

TENTAMEN för KMB056 - Molekylär Bioteknik

2009-10-24 em

Totalt 60 poäng

(Frågor 1-8, samt 11a-i: Joakim Norbeck, totalt 45 poäng;

Frågor 9-10, samt 11j-l: Lisbeth Olsson, totalt 15 poäng).

Betygsgränser: 30 poäng = betyg 3, 39 poäng = betyg 4, 48 poäng = betyg 5

Försök att hålla svaren inom en sida/fråga

(OBS! detta är inget krav, bara en rekommendation!)

1. Du studerar modell-växten *Arabidopsis thaliana* för att hitta gener som är uttryckta endast i blad som behandlats med kemikalien X. Det enklaste försöket blir att rena fram mRNA från behandlade och obehandlade/kontroll-blad, samt att analysera genuttrycks-förändringarna med hjälp av micro-array-analys. Du har tillgång till oligonukleotid-array-systemet. Beskriv hur detta system fungerar på teknik-nivå samt på prov-nivå, börja med mRNA och sluta med hur du ser skillnader i gen-uttryck (5p).

cdNA och inmärkning, korta oligos, många oligonukleotider/gen, match/mismatch-rutor & ett prov/array

2. Du finner (sensationellt nog!) att mRNA från en enda gen får ett kraftigt förändrat uttryck som respons till kemikalien X. På grund av att signalen på vissa delar av arrayen var usel så är det tyvärr osäkert vilka förutsagda exoner som finns med i ditt mRNA, du vet dessutom inte var transkriptions-start och 3' poly(A)-site ligger i sekvensen. För att ta reda på hur den aktuella mRNA-molekylen ser ut så vill du nu göra ett komplett cDNA (dubbelsträngat!), som alltså inkluderar både 5' och 3' änden av mRNA från din gen. Beskriv hur detta går till. (3p)

polyT-primer+reverstranskriptas, polyG addition till 3'ände av cDNA, PCR med polyC mot polyT.

(alternativt kan ni bestämma transkriptstart enligt "primer extension" och göra PCR med polyT och primer mot 5'änden av transkriptet)

3. Du har av olika anledningar skäl att misstänka att din ursprungliga växt (*Arabidopsis*) har fått förändringar i sin arvs massa (=spontana mutationer) som påverkar hur den reagerar på kemikalien X. Eftersom detta var den första växt som man fick fram komplett DNA-sekvens ifrån så har man ett referens-genom att utgå ifrån. Du har tur och sitter på ett lab som just köpt de senaste "next-generation" single-strand-sekvenserings-maskinerna från Helicos och från Illumina/Solexa. Beskriv hur man med en av dessa maskiner kan få fram DNA-sekvensen för hela genomet hos din lokala *Arabidopsis*-växt, du får själv välja vilken maskin du vill använda (5p)

Fragmentera DNA (+eventuellt amplifierings-steg om ni kör illumina)

3'polyA-svans addition

polyT på ytan

Fluorescenta baser

Deblocking av baser innan nästa bas adderas.

4. Från sekvenseringen så vet du nu att din favorit-gen är muterad och du vill då naturligtvis få tillbaka ursprung-sekvensen. För att åstadkomma det så behöver du mutera ett aminosyra-kodon i den gen som du nu har sittande i en plasmid (byte från CGG till ATC = Arginin till Isoleucin) med "megaprimer-metoden".

Nedan gives DNA-sekvensen uppströms och DNA-sekvensen kring det muterade understrukna kodonet (punkterna motsvarar en icke utskrivna sekvens av baser):

CGTACAGGATCCATCATACTCATCATACTGC

. . ATCCTGTCCCATAGTAACAACAACCGGCGGTCAGCGGCATTGCATGC

Svaret på denna fråga ska utgöras av primer-sekvenser om 10 baspar vardera (jag vet att detta är alltför kort i verkligheten, men det är tillräckligt för denna fråga.):

Skriv alltså ner sekvenserna för dels (i) en uppströms primer och dels (ii) för en mutagen primer (markera sekvensen för de baser du ändrat för att byta ut CGG mot ATC). Dessa båda primers ska tillsammans kunna ge er en "megaprimer" i en PCR-reaktion. Uppströms-primern ska också överlappa med ett tillgängligt restriktions-enzym site om 6 baspar, identifiera läget för detta site och markera det i sekvensen för uppströms-primern (4p)

Primersekvenser i rätt riktning och läge med tydligt markerad mutation och restriktions-enzym-site ("palindrom-sekvens")

