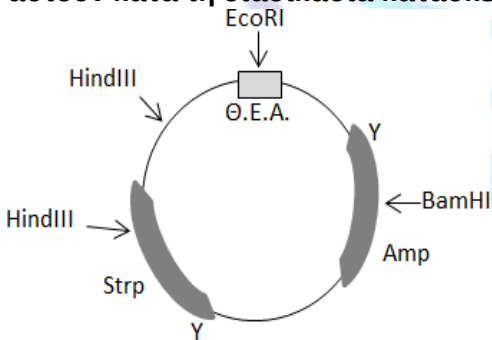


ΘΕΜΑ 4

13. Η «Green Fluorescent Protein» ή GFP, μια πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, παράγεται φυσιολογικά από τις μέδουσες του είδους *Aequorea victoria*, οι οποίες αποτελούν ευκαρυωτικούς οργανισμούς, που ζουν, κυρίως, στις δυτικές ακτές της Νοτίου Αμερικής. Μια ερευνητική ομάδα θέλει να τροποποιήσει με τις μεθόδους της γενετικής μηχανικής κάποια βακτήρια ώστε να φθορίζουν με πράσινο χρώμα.

α. Να εξηγήσετε ποιο είδος βιβλιοθήκης (γονιδιωματική ή cDNA) θα πρέπει να κατασκευάσουν οι ερευνητές ώστε να κλωνοποιήσουν και να εκφράσουν την πρωτεΐνη GFP στα βακτήρια (μονάδες 3). Να ονομάσετε τα ένζυμα, εκτός από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που θα χρειαστούν κατά τη διαδικασία κατασκευής της βιβλιοθήκης (μονάδες 3).



Θ.Ε.Α. = θέση έναρξης της αντιγραφής

Strp = Γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη

Amp = Γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη

Υ = θέση υποκινητή αντιστοιχων γονιδίων

Με βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI, BamHI και HindIII.

β. Οι ερευνητές έχουν στη διάθεσή τους το παραπάνω πλασμίδιο που θα χρησιμοποιήσουν ως φορέα κλωνοποίησης. Να εξηγήσετε ποια περιοριστική ενδονουκλεάση θα επιλέξουν για να κατασκευάσουν μόρια ανασυνδυασμένου DNA (μονάδες 6).

Μονάδες 12

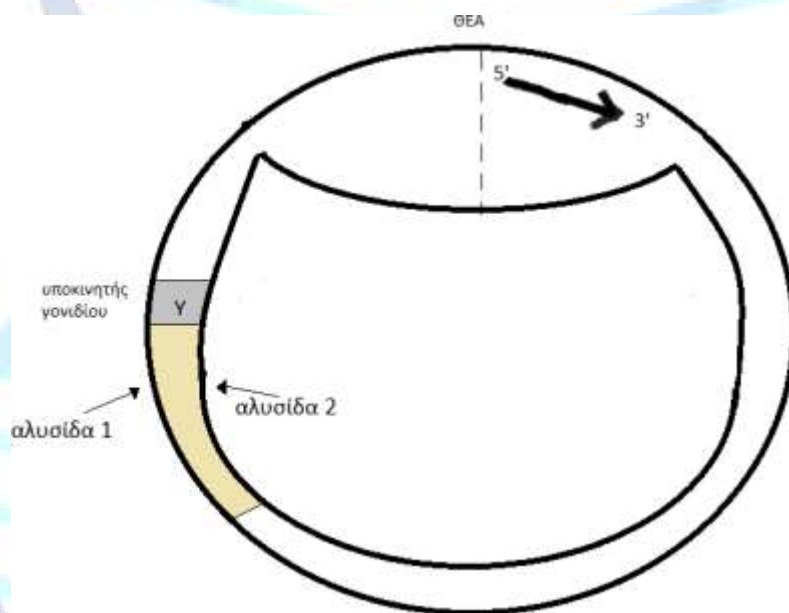
α. Οι ερευνητές θα πρέπει να κατασκευάσουν cDNA βιβλιοθήκη για να κλωνοποιήσουν και να εκφράσουν την πρωτεΐνη GFP στα βακτήρια. Η πρωτεΐνη GFP εκφράζεται φυσιολογικά σε ευκαρυωτικό οργανισμό και συνεπώς, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή είναι πιθανότατα ασυνεχές (ή διακεκομμένο), δηλαδή περιέχει εσώνια. Έτσι, το mRNA που παράγεται κατά τη μεταγραφή του γονιδίου αυτού δεν είναι έτοιμο να μεταφραστεί αμέσως, αλλά πρέπει να υποστεί ωρίμανση, έναν μηχανισμό που δεν διαθέτουν τα βακτήρια ως προκαρυωτικοί οργανισμοί. Εάν οι ερευνητές εισήγαγαν το γονίδιο της GFP στα βακτήρια κατά τη διαδικασία κατασκευής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, τα βακτήρια δεν θα παρήγαγαν σωστά τη πρωτεΐνη (δεν θα ήταν λειτουργική) επειδή δεν διαθέτουν το μηχανισμό ωρίμανσης του mRNA. Επίσης, μπορεί να μεταφερόταν στα βακτήρια τμήμα του γονιδίου και όχι ολόκληρο. Συνεπώς, τα βακτήρια δεν θα φθόριζαν με πράσινο χρώμα. Για να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, οι ερευνητές μπορούν να κατασκευάσουν cDNA βιβλιοθήκη, στην οποία το προς κλωνοποίηση γονίδιο της GFP θα φέρει μόνο τα εξώνια, εφόσον βασίζεται στην απομόνωση ώριμου mRNA από τα κύτταρα της μέδουσας.

Τα ένζυμα που θα χρειαστούν είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, η DNA πολυμεράση και η DNA δεσμάση.

β. Η περιοριστική ενδονουκλεάση που πρέπει να χρησιμοποιήσουν είναι η BamHI. Η BamHI κόβει μια φορά το πλασμίδιο εσωτερικά του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλ-

λίνη, ενώ παραμένει άθικτο το άλλο γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, κάτι που θα βοηθήσει τους ερευνητές κατά τη διαδικασία επιλογής των βακτηριακών κλώνων. Απορρίπτεται η HindIII, επειδή κόβει το πλασμίδιο σε δύο σημεία και η EcoRI γιατί κόβει στη θέση έναρξης της αντιγραφής, άρα θα χαθεί η δυνατότητα αντιγραφής του πλασμιδίου στα βακτήρια, και συνεπώς, η κλωνοποίηση του γονιδίου.

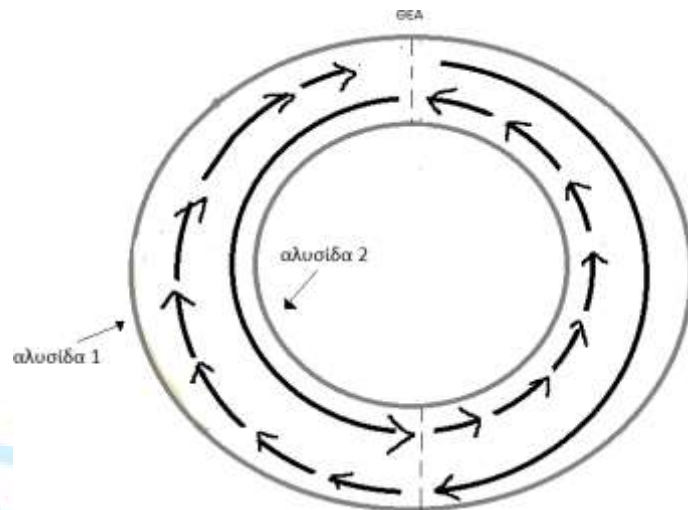
29. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται ένα πλασμίδιο, πάνω στο οποίο υποδεικνύεται η θηλιά της αντιγραφής από τη μοναδική θέση έναρξης της αντιγραφής που διαθέτει. Το έντονο βέλος αναπαριστά τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα που σχηματίζεται με συνεχή σύνθεση στη αντίστοιχη διχάλα. Επίσης, στο πλασμίδιο αυτό περιέχεται ένα γονίδιο του οποίου ο υποκινητής συμβολίζεται με Υ.



- α. Να μεταφέρετε την εικόνα του πλασμιδίου στο τετράδιο σας και να συμπληρώσετε τη θηλιά της αντιγραφής με τμήματα DNA (τα τμήματα συμβολίζονται με βέλη) μέχρι να ολοκληρωθεί η λειτουργία της DNA πολυμεράσης σε όλο το πλασμίδιο (μονάδες 4). Να ονομάσετε το ένζυμο που θα ενώσει στη συνέχεια τα ασυνεχή τμήματα DNA που σχηματίστηκαν (μονάδες 2).
- β. Να εξηγήσετε ποια αλυσίδα (αλυσίδα 1 ή 2) είναι η κωδική και ποια αλυσίδα είναι η μεταγραφόμενη του σχεδιασμένου γονιδίου, αφού υποδείξετε τον προσανατολισμό των δύο αλυσίδων του (μονάδες 6).

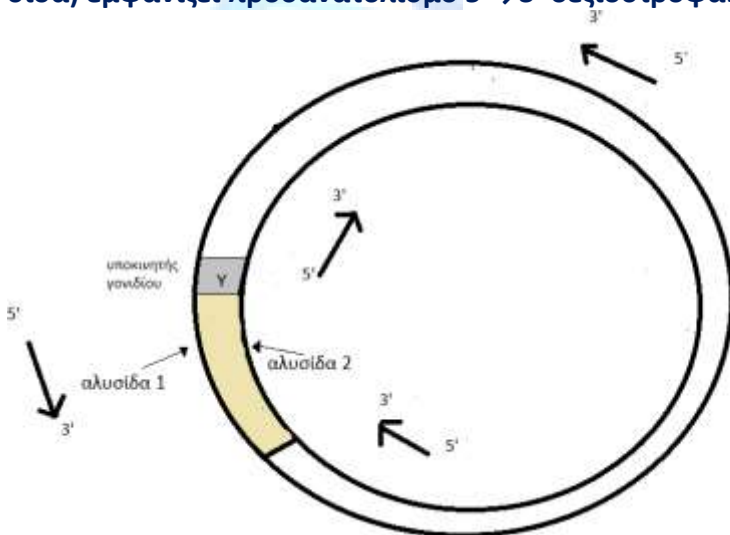
Μονάδες 12

α.



Το ένζυμο που ενώνει τα ασυνεχή τμήματα με φωσφοδιεστερικό δεσμό ονομάζεται DNA δεσμάση.

β. Από τον προσανατολισμό της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας στη διχάλα που δίνει το σχήμα, προσδιορίζουμε τον προσανατολισμό της μητρικής αλυσίδας 1 (έξω αλυσίδα), ο οποίος συμβολίζεται στο σχήμα με βέλος. Ο προσανατολισμός $5' \rightarrow 3'$ είναι αριστερόστροφος (αντίθετος από τους δείκτες του ρολογιού). Λόγω της αντιπαράλληλης, η μητρική αλυσίδα 2 (εσωτερική αλυσίδα) εμφανίζει προσανατολισμό $5' \rightarrow 3'$ δεξιόστροφα.



Συνεπώς, στην περιοχή του γονιδίου, η εξωτερική αλυσίδα 1 έχει προσανατολισμό $5' \rightarrow 3'$ μετά το υποκινητή του γονιδίου και αποτελεί την κωδική αλυσίδα του γονιδίου. Η αλυσίδα 2 είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη και είναι η μεταγραφόμενη, μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου, καθώς έχει το $3'$ άκρο της στον υποκινητή και με καλούπι αυτή την αλυσίδα θα πραγματοποιηθεί η μεταγραφή με προσανατολισμό $5' \rightarrow 3'$.

30. Για την δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων χρησιμοποιούνται οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ειδικά ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 ζευγών νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA. Για τις ανάγκες ενός πειράματος απομονώθηκαν τέσσερις διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες (ένζυμα 1-4) που αναγνωρίζουν και κόβουν τις παρακάτω αλληλουχίες. Τα βέλη δείχνουν το σημείο που κόβει κάθε φορά η περιοριστική ενδονουκλεάση.

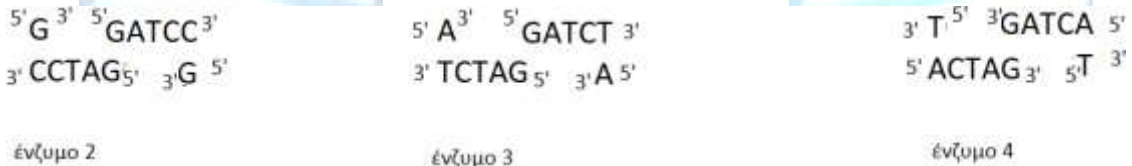


α. Να εξηγήσετε ποιες από τις παραπάνω αλληλουχίες δημιουργούν μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα στα κομμένα άκρα όταν κοπούν από τη συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση που τις αναγνωρίζει (μονάδες 3). Να γράψετε τον προσανατολισμό των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων στα κομμένα άκρα που δημιουργούνται, όταν οι παραπάνω αλληλουχίες κοπούν από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που δημιουργούν μονόκλωνα άκρα (μονάδες 3).

β. Για τον ανασυνδυασμό ενός πλασμιδίου, κόβουμε με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, τόσο το επιθυμητό τμήμα, όσο και το πλασμίδιο, αλλά μπορούμε να κόψουμε και με δύο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες υπό κατάλληλη προϋπόθεση. Να εξηγήσετε αν μπορούμε να δημιουργήσουμε ανασυνδυασμένα πλασμίδια, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά από τα παραπάνω ένζυμα (μονάδες 7).

Μονάδες 13

α. Το ένζυμο 1 κόβει κατά τέτοιο τρόπο που δεν δημιουργούνται μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις, ώστε να ενωθούν στη συνέχεια τα διαφορετικά τμήματα που φέρουν συμπληρωματικά, κολλώδη άκρα, χρησιμοποιώντας αποκλειστικά το ένζυμο DNA δεσμάση. Τα άλλα τρία ένζυμα 2,3,4 δημιουργούν μονόκλωνα άκρα. Οι προσανατολισμοί των αλυσίδων στα κομμένα άκρα φαίνονται παρακάτω:



β. Το ένζυμο 2 και 3 δημιουργούν μεταξύ τους τα ίδια μονόκλωνα άκρα με τον κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να μπορούν να σχηματιστούν οι δεσμοί υδρογόνου και να ενωθούν τμήματα που έχουν κοπεί με ένα από αυτά, δηλαδή το πλασμίδιο μπορεί να έχει κοπεί με το ένζυμο 2 και το τμήμα που θέλουμε να ενσωματωθεί με το ένζυμο 3 και αντίστροφα. Το ένζυμο 4, δημιουργεί τμήματα με την ίδια αλληλουχία αλλά με αντίθετο προσανατολισμό και δεν μπορεί να συνδυαστεί ούτε με το ένζυμο 2, ούτε με το 3.

31. Αν θέλουμε να κλωνοποιήσουμε μόνο τα γονίδια που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα, τότε κατασκευάζουμε τις cDNA βιβλιοθήκες. Για την κατασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης απομονώθηκε ένα μόριο από τα παρακάτω τρία στην εικόνα 1 και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια ενζύμων και κατάλληλων συνθηκών τα άλλα δύο:

Μόριο 1

5' ACCA ATG GAT CCG GGA TCA TGA AACCA 3'

3' TGGT TAC CTA GGC CCT AGT ACT TTGGT 5'

Μόριο 2

5' ACCA AUG GAU CCG GGA UCA UGA AACCA 3'

3' TGGT TAC CTA GGC CCT AGT ACT TTGGT 5'

Μόριο 3

5' ACCA AUG GAU CCG GGA UCA UGA AACCA 3'

εικόνα 1

α. Να εξηγήσετε ποιο μόριο από τα τρία που απεικονίζονται είναι εκείνο που απομονώθηκε (μονάδες 2) και στη συνέχεια να εξηγήσετε τη διαδικασία και να ονομάσετε τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό των άλλων δύο (μονάδες 4).

β. Να εξηγήσετε γιατί τα μόρια που απομονώνονται για την κατασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης δεν περιέχουν εσώνια (μονάδες 6).

Μονάδες 12

Αρχικά απομονώθηκε το μόριο 3 καθώς αποτελεί πιθανώς ένα mRNA (εντοπίζεται κωδικόνιο έναρξης, κωδικόνιο λήξης με κατάλληλο προσανατολισμό, βήμα τριπλέτας και δεν υπάρχουν ενδιάμεσες αλληλουχίες εσωνίων).

Το μόριο 2 αποτελεί υβρίδιο που περιλαμβάνει τη cDNA αλυσίδα που δημιουργήθηκε κατά την αντίστροφη μεταγραφή με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή με καλούπι το μόριο 3 που αρχικά απομονώθηκε και το ίδιο το mRNA.

Το μόριο 1 είναι το δίκλωνο cDNA το οποίο δημιουργήθηκε στη συνέχεια με την DNA πολυμεράση με τη διαδικασία της αντιγραφής (αφού προηγήθηκε η αποδιάταξη του μορίου mRNA-cDNA, μόριο 2).

β. Τα μόρια αυτά δεν περιέχουν εσώνια γιατί για την κατασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης απομονώνονται αρχικά ώριμα mRNA μόρια από κάποιο συγκεκριμένο ιστό ώστε να δημιουργηθούν cDNA χωρίς εσώνια, που στη συνέχεια μπορούν να εκφραστούν σε προκαρυωτικά κύτταρα (καθώς τα προκαρυωτικά κύτταρα δεν διαθέτουν τους εκτεταμένους μηχανισμούς ωρίμανσης των mRNA που διαθέτουν τα ευκαρυωτικά). Με αυτό τον τρόπο δίνουν τη δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από ένα ευκαρυωτικό γονίδιο στο κύτταρο-ξενιστή.

36. Η περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*, είναι το πρώτο ένζυμο περιορισμού που απομονώθηκε και χρησιμοποιείται ευρέως στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Έκτοτε έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από 3.000 ένζυμα περιορισμού, από τα οποία γύρω στα 800 διατίθενται για εμπορική χρήση.

α. Να αναφέρετε το βακτήριο από το οποίο έχει απομονωθεί η περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* (μονάδες 2) και να γράψετε την αλληλουχία DNA που αναγνωρίζει, υποδεικνύοντας παράλληλα τις θέσεις στις οποίες την κόβει (μονάδες 4).

β. Από ανθρώπινο κύτταρο στο τέλος της μεσόφασης απομονώνεται ολικό πυρηνικό γενετικό υλικό. Αν υποθέσουμε πως σε όλα τα μόρια πυρηνικού DNA που απομονώθηκαν από το κύτ-

ταρο, η *EcoRI* αναγνωρίζει και κόβει συνολικά 1.000 θέσεις να υπολογίσετε, αιτιολογώντας την απάντησή σας, τα τμήματα που θα προκύψουν μετά τη δράση της *EcoRI* (μονάδες 7).

Μονάδες 13

α. Η *EcoRI* απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*. Το ένζυμο αυτό όποτε συναντά την αλληλουχία:

5' - G * A A T T C - 3'

3' - C T T A A * G - 5' στο γονιδίωμα, κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A με κατεύθυνση 5' → 3' όπως υποδεικνύεται από τον *.

