

4.1

α. Η αντιγραφή του πλασμιδιακού DNA γίνεται ανεξάρτητα από το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου, αλλά αφού κάθε βακτήριο έχει δεχθεί από ένα πλασμίδιο, το οποίο αντιγράφεται μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο, σίγουρα θα πρέπει να έχουμε τέσσερα βακτήρια, ώστε να μετράμε τουλάχιστον 4 πλασμίδια. Επομένως, αν ξεκινήσουμε από 1 βακτήριο θα πρέπει να γίνουν 2 διχοτομήσεις αυτού για να προκύψουν 4 αντίγραφα του κάθε αρχικού πλασμιδίου. Η αντιγραφή του πλασμιδίου γίνεται με τον ημισυντηρητικό μηχανισμό, κατά τον οποίο προκύπτουν δύο θυγατρικά μόρια DNA, τα οποία είναι πανομοιότυπα με το μητρικό (και μεταξύ τους) και καθένα αποτελείται από μία παλιά και μία καινούργια αλυσίδα. Επομένως, μετά τον πρώτο κύκλο αντιγραφής των πλασμιδίων θα έχουμε δύο πλασμίδια και μετά τον δεύτερο κύκλο αντιγραφής θα έχουμε τέσσερα πλασμίδια και στα 2 πλασμίδια που προκύπτουν από τον πρώτο κύκλο αντιγραφής, το καθένα θα έχει από μία αλυσίδα με φθορίζοντα νουκλεοτίδια και μία χωρίς. Μετά τον 2ο κύκλο αντιγραφής, μετά δηλαδή τη 2η διχοτόμηση των βακτηρίων, τα 2 μόρια θα έχουν από μία φθορίζουσα αλυσίδα ενώ τα άλλα δύο θα έχουν και στις δύο αλυσίδες τους φθορίζοντα νουκλεοτίδια. Άρα τελικά θα υπάρχουν 6 φθορίζουσες αλυσίδες.

β. Για τον έλεγχο του ανασυνδυασμού, συνήθως χρησιμοποιούνται ως ξενιστές, βακτήρια που δεν διαθέτουν πλασμίδια και επομένως είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά. Ως φορείς κλωνοποίησης επιλέγονται πλασμίδια, που φέρουν ειδικές αλληλουχίες που κωδικοποιούν γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά. Έτσι, μπορούμε, εισάγοντας το επιθυμητό κομμάτι DNA μέσα στην αλληλουχία που κωδικοποιεί το ένα γονίδιο ανθεκτικότητας, να την καταστρέψουμε, έτσι ώστε το βακτήριο, που θα μετασηματιστεί με τέτοιο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, να μην έχει αντοχή στο εν λόγω αντιβιοτικό, σε αντίθεση με τα μετασηματισμένα βακτήρια, που έχουν δεχθεί πλασμίδιο μη ανασυνδυασμένο και τα οποία θα ανθίστανται και στα δύο αντιβιοτικά. Άρα, από μία αρχική καλλιέργεια με βακτήρια, που έχουν αναπτυχθεί στο ένα αντιβιοτικό, μπορεί να μεταφερθεί δείγμα βακτηρίων στο αντιβιοτικό, στο οποίο δεν διαθέτουν ανθεκτικότητα τα βακτήρια, λόγω της καταστροφής του αντίστοιχου γονιδίου με τον ανασυνδυασμό και να ελεγχθεί ποια από αυτά έχασαν την ανθεκτικότητά τους. Αυτά είναι και τα βακτήρια που τελικά θα επιλέξουμε. Κάποια βακτήρια λαμβάνουν μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μερικά πλασμίδια ξαναγίνονται κυκλικά, χωρίς να προσλάβουν ετερόλογο DNA. Έτσι μερικά βακτήρια - ξενιστές δέχονται πλασμίδια, που δεν είναι ανασυνδυασμένα.

4.2

α. Πραγματοποιείται μικροέγχυση του γονιδίου (με κατάλληλο υποκινητή) στον πυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου του ζώου. Το ξένο γενετικό υλικό ενσωματώνεται συνήθως σε κάποιο από τα χρωμοσώματα του πυρήνα του ζυγωτού. Εφόσον το γονίδιο μεταβιβάζεται σε όλα τα απόγονα κύτταρα του ζυγωτού, κάθε κύτταρο του νέου οργανισμού θα το φέρει. Στο πυρήνα του κατάλληλου κυτταρικού τύπου, συντίθεται και ωριμάζει το mRNA που κωδικοποιεί τη σύνθεση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Μέσα από τους πυρηνικούς πόρους, το ώριμο mRNA περνάει στο κυτταρόπλασμα, όπου και γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση είτε στα ελεύθερα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος, είτε στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο φέρει στην εξωτερική επιφάνεια των μεμβρανών του μικρούς σχηματισμούς, τα ριβοσώματα. Στην τελευταία περίπτωση, η πρωτεΐνη που συντίθενται εισέρχεται, στη συνέχεια, στο εσωτερικό των αγωγών του δικτύου, όπου ενδέχεται να υποστεί τροποποιήσεις (π.χ. προσθήκη σακχάρων).

β. Η μεταφορά και ενσωμάτωση στο DNA των κυττάρων ενός οργανισμού, αλληλουχιών

από άλλους οργανισμούς (του ίδιου ή άλλου είδους), στηρίζεται στην ιδιότητα του γενετικού κώδικα που τον καθιστά σχεδόν καθολικό. Προκειμένου να γνωρίζουμε ποιες αλληλουχίες του γονιδιώματος του κουνουπιού κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην είσοδο ή/ και στον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου μέσα στα κύτταρά του, έτσι ώστε να επηρεάσουμε την έκφρασή τους, εισάγοντας τις κατάλληλες αλληλουχίες DNA από άλλους οργανισμούς που θα τις καταστήσουν ανενεργές (ή ακόμη και να τις αντικαταστήσουμε -με σύγχρονες τεχνικές- με άλλες αλληλουχίες που θα καταστούν τα κύτταρα του κουνουπιού ανίκανα να μολυνθούν από το πλασμίδιο), απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η χαρτογράφηση των γονιδίων αυτών και η πλήρης αλληλούχισή του γονιδιώματος του κουνουπιού.