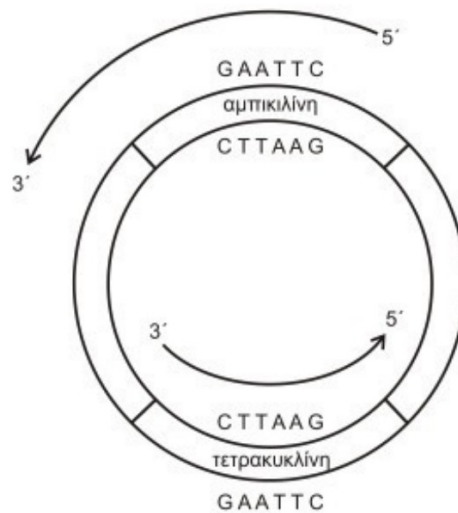


Γ3. Στο σχήμα 3 απεικονίζεται πλασμίδιο που διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας σε δύο αντιβιοτικά, την αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη και αναγράφονται εσωτερικές αλληλουχίες των δύο γονιδίων ανθεκτικότητας. Αφού το πλασμίδιο κοπεί με την EcoRI και εισαχθεί ένα γονίδιο ξένου οργανισμού σε αυτό να εξηγήσετε ποιο από τα δύο αντιβιοτικά θα χρησιμοποιούσατε για τη διάκριση των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.



σχήμα 3

Μονάδες 5

Γ2. Το τμήμα DNA, που απεικονίζεται στην **εικόνα 2**, έχει προκύψει μετά από επίδραση με ενδονουκλεάση EcoRI.

AATTCCGCAAATTAA
GGCGTTTAATT

Εικόνα 2

Να σημειώσετε τα 5' και 3' άκρα του, αιτιολογώντας την απάντησή σας.
(μονάδες 4)

Να εξηγήσετε αν είναι δυνατόν το συγκεκριμένο τμήμα να κλωνοποιηθεί με τη βοήθεια πλασμιδίου χρησιμοποιώντας τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. (μονάδες 2)

Μονάδες 6

Γ1. Προκειμένου να κλωνοποιήσουμε επιλεγμένο τμήμα DNA, κατασκευάσαμε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, το οποίο περιλαμβάνει:

- α) γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη
- β) γονίδιο που κωδικοποιεί ένζυμο, το οποίο μετατρέπει την άχρωμη ουσία Α σε έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο Β. Το γονίδιο αυτό περιλαμβάνει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI.

Αφού πραγματοποιήθηκαν όλα τα στάδια παραγωγής ανασυνδυασμένου μορίου DNA (πλασμιδίου) και εισαγωγής του σε βακτήρια-ξενιστές, προέκυψαν:

- i) βακτήρια χωρίς ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.
- ii) άχρωμες αποικίες με βακτήρια ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη.
- iii) αποικίες μπλέ χρώματος με βακτήρια ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη.

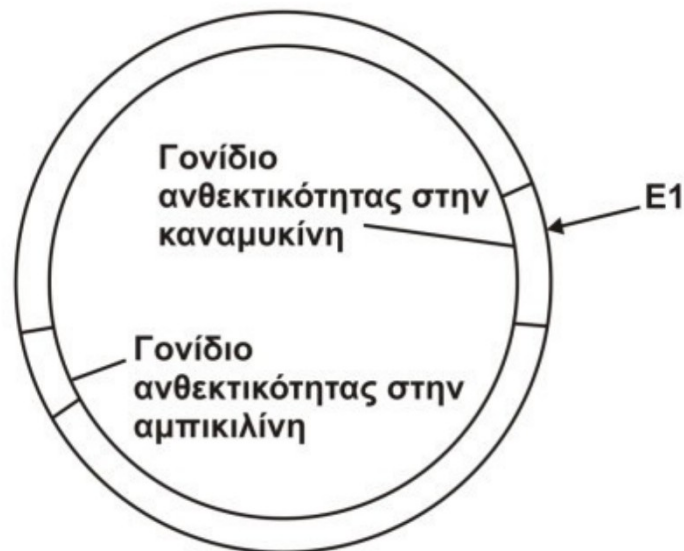
Από ποια αποικία θα επιλεγούν τα βακτήρια που περιέχουν το επιλεγμένο τμήμα DNA; (μονάδες 3)

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας. (μονάδες 6)

(Χρησιμοποιήσαμε ως ξενιστές βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια και είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά).

