Νέο Φροντιστήριο

Τράπεζα Θεμάτων Γ Λυκείου

Βιολογία

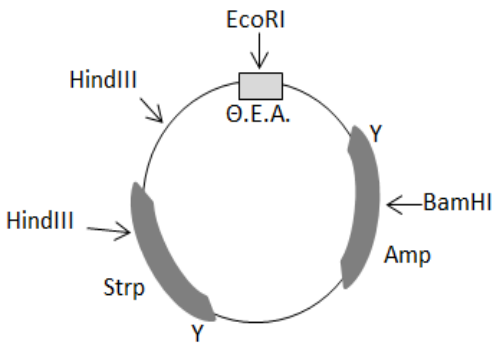
Κεφάλαιο: 4 Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

Θέμα 4

ΘΕΜΑ 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 αμπικιλλίνη
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

4.2 Η αντιγραφή του DNA είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται πολλά ένζυμα με εξειδικευμένη λειτουργία. Παρακάτω δίνεται η αλληλουχία της μιας αλυσίδας ενός τμήματος DNA, η οποία αντιγράφεται ασυνεχώς και εντοπίζεται μέσα σε μια διχάλα αντιγραφής. Στο τμήμα αυτό σχηματίζονται δύο πρωταρχικά τμήματα, που έχουν μήκος πέντε νουκλεοτιδίων το καθένα και ξεκινούν από τα νουκλεοτίδια που επισημαίνονται με έντονα γράμματα στην παρακάτω αλληλουχία, δηλαδή την αδενίνη (A) και τη κυτοσίνη (C), αντίστοιχα.

I ..GAACCTGCGTAACG**A**ACTAATGAGGATTAGCA**C**AATGCGCAA..-OH II

α. Να γράψετε τη συμπληρωματική αλυσίδα DNA που θα σχηματιστεί μετά την ολοκλήρωση της αντιγραφής της παραπάνω αλυσίδας και την αντικατάσταση των πρωταρχικών τμημάτων (μονάδες 3).

β. Να εξηγήσετε σε ποια θέση, στην I ή στη II, βρίσκεται η θέση έναρξης της αντιγραφής (μονάδες 4).

γ. Να γράψετε τα πρωταρχικά τμήματα (με τις κατευθύνσεις τους) που θα σχηματιστούν (μονάδες 4) και να ονομάσετε το ένζυμο που εμπλέκεται στο σχηματισμό τους (μονάδες 2).

Μονάδες 13

νέο φροντιστήριο

4.1

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

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

β. Η περιοριστική ενδονουκλεάση που πρέπει να χρησιμοποιήσουν είναι η BamHI. Η BamHI κόβει μια φορά το πλασμίδιο εσωτερικά του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλλίνη, ενώ παραμένει άθικτο το άλλο γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, κάτι που θα βοηθήσει τους ερευνητές κατά τη διαδικασία επιλογής των βακτηριακών κλώνων. Απορρίπτεται η HindIII, επειδή κόβει το πλασμίδιο σε δύο σημεία και η EcoRI γιατί κόβει στη θέση έναρξης της αντιγραφής, άρα θα χαθεί η δυνατότητα αντιγραφής του πλασμιδίου στα βακτήρια, και συνεπώς, η κλωνοποίηση του γονιδίου.

4.2

α. Σε μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα, πάντα το τελευταίο της νουκλεοτίδιο έχει ελεύθερο το υδροξύλιο του 3΄ άνθρακα της πεντόζης του. Άρα, η κατεύθυνση της

μητρικής αλυσίδας είναι I- 5΄-> 3΄ -II. Η αλυσίδα DNA που θα σχηματιστεί μετά την ολοκλήρωση της αντιγραφής θα είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη της αλυσίδας που αντιγράφεται με ασυνεχή τρόπο και θα έχει την εξής αλληλουχία:

3΄ ..CTTGGACGCATTGCTTGATTACTCCTAATCGTGTTACGCGTT...5΄.

β. Η αντιγραφή γίνεται με προσανατολισμό 5΄->3΄. Τα κομμάτια της ασυνεχούς αλυσίδας θα έχουν τον παρακάτω προσανατολισμό:

3΄ ← 5΄ 3΄ ← 5΄

5΄.. GAACCTGCGTAACG**A**ACTAATGAGGATTAGCA**C**AATGCGCAA..-3΄

Το 1ο πρωταρχικό τμήμα είναι αυτό που βρίσκεται πλησιέστερα στη θέση έναρξης της αντιγραφής, άρα η θέση έναρξης της αντιγραφής είναι η I.

