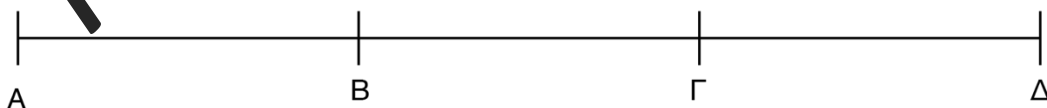


ΔΙΑΓΩΝΙΣΜΑ  
4ο BLOG (2)

ΖΗΤΗΜΑ Α

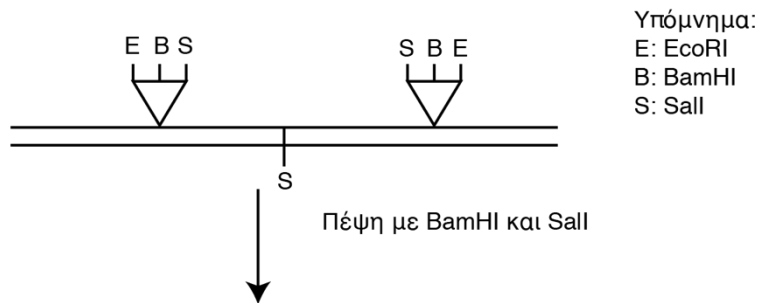
ΜΟΝΑΔΕΣ 25

1. Το γονιδίωμα του ζυμομύκητα *S. cerevisiae* έχει μέγεθος  $12 \times 10^6$  ζ.β. Εάν τα θραύσματα που προκύπτουν από την πέψη του με την *EcoRI* είναι της τάξεως 100-200 χιλιάδων ζ.β., τότε από πόσους κλώνους θα αποτελείται η βιβλιοθήκη του;  
α. περίπου 60-120  
β. περίπου 20-60  
γ. περίπου 700-1300  
δ. περίπου 220-350.
2. Η αντίστροφη μεταγραφάση *in vivo*:  
α. δεν χρειάζεται 3'-OH άκρο για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό του cDNA  
β. χρειάζεται 3'-OH άκρο για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό. Αυτό το OH- προσφέρεται από ένα μόριο tRNA  
γ. χρειάζεται 5'-PO<sub>3</sub> άκρο για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό. Αυτό προσφέρεται από ένα DNA πρωταρχικό τμήμα που προστίθεται *in vitro*  
δ. είναι ένα ιικό ένζυμο που λειτουργεί, είτε υπάρχει είτε όχι πρωταρχικό τμήμα με 3' ή 5' ελεύθερο άκρο.
3. Το κεντρομερίδιο και τα άκρα των χρωμοσωμάτων είναι περιοχές του DNA, που:  
α. δεν αντιπροσωπεύονται σε καμία βιβλιοθήκη ούτε ενισχύονται με PCR  
β. δεν αντιπροσωπεύονται στην cDNA βιβλιοθήκη αλλά ενισχύονται με PCR  
γ. αντιπροσωπεύονται μονάχα στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη  
δ. αντιπροσωπεύονται σε κάθε βιβλιοθήκη αλλά και στα προϊόντα του PCR.
4. Στη μοριακή Βιολογία χρησιμοποιείται ο όρος πλήρης ή ολική πέψη του γονιδιώματος και ο όρος μερική πέψη. Στην μερική πέψη, αναφερόμαστε μόνο όταν ένα ποσοστό των μορίων του DNA έχει κοπεί. Αυτό μπορεί να γίνει εφικτό, όταν έχει γίνει προσθήκη μικρής ποσότητας περιοριστικών ενζύμων, σε σχέση με το πλήθος των μορίων DNA, που πρόκειται να κοπεί. Δίνεται το μόριο DNA:



- α. κατά την ολική πέψη θα προκύψουν 3 θραύσματα ενώ κατά την μερική 6
- β. κατά την ολική πέψη θα προκύψουν 2 θραύσματα ενώ κατά την μερική 7
- γ. κατά την ολική πέψη θα προκύψει 1 θραύσμα ενώ κατά την μερική 8
- δ. κατά την ολική πέψη θα προκύψουν 3 θραύσματα ενώ κατά την μερική 7.

