

✚ Θέμα 1

Το DNA που απομονώσατε στην προηγούμενη άσκηση έχει συγκέντρωση 5ng/μl. Θέλετε να ετοιμάσετε μια PCR, η οποία να περιέχει 2,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs each, 2units Taq πολυμεράση, 2X PCR Buffer και 0,5 μM από κάθε εκκινητή. Σχεδιάστε μια PCR τελικού όγκου 50μl στην οποία να έχετε 80 ng DNA, ενώ τα αρχικά στοκ που έχετε στη διάθεσή σας είναι: 10X PCR buffer, 25mM MgCl₂, 2,5mM dNTPs each, 3units/μl Taq και 5μM από κάθε εκκινητή.

✚ Θέμα 2

Έστω ότι το διάλυμα DNA που απομονώσατε στην προηγούμενη άσκηση έχει όγκο 200 μl. Πόσα μl αιθανόλης 100% και πόσα μl NaCl 5M πρέπει να χρησιμοποιήσετε για να κάνετε κατακρήμνιση; Σας δίνεται ότι το NaCl πρέπει να έχει τελική συγκέντρωση στο υδατικό διάλυμα 0,2M, ενώ η αιθανόλη πρέπει να έχει συγκέντρωση 70% στο τελικό διάλυμα. (15 μονάδες)

✚ Θέμα 3

Θέλετε να κλωνοποιήσετε ένα τμήμα DNA που έχει μέγεθος 0,5kb στο φορέα κλωνοποίησης pGEM, ο οποίος έχει μέγεθος 3kb. Πόσο DNA πρέπει να χρησιμοποιήσετε στην αντίδραση αν ξέρετε ότι πρέπει να βάλετε 100ng φορέα και ότι ο κατάλληλος μοριακός λόγος ενθέματος προς τον φορέα είναι 3:1; (10 μονάδες)

✚ Θέμα 4

Θέλετε να κλωνοποιήσετε ένα DNA που έχει συγκέντρωση 50ng/μl, ενώ ο φορέας κλωνοποίησης έχει συγκέντρωση 100ng/μl. Η λιγάση που θα χρησιμοποιήσετε έχει ενεργότητα 5u/μl και το buffer της είναι 5X. Να στήσετε μια αντίδραση τελικού όγκου 20μl, αν σας δίνετε ότι πρέπει να έχετε 200ng DNA προς κλωνοποίηση και άλλα τόσα φορέα, ότι η λιγάση πρέπει να είναι 2,5u στην αντίδραση και το buffer της να είναι 1X.

✚ Θέμα 5

Ξεκινήσατε να κάνετε μετασχηματισμό 100μl δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιώντας 5μl από ένα στοκ αντίδρασης σύνδεσης συγκέντρωσης 5ng/μl. Μετά το θερμοκρασιακό σοκ προσθέσατε 400μl διαλύματος SOC και επωάσατε. Τελικά απλώσατε στο πιάτο σας 100μl. Αν στο πιάτο σας μετρήσατε 50 άσπρες και 50 μπλε αποικίες, ποια είναι η απόδοση του μετασχηματισμού;

✚ Θέμα 6

Έστω ότι στο πιάτο σας μετρήσατε 75 λευκές και 10 μπλε αποικίες (ανεξαρτήτως της απόδοσης). Τι συμπέρασμα βγάξετε;

✚ Θέμα 7

A. Θέλετε να κάνετε διπλή πέψη 2μg ενός πλασμιδιακού DNA συγκέντρωσης 400ng/μl, σε χρονικό διάστημα 30min. Τα ένζυμα που θα χρησιμοποιήσετε είναι τα *EcoRI* (10u/μl) και *HindIII* (5u/μl). Να στήσετε τη διπλή πέψη σε τελικό όγκο 30μl, γνωρίζοντας ότι τα ένζυμα δουλεύουν στο ίδιο buffer 2X Tango, το οποίο εσείς έχετε σε στοκ 10X Tango (12 μονάδες).

B. Σας δίνεται ότι θέλετε να κάνετε διπλή πέψη με τα ένζυμα *PstI* (συνθήκες αντίδρασης 0,1% Triton-X, 0,1% BSA, 100mM Tris-Cl pH 7.4, 100mM NaCl) και *RsaI* (συνθήκες αντίδρασης

0,1% Triton-X, 100mM Tris-Cl pH 7.4, 20mM KCl). Μπορεί να γίνει αυτή η διπλή πέψη ταυτόχρονα και αν όχι, τι εναλλακτικές μπορείτε να προτείνετε;

