

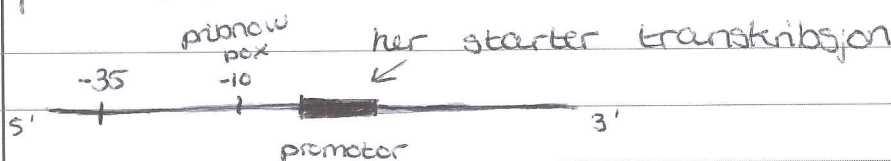


oppgave 1

Transkripsjonen er en mekanisme for å danne mRNA fra DNA. Hos prokaryoter foregår denne prosessen i cytoplasma, mens hos eukaryoter foregår transkripsjonen i kjernen.

Initiering

Ved initiering av transkripsjonen festes RNA polymerasen til en del av genet som kalles promotor, hvor transkripsjonen starter. Dette skjer ved at de to DNA-trådene skiller lag i et lite område. 35 og 10 basepar før promotoren finnes konserverte sekvensbokser som sørger for at RNA-polymerasen festes riktig. Jo mer komplementar -35 og -10 boksene er til RNA polymerasen, jo bedre festes den. -10 boksen kalles pibnow box. Den delen av genet som transkriberes ved bruk av samme promotor kalles et operon. Ved promotoren ~~kan~~ ^{være en} inducer som kan inducere transkripsjonen, mens en repressor kan hindre transkripsjon ved å binde seg til en operator ved promotor



oppgave
1 forts.

For at RNA polymerasen skal feste seg trengs en σ -faktor. Når RNA polymerasen har festet seg og transkripsjonen starter, vil σ -faktor slippe taket og forsvinne.

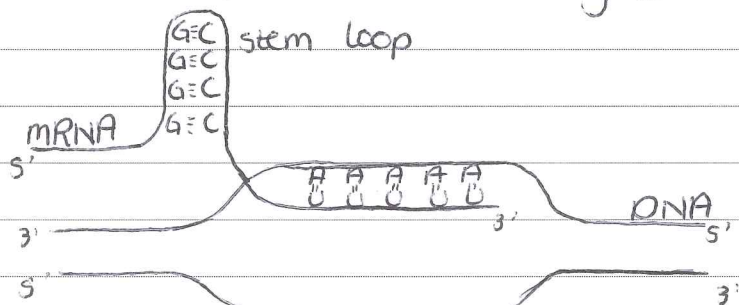
Elongering

Etter at RNA polymerasen har festet seg til DNA vil den lage mRNA som er komplementær til DNA i $5' \rightarrow 3'$ retning.

Terminering

Transkripsjonen vil fortsette fram til den avsluttes ved stem loop eller ved bruk av Rho faktor. Ved stem loop vil den være et GC-rikt område som kan danne en hãmuis-struktur.

Deretter følger mange A-er på DNA, som gir mange U på mRNA. Etersom A og U bare har to hydrogenbindinger mellom seg, mens G og C har tre, fører dette til at mRNA bindes svakere til DNA. mRNA kan på denne måten bryte løs.





Emnekode : MK-208
Kandidatnr. : 4608
Dato : 26.11.15
Ark nr. : 3 av 12

Oppgave 1
forts.

Terminering kan også skje ved bruk av Rho-faktor. Rho-faktor fører til at DNA blir opptvunnet, og ved at den legger seg mellom DNA og mRNA hemmer den transkripsjonen og fører til at mRNA bryter løs.

I prokaryoter kan translasjonen starte mens transkripsjonen fortsatt holder på, fordi begge prosesser skjer i cytoplasma.

Hos eukaryoter er prinsippet for transkripsjon ukt, men her trengs det transkripsjonsfaktorer for at RNA polymerasen (II) skal binde seg.



Emnekode : Mh-208
Kandidatnr. : 4608
Dato : 26.11.15
Ark nr. : 4 av 12

oppgave 2

Når det settes inn feil nukleotid ved replikasjon brukes mismatch repair. Det vil da være to nukleotider ovenfor hverandre som ikke er komplementære. Et av de to nukleotidene må da byttes ut med et annet nukleotid som passer inn. Dette skjer ved at det først lages et nick/brudd i rygghargen på DNA og den nukleotiden som ikke passer inn fjernes med 3'-5' eksoknuklease-aktivitet. Ved mismatch repair koder genene mut H, mut h, og mut s for viktige enzymer i prosessen. For å finne ut hvilken av de to nukleotidene som skal byttes ut, undersøkes det hvilken av DNA-trådene som er eldst og nyest. Den eldste tråden vil være mest metylert, ettersom metylering av DNA-tråden er en prosess som skjer i etterkant av replikasjon. Det vil derfor være den nukleotiden på den DNA tråden som er minst metylert som blir fjernet (den nyeste.) Ny nukleotid vil deretter bli satt inn av ~~polymerase~~ DNA polymerase.



