την δράση της EcoRI ένα μόριο DNA από ευκαρυωτικό κύτταρο κόπηκε σε 6 κομμάτια.

- Σε πόσα σημεία κόπηκε το μόριο;
- Πόσων δεσμών τη διάσπαση προκάλεσε η EcoRI;
- Πόσα πλασμίδια χρειάζονται για την κατασκευή μιας «βιβλιοθήκης» του συγκεκριμένου μορίου DNA;
- Πόσων δεσμών την διάσπαση προκάλεσε η EcoRI στα πλασμίδια αυτά

ΛΥΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ

1

Μεταξύ G-C σχηματίζονται 3 δεσμοί H ενώ μεταξύ A-T 2 δεσμοί H.

Η αποδιάταξη είναι η διαδικασία αποχωρισμού των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου μορίου DNA, είτε με επίδραση κατάλληλων χημικών ουσιών είτε με την αύξηση της θερμοκρασίας. Όσο περισσότεροι δεσμοί H σε δίκλωνο DNA, τόσο περισσότερη ενέργεια απαιτείται για την αποδιάταξη. Επομένως γρηγορότερα αποδιατάσσεται το μόριο που περιέχει τους λιγότερους δεσμούς H, δηλαδή με μικρότερο ποσοστό βάσεων G-C.

(α) $G-C = 23\%$, (β) $A-T = 54\% \Rightarrow G-C = (100-54)\% = 46\% \Rightarrow \Rightarrow$ γρηγορότερα το (α)

2

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%.

3

Μετά το μετασχηματισμό υπάρχουν 3 πληθυσμοί βακτηρίων:

α. βακτήρια που δεν μετασχηματίστηκαν και άρα δεν είναι ανθεκτικά στην αμπικιλίνη,

β. βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (που ξαναέκλεισε χωρίς να προσλάβει το γονίδιο της ινσουλίνης), που όμως πεθαίνουν λόγω της δράσης του γονιδίου B που προκαλεί θάνατο και

γ. βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, στο οποίο έχει καταστραφεί το γονίδιο B μέσα στο οποίο προστέθηκε το γονίδιο της ινσουλίνης, αλλά είναι ανθεκτικά στην αμπικιλίνη.

Επομένως έχουμε ουσιαστικά να επιλέξουμε μεταξύ 2 πληθυσμών (α και γ), οπότε επιδρώντας με αμπικιλίνη επιζούν τα αυτά με το γονίδιο της ινσουλίνης (γ).

Τα βακτήρια δεν έχουν μηχανισμούς ωρίμανσης. Εάν τους εισάγουμε γονίδιο ευκαρυωτικού οργανισμού (που περιέχει εσώνια) το mRNA από τη μεταγραφή σ'αυτά θα περιέχει εσώνια παράγοντας διαφορετική πρωτεΐνη. Το πρόβλημα λύνει η cDNA βιβλιοθήκη που περιέχει αντίγραφα των mRNA των κυττάρων που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο (ειδικά παγκρεατικά) και έχουν το πλεονέκτημα απομόνωσης αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή εξωνίων. Περιέχει ουσιαστικά τροποποιημένα γονίδια του κυτταρικού τύπου χωρίς τα εσώνια τους.

Με καλούπι το ώριμο mRNA από ειδικά παγκρεατικά κύτταρα παράγεται δίκλωνο DNA με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης και της DNA πολυμεράσης. Εισαγωγή αυτού του DNA στο βακτήριο παράγει απευθείας ώριμο mRNA που μεταφραζόμενο παράγει την πρωτεΐνη. Η προΐνσουλίνη που παράγεται μετατρέπεται ενζυμικά σε ινσουλίνη, αφού τα βακτήρια δεν διαθέτουν το κατάλληλο ένζυμο.

Επειδή εδώ, εισήχθη απευθείας το γονίδιο της ινσουλίνης, το πρόδρομο mRNA που παράγεται δεν οδηγεί σε προίνσουλίνη και τελικά σε ινσουλίνη.

4

Το περιοριστικό ένζυμο EcoRI αναγνωρίζει την αλληλουχία:

5' G A A T T C 3'

3' C T T A A G 5'

και κόβει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ G και A με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο τμημάτων DNA με μονόκλινα άκρα:

5' G A A T T C 3'

3' C T T A A G 5'

α. Το κομμάτι A αποτελείται από 1800 νουκλεοτίδια. Όπως φαίνεται παραπάνω υπάρχουν 4 νουκλεοτίδια (2 A και 2 T) που δεν είναι ζευγαρωμένα, οπότε τα ζεύγη των νουκλεοτιδίων όπου ισχύει ο κανόνας της συμπληρωματικότητας είναι $1796/2=898$ ζεύγη νουκλεοτιδίων. Στο κομμάτι A υπάρχουν 18% C που ουσιαστικά αντιστοιχούν στο δίκλινο τμήμα του εφόσον το μονόκλινο αποτελείται από 2 A και 2 T. Ωστόσο επειδή στο μονόκλινο τμήμα υπάρχουν ίσοι αριθμοί A και T ουσιαστικά όσα προαναφέραμε δεν τροποποιούν τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον κανόνα της συμπληρωματικότητας (όπου ισχύει ότι $A=T$ και $G=C$).

