

## Deeltoets 2 thuisopdracht.

In de bijgevoegde excel file vind je de tabel met het construct dat je mag maken voor deze opdracht, de vectoren staan ook op blackboard. Mocht je niet in staat zijn het genproduct te vinden of je niet op de lijst staan geef dit dan even door dan zorg ik voor een oplossing.

Dit onderdeel zal 25% van het toetscijfer bepalen (GEPE recidivisten hoeven dit onderdeel niet te maken, mag wel)

### 1 Wat is de functie van het eiwit (2)

Je wilt het aangegeven deel van het eiwit tot expressie brengen in de in de tabel aangegeven expressievector, waarbij het fusie-eiwit zowel een N-terminale als een C-terminale HIS-tag moet hebben. Je maakt hiertoe gebruik van PCR amplificatie van het genproduct.

2. ontwerp de oligo's met een  $T_m$  van  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (genspecifieke deel) die je gebruikt voor de amplificatie van dit deel van het eiwit. Je mag hierbij gebruik maken van de vuistregel: 1G/C paar =  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en een A/T paar =  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (4)

Ontwerp het construct in clone manager software e.g. Serial cloner

3. copieer de restrictie map inclusief aminozuur informatie in alle drie de frames (4), zorg ervoor dat de file leesbaar blijft

4. bepaal het moleculaire gewicht en pI van het fusie-eiwit (2)

5. maak een plasmide kaart van het expressieconstruct waarbij de belangrijkste genetische elementen en **alleen** de restrictie enzymen die je gebruikt hebt voor clonen zijn weergegeven (4)

Je hebt het fusieeiwit gemaakt en gezuiverd,

6. Verzin een experiment waarbij je het gezuiverde eiwit kan gebruiken, beschrijf duidelijk welke vraag je hierbij kan beantwoorden, deze vraag dient gerelateerd te zijn aan de functie van het eiwit (3)

Je besluit het gen dat codeert voor het aangegeven eiwit uit te schakelen met behulp van CRIPR/cas9. Hiervoor gebruik je de vector pX330 (<https://www.addgene.org/42230/>)

7. ontwerp de oligo's voor dit construct (3)

Je hebt het construct gemaakt en hebt kunnen aantonen dat het gen is uitgeschakeld

8. Verzin een experiment waarbij je gebruik maakt van de cellen die het eiwit niet meer tot expressie brengen, beschrijf duidelijk welke vraag je hierbij kan beantwoorden, deze vraag dient gerelateerd te zijn aan de functie van het eiwit (3)