Emnekode : Mk-208
Kandidatnr. : 4608
Dato : 26.11.15
Ark nr. : 5 av 12

Oppgave 3a Primere som kan brukes er:

~~3' GCTTAGC 5' og 3' GAATCTA 5'~~

5' CGAATCG 3' og 3' GAATCTA 5'

Oppgave 3b PCR er en metode som blant annet kan brukes til genotyping. Man må først ta en prøve fra personen som skal genotypes. Prøven sentrifugeres slik at alle celler faller til bunnen, i pelleten, og man kan fjerne resten som er i supernatanten. Prøven må deretter varmes for at cellene skal bli lysert, og alle cellekomponentene (bl.a. DNA) slippes ut. Man sentrifugerer så prøven på nytt, og DNA vil da befinne seg i supernatanten. Denne kan man bruke for å kjøre en PCR.

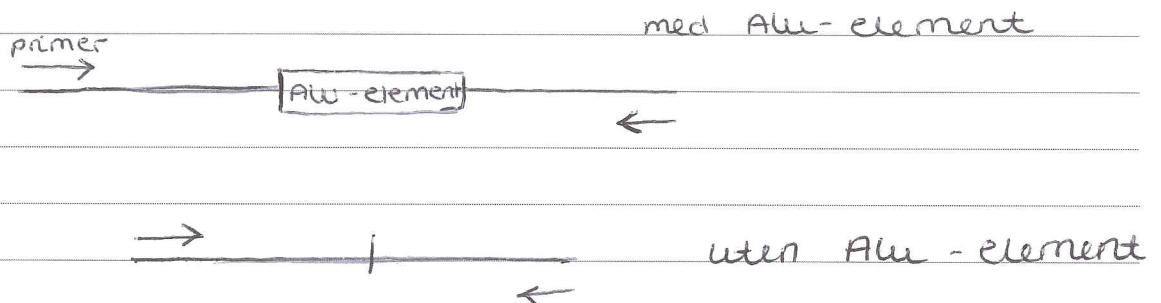
Ved PCR blir en DNA-sekvens amplifisert / oppkopiert. Dette gjøres ved å bruke to primere som er komplementære til hver side av den DNA-sekvensen man ønsker å kopiere. Man tilsetter prøven en PCR mix som inneholder primere, polymerase og dNTP.



Emnekode : MH-208
Kandidatnr. : 4608
Dato : 26.11.15
Ark nr. : 6 av 12

3b forts.

I dette tilfelle ønsker man å kopiere den delen av DNA som har et dimorft Alu-element. Dersom Alu-elementet er tilstede på kromosom 1, vil sekvensen som skal kopieres være lengre enn dersom det ikke er til stede.



Ved PCR varmes første prøven opp til 95°C slik at de to DNA-tråderne skiller lag. Dette kalles denaturering. Deretter skjer ~~kjøling~~ hybridisering, ved at prøven kjøles ned til ca 50° . Primerene kan da feste seg til komplementære DNA-sekvenser. Til slutt varmes prøven opp til ca 72°C , slik at polymeriseringen kan skje. DNA polymerasen sørger da for at hele DNA sekvensen blir kopiert. Disse 3 trinnene gjentas mange ganger, slik at DNA-sekvensen blir kopiert mange ganger.



