Κεφάλαιο 4: Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

Ασκήσεις και λύσεις

Μεθοδολογία, λυμένο παράδειγμα, ερωτήσεις κλειστού τύπου, θεωρία τύπου Β και ασκήσεις τύπου Γ και Δ, όλα με λύσεις.

1 Μεθοδολογία
2 Λυμένο παράδειγμα
3 Πολλαπλής επιλογής
4 Σωστό ή λάθος
5 Συμπλήρωση κενών
6 Ερωτήσεις θεωρίας
7 Ασκήσεις

1 Μεθοδολογία

Οι ασκήσεις του κεφαλαίου είναι τριών ειδών: μέτρημα κομματιών και δεσμών μετά από κοπή, εύρεση τμημάτων και γονιδίων σε αλληλουχίες, και επιλογή του σωστού ενζύμου, πλασμιδίου ή ανιχνευτή. Σε κάθε βήμα γράφε και την αιτιολόγηση: στις Πανελλήνιες βαθμολογείται.

Κοπή με περιοριστική ενδονουκλεάση

Τι υπολογίζω	Σχέση	Προσοχή
Κομμάτια από γραμμικό μόριο	**= θέσεις κοπής + 1**	Πυρηνικό DNA ευκαρυωτικών.
Κομμάτια από κυκλικό μόριο	**= θέσεις κοπής**	Πλασμίδια, βακτηριακό και μιτοχονδριακό DNA.
Δεσμοί που σπάνε ανά θέση (EcoRI)	**2 φωσφοδιεστερικοί + 8 υδρογόνου**	4 ζεύγη A–T ανάμεσα στις τομές.
Νουκλεοτίδια μονόκλωνου άκρου (EcoRI)	**4 (AATT)**	Έχουν 2 A και 2 T και δεν σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου.
Φωσφοδιεστερικοί γραμμικού δίκλωνου τμήματος	**= νουκλεοτίδια − 2**	Ισχύει και όταν έχει μονόκλωνα άκρα.

Τι υπολογίζω	Σχέση	Προσοχή
Μήκος ανασυνδυασμένου πλασμιδίου	**= πλασμίδιο + ένθεμα**	Η θέση αναγνώρισης υπάρχει πλέον 2 φορές.

PCR, υβριδοποίηση, cDNA

Τι υπολογίζω	Σχέση	Προσοχή
Μόρια μετά από ν κύκλους PCR	**= αρχικά μόρια × $2^{ν}$**	
Νουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν	**= ($2^{ν}$ – 1) × νουκλεοτίδια μορίου**	Τα νουκλεοτίδια του αρχικού μορίου υπήρχαν ήδη.
Νέες αλυσίδες	**= 2·$2^{ν}$ – 2**	Οι 2 αρχικές αλυσίδες διατηρούνται.
Βάσεις του αρχικού μορίου	**= βάσεις προϊόντος ÷ $2^{ν}$**	Όλα τα μόρια είναι πανομοιότυπα.
Δεσμοί υδρογόνου ανιχνευτή	**= 2·(A + U ή T) + 3·(G + C)**	Με τις βάσεις του ανιχνευτή.
Ζεύγη βάσεων δίκλωνου cDNA	**= νουκλεοτίδια ώριμου mRNA**	Χωρίς εσώνια.

Ασκήσεις με αλληλουχία και EcoRI

1. **Βρες τον προσανατολισμό.** Αν δεν δίνονται τα άκρα, βρες πρώτα την κωδική αλυσίδα: ψάξε ATG και, σε ακέραιο αριθμό τριάδων μετά, TAA, TAG ή TGA.
2. **Βρες τις θέσεις.** Ψάξε το GAATTC διαβάζοντας 5′→3′. Η αλληλουχία είναι ίδια στις δύο αλυσίδες, οπότε αρκεί να τη βρεις στη μία.
3. **Κόψε.** Ανάμεσα στο G και στο A σε κάθε αλυσίδα. Κάθε τομή αφήνει μονόκλωνο άκρο 5′-AATT-3′.
4. **Έλεγξε το κομμάτι.** Σε πλασμίδιο μπαίνει μόνο κομμάτι με μονόκλωνα άκρα και στις δύο πλευρές.

Ποιο ένζυμο ή ποιο πλασμίδιο

1. Το ένζυμο πρέπει να κόβει **εκατέρωθεν** του γονιδίου (και του υποκινητή του, αν θέλουμε να εκφραστεί) και όχι μέσα σε αυτό.
2. Το πλασμίδιο πρέπει να έχει τη θέση **μία φορά**, και όχι στη θέση έναρξης της αντιγραφής.
3. Αν η θέση είναι μέσα σε γονίδιο ανθεκτικότητας, τα βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χάνουν αυτή την ανθεκτικότητα και ξεχωρίζουν.

Συχνά λάθη

Ο ανιχνευτής πρέπει να είναι συμπληρωματικός **και αντιπαράλληλος**. Το ανθρώπινο πυρηνικό DNA είναι γραμμικό, το μιτοχονδριακό κυκλικό. Όταν δίνεται DNA σε **νουκλεοτίδια** ή σε **ζεύγη βάσεων**, πρόσεξε ποιο από τα δύο είναι.

2 Λυμένο παράδειγμα

Δίνεται τμήμα DNA οργανισμού-δότη:
`5΄-CTGAATTCAATGTCCAAGGTTTGAGAATTCGA-3΄`
`3΄-GACTTAAGTTACAGGTTCCAAACTCTTAAGCT-5΄`
και ένα πλασμίδιο 4.000 ζευγών βάσεων, με μία θέση αναγνώρισης της EcoRI. α) Ποια κομμάτια δίνει η EcoRI; β) Πόσους δεσμούς σπάει στο τμήμα; γ) Ποιο κομμάτι μπορεί να ενσωματωθεί στο πλασμίδιο; δ) Πόσα ζεύγη βάσεων έχει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο; ε) Ποιο πεπτίδιο κωδικοποιεί το κομμάτι;

1. **α)** Η πάνω αλυσίδα έχει δύο φορές το 5΄-GAATTC-3΄. Η EcoRI κόβει ανάμεσα στο G και στο A κάθε αλυσίδας και προκύπτουν τρία κομμάτια:
`5΄-CTG-3΄` / `3΄-GACTTAA-5΄`
`5΄-AATTCAATGTCCAAGGTTTGAG-3΄` / `3΄-GTTACAGGTTCCAAACTCTTAA-5΄`
`5΄-AATTCGA-3΄` / `3΄-GCT-5΄`
2. **β)** Δύο θέσεις κοπής, σε καθεμία 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου: **4 φωσφοδιεστερικοί και 16 δεσμοί υδρογόνου**.
3. **γ)** Μόνο το **μεσαίο**, γιατί έχει μονόκλωνα άκρα και στις δύο πλευρές του. Τα ακραία έχουν μονόκλωνο άκρο μόνο στη μία.

4 **δ)** Κάθε αλυσίδα του μεσαίου κομματιού έχει 22 νουκλεοτίδια. Όταν ενωθεί με το ανοιχτό πλασμίδιο, τα μονόκλωνα άκρα ζευγαρώνουν και προστίθενται 22 ζεύγη: **4.022 ζεύγη βάσεων**. Η θέση της EcoRI υπάρχει τώρα δύο φορές.

5 **ε)** Κωδική είναι η πάνω αλυσίδα: έχει ATG και, μετά από ακέραιο αριθμό τριάδων, TGA. mRNA: `5´-AUG-UCC-AAG-GUU-UGA-3´`. Πεπτίδιο: H_2N – μεθειονίνη – σερίνη – λυσίνη – βαλίνη – COOH, **4 αμινοξέα**. Για να εκφραστεί στο βακτήριο χρειάζεται και κατάλληλο υποκινητή.

3 Πολλαπλής επιλογής

Οι λύσεις είναι στο τέλος.

