

ΔΙΑΓΩΝΙΣΜΑ
4ο BLOG (B)

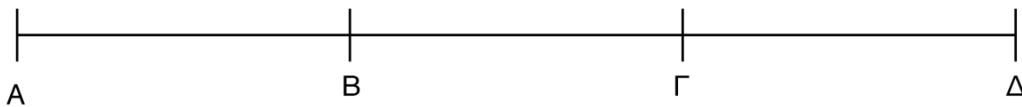
ΖΗΤΗΜΑ Α**ΜΟΝΑΔΕΣ 25**

- 1. Το γονιδίωμα του ζυμομύκητα *S. cerevisiae* έχει μέγεθος 12×10^6 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'-PO₄³⁻ 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.

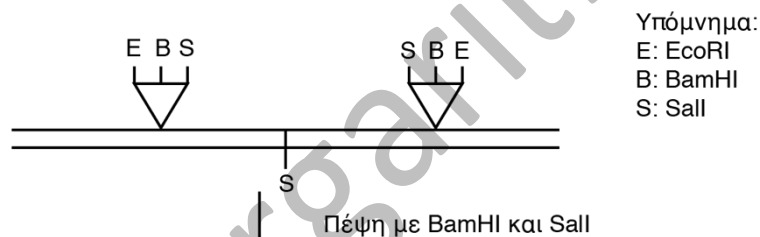
- 3. Το κεντρομερίδιο και τα άκρα των χρωμοσωμάτων, είναι περιοχές του DNA που:**
 - α. δεν αντιπροσωπεύονται σε καμία βιβλιοθήκη ούτε ενισχύονται με PCR
 - β. δεν αντιπροσωπεύονται στην cDNA βιβλιοθήκη αλλά ενισχύονται με PCR
 - γ. κλωνοποιούνται μονάχα στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη
 - δ. αντιπροσωπεύονται 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 διαφορετικά θραύσματα ενώ κατά την μερική 6 διαφορετικά.
- β. κατά την ολική πέψη θα προκύψουν 2 διαφορετικά θραύσματα ενώ κατά την μερική 7 διαφορετικά.
- γ. κατά την ολική πέψη θα προκύψει 1 μόνο θραύσμα ενώ κατά την μερική 8 διαφορετικά.
- δ. κατά την ολική πέψη θα προκύψουν 3 διαφορετικά θραύσματα ενώ κατά την μερική 7 διαφορετικά.

5. Δίνεται το γονιδίωμα του φάγου LEMBL4 (μήκους περίπου 44.000 ζ.β.) που χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης για τη δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.



αν και το σχήμα δεν είναι υπό κλίμακα, θεωρούμε ότι οι πιο κοντινές θέσεις από αυτές που παρουσιάζονται είναι παρατηρήσιμες σε πήκτωμα αγαρόζης.

Προκύπτουν:

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

ΖΗΤΗΜΑ Β

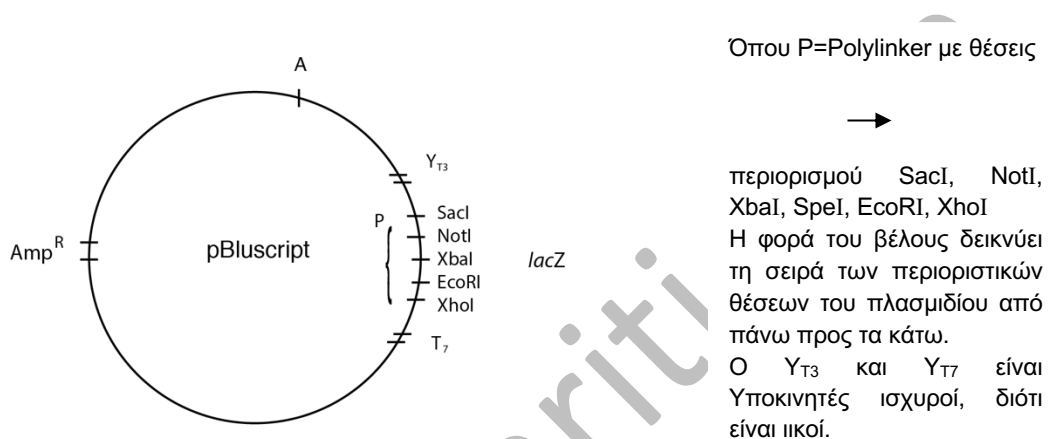
ΜΟΝΑΔΕΣ 25

1. Εξηγήστε τη διαφορά μεταξύ ενός ανιχνευτή και ενός τεχνητού ολιγονουκλεοτιδίου, που λειτουργεί ως εκκινητική αλληλουχία στο PCR.

