

Molekularbiologische Operationen für das DNA-Computing

Proseminar „Unkonventionelle Modelle der Berechenbarkeit“

Wintersemester 1999/2000

Dipl.-Inform. T. Hinze, e-mail: th1@tcs.inf.tu-dresden.de

Gliederung

1. Historie – Meilensteine in der Molekularbiologie, Biochemie und Genetik
2. DNA – Struktur, Aufbau, Eigenschaften, Begriffe, Definitionen
3. Operationen auf DNA – angewandte Rekombinationstechnik
 - Generieren von DNA-Einzelsträngen → *Synthesis*
 - Knüpfen und Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen
→ *Annealing, Melting*
 - Mischen von DNA-Lösungen → *Union*
 - Enzymatische Reaktionen
→ *Ligation, Digestion, Labeling, Polymerisation, PCR*
 - Separieren nach Strangendenmarkierung → *Affinity Purification*
 - Längenseparation und -bestimmung → *Agarose Gel Electrophoresis*
 - Sequenzbestimmung → *Sequencing*

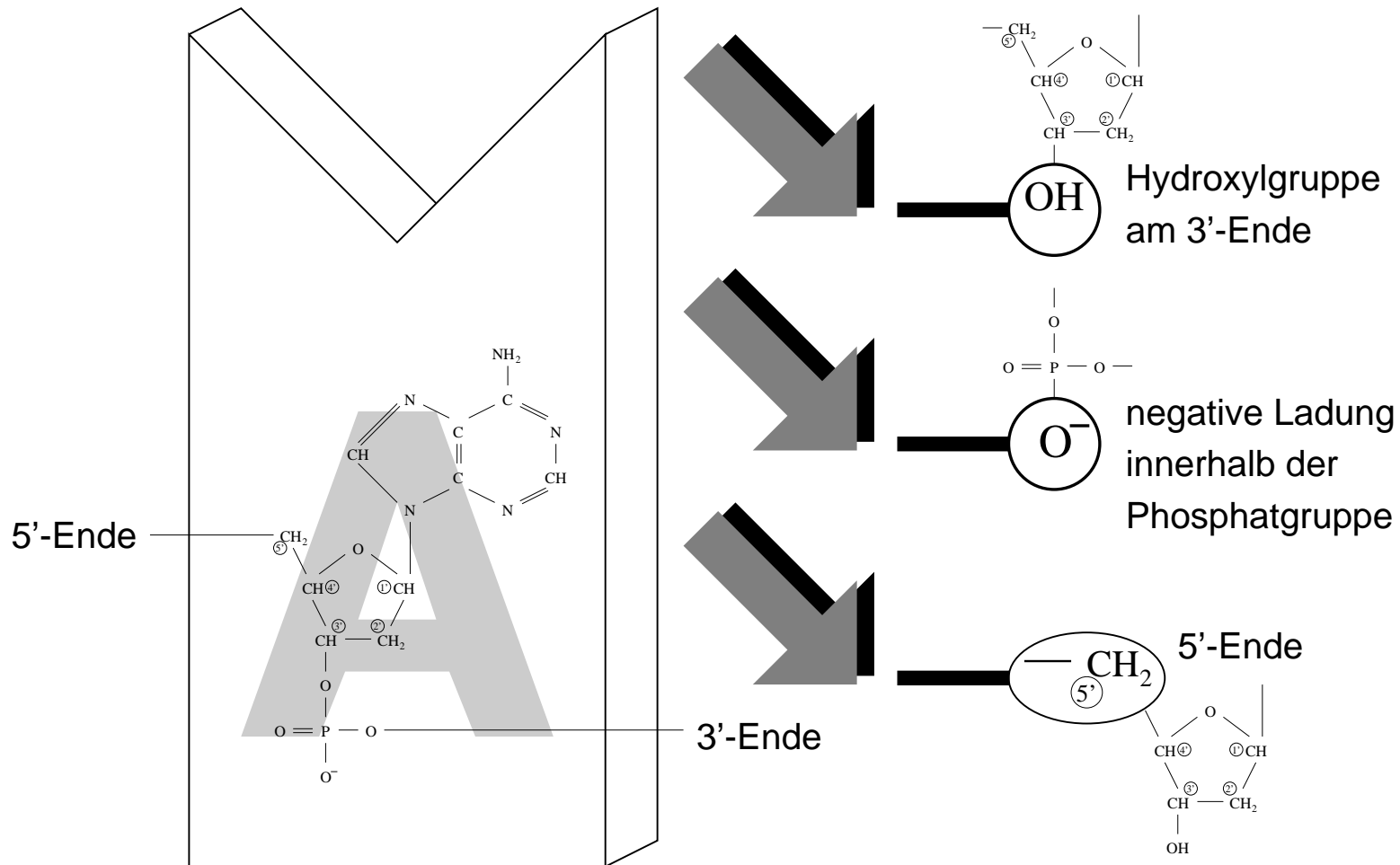
Meilensteine in der Molekularbiologie, Biochemie und Genetik

1869	Friedrich Mescher	Entdeckung der Nucleinsäuren
1913	Michaelis Menten	Theorie der Enzymkinetik
1939	Arne Tiselius	Prinzip der Gel-Elektrophorese
1944	Oswald T. Avery	Nucleinsäure als Träger der genetischen Information erkannt
1950	Erwin Chargaff	Das Verhältnis Adenin:Thymin und Guanin:Cytosin in DNA ist konstant
1953	James D. Watson, Francis H. Crick	Doppelhelixmodell der DNA
1958	Matthew Meselson, Franklin W. Stahl	DNA semikonservativ repliziert

Meilensteine in der Molekularbiologie, Biochemie und Genetik

1958	Arthur Kornberg	Isolation des Enzyms DNA-Polymerase I aus dem Bakterium <i>Escherichia coli</i>
1968	Werner Arber, Matthew Meselson	Entdeckung der Restriktionsendonucleasen
1970		Entdeckung der DNA-Ligase
1975	Walter Gilbert, Frederick Sanger	Sequenzierung von DNA
1975	R.L. Letsinger	Synthese von DNA
1985	Kary Banks Mullis	Polymerase-Kettenreaktion

DNA – Struktur, Aufbau, Eigenschaften, Begriffe



Nucleinsäuren

- im chemischen Sinne Polynucleotide
- aufgebaut aus heterozyklischen Basen, Kohlenhydrat und Phosphorsäure
- nach Art des Kohlenhydrats unterschieden:
 - Desoxyribonucleinsäuren (Desoxyribose als Kohlenhydrat)
 - Ribonucleinsäuren (Ribose als Kohlenhydrat)
- als Basen dienen:
 - bei DNA: Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin
 - bei RNA: Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil
- Begriff „Nuclein“: Komponente aus dem *Zellkern*
- Moleküle des Lebens

Chemische Struktur eines DNA-Einzelstranges

Begriffe:

Desoxyribose

Phosphatgruppe

Phosphodiesterbindung

negative Ladung

Purine (Doppelringbasen)

Pyrimidine (Einfachringbasen)

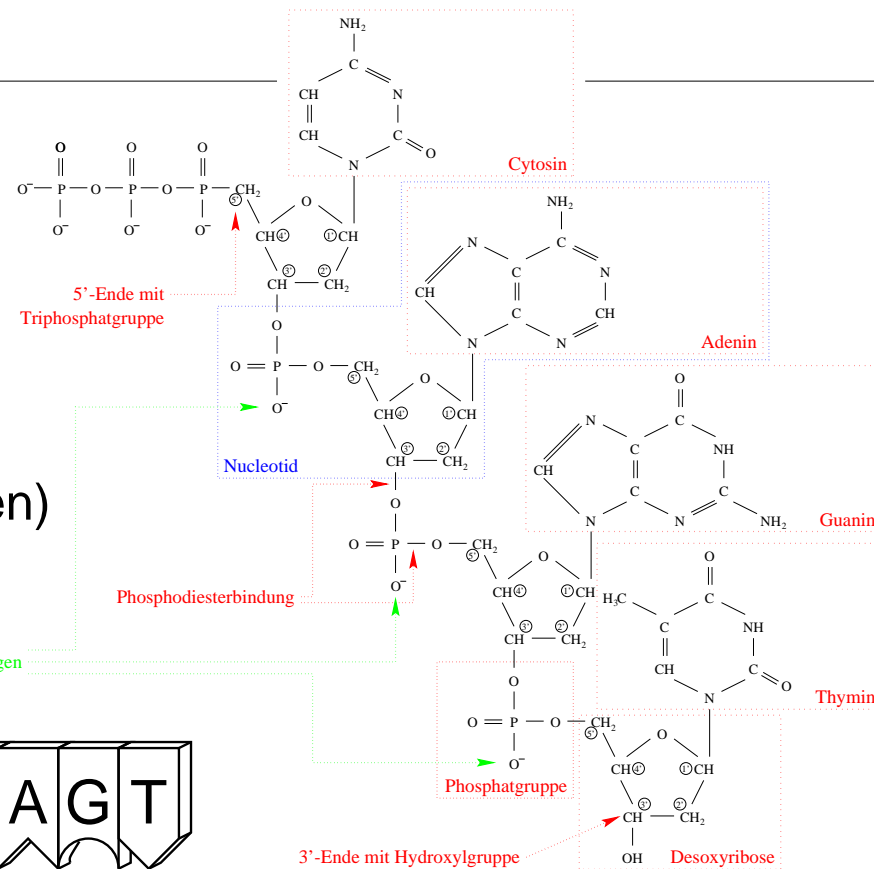
Nucleotid (A, C, G, T)

3'-Ende

5'-Ende

Hydroxylgruppe

Leserichtung



DNA-Einzelstrang

Definitionen:

DNA-Einzelstrang: Ein *DNA-Einzelstrang* ist eine Sequenz der Nucleotide A, C, G und T. Die Enden der Nucleotidsequenz werden mit 5' und 3' angegeben. Jedes der beiden DNA-Einzelstrangenden ist durch eine geeignete chemische Gruppe markiert.

sense: Die Leserichtung 5'-3' wird als *sense* bezeichnet.

antisense: Die Leserichtung 3'-5' wird als *antisense* bezeichnet.

Es ist üblich, Nucleotidsequenzen in 5'-3'-Richtung zu notieren.

