Rekombinante DNA

= im Labor neu zusammengesetzte DNA.

Ein definiertes DNA Fragment (meistens ein Gen) wird aus seiner ursprünglichen Lage entnommen und in einen Vektor integriert, der gezielt in andere Zellen eingeschleust werden kann.

Werkzeuge der Gentechnik

- 1. Enzyme: Restriktionsenzyme, DNA-Ligase, DNA-Polymerasen,
- Plasmide oder Vektoren
- 3. **Transformierbare Zellen**, die rekombinante DNA aufnehmen und replizieren (vermehren).
- 4. Markergene zur Selektion und Identifizierung der Vektoren
- 5. Synthetische Oligonukleotide, kurze chemisch hergestellte DNA-Moleküle, ca. 20 Nukleotide lang

Quelle: Institut f. Genetik, VBC Wien

Restriktionsenzyme

Sie erkennen spezifische Sequenzen auf der DNA und schneiden dort.

MICROORGANISM	ENZYME ABBREVIATION	SEQUENCE
Haemophilus aegytius	Hae T II	5' G G C C 3' 3' C C G G 5'
Thermus aquaticus	Taql	5' T C G A 3' 3' A G C T 5'
Haemophilus haemolyticus	Hhal	5' G C G C 3' 3' C G C G 5'
Desulfovibrio desulfuricans	Ddel	5' C T N A G 3' 3' G A N T C 5'
Moraxella bovis	MboII	$5' \dots G \land A G \land (N)_8 \mid \dots 3'$ $3' \dots G \land T \land G \land (N)_7 \mid \dots 5'$
Escherichia coli	EcoRV	5'G A T A T C3' 3'C T A T A G5'
	<i>Eco</i> RI	5'GAATTC3' 3'CTTAAG5'
Providencia stuarti	Pstl	5'C T G C A G 3' 3'G A C G T C 5'
Microcoleus	MstII	5'C C T N A G G3' 3'G G A N T C C5'
Nocardia otitidis-caviarum	NotI	5'G C G G C C G C3' 3'C G C C G G C G5'

Restriktionsenzyme stammen aus verschiedenen Mikroorganismen.

Quelle: Institut f. Genetik, VBC Wien

Anwendungen von Restriktionsenzymen

Klonierung

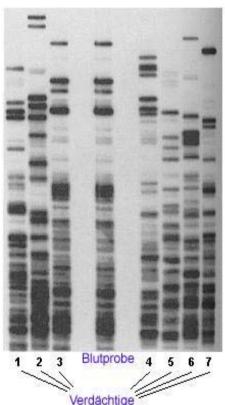
Herstellung von Medikamenten in Bakterienzellen, Herstellung transgener Organismen

Kartierung
 Anordnen von DNA-Abschnitten im Genom

 Gerichtsmedizin Identifizierung von Tätern durch DNA-Profil

Vaterschaftstest "genetischer Fingerabdruck"

• u.v.m.



dallog 🔷 gentedhrilli

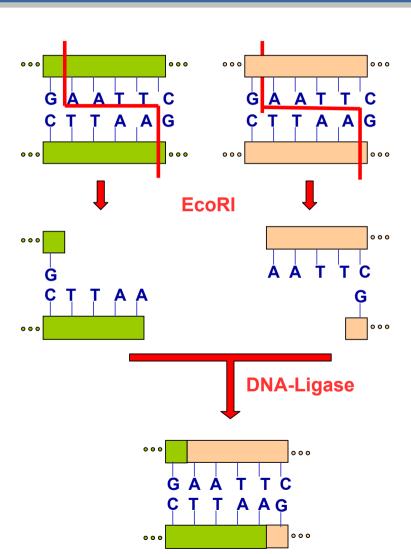
Das Restriktionsenzym EcoRI

Das Enzym EcoRI stammt aus Escherichia coli.