✚ Θέμα 8

Κλωνοποιήσατε ένα άγνωστο ένθεμα στη θέση *EcoRI* του φορέα κλωνοποίησης pBS. Προκειμένου να χαρτογραφήσετε το ένθεμα προχωρήσατε σε πέψεις τόσο του απλού, όσο και του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *BamHI*. Το *BamHI* κόβει τον φορέα πολύ κοντά στο *EcoRI* (τόσο ώστε να θεωρήσετε ότι κόβουν στην ίδια θέση). Τα αποτελέσματα των πέψεων (καθαρές ζώνες) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

pBS/ <i>EcoRI</i>	pBS/ <i>BamHI</i>	pBS/ <i>EcoRI/BamHI</i>	Construct/ <i>EcoRI</i>	Construct/ <i>BamHI</i>	Construct/ <i>EcoRI/BamHI</i>
3kb	3kb	3kb	3kb	4.3kb	3kb
			0.4kb	0.7kb	0.9kb
			1.6kb		0.7kb
					0.4kb

Να σχολιάσετε τα αποτελέσματα των πέψεων και να σχεδιάσετε τον χάρτη περιορισμού του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.

✚ Θέμα 9

Έχετε κλωνοποιήσει ένα άγνωστο ένθεμα στη θέση *BamHI* ενός φορέα κλωνοποίησης για τον οποίο επίσης λίγα ξέρετε. Για το σκοπό αυτό προχωράτε σε διάφορες πέψεις τόσο του απλού φορέα, όσο και του ανασυνδυασμένου, με τα ένζυμα *BamHI*, *EcoRI* και *HindIII*. Ακολουθώντας ηλεκτροφορέιτε τα προϊόντα των πέψεων και τα αποτελέσματα των πέψεων (σε kb) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

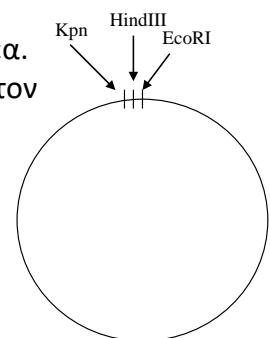
	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	B/E	B/H	E/H
Απλός Φορέας	6	6	6	1,5 4,5	2,5 3,5	4 2
Ανασυνδυασμένος φορέας	6 4	2,7 7,3	3,1 3,9 3	?	2,5 3,5 0,4 3 0,6	?

Να χαρτογραφήσετε τόσο τον απλό (8 μονάδες), όσο και τον ανασυνδυασμένο φορέα (20 μονάδες) και να συμπληρώσετε τα αποτελέσματα των πέψεων που λείπουν (12 μονάδες)

✚ Θέμα 10

Κλωνοποιήσατε το ένθεμά σας στη θέση *EcoRI* του παρακάτω φορέα. Ακολουθώντας προχωρήσατε σε πέψεις και τα αποτελέσματά τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Να χαρτογραφήσετε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>KpnI</i>	<i>HindIII/KpnI</i>
Φορέας	5	5	5	5
Ανασυνδυασμένος φορέας	5+3	6,4+1,6	6+1,3+0,7	6+0,9+0,7+0,4



✚ Θέμα 11

Το πλασμίδιο pPlasmid είναι 3.4 kb σε μέγεθος και έχει δύο γονίδια, τα Gene1 και Gene2. Στο πλασμίδιο υπάρχουν μοναδικές θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα EcoRI, KpnI, HindIII και Sall. Η κλωνοποίηση στη θέση EcoRI οδηγεί στην απενεργοποίηση του γονιδίου Gene1, ενώ η κλωνοποίηση στη θέση KpnI απενεργοποιεί το γονίδιο Gene2.

Πέψεις με τα παρακάτω ένζυμα δίνουν τα αντίστοιχα θραύσματα.

Σχεδιάστε έναν χάρτη του πλασμιδίου, δείχνοντας και τις θέσεις των περιοριστικών ενζύμων. Δώστε προσεγγιστικά τις θέσεις των γονιδίων Gene1 και Gene2.

Ένζυμα	DNA θραύσματα (kb)
EcoRI, KpnI	1.08, 2.32
EcoRI, HindIII	2.53, 0.87
EcoRI, Sall	0.2, 3.2
EcoRI, KpnI, HindIII	1.08, 1.45, 0.87
EcoRI, KpnI, HindIII, Sall	0.2, 1.08, 1.45, 0.67

✚ Θέμα 12

Το DNA του πλασμιδίου pBR607 είναι κυκλικό, δίκλωνο και έχει μέγεθος 2.6 kb. Το πλασμίδιο αυτό έχει δύο γονίδια που προσδίνουν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη (Tc^r) και στην αμικιλίνη (Ap^r) στους ξενιστές του. Το DNA έχει μοναδικές θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα EcoRI, BamHI, HindIII, PstI και Sall. Η κλωνοποίηση στη θέση EcoRI δεν επηρεάζει την ανθεκτικότητα σε κανένα από τα δύο αντιβιοτικά. Η κλωνοποίηση στις θέσεις αναγνώρισης του BamHI, HindIII και Sall καταστρέφει την ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη. Η κλωνοποίηση στη θέση PstI καταστρέφει την ανθεκτικότητα στην αμικιλίνη. Πέψεις με τους συνδυασμούς των ενζύμων που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα δίνουν τα αντίστοιχα θραύσματα.

