

MANU KURSER A/S

**Biokemi
Opgavesæt**



© 2009 MANU KURSER A/S

Nucleært DNA

- 1) Hvilke 3 hovedbestanddele består chromatin af?
- 2) Beskriv opbygningen af et nucleosom
- 3) Hvad er formålet med chromatinstrukturen?
- 4) Hvordan interagerer DNA og histoner i nucleosomet?
- 5) Hvordan kan interaktionerne mellem DNA og histoner modificeres?
- 6) Hvad er effekten af histon acetylering?
- 7) Hvad hedder enzymer der katalyserer denne reaktion?
- 8) Hvilken del af histonerne acetyleres?
- 9) Hvilken aminosyre acetyleres?
- 10) Kan dette forklare ændringen i chromatinstrukturen?
- 11) Hvad hedder enzymer, der fjerner acetylgruppen igen?
- 12) Hvad er effekten af methylering af histoner mht.
- 13) Giv et bud på antal af H1-molekyler i diploid human celle i G1-fasen?

En nysgerrig medicinstuderende ønsker at estimere den samlede **længde af DNA** i cellekernen i en af hans diploide celler i G1-fasen.

I dobbeltstrenget DNA er afstand mellem 2 nabobasepar ca. 0,34 nm.

1) Hvad når han frem, hvis det anslås, at hans haploide genom består af ca. 3 milliarder bp?

Når han nu er i gang, prøver han også at estimere **vægten af DNA** i en diploid celle i G1-fasen.

2) Hvad når man frem til, når molarmassen for et basepar antages at være 660 g/mol?

I Biokemiøvelse 1 forsøger en studerende at estimere indholdet af DNA i kernefraktionen fra enterocythomogenatet.

Dette sker vha. spektrofotometri, idet DNA absorberer lys med en bølgelængde på 260 nanometer.

25 mikrol af kernefraktionen tilsættes 75 mikrol vand, hvorefter absorptionen ved 260 nm måles til 0,32

$A_{260} = 1$ svarer til en konc. af DNA på 50 mikrogram/mL

1) Beregn konc. af DNA i kernefraktionen.

Replikation:

Før celler deler sig, replikeres cellens genom.

- 1) I hvilken del af cellecyclus foregår denne syntese?
- 2) Hvilket enzym katalyserer indbygningen af nucleotider?
- 3) Giv et bud på syntesehastigheden i eucaryote celler
- 4) Giv et bud på antallet af basepar i en somatiske celle hos en medicinstuderende efter endt replikation
- 5) Hvad hedder de områder, hvor replikationen af DNA påbegyndes?
- 6) Giv et bud på antallet af disse steder i en medicinstuderendes genom, hvor DNA syntesen startes

For DNA replikation gælder følgende:

- 5' -3' -synteseretning
- Syntesen foregår bidirektionelt fra origin
- Produkterne er semikonservative
- DNA polymerasen kan IKKE starte de novo

- 7) Hvad er fordelene ved disse valg?
- 8) Tegn replikationsgaflen
- 9) Hvilke proteiner er en forudsætning for replikation?
- 10) Hvor og hvornår er der behov for disse proteiner?
- 11) Skitser DNA syntesen fra to "nabo"-replikationsgafler
- 12) Angiv størrelsen af det længste stykke DNA som en DNA polymerase laver i forbindelse med replikation i cellekernen hos en medicinstuderende
- 13) Hvordan minimeres omfanget af fejl (mutationer) i forbindelse med replikation?
- 14) Forklar tabel 5-1 i lærebogen (s. 271)

Spontane skader på DNA.

- 1) Nævn 2 eksempler på spontant opståede skader på DNA
- 2) Beskriv hvordan spontant opståede skader repareres
- 3) Nævn eksempler på miljøfaktorer, der kan inducere skader på DNA
- 4) Nævn kendt eksempel på skader skabt vha. UV-belysning
- 5) Hvordan skades DNA?
- 6) Beskriv hvordan en sådan skade repareres?
- 7) Hvad sker der i celler med manglende repair af spontantinducerede eller miljøinducerede DNA-skader?

Sammenlign opbygning af proteinkodende gener i eucaryoter og f.eks. lac operon i E.coli (procaryot).

