

# TENTAMEN för KMB056 - Molekylär Bioteknik

**2013-01-15 em (V-salar)**

Totalt 60 poäng

(Frågor 1-8: Joakim Norbeck, totalt 45 poäng;  
Frågor 9-12: Lisbeth Olsson, totalt 15 poäng).

Betygsgränser:           30-38.5 poäng = betyg 3  
                                  39-47.5 poäng = betyg 4  
                                  48-60 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. Föt att hitta homologer till gen X som är känd från studier i andra organismer så vill du sekvensera genom hos ett kliniskt intressant isolat av bakterien E.coli. Beskriv principen för sekvensering med Illumina/Solexa-metodik. Anta att du börjar med ett rör innehållande rent kromosomalt DNA. Sluta din beskrivning med hur du läser av sekvenserna som du senare kommer att använda för att sammanställa hela genomsekvensen. (5 p)

fragmentera DNA, add linkers, PCR-reaktion på platta, sekvenserings oligonukleotider, blockerade nukleotider, läs inbunden bas i varje position, deblockera.

2. Din coli-bakterie hade en gen som var homolog till gen X. Du klonar denna nya favorit-gen (som kodar för ett protein med 500 aminosyror) på plasmid för uttryck i en labstam av E.coli. Av okänd anledning vill du nu ta bort en förutsagd proteindomän som motsvarar aminosyror med nummer 50-100. Beskriv en strategi för att med utgångspunkt i den ursprungliga plasmiden åstadkomma en plasmid med din önskvärda muterade gen-form. (OBS! Det finns inga lämpliga restriktions-enzym-sites för att klippa bort proteindomänen direkt). (5 p)

Megaprimer-metodik, se lab 1!

3. Du vill se om avlägsnandet av den lilla proteindomänen från förra frågan påverkar interaktionen med andra proteiner och kopplar på en TAP-tag på C-terminalen av ditt protein. Beskriv principen för TAP ("tandem-affinity purification") rening av protein-komplex. Börja med ett protein-extrakt sluta med att du har ett rör innehållande den slutliga renade fraktionen. (3 p)

Två olika proteindomäner separerade av ett proteas-klyvnings-site (t ex Protein A och Calmodulin binding peptide). Rening 1, klipp, Rening 2.

4. Nu vill du veta vad som finns i röret. Du har en LC-ESI-Quadropol/TOF till ditt förfogande (LC står för Liquid chromatography).

(a) Beskriv principen för ESI samt vilken roll denna del av mass-spektrometern har. (2 p)

peptider i sur lösning sprayas ut i vacuum. laddningar stannar på peptider. Jonisera peptiderna för acceleration in i Quadropol.

(b) Redogör för vilken roll Quadropolen har i denna maskin-uppsättning, svaret ska även innehålla en kort beskrivning av Quadropolens funktion (2 p)

Quadropol är fyra parallella elektroder där spänning kan varieras för att endast släppa igenom en molekylvikt. Möjliggör detektion av vilka massor som finns i prov, samt att välja en massa i taget för vidare analys.

(c) Beskriv hur denna maskin kan användas för att utläsa vilka proteiner som finns i det ursprungliga provet. Ditt svar ska börja från protein-provet och sluta med hur du kopplar mass-spektrometridata till motsvarande gen-sekvens. (3 p)

Trypsin-klipp proteiner för att få peptider. Välj en peptid i taget. Låt peptid passera kollisionscell. detektera vilka fragment som bildats. y-serier = C-terminala fragment, b-serier = N-terminala. Mass-skillnad mellan y-jonerna motsvarar aminosyror.  $y_1 - y_2$  ger aminosyra 1,  $y_2 - y_3$  ger aminosyra 2 o s v.... aminosyrasekvens används m h a BLASTP.

(d) Varför behövs LC-steget? (1 p)

För att minska antalet peptider/volym.

5. Beskriv hur du skulle plocka bort en exon från homologen till din favorit-gen specifikt från alla celler som producerar insulin i musens bukspottkörtel. Din beskrivning ska innehålla: (i) vilka två DNA-konstruktioner som krävs samt vilka funktionella enheter dessa innehåller. (ii) de steg som krävs för att du ska få in dessa DNA-konstruktioner i musens samtliga celler. (5 p)

Konstruktion 1: homologi-LoxP-Exon-LoxP-Markör-homologi

Konstruktion 2: Markör + Cre-rekombinas efter bukspottkörtel-specifik promotor.

Transformera in båda konstruktioner i ES-celler. Selekttera celler med båda konstrukt och plocka in dessa celler i blastocyst.

Låt embryo utvecklas i pseudogavid mushona. Ungar som föds blir "chimeriska" (blandningar). Korsa och selekttera avkomma med konstruktionerna.

6. Du vill uttrycka din favoritgen i tomatplantor. Vilken är den vanligaste metoden att föra in DNA-konstruktioner i växter? Beskriv kortfattat principen för denna metod. (4 p)

Agrobacterium metoden. I en binary vector sätter du mellan T-DNA flankerna in din gen och en växtmarkör. transformera in din konstruktion i en agrobacterium som uttrycker virulensgenerna på en separat plasmid. Infektera växt(celler) med dessa bakterier. Selekttera plantor med markör.