5. När du nu har klonat och muterat ett bra cDNA från din gen så tillverkar du med några raska molekylärbio-logiska steg en gen som kodar för ett fusions-protein där du kopplat på en antikropps-epitop. Eftersom enzymet som du konstruerat med en antikropps-epitop kommer från en växt från början så vill du nu föra in den muterade genen med sin renings-domän i växten igen. Stoppa alltså in DNA från din gen i en "binary vector" och överför din fusions-gen till en kultur av växtceller m h a *Agrobacterium*-systemet. Beskriv (i) vad som måste finnas på en binary-vektor samt (ii) hur det klonade/muterade stycket DNA på denna plasmid förs in i växtcellerna av *Agrobacterium* (vad måste den aktuella *Agrobacterium*-stammen innehålla)? (6p)

(i) Left- and Right-flanking regions av T-DNA, Multiple cloning site och växtmarkör (båda ska sitta mellan flanking sites), Origins och markörer för *E. coli* och *Agrobacterium*.

(ii) *Agrobacterium*-stammen måste innehålla en plasmid med vir-generna

6. Transformationen gick bra, du står nu med en växt som uttrycker ditt muterade protein med en bra antikropps-epitop. Du har tillgång till en utmärkt antikropp mot denna epitop, så naturligtvis vill du nu rena ditt protein för att hitta interagerande proteiner. Beskriv hur man utför en co-immunoprecipitering (3p).

Proteinextrakt, blanda med antikropp (som kan vara bunden till nåt slags kolonn-material), bind upp antikropp med proteinA/G-agaroskolor, tvätta och eluera.

7. Efter co-immunoprecipiteringen så vill du separera dina renade proteiner, och eftersom du vill få bästa möjliga gel-separation så bestämmer du dig för att köra två-dimensionell gel-elektrofores (2D-PAGE). Beskriv principerna för denna teknik samt ge exempel på hur du kan detektera icke-radioaktiv-inmärkta proteiner på den färdiga gelen (4p).

princip för isoelektrisk fokusering (surt pH vid pluspol och basiskt vid minus-polen)

princip för SDS-PAGE (roll av SDS och acrylamid, migrering mot pluspolen)

färgning (inte western-blotting!)

8. Co-immunoprecipiteringen verkar ha varit en succé, du fick två prickar på din 2D-PAGE-gel, varav den ena är ditt favoritprotein. Du har tillgång till en ESI-Quadropol-TOF-mass-spektrometer. Hur fungerar en sådan mass-spektrometer, samt hur skulle du gå tillväga för att få ut aminosyra-sekvens från de okända proteinerna på din gel (6p).

princip för Electrospray

vad är en Quadropol?

hur funkar TOF?

Kollisions-cell

klipp prov med Trypsin

vad är y- och b-serier och hur kan vi få sekvens-information från dom?

9. Glukos-isomeras är ett enzym som katalyserar omvandlingen av glukos till fruktos. För att utnyttja detta enzym till en industriell applikation har man beslutat att utvärdera om immobilisering av enzymet är fördelaktigt. Man utvärderar två olika metoder:

- Tvärbinding där man använder glutar-aldehyd som tvärbindande kemikalie och collagen som bärarmaterial.
 - Fysisk adsorption på poröst glass
- a) Gör en principskiss som visar enzymet (E) och bärarmaterialet (B). Dessutom skall bindningen mellan bäraren och enzymet indikeras (2p)
- b) Ge två fördelar och två nackdelar med var av de två immobiliseringsmetoderna (4p)

10. Lignocellulosa är ett råmaterial som har stor potential som råvara i en rad fermenteringsprocesser eftersom det är ett billigt material som finns i stora mängder. Materialet består av lignin, cellulosa och hemicellulosa. I den nya processen som skall designas önskar man producera äpplesyra från cellulosa. Rekombinant jäst skall användas som produktionsorganism och innan jäsningssteget skall man ha ett hydrolyssteg

- a) Beskriv cellulosans uppbyggnad (beskrivning skall inkludera bindningar) (2 p)
- b) Beskriv vilka enzym som behöves för att hydrolysera cellulosa och vilka typer av reaktioner dessa enzymer katalyserar? (2 p)
- c) Traditionellt har man använt enzymer som produceras av *Trichoderma* för hydrolysen. Man önskar öka temperaturen för hydrolysprocessen och behöver då enzymer som har bättre termostabilitet än *Trichoderma*-enzymerna har. Hur kan man hitta sådana enzym? Ge ett motiverat förslag hur man kan göra detta. (2p)

11. Ge en kort (ca 1-2 meningar) definition av följande 11 termer/tekniker (1 p/term = 12p totalt):

- a. Dideoxynukleotid
- b. Embryonala stamceller
- c. T7-polymeras
- d. BLASTP
- e. Molecular beacons
- f. Metabolic fingerprint
- g. Cre-rekombinas
- h. Lipofektion/Liposom
- i. RNAi
- j. "Rational design"
- k. "Directed evolution"
- l. Michaelis-Menten kinetik