1) Beskriv mindst to væsentlige forskelle

Sammenlign transskriptionel regulation af proteinkodende gener i eucaryoter og procaryoter.

2) Hvilke regioner er vigtige i hhv. eucaryoter og procaryoter?

Sammenlign opbygningen af en eucaryot mRNA og lac mRNA fra E.coli.

3) Skitser omfanget af modifikationer fra transskriptionen initieres til mRNA er klar til at blive translateret i hhv. eucaryot og procaryot?

4) Hvilke proteiner er involveret i modifikationerne, og hvornår finder modifikationerne sted?

Hvordan adskiller disse to mRNA-molekyler sig mht.:

5) Antallet af åbne læserammer?

6) Stabilitet?

I E.coli finder man i forsøg, at niveau af lac mRNA falder fra 100% til ca. 12,5 % på 6 min.

7) Hvad er halveringstiden for denne mRNA?

8) Hvordan foregår og kontrolleres nedbrydning af en eucaryot mRNA?

Splicing

Skitsér et pre-mRNA molekyle med 3 exons

1) Hvordan kan spliceosomerne finde ud af hvilke dele af pre-mRNA, der skal splices ud (som introns)?

2) Hvor på pre-mRNA molekylet er der sekvenser, der er vigtige mht. denne proces?

3) Beskriv udslicing af intron

I overgangen mellem exon (markeret med fed) og intron er der følgende consensus sekvens:

AGGURAGU

hvor R = A eller G

4) Hvad er konsekvenserne for en person, hvor den tilsvarende overgang mellem f.eks. exon 2 og intron 2 er **AUGURAGU** ?

Mindst en tredjedel af menneskets gener medfører syntese af varianter af et protein i f.eks. forskellige celler.

De næste spørgsmål drejer sig om et gen, der giver anledning til syntese af varianter af et protein i to celletyper.

5) Hvilken forskel på pre-mRNA er der i to celletyper, der laver hver sin variant af et protein?

6) Hvordan er splicing involveret i dannelsen af disse proteinvarianter?

Fra de to celletyper oprenses RNA og vha. primere rettet mod denne mRNA udføres RT-PCR forsøg.

Størrelsen af RT-PCR-produkterne er hhv. 815 og 1031 bp

Forskellen i molekylvægten for de tilsvarende proteiner er ca. 8 kDa.

7) Hvordan passer det med antagelsen om, at en indbygget aminosyre vejer ca. 110 Da?

8) Kender du en eller flere forklaringer på, at der fra et bestemt gen kan laves genprodukter med variationer i starten af aminosyresekvensen?

Biokemiøvelse 2 omhandlede bl.a. **regulation af lac operon i E.coli**

- 1) Hvorfor er det hensigtsmæssigt for procaryoter at organisere gener i operons?
- 2) Skitser strukturen af lac operon.
- 3) Angiv navnet på den regulatoriske forbindelse, der er involveret i den negative kontrol af lac operon
- 4) Hvor på DNA 'et binder denne regulator?
- 5) Angiv navnet på den regulatoriske forbindelse, der er involveret i den positive kontrol af lac operon
- 6) Hvor på DNA 'et binder denne regulator?
- 7) Hvornår sker der transskription af lac operon?
- 8) Skitser opbygning af lac mRNA og nævn hvilke proteiner denne mRNA oversættes til
- 9) Fra hvilken ende af mRNA foregår translationen?
– Er dette fornuftigt sammenholdt med synteseretning af mRNA?
- 10) Hvordan er ribosomerne i stand til at oversætte de åbne læserammer?
- 11) Hvorfor er det i øvelsen muligt at estimere translationstiden for β -galactosidase?

Som i øvelse II udføres et forsøg med dyrkning af bakterien Echerichia coli i et medium, der indeholder glukose og laktose som kulstofkilder.

12) Beskriv vha. tegninger hvordan lac operon reguleres fra forsøgets start indtil kulturen har brugt begge kulstofkilder.

13) Skitser resultaterne af målingerne af glucose-konc., β -galaktosidase aktivitet samt turbiditet.