Οπότε ισχύει ότι υπάρχουν ακόμα 18% G, 32% A και 32% T. Συνολικά το κομμάτι A περιλαμβάνει: $A=1800*32%=576$, $T=1800*32%=576$, $G=1800*18%=324$, $C=1800*18%=324$. Σε ότι αφορά τους δεσμούς υδρογόνου θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μόνο το δίκλινο τμήμα του κομματιού A που όπως προαναφέραμε αποτελείται από 898 ζεύγη νουκλεοτιδίων, αφαιρώντας τις 2 αζευγάρωτες A και 2 αζευγάρωτες T από τον συνολικό αριθμό A και T αντίστοιχα. Μεταξύ A-T υπάρχουν 2 δεσμοί υδρογόνου και μεταξύ G-C υπάρχουν 3. Άρα ισχύει: $\text{Δεσμοί υδρογόνου}=2*574+3*324=2120$.

β. Το κομμάτι B αποτελείται από $2*2500-1800=3200$ νουκλεοτίδια όπου όπως και στο κομμάτι A, υπάρχουν 4 νουκλεοτίδια (2 A και 2 T) που δεν είναι ζευγαρωμένα. Ωστόσο όπως εξηγήσαμε παραπάνω το γεγονός αυτό δεν τροποποιεί τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, επειδή στο μονόκλινο τμήμα υπάρχουν ίσοι αριθμοί A και T. Εφόσον στο μόριο του DNA υπάρχουν συνολικά 800 νουκλεοτίδια με A, στο κομμάτι B θα υπάρχουν $800-576=224$ A. Άρα θα υπάρχουν επίσης 224 T και $(3200-2*224)/2=1376$ C και 1376 G.

γ. Το κομμάτι A θα έχει μονόκλινα άκρα μόνο από την μία πλευρά του, εκεί όπου επέδρασε η EcoRI. Επομένως δεν είναι δυνατή η κλωνοποίηση του, αφού δεν θα μπορεί να συνδεθεί με τον φορέα κλωνοποίησης.

5

1. Το μονόκλινο DNA που θα παραχθεί με καλούπι το RNA του ιού θα έχει την παρακάτω ακολουθία νουκλεοτιδίων
...CGGCTTAAGTAAT...

Όταν θα αντιγραφεί αυτή η αλυσίδα θα προκύψει ένα δίκλινο μόριο με την παρακάτω ακολουθία νουκλεοτιδίων

...5' GCCGAATTCATTA 3'...

...3' CGGCTTAAGTAAT 5' ...

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.

6

α. Το ινίδιο χρωματίνης αποτελείται από ένα δίκλωνο γραμμικό μόριο DNA. Στη μετάφαση το χρωμόσωμα αποτελείται από δύο αδελφές χρωματίδες που είναι τα δύο δίκλωνα γραμμικά μόρια που προέκυψαν από την αντιγραφή του DNA και το καθένα έχει $5 \cdot 10^4$ ζεύγη βάσεων, δηλ. $10 \cdot 10^4$ νουκλεοτίδια. Στο κάθε δίκλωνο γραμμικό μόριο DNA θα υπάρχουν:

Φ.Δ. = νουκλεοτίδια - 2. Άρα συνολικά στο χρωμόσωμα θα υπάρχουν: Φ.Δ.ολ. = $(10 \cdot 10^4 - 2) + (10 \cdot 10^4 - 2) = 2(10 \cdot 10^4 - 2) = 20 \cdot 10^4 - 4$

β. Η EcoRI θα αναγνωρίσει την παρακάτω ακολουθία στο δίκλωνο DNA:

5'...TTAATGAATTCCCGACATAACCC...3'
3'...AATTAAGGGCTGTATTGGG...5'

και θα κόψει δημιουργώντας τα παρακάτω κομμάτια:

(α)	(β)
-ν1-G	AATTC-ν3-
-ν2-CTTAA	G-ν4-

Το α κομμάτι αποτελείται από δύο αλυσίδες που η πρώτη έχει ν1 νουκλεοτίδια και η δεύτερη ν2 νουκλεοτίδια. Το β κομμάτι αποτελείται από δύο αλυσίδες που η πρώτη έχει ν3 και η δεύτερη ν4 νουκλεοτίδια. Οι Φ.Δ. σε μια αλυσίδα νουκλεοτιδίων είναι όσα και τα νουκλεοτίδια της αλυσίδας - 1. Άρα οι συνολικοί Φ.Δ. και στα δύο κομμάτια θα είναι: Φ.Δ.ολ. = $\nu 1 - 1 - \nu 2 - 1 + \nu 3 - 1 + \nu 4 - 1 = \nu 1 + \nu 2 + \nu 3 + \nu 4 - 4 = 10 \cdot 10^4 - 4$

Ισχύει: $\nu 1 + \nu 2 + \nu 3 + \nu 4 = 10 \cdot 10^4$ δηλ. όσα και τα νουκλεοτίδια του αρχικού μορίου.