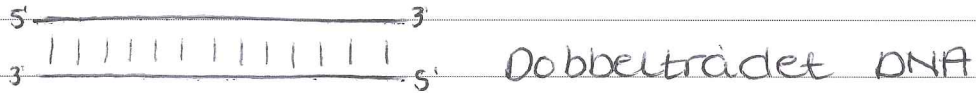
Emnekode : Mk-208

Kandidatnr. : 4608

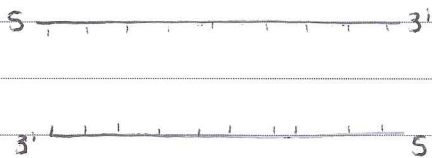
Dato : 26.11.15

Ark nr. : 7 av 12

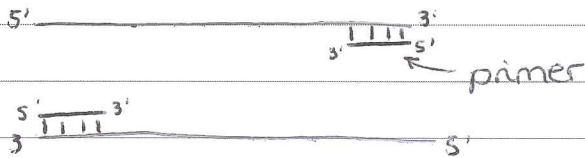
3b forts



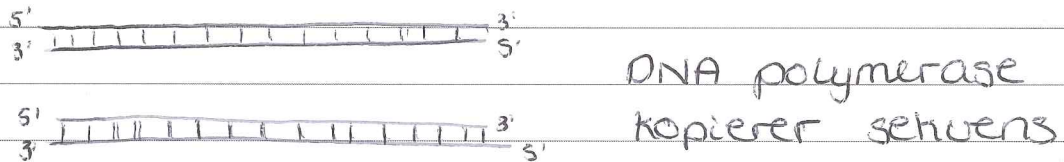
↓ varmes opp til 95°C



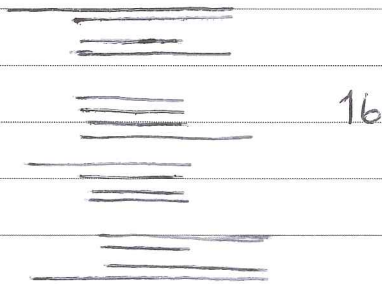
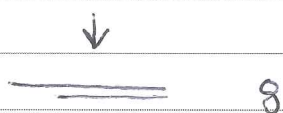
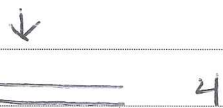
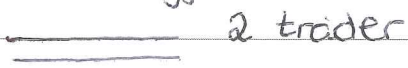
↓ kjøles ned til 50°C



↓ varmes opp til 72°C



Dette gjentas mange ganger:



OSV.



Emnekode : ML-208
Kandidatnr. : 4608
Dato : 26.11.15
Ark nr. : 8 av 12

3b forts. Produktet fra PCR kan detetter kjøres på gel-elektroforese for å finne genotypen. Ved gel-elektroforese kjøres ~~proven~~ molekylene, som er negativt ladd gjennom en gel med strøm satt på. I enden er det en positiv anode som molekylene vil bevege seg mot. I gelen er det et nettverk av polymerer som vil holde molekylene tilbake. De små molekylene kommer seg lettere forbi enn store molekyler, og vandrer derfor lengre. Ved å tilsette fargestoff (alcian blue) kan man til slutt se hvor langt molekylene (DNA-sekvensene) har vandret. Ved å sammenligne med en størrelsesstandard med kjent lengde på basesekvensene kan man også finne ut hvor lange de ukjente basesekvensene er. En DNA-sekvens med Alu-elementet vil som sagt være lengre enn ett uten, og derfor vandre kortere på gelen. Dersom man er heterozygot og har ett allel med Alu-element og et uten, vil man få to streker på gel-elektroforesen, hvor den ene har vandret lengre enn den andre. Er man derimot homozygot, og har Alu-elementet på begge kromosomer, vil man bare se en strek som ikke har vandret så langt (sammenlign



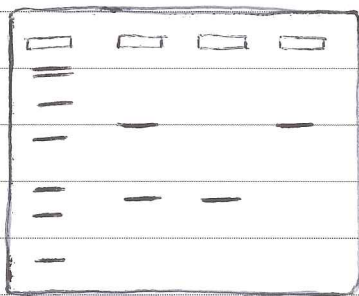
Emnekode : ML-208

Kandidatnr. : 4608

Dato : 26.11.15

Ark nr. : 9 av 12

3b forts. med størrelsesstandard). Har man ikke Alu-elementet på noen av kromosomene er man også heterozygot, og vil se en strek, som har vandret lengre.