14) Hvordan passer disse kurver med E.colis valg af kulstofkilde?

Opgave med kolonier på MacConkey-plade

En forsker ønsker at klonе DNA i E.coli

Han prøver at klonе fremmed DNA ind i lac Z-genet

Udgangspunktet er altså plasmider og fremmed DNA (insert)

1) Nævn 3 vigtige bestanddele af et plasmid

2) Hvilke enzymer kræves til dannelse af recombinante plasmider?

3) Hvad er resultatet af denne reaktion?

E.coli transformeres med plasmid vha. heatshock

Efter transformation står bakterierne 1 time med buffer ved 37°C

4) Hvad er formålet med denne inkubation?

Pladen indeholder Ampicillin, IPTG og X-gal

5) Beskriv formålet med tilsætning af disse forbindelser

6) Hvilken farve har de positive kloner (med recombinante plasmider)?

7) Hvorfor har de denne farve?

8) Hvad sker der med bakterier, der IKKE optager plasmid?

Translation

- 1) Hvilke 3 typer RNA indgår i translation?
- 2) Hvor mange nucleotider indeholder tRNA?
- 3) Hvilken RNA polymerase syntetiserer tRNA?
- 4) Hvilke nucleotider bruger denne RNA polymerase?
- 5) Nævn eksempler på posttransskriptionelle modifikationer af tRNA
- 6) I hvilken ende af tRNA bindes aminosyren?
- 7) Hvilken type binding bruges til montering af aminosyre til tRNA?
- 8) Hvilket enzym kobler aminosyre til tRNA under dannelse af aminoacyl tRNA molekylet?

Oversættelsen af mRNA til protein sker på ribosomer

- 9) Hvad består ribosomer af?
- 10) Hvor laves de ribosomale subunits i eucaryote celler?
- 11) Hvilke RNA polymeraser er involveret i syntesen af ribosomer, og hvor foregår RNA syntesen i eucaryoter?

Sammenligning af translation i Pro- og Eucaryoter.

- 12) Hvordan genkendes mRNA af ribosomer (den lille subunit)?

Translation

5'-CCCUCACCAUGGCCAAGGGA-3'

Ovenstående sekvens angiver overgang mellem 5'UTR og åben læseramme i mRNA, der bliver oversat til Aminopeptidase N i grisen.

1) Angiv hvilke codons, der er placeret i hhv. A og P site når initiator tRNA har afleveret sin aminosyre og er placeret i E-site

2) Skitser opbygning af tRNA

3) Hvordan undgår cellen, at den forkerte aminosyre bliver koblet til et tRNA molekyle?

Ved elongering følges aminoacyl tRNA med en elongeringsfaktor

4) Hvilket molekyle er bundet til elongeringsfaktoren?

5) Hvad er formålet med dette bundne molekyle?

6) Hvordan er tRNA molekylet orienteret i forhold til mRNA under translation?

7) Hvad hedder den del af tRNA molekylet, der interagerer med mRNA?

8) Hvorfor stopper (terminerer) translationen?

9) Nævn to forbindelser, der er involveret i terminering

10) Hvilken binding brydes ved terminering?

11) Hvad sker der med de to ribosomale subunits efter terminering?

I den første del af den proteinkodende del af histon H4 mRNA ses følgende sekvenser i mennesket og musen:

Menneske: 5'-AUGUCUGGCCGCGGCAAAGGC-3'

Mus: 5'-AUGUCUGGACGUGGCAAGGGU-3'

13) Hvordan passer disse sekvenser med oplysningen om, at der ved sammenligning af aminosyresekvens ses 100% lighed?

Translation

5' -TCACCCTCACCATGGCCAAGGGATTTC-3'

Ovenfor ses en lille del af sekvensen i den RNA-lignende streng i aminopeptidase N genet fra grisen

Den tilhørende del af mRNA koder for den N-terminale ende af proteinet

1) Skriv aminosyresekvensen.