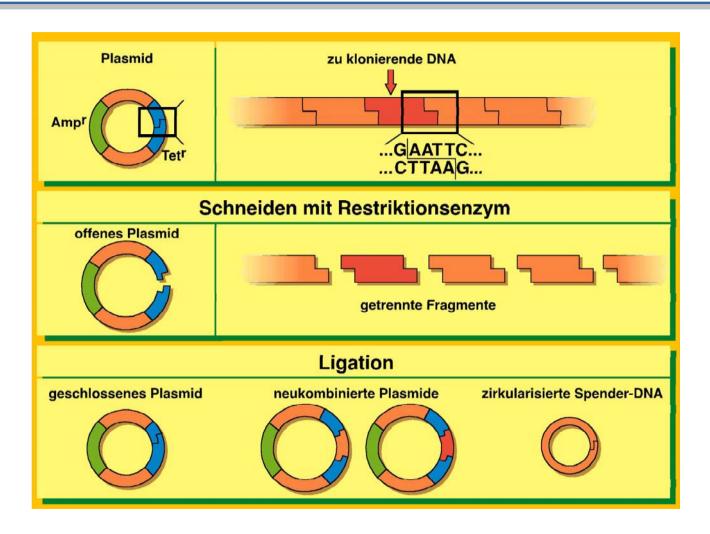
Es erkennt die Sequenz GAATTC.

EcoRI schneidet versetzt, es entstehen "sticky ends".

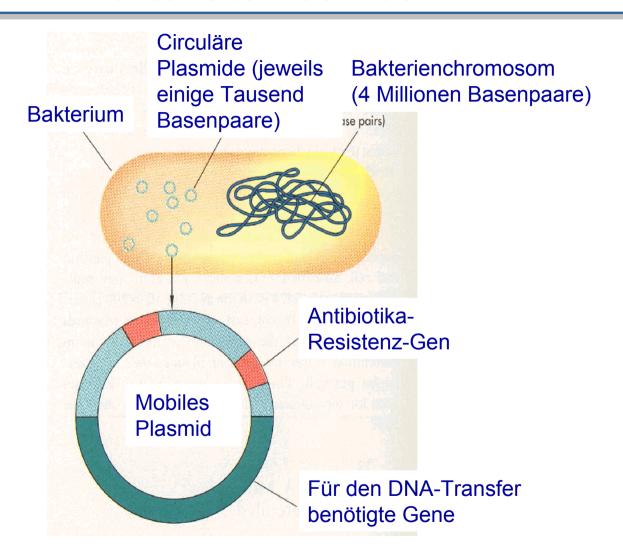
Mit dem Enzym *DNA-Ligase* können die Fragmente wieder zusammengesetzt werden.



