

TENTAMEN för KMB056 - Molekylär Bioteknik

2010-01-14 em (Maskin-salar)

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!)

Hjälpmedel: räknedosa men ej anteckningar

1. Du råkar jobba med en cell-linje från mus och din forskning går ut på att testa effekt på storskaligt genuttryck som en följd av behandling med en substans som är ett potentiellt botemedel mot alla influensa-varianter. För att studera genuttrycket väljer du att använda microarray-teknik. Du har endast "spotted" microarray att tillgå, beskriv hur du kan få ut data om gen-expressionsförändringar i din mus-cell-linje m h a denna teknik (4 p)
3. En gen visar särskilt stark förändring i expression, och du verifierar därför dess expression m h a Northern blotting. Överaskande nog så finner du med denna metod två olika storlekar på transkriptet under de två olika betingelserna. Inga introner finns i denna gen, du vill därför ta reda på var transkriptet börjar och slutar i de båda betingelserna... hur göra detta? (5 p)
2. Du har klonat din intressanta gen på en plasmid för att framställa det kodade proteinet i E.coli. Du vill av dunkla skäl nu även avlägsna två amino-syra-kodon (=sex baspar som är understrukna) ur sekvensen nedan. Detta görs ju snabbt och lätt med hjälp av en "mutagenic primer" som ska användas tillsammans med en uppströms i en "mega-primer" - mutagenes...

GACGGTTGTGACATGTGCTGAAAGTCGGCCCTGAAATG
CGAACTGTACTTATACTGGACGCGAAGAAGTGAGCCCA

Skriv ner (i) sekvensen på den mutagena primer du skulle beställa (gör den ca 20 baspar lång, dvs ca 10 baspar på varsin sida om mutationen) samt (ii) även sekvensen på uppströms-primern (gör denna primer 10 bp lång) (3p)

4. Du vill nu veta var ditt protein är lokaliserat och vill därför integrera en green fluorescent protein (GFP)-fusions-tag i arvsmassan på den mammalie-cell-linje du jobbar med och du vill absolut behålla dina uppströms och nedströms reglerande regioner. Hur skulle du gå tillväga? (5 p)

Man kan välja att placera GFP vid N- eller C-terminalen av proteinet, vilken ände bör du välja om du misstänker att ditt protein är mitokondriellt? ge en kort motivering till ditt val! (1 p)

5. Med utgångspunkt från din cell-linje, beskriv hur du skulle skapa en hel mus som har exakt samma gen-uppsättning som din GFP-taggade cell-linje från förra frågan? (3 p)
6. Och nu vill du vara säker på att din klonade mus har rätt genom-sekvens. Eftersom du har gott om tid och pengar så sekvenserar du hela genomet på det gamla hederliga sättet, d v s shotgun-sekvensering baserat på Sangers metod. Börja med att du har extraherat kromosomalt DNA från din mus, sluta med hur du pusslar ihop hela genomet, observera också att inga luckor i sekvensen tillåts (förutom mellan kromosomerna.). Beskriv hur detta går till (både sekvenseringsreaktionen och ihop-pusslandet) (6 p)
7. Du vill också undersöka hur din behandling med substansen från fråga 1 påverkar uttryck och eventuella modifieringar av ditt protein med hjälp av western blotting. Beskriv hur denna metod fungerar. (3 p)
8. Du har tur och ser att det renade proteinet migrerar annorlunda på gel när du behandlar med det potentiella influensa-botemedlet från fråga 1. Nu är ju frågan vilken typ av modifiering det är frågan om, samt var den sitter i proteinet. Du har tillgång till en ESI-MS/MS maskin, beskriv hur du skulle ta reda på vilken aminosyra som är modifierad samt vilken typ av kovalent modifiering det handlar om i det aktuella fallet? (6 p)
9. Immobilisering utnyttjas ofta när man vill använda enzymer i teknologiska sammanhang.
- Definiera enzymimmobilisering (1 p)
 - Ge två exempel på immobiliseringsmetoder. Gör en principskiss som visar enzymet (E) och bärarmaterialet (B) för de två metoderna. Dessutom skall bindningen mellan bäraren och enzymet indikeras (2 p)
 - Ge tre fördelar och tre nackdelar med enzymimmobilisering. Gäller alla för- och nack-delar för de två immobiliseringsmetoder du angett under b) (3 p)?
10. Stärkelse är ett billigt material som finns i stora mängder och som därför ofta används som råvara i en rad fermenteringsprocesser. Eftersom stärkelse är en polymer, så krävs det att den bryts ner till mindre sackarider innan en mikroorganism kan använda den som kolkälla. I de flesta processer använder man enzymer för att bryta ned stärkelsen.
- Beskriv stärkelsens uppbyggnad (beskrivning skall inkludera bindningar) (2 p)
 - Beskriv vilka enzym som behövs för att hydrolysera stärkelse och vilka typer av bindningar dessa enzymer bryter? (2 p)

- c. Man önskar öka temperaturen för hydrolyspprocessen och behöver då enzymer som har bättre termostabilitet än traditionellt använda enzymerna har. Hur kan man hitta sådana enzym? Ge ett motiverat förslag hur man kan göra detta. (2 p)

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

- a. Agrobacterium
- b. monoklonal antikropp
- c. isoelektrisk fokusering
- d. RNAi
- e. somatiska celler
- f. surface plasmon resonance
- g. metabolomik
- h. CLUSTALW
- i. single nucleotide polymorphism
- j. K_m
- k. V_{max}
- l. K_{cat}