γ. Στη συγκεκριμένη αλυσίδα, τα πρωταρχικά τμήματα ξεκινούν να σχηματίζονται στις θέσεις που δόθηκαν με έντονα γράμματα από την εκφώνηση και θα έχουν μήκος πέντε νουκλεοτιδίων.

3΄ ← 5΄ 3΄ ← 5΄

5΄.. GAACCTGCGT**AACGA**ACTAATGAGGATT**AGCAC**AATGCGCAA..-3΄

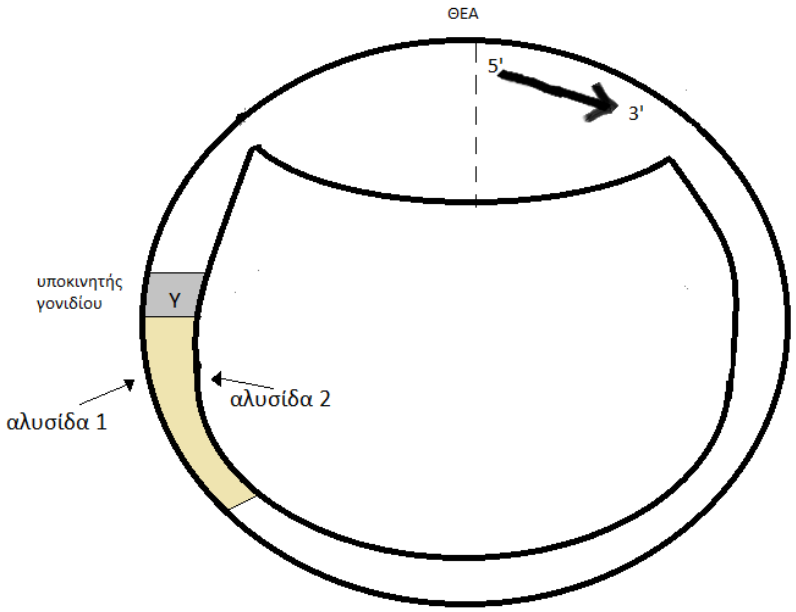
Επειδή είναι συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα ως προς τη μητρική αλυσίδα του DNA, και αποτελούνται από ριβονουκλεοτίδια, θα έχουν τις εξής αλληλουχίες βάσεων: 5΄-UCGUU- 3΄ και 5΄-GUGCU- 3΄.

Το ένζυμο που συνθέτει τα πρωταρχικά τμήματα κατά τη διαδικασία της αντιγραφής είναι το πριμόσωμα.

ΑΠΑΝΤΗΣΗ
νέο φροντιστήριο

ΘΕΜΑ 4

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

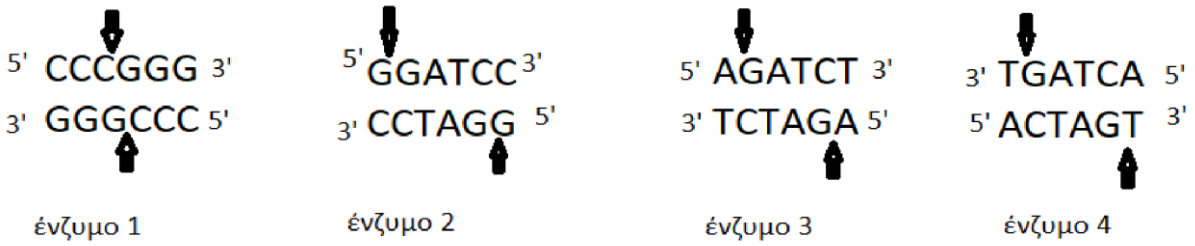


α. Να μεταφέρεται την εικόνα του πλασμιδίου στο τετράδιο σας και να συμπληρώσετε τη θηλιά της αντιγραφής με τμήματα DNA (τα τμήματα συμβολίζονται με βέλη) μέχρι να ολοκληρωθεί η λειτουργία της DNA πολυμεράσης σε όλο το πλασμίδιο (μονάδες 4). Να ονομάσετε το ένζυμο που θα ενώσει στη συνέχεια τα ασυνεχή τμήματα DNA που σχηματίστηκαν (μονάδες 2).

β. Να εξηγήσετε ποια αλυσίδα (αλυσίδα 1 ή 2) είναι η κωδική και ποια αλυσίδα είναι η μεταγραφόμενη του σχεδιασμένου γονιδίου, αφού υποδείξετε τον προσανατολισμό των δύο αλυσίδων του (μονάδες 6).