β. Στο τέλος της μεσόφασης, τα 46 χρωμοσώματα που υπάρχουν στο ανθρώπινο κύτταρο είναι διπλασιασμένα, οπότε η *EcoRI* κόβει 92 μόρια γραμμικού DNA. Επομένως, αν $v_1, v_2, v_3, \dots, v_{92}$ ο αριθμός των θέσεων που αναγνωρίζει και κόβει η *EcoRI* σε κάθε γραμμικό μόριο, θα ισχύει $v_1 + v_2 + v_3 + \dots + v_{92} = 1000$. Σε κάθε γραμμικό μόριο DNA που κόβεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση, τα τμήματα που δημιουργούνται είναι κατά 1 περισσότερα από τις θέσεις αναγνώρισης, για κάθε μόριο DNA, και επομένως στην περίπτωση του προβλήματος θα είναι: $v_1 + 1 + v_2 + 1 + v_3 + 1 + \dots + v_{92} + 1 = 1000 + 92 = 1092$. Επομένως, τα τμήματα που θα προκύψουν θα είναι 1092.

42. Για τη κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, ένας φοιτητής βιολογίας απομόνωσε πυρηνικό DNA από επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπου που βρίσκονταν στην αρχή της μεσόφασης. Ως φορέα κλωνοποίησης, επέλεξε ένα πλασμίδιο που έφερε (μεταξύ άλλων) ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη και το γονίδιο *LacZ*. Το γονίδιο *LacZ* κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση, ένα ένζυμο που φυσιολογικά υδρολύει το σάκχαρο λακτόζη. Το ένζυμο αυτό έχει, επίσης, τη δυνατότητα να υδρολύει ένα συνθετικό μόριο που μοιάζει με τη λακτόζη, την ουσία X-gal, παράγοντας κατά τη διάσπαση ένα προϊόν μπλε χρώματος. Στη συνέχεια, ο φοιτητής έκοψε τα πλασμίδια και το DNA του ανθρώπου χρησιμοποιώντας τη περιοριστική ενδονουκλεάση *P* και τα ανέμειξε μεταξύ τους.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποίησε περιείχαν μία μόνο θέση αναγνώρισης από τη περιοριστική ενδονουκλεάση *P* μέσα στο γονίδιο *LacZ*.

α. Εάν από τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης στο πυρηνικό DNA ενός επιθηλιακού κυττάρου ανθρώπου προκύπτουν 5.000 θραύσματα DNA, να βρείτε τον ελάχιστο αριθμό πλασμιδίων που θα χρειαστεί ο φοιτητής για τη κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA, χωρίς την περαιτέρω τροποποίηση των θραυσμάτων (μονάδες 5).

β. Ο φοιτητής διέθετε βακτήρια, τα οποία δεν μπορούσαν να υδρολύσουν τη λακτόζη ή την X-gal, λόγω μιας μετάλλαξης που έφεραν στο γονίδιο *LacZ* στο κύριο μόριο DNA τους, και επίσης, δεν περιείχαν πλασμίδια. Μετά τον μετασχηματισμό τους, ο φοιτητής ανέπτυξε τα βακτήρια σε θρεπτικό υλικό στο οποίο είχε προσθέσει στρεπτομυκίνη και την ουσία X-gal. Μετά από 48 ώρες, παρατήρησε την ανάπτυξη αποικιών με μπλε και με άσπρο χρώμα. Να εξηγήσετε σε ποιού χρώματος αποικίες υπήρχαν βακτήρια που είχαν προσλάβει ανασυνδυασμένα μόρια DNA (μονάδες 5).

γ. Αν στο θρεπτικό υλικό ο φοιτητής δεν προσέθετε αντιβιοτικό, να εξηγήσετε τι άλλου είδους αποικίες θα αναπτύσσονταν (μονάδα 1) και τι χρώμα θα είχαν αυτές (μονάδες 2).

Μονάδες 13

α. Στον πυρήνα ενός ανθρώπινου κυττάρου που βρίσκεται στην αρχή της μεσόφασης υπάρχουν 46 γραμμικά μόρια DNA. Σε κάθε μόριο DNA, ανεξάρτητα από τον αριθμό θέσεων που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση *P*, υπάρχουν πάντα δύο θραύσματα τα οποία δεν μπορούν να ενσωματωθούν σε πλασμίδιο, γιατί έχουν μόνο από τη μια πλευρά τους μονόκλινα

άκρα μετά τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης Π.

Συνολικά, ο αριθμός των θραυσμάτων αυτών θα είναι: $46 \times 2 = 92$ θραύσματα. Ο φοιτητής θα χρειαστεί τουλάχιστον $5.000 - 92 = 4.908$ πλασμίδια για τη κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA (επισήμανση: τα 92 θραύσματα θα μπορούν να ενσωματωθούν σε φορέα κλωνοποίησης μόνο μετά από ειδική προσθήκη μονόκλωνου άκρου).

β. Στο θρεπτικό υλικό αναπτύχθηκαν μόνο τα βακτήρια που είχαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, δηλαδή τα βακτήρια που είχαν προσλάβει πλασμίδιο (είτε ανασυνδυασμένο είτε μη ανασυνδυασμένο) κατά τη διαδικασία μετασηματισμού. Στα μετασηματισμένα βακτήρια που είχαν προσλάβει πλασμίδιο στο οποίο δεν ενσωματώθηκε κάποιο θραύσμα του ανθρώπινου DNA (μη ανασυνδυασμένο), το γονίδιο LacZ ήταν λειτουργικό και άρα, τα βακτήρια αυτά είχαν τη δυνατότητα να μεταβολίσουν την ουσία X-gal που υπήρχε στο θρεπτικό τους υλικό και να την μετατρέψουν σε μια μπλε ουσία, βάφοντας όλη την αποικία μπλε. Τα μετασηματισμένα βακτήρια που περιείχαν ανασυνδυασμένα πλασμίδια δεν είχαν τη δυνατότητα να παράγουν το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, επειδή το γονίδιο LacZ «είχε καταστραφεί» μετά την τοποθέτηση του ανθρώπινου DNA σε αυτό. Αυτό είχε ως συνέπεια, τα βακτήρια να μην μπορούν να μεταβολίσουν την ουσία X-gal στο θρεπτικό υλικό, να μην παραχθεί η μπλε ουσία και άρα, το χρώμα τους (και της αποικίας) ήταν άσπρο. Συνεπώς, οι άσπρες αποικίες έφεραν βακτήρια που είχαν προσλάβει ανασυνδυασμένα μόρια DNA.

γ. Εάν ο φοιτητής δεν προσέθετε το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη στο θρεπτικό υλικό, τότε θα αναπτύσσονταν και αποικίες βακτηρίων που δεν θα είχαν μετασηματιστεί. Παρόλο που τα βακτήρια αυτά θα διέθεταν το γονίδιο LacZ στο κύριο μόριο DNA, δεν θα παράγαν β-γαλακτοσιδάση λόγω της μετάλλαξης του γονιδίου που έφεραν, οπότε δεν θα μπορούσαν να μεταβολίσουν την ουσία X-gal. Συνεπώς, οι αποικίες τους θα ήταν όλες άσπρες.

53. Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και θανατώνουν άλλους μικροοργανισμούς ή αναστέλλουν την ανάπτυξή τους. Πολλά αντιβιοτικά μπορούν να συντεθούν και χημικά, αλλά η διαδικασία είναι τόσο ακριβή και επίπονη που δεν μπορεί να συγκριθεί σε κόστος με την παραγωγή από βακτήρια και από μύκητες σε βιοαντιδραστήρες.

α. Να εξηγήσετε ποιους στόχους της εντατικής έρευνας για την ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών εξυπηρετεί η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (μονάδες 6).

β. Παρακάτω αναφέρονται τα ονόματα τριών αντιβιοτικών, καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους σε διάφορα στάδια της γονιδιακής έκφρασης των βακτηρίων:

I. Κλυνδαμικίνη: παρεμποδίζει την πρόσδεση του mRNA στο ριβόσωμα,

II. Ριφαμυκίνη: συνδέεται με την RNA πολυμεράση και εμποδίζει τη δημιουργία του πρώτου φωσφοδιεστερικού δεσμού,

III. Χλωραμφενικόλη: παρεμποδίζει τη δημιουργία πεπτιδικού δεσμού.

Να εξηγήσετε σε ποιο συγκεκριμένο στάδιο της γονιδιακής έκφρασης του βακτηρίου δρα το κάθε αντιβιοτικό (μονάδες 6).

Μονάδες 12

α. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA εφαρμόζεται με στόχο:

- Την κλωνοποίηση όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα απαραίτητα για τη βιοσύνθεση ενός αντιβιοτικού.
- Την ανάπτυξη αντιβιοτικών με ισχυρότερη δράση εναντίον ορισμένων μικροβίων και με λιγότερες παρενέργειες.
- Την κατασκευή γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών με στόχο τη μεγαλύτερη απόδοση στην παραγωγή αντιβιοτικών.

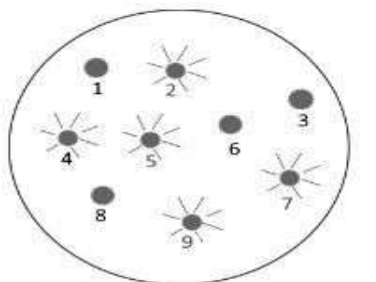
β.

I. Η Κλυνδαμικίνη, δρα στο στάδιο της έναρξης της μετάφρασης, γιατί σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η σύνδεση του mRNA με τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα.

II. Η Ριφαμυκίνη, παρεμβαίνει στο στάδιο της μεταγραφής και συγκεκριμένα στη σύνδεση των ριβονουκλεοτιδίων για τη δημιουργία RNA από την RNA πολυμεράση.

III. Η Χλωραμφενικόλη παρεμβαίνει στο στάδιο της επιμήκυνσης της πρωτεϊνοσύνθεσης κατά το οποίο, συνδέονται τα αμινοξέα που μεταφέρουν τα tRNA με πεπτιδικό δεσμό (άρα δρα στο στάδιο της μετάφρασης).

69. Για τη κλωνοποίηση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί ένα ανθρώπινο ένζυμο, οι ερευνητές χρησιμοποιούν ως φορέα κλωνοποίησης το πλασμίδιο της εικόνας, το οποίο διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικιλίνη και το γονίδιο GFP (green fluorescent protein) εντός του οποίου υπάρχει η αλληλουχία αναγνώρισης της EcoRI, την οποία χρησιμοποιούν ως περιοριστική ενδοουκλεάση.



αποικίες βακτηρίων σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αμικιλίνη

Το γονίδιο της GFP παράγει

μια πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, η οποία εκπέμπει πράσινο φθορισμό όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Ως βακτήρια – ξενιστές χρησιμοποιούνται βακτήρια *Escherichia coli*, που δεν φέρουν πλασμίδια και είναι ευαίσθητα στην αμικιλίνη. Μετά τη διαδικασία μετασχηματισμού των βακτηρίων-ξενιστών, τα βακτήρια μεταφέρονται σε στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει το αντιβιοτικό αμικιλίνη και μετά από κάποιες μέρες εμφανίζονται 9 αποικίες. Με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας, οι ερευνητές παρατηρούν ότι οι αποικίες 2, 4, 5, 7 και 9 εκπέμπουν πράσινο φθορισμό, όπως φαίνεται στην εικόνα.

α. Να αναφέρετε επιγραμματικά τι περιείχε το στερεό θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας προκειμένου να πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια σε αυτό (μονάδες 4) και να αναφέρετε ποια θερμοκρασία είχε ο κλίβανος στον οποίο τοποθετήθηκαν οι καλλιέργειες στη συνέχεια (μονάδες 2).

β. Να εξηγήσετε αν οι αποικίες 1 – 9 περιλαμβάνουν μετασχηματισμένα ή μη μετασχηματισμένα βακτήρια (μονάδες 3). Να βρείτε ποιες από τις αποικίες 1 – 9 περιέχουν βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο του ανθρώπινου ενζύμου, αιτιολογώντας την απάντησή σας (μονάδες 3).



Μονάδες 12

α. Το τεχνητό θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας περιείχε πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου και μεταλλικά ιόντα διαλυμένα στο νερό. Το θρεπτικό υλικό στερεοποιήθηκε με τη χρήση του πολυσακχαρίτη άγαρ. (Επίσης, στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε το αντιβιοτικό αμικιλίνη για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων). Μετά τον εμβολιασμό με τα βακτήρια, η καλλιέργεια τοποθετήθηκε στους 37οC, θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται άριστα τα βακτήρια αυτά.

β. Όλες οι αποικίες 1 – 9 περιλαμβάνουν μετασχηματισμένα βακτήρια. Τα βακτήρια που δεν

μετασηματίστηκαν, δηλαδή δεν προσέλαβαν πλασμίδιο, είναι ευαίσθητα στην αμπικιλίνη και συνεπώς, δεν αναπτύχθηκαν παρουσία αυτού του αντιβιοτικού που υπήρχε στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Όταν το γονίδιο του ανθρώπινου ενζύμου ενσωματώνεται μέσα στο γονίδιο GFP, το γονίδιο αυτό “απενεργοποιείται” με αποτέλεσμα να μην παράγεται η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Άρα, όσα βακτήρια μετασηματίστηκαν με αυτό το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, εντοπίζονται στις αποικίες που δεν εκπέμπουν πράσινο φθορισμό, δηλαδή στις αποικίες 1, 3, 6 και 8.

70. Η παρακάτω αλληλουχία νουκλεοτιδίων DNA περιλαμβάνει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα μικρό πεπτίδιο. Το πεπτίδιο αυτό λειτουργεί ως ένζυμο που καταλύει μία ειδική αντίδραση του μεταβολισμού σε ανθρώπινα μυϊκά κύτταρα.

I CTGATATG TACTGCCCATCGACACAGAAATTCTGACG II

III GACTATACATGACGGGTAGCTGTGTCTTTAAGACTGC IV

Τα t-RNA που χρησιμοποιήθηκαν κατά σειρά στη μετάφραση του mRNA για την παραγωγή του πεπτιδίου, είχαν τα αντικωδικόνια:

3' UAC 5', 3' AUG 5', 3' ACC 5', 3' UGU 5', 3' GUC 5', 3' UUU 5', 3' AAG 5'.

α. Να εξηγήσετε ποια αλυσίδα, η πάνω ή η κάτω, είναι η κωδική αλυσίδα του γονιδίου (μονάδες 4) και να αντιστοιχίσετε τις θέσεις I, II, III και IV στα 3' και 5' άκρα των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (μονάδες 2).

β. Να γράψετε την αλληλουχία του mRNA που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των μυϊκών κυττάρων στα οποία εκφράζεται το γονίδιο αυτό (μονάδες 3).

γ. Να εξηγήσετε, αν για τη βιοτεχνολογική παραγωγή του πεπτιδίου από μετασηματισμένα βακτήρια, θα χρησιμοποιήσουμε αντίγραφα του γονιδίου από γονιδιωματική ή cDNA βιβλιοθήκη (μονάδες 4).

Μονάδες 13

α. Η σειρά των κωδικονίων του mRNA με τα οποία θα συνδεθούν τα tRNA κατά τη διαδικασία της μετάφρασης, είναι:

5' AUG UAC UGG ACA CAG AAA UUC 3'.

Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες των δύο αλυσίδων και λαμβάνοντας υπόψη ότι το mRNA και η κωδική αλυσίδα του γονιδίου έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και την ίδια αλληλουχία βάσεων (με τη διαφορά ότι το νουκλεοτίδιο της U στο mRNA είναι νουκλεοτίδιο της T στην κωδική αλυσίδα), εντοπίζουμε τα κωδικόνια στην πάνω αλυσίδα, τα οποία διακόπτονται από την αλληλουχία του εσωνίου 5' CCCATC 3'. Συνεπώς, η αλυσίδα με άκρα I και II είναι η κωδική, με προσανατολισμό: I – 5', II – 3' και επειδή οι δύο αλυσίδες είναι αντιπαράλληλες, η αλυσίδα με άκρα III και IV είναι η μη κωδική με προσανατολισμό III – 3' και IV – 5'.

β. Τα περισσότερα γονίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι ασυνεχή ή διακεκομμένα, με αποτέλεσμα από τη μεταγραφή τους να προκύπτει πρόδρομο mRNA, το οποίο υφίσταται διαδικασία ωρίμανσης και μετατρέπεται σε ώριμο πριν εξέλθει από τον πυρήνα για να μεταφραστεί. Επομένως, το mRNA που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των μυϊκών κυττάρων στα οποία εκφράζεται το γονίδιο, θα είναι το ώριμο mRNA, η αλληλουχία του οποίου θα είναι:

5'-CUGAU AUG UAC UGG ACA CAG AAA UUC UGA CG-3'.

γ. Επειδή το ανθρώπινο γονίδιο είναι ασυνεχές και τα βακτήρια, ως προκαρυωτικοί οργανισμοί, δεν διαθέτουν αντίστοιχους μηχανισμούς ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA, θα χρησιμοποιηθούν αντίγραφα του γονιδίου από cDNA βιβλιοθήκη.

71. Το παρακάτω τμήμα DNA περιλαμβάνει την αλληλουχία του υποκινητή ενός γονιδίου το

οποίο εκφράζεται σε μυϊκά κύτταρα ποντικού. Η αλληλουχία του υποκινητή είναι η 5' TATTACG 3' και η συμπληρωματική της. Το τμήμα DNA πρόκειται να κοπεί από την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII, προκειμένου να κλωνοποιηθεί σε μία βιβλιοθήκη. Η συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση αναγνωρίζει παλίνδρομη αλληλουχία δίκλωνου DNA μήκους 6 ζευγών βάσεων, στην οποία διασπά το φωσφοδιεστερικό δεσμό των νουκλεοτιδίων με βάσεις A και A (Παλίνδρομη ονομάζεται μία αλληλουχία βάσεων η οποία στην συμπληρωματική αλυσίδα δίκλωνου DNA έχει την πανομοιότυπή της, όταν διαβάζεται με τον ίδιο προσανατολισμό π.χ. 5'→3').

T T C G A A G A T A A T G C T T C G A A
A A G C T T C T A T T A C G A A G C T T

α. Να γράψετε τη δίκλωνη αλληλουχία DNA που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII, με τον προσανατολισμό της (μονάδες 4) και να υποδείξετε με αστερίσκο τη θέση των φωσφοδιεστερικών δεσμών που διασπά κατά τη δράση της (μονάδες 2).

β. Να εξηγήσετε ποιο είδος βιβλιοθήκης (γονιδιωματική ή cDNA) κατασκεύασαν οι επιστήμονες για να κλωνοποιήσουν τον υποκινητή (μονάδες 3) και να γράψετε μία πιθανή αλληλουχία RNA μήκους 10 βάσεων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής από τους ερευνητές προκειμένου να απομονωθεί ο κλώνος βακτηρίων που την περιέχει (μονάδες 3).

Μονάδες 12

α. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει η HindIII είναι η παρακάτω:

3' T T C G A *A 5'
5' A* A G C T T 3'

β. Οι ερευνητές θα πρέπει να χρησιμοποιήσουν γονιδιωματική βιβλιοθήκη, η οποία περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού δότη και κατ' επέκταση τους υποκινητές των γονιδίων ή τμήματα αυτών. Μία πιθανή αλληλουχία RNA που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής είναι: 5'UCUAUUACGA3', η οποία είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη με την πάνω αλυσίδα του τμήματος που έχει δοθεί. (Εναλλακτικά: 3'GAAGAUAUG5', η οποία είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη με την κάτω αλυσίδα).

