

# TENTAMEN för KMB056 - Molekylär Bioteknik

**2012-10-23 em (V-salar)**

Totalt 60 poäng

(Frågor 1-9: Joakim Norbeck, totalt 45 poäng;  
Frågor 10-11: 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. Du jobbar i en grupp som har som mål att ta fram frost-tåliga morötter och drar dig till minnes att fiskar i Antarktis kan leva i underkylt vatten. Du får dig tillskickat prover från fiskar fångade i södra polarhavet och vill nu sekvensera 10 olika frys-toleranta fiskars genom (=arvs massa) för att hitta varianter på "anti-freeze-protein" (AFP). På ditt universitet har det nyligen investerats i ett instrument från 454, vilket använder pyrosekvensering som ger dig ca 400 baspar i varje enskild sekvensläsning. Beskriv hur du med hjälp av denna maskin kan sekvensera hela genom. Börja med DNA-prov från fisk och beskriv sedan hur provet skulle behandlas samt hur pyrosekvenseringen fungerar. Inkludera i ditt svar vilket som är det största problemet med metoden? (5 p)

fragmentera, linker<adapter-sekvens, emulsions-PCR, pyrosekvenseringsreaktionen och ljusutsändning, fler än 5 identiska baser i rad.
2. Sekvensen av ett AFP-protein finns känt sen tidigare. Du vill söka med BLASTP i din egen-producerade databas av förutsagda fiskproteiner från dina 10 olika sekvenserade arter efter homologer. Beskriv kortfattat principen för BLASTP. (3 p)

tre-bokstavs-ord, poäng mha BLOSUM-matris, signifikansvärden
3. Genomen från alla 10 fisk-sorterna innehåller AFP-liknande proteiner. Eftersom fiskarnas genom innehåller många introner vill du göra cDNA som kodar för AFP-protein, med utgångspunkt i mRNA från fisk. Beskriv hur du kan framställa full-längd cDNA. (4 p)

poly(T)-primer, reverstranskriptas, RNaseI och RNaseH+biotin, polyC-adding, PCR med polyT mot polyG...
4. Nu har du klonat ditt AFP-cDNA i en plasmid. För att kontrollera lokalisering och uttryck vill du nu göra en GFP-fusion med det mest lovande AFP-proteinet. Beskriv en PCR-baserad strategi för att framställa en konstruktion där du kopplar på GFP på C-terminalen av AFP-proteinet. Utgå från att du har genen för AFP-genen på en plasmid och GFP på en annan plasmid. (3 p)

PCR1 med primer som PCR'ar AFP, dubbelriktad primer=>megaprimer. PCR2 med megaprimer (som kan binda GFP) samt primer nedströms om GFP.
5. Din AFP-GFP-fusion lyckades direkt! Nu vill du föra in fusions-genen i morot m h a partikel-bombardemang följt av regenerering av hela plantor från celler. Hur skulle den DNA-konstruktion se ut som du bombarderar in, och hur skulle du kunna se vilka växter som tagit upp ditt DNA? (2 p)

växtpromotor-GOI-terminator-växtmarkör, markören visar vilka celler som är transformerade (går också att titta på GFP uttryck istället för markör... mer jobb, men OK)

6. Eftersom morötterna ska kunna ätas är det viktigt att inga stora förändringar sker på gen-expressions-nivå förutom uttrycket av AFP-proteinet. Du vill jämföra din ursprungliga morot med en mutant-morot på mRNA-nivå. Kommersiellt finns en oligonukleotid array för morot att köpa. beskriv hur denna typ av array fungerar samt hur du skulle gå tillväga för att finna gen-expressions-skillnader. (4 p)  
**cDNA och inmärkning, korta oligos, många oligonukleotider/gen, match/mismatch-rutor & ett prov/array**
7. mRNA i all ära, men allra viktigast är ju att veta om proteiner ändrar sitt uttryck. Som en modern forskare med obegränsade resurser så tar du till ICAT-systemet kombinerat med ESI-MS/MS.
- a. Beskriv principen för ESI som jonkälla (1 p)  
**peptider i sur lösning sprayas, droppar torkar in, positiv laddning på peptider.**
- b. Beskriv hur en MS/MS uppsättning kan användas för att utläsa sekvensen av peptider. (3 p)  
**välj peptid-massa, fragmentera, läs av fragment i nästa analysator => y- & b-serier.**
- c. Beskriv principen för protein-kvantifiering med ICAT. Ditt svar ska inkludera vilka de funktionella grupperna i ICAT-reagenset är, hur proverna märks in och behandlas, samt hur vi kan utläsa mängd-skillnader av proteiner från de olika proverna. (5 p)  
**tunga och lätta reagens (linkergrupp), biotin- och reaktiv-ände, trypsin, märk in peptider, blanda prov, rena upp cystein-peptider m h a biotin-tag, mass-spektrometri => 8 Da skillnad mellan peptider. skillnad i topphöjd ger expressions-skillnad**
8. Eftersom din morot blir en kommersiell succé (i länder som tillåter GMO-grödor!) så blir du kontaktad av en får-forskare som vill göra även får köld-toleranta genom att uttrycka AFP-protein i sitt blod. Hur skulle du med en retrovirus-baserad metod få in en konstruktion med AFP-genen i fårceller? Beskriv vilken typ av plasmid din konstruktion ska sitta i, samt de steg som måste utföras för att din konstruktion slutligen kan integreras i kromosomerna i fårceller. (5 p)  
**trunkerat virus-vektor där du stoppar in din gen mellan flankerande LTR-regioner, packaging cells (virulensgener på plasmid) => viruspartiklar, infektera kultur av fårceller.**
9. 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)
- a. Metabolic footprint - **extracellulära metaboliter**