γ. Για να βρούμε τα αμινοξέα και τους πεπτιδικούς δεσμούς θα πρέπει να βρούμε ποιο είναι το mRNA που μεταγράφεται.

i) Αν είναι η κάτω η μεταγραφόμενη αλυσίδα τότε το mRNA που θα προέκυπτε θα ήταν συμπληρωματικό και αντιπαράλληλο:

5' UUA AUGAAUCCCGACAUAACCC 3'

Ψάχνοντας το mRNA από το 5' προς το 3' άκρο βρίσκουμε κωδικόνιο έναρξης αλλά όχι κωδικόνιο λήξης. Άρα δε θα μπορούσε να είναι η κάτω η μεταγραφόμενη αλυσίδα.

ii) Αν είναι η επάνω η μεταγραφόμενη αλυσίδα τότε το mRNA που προκύπτει θα είναι:

3' AAUUA CUUAAGGG CUGUAUUGGG 5'

Ψάχνοντας το mRNA από το 5' προς το 3' άκρο βρίσκουμε και κωδικόνιο έναρξης και κωδικόνιο λήξης. Άρα μπορεί να κωδικοποιεί ένα πενταπεπτίδιο. Οι πεπτιδικοί δεσμοί σε αυτό θα είναι 4.

δ. Εφόσον η EcoRI κόβει στο εσωτερικό του παραπάνω γονιδίου δε θα μπορούσαμε να τη χρησιμοποιήσουμε για να απομονώσουμε ολόκληρο το γονίδιο. Θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε ένα ένζυμο που να κόβει

7

α) Η EcoRI αναγνωρίζει και κόβει, με προσανατολισμό 5' → 3', την παρακάτω ακολουθία:

5'-GAATTC-3'

3'-CTTAAG-5'

Στο δεδομένο όμως τμήμα η παραπάνω ακολουθία έχει προσανατολισμό 3' → 5' και δεν μπορεί να την αναγνωρίσει η EcoRI ούτε να την κόψει.

β) Κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη ακολουθία σε ένα δίκλωνο τμήμα DNA. Όμως το συγκεκριμένο τμήμα είναι δίκλωνο RNA.

γ) Το συγκεκριμένο τμήμα δε κόβεται από κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση επειδή είναι μονόκλωνο DNA.

8

Το ένζυμο EcoRI αναγνωρίζει την αλληλουχία:

5' GAATTC 3'

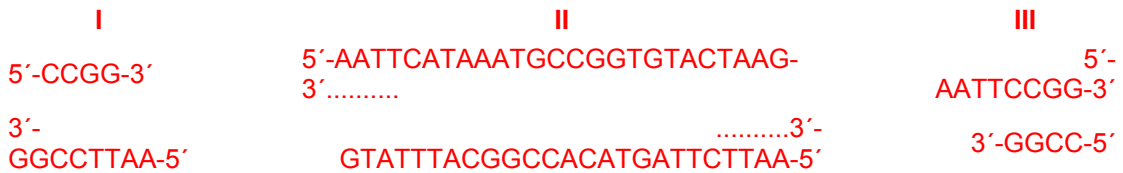
3' CTTAAG 5'

και κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A (με κατεύθυνση 5' → 3'), προκαλώντας τη διάσπαση 2 φωσφοδιεστερικών δεσμών και 8 δεσμών υδρογόνου, αφήνοντας μονόκλινα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα άκρα. Οι θέσεις αναγνώρισης της EcoRI στο μόριο DNA είναι:

5' CCGG-AATTCATAAATGCCGGTGTACTAAG-AATTCCGG 3'

3' GGCCTTAA-GTATTTACGGCCACATGATTCTTAA-GGCC 5'

Μετά την επίδραση με την EcoRI προκύπτουν 3 θραύσματα και αυτό που μας ενδιαφέρει:



Με το ίδιο ένζυμο περιορισμού κόβουμε και το φορέα κλωνοποίησης, δηλαδή το πλασμίδιο.

Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του προκαρυωτικού κυττάρου, αναμιγνύονται και επειδή έχουν συμπληρωματικά (μονόκλινα) άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση του ενζύμου DNA δεσμάση. Το ανασυνδυασμένο μόριο DNA που προκύπτει είναι κυκλικό :

---5' GAATTCATAAATGCCGGTGTACTAAGAATTC 3'---

---3' CTTAAGTATTTACGGCCACATGATTCTTAAAG 5'---

(Ενώνουμε τα άκρα του μορίου με γραμμές ούτως ώστε το μόριο να φαίνεται δίκλωνο και κυκλικό)

[Κωδικόνιο έναρξης, κωδικόνιο λήξης, κώδικας τριπλέτας, συνεχής μη επικαλυπτόμενος]

=> Η RNA πολυμεράση προσδένεται στον υποκινητή με τη βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων και προσθέτει συμπληρωματικά ριβονουκλεοτίδια έναντι των δεοξυριβονουκλεοτιδίων της μη κωδικής αλυσίδας ενώνοντάς τα με 3' – 5' φωσφοδιεστερικό δεσμό. Απέναντι από A προσθέτει U, απέναντι από T προσθέτει A και απέναντι από G προσθέτει C και αντίστροφα.