5' -TGATTCCTACTTCGTGACGCTGAGACCCT-3'

Ovenfor ses en lille del af sekvensen i den RNA-lignende streng i aminopeptidase N genet fra grisen

Den tilhørende del af mRNA koder for aminosyrerne 79-87 i aminopeptidase N, der består af 963 aminosyrer

2) Skriv sekvensen af de 9 aminosyrer

5' -GCACTATTAGCTGTGCTC-3'

Ovenfor ses en lille del af sekvensen i template strengen i aminopeptidase N genet fra grisen

Den tilhørende del af mRNA koder for den C-terminale ende af proteinet

3) Skriv aminosyresekvensen

4) Hvordan angives orientering af aminosyrer i et protein?

5) Hvad menes der med hhv. N- og C-terminal aminosyre?

Et mRNA-molekyle koder for et protein, der skal sidde i mikrovillusmembranen i en enterocyt.

- 1) Beskriv hvad der kræves for at oversættelsen af mRNA kommer til at foregå på rER
- 2) Hvilken ende af proteinet vender ind i lumen af rER, hvis proteinet er blevet syntetiseret færdigt af ribosomer på rER?
- 3) Hvilken ende af proteinet vender ind i lumen af Golgi, hvis det er blevet syntetiseret færdigt af ribosomer på rER?
- 4) Hvilken ende af proteinet sidder ekstracellulært, efter at det færdige protein ender med at sidde i plasmamembranen?
- 5) Hvordan passer denne orientering med formålet med modifikationer i rER & Golgi?
- 6) Hvilken form for glycosylering foregår i rER?
- 7) Hvilken sekvens skal proteinet have for at blive glycosyleret i rER?
- 8) Hvilken form for glycosylering foregår i Golgi?
- 9) Hvilken sekvens skal proteinet have for at blive glycosyleret i Golgi?

Et eucaryot gen, der koder for et transmembranalt protein, indeholder 3 exons.

Længden af exons og introns er følgende:

Exon 1: 200 nt's, Intron 1: 500 nt's, Exon 2: 250 nt's,

Intron 2: 300 nt's, Exon 3: 150 nt's

1) Skitser pre-mRNA før udsplicing af intron

Startcodon findes som nucleotid nr. 100-102 i Exon 1

Stopcodon findes som nucleotid nr. 76-78 i Exon 3

2) Skitser mRNA

3) Beregn længden af den åbne læseramme

4) Beregn antallet af aminosyrer, som dette gen koder for

Det færdige funktionelle protein indeholder 141 aminosyrer

5) Hvordan forklares dette?

Efter isolering af proteinet fra plasmamembranen ønsker man at estimere dets molekylvægt vha. SDS-PAGE, idet man desuden applicerer passende molekylvægtsmarkører.

Vægt af en aminosyrerest (indbygget aminosyre) er 110 Da

Det transmembranale protein vandrer som et molekyle med en vægt på ca. 20 kDa

6) Giv en forklaring på denne observation

7) Hvad kendetegner det transmembranale område mht. aminosyreindhold?

8) Hvilken af aminosyresekvenserne A & B er transmembranal?

A: Asp-Ala-Glu-Gly-Arg-Val-Lys-Leu

B: Trp-Met-Phe-Pro-Ile-Ser-Leu-Ala

9) Hvilken struktur antager den transmembranale region typisk?

10) Angiv andre måder, hvorpå proteiner kan være associeret med cellemembranen

I Biokemiøvelse 1 udføres der **RT-PCR** med primere komplementære til dele af mRNA for Aminopeptidase N.

Aminopeptidase N genet indeholder 3 exons.

Intron 1 udgøres af nukleotiderne 1827-2331 mens intron 2 udgøres af nukleotiderne 2475-2600.

1) Skitser genet

Den færdige mRNA består af 3387 nucleotider
Aminopeptidase N består af 963 aminosyrer.

2) Skitser denne mRNA

3) Hvor mange procent udgør den åbne læseramme af de 3 exons?

4) Beregn den samlede størrelse af 5'-UTR og 3'-UTR

En studerende oprenser RNA fra erythrocyt-celler vha. RNeasy-søjle og udfører RT-PCR-forsøget (1). De to primere (5' primer og 3' primer) er komplementære til hhv. exon 2 og exon 3.

5) Hvilke enzymer tilsætter hun til PCR-røret?

6) Skitser RT-PCR-forsøget – hvilke(n) primer anvender reverse transskriptase?