Herstellung rekombinanter Plasmide

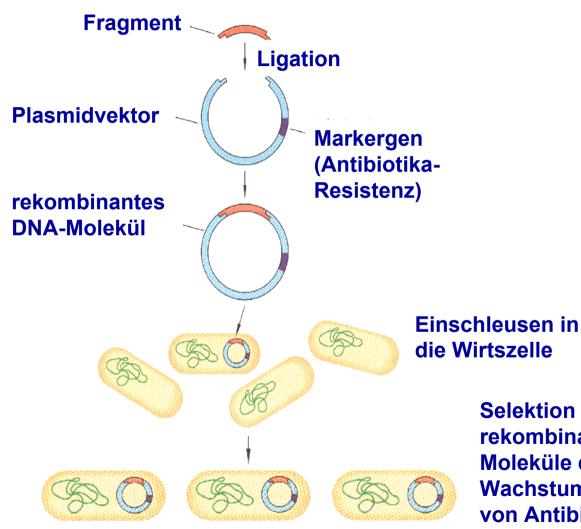


Bakterielle Plasmide



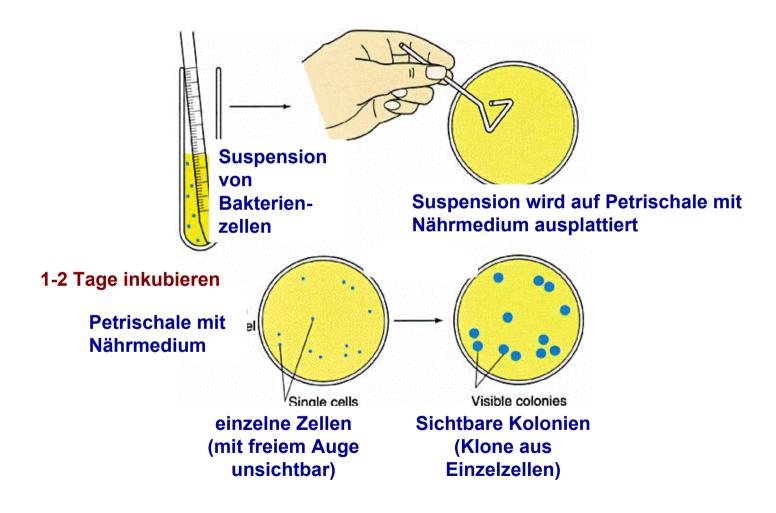
Quelle: Institut f. Genetik, VBC Wien

Klonierung von DNA



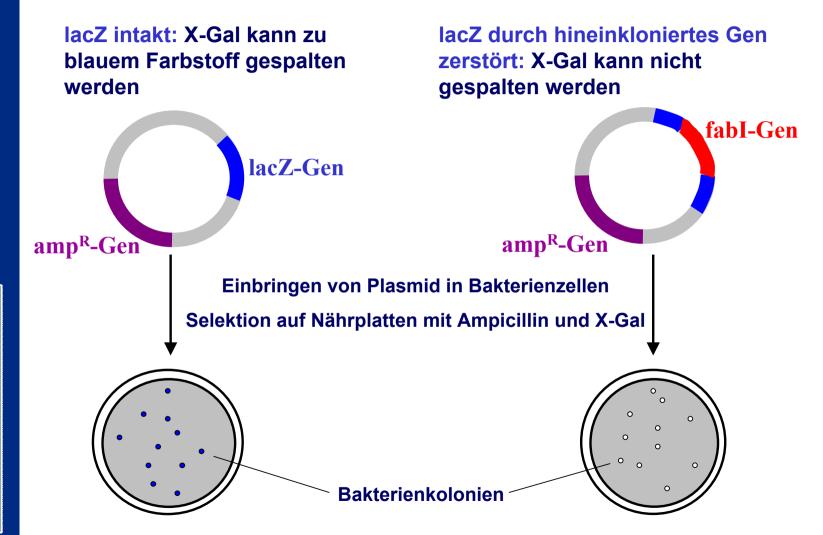
Selektion von Zellen, die rekombinante DNAMoleküle enthalten, durch Wachstum in Gegenwart von Antibiotikum

Kultivierung von Bakterien



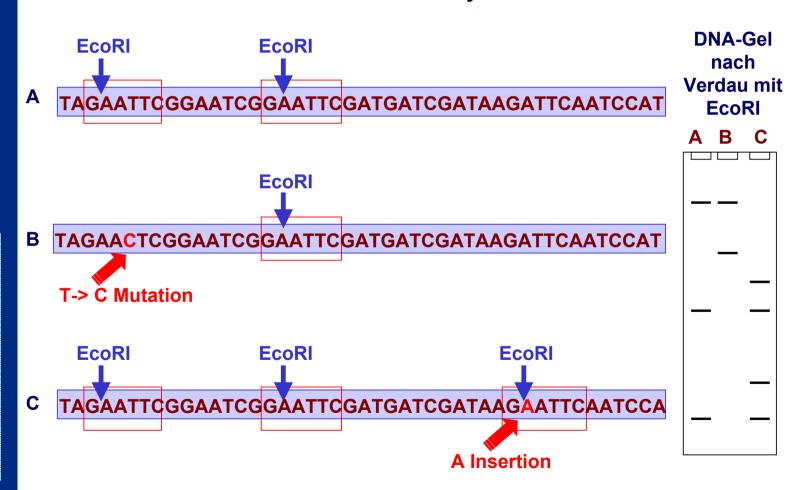
Quelle: Zentrum f. Angewandte Genetik, Wien

Blau/Weiss-Selektion



DNA-Profil

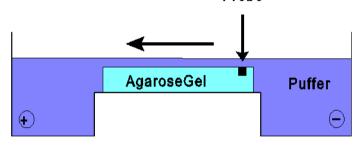
Charakteristische Unterschiede in der DNA-Sequenz jedes Menschen können Schnittstellen für Restriktionsenzyme verändern:



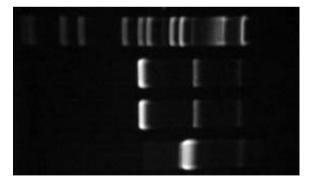
Gel-Elektrophorese 1

= Methode zur Auftrennung von DNA-Stücken verschiedener Länge

in einem Agarosegel durch Anlegen eines elektrischen Feldes





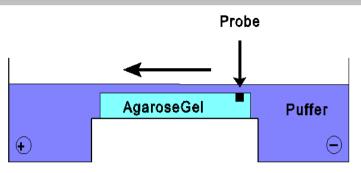


Sichtbarmachen durch UV und/oder Farbstoffe

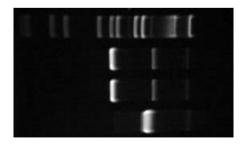
kurze Stücke wandern schnell, lange Stücke wandern langsam

Quelle: Internet

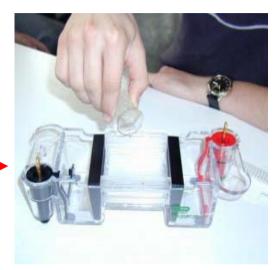
Gel-Elektrophorese 2

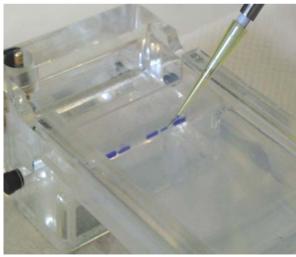


- 1. Gel gießen
- 2. Gel mit Proben beladen
- 3. Gellauf
- 4. Analyse der Banden



kurze Stücke wandern schnell, lange Stücke wandern langsam





DNA-Sequenzierung (1)

in vitro DNA-Synthese:



Kettenabbruchverfahren nach Sanger:

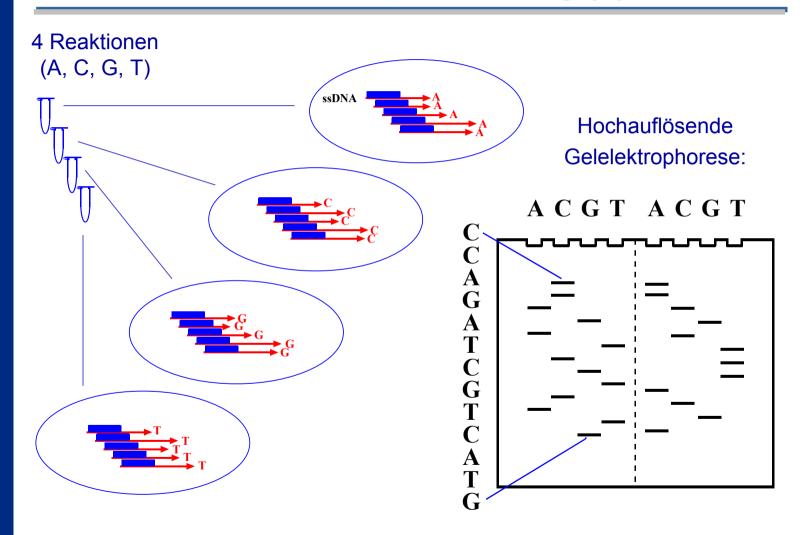
Zugabe von Dideoxy-Nucleotiden:



Sobald ein ddATP anstelle eines dATP eingebaut wird, bricht die DNA-Synthese ab.

analoges Vorgehen mit ddCTP, ddGTP und ddTTP jeweils in separaten Reaktionsansätzen

DNA-Sequenzierung (2)



Automatische DNA-Sequenzierung (1)

in vitro DNA-Synthese:



Sequenzierung in einer Reaktion mit vier Farben:

Zugabe von fluoreszenzmarkierten Dideoxy-Nucleotiden ("Dye-Terminatoren")



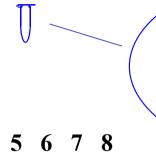
Sobald ein ddNTP anstelle eines dNTP eingebaut wird, bricht die DNA-Synthese ab.

