

# 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 misstänker att dina två isolat av jäst-svamp skiljer sig åt genom storleken av kromosom XII. En bra metod att undersöka storlekar av kromosomer är Southern Blotting. Beskriv principen för Southern blotting (3 poäng)  
**Separera DNA på gel, för över till membran, inkubera med inmärkt probe**
2. Visst var det så att kromosom XII var större i den ena jäst-stammen. Du vill nu sekvensera hela genomet hos din jäst-svamp med Illumina-sekvensering. Beskriv hur denna metod fungerar. Börja med Fragmenterat genomiskt DNA, sluta med hur sekvensen avläses. (5 poäng)  
**Ligera adaptor-ändar på fragment, "PCR" på yta med komplementära sekvenser, sekvenserings oligonukleotider, blockerade nukleotider, läs inbunden bas i varje position, deblockera.**
3. Du hittar en intressant gen vilken du raskt döper till GNU1. För att kunna lokalisera proteinet så vill du introducera en GFP-protein-domän precis innan stop-kodonet på rätt plats i kromosomen. Eftersom du jobbar med jäst så fungerar homolog rekombination utmärkt. Hur skulle ditt DNA-fragment se ut, och vilken metodik måste du använda om du vill behålla den naturliga nedströms (terminator)-regionen? .... (4 p)  
**homologi1-GFP-LoxP-Markör-LoxP-homologi2, Uttryck Cre-rekombinas från plasmid efter verifierad integrering.**
4. GNU1-genen verkar ha en intressant funktion som du vill undersöka i E.coli med hjälp av T7-lac systemet. Beskriv hur detta system fungerar, d v s hur det kan användas för att styra gen-uttryck i E.coli. (3 poäng)  
**T7-polymeras finns i E.coli-genom (BL21) efter en Lac-promotor. Din gen finns på plasmid efter en T7-lac-promotor, där även LacI-repressor finns på plasmiden. Tillsats av IPTG eller odling på laktos ger uttryck av T7-polymeras som kan hitta mål-promotor vilken också inte är blockerad av Lac-repressorn.**
5. Efter att snabbt och lätt ha gjort en deletion av GNU1-genen i jästsvampen, så vill du nu utvärdera effekten på genuttryck med en Tiling array.
  - a. Vad finns på ytan av denna typ av array, och varför? Du behöver inte beskriva processen att konstruera arrayen (2 poäng)  
**20-25 bp överlappande oligonukleotider komplementära mot genomisk sekvens (många olika oligos täcker genomets båda strängar). Varje sekvens har även en mismatch ruta som negativ kontroll.**
  - b. Hur kan du utläsa förändringar av gen-uttryck med detta system? Börja ditt svar med att du har extraherat RNA från både den muterade jästsvampen samt den ursprungliga vild-typs-jästsvampen. (3 poäng)  
**märk in ditt RNA direkt, eller via cDNA-syntes eller cRNA-syntes. Inkubera ett prov/array. Läs av inbindning korrigerad för mismatch-ruta för varje punkt. Upprepa för prov2. Jämför data-set.**
6. Från dina studier anar du att GNU1-genen kodar för ett protein som fäster metylgrupper på histidiner. Du vill därför jämföra GNU1-deletionen med

vildtyps-jästsvampen med avseende på förändringar i protein-metylering på histidiner i alla cellens proteiner. Du har tillgång till en MS/MS-kapabel maskin (Quadropol-TOF).

- a. Som jonkälla kan du välja antingen MALDI eller kromatografi-kopplad-ESI. Motivera kortfattat vilken som är mest lämplig i detta sammanhang. (2 poäng)

Utan tvekan LC-ESI, eftersom det är den enda som kan separera peptiderna för att minska komplexitet i provet.

- b. Beskriv vilken roll quadropolen har i denna maskin, samt kortfattat hur en quadropol fungerar. (2 poäng)

Q funkisar som en mass specifik "gate". fyra cylindriska elektroder över vilka två spänningar kan varieras avgör vilka massor som ska slippa igenom till detektor.

- c. Anta att du har protein-extrakt från både mutant och vildtypsjäst. Hur skulle du med din mass-spektrometer kunna identifiera modifierade histidiner? Svaret behöver inte innehålla beskrivning av maskinen som sådan. (4 poäng)

Trypsin-klipp protein, analysera peptider i prov, fragmentera varje peptid i kollisions-cell, bestäm massorna av y- och b-serier. Läs ut sekvens samt identifiera hopp i y-serien motsvarande metyl-histidin.