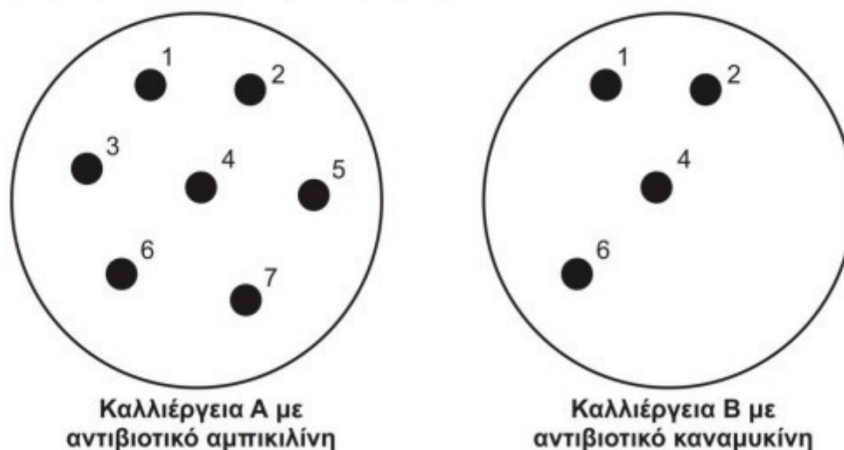
Μονάδες 9

Γ3. Προκειμένου να μελετήσουμε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί κάποια πρωτεΐνη, το κλωνοποιούμε σε κατάλληλο πλασμίδιο φορέα (**Εικόνα 3**) που φέρει τις αλληλουχίες δύο γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη. Το γονίδιο εισάγεται στο σημείο που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση E1. Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιούμε ως βακτήρια ξενιστές στελέχη *E.coli* τα οποία είναι ευαίσθητα και στα δύο αντιβιοτικά.



Εικόνα 3

Μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού, τα βακτήρια μεταφέρονται σε στερεό θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικό αμπικιλίνη (καλλιέργεια Α, **Εικόνα 4**). Στη συνέχεια μεταφέρουμε δείγματα από όλες τις αριθμημένες αποικίες σε νέο στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό καναμυκίνη, οπότε αναπτύσσεται η καλλιέργεια Β (**Εικόνα 4**).

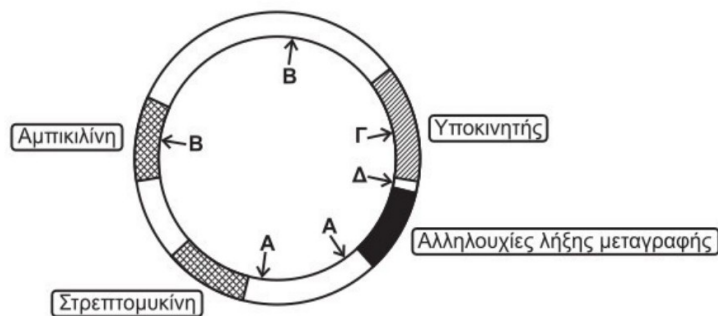


Εικόνα 4

Να αναφέρετε τα είδη των βακτηρίων που αναπτύσσονται στις δύο καλλιέργειες. (μονάδες 3) Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας. (μονάδες 4)

Μονάδες 7

Στην **Εικόνα 1** δίνεται ένα πλασμίδιο που φέρει γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και στρεπτομυκίνη, έναν υποκινητή και αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής. Στις θέσεις **A**, **B**, **Γ** και **Δ** βρίσκονται αλληλουχίες, οι οποίες αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες **α**, **β**, **γ** και **δ** αντίστοιχα. Το πλασμίδιο αυτό το χρησιμοποιούμε ως φορέα για την κλωνοποίηση ενός ανθρώπινου συνεχούς γονιδίου με σκοπό να παράγουμε ένα ολιγοπεπτίδιο σε καλλιέργειες *in vitro*. Στα βακτήρια που θα χρησιμοποιηθούν για τον μετασχηματισμό περιέχονται όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες που απαιτούνται για τη μεταγραφή και δεν περιέχονται πλασμίδια.



Εικόνα 1

- Δ1.** Ποια από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες **α**, **β**, **γ** ή **δ** είναι η κατάλληλη για τη χρήση του πλασμιδίου αυτού ως φορέα κλωνοποίησης; (μονάδα 1)
Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας. (μονάδες 3)

Μονάδες 4

- Δ2.** Με ποιον τρόπο μπορούμε να επιλέξουμε τους βακτηριακούς κλώνους που έχουν προσλάβει πλασμίδιο (ανασυνδυασμένο ή μη) από τους κλώνους που δεν έχουν προσλάβει πλασμίδιο; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

Μονάδες 3

Στην **Εικόνα 2** δίνεται τμήμα DNA το οποίο περιέχει το συνεχές ανθρώπινο γονίδιο που επιθυμούμε να εισαγάγουμε στο πλασμίδιο της **Εικόνας 1**.