5' U C U A U U A C G A 3'
3' T T C G A A G A T A A T G C T T C G A A 5'
5' A A G C T T C T A T T A C G A A G C T T 3'
3' G A A G A U A A U G 5'

81. Τα πλασμίδια αποτελούν συνηθισμένο “εργαλείο” της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, οπότε και υφίστανται πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για να εισαχθεί σε αυτά το επιθυμητό DNA. Στη συνέχεια, το ανασυνδυασμένο DNA εισάγεται σε κύτταρα, συνήθως προκαρυωτικά, με την μέθοδο του μετασχηματισμού και δημιουργούνται αντίγραφα των ανασυνδυασμένων μορίων. Στα πλαίσια ενός τέτοιου πειράματος κατασκευής ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, μετά την εισαγωγή τους σε βακτήρια, τα μετασχηματισμένα βακτήρια τοποθετούνται σε ειδικό θρεπτικό υλικό, που περιέχει νουκλεοτίδια ιχνηθετημένα με φθορίζουσα χρωστική, για να πολλαπλασιαστούν.

α. Αν υποθέσουμε ότι κάθε βακτήριο έχει προσλάβει από ένα πλασμίδιο, το οποίο αντιγράφεται μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο, να υπολογίσετε πόσες διχοτομήσεις πρέπει να κάνουν τα βακτήρια, ώστε να προκύψουν τουλάχιστον 4 αντίγραφα του πλασμιδίου από κάθε αρχικό

βακτήριο (μονάδες 3). Να καταμετρήσετε τις φθορίζουσες αλυσίδες DNA που θα περιέχονται στα βακτήρια αυτά μετά τον τετραπλασιασμό του πλασμιδίου (μονάδες 3).

β. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο κλωνοποίησης χρησιμοποιούνται πλασμίδια που διαθέτουν δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το επιθυμητό DNA εισάγεται στο ένα από τα δύο γονίδια ανθεκτικότητας. Να εξηγήσετε πως θα μπορούσαμε, να διακρίνουμε τα βακτήρια που έλαβαν το ετερόλογο DNA από εκείνα που δεν το έλαβαν (μονάδες 3) και να αιτιολογήσετε το γεγονός ότι κάποια βακτήρια δέχτηκαν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (μονάδες 3).

Μονάδες 12

α. Η αντιγραφή του πλασμιδιακού DNA γίνεται ανεξάρτητα από το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου, αλλά αφού κάθε βακτήριο έχει δεχθεί από ένα πλασμίδιο, το οποίο αντιγράφεται μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο, σίγουρα θα πρέπει να έχουμε τέσσερα βακτήρια, ώστε να μετράμε τουλάχιστον 4 πλασμίδια. Επομένως, αν ξεκινήσουμε από 1 βακτήριο θα πρέπει να γίνουν 2 διχοτομήσεις αυτού για να προκύψουν 4 αντίγραφα του κάθε αρχικού πλασμιδίου. Η αντιγραφή του πλασμιδίου γίνεται με τον ημισυντηρητικό μηχανισμό, κατά τον οποίο προκύπτουν δύο θυγατρικά μόρια DNA, τα οποία είναι πανομοιότυπα με το μητρικό (και μεταξύ τους) και καθένα αποτελείται από μία παλιά και μία καινούργια αλυσίδα. Επομένως, μετά τον πρώτο κύκλο αντιγραφής των πλασμιδίων θα έχουμε δύο πλασμίδια και μετά τον δεύτερο κύκλο αντιγραφής θα έχουμε τέσσερα πλασμίδια και στα 2 πλασμίδια που προκύπτουν από τον πρώτο κύκλο αντιγραφής, το καθένα θα έχει από μία αλυσίδα με φθορίζοντα νουκλεοτίδια και μία χωρίς. Μετά τον 2ο κύκλο αντιγραφής, μετά δηλαδή τη 2η διχοτόμηση των βακτηρίων, τα 2 μόρια θα έχουν από μία φθορίζουσα αλυσίδα ενώ τα άλλα δύο θα έχουν και στις δύο αλυσίδες τους φθορίζοντα νουκλεοτίδια. Άρα τελικά θα υπάρχουν 6 φθορίζουσες αλυσίδες.

β. Για τον έλεγχο του ανασυνδυασμού, συνήθως χρησιμοποιούνται ως ξενιστές, βακτήρια που δεν διαθέτουν πλασμίδια και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά. Ως φορείς κλωνοποίησης επιλέγονται πλασμίδια, που φέρουν ειδικές αλληλουχίες που κωδικοποιούν γονίδια ανοχής σε αντιβιοτικά. Έτσι, μπορούμε, εισάγοντας το επιθυμητό κομμάτι DNA μέσα στην αλληλουχία που κωδικοποιεί το ένα γονίδιο ανθεκτικότητας, να την καταστρέψουμε, έτσι ώστε το βακτήριο, που θα μετασηματιστεί με τέτοιο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, να μην έχει ανοχή στο εν λόγω αντιβιοτικό, σε αντίθεση με τα μετασηματισμένα βακτήρια, που έχουν δεχθεί πλασμίδιο μη ανασυνδυασμένο και τα οποία θα ανθίστανται και στα δύο αντιβιοτικά. Άρα, από μία αρχική καλλιέργεια με βακτήρια, που έχουν αναπτυχθεί στο ένα αντιβιοτικό, μπορεί να μεταφερθεί δείγμα βακτηρίων στο αντιβιοτικό, στο οποίο δεν διαθέτουν ανθεκτικότητα τα βακτήρια, λόγω της καταστροφής του αντίστοιχου γονιδίου με τον ανασυνδυασμό και να ελεγχθεί ποια από αυτά έχασαν την ανθεκτικότητά τους. Αυτά είναι και τα βακτήρια που τελικά θα επιλέξουμε. Κάποια βακτήρια λαμβάνουν μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μερικά πλασμίδια ξαναγίνονται κυκλικά, χωρίς να προσλάβουν ετερόλογο DNA. Έτσι μερικά βακτήρια - ξενιστές δέχονται πλασμίδια, που δεν είναι ανασυνδυασμένα.

85. Το γενετικό υλικό του βακτηριοφάγου λ είναι δίκλωνο γραμμικό DNA μήκους 48.500 ζευγών βάσεων περίπου και χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης, ειδικά στις περιπτώσεις που οι ερευνητές θέλουν να ενσωματώσουν μεγαλύτερου μήκους ξένο DNA.

α. Να ορίσετε τι είναι οι φορείς κλωνοποίησης (μονάδες 4) και να αναφέρετε έναν ακόμη φορέα κλωνοποίησης που γνωρίζετε (μονάδες 2).

β. Όταν χρησιμοποιούνται τα DNA των βακτηριοφάγων λ ως φορείς κλωνοποίησης, δημιουργούνται γενετικά τροποποιημένοι φάγοι, οι οποίοι αφήνονται να προσβάλουν βακτηριακά κύτταρα σε καλλιέργεια. Να εξηγήσετε, αντλώντας ως παράδειγμα το πείραμα των Hershey & Chase, αν είναι απαραίτητο τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων – ξενιστών να καταστούν

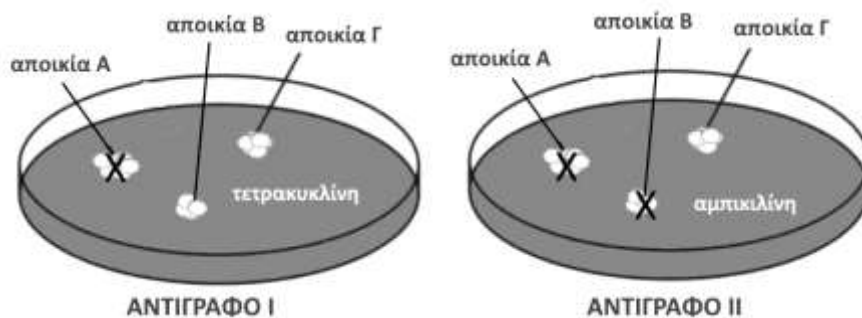
παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια για να δεχτούν το ανασυνδυασμένο DNA (μονάδες 6).

Μονάδες 12

α. Οι φορείς κλωνοποίησης είναι μόρια DNA τα οποία μπορούν να ενσωματώνουν ξένα τμήματα DNA, να μεταφέρονται σε κύτταρα – ξενιστές και να αυτοδιπλασιάζονται ανεξάρτητα (χρονικά) μέσα σε αυτά. Ένας άλλος φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιείται συχνά είναι τα πλασμίδια.

β. Η κατεργασία των τοιχωμάτων των βακτηρίων για να δεχτούν το ανασυνδυασμένο γενετικό υλικό των ιών δεν είναι απαραίτητη, γιατί οι βακτηριοφάγοι έχουν τη φυσική ικανότητα να μολύνουν βακτήρια εισάγοντας μέσα σε αυτά το DNA τους προκειμένου να πολλαπλασιαστούν, όπως συμβαίνει και με τους βακτηριοφάγους T2 που χρησιμοποίησαν στο πείραμά τους οι Hershey & Chase.

87. Για την κλωνοποίηση ενός γονιδίου ποντικού, ερευνητές χρησιμοποίησαν την περιοριστική ενδονουκλεάση E1, με την οποία απομόνωσαν με κατάλληλες τεχνικές, μόνο το γονίδιο από το γονιδίωμα του ποντικού (σε πολλά αντίγραφα). Ως φορέα κλωνοποίησης χρησιμοποίησαν ένα πλασμίδιο, το οποίο φέρει γονίδια ανθεκτικότητας σε δύο αντιβιοτικά, την αμπικιλίνη και την τετρακυκλίνη, ενώ η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης E1 βρίσκεται μόνο μία φορά μέσα στο γονίδιο της αμπικιλίνης. Ως ξενιστές οι ερευνητές χρησιμοποίησαν βακτήρια χωρίς δικά τους πλασμίδια. Μετά τη διαδικασία μετασχηματισμού των βακτηρίων - ξενιστών με τα πλασμίδια, για πειραματικούς σκοπούς, ακολούθησε καλλιέργειά τους σε στερεό θρεπτικό υλικό χωρίς παρουσία αντιβιοτικού, οπότε προέκυψαν τρεις αποικίες βακτηρίων εκείνες των Α, Β και Γ. Οι ερευνητές δημιούργησαν δύο αντίγραφα καλλιεργείων μεταφέροντας τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν (στην αρχική καλλιέργεια) σε δύο νέα θρεπτικά υλικά, σε καθένα από τα οποία είχε προστεθεί κατάλληλο αντιβιοτικό, όπως φαίνεται στην εικόνα. Στο αντίγραφο I, που περιείχε το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, τα βακτήρια Α δεν ανέπτυξαν αποικία, ενώ στο αντίγραφο II, που περιείχε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, αναπτύχθηκε μόνο η αποικία Γ.



α. Να αναφέρετε το λόγο για τον οποίο οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, την E1, τόσο για να κόψουν το γονιδίωμα του ποντικού, όσο και για να κόψουν το κάθε πλασμίδιο – φορέα κλωνοποίησης (μονάδες 4) και να αναφέρετε το ένζυμο που χρειάστηκε να χρησιμοποιήσουν προκειμένου να δημιουργηθούν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια (μονάδες 2).

β. Να εξηγήσετε ποια από τις αποικίες Β ή Γ αποτελείται από μετασχηματισμένα βακτήρια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (μονάδες 4) και γιατί το βακτήριο Α δεν σχημάτισε αποικία σε κανένα από τα αντίγραφα των καλλιεργείων (μονάδες 2).

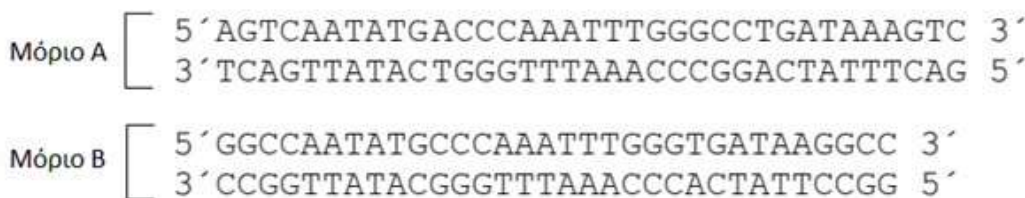
Μονάδες 12

α. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, την E1, προκειμένου τόσο το τμήμα DNA με το συνεχές γονίδιο του ποντικού, όσο και το πλασμίδιο, το οποίο έχει γίνει γραμμικό μετά τη δράση της E1, να έχουν ίδια συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα, ώστε

όταν αναμειχθούν να διευκολυνθεί ο ανασυνδυασμός τους. Για τη σύνδεση πλασμιδίων - γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο DNA δεσμάση, το οποίο ενώνει τμήματα DNA μεταξύ τους με 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό.

β. Η αποικία που αποτελείται από μετασχηματισμένα βακτήρια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο είναι η αποικία Β. Στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια δεν είναι ενεργό το γονίδιο ανθεκτικότητας για την αμπικιλίνη, καθώς μέσα σε αυτό ενσωματώθηκε το συνεχές γονίδιο του ποντικού. Επομένως, τα βακτήρια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο είναι ανθεκτικά μόνο στην τετρακυκλίνη. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια με το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αποτελούν την αποικία Γ, που αναπτύσσεται παρουσία τόσο τετρακυκλίνης, όσο και αμπικιλίνης. Τα βακτήρια Α είναι μη μετασχηματισμένα βακτήρια, τα οποία δεν έχουν δικό τους πλασμίδιο και επομένως δεν έχουν ανθεκτικότητα σε κανένα από τα δύο αντιβιοτικά, άρα δεν σχηματίζουν αποικίες στα θρεπτικά υλικά που περιέχουν αντιβιοτικά.

90. Οι ιοί περιέχουν ένα μόνο είδος νουκλεϊκού οξέος, το οποίο μπορεί να είναι DNA ή RNA. Το DNA των ιών μπορεί να είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο, γραμμικό ή κυκλικό. Τα παρακάτω δίκλιωνα τμήματα DNA Α και Β απομονώθηκαν από ένα στέλεχος ιού και αντιστοιχούν σε μικρά συνεχή γονίδια που κωδικοποιούν σημαντικά πεπτίδια του καψιδίου του ιού.



Μια περιοριστική ενδονουκλεάση, που απομονώθηκε από βακτήριο, αναγνωρίζει την παρακάτω δίκλιωνα αλληλουχία 4 ζευγών νουκλεοτιδίων, την οποία κόβει μεταξύ των δύο διαδοχικών νουκλεοτιδίων με βάση G:



α. Ποιο από τα παραπάνω γονίδια θεωρείτε ότι μπορεί να περιλαμβάνεται αυτούσιο σε γονιδιωματική βιβλιοθήκη του ιού αυτού που κατασκευάστηκε με τη χρήση της παραπάνω περιοριστικής ενδονουκλεάσης (μονάδες 2); Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας υποδεικνύοντας την κωδική αλυσίδα κάθε γονιδίου (μονάδες 3).

β. Να υπολογίσετε τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου που διασπώνται σε κάθε θέση αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση (μονάδες 3).

γ. Το/τα τμήματα DNA που προέκυψαν μετά τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης ενσωματώνεται σε πλασμίδιο ώστε να κλωνοποιηθεί. Να γράψετε το ή τα τμήμα/τα DNA με τα μονόκλιωνα άκρα του/τους, μετά την δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (μονάδες 3), καθώς και τα συμπληρωματικά άκρα του πλασμιδίου μετά την δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης, ώστε το γονίδιο του ιού να μπορεί να το ανασυνδυάσει (μονάδες 2).

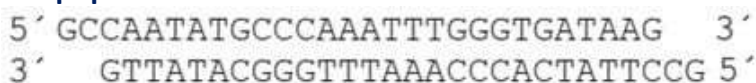
Μονάδες 13

α. Το γονίδιο Β, είναι αυτό που θα περιλαμβάνεται αυτούσιο στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη αφού κοπεί με την συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση. Στο γονίδιο αυτό, που έχει ως κωδική την πάνω αλυσίδα, η περιοριστική ενδονουκλεάση αναγνωρίζει την ειδική αλληλουχία των 4 ζευγών νουκλεοτιδίων στα δύο άκρα του γονιδίου, ενώ δεν κόβει στο εσωτερικό του. Στο γονίδιο Α, η κωδική αλυσίδα είναι η πάνω και δεν θα περιλαμβάνεται αυτούσιο στη βιβλιοθήκη, καθώς δεν υπάρχουν οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζονται από τη συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση και στα δύο άκρα του, ενώ, αντίθετα, υπάρχει η αλληλου-

χία αναγνώρισης εντός του γονιδίου.

β. Οι δεσμοί υδρογόνου που διασπώνται στην κάθε θέση αναγνώρισης είναι 6 (= 2 ζεύγη C- G x 3).

γ. Το τμήμα DNA, που περιέχει το γονίδιο, μετά την δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης στο μόριο είναι το:



Τα συμπληρωματικά άκρα του πλασμιδίου μετά την δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης είναι:



95. Το *Thermus aquaticus* είναι ένα θερμόφιλο βακτήριο που αναπτύσσεται κοντά σε θερμοπηγές, όπου η θερμοκρασία είναι πολύ υψηλή, γύρω στους 60-70⁰ C, αλλά μπορεί να αντέξει και σε θερμοκρασίες της τάξης των 80⁰ C. Από το βακτήριο αυτό απομονώνεται μια ειδική θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, που είναι γνωστή ως Taq DNA πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό διατηρεί τη λειτουργικότητά του ακόμα και σε θερμοκρασίες που φτάνουν τους 95⁰ C.

α. Να ονομάσετε δύο βασικά ένζυμα που καταλύουν *in vivo* τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δεοξυριβονουκλεοτιδίων κατά την αντιγραφή του DNA (μονάδες 4) και να εξηγήσετε αν τα ένζυμα αυτά διαθέτουν την ικανότητα να καταλύουν και άλλο είδος αντίδρασης εκτός της αναφερόμενης (μονάδες 2).

β. Με δεδομένο ότι η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) στηρίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους *in vitro* αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης του DNA, οι οποίες απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες (περίπου 95⁰ C, 45-60⁰ C και 70⁰ C, αντίστοιχα), να εξηγήσετε για ποιο λόγο πιστεύετε ότι για την *in vitro* αντιγραφή τμημάτων DNA που πραγματοποιείται με την τεχνική της PCR, χρειάζεται να χρησιμοποιήσουμε το ένζυμο Taq πολυμεράση, που απομονώνεται από τα θερμόφιλα αυτά βακτήρια (μονάδες 6).

Μονάδες 12

Δύο βασικά ένζυμα που καταλύουν *in vivo* τη δημιουργία 3'-5' φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δεοξυριβονουκλεοτιδίων κατά την αντιγραφή του DNA είναι η DNA πολυμεράση και η DNA δεσμάση (εναλλακτικά: τα επιδιορθωτικά ένζυμα). Η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τα πρωταρχικά τμήματα συνθέτοντας ουσιαστικά τους νέους κλώνους του DNA (και αντικαθιστά τα ριβονουκλεοτίδια των πρωταρχικών τμημάτων ή τα λάθη που η ίδια έκανε κατά την τοποθέτηση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων), ενώ η DNA δεσμάση καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών, τόσο μεταξύ των νεοσυντιθέμενων τμημάτων που προκύπτουν με ασυνεχή σύνθεση, όσο και μεταξύ των τμημάτων στις διαδοχικές θέσεις έναρξης της αντιγραφής. Η DNA πολυμεράση και τα επιδιορθωτικά ένζυμα έχουν την δυνατότητα και να διασπών φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.

