

**ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΑ ΗΜΕΡΗΣΙΑ 2014****ΘΕΜΑ Α**

1. γ
2. β
3. γ
4. δ
5. α

**ΘΕΜΑ Β**

1. Η αλληλουχία των βάσεων του mRNA καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες με βάση έναν κώδικα αντιστοίχισης νουκλεοτιδίων mRNA με αμινοξέα πρωτεϊνών, ο οποίος ονομάζεται γενετικός κώδικας.

Μία από τις ιδιότητες του γενετικού κώδικα είναι το γεγονός ότι είναι σχεδόν καθολικός. Όλοι οι οργανισμοί έχουν τον ίδιο γενετικό κώδικα. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το mRNA από οποιονδήποτε οργανισμό μπορεί να μεταφραστεί σε εκχυλίσματα φυτικών, ζωικών ή βακτηριακών κυττάρων *in vitro* και να παραγάγει την ίδια πρωτεΐνη.

2. Η σωστή σειρά των βημάτων που ακολουθούνται για την εργαστηριακή καλλιέργεια μικροοργανισμών είναι η εξής:

3 → 1 → 5 → 2 → 4

3. Τα αντισώματα είναι πρωτεϊνικά μόρια, που παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού μας συστήματος, όταν ένα αντιγόνο (παθογόνος μικροοργανισμός, ιός ή ξένο υλικό) προσβάλει τον οργανισμό. Τα αντισώματα αντιδρούν με το αντιγόνο και το εξουδετερώνουν.

Ο οργανισμός μας είναι ικανός να παράγει αντισώματα εναντίον κάθε ξένου αντιγόνου. Στην πραγματικότητα, ένα αντίσωμα αναγνωρίζει μόνο μία περιοχή του αντιγόνου, η οποία ονομάζεται αντιγονικός καθοριστής. Ένα μεγάλο αντιγόνο, π.χ. ένας

μικροοργανισμός, έχει πολλούς αντιγονικούς καθοριστές γι' αυτό παράγονται πολλά είδη αντισωμάτων εναντίον του.

Κάθε είδος αντισώματος που αναγνωρίζει έναν αντιγονικό καθοριστή παράγεται από μια ομάδα όμοιων Β-λεμφοκυττάρων, που αποτελούν έναν κλώνο. Τα αντισώματα που παράγονται από έναν κλώνο Β-λεμφοκυττάρων ονομάζονται μονοκλωνικά.

Τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά. Η πιο ενδιαφέρουσα εφαρμογή τους αφορά τη θεραπεία του καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν στην εξωτερική επιφάνεια τους μεγάλη ποικιλία αντιγόνων που δεν υπάρχουν στα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού, και ονομάζονται καρκινικά αντιγόνα. Έτσι μπορούν να κατασκευαστούν μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον αυτών των αντιγόνων. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πολύ ειδικά μόνο για τα καρκινικά κύτταρα και μπορούν να «γίνουν μεταφορείς» ισχυρών αντικαρκινικών φαρμάκων. Όταν εισαχθούν στον οργανισμό, βρίσκουν και προσβάλλουν τους καρκίνους-στόχους. Τα αντικαρκινικά φάρμακα, που είναι συνδεδεμένα με τα αντισώματα, δρουν κατευθείαν στα καρκινικά κύτταρα και τα καταστρέφουν. Επιτρέπουν έτσι τη θεραπεία με αποφυγή της χειρουργικής επέμβασης και των δυσάρεστων επιπτώσεων της χημειοθεραπείας.

4. Ένας τρόπος βελτίωσης της φυτικής και ζωικής παραγωγής είναι οι ελεγχόμενες από τον άνθρωπο διασταυρώσεις φυτών και ζώων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται επιλογή φυτών και ζώων που έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως φυτά με μεγάλο μέγεθος καρπών, με ανθεκτικότητα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες ή ζώα που παράγουν μεγάλη ποσότητα κρέατος. Οι οργανισμοί αυτοί διασταυρώνονται με σκοπό τη δημιουργία απογόνων με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Αυτός ο τρόπος βελτίωσης της παραγωγής είναι χρονοβόρος και επίπονος, επειδή απαιτούνται συνεχείς διασταυρώσεις. Επιπλέον οι απόγονοι που προκύπτουν φέρουν συνήθως ορισμένους μόνο από τους επιθυμητούς χαρακτήρες μαζί με άλλες μη επιθυμητές ιδιότητες.

