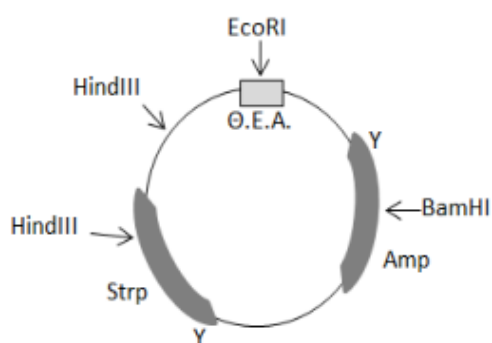


ΤΕΥΧΟΣ Β

ΚΕΦ.4

4.1 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
Y = θέση υποκινητή αντίστοιχων 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

2.2 Τα τελευταία χρόνια, οι επιστήμονες έχουν αναπτύξει εργαστηριακές μεθόδους για τη κλωνοποίηση τμημάτων DNA, που τους δίνουν τη δυνατότητα για νέες και εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ερευνητικές και παραγωγικές δυνατότητες. Η κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε *in vitro*, είτε με τη βοήθεια κυττάρων-ξενιστών, π.χ. βακτηρίων, που δημιουργούν κλώνους κυττάρων.

- α. Να δώσετε τη σημασία των όρων «κλώνος» και «κλωνοποίηση» (μονάδες 6).
β. Να ονομάσετε τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την *in vitro* κλωνοποίηση τμημάτων DNA με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων (μονάδα 1), να εξηγήσετε το σκοπό της μεθόδου αυτής (μονάδες 3) και να αναφέρετε τρεις πρακτικές εφαρμογές της (μονάδες 3).

Μονάδες 13

2.2 Τα τελευταία χρόνια, οι επιστήμονες έχουν αναπτύξει εργαστηριακές μεθόδους για τη κλωνοποίηση τμημάτων DNA, που τους δίνουν τη δυνατότητα για νέες και εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ερευνητικές και παραγωγικές δυνατότητες. Η κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε *in vitro*, είτε με τη βοήθεια κυττάρων-ξενιστών, π.χ. βακτηρίων, που δημιουργούν κλώνους κυττάρων.

- α. Να δώσετε τη σημασία των όρων «κλώνος» και «κλωνοποίηση» (μονάδες 6).
β. Να ονομάσετε τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την *in vitro* κλωνοποίηση τμημάτων DNA με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων (μονάδα 1), να εξηγήσετε το σκοπό της μεθόδου αυτής (μονάδες 3) και να αναφέρετε τρεις πρακτικές εφαρμογές της (μονάδες 3).

Μονάδες 13

2.1 Η απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών, καθώς και ειδικών φορέων κλωνοποίησης επέτρεψε την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA και έδωσε στον άνθρωπο την ικανότητα όχι μόνο να ερευνά, αλλά να επεμβαίνει και να τροποποιεί το γενετικό υλικό των οργανισμών.

α. Να αναφέρετε τι εννοούμε, στα πλαίσια της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, με τον όρο “ανασυνδυασμένο μόριο DNA” (μονάδες 2) και να εξηγήσετε τι είναι ένας φορέας κλωνοποίησης (μονάδες 4).

β. Να εξηγήσετε τι είναι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες (μονάδες 2), να αναφέρετε από πού απομονώνονται (μονάδες 2) και να γράψετε το φυσιολογικό τους ρόλο (μονάδες 2).

Μονάδες 12

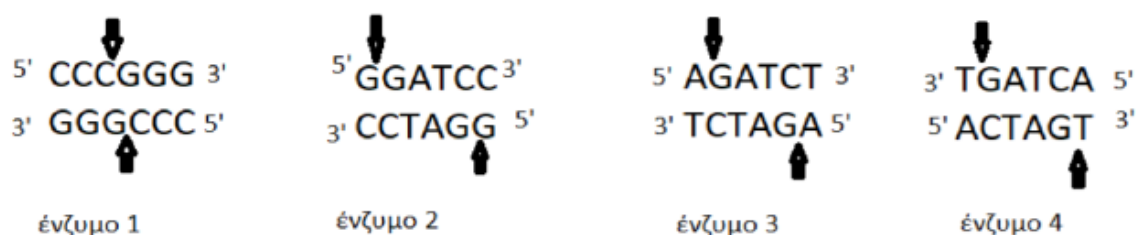
2.2 Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA συνέβαλε στη δυνατότητα μεταφοράς τμημάτων γενετικού υλικού από ένα οργανισμό σε έναν άλλο, ώστε να επιτυγχάνεται η κλωνοποίησή τους. Με τη συμβολή των βακτηρίων μπορεί να κλωνοποιηθεί ξένο DNA με την κατασκευή της γονιδιωματικής και της cDNA βιβλιοθήκης, οι οποίες περιέχουν ένα σύνολο μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων.