Μονάδες 12

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 ενδονουκλέαση.



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).

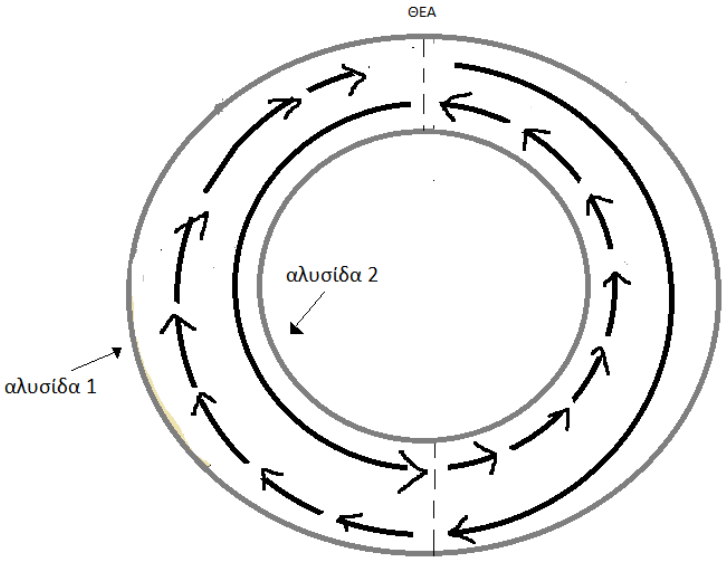
β. Για τον ανασυνδυασμό ενός πλασμιδίου, κόβουμε με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, τόσο το επιθυμητό τμήμα, όσο και το πλασμίδιο, αλλά μπορούμε να κόψουμε και με δύο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες υπό κατάλληλη προϋπόθεση. Να εξηγήσετε αν μπορούμε να δημιουργήσουμε ανασυνδυασμένα πλασμίδια,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

Μονάδες 13

νέο φροντιστήριο

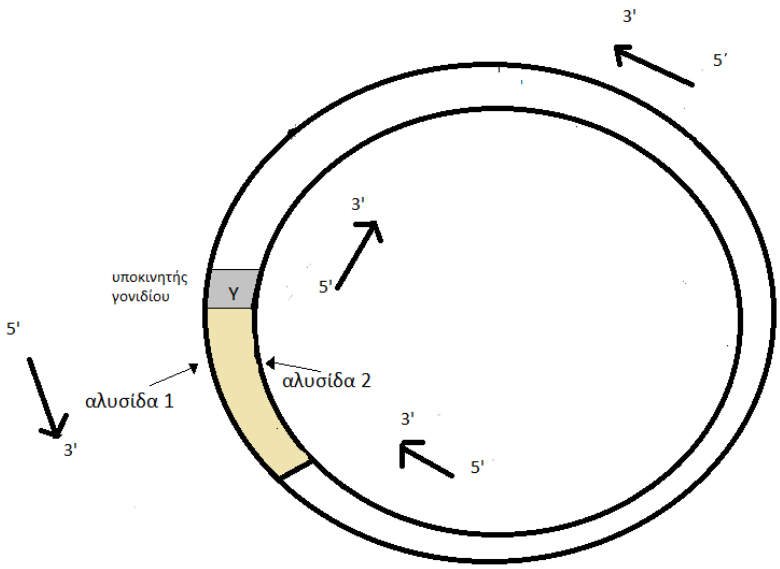
4.1

α.



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

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



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

4.2

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

ένζυμο 2	ένζυμο 3	ένζυμο 4
5' G 3' 5' GATCC 3' 3' CCTAG 5' 3' G 5'	5' A 3' 5' GATCT 3' 3' TCTAG 5' 3' A 5'	3' T 5' 3' GATCA 5' 5' ACTAG 3' 5' T 3'