**ΘΕΜΑ Γ**

1. Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών καθορίζεται από το χρόνο διπλασιασμού, δηλαδή από το ρυθμό με τον οποίο διαιρούνται τα κύτταρα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού και κατά συνέπεια το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το pH, το O<sub>2</sub> και η θερμοκρασία.

2. Όπως και όλοι οι υπόλοιποι οργανισμοί, για να αναπτυχθεί ένας μικροοργανισμός είναι απαραίτητο να μπορεί να προμηθεύεται από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται μια σειρά θρεπτικών συστατικών. Σ' αυτά περιλαμβάνονται ο άνθρακας, το άζωτο, διάφορα μεταλλικά ιόντα.

Η πηγή N για τους περισσότερους μικροοργανισμούς (πιθανώς και για το βακτήριο *E.coli*) είναι τα αμμωνιακά ή τα νιτρικά ιόντα (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Η πηγή C για τους ετερότροφους μικροοργανισμούς όπως το βακτήριο *E.coli* είναι διάφορες οργανικές ενώσεις όπως οι υδατάνθρακες.

Ειδικότερα γνωρίζουμε ότι τα βακτήρια *E. coli* χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα το σάκχαρο γλυκόζη. Γεννιέται λοιπόν το ερώτημα: αν στο περιβάλλον αντί για γλυκόζη υπάρχει ο δισακχαρίτης λακτόζη, το βακτήριο έχει τη δυνατότητα να τον διασπάσει για να επιβιώσει ή θα πεθάνει, μολονότι γύρω του υπάρχει άφθονη τροφή; Το βακτήριο λύνει το πρόβλημα αυτό ρυθμίζοντας την παραγωγή των κατάλληλων ενζύμων, που θα διασπάσουν τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη.

3. Σύμφωνα με τα δεδομένα της άσκησης και τα διαγράμματα της εικόνας 1, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών *E.coli* που περιγράφει την αύξηση του πληθυσμού στο βιοαντιδραστήρα A είναι η καμπύλη I και αυτή που περιγράφει την αύξηση του πληθυσμού *E.coli* στο βιοαντιδραστήρα B είναι η καμπύλη II.

Αιτιολόγηση: Η θερμοκρασία είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό ανάπτυξης των

μικροοργανισμών. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται άριστα σε θερμοκρασία 20-45°C. Για παράδειγμα, η *Escherichia coli*, που χρησιμοποιείται σε πειράματα Μοριακής Βιολογίας, αναπτύσσεται άριστα σε θερμοκρασία 37°C.

Εφόσον λοιπόν μεταξύ των συνθηκών που επικρατούν στους δύο βιοαντιδραστήρες Α και Β η μόνη παράμετρος που διαφέρει είναι η θερμοκρασία (37°C στο βιοαντιδραστήρα Α και 20°C στο βιοαντιδραστήρα Β) και με δεδομένο ότι η ιδανική θερμοκρασία περιβάλλοντος για την ανάπτυξη του βακτηρίου *E.coli* είναι 37°C (το βακτήριο *E.coli* φυσιολογικά αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου μας και επομένως ιδανικό περιβάλλον ανάπτυξης γι' αυτό είναι οι συνθήκες που επικρατούν στο λεπτό μας έντερο, δεδομένου όμως ότι η φυσιολογική θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος είναι 36,6°C είναι ευνόητο ότι είναι αυτή και η ιδανική θερμοκρασία για το βακτήριο *E.coli* που ενδημεί εντός του σώματός μας), η καμπύλη Ι είναι αυτή που παρουσιάζει την αύξηση του πληθυσμού του *E.coli* συναρτήσει του χρόνου στο βιοαντιδραστήρα Α όπου η θερμοκρασία είναι 37°C.

Σε ιδανικές συνθήκες τα κύτταρα εμφανίζουν το μέγιστο δυνατό ρυθμό διαίρεσής τους αφού είναι λογικό να έχουν το μικρότερο δυνατό χρόνο διπλασιασμού τους, ενώ όσο οι συνθήκες περιβάλλοντος (εδώ ειδικότερα η θερμοκρασία) απομακρύνονται από τις ιδανικές αυξάνεται ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων άρα μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας.