Med eluatet fra RNeasy-søjlen som template udføres desuden PCR-forsøg (2)

7) Hvilke enzymer tilsættes hun til PCR-røret?

8) Hvorfor udføres dette forsøg?

Laboranten udleverede to PCR-rør, hvor der i forvejen var tilsat template, nemlig hhv. RNA og genomisk DNA. Der blev ligeledes udført hhv. RT-PCR og PCR-forsøg med disse kontrolprøver (3 & 4).

Efter amplifikationsforsøget og elektroforese af indholdet i de 4 PCR-rør ses der som forventet et bånd på 475 bp i bane 1 (med indhold af prøve 1).

9) Hvilken størrelse forventes der i banen med prøve 4?

10) Hvordan ville gelen se ud, hvis de to primere var komplementære til sekvenser i den samme exon?

Rapportørgen-, EMSA- & footprintingforsøg

Betydning af regioner opstrøms for transskriptionsinitieringssite i et humant gen undersøges vha. rapportørgenet lac Z.

En cellelinie, hvor genet normalt udtrykkes, transfecteres med plasmider indeholdende varierende regioner opstrøms for genet fusioneret til rapportørgenet.

1) Skitser opbygning af det anvendte plasmid.

2) Hvorfor anvendes rapportørgen?

Resultater

	Rapportørgenaktivitet
Med 1000 bp før (+1)	300 %
Med 700 bp før (+1)	500 %
Med 400 bp før (+1)	500 %
Med 100 bp før (+1)	100 %
Med 10 bp før (+1)	0 %

3) Hvad ønsker man at få klarlagt ved denne type forsøg?

4) Forklar resultaterne af disse forsøg – hvordan reguleres transskriptionen af dette gen?

5) Hvordan ville udfaldet af forsøgene være, hvis man i stedet for udeladelse af opstrøms regioner indførte mange mutationer i disse regioner?

Måden, hvorpå regionen (-400)-(100) er involveret i genregulationen, ønskes afklaret vha. et EMSA forsøg.

6) Hvad er formålet med EMSA?

Regionen (-400)-(-100) amplificeres vha. PCR.

Samme mængde af dette DNA overføres til 8 forskellige Eppendorfrør.

Til rør nr. 1 tilsættes buffer

Til rørene 2-8 tilsættes stigende koncentration af kerneekstrakt fra cellelinien.

Eppendorfrørene inkuberes 10 minutter ved stuetemperatur, hvorefter indholdet analyseres ved agarosegelelektroforese.

Efter elektroforese viser gelen, at der i banerne med indhold fra Eppendorfrørene 3-8 opstår et nyt bånd. Intensiteten af dette bånd er proportional med koncentration af kerneekstakt.

7) Skitser gelen

8) Hvordan vil du fortolke resultatet?

I bestræbelserne at få præciseret, hvor DNA-bindende proteiner interagerer med denne opstrøms region udføres footprinting

9) Hvordan udføres dette forsøg?

10) Skitser hvordan autoradiogrammet vil se ud i området, hvor der er bundet protein

Sekventering

I opgaver med sekventering af DNA anvendes følgende 3 navne for samme metode: Sanger, enzymatisk og dideoxy sekventering.

1) Beskriv sekventering

2) I hvor mange beholdere (rør) foregår sekventeringen?

3) Hvor mange slags nucleotider er der tilstede i hvert rør?

4) Hvilket enzym bruges under sekventeringen?

5) Hvor mange slags primere anvendes der?

6) Hvilken teknik anvendes efter endt reaktion?

7) Hvordan visualiseres båndene i det færdige båndmønster?

Opgaveformuleringen "Figuren viser resultatet af sekventering af den RNA-lignende streng" skal tolkes således, at der er tale om sekvensen af den RNA-lignende streng. Faktisk er det jo den modsatte streng, der har været anvendt som template i forsøget.

Ved analysen findes følgende sekvens:

5' -ATGCCGTAGCTAACGGTC-3'

8) Skitser hvordan dette vil se ud på en tilsvarende sekventeringsfigur

9) Hvilket nucleotid (A eller C) blev bygget ind først i forsøget?