5. Δίνεται το γονιδίωμα του φάγου λEMBL4, που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης για τη δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.



- Προκύπτουν:  
 α. 5 θραύσματα  
 β. 6 θραύσματα  
 γ. 7 θραύσματα  
 δ. 2 θραύσματα.

## ΖΗΤΗΜΑ Β

ΜΟΝΑΔΕΣ 25

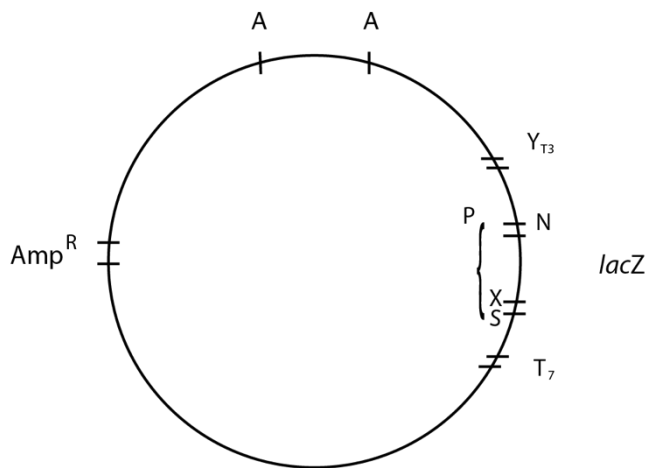
- Εξηγήστε τη διαφορά μεταξύ ενός ανιχνευτή και ενός τεχνητού ολιγονουκλεοτιδίου που λειτουργεί ως εκκινητική αλληλουχία στο PCR.  
Μονάδες 6
- Τοποθετήστε τις παρακάτω προτάσεις στη σωστή σειρά ώστε να παράγεται λειτουργική ανθρώπινη ιντερφερόνη από cDNA βιβλιοθήκη λ-φάγου (λZAPII). Στο γονιδίωμα του λ-φάγου αυτού έχει ενθεθεί το πλασμίδιο φορέας κλωνοποίησης pBluescript, χωρίς να έχουν απομακρυνθεί τα γονίδια του λυσιγόνου κύκλου ζωής του φάγου.  
Το πλασμίδιο αυτό έχει τις εξής αλληλουχίες:

A A

Όπου P-Polylinker με θέσεις περιορισμού SacI, NotI, XbaI, SphI, EcoRI, XhoI

Η σειρά τους δεικνύει τη σειρά των περιοριστικών θέσεων του πλασμιδίου από πάνω προς τα κάτω.

Ο Υ<sub>T3</sub> και Υ<sub>T7</sub> είναι Υποκινητές ισχυροί διότι είναι ιικοί.



Το γονιδίωμα του φάγου είναι:



1. Επιλογή βακτηριακών αποικιών ανθεκτικών σε Amp και άχρωμες.
2. Ενζυμική *in vitro* μετα-μεταφραστική προετοιμασία της προϊνσουλίνης.
3. Παραγωγή από τα βακτήρια της προϊνσουλίνης.
4. Ανασυνδυασμός με δεσμάση του γονιδιώματος του ανασυνδυασμένου λ-φάγου με το ετερόλογο ds-cDNA.
5. Δημιουργία χιμαιρικού ιικού DNA με τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης.
6. Μόλυνση βακτηριακής εστίας καλλιέργειας και εν συνεχεία επίστρωση της σε τρυβλία για στερεή καλλιέργεια.
7. Καλλιέργεια βακτηρίων που παράγουν προϊνσουλίνη σε βιομηχανικό επίπεδο.
8. Δημιουργία cDNA προϊνσουλίνης με αντίστροφη μεταγραφή από παγκρεατικά κύτταρα.
9. Ανάπτυξη cDNA βιβλιοθήκης ανθρώπινης ινσουλίνης σε ιικό DNA σε βακτήρια.
10. Απομόνωση ολικού ώριμου mRNA από παγκρεατικά κύτταρα.

Μονάδες 10

3. Εξηγήστε ποια είναι η χρησιμότητα της παραμονής των γονιδίων του λυσιγόνου κύκλου ζωής του φάγου στο γονιδίωμά του.