Αλυσίδα I **OH-GCCAAATATTAAATGAGCATGCCGTAGGAATATTCGG**

Αλυσίδα II **CGGTTATAATTTACTCGTACGGCATCCTTATAAGCC**

Εικόνα 2

- Δ3.** Να εντοπίσετε την κωδική αλυσίδα του γονιδίου της **Εικόνας 2**. (μονάδα 1)
Να γράψετε το mRNA και να σημειώσετε τον προσανατολισμό του. (μονάδες 2) Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας. (μονάδες 4)

Μονάδες 7

- Δ4.** Σύμφωνα με την **Εικόνα 2**, να γράψετε την αλληλουχία μήκους έξι ζευγών βάσεων που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση, την οποία προσδιορίσατε στο ερώτημα Δ1, για την κλωνοποίηση του γονιδίου.

Μονάδες 5

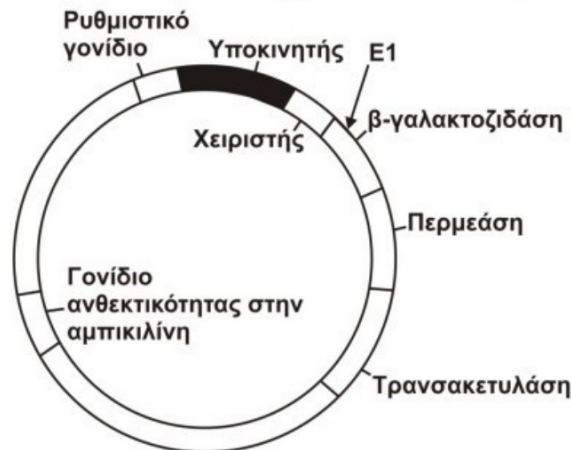
- Δ5.** Να εξηγήσετε γιατί η κλωνοποίηση του γονιδίου της **Εικόνας 2** στο πλασμίδιο της **Εικόνας 1** μπορεί να οδηγήσει

i) στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων που παράγουν το ολιγοπεπτίδιο και

ii) στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων που δεν παράγουν το ολιγοπεπτίδιο παρόλο που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Μονάδες 6

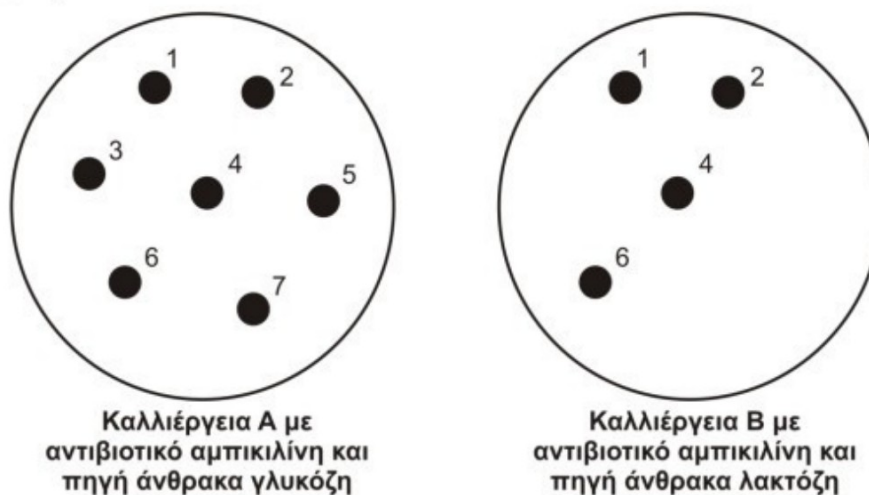
Γ3. Προκειμένου να μελετήσουμε το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Α, το κλωνοποιούμε σε κατάλληλο πλασμίδιο φορέα (**Εικόνα 3**) που φέρει την αλληλουχία του οπερονίου της λακτόζης. Το γονίδιο εισάγεται στο σημείο που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση E1. Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιούμε ως βακτήρια ξενιστές στελέχη *E.coli* στα οποία δεν λειτουργεί το οπερόνιο της λακτόζης και είναι ευαίσθητα στην αμπικιλίνη.



Εικόνα 3

Μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού, τα βακτήρια μεταφέρονται σε στερεό θρεπτικό υλικό με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και αντιβιοτικό

αμπικιλίνη (καλλιέργεια Α, **Εικόνα 4**). Στη συνέχεια μεταφέρουμε δείγματα από όλες τις αριθμημένες αποικίες σε νέο στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει λακτόζη και αμπικιλίνη, οπότε αναπτύσσεται η καλλιέργεια Β (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4

Να αναφέρετε τα είδη των βακτηρίων που αναπτύσσονται στις δύο παραπάνω καλλιέργειες Α και Β (μονάδες 3). Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 4).

Μονάδες 7