**Προτεινόμενη απάντηση**

**Δ1.** Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλ/χίες DNA μήκους 4-8 ν/δίων και κόβουν φ/δ δεσμούς σε συγκεκριμένες θέσεις εντός της αλληλουχίες αναγνώρισης και στις 2 αλυσίδες, αφήνοντας (τις περισσότερες φορές) μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI που έχει απομονωθεί από το βακτήριο E. coli αναγνωρίζει τη δίκλωνη αλ/χία 5’ GAATTC 3’

 3’ CTTAAG 5’
και κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ Gκαι A με κατεύθυνση 5’ → 3’ αφήνοντας μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα.

Στο τμήμα του γονιδίου Bt που δίνεται, εντοπίζουμε **ένα** σημείο δράσης της EcoRI, με το χαρακτηριστικό μονόκλωνο άκρο ΤΤΑΑ στη μια αλυσίδα. Στο σχήμα φαίνεται το τμήμα της αλ/χίας αναγνώρισης της EcoRI μετά τη δράση του ενζύμου.

AGCTTCTACATGCCTGAACGAACGTACATCC**G -** (AATTC...)

 AGATGTACGGACTTGCTTGCATGTAGG**CTTAA -** (**G**...**)**

(με κόκκινο οι κομμένοι φ/δ δεσμοί )

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι αλυσίδες θα έχουν τον προσανατολισμό:

5’ AGCTTCTACATGCCTGAACGAACGTACATCC**G** 3’

 3’ AGATGTACGGACTTGCTTGCATGTAGG**CTTAA** 5’

Επομένως, θα αναζητήσουμε στο άλλο (αριστερό) άκρο του δίκλωνου τμήματος την αλ/χία αναγνώρισης της περ. ενδονουκλεάσης HindIII. Παρατηρούμε ότι υπάρχει στην πανω αλυσίδα μονόκλωνο άκρο 5’ AGCT. Προφανώς το συμπληρωματικό του τμήμα 3’ TCGA στην απέναντι κάτω αλυσίδα έχει αποκοπεί με τη δράση της HindIII, που έκοψε μεταξύ Α και Α με κατεύθυνση 5’ → 3’. Επομένως η αλ/χία που αναγνωρίζει η HindIII είναι η 5’ AAGCTT 3’

 3’ TTCGAA 5’

**Δ2.** Παρατηρούμε ότι και οι δύο θ. αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων βρίσκονται εντός του γονιδίου β και στα δυο πλασμίδια.

Επιπλέον και στα δύο πλασμίδια ο Υποκινητής του γον. β βρίσκεται αριστερά του γονιδίου β. Ο Υποκινητής είναι μια αλληλουχία στην οποία δεσμεύεται η RNA πολυμεράση με τη βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων προκειμένου να μεταγράψει το γονίδιο παράγοντας mRNA. Ο Υποκινητής βρίσκεται πάντα πριν την αρχή του κάθε γονιδίου. Επομένως **η κατεύθυνση της μεταγραφής θα είναι αυτή της φοράς του ωρολογίου** και για τα δυο πλασμίδια.

Η RNA pol. τοποθετεί και συνδέει ριβον/δια συμφωνα με τον κανόνα της συμπλ/τητας απέναντι από τα δεοξυριβον/δια της μιας αλυσίδας (μεταγραφόμενης) με κατ/ση 5’ → 3’. Η άλλη αλυσίδα του DNA είναι η κωδική, που έχει τον ίδιο προσανατολισμό και αλ/χία με το mRNA που παράγεται.

Η εισαγωγή της αλ/χίας του γονιδίου Bt στο πλασμίδιο θα καταστρέψει την αλληλουχία του γονιδίου β με αποτέλεσμα αυτό να μην μπορεί να εκφραστεί, άρα να μη δημιουργούνται όγκοι στα μετασχηματισμένα φυτά.

Η αλληλουχία των αμινοξέων του ολιγοπεπτιδίου της τοξίνης καθορίζεται από την αλληλουχία νουκλεοτιδίων του mRNA με βάση τον Γ. Κ. που είναι κώδικας τριπλέτας και διαβάζεται με συνεχή και μη επικαλυπτόμενο τρόπο. Κωδικόνιο έναρξης είναι το AUG και κωδικόνια λήξης της μετάφρασης ένα εκ των UAA, UAG, UGA.

Σύμφωνα με τα παραπάνω και επειδή ο όρος κωδικόνιο αναφέρεται και στο DNA, (κωδική αλυσίδα), αναζητούμε στο γονίδιο Bt που δίνεται την κωδικοποιούσα περιοχή και στις 2 αλυσίδες με κατ/ση 5’ → 3’. Το γονίδιο προέρχεται από προκαρυωτικό οργανισμό, άρα είναι συνεχές.

5’ AGCTTCTACATGCCTGAACGAACGTACATCCG3’

 3’ AGATGTACGGACTTGCTTGCATGTAGGCTTAA5’

Στην επάνω αλυσίδα εντοπίζουμε κωδ. έναρξης, αλλά όχι κωδ. λήξης.

Στην κάτω αλυσίδα εντοπίζουμε κωδ. έναρξης, και με βήματα τριπλέτας το κωδ. λήξης TAG. To τμήμα κωδικοποιεί 7 αμινοξέα.

Επομένως η κάτω αλυσίδα του γονιδίου είναι η κωδική.

Προκειμένου να εκφρασθεί το γονίδιο και να παραχθεί η τοξίνη, θα πρέπει να ενσωματωθεί στο πλασμίδιο Ti με τον κατάλληλο προσανατολισμό.

Για να ακολουθηθεί η κατεύθυνση της μεταγραφής που δηλώνεται από τη θέση του Υποκινητή, θα πρέπει να τοποθετηθεί με τον προσανατολισμό:

Υποκ.- 5’ EcoRI - κωδική - HindIII 3’

Με αυτό τον τρόπο η κωδική αλυσίδα του γονιδίου Bt θα συμπέσει ως προς τον προσανατολισμό με την κωδική αλυσίδα του γονιδίου β του πλασμιδίου (εξωτερική αλυσίδα) με αποτέλεσμα να μπορεί να μεταγραφεί και να παραχθεί η τοξίνη.

**Κάτι τέτοιο μπορεί να γίνει μόνο στην περίπτωση του πλασμιδίου TiΒ** .
Αν χρησιμοποιηθεί το πλασμίδιο Ti A, θα μεταγραφεί η κωδική αλυσίδα του Bt, που θα βρεθεί εσωτερικά, με αποτέλεσμα να μην παραχθεί το σωστό mRNA, που θα μεταφραζόταν στα ριβοσώματα παράγοντας την τοξίνη Bt.
Επομένως κατάλληλο είναι μόνο το πλασμίδιο **TiΒ** .