

ZBIRKA IZPITNIH VPRAŠANJ IZ TEHNOLOGIJE REKOMBINANTNE DNA (2006)

V oklepaju pred vprašanjem je število točk, ki jih dobite za povsem pravilen odgovor. Izpiti imajo običajno 12 - 15 vprašanj (skupaj 40 - 50 točk).

KRATKA VPRAŠANJA

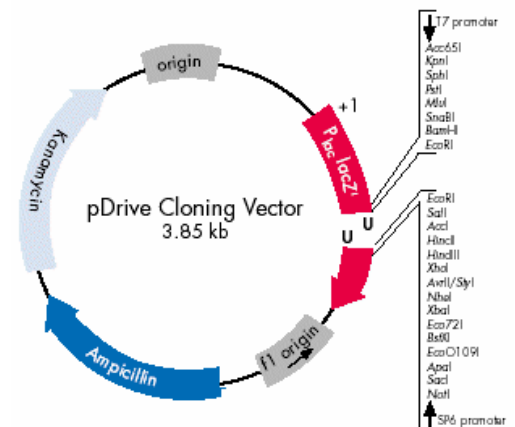
- (2) Kaj pomeni izraz 'star - aktivnost' pri restriktazah in posledica česa je?
- (2) Opišite aktivnost terminalne transferaze!
- (2) Za kaj uporabljamo termostabilno DNA-ligazo?
- (3) Navedite tri fizikalne načine vnosa DNA v gostiteljske celice!
- (3) Navedite tri primere oznak, ki jih dodajamo rekombinantnim proteinom z namenom, da bi si poenostavili njihovo detekcijo ali izolacijo. Vsakič pripišite, katere molekule bi uporabili za čiščenje ali detekcijo!
- (3) V katerih primerih je smiselno uporabiti reporterske sisteme. Navedite primer uporabe!
- (2) V čem je razlika med prenosoma northern in Southern?
- (3) Kaj je ekspresijska knjižnica in katere druge tipe knjižnic v DNA-tehnologiji še poznate?
- (2) Razložite pomen izraza 'reprezentativnost genske knjižnice'!
- (3) Navedite tri resne razloge, zakaj je smiselno pripraviti rekombinantne proteine, ne pa jih izolirati iz naravnih virov!
- (2) V čem je razlika med homolognimi in heterolognimi sistemi za izražanje genov?
- (3) Zakaj je smiselno proteine izraziti na površini delcev kot so virusi, celice ali ribosomi? Kakšne vrste analiz lahko opravimo s tako pripravljenimi konstrukti?
- (3) Opišite s po enim stavkom tri pomanjkljivosti, ki jih imajo rastline kot ekspresijski sistem!
- 3) Primerjajte *S. cerevisiae* in *P. pastoris* kot ekspresijska sistema. Kje so prednosti oz. slabosti vsakega od njiju?
- (3) V katerem ekspresijskem sistemu / gostiteljskem organizmu bi bilo najbolj smiselno pripraviti rekombinantna protitelesa za zdravljenje tumorjev pri človeku? Zakaj?
- (3) Zakaj je smiselno, da bi v rastlinah pridobili rekombinantne proteine v semenih in kako bi dosegli, da bi bili ti proteini v resnici lokalizirani samo tam?
- (2) V čem je smisel spreminjanja Cys ostankov v proteinih, ki vsebujejo neparno število Cys ostankov in s katero metodo lahko izvedemo spremembe?
- (3) Navedite tri pogosto uporabljane promotorje za delo z bakterijami in njihove osnovne lastnosti!

- (2) Kakšna je vloga dideoksinukleotidov pri določanju nukleotidnega zaporedja?
- (2) V čem je prednost hkratne (multipleksne) PCR pred klasično PCR?
- (2) Zakaj so lokusi STR primerni genetski markerji?
- (3) S čim se ukvarja primerjalna genomika? Navedite primer raziskave, ki bi jo lahko umestili v to področje!
- (2) Kako bi na kratko opisali spekter delovanja strukturne genomike?
- (2) V čem je razlika med farmakogenetiko in farmakogenomiko?
- (2) Za kakšne vrste poskusov so uporabni adenovirusni vektorji? Kakšna je njihova kapaciteta?
- (3) Opišite primer rekombinantnega zdravila z izboljšanimi lastnostmi (glede na gensko nespremenjeno različico)!
- (2) Kaj so aptameri in za kaj jih lahko uporabimo?

VEKTORJI

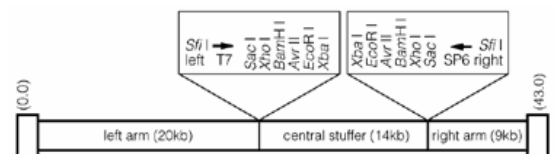
(4) Na osnovi plazmidne karte opišite lastnosti tega klonirnega vektorja!