Størrelses-
standard
heterozygot
homozygot
ikke Alu
homozygot
har Alu

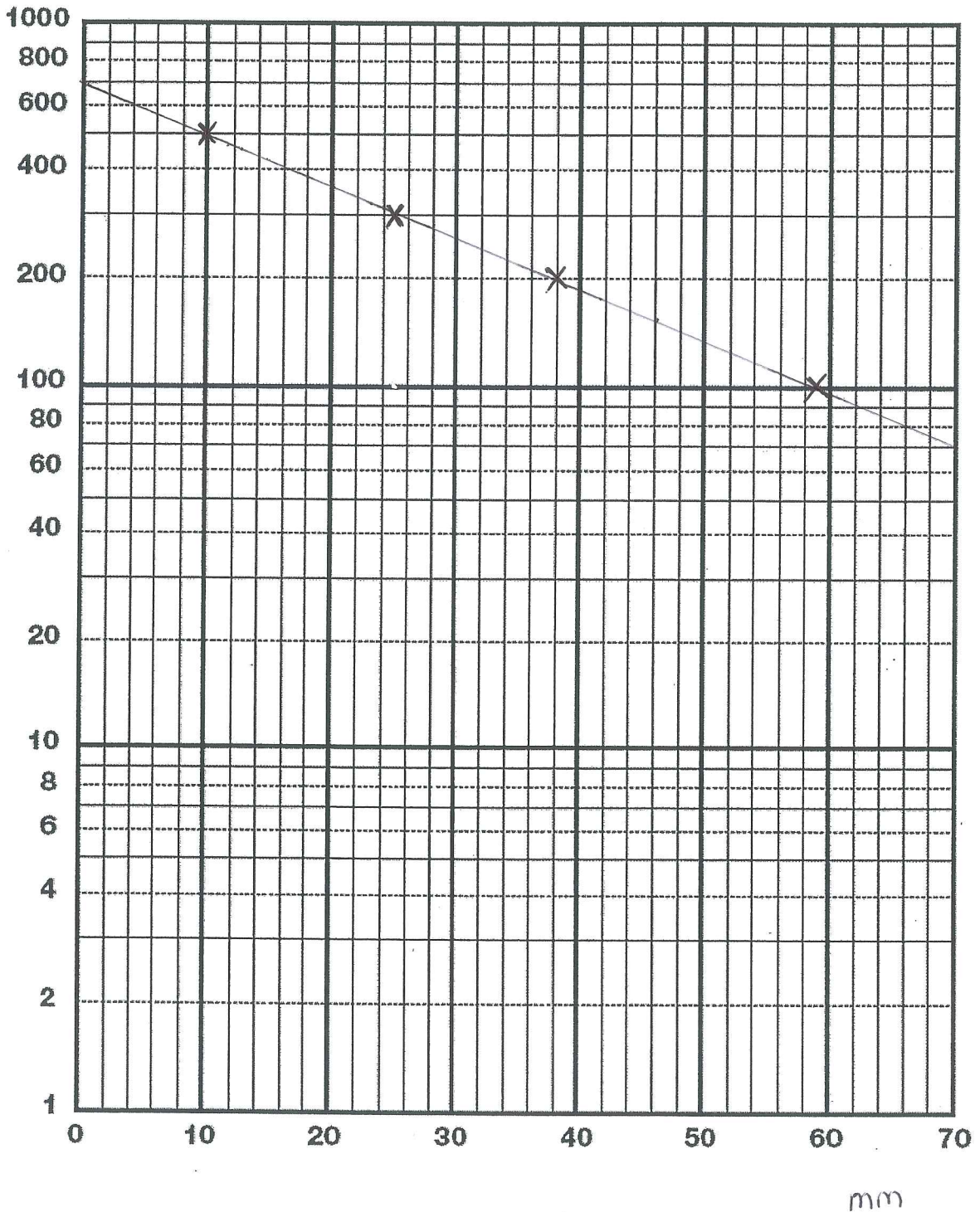
Det kan være lurt å bruke negativ og positiv kontroll, for å utelukke feilkilder.

(Til bruk i oppgave 4)

Emnekode: ML-208

Kandidatnr: 4608

bp





Emnekode : ML-208
Kandidatnr. : 4608
Dato : 26.11.15
Ark nr. : 11 av 12

Oppgave 4

Ved å bruke standardkurven, finner jeg ut at fragment 1, som har vandret 20 mm, er ca 350 bp. Fragment 2 har vandret 31 mm og er ca 250 bp langt. Fragment 3 har vandret 46 mm og er ca 150 bp langt.

Oppgave 5

For å isolere genet for et protein fra et cDNA-bibliotek, må man først finne aminosyresekvensen til proteinet. Dersom man har aminosyresekvensen kan man bruke denne til å finne basesekvensen til genet. Ettersom noen aminosyrer kodes for av flere ulike kodon (tre baser etter hverandre) er det ofte flere mulige basesekvenser. Jo lengre aminosyresekvensen er, jo fler mulige basesekvenser er det. Man kan likevel klare å finne den riktige basesekvensen. Når denne er funnet, kan man lage prober som er ^{komplementær med} ~~komplementære med~~ basesekvensen til proteinet. Disse probene kan brukes til å binde seg til komplementære basesekvenser i cDNA-biblioteket. Probene kan være festet til reportere som synliggjør hvor i cDNA-biblioteket



Emnekode : ML-208
Kandidatnr. : 4608
Dato : 26.11.15
Ark nr. : 12 av 12

5 forts. Proben har festet seg, og dermed
hvor det finnes DNA som koder
for dette proteinet. Dette genet
kan deretter isoleres og kopieres
opp, for eksempel med PCR.