



2019 | Απρίλιος | Φάση 3 | Διαγωνίσματα Επανάληψης

ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Γ' Γενικού Λυκείου

Θετικών Σπουδών

Πέμπτη 2 Μαΐου 2019 | Διάρκεια Εξέτασης: 3 ώρες

ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

ΘΕΜΑ Α

A1: Δ, A2: Α, A3: Β, A4: Α, A5: Β

ΘΕΜΑ Β

B1.

1. Απομόνωση σωματικού κυττάρου από τον υπό κλωνοποίηση οργανισμό.
2. Απομόνωση ωαρίων από οργανισμό δότη.
3. Αφαίρεση πυρήνων ωαρίου και σωματικού κυττάρου.
4. Προσθήκη πυρήνα σωματικού κυττάρου στο απύρηνο ωάριο.
5. Εμφύτευση τροποποιημένου κυττάρου σε μήτρα παρένθετης μητέρας.
6. Κυοφορία και τοκετός κλωνοποιημένου οργανισμού.

B2. Καθώς η μητέρα έχει ομάδα αίματος Ο έχει υποχρεωτικά γονότυπο $i i$.

Το αλληλόμορφο i υπολείπεται σε σχέση με τα I^A και I^B .

Επίσης ο πατέρας με ομάδα αίματος ΑΒ έχει γονότυπο $I^A I^B$.

Κατά συνέπεια το συγκεκριμένο ζευγάρι δεν μπορεί να αποκτήσει παιδιά με ομάδες αίματος Ο ή ΑΒ. Τα μόνα παιδιά που μπορεί να αποκτήσει θα έχουν ομάδες αίματος Α ή Β (γονότυποι $I^A i$ και $I^B i$ αντίστοιχα).

Δίνεται και η αντίστοιχη διασταύρωση του ζεύγους:

$I^A I^B \times i i$

Απόγονοι: $I^A i$ και $I^B i$



Επομένως από τα τέσσερα παιδιά τα δύο με ομάδες αίματος Α και Β ανήκουν στο ζευγάρι. Από τα άλλα δύο το παιδί με ομάδα αίματος ΑΒ δεν μπορεί να έχει ως βιολογική μητέρα τη γυναίκα με ομάδα αίματος Ο και επομένως προέρχεται από υιοθεσία. Το παιδί που απομένει (ομάδα αίματος Ο) προέρχεται από προηγούμενο γάμο της μητέρας.

- B3.** Εφόσον το απλοειδές γονιδίωμα του ανθρώπου έχει μέγεθος 3×10^9 ζεύγη βάσεων, τα σωματικά κύτταρα οποιουδήποτε ανθρώπου, τα οποία είναι διπλοειδή θα έχουν μέγεθος γονιδιώματος 6×10^9 ζεύγη βάσεων (εφόσον βρίσκονται στην αρχή της μεσόφασης και δεν έχει γίνει ακόμη ο διπλασιασμός του γενετικού υλικού).

Τα κύτταρα με συνολικό μέγεθος γονιδιώματος 12×10^9 ζεύγη βάσεων είναι προφανώς σωματικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο τέλος της μεσόφασης ή στην αρχή της πρόφασης και στα οποία έχει ολοκληρωθεί ο διπλασιασμός του γενετικού υλικού.

Τέλος, τα κύτταρα με μέγεθος γονιδιώματος ενδιάμεσο των δύο προηγούμενων τιμών, είναι επίσης σωματικά κύτταρα στα οποία έχει ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής, αλλά δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμη.

- B4.**

A 4, B 1, Γ 6, Δ 8, Ε 2, ΣΤ 3, Ζ 5, Η 7.

- B5.** Σύμφωνα με τα δεδομένα της εκφώνησης το χαρακτηριστικό Χ εκφράζεται όταν παράγονται ταυτόχρονα οι παράγοντες Α και Β. Επομένως το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό θα εκφράζεται σε φυτά με γονότυπους:

AABB, AaBB, AABb και AaBb.

Τα φυτά με γονότυπους aaBB, aaBb, aabb, Aabb, AaBb δεν θα εκφράζουν το παραπάνω χαρακτηριστικό.

Κάνουμε τη διασταύρωση AaBb X AaBb:



	AB	Aβ	αB	αβ
AB	AABB	AABβ	AαBB	AαBβ
Aβ	AABβ	AAββ	AαBβ	Aαββ
αB	AαBB	AαBβ	ααBB	ααBβ
αβ	AαBβ	Aαββ	ααBβ	ααββ

Οι απόγονοι οι οποίοι εμφανίζουν γονότυπο που εκφράζει το χαρακτηριστικό X είναι συνολικά 9 και έχουν γραφεί με έντονους χαρακτήρες.