β. Είναι γνωστό ότι κάθε ένζυμο είναι (σχεδόν πάντα) μια πρωτεΐνη η οποία καταλύει μια συγκεκριμένη αντίδραση. Η δραστηριότητα των ενζύμων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Σ' αυτούς ανήκουν η θερμοκρασία, το pH κ.ά. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην τεχνική PCR οφείλει να είναι θερμοανθεκτική, αφού οι απαραίτητες διαδικασίες που εκτυλίσσονται σε κάθε κύκλο της διαδικασίας (ιδίως η αποδιάταξη, αφού η επιμήκυνση γίνεται σε υψηλή θερμοκρασία λόγω της ίδιας της χρήσης του ενζύμου), απαιτούν θερμοκρασίες πολύ υψηλότερες από τις φυσιολογικές θερμοκρασίες δράσης των ενζύμων των περισσότερων ζωικών και φυτικών οργανισμών. Οποιαδήποτε, λοιπόν, άλλη DNA πολυμεράση δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην τεχνική PCR, αφού θα μετουσιωνόταν. Αντίθετα, η Taq πολυμεράση

μπορεί να δράσει σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, ιδιότητα που την καθιστά ιδανική για διαδικασίες όπως η PCR.

102. Περίπου το 10% των περιπτώσεων καρκίνου οφείλονται στη μετάλλαξη ενός γονιδίου, η οποία έχει κληρονομηθεί. Από τις πιο συχνές μορφές καρκίνου, που παρουσιάζουν κληρονομική προδιάθεση είναι ο οικογενής καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών. Ο κληρονομικός αυτός καρκίνος οφείλεται κατά κύριο λόγο σε μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1 και BRCA2. Στην Εικόνα 1 απεικονίζεται ένα τμήμα DNA, του γονιδίου BRCA1. Στο τμήμα αυτό φαίνονται τα πρώτα νουκλεοτίδια της κωδικής αλυσίδας, μέρος του 1ου εξωνίου, ακολουθεί (στις αγκύλες) το 1ο εσώνιο, μέρος του 2ου εξωνίου, το 2ο εσώνιο (στις αγκύλες) κ.ο.κ.

5'...CGGAACCATCATGGAATTCAC....[.....]...AACGCTTAACTAGTG...[.....]

Τμήμα 1ου εξωνίου

1ο εσώνιο

Τμήμα 2ου εξωνίου

2ο εσώνιο

Εικόνα 1

α. Να γράψετε τις τριπλέτες που αποτελούν το πρώτο και το δεύτερο κωδικόνιο του 2ου εξωνίου που παρατίθεται παραπάνω και να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 6).

β. Μια μετάλλαξη που προκλήθηκε στο γονίδιο BRCA1, είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός καινούργιου αλληλομόρφου. Γνωρίζοντας ότι ο ανιχνευτής 3' AGTACATTAAG 5' υβριδοποιείται με την κωδική αλυσίδα του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου, να εξηγήσετε το είδος της μετάλλαξης που συνέβη, καθώς και την επίπτωσή της στο γονιδιακό προϊόν (μονάδες 3). Κύτταρα που είναι ομόζυγα, ως προς αυτή τη μετάλλαξη, μετατρέπονται σε καρκινικά. Να εξηγήσετε, με βάση αυτή την παρατήρηση, αν το BRCA1 είναι ογκογονίδιο ή ογκοκατασταλτικό γονίδιο (μονάδες 4).

Μονάδες 13

α. Εφόσον δίνεται δεύτερο εσώνιο θα ακολουθεί και τρίτο εξώνιο. Επομένως, στη διερεύνηση του βήματος των τριπλετών του δεύτερου εξωνίου δεν θα πρέπει να εμφανίζεται κωδικόνιο λήξης. Από τη διερεύνηση της αλληλουχίας του τμήματος του δεύτερου εξωνίου που δίνεται, προκύπτει ότι η μόνη λύση που ικανοποιεί την παραπάνω συνθήκη είναι η:

5'...AA/CGC/TTA/ACT/AGT/G...3'

Άρα τα ζητούμενα κωδικώνια είναι: 5'CGC3', 5'TTA3'.

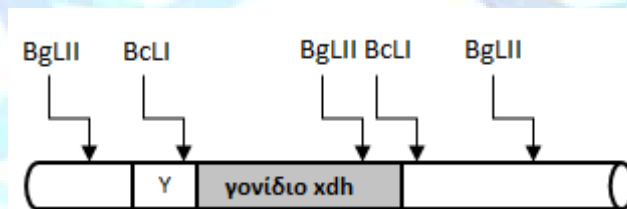
β. Το μόριο ανιχνευτής υβριδοποιείται με την αλληλουχία του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου:

5'TCATGTAATTC...3'
3'AGTACATTAAG5'

Συγκρίνοντας το φυσιολογικό αλληλόμορφο με το μεταλλαγμένο παρατηρούμε ότι αυτά διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο. Το πρώτο νουκλεοτίδιο του δεύτερου κωδικονίου στο φυσιολογικό αλληλόμορφο έχει ως βάση G, ενώ στο μεταλλαγμένο υπάρχει T. Επομένως, έχει γίνει μετάλλαξη αντικατάστασης ενός νουκλεοτιδίου (το ζευγος T-A έχει αντικαταστήσει το ζεύγος G-C στην κωδική και μη κωδική αντίστοιχα). Αποτέλεσμα αυτής της μετάλλαξης είναι το κωδικόνιο GAA να μετατρέπεται σε TAA, επιφέροντας πρόωρη λήξη στη μετάφραση της πρωτεΐνης του γονιδίου BRCA1, αμέσως μετά την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Επομένως, το μεταλλαγ-

μένο αλληλόμορφο του BRCA1 δεν καταλήγει σε παραγωγή πρωτεΐνης. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο BRCA1 πριν τη μετάλλαξη έλεγχε τον κυτταρικό κύκλο, διακόπτοντάς τον όταν αυτό απαιτείτο. Έτσι, η μετάλλαξή του, που είναι υπολειπόμενη, οδηγεί σε ένα γονίδιο που το προϊόν του δεν είναι λειτουργικό, δηλαδή παύει να σταματά τον κυτταρικό κύκλο. Άρα, το συγκεκριμένο γονίδιο σε ομοζυγωτία επάγει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και οδηγεί σε καρκίνο. Συνεπώς, πρόκειται για ογκοκατασταλτικό γονίδιο.

106. Το αμφίβιο *Litoria caerulea* (πράσινος δενδροβάτραχος) είναι ευρέως διαδεδομένο στις ανατολικές περιοχές της Αυστραλίας και στη νότια Νέα Γουινέα. Το χρώμα του, που εξαρτάται από την θερμοκρασία και τους χρωματισμούς του περιβάλλοντος, κυμαίνεται από καφέ έως πράσινο. Στόχος μας είναι η μελέτη του γονιδίου *xch* που είναι υπεύθυνο για τον χρωματισμό του δέρματος του αμφιβίου. Στην παρακάτω εικόνα αναπαρίσταται το τμήμα του DNA που περιέχει το γονίδιο *xch* και οι θέσεις αναγνώρισης από διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες.



α. Να γράψετε την περιοριστική ενδονουκλεάση που θεωρείτε ιδανικότερη για την απομόνωση του συγκεκριμένου γονιδίου (μονάδα 1) και να δικαιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 3). Να αναφέρετε δύο λειτουργικές διαφορές μεταξύ των προαναφερόμενων ενζύμων (μονάδες 2).

β. Εισάγουμε το γονίδιο *xch* από το αμφίβιο σε ένα πλασμίδιο φορέα που επιτρέπει την έκφραση του στο βακτήριο. Θα προτιμούσατε να εισάγετε το γονίδιο με τον δικό του υποκινητή (Υ) ή να εισάγετε το γονίδιο δίπλα σε υποκινητή ενός γονιδίου του πλασμιδίου που εκφράζεται σε οποιοσδήποτε συνθήκες (μονάδες 3); Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 4).

Μονάδες 13

α. Η περιοριστική ενδονουκλεάση που είναι ιδανικότερη για την απομόνωση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι η BclI, καθώς μεταξύ των δύο θέσεων που αναγνωρίζει περιέχεται ολόκληρο το γονίδιο. Το ένζυμο BglII διασπά φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στις τελικές αλληλουχίες του γονιδίου με αποτέλεσμα να το καταστρέφει. Λειτουργικές διαφορές των περιοριστικών ενδονουκλεάσεων μπορεί να είναι ότι:

- αναγνωρίζουν διαφορετικές ειδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο μόριο DNA,
- αναγνωρίζουν διαφορετικό μήκος (4-8) ζευγών νουκλεοτιδίων.

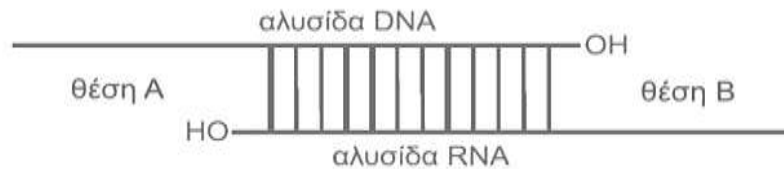
Εναλλακτικά:

- ο αριθμός δεσμών υδρογόνου που διασπώνται κατά την δράση των ενζύμων είναι διαφορετικός.

β. Για την έκφραση του γονιδίου συνιστάται ο υποκινητής του πλασμιδίου. Ο μηχανισμός της μεταγραφής είναι ο ίδιος στους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η RNA πολυμεράση, ως βασικό ένζυμο της μεταγραφής, λειτουργεί με βοήθεια πρωτεϊνών, που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι μεταγραφικοί παράγοντες παρουσιάζουν τεράστια ποικιλία σε σχέση με τους προκαρυωτικούς. Διαφορετικός συνδυασμός μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζει τη μεταγραφή κάθε γονιδίου. Αν ο υποκινητής προέρχεται από ευκαρυωτικό κύτταρο το βακτήριο δεν θα έχει τους κατάλληλους μετα-

γραφικούς παράγοντες και το εν λόγω γονίδιο, πιθανότατα, δεν θα εκφραστεί.

111. Κατά την αντιγραφή του DNA, οι DNA πολυμεράσες τοποθετούν συμπληρωματικά δεοξυριβονουκλεοτίδια απέναντι από τις μητρικές αλυσίδες του DNA, λειτουργώντας μόνο προς καθορισμένη κατεύθυνση. Παράλληλα, οι DNA πολυμεράσες μπορούν να συνθέτουν αλυσίδες DNA στο εργαστήριο, *in vitro*, εφόσον υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες και όλα τα απαραίτητα μόρια και υλικά. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται ένα υβριδικό μόριο DNA – RNA.



α. Να αναφέρετε τα ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων μεταξύ των οποίων αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου στο υβριδικό μόριο (μονάδες 2) και να εξηγήσετε σε ποια/ες βιολογική/ές διεργασία/ες που σχετίζονται με το γενετικό υλικό μπορεί να προκύψουν τέτοιου είδους υβριδικά μόρια τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* (μονάδες 4).

β. Αν σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα διαθέσετε τέτοιου είδους υβριδικά μόρια και όλες οι συνθήκες είναι κατάλληλες για τη σύνθεση πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας, να εξηγήσετε σε ποια/ες θέση/εις (A ή/και B) του σχήματος μπορεί να δράσει η DNA πολυμεράση επιμηκώνοντας την αλυσίδα, το άκρο της οποίας είναι μικρότερου μήκους (μονάδες 6).

Μονάδες 12

α. Με δεσμούς υδρογόνου συνδέονται δεοξυριβονουκλεοτίδια με βάσεις A, T, G, C με ριβονουκλεοτίδια με βάσεις U, A, C, G αντίστοιχα και αντίστροφα.

Υβριδικό μόριο RNA – DNA δημιουργείται:

-Κατά την αντιγραφή του DNA μεταξύ μητρικής αλυσίδας DNA και πρωταρχικού τμήματος RNA.
-Κατά τη μεταγραφή του DNA μεταξύ μεταγραφόμενης αλυσίδας DNA και του παραγόμενου RNA.

-Κατά την αντίστροφη μεταγραφή (*in vivo* ενός RNA ιού ή *in vitro* στα πλαίσια π.χ. cDNA βιβλιοθηκών).

-Κατά την ανίχνευση επιθυμητών μορίων - τμημάτων DNA ή RNA. Σε πολλές εργαστηριακές τεχνικές απαιτείται η χρήση μονόκλωνων ιχνηθετημένων ανιχνευτών DNA ή RNA, αντίστοιχα, οπότε μπορεί να προκύπτουν τέτοια υβριδικά μόρια.

β. Η DNA πολυμεράση μπορεί να δράσει μόνο στη θέση A, γιατί υπάρχει ελεύθερο 3' OH, για να δημιουργήσει 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό με τη φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου και υπάρχει και αλυσίδα – καλούπι DNA. Αντίθετα στη θέση B δεν μπορεί να δράσει, διότι αν και υπάρχει ελεύθερο 3' OH για να δράσει η DNA πολυμεράση, η αλυσίδα - καλούπι που θα την καθοδηγεί είναι αλυσίδα RNA.

116. Οι ιντερφερόνες είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιούς. Με τη σύνδεση των ιντερφερονών στα υγιή κύτταρα ενεργοποιείται η παραγωγή άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών στο εσωτερικό τους. Οι ιντερφερόνες σήμερα αποτελούν σημαντικό φάρμακο για πολλές ασθένειες όπως οι λευχαιμίες, η ηπατιτίδα και το μελάνωμα, γι' αυτό προέκυψε η ανάγκη της παραγωγής τους σε μεγάλες ποσότητες μέσω cDNA βιβλιοθηκών.

α. Να αναφέρετε τα βήματα για την δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών που να εκφράζουν το/τα γονίδια των ιντερφερονών (μονάδες 2) και να εξηγήσετε πως θα γίνει η επιλογή του κατάλλη-

λου κλώνου μετασηματισμένων βακτηρίων που θα εκφράζουν το γονίδιο μιας συγκεκριμένης ιντερφερόνης (μονάδες 2).

β. Να ονομάσετε την κατάλληλη συσκευή (μονάδες 3) και να γράψετε με ποιο είδος καλλιέργειας θα πρέπει να καλλιεργηθούν αυτά τα βακτήρια για να πετύχουμε αυξημένη παραγωγή της ιντερφερόνης, με δεδομένο ότι τα βακτήρια παράγουν την ιντερφερόνη κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής τους (μονάδες 3).

γ. Άλλες φαρμακευτικές πρωτεΐνες που παρασκευάζονται με μεθόδους βιοτεχνολογίας επιλέγεται να παράγονται μέσω των διαγονιδιακών ζώων και όχι μέσω cDNA βιβλιοθηκών σε βακτήρια. Να αιτιολογήσετε γιατί μπορεί να συμβαίνει αυτό (μονάδες 3).

Μονάδες 13

α. Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- Απομόνωση του συνολικού ώριμου mRNA, από κατάλληλα κύτταρα (π.χ. κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιό).
- Κατασκευή δίκλωνων μορίων DNA (με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και της DNA πολυμεράσης) και ενσωμάτωσή τους σε πλασμίδια.
- Μετασηματισμός βακτηρίων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και πολλαπλασιασμός τους σε υγρό θρεπτικό υλικό.
- Επιλογή των μετασηματισμένων βακτηρίων και στη συνέχεια εκείνων που περιέχουν το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την επιθυμητή ιντερφερόνη με τη χρήση κατάλληλων ιχνηθετημένων ανιχνευτών, δηλαδή μονόκλωνων μορίων DNA ή RNA με αλληλουχία συμπληρωματική και αντιπαράλληλη με το επιθυμητό γονίδιο (εναλλακτικά μπορεί να γίνει η ανίχνευση της ίδιας της ιντερφερόνης με τη χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων).

β. Η ανάπτυξη των βακτηρίων που επιλέχθηκαν θα πραγματοποιηθεί σε βιοαντιδραστήρα, με συνεχή καλλιέργεια, για παραγωγή του μορίου της ιντερφερόνης σε μεγάλη ποσότητα (με δεδομένο ότι παράγουν την ιντερφερόνη κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής τους).

γ. Τα διαγονιδιακά ζώα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χρήσιμων πρωτεϊνών σε μεγάλη ποσότητα. Είναι δυνατή η παραγωγή πρωτεϊνών, όπως η ινσουλίνη και η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη, από βακτήρια. Στις περισσότερες, όμως, περιπτώσεις οι πρωτεΐνες αυτές δεν είναι ακριβώς ίδιες με τις πρωτεΐνες του ανθρώπου, επειδή τα βακτήρια δεν διαθέτουν τους μηχανισμούς τροποποίησης των πρωτεϊνών που διαθέτουν οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Επιπρόσθετα, δεν είναι δυνατόν να γίνουν αυτές οι τροποποιήσεις *in vitro* (όπως στην περίπτωση της προΐνσουλίνης με τη χρήση κατάλληλου ενζύμου). Συνεπώς, η παραγωγή πρωτεϊνών (σε μεγάλες ποσότητες) που γίνονται λειτουργικές με πολύπλοκες τροποποιήσεις, πρέπει να γίνεται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως τα ζώα. Μια πολλά υποσχόμενη ιδέα είναι η παραγωγή πρωτεϊνών από κύτταρα των μαστικών αδένων των ζώων, για παράδειγμα των προβάτων και των αγελάδων. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η συλλογή της πρωτεΐνης από το γάλα των ζώων.

120. Σε ένα εργαστήριο μοριακής βιοτεχνολογίας και στα πλαίσια ενός πειράματος δημιουργίας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, ένα μόριο γραμμικού DNA αναμιγνύεται με το ένζυμο περιορισμού EcoRI και από τη δράση του (πέψη) προκύπτουν 10 τμήματα.

α. Να υπολογίσετε πόσοι φωσφοδιεστερικοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου θα διασπαστούν μετά την παραπάνω πέψη (μονάδες 4). Να σκεφτείτε αν οι αριθμοί των δεσμών που υπολογίσατε θα διαφοροποιούνταν σε περίπτωση που χρησιμοποιούσαμε διαφορετικό ένζυμο για να κόψουμε το ίδιο DNA σε ίσο αριθμό κομματιών (μονάδες 2).

β. Αν τα παραπάνω κομμάτια ενσωματωθούν το καθένα σε ένα πλασμίδιο, που έχει προηγουμένως κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση (EcoRI), να υπολογίσετε πόσοι φωσφοδι-

εστερικοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου θα δημιουργηθούν κατά το σχηματισμό καθενός ανασυνδυσμένου πλασμιδίου (μονάδες 3). Να ονομάσετε το ένζυμο, που είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωση του ξένου DNA στα πλασμίδια (μονάδες 2), περιγράφοντας τη συνεισφορά του στη διαδικασία του ανασυνδυασμού (μονάδες 2).

