

Διαγώνισμα
Κεφάλαιο 4
Τεχνολογία του Ανασυνδυασμένου DNA

Ζήτημα Α.

Μονάδες 25

1. Η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Bam*HI είναι:



Η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Bcl*I είναι:



Ένα γραμμικό μόριο DNA διαθέτει μοναδική θέση αναγνώρισης *Bam*HI και ένα άλλο μόριο επίσης γραμμικό, με την ίδια κατά τα άλλα, ακριβώς αλληλουχία διαθέτει μοναδική θέση *Bcl*I, στη θέση της *Bam*HI. Τα δυο μόρια πέπτονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση το καθένα. Τα προϊόντα της πέψης, αναμιγνύονται και προστίθεται το ένζυμο DNA δεσμάση. Στο τελικό μείγμα προστίθενται και οι δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Bcl*I.

Δημιουργούνται:

- α. 4 διαφορετικά μόρια DNA
- β. 2 διαφορετικά μόρια DNA
- γ. 1 μόριο DNA
- δ. 2 όμοια μόρια DNA

2. Στο παραπάνω μείγμα:

- α. δρουν και οι δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες πάντα
- β. δρα μόνο η μια από τις δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες πάντα
- γ. μπορεί να δράσει ή η μια ή άλλη περιοριστική ενδονουκλεάση
- δ. μπορεί να μην δράσει καμιά από τις δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

3. Ποια από τις παρακάτω αλληλουχίες αποτελεί πιθανή θέση αναγνώρισης κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης;



4. Μπορούμε να δημιουργήσουμε cDNA βιβλιοθήκη:

- α. Για το γονίδιο της *EcoRI*,
- β. Για το γονίδιο του tRNA της Αργινίνης των λευκοκυττάρων μας
- γ. Για το οπερόνιο της λακτόζης,
- δ. Για το γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV.

5. Ένας φορέας κλωνοποίησης διαθέτει εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (αντιβιοτικό) και το γονίδιο *LeuI*⁺, που κωδικοποιεί το ένζυμο το οποίο απαιτείται για την σύνθεση του αμινοξέος Λεύκίνη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο, για την επιλογή των μετασχηματισμένων ξενιστών με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Ποιο γονότυπο και ποιο φαινότυπο, πρέπει να εμφανίζουν τα επιθυμητά κύτταρα ξενιστές;

- α. Πριν το μετασχηματισμό ήταν *LeuI*⁻ και μετά τον μετασχηματισμό αυξάνονται σε περιβάλλον δίχως Λεύκίνη.
- β. Πριν το μετασχηματισμό ήταν *LeuI*⁺ και μετά το μετασχηματισμό δεν αυξάνεται σε περιβάλλον δίχως Λεύκίνη
- γ. Μετά το μετασχηματισμό ήταν *LeuI*⁻ και αυξάνεται σε περιβάλλον δίχως Λεύκίνη
- δ. Μετά το μετασχηματισμό ήταν *LeuI*⁺ και δεν αυξάνεται σε περιβάλλον δίχως Λεύκίνη

Ζήτημα Β

Μονάδες 25

1. Διαθέτετε το γονίδιο Ψ_2 και θέλετε να το ενθέσετε εντός του φορέα κλωνοποίησης B_2 , οποίος διαθέτει τις εξής θέσεις περιορισμού (οι αλληλουχίες είναι δίκλωνες αλλά δίνονται μόνο ο ένας από τους δυο κλώνους):

StuI : 5' AGG|CCT₃

SaII: 5'G|TCGAC₃

Ψ_2 : 5' TCCGGCGGAATTCCAAGGCCT[ATG...κωδική περιοχή]CGTCGACTCCGGC 3'
3' AGGCCGCCTTAAGGTTCCGGA[TAC...κωδική περιοχή]GCAGCTGAGGCCG 5'

Τμήμα του πλασμιδιακού φορέα B_2 :

_____ Διεύθυνσης μεταγραφής > _____ *StuI* _____ *SaII* _____ *EcoRI* _____

- α. Υπάρχουν δυο διαφορετικοί τρόποι ένθεσης του γονιδίου Ψ_2 (κωδική περιοχή του) στο πλασμίδιο B_2 . Ποιο είναι αυτοί;
- Ποιο περιοριστικό ένζυμο θα χρησιμοποιήσετε για να πέψετε το πλασμίδιο και το γονίδιο, ώστε να απομονώσετε μόνο την κωδική περιοχή του γονιδίου;

(10)

β. Ποιος από τους δυο αυτούς τρόπους είναι ο κατάλληλος για να είναι δυνατή η έκφραση του γονιδίου Ψ_2 στο κύτταρο ξενιστή (5);
Αιτιολογήστε την απάντησή σας. (10)

Ζήτημα Γ

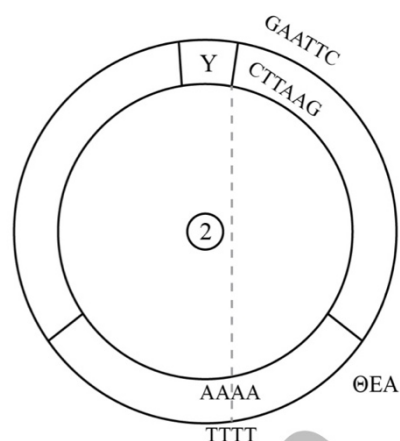
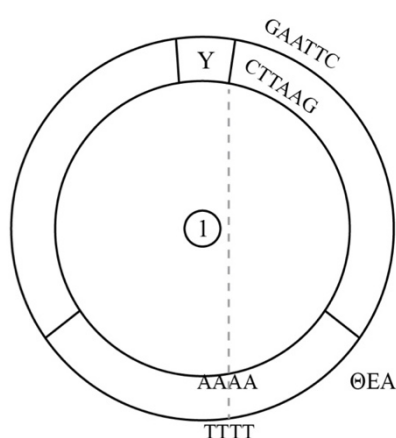
Μονάδες 25

1. Εξηγήστε πως θα μπορούσαμε να παράξουμε την αιμοσφαιρίνη Α, που αποτελείται από 2α και 2β πολυπεπτιδικές αλυσίδες, από βακτήρια με την τεχνολογία της cDNA βιβλιοθήκης. (5)
2. Δίνεται το παρακάτω υποθετικό γονίδιο του λ φάγου, που κωδικοποιεί για ένα ολιγοπεπτίδιο. Το γονίδιο αυτό θέλουμε να το κλωνοποιήσουμε σε ζυμομύκητα, με σκοπό την παραγωγή του ολιγοπεπτιδίου που κωδικοποιεί.

...Y ...ATTGCGTAATTAAAATGCCAGTTCATGAATAATTAAAGCGC...

...Y ...TAACGCATTAATTTTACGGGTCAAGTACTTATTAATTTTCGCG...

Για την κλωνοποίηση του συγκεκριμένου γονιδίου θα επιλέξετε μεταξύ των παρακάτω φορέων κλωνοποίησης.



nikimargariti.com

Στο πλασμίδιο 1, ο εσωτερικός μητρικός κλώνος όταν αντιγράφεται στη διχάλα που εξελίσσεται προς τα αριστερά, ο νεοσυντιθέμενος συμπληρωματικός κλώνος συντίθεται συνεχώς.

Στο πλασμίδιο 2, ο αντίστοιχος μητρικός κλώνος στη διχάλα που εξελίσσεται προς τα δεξιά, ο νεοσυντιθέμενος συμπληρωματικός κλώνος συντίθεται συνεχώς.

Τα πλασμίδια έχουν μέγεθος 2.000 ζευγών βάσεων το καθένα και ισχύει ότι, το πρώτο νουκλεοτίδιο του μητρικού κλώνου που αντιγράφεται συνεχώς σε κάθε πλασμίδιο, βρίσκεται για το πρώτο πλασμιδιο1001 νουκλεοτίδια και για το δεύτερο πλασμίδιο ακριβώς 1000 νουκλεοτίδια, από το πρώτο νουκλεοτίδιο, αμέσως μετά τον υποκινητή του γονιδίου που δίνεται.

α. Ποια είναι κωδική και ποια μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου του λ-φάγου;

β. Ποιο ολιγοπεπτίδιο κωδικοποιεί αυτό το γονίδιο;

γ. Ποιο από τα πλασμίδια θα χρησιμοποιήσετε για την κλωνοποίηση του γονιδίου; Για ποιο λόγο θα χρειαστείτε δυο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα για τον ανασυνδυασμό;

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

δ. Μετά την επιτυχή έκφραση του γονιδίου στα κύτταρα ξενιστές, απομονώθηκαν δυο διαφορετικά ολιγοπεπτίδια, που παράγονται από τα μετασχηματισμένα κύτταρα ζυμών με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Τα δυο αυτά ολιγοπεπτίδια παράγονται από διαφορετικά μετασχηματισμένα μυκητιακά κύτταρα. Δηλαδή το ίδιο κύτταρο δεν παράγει και τα δυο ολιγοπεπτίδια. Και τα δυο είναι προϊόντα έκφρασης του ετερόλογου γονιδίου που ανασυνδυάστηκε με τον φορέα κλωνοποίησης.

Εξηγήστε το φαινόμενο.

ε. Είναι δυνατόν το κύτταρο ζύμης ξενιστής, να παράγει το λειτουργικό ολιγοπεπτίδιο του λ-φάγου, δεδομένου ότι ο λ-φάγος προσβάλλει βακτηρία; (5×4)

Ζήτημα Δ

Μονάδες 25

Δίνεται η παρακάτω αλληλουχία του γονιδίου Φ_1 (εδώ εμφανίζεται μονόκλωνη ενώ είναι δίκλωνη), που κωδικοποιεί για το ένζυμο του βακτηρίου *Lactobacillus arabinosus* το οποίο σχηματίζει την βιταμίνη B₉ (φολικό οξύ).

Από την γονιδιωματική βιβλιοθήκη του βακτηρίου, απομονώθηκε το γονίδιο Φ_1 με στόχο την εισαγωγή του σε κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης, που θα μετασχηματίσει κύτταρα ζυμών αρτοποιίας, ώστε να εμπλουτίζεται το ψωμί με φολικό οξύ.

Στο δοθέν γονίδιο δεν περιλαμβάνεται η αλληλουχία του υποκινητή του. Υποδεικνύονται τα κωδικόνια έναρξης και λήξης του Φ_1 και εντός των 1500 ζ. β. που παρεμβάλλονται μεταξύ των κωδικονίων έναρξης και λήξης, δεν υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων:

XbaI (5' TCTAGA_{3'})

SacI (5' GAGCTC_{3'})

BamHI (5' GGATCC_{3'})

BglII (5' AGATCT_{3'})

NdeI (5' CATATG_{3'})

5' GTCTAGAAGAGCTCCTTGGATCCAAGATCTACCATATGTCTCGCCTA....1500nt συνεχία του γονιδίου... GTCTAGAAGAGCTCTGGATCCAAGATCTACCATATGTAAGCG₃'

Δίνεται επίσης ο φορέας κλωνοποίησης που θα χρησιμοποιηθεί για την κλωνοποίηση του γονιδίου Φ₁ στη ζύμη αρτοποιίας. Δίνεται ακόμη, η αλληλουχία του φορέα κλωνοποίησης (εδώ εμφανίζεται μονόκλωνη ενώ είναι δίκλωνη) από τη θέση *Bgl*I μέχρι τη θέση *Sac*I, όπου περιλαμβάνεται και ο υποκινητής που θα είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή του γονιδίου Φ₁.

Τμήμα του φορέα κλωνοποίησης:

Διεύθυνση

μεταγραφής → *Xba*I *Nde*I *Bam*HI *Sac*I

Υποκινητής

----->

5' AGATCTCGATCCCCGAAATTAATACGACTCACTATACGGGAATTGTCACCGCATAACAATTC CCCTCTAGAAATAAT

5' TTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG GCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGT CGCGGATCCGAA

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Glu

5' TCGAGCTCCGTCGAC 3'

Leu Arg Arg Gln Ala

α. Για την έκφραση του γονιδίου Φ₁ στη ζύμη, ποιες πρωτεΐνες και από ποιον οργανισμό θα πρέπει να συνδεθούν με τον υποκινητή του φορέα κλωνοποίησης που θα χρησιμοποιηθεί; (5)

β. Αν υποθέσουμε ότι, τα επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το Φ₁ γονίδιο, δεν επηρεάζουν την λειτουργικότητά της, απαντήστε στις παρακάτω ερωτήσεις:

I. Εάν δημιουργούσατε τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης με πέψη με *Bam*HI:

i. Θα αναμέναμε το κύτταρο ζύμης, που δέχθηκε τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης, να δημιουργεί μόριο mRNA από το γονίδιο Φ₁;

ii. Το μετασηματισμένο κύτταρο ζύμης, θα συνθέτει λειτουργική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο Φ₁;

II. Εάν δημιουργούσατε τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης, με πέψη με το ένζυμο *Sac*I:

i. Θα αναμένατε το κύτταρο ζύμης, που δέχθηκε τον ανασυνδυασμένο φορέα κλωνοποίησης, να δημιουργεί μόριο mRNA από το γονίδιο Φ₁;

ii. Το μετασηματισμένο κύτταρο ζύμης, θα συνθέτει λειτουργική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο Φ₁;

(5X4)

Καλή επιτυχία!