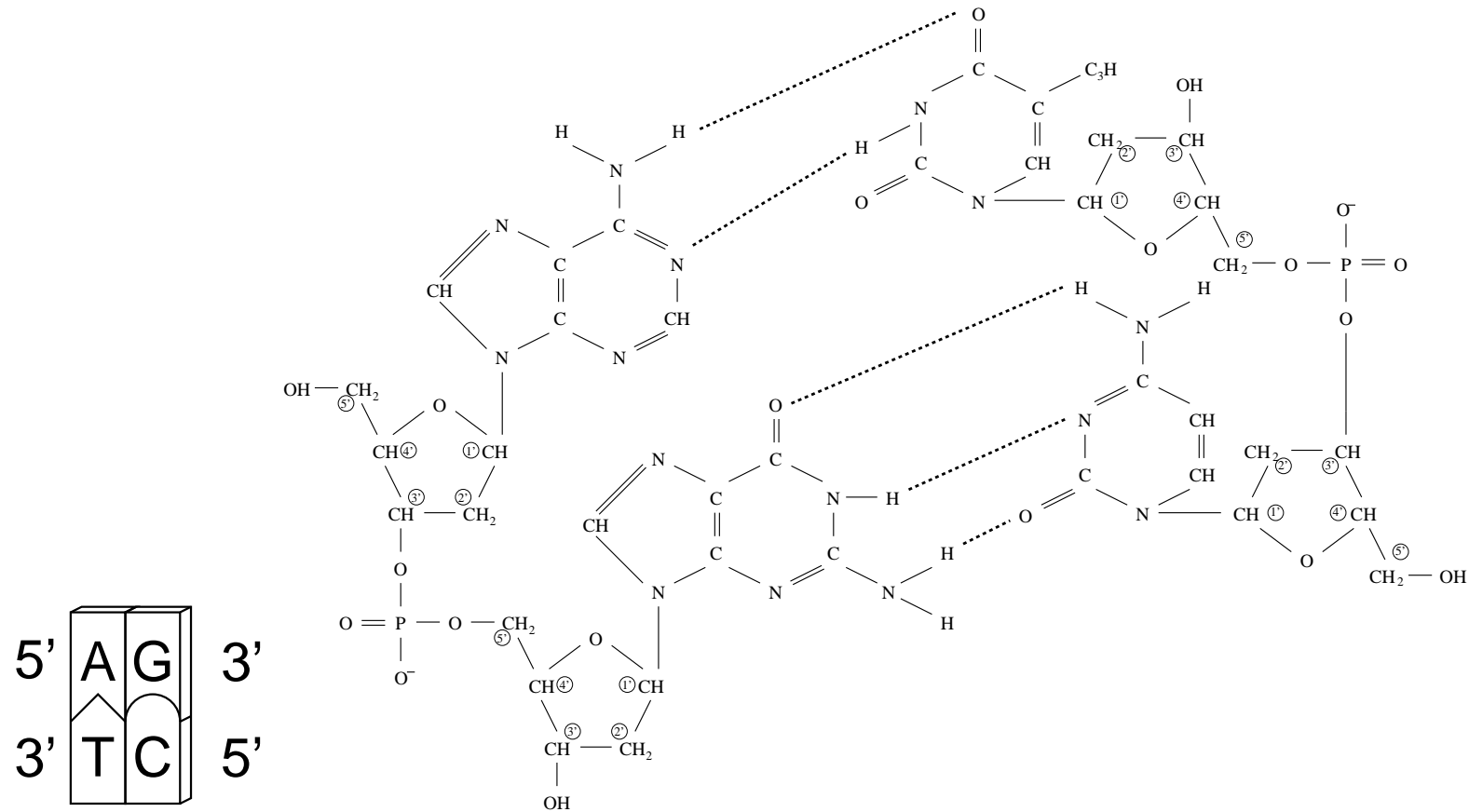
Basenpaarung durch Wasserstoffbrückenbindungen

Definition:

Wasserstoffbrückenbindung: ist eine chemische Bindung zwischen einem Proton (H^+) einer Hydroxylgruppe (-OH) oder HN-Gruppe und dem einsamen Elektronenpaar eines O-Atoms oder eines N-Atoms. Sie bildet sich aus, wenn die Gruppen sich auf eine Entfernung von $0,28nm$ nähern.

- Die Bindungsenergie beträgt nur $1/10$ der Hauptvalenzbindung.
- Basenpaarung kann zwischen benachbarter einzelsträngiger DNA auftreten.
- Dabei bilden sich zwischen je zwei gegenüberliegenden Basen Wasserstoffbrückenbindungen wie folgt aus:
- Adenin und Thymin können sich paaren (2 Wasserstoffbrücken).
- Cytosin und Guanin können sich paaren (3 Wasserstoffbrücken).

Chemische Struktur eines DNA-Doppelstranges



Komplementarität und Antiparallelismus

Definitionen:

Infolge der Möglichkeiten zur Basenpaarung:

Komplementarität von Nucleotiden: Die Nucleotide A und T sind zueinander *komplementär*, ebenso die Nucleotide C und G.

Nur komplementäre Nucleotide können sich über Wasserstoffbrückenbindungen zusammenlagern!

antiparallel: Zwei DNA-Einzelstränge, die entgegengesetzt ausgerichtet sind (ein Strang in 5'-3'-Richtung, der andere Strang in 3'-5'-Richtung), werden als *antiparallel* bezeichnet.

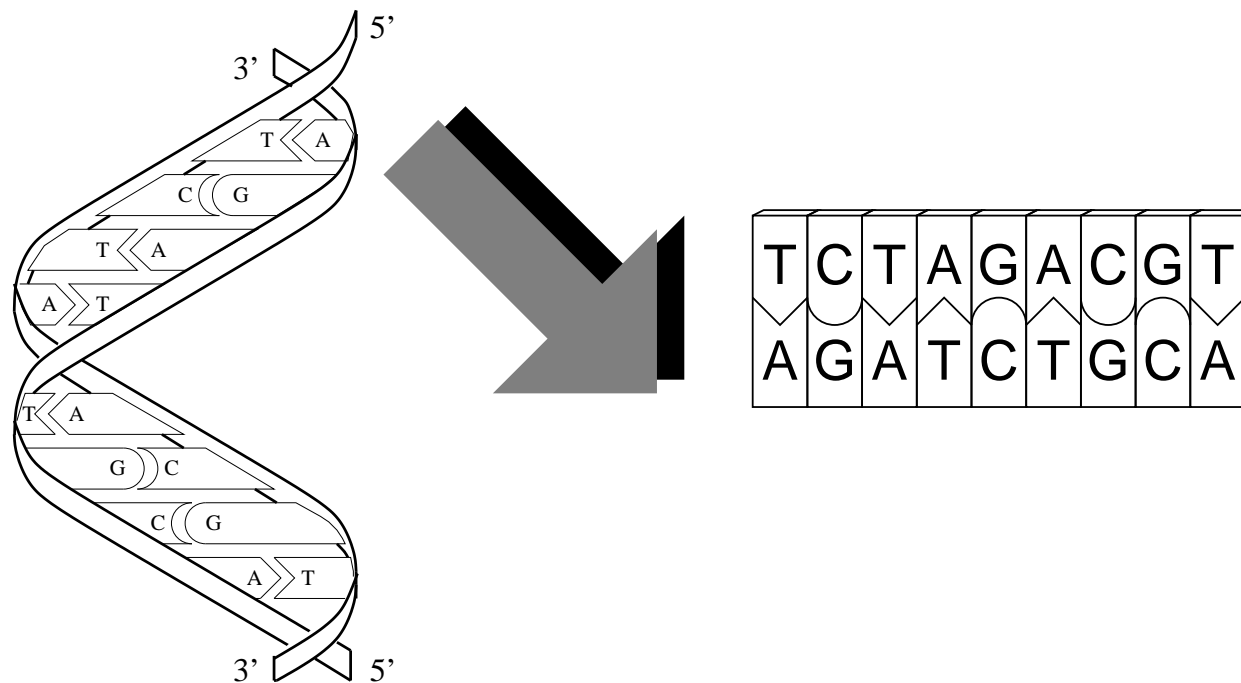
Vom DNA-Einzelstrang zum DNA-Doppelstrang

Basenpaarung bei kompletten Nucleotidsequenzen:

- *jede* Base des einen Stranges paart mit der gegenüberliegenden Base des anderen Stranges
- zweisträngiges Band komplementärer Nucleotide
- gegenüberliegende Stränge sind antiparallel
- gegenüberliegende Stränge zu einer Schraube gewunden
- eine Windung enthält 10 Basenpaare
- Struktur bezeichnet man als DNA-Doppelhelix
- → Kern des DNA-Modells von Watson/Crick

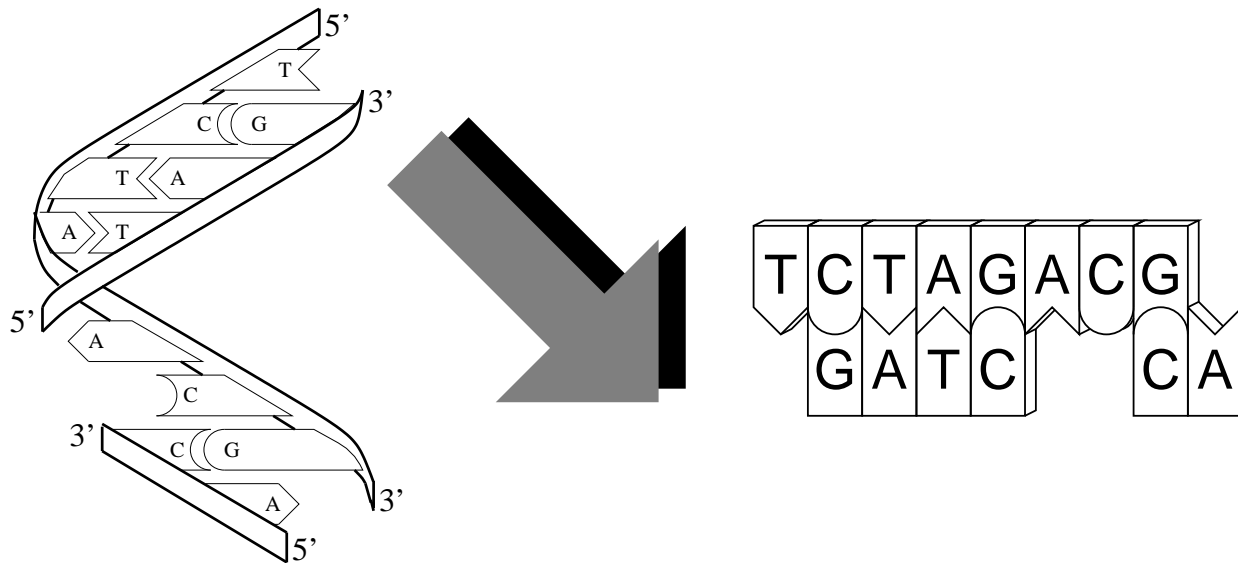
Struktur der DNA-Doppelhelix

- DNA in zelluaren Organismen zumeist als Doppelhelix
- komplementäre Nucleotide durch paßgeformte Bausteine dargestellt



Struktur der DNA-Doppelhelix

- durch die Möglichkeiten der in-vitro-Rekombinationstechnik muß der Begriff DNA-Doppelstrang weiter gefaßt werden
- Beispiel mit Einzelstrangüberhängen und -abschnitten:



DNA-Doppelstrang

Definition:

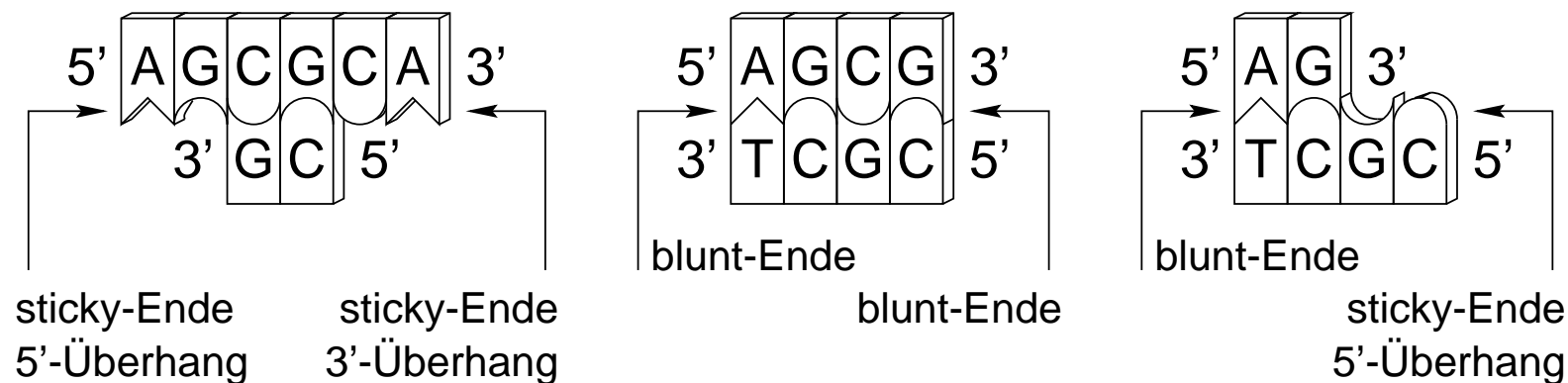
DNA-Doppelstrang: Ein *DNA-Doppelstrang* besteht aus mindestens zwei, jeweils in einer Nucleotidfolge komplementären sowie antiparallelen DNA-Einzelsträngen, die sich unter Bildung von Sequenzen komplementärer Nucleotidpaare verbunden haben. Die Nucleotidfolge reicht dabei bis zu einem Ende eines beteiligten DNA-Einzelstranges. Ein DNA-Doppelstrang läßt sich durch eine Sequenz komplementärer Nucleotidpaare beschreiben, die von Nucleotidsequenzen (DNA-Einzelstrangabschnitten), auch an den Strangenden, unterbrochen sein kann. Jeder integrierte DNA-Einzelstrang erzeugt ein 3'-5'-Endenpaar des DNA-Doppelstranges. Jedes der DNA-Doppelstrangenden ist durch eine geeignete chemische Gruppe markiert.

DNA-Doppelstrangenden

Definition:

blunt-Ende: Ein DNA-Doppelstrangende ist *blunt* (glatt), wenn es keinen Einzelstrangüberhang besitzt.

sticky-Ende: Ein DNA-Doppelstrangende ist *sticky* (klebrig), wenn es einen Einzelstrangüberhang besitzt. Dabei können sowohl das 3'-Ende als auch das 5'-Ende überhängen.



Eigenschaften von DNA-Strängen

im Hinblick auf ihre Nutzung als Datenträger im DNA-Computing

Speicherdichte: bis zu 10^{21} Basenpaaren pro Liter, das entspricht etwa 1 bit pro nm^3 . DNA durch gewundene Struktur sehr kompakt

Langlebigkeit: DNA unter geeigneten Bedingungen beliebig lange konservierbar, deshalb auch Eignung als persistentes Speichermedium

redundante, dezentrale, verlustsichere Informationsspeicherung: DNA leicht millionenfach duplizierbar und auf mehrere Reagenzgläser verteilbar

In-vitro-Handling: DNA auch außerhalb von Zellen generierbar, verarbeitbar und konservierbar

energieeffiziente Verarbeitung: etwa $2 \cdot 10^{19}$ Operationen pro Joule

Eigenschaften von DNA-Strängen

im Hinblick auf ihre Nutzung als Datenträger im DNA-Computing

Operationsspektrum: Vielzahl von Rekombinationstechniken, großes Repertoire an molekularbiologischen Operationen

richtungsbehaftet: erleichtert Kodierung und Dekodierung von Daten in DNA-Sequenzen

elektrisch negativ geladen: Anwendung elektrophoretischer Analysemethoden

Instrumentarium zur Kodierung und Visualisierung von DNA-Daten:
Synthese und Sequenzierung möglich

umweltfreundlich: keine aufwendig zu entsorgenden Nebenprodukte wie z.B. bei Elektronikschrott

Molekularbiologische Operationen für das DNA-Computing

Allgemeine Grundsätze:

in vitro: Reaktionen zumeist im Reagenzglas (Reaktionsgefäß, Tube) ausgeführt und nicht in der lebenden Zelle

Dilution (Verdünnung): DNA in wässriger Lösung bestimmter DNA-Konzentration (Molarität, $\frac{mol}{l}$) zur Reaktion bereitgestellt

Redundanz: jeder DNA-Strang in sehr vielen identischen Kopien vorhanden

vollständiger Ablauf: jede Reaktion wirkt idealerweise auf alle DNA-Stränge im Reagenzglas

Reinheit des Ansatzes: idealerweise keine Verunreinigungen durch Fremdstoffe und Reste vorangegangener Reaktionen

Abarbeitungsprotokoll: beschreibt die praktische Ausführung der Reaktion reproduzierbar unter Erfassung aller kontrollierbaren Einflußgrößen

Einflußgrößen molekularbiologischer Operationen (Auswahl)

Reaktionen sind parameterbehaftet!

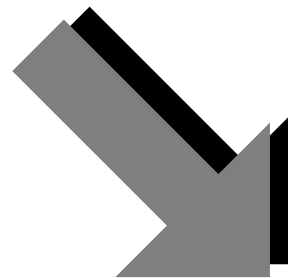
- Ausgangsstoffe und ihre Konzentrationen
- Reihenfolge und Zeitpunkte ihrer Zusammenführung
- Temperatur-Zeit-Verlauf des Reaktionsansatzes
- Inkubationszeiten des Reaktionsansatzes
- pH-Wert, Luftfeuchtigkeit, elektrische Größen
- äußere Kräfte und ihr Verlauf (Vortexen, Zentrifugieren, Schütteln, Durchmischen mit Pipette, Ruhelage)
- ...

Es gibt auch sehr viele unkontrollierbare Einflußgrößen, die die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen (Seiteneffektanfälligkeit)!

Synthesis

- Synonyme: Synthese

5' -ACGGAAC- 3'

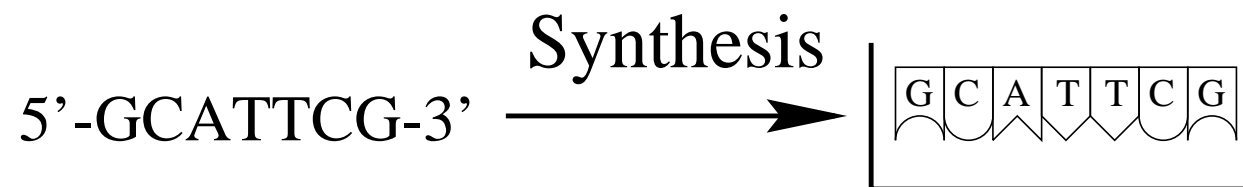


- Generieren von DNA-Einzelsträngen

Synthesis

Definition:

Synthesis, Synthese: Unter *Synthesis* versteht man das Erzeugen von DNA-Einzelsträngen (Oligonucleotiden) frei wählbarer Nucleotidsequenz.



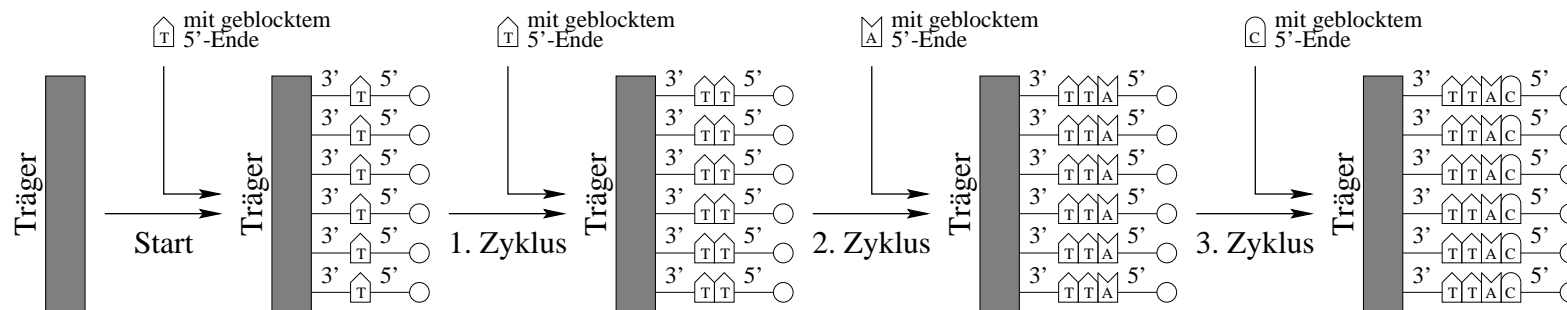
Synthesis – biochemischer Prozeß

- synthetisches Herstellen von DNA-Einzelsträngen beliebiger Sequenz bis etwa 100 Basen Länge in hoher Reinheit ($< 5\%$ fehlerhafte Stränge) möglich
- etabliert: Methode nach Letsinger, erstveröffentlicht 1975
- inzwischen vollautomatisiert
- Durchsatz: etwa 20 Basen in 24 Stunden („wachsende Kette“)

DNA-Einzelstrangsynthese nach Letsinger

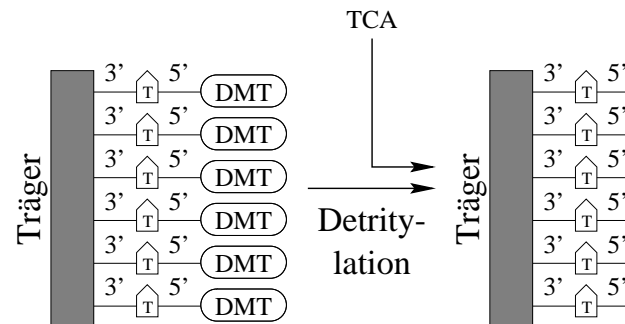
- Synthese in 3'-5'-Richtung
- Prinzip der wachsenden Kette:
 - fixiert an einen Träger wird der Strang beginnend am 3'-Ende zyklisch Nucleotid für Nucleotid aufgebaut
 - zum Anfügen eines neuen Nucleotids wird ein Zyklus durchlaufen, bestehend aus vier Schritten (Detritylation, Coupling, Capping und Oxidation)

5'-CATT-3'



