

# TENTAMEN för KMB056 - Molekylär Bioteknik

**2012-01-12 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. Din forskargrupp är av synnerligen oklar anledning intresserad av att isolera gener vars uttryck och splicing-former är specifika för vävnad från näbben hos australiskt näbbdjur (Platypus), vars hela genom nyligen blev sekvenserat. Din kollega tar en liten näbb-biopsi från sitt senaste försöksdjur och ger till dig, varefter din uppgift blir att konstruera ett cDNA-bibliotek från denna vävnads-bit. Beskriv de steg som måste utföras med startpunkt i mRNA isolerat från näbb-vävnaden, till att hela biblioteket föreligger som plasmider i E.coli. Observera att det är absolut nödvändigt att alla cDNA är av full-längd. (7 poäng)

polyT-primer, revers-transkriptas, biotinylera mRNA, RNaseI, isolera cDNA/mRNA hybrid, RNaseH tar bort mRNA, lägg till polyG på 3'ände, polyC-primer, kloning av produkt i klippt plasmid, transformation och selektion i E.coli.

2. Du gör också cDNA-bibliotek från andra vävnader av näbb-djuret med avsikten att med hjälp av DNA-sekvensering avgöra vilka gener som har annorlunda splicing-former i näbben. En sån studie kan bara utföras med "next-generation sequencing", och ni har tur som har tillgång till Illumina/Solexa-systemet. Beskriv hur detta system fungerar med avseende på provberedning och sekvens-resultat. Börja med isolerat DNA och sluta med en kortfattad beskrivning av hur det går till att sammanställa sekvensen av hela cDNA-molekyler . (6 poäng)

Fragmentera DNA, lägg till adapters/linkers på ändarna av fragmenten, glasplatta med komplementära oligonukleotider används för att fästa in enstaka DNA-fragment på slumpvisa platser, PCR-reaktion för att skapa fläckar av 1000-tals identiska fragment, Sekvenseringsreaktion med blockerade nukleotider, läs av ljus i olika våglängder (en färg/bas-typ), de-blockera, nästa bas.... korta sekvenser pusslas ihop i en dator.

3. Studiet av dina cDNA-bibliotek ger dig en massa information om förändringar på mRNA nivå, och du vill nu också undersöka hur protein-sammansättningen skiljer sig åt mellan proverna. Du är inte riktigt lika välutrustad för dessa studier, så du får hålla tillgodo med att använda två-dimensionell gel-elektrofores (2D-PAGE). Beskriv hur separation av proteiner från ett tidigare framställt protein-extrakt utföres med denna teknik. Svaret ska också innehålla hur du avser att detektera de separerade proteinerna och en motivering till varför du väljer denna detektionsmetod. (5 poäng)

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!)

4. En hel del proteiner verkar vara närvarande endast i proverna från Platypus-näbb och du vill naturligtvis veta vilka gener de motsvarar. Ditt lab är som sagt inte så väl-utrustat, men en ESI-kopplad till en jonfälla finns att tillgå. Beskriv hur du kan identifiera dina separerade proteiner från 2D-PAGE med

hjälp av denna mass-spektrometer. Beskriv även kortfattat principen för denna mass-spektrometers jon-källa och mass-analysator (4 poäng)

Trypsin, elektropray (sur lösning som avdunstar, acceleration av laddade peptider), jonfällan fångar in peptiderna, variation i elektrodernas spänningar släpper ut en massa åt gången. Peptidfingeravtryck jämförs med teoretiskt framräknade fingeravtryck.

5. Eftersom du under din studietid gick en kurs i molekylär bioteknik, så vet du ju att längden av polyA-svansen på 3' änden av mRNA kan variera. Du vill undersöka detta genom att isolera en fraktion av mRNA med väldigt kort polyA-svans och en fraktion med lång polyA-svans och sedan jämföra vilka mRNA som är olika högt representerade i de båda fraktionerna med hjälp av spotted microarray.
- a. Beskriv hur du skulle gå tillväga för att få fram de båda fraktionerna av mRNA (2 poäng)

bind in till polyT-kulor, eluera vid olika temperatur.

- b. Beskriv hur du skulle få fram expressions-skillnader med hjälp av spotted microarray-systemet. Svaret ska innehålla en redogörelse för prov-hanteringen, av vad som finns på microarrayen samt hur skillnaderna i expression avläses (4 poäng)

cDNA inmärkning, två olika färger, en gen/punkt, ratio mellan signalerna.

