

TENTAMEN för KMB056 - Molekylär Bioteknik

2011-10-22 em (V-salar)

Totalt 60 poäng

(Frågor 1-8: Joakim Norbeck, totalt 45 poäng;

Frågor 9-12: Lisbeth Olsson, totalt 15 poäng).

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

Försök att hålla svaren inom 1-2 sida/fråga (OBS! detta är inget krav, bara en rekommendation!). Se poängen som en ungefärlig indikator på hur utförligt svaret bör vara.

(OBS! Det kan finnas alternativa lösningar på frågorna, välj i så fall att presentera EN strategi.)

Hjälpmedel: räknedosa men ej anteckningar

Frågor från Joakim Norbeck på avsnitten kring Molekylär Bioteknik

1. I ditt projekt jobbar du med tolerans mot etanol hos jästsvampen *Saccharomyces cerevisiae*. Genom slumpmässig UV-mutagenes har du fått fram tio isolat av jäst-stammar som uppvisar ökad tålighet mot etanolen. För att ta reda på vad som skiljer stammarna från vild-typen så vill du sekvensera deras genomiska DNA.
Du har en maskin från 454/Pyrosekvensering. Beskriv med utgångspunkt från extraherat kromosomalt DNA från din muterade jästsvamp: hur pyrosekvenseringen fungerar (provberedning och sekvens-avläsning). samt vad som är den största källan till problem med denna teknik. (5 poäng).

fragmentera, linker<adapter-sekvens, emulsions-PCR, pyrosekvenseringsreaktionen och ljusutsändning, fler än 5 identiska baser i rad.

2. Den enda gemensamma nämnaren för dina sekvenserade jäst-stammar är att genen YGL199W har ett muterat kodon som leder till ett utbyte av serin 250 till alanin. Självklart vill du nu testa om uttryck av ditt protein med denna mutation kan bidra till etanol-tolerans. Du har klonat YGL199W på en plasmid, beskriv hur du m h a megaprimer-mutagenes skulle förändra serinkodon 250 till att koda för alanin. (4 poäng)

uppströms och nedströmsprimer samt dubbelriktad/mutagen-primer. 2 PCR-steg. Ligerings och transformation.

3. Nu vill du veta hur transkriptionen påverkas av ett muterat serin 250. Du vill alltså jämföra en muterad jäst-stam med en omuterad jäst-stam. Din mRNA-kvantifiering kommer du att utföra m h a oligonukleotid-microarray. 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 (5 poäng).

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

4. Eftersom många geners expression på mRNA nivå förändrades så vill du nu se om dessa förändringar motsvaras på protein nivå. Du vill utföra ICAT-kvantifiering av totala protein-uttrycket i muterad och omuterad YGL199W-stammar. börja med protein-extrakt, beskriv sedan (i) principen för kvantifiering m h a ICAT-analys och (ii) för sekvens-bestämning av peptider via MS/MS (utfört m h a en ESI-Quadropol-TOF). (iii) I svaret ska också ingå en kortfattad beskrivning av jonkällan och analysator-delen av instrumentet. (totalt 8 poäng)

inmärkning med tungt/lätt ICAT-reagens på cysteiner, trypsin, rening av ICAT-märkta peptider via Biotin/Streptavidin, ESI, Quadropol, kollisions-cell, TOF, y-/b-serier, läs ut sekvens och mängd av varje peptid.

5. När du nu ändå jobbar med proteiner så vill du också veta vilka proteiner som YGL199W interagerar med samt om de är beroende av serin 250. I dina plasmider sätter du därför in en C-terminal TAP (Tandem affinity

purification)-tag för att kunna rena proteinet på ett effektivt sätt. Beskriv principen för TAP-rening. Svaret ska inkludera en beskrivning av TAP-taggens relevanta delar samt hur proceduren att rena protein-komplex via denna "tagg" går till. (3 poäng)

TAP-taggen består av ProteinA och CBP, gör Protein-extrakt, IgG-kulor, TEV-proteas, Calmodulin-kulor, EGTA.

