

UNIVERSITETET I OSLO

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Eksamen i:

MBV4010 Arbeidsmetoder i molekylærbiologi og biokjemi I

Eksamensdag: Fredag 28. september 2007

Tid for eksamen: Kl . 09.00 – 12.00

Oppgavesettet er på 8 sider.

Vedlegg: 3 (3 sider)

Tillatte hjelpemidler: Kalkulator

*Kontroller at oppgavesettet er komplett
før du begynner å besvare spørsmålene.*

UNIVERSITETET I OSLO

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Exam in:

MBV4010 Methods in molecular biology and biochemistry I

Day of exam: Friday 28 September 2007

Exam hours: 09.00 – 12.00

This examination paper consists of 8 pages.

Appendices: 3 (3 pages)

Permitted materials: Calculator

*Make sure that your copy of this examination paper
is complete before answering.*

Oppgave 1

a)

Type II restriksjonsenzym, slik som EcoRI, er mye brukt til DNA-kloning. Forklar hvorfor gjenkjennelsessekvensen til EcoRI, GAATTC, betegnes som en palindromisk gjenkjennelsessekvens.

b)

Hvorfor blir kutting med det metyleringsspesifikke restriksjonsenzymet DpnI utført som en del av QuikChange-protokollen for setespesifikk mutagenese?

c)

Hvor ofte forventer du at et restriksjonsenzym som har en 4-basers gjenkjennelsessekvens (f. eks. TaqI, som gjenkjenner TCGA) kutter en DNA sekvens med tilfeldig sammensetning?

d)

Hvilken rolle har dideoksynukleotider (ddNTP'er) i Sangers metode for DNA-sekvensering?

e)

Forklar hvorfor basesammensetningen til en PCR-primer påvirker smeltepunktet til hybridet dannet mellom primeren og DNA-templatet.

f)

Hvilket av de tre trinnene i en PCR-reaksjon er mest følsomt overfor endringer i smeltepunktet til hybridet dannet mellom primeren og DNA-templatet? Forklar kort.

g)

Hvorfor er det viktig at et plasmid som brukes til DNA-kloning har en selekterbar markør (vanligvis et gen som gir antibiotikaresistens)?

Problem 1

a)

Type II restriction enzymes, such as EcoRI, are commonly used in DNA cloning. Explain why the EcoRI recognition sequence, GAATTC, is referred to as a palindromic recognition sequence.

b)

Why is cleavage with the methylation specific restriction enzyme DpnI performed as part of the QuikChange protocol for site-directed mutagenesis?

c)

How frequently would you expect a restriction enzyme having a 4-base recognition sequence (e. g. TaqI, which recognises TCGA) to cleave a random DNA sequence?

d)

What is the role of dideoxynucleotides (ddNTPs) in the Sanger method for DNA sequencing?

e)

Explain why the base composition of a PCR primer influences the melting point of the hybrid formed between the primer and the DNA template.

f)

Which of the three steps in a PCR reaction is most sensitive to changes in the melting point of the hybrid formed between the primer and the DNA template? Explain briefly.

g)

Why is it important that a plasmid used for DNA cloning contains a selectable marker (usually a gene conferring antibiotic resistance)?

Oppgave 2

Du har fått utdelt en del av genomsekvensen til SET-domene-genet *SUVR4* (Vedlegg 1). Sekvensen i sort svarer til ekson 1 og 2, mens sekvensen i grått svarer til intron 1. Det er også indikert hvor sens- og antisens-primere ("forward-" og "reverse-"primere) assosierer, samt kutteseter for enzymene HindIII, NsiI, SpeI and AccI.

Du har også fått et kart over regionen rundt kloningssetet i vektoren pCR 2.1-TOPO (Vedlegg 2).