Το mRNA συντίθεται με κατεύθυνση 5' → 3' με μεταγραφή της μη κωδικής αλυσίδας με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας και της αντιπαραλληλίας. Έτσι το mRNA που συντίθεται είναι: 5' GAAUUCAUAAAUGCCGGUGUACUAAGAAUUC 3'

Στο παραπάνω μόριο mRNA εντοπίζουμε 5 κωδικόνια. Το κωδικόνιο λήξης δεν κωδικοποιεί κανένα αμινοξύ. Συνεπώς το παραγόμενο πεπτιδίο αποτελείται από τέσσερα αμινοξέα τα οποία με βάση το γενετικό κώδικα έχουν ακόλουθη αλληλουχία:

NH₂ – μεθειονίνη – προλίνη – βαλίνη – τυροσίνη –

9

α) Κωδική είναι η πάνω αλυσίδα με 5' άκρο στα αριστερά, αφού έχει κωδικόνιο έναρξης και λήξης. Η κωδικοποιούσα περιοχή περιλαμβάνει 327 νουκλεοτίδια

5' ATG AAG CTT CA ... 302 βάσεις ... TA AAG CTTATA TAG 3'

β) 327 : 3 = 109 κωδικόνια, άρα 108 αμινοξέα (μείον ένα κωδικόνιο λήξης)

γ) Η HambIII κόβει σε θέσεις που δεν επηρεάζουν το γονίδιο, άρα είναι κατάλληλη, ενώ η HindIII εντοπίζεται μέσα στη κωδικοποιούσα περιοχή του αντίστοιχου γονιδίου, οπότε αυτό θα καταστραφεί και δεν θα μπορεί να κλωνοποιηθεί

δ) Ο φορέας κλωνοποίησης πρέπει να κοπεί έτσι ώστε να εμφανίσει μονόκλινα άκρα συμπληρωματικά προς το κομμάτι που θα κλωνοποιηθεί. Άρα αφού πρέπει να κοπεί με την HambIII, οφείλει να διαθέτει την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου αυτού.

10

α. Επειδή πρόκειται για γονίδιο που εκφράζεται σε συγκεκριμένο ιστό θα χρησιμοποιήσουμε τη cDNA βιβλιοθήκη (αναφορά στον ορισμό της cDNA από σχολικό βιβλίο σελ. 60)

β. Το ώριμο mRNA από το οποίο κατασκευάζουμε την cDNA βιβλιοθήκη περιλαμβάνει την 5'

αμετάφραστη περιοχή, συνεπώς αυτό θα χρησιμοποιήσουμε στην ανίχνευση.

γ. Περιγραφή υβριδοποίησης από σχολικό σελίδα 60. Δύο φορές γίνεται αποδιάταξη: μία για να γίνουν μονόκλωνα τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και μία μετά την υβριδοποίηση για να απομακρυνθούν οι ανιχνευτές

11

α. Μη κωδική αλυσίδα είναι η β (η κάτω αλυσίδα) αφού στο mRNA που προκύπτει από αυτή υπάρχει κωδικόνιο έναρξης και κωδικόνιο λήξης.

β. 5' GCCUAUGCACCGGUACGAACAUGAUCC 3'

γ. εσώνιο: 5' UACGA 3'

5' αμετάφραστη περιοχή: 5' GCCU 3'

3' αμετάφραστη περιοχή: 5' UCC 3'

δ. Καταλληλότερη είναι η TaqI γιατί η αλληλουχία που αναγνωρίζει βρίσκεται εκτός του γονιδίου με αποτέλεσμα το γονίδιο να παραμένει ανέπαφο. Αντίθετα η αλληλουχία που αναγνωρίζει η MspI βρίσκεται μέσα στο γονίδιο με αποτέλεσμα το γονίδιο να κόβεται σε δύο τμήματα.

ε. Αν η 21η βάση της κωδικής αλυσίδας αντικατασταθεί με G τότε προκύπτει το κωδικόνιο CAG που είναι συνώνυμο με το αρχικό κωδικόνιο CAC. Άρα πρόκειται για σιωπηλή μετάλλαξη.

Στην περίπτωση που μετά την 8η βάση της κωδικής αλυσίδας γίνει προσθήκη C αλλάζει η αλληλουχία του υποκινητή. Εάν δεν επηρεαστεί η ικανότητα πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης τότε δε θα υπάρχει αλλαγή στην έκφραση αυτού του γονιδίου. Αν όμως η προσθήκη αυτή επηρεάσει την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης τότε το γονίδιο δε θα μπορέσει να εκφραστεί.

12

A) Στο συγκεκριμένο τμήμα DNA υπάρχουν 8 αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζει η HindIII αφού το DNA αυτό προέρχεται από πυρήνα ευκαρυωτικού κυττάρου και είναι γραμμικό δίκλωνο.

B) Σε κάθε αλληλουχία που αναγνωρίζει η HindIII γίνεται διάσπαση 2 3'-5' φωσφοδιεστερικών δεσμών, έτσι $8 \times 2 = 16$ φ.δ

Γ) Για την κλωνοποίηση των 9 τμημάτων θα χρειαστούν τουλάχιστον 9 φορές κλωνοποίησης διότι κάθε τμήμα πρέπει να συνδεθεί με ένα φορέα.

