

## ΚΕΦ.4 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA

### ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ-ΕΜΒΑΘΥΝΣΗΣ ΘΕΩΡΙΑΣ

- 4.1. Τι ονομάζεται ανασυνδυασμένο DNA, που χρησιμοποιείται;
- 4.2. Τι είναι η γενετική μηχανική, ποιοι είναι οι στόχοι της και ποια τα εργαλεία της;
- 4.3. Τι είναι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, και πως δρουν;
- 4.4. Πως γίνεται η μεταφορά γενετικού υλικού από οργανισμό σε οργανισμό;
- 4.5. Τι είναι η γονιδιωματική βιβλιοθήκη και με ποιο τρόπο δημιουργείται;
- 4.6. Ποιοι είναι οι συνήθεις φορείς κλωνοποίησης, τότε χρησιμοποιείται ο καθένας, τι είδους κύτταρα μολύνουν ο καθένας και πως;
- 4.7. Τι είναι μια cDNA βιβλιοθήκη, ποια τα πλεονεκτήματά της και σε τι διαφέρει από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη;
- 4.8. Πως κατασκευάζεται μια cDNA βιβλιοθήκη;
- 4.9. Με ποιο τρόπο οι επιστήμονες μπορούν να επιτύχουν επιλεκτικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA και ποιες οι εφαρμογές του;
- 4.10. Με ποιο τρόπο επιλέγονται τα μετασχηματισμένα βακτήρια και πως επιλέγεται ένας κλώνος που περιέχει ένα επιθυμητό γονίδιο;
- 4.11. Τι ονομάζεται μετασχηματισμός, κλωνοποίηση, ανασυνδυασμένο DNA;
- 4.12. Τι χρειάζεται για την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης;
- 4.13. Γιατί τα πλασμίδια είναι σημαντικά για την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA;
- 4.14. Γιατί κατά το σχηματισμό μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης δεν απομονώνουμε mRNA, αλλά χρησιμοποιούμε το DNA των κυττάρων ενός οργανισμού;
- 4.15. Ποια βακτήρια χρησιμοποιούνται για το μετασχηματισμό και πως επιτυγχάνεται αυτό;
- 4.16. Πως χρησιμοποιείται το DNA του φάγου λ ως φορέας κλωνοποίησης;
- 4.17. Δυο μόρια DNA περιέχουν 20% και 30% αδενίνη αντίστοιχα. Ποιο από τα δύο θα υποστεί ευκολότερα αποδιάταξη και γιατί;
- 4.18. Να γράψετε δυο μεθόδους παραγωγής αντιγράφων μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων ενός μορίου DNA. Σε τι πλεονεκτεί η μια της άλλης;
- 4.19. Πως θα μπορούσαμε να διαπιστώσουμε εάν ένα φυτό έχει μολυνθεί από ρετροϊό;
- 4.20. Ένα γονίδιο ενσωματώθηκε σ' ένα πλασμίδιο και στο μετασχηματισμένο βακτήριο δεν εκφράζονταν το γονίδιο. Μπορείτε να μερικούς λόγους για το γεγονός αυτό;
- 4.21. Τι είναι μια cDNA βιβλιοθήκη, ποια τα πλεονεκτήματά της και σε τι διαφέρει από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη;
- 4.22. Πως κατασκευάζεται μια cDNA βιβλιοθήκη;
- 4.23. Με ποιο τρόπο οι επιστήμονες μπορούν να επιτύχουν επιλεκτικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA και ποιες οι εφαρμογές του;
- 4.24. Γιατί τα πλασμίδια είναι σημαντικά για την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA; Ποιες από τις ιδιότητές τους είναι απαραίτητες για τη διαδικασία αυτή;
- 4.25. Γιατί κατά το σχηματισμό μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης δεν απομονώνουμε mRNA, αλλά χρησιμοποιούμε το DNA των κυττάρων ενός οργανισμού;
- 4.26. Ποια βακτήρια χρησιμοποιούνται για το μετασχηματισμό και πως επιτυγχάνεται αυτό;
- 4.27. Πως χρησιμοποιείται το DNA του φάγου λ ως φορέας κλωνοποίησης;
- 4.28. Δυο μόρια DNA περιέχουν 20% και 30% αδενίνη αντίστοιχα. Ποιο από τα δύο θα υποστεί ευκολότερα αποδιάταξη και γιατί;
- 4.29. Να γράψετε δυο μεθόδους παραγωγής αντιγράφων μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων ενός μορίου DNA. Σε τι πλεονεκτεί η μια της άλλης;
- 4.30. Πως θα μπορούσαμε να διαπιστώσουμε εάν ένα φυτό έχει μολυνθεί από ρετροϊό;
- 4.31. Ένα γονίδιο ενσωματώθηκε σ' ένα πλασμίδιο και στο μετασχηματισμένο βακτήριο δεν εκφράζονταν το γονίδιο. Μπορείτε να υποθέσετε μερικούς λόγους για το γεγονός αυτό;

### ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΣΗΣ ΚΕΝΟΥ

- 4.32. Η εισαγωγή ανασυνδυασμένου DNA σε βακτηριακό κύτταρο ξενιστή ονομάζεται .....
- 4.33. Οι ..... παράγονται από τα βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την 'εισβολή' .....DNA.
- 4.34. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού δότη αποτελεί μια.....
- 4.35. Για να γίνει η επιλογή ενός κλώνου που έχει ένα επιθυμητό γονίδιο, χρησιμοποιούνται ειδικοί .....
- 4.36. Η σύνθεση του cDNA γίνεται από το ένζυμο .....
- 4.37. Για να κατασκευαστεί μια ..... απομονώνεται το ολικό mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο.
- 4.38. Κάθε βακτήριο περιέχει αντίγραφα ενός μόνο ..... πλασμιδίου και δίνει ένα .....
- 4.39. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ..... δίκλωνου DNA.
- 4.40. Κλώνος ονομάζεται μια ομάδα ..... μορίων, ..... ή.....
- 4.41. Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει ένα τεράστιο αριθμό από ..... κομμάτια χρωμοσωμικού DNA .

### ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΣΩΣΤΟΥ-ΛΑΘΟΥΣ

- 4.42. Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA έδωσε τη δυνατότητα στον άνθρωπο να τροποποιεί το γενετικό υλικό των οργανισμών.
- 4.43. Η διαδικασία δημιουργίας ομάδας πανομοιότυπων βακτηρίων ονομάζεται PCR
- 4.44. Η DNA δεσμάση μπορεί να ενώσει τμήματα αλυσίδων DNA ενός οργανισμού αλλά και τμήματα DNA διαφορετικών οργανισμών.
- 4.45. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορούν να δράσουν στο DNA των ανθρώπινων κυττάρων, των βακτηρίων, φυτικών, ζωικών κυττάρων και ιών που έχουν δίκλωνο DNA ως γενετικό υλικό.
- 4.46. Οι cDNA βιβλιοθήκες περιέχουν μόνο τα εξώνια των γονιδίων που εκφράζονται σε ένα κύτταρο.
- 4.47. Το ανασυνδυασμένο DNA λέγεται και φορέας κλωνοποίησης.
- 4.48. Κλώνος είναι μια ομάδα πανομοιότυπων κυττάρων.
- 4.49. Για τη δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης χρησιμοποιείται μόνο το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.
- 4.50. Στη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιούνται πρωταρχικά τμήματα.
- 4.51. Τα βακτήρια ενός κλώνου έχουν όλα την ίδια γενετική σύσταση.
- 4.52. Τα πλασμίδια είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.
- 4.53. Μεγάλο ποσοστό από τα βακτήρια δέχεται το ανασυνδυασμένο DNA.
- 4.54. Η EcoR1 κόβει το DNA δημιουργώντας τμήματα με μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα.
- 4.55. Στην κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης χρησιμοποιείται το ένζυμο DNA δεσμάση.
- 4.56. Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει το DNA του οργανισμού δότη που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες.
- 4.57. Τα βακτήρια είναι χρήσιμα όχι μόνο ως φορείς κλωνοποίησης αλλά και γιατί από αυτά απομονώνονται ένζυμα όπως οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η πολυμεράση και η αντίστροφη μεταγραφάση
- 4.58. Ως κύτταρο ξενιστής χρησιμοποιούνται συνήθως βακτήρια που περιέχουν πλασμίδιο.
- 4.59. Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει το σύνολο του DNA του οργανισμού δότη.
- 4.60. Δυο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες κόβουν το DNA του ανθρώπινου κυττάρου σε διαφορετικές θέσεις.

