

LEKTIEARK 1:

Gensplejsning.

Opgave

Forestil dig, at du arbejder på et genteknologisk laboratorium, og du er netop blevet beordret til af chefen at gå i gang med at lave den gensplejsning, som er blevet bestilt hos laboratoriet af medicinalfirmaet Growit. Det drejer sig om en produktion af det humane væksthormon, som også benævnes hGH. Det bruges til behandling af personer, der ikke selv producerer nok hormon.

- 1) Du skal nu i gang i laboratoriet. Du begynder med at gøre dig klart, at der er 3 overordnede ting du har brug for, for at lave denne opgave. Hvad er det?

Du har nu fået fat i nogle humane celler og skal i gang med at oprense DNA'et i disse celler.

- 2) Beskriv hvordan du isolerer DNA'et fra de humane celler.

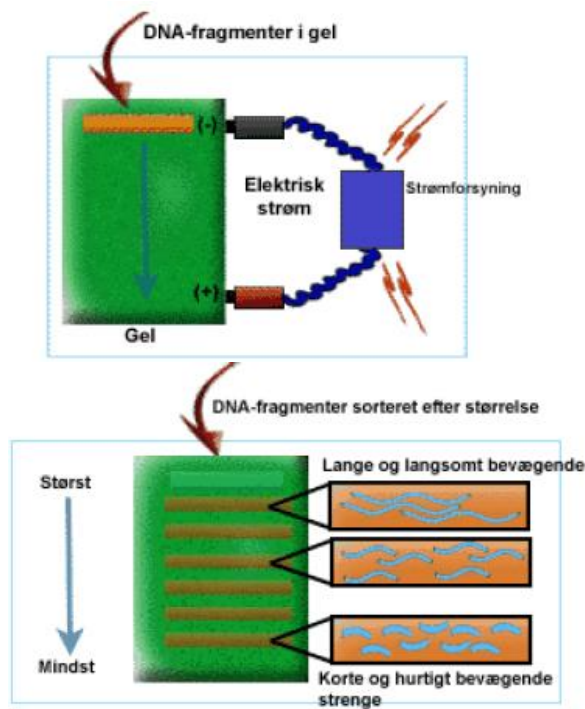
- 3) Der findes en anden måde at skaffe donorgenet på. Forklar hvordan man kan fremstille væksthormongenet, hvis man kan isolere mRNA sekvensen for genet i cellerne.

Hvis vi nu forestiller os at du har isoleret DNA fra de humane celler ved den første metode, så står du nu med noget humant DNA i et reagensglas. Men da du jo kun er interesseret i at sætte det stykke DNA ind i din vært som koder for hGH må du nu benytte dig af nogle specielle enzymer.

- 4) Hvad hedder disse enzymer, og hvilken vigtig virkning har de, når du tilsætter dem til dit donor-DNA.

- 5) Tegn det opklippede DNA's baser for et restriktionsenzym. Du vælger selv hvilket.

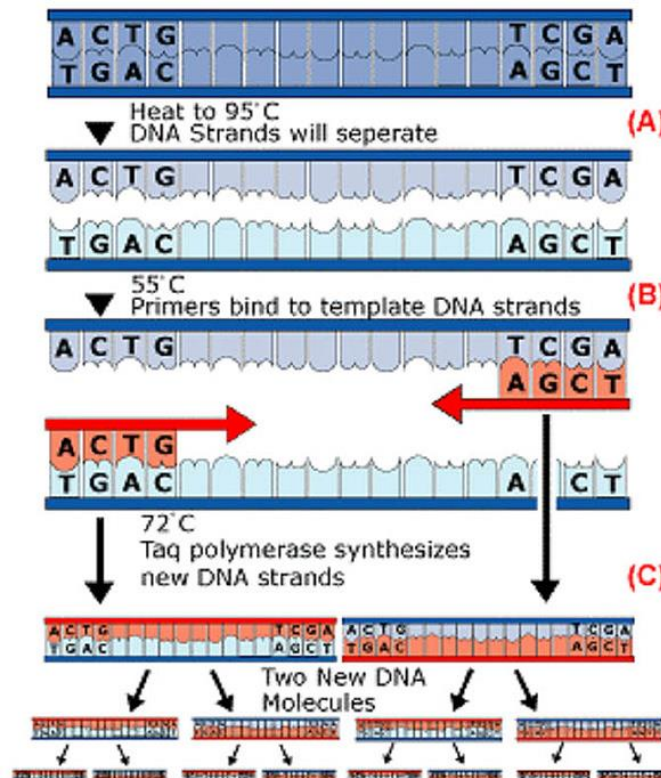
Du har nu klippet dit donor-DNA i stykker med et restriktionsenzym, lad os sige at det er det, der kaldes HindIII. Og du har så brugt gelelektroforesemetoden til at isolere netop hGH genet. Gelelektroforese er en metode til elektrisk at adskille DNA stykker af forskellige længder se **figur 1**. DNA er negativt ladet og vil derfor vandre imod pluspolen, når det placeres ved minuspolen i en gel. De tungeste og dermed største stykker DNA vil vandre kortest, og de korte og lette længst. hGH genet vil have en bestemt størrelse, og når det har vandret imod pluspolen, vil det placere sig i en bestemt afstand fra begyndelsespunktet. Man kan nu oprense genet fra gelen og arbejde videre med det.



