

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΣΚΗΣΕΩΝ ΣΤΟ 4<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ

**1. Προβλήματα που αναφέρονται στα κομμάτια που θα κοπεί το DNA, στις θέσεις που κόβουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, στον αριθμό των πλασμιδίων που θα χρειαστούν κλπ**

α. Στο κυκλικό DNA αν υπάρχουν  $n$  θέσεις αναγνώρισης από μια περιοριστική ενδονουκλεάση τότε:

- i. προκύπτουν  $n$  κομμάτια και
- ii. χρησιμοποιούνται  $n$  κομμάτια για ανασυνδυασμό και  $n$  πλασμίδια τουλάχιστον.

β. Στο γραμμικό DNA αν υπάρχουν  $n$  θέσεις αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση, τότε για κάθε μόριο :

- i. προκύπτουν  $n+1$  κομμάτια
- ii. χρησιμοποιούνται  $n-1$  κομμάτια για ανασυνδυασμό και  $n-1$  πλασμίδια τουλάχιστον

γ. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν και σπάνε τους 3' – 5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που υπάρχουν μεταξύ των συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων.

**2. Προβλήματα που αναφέρονται στις αλυσίδες του DNA, συνδυασμός με το δεύτερο κεφάλαιο.**

**3. Προβλήματα όπως 12 σελ 65 βιβλίου (Διαχωρισμός μετασχηματισμένων από τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια σε μια καλλιέργεια)**

Μεθοδολογία:

A. Καταγράφουμε τις ομάδες βακτηρίων που δημιουργήθηκαν

Ομάδες βακτηρίων που δημιουργήθηκαν	Χρήση αντιβιοτικού A	Χρήση αντιβιοτικού B
1. Βακτήρια που μετασχηματίστηκαν από ανασυνδυασμένα βακτήρια	Ζουν ή πεθαίνουν ανάλογα	Ζουν ή πεθαίνουν ανάλογα
2. Βακτήρια που μετασχηματίστηκαν από μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια		
3. Βακτήρια που δεν μετασχηματίστηκαν	πεθαίνουν	πεθαίνουν

B. Αρχικά διαχωρίζουμε τα βακτήρια της 3ης ομάδας από αυτά των άλλων δύο, αφού δεν επιζούν σε περιβάλλον όπου υπάρχουν αντιβιοτικά

Γ. Διαχωρίζουμε τα βακτήρια της 2ης ομάδας από αυτά της 1ης, αφού παρουσιάζουν διαφορετικά ανθεκτικότητα στα διάφορα αντιβιοτικά

#### 4. Εύρεση του πλήθους των μορίων του DNA που παράγονται με τη μέθοδο PCR, χρόνου παραγωγής αντιγράφων κ.λ.π.

Εάν εφαρμόσουμε την μέθοδο PCR  $n$  φορές τότε τα μόρια DNA που παράγονται υπολογίζονται από την σχέση: Μόρια DNA =  $2^n$

### ΑΣΚΗΣΕΙΣ 4<sup>ου</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

1. Με τη δράση της EcoRI ένα τμήμα DNA από ευκαρυωτικό κύτταρο κόπηκε σε 5 κομμάτια :

α. Σε πόσα σημεία κόπηκε το μόριο;

β. Πόσων δεσμών τη διάσπαση προκάλεσε η EcoRI

16.225.1

2. Έστω ότι ένα μιτοχονδριακό κομμάτι DNA κόβεται σε πέντε σημεία με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI .

α. Σε πόσα κομμάτια κόπηκε το DNA αυτό;

β. Πόσοι δεσμοί σπάσανε συνολικά στο δεδομένο μόριο DNA;

γ. Αν θελήσουμε να ενσωματώσουμε τα κομμάτια του DNA που προέκυψαν μετά τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης, πόσα πλασμίδια θα χρειαστούμε;

3. Η περιοριστική ενδονουκλεάση BamH1 έχει σαν θέση αναγνώρισης την αλληλουχία

... G GATCC...

...CCTAG G... και κόβει ανάμεσα στις δύο γουανίνες.

α. να βρείτε σε πόσες θέσεις θα κόψει η BamH1 την παρακάτω αλληλουχία:

...TTAGGATCCCAGTTAGAGTGGATCCAGTC...

...AATCCTAGGGTCAATCTCACCTAGGTCAG... και πόσα πλασμίδια θα

χρειαστούν;

β. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου διασπάστηκαν;

14.132.2

4. Με τη βοήθεια του ενζύμου EcoRI κόβουμε ένα τμήμα δίκλωνου DNA σε δύο κομμάτια A και B. Το κομμάτι A αποτελείται από 304 νουκλεοτίδια , από τα οποία τα 60 έχουν ως βάση τη θυμίνη.