Οι απόγονοι που δεν εκφράζουν το χαρακτηριστικό είναι 7.

ΘΕΜΑ Γ

Γ1. Μελετώντας προσεκτικά τις δοσμένες αλληλουχίες παρατηρούμε πως η μόνη αλληλουχία που μπορεί να περιέχει πληροφορία για την σύνθεση εξαπεπτιδίου, είναι η αλληλουχία 2, στην οποία διαβάζοντας από αριστερά προς τα δεξιά βρίσκουμε κωδικόνιο έναρξης (AUG) και πέντε κωδικόνια μετά συναντάμε και κωδικόνιο λήξης (UAA).

Παρακάτω δίνεται η συγκεκριμένη αλληλουχία, στην οποία με έντονους χαρακτήρες έχει σημειωθεί το πλαίσιο ανάγνωσης:

GGCAAUAUGAAUGGUU**CCAACAUAAGGCACCGUU** (αλληλουχία 2)

Συνεχίζοντας τη μελέτη των αλληλουχιών, παρατηρούμε πως η αλληλουχία 4 είναι σχεδόν πανομοιότυπη με την αλληλουχία 2, εκτός από μία αντικατάσταση βάσης, η οποία έχει μετατρέψει το κωδικόνιο έναρξης (AUG) σε ACG. Κατά συνέπεια η συγκεκριμένη αλληλουχία αντιστοιχεί στην μετάλλαξη που έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία παράγωγης πεπτιδίου (καταστροφή κωδικονίου έναρξης).

Παρακάτω δίνεται η συγκεκριμένη αλληλουχία, στην οποία με έντονους χαρακτήρες έχει σημειωθεί το πλαίσιο ανάγνωσης και υπογραμμισμένο το αλλοιωμένο κωδικόνιο έναρξης:

GGCAAUAACG**AAU**GGUU**CCAACAUAAGGCACCGUU** (αλληλουχία 4)

Η αλληλουχία 6 εμφανίζει επίσης ομοιότητες με την αλληλουχία 2, αλλά δύο νουκλεοτίδια μετά το κωδικόνιο έναρξης έχει προστεθεί η αλληλουχία GAAGAA.



2019 | Απρίλιος | Φάση 3 | Διαγωνίσματα Επανάληψης

Έτσι δημιουργείται πλαίσιο ανάγνωσης μεγαλύτερο κατά δύο κωδικόνια και από την συγκεκριμένη αλληλουχία μπορεί να παραχθεί οκταπεπτίδιο:

GGCAAAUAUGAAGAAGAAAUGGUUCCAAACAUAAGGCACCGUU

(αλληλουχία 6)

(Υπογραμμισμένα δίνονται τα πρόσθετα νουκλεοτίδια).

Το rRNA το οποίο συμμετέχει στον σχηματισμό της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας, συνδέεται με την 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων. Επομένως το συγκεκριμένο μόριο θα πρέπει να έχει μία αλληλουχία η οποία να είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη με την 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA. Η αλληλουχία της 5' αμετάφραστης περιοχής του mRNA (η οποία βρίσκεται ακριβώς πριν το κωδικόνιο έναρξης) είναι η ακόλουθη: GGCAAAU. Επομένως το rRNA που συμμετέχει στον σχηματισμό της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας θα πρέπει να έχει την ακόλουθη αλληλουχία: CCGTTTA. Η συγκεκριμένη αλληλουχία εντοπίζεται στο μόριο 1, τέσσερα νουκλεοτίδια μετά το αριστερό του άκρο, και διαβάζοντας από δεξιά προς τα αριστερά, είναι σημειωμένη με έντονους χαρακτήρες:

AUAUAUUUGCCAGGCCAGCUAGCCAAUGGGCAAUUUCCG

(αλληλουχία 1)

Η μεθειονίνη είναι γνωστό πως κωδικοποιείται από την τριπλέτα 5' AUG 3', επομένως το μόριο tRNA που την μεταφέρει θα πρέπει να φέρει στην αλληλουχία του το αντικωδικόνιο με αλληλουχία 3' UAC 5'. Η συγκεκριμένη αλληλουχία εντοπίζεται μόνο στο μόριο 3 αν διαβαστεί από δεξιά προς τα αριστερά:

AUAUAUCCCAAUAGGACAUUUAGGAACCGGAAUGAGAGGA

(αλληλουχία 3)

Επομένως η συγκεκριμένη αλληλουχία αποτελεί το φυσιολογικό μόριο tRNA που μεταφέρει την μεθειονίνη.