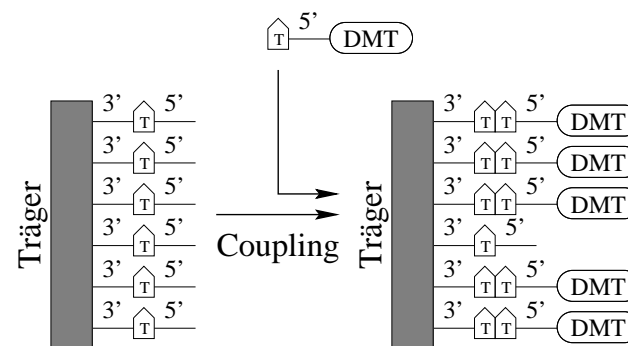
Zyklus 1. Schritt – Detritylation

- 5'-Ende jeder wachsenden Kette ist mit einer Dimethoxytrityl-Gruppe (DMT) geblockt, damit sich in jedem Zyklus an jede Kette nur ein neues Nucleotid anfügen kann und nicht mehrere
- Detritylation: 5'-DMT durch Trichloracetic acid (TCA) abgespaltet und ausgeschwemmt
- Jede wachsende Kette hat danach ein freies 5'-Ende (Hydroxylgruppe)



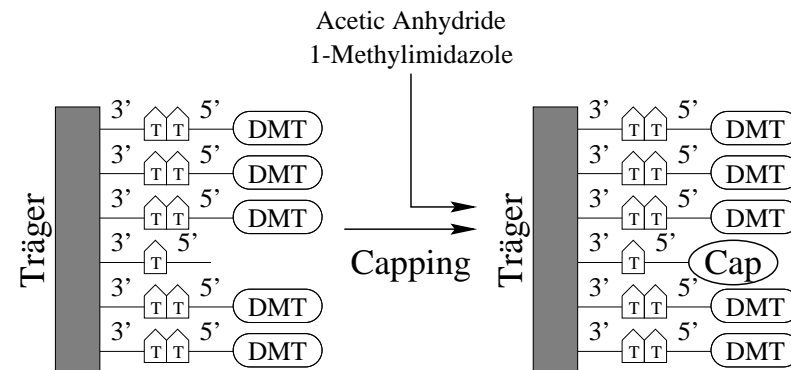
Zyklus 2. Schritt – Coupling

- Anfügen eines neuen, 5'-DMT-geblockten Nucleotids unter Hinzugabe von Tetrazol
- An manche freien 5'-Enden lagert sich kein neues Nucleotid (unerwünschter Nebeneffekt)!



Zyklus 3. Schritt – Capping

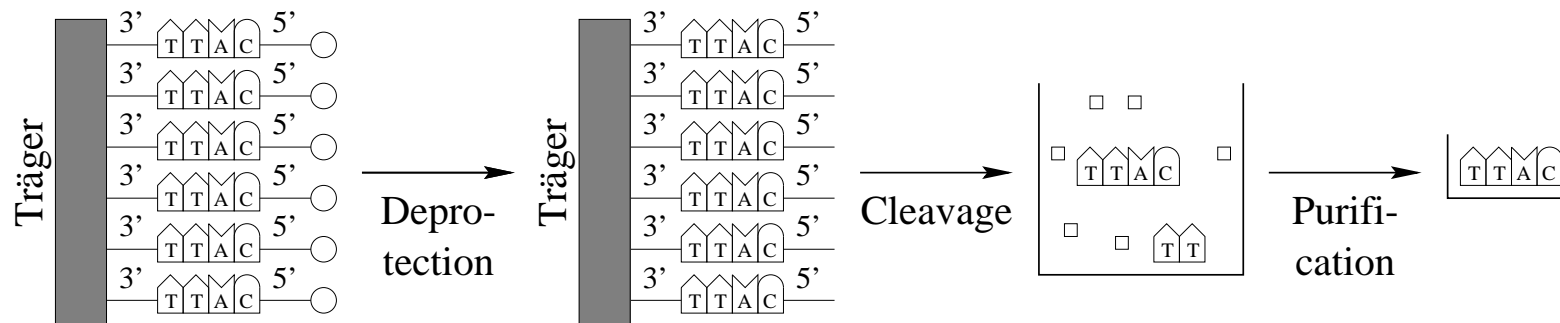
- Die beim Coupling freigebliebenen 5'-Enden werden chemisch deaktiviert, damit sich dort in keinem nachfolgenden Zyklus noch Nucleotide anfügen können.
- Die betreffenden Ketten sind damit als DNA-Einzelstränge verloren (Abfallprodukt).



DNA-Einzelstrangsynthese nach Letsinger

- nach Aufbau der Kette:
 - chemisches Entblocken des 5'-Endes (Deprotection)
 - Ablösen der DNA-Einzelstränge vom Träger (Cleavage)
 - Entfernen zu kurzer DNA-Einzelstränge und von Reaktionsresten (Purification)

5'-CATT-3'

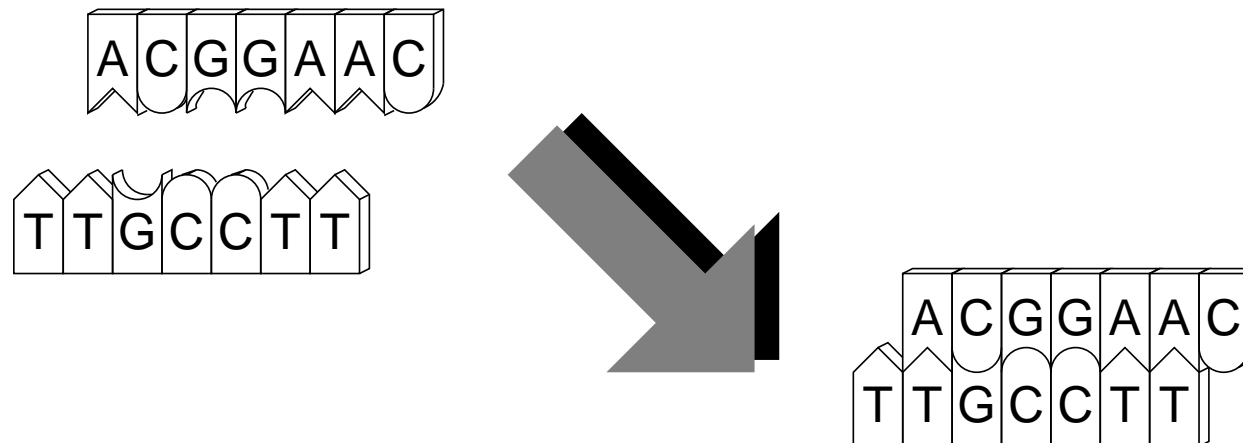


Synthesis – mögliche Seiteneffekte im Labor

- fehlerhafte (insbesondere zu kurze) DNA-Einzelstränge überdauern die Purification
- Verunreinigungen durch die verwendeten Chemikalien verbleiben in der DNA-Lösung
- die DNA-Konzentration ist sehr niedrig, so daß nicht genügend DNA-Material für Folgereaktionen zur Verfügung steht (überprüfbar mittels Spektroskopie)

Annealing

- Synonyme: Hybridisieren, Erstarren

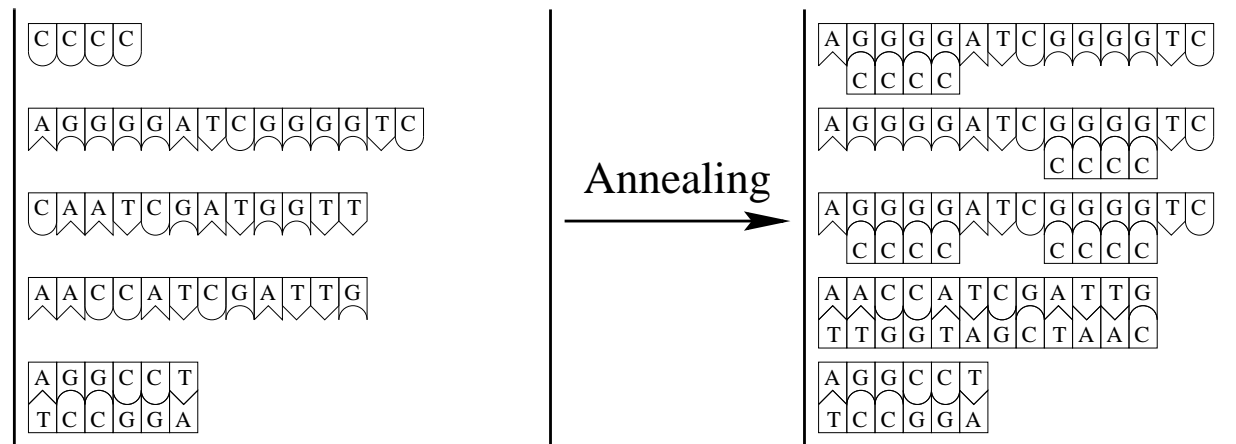


- Zusammenlagern von DNA-Einzelsträngen zu DNA-Doppelsträngen

Annealing

Definition:

Annealing, Hybridisieren: Unter *Annealing* versteht man das Zusammenlagern von mindestens zwei antiparallelen und komplementären DNA-Einzelsträngen oder Einzelstrangüberhängen zu DNA-Doppelsträngen unter fortgesetzter Bildung aller Anlagerungsmöglichkeiten.



Annealing – biochemischer Prozeß

- Beim Annealing bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen (hydrogen bonds) zwischen den gegenüberliegenden komplementären Nucleotiden aus. Diese Bindungen halten die DNA-Einzelstränge zusammen.
- Je höher der CG-Anteil in einem DNA-Doppelstrang ist, umso stabiler ist er.
- Wasserstoffbrückenbindungen sind thermisch instabil.
- Jeder DNA-Doppelstrang besitzt eine spezifische Schmelztemperatur, unterhalb derer sich die Wasserstoffbrücken ausbilden und oberhalb derer sie aufbrechen.
- D.h. Annealing (Erstarren) als langsamer Abkühlungsprozeß

Annealing – ein mögliches Laborprotokoll

1. zu annealende DNA-Einzelstränge in Reinstwasser lösen (bzw. auftauen und verdünnen) und in gleicher DNA-Konzentration in ein gemeinsames Reagenzglas überführen
 - Richtwert für Endkonzentration: $K_{DNA} = 0,25\mu M$
2. einfach geladene Kationen hinzugeben
 - Ziel: Erhöhung der Schmelztemperatur
$$T_{m,^{\circ}C} = 81,5 + 16,6 \cdot \ln(K_{+,M}) + 0,58 \cdot \%GC - 500/L$$
 - $\%GC$: prozentualer GC-Anteil, L : (kürzeste) DNA-Einzelstranglänge in Basen, Einheit $M = \frac{mol}{l}$ (Molarität)
 - i.a. NaCl oder KCl verwendet
 - Richtwert für Endkonzentration: $K_{+} = 50mM$

3. für etwa 10min bei $+94^{\circ}\text{C}$ halten

- Ziel: kinetische Energie der Teilchen erhöhen, damit sie sich neu formieren und während der Abkühlung binden können