α. ποια είναι η αριθμητική σύσταση των υπόλοιπων βάσεων στο κομμάτι A;

β. Πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου υπάρχουν στο κομμάτι A;

γ. Αν το μήκος όλου του τμήματος DNA είναι 800 ζεύγη βάσεων και ο συνολικός αριθμός των θυμινών είναι 160, ποια είναι η αριθμητική σύσταση των βάσεων στο κομμάτι B; 14.134.5

5. Δίνεται το παρακάτω τμήμα μορίου DNA προκαρυωτικού κυττάρου

5'GAATTCTTAATGCAAGATCATAAAGAATTCTAG 3'

3'CTTAAGAATTACGTTCTAGTATTTCTTAAGATC 5'

Το παραπάνω τμήμα DNA κόβεται με EcoRI, προκειμένου να ενσωματωθεί σε κατάλληλο πλασμίδιο που έχει κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, με τελικό σκοπό να εισαχθεί σε βακτήριο για την παραγωγή φαρμακευτικού πολυπεπτιδίου. Να βρείτε την αλληλουχία των αμινοξέων του πολυπεπτιδίου με χρήση του γενετικού κώδικα. 10.124.Π

6. Δίνεται το παρακάτω τμήμα βακτηριακού DNA:

3'... AACTTAAGATGTTTGAAAAGTAATACTTAAGGC...5'  
5'... TTGAATTCTACAACTTTT C ATTATGAATTCCG ...3'

Το τμήμα αυτό του DNA κόβεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, προκειμένου να ενσωματωθεί σε κατάλληλο πλασμίδιο που έχει κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, με τελικό σκοπό να εισαχθεί σε βακτήριο για την παραγωγή ενός πεπτιδίου. Να βρείτε την αλληλουχία των αμινοξέων του πεπτιδίου με τη χρήση του γενετικού κώδικα.

10.135.7

**7.** Όταν σε ένα δίκλωνο DNA μήκους 10000 βάσεων επιδράσει το ένζυμο περιορισμού EcoRI προκύπτουν δύο κομμάτια μήκους 2000 και 8000 βάσεων. Αν σ' αυτό το τμήμα επιδράσει η ενδονουκλεάση BamH1 προκύπτουν τρία κομμάτια, δύο με μεγέθη 3000 βάσεων και ένα με μέγεθος 4000 βάσεων. Όταν στο αρχικό κομμάτι επιδράσουν ταυτόχρονα και τα δύο ένζυμα, προκύπτουν δύο κομμάτια με μήκος 3000 βάσεων και δύο με μήκος 2000 βάσεων. Να δείξετε σε ποιες θέσεις κόβουν τα δύο ένζυμα το DNA.

**8.** Σε πείραμα γενετικής Μηχανικής χρησιμοποιείται πλασμίδιο το οποίο έχει δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντίστοιχα αντιβιοτικά : το ένα γονίδιο δίνει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και το άλλο στρεπτομυκίνη. Στο πλασμίδιο αυτό εισάγεται τμήμα DNA μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας της στρεπτομυκίνης . Στη συνέχεια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μετασχηματίζονται κύτταρα Escherichia coli που δεν είναι ανθεκτικά σε κανένα από τα δύο αντιβιοτικά. Αναλύστε τρόπο με τον οποίο μπορούν να επιλεγούν τα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

**9.** Ένα πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης για την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης διαθέτει τρία γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό ( για στρεπτομυκίνη, αμπικιλίνη, πενικιλίνη). Η αλληλουχία βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση βρίσκεται μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας στην πενικιλίνη. Να εξηγήσετε με ποιο τρόπο θα επιλέξετε τα μετασχηματισμένα από τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια, ώστε να προχωρήσετε στη φάση της κλωνοποίησης. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως κύτταρα-ξενιστές φέρουν στο κύριο μόριο DNA ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

16.233.7

**10.** Σε ένα πείραμα PCR επιχειρείται η κατασκευή τουλάχιστον 32 αντιγράφων ενός αρχικού κομματιού από DNA που αποτελείται από 10.000 νουκλεοτίδια και η αντιγραφή του διαρκεί 2 ώρες.

α. μετά από πόσο χρόνο θα έχουμε τον επιθυμητό αριθμό αντιγράφων;

β. πόσα νουκλεοτίδια θα υπάρχουν τελικά στα αντίγραφα και πόσα χρειάστηκαν;

γ. πόσοι κλώνοι συντέθηκαν;

16.229.3

**11.** Δίνεται η παρακάτω αλληλουχία νουκλεοτιδίων ενός τμήματος δίκλωνου μορίου DNA που περιέχει ένα γονίδιο υπεύθυνο για τη σύνθεση ενός ολιγοπεπτιδίου 6 αμινοξέων:

5' TTTCTCGAGATGCCCTTACGCGAATTCCGCCAACATTGGGGAATTC CCCCTCGAGAAA  
3'

3' AAAGAGCTCTACGGGAATGCGCTTAAGGCGGTTGTAACCCCTTAAGGGGGAGCTCTT  
T 5'

α. πόσα και ποια κομμάτια θα προκύψουν μετά τη δράση της **EcoRI** στο παραπάνω μόριο;

β. αν χρησιμοποιήσουμε μαζί την και την περιοριστική ενδονουκλεάση **XhoI** που αναγνω-ρίζει την αλληλουχία νουκλεοτιδίων : 5' CTCGAG 3'