Παρατηρώντας λοιπόν τις καμπύλες Ι και ΙΙ διαπιστώνουμε ότι η καμπύλη Ι εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη κλίση ( $\frac{dN_A}{dt}$ ) από την καμπύλη ΙΙ ( $\frac{dN_B}{dt}$ ), δηλαδή ο ρυθμός μεταβολής του πληθυσμού  $\frac{dN}{dt}$  όπως παρουσιάζεται στην καμπύλη Ι είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό μεταβολής του πληθυσμού  $\frac{dN}{dt}$  όπως παρουσιάζεται στην καμπύλη ΙΙ, άρα η καμπύλη Ι υποδηλώνει μικρότερο χρόνο διπλασιασμού του πληθυσμού στην καλλιέργεια από ότι η καμπύλη ΙΙ, συνεπώς η καμπύλη Ι αντιπροσωπεύει έναν πληθυσμό που αυξάνει σε ευνοϊκότερο περιβάλλον από ότι στο περιβάλλον στο οποίο αυξάνει ο πληθυσμός της *E.coli* η αύξηση του οποίου

υποδηλώνεται από την καμπύλη II, άρα η καμπύλη I υποδηλώνει τον πληθυσμό που αυξάνει σε θερμοκρασία 37°C και η καμπύλη II τον πληθυσμό που αυξάνει σε θερμοκρασία 20°C. Συνεπώς η καμπύλη I αντιστοιχεί στον πληθυσμό που αυξάνει στο βιοαντιδραστήρα A και η καμπύλη II αντιστοιχεί στον πληθυσμό *E.coli* που αυξάνει στο βιοαντιδραστήρα B.

4. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ζυμώσεων, οι οποίοι μπορούν να εφαρμοστούν ανάλογα με το επιθυμητό προϊόν. Δύο ευρέως χρησιμοποιούμενοι τύποι είναι η κλειστή και η συνεχής καλλιέργεια.

Κλειστή καλλιέργεια: Σ' αυτό τον τύπο ζύμωσης τοποθετείται στο βιοαντιδραστήρα ορισμένη ποσότητα αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού, η οποία εμβολιάζεται με αρχική καλλιέργεια μικροοργανισμών. Η καλλιέργεια συνεχίζεται μέχρι την παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Στην κλειστή καλλιέργεια οι φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι η λανθάνουσα, η εκθετική, η στατική και η φάση θανάτου. Κατά τη λανθάνουσα φάση ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που προέρχεται από την αρχική καλλιέργεια παραμένει σχεδόν σταθερός. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστούν στις καινούργιες συνθήκες και να αρχίσουν να αναπτύσσονται. Στη συνέχεια, οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με ταχύ ρυθμό, επειδή η καλλιέργεια πραγματοποιείται κάτω από άριστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης O<sub>2</sub> και στο υλικό καλλιέργειας υπάρχουν άφθονα θρεπτικά συστατικά. Αυτή η φάση ανάπτυξης ονομάζεται εκθετική, επειδή ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται εκθετικά. Ακολουθεί η στατική φάση, κατά την οποία ο πληθυσμός των βακτηρίων δεν αυξάνεται, λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή λόγω συσσώρευσης τοξικών προϊόντων από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Τέλος κατά τη φάση θανάτου ο αριθμός των μικροοργανισμών μειώνεται. Παρ' ότι η διαδοχή των φάσεων ανάπτυξης σε κάθε κλειστή καλλιέργεια είναι συγκεκριμένη, η διάρκεια κάθε φάσης διαφέρει ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών. Οι

μικροοργανισμοί παράγουν χρήσιμα προϊόντα συνήθως κατά τη διάρκεια της εκθετικής και της στατικής φάσης ανάπτυξής τους. Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω και με βάση τη δοθείσα καμπύλη I της εικόνας 1 μπορούμε να υπολογίσουμε τη χρονική περίοδο κατά την οποία παράγονται χρήσιμα προϊόντα στο βιοαντιδραστήρα Α. Η περίοδος αυτή καταλαμβάνει το χρονικό διάστημα που η καλλιέργεια των βακτηρίων βρίσκεται στην εκθετική και τη στατική φάση. Στο βιοαντιδραστήρα Α λοιπόν παράγονται από τα κύτταρα χρήσιμα προϊόντα κατά το χρονικό διάστημα 2-6 ώρες καλλιέργειας όπου η καλλιέργεια βρίσκεται σε εκθετική φάση, οπότε παράγονται από τα κύτταρα πρωτογενείς μεταβολίτες και κατά το χρονικό διάστημα 6 έως 12 ώρες καλλιέργειας όπου τα κύτταρα βρίσκονται στη στατική φάση οπότε παράγονται απ' αυτή δευτερογενείς μεταβολίτες.