4. langsam abkühlen auf Raumtemperatur

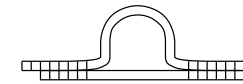
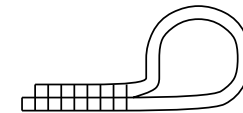
- Richtwert: $15 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{h}}$

5. bei -20°C tiefrieren

- Ziel: Konservierung des Reaktionsproduktes

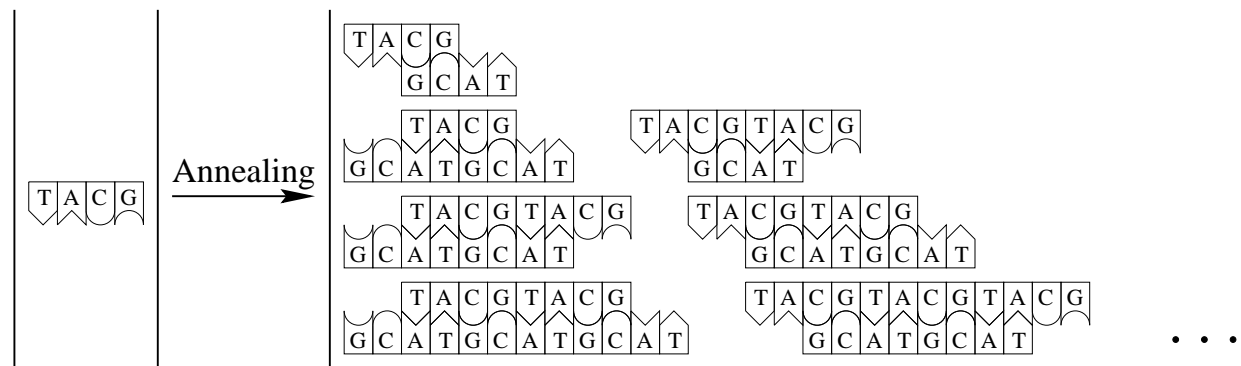
Annealing – mögliche Seiteneffekte im Labor

- DNA-Einzelstränge lagern sich nicht an allen komplementären Stellen zusammen, es entstehen Hairpins und Loops:
 - Hairpins: DNA-Einzelstränge annealen mit sich selbst
 - Loops: Verwerfungen
- Nach dem Annealing verbleiben ungebundene DNA-Einzelstränge zurück.
 - Die Konzentrationen der zu annealenden DNA-Einzelstränge waren nicht exakt aufeinander abgestimmt.
- Die gebildeten DNA-Doppelstränge sind nicht stabil.
 - Bei zu niedriger Schmelztemperatur können Doppelstränge leicht wieder in ihre Einzelstrangbestandteile zerfallen (Melting), wodurch andere biochemische Reaktionen beeinflusst werden.



Annealing – Sonderfälle

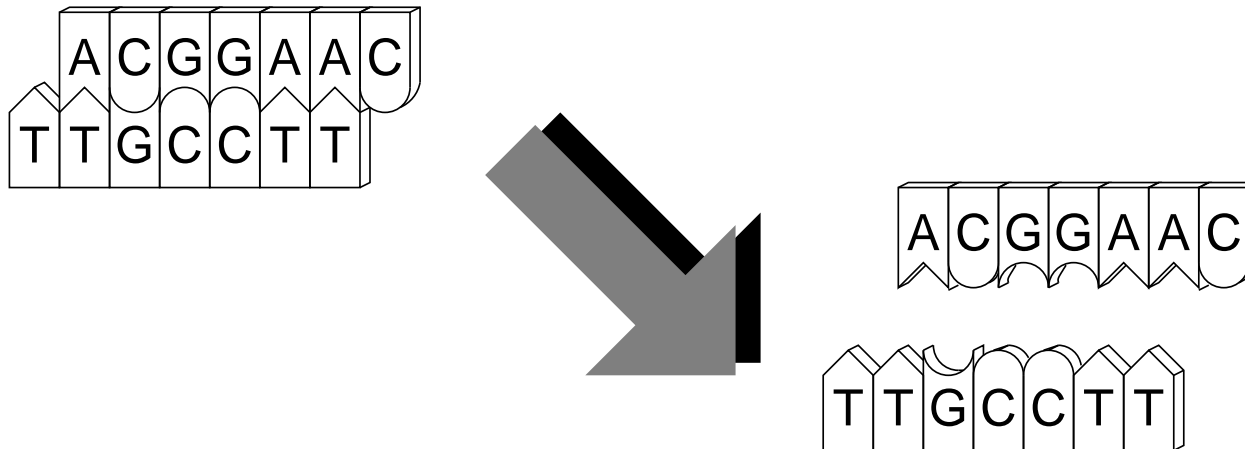
Durch Annealing können unendlich viele unterschiedliche DNA-Doppelstränge entstehen:



Daraus folgt die Notwendigkeit einer Längenbegrenzung bei der Simulation!

Melting

- Synonyme: Denaturieren, Schmelzen

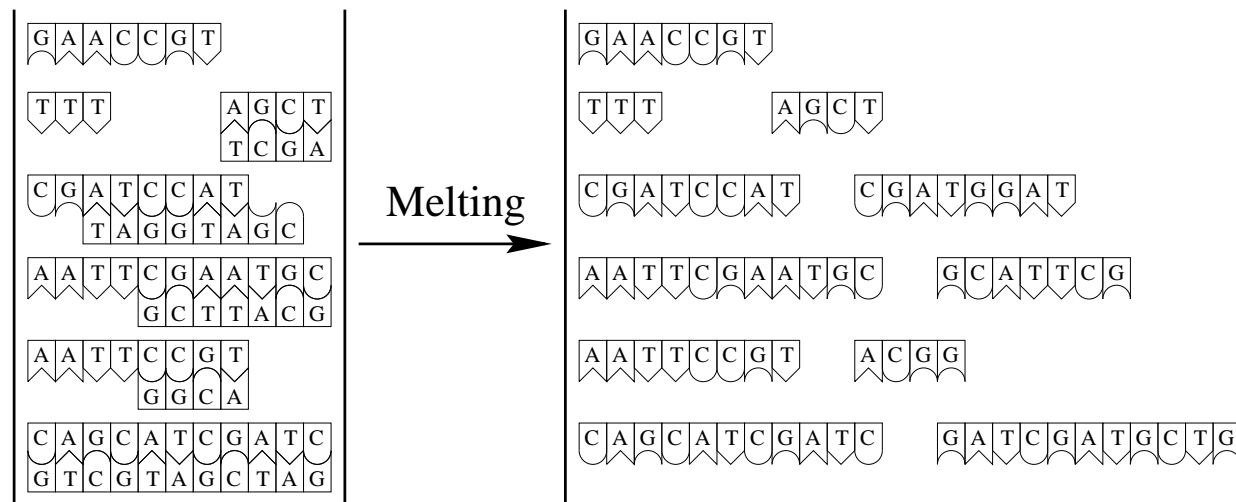


- Aufspalten von DNA-Doppelsträngen in DNA-Einzelstränge

Melting

Definition:

Melting, Denaturieren: Unter *Melting* versteht man das Aufspalten von DNA-Doppelsträngen in die zugrundeliegenden DNA-Einzelstränge.



Melting – biochemischer Prozeß

- Beim Melting werden die Wasserstoffbrückenbindungen (hydrogen bonds) zwischen den gegenüberliegenden komplementären Nucleotiden von DNA-Doppelsträngen aufgebrochen.
- Je höher der CG-Anteil in einem DNA-Doppelstrang ist, umso stabiler ist er.
- Wasserstoffbrückenbindungen sind thermisch instabil.
- Jeder DNA-Doppelstrang besitzt eine spezifische Schmelztemperatur, unterhalb derer sich die Wasserstoffbrücken ausbilden und oberhalb derer sie aufbrechen.
- D.h. Melting als Erhitzungsprozeß

Melting – ein mögliches Laborprotokoll

1. DNA-Stränge in Reinstwasser lösen (bzw. auftauen und verdünnen)
 - Richtwert für Endkonzentration: $K_{DNA} = 0,25\mu M$
2. für etwa $10min$ bei $+94^{\circ}C$ halten
 - Ziel: Erhitzung auf eine Temperatur, die mit Sicherheit oberhalb der Schmelztemperatur liegt und die DNA-Stränge nicht schädigt.
3. abkühlen auf eine Temperatur oberhalb der Schmelztemperatur

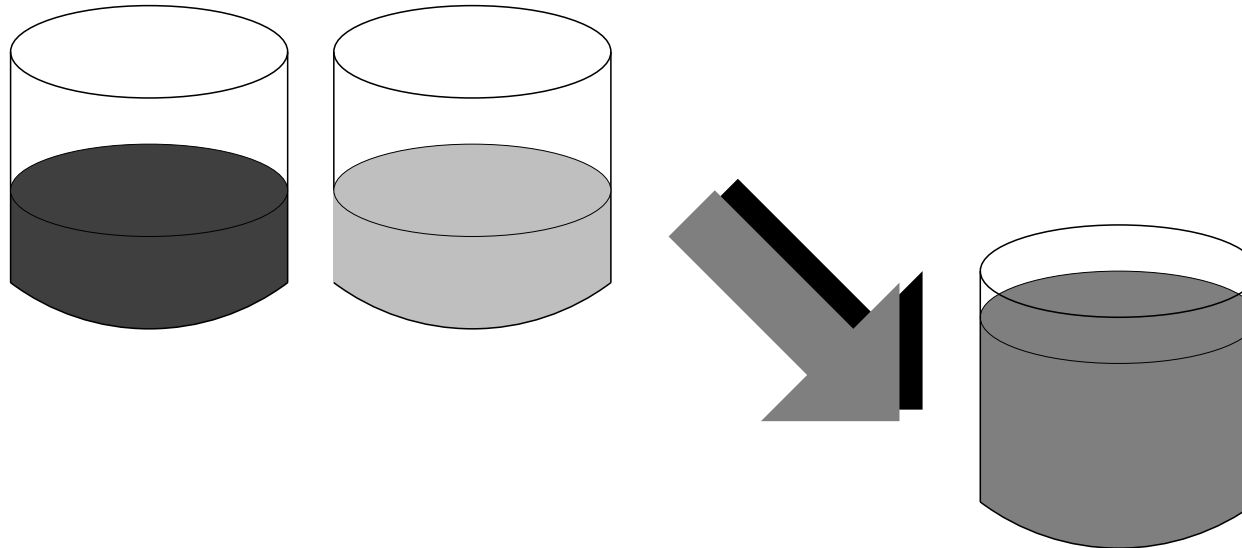
„Alternativ zum Erhitzen besteht auch die Möglichkeit, DNA-Doppelstränge zu denaturieren, indem man sie alkalischen Bedingungen (hoher pH-Wert im Reagenzglas) aussetzt. Eventuell nachfolgende enzymatische Reaktionen können jedoch i.a. in einem solchen pH-Milieu nicht stattfinden, so daß das Denaturieren über eine Temperaturerhöhung für den Einsatzzweck DNA-Computing geeigneter erscheint.“

Melting – mögliche Seiteneffekte im Labor

- Die Reaktion kann unvollständig ablaufen, wodurch DNA-Doppelstrangabschnitte mit gespleißten Enden oder Loops zurückbleiben.
- Bereits bei geringfügiger Abkühlung können DNA-Einzelstränge an bestimmten Stellen wieder hybridisieren.