- 4.61. Η μέθοδος PCR είναι μία μέθοδος κλωνοποίησης.
- 4.62. Με τη βοήθεια των αντιβιοτικών, στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη, μπορούμε να επιλέξουμε μόνο τους μετασχηματισμένους κλώνους, δηλαδή αυτούς που έχουν προλάβει πλασμίδιο, είτε αυτό είναι ανασυνδυασμένο, είτε όχι.
- 4.63. Η παραγωγή ανθρώπινων πρωτεϊνών μεταξύ των άλλων και στο ότι ο γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος

#### ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΕΠΙΛΟΓΗΣ

- 4.64. Μετασχηματισμός είναι:
- α) η δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA
  - β) η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA στα βακτήρια
  - γ) η κατασκευή βακτηριακών κλώνων
  - δ) η αύξηση της διαπερατότητας του τοιχώματος των βακτηρίων με χημικές ουσίες
- 4.65. Για την DNA δεσμάση ισχύει:
- α) ενώνει πολυπεπτίδια
  - β) είναι ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σωματίδιο
  - γ) μπορεί να ενώσει κομμάτια DNA
  - δ) είναι ουσία ανιχνευτής
- 4.66. Ο DNA δότης που απομονώνεται από έναν κλώνο μιας cDNA βιβλιοθήκης περιλαμβάνει:
- α) τα εσώνια του γονιδίου
  - β) τα εσώνια και τα εξώνια του γονιδίου
  - γ) μόνο τα εξώνια και αλληλουχίες του DNA που αντιστοιχούν στις αμετάφραστες περιοχές 5' και 3'
  - δ) όλα τα παραπάνω
- 4.67. Τα μονομερή ενός φορέα κλωνοποίησης είναι:
- α) αμινοξέα
  - β) ολιγοπεπτίδια
  - γ) ριβονουκλεοτίδια
  - δ) δεσοξυριβονουκλεοτίδια
- 4.68. Ένα μετασχηματισμένο βακτήριο περιέχει:
- α) ανασυνδυασμένο πλασμίδιο
  - β) πλασμίδιο
  - γ) ένα γονίδιο ανθεκτικότητας
  - δ) ένα γονίδιο του οργανισμού δότη
- 4.69. Ένας κλώνος βακτηρίων περιλαμβάνει:
- α) βακτήρια με αντοχή στα αντιβιοτικά
  - β) βακτήρια που έχουν το ίδιο γενετικό υλικό
  - γ) βακτήρια που έχουν πλασμίδιου
  - δ) τίποτα από τα παραπάνω
- 4.70. Η αποδιάταξη του DNA γίνεται :
- α) με τη χρήση κατάλληλων χημικών ουσιών
  - β) με την αύξηση της θερμοκρασίας
  - γ) με το σπάσιμο υδρογονικών δεσμών
  - δ) με όλα τα παραπάνω
- 4.71. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται σαν ξενιστές ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πρέπει να στερούνται:
- α) πλασμιδίων
  - β) ενδονουκλεασών που να μπορούν να κόψουν το εξωγενές DNA
  - γ) DNA πολυμεράση
  - δ) σχεδόν πάντα το α και σίγουρα το β