- Čemu služijo posamezni elementi?
- Vektor je mogoče kupiti v linearizirani obliki. Glede na dodane nukleotide U na obeh koncih predvidite, za kakšen namen ga prodajajo!



(4) V vektor s slike morate vstaviti zapis za piroglutamazo (3944 bp). V katera restrikcijska mesta je smiselno vstaviti zapis za ta protein in kako bo potekal poskus, glede na to, da ste dobili zapis v nekem evkariontskem ekspresijskem vektorju, ki nima kompatibilnih koncev?

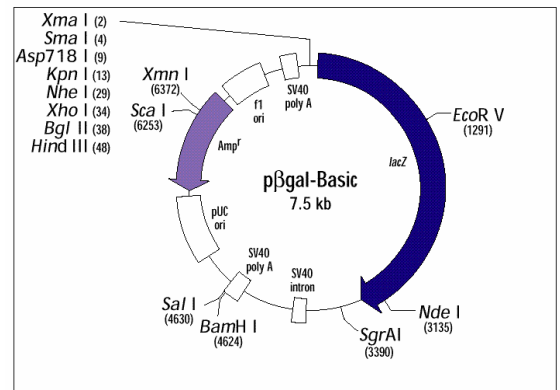
(6) Slika na desni prikazuje vektorsko molekulo. Za kakšno vrsto vektorja gre? Kaj predstavljata oznaki T7 in SP6 in čemu služita ta dva odseka na vektorju? Ali lahko na osnovi slike poveste, kako dolge inserte lahko vstavljamo v vektor? Utemeljite! Ali lahko uporabimo samo eno od polilinkerskih regij ali moramo izkoristiti po eno mesto v vsaki? Utemeljite!



(3) V vektor z zgornje slike morate vstaviti fragmente genomske DNA, ki ste jih dobili z rezanjem genoma z restriktazo *PvuI*. Kako boste izvedli poskus glede na to, da konci niso kompatibilni z mesti v polilinkerski regiji?

(6) Na osnovi vektorske karte določite:

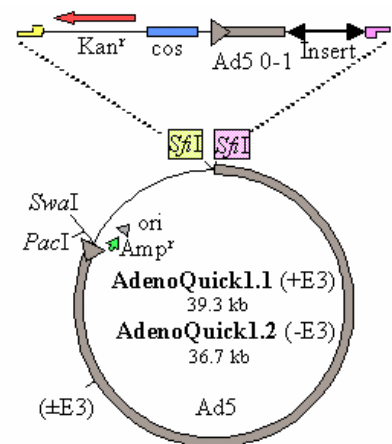
- za kakšno vrsto vektorja gre?
- čemu služijo posamezni odseki na vektorju (opišite natančno!)?
- ali lahko določite, kako dolge inserte lahko vstavljamo v vektor?



(3) V vektor z zgornje slike morate vstaviti zapis za fosfolipazo C. Katero mesto bi si izbrali za vstavljanje na 5'- oziroma na 3'-koncu? Na kaj je treba pri pripravi konstrukta paziti? (namig: funkcija gena lacZ)

(6) Na osnovi vektorske karte določite:

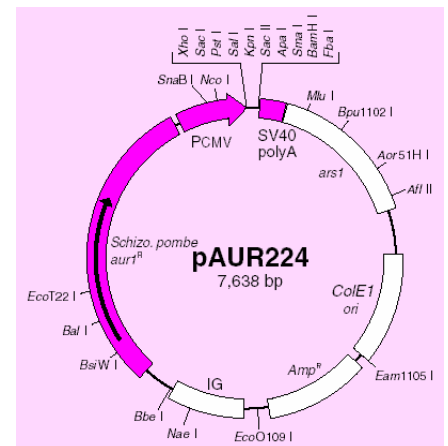
- za kakšno vrsto vektorja gre?
- čemu služijo posamezni odseki na vektorju (opišite natančno!)?
- katera od regij na vektorju predvidevate, da predstavlja insert?
- ali mislite, da imajo vektorji tega tipa promotorje (utemeljite)?



(2) Ali bi zgornji vektor lahko uporabili za delo s kvasovkami? Zakaj?

(6) Na osnovi vektorske karte določite:

- za kakšno vrsto vektorja gre?
- v katerih gostiteljskih organizmih ga lahko uporabljamo?
- čemu služijo posamezni odseki na vektorju (opišite natančno!)?
- ali je treba pri vstavljanju inserta v vektor paziti na bralni okvir (utemeljite)?