Σχεδιάστε ένα χάρτη των περιοριστικών αυτών ενζύμων του πλασμιδίου. Επίσης υποδείξτε προσεγγιστικά τις θέσεις των γονιδίων Tc^r και Ap^r.

Μίγμα ενζύμων	DNA θραύσματα (kb)
EcoRI, PstI	0.46, 2.14
EcoRI, BamHI	0.2, 2.4
EcoRI, HindIII	0.05, 2.55
EcoRI, Sall	0.55, 2.05
EcoRI, BamHI, PstI	0.2, 0.46, 1.94

✚ Θέμα 13*

Έχετε απομονώσει ένα εξώνιο από το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης της μεσογειακής μύγας και θέλετε να το μελετήσετε. Για το σκοπό αυτό το κλωνοποιείτε στη θέση PstI ενός πλασμιδιακού φορέα και προσπαθείτε να το χαρτογραφήσετε μέσω πέψεων με τα ένζυμα περιορισμού PstI, XbaI και RsaI και ηλεκτροφόρησης των προϊόντων. Στον παρακάτω πίνακα σας δίνονται τα αποτελέσματα των πέψεων, σε kb.

	PstI	XbaI	RsaI	PstI/ XbaI	PstI/ RsaI	XbaI/ RsaI	X/P/R
Φορέας	5	5	5	4,5+0,5	3,5+1,5	3+2	-
Construct	5+3	5,2+2,8	5,3+2,7	-	-	-	-

A. Να κατασκευάσετε το χάρτη περιορισμού της συγκεκριμένης κατασκευής και να συμπληρώσετε τις πέψεις που λείπουν.

B. Η θέση αναγνώρισης *PstI* βρίσκεται στο κέντρο του γονιδίου της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, το οποίο έχει μέγεθος 2 kb. Αν πάρουμε αυτό το γονίδιο μόνο και το χρησιμοποιήσουμε ως ανιχνευτή, ποιες ζώνες θα δώσουν σήμα στις διπλές και την τριπλή πέψη;

✚ Θέμα 14*

Στη θέση *RsaI* ενός φορέα κλωνοποίησης έχετε κλωνοποιήσει ένα κομμάτι από τον υποδοχέα της εκδυσόνης. Έχετε φτιάξει έναν ανιχνευτή για κάποια περιοχή του γονιδίου αυτού, για τον οποίο ξέρετε ότι έχει μέγεθος 2,4 kb και ακριβώς στο κέντρο του μια θέση αναγνώρισης *RsaI*.

	<i>RsaI</i>	<i>SmaI</i>	<i>HindIII</i>	H/S	H/R	R/S	H/R/S
Απλός φορέας	6	6	6	4/2	5,5/0,5	4,5/1,5	;
Ανασυνδυασμένος φορέας	6/2	5,2/4,8	3,5/6,5	4/2,5/1,2/2,3	;	;	;

Να χαρτογραφήσετε τόσο τον απλό, όσο και τον ανασυνδυασμένο φορέα και να συμπληρώσετε τα αποτελέσματα των πέψεων που λείπουν.

Να δείξετε πάνω στο τελικό σας σχήμα ποια περιοχή αναγνωρίζει ο ανιχνευτής.

Μετά από πέψη με S/H, ηλεκτροφόρηση, μεταφορά και υβριδοποίηση με τον συγκεκριμένο ανιχνευτή, ποιες ζώνες περιμένετε να σας δώσουν σήμα;

✚ Θέμα 15*

Έχετε κλωνοποιήσει ένα κομμάτι γνωστού γονιδίου από το **Είδος 1** στη θέση *HindIII* ενός φορέα κλωνοποίησης. Προχωράτε σε διάφορες πέψεις τόσο του απλού φορέα, όσο και του ανασυνδυασμένου, με τα ένζυμα *PstI*, *EcoRI* και *HindIII*. Ακολούθως ηλεκτροφορείτε τα προϊόντα των πέψεων και τα αποτελέσματα των πέψεων (σε kb) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

	<i>PstI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	P/E	P/H	E/H	E/H/P
Απλός φορέας	8	8	8	1 7	3 5	2 6	?
Ανασυνδυασμένος φορέας	8 3,5 1,5	7 6	8 5	;	;	;	;

Να χαρτογραφήσετε τόσο τον απλό (4 μονάδες), όσο και τον ανασυνδυασμένο φορέα και να συμπληρώσετε τα αποτελέσματα των πέψεων που λείπουν.