Du arbeider i en forskningsgruppe som ønsker å undersøke om de predikerte intron-ekson spleisesetene for *SUVR4* er riktige. Din veileder gir deg et rør med cDNA som hun har amplifisert opp ved revers transkribering fra totalt RNA, og hun ber deg sette opp en PCR-reaksjon med sens- og antisens-primere vist på sekvensen. Hun er, imidlertid, usikker på om prøven kan være noe kontaminert med genomisk DNA, men forteller deg at du bør være i stand til å skille mellom hvorvidt du har amplifisert opp cDNA eller genomisk DNA..

- a) Hvorfor er veilederen din sikker på at du bør greie å skille mellom et PCR-bånd amplifisert opp fra cDNA og et bånd amplifisert fra genomisk DNA?
- b) Hvor stort vil PCR-produktet fra et cDNA templat være? Hvor stort vil PCR-produktet fra genomisk DNA være?

Hun ber deg deretter om å klonere cDNA PCR-produktet inn i vektoren pCR 2.1-TOPO, og ønsker at du skal finne ut i hvilken retning PCR-produktet er satt inn i vektoren.

- c) Hvorfor kan PCR-produktet settes inn i begge retninger?
- d) Gi en detaljert beskrivelse av hvordan du, ved å bruke kutting med restriksjonszymer, kan finne ut i hvilken retning PCR-produktet er satt inn. Du kan anta at alle kombinasjoner av enzymer kutter effektivt i de tilgjengelige bufferne, og at restriksjonsenzymene kutter midt i gjenkjennelsessekvensen. Følgende restriksjonszymer er tilgjengelige: SpeI, AccI, EcoRI, and SalI.
- e) Hvordan ville du gå fram for å verifisere de predikerte ekson-intron spleisesetene?
- f) Beskriv kort en annen kloningsmetode du kunne ha brukt dersom du hadde behov for at PCR-produktet ble satt inn i vektoren i en bestemt retning.

Problem 2

You have been provided with part of the genomic sequence for the SET domain gene *SUVR4* (Appendix 1). The sequence in black print corresponds to exons 1 and 2, while the sequence in grey corresponds to intron 1. Where the sense and antisense (forward and reverse) primers anneal is shown on the sequence, as is where the following restriction enzymes cut: HindIII, NsiI, SpeI and AccI.

You have also been provided with a map of the region surrounding the cloning site in the vector pCR 2.1-TOPO (Appendix 2).

You work in a research group that wants to investigate if the predicted intron-exon splice sites for *SUVR4* are correct. Your supervisor hands you a tube with cDNA which she has amplified by reverse transcription from total RNA and asks you to set up a PCR with the sense and antisense primers shown on the sequence. She is however, uncertain of whether the sample may be somewhat contaminated with genomic DNA, but tells you that you should be able to distinguish if you have amplified cDNA or genomic DNA.

- a) Why is your supervisor sure that you will be able to distinguish between a PCR band amplified from cDNA and a band amplified from genomic DNA?
- b) How large would the PCR product from a cDNA template be? How large would the PCR product from a genomic DNA template be?

She then asks you to clone your cDNA PCR product into the pCR 2.1 TOPO vector and wants you to find out in which orientation the PCR product has been inserted in the TOPO vector.

- c) Why can the PCR product be inserted in both orientations?
- d) Give a detailed description of how, by the aid of restriction cutting, you can find out in which orientation the PCR product is inserted. You can assume that all combinations of enzymes cut efficiently in the buffers available to you, and that the enzymes cut in the middle of the recognition sequence. The following restriction enzymes are available: SpeI, AccI, EcoRI, and SalI.
- e) How would you go about to verify the predicted intron-exon splice sites?
- f) Briefly describe another cloning method that you could use if you needed a unidirectional insertion of a PCR product.