Η τελευταία αλληλουχία που μας απομένει (αλληλουχία 5) είναι πανομοιότυπη με την αλληλουχία του μορίου 3 με μοναδική διαφορά μία αντικατάσταση βάσης που μετατρέπει το αντικωδικόνιο UAC σε CAA. Κατά συνέπεια αυτή η αλληλουχία αποτελεί το μόριο tRNA που έχει υποστεί μετάλλαξη στην αλληλουχία του αντικωδικονίου.



AUAUAUCCCAAUAGGACAAUUAGGAACCGGAAUGAGAGGA

(αλληλουχία 5)

Η αλλοιωμένη αλληλουχία σημειώνεται με έντονους χαρακτήρες.

- Γ2.** Σύμφωνα με τις προηγούμενες επιλογές μας και γνωρίζοντας πως το πλαίσιο ανάγνωσης σε ένα μόριο mRNA διαβάζεται πάντα από το 5' άκρο προς το 3' άκρο, καταλήγουμε πως οι αλληλουχίες 2, 4 και 6, οι οποίες αντιστοιχούν σε μόρια mRNA έχουν όλες προσανατολισμό 5' αριστερά και 3' δεξιά.

Αντίστοιχα οι αλληλουχίες 3 και 5 οι οποίες αντιστοιχούν σε μόρια tRNA θα πρέπει επίσης να έχουν προσανατολισμό 5' αριστερά και 3' δεξιά, έτσι ώστε τα αντικωδικόνια που υπάρχουν σε αυτά να είναι όχι μόνο συμπληρωματικά αλλά και αντιπαράλληλα με τα κωδικόνια.

Τέλος η αλληλουχία 1 η οποία αντιστοιχεί σε μόριο rRNA φέρει αλληλουχία που είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη με την 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA. Για να ισχύει το παραπάνω θα πρέπει και αυτή η αλληλουχία να έχει προσανατολισμό 5' αριστερά και 3' δεξιά.

Συμπερασματικά όλες οι δοθείσες αλληλουχίες διαβάζονται από δεξιά προς τα αριστερά:

5' AUAUAUUUGCCAGGCCAGCUAGCCAAUGGCAAAUUUCCG 3' (αλληλουχία 1)

5' GGCAAAUAUGAAAUGGUUCCAACAUAAGGCACCGUU 3' (αλληλουχία 2)

5' AUAUAUCCCAAUAGGACAAUUAGGAACCGGAAUGAGAGGA 3' (αλληλουχία 3)

5'GGCAAAUACCGAAUGGUUCCAACAUAAGGCACCGUU 3' (αλληλουχία 4)

5'AUAUAUCCCAAUAGGACAAUUAGGAACCGGAAUGAGAGGA 3' (αλληλουχία 5)

5'GGCAAAUAUGAAGAAAUGGUUCCAACAUAAGGCACCGUU3'

(αλληλουχία 6)

- Γ3.** Από τα δεδομένα της εκφώνησης (25% των απογόνων τελικά δεν επιβίωσαν), συμπεραίνουμε πως μεταξύ των αλληλόμορφων A1, A2, A3 θα πρέπει να υπάρχει ένα, το οποίο σε ομόζυγη κατάσταση να λειτουργεί ως θνησιγόνο. Έστω ότι το συγκεκριμένο αλληλόμορφο είναι το A3.

Άτομα με γονότυπο A3A3 δεν καταφέρνουν να αναπτυχθούν και επομένως δεν επιβιώνουν.



2019 | Απρίλιος | Φάση 3 | Διαγωνίσματα Επανάληψης

Τα άλλα δύο αλληλόμορφα (A1 και A2) είναι υπεύθυνα για το καφέ (A1) και για το ιώδες (A2) χρώμα. Τα δύο αυτά αλληλόμορφα θα πρέπει να είναι επικρατή σε σχέση με το A3 και μεταξύ τους να εμφανίζουν σχέση συνεπικράτησης. Οπότε ο γονότυπος A1A2 να δίνει απογόνους με καφέ χρώμα και ιώδεις ρίγες (ταυτόχρονη έκφραση και των δύο χαρακτήρων). Επίσης οι γονότυποι A1A1 και A1A3 θα δίνουν καφέ χρώμα, και οι γονότυποι A2A2 και A2A3 θα δίνουν ιώδες χρώμα.

- Γ4.** Τα φυτά που διασταυρώθηκαν έχουν φαινότυπους καφέ και ιώδεις αντίστοιχα. Στους απογόνους όμως εμφανίζονται φυτά λευκά, φυτά καφέ με ιώδεις ρίγες, καθώς και φυτά με τους φαινότυπους των γονέων τους. Επίσης το ένα τέταρτο των απογόνων τελικά δεν επιβιώνει.

