

Výberové sústredenie IJSO 2015

Teoretické úlohy z biológie

Meno:

1 Klonovanie a mapovanie DNA

Klonovanie DNA znamená vytvorenie rekombinantnej DNA a vloženie tejto molekuly do baktérie, kde sa za krátky čas vegetatívne namnoží a vytvorí množstvo identických kópií. Na prípravu rekombinantnej DNA potrebujeme nosičovú DNA (najčastejšie plazmid) a DNA, ktorú chceme klonovať. Obe tieto DNA opracujeme špeciálnymi enzýmami, ktorým hovoríme restriktčné endonukleázy. Restriktčné endonukleázy sú súčasťou restriktčno-modifikačného systému baktérií, ktorý slúži na degradáciu a označenie cudzej DNA v bunke. Takto sa baktéria bráni preniknutiu cudzej DNA do bunky. Enzýmy štiepia dvojvláknovú DNA na miestach so symetrickou palindrómovou sekvenciou (sekvencia rovnako čítaná z dvoch strán v protiľahlých reťazcoch).



Restriktčné endonukleázy môžu zanechávať 5' alebo 3' prečnievajúce konce, alebo tupé konce. Kompatibilné konce sú dôležité pri spájaní (ligovaní) rekombinantných DNA molekúl, pretože sa môžu komplementárne spárovať iba pri použití rovnakého restriktčného enzýmu.

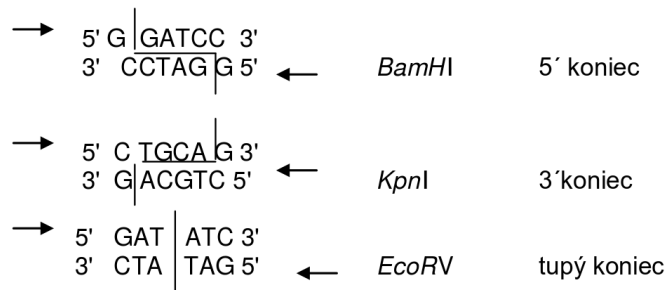
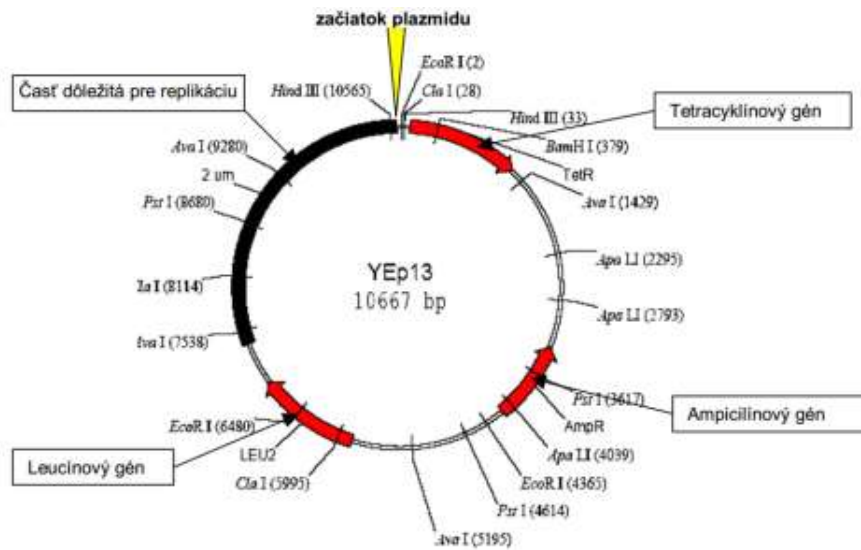


Schéma molekuly DNA s vyznačenými restriktčnými miestami sa nazýva restriktčná mapa. Na obrázku máte restriktčnú mapu plazmidu Yep13. Niektoré enzýmy majú svoje restriktčné miesta prítomné len raz, niektoré viackrát. Plazmid obsahuje časť, ktorá je potrebná pre jeho replikáciu a časť, ktorú môžeme nahradiť cudzou DNA, ktorá nesie cieľový gén, ktorý chceme klonovať. V plazmide sú prítomné 2 markerové gény pre rezistenciu na dve rôzne antibiotiká ampicilín a tetracyklín. Markerové gény slúžia na odlíšenie baktérií, do ktorých sa plazmid dostane od ostatných. Bunky s plazmidom budú rásť na pôde s antibiotikom a vytvoria kolónie, teda klony a bunky bez plazmidu zahynú.