Μονάδες 13

α. Αφού, από το ευθύγραμμο τμήμα, προκύπτουν 10 κομμάτια σημαίνει ότι έχουμε 9 σημεία τομής, όπου η αλληλουχία 5'GAATTC3' (και η συμπληρωματική της) αναγνωρίζεται και κόβεται μεταξύ του πρώτου G-A στους δύο κλώνους του DNA. Συνεπώς, σπάνε 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί ανάμεσα σε νουκλεοτίδια με βάσεις G και A σε καθένα από τα 9 σημεία τομής, δηλαδή συνολικά σπάνε 18 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί. Επιπλέον σπάνε οι 2 δεσμοί υδρογόνου που ενώνουν καθένα από τα 4 ζευγάρια T-A στη δίκλωνη αλληλουχία αναγνώρισης, που αποδιατάσσεται μετά την πέψη με το ένζυμο. Άρα υπάρχουν 8 δεσμοί υδρογόνου για καθεμιά από τις 9 αλληλουχίες αναγνώρισης σε ολόκληρο το μόριο DNA, συνολικά δηλαδή 72 δεσμοί υδρογόνου. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούσαμε άλλη περιοριστική ενδονουκλεάση για την πέψη στον ίσο αριθμό κομματιών, η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου ίσως ήταν διαφορετική. Επομένως, μπορεί να άλλαζε ο αριθμός των δεσμών υδρογόνου, αλλά ο αριθμός των φωσφοδιεστερικών δεσμών που θα έσπαζαν θα παρέμενε ο ίδιος, καθώς ο αριθμός των σημείων κοπής στο δίκλωνο DNA θα ήταν ο ίδιος.

β. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού, αναμιγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους, οπότε αποκαθίστανται σε κάθε σημείο ένωσης οι 8 δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα 4 ζευγάρια T-A. Εφόσον έχουμε δύο σημεία ένωσης, από ένα εκατέρωθεν, του "ξένου" DNA, με τα δύο άκρα του "ανοιγμένου" πλασμιδίου έχουμε συνολικά $8+8=16$ δεσμούς υδρογόνου να δημιουργούνται εκ' νέου κατά τον ανασυνδυασμό ενός πλασμιδίου. Όσον αφορά τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, αυτοί αποκαθίστανται με τη μεσολάβηση ενός ειδικού ενζύμου, της DNA δεσμάσης. Η DNA δεσμάση φυσιολογικά είναι ένα από τα ένζυμα της αντιγραφής που συνδέει κομμάτια DNA. Έτσι προκύπτουν τελικά τα ανασυνδυσμένα πλασμίδια, με τη δημιουργία 2 φωσφοδιεστερικών δεσμών σε καθένα από τα δύο άκρα ενσωμάτωσης του "ξένου" DNA σε κάθε πλασμίδιο. Συμπερασματικά λοιπόν, η DNA δεσμάση καταλύει το σχηματισμό 4 φωσφοδιεστερικών δεσμών σε κάθε ανασυνδυσμένο πλασμίδιο.

122. Σε ένα εργαστήριο εμβρυολογίας λαμβάνεται δείγμα σπέρματος από έναν άνδρα. Στα πλαίσια ενός πειράματος μοριακής γενετικής κατασκευάζεται γονιδιωματική βιβλιοθήκη από τα σπερματοζωάρια του δείγματος. Σε γενικές γραμμές τα βήματα που ακολουθούνται προκειμένου να κατασκευάσουμε γονιδιωματική βιβλιοθήκη από γαμέτες είναι κατά βάση ίδια με αυτά που ακολουθούμε για να κατασκευάσουμε γονιδιωματική βιβλιοθήκη από σωματικά κύτταρα.

α. Να εξηγήσετε αν η γονιδιωματική βιβλιοθήκη που θα προκύψει από τα σπερματοζωάρια του συγκεκριμένου άνδρα αναμένεται να έχει διαφορές από την γονιδιωματική βιβλιοθήκη που θα έδινε κάποιο σωματικό κύτταρο του ίδιου άνδρα (μονάδες 6).

β. Η κατασκευή μοριακού καρυστύπου είναι μια σύγχρονη μοριακή μέθοδος στην οποία, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνεται ο εντοπισμός συγκεκριμένων αλληλουχιών, με τη χρήση ειδικών μορίων ανιχνευτών. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό γονιδίων που ενοχοποιούνται για ασθένειες, όπως το γονίδιο της κυστικής ίνωσης. Αποφασίζουμε να προβούμε στην κατασκευή μοριακού καρυστύπου για να αναζητήσουμε στα σπερματοζωάρια του άνδρα ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο γονίδιο υπεύθυνο για την κυστική ίνωση. Να αναφέρετε τις δύο διαδικασίες που θα υποστεί η διπλή έλικα του DNA του δείγματος, προκειμένου να γίνει η

ανίχνευση των αλληλομόρφων με τα κατάλληλα μόρια-ανιχνευτές (μονάδες 4) και να περιγράψετε πώς η συμπληρωματικότητα των βάσεων στηρίζει την όλη εφαρμογή της τεχνικής ανίχνευσης (μονάδες 3).

Μονάδες 13

α. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού δότη αποτελεί μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη. Μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει έναν τεράστιο αριθμό από κλωνοποιημένα κομμάτια χρωμοσωμικού DNA, τα οποία έχουν παραχθεί με δράση κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Επομένως κάθε είδος οργανισμού έχει μία και μοναδική γονιδιωματική βιβλιοθήκη ανεξάρτητα από το είδος του σωματικού κυττάρου από το οποίο απομονώνεται το ολικό DNA. Στην περίπτωση, όμως, που το DNA για την κατασκευή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης απομονώνεται από γαμέτες, όπως είναι τα σπερματοζωάρια, θα υπάρχει η μισή ποσότητα γενετικού υλικού σε σχέση με την γονιδιωματική βιβλιοθήκη που προκύπτει από σωματικά κύτταρα του ανθρώπου. Εκτός όμως από την ποσοτική διαφορά θα υπάρχει και ποιοτική: κάθε γονίδιο ή τμήμα γονιδίου ή οποιαδήποτε άλλη αλληλουχία (ρυθμιστική ή μη) του γονιδιώματος θα βρίσκεται στη βιβλιοθήκη του γαμέτη μία μόνο φορά, και επειδή οι αλληλουχίες αυτές στα δύο ομόλογα χρωμοσώματα μπορεί να είναι διαφορετικές, ανάλογα με το ποια έχει επιλεγεί κατά τη μειωτική διαδικασία να μεταβιβαστεί στο γαμέτη, θα υπάρχει αντίστοιχος αριθμός διαφορετικών κλώνων.

β. Οι δύο διαδικασίες - κλειδί στην όλη πειραματική πορεία είναι η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA των σπερματοζωαρίων και στη συνέχεια η υβριδοποίηση επιλεκτικά των αλληλουχιών του γονιδίου της κυστικής ίνωσης που αναζητάμε με τα μόρια των ανιχνευτών, βάσει της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Η τεχνική περιλαμβάνει τη χρήση ιχνηθετημένων μονόκλωνων μορίων DNA ή RNA ανιχνευτών που περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές και αντιπαράλληλες προς το DNA του γονιδίου της κυστικής ίνωσης. Οι ανιχνευτές αναμειγνύονται με το απομονωμένο DNA των σπερματοζωαρίων (το οποίο έχει προηγουμένως αποδιαταχθεί) και υβριδοποιούν μόνο το συμπληρωματικό τους DNA. Η υβριδοποίηση είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα του DNA, η οποία, χάρη στη συμπληρωματικότητα των βάσεων, μας δίνει τη δυνατότητα αν έχουμε ένα γνωστό μόριο DNA, να το χρησιμοποιήσουμε ως ανιχνευτή για τον εντοπισμό του συμπληρωματικού του, ακόμη και όταν το τελευταίο βρίσκεται μαζί με χιλιάδες άλλα κομμάτια.

123. Το παρακάτω τμήμα DNA έχει προκύψει από τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI και περιέχει γονίδιο που κωδικοποιεί ένα ολιγοπεπτίδιο τεσσάρων αμινοξέων.

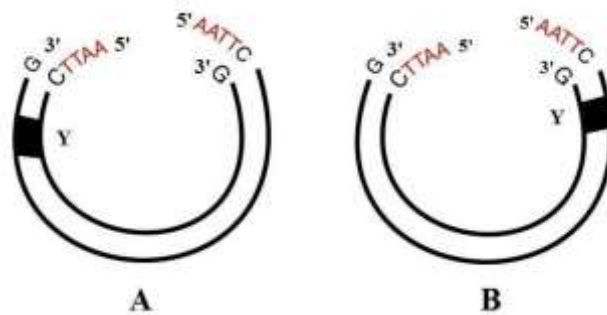
5' AATTCATGTTTATACGCTGAG 3'

3' GTACAAATATGCGACTCTTAA 5'

α. Να γράψετε αν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ολιγοπεπτίδιο προέρχεται από ευκαρυωτικό ή προκαρυωτικό οργανισμό (μονάδες 2) και να δικαιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 4).

β. Το παραπάνω γονίδιο, με τα μονόκλινα άκρα του, το διαθέτουμε σε περισσότερα αντίγραφα και μπορούμε να το εισάγουμε σε δύο φορείς κλωνοποίησης – πλασμίδια A και B

- όπως φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Αν το γράμμα Y αντιστοιχεί σε έναν βακτηριακό υποκινητή γονιδίου του πλασμιδίου, μετά από τον οποίο θα εισαχθεί το γονίδιο που διαθέτουμε, ποιος (ή ποιοι) από τους παραπάνω φορείς A και B θεωρείτε ότι είναι κατάλληλος/κατάλληλοι για την εισαγωγή του γονιδίου ώστε αυτό να εκφραστεί και να παράγει το ολιγοπεπτίδιο μέσα σε βακτήρια ξενιστές που μετασχηματίζονται με αυτά (μονάδες 2); Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 2) και να γράψετε έναν τρόπο με τον οποίο μπορεί να πραγματοποιηθεί η επιλογή των βακτηρίων που εκφράζουν το γονίδιο (μονάδες 2).

Μονάδες 12

α. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ολιγοπεπτίδιο μπορεί να προέρχεται είτε από ευκαρυωτικό είτε από προκαρυωτικό οργανισμό. Το γονίδιο δεν φέρει εσώνια γιατί αποτελείται από πέντε κωδικόνια εκ των οποίων τα τέσσερα είναι των αμινοξέων και το πέμπτο είναι το κωδικόνιο λήξης (της μετάφρασης). Συνεχή γονίδια μπορεί να συναντήσουμε και στο γονιδίωμα (ή στο μιτοχονδριακό ή χλωροπλαστιδιακό γενετικό υλικό) των ευκαρυωτικών οργανισμών αλλά και στο κύριο DNA ή στα πλασμίδια των βακτηρίων.

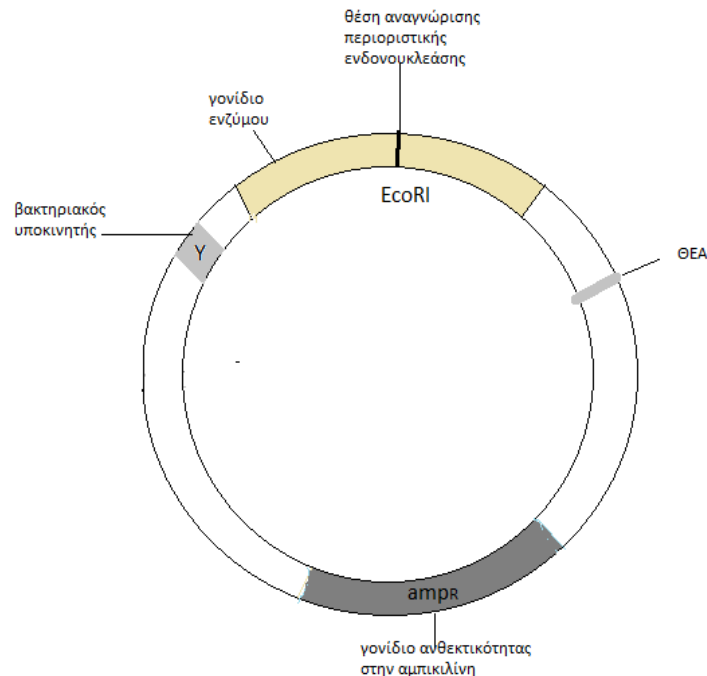


β. Και τα δύο φορείς – πλασμίδια είναι κατάλληλα για την εισαγωγή του γονιδίου ώστε αυτό να εκφραστεί και να παράγει το ολιγοπεπτίδιο, αρκεί να μπει κάθε φορά με κατάλληλο προσανατολισμό. Τα άκρα των πλασμιδίων μπορούν να συνδεθούν με εκείνα του τμήματος DNA που φέρει το γονίδιο (καθώς είναι συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα). Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο εκφράζεται στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο A όταν έχει τη μη κωδική του αλυσίδα τοποθετημένη με το 3' άκρο στον υποκινητή που βρίσκεται αριστερά. Άρα, το τμήμα DNA θα πρέπει να συνδέεται έχοντας την αλυσίδα 1 εξωτερικά με προσανατολισμό 5' → 3', ξεκινώντας από τον υποκινητή. Στο πλασμίδιο B, το γονίδιο εκφράζεται όταν η μη κωδική έχει το 3' άκρο δεξιά, μετά τον υποκινητή, άρα η κωδική (με προσανατολισμό 5' → 3') εκφράζεται όταν συνδέεται στην εσωτερική αλυσίδα του πλασμιδίου μετά τον υποκινητή που βρίσκεται δεξιά. Επειδή όλα τα πλασμίδια φέρουν την ίδια αλληλουχία με κατάλληλο ή μη προσανατολισμό, η επιλογή μπορεί να γίνει είτε με κατάλληλο ανιχνευτή που να αναγνωρίζει την αλληλουχία του γονιδίου και μέρος του υποκινητή (ή με κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα που ανιχνεύουν το προϊόν του γονιδίου, δηλαδή το επιθυμητό πεπτίδιο).

126. Για την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πλασμίδιο, στο οποίο υπάρχουν οι εξής αλληλουχίες: μοναδικό γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικίνη, βακτηριακός υποκινητής μπροστά από γονίδιο ενός ενζύμου, με το οποίο τα θαλάσσια βακτήρια *Vibrio fischeri*, όταν βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα, παράγουν βιοφωτάγεια και τέλος, θέση έναρξης της αντιγραφής. Η μοναδική θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI βρίσκεται μέσα στο γονίδιο του ενζύμου. Στο θρεπτικό υλικό της

καλλιέργειας για την ανάπτυξη της βιβλιοθήκης υπάρχουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των βακτηριακών κλώνων, το κατάλληλο υπόστρωμα για τη δράση του εν λόγω ενζύμου, καθώς και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη.

υπόστρωμα $\xrightarrow{\text{ένζυμο}}$ προϊόντα + βιοφωταύγεια



α. Να εξηγήσετε ποια κατηγορία βακτηρίων θα επιβιώσει στο παραπάνω θρεπτικό υλικό, τα μετασχηματισμένα ή τα μη μετασχηματισμένα με το παραπάνω πλασμίδιο (μονάδες 4), καθώς και με ποιο ένζυμο θα πρέπει να κοπεί το γονιδίωμα του δότη που θα κλωνοποιηθεί με τη βιβλιοθήκη (μονάδες 2).

β. Να περιγράψετε ποιες αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων μπορούν να παράγουν βιοφωταύγεια στην παραπάνω βιβλιοθήκη (μονάδες 5) και να αιτιολογήσετε γιατί όταν άλλαξε το pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας δεν παρατηρήθηκε καμία αποικία που να παράγει βιοφωταύγεια (μονάδες 2).

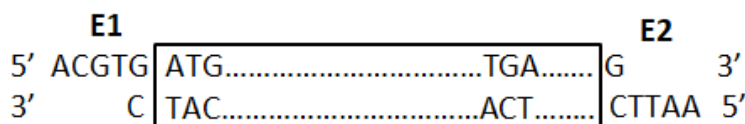
Μονάδες 13

α. Στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας έχει προστεθεί το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, συνεπώς θα επιβιώσουν μόνο εκείνα τα βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί, δηλαδή έχουν προσλάβει το πλασμίδιο που περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Αυτά θα επιβιώσουν και θα σχηματίσουν αποικίες. Τα μη μετασχηματισμένα θα πεθάνουν. Το γονιδίωμα του δότη πρέπει να κοπεί με το ίδιο ένζυμο περιορισμού που αναγνωρίζει και το πλασμίδιο σε μοναδική θέση, δηλαδή την EcoRI. Έτσι θα δημιουργηθούν τμήματα που διαθέτουν με τα πλασμίδια (μετά την πέψη) τα ίδια μονόκλωνα, συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα άκρα.

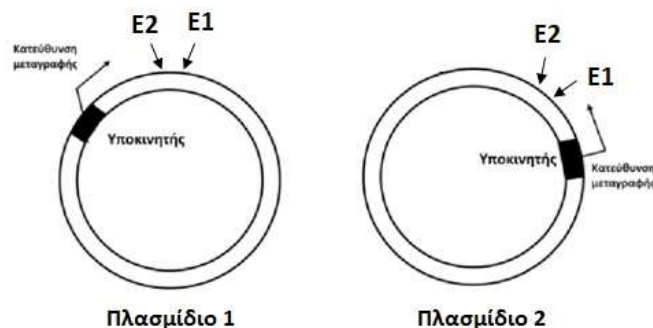
β. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια με ανασυνδυασμένα πλασμίδια (που είναι και τα επιθυμητά στην βιβλιοθήκη) δεν παράγουν φωταύγεια καθώς το ξένο DNA έχει εισαχθεί μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου του ενζύμου (εκεί είναι η μοναδική θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης). Συνεπώς, το γονίδιο του ενζύμου δεν εκφράζεται και δεν πραγματοποιείται η αντίδραση που οδηγεί στην παραγωγή φωτός. Αντίθετα, στα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια (στα οποία ξαναέκλεισαν τα άκρα τους), το γονίδιο του ενζύμου παραμένει λειτουργικό και πραγματοποιείται η αντίδραση, άρα οι αποικίες των βακτηρίων που έχουν προσλάβει μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, θα παράγουν βιοφωταύγεια. Τέλος, όταν άλλαξε το pH στο θρε-

πτικό υλικό της καλλιέργειας, το ένζυμο πιθανότατα μετουσιώθηκε και δεν πραγματοποιήθηκε σε καμία αποικία η αντίδραση που καταλύει.

134. Η αλβουμίνη, μια πρωτεΐνη του πλάσματος, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του όγκου του αίματος, καθώς και στη μεταφορά διαφόρων ουσιών στη κυκλοφορία του αίματος. Στην ιατρική, η αλβουμίνη χορηγείται σε ασθενείς που εμφανίζουν υπερβολική απώλεια αίματος ή φέρουν σοβαρά εγκαύματα. Επίσης, χρησιμοποιείται και στη παρασκευή φαρμάκων και εμβολίων. Επειδή, σήμερα, η ετήσια ζήτηση αλβουμίνης είναι τόσο υψηλή, ώστε δεν επαρκούν οι φυσικές πηγές, η πρωτεΐνη αυτή παράγεται συνθετικά με τα εργαλεία της γενετικής μηχανικής. Το 2011, μια ερευνητική ομάδα στη Κίνα συνέθεσε αλβουμίνη σε φυτά ρυζιού στα οποία εισήγαγαν το παρακάτω τμήμα DNA που κωδικοποιούσε για την ανθρώπινη αλβουμίνη και δεν έφερε εσώνια. Το τμήμα αυτό είχε στα άκρα του θέσεις που αναγνώριζαν δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η E1 και E2, οι οποίες, όταν επιδράσουν, αφήνουν τα μονόκλωνα άκρα που φαίνονται στην εικόνα. Επίσης, στο παρακάτω τμήμα DNA φαίνονται και οι θέσεις των κωδικονίων έναρξης και λήξης.