Κατά συνέπεια ως προς τα αλληλόμορφα X, x τα οποία καθορίζουν την σύνθεση του προϊόντος X, τα δύο φυτά της πατρικής γενιάς θα πρέπει να είναι ετερόζυγα και να έχουν γονότυπο Xx (παρουσία απόγονων με λευκό χρώμα ανθούς).

Επίσης οι δύο γονείς θα πρέπει να είναι ετερόζυγοι και ως προς το θνησιγόνο αλληλόμορφο A3, καθώς υπάρχουν απόγονοι που δεν επιβιώνουν. Επομένως οι γονείς θα έχουν γονότυπους A1A3 ο καφέ και A2A3 ο ιώδης.

Συνολικά οι γονότυποι των γονέων θα είναι:

XxA1A3 και XxA2A3

- Γ5.** Προκείμενου να επαληθεύσουμε τις παραπάνω παραδοχές μας θα κάνουμε την διασταύρωση και τον πίνακα Punnett.

XxA1A3 X XxA2A3

	XA1	xA1	XA3	xA3
XA2	XXA1A2	XxA1A2	XXA2A3	XxA2A3
xA2	XxA1A2	xxA1A2	XxA2A3	xxA2A3
XA3	XXA1A3	XxA1A3	XXA3A3	XxA3A3
xA3	XxA1A3	xxA1A3	XxA3A3	xxA3A3



2019 | Απρίλιος | Φάση 3 | Διαγωνίσματα Επανάληψης

Οι απόγονοι με γονότυπο A3A3 ανεξαρτήτως του γονότυπου για το αλληλόμορφο X δεν επιβιώνουν (σκιασμένα κελιά) και αποτελούν το 25% των συνολικών απογόνων (4/16).

Οι απόγονοι με γονότυπο χχ ανεξαρτήτως του γονότυπου για τα αλληλόμορφα A εμφανίζουν λευκό φαινότυπο (μαύρα κελιά, 3/16).

Οι απόγονοι με γονότυπο ΧΧΑ1Α3 ή ΧχΑ1Α3 εμφανίζουν καφέ φαινότυπο (3/16).

Οι απόγονοι με γονότυπο ΧΧΑ2Α3 ή ΧχΑ2Α3 εμφανίζουν ιώδη φαινότυπο (3/16 επίσης).

Τέλος οι απόγονοι με γονότυπο ΧΧΑ1Α2 ή ΧχΑ1Α2 εμφανίζουν φαινότυπο καφέ με ιώδεις ρίγες (3/16 επίσης).

Καθώς τα αποτελέσματα της διασταύρωσης είναι συμβατά με τα δεδομένα της εκφώνησης οι παραδοχές μας επαληθεύονται.

ΘΕΜΑ Δ

Δ1. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αποτελούν φυσιολογικό συστατικό των βακτηρίων, από τα οποία και απομονώνονται. Ο ρόλος τους είναι να καταστρέφουν ξένα μόρια DNA που πιθανά προσβάλλουν το συγκεκριμένο κύτταρο. Το παραπάνω το επιτυγχάνουν καθώς αναγνωρίζουν και κόβουν συγκεκριμένες αλληλουχίες 4 - 8 ζευγών βάσεων με ασύμμετρο τρόπο, δημιουργώντας μονόκλινα άκρα.

Δ2. Με δεδομένο πως τα μόρια από τα οποία προέρχονται τα παραπάνω γονίδια δεν φέρουν ελεύθερα υδροξύλια, συμπεραίνουμε πως τα μόρια αυτά είναι όλα κυκλικά. Καθώς κυκλικά μόρια DNA δεν συναντώνται στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων, αλλά μόνο σε μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες, είναι προφανές πως τα συγκεκριμένα γονίδια αποτελούν είτε μιτοχονδριακό γενετικό υλικό, είτε γενετικό υλικό των χλωροπλάστων. Να σημειώσουμε πως χλωροπλάστες υπάρχουν μόνο σε φυτικά κύτταρα.



Η προέλευση των παραπάνω γονιδίων εξηγεί και γιατί δεν περιέχουν εσώνια στις αλληλουχίες τους. Συνήθως εσώνια υπάρχουν στα γονίδια που εντοπίζονται στο πυρηνικό γενετικό υλικό και όχι στα γονίδια που εντοπίζονται στα παραπάνω οργανίδια.

- Δ3.** Για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την αλληλουχία των πεπτιδίων που παράγονται από τα δεδομένα γονίδια, πρέπει αρχικά να εντοπίσουμε πλαίσιο ανάγνωσης σε καθένα από αυτά.