1. Ktorý restričný enzým by ste použili ako miesto na klonovanie tak aby ste neporušili potrebné časti plazmidu a prečo? Ako budete selektovať bunky s rekombinantnou DNA?

2. Koľko fragmentov vznikne po štiepení restričným enzýmom *AvaI* a aká bude ich veľkosť?
 Počet fragmentov:
 Veľkosti fragmentov:

3. Koľko fragmentov vznikne po štiepení restričnými enzýmami *BamHI* a *EcoRI* spolu v jednej reakcii a aká bude ich veľkosť?
 Počet fragmentov:
 Veľkosti fragmentov:

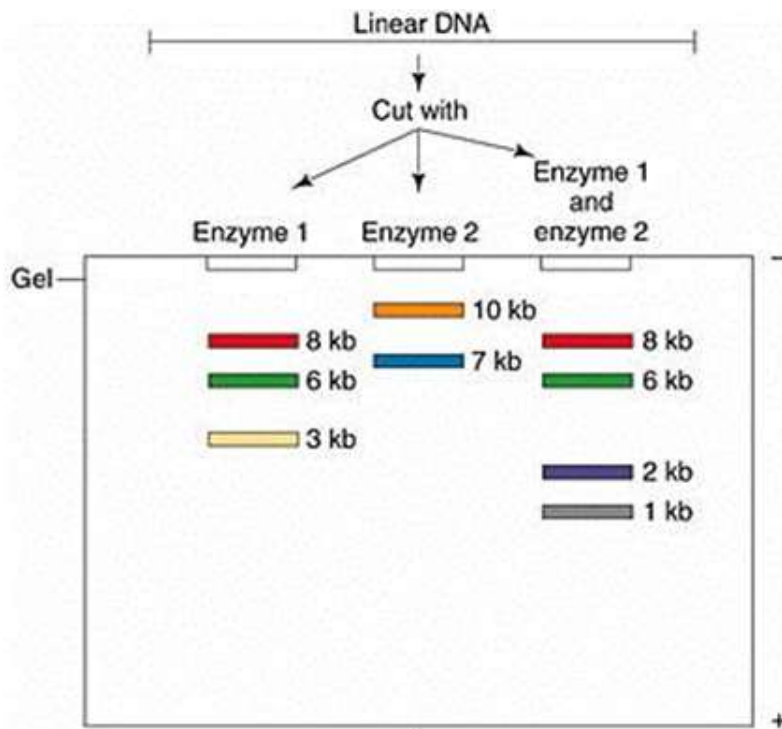
Restričný enzým *EcoRI* štiepi dvojláknú DNA nasledovne:



4. Ktorý z nasledovných fragmentov sa môže viazať na *EcoRI* restričné miesto?

- | | | | |
|----------|-----------|----------|-----------|
| (A) | (B) | (C) | (D) |
| ..CG | AATTCG .. | ..TGAATT | GT .. |
| ..GCAATT | GC .. | ..AC | TTAACA .. |

Nie vždy máte k dispozícii DNA, v ktorej sú identifikované miesta pre restričné enzýmy. Pokiaľ chcete takúto DNA klonovať, musíte zmapovať miesta pre restričné enzýmy, ktoré by ste mohli použiť na klonovanie. Na restričné mapovanie musíte použiť niekoľko enzýmov a urobiť jednoduché aj dvojité štiepenia. Na základe veľkostí fragmentov, ktoré dostanete po štiepeniach viete lokalizovať restričné miesta a určiť aj ich vzájomné vzdialenosti. Na obrázku máte schému takých štiepení lineárnej DNA.