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

νέο φροντιστήριο

ΘΕΜΑ 4

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

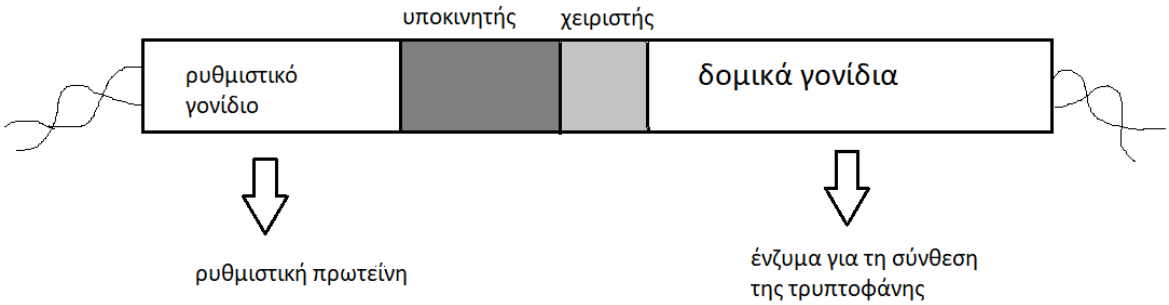
α. Να εξηγήσετε ποιο μόριο από τα τρία που απεικονίζονται είναι εκείνο που απομονώθηκε (μονάδες 2) και στη συνέχεια να εξηγήσετε τη διαδικασία και να ονομάσετε τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό των άλλων δύο (μονάδες 4).

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

Μονάδες 12

4.2 Το οπερόνιο της τρυπτοφάνης (αμινοξύ), όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, είναι ένα οπερόνιο με αντίστοιχη δομή με τη δομή του οπερονίου της λακτόζης, όμως έχει ως στόχο τη ρύθμιση της σύνθεσης της τρυπτοφάνης, όταν το συγκεκριμένο αμινοξύ απουσιάζει από το θρεπτικό υλικό των βακτηρίων.

νεο φροντιστηριο



α. Να γράψετε τον ορισμό του οπερονίου (μονάδες 3) και να περιγράψετε τα τμήματα από τα οποία αποτελείται το οπερόνιο της λακτόζης (μονάδες 3).

β. Στο οπερόνιο της τρυπτοφάνης η ίδια η τρυπτοφάνη, όταν υπάρχει στο θρεπτικό υλικό του βακτηρίου, συνδέεται με μία ρυθμιστική πρωτεΐνη και της επιτρέπει να συνδεθεί στο χειριστή για να καταστείλει το οπερόνιο. Να συγκρίνετε αυτό το μηχανισμό καταστολής με εκείνο του οπερονίου της λακτόζης (μονάδες 7).

Μονάδες 13

νέο φροντιστήριο

4.1

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

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

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

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

4.2

α. Στο γονιδίωμα των προκαρυωτικών οργανισμών τα γονίδια των ενζύμων που παίρνουν μέρος σε μια μεταβολική οδό, όπως η διάσπαση της λακτόζης ή η βιοσύνθεση διάφορων αμινοξέων, οργανώνονται σε οπερόνια, δηλαδή σε ομάδες γονιδίων που υπόκεινται σε κοινό έλεγχο της έκφρασής τους. Σε αυτά περιλαμβάνονται εκτός από αυτά τα γονίδια, που ονομάζονται δομικά, και αλληλουχίες DNA που ρυθμίζουν τη μεταγραφή τους. Οι αλληλουχίες αυτές που βρίσκονται μπροστά από τα δομικά γονίδια είναι κατά σειρά ένα ρυθμιστικό γονίδιο, ο υποκινητής και ο χειριστής

β. Στο οπερόνιο της λακτόζης υπάρχει μια ρυθμιστική πρωτεΐνη-καταστολέας. Όταν απουσιάζει η λακτόζη ο καταστολέας προσδένεται ισχυρά στο χειριστή και εμποδίζει την RNA πολυμεράση να αρχίσει τη μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου. (Ο καταστολέας κωδικοποιείται από ένα ρυθμιστικό γονίδιο, που βρίσκεται μπροστά από τον υποκινητή.) Το ρυθμιστικό γονίδιο μεταγράφεται συνεχώς και παράγει λίγα μόρια του καταστολέα. Τα μόρια αυτά προσδένονται συνεχώς στο χειριστή. Όταν στο θρεπτικό υλικό υπάρχει μόνο λακτόζη, τότε ο ίδιος ο δισακχαρίτης προσδένεται στον καταστολέα και δεν του επιτρέπει να προσδεθεί στο χειριστή.