Έχοντας λοιπόν κατά νου τα χαρακτηριστικά του γενετικού κώδικα (τριαδικός συνεχής, μη επικαλυπτόμενος, εκφυλισμένος κ.τ.λ.) και με δεδομένο πως η ανάγνωση σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να γίνει από το 5' προς το 3' άκρο, καταλήγουμε στα παρακάτω:

Γονίδιο 1: 3'CTTAAGGCACCGATGGTAAACCCGTACCGAGCATATGC5'

5'GAATTCCGTGCTACCAATTTGGGCATGGCTCGTATACG3'

Μετά από προσεκτική παρατήρηση και των δύο αλυσίδων του γονιδίου, εντοπίζουμε στην πρώτη αλυσίδα (κέντρο προς δεξιά) κωδικόνιο έναρξης ATG, και διαβάζοντας προς τα αριστερά ανά τριάδες, εντοπίζουμε και κωδικόνιο λήξης τέσσερις τριάδες μετά. Στην αλληλουχία του γονιδίου τα κωδικόνια έναρξης και λήξης δίνονται υπογραμμισμένα. Η αλληλουχία του πλαισίου ανάγνωσης είναι:

5'ATGCCCAAATGGTAG3'

Συνοψίζοντας η κωδική αλυσίδα του γονιδίου είναι η πρώτη και έχει προσανατολισμό: 5' δεξιά και 3' αριστερά. Αντίστοιχα η μεταγραφόμενη αλυσίδα (δεύτερη αλυσίδα) έχει προσανατολισμό 5' αριστερά και 3' δεξιά.

Μετατρέπουμε την αλληλουχία του πλαισίου ανάγνωσης στην κωδική αλυσίδα σε αλληλουχία mRNA, καθώς το παραγόμενο mRNA έχει ίδιο προσανατολισμό και παρόμοια αλληλουχία με την κωδική αλυσίδα του γονιδίου (μόνη διαφορά η αλλαγή της θυμίνης σε ουρακίλη):

5'AUGCCCAA AUGGUAG 3'

Με τη χρήση του γενετικού κώδικα η αλληλουχία του πεπτιδίου που παράγεται είναι:



2019 | Απρίλιος | Φάση 3 | Διαγωνίσματα Επανάληψης

H₂N - μεθειονίνη - προλίνη - λυσίνη - τρυπτοφάνη - COOH

Εργαζόμενοι με τον ίδιο τρόπο στο γονίδιο 2:

Γονίδιο 2: 5'CTTAAGCCAGCATGTGGAGATTTCCATAACCGCAATTG3

3'GAATTCGGTCGTACACCTCTAAAGGTATTTGGCGTTAAC5'

προκύπτει πως το πλαίσιο ανάγνωσης εντοπίζεται στην πρώτη αλυσίδα (υπογραμμισμένα τα κωδικόνια έναρξης και λήξης) και διαβάζεται από αριστερά προς τα δεξιά (εδώ παράγεται πενταπεπτίδιο). Προσανατολισμός αλυσίδων:

Κωδική η αλυσίδα 1 με προσανατολισμό 5' αριστερά, 3' δεξιά και αντίστοιχα μεταγραφόμενη η αλυσίδα 2 με προσανατολισμό 3' αριστερά και 5' δεξιά.

Πλαίσιο ανάγνωσης:

5'ATGTGGAGATTTCCATAA3'

Παραγόμενο mRNA:

5'AUGUGGAGAUUUCCAUA3'

Με χρήση του γενετικού κώδικα το πεπτίδιο που παράγεται είναι:

H₂N - μεθειονίνη - τρυπτοφάνη - αργινίνη - φαινυλαλανίνη - προλίνη - COOH.

Γονίδιο 3: GAATTCCCCGATGATGCCCGAGGTGTGACCGCGGTATACC

CTTAAGGGCGCTACTACGGGCTCCACACTGGCGCCATATGG

Εργαζόμενοι με τον ίδιο τρόπο καταλήγουμε στα ακόλουθα:

Κωδική αλυσίδα η πρώτη με προσανατολισμό 5' αριστερά και 3' δεξιά. Μεταγραφόμενη αλυσίδα η δεύτερη με προσανατολισμό 3' αριστερά και 5' δεξιά.

Πλαίσιο ανάγνωσης:

5'ATGATGCCCGAGGTGTGA3'

Παραγόμενο mRNA:

5'AUGAUGCCCGAGGUGUGA3'

Παραγόμενο πεπτίδιο:

H₂N - μεθειονίνη - μεθειονίνη - προλίνη - γλουταμινικό οξύ - βαλίνη - COOH.