### **ΘΕΜΑ Δ**

1. Η κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση για τη χρήση του συγκεκριμένου πλασμιδίου που δίνεται ως φορές κλωνοποίησης είναι η **δ**.

**Αιτιολόγηση:** Από το 1953, που οι Watson και Crick πρότειναν το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής του DNA, μέχρι σήμερα, η πρόοδος της επιστήμης της Βιολογίας ήταν αλματώδης. Η απομόνωση και χρήση πολυάριθμων ενζύμων, έδωσε στους ερευνητές τη δυνατότητα «αναπαραγωγής» των διαδικασιών της αντιγραφής, αντίστροφης μεταγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης *in vitro*. Ειδικότερα η απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών, ενζύμων που κόβουν το DNA σε κομμάτια με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων, καθώς και ειδικών φορέων που μεταφέρουν DNA από κύτταρο σε κύτταρο, 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.

Σήμερα μπορούμε να κατασκευάζουμε στο δοκιμαστικό σωλήνα ένα «ανασυνδυασμένο» μόριο DNA, δηλαδή ένα τεχνητό μόριο DNA, που περιέχει γονίδια από δύο ή και περισσότερους οργανισμούς.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA. Μία από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η EcoRI που 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') αφήνοντας μονόκλινα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο.

Στη συνέχεια τα κομμάτια του DNA που προκύπτουν από τη δράση του περιοριστικού ενζύμου που διαθέτουν τα χαρακτηριστικά μονόκλινα άκρα ενσωματώνονται σε ειδικούς φορείς κλωνοποίησης. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης έχουν τη συγκεκριμένη αλληλουχία που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο μία μόνο φορά. Έτσι τα πλασμίδια κόβονται από το ένζυμο σε αυτή τη θέση και δημιουργείται ένα γραμμικό μόριο DNA με μονόκλινα άκρα. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού (εδώ του ανθρώπου), επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση ενός ενζύμου, της DNA δεσμάσης. Η DNA δεσμάση είναι φυσιολογικά ένα από τα ένζυμα της αντιγραφής που συνδέει τμήματα του DNA. Έτσι δημιουργούνται ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Μερικά πλασμίδια ξαναγίνονται κυκλικά, χωρίς να προσλάβουν DNA του οργανισμού.

Ο μηχανισμός της μεταγραφής είναι ο ίδιος στους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η μεταγραφή καταλύεται από ένα ένζυμο, την RNA πολυμεράση.

Η RNA πολυμεράση προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, που ονομάζονται υποκινητές, με τη βοήθεια πρωτεϊνών που

ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες. Οι υποκινητές και οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν τα ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής του DNA και επιτρέπουν στην RNA πολυμεράση να αρχίσει σωστά τη μεταγραφή. Οι υποκινητές βρίσκονται πάντοτε πριν από την αρχή κάθε γονιδίου. Κατά την έναρξη της μεταγραφής ενός γονιδίου η RNA πολυμεράση προσδέεται στον υποκινητή και προκαλεί τοπικό ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA. Στη συνέχεια, τοποθετεί τα ριβονουκλεοτίδια απέναντι από τα δεοξυριβονουκλεοτίδια μίας αλυσίδας του DNA σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων, όπως και στην αντιγραφή, με τη διαφορά ότι εδώ απέναντι από την αδερίνη τοποθετείται το ριβονουκλεοτίδιο που περιέχει ουρακίλη. Η RNA πολυμεράση συνδέει τα ριβονουκλεοτίδια που προστίθενται το ένα μετά το άλλο, με 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό. Η μεταγραφή έχει προσανατολισμό 5'→3' όπως και η αντιγραφή. Η σύνθεση του RNA σταματά στο τέλος του γονιδίου, όπου ειδικές αλληλουχίες οι οποίες ονομάζονται αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής, επιτρέπουν την απελευθέρωσή του.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω και με βάση τα δεδομένα της άσκησης, η περιοριστική ενδονουκλεάση δ είναι η κατάλληλη, διότι υπάρχει μία μοναδική θέση αναγνώρισής της (θέση Δ) στο πλασμίδιο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης.