Δ) Για την σύνδεση ενός τμήματος DNA με ένα φορέα κλωνοποίησης η DNA δεσμάση θα σχηματίσει 4 3'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Συνολικά λοιπόν θα σχηματιστούν $9 \times 4 = 36$ φ.δ.

13

Το πλασμίδιο αυτό που θα χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης θα έχει μία φορά την αλληλουχία αναγνώρισης της BamHI. Μετά την επίδραση του ενζύμου σ' αυτό θα έχουν σπάσει 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί (ένας στη μία αλυσίδα του πλασμιδίου και ένας στην άλλη) και θα έχουν «χαλάσει» 10 δεσμοί υδρογόνου. Επομένως, όταν ενσωματωθεί το τμήμα DNA με τις αζευγάρωτες βάσεις στα 2 άκρα του στο πλασμίδιο για να σχηματιστεί το ανασυνδυασμένο μόριο θα δημιουργηθούν 4 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί, 2 σε κάθε άκρο του τμήματος και 20 επιπλέον δεσμοί υδρογόνου, 10 σε κάθε άκρο του τμήματος. Άρα, οι συνολικοί δεσμοί υδρογόνου του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου θα είναι: $120.000 - 10 + 14.000 + 20 = 134.000 + 10 = 134.010$ δεσμοί υδρογόνου. Γνωρίζουμε ότι όταν δημιουργείται ένας φωσφοδιεστερικός δεσμός παράγεται ένα μόριο νερού, ενώ η διάσπασή του απαιτεί πρόσληψη ενός μορίου νερού. Το πλασμίδιο, μετά την επίδραση της BamHI την ενσωμάτωση του τμήματος σ' αυτό, έχει μοριακό βάρος $100.000 + 2 \times 18$. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

έχει μοριακό βάρος $100.000 + 2 \times 18 + 10.000 - 4 \times 18 = 110.000 - 2 \times 18 = 110.000 - 36 = 109.964$

14

Η αλυσίδα με κατεύθυνση 5'-3' είναι η κωδική αλυσίδα του γονιδίου, διότι σ' αυτή εντοπίζεται το κωδικόνιο έναρξης ATG στο 5' άκρο της και το κωδικόνιο λήξης TAA στο 3' άκρο της. Επομένως κατά τη μεταγραφή η σύνθεση του mRNA γίνεται με καλούπι την αλυσίδα με προσανατολισμό 3'-5'. Το σχηματιζόμενο mRNA έχει την ακόλουθη αλληλουχία βάσεων: 5-GAAUCCAUC AUG CGC GAA UUC UAU UAA AGCAGAAUUC-3

Παρατηρούμε ότι το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο πέντε αμινοξέων. Για να κλωνοποιήσουμε το παραπάνω τμήμα χρησιμοποιούμε την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI (η μόνη που αναφέρει το σχολικό βιβλίο). Το ένζυμο αυτό υδρολύει το δεσμό G-A όταν συναντά την αλληλουχία GAATTC. Παρατηρούμε όμως ότι η συγκεκριμένη αλληλουχία βρίσκεται μέσα στο πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί το αντίστοιχο πεπτίδιο άρα η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Φυσικά η κλωνοποίηση θα μπορέσει να γίνει με άλλη περιοριστική ενδονουκλεάση.

15

Κωδική DNA: 5' AAAG↓AATT CATGAATAACAAGATAATTT AAG↓AATT CTTT 3'

Μη κωδική DNA: 3' TTTC TTAA↓GTACT TATTGTTCTATTAATTC TTAA↓GAAA 5'

Ωριμο mRNA: 5' AUG – AAU – AAC – AAG – AUA – AUU – UAA (λήξη)3'

Το ολιγοπεπτίδιο είναι: μεθειονίνη – ασπαραγίνη – ασπαραγίνη – λυσίνη – ισολευκίνη – ισολευκίνη

Η EcoRI συναντά την αλληλουχία

GAATTC

CTTAAG

δύο φορές, άρα θα διασπάσει 4 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.

Τα 39 νουκλεοτίδια στο mRNA αντιστοιχούν σε $39-1=38$ φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και στο DNA (δίκλωνο) σε $39 \times 2 = 78 - 2 = 76$ φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.

16

Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηρίων έχουμε τρεις πληθυσμούς κυττάρων:

i. Βακτήρια που δεν έχουν μετασχηματιστεί και επομένως δεν είναι ανθεκτικά στην αμπικιλίνη.

ii. Βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, δηλαδή με το πλασμίδιο που ξαναέκλεισε χωρίς να προσλάβει το γονίδιο της ινσουλίνης, τα οποία όμως πεθαίνουν λόγω της δράσης του γονιδίου B που προκαλεί θάνατο.

iii. Βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, με αποτέλεσμα να καταστραφεί το γονίδιο B μέσα στο οποίο εισάγεται το γονίδιο της ινσουλίνης και τα οποία είναι ανθεκτικά στην αμπικιλίνη.