- 4.72. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται σαν φορείς κλωνοποίησης πρέπει:
- να έχουν τη δυνατότητα να κόβονται σε πολλά σημεία από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, για να μπορέσουν να μεταφέρουν μεγάλα κομμάτια DNA
  - να διαθέτουν ένα τουλάχιστον γονίδιο που προσδίδει ανοχή σε αντιβιοτικό
  - να μπορούν να αυτοδιπλασιάζονται ανεξάρτητα μέσα στο κύτταρο ξενιστή
  - τα β και γ
- 4.73. Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη από βακτηριοφάγους λ που περιέχει το συνολικό DNA ενός οργανισμού δότη αποτελείται:
- από κλώνους βακτηρίων που είχαν μολυνθεί από το βακτηριοφάγο λ
  - από πλασμίδια που περιέχουν ανασυνδυασμένα μόρια DNA
  - από το σύνολο των φάγων που περιέχουν στο γονιδίωμά τους τα κομμάτια του συνολικού DNA του οργανισμού δότη
  - από ιούς ζωικών κυττάρων που περιέχουν το συνολικό DNA του οργανισμού δότη
- 4.74. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται:
- για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων για τον άνθρωπο
  - για την ανίχνευση ιών που υπάρχουν σε μικρές ποσότητες στο αίμα
  - για τη θεραπεία του καρκίνου
  - για όλα τα παραπάνω
- 4.75. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες
- κόβουν τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ A και G
  - κόβουν τις πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του DNA σε ειδικές θέσεις
  - ενώνουν τμήματα του ανασυνδυασμένου DNA με 3-8 νουκλεοτίδια
  - ενσωματώνουν το DNA του δότη σε ειδική θέση του φορέα κλωνοποίησης
- 4.76. Μερικά βακτήρια φέρουν γονίδιο που σχετίζεται με την ευαισθησία του βακτηρίου σε κάποιο αντιβιοτικό. Αυτό εξυπηρετεί:
- την κλωνοποίηση των βακτηρίων στα οποία έχει εισαχθεί αυτό το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο
  - την καταστροφή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου πριν την εισαγωγή του στο βακτήριο ξενιστή
  - την κλωνοποίηση των βακτηρίων που δεν φέρουν πλασμίδιο
  - την αναπαραγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης

## ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

- 4.77. Σε μια εφαρμογή PCR επιχειρείται η σύνθεση τουλάχιστον 120 αντιγράφων ενός τμήματος κάποιου μορίου DNA. Το τμήμα αυτό συνίσταται από 50.000 νουκλεοτίδια. Η διάρκεια της αντιγραφής του τμήματος αυτού με τη μέθοδο PCR διαρκεί 1 ώρα. Μετά από πόση ώρα θα έχουμε τον επιθυμητό αριθμό αντιγράφων του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει; Πόσα νουκλεοτίδια θα υπάρχουν σ' όλα συνολικά τα αντίγραφα και πόσα νουκλεοτίδια θα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεσή τους; Πόσοι κλώνοι θα έχουν συντεθεί;
- 4.78. Η περιοριστική ενδονουκλεάση MspI κόβει την αλληλουχία -CCGG- μεταξύ των δύο βάσεων C:
- $$\begin{array}{ccc} \text{-C} & & \text{CGG-} \\ \text{-GGC} & & \text{C-} \end{array}$$
- και η Tac I κόβει την αλληλουχία
- $$\begin{array}{ccc} \text{-TCGA-} & \text{μεταξύ των βάσεων T και C:} & \text{-T} & & \text{CGA-} \\ \text{-AGCA-} & & \text{-AGC} & & \text{T-} \end{array}$$
- Δίνεται η αλληλουχία :
- ATTTCGAGCCGGTT**GATTA**ACT**GACCGG**ATATCGCGTCGACCCGG  
TAAGCTCGGCCA**CTAATTGACTGGCCT**ATAGCGCAGCTGGCC
- Το έντονα σκιασμένο τμήμα πρόκειται να κλωνοποιηθεί. Ποια περιοριστική ενδονουκλεάση είναι η κατάλληλη, ποια αλληλουχία πρέπει να διαθέτει ο φορέας κλωνοποίησης, πόσους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς θα σπάσει κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση στο δεδομένο τμήμα και πόσοι είναι οι υδρογονικοί δεσμοί που θα σπάσουν;