1. Η διαδικασία εισαγωγής των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στα βακτήρια ονομάζεται:

α) κλωνοποίηση
β) γονιδιωματική βιβλιοθήκη
γ) μετασχηματισμός
δ) βακτηριακός κλώνος

2. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού-δότη, αναμειγνύονται και ενώνονται:

α) επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα
β) με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης
γ) δημιουργώντας ανασυνδυασμένα πλασμίδια
δ) όλα τα παραπάνω

3. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

α) παράγονται από βακτήρια
β) προστατεύουν τα βακτήρια από την εισβολή ξένου DNA
γ) αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4 έως 8 νουκλεοτιδίων του δίκλωνου DNA
δ) όλα τα παραπάνω

4. Μια cDNA βιβλιοθήκη περιέχει:

α) αντίγραφα των mRNA ενός ιστού
β) τμήμα του DNA ενός ιστού
γ) αντίγραφα ενός μόνο ανασυνδυασμένου πλασμιδίου
δ) το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση

5. **Η αποδιάταξη, δηλαδή το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου και ο αποχωρισμός των δύο αλυσίδων του DNA, γίνεται:**

α) με τη βοήθεια της DNA δεσμάσης
β) με κατάλληλες χημικές ουσίες ή με αύξηση της θερμοκρασίας
γ) με τη βοήθεια περιοριστικών ενδονουκλεασών
δ) με τη βοήθεια ειδικών ανιχνευτών

6. **Σε κάθε θέση όπου κόβει, η EcoRI σπάει:**

α) 2 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και 8 δεσμούς υδρογόνου
β) 1 φωσφοδιεστερικό δεσμό και 4 δεσμούς υδρογόνου
γ) 2 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και 12 δεσμούς υδρογόνου
δ) 4 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και 8 δεσμούς υδρογόνου

7. **Ένα κυκλικό πλασμίδιο με 3 θέσεις αναγνώρισης μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης κόβεται σε:**

α) 2 κομμάτια
β) 3 κομμάτια
γ) 4 κομμάτια
δ) 6 κομμάτια

8. **Από ένα δίκλωνο μόριο DNA, μετά από 5 κύκλους PCR, υπάρχουν:**

α) 10 μόρια
β) 16 μόρια
γ) 32 μόρια
δ) 64 μόρια

---

4 Σωστό ή λάθος

Οι λύσεις είναι στο τέλος.

1. **Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες κόβουν το DNA σε θέσεις με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων. Σ / Λ**

2. **Το DNA του πλασμιδίου και το DNA του δότη ενώνονται με τη βοήθεια της RNA πολυμεράσης. Σ / Λ**

3. **Η διαδικασία δημιουργίας του ανασυνδυασμένου DNA ονομάζεται μετασχηματισμός. Σ / Λ**

4. **Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται τεχνητά και έλυσαν το πρόβλημα της κατασκευής ανασυνδυασμένου DNA. Σ / Λ**

5. **Η EcoRI κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ των νουκλεοτιδίων C και A. Σ / Λ**

6. **Οι ιχνηθετημένοι ανιχνευτές περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές προς το κλωνοποιημένο DNA. Σ / Λ**

7. **Η PCR επιτρέπει να αντιγράψουμε ειδικές αλληλουχίες DNA χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών κυττάρων. Σ / Λ**

8. **Τα πλασμίδια κόβονται με διαφορετική περιοριστική ενδονουκλεάση από αυτήν που κόβει το DNA του δότη. Σ / Λ**

9. **Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη ενός ανθρώπου είναι ίδια από όποιο σωματικό του κύτταρο κι αν κατασκευαστεί. Σ / Λ**

10. **Η cDNA βιβλιοθήκη από ηπατικά κύτταρα είναι ίδια με αυτήν από νευρικά κύτταρα του ίδιου ατόμου. Σ / Λ**

11. **Το cDNA ενός ασυνεχούς γονιδίου περιέχει εσώνια. Σ / Λ**

12. **Κάθε κλώνος μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης περιέχει ολόκληρο το DNA του δότη. Σ / Λ**

13. **Τα βακτήρια-ξενιστές πρέπει, πριν από τον μετασχηματισμό, να είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό της επιλογής. Σ / Λ**

14. **Υβριδοποίηση μπορεί να γίνει και ανάμεσα σε μια αλυσίδα DNA και μια αλυσίδα RNA. Σ / Λ**

15. **Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί ως καλούπι DNA. Σ / Λ**

16. **Ένα κομμάτι DNA με μονόκλωνο άκρο μόνο στη μία πλευρά του μπορεί να ενσωματωθεί σε πλασμίδιο κομμένο με EcoRI. Σ / Λ**

---

5 Συμπλήρωση κενών

Οι απαντήσεις είναι στο τέλος.

1. Οι τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό αποτελούν τη _____ _____.

2. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται από _____ και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα _____ από την εισβολή _____ _____.

3. Η διαδικασία δημιουργίας κλώνων βακτηρίων ονομάζεται _____.

4. Για να κατασκευαστεί μια _____ _____, απομονώνεται το ολικό ώριμο mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο.

5. Το mRNA χρησιμοποιείται ως _____ για τη σύνθεση μιας _____ αλυσίδας _____, με τη βοήθεια του ενζύμου _____ _____.

6. Η PCR επιτρέπει να αντιγράψουμε επιλεκτικά ειδικές αλληλουχίες _____ από ένα σύνθετο μείγμα μορίων, χωρίς τη μεσολάβηση _____ _____.

7. Η EcoRI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5΄-_____-3΄ και κόβει κάθε αλυσίδα ανάμεσα στο _____ και στο _____.

8. Η σύνδεση μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA, ή DNA με RNA, ονομάζεται _____ και γίνεται με δεσμούς _____.

---

6 Ερωτήσεις θεωρίας

Τύπου Θέματος Β. Οι απαντήσεις είναι στο τέλος.

Γενετική Μηχανική και περιοριστικές ενδονουκλεάσες

1. Πού βρίσκει εφαρμογές η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;

2. Τι ονομάζουμε Γενετική Μηχανική και ποιους στόχους εξυπηρετεί;

3. Ποια είναι, συνοπτικά, τα στάδια της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA;

4. Τι είναι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες; Ποιος είναι ο φυσιολογικός τους ρόλος και πού τις χρησιμοποιούμε; Δώσε ένα παράδειγμα.

5. Ποια αλληλουχία αναγνωρίζει η EcoRI και πού κόβει; Πόσους και ποιους δεσμούς σπάει όταν η αλληλουχία υπάρχει μία φορά σε ένα μόριο;

6. Γιατί το DNA του δότη και ο φορέας κόβονται με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση;

Κλωνοποίηση και φορείς

1. Ποιους φορείς κλωνοποίησης γνωρίζεις και ποιος είναι ο ρόλος τους;

2. Σύγκρινε τη χρήση των πλασμιδίων και των ιών ως φορέων κλωνοποίησης.

3. Ποιος είναι ο ρόλος της DNA δεσμάσης στον σχηματισμό του ανασυνδυασμένου DNA;

4. Γιατί τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται σε βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια και είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά;

5. Πώς εισάγονται τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια στα βακτήρια;

6. Πώς ξεχωρίζουν τα βακτήρια που προσέλαβαν ανασυνδυασμένο DNA από τα υπόλοιπα;

7. Περίγραψε τα στάδια της κλωνοποίησης με φορέα το DNA του βακτηριοφάγου λ.

8. Ποια είναι η σημασία της καθολικότητας του γενετικού κώδικα για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;

9. Ένα γονίδιο ενσωματώθηκε σε πλασμίδιο, αλλά δεν εκφράζεται στο μετασχηματισμένο βακτήριο. Ποιοι μπορεί να είναι οι λόγοι;

Βιβλιοθήκες

1. Τι είναι η γονιδιωματική βιβλιοθήκη και πώς κατασκευάζεται;

2. Πώς ονομάζεται το DNA που συντίθεται με καλούπι mRNA από την αντίστροφη μεταγραφάση;

3. Περίγραψε την πορεία κατασκευής μιας cDNA βιβλιοθήκης.

4. Ποιος είναι ο ρόλος της αντίστροφης μεταγραφάσης στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA;

5. Ποια ένζυμα χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία βιβλιοθηκών;

6. Ποιες είναι οι διαφορές μιας γονιδιωματικής και μιας cDNA βιβλιοθήκης;

7. Γιατί χρησιμοποιούμε cDNA και όχι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες για να παράγουμε ανθρώπινες πρωτεΐνες σε μεγάλες ποσότητες;

Υβριδοποίηση και PCR

1. Πώς δρα η θέρμανση στο DNA κατά την αποδιάταξη; Ποια μέθοδος βασίζεται στην αποδιάταξη και στην επανασύνδεση των αλυσίδων;

2. Πώς χρησιμοποιείται η υβριδοποίηση για τον εντοπισμό ενός κλώνου σε γονιδιωματική ή cDNA βιβλιοθήκη;

3. Τι γνωρίζεις για την PCR και τις εφαρμογές της;

4. Γράψε δύο μεθόδους με τις οποίες παράγονται πολλά αντίγραφα μιας αλληλουχίας DNA.