Επομένως, με βάση τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη ότι τελικά έχουμε δύο πληθυσμούς βακτηρίων, θα επιλέξουμε τα μετασχηματισμένα βακτήρια που περιέχουν το γονίδιο της ινσουλίνης με την προσθήκη του αντιβιοτικού αμπικιλίνη στο τρυβλίο της καλλιέργειας.

Στα βακτήρια που είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί δεν υπάρχει μηχανισμός ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA σε ώριμο mRNA. Αν επομένως εισάγουμε σε αυτά το γονίδιο της ινσουλίνης που έχουμε απομονώσει από το ανθρώπινο γονιδίωμα, και περιλαμβάνει εξώνια και εσώνια, δεν είναι δυνατόν να γίνει η ωρίμανση, με αποτέλεσμα να μην παράγεται η φυσιολογική πρωτεΐνη.

Το πρόβλημα αυτό επιλύεται με την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης, όπου εμπεριέχεται το

σύνολο των γονιδίων που εκφράζεται σε έναν κυτταρικό τύπο, μεταξύ των οποίων και το γονίδιο που μας ενδιαφέρει να απομονώσουμε (όπως τα παγκρεατικά κύτταρα στα οποία εκφράζεται το γονίδιο της ινσουλίνης).

Στην προκειμένη περίπτωση, εφόσον το γονίδιο προέρχεται από το γονιδίωμα, αποτελείται από εξώνια και εσώνια, οπότε δεν είναι δυνατόν να ωριμάσει το πρόδρομο mRNA που θα παραχθεί κατά την μεταγραφή και δεν θα παραχθεί τελικά η προίνσουλίνη και κατ' επέκταση η ινσουλίνη.

17

α) Σε δίκλινα μόρια DNA απέναντι από την αζωτούχο βάση A υπάρχει T και αντίστροφα και απέναντι από την αζωτούχο βάση G υπάρχει πάντα C και αντίστροφα. Επίσης οι δύο αλυσίδες του DNA είναι αντιπαράλληλες. Δηλαδή το 3' άκρο της μιας είναι απέναντι από το 5' άκρο της άλλης και αντίστροφα. Επομένως η συμπληρωματική αλυσίδα της δοθείσας θα είναι:

3' TTTCTTAAGTACTTATTGTTCTATTAAATTCTTAAGAAA 5'

β) Εκτός από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI απαιτούνται τα εξής υλικά:

- φορέας κλωνοποίησης
- DNA δεσμάση
- βακτήρια ξενιστές μη ανθεκτικά στο αντιβιοτικό το αντίστοιχου γονιδίου ανθεκτικότητας που φέρει ο φορέας κλωνοποίησης.
- χημικές ουσίες για το μετασχηματισμό
- αντιβιοτικά
- θρεπτικά υλικά για πραγματοποίηση καλλιέργειας
- άγαρ για στερεή καλλιέργεια
- κλίβανο επώασης

Σημείωση: δεν πρέπει να αναφερθούν τα ιχνηθετημένα μόρια ανιχνευτές γιατί αυτά απαιτούνται για την εύρεση ενός επιθυμητού κλώνου μετά την κατασκευή μιας γονιδιωματικής ή μιας cDNA βιβλιοθήκης.

γ) πλασμίδιο ή DNA από βακτηριοφάγο λ που να διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά:

- θέση έναρξης της αντιγραφής
- γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη
- να υπάρχει η αλληλουχία 5' GAATTC 3' μια και μόνο φορά μέσα σε ένα από τα γονίδια ανθεκτικότητας

δ) Μια cDNA βιβλιοθήκη περιέχει αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται στο κύτταρο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να απομονωθεί το ολικό mRNA προκειμένου να κατασκευαστεί η βιβλιοθήκη. Επομένως, αν το συγκεκριμένο γονίδιο δεν εκφράζεται στα κύτταρα των ριζών της ελιάς δεν θα υπάρχει και αντίστοιχος βακτηριακός κλώνος που θα φέρει το δοθέν DNA. Η cDNA βιβλιοθήκη από κύτταρα φύλλων πεύκου δεν θα χρησιμοποιηθεί γιατί είναι από διαφορετικό είδος και ενδέχεται είτε το γονίδιο αυτό να μην υπάρχει, είτε να μην εκφράζεται, είτε να φέρει διαφορετική νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Επομένως, θα χρησιμοποιηθεί η cDNA βιβλιοθήκη από κύτταρα φύλλων ελιάς, στα οποία το γονίδιο εκφράζεται και άρα θα υπάρχει και βακτηριακός κλώνος με το συγκεκριμένο αντίγραφο του mRNA. Η μέθοδος που θα ακολουθούσαμε για τον προσδιορισμό του παραπάνω βακτηριακού κλώνου έχει ως εξής: Σχολικό βιβλίο σελ. 60 « Αν επιδράσουμε στο DNA με κατάλληλες χημικές ουσίες ... με το DNA της βιβλιοθήκης (το οποίο έχει αποδιαταχθεί) και υβριδοποιούν μόνο το συμπληρωματικό τους DNA» Σχολικό βιβλίο σελ. 61. Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι το ιχνηθετημένο μόριο ανιχνευτής DNA (ή RNA) θα είναι συμπληρωματικό ως προς τη δοθείσα από την άσκηση αλληλουχία.

