

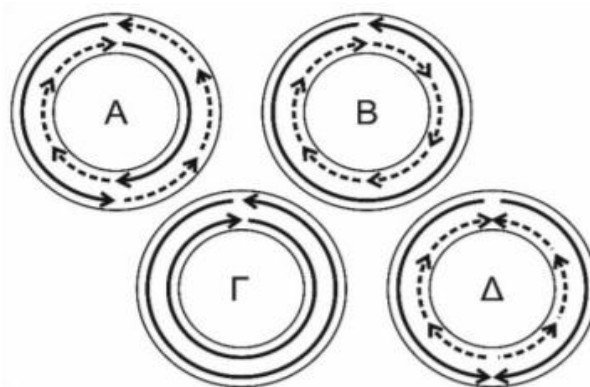
Ασκήσεις και προβλήματα στο 4^ο Κεφάλαιο

Άσκηση 1^η

Ποιο από τα παρακάτω μοντέλα είναι αυτό που αναπαριστάνει πιστά την αντιγραφή του πλασμιδίου;

(Η συνεχής γραμμή υποδηλώνει την συνεχή αντιγραφή και η διακεκομμένη την ασυνεχή.)

Να αιτιολογήσετε την επιλογή που κάνατε.



Άσκηση 2^η

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

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

Να αιτιολογήσετε την επιλογή που κάνατε.

Άσκηση 3^η

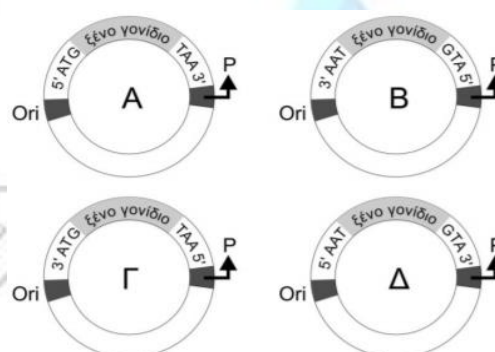
Ποιο από τα παρακάτω τμήματα DNA θα μπορούσε να συνδεθεί σε ένα άκρο που θα είχε προκύψει με το ένζυμο EcoRI;

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

Άσκηση 4^η

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

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.



Άσκηση 5^η

Πλασμίδια φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη και γονίδιο του οποίου το πρωτεϊνικό προϊόν είναι ένζυμο (β-γαλακτοζιδάση), που μετατρέπει μία άχρωμη ουσία (X-gal), που υπάρχει στο θρεπτικό υλικό και την οποία προσλαμβάνει το βακτήριο, σε μπλε. Τα πλα-

σμίδια έχουν την αλληλουχία που κόβει η EcoRI μέσα στο γονίδιο που παράγει το ένζυμο. Μετά τον ανασυνδυασμό των πλασμιδίων με τμήματα DNA και την εισαγωγή τους σε βακτήρια ξενιστές (μετασχηματισμός) πήραμε τρεις πληθυσμούς βακτηρίων:

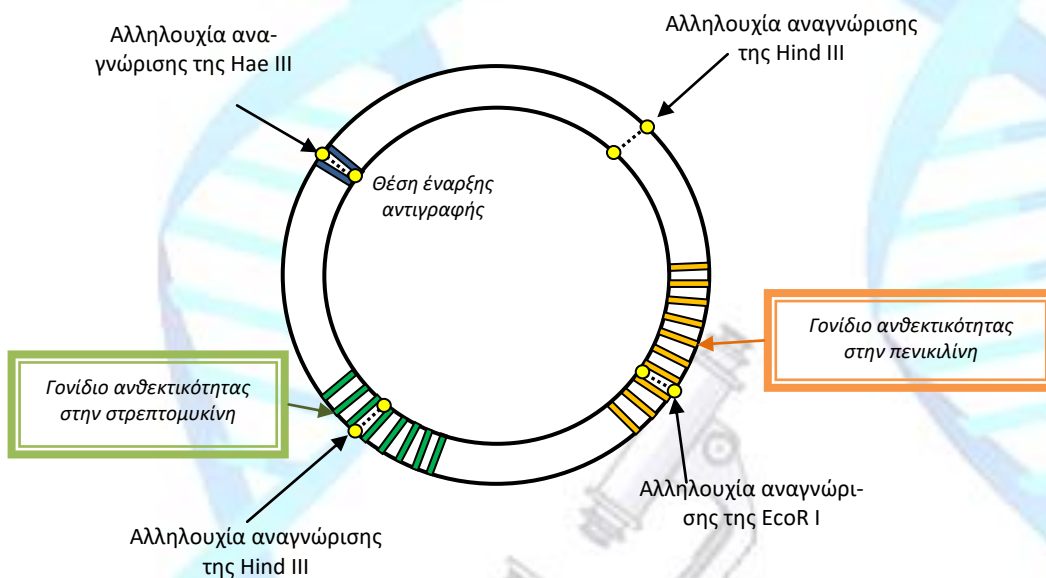
- α. Βακτήρια μη ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη,
- β. Βακτήρια μπλε και ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη,
- γ. Βακτήρια άχρωμα και ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη

Ποια από τα παραπάνω βακτήρια πρέπει να επιλεγούν με χρήση του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη για να αποτελέσουν μέρος γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

Άσκηση 6^η

Στο διάγραμμα απεικονίζεται ένα πλασμίδιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης.

Με βάση τα δεδομένα του διαγράμματος, ποια περιοριστική ενδονουκλεάση είναι η κατάλληλη για τον τεμαχισμό του συγκεκριμένου πλασμιδίου; Δικαιολογήστε την απάντησή σας.



Άσκηση 7^η

Πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης, περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη και το οπερόνιο της λακτόζης.

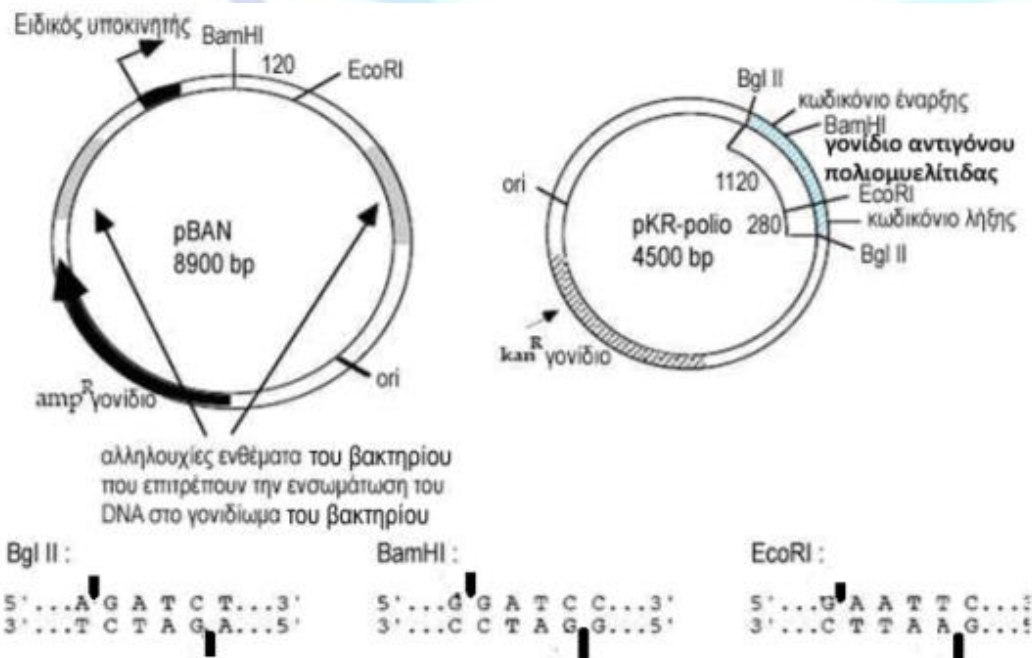
1) Η περιοριστική ενδονουκλεάση Hind III τέμνει το πλασμίδιο στον υποκινητή του γονιδίου ανθεκτικότητας, 2) η περιοριστική ενδονουκλεάση Not I τέμνει το πλασμίδιο στη θέση έναρξης της αντιγραφής και 3) η περιοριστική ενδονουκλεάση Hae III τέμνει το πλασμίδιο στον υποκινητή των δομικών γονιδίων και σε ένα ακόμη σημείο. Το πλασμίδιο αυτό πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Για το λόγο αυτό αρχικά ανασυνδυάζεται με το DNA του οργανισμού δότη και στη συνέχεια μετασχηματίζει βακτήρια *Staphylococcus* που έχουν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη.