Oppgave 3

81 W S E A S R A I L Q R V Q A A A F G P G
 241 TGGTCAGAAGCCAGCCGGGCCATCCTGCAGCGCGTGCAGGCGGCCGCCTTTGGCCCCGGC

Sekvensen vist over utgjør nukleotidene 241-300 og aminosyrene 81-100 i genet som koder for protein X. Ved å bruke QuikChange-metoden for sete-spesifikk mutagenese, ønsker du å introdusere mutasjonen L89W i sekvensen til protein X (I vedlegg 3 finner du den genetiske kode, samt informasjon om enkelt-bokstav-forkortelser for aminosyrer). Du vil også, ved å generere en "stille" mutasjon, introdusere et kuttsete for restriksjonesenzymet ApeI (gjenkjennelsesekvens: ACGCGT). Når du designer mutageneseprimerne, la det være 11 nukleotider med ikke mutert sekvens på hver side av den muterte regionen.

a)

Skriv ned sekvensen på forward-primeren du har designet, og indiker hvilke nukleotider som har blitt mutert.

b)

Skriv ned sekvensen til den reverse mutagenese primeren (revers komplement av forward-primeren)

c)

Gen X har blitt klonet inn i et ekspresjonsplasmid, og det resulterende plasmidet er 5656 nukleotider langt. Det er i tillegg et ApeI-site i posisjonen som svarer til aminosyre 390 i genet som koder for protein X, men ingen ApeI-seter andre steder i plasmidet. Hvis mutagenesen har vært vellykket, og de ønskede mutasjoner introdusert, hva er da de forventede størrelser på fragmentene du får når du kutter det resulterende muterte plasmidet med ApeI? (Du forventes kun å gi et tilnærmet svar, dvs ± 2 nukleotider)

Problem 3

```

81  W S E A S R A I L Q R V Q A A A F G P G
241 TGGTCAGAAGCCAGCCGGGCCATCCTGCAGCGCGTGCAGGCGGCCGCCTTTGGCCCCGGC

```

The sequence shown above represents nucleotides 241-300 and amino acids 81-100 of the gene encoding protein X. By using the QuikChange method for site-directed mutagenesis, you will introduce the mutation L89W in the sequence of protein X (In Appendix 3 you will find the genetic code, as well as information on one-letter amino acid abbreviations). Also, you will, by generating a silent mutation, introduce a cleavage site for the restriction enzyme *ApeI* (recognition sequence: ACGCGT). When designing the mutagenesis primers, leave 11 nucleotides of non-mutated sequence on each side of the mutated region.

a)

Write down the sequence of the forward mutagenesis primer you have designed, indicating which nucleotides have been mutated.

b)

Write down the sequence of the reverse mutagenesis primer (the reverse complement of the forward primer).

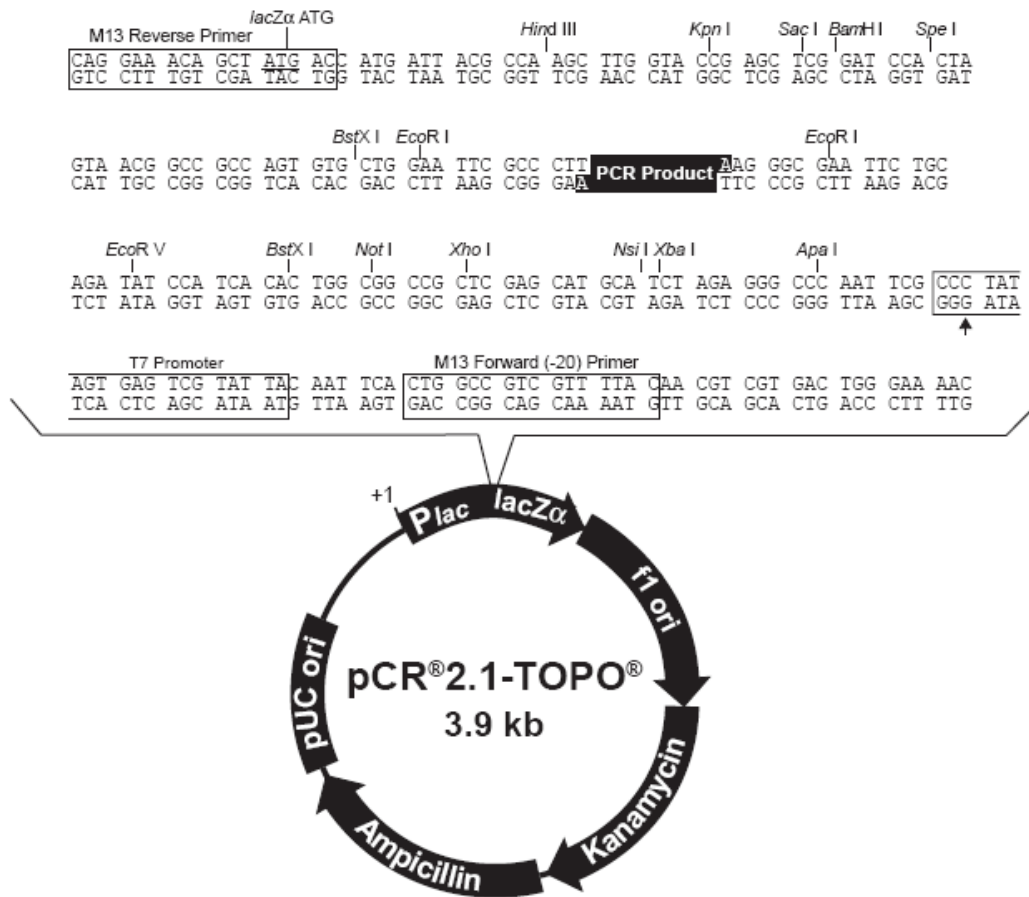
c)