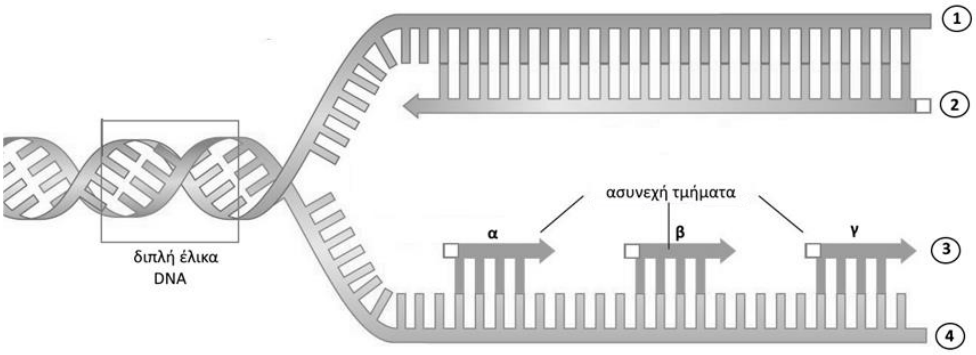
Αντίθετα, στο οπερόνιο της τρυπτοφάνης, όταν στο θρεπτικό υλικό υπάρχει τρυπτοφάνη, δεν χρειάζεται να παράγεται αυτό το αμινοξύ. Συνεπώς το ίδιο αυτό αμινοξύ συνδέεται με την αντίστοιχη ρυθμιστική πρωτεΐνη καταστολέα και της επιτρέπει τη σύνδεση στο χειριστή. Με αυτό τον τρόπο το οπερόνιο είναι σε καταστολή και δεν συντίθεται τρυπτοφάνη.

νέο φροντιστήριο

ΘΕΜΑ 4

4.1 Η αντιγραφή του DNA, όπως προτάθηκε από τους Watson και Crick το 1953, και αποδείχτηκε πειραματικά το 1958, γίνεται με τον ημισυντηρητικό μηχανισμό. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της αντιγραφής σε μία διχάλα αντιγραφής, η σύνθεση του DNA είναι συνεχής στη μια αλυσίδα και ασυνεχής στην άλλη, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

α. Να εξηγήσετε γιατί σε κάθε θηλιά αντιγραφής η μία αλυσίδα αντιγράφεται τόσο με συνεχή όσο και με ασυνεχή τρόπο (μονάδες 6).



β. Να αντιστοιχίσετε, αιτιολογώντας την απάντησή σας, στις θέσεις 1, 2, 3 και 4 της παραπάνω εικόνας τα 5΄ και 3΄ άκρα των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (μονάδες 4) και να εξηγήσετε ποιο από τα ασυνεχή τμήματα α, β ή γ συντέθηκε πρώτο (μονάδες 2).

Μονάδες 12

4.2 Η περιοριστική ενδονουκλεάση *Eco*RI, 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 *Eco*RI (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 *Eco*RI αναγνωρίζει και κόβει συνολικά 1.000 θέσεις

νεο φροντιστηριο

να υπολογίσετε, αιτιολογώντας την απάντησή σας, τα τμήματα που θα προκύψουν μετά τη δράση της *Eco*RI (μονάδες 7).

Μονάδες 13

νέο φροντιστήριο

4.1

α. Οι DNA πολυμεράσες λειτουργούν μόνο προς καθορισμένη κατεύθυνση και τοποθετούν τα νουκλεοτίδια στο ελεύθερο 3' άκρο της δεοξυριβόζης του τελευταίου νουκλεοτιδίου κάθε αναπτυσσόμενης αλυσίδας. Έτσι, λέμε ότι αντιγραφή γίνεται με προσανατολισμό 5' προς 3'. Κάθε νεοσυντιθέμενη αλυσίδα θα έχει προσανατολισμό 5'→3'. Έτσι, σε κάθε διπλή έλικα που παράγεται οι δύο αλυσίδες θα είναι αντιπαράλληλες. Παράλληλα, καθώς προχωρά η αντιγραφή σε κάθε διχάλα, πρέπει να τοποθετούνται νέα νουκλεοτίδια απέναντι από τις μητρικές αλυσίδες σχεδόν ταυτόχρονα. Για να ακολουθηθεί αυτός ο κανόνας σε κάθε τμήμα DNA που γίνεται η αντιγραφή, η σύνθεση του DNA είναι συνεχής στη μια αλυσίδα και ασυνεχής στην άλλη κάθε διχάλας. Άρα σε επίπεδο θηλιάς, το ένα ήμισυ κάθε αλυσίδας αντιγράφεται συνεχώς και το άλλο ασυνεχώς.