ε) Η δοθείσα αλληλουχία DNA αποτελείται από 39 νουκλεοτίδια, επομένως στο δίκλινο DNA υπάρχουν 39ζ.β. Σε ένα δίκλινο γραμμικό μόριο DNA οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί είναι N – 2, όπου N νουκλεοτίδια, αφού ένα νουκλεοτίδιο από κάθε μια αλυσίδα μένει ελεύθερο χωρίς

να σχηματίζει φωσφοδιεστερικό δεσμό. Άρα στο δίκλωνο μόριο DNA υπάρχουν 76 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί.

Το mRNA που προέρχεται από τη μεταγραφή αυτού του γονιδίου είναι μονόκλωνο μόριο άρα οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ των νουκλεοτιδίων του είναι $N - 1 = 38$. Θεωρούμε πως στη δοθείσα αλληλουχία δεν υπάρχει τμήμα υποκινητή ή αλληλουχίας λήξης της μεταγραφής) σελ 57

«Μια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιείται ... αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα». Άρα η EcoRI θα διασπάσει 4 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.

στ) 5' A A T T C A T G A A T A A C A A G A T A A T T T A A G 3'
3' G T A C T T A T T G T T C T A T T A A A T T C T T A A 5'

Η δοθείσα αλυσίδα αν είναι η κωδική, τότε διαβάζοντας με προσανατολισμό 5' - 3' ψάχνουμε να βρούμε κωδικόνιο έναρξης ATG, που με βήμα τριπλέτας να καταλήγει σε ένα από τα κωδικόνια λήξης TAA, TAG, TGA. Πράγματι υπάρχει κωδικόνιο έναρξης και με βήμα τριπλέτας καταλήγουμε σε κωδικόνιο λήξης μετά από 5 κωδικόνια. Επομένως η αλυσίδα αυτή θα κωδικοποιεί το εξαπεπτιδίο: NH₂-μεθειονίνη-ασπαραγίνη-ασπαραγίνη-λυσίνη-ισολευκίνη-ισολευκίνη-COOH

Η συμπληρωματική αλυσίδα δε μπορεί να είναι η κωδική γιατί διαβάζοντάς την με προσανατολισμό 5' - 3', ενώ βρίσκουμε κωδικόνιο έναρξης, δεν βρίσκουμε κωδικόνιο λήξης.

18

Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI δημιουργεί 2 μονόκλωνα άκρα που αποτελούνται από συνολικά 4A και 4T. Κατά συνέπεια στο δίκλωνο τμήμα του DNA θα υπάρχουν 408-4=404A και 404T.

Οι δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται μόνο σε δίκλωνο τμήμα. Κατά συνέπεια ισχύει:
 $2A+3G=$ δεσμοί υδρογόνου $\rightarrow 2 \cdot 404+3G=1558 \rightarrow G=250=C$.

Ο συνολικός αριθμός νουκλεοτιδίων σε όλο το τμήμα του DNA (δίκλωνο και μονόκλωνα άκρα) δίνεται από τη σχέση: $2A+2G=$ νουκλεοτιδία $\rightarrow 2 \cdot 408+2 \cdot 250=1316$ νουκλεοτιδία.

Επειδή το τμήμα που εξετάζουμε είναι δίκλωνο γραμμικό οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί θα είναι κατά 2 λιγότεροι σε σχέση με τον συνολικό αριθμό νουκλεοτιδίων δηλαδή θα είναι σε αριθμό 1314.

19

α. Σε κάθε θέση αναγνώρισης της EcoRI σπάνε 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου. Κατά συνέπεια οι θέσεις αναγνώρισης της EcoRI στο συγκεκριμένο μόριο DNA θα είναι $32:2=16$. Οι δεσμοί υδρογόνου που σπάνε σε 16 θέσεις αναγνώρισης της EcoRI θα είναι: $16 \cdot 8=128$.

β. Διακρίνουμε δύο περιπτώσεις:

• Εάν το μόριο είναι κυκλικό τότε προέκυψαν 16 θραύσματα όσες είναι και οι θέσεις αναγνώρισης.

• Εάν το μόριο είναι γραμμικό τότε προέκυψαν 17 θραύσματα ένα παραπάνω από τις θέσεις αναγνώρισης.

γ. Στην περίπτωση που το μόριο του DNA είναι κυκλικό τότε όλα τα θραύσματα έχουν μονόκλωνα άκρα και επομένως μπορούν να ανασυνδυαστούν. Στην περίπτωση που το μόριο του DNA είναι γραμμικό τότε τα 15 από τα 17 θραύσματα έχουν μονόκλωνα άκρα και επομένως μπορούν να ανασυνδυαστούν άμεσα. Τα 2 ακραία τμήματα έχουν το καθένα από ένα μονόκλωνο και ένα δίκλωνο άκρο και επομένως δεν μπορούν να ανασυνδυαστούν άμεσα εκτός και αν το δίκλωνο άκρο τους μετατραπεί μετά από ειδική κατεργασία σε μονόκλωνο.