Gene X has been cloned into an expression plasmid, and the resulting plasmid is 5656 nucleotides long. There is an additional *ApeI* site at a position corresponding to amino acid 390 in the gene encoding protein X, and no other *ApeI* sites are found elsewhere in the plasmid. If the mutagenesis reaction has been successful, and the desired mutations have been introduced, what are the expected sizes of the fragments obtained when cleaving the resulting mutant plasmid with *ApeI*? (You are only expected to give an approximate answer; ± 2 nucleotides)

Vedlegg 1 / Appendix 1

	sense primer 100.0%									
1	CGCACGACGC	AGTGAAACAG	AGATACTGTG	GAAAAGTGTG	TTTAAAATGG	ATCTGTTTTA	GGGTATTTAT	CAATTCGAAA	ATTGATTAAT	TTATTAATTT
	GCGTGCTGCG	TCACTTTGTC	TCTATGACAC	CTTTTCACAC	AAATTTTACC	TAGACAAAAT	CCCATAAATA	GTAAAGCTTT	TAAC TAATTA	AATAATTTAA
101	CGTAAGCTTT	CACAGAAAAGT	TCGAACTCTT	TGCATGCAAT	CATTCGCCGT	CTTCTTCCAC	AATTGTGTTT	TTTAGCCGGC	GGCGGCTGGA	TTCGAGAAGC
	GCATTCGAAA	GTGTCTTTCA	AGCTTGAGAA	ACGTACGTTA	GTAAGCGGCA	GAAGAAGGTG	TTAACACAAA	AAATCGGCCG	CCGCCGACCT	AAGCTCTTCG
201	TTCCGATTGT	TCTGTATGAT	CAGTCTCTCC	GGACTAACC A	GTAAGGTTTT	TTGTTTGTAT	GTTACGCATT	CTCTTTGCTT	TTCTCATGCA	TTCTCTTTTC
	AAGGCTAACA	AGACATACTA	GTCAGAGAGG	CCTGATTGGT	CATTCCAAAA	AACAAACATA	CAATGCGTAA	GAGAAAACGAA	AAGAGTACGT	AAGAGAAAAG
301	TTATTGTGTT	GATCAATGTG	GGTTCTTACT	CCGCGAGTTG	CAGAACGGTT	TAAGCTTGAA	ATTTTGAAAA	ATGTTGGAAT	CTGTCTTTGT	CGATTTGATG
	AATAACACAA	CTAGTTACAC	CCAAGAATGA	GGCGCTCAAC	GTCTTGCCAA	ATTCGAACTT	TAAAACTTTT	TACAACTTTA	GACAGAAAACA	GCTAAACTAC
401	AGATCGCCGT	TTTTGTTTTG	TTTGGAATTG	GCATAAATCT	GTTTTTAGGG	TTCTTGATTG	GTGAGATTTT	TGGATGATTG	TTGATAAGGA	TTGGGTTTAT
	TCTAGCGGCA	AAAACAAAAC	AAACCTTAAC	CGTATTTAGA	CAAAAATCCC	AAGAACTAAC	CACTCTAAAA	ACCTACTAAC	AACTATTCTT	AACCCAAATA
501	TCAAAATTTCG	CAGATCTTTA	AGGATAGCTG	ATGCATTGAT	GTGTCTTTAC	TTTGGTGATT	AGCAGTTTCA	TACATATGAA	CCAGATTATA	TTTTATCACT
	AGTTTTAAGC	GTCTAGAAAT	TCCTATCGAC	TACGTAACTA	CACAGAAATG	AAACCACTAA	TCGTCAAAGT	ATGTATACTT	GGTCTAATAT	AAAATAGTGA
601	AGAAAAC TAG	TAATTTGGCA	TTTTTTACCA	ATTAAGATAT	TTAGTGTGTA	TTTGCAGGTT	CTGTTGAAA G	TGATCTCGAT	ATGCAACAAG	CGATGCTCAC
