

4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΣΚΗΣΕΩΝ

A. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΚΡΙΣΕΩΣ

1. Ασκήσεις στις οποίες ζητείται να απαντήσουμε στο αν μία περιοριστική ενδονουκλεάση (π.ε) κόβει σε ένα δοσμένο τμήμα ή όχι.

Απάντηση: Αφού ανιχνεύσουμε την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου, ελέγχουμε προσεχτικά αν έχει την κατάλληλη πολικότητα.

2. Ασκήσεις στις οποίες ζητείται να επιλέξουμε την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση για συγκεκριμένο φορέα κλωνοποίησης και συγκεκριμένη ξενιστή.

Απάντηση: Επιλέγουμε την π.ε η οποία τηρεί τις παρακάτω προϋποθέσεις:
α) δεν κόβει εσωτερικά το προς κλωνοποίηση τμήμα,
β) δεν κόβει την Θ.Ε.Α του φορέα,
γ) παράγεται από τον ξενιστή που θα χρησιμοποιήσουμε για να είμαστε σίγουροι ότι δεν θα κόψει το γονιδίωμά του,
δ) αν είναι δυνατόν αποφεύγουμε π.ε που να κόβει εσωτερικά σε γονίδιο ανθεκτικότητας, σε αντιβιοτικό.

3. Ασκήσεις στις οποίες πρέπει να επιλέξουμε μια μέθοδο για να κλωνοποιήσουμε ένα τμήμα DNA.

Απάντηση: α) εάν η αλληλουχία δεν περιέχεται στο ώριμο mRNA τότε επιλέγουμε γονιδιωματική (υποκινητές, αλληλουχίες, λοξής μεταγρ., εσώνια)
β) εάν η αλληλουχία περιέχεται στο ώριμο mRNA (3'-5' αμετάφραστες περιοχές, κωδικοποιούσα περιοχή) τότε επιλέγω

cDNA βιβλιοθήκη.

- γ) εάν ένα συγκεκριμένο τμήμα πρέπει να το αντιγράψουμε πάρα πολλές φορές, χωρίς να έχουμε στη διάθεσή μας ζωντανό οργανισμό επιλέγουμε PCR.

4. Ασκήσεις στις οποίες πρέπει να επιλέξουμε τον κατάλληλο ανιχνευτή.

Απάντηση: Ο ανιχνευτής που θα επιλέξουμε πρέπει να είναι σημασμένος και να είναι συμπληρωματικός με αντιπαράλληλα άκρα στο τμήμα που ψάχνουμε.

ΠΡΟΣΟΧΗ! Δεν χρειάζεται να είναι σε όλο το μήκος συμπληρωματικός και αντιπαράλληλος, αρκεί σε ένα τμήμα του.

B. ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ

1. Διαχωρισμός μετασχηματισμένων βακτηρίων από τα μη μετασχηματισμένα.

Απάντηση: α) εάν ο φορέας μας έχει γονίδιο ανθεκτικότητας αντιβιοτικό, το οποίο δεν έχει κοπεί χορηγούμε το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.
β) εάν το τμήμα έχει εισαχθεί μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας, τότε εισάγουμε 2^ο γονίδιο ανθεκτικότητας το οποίο ενσωματώνουμε πρώτα στο προς κλωνοποίηση τμήμα.

2. Διαχωρισμός μετασχηματισμένων βακτηρίων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί σε μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Απάντηση: Μαζί με το προς κλωνοποίηση τμήμα εισάγουμε γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, που δεν υπήρχε αρχικά ούτε στον φορέα ούτε στο κυρίως γενετικό υλικό του ξενιστή.

3. Ειδική Περίπτωση: επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στο οποίο το τμήμα του δότη έχει εισαχθεί εντός γονιδίου ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό και παράλληλα δεν έχουμε τη δυνατότητα να εισάγουμε 2^ο γονίδιο ανθεκτικότητας.

Απάντηση: Παίρνουμε μικρό δείγμα βακτηρίων από κάθε κλώνο και το τοποθετούμε στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, το γονίδιο ανθεκτικότητας του οποίου έχει “χαλάσει” μετά την είσοδο του ξένου DNA. Τα βακτήρια τα οποία πεθαίνουν προέρχονται από κλώνο, όπου έχει πετύχει και ο ανασυνδυασμός και ο μετασχηματισμός.

Γ. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ PCR

ΠΡΟΣΟΧΗ!!!

- Όταν μας ζητείται από την άσκηση συγκεκριμένο πλήθος αντιγράφων, εμείς κάνουμε τόσους κύκλους μέχρι να καλύψουμε το ζητούμενο αριθμό προσέχοντας ότι σε κάθε κύκλο η ποσότητα των
- Εάν ξεκινήσουμε από n αντίγραφα και κάνουμε x κύκλους αντιγραφής, το συνολικό πλήθος αντιγράφων στο τέλος θα είναι $n \cdot 2^x$, όπου αυτό θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο ή ίσο από το ζητούμενο αριθμό αντιγράφων.

ΠΡΟΣΟΧΗ!!!

Οι υπολογισμοί που κάνουμε για να βρούμε δ.υ, φ.δ, συνολικά νουκλεοτίδια κ.ά, πρώτα γίνονται στο ένα τμήμα και έπειτα αναλογικά στο σύνολο των τμημάτων

Δ. ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ , cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

1. Ασκήσεις στις οποίες ζητείται ο αριθμός των κομματιών που θα προκύψουν μετά τη δράση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης ή περισσοτέρων.

Απάντηση: i) εάν το μόριο είναι κυκλικό τότε το πλήθος των τμημάτων που προκύπτουν είναι ίσο με το πλήθος των θέσων που αναγνωρίζουν τα ένζυμα.
ii) εάν το μόριο είναι ευθύγραμμο, τα τμήματα που προκύπτουν είναι κατά 1 περισσότερα από τις θέσεις αναγνώρισης.

2. Ασκήσεις στις οποίες ζητείται να υπολογίσουμε ποσοστό ή ποσό βάσεων σε τμήματα που προκύπτουν μετά τη δράση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης.

Απάντηση: Χρησιμοποιούμε τον κανόνα της συμπληρωματικότητας προσέχοντας τα άκρα που προκύπτουν σε κάθε τμήμα μετά τη δράση του ενζύμου. Προσέχουμε δηλαδή ότι δεν είναι όλες οι βάσεις συμπληρωματικές.