20

α. Υπάρχουν 3 θέσεις αναγνώρισης της EcoRI και επειδή το τμήμα DNA είναι δίκλωνο γραμμικό θα υπάρξουν 4 θραύσματα. Τα θραύσματα που προκύπτουν είναι τα εξής:

1ο θραύσμα	5' CCATG 3'
	3'GGTACT TAA 5'
2ο θραύσμα	5' AATTCTCACTTAAAAG 3'
	3' GAGTGAATTTTCTTAA5'
3ο θραύσμα	5' AATTCGAATGAG 3'
	3' GCTTACTCTTAA 5'
4ο θραύσμα	5' AATTCACGA 3'
	3' GTGCT 5'

β. Όπως είναι γνωστό σε κάθε θέση αναγνώρισης της EcoRI σπάνε 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου. Κατά συνέπεια για το συγκεκριμένο τμήμα DNA η επίδραση της EcoRI θα έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση $3 \cdot 2=6$ φωσφοδιεστερικών δεσμών και $3 \cdot 8=24$ δεσμών υδρογόνου.

γ.

• Το 2ο τμήμα έχει 32 νουκλεοτίδια τα οποία έχουν συνολικό μοριακό βάρος $32 \cdot 200=6.400$.

• Στο δίκλωνο τμήμα του 2ου τμήματος υπάρχουν συνολικά 28 δεσμοί υδρογόνου.

• Όπως είναι γνωστό σε κάθε θέση αναγνώρισης της EcoRI σπάνε 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου, ενώ η ένωση ενός θραύσματος και ενός πλασμιδίου που έχουν προκύψει από τη δράση της EcoRI, έχει σαν συνέπεια τη δημιουργία τεσσάρων (4) φωσφοδιεστερικών δεσμών και δεκαέξι (16) δεσμών υδρογόνου.

• Επίσης είναι γνωστό ότι κατά τη διάσπαση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού

προσλαμβάνεται 1 μόριο νερού ενώ κατά τη δημιουργία αποβάλλεται 1 μόριο νερού.

Κατά συνέπεια η δημιουργία του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου έχει σαν αποτέλεσμα την αποβολή 2 μορίων νερού. Οπότε: Μ.Β. ανασυνδυσμένου πλασμιδίου= $80.000+6.400-2 \cdot 18=86.364$,

δεσ. Η ανασυνδυσμένου πλασμιδίου= $100.000-8+16+28=100.036$

21

α. Εάν γίνουν κ κύκλοι αντιγραφής θα προκύψουν $\alpha \cdot 2^k$ μόρια DNA, όπου α ο αριθμός των αρχικών μορίων DNA. Στη συγκεκριμένη περίπτωση θα ισχύει: $2 \cdot 2^6=128$ μόρια DNA

β. Οι 76.800 βάσεις T θα υπάρχουν στα 128 μόρια DNA, οπότε στο αρχικό μόριο ο αριθμός των T θα είναι: $76.800/128=600=A$. Ο αριθμός των C στο αρχικό μόριο θα είναι:

$$89.600/128=700=G$$

Ισχύει η σχέση: $2A+3C=\delta.H \rightarrow 2 \cdot 600+3 \cdot 700=3.300$ δεσμοί υδρογόνου στο αρχικό μόριο.

22

Ένα μόριο DNA είναι σταθερότερο όσο περισσότερους δεσμούς υδρογόνου έχει. Επιπλέον για τη σταθερότητα του μορίου σημαντικός είναι και ο αριθμός των νουκλεοτιδίων. Για τα 3 παραπάνω μόρια ισχύει:

1ο μόριο: 12 ζεύγη βάσεων, 32 δ.Η.

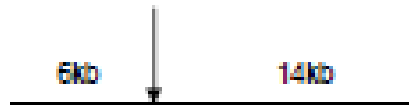
2ο μόριο: 14 ζεύγη βάσεων, 34 δ.Η.

3ο μόριο: 15 ζεύγη βάσεων, 35 δ.Η.

Άρα με την αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος η αποδιάταξη των κλώνων θα γίνει με την εξής σειρά: 1ο μόριο-2ο μόριο-3ο μόριο

23

Η περιοριστική ενδονουκλεάση A έχει 1 θέση αναγνώρισης στο δίκλωνο μόριο DNA με αποτέλεσμα την εμφάνιση 2 θραυσμάτων, 6 και 14kb αντίστοιχα



Η περιοριστική ενδονουκλεάση B έχει 1 θέση αναγνώρισης στο δίκλωνο μόριο DNA με αποτέλεσμα την εμφάνιση 2 θραυσμάτων, 2 και 18kb αντίστοιχα

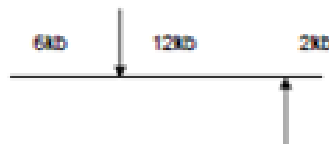


Η επεξεργασία του δίκλωνου μορίου DNA και με τις 2 περιοριστικές ενδονουκλεάσες έχει σαν τις 2 παρακάτω περιπτώσεις:

• 1η περίπτωση:



• 2η περίπτωση:



24

- α. 5,
- β. 50,
- γ. 6,
- δ. 6