β. Επειδή η σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων γίνεται πάντοτε με κατεύθυνση 5΄ → 3΄, ενώ οι θυγατρικές και οι μητρικές αλυσίδες είναι μεταξύ τους αντιπαράλληλες, τα σημεία 1 και 3 αντιστοιχούν στα 3΄ άκρα, ενώ τα σημεία 2 και 4 στα 5΄άκρα.

Από τα τρία ασυνεχή τμήματα α, β και γ, αυτό που συντέθηκε πρώτο είναι αυτό που βρίσκεται πιο κοντά στη θέση έναρξης της αντιγραφής, η οποία βρίσκεται στα δεξιά του σχήματος. Επομένως από τα τρία ασυνεχή τμήματα που φαίνονται στο σχήμα, το τμήμα που συντέθηκε πρώτο είναι το γ.

4.2

α. Η *Eco*RI απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*. Το ένζυμο αυτό όποτε συναντά την αλληλουχία: 5΄- G *A A T T C - 3΄

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

β. Στο τέλος της μεσόφασης, τα 46 χρωμοσώματα που υπάρχουν στο ανθρώπινο κύτταρο είναι διπλασιασμένα, οπότε η *Eco*RI κόβει 92 μόρια γραμμικού DNA. Επομένως, αν $ν_1$, $ν_2$, $ν_3$, …., $ν_{92}$ ο αριθμός των θέσεων που αναγνωρίζει και κόβει η *Eco*RI σε κάθε γραμμικό μόριο, θα ισχύει $ν_1 + ν_2 + ν_3 + ... + ν_{92} = 1000$. Σε κάθε γραμμικό μόριο DNA που κόβεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση, τα τμήματα που δημιουργούνται είναι κατά 1 περισσότερα από τις θέσεις αναγνώρισης, για κάθε

μόριο DNA, και επομένως στην περίπτωση του προβλήματος θα είναι: $\nu_1 + 1 + \nu_2 + 1 + \nu_3 + 1 + \ldots + \nu_{92} + 1 = 1000 + 92 = 1092$. Επομένως, τα τμήματα που θα προκύψουν θα είναι 1092.

νέο φροντιστήριο

ΘΕΜΑ 4

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 Α και Α (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

4.2 Το γονιδίωμα των σωματικών κυττάρων του γορίλα (είδος *Gorilla gorilla),* ο οποίος είναι το μεγαλύτερο από όλα τα πρωτεύοντα που ζουν σήμερα, κατανέμεται σε 48 χρωμοσώματα, ενώ ο καθορισμός του φύλου γίνεται όπως και στον άνθρωπο.

νεο φροντιστηριο

α. Να υπολογίσετε τον αριθμό μορίων DNA (μονάδες 3) και τον αριθμό των βραχιόνων των συνολικών χρωμοσωμάτων (μονάδες 4) που θα υπάρχουν στον καρυότυπο του γορίλα, αιτιολογώντας την απάντησή σας.

β. Να προσδιορίσετε τον αριθμό και το είδος των χρωμοσωμάτων, καθώς και το συνολικό αριθμό μορίων DNA, που θα υπάρχουν σε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα της 1ης μειωτικής διαίρεσης ενός άωρου γεννητικού κυττάρου αρσενικού γορίλα (μονάδες 3), καθώς και σε έναν από τους γαμέτες που θα προκύψουν στο τέλος της 2ης μειωτικής διαίρεσης (μονάδες 3).

Μονάδες 13

νέο φροντιστήριο

4.1

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

3′	T	T	C	G	A	*A	5′
5′	A*	A	G	C	T	T	3′

β. Οι ερευνητές θα πρέπει να χρησιμοποιήσουν γονιδιωματική βιβλιοθήκη, η οποία περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού δότη και κατ' επέκταση τους υποκινητές των γονιδίων ή τμήματα αυτών. Μία πιθανή αλληλουχία RNA που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής είναι: 5′UCUAUUACGA3′, η οποία είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη με την πάνω αλυσίδα του τμήματος που έχει δοθεί. (Εναλλακτικά: 3′GAAGAUAAUG5′, η οποία είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη με την κάτω αλυσίδα).