Figur 1 Gelelektroforese af donor_DNA fragmenter efter at de er klippet med restriktionsenzym EcoRI. Korte og lette fragmenter er vandret længere end lange og tunge fragmenter.

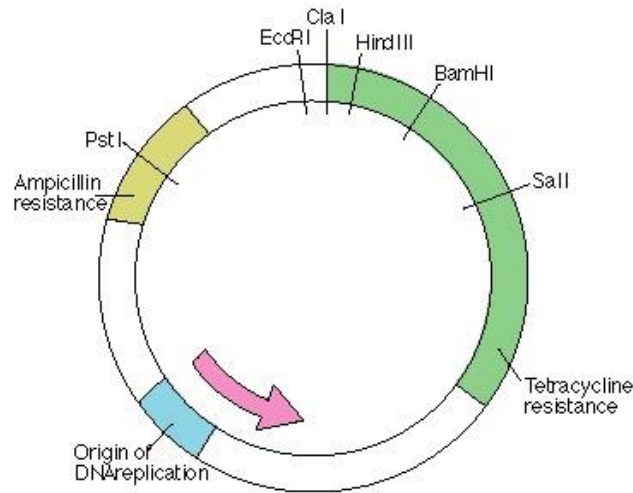
Efter at du nu har isoleret hGH-genet skal du opformere det ved en laboratoriemetode, der hedder PCR-metoden (Polymerasekædereaktion).

- 6) Ud fra nedenstående **figur 2** skal du forklare din nabo, hvordan du vha. PCR-metoden kan danne kopier af hGH genet til brug ved den forestående gensplejsning.



Figur 2 Polymerasekædereaktion PCR-metoden.

Du er nu nået så langt, at du har tusindvis af kopier af hGH genet fremstillet ved PCR metoden efter isoleringen af genet fra de humane celler. Du skal nu have overført genet til vektoren. Her benytter du dig af et plasmid fra *E.coli* bakterien, som har to antibiotikaresistensgenet. Et for ampicillin og et for tetracyclin.



HindIII



Sådan klipper HindIII DNA op

7) Forklar hvad et plasmid er, hvor det findes, og hvilke karakteristika det har.

8) Hvad skal man sikre, at der er til stede på genet før og efter den DNA-sekvens, der koder for selve hormonet hGH. Er det ikke til stede vil genet ikke kunne translateres (oversættes) på ribosomerne til protein.

Din opgave er nu at åbne det ringformede plasmid DNA på en sådan måde, at du kan indsætte donorgenet deri.

9) Hvordan vil du gøre det?

Nu har du åbnet plasmidringen og har hældt donor-DNA'et ned til de åbne plasmider i et reagensglas.

- 10) Forklar hvorfor enderne på plasmiderne og donor-DNA'et passer sammen i basesekvensen på disse udstikkende enkeltstrengede ender (de klæbrige ender) og hvordan de lukkes sammen igen. Tegn evt. hvordan enderne ser ud imod hinanden.

- 11) Når du nu er færdig med at lukke plasmiderne igen, hvilke to former for plasmider har du så nede i glasset? Tegn dem.

Nu skal du indføre dine plasmider i værten.

- 12) Hvilke type af værtsorganisme vil du foreslå og hvorfor?

- 13) Hvordan vil du udføre selve indføringen af plasmiderne i værtscellen?

TILLYKKE, du har nu udført en gensplejsning og har nede i dit glas værtsorganismer med plamider, der indeholder det humane hGH gen. Men du har også to andre versioner af værtsorganismer dernede.

- 14) Hvilke typer af værtsorganismer er der nu i glasset ud over den værtsorganisme, vi er interesserede i? Tegn de to typer værtsceller.

Du må nu i gang med at isolere den interessante værtsorganisme fra de to ikke interessante. Du kan nu udnytte, at du benyttede HindIII restriktionsenzymet tidligere, som skar tetracyclin-genet op (herved ødelægges genet funktion).

- 15) Du lader nu værtsorganismen vokse på petriskåle med et vækstmedium, der indeholder ampicillin. Hvilken type værtsorganisme kan vokse herpå? Tegn skål og værtsorganismer.

Nogle værtsorganismer fra hver overlevende koloni fra de første petriskåle med ampicillin overføres nu (podes på) til petriskåle med vækstmedium indeholdende tetracyclin.

- 16) Hvilke værtsorganismer overlever på disse skåle? Tegn skål og værtsorganisme.

Man kan nu gå tilbage på de første skåle med ampicillin og tage nogle af kolonierne fra og opformere disse til produktion af hGH hormonet. Det er selvfølgelig en forudsætning, at man ikke har overført alle bakterier fra de første skåle til dem med tetracyclin, da man så ikke har nogle at gå tilbage og opformere til produktion af hGH.

Hvis du har valgt en bakterie som værtsorganisme har du dog et problem nu, som du ikke har, hvis du har valgt en gærcele som vært.



17) Hvorfor kan bakterier ikke transkribere humant DNA til mRNA, som derefter direkte translateres til det humane protein genet koder for? Det kan gærceller til gengæld.

Krav Ingen krav om aflevering eller fremlæggelse.

Arbejdsform I arbejder sammen i grupper eller individuelt

God arbejdslyst.