

Superkleber

Die Muscheln (zweischalige Mollusken) der Art *Mytilus* PRODUZIEREN einen wasserdichten Superkleber.

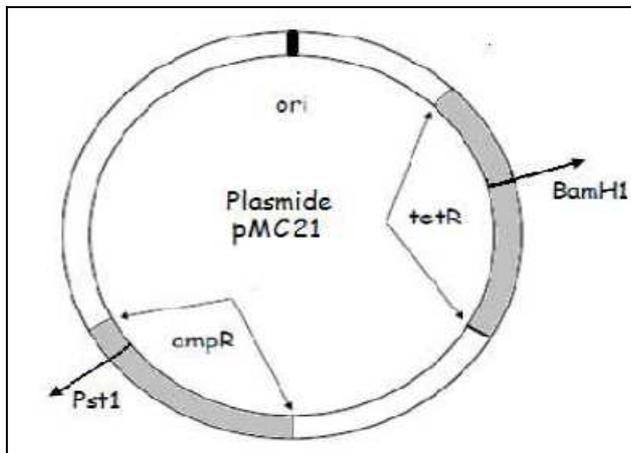
Wie schaffen sie es, in einer wässrigen Umgebung so gut an einer festen Oberfläche zu haften? Möglich wird das durch den Byssus. Das ist ein Bündel von Fäden, die in halbflüssiger Form von einer Drüse im Fuß abgesondert werden. Diese Fäden, die in Kontakt mit Wasser sofort koagulieren, bilden dabei eine Struktur mit hoher Haftungsfähigkeit.

Allerdings denken die Wissenschaftler nicht daran, Muscheln zu verwenden, um einen Superkleber herzustellen. Es bräuchte mindestens 10.000 davon, um nur ein Gramm Kleber zu erzeugen. Nun sind aber bereits viele Arten von Mollusken vom Aussterben bedroht. Wollte man also diejenige Menge von Mollusken sammeln, die es braucht, um die weltweite Nachfrage nach Superkleber zu befriedigen, würde das die Ausrottung des gesamten Bestandes der Mollusken bedeuten. Stattdessen haben einige amerikanische Forscher das DNA-Fragment aus Miesmuscheln isoliert, das diejenigen Gene enthält, die für die Synthese des Moleküls mit Klebeeigenschaften nötig sind.

Du bist Forscher geworden und von dir wurde verlangt, dieses Fragment auf einem plasmidischen Vektor zu klonen, um große Mengen von Superkleber herzustellen.

Du hast zur Verfügung:

- a) die DNA des Plasmides pMC21 (in mehr als ausreichender Menge)



ori Ursprungssequenz der Replikation
 ampR Gen für die Ampicillinresistenz
 tetR Gen für die Tetracyclinresistenz

BamHI
 erkannte Sequenz: G[↓]GATCC
 CCTAG[↑]G

PstI:
 erkannte Sequenz: CTGCA[↓]G
 G[↑]ACGTC

- b) die Restriktionsenzyme BamHI und PstI

- c) die DNA des Fragments, welches das Gen enthält, das den Superkleber codiert (in mehr als ausreichender Menge). Die folgende Abbildung zeigt die flankierenden Sequenzen dieses Fragments

```

ggatc caaaaatctc _____ cgcgattaggatcc
cctaggttttagag _____ gcgctaactctagg
    
```

- d) einen Stamm von *Escherichia coli*, der empfindlich gegenüber den Antibiotika Ampicillin und Tetracyclin ist
 e) das Enzym Ligase
 f) flüssiges Nährmedium

- g) Petrischalen, welche die folgenden festen Nährmedien enthalten
- Nähragar
 - Nähragar, welches das Antibiotikum Ampicillin enthält
 - Nähragar, welches das Antibiotikum Tetracyclin enthält
 - Nähragar, welches sowohl Ampicillin als auch Tetracyclin enthält
1. Erkläre der Reihe nach die Arbeitsschritte, mit denen du das Gen des Superklebers klonen würdest. Benutze dabei die Darstellungsform, die du für geeignet hältst.
2. Begründe die Wahl des festen Nährmediums, mit dem die Kolonien von *E. coli* mit Plasmid selektiert werden können. Begründe ebenso die Wahl des festen Nährmediums das im Anschluss verwendet wird, um die Kolonien von *E. coli* mit rekombinantem Plasmid zu selektieren.

Alternative:

- 1) Lege in detaillierter Weise deine Strategie dar und spezifiziere/erläutere dabei:
- Welche/s Restriktionsenzym/e kommen für eine zweckdienliche Verwendung in Frage?
 - Welche ist die Funktion der Ligase?
 - Wie wirst du das „in vitro“ konstruierte Plasmid in die Zellen von *E. coli* einschleusen?
- 2) Wie wirst du die Kolonien von *E. coli* auswählen, die das Plasmid mit dem gewünschten Fragment enthalten? Gib an, welches der folgenden Nährmedien du verwenden musst, und begründe deine Wahl:
- a. Nähragar
 - b. Nähragar mit Antibiotikum Ampicillin
 - c. Nähragar mit Antibiotikum Tetracyclin
 - d. Nähragar mit Ampicillin und Tetracyclin
- Mit welcher Vorgangsweise wirst du nach dem Wachstum der Kolonien auf dem Nährboden überprüfen, ob du den Klon mit dem Gen für den Superkleber erhalten hast?