6. Ett protein verkar särskilt intressant då det är både högt uttryckt och dessutom i sitt mRNA har en exon som är specifik för näbb-vävnaden. En gen med oerhört hög homologi återfinns i mus-genome. Du vill testa om den näbb-specifika exonen är viktig för nosens utveckling i möss och du vill därför ersätta den aktuella exonen med ett LoxP-site. Hur skulle du gå tillväga för att åstadkomma en homozygot mus som helt saknar exonet i sitt genom (ersatt med LoxP-sitet)? (6 poäng)

Markör-gen med flankerande homologi och LoxP-sites på varje sida, positiv-negativ selektion, transformation av ES-celler, transient uttryck av Cre-rekombinas, Blastocyst in i pseudogavid mus-> Chimeric mice, korsa och identifiera knockade möss

7. Beskriv följande 8 termer i 1-3 meningar och/eller någon figur. Förklara även kortfattat betydelsen av varje term för molekylär bioteknik. (1 poäng/term = totalt 8 poäng)
- a. ddNTP
- b. Immunoprecipitering

- c. BLASTN
- d. Monoklonal antikropp
- e. Ti-plasmid
- f. Två-hybrid-screening
- g. Meta-genom
- h. BLOSUM-matris

8. Nedan anges sekvensen av tre olika primers. Ange och motivera vilken du skulle välja i första hand som en PCR-primer. Motivera också kortfattat vad som är fel med de två primers du inte skulle välja. (3 poäng)

- a. GAGCCGGGGGAATTTAAAA (bara AT på 3'ände)
- b. TGCACGATGAAGACCTTGAG (bra!)
- c. ATAGTTTAAACTTTTAACTC (för få GC)

## Frågor från Lisbeth Olsson på avsnittet Enzymteknik

- 9.** Stärkelse används ofta som råvara vid ölbryggning. Eftersom stärkelse är en polymer, så krävs det att den bryts ner till mindre sackarider innan jäst kan använda den som kolkälla och producera etanol. I de flesta processer använder man enzymer för att bryta ned stärkelsen.
- Beskriv stärkelsens uppbyggnad (beskrivning skall inkludera en beskrivning av bindningstyp) (2 poäng)
  - Beskriv vilka enzym som behövs för att hydrolysera stärkelse och vilka typer av bindningar varje enzym-typ bryter? (2 poäng)
  - Man önskar öka temperaturen för hydrolys-processen och behöver då enzymer som har bättre termostabilitet än de traditionellt använda enzymerna har. Hur kan man hitta sådana enzym? Ge ett motiverat förslag hur man kan göra detta. (2 poäng)
- 10.** Glukosisomerase används i stor utsträckning i industrin för att göra stärkelsesirap. Glukosisomerase katalyserar isomeringsreaktionen från glukos till fruktos. Eftersom fruktos har en sötare smak än glukos, leder detta fram till en produkt som är sötare, men som har samma kaloriinnehåll. För industriell användning av glukosisomerase så har en rad olika immobiliseringsmetoder undersökts.
- Definiera vad enzym-immobilisering är (1 poäng)
  - Man immobiliserar glukoseisomerase till ett bärrmaterial med hjälp av en kovalent bindning. Gör en skiss av enzym-immobiliseringsmetoden som inkluderar bindningarna (1 poäng)
  - Vilka krav ställs på ett bra bärrmaterial? Ange 3 nödvändiga egenskaper bärrmaterialet skall uppfylla. Ge ett exempel på ett bärrmaterial som kan användas i det givna exemplet. (2 poäng)
  - Vilka krav ställs på kopplingreaktionen (dvs. Reaktionen där det skapas en koppling mellan enzymet och bärrmaterialet) (1 poäng)

- 11.** Enzymers aktivitet och beroende av substratkoncentrationen beskrivs ofta med Michaelis-Menten kinetik.
- a. Beskriv med Michaelis-Menten kinetik hur enzymaktiviteten beror av substrat-koncentrationen. (1 poäng)
  - b. Skissera en Lineweaver-Burk plot. Beskriv hur man bestämmer  $K_m$  och  $V_{max}$  från en sådan plot. (1 poäng)
  - c. Din chef har bett dig att undersöka de kinetiska egenskaperna hos 10 olika glukos-isomeraser. Baserat på de framkomna resultaten skall du rekommendera vilket enzym som företagets nya process skall baseras på. Ge ett motiverat förslag på hur du skulle välja ut enzymet till processen (en del av svaret skall baseras på enzymets kinetiska egenskaper) (2 poäng)