Επιπλέον, η θέση Δ βρίσκεται ακριβώς μετά από αλληλουχία υποκινητή που αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες του βακτηρίου-ξενιστή, δηλαδή το μετασχηματισμένο βακτήριο-ξενιστής θα μπορεί να ξεκινήσει σωστά τη μεταγραφή του ενσωματωμένου στο πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης ανθρώπινου γονιδίου, και ακόμη, η θέση Δ βρίσκεται ακριβώς πριν από αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής στο πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης, δηλαδή θα είναι δυνατόν να τερματιστεί η μεταγραφή του ανασυνδυασμένου ανθρώπινου γονιδίου στο πλασμίδιο αυτό, όταν το πλασμίδιο αυτό έχει μετασχηματίσει το βακτήριο-ξενιστή.



2. Για να επιλέξουμε τους βακτηριακούς κλώνους που έχουν προσλάβει πλασμίδιο (ανασυνδυασμένο ή μη) από τους κλώνους που δεν έχουν προσλάβει, θα ακολουθήσουμε την εξής διαδικασία: Θα αναπτύξουμε τη βακτηριακή καλλιέργεια που μετασηματίσαμε σε θρεπτικό υλικό, το οποίο εκτός από τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά για τα βακτήρια θα περιέχει και ένα τουλάχιστον από τα δύο αντιβιοτικά (Αμπικιλίνη, Στρεπτομυκίνη) για τα οποία διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας το πλασμίδιο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε.

Γνωρίζουμε ότι τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης έχουν τη συγκεκριμένη αλληλουχία μία μόνο φορά. Έτσι τα πλασμίδια κόβονται από την EcoRI σε αυτή τη θέση και δημιουργείται ένα γραμμικό μόριο DNA με μονόκλινα άκρα. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού, αναμιγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση ενός ενζύμου, της DNA δεσμάσης. Όπως θυμάστε η DNA δεσμάση φυσιολογικά είναι ένα από τα ένζυμα της αντιγραφής που συνδέει κομμάτια του DNA. Έτσι δημιουργούνται ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Μερικά πλασμίδια ξαναγίνονται κυκλικά, χωρίς να προσλάβουν DNA του οργανισμού.

Βακτήρια - ξενιστές δέχονται σε μικρό ποσοστό πλασμίδια, μερικά από τα οποία είναι ανασυνδυασμένο. Συνήθως χρησιμοποιούνται ως ξενιστές, βακτήρια που δεν έχουν πλασμίδια και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά. Για να μπει ένα πλασμίδιο μέσα στο βακτήριο, τα τοιχώματα του βακτηρίου γίνονται παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια, μετά από κατάλληλη κατεργασία (μετασηματισμός).

Η επιλογή των βακτηρίων που δέχτηκαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στηρίζεται στην ικανότητα ανάπτυξής τους παρουσία αντιβιοτικού, επειδή το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Κάθε βακτήριο που προσέλαβε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πολλαπλασιάζεται και δίνει ένα κλώνο. Η διαδικασία δημιουργίας κλώνων βακτηρίων ονομάζεται κλωνοποίηση.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, εάν η βακτηριακή καλλιέργεια που χρησιμοποιήσαμε για το μετασχηματισμό των βακτηρίων με το δοθέν πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης αναπτυχθεί σε θρεπτικό υλικό που διαθέτει τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά για τη θρέψη των κυττάρων και ένα τουλάχιστον από τα δύο αντιβιοτικά Αμπικιλίνη ή/και Στρεπτομυκίνη για τα οποία το πλασμίδιο φορέας κλωνοποίησης διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας, τότε εφόσον τα βακτήρια-ξενιστές πριν το μετασχηματισμό δεν διέθεταν κανένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο από τα δύο αυτά αντιβιοτικά, όσα από αυτά δεν δέχθηκαν το πλασμίδιο (δηλαδή η πλειοψηφία τους), ανασυνδυασμένα ή μη, θα αδυνατούν να αναπτυχθούν σε αυτό το θρεπτικό υλικό. Αντίθετα, όσα βακτήρια της καλλιέργειας μετασχηματίστηκαν, ανεξάρτητα με το αν το πλασμίδιο που δέχθηκαν ήταν ή όχι ανασυνδυασμένο, θα διαθέτουν πλέον γονίδια ανθεκτικότητας στο/στα αντιβιοτικά αυτά και θα μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτό το θρεπτικό υλικό. Αυτό είναι δυνατό καθώς η θέση ανασυνδυασμού Δ που επιλέξαμε εκτός του ότι επιτρέπει τη σωστή μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδίου, δεν καταστρέφει καμία από τις δύο αλληλουχίες γονιδίων ανθεκτικότητας που φέρει ο φορέας κλωνοποίησης.