5′ U C U A U U A C G A 3′
3′ T T C G A A G A T A A T G C T T C G A A 5′
5′ A A G C T T C T A T T A C G A A G C T T 3′
3′ G A A G A U A A U G 5′

4.2

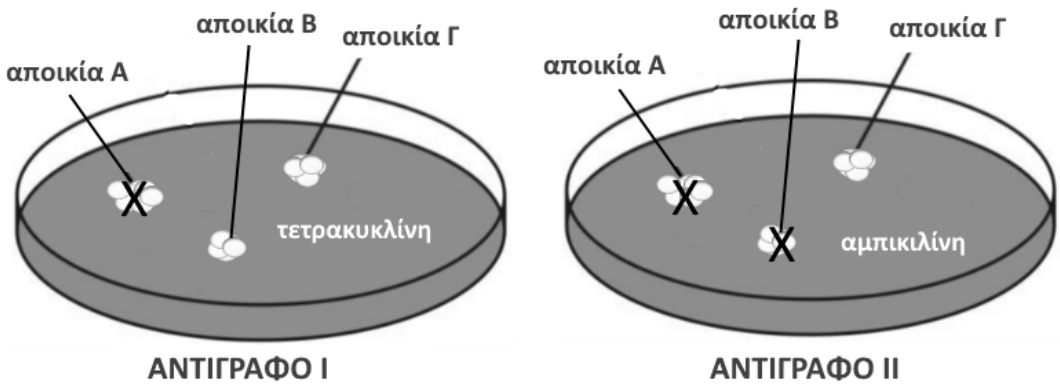
α. Ο καρυότυπος είναι η απεικόνιση των ομολόγων μεταφασικών χρωμοσωμάτων ενός οργανισμού, κατά ζεύγη και κατά ελαττούμενο μέγεθος. Στον καρυότυπο του γορίλα θα υπάρχουν 48 διπλασιασμένα χρωμοσώματα και επομένως 96 μόρια DNA. Επειδή το κεντρομερίδιο «διαιρεί» κάθε χρωματίδα σε 2 βραχίονες (δηλ. κάθε διπλασιασμένο χρωμόσωμα σε τέσσερις βραχίονες) θα υπάρχουν 96 x 2 = 192 βραχίονες.

β. Σε κάθε θυγατρικό κύτταρο της 1ης μειωτικής διαίρεσης θα υπάρχει ο μισός αριθμός χρωμοσωμάτων, δηλαδή 24 χρωμοσώματα, τα οποία θα είναι διπλασιασμένα. Από αυτά, τα 23 θα είναι αυτοσωμικά και ένα φυλετικό χρωμόσωμα που μπορεί να είναι είτε το Χ είτε το Υ και θα υπάρχουν συνολικά 48 μόρια DNA. Στον γαμέτη θα υπάρχουν 24 μόρια DNA με μορφή ινιδίων χρωματίνης από τα οποία τα 23 θα είναι αυτοσωμικά και το ένα φυλετικό (Χ ή Υ).

ΑΠΑΝΤΗΣΗ
νέο φροντιστήριο

ΘΕΜΑ 4

4.1 Για την κλωνοποίηση ενός γονιδίου ποντικού, ερευνητές χρησιμοποίησαν την περιοριστική ενδονουκλεάση Ε1, 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 Ε1 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 καλλιεργειών μεταφεροντας 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 Ι, που περιείχε το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, τα βακτήρια Α δεν ανέπτυξαν αποικία, ενώ στο αντίγραφο ΙΙ, 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 Ε1, 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 καλλιεργειών (μονάδες 2).

Μονάδες 12

4.2 Τμήμα της κωδικής αλυσίδας ενός βακτηριακού γονιδίου, που περιλαμβάνει τα 6 τελευταία κωδικόνια μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται και το κωδικόνιο για την αλανίνη, έχει την παρακάτω αλληλουχία:

5΄ … TGAACGGAGCCTACCCATAGG … 3΄

α. Να γράψετε τα 6 κωδικόνια που περιλαμβάνονται στην παραπάνω αλληλουχία της κωδικής αλυσίδας του βακτηριακού γονιδίου (μονάδες 6).

β. Όταν σπάζει ο δεσμός που συνδέει την αλανίνη με το tRNA που τη μετέφερε, να εξηγήσετε με ποιο αμινοξύ συνδέεται η αλανίνη (μονάδα 1) και μέσω ποιων χημικών ομάδων του κάθε αμινοξέος γίνεται η σύνδεσή τους (μονάδες 2).

γ. Κατά τη διαδικασία της μετάφρασης του βακτηριακού γονιδίου, να εξηγήσετε ποιο είναι το αντικωδικόνιο του tRNA που θα προσδεθεί στο ριβόσωμα, όταν το tRNA που μεταφέρει την αλανίνη εγκαταλείψει το ριβόσωμα (μονάδες 4).