6. Eftersom YGL199W är involverat i alkohol-tolerans så vill du undersöka om ett homologt protein från mus kan bidra till att skapa en modell för alkohol-relaterade leverskador. I detta syfte vill du få fram en mus som saknar det aktuella homologa proteinet i sin levervävnad. Beskriv hur du skulle gå till väga. (i) Hur skulle gen-konstruktionerna se ut, (ii) hur får du in dessa i varje cell i vuxna möss och (iii) hur avlägsnas genen ifråga i levercellerna. (totalt 6 poäng)

Markör-gen och ursprunglig gen med LoxP-sites på varje sida och med flankerande homologi, positiv-negativ selektion, transformation av ES-celler, Blastocyst in i pseudogavid mus-> Chimeric mice, korsa och identifiera möss med konstrukt, korsa med möss som uttrycker Cre-rekombinas efter leverspecifik promotor..

7. Du vill också skapa en potatis-sort som uttrycker en muterad version av en växthomolog till YGL199W. Labbet har just köpt en "gene-gun" som du vill pröva för att den låter pang! Det spelar ingen större roll var din gen-konstruktion hamnar i växtens genom. Beskriv kortfattat stegen från icke gen-modifierat potatisblad till en groende gen-modifierad potatis-planta samt hur ditt introducerade DNA-fragment skulle se ut. (4 poäng)

gen kopplad till markör, skjut in i bladet (DNA/tungsten-kulor), cell-suspension, regenerering.

8. Beskriv följande 10 termer i 1-3 meningar och/eller någon figur. Förklara även kortfattat betydelsen av varje term för molekylär bioteknik. (1 poäng/term = totalt 10 poäng)
- RNaseH
 - Immunoprecipitering
 - TBLASTX
 - Molecular Beacon
 - Orbitrap
 - Två-hybrid-screening
 - Meta-genom
 - BLOSUM-matris

- i. RT-QPCR
- j. Blå/vit-selektion

Frågor från Lisbeth Olsson på avsnittet Enzymteknik

9. Vid produktion av bioethanol, så är ett led i framställningsprocessen att man genomför en enzymatisk nedbrytning av cellulosa. Detta process-steg är dyrt och man arbetar därför med olika strategier för att minska kostnaden i detta steg.
- a. Vilka enzymgrupper behövs för att bryta ner cellulosa? Namnge varje grupp och beskriv hur de medverkar till hydrolysen av cellulosa, genom att beskriva vilken typ av bindning dessa enzym kan bryta (3 poäng)
 - b. Definera och beskriv skillnaden mellan directed evolution och protein engineering (Svaret skall ta upp fördelar och nackdelar med metoderna) (2 poäng)
 - c. I arbetet med att förbättra den enzymatiska hydrolysen har man för avsikt att genomföra hydrolysen vid högre temperatur. Dock har man kommit fram till att de enzymer man använder har ett temperatur-optimum på 45°C. Varför ökar aktiviteten med temperaturen och vad händer när man passerat enzymets temperatur-optimum? (2 poäng)
 - d. Eftersom man gärna vill använda enzymet vid högre temperature än 45°C beslutar man sig för att förbättra enzymets egenskaper. Ge ett förslag på hur man kan gå tillväga för att nå detta mål vid användning av directed evolution och ett förslag vid användning av protein engineering (2 poäng)

10. Henrik har under längre tid arbetat med utveckling av glukos-isomeras och han har precis genomfört en kinetisk studie. Henrik har mätt enzymaktiviteten vid en glukoskoncentration på 0.25, 0.5, 1, 2, 5 och 10 mM. De motsvarande uppmätta enzymaktiviteterna var 0.64, 1.09, 1.68, 2.31, 2.94 och 3.30 U. Hjälp honom att beräkna K_m och V_{max} . Ditt svar skall innehålla värden för K_m och V_{max} (inklusive enheter), samt även redogöra för hur dessa värden beräknats (3 poäng)
11. Henriks chef ber Henrik att bestämma xylosens inhiberande verkan på glukos-isomeras och bestämma K_i värdet. Ge förslag på hur han skall göra. Förslaget skall täcka både vilka experiment som behöver genomföras och hur man skall kunna räkna fram K_i (2 poäng)
12. För att förbättra stabiliteten av glukos-isomeras beslutar man att immobilisera enzymet genom tvärbinding. Nämn en fördel och en nackdel med att använda en sådan immobiliseringsmetod, samt vilken påverkan en immobilisering förmodas ha på de kinetiska egenskaperna (1 poäng)