5. Θέλουμε να εντοπίσουμε και να μελετήσουμε το γενετικό υλικό ενός RNA ιού. Μπορούμε να εφαρμόσουμε PCR;

---

7 Ασκήσεις

Τύπου Θέματος Γ και Δ. Οι αριθμοί και οι αλληλουχίες είναι αλλαγμένοι σε σχέση με τα συνηθισμένα φυλλάδια. Οι λύσεις είναι στο τέλος.

1. Με τη δράση της EcoRI, ένα μόριο DNA από τον πυρήνα ανθρώπινου κυττάρου κόπηκε σε 36 κομμάτια. α) Σε πόσα σημεία κόπηκε; β) Πόσους δεσμούς έσπασε η EcoRI; γ) Πόσα κατάλληλα πλασμίδια χρειάζονται για να κατασκευαστεί βιβλιοθήκη του μορίου; δ) Πόσους δεσμούς θα σπάσει η EcoRI στα πλασμίδια αυτά; ε) Τι θα άλλαζε στα α και β αν το μόριο ήταν μιτοχονδριακό;

2. Ένα μόριο DNA έχει την αλληλουχία που αναγνωρίζει η EcoRI 12 φορές. α) Πόσα κομμάτια θα προκύψουν με τη δράση της EcoRI; β) Πόσοι δεσμοί θα σπάσουν;

3. Δίκλωνο μόριο DNA έχει 1.500 ζεύγη βάσεων και 350 αδενίνες. Με την EcoRI κόβεται σε 16 κομμάτια. Βρες: α) τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και τους δεσμούς υδρογόνου του μορίου, β) πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου έμειναν στα 16 κομμάτια.

4. Ένα τμήμα DNA που έχει κοπεί με EcoRI έχει δύο μονόκλωνα άκρα. Αποτελείται συνολικά από 1.268 νουκλεοτίδια, από τα οποία 380 έχουν G ή C. Υπολόγισε το σύνολο των φωσφοδιεστερικών δεσμών και των δεσμών υδρογόνου του τμήματος.

5. Η EcoRI κόβει ένα μικρό γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA σε δύο τμήματα, το Κ και το Λ. Το Κ έχει 172 νουκλεοτίδια, από τα οποία 34 έχουν αδενίνη. α) Πόσες είναι οι άλλες βάσεις του Κ; β) Πόσους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και πόσους δεσμούς υδρογόνου έχει το Κ; γ) Αν το αρχικό μόριο είχε 320 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και 70 αδενίνες, βρες τις βάσεις του Λ.

6. Ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA κόβεται από μια περιοριστική ενδονουκλεάση σε δύο κομμάτια. Το ένα έχει 240 ζεύγη βάσεων και 70 κυτοσίνες. Το άλλο έχει 318 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και 410 δεσμούς υδρογόνου. α) Πόσες φορές υπάρχει στο μόριο η αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο; β) Πόσες A, T, G και C έχει το αρχικό μόριο; Θεώρησε ότι το ένζυμο αφήνει δίκλωνα άκρα.

7. Ένα δίκλωνο μόριο DNA έχει δύο φορές την αλληλουχία που αναγνωρίζει η BamHI και τέσσερις φορές αυτήν που αναγνωρίζει η HindIII. Με ταυτόχρονη επίδραση των δύο ενζύμων κόβεται σε 6 κομμάτια. Είναι κυκλικό ή γραμμικό;

8. Γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA μήκους 20 kb (1 kb = 1.000 ζεύγη βάσεων) κόβεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση Α σε δύο τμήματα, 13 kb και 7 kb. Η περιοριστική ενδονουκλεάση Β το κόβει σε δύο τμήματα, 5 kb και 15 kb. Πόσα τμήματα, και τι μεγέθους, δίνει η ταυτόχρονη επίδραση των δύο ενζύμων;

9. Η EcoRI αναγνωρίζει μια αλληλουχία 6 ζευγών βάσεων και η HaeIII μια αλληλουχία 4 ζευγών βάσεων. Το DNA ενός ευκαρυωτικού κυττάρου μοιράζεται σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες και σε καθέναν προστίθεται ένα από τα δύο ένζυμα. Σε ποιον σωλήνα περιμένεις περισσότερα κομμάτια;

10. Το DNA του φάγου λ έχει $9{,}6 \cdot 10^4$ νουκλεοτίδια. Πόσες το πολύ διαφορετικές πρωτεΐνες μέσου μοριακού βάρους 30.000 θα μπορούσε να κωδικοποιεί; Το μέσο μοριακό βάρος των αμινοξέων είναι 100.

11. Γράψε τα τμήματα που προκύπτουν από το παρακάτω DNA μετά τη δράση της EcoRI:

`5΄…GCAGAATTCGTTA…3΄`
`3΄…CGTCTTAAGCAAT…5΄`

12. Δίνεται τμήμα DNA οργανισμού-δότη, χωρίς να σημειώνονται τα άκρα των αλυσίδων:

`TTCCTTAAGGATCAGTGAACCTTTCACGGTATCACTTAAGGCT`
`AAGGAATTCCTAGTCACTTGGAAAGTGCCATAGTGAATTCCGA`

Σε ένα από τα κομμάτια που δίνει η EcoRI υπάρχει ένα μικρό γονίδιο. α) Βρες τον προσανατολισμό των αλυσίδων. β) Γράψε τα κομμάτια που δίνει η EcoRI. γ) Πόσα αμινοξέα κωδικοποιεί το γονίδιο;

13. Δίνεται το μόριο DNA:

`5΄-TCAGAATTCGGATGCCGTTAGGTTAGCAAGAATTCACT-3΄`
`3΄-AGTCTTAAGCCTACGGCAATCCAATCGTTCTTAAGTGA-5΄`

Το μόριο κόβεται με EcoRI και εισάγεται σε κατάλληλο φορέα, ώστε να παραχθεί σε βακτήριο το ολιγοπεπτίδιο που κωδικοποιεί. Από ποια αμινοξέα αποτελείται;

14. Στο παρακάτω μόριο DNA θέλουμε να κλωνοποιήσουμε το υπογραμμισμένο τμήμα, για να παράγουμε το ολιγοπεπτίδιο που κωδικοποιεί:

`5΄-TGGATCCGGCCATGAAAGGCCTTTCTTGAGGCCGGATCCA-3΄`
`3΄-ACCTAGGCCGGTACTTTCCGGAAAGAACTCCGGCCTAGGT-5΄`

Διαθέτουμε την HaeIII, που κόβει στην αλληλουχία 5΄-GGCC-3΄, και την BamHI, που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5΄-GGATCC-3΄. α) Ποιο ένζυμο θα χρησιμοποιήσουμε; β) Ποια είναι η ακολουθία των αμινοξέων του ολιγοπεπτιδίου;

15. Το παρακάτω δίκλωνο τμήμα DNA αντιγράφεται *in vitro*:

`5΄-GCTTACGAATTCAGGTATC-3΄`
`3΄-CGAATGCTTAAGTCCATAG-5΄`

Κατά την αντιγραφή, απέναντι από την πρώτη Α της αλληλουχίας GAATTC της πάνω αλυσίδας, η DNA πολυμεράση τοποθετεί κατά λάθος G αντί για Τ. Το λάθος παραμένει. α) Γράψε τα δίκλωνα μόρια που υπάρχουν μετά την αντιγραφή. β) Πόσα τμήματα DNA θα υπάρχουν αν στο μείγμα προστεθεί EcoRI;

16. Δίνεται ο ανιχνευτής `5΄-CUGAAUCCGA-3΄`. Ποια από τις παρακάτω αλυσίδες μπορεί να υβριδοποιήσει;
Μόριο Ι, αλυσίδα 1: `5΄…AACTGAATCCGATG…3΄`
Μόριο Ι, αλυσίδα 2: `3΄…TTGACTTAGGCTAC…5΄`
Μόριο ΙΙ, αλυσίδα 1: `5΄…ATGACTTAGGCTAA…3΄`
Μόριο ΙΙ, αλυσίδα 2: `3΄…TACTGAATCCGATT…5΄`