Να εξηγήσετε:

- α. Ποια περιοριστική ενδονουκλεάση είναι καταλληλότερη.
- β. Πως θα διαχωριστούν τα μετασχηματισμένα από τα μη μετασχηματισμένα στελέχη του βακτηρίου *Staphylococcus*.

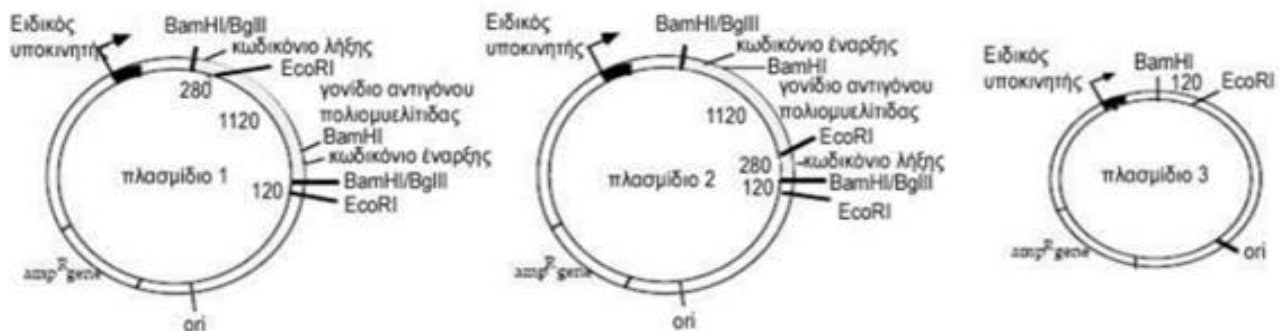
Άσκηση 8^η

Το γονίδιο που κωδικοποιεί μια φαρμακευτική πρωτεΐνη που χρησιμεύει στην παραγωγή εμβολίου κατά της πολιομυελίτιδας έχει ήδη κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο pKR-polio που περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη (kan^R). Προκειμένου να ενσωματωθεί το γονίδιο αυτό στο DNA του βακτηρίου, πρέπει να συνδεθεί με έναν εξειδικευμένο για το βακτήριο υποκινητή και συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Οι παραπάνω αλληλουχίες περιέχονται στο πλασμίδιο pBAN, το οποίο φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (amp^R). Οι χάρτες των παρακάτω πλασμιδίων, συμπεριλαμβανομένων των θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών φαίνονται στο σχήμα που ακολουθεί.



Να απαντήσετε στις παρακάτω ερωτήσεις.

- α. Κατά τη διαδικασία μεταφοράς του γονιδίου από το pKR-polio στο pBAN, ποια περιοριστική ενδονουκλεάση θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε πλασμίδιο; Ακολούθως, μετασχηματίζονται κύτταρα *E. coli* με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.
- β. Ποιο(α) αντιβιοτικό(α) θα περιέχει το θρεπτικό υλικό στο οποίο καλλιεργηθούν τα μετασχηματισμένα κύτταρα;
- γ. Ποιο από τα παρακάτω πλασμίδια που θα προκύψουν θα επιτρέψει την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης;



Άσκηση 9^η

Στο ίδιο βακτήριο εισάγονται ταυτόχρονα δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια: το πλασμίδιο Α και το πλασμίδιο Β. Στο πλασμίδιο Α έχει εισαχθεί το ευκαρυωτικό γονίδιο α, μαζί με τον υποκινητή του, σε θέση που βρίσκεται μακριά από υποκινητές γονιδίων του πλασμιδίου. Το πλασμίδιο Β φέρει το ευκαρυωτικό γονίδιο β, χωρίς υποκινητή, το οποίο όμως έχει εισαχθεί δίπλα στον υποκινητή ενός γονιδίου του πλασμιδίου. Τα γονίδια α και β αποτελούνται μόνο από εξώνια και φέρουν τη γενετική πληροφορία για τη σύνθεση των πρωτεϊνών α και β αντίστοιχα.