Union

- Synonyme: Merge, Mix, Pour, Mischen, Vereinigen

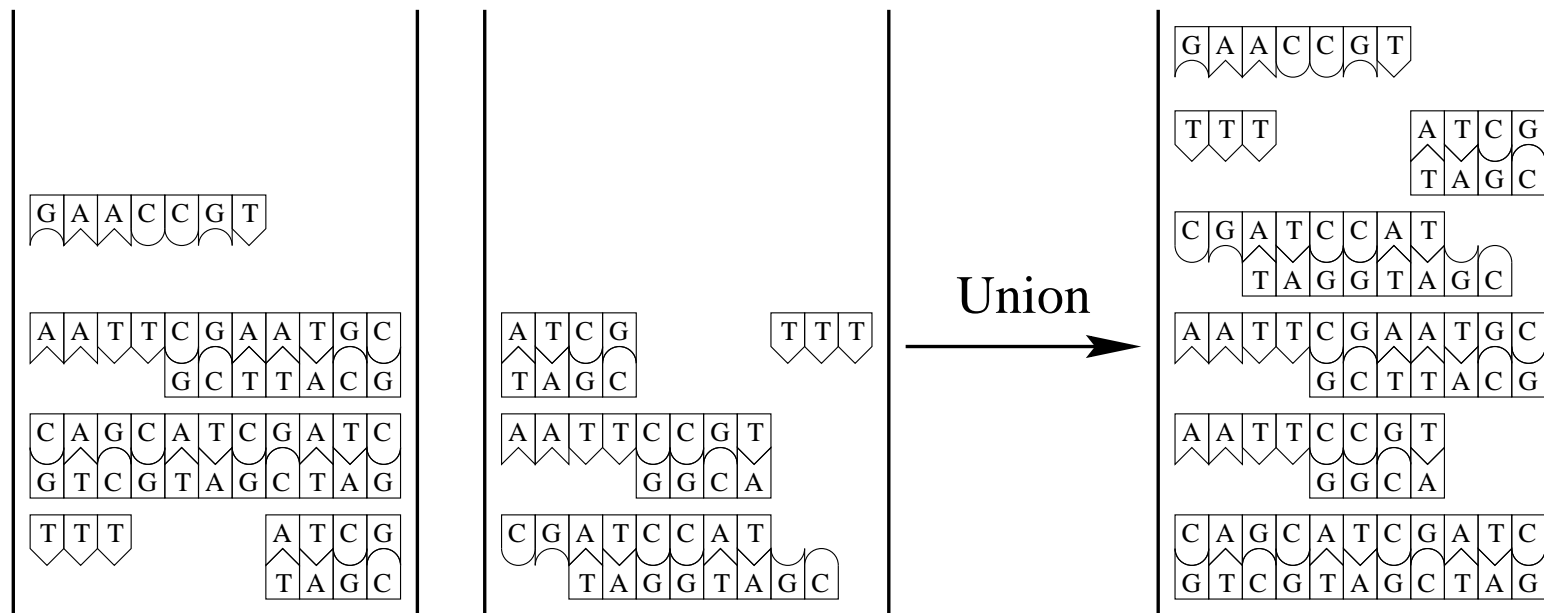


- Vereinigen von Reagenzglasinhalten

Union

Definition:

Union, Vereinigen: Unter *Union* versteht man das Zusammenführen mehrerer Reagenzglasinhalte in ein gemeinsames Reagenzglas.



Union – biochemischer Prozeß

- Bei der Operation Union wird die in Reinstwasser gelöste DNA aus verschiedenen Reagenzgläsern miteinander vermischt.
- Die Operation ist in diesem Sinne keine chemische Reaktion, da keine Bindungen umgebaut werden, sondern ein physikalischer Prozeß.
- Es ist zu gewährleisten, daß die DNA-Lösungen vorsichtig, aber gründlich durchmischt werden, um Clusterbildungen auszuschließen.

Union – ein mögliches Laborprotokoll

1. DNA-Stränge in jedem Eingangsreagenzglas gesondert in Reinstwasser lösen (bzw. auftauen und verdünnen)
2. leeres steriles Reagenzglas bereitstellen
3. Inhalt jedes Eingangsreagenzglases vollständig mit einer Pipette aufsaugen und in das bereitgestellte Reagenzglas geben
4. Inhalt des bereitgestellten Reagenzglases mit der Pipette durchmischen (mehrmaliges Hoch- und Runterziehen)
5. Inhalt des bereitgestellten Reagenzglases bei $-20^{\circ}C$ tiefrieren

Union – mögliche Seiteneffekte im Labor

- Es bleiben DNA-Reste in den Eingangsreagenzgläsern zurück, wodurch sich die DNA-Konzentration im Ergebnisreagenzglas verringert.
- Verunreinigungen eines einzelnen Eingangsreagenzglases kontaminieren das gesamte Ergebnisreagenzglas.
- DNA-Clusterungen im Reagenzglas können dazu führen, daß nachfolgende enzymatische Reaktionen unvollständig und ineffizient ablaufen.

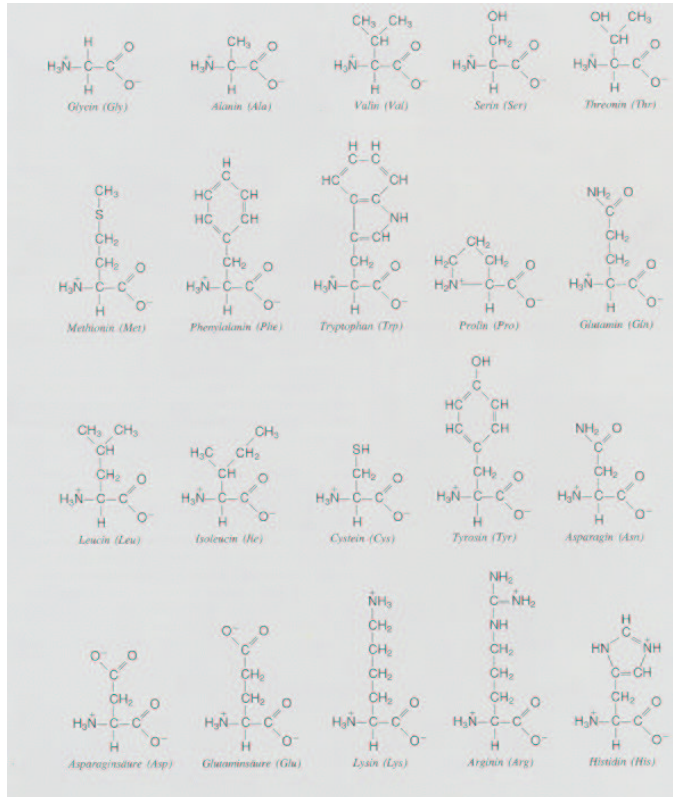
Enzymatische Reaktionen – eine Einführung

- Enzyme gelten als „Katalysatoren des Lebens“ (Biokatalysatoren).
- bestimmte Reaktionen – insbesondere in lebenden Zellen – durch Enzyme milliardenfach beschleunigt; Grundlage für Lebensvorgänge
- Begriff „Enzym“ vom griechischen Wort für Sauerteig abgeleitet
- Vielzahl von Enzymen bekannt, nach ihrer Wirkung klassifiziert (EC)
- Jedes Enzym katalysiert eine bestimmte biochemische Reaktion, geht jedoch selbst unverändert aus der Reaktion hervor.
- chemische Struktur und Wirkungsweise vieler Enzyme aufgeklärt

Was sind Enzyme?

- Fast alle Enzyme sind Proteine, im chemischen Sinne Polypeptidketten.
- Proteine bestehen aus einer Kette von Aminosäuren, deren Glieder über Amino- und Carboxylgruppen verbunden sind.
- Man unterscheidet 20 Aminosäuren als Bausteine.
- Jede dieser Aminosäuren besitzt durch ihre Seitenketten spezifische chemische Eigenschaften.

Aminosäuren und ihre Eigenschaften



Dressler D., Potter H.: Katalysatoren des Lebens: Struktur und Wirkung von Enzymen. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, New York, 1992

Aminosäure-Bausteine und ihre Eigenschaften

hydrophob

- wasserabstoßend, fixiert Aminosäure-Bausteine

Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin

Aminosäuren mit Hydroxylgruppen

- können Wasserstoffbrückenbindungen bilden

Serin, Threonin

Aminosäuren mit Kohlenwasserstoffringen

- ermöglichen bestimmte räumliche Proteinstrukturen

Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan

Aminosäuren mit einer positiven oder negativen Ladung

- können Ionenbindungen eingehen; Protonenaustausch

Lysin, Arginin, Histidin

Derivate von Asparaginsäure und Glutaminsäure

- können Wasserstoffbrückenbindungen unterschiedlicher Stärke bilden

Asparagin, Glutamin

Schwefelhaltige Aminosäuren

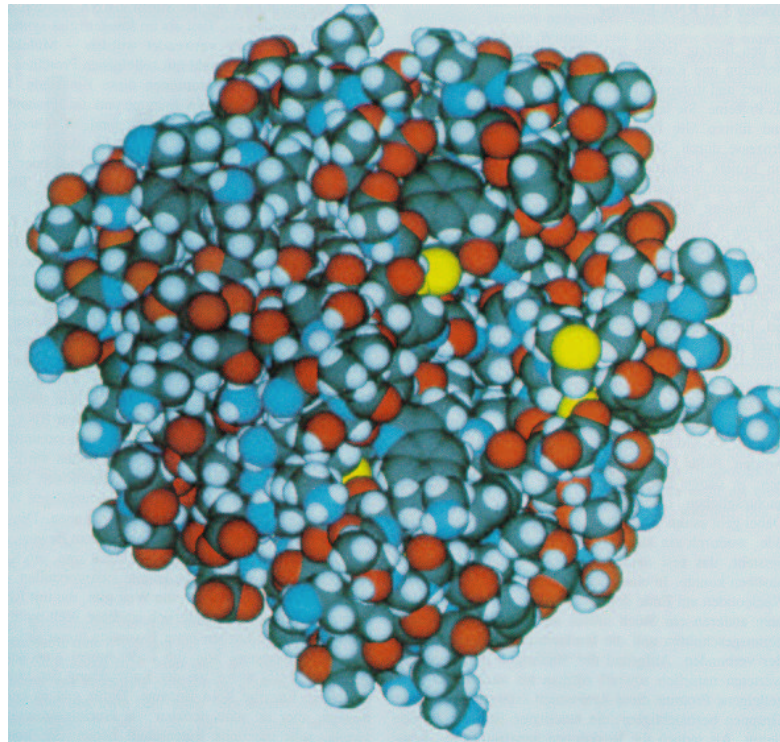
- können über Disulfidbrücken kovalente Bindungen ausbilden

Methionin, Cystein

Aufbau von Proteinen

- Ein Protein kann mehr als 1000 Aminosäuren enthalten.
- Jedes Protein ist bestimmt durch seine Aminosäuresequenz und durch die dreidimensionale Faltung der Kette, hervorgerufen durch mannigfaltige Bindungen der Aminosäure-Seitenketten und des Kettenrückgrats untereinander:
- Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen, kovalente Bindungen, verschiedene Wechselwirkungen
- Die Faltung verleiht dem Protein eine charakteristische dreidimensionale Oberflächenstruktur aus einem Muster an Eindellungen, Rillen, Taschen, Höhlungen usw.