α. Να αναφέρετε τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για κάθε μία από τις δύο βιβλιοθήκες (μονάδες 4) και να γράψετε ποιο από αυτά απομονώνεται από βακτηριακά κύτταρα και ποιο από ιούς (μονάδες 2).

β. Να εξηγήσετε ποια από τις δυο βιβλιοθήκες περιέχει γονίδια (ή τμήματά τους) που κωδικοποιούν για μόρια tRNA ενός οργανισμού δότη (μονάδες 4) και ποια περιέχει τους υποκινητές (ή τμήματά τους) γονιδίων (μονάδες 3).

Μονάδες 13

4.2 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

4.1 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

4.2 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 κύτταρο, 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

4.2 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 Π και τα ανέμειξε μεταξύ τους.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποίησε περιείχαν μία μόνο θέση αναγνώρισης από τη περιοριστική ενδονουκλεάση Π 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

2.2 Στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιούνται πολλές διαδικασίες. Ανάμεσα τους είναι η αποδιάταξη και η υβριδοποίηση μορίων ή τμημάτων DNA - DNA, RNA - RNA ή DNA - RNA.

α. Να δώσετε τους ορισμούς των εννοιών “αποδιάταξη” και “υβριδοποίηση”(μονάδες 6).

β.Τόσο κατά την κατασκευή όσο και κατά την χρήση της γονιδιωματικής ή της cDNA βιβλιοθήκης εφαρμόζεται η διαδικασία της υβριδοποίησης. Να περιγράψετε το ρόλο της υβριδοποίησης στις δύο διαδικασίες (μονάδες 7).

Μονάδες 13

4.2 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 CTGATATGTACTGCCCATCGACACAGAAATTCTGACG 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 μετασχηματισμένα βακτήρια, θα χρησιμοποιήσουμε αντίγραφα του γονιδίου από γονιδιωματική ή cDNA βιβλιοθήκη (μονάδες 4).

Μονάδες 13

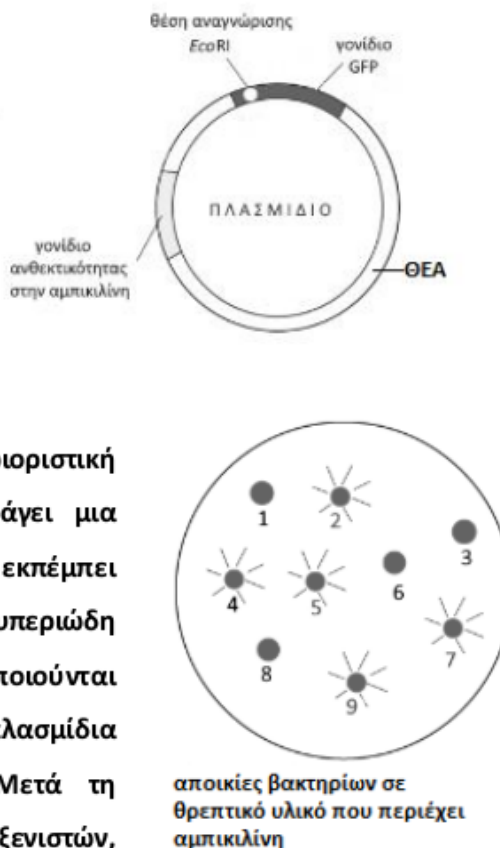
4.1 Για τη κλωνοποίηση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί ένα ανθρώπινο ένζυμο, οι ερευνητές χρησιμοποιούν ως φορέα κλωνοποίησης το πλασμίδιο της εικόνας, το οποίο διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικίνη και το γονίδιο GFP (green fluorescent protein) εντός του οποίου υπάρχει η αλληλουχία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

EcoRI, την οποία χρησιμοποιούν ως περιοριστική ενδονουκλεάση. 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 αμικικίνη. Μετά τη διαδικασία μετασχηματισμού των βακτηρίων-ξενιστών, τα βακτήρια μεταφέρονται σε στερεό θρεπτικό υλικό

που περιέχει το αντιβιοτικό αμικικίνη 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

2.2 Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, πολλά γονίδια μεταγράφονται σε ορισμένους μόνο κυτταρικούς τύπους, όπως για παράδειγμα τα γονίδια των αλυσίδων των αιμοσφαιρινών που εκφράζονται μόνο στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα του ανθρώπου. Αν θέλουμε να κλωνοποιήσουμε μόνο τα γονίδια που εκφράζονται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, τότε κατασκευάζουμε τις cDNA βιβλιοθήκες.