- b. Pronuclear injection - injektion av DNA i den "manliga" cellkärnan i nybefruktat ägg.
- c. Ti-plasmid - plasmid från agrobakterium som används för att föra in genetiskt material i växter.
- d. Molecular Beacon - "hårnåls"-formad dna-molekyl som lyser bara när den binder till specifik sekvens.
- e. Protein detection microarray - glasskiva med specifika antikroppar i varje punkt.
- f. Två-hybrid-screening - 2 fusionsproteiner uttrycks, om de interagerar i cellkärnan så bildar de en transkriptionsfaktor som ger uttryck av en rapportör-gen.
- g. Meta-genom - genomet från en miljö.
- h. CLUSTALW - program som jämför två eller flera olika protein eller dna/rna sekvenser och ger ett mått på likhet.
- i. RT-QPCR - Revers-transkriptas kvantitativ PCR. "mäter" hur mycket det fanns av en specifik RNA sekvens i provet.
- j. Blå/vit-selektion - metod för att skilja plasmider som återligerat från plasmider som har tagit upp ett insert.

## Frågor från Lisbeth Olsson på avsnittet Enzymteknik

10. På företaget EnzyVision arbetar man med att designa en glukos-sensor som via en enzymatisk assay med immobiliserat glukos-oxidas (GOD) används för att uppskatta glukos-koncentrationen i blod. I reaktionen bildas väteperoxid som man mäter i mätinstrumentet. Första steget i arbetet är att välja vilket enzym som man skall användas i denna application. Man har två olika enzym att välja på: GODasp har ett uppmätt  $K_m$ -värde på 0.2 mM och  $V_{max}$  på 1,5 U/mg och GODbac har ett uppmätt  $K_m$ -värde på 1 mM och  $V_{max}$  på 3 U/mg. Mätvärdena är bestämda vid rumstemperatur.
- Skissera hur produktionshastigheten av väteperoxid beror på substratkoncentrationen för de två enzymerna. I figuren skall också enheter anges. (2 p)
  - Man vill arbeta med att mäta glukoskoncentrationen i intervallet 0.2-1.0 mM. Vilket av enzymerna väljer du? Motivera ditt svar. (2 p)
  - Man bestämmer att den enzymatiska omvandlingen skall ske i en packad bädd-kolonn med enzymet kovalent bundet till ett bärarmaterial. Ge ett motiverat förslag till vilket bärarmaterial som är lämpligt att använda i denna application. (1 p)
  - Nämn två fördelar och två nackdelar med att använda kovalent bindning vid immobiliseringen. (2 p)
  - När man försöker implementera analysmetoden, inser man att enzymerna har dålig temperaturstabilitet. Emilie vill använda "directed evolution" för att öka stabiliteten och Emil tycker att "target design" är mera effektivt. Förklara vad de olika metodernas princip för deras chef. Ge ett motiverat svar till vilken metod de skall välja och förklara hur denna metod används för att öka temperatur-stabiliteten. (3p)
11. En process som det sker mycket utvecklingsarbete för att få ekonomiskt hållbar är produktion av bio-etanol från lignocellulosa-material, där man använder jäst, *Saccharomyces cerevisiae*, som jäsningsorganism.
- Vilka orsaker finns det till att man ser lignocellulosa-material som en bättre råvara för processen än sukros och stärkelse som används idag? Ge ett exempel på en lignocellulosaråvara (1 p)
  - Ange 4 krav som ställs på en mikroorganism för att det skall vara en lämplig produktionsorganism vid etanolproduktion från lignocellulosa. (2 p)
  - En möjlighet att genomföra stamförbättring är att fokusera på transkriptionsfaktorerna i cellen. Förklara vad metoden går ut på och motivera när denna metod är speciellt användbar. (2 p)