5. Určte počet restričných miest pre oba enzýmy a ich poradie. Nakreslite restričnú mapu lineárnej DNA tak, že na schéme nižšie vyznačíte polohu jednotlivých miest a ich vzdialenosti.

Počet miest:

Enzým 1:

Enzým 2:

Restričná mapa:

14 kb



6. Pri štiepení kruhového plazmidu pBIO sme dostali nasledovné fragmenty:

HindIII 3,82 kbp, 0,18 kbp

BamHI 2,35 kbp, 1,65 kbp

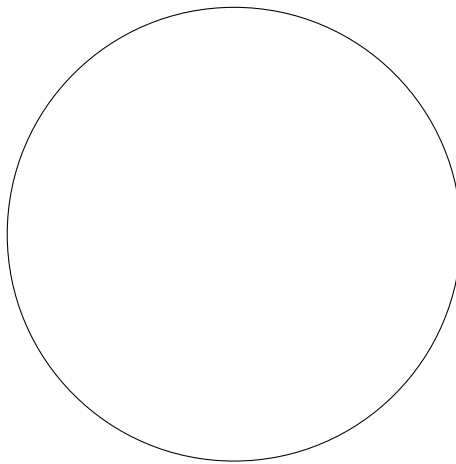
EcoRI 3,0 kbp, 1,0 kbp

HindIII + BamHI 2,35 kbp, 1,2 kbp, 0,27 kbp, 0,18 kbp

HindIII + EcoRI 1,87 kbp, 1,0 kbp, 0,95 kbp, 0,18 kbp

BamHI + EcoRI 1,6 kbp, 1,4 kbp, 0,75 kbp, 0,25 kbp

Zakreslite polohu jednotlivých restričných miest do schémy kruhového plazmidu aj so vzdialenosťami medzi restričnými miestami.

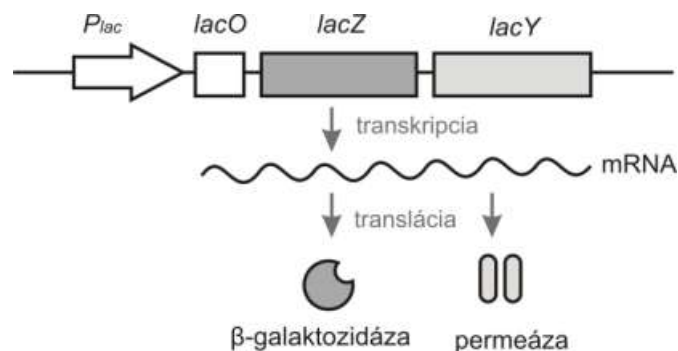


Určte veľkosť plazmidu:

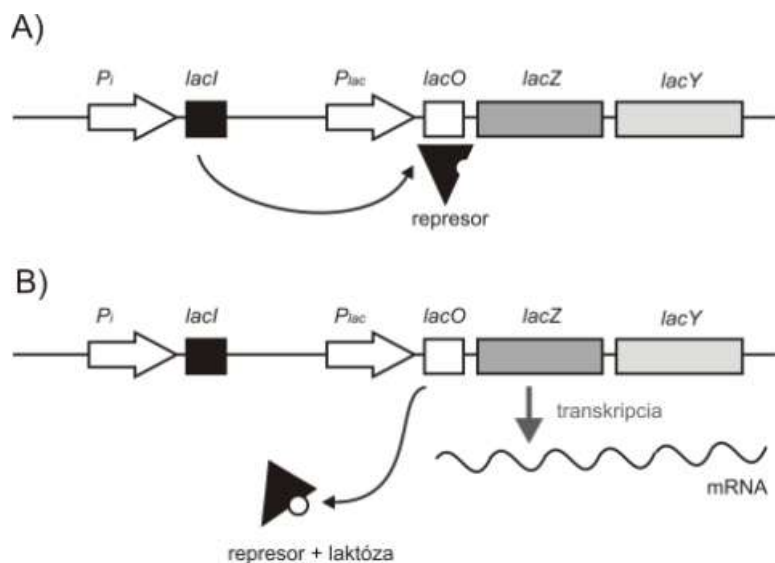
2 Molekulárna biológia—expresia génov u prokaryotov