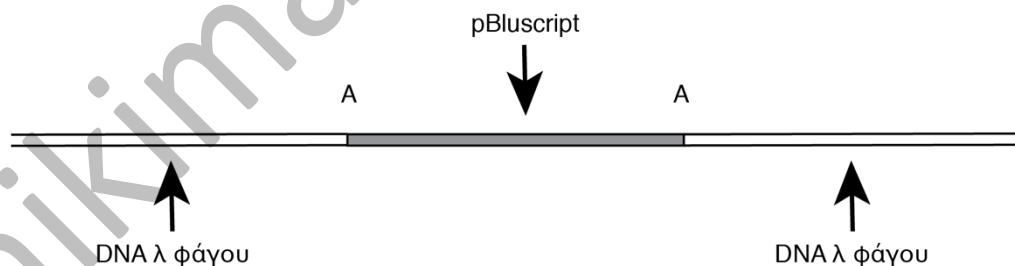
Μονάδες 6

2. Τοποθετήστε τις παρακάτω προτάσεις στη σωστή σειρά, ώστε να παράγεται λειτουργική ανθρώπινη ινσουλίνη 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:



Το γονιδίωμα του φάγου είναι:



1. Επιλογή βακτηριακών αποικιών ανθεκτικών σε Amp και άχρωμες.
2. Ενζυμική *in vitro* μετα-μεταφραστική τροποποίηση της προϊνσουλίνης.
3. Παραγωγή από τα βακτήρια της προϊνσουλίνης.
4. Ανασυνδυασμός με δεσμάση του γονιδιώματος του ανασυνδυασμένου λ-φάγου με το ετερόλογο dscDNA.
5. Δημιουργία χιμαιρικού ιικού DNA, με τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης.
6. Μόλυνση βακτηριακής υγρής καλλιέργειας με ιούς και κατόπιν επίστρωση σε τρυβλίο.
7. Καλλιέργεια βακτηρίων που παράγουν προϊνσουλίνη σε βιομηχανικό επίπεδο.

Διαγώνισμα 4(B)

8. Δημιουργία cDNA προϊνσουλίνης με αντίστροφη μεταγραφάση από παγκρεατικά κύτταρα.
9. Ανάπτυξη αποικιών 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 γονιδίωμα του φαγικού φορέα κλωνοποίησης.

Μονάδες 4

4. Εξηγήστε για ποιο λόγο το dsDNA 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 ολικής 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: $5' \text{GGATCC} \text{CCTAGG} 3'$ ενώ η θέση περιορισμού της *Pst*I είναι: $5' \text{CTGCAG} \text{GACGTC} 3'$

Για ποιο λόγο το πλασμίδιο φορέας κλωνοποίησης για την cDNA βιβλιοθήκη φέρει θέση *Pst*I και όχι *Bam*HI ή οποιαδήποτε άλλη ως θέση ένθεσης του ετερόλογου dsDNA;

Μονάδες 5

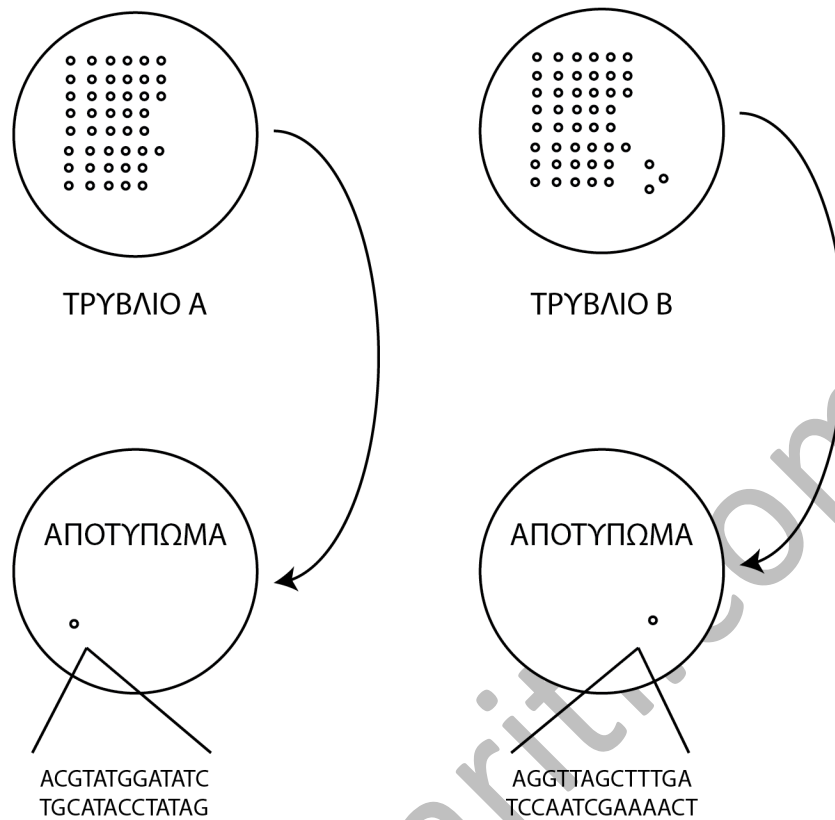
3. Δίνεται ο ανιχνευτής **AGCTAAGCATTGA** και οι βιβλιοθήκες δύο διαφορετικών ειδών οργανισμών. Ο ανιχνευτής προέρχεται από το είδος φυτού *Solanum tuberosum*.