3. Η κωδική αλυσίδα του γονιδίου που δίνεται είναι η αλυσίδα Ι. Το παραγόμενο από τη μεταγραφή μόριο mRNA αυτού του γονιδίου είναι το παρακάτω:

5' GGCUUAUAAGG **AUG**CCGUACGAG **UAA**AUUAUAACCG 3'

κωδικόνιο

κωδικόνιο

έναρξης

λήξης

**Αιτιολόγηση:** «Γνωρίζουμε ότι με τη μεταγραφή ... 5' άκρου της γονικής αλυσίδας του γονιδίου» ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΣΗ ΘΕΜΑΤΑ ΗΜΕΡΗΣΙΑ 2012 ΘΕΜΑ 4<sup>ο</sup> .1 . **Βλέπε « Τα βιβλία μου » «Τα θέματα των εξετάσεων»**

Τις παραπάνω προϋποθέσεις πληροί μόνο η αλυσίδα I η οποία όταν διαβάζεται από τα δεξιά (5' άκρο) προς τα αριστερά (3' άκρο) διαθέτει κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης 5'ATG 3' μετά από έντεκα νουκλεοτίδια από την αρχή της και διαθέτει και κωδικόνιο λήξης (5'TAA<sub>3'</sub>), ενώ μεταξύ κωδικονίου έναρξης και λήξης παρεμβάλλεται πλήθος εννέα νουκλεοτιδίων, δηλαδή το mRNA αυτού του γονιδίου οδηγεί αμέσως μετά τη μετάφρασή του σε ένα ολιγοπεπτίδιο τεσσάρων αμινοξέων.

4. Η περιοριστική ενδονουκλεάση Δ αναγνωρίζει την αλληλουχία Δ μήκους έξι ζευγών βάσεων, η οποία αλληλουχία αυτή είναι η εξής:



Η αλληλουχία αυτή είναι η μόνη κοινή αλληλουχία που εντοπίζεται εκατέρωθεν της μεταφραζόμενης (κωδικής) περιοχής του γονιδίου που μας δίνεται. Έτσι κατά την απομόνωση του γονιδίου αυτού από το ανθρώπινο DNA χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση Δ, η οποία μετά τη δράση της άφησε μονόκλινα άκρα, από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα του (κολλώδη άκρα) τμήματος DNA που περιέχει ακέραιο το ανθρώπινο γονίδιο που ζητάμε να κλωνοποιήσουμε. Η κοπή του πλασμιδίου φορέα κλωνοποίησης που μας δίνεται με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση στη θέση Δ οδηγεί σε ένα γραμμικό μόριο DNA με κολλώδη άκρα συμπληρωματικά προς τα κολλώδη άκρα του τμήματος DNA του ανθρώπου που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Έτσι είναι δυνατός ο ανασυνδυασμός του φορέα κλωνοποίησης στη θέση Δ με το συνεχές ανθρώπινο γονίδιο χάρη στη συμπληρωματικότητα των κολλωδών άκρων τους και τη βοήθεια της DNA δεσμάσης που θα δημιουργήσει την 3'→5' φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ τους.



- A ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ Μ<sub>3'</sub>-<sup>5'</sup>Χ ΑΝΘΡ. ΓΟΝΙΔΙΟ Φ<sub>3'</sub>-<sup>5'</sup>Ν ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ  
ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ Ο<sup>5'</sup>-<sub>3'</sub>Ψ ΑΝΘΡ. ΓΟΝΙΔΙΟ Ω<sup>5'</sup>-<sub>3'</sub>Ξ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ

ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ → ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΛΗΞΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Δηλαδή:



ή εναλλακτικά

- B ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ Μ<sup>3'</sup>-<sup>5'</sup>Ω ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΓΟΝΙΔΙΟ Ψ<sub>3'</sub>-<sup>5'</sup>Ν ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ  
ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ Ο<sup>5'</sup>-<sub>3'</sub>Φ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΓΟΝΙΔΙΟ Χ<sup>5'</sup>-<sub>3'</sub>Ξ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ

ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ → ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΛΗΞΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Δηλαδή:



Υπόμνημα:

Τα άκρα Μ και Ν συνιστούν τα κολλώδη άκρα που δημιουργεί η περιοριστική ενδονουκλεάση Δ στον εξωτερικό (πάνω) κλώνο του πλασμιδίου, όταν δρα επι αυτού. Ομοίως, τα άκρα Ο και Ξ για τον εσωτερικό (κάτω) κλώνο του πλασμιδίου.

Τα άκρα Φ, Χ, Ψ, Ω αποτελούν τα κολλώδη άκρα που αφήνει εκατέρωθεν του πλαισίου ανάγνωσης του ανθρωπίνου γονιδίου η περιοριστική ενδονουκλεάση Δ ή κάποιο ισοσχιζομερές αυτής περιοριστικό ένζυμο, όταν δρα επι του ανθρωπίνου γονιδίου.

Όπως φαίνεται από τους δύο πιθανούς συνδυασμούς μεταξύ των DNA του πλασμιδίου και του ανθρωπίνου γονιδίου, που αμφότερα έχουν κολλώδη άκρα τα οποία δημιουργεί η περιοριστική ενδονουκλεάση Δ,

μόνο ο πρώτος τρόπος ανασυνδυασμού οδηγεί στη δημιουργία βακτηριακών κλώνων, που παράγουν το ανθρώπινο ολιγοπεπτίδιο. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι κατά τον ανασυνδυασμό A, η κωδική αλυσίδα του γονιδίου, που είναι η αλυσίδα I και η μη-κωδική αλυσίδα του γονιδίου, που είναι η αλυσίδα II ανασυνδυάζονται με τέτοιο τρόπο με το πλασμίδιο, ώστε ο υποκινητής που διαθέτει το πλασμίδιο και αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες του βακτηρίου-ξενιστή να βρίσκεται προς το 5' άκρο της κωδικής αλυσίδας του γονιδίου και φυσικά προς το 3' άκρο της μη-κωδικής αλυσίδας του γονιδίου. Έτσι κατά τη μεταγραφή του γονιδίου προκύπτει ένα μόριο mRNA που έχει την ίδια αλληλουχία βάσεων (μόνο που αντί για T διαθέτει U) και τον ίδιο προσανατολισμό με την κωδική αλυσίδα του γονιδίου, αυτό γίνεται εφικτό επειδή κατά τη μεταγραφή ανασυνδυασμένου γονιδίου με αυτόν τον τρόπο (τρόπο A) χρησιμοποιείται από την RNA πολυμεράση ως καλούπι για τη δημιουργία του mRNA η ίδια αλυσίδα που χρησιμοποιείται και κατά τη μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδίου στα ανθρώπινα κύτταρα.

ii) Αντίθετα κατά τον ανασυνδυασμό B δημιουργούνται βακτηριακοί κλώνοι που αδυνατούν να παράγουν το ανθρώπινο ολιγοπεπτίδιο, διότι κατά αυτόν τον τρόπο ανασυνδυασμού χρησιμοποιείται για τη μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδίου από τη βακτηριακή RNA πολυμεράση η αλυσίδα του ανθρώπινου γονιδίου που φυσιολογικά συνιστά την κωδική του αλυσίδα κατά τη μεταγραφή του γονιδίου στα ανθρώπινα κύτταρα. Με αυτόν δηλαδή τον τρόπο ανασυνδυασμού (τρόπος B), το ανθρώπινο γονίδιο ενσωματώνεται με τέτοιο τρόπο στο πλασμίδιο ώστε η φυσιολογική κωδική αλυσίδα του να αποτελεί τώρα μη-κωδική αλυσίδα και η φυσιολογική μη-κωδική αλυσίδα του να συνιστά τώρα κωδική αλυσίδα. Έτσι το παραγόμενο από τη μεταγραφή μόριο mRNA εντός του βακτηριακού κυττάρου-ξενιστή δεν έχει την ίδια αλληλουχία ριβονουκλεοτιδίων με το φυσιολογικό mRNA του γονιδίου, δηλαδή μεταφέρει εντελώς διαφορετικό μήνυμα και συγκεκριμένα επειδή δεν διαθέτει κωδικόνιο έναρξης (5' AUG<sub>3'</sub>) δεν κωδικοποιεί για κάποιο πεπτίδιο.