	TCTTTTGATC	ATTAAACCGT	AAAAAATGGT	TAATTCTATA	AATCACACAT	AAACGTCCAA	GACAAC TTTC	ACTAGAGCTA	TACGTTGTTC	GCTACGAGTG
701	CAATAAAGAC	GAGAAGGTAC	TCAAAAGCTTT	AGAGAGAACA	AGGCAATTGG	ATATTCCCGA	TGAAAAAGACA	ATGCCAGTGC	TTATGAAAGCT	CCTAGAAGAG
	GTTATTTCTG	CTCTTCCATG	AGTTTCGAAA	TCTCTCTTGT	TCCGTTAACC	TATAAGGGCT	ACTTTTCTGT	TACGGTCACG	AATACTTCGA	GGATCTTCTC
801	GCTGGTGGCA	ATTGGTCGTA	TATAAAGTTG	GATAACTATA	CTGCACTGGT	CGACGCTATT	TATTCTGTTG	AGGATGAGAA	TAAGCAAAGT	GAAGGTTTCAT
	CGACCACCGT	TAACCAGCAT	ATATTTCAAC	CTATTGATAT	GACGTGACCA	GCTGCGATAA	ATAAGACAAC	TCCTACTCTT	ATTCGTTTCA	CTTCCAAGTA
901	CTAATG	GATTAC								
										antisense primer 100.0%

Vedlegg 2 / Appendix 2



Comments for pCR®2.1-TOPO® 3931 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-547
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- f1 origin: bases 548-985
- Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
- Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
- pUC origin: bases 3136-3809

Vedlegg 3 / Appendix 3

The genetic code

		Second letter				
		T	C	A	G	
First letter	T	TTT Phe	TCT Ser	TAT Tyr	TGT Cys	T C A G
		TTC Phe	TCC Ser	TAC Tyr	TGC Cys	
		TTA Leu	TCA Ser	TAA Stop	TGA Stop	
		TTG Leu	TCG Ser	TAG Stop	TGG Trp	
	C	CTT Leu	CCT Pro	CAT His	CGT Arg	T C A G
		CTC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	
		CTA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	
		CTG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	
	A	ATT Ile	ACT Thr	AAT Asn	AGT Ser	T C A G
		ATC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	
		ATA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	
		ATG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	
	G	GTT Val	GCT Ala	GAT Asp	GGT Gly	T C A G
		GTC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	
		GTA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	
		GTG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	

Third letter

Amino acid	Abbreviation (three letters)	Abbreviation (one letter)
Alanine	Ala	A
Cysteine	Cys	C
Aspartate	Asp	D
Glutamate	Glu	E
Phenylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Methionine	Met	M
Asparagine	Asn	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y