17. Διαθέτεις δύο ανιχνευτές:
Ανιχνευτής Α: `5΄-CCUAGAUUCG-3΄`
Ανιχνευτής Β: `5΄-GCTTAGATCC-3΄`
Ποιον θα χρησιμοποιούσες για να ανιχνεύσεις ένα γονίδιο του οποίου η κωδική αλυσίδα περιέχει την αλληλουχία `5΄…TTGCAGGATCTAAGCCGT…3΄`;

18. Το πρόδρομο mRNA ενός γονιδίου έχει 5 εσώνια και 6 εξώνια. Τα εσώνια καταλαμβάνουν το 60% του μήκους του. Το γονίδιο απομονώνεται, αποδιατάσσεται και υβριδοποιείται με το ώριμο mRNA από το κυτταρόπλασμα. α) Ποια αλυσίδα του DNA συμμετέχει στην υβριδοποίηση; β) Τι ποσοστό του mRNA και τι ποσοστό της αλυσίδας του DNA υβριδοποιείται;

19. Δύο μόρια DNA έχουν τις παρακάτω αλληλουχίες. Ποιο αποδιατάσσεται ευκολότερα;
Μόριο Α: `5΄-ATTGACATAATTGA-3΄` / `3΄-TAACTGTATTAACT-5΄`
Μόριο Β: `5΄-GCCGTACGGCACGT-3΄` / `3΄-CGGCATGCCGTGCA-5΄`

20. Ένα γονίδιο 1.200 ζευγών βάσεων έχει ακριβώς πριν και ακριβώς μετά από αυτό την αλληλουχία GGATCC, που η BamHI αναγνωρίζει και κόβει ανάμεσα στα δύο G. Ένα πλασμίδιο 3.000 ζευγών βάσεων έχει την αλληλουχία μία φορά. Το πλασμίδιο επωάζεται με BamHI και μετά με αντίγραφα του γονιδίου κομμένα με το ίδιο ένζυμο. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είχαν 3.000, 4.206 ή 5.412 ζεύγη βάσεων. Πώς ερμηνεύονται τα μεγέθη αυτά;

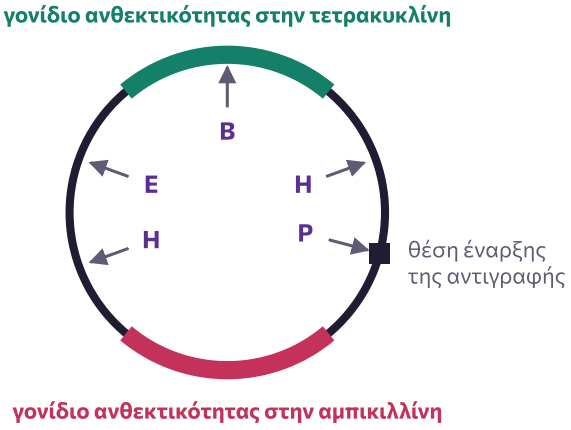
21. Ένα πλασμίδιο έχει δύο γονίδια ανθεκτικότητας, ένα στην αμπικιλλίνη και ένα στην τετρακυκλίνη. Η BamHI κόβει το πλασμίδιο μέσα στο γονίδιο της τετρακυκλίνης και σε ένα ακόμη σημείο εκτός γονιδίων. Η EcoRI το κόβει μία φορά, μέσα στο γονίδιο της αμπικιλλίνης. Η HindIII το κόβει μία φορά, εκτός των γονιδίων. Ποιο από τα τρία ένζυμα είναι το καταλληλότερο για την κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA;

22. Στο σχήμα φαίνονται (i) ένα τμήμα DNA προκαρυωτικού κυττάρου με ένα γονίδιο και τον υποκινητή του (Υ) και (ii) ένα πλασμίδιο που θα χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης. Τα γράμματα δείχνουν τις θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων EcoRI (E), BamHI (B), HindIII (H) και PstI (P). Η αλυσίδα α΄ έχει το 5΄ άκρο της αριστερά.

(i) τμήμα DNA



(ii) πλασμίδιο



α) Ποια από τις δύο αλυσίδες του γονιδίου είναι η μη κωδική; β) Ποιο από τα τέσσερα ένζυμα είναι το καταλληλότερο για την κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA;

23. Για την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης διαθέτεις δύο πλασμίδια και δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που απομονώθηκαν από το *Escherichia coli* και από το *Streptococcus pneumoniae*. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει η ενδονουκλεάση του E. coli (EcoRI) υπάρχει δύο φορές στο πλασμίδιο του S. *pneumoniae*. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει η ενδονουκλεάση του S. *pneumoniae* υπάρχει μία φορά στο πλασμίδιο του E. coli. Κάθε πλασμίδιο έχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε διαφορετικό αντιβιοτικό. Ποιον συνδυασμό πλασμιδίου, ενζύμου και βακτηρίου-ξενιστή θα διάλεγες;

24. Ένα πλασμίδιο-φορέας έχει τρία γονίδια ανθεκτικότητας, στην τετρακυκλίνη, στην αμπικιλλίνη και στην καναμυκίνη. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση βρίσκεται μέσα στο γονίδιο της καναμυκίνης. Τα βακτήρια-ξενιστές έχουν στο κύριο μόριο DNA τους ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη. Πώς θα επιλέξεις τα βακτήρια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο;

25. Ένα μόριο DNA από τον πυρήνα ευκαρυωτικού κυττάρου υποβάλλεται σε 6 κύκλους PCR. Το τελικό προϊόν περιέχει συνολικά 19.200 Α και 28.800 C. Βρες τους δεσμούς υδρογόνου του αρχικού μορίου.

26. Ένα τμήμα DNA πολλαπλασιάζεται με PCR. Κάθε κύκλος διαρκεί 3 λεπτά και διπλασιάζει το DNA. α) Πόσα αντίγραφα του τμήματος υπάρχουν μετά από 30 λεπτά, αν η αντίδραση ξεκίνησε από ένα μόριο; β) Αν το τμήμα έχει 400 ζεύγη βάσεων, πόσα νουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν στα 30 αυτά λεπτά;

27. Με PCR θέλουμε να φτιάξουμε τουλάχιστον 100 αντίγραφα ενός τμήματος DNA 300 ζευγών βάσεων, ξεκινώντας από ένα μόριο. Κάθε κύκλος διαρκεί 5 λεπτά. α) Πόσος χρόνος χρειάζεται; β) Πόσα νουκλεοτίδια θα υπάρχουν τελικά στα μόρια και πόσα χρειάστηκαν για την κατασκευή τους; γ) Πόσες νέες αλυσίδες συντέθηκαν;

28. Ένα μόριο RNA 40 νουκλεοτιδίων χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής για μια αλληλουχία ενός γονιδίου. Στον ανιχνευτή ισχύει (A + U) ÷ (G + C) = 3. Από μια βιβλιοθήκη απομονώνονται 8 πλασμίδια που περιέχουν το καθένα μία φορά την αλληλουχία. Τα πλασμίδια αποδιατάσσονται και αναμειγνύονται με 15 μόρια ανιχνευτή. Πόσοι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται κατά την υβριδοποίηση;

29. Ένα ώριμο mRNA 900 νουκλεοτιδίων, στο οποίο G + C = 40%, χρησιμοποιείται για τη σύνθεση δίκλωνου cDNA. α) Ποια ένζυμα χρειάζονται; β) Πόσα δεοξυριβονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται και πόσοι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί σχηματίζονται; γ) Πόσους δεσμούς υδρογόνου έχει το δίκλωνο cDNA;

8 Λύσεις

Πολλαπλής επιλογής

1. **γ)** Μετασχηματισμός. Κλωνοποίηση είναι η δημιουργία κλώνων βακτηρίων.
2. **δ)** Τα συμπληρωματικά άκρα ζευγαρώνουν, η DNA δεσμάση τα ενώνει και προκύπτει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
3. **δ)** Και οι τρεις προτάσεις ισχύουν.
4. **α)** Περιέχει αντίγραφα των mRNA των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα από τα οποία φτιάχτηκε.
5. **β)** Τα ένζυμα των άλλων επιλογών δρουν σε φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, και οι ανιχνευτές υβριδοποιούν.
6. **α)** Έναν φωσφοδιεστερικό σε κάθε αλυσίδα, και τους δεσμούς υδρογόνου των 4 ζευγών A–T ανάμεσα στις τομές (4 × 2).
7. **β)** Στο κυκλικό μόριο τα κομμάτια είναι όσα και οι θέσεις κοπής. Στο γραμμικό θα ήταν 4.
8. **γ)** $2^5 = 32$.