5' -CTG/ATAAGTTGGATTCAT-3'

G/A: der er to bånd i samme position svarende til indbygning af G ud fra én template og indbygning af A ud fra en anden template

Ovenstående sekvens er resultatet af sekventering af en del af template strengen i exon 2 fra et gen bestående af 3 exons. Analysen er foretaget med DNA fra somatisk celle i en patient.

10) Skitser hvordan dette vil se ud på en tilsvarende sekventeringsfigur

11) Bestem aminosyresekvensen i proteinet

12) Hvad er genotypen hos personen, hvis DNA er blevet sekventeret?

13) Hvordan kan man få afklaret, om der er tale om en nedarvet eller erhvervet mutation

Ved sekventering af DNA fra en del af et rask gen og muteret gen (med punktmutation) findes flg. sekvenser (den RNA lignende streng er sekventeret):

Rask gen: 5' -ATGCGAATTAAGCTAC-3'

Muteret gen: 5' -ATGCGAAGTAAGCTAC-3'

14) Find det codon, der i det muterede gen medfører indbygning af Valin i stedet for Leucin

En forsker undersøger syntese og størrelse af et sekretorisk protein. Proteinet syntetiseret in vitro (ud fra mRNA, ribosomer, aminosyrer, tRNA m.m.) undersøges (bane 2)
Desuden undersøges proteinet fra hhv. rER, Golgi, sekretoriske vesikler (bane 3-5)
Endelig undersøges proteinet efter udskillelse (ekstracellulært) (bane 6)

1) Hvordan kan man påvise tilstedeværelse af et bestemt protein?

Hans forsøg giver følgende resultater:

Bane 2: 15,3 kDa

Bane 3: 14,5 & 20,7 kDa

Bane 4: 20,7, 22,6, 24,0 & 26,5 kDa

Bane 5: 26,5 kDa

Bane 6: 25,5 kDa

2) Skitser vandringen på en gel

3) Forklar observationerne

4) Hvorfor er der flere størrelser af proteinet i rER og Golgi?

5) Hvorfor er der forskel på størrelse af protein i sekretoriske vesikler og det ekstracellulære protein?

Familiær hyperkolesterolemia skyldes manglende optagelse af LDL pga. mutationer i genet, der koder for LDL receptoren. Arvegangen er autosomal dominant.

Efter oprensning af hhv. RNA og protein fra patienter foretages **Northern blotting og Western blotting**, idet man inkluderer prøver fra en rask person (kontrol).

- 1) Hvordan udføres Northern blotting?
- 2) Hvordan udføres Western blotting?
- 3) Hvordan sikrer man sig, at forsøget er foretaget korrekt, og at resultaterne er informative mht. forskelle på niveau af mRNA/protein?

Vi forestiller os, at vi kun ser på transskriptions- og translationsprodukt fra det muterede gen.

Hvordan vil du forvente at Northern og Western blottet vil se ud sammenlignet med resultatet fra et ikke muteret gen i følgende tilfælde?

Du skal vurdere såvel kvalitet (størrelse) og kvantitet (mængde) af hhv. mRNA og protein.

- 4) Patient med punktmutation i TATA box
- 5) Patient med deletion af TATA box
- 6) Patient med deletion af enhancer
- 7) Patient med mutation i exon-intron-overgang
- 8) Patient med mutation i polyadenyleringssignal
- 9) Patient med deletion af nukleotid i den åbne læseramme
- 10) Patient med deletion af codon i den åbne læseramme
- 11) Patient med missense mutation
- 12) Patient med nonsense mutation

13) Patient med mutation i det normale stopcodon; translation fortsætter ind i 3'-UTR

14) Patient hvor genet er flyttet fra euchromatin til heterochromatin

Antag, at der blev lavet Southern blotting af DNA fra en patient med punktmutation.

Punktmutationen medfører, at der opstår et ekstra genkendelsessite for restrictionsenzymet Hind III

15) Skitser hvordan denne mutation kan analyseres vha. Southern blotting

Antag, at der fra en eucaryot cellelinie oprenses poly A-holdigt RNA fra såvel kerne som cytoplasma.