Μονάδες 4

Εξηγήστε για ποιο λόγο το ds-cDNA της ινσουλίνης εκφράζεται με οποιοδήποτε τρόπο και αν ενθεθεί στον Polylinker του pBluescript στο ιικό γονιδίωμα.

Μονάδες 5

**ΖΗΤΗΜΑ Γ****ΜΟΝΑΔΕΣ 25**

1. Δίνονται τα παρακάτω τμήματα μερικής πέψης ενός ιικού γονιδιώματος που είναι με μορφή dsDNA.  
AC=28 kbp, AD=25 kbp, BC=20 kbp και BD=33 kbp  
όπου kbp=χιλιάδες ζεύγη βάσεων. Να σχεδιαστεί ο περιοριστικός χάρτης του μορίου.

Μονάδες 8

2. Οι θέσεις περιορισμού της *Bam*HI είναι: 5'G↓GATCC  
CCTAG↓G3'

ενώ η θέση περιορισμού της *Pst*I είναι:5'CTGCA↓G  
G↓ACGTC3'

Για ποιο λόγο το πλασμίδιο φορέας κλωνοποίησης για την cDNA βιβλιοθήκη που φέρει θέση *Pst*I και *Bam*HI είναι κατάλληλο μόνο εφόσον χρησιμοποιηθεί ως θέση ένθεσης του ετερόλογου dsDNA, η *Pst*I;

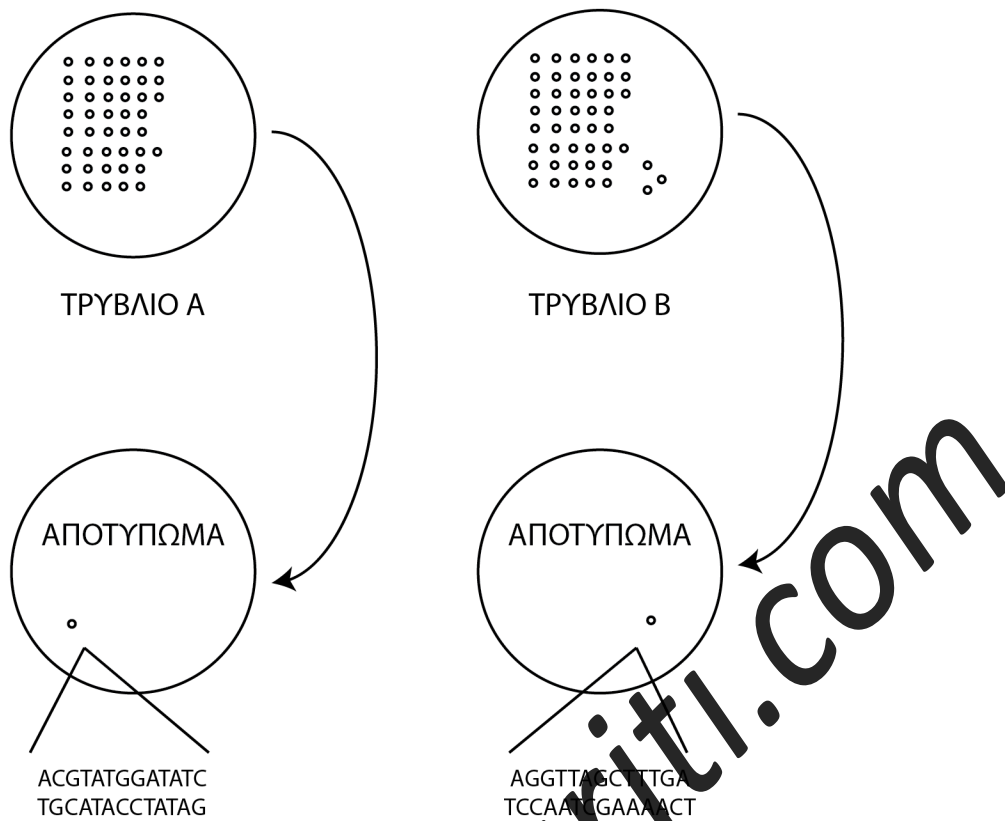
Μονάδες 5

3. Δίνεται ο ανιχνευτής AGCTAAGCATTGA και οι βιβλιοθήκες δύο διαφορετικών ειδών οργανισμών. Ο ανιχνευτής προέρχεται από το είδος φυτού *Solanum tuberosum*. Ποιο από τα δύο φυτά που εξετάζονται είναι το *Solanum lycopersicum* και ποιο το *Lens culinaris*;