Ποια από τις προτάσεις που ακολουθούν είναι η σωστή:

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

Να αιτιολογήσετε την επιλογή που κάνατε.

Άσκηση 10^η

Να τοποθετήσετε τα παρακάτω μόρια DNA κατά σειρά αύξουσας αποδιάταξης μετά από επίδραση στα μόρια μεγάλης ποσότητας θερμότητας.

- α. 5'-AAGTTCTCTGAA-3'
3'-TTCAAGAGACTT-5'
- β. 5'-AGTCGTCAATGCGG-3'
3'-TCAGCAGTTACGCC-5'
- γ. 5'-GGACCTCTCAGG-3'
3'-CCTGGAGAGTCC-5'

Να αιτιολογήσετε την επιλογή που κάνατε.

Άσκηση 11^η

Θέλετε να μελετήσετε τη γ-κρυσταλλίνη του ανθρώπου, μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο φακό του ματιού. Για να αποκτήσετε επαρκή ποσότητα της πρωτεΐνης αποφασίζετε να κλωνοποιήσετε το γονίδιο της γ-κρυσταλλίνης με την τεχνική της cDNA βιβλιοθήκης. Σχετικά με τη διαδικασία της τεχνικής αυτής, να τοποθετήσετε τα παρακάτω βήματα στη σωστή σειρά:

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

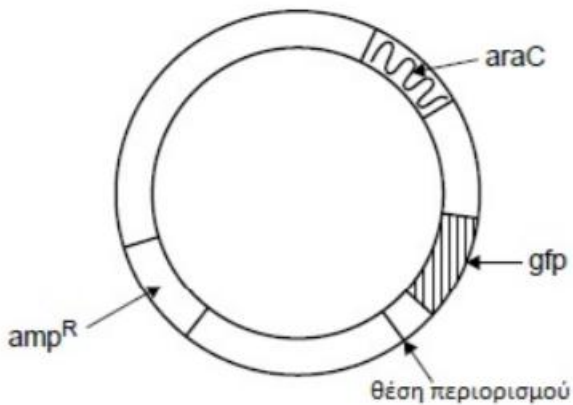
Άσκηση 12^η

Για την κλωνοποίηση ενός γονιδίου Χ τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

1. Το πλασμίδιο που εικονίζεται παρακάτω κόβεται από μία συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκlease.
2. Το γονίδιο Χ εισάγεται στο πλασμίδιο.

3. Τα πλασμίδια μετασχηματίζουν βακτήρια.

4. Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό με άγαρ και συστατικά όπως φαίνονται στον πίνακα.



Αυτό το πλασμίδιο περιέχει θέση στην οποία κόβει η περιοριστική ενδονουκlease και τα παρακάτω τρία γονίδια:

- *amp^R* – προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.
- *gfp* – κωδικοποιεί την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), η οποία φθορίζει σε υπεριώδη ακτινοβολία.
- *araC* – κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που απαιτείται για να προκαλέσει την έκφραση του *gfp* όταν είναι παρούσα η αραβινόζη.

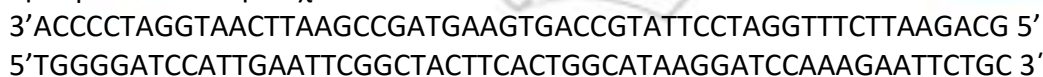
Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του πειράματος του βακτηριακού μετασχηματισμού.