Baktérie druhu *Escherichia coli*, ktoré sa bežne vyskytujú v ľudskom tráviacom trakte, sú často vystavené zmenám v chemickom zložení prostredia. Tieto zmeny, spôsobené výkyvmi v zložení potravy prijímanej ich hostiteľom, vyžadujú aby sa bakteriálny metabolizmus dokázal rýchlo prispôbiť aktuálnym podmienkam.

Preferovaným zdrojom energie je pre *E. coli* glukóza. Ak sa však bunky dostanú do kontaktu s potravou, ktorá obsahuje málo glukózy, ale je bohatá napríklad na laktózu (mlieko), je potrebné začať syntetizovať enzým nevyhnutný pre jej metabolizmus (β -galaktozidáza). Navyše je potrebné vytvoriť aj prenášačový proteín zodpovedný za transport laktózy do buniek (β -galaktozid permeáza). Gény, kódujúce tieto proteíny (*lacZ*, *lacY*), sa v genóme nachádzajú vedľa seba a ich expresia je regulovaná rovnakými regulačnými oblasťami—vytvárajú operón. Ak je v prostredí prítomná laktóza, RNA-polymeráza sa viaže na oblasť promótoru (P_{lac}) tohto operónu a prepíše nasledujúce sekvencie do mRNA. Transláciou tejto mRNA potom vznikajú oba proteíny, čo zabezpečuje ich súčasnú produkciu (pozri obrázok).



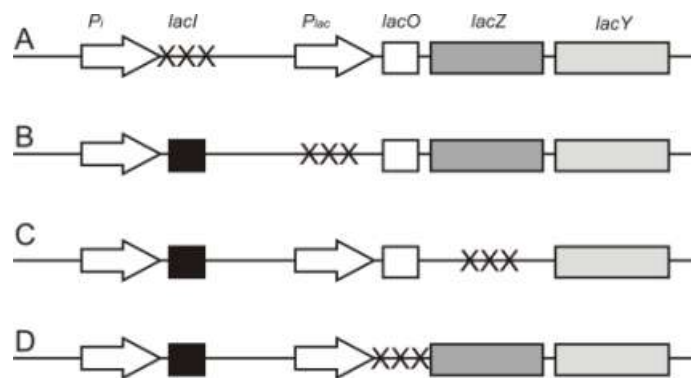
Ako je však zabezpečené, že gény laktózového operónu sú exprimované (vytvárajú sa z nich proteíny) iba v prítomnosti laktózy? Na prechádzajúcom obrázku ste si možno všimli aj oblasť označenú *lacO*, ktorú nazývame operátor. Sem sa v neprítomnosti laktózy viaže proteín označovaný ako represor, ktorý je kódovaný mimo operónu a konštitutívne (neustále) produkovaný. Ak je represor naviazaný na operátor, zabraňuje transkripcii operónu RNA-polymerázou a tým aj produkcii proteínov nevyhnutných pre metabolizmus laktózy (Obr. A). Ak sa však v prostredí objaví laktóza, naviaže sa na represor a spôsobí jeho odpadnutie z operátora, čo má za následok expresiu génov *lac* operónu (Obr. B). Laktóza teda pôsobí ako induktor *lac* operónu.



7. Laktózový operón je príkladom transkripčnej regulácie génovej exprese, čiže systému, pri ktorom sa o vytvorení/nevytvorení proteínu rozhoduje už na úrovni zapínania a vypínania transkripcie génu, ktorý ho kóduje. Okrem toho však bunky využívajú aj iné typy regulácie, napríklad degradáciu už transkribovanej mRNA, znemožnenie translácie mRNA, či degradáciu proteínu až po translácii. Napíšte a vysvetlite, ktorý zo štyroch spomenutých regulačných mechanizmov je pre bunky najmenej nákladný z hľadiska energie a zdrojov, ktoré musia využiť.