- 4.79. Με τη δράση της EcoRI ένα μόριο DNA από ευκαρυωτικό κύτταρο κόπηκε σε 5 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 τη διάσπαση προκάλεσε η EcoRI στα πλασμίδια αυτά;
- 4.80. Για την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης διαθέτεται δύο πλασμίδια και δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η απομόνωσή τους έγινε από την *Escherichia coli* και από τον *Streptococcus pneumoniae*. Η αλληλουχία των βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση της *E.coli* (Eco RI) συναντάται μια μόνο φορά στο πλασμίδιο του *Streptococcus pneumoniae*. Το ίδιο ισχύει και για την άλλη περιοριστική ενδονουκλεάση (SPRI) και το πλασμίδιο EcoRI, μόνο που διαθέτει την αλληλουχία αναγνώρισης από την SPRI δύο φορές. Και τα δύο πλασμίδια διαθέτουν ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε διαφορετικό όμως αντιβιοτικό. Να εξηγήσετε ποιο συνδυασμό βακτηρίων, πλασμιδίου και περιοριστικής ενδονουκλεάσης θα χρησιμοποιήσετε για να κατασκευάσετε την παραπάνω βιβλιοθήκη.
- 4.81. Ένα πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης για την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης διαθέτει 3 γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό (στρεπτομυκίνη, αμπικιλίνη και πενικιλίνη). Η αλληλουχία των βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση βρίσκεται μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας για την αμπικιλίνη. Να εξηγήσετε με ποιον τρόπο θα επιλέξετε τα μετασχηματισμένα βακτήρια που φέρουν το ανασυνδυασμένο DNA, ώστε να προχωρήσετε στη φάση της κλωνοποίησης. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές φέρουν στο κύριο μόριο DNA ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην πενικιλίνη.
- 4.82. Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία 6 ζευγών βάσεων στο DNA. Η περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII αναγνωρίζει μια αλληλουχία 4 ζευγών βάσεων στο DNA. Απομονώνεται το DNA ενός ευκαρυωτικού κυττάρου και δημιουργούνται δυο δείγματα ενός καθαρού παρασκευάσματος DNA σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στο καθένα επιδρούμε με διαφορετική περιοριστική ενδονουκλεάση. Ποιος δοκιμαστικός σωλήνας αναμένεται να περιέχει περισσότερα κομμάτια DNA;
- 4.83. Δίνεται το παρακάτω τμήμα DNA προκαρυωτικού κυττάρου.

GAATTCTTAATGCAAGATCATAAAGAATTCTAG  
CTTAAGAATTACGTTCTAGTATTTCTTAAGATC

Το παραπάνω τμήμα DNA κόβεται με EcoRI προκειμένου να ενσωματωθεί σε κατάλληλο πλασμίδιο που έχει κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, με τελικό σκοπό να εισαχθεί σε βακτήριο για την παραγωγή φαρμακευτικού πολυπεπτιδίου. Να ορίσετε τα 5' και 3' άκρα της παραπάνω αλληλουχίας και να αιτιολογήσετε την απάντησή σας

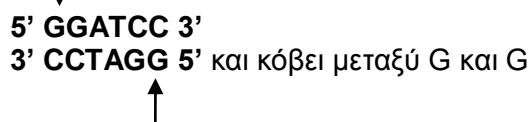
Να βρείτε την αλληλουχία των αμινοξέων του πολυπεπτιδίου με τη χρήση του γενετικού κώδικα. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