Γονίδιο 4: 5'GGTATATCCGCGGACTAGGGCCATGGCGCTATCATGCTTCCTTAAG3'
3'CCATATGGCGCCTGATCCCGGTACCGCGATAGTACGAAGGAATTC5'

Εργαζόμενοι με τον ίδιο τρόπο καταλήγουμε στα ακόλουθα:

Κωδική αλυσίδα η δεύτερη με προσανατολισμό 5' δεξιά και 3' αριστερά.
Μεταγραφόμενη αλυσίδα η πρώτη με προσανατολισμό 5' αριστερά και 3' δεξιά.

Πλαίσιο ανάγνωσης:

5'ATGATAGCGCCATGGCCCTAG3'

Παραγόμενο mRNA:

5'AUGAUAGCGCCAUGGCCCUAG3'

Παραγόμενο πεπτίδιο:

H₂N-μεθειονίνη-ισολευκίνη-αλανίνη-προλίνη-τρυπτοφάνη-προλίνη-COOH.

Σημειώνεται πως οι αλληλουχίες των παραγόμενων RNA αφορούν μόνο το πλαίσιο ανάγνωσης και όχι τις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές.

Δ4.

Γονίδιο 1: 3'CTTAAGGCACGATGGTAAACCCGTACCGAGCATATGC5'
5'GAATTCGTGCTACCATTTGGGCATGGCTCGTATACG3'

Οι αλληλουχίες αναγνώρισης που υπάρχουν στο συγκεκριμένο γονίδιο φαίνονται παραπάνω με έντονους χαρακτήρες και είναι: α) στην αριστερή μεριά της σελίδας η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI:

3' CTTAAG5'

5'GAATTC3'

β) Στη δεξιά μεριά της σελίδας η αλληλουχία αναγνώρισης για την ενδονουκλεάση B:

3' GCATATGC 5'

5'CGTATACG 3'



Και οι δύο αλληλουχίες βρίσκονται εκτός του πλαισίου ανάγνωσης. Συγκεκριμένα η αλληλουχία αναγνώρισης της EcoRI βρίσκεται μετά το κωδικόνιο λήξης και η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης B βρίσκεται πριν από το κωδικόνιο έναρξης.

Γονίδιο 2: 5' **CTTAAGCCAGCATG**TGGAGATTTCCATA**AACCGCAATTG**3
3' **GAATTCGGT**CGTACACCTCTAAAGGTATTGGCG**TTAAC**5'

Οι αλληλουχίες αναγνώρισης που υπάρχουν στο συγκεκριμένο γονίδιο φαίνονται παραπάνω με έντονους χαρακτήρες και είναι: α) στην αριστερή μεριά της σελίδας η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης Δ:

5' CTTAAG 3'

3' GAATTC 5'

και β) στην δεξιά μεριά της σελίδας βρίσκεται η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης Γ:

5' CAATTG 3'

3' GTTAAC 5'

Η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης Δ βρίσκεται πριν από το κωδικόνιο έναρξης και αντίστοιχα η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης Γ βρίσκεται μετά το κωδικόνιο λήξης.

Όπως και στην περίπτωση του γονιδίου 1 και οι δύο αλληλουχίες αναγνώρισης βρίσκονται εκτός του πλαισίου ανάγνωσης.

Γονίδιο 3:

5' **GAATTC**CCGCGATGATGCCCGAGGTGTG**ACCGCGGTATACC**3'

3' **CTTAAG**GGCGCTACTACGGGCTCCACACTGGCG**CCATATGG**5'

Οι αλληλουχίες αναγνώρισης που υπάρχουν στο συγκεκριμένο γονίδιο φαίνονται παραπάνω με έντονους χαρακτήρες και είναι: α) στην αριστερή μεριά της αλυσίδας σελίδας η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI:



5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5'

και β) στη δεξιά μεριά της σελίδας βρίσκεται η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης A:

5'GGTATACC 3'

3'CCATATGG 5'

Όπως φαίνεται και σε αυτή την περίπτωση οι δύο αλληλουχίες αναγνώρισης βρίσκονται εκτός του πλαισίου ανάγνωσης και συγκεκριμένα: η αλληλουχία αναγνώρισης της EcoRI βρίσκεται αριστερά της σελίδας, δηλαδή πριν το κωδικόνιο έναρξης, ενώ η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης A βρίσκεται στα δεξιά της σελίδας μετά το κωδικόνιο λήξης.