Μονάδα 1

Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

Μονάδες 6

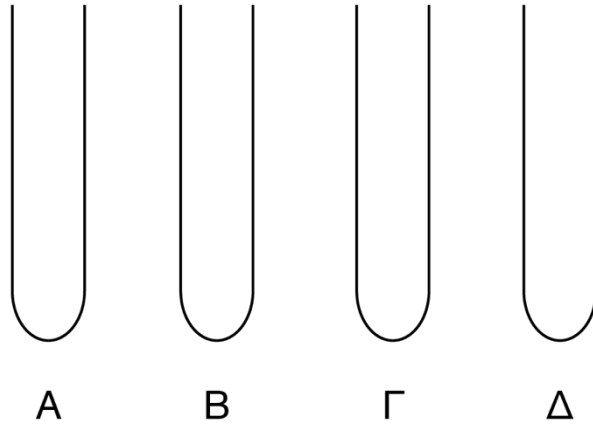


4. Από μία cDNA βιβλιοθήκη ενός ανθρώπου που νοσεί με οικογενή υπερχοληστερολαιμία απομονώθηκε το προς αναζήτηση μόριο ds-cDNA και αφού υπέστη ολική πέψη προσδιορίστηκε η αλληλουχία του ενός κλώνου του, με τον εξής τρόπο.

*Εδώ αναλύουμε την αλληλουχία του πρώτου εξονίου δίχως την 5' αμετάφραστη περιοχή.*

Τρόπος: Μέθοδος χημικής αποικοδόμησης.

Σε 4 διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν μόρια mRNA (ίδια) που απομονώθηκαν από τη βιβλιοθήκη.



Στο σωλήνα Α με ειδικές τεχνικές απομακρύνονται από το μόριο mRNA μόνο οι βάσεις G.

Στο σωλήνα Β αποκόπτονται από το μόριο οι βάσεις Α και G (πυριμίνες).

Στο σωλήνα Γ αποκόπτονται οι πυριμιδίνες Τ, C.

Στο σωλήνα Δ αποκόπτονται μόνο οι βάσεις C.

Στη συνέχεια γίνεται ηλεκτροφόρηση σε γελακουλάκι 10ης και έκθεση σε φιλμ.

Με βάση τα αποτελέσματα της αυτοραδιογραφίας του φιλμ που δίνεται παραπάνω, να βρεθεί η αλληλουχία του ζητούμενου mRNA που απομονώθηκε από τη cDNA βιβλιοθήκη. (3)

	G	A+G	C+T	C
G	G			
	G			
G				
	A	C	C	
		C	C	
		T		
	C	C	C	
G	A			
	G			
		C	C	
		T		
	A			
		T		
		A		
		T		
G	G			
	A			
	A			