Man udfører et Northern blot under anvendelse af cDNA probe svarende til mRNA fra et gen, der udtrykkes i cellerne.

Forsøget gav følgende resultater:

I kernen var der flere bånd.

I cytoplasma var der kun et bånd (svarende til det, der var vandret længst i analyse af poly A-holdigt RNA fra kernen)

16) Hvordan forklares disse resultater?

Når man i opgaver spørger til måder, hvorpå genekspression i eucaryoter kan reguleres, menes der følgende:
Hvordan kan en eucaryot celle ændre på niveauet/aktiviteten af et protein?

1) Skitser processerne, der er involveret i denne regulation

2) Hvordan kan disse regulatoriske trin påvirkes?

Der foretages Northern & Western blotting, idet man undersøger niveau af hhv. mRNA og protein dannet ud fra et eucaryot gen,

Northern blottet viser øget niveau af mRNA

1) Hvordan kan dette forklares?

Altså: Hvilke forhold kan føre til øget niveau af mRNA?

Western blottet viser øget niveau af protein

2) Hvordan kan dette forklares?

Altså: Hvilke forhold kan føre til øget niveau af protein?

Western blottet viser nedsat niveau af protein

3) Hvordan kan dette forklares?

Altså: Hvilke forhold kan føre til nedsat niveau af protein?

Analyse af protein vha. SDS-PAGE

I biokemiøvelse 1 blev proteiner fra homogenat og forskellige oprensningsfraktioner analyseret vha. SDS-PAGE.

I denne øvelse blev der f.eks. til 35 µL mitochondrie-fraktion tilsat 20 µL 10% SDS, 20 µL glycerol/farve samt 25 µL DTT.

1) Hvorfor skulle disse forbindelser tilsættes?

2) Hvad skal der yderligere ske med prøverne før elektroforese?

Efter elektroforese farves og fotograferes gelen.

3) Hvor forventes det, at man finder aminopeptidase N?

4) I hvilke baner forventes cytochrome c?

Blandt de anvendte molekyelvægtsmarkører var netop cytochrome c. På billedet ses i flere baner et svagt bånd af et protein, der har vandret lige så langt som cytochrome c i markørblandingen.

5) Har I hermed bevist, at der i enterocytterne var cytochrome c tilstede?

Der arbejdes i laboratoriet med et protein med en molekyelvægt på 77 kDa.

For at opnå informationer om interaktionerne i proteinet udføres flg. forsøg med prøverne I) & II)

I) Protein + SDS + DTT

II) Protein + SDS

Prøverne blev opvarmet ved 95°C i 5 minutter før elektroforesen.

Efter farvning af gelen ses flg. båndmønster:

I) Bånd ved 18, 24 & 35 kDa

II) Bånd ved 24 & 53 kDa

6) Skitser gelen og redegør for det observerede båndmønster

Kloning og restrictionsmapning

Et forskerhold ønsker at undersøge et område opstrøms for et gen – man vil gerne klonе regionen (-1500)-(-1).

1) Angiv to måder, hvorpå forskerne kan skaffe mange kopier af denne region.

Ved hjælp af restrictionsenzym er det muligt at skære bestemte regioner af DNA ud og arbejde videre med disse.

2) Hvilken type enzymer tilhører restrictionsenzym?

3) Hvor stammer restrictionsenzym fra og hvad kendetegner de sekvenser de genkender og overskærer?

Ved restrictionsmapning er man interesseret i at bestemme den relative beliggenhed af forskellige restrictionsenzymers genkendelsessekvenser på et bestemt DNA molekyle. Derfor skærer man DNA molekylet med forskellige restrictionsenzym og undersøger skæringsmønstrene.

Det opformerede fragment (-1500)-(-1) skæres med restrictioneenzymerne X og Y, hvorefter prøverne analyseres vha. agarosegelelektroforese.