- α. Να βρείτε ποια από τις δύο αλυσίδες του τμήματος αυτού αντιστοιχεί στην αλυσίδα cDNA (μονάδες 2) και να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 3).
 β. Να εξηγήσετε ποιο από τα παρακάτω πλασμίδια θεωρείτε κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί για να παραχθεί η αλβουμίνη στα φυτικά κύτταρα (μονάδες 4).



- γ. Να εξηγήσετε ποιο είδος πλασμιδίων χρησιμοποίησαν οι επιστήμονες για να μεταφέρουν ξένο DNA στα φυτά του ρυζιού (μονάδες 3) και να αναφέρετε τους οργανισμούς στους οποίους φυσιολογικά εντοπίζονται τα πλασμίδια αυτά (μονάδα 1).

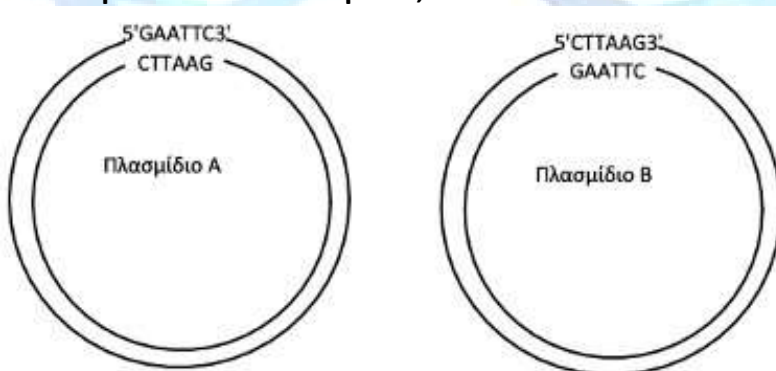
Μονάδες 13

- α. Μια αλυσίδα cDNA συντίθεται με καλούπι ένα μόριο mRNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης. Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αποδιατάσσεται με θέρμανση και το cDNA χρησιμοποιείται εκ' νέου σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Έτσι, σχηματίζεται ένα δίκλωνο μόριο DNA (όπως του σχήματος που δίνεται στην εκφώνηση). Επειδή μια αλυσίδα cDNA είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη στο μόριο του mRNA, θα φέρει τις συμπληρωματικές αλληλουχίες των κωδικονίων έναρξης 5'-AUG-3' και λήξης 5'-UGA-3'. Συνεπώς, η αλυσίδα cDNA θα είναι η κάτω στο τμήμα DNA που δίνεται.
 β. Για να παραχθεί αλβουμίνη, το τμήμα που δίνεται θα πρέπει να ενσωματωθεί στο πλασμίδιο με τον κατάλληλο προσανατολισμό αμέσως μετά τον υποκινητή. Με άλλα λόγια, το κωδικόνιο έναρξης, που εντοπίζεται δίπλα από τη θέση που κόβει η E1, πρέπει να βρίσκεται κοντά στον

υποκινητή. Συνεπώς, το πλασμίδιο 2 είναι κατάλληλο για να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης.

γ. Οι επιστήμονες χρησιμοποίησαν τα πλασμίδια Ti για να μεταφέρουν ξένο DNA στα φυτικά κύτταρα του ρυζιού. Τα πλασμίδια αυτά έχουν φυσιολογικά την δυνατότητα να ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό των φυτικών κυττάρων και να δημιουργούν εξογκώματα (όγκους) στο σώμα των φυτών. Για το λόγο αυτό, οι ερευνητές απενεργοποιούν τα γονίδια που δημιουργούν τους όγκους, τοποθετώντας στη θέση τους το ξένο DNA που θα προσδώσει στο φυτό μία επιθυμητή ιδιότητα. Τα πλασμίδια Ti φυσιολογικά εντοπίζονται στα βακτήρια του είδους *Agrobacterium tumefaciens*.

138. Θέλουμε να δημιουργήσουμε, χρησιμοποιώντας κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση και τη DNA δεσμάση, ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που να περιέχει ένα ευκαρυωτικό γονίδιο υπεύθυνο για τη σύνθεση ενός ολιγοπεπτιδίου, και στη συνέχεια να μετασχηματίσουμε βακτήρια με το ανασυνδυασμένο DNA, με σκοπό τη μελέτη και την έκφραση του ευκαρυωτικού γονιδίου. Δίνονται παρακάτω δύο πλασμίδια, το A και το B.



Το κάθε πλασμίδιο διαθέτει από ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε ένα αντιβιοτικό και έχει το κατάλληλο μέγεθος για την είσοδό του σε ένα βακτήριο-ξενιστή. Στο σχήμα επισημαίνονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες δεν επηρεάζουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ή τη θέση έναρξης της αντιγραφής των πλασμιδίων.

α. Να εξηγήσετε ποιο από τα δύο πλασμίδια, το A ή το B, πιστεύετε ότι είναι το κατάλληλο για τον ανασυνδυασμό (μονάδες 2), αναφέροντας παράλληλα και τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληροί το πλασμίδιο, προκειμένου, επιπλέον, να μπορεί να εκφραστεί το γονίδιο μετά τον μετασχηματισμό βακτηρίων με αυτό (μονάδες 4).

β. Αν το κατάλληλο πλασμίδιο διαθέτει όλα όσα απαιτούνται για την έκφραση του ευκαρυωτικού γονιδίου στα μετασχηματισμένα βακτήρια, και με δεδομένο ότι το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί για μία πεπτιδική αλυσίδα, να εξηγήσετε αν τα μετασχηματισμένα βακτήρια θα παράγουν το ίδιο πεπτίδιο με αυτό που θα παραγόταν στο ευκαρυωτικό κύτταρο (μονάδες 7).

Μονάδες 13

α. Κατάλληλο είναι τόσο το πλασμίδιο A όσο και το πλασμίδιο B γιατί δεν αναφέρεται ποια περιοριστική ενδονουκλεάση θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε. Αν χρησιμοποιούσαμε την EcoRI θα ήταν κατάλληλο το A γιατί περιέχει την αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI με τον σωστό προσανατολισμό, δηλαδή την αλληλουχία:

5'-G/AATTC-3'

3'-CTTAA/G-5'

Αν όμως επιλέγαμε κάποια άλλη περιοριστική ενδονουκλεάση, θα μπορούσε να είναι κατάλληλο και το πλασμίδιο B.

Για να εκφραστεί το ευκαρυωτικό αυτό γονίδιο, θα πρέπει να ενσωματωθεί μετά από έναν ενεργό βακτηριακό υποκινητή με κατάλληλο προσανατολισμό και να υπάρχουν οι κατάλληλες

αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής μετά από αυτό.

β. Μπορούμε να διακρίνουμε δύο περιπτώσεις: Αν το γονίδιο που έχει ενσωματωθεί είναι ασυνεχές δεν θα παραχθεί το ίδιο προϊόν διότι, ακόμα κι αν ο ανασυνδυασμός πραγματοποιηθεί με το σωστό προσανατολισμό (το γονίδιο μπορεί να ενσωματωθεί στο πλασμίδιο με δύο τρόπους), δεν υπάρχει δυνατότητα αφαίρεσης του εσωνίου από το παραγόμενο mRNA, καθώς οι προκαρυωτικοί οργανισμοί δεν έχουν τη δυνατότητα ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA. Επιπρόσθετα, μία πρωτεΐνη για να γίνει λειτουργική μπορεί να χρειάζεται περαιτέρω τροποποιήσεις, πχ αποκοπή αμινοξέων. Αν το γονίδιο που έχει ενσωματωθεί είναι συνεχές, μπορεί να παραχθεί το ίδιο προϊόν εφόσον ο ανασυνδυασμός πραγματοποιηθεί με το σωστό προσανατολισμό και εφόσον το πεπτίδιο που παράγεται δεν χρειάζεται τροποποιήσεις μετά τη μετάφραση.

140. Οι φάγοι αποτελούν κατηγορία ιών που μολύνουν βακτήρια και μπορεί να διαθέτουν DNA ή RNA ως γενετικό υλικό που μπορεί να είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο, χωρίς όμως να έχουν τη δυνατότητα να συνθέσουν DNA από RNA. Οι παρακάτω αλληλουχίες συνιστούν τμήματα των αλληλουχιών του γενετικού υλικού διαφορετικών φάγων:

Φάγος Α: 5'.....CCCCGGCGGCCGCGGCAU.....3',

Φάγος Β: 5'.....CCCAGAATTCAAGCGGCCGAGGC.....3'

Φάγος Γ: 5'.....CCCCGCCCGCGGCCGCGGC.....3'

3'.....GGGGCGGGCGCCGGCGCCG.....5'

Με τους ιούς αυτούς μολύνουμε βακτήρια του είδους *Nocardia otitidis*, τα οποία γνωρίζουμε ότι συνθέτουν στο κυτταρόπλασμα τους το ένζυμο περιορισμού NotI, του οποίου η αλληλουχία αναγνώρισης και η θέση κοπής είναι:

5'GC\ GGCCGC3'

3'CGCCGG /CG5'

Στη συνέχεια μελετούμε τον κύκλο ζωής των φάγων και καταγράφουμε τη δυνατότητά τους για παραγωγή νέων ιών.

α. Να περιγράψετε τον τρόπο δράσης των περιοριστικών ενζύμων και να εξηγήσετε τον ρόλο τους στα βακτηριακά κύτταρα (μονάδες 4), αναφέροντας ένα παράδειγμα τέτοιου ενζύμου (μονάδες 2).

β. Να εξηγήσετε εάν η περιοριστική ενδονουκλεάση που παράγει το εν λόγω βακτήριο μπορεί να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των ιών Α (μονάδες 2), Β (μονάδες 2) και Γ (μονάδες 3) στο εσωτερικό του.

Δίνεται ότι οι ιοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν όλα τα ένζυμα που διαθέτει το κύτταρο που προσβάλλουν για να πραγματοποιήσουν τις διαδικασίες αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης και ότι η αλληλουχία του περιοριστικού ενζύμου δεν εντοπίζεται στο υπόλοιπο γενετικό υλικό των ιών.

Μονάδες 13

α. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την εισβολή «ξένου» DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 ζευγών νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA και τις κόβουν σε συγκεκριμένες θέσεις αφήνοντας τις περισσότερες φορές μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις. Μία από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η EcoRI που απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*. Το ένζυμο αυτό όποτε συνα-

ντά την αλληλουχία: 5'-G A A T T C-3' (δίκλωνη) στο γονιδίωμα, κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του G και του A (με κατεύθυνση 5'→3') αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα.

β. Φάγος A: 5'.....CCCCGGCGGCCGCGCAU.....3', διαθέτει RNA γενετικό υλικό το οποίο δε θα κοπεί από το περιοριστικό ένζυμο που διαθέτει το βακτήριο, άρα ο φάγος θα πολλαπλασιαστεί.

Φάγος B: 5'.....CCCAGAATTCAAGCGGCCGAGGC.....3', διαθέτει DNA μονόκλωνο ως γενετικό υλικό το οποίο ακόμη και αν το μετατρέψει σε δίκλωνο κατά την αντιγραφή, η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης δεν εντοπίζεται στο συγκεκριμένο τμήμα, οπότε το ένζυμο δε θα δράσει και ο ιός θα πολλαπλασιαστεί.

Φάγος Γ: 5'.....CCCCGCCCGCGGCCGCGGC.....3'
3'.....GGGGCGGGCGCCGGCGCCG.....5'

1^η περίπτωση: αν το γενετικό υλικό είναι δίκλωνο DNA, εντοπίζεται η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου, οπότε θα γίνει θραύση του γενετικού υλικού και ο φάγος δε θα πολλαπλασιαστεί μέσα στο βακτηριακό κύτταρο.

2^η περίπτωση: αν το γενετικό υλικό είναι δίκλωνο RNA, δε θα γίνει θραύση του γενετικού υλικού και ο φάγος θα πολλαπλασιαστεί μέσα στο βακτηριακό κύτταρο.

147. Η μεταγραφή ενός γονιδίου και η μετάφραση του mRNA που έχει παραχθεί από την εν λόγω μεταγραφή, έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μιας πεπτιδικής αλυσίδας. Τα πεπτίδια στα οποία ο αριθμός των αμινοξέων υπερβαίνει τα 50 ονομάζονται πολυπεπτίδια, ενώ όταν ο αριθμός δεν υπερβαίνει τα 50 ονομάζονται ολιγοπεπτίδια. Παρακάτω φαίνεται η αλληλουχία των δύο κλώνων ενός γονιδίου το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ενός ολιγοπεπτιδίου.

I	5'	G	G	A	A	T	T	C	A	T	G	A	C	T	A	C	T	C	C	A	C	C	T	C	C	A	T	G	A	A	T	T	C	G
II	3'	C	C	T	T	A	A	G	T	A	C	T	G	A	T	G	A	G	G	T	G	G	A	G	G	T	A	C	T	T	A	A	G	C

Ύστερα από χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI στην παραπάνω αλληλουχία προέκυψε τμήμα που εντάχθηκε σε πλασμίδιο. Το πλασμίδιο, στη συνέχεια, εισήχθη σε βακτήριο με αποτέλεσμα την παραγωγή του ολιγοπεπτιδίου με αλληλουχία αμινοξέων:

H₂N-μεθειονίνη-γλουταμινικόξυ-βαλίνη-γλουταμινικό οξύ-COOH.

α. Να υποδείξετε τα σημεία στα οποία κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στην παραπάνω αλληλουχία και να υπολογίσετε πόσοι και τι είδους δεσμοί καταστρέφονται κατά τη δράση της (άμεσα ή έμμεσα) (μονάδες 4).

β. Να εξηγήσετε ποιος από τους δύο κλώνους αποτελεί τον κωδικό κλώνο της αλληλουχίας (μονάδες 3).

γ. Να εξηγήσετε ποια ήταν η θέση του υποκινητή στο πλασμίδιο προκειμένου να παραχθεί το ολιγοπεπτίδιο της εκφώνησης (μονάδες 3) και να εξηγήσετε ποια θα ήταν η συνέπεια αν το γονίδιο εισαγόταν στο πλασμίδιο με αντίθετο προσανατολισμό (μονάδες 3).

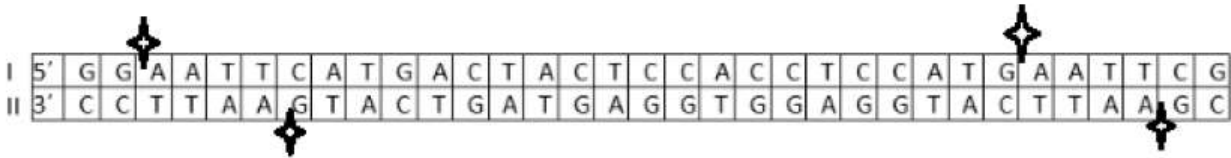
Μονάδες 13

α. Η EcoRI αναγνωρίζει την αλληλουχία: 5'-G↓A A T T C-3'
3'-C T T A A ↓G-5'

και κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ των νουκλεοτιδίων με βάση G και A (με κατεύθυνση 5'→3') αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Στη συγκεκριμένη

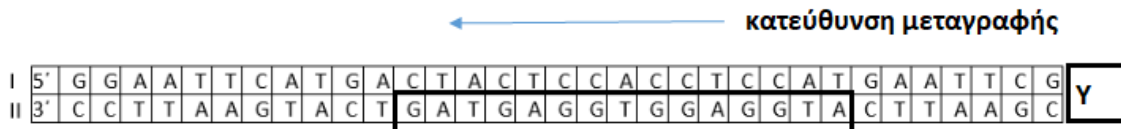
αλληλουχία υπάρχουν δύο σημεία όπου κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, όπως υποδεικνύεται παρακάτω, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται συνολικά 20 δεσμοί, 16 δεσμοί υ-

δρογόνου και 4 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί.



β. Ο κλώνος που αποτελεί τον κωδικό κλώνο της αλληλουχίας είναι ο κλώνος II, ενώ ο κλώνος που αποτελεί τον μη κωδικό κλώνο, με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας και της αντιπαλληλίας των δύο αλυσίδων, είναι ο I. Αυτό συμβαίνει διότι στον κλώνο II συναντάμε με βήμα τριπλέτας, συνεχώς και μη επικαλυπτόμενα, τα κωδικόνια, $5'ATG^3'$ (που αντιστοιχεί στο κωδικόνιο έναρξης $5'AUG^3'$ του mRNA και κωδικοποιεί για το αμινοξύ μεθειονίνη), καθώς και τα κωδικόνια για τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, βαλίνη, γλουταμινικό οξύ. Τέλος, μετά τα κωδικόνια που κωδικοποιούν το ολιγοπεπτίδιο συναντάμε στο κλώνο II το κωδικόνιο λήξης $5'TAG^3'$ που αντιστοιχεί στο κωδικόνιο λήξης $5'TAG^3'$ στο mRNA. (Γνωρίζουμε ότι τα κωδικόνια για το γλουταμινικό οξύ και τη βαλίνη είναι αντίστοιχα τα $5'GAG^3'$ και $5'GTG^3'$ από την αλληλουχία του γονιδίου B της αιμοσφαιρίνης HbA του ανθρώπου, όπου στην περίπτωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας το γλουταμινικό οξύ $5'GAG^3'$ μεταλλάσσεται σε $5'GTG^3'$ για βαλίνη).

γ. Ο υποκινητής πρέπει να βρίσκεται στα δεξιά της αλληλουχίας που δίνεται, ώστε να μεταγραφεί ο μη κωδικός κλώνος I με κατεύθυνση από το 3' προς το 5' άκρο του. Η μεταγραφή καταλύεται από ένα ένζυμο, την RNA πολυμεράση (στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν τρία είδη RNA πολυμερασών). Η RNA πολυμεράση προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, που ονομάζονται υποκινητές, με τη βοήθεια πρωτεϊνών που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες. Οι υποκινητές και οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν τα ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής του DNA και επιτρέπουν στην RNA πολυμεράση να αρχίσει σωστά τη μεταγραφή. Οι υποκινητές βρίσκονται πάντοτε πριν από την αρχή κάθε γονιδίου.



Αν η αλληλουχία τοποθετείτο με αντίθετο προσανατολισμό ως προς τον υποκινητή, τότε θα διαβαζόταν ως μη κωδική η αλυσίδα II, και η κατεύθυνση της μεταγραφής θα οδηγούσε στην παραγωγή ενός mRNA που θα περιείχε επίσης κωδικόνιο έναρξης και λήξης, αλλά ενδιάμεσα θα υπήρχαν διαφορετικά κωδικονία από εκείνα του πεπτιδίου που θέλουμε να παραχθεί. Συγκεκριμένα διαβάζουμε τα κωδικονία $5'-ATG ACT ACT CCA CCT CCA TGA -3'$, με το τελευταίο να αποτελεί το κωδικόνιο λήξης. Άρα θα παραγόταν ένα διαφορετικό πεπτίδιο με 6 αμινοξέα.