8. Je zaujímavé, že minimálna expresia génov *lac* operónu prebieha aj v neprítomnosti laktózy. Vedeli by ste vysvetliť, aký význam má tento jav? Pomôcka—na to, aby sa laktóza naviazala na repressor, musí sa dostať do bunky.

9. Jedna z možností ako študovať funkciu jednotlivých sekvencií v genóme je príprava delečných mutantov, ktorým konkrétne sekvencie chýbajú. Pripravili ste štyroch delečných mutantov (A–D), pričom každému z nich chýba niektorá súčasť *lac* operónu. Keď ste ich ďalej analyzovali, zistili ste, že niektoré z nich produkujú veľké množstvá β -galaktozidázy aj bez prítomnosti laktózy. Tiež ste medzi nimi našli také, ktoré β -galaktozidázu neprodukujú ani keď im do média pridáte laktózu. Určte, ako sa budú správať jednotlivé mutanty a vysvetlite svoje tvrdenie. Na obrázku nižšie sú deletované úseky označené krížikmi.

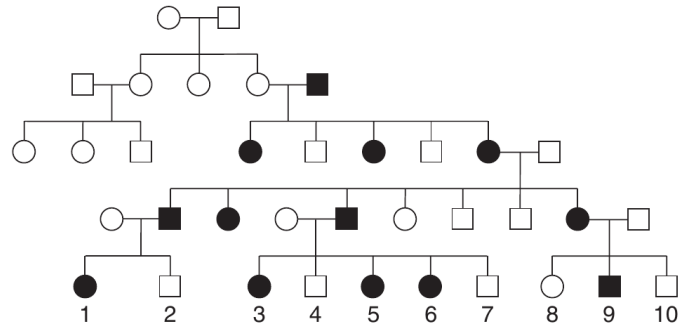


Mutant A produkujú β -galaktozidázu aj bez prítomnosti laktózy, pretože:

Mutant B neprodukujú β -galaktozidázu ani v prítomnosti laktózy, pretože:

3 Genetika

10. Rodokmeň nižšie zobrazuje príbuzenské vzťahy v rodine postihnutej ojedinelou chorobou.

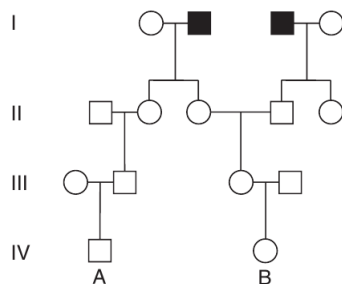


Identifikujte najpravdepodobnejší mód dedičnosti tejto choroby:

Akých potomkov by vyprodukovali páry 1×9 , 1×4 , 2×3 a 2×8 ?

11. Dve čierne morske prasiatka boli po dobu niekoľkých rokov krížené a vyprodukovali 29 čiernych a 9 bielych potomkov. Vysvetli tieto výsledky a identifikuj genotypy rodičov a potomkov.

12. Na obrázku nižšie je zobrazený rodokmeň rodiny postihnutej fenylketonúriou (PKU), ojedinelou autozomálnou recesívnou chorobou. V nasledujúcich úlohách pracuj s predpokladom, že muži a ženy príznení do rodiny nemajú recesívnu alelu.



13. Identifikuj genotypy čo najviac príbuzných.
14. Aká je pravdepodobnosť, že prvé dieťa jedincov A a B bude trpieť PKU?
15. Ak je ich prvé dieťa nepostihnuté, aká je pravdepodobnosť, že ich druhé dieťa bude trpieť PKU?
16. Ak je ich prvé dieťa postihnuté, aká je pravdepodobnosť, že ich druhé dieťa bude nepostihnuté?