- 4.84. Πλασμίδιο που αποτελείται από  $3 \times 10^6$  ζεύγη αζωτούχων βάσεων σπάει με την επίδραση της EcoRI σε δύο θραύσματα A και B, από τα οποία το A με διπλάσιο αριθμό βάσεων του B. Στο θραύσμα A πραγματοποιήθηκε ανάλυση αζωτούχων βάσεων, η οποία έδειξε ότι περιέχει  $8 \times 10^5$  βάσεις αδενίνης. α) Ποια αλληλουχία βάσεων αναγνωρίζει η EcoRI και πόσες φορές η αλληλουχία αυτή απαντάται μέσα στο πλασμίδιο; Καταγράψτε την πριν και μετά τη δράση του ενζύμου. β) Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί περιέχονται μέσα στο πλασμίδιο και πόσοι στο θραύσμα A; γ) Πόσοι δεσμοί υδρογόνου συγκρατούν ενωμένους τους δύο κλώνους του θραύσματος A; δ) Ποια η εκατοστιαία αναλογία του αθροίσματος των βάσεων γουανίνης και κυτοσίνης στο θραύσμα A και σε κάθε μία αλυσίδα ξεχωριστά; (Προσ. 2002)
- 4.85. Βακτηριακό DNA τέμνεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI1. Ένα από τα θραύσματα που προκύπτουν περιέχει 312 θυμίνες, ενώ οι δύο αλυσίδες τους συγκρατούνται με 2446 δεσμούς υδρογόνου. Να υπολογίσετε α) τον αριθμό των υπολοίπων αζωτούχων βάσεων του τμήματος, β) τον αριθμό των φωσφοδιεστερικών δεσμών που περιλαμβάνονται στο τμήμα αυτό. (α) 610 G, C β) 1842 φ.δ)
- 4.86. Η επίδραση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI σε μόριο DNA προκάλεσε το σπάσιμο 16 φωσφοδιεστερικών δεσμών. α) πόσοι δεσμοί υδρογόνου έσπασαν; β) πόσα θραύσματα προέκυψαν; (α) 64,β) 8 ή 9)