α. Να περιγράψετε τι περιέχουν οι cDNA βιβλιοθήκες (μονάδες 3) και να αναφέρετε το βασικό πλεονέκτημα που παρουσιάζουν σε σχέση με τις γονιδιωματικές (μονάδες 3).

β. Να περιγράψετε τη διαδικασία κατασκευής μιας cDNA βιβλιοθήκης (μονάδες 3) και να αναφέρετε ονομαστικά τα ένζυμα που πρέπει να χρησιμοποιήσουν οι ερευνητές (μονάδες 4).

Μονάδες 13

2.2 Η ανακάλυψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών, δηλαδή των ενζύμων που αναγνωρίζουν στο DNA συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων και το «κόβουν» σε συγκεκριμένα σημεία, καθώς και των ειδικών φορέων κλωνοποίησης, που μεταφέρουν DNA από κύτταρο σε κύτταρο, επέτρεψε την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Έτσι, μπορούμε πλέον να κατασκευάζουμε και να πολλαπλασιάζουμε *in vitro* «ανασυνδυασμένα» μόρια DNA και στη συνέχεια να τα μεταφέρουμε σε *in vivo* περιβάλλον. Με αυτόν το τρόπο προκύπτουν γενετικά τροποποιημένα βακτήρια ή ευκαρυωτικά κύτταρα που μπορούν να πολλαπλασιάζονται μεταβιβάζοντας στους απογόνους τους τις νέες τους ιδιότητες.

α. Να αποδώσετε τις εννοιες του ανασυνδυασμού και του μετασχηματισμού, όπως αυτές χρησιμοποιούνται στα πλαίσια της γενετικής μηχανικής (μονάδες 6).

β. Να περιγράψετε συνοπτικά δύο τρόπους με τους οποίους μπορούμε να επιτύχουμε την κλωνοποίηση μορίων DNA (μονάδες 5), χαρακτηρίζοντας παράλληλα αυτές τις διαδικασίες ως *in vivo* ή *in vitro* (μονάδες 2).

Μονάδες 13

4.1 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

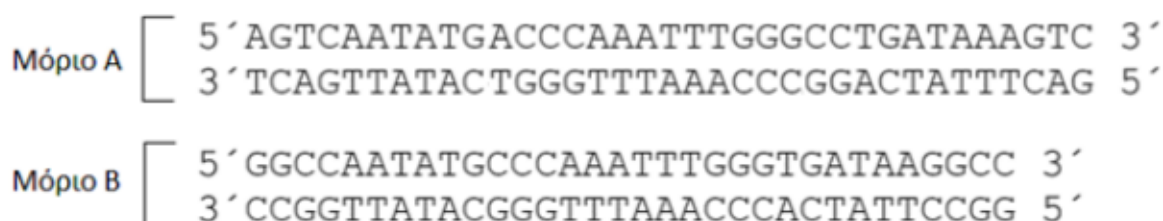
4.1 Τα πλασμίδια αποτελούν συνηθισμένο “εργαλείο” της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, οπότε και υφίστανται πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για να εισαχθεί σε αυτά το επιθυμητό DNA. Στη συνέχεια, το ανασυνδυασμένο DNA εισάγεται σε κύτταρα, συνήθως προκαρυωτικά, με την μέθοδο του μετασχηματισμού 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

4.2 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 δίκλωνα τμήματα DNA A και B 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 δίκλωνη αλληλουχία 4 ζευγών νουκλεοτιδίων, την οποία κόβει μεταξύ των δύο διαδοχικών νουκλεοτιδίων με βάση G:



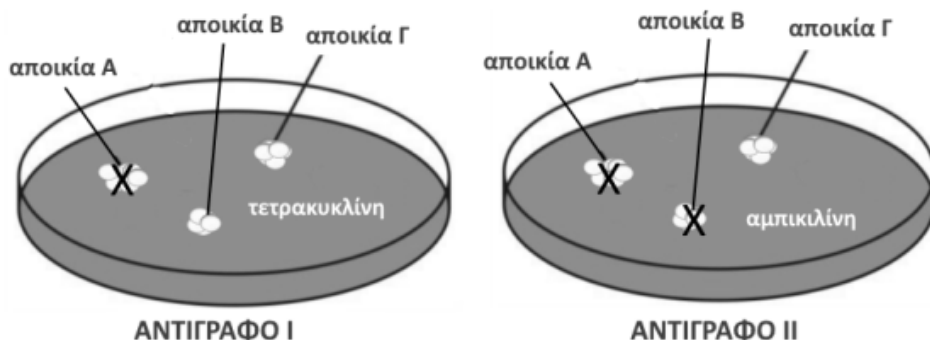
α. Ποιο από τα παραπάνω γονίδια θεωρείτε ότι μπορεί να περιλαμβάνεται αυτούσιο σε γονιδιωματική βιβλιοθήκη του ιού αυτού που κατασκευάστηκε με τη χρήση της παραπάνω περιοριστικής ενδονουκλεάσης (μονάδες 2); Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας υποδεικνύοντας την κωδική αλυσίδα κάθε γονιδίου (μονάδες 3).

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 μονόκλωνα 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

4.1 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 καλλιεργιών 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 καλλιεργιών (μονάδες 2).

Μονάδες 12

4.1 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

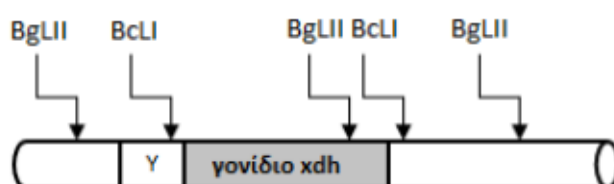
4.1 Το *Thermus aquaticus* είναι ένα θερμοφίλο βακτήριο που αναπτύσσεται κοντά σε θερμοπηγές, όπου η θερμοκρασία είναι πολύ υψηλή, γύρω στους 60-70° C, αλλά μπορεί να αντέξει και σε θερμοκρασίες της τάξης των 80° C. Από το βακτήριο αυτό απομονώνεται μια ειδική θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, που είναι γνωστή ως Taq DNA πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό διατηρεί τη λειτουργικότητά του ακόμα και σε θερμοκρασίες που φτάνουν τους 95° 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 95° C, 45-60 ° C και 70° 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 θερμοφίλα αυτά βακτήρια (μονάδες 6).

Μονάδες 12

4.2 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 (Y) 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

4.1 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.



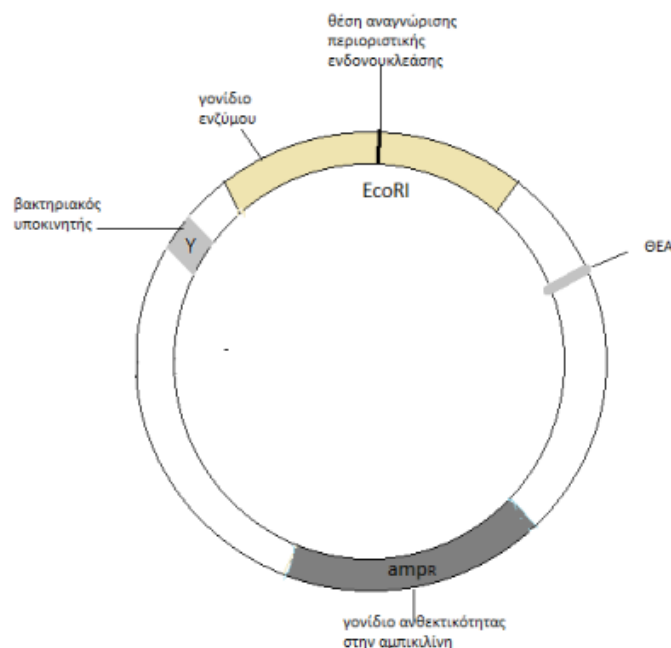
α. Να αναφέρετε τα ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων μεταξύ των οποίων αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου στο υβριδικό μόριο (μονάδες 2) και να εξηγήσετε σε ποια/ες βιολογική/ές διεργασία/ες που σχετίζονται με το γενετικό υλικό μπορεί να προκύψουν τέτοιου είδους υβριδικά μόρια τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*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

β. Αν σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα διαθέτετε 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 επιμηκύνοντας την αλυσίδα, το άκρο της οποίας είναι μικρότερου μήκους (μονάδες 6).