150. Η κλωνοποίηση είναι μια ιδιαίτερα επίπονη ερευνητική διαδικασία. Πρέπει να ληφθούν υπόψη αρκετοί παράγοντες, τόσο ως προς το γονίδιο που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε, όσο και ως προς τον φορέα κλωνοποίησης. Στην παρακάτω αλληλουχία DNA εντοπίζεται ένα συνεχές γονίδιο, που κωδικοποιεί για ένα ολιγοπεπτίδιο (σημειώνεται η κωδική και η μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου, καθώς και το κωδικόνιο έναρξής του):

$5' \dots ACGTGAATTCATGTTATTTCCCGGCTAGCATAAGCTTACGT \dots 3'$ κωδική

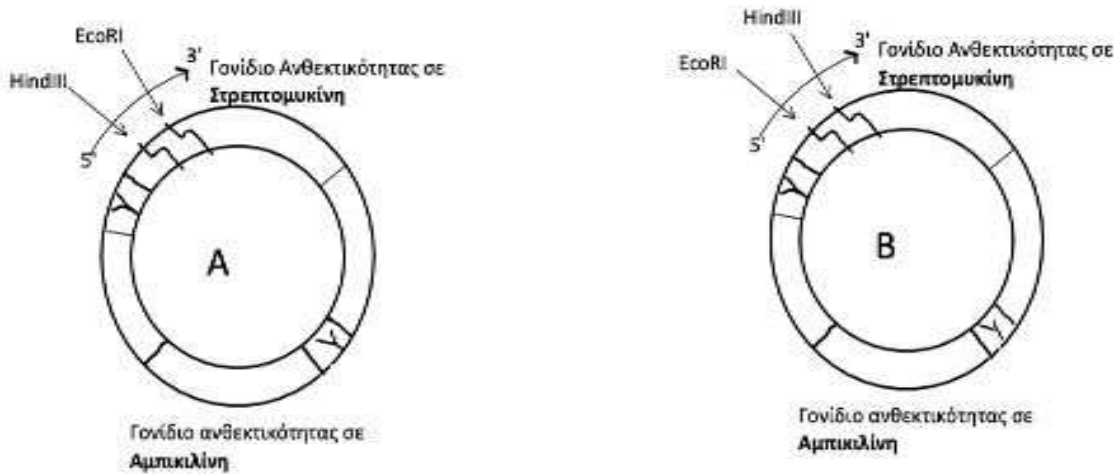
$3' \dots TGCACCTAAGTACAATAAAGGGCCGATCGTATTTCGAATGCA \dots 5'$ μη κωδική

Για την κλωνοποίηση του παραπάνω γονιδίου, είναι διαθέσιμα τα παρακάτω πλασμίδια A και B, στα οποία φαίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών EcoRI και HindIII εσωτερικά του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη. Η αλληλουχία

που αναγνωρίζει η *HindIII* είναι:

5' A/AGCTT 3'

3' TTCGA/A 5', η οποία διασπά τους δεσμούς ανάμεσα στα δύο νουκλεοτίδια με αδενίνη (A).



α. Να εξηγήσετε αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα δύο πλασμίδια για την κλωνοποίηση του παραπάνω τμήματος DNA μέσα σε βακτήρια-ξενιστές, αν γνωρίζετε ότι ένα πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης αφού κοπεί ταυτόχρονα από δύο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες που κόβουν σε μικρή απόσταση (μονάδες 6).

β. Να προβλέψετε το προϊόν έκφρασης του παραπάνω γονιδίου, έπειτα από την κλωνοποίησή του μέσα σε βακτήρια-ξενιστές, που το καθένα είχε λάβει από ένα μόνο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ο γενετικός κώδικας παρατίθεται στο τέλος του θέματος (μονάδες 6).

Μονάδες 12

α. Η θέση αναγνώρισης της *EcoRI* είναι 5'G/AATTC3' και της *HindIII* είναι 5' A/AGCTT 3'.
3' CTAA/G5' 3' TTCGA/A 5'

Συνεπώς, το δοθέν τμήμα DNA κόβεται αριστερά από την *EcoRI* και δεξιά από την *HindIII*, όπως φαίνεται παρακάτω:

5' ...ACGTG/AATTCATGTTA|TTCCTCCGG CTAGCATA/AGCTTACGT ...3' κωδική
3' ...TGCACTTAA/GTACAATAAAGGGCCGATCGTATTTCGA/ATGCA ...5' μη κωδική

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα δύο πλασμίδια για την κλωνοποίηση του παραπάνω τμήματος DNA, διότι διαθέτουν και τις δύο αλληλουχίες αναγνώρισης, ωστόσο αυτές βρίσκονται με διαφορετική σειρά μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας στη στρεπτομυκίνη.

β. Στην περίπτωση που το γονίδιο κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο A, το γονίδιο θα εισαχθεί ανεστραμμένο, αλλά και πάλι αναγνωρίζεται κωδικόνιο έναρξης και λήξης της μετάφρασης με ενδιάμεσο αριθμό νουκλεοτιδίων πολλαπλάσιο του 3, άρα το προϊόν της μετάφρασης θα είναι:

NH₂-Met-Leu-Ala-Gly-Lys-COOH

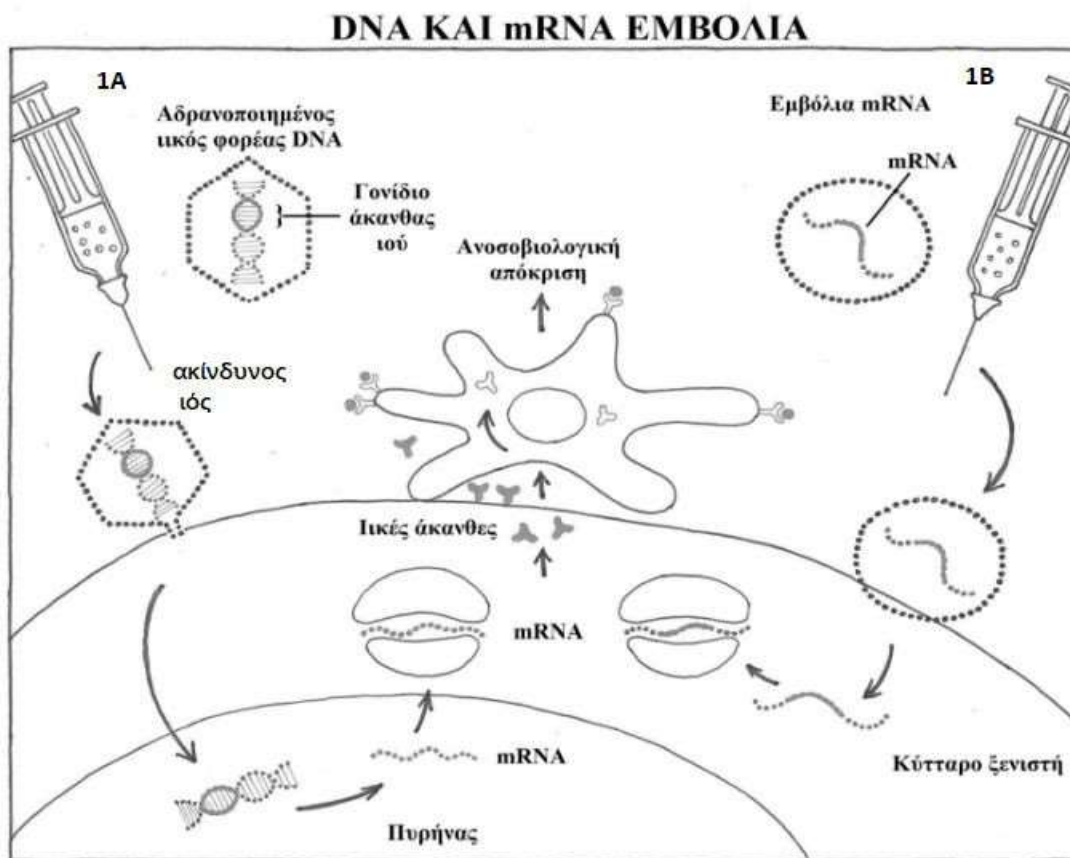
Επομένως, θα προκύψει διαφορετικό πεπτίδιο από αυτό που παράγεται φυσιολογικά από το γονίδιο αυτό.

Στην περίπτωση που το γονίδιο κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο B, το γονίδιο θα εισαχθεί με το σωστό προσανατολισμό και το προϊόν της μετάφρασης θα είναι:

NH₂-Met-Leu-Phe-Pro-Gly-COOH

Επομένως, θα προκύψει το πεπτίδιο που παράγεται φυσιολογικά από την έκφραση του γονιδίου.

154. Η παρασκευή εμβολίων έναντι του νέου κορονοϊού, SARS-CoV-2, αποτελεί ένα μεγάλο επίτευγμα της σύγχρονης Βιολογίας. Στην εικόνα 1 παρουσιάζονται δύο από τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή εμβολίων κατά τη διάρκεια της πανδημίας της νόσου COVID-19.



Εικόνα 1

Πιο συγκεκριμένα στην Εικόνα 1A παρουσιάζεται η εισαγωγή (μέσω εμβολίου) του γονιδίου που κωδικοποιεί για μία επιφανειακή πρωτεΐνη (ική άκανθα) του ιού, που δρα ως αντιγονικός καθοριστής στα άτομα που εμβολιάζονται. Το γονίδιο εισάγεται με τη βοήθεια κατάλληλου ιικού φορέα DNA, όπως συνηθίζεται σε αυτήν την κατηγορία εμβολίων (εμβόλιο DNA). Από την άλλη μεριά, στην Εικόνα 1B παρουσιάζεται η εισαγωγή του mRNA για το ίδιο τμήμα του γονιδίου της ικής άκανθας, το οποίο, όμως, εισάγεται με τη βοήθεια ενός νανομοριακού λιπιδικού καλύμματος (εμβόλιο RNA). Παρακάτω φαίνονται οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του γονιδίου (εικόνα 2α) και του αντίστοιχου mRNA μετάγραφου, που κωδικοποιεί την επιφανειακή πρωτεΐνη του ιού (εικόνα 2β). Γνωρίζουμε ότι τα τμήματα της επιφανειακής πρωτεΐνης του ιού, που στοχεύουν να παράξουν και τα δύο είδη εμβολίων μέσα στο σώμα του εμβολιαζόμενου είναι απόλυτα όμοια, ενώ δεν λαμβάνει χώρα κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση μετά τη σύνθεσή τους.

1-TATAACCACTAATGTTATTGCT T C TT T C TTGACCC AAAATTTT-OH

2-ATATTGGTGGTTACAATAACGAAGAAAGAACTGGGTTTAAAA

Εικόνα 2α

3'-UUUUAAAACCCAGUUCUUUCUUCGUUAUUGUAACCACC-5'

Εικόνα 2β

α. Να αναφέρετε σε ποια κατηγορία εμβολίων νέας γενιάς ανήκει το εμβόλιο της εικόνας 1Α (μονάδες 2) και να περιγράψετε πως λειτουργούν τα εμβόλια αυτά (μονάδες 3).

β. Να γράψετε την αλληλουχία των αμινοξέων που παράγει τόσο το εμβόλιο DNA όσο και το εμβόλιο mRNA (μονάδες 3).

γ. Η ομάδα που αναπτύσσει τα εμβόλια υποστηρίζει ότι η αλληλουχία των αμινοξέων του τμήματος της ιϊκής ακίδας, που έχει επιλέξει για την παρασκευή του εμβολίου, μπορεί να διασφαλίσει προστασία από μια πληθώρα μεταλλάξεων. Μελετώντας προσεκτικά την αλληλουχία των αμινοξέων του πεπτιδίου που παράγεται και αξιοποιώντας τις ιδιότητες του γενετικού κώδικα, να εξηγήσετε την αισιοδοξία των μελών της ερευνητικής ομάδας (μονάδες 5).

Μονάδες 13

		Δεύτερο γράμμα							
		U	C	A	G				
U	UUU	Φαινυλαλανίνη (phe)	UUC	Φαινυλαλανίνη (phe)	UUA	Λευκίνη (leu)	UUG	Λευκίνη (leu)	U C A G
	UUC	Φαινυλαλανίνη (phe)	UCC	Σερίνη (ser)	UAC	Λευκίνη (leu)	UGC	Κυστεΐνη (cys)	
	UUA	Λευκίνη (leu)	UCA	Σερίνη (ser)	UAA	Λήξη	UGA	Λήξη	
	UUG	Λευκίνη (leu)	UCG	Σερίνη (ser)	UAG	Λήξη	UGG	Τροποφώση (trp)	
C	CUU	Λευκίνη (leu)	CCU	Προλίνη (pro)	CAU	Ιστιδίνη (his)	CGU	Αργινίνη (arg)	U C A G
	CUC	Λευκίνη (leu)	CCC	Προλίνη (pro)	CAC	Ιστιδίνη (his)	CGC	Αργινίνη (arg)	
	CUA	Λευκίνη (leu)	CCA	Προλίνη (pro)	CAA	Γλουταμίνη (glu)	CGA	Αργινίνη (arg)	
	CUG	Λευκίνη (leu)	CCG	Προλίνη (pro)	CAG	Γλουταμίνη (glu)	CGG	Αργινίνη (arg)	
A	AUU	Ισολευκίνη (ile)	ACU	Θρεονίνη (thr)	AAU	Ασπαρτίνη (asp)	AGU	Σερίνη (ser)	U C A G
	AUC	Ισολευκίνη (ile)	ACC	Θρεονίνη (thr)	AAC	Ασπαρτίνη (asp)	AGC	Σερίνη (ser)	
	AUA	Ισολευκίνη (ile)	ACA	Θρεονίνη (thr)	AAA	Λυσίνη (lys)	AGA	Αργινίνη (arg)	
	AUG	Μεθειονίνη (met) έναρξη	ACG	Θρεονίνη (thr)	AAG	Λυσίνη (lys)	AGG	Αργινίνη (arg)	
G	GUU	Βαλίνη (val)	GCU	Αλανίνη (ala)	GAU	Ασπαρτικό οξύ (asp)	GGU	Γλυκίνη (gly)	U C A G
	GUC	Βαλίνη (val)	GCC	Αλανίνη (ala)	GAC	Ασπαρτικό οξύ (asp)	GGC	Γλυκίνη (gly)	
	GUA	Βαλίνη (val)	GCA	Αλανίνη (ala)	GAA	Γλουταμικό οξύ (glu)	GGA	Γλυκίνη (gly)	
	GUG	Βαλίνη (val)	GCG	Αλανίνη (ala)	GAG	Γλουταμικό οξύ (glu)	GGG	Γλυκίνη (gly)	

α. Το εμβόλιο της εικόνας 1α αποτελεί εμβόλιο από ζωντανούς γενετικά τροποποιημένους ιούς. Στα συγκεκριμένα εμβόλια, γονίδια από επικίνδυνο ιό (εδώ αναφερόμαστε στον κορονοϊό) ή άλλο μικροοργανισμό ενσωματώνονται σε άλλον ιό, που είναι αβλαβής για τον άνθρωπο (πχ. ιός της δαμαλίτιδας). Ο γενετικά τροποποιημένος ιός που προκύπτει εξακολουθεί να είναι αβλαβής. Ωστόσο, παράγει την αντιγονική πρωτεΐνη του ιού ή του μικροοργανισμού, εισάγεται στο σώμα και προκαλεί έντονη ανοσολογική αντίδραση.

β. Η περιοχή στη κωδική αλυσίδα του DNA που μεταφράζεται τόσο στο εμβόλιο DNA όσο και στο εμβόλιο mRNA έχει την εξής αλληλουχία:

5'..ATG-TTA-TTG-CTT-CTT-TCT-TGA..3'

Από αυτήν προκύπτει το πεπτίδιο: NH₂-Met-Leu-Leu-Leu-Leu-Ser-COOH

γ. Μελετώντας τον γενετικό κώδικα παρατηρούμε ότι για τα παραπάνω αμινοξέα (εκτός από αυτό της Met) υπάρχουν πολλά συνώνυμα κωδικόνια: Για τη Leu 6 και για τη Ser 6. Επομένως, με βάση τον εκφυλισμό του γενετικού κώδικα αρκετές μεταλλάξεις μπορούν να οδηγήσουν στη σύνθεση του ίδιου πεπτιδίου της ακίδας (σιωπηλές) και αυτό καθιστά το εμβόλιο ιδιαίτερα ισχυρό απέναντι σε μεταλλάξεις που μπορεί να συμβούν στο γονίδιο της πρωτεΐνης της ακίδας του ιού.

165. Σε ένα εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό, και υπό σταθερές συνθήκες ανάπτυξης, βακτηριακές καλλιέργειες. Τα βακτήρια διχοτομούνται και δίνουν νέα βακτήρια - κλώνους, που εμφανίζουν συνήθως τις ίδιες ακριβώς ιδιότητες με τα προγονικά βακτήρια από τα οποία προέκυψαν.

α. Ωστόσο, σε μια βακτηριακή καλλιέργεια εντοπίστηκε η έκφραση ενός γονιδίου, που προσδί-

δει στις αποικίες των βακτηρίων ένα χαρακτηριστικό χρώμα, χωρίς να έχει γίνει με τεχνητό τρόπο γενετική τροποποίηση αυτών των βακτηρίων. Να διερευνήσετε την προέλευση εμφάνισης αυτού του νέου χαρακτηριστικού στις αποικίες των συγκεκριμένων βακτηρίων (μονάδες 6).
β. Εκτός από την δημιουργία κυττάρων - κλώνων, που προκύπτουν με τις διαδοχικές διχοτομήσεις των βακτηρίων, υπάρχει η δυνατότητα κλωνοποίησης μορίων νουκλεϊκών οξέων, χωρίς την μεσολάβηση ζωντανών κυττάρων. Να ονομάσετε την παραπάνω μέθοδο κλωνοποίησης (μονάδες 2) και να αναφέρετε τι επιτυγχάνει σε σχέση με τον *in vivo* πολλαπλασιασμό των μορίων DNA στα βακτήρια (μονάδες 4).

Μονάδες 12

α. Τα κύτταρα που ανήκουν σε ένα βακτηριακό στέλεχος είναι πανομοιότυπα μεταξύ τους, καθώς τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται μονογονικά. Στη μονογονική αναπαραγωγή, οι γενετικές πληροφορίες για τη δημιουργία του νέου μονοκύτταρου οργανισμού προέρχονται από ένα κύτταρο-γονέα που με κυτταρική διαίρεση δίνει τα απόγονα κύτταρα - οργανισμούς. Είναι, λοιπόν, επόμενο οι απόγονοι, να είναι πιστά αντίγραφα του. Ωστόσο, το γενετικό υλικό μπορεί να υποστεί τυχαίες αλλαγές, που ονομάζονται μεταλλάξεις, οι οποίες μπορεί να δημιουργήσουν έναν διαφορετικό φαινότυπο, αν η αλλαγή επιδράσει στο γονιδιακό προϊόν, δηλαδή στην πρωτεΐνη. (Εναλλακτικά, μπορεί η εμφάνιση του νέου χαρακτηριστικού να οφείλεται σε φυσική μεταφορά πλασμιδιακού DNA στα εν' λόγω βακτήρια από κάποιο άλλο στέλεχος του ίδιο βακτηρίου που βρέθηκε στην καλλιέργεια. Πράγματι, σε πολλά βακτήρια, εκτός από το κύριο κυκλικό μόριο DNA, υπάρχουν και τα πλασμίδια που περιέχουν συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά γενετικού υλικού από ένα βακτήριο σε άλλο. Τα πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό, τόσο μεταξύ τους, όσο και με το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου, καθώς και να μεταφέρονται φυσικά από ένα βακτήριο σε άλλο).