- 4.87. Μόριο DNA απομονώνεται από πυρήνα ευκαρυωτικού κυττάρου και στη συνέχεια υποβάλλεται με τη μέθοδο PCR σε 8 κύκλους αντιγραφής. Το προϊόν αναλύεται σ προς τη σύσταση των βάσεων του και προκύπτει ότι περιέχει 102400 βάσεις A και 76800 βάσεις C. Να βρείτε α) από πόσους κλώνους μορίων αποτελείται το μείγμα β) τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου στο μόριο. (α)1 κλώνος / β) 1700 )
- 4.88. Προκειμένου να κλωνοποιήσουμε επιλεγμένο τμήμα DNA, κατασκευάσαμε ένα τεχνητό πλασμίδιο, που περιλαμβάνει:
- α. γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη,
  - β. γονίδιο που κωδικοποιεί ένζυμο, το οποίο μετατρέπει την άχρωμη ουσία A σε έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο B. Το γονίδιο αυτό περιλαμβάνει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI.
- Αφού πραγματοποιήθηκαν όλα τα στάδια παραγωγής του ανασυνδυασμένου μορίου DNA (πλασμιδίου) και εισαγωγής του σε βακτήρια – ξενιστές, προέκυψαν:
- i. Βακτήρια που δεν είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.
  - ii. Άχρωμες αποικίες ανθεκτικές στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.
  - iii. Αποικίες μπλε χρώματος ανθεκτικές στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.
- Από ποια αποικία θα επιλεγούν τα βακτήρια, που περιέχουν το επιθυμητό τμήμα DNA; Αιτιολογήστε την απάντησή σας  
(Χρησιμοποιήσαμε ως ξενιστές βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια και είναι ευαίσθητα στα αντιβιοτικά.)
- 4.89. Ένα πλασμίδιο υπόκειται στη δράση της EcoRI, οπότε παράγονται δύο τμήματα των 2Kb και 6Kb αντίστοιχα (Kb= χιλιάδες ζεύγη βάσεων). Όταν το ίδιο πλασμίδιο υπόκειται στη δράση της HINDIII, παράγονται 2 τμήματα 1,5Kb και 6,5 Kb. Από την ταυτόχρονη επώαση του πλασμιδίου και με τις 2 περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται 4 τμήματα 0,5Kb , 1Kb, 1,5Kb και 5Kb. Να απεικονίσετε στο πλασμίδιο τις σχετικές θέσεις αναγνώρισης των 2 ενδονουκλεασών.
- 4.90. Δίκλωνο και γραμμικό μόριο DNA τέμνεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση A σε 2 τμήματα των 12Kb και 22Kb αντίστοιχα (Kb= χιλιάδες ζεύγη βάσεων). Αντίγραφο του μορίου υποβάλλεται σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ώστε να παραχθούν τουλάχιστον 800 νέα αντίγραφα. Στο προϊόν της αντίδρασης επιδρά η περιοριστική ενδονουκλεάση A και ταυτόχρονα μια άλλη, η B, οπότε παράγονται 3.072 θραύσματα, μεταξύ των οποίων και 1024 θραύσματα μήκους 6 Kb βάσεων, το καθένα από τα οποία φέρει διαφορετικές αλληλουχίες στα μονόκλινα άκρα του. Τι μήκος έχουν τα υπόλοιπα θραύσματα; (1024 των 12Kb & 1024 των 16Kb)
- 4.91. Σε ένα πλασμίδιο, που είχε χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση, συνέβη μια μετάλλαξη, δηλ μια αλλαγή στην αλληλουχία βάσεων του. Μετά τη μετάλλαξη το μόριο κρίθηκε ως ακατάλληλος φορέας κλωνοποίησης. Μπορείτε να προσδιορίσετε τις πιθανές θέσεις του πλασμιδίου στο οποίο συνέβη η αλλαγή, ώστε να επηρεαστεί η καταλληλότητά του; (4 πιθανοί λόγοι)
- 4.92. Ένα μόριο RNA αποτελείται από 30 νουκλεοτίδια και αποτελεί ανιχνευτή για συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων σε γονίδιο. Για την αναλογία των βάσεων στο μόριο του ανιχνευτή είναι γνωστό ότι ισχύει  $A+U/G+C=2$  . Από κλώνο βακτηρίων απομονώθηκαν 10 πλασμίδια. Τα πλασμίδια αυτά αποδιατάσσονται και στη συνέχεια αναμειγνύονται με 12 μόρια ανιχνευτή. Να υπολογίσετε τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται κατά την υβριδοποίηση. ( $70 \cdot 10 = 700$  δεσμοί υδρογόνου)
- 4.93. Η παρακάτω αλληλουχία βάσεων αποτελεί το mRNA που απομονώθηκε από ανθρώπινο κύτταρο με σκοπό την παραγωγή ανθρώπινης πρωτεΐνης με την τεχνική της cDNA βιβλιοθήκης

**5' GGAUCCCAGAUGGAAUUC...167 νουκλ. .. CGAUGACCGGAUCCGAAUUC 3'**

Για τη δημιουργία της βιβλιοθήκης μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλασμίδιο, το οποίο έχει μία θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI και μία για την BamHI. Η BamHI αναγνωρίζει την αλληλουχία



(Να σημειωθεί ότι η αλληλουχία των 167 βάσεων δεν κόβεται από καμία εκ των 2 ενδονουκλεασών.)