Μονάδες 12

4.2 Για την κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πλασμίδιο, στο οποίο υπάρχουν οι εξής αλληλουχίες: μοναδικό γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, βακτηριακός υποκινητής μπροστά από γονίδιο ενός ενζύμου, με το οποίο τα θαλάσσια βακτήρια *Vibrio fischeri*, όταν βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα, παράγουν βιοφωταύγεια 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

4.2 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 φωσφοδιεστερικοί και πόσοι δεσμοί υδρογόνου θα δημιουργηθούν κατά το σχηματισμό καθενός ανασυνδυασμένου 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

4.2 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 καρυοτύπου 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 καρυοτύπου 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).

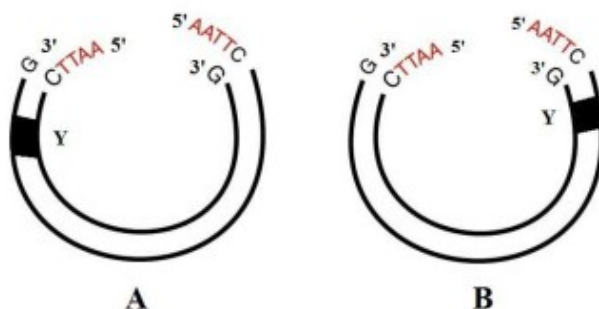
Μονάδες 13

4.1 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).

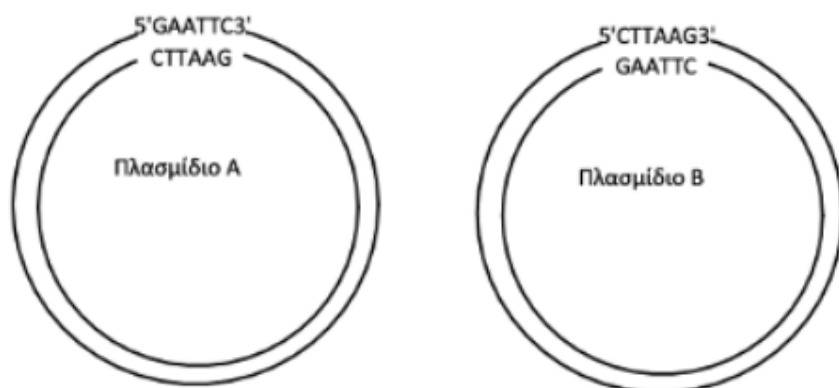
β. Το παραπάνω γονίδιο, με τα μονόκλωνα άκρα του, το διαθέτουμε σε περισσότερα αντίγραφα και μπορούμε να το εισάγουμε σε δύο φορείς κλωνοποίησης – πλασμίδια A και B - όπως φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



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

4.2 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 παράξουν το ίδιο πεπτίδιο με αυτό που θα παραγόταν στο ευκαρυωτικό κύτταρο (μονάδες 7).

Μονάδες 13

4.1 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):

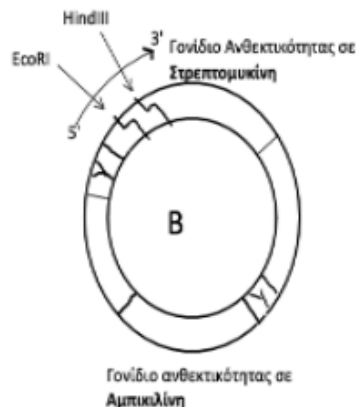
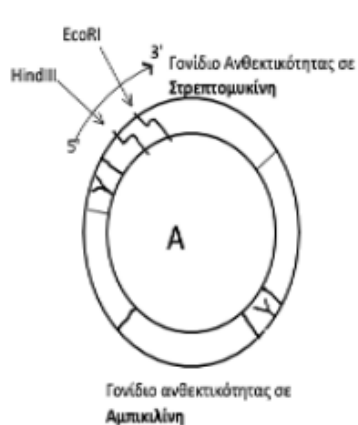
5' ...ACGTGAATTCATGTTATTT CCCGGCTAGCATAAAGCTTACGT ...3' κωδική

3' ...TGCACTTAAGTACAATAAAGGGCCGATCGTATTCGAATGCA ...5' μη κωδική

Για την κλωνοποίηση του παραπάνω γονιδίου, είναι διαθέσιμα τα παρακάτω πλασμίδια Α και Β, 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