Σωστό ή λάθος

1. **Σ.** Αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4 έως 8 νουκλεοτιδίων.
2. **Λ.** Ενώνονται με την DNA δεσμάση.
3. **Λ.** Μετασχηματισμός είναι η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στο βακτήριο.
4. **Λ.** Παράγονται φυσιολογικά από βακτήρια.
5. **Λ.** Κόβει μεταξύ G και A.
6. **Σ.** Γι’ αυτό υβριδοποιούν μόνο το DNA που ψάχνουμε.
7. **Σ.** Γίνεται σε δοκιμαστικό σωλήνα.
8. **Λ.** Με την ίδια, ώστε να προκύψουν συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα.
9. **Σ.** Όλα τα σωματικά κύτταρα έχουν το ίδιο DNA.
10. **Λ.** Κάθε κυτταρικός τύπος εκφράζει διαφορετικά γονίδια, άρα έχει διαφορετικά mRNA.
11. **Λ.** Συντίθεται με καλούπι το ώριμο mRNA, που δεν έχει εσώνια.
12. **Λ.** Κάθε κλώνος έχει ένα κομμάτι. Όλοι μαζί έχουν το συνολικό DNA.
13. **Λ.** Πρέπει να είναι ευαίσθητα, αλλιώς θα επιβίωναν και όσα δεν πήραν πλασμίδιο.
14. **Σ.** Αρκεί να είναι συμπληρωματικές.
15. **Λ.** Χρησιμοποιεί RNA και συνθέτει DNA.
16. **Λ.** Χρειάζεται μονόκλωνα άκρα και στις δύο πλευρές για να κλείσει ο κύκλος.

Συμπλήρωση κενών

1. Γενετική Μηχανική.

2. βακτήρια, προστατεύουν, ξένου DNA.
3. κλωνοποίηση.
4. cDNA βιβλιοθήκη.
5. καλούπι, συμπληρωματικής, DNA, αντίστροφη μεταγραφάση.
6. DNA, ζωντανών κυττάρων.
7. GAATTC, G, A.
8. υβριδοποίηση, υδρογόνου.

Θεωρία: Γενετική Μηχανική και περιοριστικές ενδονουκλεάσες

1. Έδωσε στον άνθρωπο την ικανότητα όχι μόνο να ερευνά αλλά και να τροποποιεί το γενετικό υλικό των οργανισμών. Εφαρμόζεται στην παραγωγή σειράς προϊόντων, όπως πρωτεϊνών, και στη δημιουργία φυτών και ζώων με «βελτιωμένες» ιδιότητες.
2. Το σύνολο των τεχνικών με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό. Άνοιξε τον δρόμο για νέες παραγωγικές και ερευνητικές δυνατότητες και εξυπηρετεί δύο θεμελιώδεις στόχους: την κατανόηση των μυστηρίων της ζωής και της εξέλιξης, και τη βελτίωση της υγείας και του τρόπου διαβίωσης του ανθρώπου.
3. Κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA. Μεταφορά του σε κύτταρο-ξενιστή (μετασχηματισμός). Επιλογή και απομόνωση των ξενιστών που το προσέλαβαν. Επιλογή του βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό DNA.
4. Ένζυμα που παράγονται από βακτήρια και κόβουν το δίκλωνο DNA σε ειδικές αλληλουχίες 4 έως 8 νουκλεοτιδίων. Φυσιολογικά προστατεύουν το βακτήριο από την εισβολή ξένου DNA. Στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται για να κόβεται το DNA του δότη και του φορέα κατά την κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA. Παράδειγμα η EcoRI, από το *Escherichia coli*.
5. Αναγνωρίζει την αλληλουχία 5′-GAATTC-3′ (3′-CTTAAG-5′ στην απέναντι αλυσίδα), τόσο σε πλασμίδια όσο και σε ευκαρυωτικό DNA. Κόβει κάθε αλυσίδα ανάμεσα στο G και στο A, με κατεύθυνση 5′→3′, και αφήνει μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις. Σπάει 2 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, έναν σε κάθε αλυσίδα, και 8 δεσμούς υδρογόνου (4 ζεύγη A–T).
6. Για να αποκτήσουν τα ίδια μονόκλωνα άκρα. Μόνο τότε τα άκρα τους είναι συμπληρωματικά, ζευγαρώνουν με δεσμούς υδρογόνου και μπορεί η DNA δεσμάση να τα ενώσει.

Θεωρία: Κλωνοποίηση και φορείς

1. Τα πλασμίδια και το DNA φάγων, όπως του βακτηριοφάγου λ. Δέχονται το ξένο DNA, το μεταφέρουν στο κύτταρο-ξενιστή και, επειδή αντιγράφονται ανεξάρτητα μέσα σε αυτό, το πολλαπλασιάζουν.
2. Τα πλασμίδια είναι ο συνηθέστερος φορέας και χρησιμοποιούνται για οργανισμούς με μικρό γονιδίωμα, γιατί δεν μπορούν να ενσωματώσουν μεγάλα κομμάτια DNA. Το DNA των φάγων, όπως του βακτηριοφάγου λ, ενσωματώνει μεγαλύτερα κομμάτια ξένου DNA. Η διαδικασία της κλωνοποίησης είναι παρόμοια.
3. Όταν το DNA του πλασμιδίου και του δότη αναμειχθούν, τα συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα τους ζευγαρώνουν. Η DNA δεσμάση σχηματίζει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που ενώνουν μόνιμα τα δύο είδη DNA σε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

4. Η επιλογή στηρίζεται στην ανάπτυξη παρουσία αντιβιοτικού. Αν οι ξενιστές είχαν ήδη πλασμίδια με γονίδια ανθεκτικότητας, θα επιβίωναν και όσοι δεν πήραν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, και η επιλογή θα ήταν αδύνατη.
5. Με μετασχηματισμό. Μετά από κατάλληλη κατεργασία, τα τοιχώματα των βακτηρίων γίνονται παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια και το πλασμίδιο περνά στο κύτταρο.
6. Με καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό: επιβιώνουν μόνο όσα πήραν πλασμίδιο, που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας. Ο κλώνος με το συγκεκριμένο τμήμα DNA εντοπίζεται στη συνέχεια με ειδικό ανιχνευτή.
7. Απομονώνεται το ολικό DNA του δότη. Το DNA του δότη και το DNA του φάγου κόβονται με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση. Αναμειγνύονται και, με DNA δεσμάση, σχηματίζονται ανασυνδυασμένα μόρια DNA φάγου. Οι ανασυνδυασμένοι φάγοι μολύνουν βακτήρια-ξενιστές και πολλαπλασιάζονται μέσα σε αυτά, δίνοντας πολλά αντίγραφα του ξένου DNA. Ο κλώνος με το επιθυμητό τμήμα επιλέγεται με ανιχνευτή.
8. Επειδή ο κώδικας είναι σχεδόν καθολικός, το mRNA ενός οργανισμού μεταφράζεται σωστά από τα ριβοσώματα και τα tRNA ενός άλλου.Έτσι ένα βακτήριο που έχει προσλάβει ανθρώπινο γονίδιο μπορεί να συνθέσει την ανθρώπινη πρωτεΐνη.
9. Το γονίδιο μπορεί να μην έχει μπροστά του υποκινητή που να αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση του βακτηρίου. Αν είναι ευκαρυωτικό με εσώνια, το βακτήριο δεν μπορεί να κάνει ωρίμανση. Η περιοριστική ενδονουκλεάση μπορεί να έκοψε μέσα στο γονίδιο ή να απομάκρυνε μέρος του. Το γονίδιο μπορεί να μπήκε με αντίστροφο προσανατολισμό ως προς τον υποκινητή. Τέλος, η πρωτεΐνη μπορεί να χρειάζεται τροποποιήσεις μετά τη μετάφραση που το βακτήριο δεν κάνει.