- α. Από πόσα αμινοξέα αποτελείται κατά τη σύνθεσή της η παραπάνω πρωτεΐνη και γιατί;
- β. Να γράψετε την αλληλουχία βάσεων που θα συντεθούν *in vitro* από αυτή την αλληλουχία κατά την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης σημειώνοντας σε κάθε περίπτωση τα 5' και 3' άκρα τους.
- γ. Ποια από τις 2 περιοριστικές ενδονουκλεάσες θα χρησιμοποιηθεί προκειμένου να κοπεί το DNA που θα προκύψει από την προηγούμενη διαδικασία για να εισαχθεί στο πλασμίδιο και γιατί;

4.94. Δίνεται το τμήμα βακτηριακού DNA, το οποίο κωδικοποιεί ένα ολιγοπεπτίδιο:

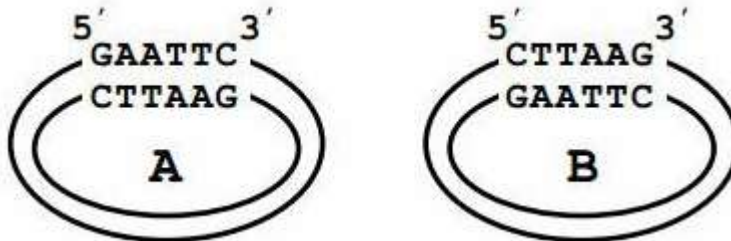
**Αλυσίδα 1: GTTGAATTCTTAGCT TAAGTCGGGCATGAATT CTC**

**Αλυσίδα 2: CAACTTAAGAATCGAATTCAGCCCGT ACTT AAGAG**

α. Να προσδιορίσετε την κωδική και τη μη κωδική αλυσίδα του τμήματος DNA επισημαίνοντας τα 5' και 3' άκρα των αλυσίδων. Αιτιολογήστε

β. Το ακόλουθο τμήμα αντιγράφεται και, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής, δημιουργούνται τα ακόλουθα πρωταρχικά τμήματα: i) 5' GAGAAUUC 3' ii) 5' UUAAGCUA3' iii) 5' GUUGAAUU 3' Να αιτιολογήσετε ποια αλυσίδα αντιγράφεται με συνεχή και ποια με ασυνεχή τρόπο.

γ. Το παραπάνω τμήμα DNA κόβεται με το ένζυμο EcoRI, προκειμένου να ενσωματωθεί σε ένα από τα δύο πλασμίδια A και B που δίνονται στο σχήμα:



Ποιο από τα δύο πλασμίδια θα επιλέξετε για τη δημιουργία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου; Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί θα σπάσουν στο πλασμίδιο που επιλέξατε και πόσοι θα δημιουργηθούν κατά το σχηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου;

4.95. Από μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη απομονώθηκαν 3 αλληλουχίες που αποδιατάχθηκαν με θέρμανση προκειμένου να εντοπιστεί μέσω ανιχνευτή συγκεκριμένο γονίδιο που περιέχεται σε μια από αυτές. Ο ανιχνευτής που περιέχεται σε μια από αυτές. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε περιείχε την αλληλουχία βάσεων 3' **UAAAAUUAUGGGCUUG** 5'

α. Με ποια χρονική σειρά αποδιατάχθηκαν οι 3 παρακάτω αλληλουχίες; Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.

β. Ποια αλληλουχία υβριδοποιεί ο ανιχνευτής;

γ. Η αλληλουχία που υβριδοποιεί ο ανιχνευτής είναι η κωδική ή η μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου;

1<sup>η</sup> 3' **GAGAGTACATTTTATATACCCG** AACTCCGACTCCGAG 5'  
5' **CTCTC** ATGTAAAATATATGGGCTTGAGGCTGAGGCTC 3'

2<sup>η</sup> 3' **CCCCGAGAATTTT** AAAATATATGGGCTTGTAGGGCAA 5'  
5' **GGGGCTCTT** AAAATTTT ATATACCCGAACATCCCGTT 3'

3<sup>η</sup> 3' **CATCCGAGGATATATTTATATATCCCC** TTGTAGGCCC 5'  
5' **GTAGGCT** CCTATATAAATATATAGGGGAACATCCGGG 3'