Ποιο από τα δύο φυτά που εξετάζονται, είναι το *Solanum lycopersicum* και ποιο το *Lens culinaris*;

Μονάδα 1

Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

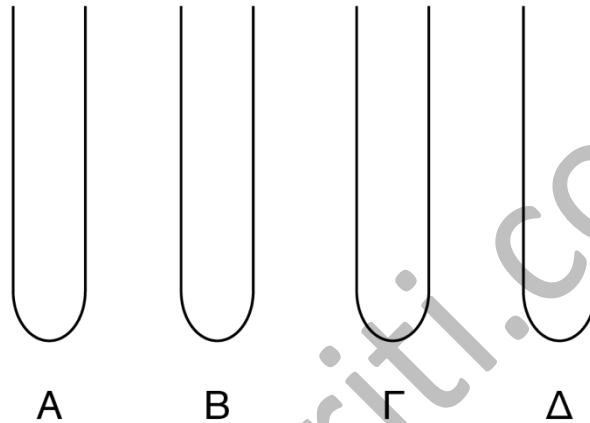
Μονάδες 6



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 τη μέθοδο της λήξης πολυμερισμού με διδεοξυ - νουκλεοτίδια. *Εδώ αναλύουμε την αλληλουχία ολόκληρου του πρώτου εξωνίου, δίχως την 5' αμετάφραστη περιοχή.*

Μέθοδος λήξης πολυμερισμού με διδεοξυ - νουκλεοτίδια.

Σε 4 διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν μόρια μονόκλωνου DNA (ίδια) από το dscDNA και συγκεκριμένα η μη κωδική αλυσίδα, που απομονώθηκαν από τη βιβλιοθήκη.



Στο σωλήνα A προστίθενται πολλά μόρια μονόκλωνου DNA (μη κωδικής αλυσίδας του γονιδίου) και πολλά ελεύθερα δεοξυνουκλεοτίδια, κάποια από τα οποία είναι δυδέοξυ αδενίνες.

Στο σωλήνα B, ομοίως με τον δοκιμαστικό σωλήνα A αλλά υπάρχουν δυδέοξυ νουκλεοτίδια με τις βάσεις A και G (πουρίνες).

Στο σωλήνα Γ, ομοίως με τον δοκιμαστικό σωλήνα A αλλά υπάρχουν δυδέοξυ νουκλεοτίδια με τις πυριμιδίνες T, C.

Στο σωλήνα Δ, ομοίως με τον δοκιμαστικό σωλήνα A αλλά υπάρχουν δυδέοξυ νουκλεοτίδια με βάσεις C.

Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα υπάρχουν μόρια DNA πολυμερασών και ένα είδος (σε πολλά αντίγραφα) ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA, που λειτουργεί ως πρωταρχικό τμήμα για την πολυμεράση.

Στη συνέχεια γίνεται ηλεκτροφόρηση σε gel ακρυλαμίδης και έκθεση σε φιλμ, για τα προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων πολυμερισμού των παραπάνω δοκιμαστικών σωλήνων.

Δίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρακάτω:

	G	A+G	C+T	C
	G	G		
		G		
	G			
		A	T	
			C	C
			T	
			C	C
	G	A		
		G		
			C	C
		A	T	
		A	T	
	G		T	
		G	C	C
		A		
A		B	Γ	Δ

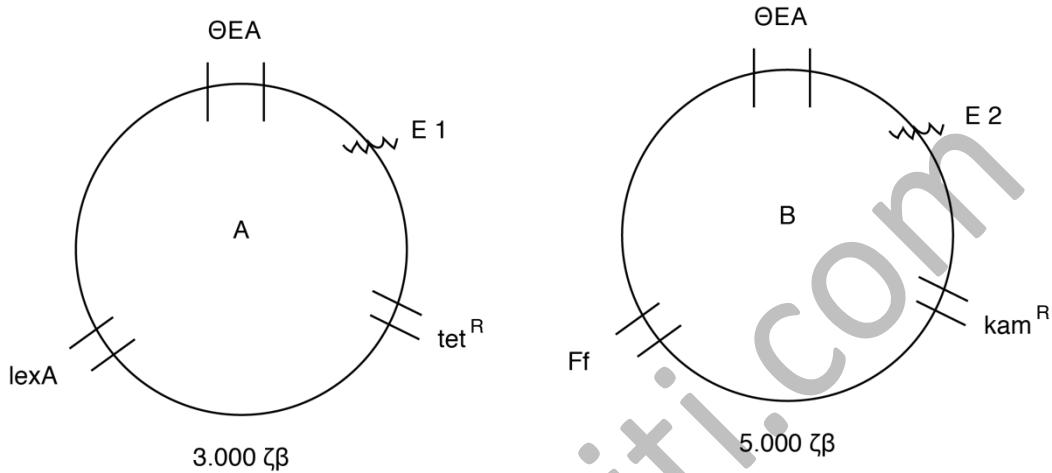
α. Με βάση τα αποτελέσματα της αυτοραδιογραφίας του φιλμ που δίνεται παραπάνω, να βρεθεί η αλληλουχία με τον προσανατολισμό της, του ζητούμενου DNA, που απομονώθηκε από τη cDNA βιβλιοθήκη. (3)

β. Εξηγήστε για ποιο λόγο το άτομο αυτό νοσεί από τη συγκεκριμένη νόσο, όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα. (2)

ΖΗΤΗΜΑ Δ

ΜΟΝΑΔΕΣ 25

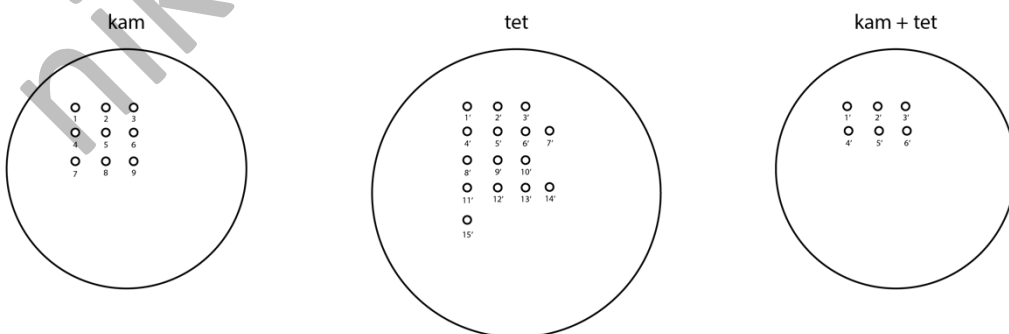
1. Σε δύο διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες βρίσκονται δύο διαφορετικά πλασμίδια, σε χιλιάδες αντίγραφα το καθένα. Στο πλασμίδιο B, το γονίδιο F^f επιτρέπει την μεταφορά του πλασμιδίου B από βακτήριο σε βακτήριο.



Και τα δύο πέπτονται, ξεχωριστά το καθένα με κάθε Π.Ε., από δύο διαφορετικές Π.Ε. που είναι όμως ισοσχιζομερή, δηλαδή αφήνουν τα ίδια κολλώδη άκρα, αλλά αναγνωρίζουν διαφορετικές θέσεις αναγνώρισης.