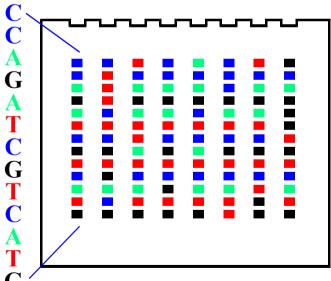
ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP tragen jeweils eine andere Fluoreszenzmarkierung (=Farbe)

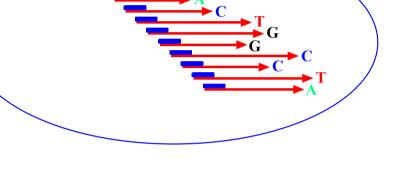


Automatische DNA-Sequenzierung (2)

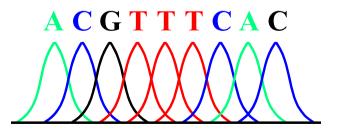
1 Reaktion ("dye terminator")







Kapillar-Gelelektrophorese:



Mikrosatelliten-DNA

= DNA mit sich wiederholenden Sequenz-Motiven von 2 − 7 Nucleotiden

z.B.
$$(CA)_{25}$$
; $(CAA)_{13}$; $(GAAA)_{17}$

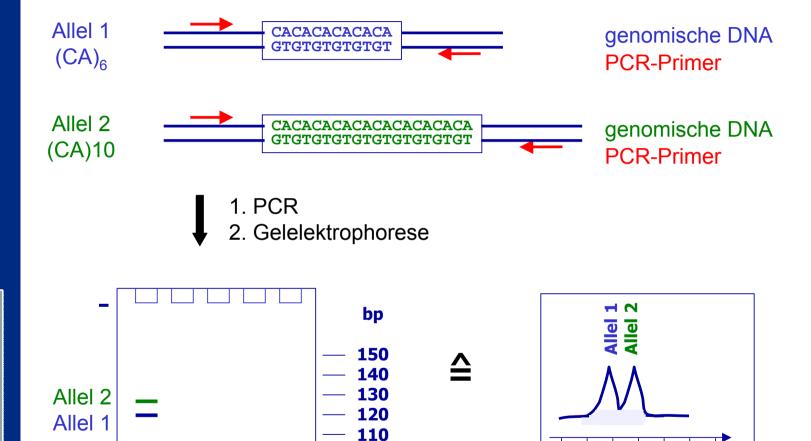
In einem typischen Säugergenom findet man ca. 100.000 CA-Dinucleotid-Mikrosatelliten.

Bei der DNA-Replikation verändert sich häufig die Länge von Satelliten-DNA (durch Fehler bei der Replikation).

Daher sind Mikrosatellitensequenzen hoch polymorph, es gibt viele verschiedene Allele in der Population.

Mikrosatelliten können somit für Typisierungen verwendet werden.

Mikrosatelliten-Typisierung



100

100

150

Chromatogramm

bp

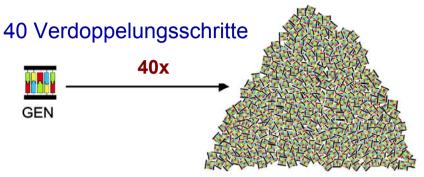
Quelle: Tosso Leeb, Tierärztl. HS Hannover

Gel

Die Polymerase-Kettenreaktion

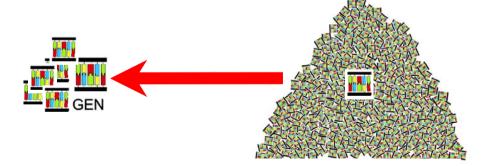
PCR = "Polymerase Chain Reaction" - Eine DNA Kopiermaschine

Vervielfältigung



ca. 1.100.000.000.000 Genkopien

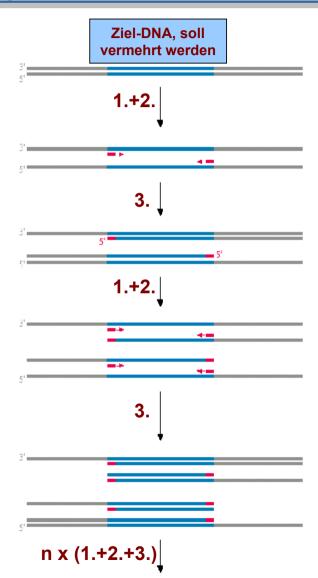
Nachweis



z. B. GVO Nachweis

Prinzip der PCR

- zur Trennung der Stränge erhitzen
- 2. abkühlen,synthetischeOligonukleotid-Primerbinden
- 3. thermostabile DNA-Polymerase bewirkt DNA-Synthese



Quelle: Institut f. Genetik, VBC Wien

dalog 🔷 gentedhilk

Was braucht man für eine PCR?