Τρυβλίο	I	II	III	IV
Εικόνα τρυβλίου				
Θρεπτικό υλικό	Μόνο άγαρ	Άγαρ, στρεπτομικίνη και αραβινόζη	Άγαρ, αμπικιλίνη και αραβινόζη	Άγαρ και αμπικιλίνη
Περιγραφή αποτελέσματος	Όλη η επιφάνεια με βακτήρια		Παρούσες αποικίες βακτηρίων	Παρούσες αποικίες βακτηρίων

- Ποιο τρυβλίο θα περιέχει βακτήρια που φθορίζουν σε υπεριώδη ακτινοβολία;
- Τι είδους βακτήρια αναπτύσσονται στο τρυβλίο I ;
- Τι είδους βακτήρια αναπτύσσονται στο τρυβλίο II ;
- Σε ποιο τρυβλίο θα υπάρχουν αποκλειστικά μετασχηματισμένα βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;

Άσκηση 13^η

Δίνεται η παρακάτω αλληλουχία DNA:



I. Η συγκεκριμένη αλληλουχία επωάζεται με την περιοριστική ενδονουκlease *Bam*H1, που αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' \text{ -G} \downarrow \text{GATCC-3'}$

$3' \text{ -CCTAG} \downarrow \text{G-5'}$ και κόβει όπως υποδηλώνει το σύμβολο «↓».

- Πόσα τμήματα θα προκύψουν μετά την δράση της *Bam*H1;
- Πόσα τμήματα θα προκύψουν αν η συγκεκριμένη αλληλουχία επωασθεί και με την *Bam*H1 και την *Eco*RI;

II. Από την συγκεκριμένη αλληλουχία επιθυμούμε να απομονώσουμε και να κλωνοποιήσουμε το τμήμα 5'ATGCCAGTGAAGTAG3'.

Μετά από επώαση της συγκεκριμένης αλληλουχίας με EcoRI, πρόκειται να δοκιμαστούν διάφοροι ανιχνευτές για την ανίχνευση του τμήματος, το οποίο περιέχει τη συγκεκριμένη αλληλουχία:

1. 3' TTAAGAAACC5'
2. 3' CTTTGGATCC 5'
3. 3' CGGCTACTTC5'
4. 3' AGGTAACCTTA 5'

γ. Ποια από τις παραπάνω αλληλουχίες είναι ο καταλληλότερος ανιχνευτής; Να αιτιολογήσετε την επιλογή που κάνατε.

Άσκηση 14^η

Αν υποθεθεί ότι είναι επιθυμητή η δημιουργία μίας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του ανθρώπου, οι κλώνοι της οποίας να περιέχουν όσο το δυνατό μικρότερου μήκους τμήματα DNA, ποια από τις παρακάτω περιοριστικές ενδονουκλεάσες πρέπει να επιλεγεί;

Πόσα είναι τα θεωρητικά αναμενόμενα θραύσματα και το μέσο εκτιμώμενο μήκος τους, που θα δημιουργήσει κάθε ένα από αυτά τα ένζυμα στο απλοειδές ανθρώπινο γονιδίωμα;

Περιοριστική ενδονουκλεάση

Θέση αναγνώρισης

1. NotI

5' GC ↓ GGCCGC 3'

3' CGCCGG ↑ CG 5'

2. HhaI

5' GCG ↓ C 3'

3' C ↑ GCG 5'

3. BamHI

5' G ↓ GATCC 3'

3' CCTA G ↑ G 5'

Άσκηση 15^η

Το απλοειδές ανθρώπινο γονιδίωμα φέρει συνολικά $1,2 \cdot 10^7$ θέσεις αναγνώρισης από την ενδονουκλεάση HhaI που αναγνωρίζει την αλληλουχία:

5' GCG ↓ C 3'

3' C ↑ GCG 5'

α. Πόσα τμήματα DNA θα προκύψουν συνολικά μετά τη δράση της HhaI στο απλοειδές ανθρώπινο γονιδίωμα;

β. Πόσα τμήματα DNA είναι δυνατόν να παραχθούν που θα φέρουν δύο μονόκλωνα άκρα;

γ. Πόσα τμήματα DNA δεν θα μπορούν να ενσωματωθούν σε πλασμίδια που έχουν υποστεί επεξεργασία με την HhaI;