Γονίδιο 4: 5'**GGTATATCCGCGGACTAGGGCCATGGCGCTATCATGCTTCCTTAAG**3'

3'**CCATATGGCGCCTGATCCCGGTACCGGATAGTACGAAGGAATTC**5'

Οι αλληλουχίες αναγνώρισης που υπάρχουν στο συγκεκριμένο γονίδιο φαίνονται παραπάνω με έντονους χαρακτήρες και είναι: α) στην αριστερή μεριά της σελίδας η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης A:

5'GGTATACC 3'

3'CCATATGG 5'

και β) στην δεξιά μεριά της σελίδας βρίσκεται η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης Δ:

5'CTTAAG 3'

3'GAATTC 5'

Όπως φαίνεται και σε αυτή την περίπτωση οι δύο αλληλουχίες αναγνώρισης βρίσκονται εκτός του πλαισίου ανάγνωσης και συγκεκριμένα: η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης A βρίσκεται μετά το κωδικόνιο λήξης στα αριστερά της σελίδας, ενώ η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης Δ βρίσκεται στα δεξιά της αλυσίδας (σελίδας) πριν από το κωδικόνιο έναρξης.



Δ5. Και οι πέντε ενδονουκλεάσες που δίνονται έχουν θέσεις αναγνώρισης μέσα στο πλασμίδιο και συγκεκριμένα είτε μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (A, Δ, E), είτε λίγο μετά το τέλος αυτής (Γ, B).

Επίσης από προσεκτική παρατήρηση των αλληλουχιών αναγνώρισης βλέπουμε πως η EcoRI και η ενδονουκλεάση Γ παρότι έχουν διαφορετικές αλληλουχίες αναγνώρισης δημιουργούν τα ίδια μονόκλωνα άκρα. Το ίδιο ισχύει και για τις ενδονουκλεάσες A και B. Η παραπάνω παρατήρηση είναι πολύ σημαντική καθώς μας δίνει τη δυνατότητα να ανασυνδυάσουμε μόρια DNA τα οποία έχουν επωαστεί με δύο διαφορετικές ενδονουκλεάσες (EcoRI και Γ ή A και B αντίστοιχα).

Όσον αφορά τη δυνατότητα ανασυνδυασμού έχουμε τις παρακάτω επιλογές ανά γονίδιο:

Γονίδιο 1: Όπως έχουμε αναφέρει έχει θέσεις αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες B και EcoRI, επομένως μπορεί να ανασυνδυαστεί με το πλασμίδιο ως εξής:

Είτε χρησιμοποιώντας τις δύο παραπάνω ενδονουκλεάσες, όποτε θα απομακρυνθεί από το πλασμίδιο το τμήμα μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης των δύο ενδονουκλεασών και το γονίδιο 1 θα ενσωματωθεί στο πλασμίδιο με τέτοιο τρόπο, ώστε το κωδικόνιο έναρξης να βρεθεί προς τη μεριά του υποκινητή του γονιδίου ανθεκτικότητας της αμπικιλίνης και το κωδικόνιο λήξης προς την αντίθετη κατεύθυνση. Εναλλακτικά, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις δύο παραπάνω ενδονουκλεάσες για το γονίδιο και για το πλασμίδιο να χρησιμοποιήσουμε τις ενδονουκλεάσες Γ (αντί για EcoRI) και A (αντί για B) (έχουμε αναφέρει παραπάνω για τα ίδια μονόκλωνα άκρα). Σε αυτήν την περίπτωση το γονίδιο θα ενσωματωθεί με αντίθετο προσανατολισμό από ότι στην πρώτη (το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου θα βρεθεί προς τη μεριά του υποκινητή). Είναι αυτονόητο πως υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε για το πλασμίδιο και τους παρακάτω συνδυασμούς: Γ και B ή EcoRI και A, όποτε θα έχουμε και αντίστοιχα λάθος και σωστό προσανατολισμό. (Ως σωστός προσανατολισμός θεωρείται και θα αναφέρεται στο έξης αυτός που έχει σαν αποτέλεσμα το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου να βρεθεί προς το μέρος του υποκινητή. Αντίστοιχα, λάθος θα θεωρείται ο αντίθετος προσανατολισμός).



Γονίδιο 2: Όπως έχουμε αναφέρει έχει θέσεις αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες Δ και Γ, επομένως μπορεί να ανασυνδυαστεί με το πλασμίδιο ως εξής:

Είτε χρησιμοποιώντας τις δύο παραπάνω ενδονουκλεάσες, όποτε θα απομακρυνθεί από το πλασμίδιο το τμήμα μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης των δύο ενδονουκλεασών και το γονίδιο 2 θα ενσωματωθεί στο πλασμίδιο με σωστό προσανατολισμό. Εναλλακτικά, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την EcoRI αντί για την ενδονουκλεάση Γ οπότε και πάλι θα έχουμε ενσωμάτωση με σωστό προσανατολισμό.