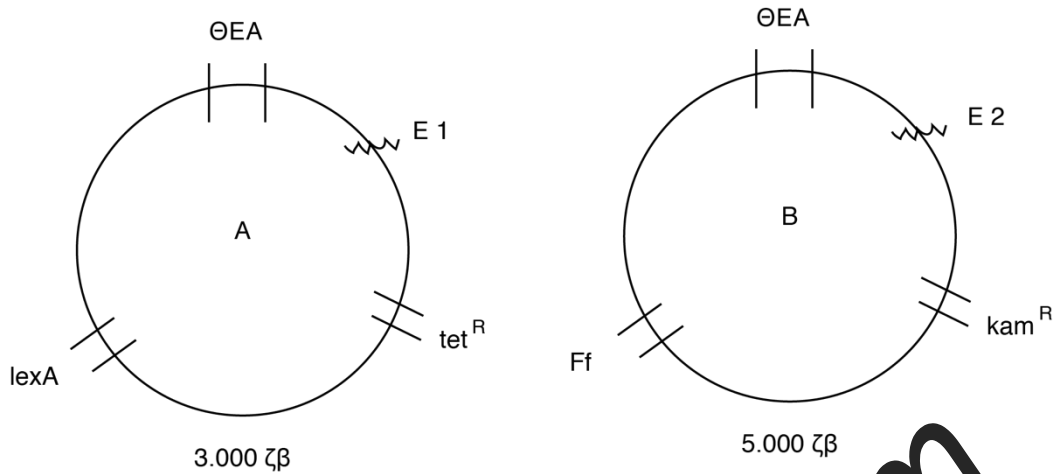
Α      Β      Γ      Δ

5. Εξηγήστε ποιες μεταλλαγές φέρει το τμήμα αυτό που αποτελούν και το λόγο που το άτομο αυτό νοσεί από τη συγκεκριμένη ασθένεια. (2)

#### ΖΗΤΗΜΑ 4

Μονάδες 25

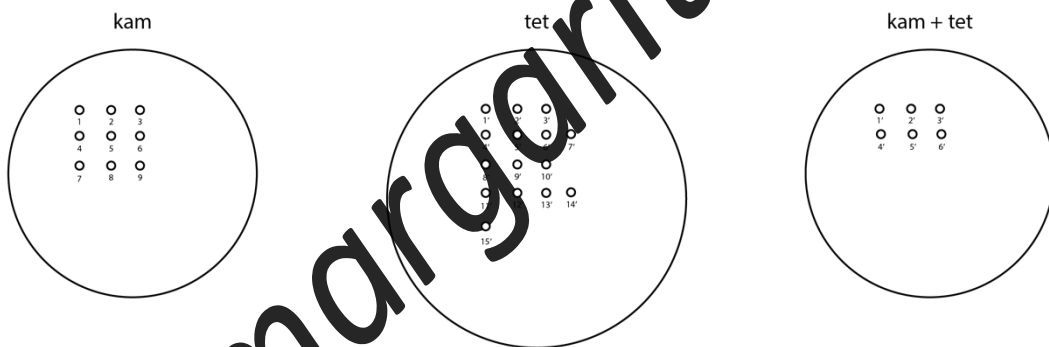
1. Σε δύο διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες βρίσκονται δύο διαφορετικά πλασμίδια.



Και τα δύο πέπτονται από δύο διαφορετικές Π.Ε. που είναι όμως υποσυγκριζομερή, δηλαδή αφήνουν τα ίδια κολλώδη άκρα αλλά αναγνωρίζουν διαφορετικές θέσεις αναγνώρισης.

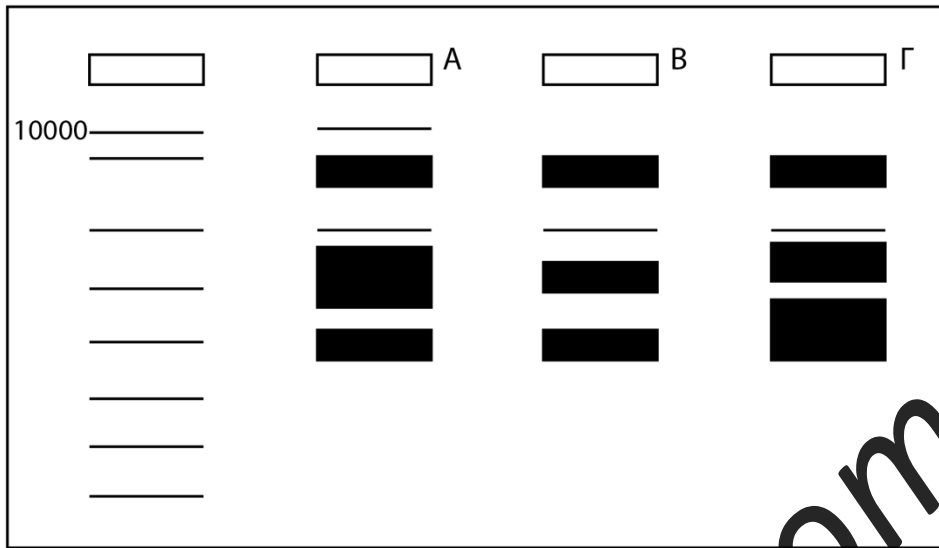
Μετά την πέψη τους αναμιγνύονται τα κομμένα πλασμίδια και επιδρά η DNA δεσμάση.