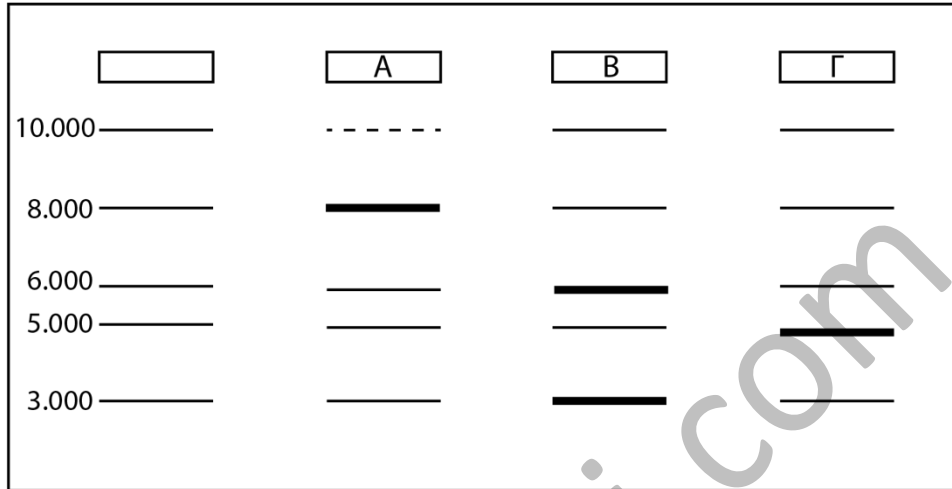
Μετά την πέψη τους αναμιγνύονται τα κομμένα πλασμίδια και επιδρά η DNA δεσμάση.

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



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

Λάβετε υπόψη σας, ότι θεωρούμε πως ένα πλασμίδιο που δεν πεπτετε «τρέχει» στο πήκτωμα όπως ακριβώς και ένα πλασμίδιο κομμένο σε ένα σημείο ιδίου μήκους με αυτό που δεν κόπηκε.

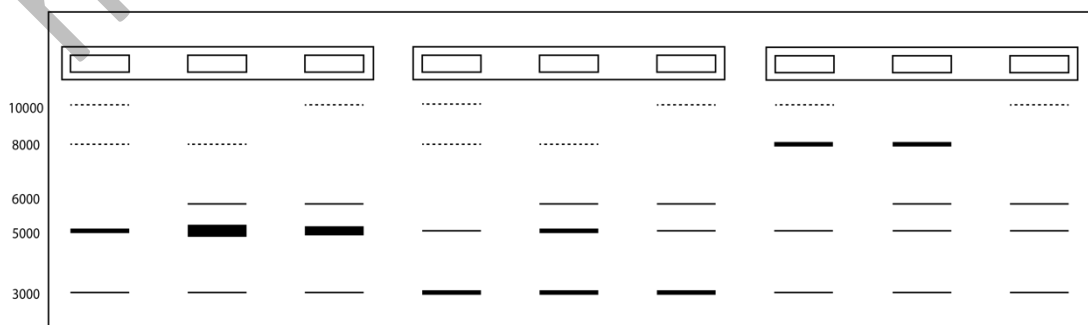


- α. Ποιο τρυβλίο αντιστοιχίζεται σε ποιο «πηγαδάκι» του gel;
- β. Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

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. E₁ και E₂, E₃, δηλαδή το δείγμα κάθε τρυβλίου κατεργάζεται ξεχωριστά με E₁, E₂ και E₃. Το τρίτο ένζυμο αναγνωρίζει και πέπτει την χιμαιρική θέση περιορισμού που δημιουργείται με τον ανασυνδυασμό των κολλωδών άκρων των δυο άλλων περιοριστικών ενζύμων. Τα προϊόντα «τρέχουν» εν συνεχεία σε gel.

Θεωρούμε ότι είναι απίθανος ο ανασυνδυασμός περισσοτέρων από δυο θραυσμάτων.

Να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα. (6)



3. Ένα τμήμα δίκλωνου DNA μήκους 5.000 ζ.β., που αποτελεί το ενδιάμεσο τμήμα ενός μεγαλύτερου μορίου μήκους 10.000 ζ.β., το οποίο το χωρίζει σε δυο βραχίονες ίσου μήκους, ενισχύθηκε με PCR. Το ζεύγος των primers που χρησιμοποιήθηκε είχε κάθε μέλος του μήκος 20 νουκλεοτίδια.

Μετά από 4 κύκλους να υπολογιστούν:

α. Πόσα μόρια από τα ζητούμενα έχουν δημιουργηθεί.

β. Ποσά νουκλεοτίδια έχει προσθέσει η θερμοάνοχη πολυμεράση.

γ. Πόσοι είναι όλοι οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί που υπάρχουν μεταξύ των νουκλεοτιδίων σε όλα τα υπάρχοντα μόρια, εξαιρούμενων των ελεύθερων primer.

δ. Πόσα είναι τα μονόκλινα 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, πώς σχετίζεται με το ποσοστό G + C των primers;

(10)

Καλή επιτυχία