(3) V vektor z zgornje slike ste želeli preko mest *SacI* in *ApaI* vstaviti fragment, ki je dolg 862 bp in vsebuje začetni ATG (mesta 1-3) in stop-kodon (mesta 860-862). Po končani ligaciji pa ste ugotovili, da ste namesto encima *ApaI* pomotoma uporabili *AflIII*. Ali to kakorkoli spremeni nadaljnji potek dela? Kaj predvidevate, da se bo zgodilo v nadaljevanju poskusa?

POSTOPKI

(4) Kako iz predhodno izolirane celotne evkariontske RNA izolirate samo mRNA? Na kratko opišite postopek (~3 ključne stopnje)!

(3) Kateri so kriteriji za izbor izhodnega tkiva pri izolaciji mRNA, ko je končni cilj priprava zapisa za točno določen protein? (namig: zamislite si nek konkreten protein, npr. tripsin ali insulin)

(5) Opišite pripravo genomske knjižnice muflona. Na kaj je treba paziti pri izboru izhodnega tkiva, kako boste določili pogoje rezanja z restriktazo in kakšne lastnosti mora imeti vektor, ki ga boste uporabili?

(3) V reakciji za določanje nukleotidnega zaporedja ste pozabili dodati dNTP, vse ostale reagente pa ste dodali. Kakšen rezultat lahko pričakujete in zakaj?

(3) V reakciji za določanje nukleotidnega zaporedja ste pomotoma dodali 10x več ddNTP. Kako se bo to odrazilo na rezultat analize. Obrazložite!

(3) Zakaj menite, da se metoda določanja nukleotidnega zaporedja po Maxamu in Gilbertu ni uveljavila do take mere kot se je Sangerjeva metoda? (navedite tri razloge)

(3) Za določanje celotnih genomov je bil ključnega pomena napredek tehnologije pri ločevanju produktov sekvenčnih reakcij. Vsaj dve spremembi glede na klasično metodo, ki so jo razvili še pred letom 1980, sta bili pomembni. Kateri?

(3) Opišite preprost postopek za uvedbo točkovnih mutacij na rekombinantnem bakteriofagnem vektorju! Kakšen je teoretično pričakovani delež mutiranih produktov?

(3) Opišite najenostavnejši postopek za uvedbo točkovnih mutacij s PCR!

(5) Pri mutagenezi na plazmidu, kjer bi morali razen oligonukleotida za uvedbo mutacije v insertu uporabiti še dva oligonukleotida za uvedbo sprememb na vektorju, vam je enega od slednjih zmanjkalo. Opišite, kaj lahko naredite v tem primeru! Ali je poskus izvedljiv: ali lahko uvedete mutacijo v insert, kako bi izvedli selekcijo klonov, ali bi spremembe vplivale na transformacijo kompetentnih bakterijskih celic, kolikšen delež klonov pričakujete, da bo imel uvedeno mutacijo?

(3) Kakšne analize nam omogoča kvantitativni PCR in kako običajno poteka detekcija produktov? Navedite smiselni primer uporabe!

(4) Pri PCR lahko oznako RT uporabimo v dveh povsem različnih pomenih – katerih in kaj je za vsako od različic značilno?

(4) Pri analizah z biočipi rezultat običajno predstavijo z zelenimi in rdečimi točkami. Zakaj so rezultati v obliki barv? Zakaj sta barvi dve? Kaj v resnici pomeni, če je neka skupina genov označena pretežno z zeleno, druga pa pretežno z rdečo barvo? Kako lahko rezultate kvantificiramo?

(4) Navedita dva različna pristopa pri pripravi biočipov (namig: značilnosti molekul, ki so imobilizirane). Katere so prednosti enega in drugega načina priprave in uporabe?

(4) Opišite fenotipa, ki sta rezultat različnega načina vnosa inserta v kvasovko *Pichia pastoris* in razložite, zakaj do tega pride!

(4) Na kratko opišite dva različna načina priprave vektorskega konstrukta pri bakoluvirusnih ekspresijskih sistemih!

(4) Zakaj je v postopku vnosa tuje DNA v rastlinske celice potrebno delo z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*? Katere omejitve ima ta pristop in kakšne so alternative?

4) Opišite biološki način vnosa tuje DNA v rastline in genetske elemente, ki pri tem sodelujejo!

(4) Kako bi izolirali rekombinantni protein, ki je pripravljen kot N-končna fuzija z glutation-transferazo, vmesni segment med obema deloma pa vsebuje cepitveno mesto za enterokinazo.

(4) Pri pripravi rekombinantnega tripsinogena v bakterijah z uporabo vektorja pET41b ste ugotovili, da je delež topnega proteina samo 15 %. Kaj predvidevate, da se je zgodilo z ostalimi 85 %? Kako bi povečali delež topnega tripsinogena?