Μονάδες 13

Πρώτο γράμμα	Δεύτερο γράμμα: U	C	A	G	Τρίτο γράμμα
U	UUU, UUC φαινυλαλανίνη (phe); UUA, UUG λευκίνη (leu)	UCU, UCC, UCA, UCG σερίνη (ser)	UAU, UAC τυροσίνη (tyr); UAA, UAG λήξη	UGU, UGC κυστεΐνη (cys); UGA λήξη; UGG τρυπτοφάνη (trp)	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG λευκίνη (leu)	CCU, CCC, CCA, CCG προλίνη (pro)	CAU, CAC ιστιδίνη (his); CAA, CAG γλουταμίνη (gln)	CGU, CGC, CGA, CGG αργινίνη (arg)	U C A G
A	AUU, AUC, AUA ισολευκίνη (ile); AUG μεθειονίνη (met) έναρξη	ACU, ACC, ACA, ACG θρεονίνη (thr)	AAU, AAC ασπαραγίνη (asn); AAA, AAG λυσίνη (lys)	AGU, AGC σερίνη (ser); AGA, AGG αργινίνη (arg)	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG βαλίνη (val)	GCU, GCC, GCA, GCG αλανίνη (ala)	GAU, GAC ασπαρτικό οξύ (asp); GAA, GAG γλουταμινικό οξύ (glu)	GGU, GGC, GGA, GGG γλυκίνη (gly)	U C A G

4.1

α. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, την Ε1, προκειμένου τόσο το τμήμα DNA με το συνεχές γονίδιο του ποντικού, όσο και το πλασμίδιο, το οποίο έχει γίνει γραμμικό μετά τη δράση της Ε1, να έχουν ίδια συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα, ώστε όταν αναμειχθούν να διευκολυνθεί ο ανασυνδυασμός τους. Για τη σύνδεση πλασμιδίων - γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο DNA δεσμάση, το οποίο ενώνει τμήματα DNA μεταξύ τους με 3΄- 5΄ φωσφοδιεστερικό δεσμό.

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

4.2

α. Διαβάζουμε με βήμα τριπλέτας την κωδική αλυσίδα, με όλα τα πιθανά πλαίσια ανάγνωσης, δηλαδή ξεκινώντας από το πρώτο νουκλεοτίδιο, με βάση Τ, μετά από το 2ο με βάση G και στη συνέχεια από το 3ο νουκλεοτίδιο με βάση Α. Το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης είναι το 3ο γιατί με το 1ο δημιουργείται αμέσως κωδικόνιο λήξης 5΄ TGA 3΄, ενώ το 2ο πλαίσιο ανάγνωσης δεν περιέχει κωδικόνιο λήξης στην 6η θέση, ούτε το σωστό κωδικόνιο 5΄ GCC 3΄ της αλανίνης. Συνεπώς, τα 6 κωδικόνια της κωδικής αλυσίδας είναι τα: 5΄ AAC, GGA, GCC, TAC, CCA 3΄ και το κωδικόνιο λήξης 5΄ TAG 3΄.

β. Πριν το tRNA που μεταφέρει την αλανίνη εγκαταλείψει την πρώτη θέση εισδοχής του ριβοσώματος, στη δεύτερη θέση εισδοχής στο ριβόσωμα έχει προσδεθεί το επόμενο tRNA με αντικωδικόνιο συμπληρωματικό του κωδικονίου 5΄ UAC 3΄ που

μεταφέρει το αμινοξύ τυροσίνη. Έτσι, δημιουργείται πεπτιδικός δεσμός μεταξύ της καρβοξυλομάδας (-COOH) της αλανίνης και της αμινομάδας (-NH_2) της τυροσίνης.

γ. Όταν το tRNA της αλανίνης εγκαταλείπει το ριβόσωμα, το ριβόσωμα μετακινείται προς το 3΄ άκρο του mRNA. Έτσι, το tRNA που είναι συνδεδεμένο με την τυροσίνη και μέσω αυτής με την ήδη αναπτυσσόμενη πεπτιδική αλυσίδα, μετακινείται από την δεύτερη θέση εισδοχής στην πρώτη, αφήνοντας τη δεύτερη θέση ελεύθερη για να προσδεθεί το επόμενο tRNA με αντικωδικόνιο συμπληρωματικό και αντιπαράλληλο με το κωδικόνιο 5΄ CCA 3΄, δηλαδή το 3΄ GGU 5΄, που μεταφέρει το αμινοξύ προλίνη.

ΑΠΑΝΤΗΣΗ
νέο φροντιστήριο