

Gewinnung des Insulins und Herstellung von Insulin über eine copy-DNA

Lösungsvorschlag:

Aufgabe 1

Abschnitt (I):

Herstellung des Proinsulins

- ✓ Man isoliert aus diesem Gewebe eine sogenannte Proinsulin-m-RNA, die an den Ribosomen der Insel-Zellen in das Protein translatiert wird. Diese Proinsulin-m-RNA wird mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase in eine DNA umgeschrieben.
- ✓ Der RNA-DNA-Doppelstrang wird erhitzt und dadurch aufgespalten. Der RNA-Strang wird durch eine spezielle RNAase abgebaut.
- ✓ Der DNA-Einzelstrang wird mittels DNA-Polymerase zu einem Doppelstrang ergänzt.
- ✓ An den DNA-Doppelstrang wird das Trinukleotid „ATG“ angehängt, das für die Aminosäure Methionin codiert.
- ✓ Um in das Plasmid eingebaut werden zu können, benötigen die Enden der Proinsulin-DNA noch die zugehörigen sticky-ends.

Abschnitt (II)

Rekombination und Selektion

- ✓ Schneiden des Plasmids mit EcoRI. Inkubieren des geschnittenen Plasmids mit der copy-DNA. Aufnahme von Plasmiden in die aufnahmebereiten Bakterien.
- ✓ Selektion derjenigen Bakterien, die ein rekombiniertes Plasmid aufgenommen haben. Vermehrung dieser Bakterien.

Abschnitt (III)

Reinigen und Prozessieren des Proinsulins

- ✓ Synthese des Proinsulins in den Bakterien. Aufschluss und Gewinnung des Proinsulins.
- ✓ Das Protein besteht nun einerseits aus einem Teil des β -Galaktosidase-Gens und dem Proinsulin(A,B und C-Kette). Durch die Behandlung mit Bromcyan wird an der eingefügten Aminosäure Methionin das Fusionsprotein gespalten.
- ✓ Enzymatisch wird nun die C-Kette aus dem Proinsulin-Molekül herausgeschnitten. Übrig bleibt das fertige Humaninsulin-Molekül.

Aufgabe 2

- ✓ Das Trinukleotid „ATG“ codiert für die Aminosäure Methionin. Dieses Nukleotid sitzt später genau an der Nahtstelle zwischen dem Rest des β -Galaktosidase-Gens und dem Proinsulin-Gen. Bromcyan spaltet gerade an dieser Stelle das spätere Protein. So wird das Fusionsprotein in das Proinsulin und den Rest der β -Galaktosidase gespalten.

Aufgabe 3

- ✓ Da es sich bei den beiden Polypeptidketten des Insulinmoleküls um sehr kurze Ketten handelt, lässt sich die Synthese der zugehörigen Nukleotidsequenzen(incl. der zugehörigen sticky-ends) künstlich vollziehen. Daraufhin werden diese synthetischen Gene in verschiedene Plasmide eingebaut. Die in unterschiedlichen Ansätzen rekombinierten Plasmide werden auf getrennten Wegen in E.coli-Zellen eingeschleust. Die rekombinierten Bakterien werden jeweils selektiert, anschließend vermehrt und die jeweiligen Transgene exprimiert. Nach Isolierung der beiden Proteinvorstufen, der Bromcyanspaltung und Abspaltung des β -Galaktosidaseabschnitts, werden die so gewonnenen A und B-Ketten des Insulins über Disulfidbrücken miteinander zum fertigen Insulinmolekül verknüpft.

Quelle: ZPG Biologie©2011