Γονίδιο 3: Όπως έχουμε αναφέρει έχει θέσεις αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και A επομένως μπορεί να ανασυνδυαστεί με το πλασμίδιο ως εξής:

Είτε χρησιμοποιώντας τις δύο παραπάνω ενδονουκλεάσες, οπότε θα απομακρυνθεί από το πλασμίδιο το τμήμα μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης των δύο ενδονουκλεασών και το γονίδιο 3 θα ενσωματωθεί στο πλασμίδιο με τέτοιο τρόπο ώστε το κωδικόνιο έναρξης να βρεθεί προς την μεριά του υποκινητή του γονιδίου ανθεκτικότητας της αμικιλίνης και το κωδικόνιο λήξης προς την αντίθετη κατεύθυνση. Εναλλακτικά, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις δύο παραπάνω ενδονουκλεάσες για το γονίδιο και για το πλασμίδιο να χρησιμοποιήσουμε τις ενδονουκλεάσες Γ (αντί για EcoRI) και Β (αντί για Α) (έχουμε αναφέρει παραπάνω για τα ίδια μονόκλωνα άκρα). Σε αυτή την περίπτωση το γονίδιο θα ενσωματωθεί με αντίθετο προσανατολισμό από ότι στην πρώτη περίπτωση (το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου θα βρεθεί προς την μεριά του υποκινητή). Είναι αυτονόητο πως υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε για το πλασμίδιο και τους παρακάτω συνδυασμούς: Γ και Α ή EcoRI και Β, οπότε θα έχουμε και αντίστοιχα λάθος και σωστό προσανατολισμό.

Γονίδιο 4: Όπως έχουμε αναφέρει έχει θέσεις αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες Δ και Α, επομένως μπορεί να ανασυνδυαστεί με το πλασμίδιο ως εξής:

Είτε χρησιμοποιώντας τις δύο παραπάνω ενδονουκλεάσες, όποτε θα απομακρυνθεί από το πλασμίδιο το τμήμα μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης των δύο ενδονουκλεασών και το γονίδιο 4 θα ενσωματωθεί στο πλασμίδιο με τέτοιο τρόπο ώστε το κωδικόνιο έναρξης να βρεθεί προς την μεριά του υποκινητή του γονιδίου ανθεκτικότητας της αμικιλίνης και το κωδικόνιο λήξης προς την



αντίθετη κατεύθυνση. Εναλλακτικά, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις δύο παραπάνω ενδονουκλεάσες για το γονίδιο και για το πλασμίδιο να χρησιμοποιήσουμε τις ενδονουκλεάσες Δ και Β (αντί για Α) (έχουμε αναφέρει παραπάνω για τα ίδια μονόκλωνα άκρα). Σε αυτή την περίπτωση το γονίδιο θα ενσωματωθεί με αντίθετο προσανατολισμό από ότι στην πρώτη περίπτωση (το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου θα βρεθεί προς την μεριά του υποκινητή).

Είναι προφανές πως παραγωγή πεπτιδίου είναι δυνατόν να συμβεί μόνο στις περιπτώσεις κατά τις οποίες έχει συμβεί ενσωμάτωση με σωστό προσανατολισμό (κωδικόνιο έναρξης προς την μεριά του υποκινητή του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη). Αυτό ισχύει καθώς για να ξεκινήσει η μεταγραφή πρέπει ο υποκινητής να βρίσκεται πριν από την θέση έναρξης της μεταγραφής (5' άκρο κωδικής αλυσίδας, όπου βρίσκεται και το κωδικόνιο έναρξης), ώστε να είναι δυνατή η σύνδεσή του με την RNA πολυμεράση και να ξεκινήσει η διαδικασία.

Δ6. Όπως έχει ήδη αναφερθεί για να εκφραστούν τα γονίδια που μελετάμε πρέπει το κωδικόνιο έναρξης να βρίσκεται προς τη μεριά του υποκινητή του πλασμιδίου.

Επομένως, συνοψίζοντας ανά γονίδιο, πεπτίδιο θα παραχθεί στους παρακάτω συνδυασμούς ενδονουκλεασών:

Γονίδιο 1: EcoRI και Β και πλασμίδιο με Γ και Α ή EcoRI και Α

Γονίδιο 2: Δ και Γ και πλασμίδιο με Δ και Γ ή EcoRI και Δ

Γονίδιο 3: EcoRI και Α και πλασμίδιο με Γ και Β ή EcoRI και Β

Γονίδιο 4: Δ και Α και πλασμίδιο με Δ και Β.