(6) V bakterijah ste pripravili fuzijski protein, ki ima na N-koncu funkcionalno glutation-S-transferazo, na C-koncu pa na osnovi sinteznega gena izražen tripsin. Rekombinantni protein naj bi bil lociran v citoplazmi v topni obliki. Kako bi preverili, ali je protein res topen in da se res nahaja v citoplazmi? Kako bi topni fuzijski protein izolirali? Postopek opišite po stopnjah, pri čemer začnete s pribl. 500 ml bakterijske kulture po končani indukciji izražanja!

(4) Opišite značilnosti priprave transgenskih miši s pomočjo retrovirusov!

(4) Razložite postopek selekcije mišjih embrionalnih izvornih celic z vključenim transgenom s PCR!

(4) Na kratko opišite sintezo DNA kot ta poteka v avtomatiziranih postopkih!

(4) Kakšne vrste analiz nam omogoča izražanje zapisov na površini bakteriofagov? Navedite vsaj dva primera!

(3) Opišite postopek DNA-diagnostike na primeru bolezni, ki je na ravni genoma povezana s spremembo restrikcijskih mest v zapisu za nek protein!

PROBLEMSKE NALOGE

(6) Vaša naloga je, da z uvedbo mutacij ugotovite, kateri aminokislinski ostanki pri heparinazi (543 AK) predstavljajo mesto vezave heparansulfata. Iz podatkov, ki so vam na voljo, predvidevate, da je to med ostankoma 170 in 190. Na voljo imate cDNA v klonirnem plazmidnem vektorju. S katero metodo bi izvedli mutagenozo in kako bi analizirali klone, ki bi jih dobili?

(8) Učinek nekega strukturnega proteina (nukleotidno zaporedje njegove cDNA poznate) na morfologijo človeških endotelijskih celic želite preizkusti z uporabo protismerne DNA. Celice gojite v kulturi, cDNA pa imate v prokariontskem klonirnem vektorju. Kako se boste lotili poskusa? Opišite tiste stopnje, ki jih boste izvedli v bakterijah in opišite, kako boste konstrukt vnesli v človeške celice! Kako boste preverili učinek inaktivacije gena?

(4) Pripraviti morate rekombinanten heterodimerni protein, ki za aktivnost ne potrebuje posttranslacijskih modifikacij. Sestavljata ga veriga A (47 kDa) in veriga B (15 kDa). Kako bi se lotili poskusa – opišite, kako bi rešili problem izbora vektorja in gostitelja in kako predvidevate, da bi prišlo do sestavljanja v dimer!

(6) Ugotoviti morate, ali je v genomu črne redkve ena ali več kopij gena za katalazo. Najprej boste izolirali celotno genomsko DNA. Katere postopke morate izvesti zatem, da boste lahko odgovorili na postavljeno vprašanje? Na voljo imate sondo, ki je radioaktivno označena cDNA za katalazo iz istega organizma.

(5) Določiti morate epitop, ki ga prepozna eno od monoklonskih protiteles proti fosfoglukoza-izomerazi (FGI). Kako bi izvedli ta eksperiment s pomočjo DNA-tehnologije. Proteina FGI namreč nimate v čisti obliki, s tehnikami rekombinantne DNA v prokariotskih sistemih pa nimate težav. Navedite tehniko in jo na kratko opišite na konkretnem primeru anti-FGI!

(6) Potrošniška organizacija je pri vas naročila analizo 20 živil, za katera sumijo, da vsebujejo gensko spremenjene sestavine. Izberite ustrezno metodo in natančno opišite ključne stopnje v postopku dela na primeru koruznih kosmičev. Na voljo imate 200 g vzorca – kako boste nadaljevali...?

(6) Z naključno mutagenezo ste spremenili del zapisa za DNA-polimerazo iz arheje *Thermus aquaticus*. Vaš namen je bil, da bi pridobili mutanto, ki bi se bolj stabilno (od divjega tipa) vezala na metilirana nukleotidna zaporedja. Pričakujete, da ste generirali med 20.000 in 50.000 različnih mutant. Na kakšen način bi izvedli kloniranje in izbor mutante z želenimi lastnostmi?

(4) Odločate se za nadaljevanje študija na univerzi v Lozani v Švici, kjer analizirajo tkivno-specifično izražanje mRNA pri pacientih z rakom glave in vratu. Ali lahko predvidevate, katera metoda bi bila za tovrstno raziskavo najbolj primerna in zakaj? Kako bi vi zastavili poskus, če bi dobili v analizo 50 vzorcev pacientov v različnih stadijih bolezni in kontrolne vzorce?