7. Du vill uttrycka GNU1-genen i mammalieceller. Uppgiften i denna fråga är att beskriva hur du skulle gå tillväga för att introducera din gen i en mammalie-cell-linje med hjälp av en retrovirus-baserad strategi. Svaret ska innehålla beskrivning av de DNA-konstruktioner som måste göras, samt de processer som krävs för att generera viruspartiklarna som ska infektera din cell-linje. Du behöver inte beskriva vad som sker i mål-cellerna efter infektionen. (5 poäng)

Virusets genom "desarmeras/trunkeras" genom att det delas upp i virulens-gener och LTR-regioner. virulensgenerna uttrycks i en "Packaging cell". GNU1 ligger i ett MCS mellan LTR-regionerna på en plasmid, som sedan transformeras i packaging cellerna. Viruspartiklar med GNU1-konstruktionen kommer att bildas och kan användas för att infektera cell-linjen.

8. GNU1 innehåller en målsekvens med ett kodon AGT som du vill mutera (understruket i nedanstående sekvens):

CGTAAGTCGCG

vilken av följande tre primers kan användas för att i en PCR-baserad strategi byta ut detta AGT-kodon mot ett ATT-kodon? (2 poäng)

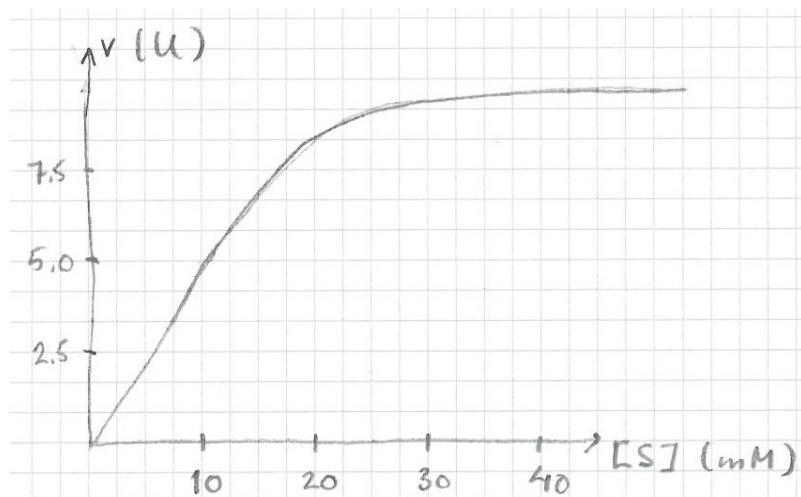
- a. CGCGTTATACG  
b. CGCGATTTACG  
c. CGCGAATTACG

primer C är rätt! De andra ger fel kodon.

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. Blå-vit selektion
  - b. Error-prone PCR
  - c. BLOSUM-matris
  - d. RNase H
  - e. RT-qPCR
  - f. ELISA
  - g. Isoelektrisk fokusering (IEF)
  - h. ICAT
  - i. Ti-plasmid
  - j. Floxing

## Frågor från Lisbeth Olsson på avsnittet Enzymteknik

1. Emil och Emilia har undersökt glukosisomeras kinetiska egenskaper och de drog slutsatsen att enzymet följer Michaelis-Menten kinetik
  - a. Skriv upp ekvationen för Michaelis-Menten kinetik (1 p)
  - b. Uppskatta  $K_m$  och  $V_{max}$  för glukosisomeras från nedanstående graf. (2 p)



- c. Man undersökte också om sukros hade en inverkan på isomeriseringshastigheten. Man kom fram till att sukros verkar inhiberande och efter ytterligare kinetiska undersökningar kunde man dra slutsatsen att sukros kompetitivt inhiberar glukose-isomeras, illustrera i en Lineweaver-Burk plot hur den kompetitiva inhiberingen påverkar kinetiken (1 p)
  - d. Glukos-isomeras har sitt temperatur-optimum vid 60 grader Celcius. Varför ökar aktiviteten med temperaturen upp till 60 grader för att sedan minska? (2p)
  - e. Ge ett förslag till hur kan man ta fram ett glukos-isomeras med ett högre temperaturoptimum (1 p)
  - f. Glukos-isomeras immobiliserades med hjälp av tvärbinding. Beskriv metoden i ord och gör en principskiss som beskriver denna immobiliseringsmetod. Diskutera vad som är för och nackdelarna med att immobilisera glukos-isomeras (3 p)
2. Gör en principskiss över hur amylopektin och cellulosa är uppbyggda. Det skall framgå vilka monomerer som bygger upp polymererna och vilken typ av bindningar som finns mellan monomerna. Vilka enzymer behövs för att bryta ner amylopektin (5p)