Skæring med X; bånd på 600 & 900 bp

Skæring med Y; bånd på 450 & 1050 bp

Skæring med X & Y; bånd ved 450 & 600 bp

4) Skitser vandring af DNA fragmenter på agarosegelen

5) Find den relative beliggenhed af genkendelsessites for restrictionsenzymene X & Y

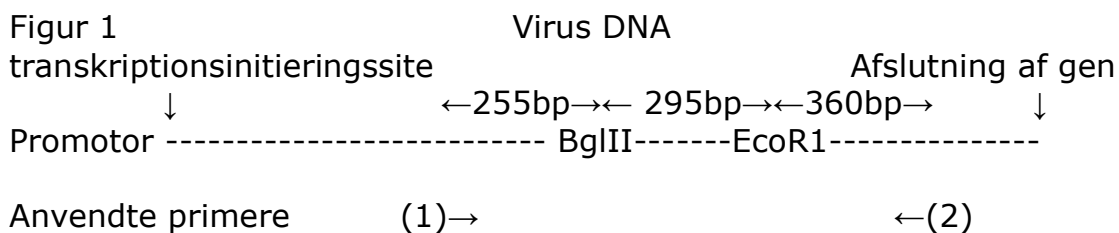
Celler i kultur kræver normalt vækstfaktorer i mediet for at kunne dele sig. Transfektion med et gen fra cancerfremkaldende vira kan dog bevirke, at cellerne deler sig, selvom der ikke er vækstfaktorer tilstede.

mRNA oprenses fra transfekterede og ikke-transfekterede celler (kontrol celler).

Ved hjælp af RT-PCR undersøges de transfekterede celler for tilstedeværelse af mRNA dannet ud fra det virale gen. Der anvendes primerne (1) og (2) (figur 1).

For at undersøge, om cellerne indeholder og udtrykker gener, der ligner det virale gen, udføres desuden RT-PCR på mRNA fra kontrol celler (ikke transfekterede celler).

1) Beskriv hvad der skal være i PCR-røret, når man skal udføre et RT-PCR-forsøg?



2) Hvilken primer (1) eller (2) anvendes af reverse transkriptase?

3) Hvor stort er RT-PCR produkt forventes i forsøget?

Efter RT-PCR og elektroforese var der i gelen bånd svarende til følgende produkter:

Kontrolceller: 910 bp

Transfekterede celler: 910 bp

4) Hvordan vil du fortolke disse resultater?

5) Hvor store amplifikationsprodukter opnås, hvis der anvendes DNA som template?

Det kan oplyses, at der ikke skete nogen amplifikation i fravær af reverse transcriptase.

6) Hvad skal denne oplysning bruges til?

Efter skæring af amplifikationsprodukterne med restriktionsenzymene BglII, og EcoR1, blev der foretaget endnu en elektroforese.

På gelen så man bånd svarende til følgende størrelser:

Kontrolceller: 360 & 550 bp

Transfekterede celler: 255, 295, 360 & 550 bp

7) Hvordan vil du tolke resultatet af gelen på Figur 2?

8) Hvad kaldes generne for de mRNA, der er blevet amplificeret?

Cellecycluskontrol

I cellecycluskontrol indgår bl.a. cyclinafhængige kinaser og cycliner.

- 1) Hvilke af disse molekyler er til stede hele tiden?
- 2) Hvordan forklarer du, at progression gennem cellecyclus kræver proteolyse?
- 3) Hvorfor fører f.eks. UV-bestråling til øget niveau af p53?
- 4) Forklar hvordan p53 indirekte kan føre til stop i cellecyclus
- 5) Hvad sker der, når cellen ikke længere har et rask p53 gen?
- 6) Er p53-genet et protooncogen eller et tumor suppressor gen?

Etoposid er en cellegift, der anvendes på patienten med cancer. Dette anticancerdrug påvirker aktiviteten af topoisomerase II.

- 7) Nævn en forskel på topoisomerase I & II
- 8) Hvilken aktivitet i topoisomerasen II påvirkes af etoposid?
- 9) Hvad ønsker man som behandler, at der skal ske i cancercellerne, hvor dette drug virker?
- 10) Forklar hvordan p53 kan føre til apoptose
- 11) Forklar hvorfor en gain of function mutation af Ras genet kan føre til udvikling af cancer
- 12) Forklar (skitser) hvordan vækstfaktorer kan ændre aktiviteten af proteiner og ændre genekspressionen
- 13) Hvilke aminosyrer kan phosphoryleres?