- DNA Probe (template)
- 2 verschiedene Primer
- Puffer
- MgCl₂
- dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate)
- DNA Polymerase



PCR-Gerät

1 Zyklus:

- 1. Denaturierung der DNA (95°C)
- 2. Annealing: Hybridisierung der Primer (z.B. 65°C)
- 3. Extension: DNA Synthese (72°C)

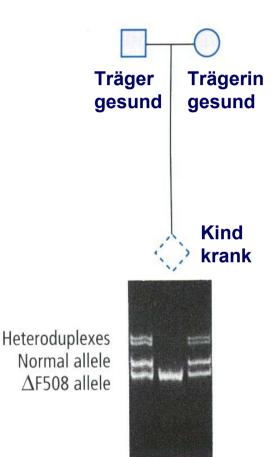
20-30 Zyklen

Anwendungen der PCR

zum Beispiel:

- **Medizinische Diagnostik** Diagnose von Erbkrankheiten (CF)
- Lebensmitteldiagnostik gentechnisch veränderte Lebensmittel
- Gerichtsmedizin Vervielfältigung von Probenmaterial (Haarwurzel, Sperma)
- Evolutionsforschung fossile DNA (Jurassic Park!)





u.v.m.

DNA in der forensischen Medizin - Täteridentifizierung

Jeder Mensch hat eine bestimmte Anzahl repetitiver Sequenzen in seiner DNA.

Die Anzahl dieser Sequenzen ist eindeutig und daher für jede Person wie ein Fingerabdruck.

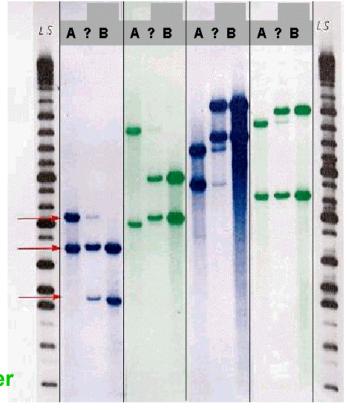
DNA kann daher mit der von Opfern und/oder Verdächtigen verglichen werden.

DNA aus 1 Tropfen Blut = 50 Mikroliter

1 Mini - Tropfen Sperma

1 Haarfollikel

Hautabschürfungen



A = Verdächtige/r

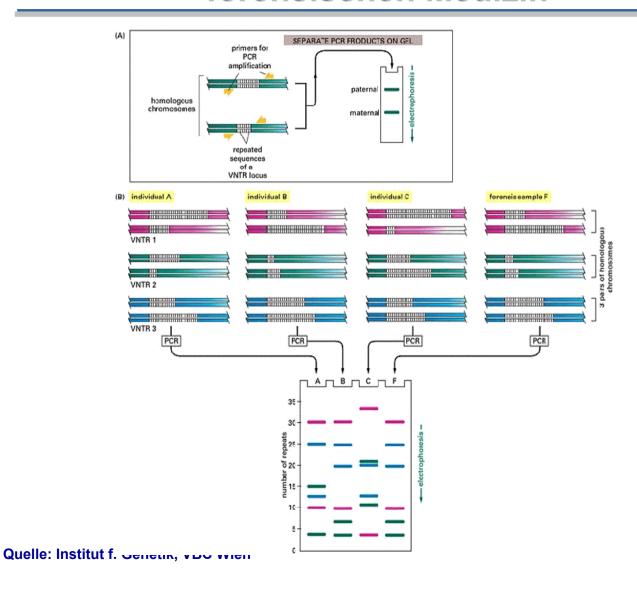
? = DNA vom Tatort

B = Opfer

Quelle: ISB

alalog Sentednilla

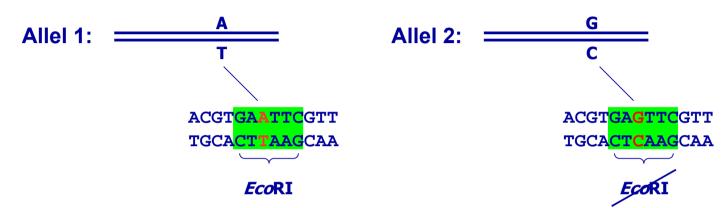
Nachweis eines Individuums in der forensischen Medizin



dlallog 🔷 gentedhilk

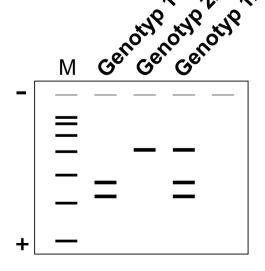
Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

z.B. EcoRI-RFLP:



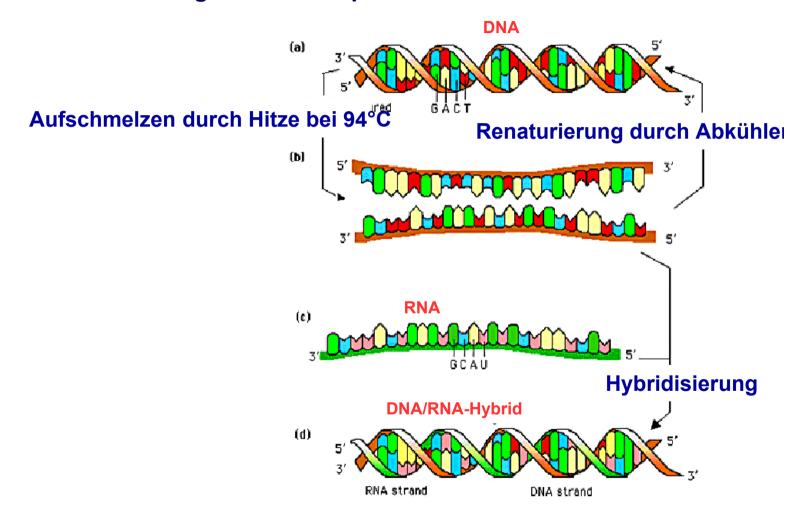
Nachweis: "PCR-RFLP"

- 1. PCR mit flankierenden Primern
- 2. Restriktionsspaltung des PCR-Produkts
- 3. Gelelektrophorese



Hybridisierung

= Aneinanderlagern von komplementären DNA-Stücken

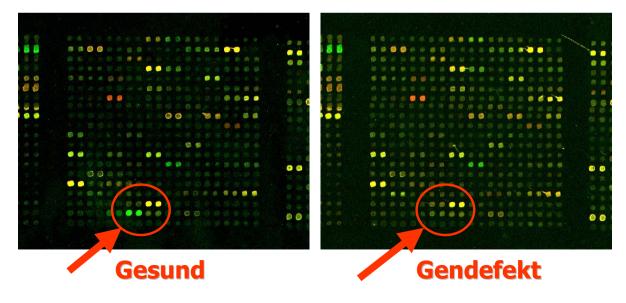


Anwendungen der Hybridisierung

zum Beispiel:

- Polymerase Kettenreaktion (PCR)
 Anlagern von Primern
- Sequenzierung
- Medizinische Diagnostik, DNA-Chips gleichzeitige Untersuchung vieler DNA-Proben

• u.v.m.



Prinzip des DNA-Chips - 1

Gebundene Chip-DNA

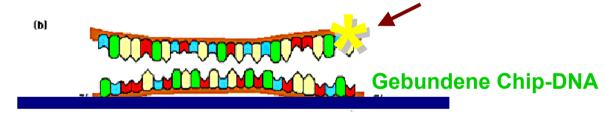


Glasträger

Prinzip des DNA-Chips - 2

DNA Hybridisierung erfolgt nach einem Schlüssel-Schloss Prinzip.





Glasträger

Nur passende DNA-Stücke hybridisieren.

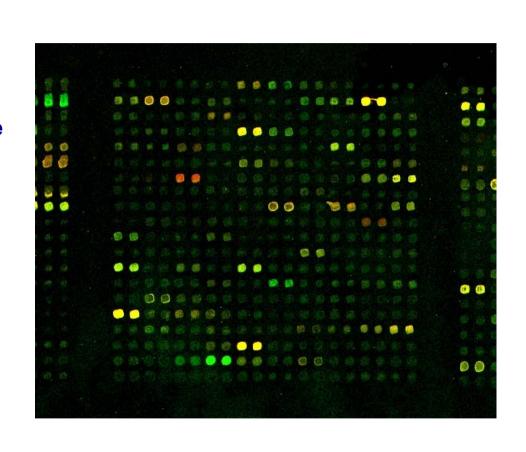
Prinzip des DNA-Chips - 3

Auf einem DNA-Chip können viele tausende DNA-Stücke zugleich untersucht werden.