Θεωρία: Βιβλιοθήκες

1. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού-δότη. Το DNA του δότη κόβεται με περιοριστική ενδονουκλεάση σε χιλιάδες κομμάτια, που ενσωματώνονται, με DNA δεσμάση, σε πλασμίδια κομμένα με το ίδιο ένζυμο. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται σε βακτήρια με μετασχηματισμό, τα βακτήρια επιλέγονται με αντιβιοτικό και το καθένα δίνει έναν κλώνο.
2. cDNA, δηλαδή συμπληρωματικό DNA.
3. Απομονώνονται τα κύτταρα όπου εκφράζεται το γονίδιο και από αυτά το ολικό ώριμο mRNA. Με καλούπι το mRNA, η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει συμπληρωματικές αλυσίδες cDNA και προκύπτουν υβριδικά μόρια mRNA–cDNA. Το mRNA διασπάται με χημικές ουσίες ή με θέρμανση. Με καλούπι το cDNA, η DNA πολυμεράση συνθέτει τη δεύτερη αλυσίδα. Τα δίκλωνα μόρια ενσωματώνονται σε πλασμίδια με περιοριστική ενδονουκλεάση και DNA δεσμάση. Ακολουθούν μετασχηματισμός, καλλιέργεια με αντιβιοτικό, επιλογή και δημιουργία των κλώνων.
4. Χρησιμοποιεί ως καλούπι τα ώριμα mRNA ενός κυτταρικού τύπου και συνθέτει συμπληρωματικές αλυσίδες DNA (cDNA). Είναι το πρώτο βήμα για την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης.
5. Και στις δύο βιβλιοθήκες: περιοριστική ενδονουκλεάση και DNA δεσμάση. Στη cDNA επιπλέον: αντίστροφη μεταγραφάση και DNA πολυμεράση.

6. Η γονιδιωματική περιέχει το συνολικό DNA του δότη, έχει πολύ μεγάλο αριθμό κλώνων, και τα τμήματά της είναι ολόκληρα γονίδια, μέρη γονιδίων ή DNA που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες, με εξώνια και εσώνια. Η cDNA περιέχει μόνο αντίγραφα των mRNA των γονιδίων που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα, έχει λιγότερους κλώνους, περιέχει μόνο εξώνια, διαφέρει από ιστό σε ιστό και χρειάζεται δύο επιπλέον ένζυμα.
7. Τα περισσότερα ανθρώπινα γονίδια έχουν εσώνια και τα βακτήρια δεν διαθέτουν μηχανισμό ωρίμανσης, οπότε δεν θα έδιναν τη σωστή πρωτεΐνη. Το cDNA περιέχει μόνο την πληροφορία των εξωνίων. Επιπλέον η cDNA βιβλιοθήκη έχει λιγότερους κλώνους, που όλοι αντιστοιχούν σε γονίδια, και το επιθυμητό γονίδιο εντοπίζεται ευκολότερα.

Θεωρία: Υβριδοποίηση και PCR

1. Η θέρμανση σπάει τους δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις δύο αλυσίδες, που αποχωρίζονται χωρίς να καταστραφούν. Η μέθοδος είναι η υβριδοποίηση: η σύνδεση μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ή DNA–RNA, που χρησιμοποιείται με ιχνηθετημένους ανιχνευτές. Στα ίδια φαινόμενα στηρίζεται και η PCR.
2. Χρησιμοποιούνται ιχνηθετημένοι ανιχνευτές, δηλαδή μονόκλωνα μόρια DNA ή RNA με αλληλουχία συμπληρωματική προς το DNA που ψάχνουμε. Το DNA των κλώνων αποδιατάσσεται και αναμειγνύεται με τους ανιχνευτές, οι οποίοι υβριδοποιούν μόνο το συμπληρωματικό τους DNA.Έτσι εντοπίζεται, ανάμεσα σε χιλιάδες κλώνους, αυτός που περιέχει το επιθυμητό τμήμα.
3. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτρέπει να αντιγράψουμε επιλεκτικά, εκατομμύρια φορές, ειδικές αλληλουχίες DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών κυττάρων. Άρχισε να εφαρμόζεται ευρέως το 1985 και αύξησε την ευαισθησία των γενετικών αναλύσεων. Χρησιμοποιείται στην Ιατρική για τη διάγνωση ασθενειών όπως το AIDS, στην εγκληματολογία για τη διαλεύκανση υποθέσεων και στη μελέτη DNA από απολιθώματα.
4. Η κλωνοποίηση, δηλαδή η ενσωμάτωση της αλληλουχίας σε φορέα και ο πολλαπλασιασμός της μέσα σε βακτήρια-ξενιστές, και η PCR, που γίνεται σε δοκιμαστικό σωλήνα χωρίς ζωντανά κύτταρα.
5. Όχι απευθείας. Η DNA πολυμεράση της PCR χρησιμοποιεί ως καλούπι μόνο DNA. Μπορούμε όμως πρώτα να συνθέσουμε cDNA από το RNA του ιού με αντίστροφη μεταγραφάση και μετά να εφαρμόσουμε την PCR στο cDNA.

Ασκήσεις

1. α) Το πυρηνικό DNA είναι γραμμικό, άρα 36 κομμάτια προκύπτουν από **35** θέσεις κοπής.
   β) Σε κάθε θέση σπάνε 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και 8 δεσμοί υδρογόνου (4 ζεύγη A–T). Σύνολο: **70 φωσφοδιεστερικοί και 280 δεσμοί υδρογόνου**.
   γ)Ένα πλασμίδιο για κάθε κομμάτι: **36**. Αυστηρά, τα δύο ακραία κομμάτια έχουν μονόκλωνο άκρο μόνο στη μία πλευρά και δεν μπορούν να ενσωματωθούν. Αν η άσκηση το ζητά, γράψε 34 και εξήγησέ το.
   δ) Κάθε πλασμίδιο έχει τη θέση μία φορά: 36 × (2 + 8), δηλαδή **72 φωσφοδιεστερικοί και 288 δεσμοί υδρογόνου**.
   ε) Το μιτοχονδριακό DNA είναι κυκλικό: 36 κομμάτια σημαίνουν 36 θέσεις κοπής, άρα 72 φωσφοδιεστερικοί και 288 δεσμοί υδρογόνου.

2. α) Αν το μόριο είναι γραμμικό, **13** κομμάτια. Αν είναι κυκλικό, **12**.
   β) Και στις δύο περιπτώσεις η EcoRI κόβει 12 φορές: 12 × 2 = **24 φωσφοδιεστερικοί** και 12 × 8 = **96 δεσμοί υδρογόνου**.

3. α) A = T = 350 και G = C = 1.500 − 350 = 1.150. Δεσμοί υδρογόνου: 2·350 + 3·1.150 = **4.150**.
   Φωσφοδιεστερικοί: αν είναι γραμμικό 3.000 − 2 = **2.998**, αν είναι κυκλικό **3.000**.
   β) Γραμμικό: 15 θέσεις κοπής, σπάνε 30 φωσφοδιεστερικοί και 120 δεσμοί υδρογόνου. Μένουν **2.968** και **4.030**.
   Κυκλικό: 16 θέσεις κοπής, σπάνε 32 και 128. Μένουν **2.968** και **4.022**.

4. Κάθε μονόκλωνο άκρο έχει 4 αζευγάρωτα νουκλεοτίδια (AATT), άρα στο δίκλωνο μέρος βρίσκονται 1.268 − 8 = 1.260 νουκλεοτίδια.
   A + T συνολικά: 1.268 − 380 = 888. Τα 8 είναι στα μονόκλωνα άκρα, οπότε στο δίκλωνο μέρος A + T = 880, δηλαδή 440 ζεύγη A–T. Ζεύγη G–C: 380 ÷ 2 = 190.
   Δεσμοί υδρογόνου: 2·440 + 3·190 = **1.450**.
   Φωσφοδιεστερικοί (δύο γραμμικές αλυσίδες): 1.268 − 2 = **1.266**. Σύνολο δεσμών: 2.716.