Ακολουθεί μετασχηματισμός *E.coli* ξενιστών και αναπτυξή τους στα παρακάτω τρυβλία.



Απομονώθηκαν τα πλασμίδια από τα κύτταρα των τρυβλίων και «έτρεξαν» σε gel.

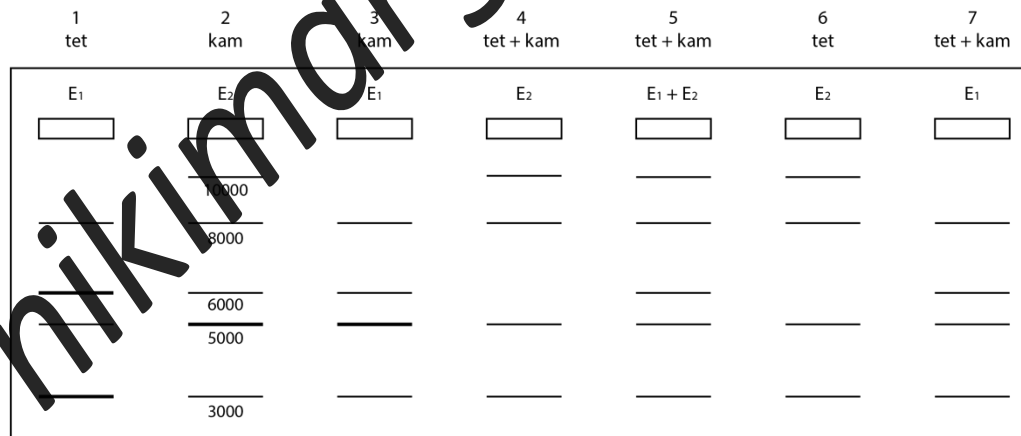




α. Ποιο τρυβλίο αντιστοιχίζεται σε ποιο «πηγαδάκι» του gel, (3)

β. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας. (6)

2. Σε ένα επόμενο στάδιο του πειράματος μετά την απομόνωση των πλασμιδίων από τα κύτταρα των τριών τρυβλίων, ακολούθησε κατεργασία τους με τις Π.Ε. E<sub>I</sub> και E<sub>II</sub>, E<sub>III</sub>, η τελευταία κόβει την χιμαιρική θέση περιορισμού που δημιουργείται από τα κολλώδη άκρα των E<sub>I</sub> και E<sub>II</sub>. Το δείγμα κάθε τρυβλίου κατεργάζεται ξεχωριστά με E<sub>I</sub>, E<sub>II</sub> και E<sub>III</sub>. Κατόπιν προστίθεται DNA δεσμάση. Τα προϊόντα «τρέχουν» εν συνεχεία σε gel.



Ερμηνεύστε την στήλη 5. (6)

4. Ένα τμήμα δίκλωνου DNA μήκους 5.000 ζ.β., που αποτελεί το ενδιάμεσο τμήμα ενός μεγαλύτερου μορίου μήκους 10.000 ζ.β., ενισχύθηκε με PCR. Το ζεύγος των primers που χρησιμοποιήθηκε είχε κάθε μέλος του μήκους 20 νουκλεοτίδια.

Μετά από 4 κύκλους να υπολογιστούν:

- α. Πόσα μόρια από τα ζητούμενα έχουν δημιουργηθεί.
- β. Ποσά νουκλεοτίδια έχει προσθέσει η θερμοαντοχη πολυμεραση.
- γ. Πόσοι είναι όλοι οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί που υπάρχουν μεταξύ των νουκλεοτιδίων σε όλα τα υπάρχοντα μόρια, εξαιρούμενων των ελεύθερων primers.
- δ. Πόσα είναι τα μονόκλωνα νουκλεοτίδια, που δεν είναι όμως ελεύθερα ή ανήκουν σε ελεύθερους primers.
- ε. Η ιδανική θερμοκρασία όπου επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των primers με τα αναδιατεταγμένα μόρια DNA, πως σχετίζεται με το ποσοστό G + C των primers;

(10)

καλή επιτυχία

nikimargariti.com