

▼ Hilfe 1

Einbau und Nachweis eines Fremdgens

Hilfe 1

Was genau ist Ihre Aufgabe?
Formulieren Sie den Arbeitsauftrag nochmals mit eigenen Worten.

Antwort 1

Sie sollen das Insulin-Gen in das Plasmid einbauen, indem Sie Plasmid und menschliche DNA mit dem geeigneten Restriktionsenzym schneiden. Anschließend wird das Plasmid in eine Bakterienzelle eingeschleust.

Ihre Aufgabe ist es, das Insulin-Gen so in das Plasmid einzubauen, dass Sie hinterher auch überprüfen können,

- ob das Insulin-Gen tatsächlich in das Plasmid eingebaut wurde und
- ob die Bakterienzellen tatsächlich ein Plasmid mit Insulin-Gen aufgenommen haben.

Sie sollen beschreiben, wie Sie vorgehen, um den korrekten Einbau nachzuweisen.



Hilfe 2

Einbau und Nachweis
eines Fremdgens

Hilfe 2

Zum Schneiden des Plasmids und der menschlichen DNA stehen Ihnen drei verschiedene Restriktionsenzyme zur Verfügung.

Markieren Sie jeweils mit der entsprechenden Farbe die Schnittstellen der drei Restriktionsenzyme.

Überlegen Sie, welche(s) der drei Restriktionsenzyme prinzipiell geeignet ist, um das Insulin-Gen aus der menschlichen DNA auszuschneiden.

Antwort 2

Je eines der drei Restriktionsenzyme schneidet im Bereich der Plasmid-Gene, des Ampicillin-Resistenz-Gens bzw. des β -Galaktosidase-Gens (X-Gal-Gens). Die menschliche DNA weist sowohl vor als auch hinter dem Insulin-Gen Schnittstellen für zwei der drei Restriktionsenzyme auf.

Demnach eignen sich prinzipiell zwei Restriktionsenzyme, um das Insulin-Gen aus der menschlichen DNA zu isolieren.

▼ Hilfe 3

Einbau und Nachweis
eines Fremdgens

Hilfe 3

Das Plasmid wird nach Einbau des Insulin-Gens in eine Bakterienzelle eingeschleust. Machen Sie sich die Bedeutung

- des Ampicillin-Resistenz-Gens und
- des β -Galaktosidase-Gens für die Bakterienzelle bewusst. Welche Fähigkeiten erwirbt eine Bakterienzelle, die ein Plasmid aufgenommen hat?

Antwort 3

Bakterien, die über ein intaktes **Ampicillin-Resistenz-Gen** verfügen, sind gegen das Antibiotikum Ampicillin resistent. Während Bakterien ohne Resistenz-Gen absterben, können sie demnach auch auf einem Nährboden wachsen, der dieses Antibiotikum enthält.

Bakterien, die über ein intaktes **β -Galaktosidase-Gen** verfügen, können ein Enzym, herstellen, das den Zucker X-Gal spaltet. Dabei entsteht ein blauer Farbstoff. Sie bilden auf einem Nährboden, der den Zucker X-Gal enthält, demnach blaue Kolonien, während Bakterien ohne funktionsfähiges β -Galaktosidase-Gen farblose Kolonien bilden.



Hilfe 4

Einbau und Nachweis
eines Fremdgens

Hilfe 4

Überlegen Sie, welche Folgen ein Einbau des Insulin-Gens

- innerhalb des Ampicillin-Resistenz-Gens
 - innerhalb des β -Galaktosidase-Gens
- für eine Bakterienzelle hat, die dieses Plasmid aufnimmt.

Antwort 4

Zunächst ermöglicht der Einbau des Insulin-Gens den Bakterienzellen mit Plasmid die Herstellung des Proteins Insulin.

Wird das Insulin-Gen innerhalb des Ampicillin-Resistenz-Gens eingebaut, so kann dieses Resistenz-Gen nicht mehr korrekt abgelesen werden. Die Bakterienzelle ist demnach auch nach Aufnahme dieses Plasmids nicht gegen das Antibiotikum Ampicillin resistent. Sie kann nicht auf einem Nährboden mit Ampicillin wachsen.

Wird das Insulin-Gen innerhalb des β -Galaktosidase-Gens eingebaut, kann das zuckerspaltende Enzym nicht gebildet werden. Die Bakterienkolonien bleiben farblos.

An welcher Stelle würden Sie das Insulin-Gen nun einbauen?



Hilfe 5

Einbau und Nachweis
eines Fremdgens

Hilfe 5

Auch bei Verwendung des geeigneten Restriktionsenzymys gelingen sowohl der Einbau des Insulin-Gens in das Plasmid als auch das Einschleusen des Plasmids in die Bakterienzelle nur in einigen wenigen Glücksfällen. Man erhält zahlreiche Bakterienzellen, die kein Plasmid oder aber ein unverändertes Plasmid ohne Insulin-Gen aufgenommen haben. Nur sehr wenige Bakterienzellen enthalten ein Plasmid mit eingebautem Insulin-Gen. Die gilt es zu finden. Aber wie???

Antwort 5

Das Insulin-Gen wird innerhalb des β -Galaktosidase-Gens eingebaut.

Wie gehen Sie vor um die Bakterienzellen zu finden, die ein Plasmid mit eingebautem Insulin-Gen aufgenommen haben?

▼ Hilfe 6

Einbau und Nachweis eines Fremdgens

Hilfe 6

Das Insulin-Gen wird innerhalb des β -Galaktosidase-Gens eingebaut.

Überlegen Sie, welche Eigenschaften Bakterienzellen haben, die

- kein Plasmid
- ein unverändertes Plasmid ohne Insulin-Gen
- ein Plasmid mit Insulin-Gen aufgenommen haben?

Beschreiben Sie, wie Sie vorgehen um die Bakterien mit Insulin-Gen zu finden.

Antwort 6

Bakterienzellen ohne Plasmid sind nicht resistent gegen Ampicillin. Bakterienzellen mit unverändertem Plasmid sind resistent gegen Ampicillin und bilden auf einem Nährboden mit dem Zucker X-Gal blaue Kolonien.

Bakterienzellen, die ein Plasmid mit eingebautem Insulin-Gen besitzen, sind resistent gegen Ampicillin und bilden auf einem Nährboden mit X-Gal weiße Kolonien.

Die Bakterien werden auf einem Ampicillin-haltigen Nährboden gezüchtet. Bakterien ohne Plasmid sterben ab. Die gewünschten Bakterien bilden weiße Kolonien und sind so leicht von den Bakterien mit blauen Kolonien zu unterscheiden.