5. Το Κ είναι ακραίο τμήμα, άρα έχει ένα μονόκλωνο άκρο 5΄-AATT-3΄ (2 A και 2 T).
   α) Δίκλωνο μέρος: 172 − 4 = 168 νουκλεοτίδια. Αδενίνες στο δίκλωνο μέρος: 34 − 2 = 32, άρα και 32 θυμίνες. G = C = (168 − 64) ÷ 2 = 52. Συνολικά στο Κ: **A = 34, T = 34, G = 52, C = 52**.
   β) Η μικρή αλυσίδα έχει 84 νουκλεοτίδια (83 δεσμοί) και η μεγάλη 88 (87 δεσμοί): **170 φωσφοδιεστερικοί**. Δεσμοί υδρογόνου: 2·32 + 3·52 = **220**.
   γ) Το αρχικό μόριο είχε 320 + 2 = 322 νουκλεοτίδια, άρα το Λ έχει 322 − 172 = 150. Αδενίνες του Λ: 70 − 34 = 36. Επειδή στο αρχικό A = T = 70, θυμίνες του Λ: 70 − 34 = 36. G = C = (150 − 72) ÷ 2 = 39. Άρα **A = 36, T = 36, G = 39, C = 39**.

6. α) Κυκλικό μόριο, 2 κομμάτια: **2 φορές**.
   β) 1ο κομμάτι: 480 νουκλεοτίδια, C = G = 70, άρα A = T = (480 − 140) ÷ 2 = 170.
   2ο κομμάτι: γραμμικό, 318 + 2 = 320 νουκλεοτίδια. 2A + 2G = 320 και 2A + 3G = 410, άρα G = C = 90 και A = T = 70.
   Συνολικά: **A = T = 240, G = C = 160**.

7. Οι θέσεις κοπής είναι συνολικά 6. Ένα γραμμικό μόριο θα έδινε 7 κομμάτια, ένα κυκλικό 6. Άρα το μόριο είναι **κυκλικό**.

8. Κάθε ένζυμο κόβει μία φορά, άρα με τα δύο μαζί προκύπτουν **3 τμήματα**. Το μέγεθός τους εξαρτάται από το άκρο από το οποίο απέχει 5 kb η θέση της B:
   Αν η θέση της B είναι 5 kb από το άκρο του τμήματος των 13 kb: **5, 8 και 7 kb**.
   Αν είναι 5 kb από το άλλο άκρο, μέσα στο τμήμα των 7 kb: **13, 2 και 5 kb**.

9. Στον σωλήνα με την **HaeIII**. Μια συγκεκριμένη αλληλουχία 4 ζευγών βάσεων εμφανίζεται τυχαία κάθε $4^4 = 256$ ζεύγη περίπου, ενώ μια αλληλουχία 6 ζευγών κάθε $4^6 = 4.096$. Η μικρότερη αλληλουχία υπάρχει πολύ περισσότερες φορές στο γονιδίωμα.

10. Κάθε πρωτεΐνη έχει 30.000 ÷ 100 = 300 αμινοξέα, άρα χρειάζεται 301 κωδικόνια (με το κωδικόνιο λήξης), δηλαδή 903 νουκλεοτίδια μιας αλυσίδας.
    Το DNA είναι δίκλωνο: $4{,}8 \cdot 10^4$ ζεύγη, και κάθε γονίδιο χρησιμοποιεί τη μία αλυσίδα. 48.000 ÷ 903 = 53,2. Άρα το πολύ **53** πρωτεΐνες (χωρίς υποκινητές και άλλες αλληλουχίες).

11. Η EcoRI κόβει μεταξύ G και A στην αλληλουχία 5′-GAATTC-3′ κάθε αλυσίδας:
    1ο τμήμα: `5′…GCAG-3′` και `3′…CGTCTTAA-5′`
    2ο τμήμα: `5′-AATTCGTTA…3′` και `3′-GCAAT…5′`
    Αν οι προσανατολισμοί ήταν οι αντίθετοι, δεν θα υπήρχε θέση αναγνώρισης.

12. α) Ψάχνω ATG και, σε ακέραιο αριθμό τριάδων μετά, κωδικόνιο λήξης. Τα βρίσκω μόνο στην πάνω αλυσίδα διαβασμένη από δεξιά προς τα αριστερά: ATG GCA CTT TCC AAG TGA. Άρα η πάνω είναι η κωδική, με το 5′ άκρο της δεξιά, και η κάτω έχει το 5′ άκρο της αριστερά.
    β) Η κάτω αλυσίδα, 5′→3′, έχει δύο φορές το GAATTC. Προκύπτουν τρία κομμάτια (γραμμένα με την κάτω αλυσίδα 5′→3′):
    `5′-AAGG-3′` / `3′-TTCCTTAA-5′`
    `5′-AATTCCTAGTCACTTGGAAAGTGCCATAGTG-3′` / `3′-GGATCAGTGAACCTTTCACGGTATCACTTAA-5′`
    `5′-AATTCCGA-3′` / `3′-GGCT-5′`
    γ) Το γονίδιο βρίσκεται στο μεσαίο κομμάτι. mRNA: `5′-AUG-GCA-CUU-UCC-AAG-UGA-3′`. Το UGA είναι κωδικόνιο λήξης, άρα **5 αμινοξέα** (μεθειονίνη, αλανίνη, λευκίνη, σερίνη, λυσίνη).

13. Η αλληλουχία GAATTC υπάρχει δύο φορές. Το τμήμα που προκύπτει ανάμεσα στις δύο τομές είναι:
    `5′-AATTCGGATGCCGTTAGGTTAGCAAG-3′`
    `3′-GCCTACGGCAATCCAATCGTTCTTAA-5′`
    Κωδική είναι η πάνω αλυσίδα: έχει ATG και, μετά από ακέραιο αριθμό τριάδων, TAG. mRNA: `5′-AAUUCGG·AUG·CCG·UUA·GGU·UAG·CAAG-3′`.
    Ολιγοπεπτίδιο: H_2N – **μεθειονίνη – προλίνη – λευκίνη – γλυκίνη** – COOH. Αντικωδικόνια με τη σειρά: 3′-UAC-5′, 3′-GGC-5′, 3′-AAU-5′, 3′-CCA-5′.

14. α) Η HaeIII βρίσκει την αλληλουχία GGCC πιο κοντά στα άκρα του τμήματος, αλλά και **μέσα** σε αυτό (AAAGGCCTT), οπότε θα το κομμάτιαζε. Η BamHI βρίσκει την αλληλουχία GGATCC μόνο εκατέρωθεν του τμήματος. Επιλέγουμε την **BamHI**.
    β) Κωδική είναι η πάνω αλυσίδα. mRNA: `5′-AUG-AAA-GGC-CUU-UCU-UGA-3′`. Ολιγοπεπτίδιο: H_2N – **μεθειονίνη – λυσίνη – γλυκίνη – λευκίνη – σερίνη** – COOH.

15. α) Ο μηχανισμός είναι ημισυντηρητικός και, επειδή η αντιγραφή γίνεται *in vitro*, δεν υπάρχουν επιδιορθωτικά ένζυμα να διορθώσουν το λάθος.
    1ο μόριο (παλιά πάνω αλυσίδα, νέα κάτω με το λάθος): `5′-GCTTACGAATTCAGGTATC-3′` / `3′-CGAATGCGTAAGTCCATAG-5′`
    2ο μόριο (παλιά κάτω αλυσίδα, νέα πάνω): `5′-GCTTACGAATTCAGGTATC-3′` / `3′-CGAATGCTTAAGTCCATAG-5′`
    β) Η EcoRI αναγνωρίζει την αλληλουχία μόνο όταν υπάρχει σωστή και στις δύο αλυσίδες. Κόβει το 2ο μόριο σε δύο τμήματα και αφήνει το 1ο ακέραιο. Σύνολο **3 τμήματα**.

16. Ο ανιχνευτής υβριδοποιεί την αλυσίδα που είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη: `3′-GACTTAGGCT-5′`. Αυτή υπάρχει στην **αλυσίδα 2 του μορίου Ι**.
    Η αλυσίδα 1 του μορίου Ι έχει την ίδια αλληλουχία με τον ανιχνευτή. Η αλυσίδα 1 του μορίου ΙΙ έχει τις συμπληρωματικές βάσεις αλλά με τον ίδιο προσανατολισμό (5′→3′), άρα δεν είναι αντιπαράλληλη.