β. Πρόκειται για επιλεκτική κλωνοποίηση μορίων που επιτυγχάνεται με την μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται *in vitro* ο πολλαπλασιασμός ειδικά επιλεγμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων και μόνον αυτών σε πολύ μικρό χρόνο.

169. Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος ολοένα και περισσότερα πρωτόκολλα αλληλούχισης DNA (προσδιορισμού της αλληλουχίας της πρωτοταγούς διάταξης) από διάφορα είδη κυττάρων και οργανισμών ή ακόμη και γενετικού υλικού από ιούς υλοποιούνται σε εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας ανά τον κόσμο καθημερινά, στα πλαίσια μιας εργαστηριακής "ρουτίνας". Από ένα αντίστοιχο πρωτόκολλο αλληλούχισης του γενετικού υλικού ενός στελέχους βακτηρίου προέκυψε και η παρακάτω αλληλουχία DNA.

PO₄--TTTCCAAATGAGTAAAAAAAACGTAAGTATGGGTT-- OH

α. Ξέροντας ότι το παραπάνω τμήμα DNA ανήκει σε ένα προκαρυωτικό γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί για πεπτίδιο, να εξηγήσετε αν η δοθείσα αλυσίδα είναι η κωδική ή η μη κωδική του γονιδίου και να γράψετε το mRNA που παράγεται από την μεταγραφή του (μονάδες 4). Να υπολογίσετε τον αριθμό των αμινοξέων που θα συγκροτούν το παραγόμενο ολιγοπεπτίδιο μετά την μετάφραση του mRNA μορίου (μονάδες 2).

β. Τελικά βρέθηκε ότι το γονίδιο αυτό αποτελεί το μοναδικό γονίδιο ανθεκτικότητας ενός είδους πλασμιδίων, το οποίο προσδίδει αντοχή στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη στα βακτήρια που το φέρουν. Ένας μεταπτυχιακός φοιτητής σκέφτεται να πραγματοποιήσει κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ενός ιού, με τη χρήση των συγκεκριμένων πλασμιδίων, ως φορείς κλωνοποίησης, και να κόψει τόσο τους φορείς, όσο και το γονιδίωμα του ιού με την περιοριστική ενδο-νουκλεάση EcoRI. Ως ξενιστές θα χρησιμοποιήσει βακτήρια χωρίς ανθεκτικότητα στο συγκεκρι-

μένο αντιβιοτικό. Γνωρίζει ότι τα πλασμίδια κόβονται σε μία θέση από το ένζυμο αυτό, αλλά δεν γνωρίζει που βρίσκεται αυτή η θέση. Να εξηγήσετε αν θεωρείτε κατάλληλα αυτά τα πλασμίδια και να διερευνήσετε τυχόν πρόσθετες προϋποθέσεις που πρέπει να πληροί ένα πλασμίδιο για να θεωρηθεί κατάλληλο ως φορέας κλωνοποίησης (μονάδες 7).

Μονάδες 13

α. Από την παρουσία ελεύθερης φωσφορικής ομάδας στο ένα άκρο διαπιστώνουμε ότι θα αποτελεί το 5' ελεύθερο άκρο του, ενώ το άλλο άκρο θα είναι, αντίστοιχα, το 3' ελεύθερο άκρο του κλώνου DNA. Οπότε η αλληλουχία έχει προσανατολισμό:

5'--TTTCCAA-ATG-AGT- AAA-AAA-AAA-ACG-TAA-GTATGGGTT--3'.

Για να διαπιστώσουμε αν η δοθείσα αλυσίδα DNA είναι η κωδική αλυσίδα του γονιδίου, αναζητούμε την τριπλέτα νουκλεοτιδίων ATG διαβάζοντας το μόριο με κατεύθυνση 5'→3', έτσι ώστε να προκύψει ένα μόριο mRNA με το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης 5' AUG 3', όταν η RNA πολυμεράση τοποθετήσει συμπληρωματικά ριβονουκλεοτίδια ως προς τη μη κωδική (μεταγραφόμενη) αλυσίδα. Επίσης, αναζητούμε και μία τριπλέτα που να αντιστοιχεί, κατά τον ίδιο τρόπο σε ένα από τα τρία κωδικόνια λήξης της μετάφρασης δηλ. UGA, UAG ή UAA με προσανατολισμό 5'→3'. Διαπιστώνουμε ότι στη δοθείσα αλυσίδα υπάρχει η τριπλέτα 5' ATG 3' στην αρχή του μορίου και μετά από 6 συνεχόμενες, μη επικαλυπτόμενες τριπλέτες νουκλεοτιδίων υπάρχει και η τριπλέτα 5' TAA 3' που αντιστοιχεί στο κωδικόνιο λήξης 5' UAA 3'. Αντίθετα, τα κωδικόνια αυτά δεν εντοπίζονται στη συμπληρωματική της. Άρα η δοθείσα αλυσίδα DNA είναι η κωδική και η αλληλουχία του μορίου mRNA που θα προκύψει θα είναι:

5'-- UUUCCAA-AUG-AGU-AAA-AAA-AAA-ACG-UAA-GUAUGGGUU--3'. Έτσι, από τη μετάφραση του παραπάνω μορίου προκύπτει ένα ολιγοπεπτίδιο με 6 αμινοξέα καθώς από τις 7 τριπλέτες νουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στα 7 κωδικόνια, το τελευταίο κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης 5' UAA 3' δεν αντιστοιχεί σε αμινοξύ.

β. Για να απαντήσουμε αν το συγκεκριμένο πλασμίδιο είναι κατάλληλο πρέπει να ελέγξουμε αν θα κοπεί από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας. Το δίκλωνο τμήμα:

5' TTTCCAA-ATG-AGT-AAA-AAA-AAA-ACG-TAA-GTATGGGTT 3'

3' AAAGGTT-TAC-TCA-TTT- TTT- TTT- TGC- ATT-CATACCCAA 5'

δεν φέρει την δίκλωνη αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου, δηλαδή την αλληλουχία 5'GAATTC3' και τη συμπληρωματική της. Επομένως, μετά την πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, δεν θα κοπεί το γονίδιο που κωδικοποιεί το πεπτίδιο αντοχής στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, το οποίο αποτελεί και το μοναδικό γονίδιο ανθεκτικότητας του πλασμιδίου. Άρα, τα πλασμίδια είναι κατάλληλα ως φορείς κλωνοποίησης, ως προς την προϋπόθεση αυτή. Ωστόσο, θα πρέπει επιπρόσθετα να ελεγχθεί αν το πλασμίδιο κόβεται από την EcoRI σε άλλη σημαντική θέση όπως είναι η θέση έναρξης της αντιγραφής, καθώς και αν, με τον τρόπο που κόβει, επιτρέπει την επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από τα μη ανασυνδυασμένα, στα μετασχηματισμένα βακτήρια.

171. Στον άνθρωπο οι οστεοχονδροδυσπλασίες αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κληρονομικών διαταραχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ανώμαλη ανάπτυξη των οστών και των χόνδρων. Η συχνότερη οστεοχονδροδυσπλασία είναι ένα είδος νανισμού που ονομάζεται αχονδροπλασία. Η αχονδροπλασία (ή νανισμός), που κληρονομείται με επικρατή τρόπο, οφείλεται στις περισσότερες περιπτώσεις σε μεταλλάξεις στο γονίδιο FGFR3 που εδράζεται στο χρωμόσωμα 4. Η νόσος προκαλεί μη φυσιολογική ανάπτυξη των χόνδρων και η συχνότητα εμφάνισής της είναι 1/25.000 ανθρώπους.

α. Αν δύο γονείς με αχονδροπλασία, οι οποίοι έχουν ήδη ένα υγιές αγόρι αποφασίσουν να α-

ποκτήσουν δεύτερο παιδί, να βρείτε τη πιθανότητα το επόμενο παιδί τους να πάσχει από αχονδροπλασία και να είναι επίσης αγόρι (μονάδες 2), αιτιολογώντας την απάντησή σας (μονάδες 4).

β. Η διάγνωση της νόσου μπορεί να γίνει κατά τη διενέργεια του προγεννητικού ελέγχου με χρήση της τεχνικής PCR και στη συνέχεια ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου FGFR3. Να εξηγήσετε γιατί θα εφαρμοστεί πρώτα η τεχνική PCR κατά την μοριακή ανάλυση (μονάδες 4) και να αναφέρετε άλλες πρακτικές εφαρμογές της (μονάδες 2).

Μονάδες 12

α. Η αχονδροπλασία κληρονομείται με επικρατή και αυτοσωμικό τρόπο εφόσον το υπεύθυνο γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 4. Συμβολίζουμε με A το αλληλόμορφο γονίδιο που ευθύνεται για την αχονδροπλασία και με α το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Από τη στιγμή που και οι δύο γονείς πάσχουν από αχονδροπλασία και έχουν ήδη αποκτήσει υγιές παιδί πρέπει να είναι ετερόζυγοι, δηλαδή Aα.

Γαμέτες	A	α
A	AA (αχονδροπλασία)	Aα (αχονδροπλασία)
α	Aα (αχονδροπλασία)	αα (φυσιολογικό)

Από τη διασταύρωση των συγκεκριμένων γονέων, η πιθανότητα το επόμενο παιδί να πάσχει από αχονδροπλασία είναι $3/4$ ή 75%. Η πιθανότητα το επόμενο παιδί ενός ζευγαριού να είναι αγόρι είναι $1/2$ ή 50%. Συνεπώς, η πιθανότητα το επόμενο παιδί να πάσχει από αχονδροπλασία και να είναι αγόρι είναι ίση με $3/4 \times 1/2 = 3/8$ ή 37,5 %.

β. Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) θα δώσει τη δυνατότητα στους επιστήμονες να αντιγράψουν επιλεκτικά και εκατομμύρια φορές το γονίδιο FGFR3 ή τμήμα του από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA (του υπόλοιπου γονιδιώματος του εξεταζόμενου) *in vitro*. Η τεχνική αυτή που άρχισε να εφαρμόζεται ευρέως από το 1985, έχει αυξήσει την ευαισθησία των γενετικών αναλύσεων και έχει πολλές πρακτικές εφαρμογές. Εκτός από τη χρήση της στη διάγνωση ασθενειών, όπως της αχονδροπλασίας, του AIDS κτλ. χρησιμοποιείται επίσης στην εγκληματολογία για τη διαλεύκανση υποθέσεων και στη μελέτη DNA από απολιθώματα.

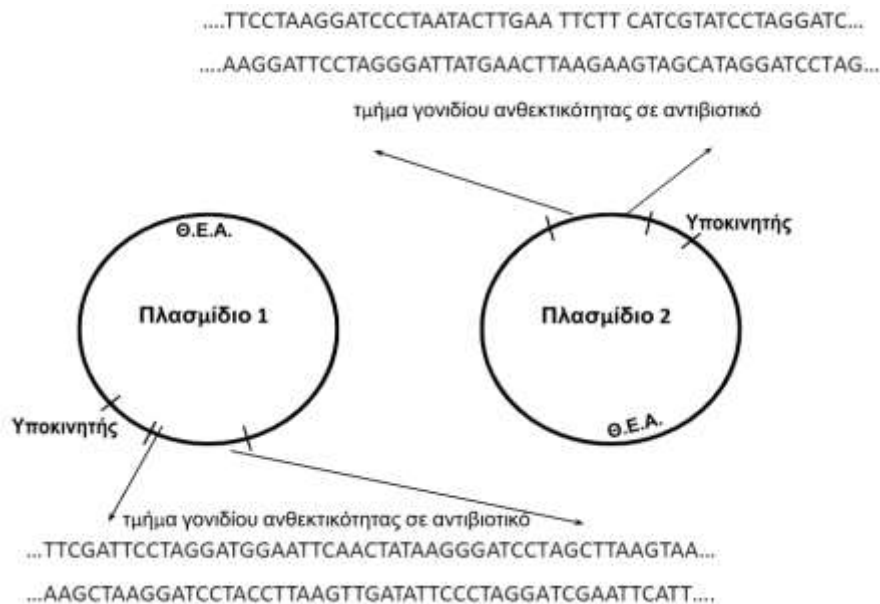
184. Την τελευταία 20ετία, η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA έδωσε τη δυνατότητα ανάπτυξης μιας νέας γενιάς εμβολίων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και τα εμβόλια-υπομονάδων. Τα εμβόλια αυτά στηρίζονται στη παραγωγή μόνο ορισμένων πρωτεϊνών ενός παθογόνου μικροοργανισμού, που προκαλούν ανοσολογική αντίδραση στον οργανισμό που εισάγονται. Έτσι, γονίδια του παθογόνου μικροοργανισμού, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αντιγονική δράση, εισάγονται σε κύτταρα (βακτηριακά) και παράγουν την πρωτεΐνη αυτή σε μεγάλες ποσότητες. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη καθαρίζεται και χρησιμοποιείται ως εμβόλιο.

α. Έστω ότι στο παρακάτω τμήμα DNA εντοπίζεται ένα συνεχές γονίδιο που κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο με αντιγονική δράση. Να τοποθετήσετε κατάλληλα τα 5' και 3' άκρα στις παρακάτω αλυσίδες (μονάδες 2) και να προσδιορίσετε ποια είναι η κωδική και η μη κωδική αλυσίδα (μονάδες 2), χωρίς να αιτιολογήσετε τις απαντήσεις σας. Να γράψετε από πόσα αμινοξέα αποτελείται το πεπτίδιο που παράγεται από το γονίδιο αυτό (μονάδες 2).

I -GGATTCAATGGAATTCTTATGTCCCGGATCCTGAAAATC-II
III -CCTAAGTTACCTTAAGAATACAGGGCCTAGGACTTTTAG-IV

β. Οι επιστήμονες ενσωμάτωσαν το παραπάνω γονίδιο στα παρακάτω πλασμίδια (μέσα σε

ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό) χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και BamHI, ώστε το γονίδιο να ενσωματωθεί με το σωστό προσανατολισμό στο πλασμίδιο. Διαπίστωσαν ότι μόνο στη μία περίπτωση παραγόταν το επιθυμητό πεπτιδίο-αντιγόνο στα μετασχηματισμένα βακτήρια. Να εξηγήσετε ποιο από τα δύο πλασμίδια ήταν κατάλληλο για την παραγωγή του επιθυμητού πεπτιδίου-αντιγόνου, αν γνωρίζετε ότι η EcoRI και η BamHI κόβουν μία μόνο φορά το κάθε πλασμίδιο (μονάδες 7). Δίνεται η αλληλουχία που αναγνωρίζει και κόβει η BamHI: 5'-G*GATCC-3' 3'-CCTAG*G-5'



Μονάδες 13

α. Οι κατευθύνσεις των αλυσίδων είναι:

I-5'- GGATTCA **ATG**-GAA-TTC-TTA-TGT-CCC-GGA-TCC-**TG**AAAATC-3'-II
 III-3'-CCTAAGTTAC-CTT-AAG-AAT-ACA-GGG-CCT-AGG-ACTTTTAG-5'-IV

Η αλυσίδα I είναι η κωδική και η II είναι η μη κωδική. Το πεπτιδίο που παράγεται από αυτό το γονίδιο αποτελείται από 8 αμινοξέα.

β. Το τμήμα DNA που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο κόβεται από τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες στις παρακάτω θέσεις που βρίσκονται εντός του γονιδίου:

I- 5'-GGATTCAAT**GG***AATCCTTATGT CCC **G***GATCCTGAAAATC-3'-II
 III-3'-CCTAAGTTAC **CTTAA***GAATACAGGG**CCTAG***GACTTTTAG-5'-IV

Πριν την ενσωμάτωση του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου, θα πρέπει να βρεθούν και οι κατευθύνσεις των αλυσίδων των τμημάτων που δίνονται στα πλασμίδια. Με βάση τη θέση του υποκινητή, βρίσκουμε την κατεύθυνση της μεταγραφής (δείτε παρακάτω) και εντοπίζουμε αρχικά το κωδικόνιο έναρξης 5'- ATG-3' και έπειτα, με βήμα τριπλέτας, συνεχόμενα και μη επικαλυπτόμενα, ένα από τα κωδικόνια λήξης 5'-TGA-3', 5'-TAA-3' και 5'-TAG-3'.

Για το πλασμίδιο 1:

κατεύθυνση μεταγραφής

ΥΠΟΚ...5'-TTCGATTCTAG**GATGG***AATC**CACTATAAGG***GATCCTAGCTTAAGTAA-3'...
 ...3'-AAGCTAAGGATCCTAC**CTTAA***GTTGATATTC **CCTAG***GATCGAATTCATT-5'....

Μετά την ενσωμάτωση του επιθυμητού τμήματος τους γονιδίου έχουμε:

ΥΠΟΚ...5'-ΤΤCGATTCTAGG**ATGG*****AATTCTTATGT** CCC **G*****GATCCTAG**CTTAAGTAA-3'...
3'-AAGCTAAGGATCCTAC**CTTAA*****GAATACAGGGCCTAG*****GATCGAATTCATT**-5'....

Άρα, τα κωδικόνια στη κωδική αλυσίδα του DNA θα είναι:

5'-ATG-GAA-TTC-ΤΤΑ-TGT-CCC-GGA-TCC-TAG-3',

δηλαδή ίδια με του αρχικού γονιδίου, οπότε θα παραχθεί το επιθυμητό πεπτίδιο-αντιγόνο.

Για το πλασμίδιο 2:

....5'-ΤΤCCTAA **G*****GATCC**CTAATAC ΤΤ **G*****AATTC**TTTCATCGTATCCTAGGATC-3' ... ΥΠΟΚ
....3'-AAGGATT**CCTAG*****GGATTATGAACTTAA*****GAAGTAGCATAGGATCCTAG**-5'...
← κατεύθυνση μεταγραφής

Μετά την ενσωμάτωση του επιθυμητού τμήματος τους γονιδίου έχουμε:

....5'-ΤΤCCTAA **G*****GATCCGGGACATAAG*****AATTC**TTTCATCGTATCCTAGGATC-3' ... ΥΠΟΚ
....3'-AAGGATT**CCTAG*****GCCCTGTATT** **CTTAA*****GAAGTAGCATAGGATCCTAG**-5'...

Άρα, τα κωδικόνια στη κωδική αλυσίδα του DNA θα είναι:

5'-ATG-AAG-AAT-TCT-TAT-GTC-CCG-GAT-CCT-TAG-3', που είναι τελείως διαφορετικά από τα αρχικά κωδικόνια, καθώς αλλάζει το πλαίσιο ανάγνωσης της αρχικής αλληλουχίας μετά την ενσωμάτωσή της σε αυτό το πλασμίδιο. Επομένως, δεν θα παραχθεί το επιθυμητό πεπτίδιο-αντιγόνο.

Άρα, θα επιλέγαμε το πλασμίδιο 1.