7. Det är viktigt att verifiera att inte uttrycket av en massa andra gener ändras i den modifierade växten. Beskriv hur oligo-nukleotid microarray-systemet fungerar samt hur du skulle gå tillväga för att finna skillnader i det totala genuttrycket mellan muterad och ursprunglig växt. Börja med att du har renat upp mRNA från varje växtsort i ett rör. (5 p)

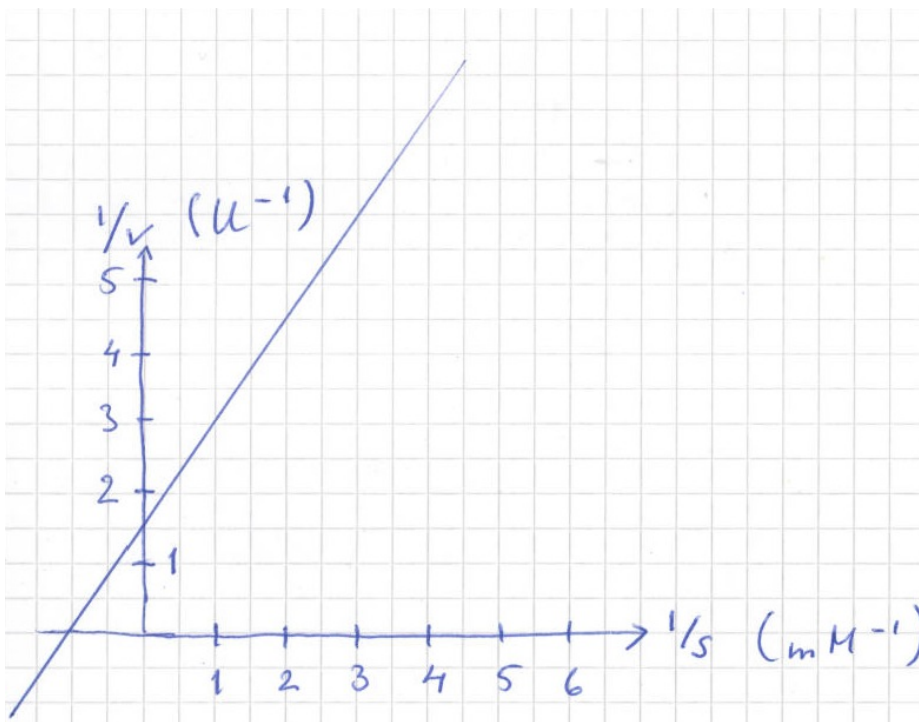
På array finns många oligo-nukleotider/gen. Varje oligo har en mismatch ruta. oligonukleotider byggs upp bas för bas direkt på plattan m h a "masker".

Man kör ett prov/array. mRNA märks in med fluorescens vid omvandling till cDNA. Inkubera cDNA på array, läs av ljusstyrka i varje punkt (mismatch-ruta fungerar som bakgrunds-subtraktion)

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)
- a. **Metabolic footprint**  
analys av metaboliter i lösning/medium
  - b. **Lipofection**  
liposom-medierad transformation av celler
  - c. **BLOSUM-matris**  
tabell där aminosyroras likhet och relativa förekomst poängsätts. nödvändig för BLASTP.
  - d. **ICAT**  
reagens för att märka in peptider för MS-baserad kvantifiering
  - e. **GFP**  
green fluorescent protein. Lokalisering av proteiner.
  - f. **Två-hybrid-screening**  
Protein 1 kopplas till DNA-bindande domän, protein 2 till aktivator-domän. Om Protein 1 och 2 interagerar kan rapportör-gen uttryckas.
  - g. **Meta-genom**  
allt DNA i en miljö. Kan t ex användas för att studera artsammansättning eller för att identifiera nya enzymer
  - h. **CLUSTALW**  
Program som utför "aligning" av  $\geq 2$  olika sekvenser.
  - i. **RNA-seq**  
Sekvensering av RNA molekyler. Möjliggör kvantifiering av gen-uttryck
  - j. **Blå/vit-selektion**  
Metod att skilja celler som tagit upp plasmider med "insert" från celler vilka tagit upp "tomma" plasmider.

## Frågor från Lisbeth Olsson på avsnittet Enzymteknik

9. Glukos-isomeras används i stor utsträckning i industrin för att göra stärkelsesirap. Glukos-isomeras katalyserar isomeringsreaktionen från glukos till fruktos. Eftersom fruktos har en sötare smak än glukos, leder detta fram till en produkt som är sötare men med samma kaloriinnehåll. För industriell användning av glukos-isomeras så har en rad olika immobiliseringsmetoder undersökts.
- Definiera vad enzymimmobilisering är (1 p)
  - Två intressanta immobiliseringsmetoder för glukos-isomeras är
    - Tvärbindning med BSA och glukos-isomeras
    - Kovalent inbindning till glaskulorDitt svar ska bestå av en skiss av de två olika enzymimmobiliseringsmetoderna som inkluderar bindningarna (2 p)
  - Ge en fördel och en nackdel med varje immobiliseringsmetod, motivera ditt svar (2 p)
10. Urban och Ulrika undersökte beta-glukosidas kinetiska egenskaper och de kunde dra slutsatsen att enzymet följer Michaelis Menten kinetik
- Skriv upp ekvationen för Michaelis Menten kinetik (1 p)



- Uppskatta  $K_m$  och  $V_{max}$  för beta-glukosidas från den givna grafen. Redogör för hur du kommit fram till resultatet (2 p)

- c. Urban och Ulrika fortsätter sina kinetiska försök och undersöker glukos påverkan på kinetiken. De kommer fram till att etanol inhiberar enzymets aktivitet kompetitivt. Hur influeras i detta fall värdena för  $K_m$  och  $V_{max}$ ? (2 p)
11. Eftersom man gärna vill använda enzymet vid högre temperaturer än  $45^\circ\text{C}$  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 (2p)
12. Vid produktion av bioetanol, så är ett led i framställningsprocessen att man genomför en enzymatisk nedbrytning av cellulosa. Detta process-steg är kostsamt och man arbetar därför med olika strategier för att minska kostnaden i detta steg. 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 p)