3' GAGCTC 5' και την κόβει μεταξύ C και T,

ποια κομμάτια θα προκύψουν από την δράση και των δύο περιοριστικών ενδονουκλεασών και ποια θα είναι η αλληλουχία τους;

γ. αν θέλουμε να κλωνοποιήσουμε το τμήμα που μεταφράζεται στο ολιγοπεπτίδιο, ποια περιοριστική ενδονουκλεάση θα χρησιμοποιήσουμε;

δ. από πόσα ( ή ποια) αμινοξέα αποτελείται το ολιγοπεπτίδιο;

16.230.2

**12.** Το ένζυμο EcoRI κόβει μικρό γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA σε δύο τμήματα, το A και το B. Το A αποτελείται από 212 νουκλεοτίδια, 40 από τα οποία περιέχουν τη βάση αδενίνη.

α. ποιος ο αριθμός των άλλων βάσεων του A τμήματος;

β. ποιος ο αριθμός των φωσφοδιεστερικών δεσμών, που υπάρχουν στο τμήμα A;

γ. πόσοι δεσμοί υδρογόνου συγκρατούν μεταξύ τους τις συμπληρωματικές αλυσίδες του A;

δ. ποιος είναι ο αριθμός κάθε είδους βάσεων του τμήματος B, αν το αρχικό μόριο DNA περιέχει 400 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και 85 αδενίνες;

16.231.3

**13.** Υπάρχει μια περιοχή του DNA που περιέχει ένα γονίδιο με την ακόλουθη αλληλουχία βάσεων

AAAGAATTCATTGAAGCTTCAA...300 νουκλεοτίδια

...TTGAAGCTTTAAGAATTCACG

TTTCTTAAGTAAGTTCGAAGTT...300 νουκλεοτίδια

...AACTTCGAAATTCTTAAGTGC

Η περιοχή αυτή περιέχει θέσεις αναγνώρισης από τις ακόλουθες ενδονουκλεάσες:

**EcoRI** και **HindIII**     A↓AGCTT...

...TTCGA↑A

Υπάρχει ένα φορέας κλωνοποίησης

γενετικού υλικό που περιέχει από μια φορά τις θέσεις αυτές περιορισμού.

α. που αρχίζει και που τελειώνει το γονίδιο αυτό που υπάρχει στη δοθείσα περιοχή του DNA;

β. πόσα νουκλεοτίδια έχει το mRNA που μεταγράφεται;

γ. πόσα αμινοξέα έχει η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται;

δ. ποιο ένζυμο πρέπει να χρησιμοποιήσουμε για να ανασυνδυάσουμε ένα φορέα γενετικού υλικού ( που περιέχει κα τις δύο θέσεις από μία φορά), ώστε να περιέχεται όλο το γονίδιο; 14.133.2

**14.** Σε ένα πείραμα PCR επιθυμούμε να κατασκευάσουμε τουλάχιστον 60 αντίγραφα ενός τμήματος DNA. Το τμήμα αυτό έχει μήκος 200 ζεύγη βάσεων και κάθε αντιγραφή διαρκεί μία ώρα.

α. σε πόσο χρόνο θα έχουμε τον αριθμό των αντιγράφων που επιθυμούμε;

β. ποσοι κλώνοι συντέθηκαν και πόσα νουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν;

γ. πόσα αντίγραφα DNA θα έχουμε μετά από 15 κύκλους αντιγραφής;

14.134.4

**15.** Με τη βοήθεια ενζύμου **EcoRI** κόβουμε ένα τμήμα δίκλωνου σε δύο κομμάτια A και B. Το κομμάτι A αποτελείται από 304 νουκλεοτίδια , από τα οποία τα 60 έχουν ως βάση θυμίνη.

α. ποια είναι η αριθμητική σύσταση των υπολοίπων βάσεων στο κομμάτι A;

β. πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου υπάρχουν στο κομμάτι A;

γ. αν το μήκος όλου του τμήματος DNA είναι 800 ζεύγη βάσεων και ο συνολικός αριθμός θυμινών είναι 160, ποια είναι η αριθμητική σύσταση των βάσεων στο κομμάτι B; 14.134.5

**16.** Σε μια μικρή πόλη έγινε ένα έγκλημα και η αστυνομία βρήκε κοντά στο θύμα μικρή κηλίδα αίματος η οποία δεν ανήκε σ' αυτό. Ο γιατρός της πόλης διαθέτει δείγμα αίματος από όλους του κατοίκους της. Ποιες μεθόδους και τεχνικές θα ακολουθήσει για να εξακριβώσει αν η μικρή κηλίδα αίματος ανήκει σε κάποιον από τους κατοίκους της μικρής αυτής πόλης;

10.134.1

**17.** Δύο άνθρωποι που υποψιάζονται ότι είναι αδέρφια σκοπεύουν να υποβληθούν σε εξέταση DNA για επιβεβαιώσουν ή όχι τις υποψίες τους. Να περιγράψετε τα βήματα που θα ακολουθήσουν για να γίνει η πιστοποίηση.

10.135.3

**18.** Τι θα χρειαστείτε για να αντιγράψετε μια ειδική αλληλουχία DNA πολλές φορές με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης;