

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΘΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

Γ' ΛΥΚΕΙΟΥ

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ: ΛΑΛΟΥ ΗΛΙΑΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Κεφάλαιο 4^ο

Τεχνολογία του ανασυνδρασμένου DNA

ΔΙΑΓΩΝΙΣΜΑΤΑ

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ - ΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΜΕ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

1. Γιατί οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες και οι φορείς κλωνοποίησης είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική;

- Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στο εσωτερικό του μορίου και είναι τα απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική, επειδή αναγνωρίζουν και κόβουν τις ίδιες πάντα ειδικές αλληλουχίες του δι-κλωνου DNA, αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα. (Υπάρχουν ορισμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που κόβουν το DNA χωρίς να δημιουργούν μονόκλωνες ουρές). Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές βάσεις του φορέα κλωνοποίησης που έχει κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Τα δύο είδη DNA μπορεί να αναμειχθούν, και επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυασμένα μόρια DNA.
- Οι φορείς κλωνοποίησης είναι απαραίτητα εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική, επειδή είναι μόρια αυτόνομα, που μπορούν να αναπαράγονται ανεξάρτητα. Οι φορείς κλωνοποίησης είναι μόρια DNA όπως πλασμίδια, DNA φάγων, που μπορούν να αυτόδυπλασιάζονται μέσα σε ένα κύτταρο ξενιστή όπως ένα βακτήριο. Το DNA απομονώνεται από έναν οργανισμό-δότη, κόβεται ενζυματικά με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ενώνεται με το φορέα κλωνοποίησης και δημιουργείται ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA.

2. Τι είναι μια γονιδιοματική βιβλιοθήκη;

- α. ένα κλώνος βακτηρίων που περιέχει ένα τμήμα DNA ενός οργανισμού
- β. μια συλλογή βιβλίων για κλώνους
- γ. ένα σύνολο από κλώνους βακτηρίων που ο καθένας έχει ένα πλασμίδιο με διαφορετικό τμήμα DNA ενός οργανισμού
- δ. ένα σύνολο από περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται για να παράγουν διαφορετικούς κλώνους
- ε. τίποτε από τα παραπάνω.

Ποια είναι η σωστή απάντηση;

Η σωστή απάντηση είναι η γ.

3. Θα μπορούσε να αναπτυχθεί η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, αν ο γενετικός κώδικας δεν ήταν καθολικός; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

Με τον όρο τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA εννοούμε όλες τις τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά τμήματος DNA από έναν οργανισμό σε έναν άλλο. Το DNA που μεταφέρθηκε θέλουμε να μπορεί να παράγει στο νέο οργανισμό την ίδια πρωτεΐνη. Αυτό μπορεί να συμβεί, μόνο αν η ίδια τριπλέτα DNA καθορίζει (μέσω των κωδικονίων του mRNA) την ένταξη του ίδιου αμινοξέος στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αυτό επιτυγχάνεται, μόνο επειδή ο γενετικός κώδικας είναι καθολικός.

Το διάγραμμα παρουσιάζει ένα κομμάτι του μορίου του DNA:

- α) Να συμπληρώσετε τα κενά πλαίσια με τα γράμματα που αντιστοιχούν στις σωστές βάσεις.
- β) Να σχηματίσετε τόξα, που θα δείχνουν τους χημικούς δεσμούς που ανοίγουν, όταν γίνεται αποδιάταξη των κλώνων.
- γ) Να δώσετε την ονομασία των ενζύμων που παίζουν τον ρόλο της "κόλας" ανάμεσα στα μέρη του DNA του ίδιου κλώνου.

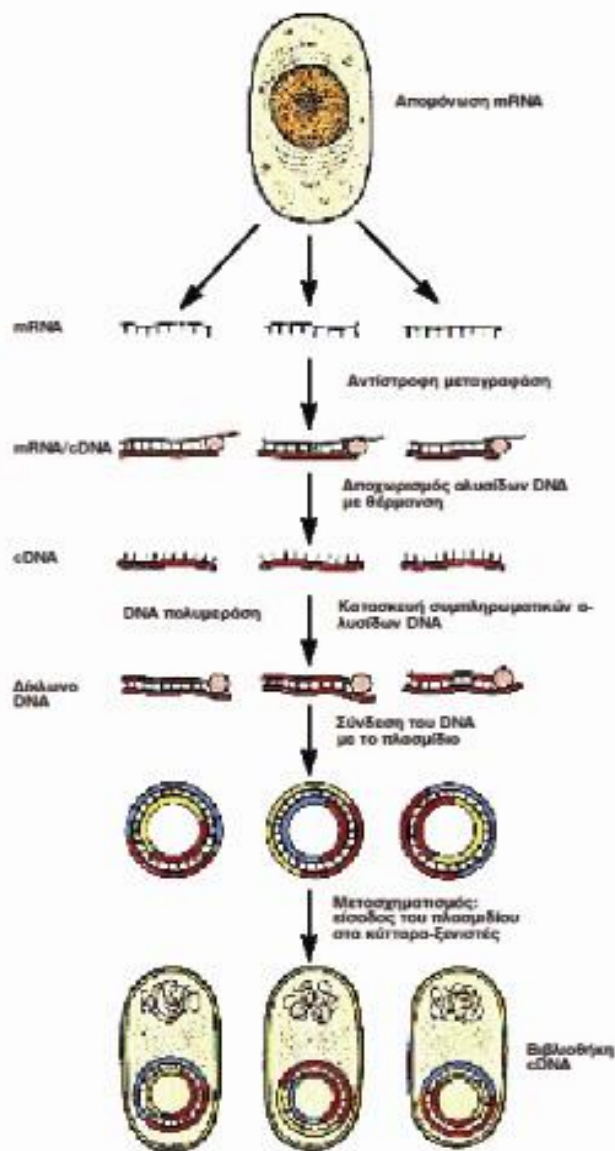


α. Συμπληρωματικότητα των βάσεων A-T και G-C

β. οι δεσμοί που ανοίγουν είναι, οι δεσμοί υδρογόνου, δύο ανάμεσα στη A και τη T και τρεις ανάμεσα στη G και C

γ. DNA δεσμάσες

4. Εξηγήστε με σχήματα πως παράγεται το cDNA και πως χρησιμοποιείται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA.



Για να κατασκευαστεί cDNA, απομονώνεται το ολικό mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο που μας ενδιαφέρει.

Το mRNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για την σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA).

Η σύνθεση του cDNA γίνεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή.

Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA-mRNA.

Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή θέρμανση και το cDNA χρησιμεύει σαν καλούπι για την σύνθεση μια συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δίκλωνου μορίου DNA.

Το δίκλωνο μόριο DNA εισάγεται σε πλασμίδιο ή βακτηριοφάγο και κλωνοποιείται.

Το cDNA περιέχει αντίγραφο του mRNA και έχει το πλεονέκτημα απομόνωσης μόνο των αλληλουχιών των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλαδή των εξωνίων. Με αυτό τον τρόπο δίνει τη δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο ξενιστή.

5. Συμπληρώστε με τις κατάλληλες λέξεις τα κενά στο κείμενο:

Το DNA κόβεται μεσε κομμάτια με γνωστό άκρα. Τα κομμάτια συνδέονται με ένα, που έχει συμπληρωματικό άκρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που λέγεται Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί από τομε τη βοήθεια του ενζύμου που ονομάζεται..... και να συνδεθεί με ένα.....Το ανασυνδυασμένο μόριο εισάγεται κατόπιν σε.....

Το DNA κόβεται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε κομμάτια με γνωστά άκρα. Τα κομμάτια συνδέονται με ένα φορέα κλωνοποίησης, που έχει συμπληρωματικά άκρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που λέγεται DNA δεσμάση.

Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί από το m-RNA με τη βοήθεια ενζύμου, που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή και να συνδεθεί με ένα φορέα κλωνοποίησης. Το ανασυνδυασμένο μόριο εισάγεται σε βακτήριο.

6. Ποια κύτταρα θα χρησιμοποιούσατε, για να κατασκευάσετε μία cDNA βιβλιοθήκη, εάν θα θέλατε να απομονώσετε το γονίδιο για την:

- α. Ινσουλίνη**
- β. Αιμοσφαιρίνη**
- γ. Αντισώματα**
- δ. Μυοσίνη**

α. Ινσουλίνη	=>	κύτταρα παγκρέατος
β. Αιμοσφαιρίνη	=>	πρόδρομα ερυθροκύτταρα
γ. Αντισώματα	=>	B λεμφοκύτταρα
δ. Μυοσίνη	=>	μυϊκά κύτταρα

7. Για ποιο λόγο για την ενσωμάτωση DNA ευκαρυωτικού οργανισμού σε πλασμίδιο χρησιμοποιείται η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, για να κόψει το πλασμίδιο και το DNA του οργανισμού;

Όπως γνωρίζουμε, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA, μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων. Έχουν απομονωθεί πολλές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες, όποτε συναντούν την ειδική αλληλουχία στο γονιδίωμα, κόβουν κάθε αλυσίδα σε συγκεκριμένη θέση αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα. Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA, που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Επομένως, η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση μπορεί και κόβει το πλασμίδιο και το DNA του οργανισμού στις ίδιες συγκεκριμένες θέσεις και έτσι δημιουργούνται σ' αυτά άκρα με συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού, αναμειγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυασμένα πλασμίδια

8. Ποιος είναι ο ρόλος των παρακάτω στις τεχνικές της Γενετικής Μηχανικής

- α. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες**
- β. Πλασμίδια**
- γ. Βακτήρια**

α. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα, που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA και κόβουν κάθε αλυσίδα του σε συγκεκριμένη θέση αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα.

β. Τα πλασμίδια είναι οι φορείς κλωνοποίησης, με τους οποίους ενώνονται τα κομμάτια του DNA από τον οργανισμό-δότη, ώστε να δημιουργηθεί το ανασυνδυασμένο μόριο DNA.

γ. Στα βακτήρια μεταφέρονται τα ανασυνδυασμένα μόρια DNA και τα μετασχηματίζουν. Κάθε βακτήριο προσλαμβάνει ένα μόνο μόριο DNA και μετά τον πολλαπλασιασμό του, δημιουργεί ένα βακτηριακό κλώνο

9. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

- α. παράγονται φυσιολογικά από ευκαρυωτικά κύτταρα**
 - β. κόβουν μονόκλωνο μόριο DNA**
 - γ. κόβουν το DNA σε πολύ εξειδικευμένες θέσεις**
 - δ. εισάγονται στα βακτήρια από τους βακτηριοφάγους**
- Ποια από τις προτάσεις α, β, γ, δ είναι σωστή;**

Η σωστή πρόταση είναι η γ.

- 10. Ποια από τις παρακάτω προτάσεις που αφορούν την DNA δεσμάση είναι λανθασμένη;**
- α. είναι ένζυμο**
 - β. είναι φυσιολογικό συστατικό των κυττάρων**
 - γ. μπορεί να ενώνει κομμάτια στο ανασυνδυνασμένο DNA**
 - δ. παίρνει μέρος στην αντιγραφή του DNA**
 - ε. ενώνει πολυπεπτίδιο.**

Η λανθασμένη πρόταση είναι η ε.

- 11. Τι είναι ή σε τι χρησιμοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR):**
- α. είναι μέθοδος εύρεσης της ακολουθίας βάσεων του DNA**
 - β. Χρησιμοποιείται, για να ανιχνεύει ένα ειδικό τμήμα DNA**
 - γ. Χρησιμοποιείται, για να παράγει μεγάλες ποσότητες ενός ειδικού τμήματος DNA**
 - δ. Χρησιμοποιείται για την χαρτογράφηση γονιδίων**

Η σωστή πρόταση είναι η γ.

- 12. Σε πείραμα Γενετικής Μηχανικής χρησιμοποιείται πλασμίδιο που έχει δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αντίστοιχα αντιβιοτικά: το ένα γονίδιο προσδίδει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη και το άλλο σε στρεπτομυκίνη. Στο πλασμίδιο αυτό εισάγεται τμήμα DNA μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας της αμπικιλίνης. Στη συνέχεια με το ανασυνδυνασμένο πλασμίδιο σχηματίζονται κύτταρα Escherichia coli, που δεν είναι ανθεκτικά και στα δύο αντιβιοτικά. Αναλύστε τον τρόπο με τον οποίο μπορούν να επιλεγούν τα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυνασμένο πλασμίδιο.**

Τα βακτήρια που περιέχουν το ανασυνδυνασμένο πλασμίδιο θα έχουν ανθεκτικότητα μόνο στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, παρουσία του οποίου αναπτύσσονται.

Τα βακτήρια που δεν περιέχουν το ανασυνδυνασμένο πλασμίδιο δεν αναπτύσσονται παρουσία ενός ή και των δύο αντιβιοτικών και τα βακτήρια που περιέχουν το πλασμίδιο χωρίς το ξένο DNA θα είναι ανθεκτικά και στα δύο αντιβιοτικά

- 13. Σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο ένα γονίδιο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης 148 αμινοξέων. Αν το ίδιο γονίδιο κλωνοποιηθεί σ' ένα βακτηριακό πλθυσμό, θα παραχθεί η ακριβής πρωτεΐνη; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.**

Δεν ξέρουμε αν θα εκφραστεί το γονίδιο.

α. Αν το γονίδιο περιέχει εσόνια, η μετάφραση του πρόδρομου mRNA που προκύπτει θα δώσει μια πρωτεΐνη με περισσότερα από 148 αμινοξέα, αφού δεν υπάρχει «διαδικασία της ωρίμανσης στο βακτηριακό κύτταρο.

β. Αν το γονίδιο δεν περιέχει εσόνια, η μετάφραση του σχηματιζόμενου mRNA θα δώσει την ακριβή πρωτεΐνη, αν δεν γίνεται αποκοπή, τμήματος της πρωτεΐνης

γ. Σε πολλές πρωτεΐνες, μετά τη σύνθεσή τους απομακρύνονται ορισμένα αμινοξέα από το αρχικό αμινοτικό τους άκρο, οπότε αν συμβεί αυτό θα πάρουμε άλλη πρωτεΐνη.

- 14. Παρατηρήθηκε ότι οι κλώνοι ενός μορίου DNA αποχωρίζονται στη θερμοκρασία των 100°C. Οι παρατηρήσεις έδειξαν ότι οι κλώνοι παραμένουν ανέπαφοι. Αυτό το φαινόμενο οι ερευνητές το ονόμασαν αποδιάταξη της νουκλεοτιδικής αλυσίδας.**
- α) Πώς δρα η θερμοκρασία στο DNA για να γίνει η αποδιάταξη των κλώνων του;**
 - β) Παρατηρήθηκε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η αποδιάταξη των κλώνων είναι φαινόμενο αντιστρεπτό. Ποια σημαντική μέθοδος για τη σύγχρονη Βιολογία ανακαλύφθηκε, που βασίζεται αφενός στην ιδιότητα της αποδιάταξης των κλώνων και αφετέρου στην ιδιότητα της επανέλιξής τους.**

α. Διασπά τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες.

β. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)