

4.1

α. Οι ερευνητές θα πρέπει να κατασκευάσουν cDNA βιβλιοθήκη για να κλωνοποιήσουν και να εκφράσουν την πρωτεΐνη GFP στα βακτήρια. Η πρωτεΐνη GFP εκφράζεται φυσιολογικά σε ευκαρυωτικό οργανισμό και συνεπώς, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή είναι πιθανότατα ασυνεχές (ή διακεκομμένο), δηλαδή περιέχει εσώνια. Έτσι, το mRNA που παράγεται κατά τη μεταγραφή του γονιδίου αυτού δεν είναι έτοιμο να μεταφραστεί αμέσως, αλλά πρέπει να υποστεί ωρίμανση, έναν μηχανισμό που δεν διαθέτουν τα βακτήρια ως προκαρυωτικοί οργανισμοί. Εάν οι ερευνητές εισήγαγαν το γονίδιο της GFP στα βακτήρια κατά τη διαδικασία κατασκευής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, τα βακτήρια δεν θα παρήγαγαν σωστά τη πρωτεΐνη (δεν θα ήταν λειτουργική) επειδή δεν διαθέτουν το μηχανισμό ωρίμανσης του mRNA. Επίσης, μπορεί να μεταφερόταν στα βακτήρια τμήμα του γονιδίου και όχι ολόκληρο. Συνεπώς, τα βακτήρια δεν θα φθόριζαν με πράσινο χρώμα. Για να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, οι ερευνητές μπορούν να κατασκευάσουν cDNA βιβλιοθήκη, στην οποία το προς κλωνοποίηση γονίδιο της GFP θα φέρει μόνο τα εξώνια, εφόσον βασίζεται στην απομόνωση ώριμου mRNA από τα κύτταρα της μέδουσας.

Τα ένζυμα που θα χρειαστούν είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, η DNA πολυμεράση και η DNA δεσμάση.

β. Η περιοριστική ενδονουκλεάση που πρέπει να χρησιμοποιήσουν είναι η BamHI. Η BamHI κόβει μια φορά το πλασμίδιο εσωτερικά του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη, ενώ παραμένει άθικτο το άλλο γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, κάτι που θα βοηθήσει τους ερευνητές κατά τη διαδικασία επιλογής των βακτηριακών κλώνων. Απορρίπτεται η HindIII, επειδή κόβει το πλασμίδιο σε δύο σημεία και η EcoRI γιατί κόβει στη θέση έναρξης της αντιγραφής, άρα θα χαθεί η δυνατότητα αντιγραφής του πλασμιδίου στα βακτήρια, και συνεπώς, η κλωνοποίηση του γονιδίου.

4.2

α. Σε μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα, πάντα το τελευταίο της νουκλεοτίδιο έχει ελεύθερο το υδροξύλιο του 3' άνθρακα της πεντόζης του. Άρα, η κατεύθυνση της

μητρικής αλυσίδας είναι I- 5' → 3' -II. Η αλυσίδα DNA που θα σχηματιστεί μετά την ολοκλήρωση της αντιγραφής θα είναι συμπληρωματική και αντιπαράλληλη της αλυσίδας που αντιγράφεται με ασυνεχή τρόπο και θα έχει την εξής αλληλουχία:

3' ..CTTGGACGCATTGCTTGATTACTCCTAATCGTGTTACGCGTT...5'.

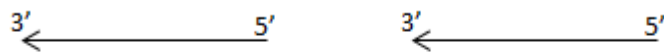
β. Η αντιγραφή γίνεται με προσανατολισμό 5' → 3'. Τα κομμάτια της ασυνεχούς αλυσίδας θα έχουν τον παρακάτω προσανατολισμό:



5'.. GAACCTGCGTAACGA**ACTAATGAGGATTAGCAC**AATGCGCAA...3'

Το 1ο πρωταρχικό τμήμα είναι αυτό που βρίσκεται πλησιέστερα στη θέση έναρξης της αντιγραφής, άρα η θέση έναρξης της αντιγραφής είναι η I.

γ. Στη συγκεκριμένη αλυσίδα, τα πρωταρχικά τμήματα ξεκινούν να σχηματίζονται στις θέσεις που δόθηκαν με έντονα γράμματα από την εκφώνηση και θα έχουν μήκος πέντε νουκλεοτιδίων.



5'.. GAACCTGCGT**AACGA**ACTAATGAGGATT**AGCAC**AATGCGCAA...3'

Επειδή είναι συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα ως προς τη μητρική αλυσίδα του DNA, και αποτελούνται από ριβονουκλεοτίδια, θα έχουν τις εξής αλληλουχίες βάσεων: 5'-UCGUU- 3' και 5'-GUGCU- 3'.

Το ένζυμο που συνθέτει τα πρωταρχικά τμήματα κατά τη διαδικασία της αντιγραφής είναι το πριμόσωμα.