Jeder Punkt entspricht einer gebundenen Chip-DNA.

Die Farbe ist abhängig von der Markierung der daran gebundenen DNA-

Probe, hier mit Quelle: Inst. f. Med. Biochemie, Univ. Wien



"Blotting" - Techniken

= Übertragung von DNA, RNA oder Proteinen von einem Elektrophorese-Gel auf eine Membran, um dann bestimmte Moleküle nachzuweisen.

Southern-blot

Hybridisierung von genomischer DNA mit spezifischen DNA-Sonden. Zum Nachweis eines Gens.

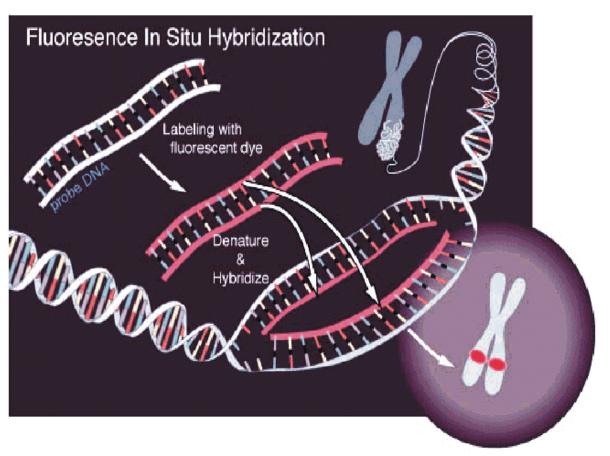
Northern-blot

Zelluläre mRNA wird mit DNA Sonden hybridisiert. Zum Nachweis der Expression eines Gens.

Western-blot

Zelluläre Proteine werden mit Antikörpern nachgewiesen. Zum Nachweis eines Proteins.

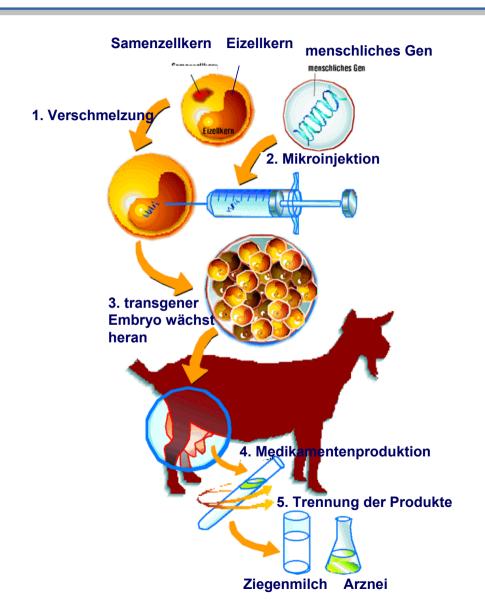
Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)



Nachweis von DNA auf einem Chromosom in der Zelle

Quelle: Institut f. Genetik, VBC Wien

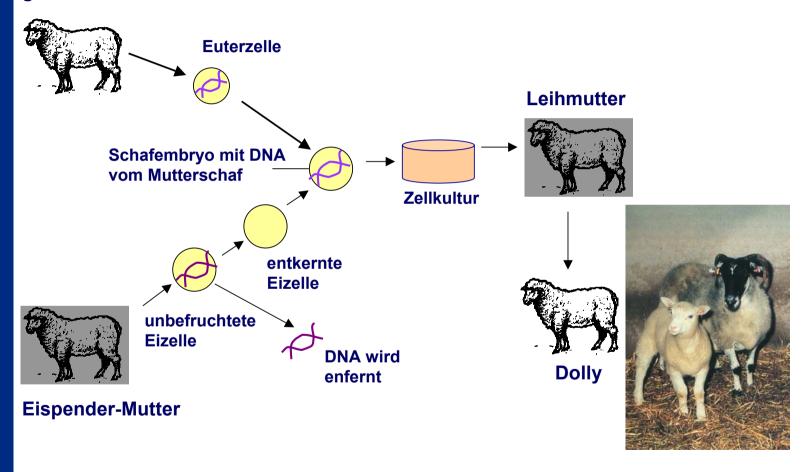
Transgene Tiere als Medikamentenlieferanten



Quelle: Internet

Klonschaf Dolly

genetische Mutter



Quelle: nach WDR, Internet