17. Τον **Β**. Διαβασμένος 3′→5′ είναι `3′-CCTAGATTCG-5′`, δηλαδή συμπληρωματικός και αντιπαράλληλος με το τμήμα `5′-GGATCTAAGC-3′` της κωδικής αλυσίδας.
    Ο Α έχει τις συμπληρωματικές βάσεις προς το ίδιο τμήμα, αλλά με τον ίδιο προσανατολισμό με την κωδική. Δεν είναι αντιπαράλληλος με καμία από τις δύο αλυσίδες του γονιδίου, οπότε δεν υβριδοποιεί.

18. α) Η **μη κωδική**, που είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη με το mRNA.
β) Το ώριμο mRNA υβριδοποιείται ολόκληρο (**100%**). Από την αλυσίδα του DNA υβριδοποιούνται μόνο οι περιοχές που αντιστοιχούν στα εξώνια, δηλαδή το **40%** της μεταγραφόμενης περιοχής. Οι 5 περιοχές των εσωνίων μένουν αζευγάρωτες και σχηματίζουν θηλιές.

19. Στην αποδιάταξη σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου. Όσο λιγότεροι είναι, τόσο ευκολότερα αποχωρίζονται οι αλυσίδες.
Μόριο Α: 11 ζεύγη A–T και 3 ζεύγη G–C, δηλαδή 2·11 + 3·3 = 31 δεσμοί υδρογόνου.
Μόριο Β: 4 ζεύγη A–T και 10 ζεύγη G–C, δηλαδή 2·4 + 3·10 = 38.
Ευκολότερα αποδιατάσσεται το **Α**.

20. **3.000**: το πλασμίδιο ξανάκλεισε χωρίς να πάρει ξένο DNA.
4.206: πήρε ένα αντίγραφο του γονιδίου. Μαζί με το γονίδιο προστίθεται και μία ακόμη θέση αναγνώρισης (6 ζεύγη), αφού η αλληλουχία GGATCC υπάρχει πλέον και στα δύο σημεία ένωσης: 3.000 + 1.200 + 6.
5.412: πήρε δύο αντίγραφα στη σειρά: 3.000 + 2·(1.200 + 6).

21. Η **EcoRI**. Κόβει το πλασμίδιο μία μόνο φορά, άρα το ανοίγει χωρίς να χαθεί κομμάτι του. Επιπλέον κόβει μέσα σε γονίδιο ανθεκτικότητας: τα βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο είναι ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη αλλά ευαίσθητα στην αμπικιλλίνη, και έτσι ξεχωρίζουν από όσα πήραν πλασμίδιο χωρίς ξένο DNA.
Η BamHI κόβει σε δύο σημεία και το πλασμίδιο χωρίζεται σε δύο κομμάτια. Η HindIII δίνει ανασυνδυασμένα πλασμίδια, αλλά και τα δύο γονίδια μένουν λειτουργικά, οπότε δεν διακρίνονται τα βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από εκείνα με το αρχικό.

22. α) Η RNA πολυμεράση ξεκινά από τον υποκινητή, που βρίσκεται δεξιά του γονιδίου, και κινείται προς τα αριστερά. Το mRNA συντίθεται 5΄→3΄, άρα έχει το 5΄ άκρο του δεξιά, όπως και η κωδική αλυσίδα. Η β΄ έχει το 5΄ άκρο της δεξιά, άρα είναι η κωδική. **Μη κωδική είναι η α΄.**
β) Η **BamHI**. Έχει θέσεις και από τις δύο πλευρές του γονιδίου και του υποκινητή του, χωρίς να κόβει μέσα σε αυτά. Στο πλασμίδιο κόβει μία φορά, μέσα στο γονίδιο της τετρακυκλίνης, οπότε τα βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο είναι ανθεκτικά στην αμπικιλλίνη και ευαίσθητα στην τετρακυκλίνη. Η EcoRI κόβει μέσα στο γονίδιο. Η PstI έχει θέση μόνο από τη μία πλευρά του γονιδίου και, στο πλασμίδιο, κόβει στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Η HindIII κόβει το πλασμίδιο σε δύο κομμάτια.

23. Το πλασμίδιο πρέπει να κόβεται μία μόνο φορά. Το πλασμίδιο του *S. pneumoniae* κόβεται δύο φορές από την EcoRI, άρα χωρίζεται σε δύο κομμάτια και δεν είναι κατάλληλο. Διαλέγω το **πλασμίδιο του *E. coli*** και την **ενδονουκλεάση του *S. pneumoniae***, με την οποία κόβω και το DNA του δότη.
Ξενιστής: βακτήρια ***E. coli*** χωρίς πλασμίδια και ευαίσθητα στο αντιβιοτικό του πλασμιδίου. Το *S. pneumoniae* παράγει την ενδονουκλεάση που αναγνωρίζει τις θέσεις στα σημεία ένωσης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και θα το έκοβε.

24. Υπάρχουν τρία είδη βακτηρίων: χωρίς πλασμίδιο (ανθεκτικά μόνο στην τετρακυκλίνη), με πλασμίδιο χωρίς ξένο DNA (ανθεκτικά και στα τρία) και με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη και στην αμπικιλλίνη, ευαίσθητα στην καναμυκίνη).
1. Καλλιεργώ με **αμπικιλλίνη**: πεθαίνουν όσα δεν πήραν πλασμίδιο. Η τετρακυκλίνη δεν βοηθά, αφού είναι όλα ανθεκτικά.
2. Φτιάχνω στερεές καλλιέργειες, ώστε κάθε βακτήριο να δώσει μια αποικία.
3. Ελέγχω κάθε αποικία παρουσία **καναμυκίνης**: όσες **δεν** μεγαλώνουν έχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Τις παίρνω από την αρχική καλλιέργεια.

25. Μετά από 6 κύκλους υπάρχουν $2^6 = 64$ πανομοιότυπα μόρια. Κάθε μόριο έχει 19.200 ÷ 64 = 300 A και 28.800 ÷ 64 = 450 C. Δεσμοί υδρογόνου: 2·300 + 3·450 = **1.950**.

26. α) 30 ÷ 3 = 10 κύκλοι, άρα 2^{10} = **1.024** μόρια.
    β) Κάθε μόριο έχει 800 νουκλεοτίδια. Τα 1.024 μόρια έχουν 819.200, αλλά τα 800 του αρχικού μορίου υπήρχαν ήδη. Χρησιμοποιήθηκαν (1.024 − 1) × 800 = **818.400** νουκλεοτίδια.

27. α) $2^6 = 64 < 100$ και $2^7 = 128 \geq 100$, άρα χρειάζονται 7 κύκλοι: **35 λεπτά**.
    β) Κάθε μόριο έχει 600 νουκλεοτίδια. Τελικά υπάρχουν 128 × 600 = **76.800**. Χρειάστηκαν 127 × 600 = **76.200**, γιατί τα νουκλεοτίδια του αρχικού μορίου υπήρχαν ήδη.
    γ) Οι αλυσίδες είναι 2 × 128 = 256 και οι 2 είναι οι αρχικές: **254** νέες αλυσίδες.

28. A + U + G + C = 40 και A + U = 3·(G + C), άρα G + C = 10 και A + U = 30.
    Σε κάθε υβριδικό μόριο, κάθε A ή U του ανιχνευτή σχηματίζει 2 δεσμούς και κάθε G ή C 3: 2·30 + 3·10 = 90 δεσμοί υδρογόνου.
    Η αλληλουχία υπάρχει 8 φορές, άρα από τα 15 μόρια ανιχνευτή υβριδοποιούν τα 8: 8 × 90 = **720**.

29. α) Αντίστροφη μεταγραφάση για την πρώτη αλυσίδα και DNA πολυμεράση για τη δεύτερη.
    β) Δύο αλυσίδες των 900 νουκλεοτιδίων: **1.800** δεοξυριβονουκλεοτίδια. Φωσφοδιεστερικοί: 2 × 899 = **1.798**.
    γ) Το δίκλωνο cDNA έχει 900 ζεύγη. Ζεύγη G–C: 40% × 900 = 360. Ζεύγη A–T: 540. Δεσμοί υδρογόνου: 2·540 + 3·360 = **2.160**.

Σημειώσεις Βιολογίας Προσανατολισμού Γ΄ Λυκείου. Κεφάλαιο 4, ασκήσεις.