Kalottenmodell des Enzyms Chymotrypsin (Verdauungsenzym)



Dressler D., Potter H.: Katalysatoren des Lebens: Struktur und Wirkung von Enzymen. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, New York, 1992

Wie wirken Enzyme?

Prinzip von „Schlüssel und Schloß“

- Ein Teil der Enzymoberfläche ist komplementär zum Substratmolekül (z.B. DNA!) geformt.
- Enzym kann an das Substratmolekül andocken und es eng umschließen.
- Herausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes
- eigentliche Reaktion: eine chemische Bindung des Substratmoleküls aufbrechen und schrittweise umordnen
- dazu Aktivierungsenergie erforderlich

Wie wirken Enzyme?

- katalytische Wirkung heißt:
 - Aktivierungsenergie herabsetzen und/oder
 - Energie der Substratmoleküle erhöhen
- Enzyme senken die Aktivierungsenergie durch ihre Fähigkeit zum Protonenaustausch (freie H^+ -Ionen oder OH^- -Ionen; erzwingt bestimmten pH-Wert).
- bestimmte Aminosäuren des Enzyms in unmittelbarer Nähe der umzubauenden Substratbindung (aktives Zentrum)
- Seitenketten der Aminosäuren im aktiven Zentrum ermöglichen Protonenaustausch
- zusätzlich durch Schlüssel-Schloß-Prinzip die Reaktionspartner zielgerichtet zusammengeführt; Reaktion nicht auf zufällige Zusammenstöße angewiesen

Wie wirken Enzyme?

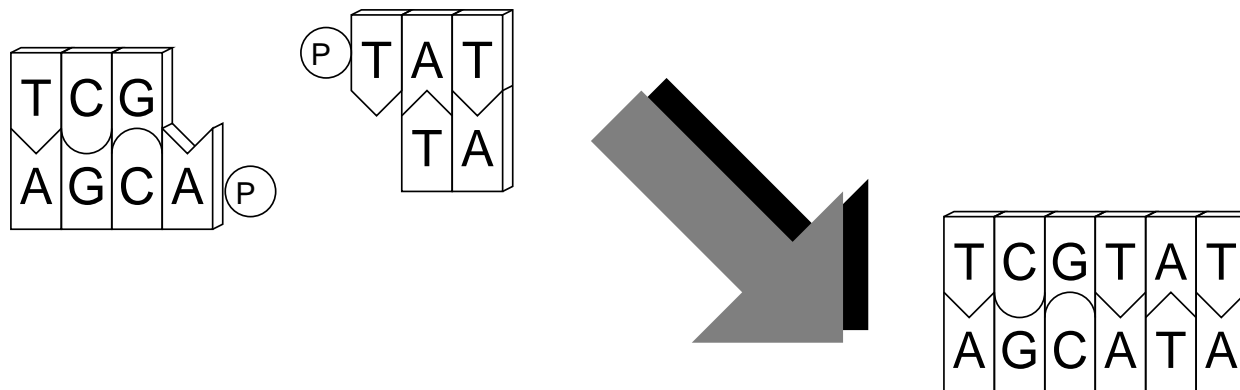
- Enzym-Substrat-Komplex \longrightarrow Enzym-Produkt-Komplex
- Enzym löst sich wieder vom Substrat ab (Dissoziation) und
- steht für die Katalyse einer gleichartigen Reaktion an einem anderen Substratmolekül zur Verfügung

Eigenschaften von Enzymen

- Oberflächenstruktur von Enzymen angepaßt an bestimmte Wirktemperatur und pH-Wert (maximale Aktivität)
- Temperatur- oder pH-Wert-Abweichungen können die Oberflächenstruktur von Enzymen verändern oder gar zerstören (Entfaltung der Polypeptidkette).
- Daraus folgt:
 - Zugabe von Puffersubstanzen zur Einstellung des optimalen pH-Wertes
 - Inkubationstemperatur der Reaktion durch Enzym bestimmt
 - thermische Deaktivierung (Zerstörung) des Enzyms möglich nach Abschluß der Reaktion, um Einfluß des Enzyms auf Folgereaktionen so gering wie möglich zu halten

Ligation

- Synonyme: Concatenate, Verketteten



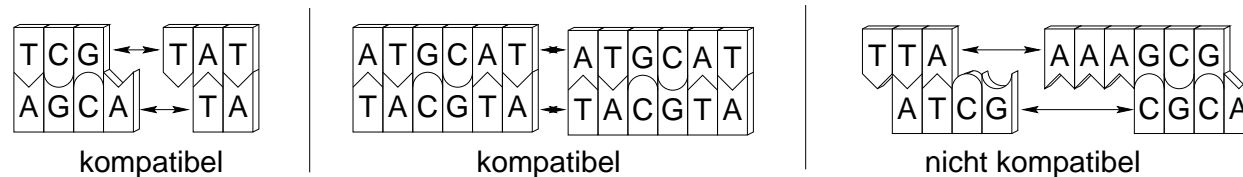
- Verketteten von DNA-Doppelsträngen

Ligation

Definitionen:

Kompatibilität von DNA-Doppelsträngenden: Zwei sticky-Enden von DNA-Doppelsträngen sind *kompatibel*, wenn die Einzelstrangüberhänge beider Stränge über ihre gesamte Länge antiparallel komplementär sind. Blunt-Enden von DNA-Doppelsträngen sind generell zueinander *kompatibel*.

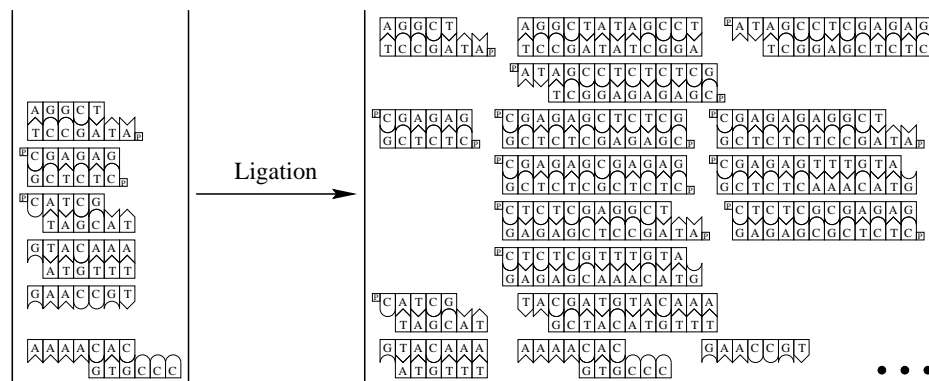
5'-Phosphorylierung eines DNA-Strangendes: *5'-Phosphorylierung* bedeutet, daß das betreffende 5'-DNA-Strangende mit einer Phosphatgruppe markiert ist.



Ligation

Definition:

Ligation: Unter *Ligation* versteht man eine biochemische Reaktion, bei der DNA-Doppelstränge mit kompatiblen Enden und mindestens einer 5'-Phosphorylierung an diesen kompatiblen Enden fortgesetzt miteinander verkettet werden. Es werden alle möglichen Endenpaare, auch von Zwischenprodukten, in die Reaktion einbezogen. Die Reaktion wird durch eine DNA-Ligase als Enzym katalysiert.



Ligation – biochemischer Prozeß

- Verkleben von DNA-Doppelsträngen, so daß schrittweise immer längere Stränge entstehen
- Enzym DNA-Ligase entstammt dem Bakterium *Escherichia coli* oder dem Bakteriophagen T4
- DNA-Ligasen katalysieren die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatgruppen an DNA-Doppelstrangenden
- Katalyse erfolgt in drei Schritten unter Nutzung von Adenosintriphosphat (ATP) als Energielieferant
- T4-DNA-Ligase hat maximale Aktivität bei pH 7,5 ... 8,0, über geeigneten Puffer gewährleistet

Ligation – ein mögliches Laborprotokoll

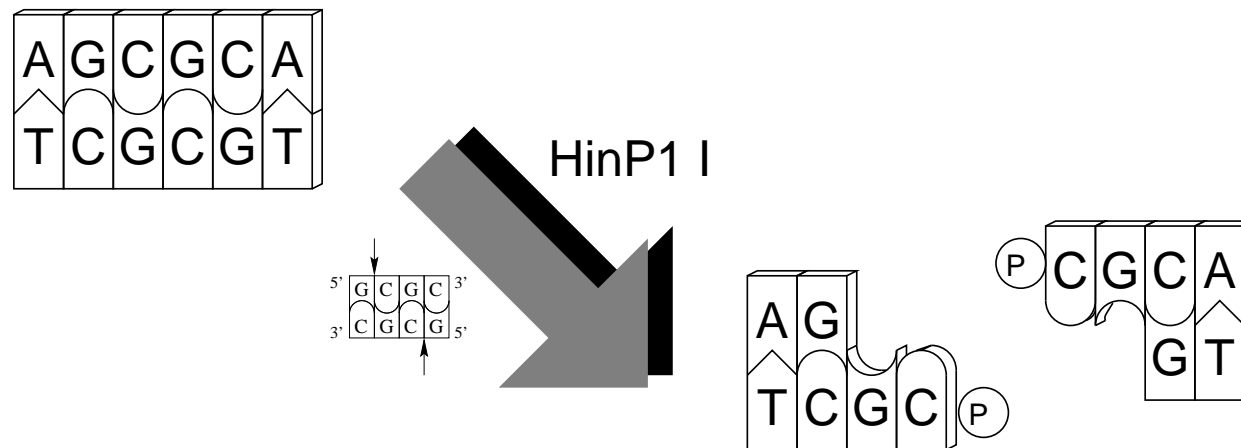
1. die zu ligierenden DNA-Doppelstränge, DNA-Ligase-Puffer, ggf. ATP sowie die DNA-Ligase in den vom Hersteller der DNA-Ligase angegebenen Endkonzentrationen in ein gemeinsames Reagenzglas geben und Reagenzien durchmischen. Zum Verdünnen Reinstwasser benutzen.
2. für 12 bis 16h bei $+16^{\circ}C$ halten (Inkubationszeit), danach
3. für 10min bei $+65^{\circ}C$ halten (Enzymdeaktivierung)
4. bei $-20^{\circ}C$ tiefrieren

Ligation – mögliche Seiteneffekte im Labor

- intramolekulare Ligation; d.h., Bildung von DNA-Ringen, die im Gel anderes Laufverhalten besitzen als lineare DNA
- DNA-Konzentrationen der durch die Ligation entstandenen DNA-Fragmentketten-Kombinationen können stark voneinander abweichen
- deaktiviertes Enzym als Verunreinigung im Ergebnisreagenzglas
- DNA-Doppelstränge sollten so beschaffen sein, daß sie während der thermischen Deaktivierung nicht denaturieren
- Enzyme altern und verlieren an Aktivität
- Reaktionspartner müssen sich in räumlicher Nähe zueinander befinden (gleichmäßig verteilt vorliegen), sonst kaum Strangverkettungen

Cut

- Synonyme: Digestion, Cleavage, Verdau, Schnitt

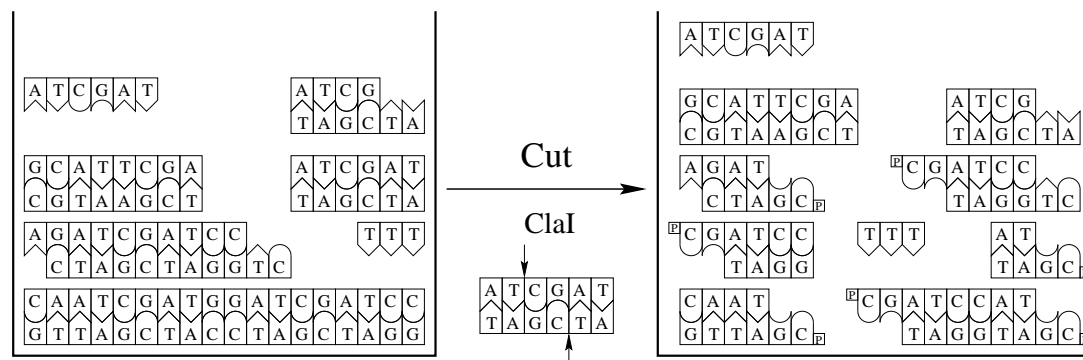


- Zerschneiden von DNA-Doppelsträngen

Cut

Definition:

Cut: Unter *Cut* versteht man eine biochemische Reaktion, bei der DNA-Doppelstränge an jedem Vorkommen einer durch das Enzym bestimmten Subsequenz (Erkennungssequenz) an ebenfalls durch das Enzym bestimmten Spaltstellen geschnitten werden, wodurch bei jedem ausgeführten Schnitt ein neues 3'-5'-Endenpaar entsteht und auch Einzelstrangüberhänge auftreten können. Die beiden bei jedem ausgeführten Schnitt gebildeten 5'-Enden sind mit einer Phosphatgruppe markiert, die 3'-Enden mit einer Hydroxylgruppe. Die Reaktion wird durch eine auf DNA wirkende Typ-II-Restriktionsendonuclease katalysiert.



Cut – biochemischer Prozeß

- Ursprung: Zerstörung von in die Zelle eindringender Fremd-DNA
- etwa 500 Restriktionsendonucleasen bekannt, mehr als 100 kommerziell angeboten
- Typ-II-Restriktionsendonucleasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen doppelsträngiger DNA (Hydrolyse: Reaktion, bei der unter Zugabe von Wasser eine kovalente Bindung des Substrats aufgebrochen wird)
- Enzymname abgeleitet vom Herkunftsbakterium (z.B. HinP1 I aus *Haemophilus influenzae* P₁; mehrere Enzyme aus demselben Bakterium durch fortlaufende römische Numerierung unterschieden; Angabe von Erkennungssequenz und Spaltstellen sowie der Reaktionsparameter)
- Wirkparameter enzymspezifisch; Katalog der Restriktionsendonucleasen unter <http://rebase.neb.com> abrufbar

Cut – ein mögliches Laborprotokoll

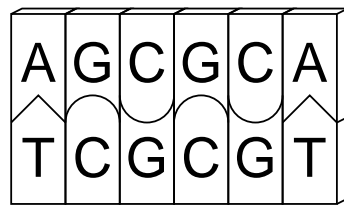
1. die zu schneidenden DNA-Doppelstränge, enzymespezifischen Puffer nach Herstellerangabe sowie die Restriktionsendonuclease in den vom Enzymhersteller angegebenen Endkonzentrationen in ein gemeinsames Reagenzglas geben und Reagenzien gut durchmischen. Zum Verdünnen Reinstwasser benutzen.
2. Inkubation; Zeit und Temperatur nach Enzymherstellerangaben (i.a. ca. *3h* bei $+37^{\circ}C$)
3. thermische Enzymdeaktivierung nach Enzymherstellerangaben (i.a. *10min* bei $+65^{\circ}C$)
4. bei $-20^{\circ}C$ tiefrieren

Cut – mögliche Seiteneffekte im Labor

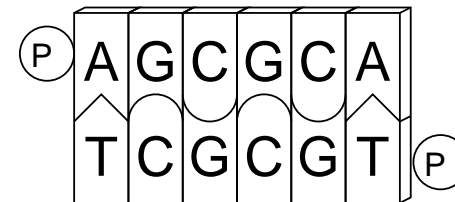
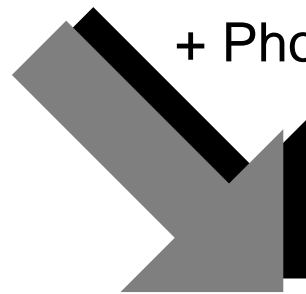
- unvollständige Reaktion (ungeschnittene DNA-Doppelstränge, die die Erkennungssequenz des gewählten Enzyms enthalten, bleiben zurück)
- zusätzliche, willkürliche Schnitte an nicht spezifizierten Stellen
- deaktiviertes Enzym als Verunreinigung im Ergebnisreagenzglas
- DNA-Doppelstränge sollten so beschaffen sein, daß sie während der thermischen Deaktivierung nicht denaturieren
- Enzyme altern und verlieren an Aktivität
- Reaktionspartner müssen sich in räumlicher Nähe zueinander befinden

Labeling

- Synonyme: Markieren, Labeln



5'-Ende
+ Phosphatgruppe

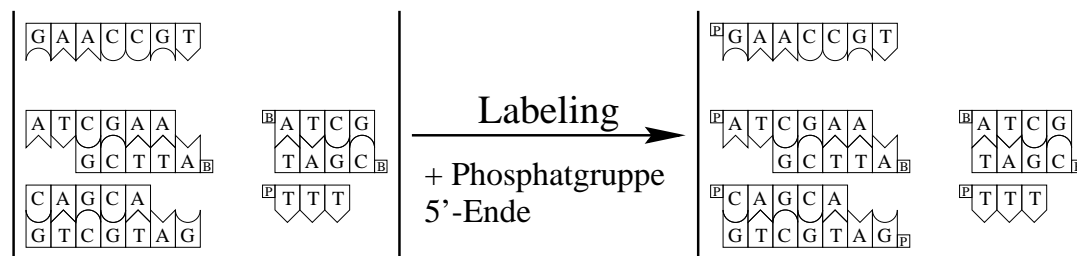


- Markieren von Strangenden

Labeling

Definition:

Labeling: Unter *Labeling* versteht man eine biochemische Reaktion, bei der eine spezifische chemische Gruppe spezifizierbar entweder an den 3'-Enden oder an den 5'-Enden und ebenfalls spezifizierbar entweder angefügt oder abgebaut wird. Das Anfügen geschieht dann und nur dann, wenn das betreffende Ende frei (durch eine Hydroxylgruppe markiert) ist. Das Abbauen markiert das betreffende Ende durch eine Hydroxylgruppe. Die Reaktion wird durch geeignete auf DNA wirkende Enzyme (Transferasen, Hydrolasen, ...) katalysiert.



Labeling (5'-Phosphorylierung) – biochemischer Prozeß

- Enzym T4-Polynucleotide-Kinase katalysiert den Transfer und Austausch einer Phosphatgruppe (P_i) an der γ -Position von ATP zur Hydroxylgruppe am DNA- oder RNA-5'-Ende
- D.h., Adenosintriphosphat als Phosphor- und Energielieferant erforderlich
- T4-Polynucleotide-Kinase entstammt dem Bakterium *Escherichia coli*, welches ein geklontes T4-Polynucleotide-Kinase-Gen trägt.
- T4-Polynucleotide-Kinase hat maximale Aktivität bei pH 7,4, über geeigneten Puffer gewährleistet

Labeling (5'-Phosphorylierung) – ein mögliches Laborprotokoll

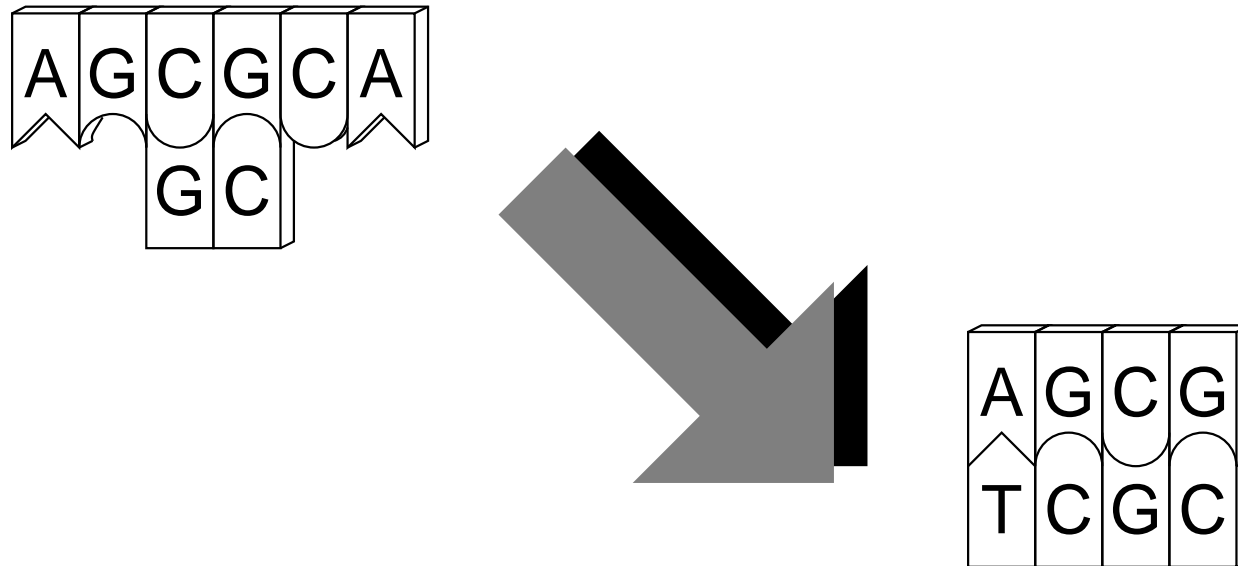
1. die 5' zu phosphorylierenden DNA-Stränge, T4-Polynucleotide-Kinase-Puffer, ATP (Endkonzentration $10mM$) und T4-Polynucleotide-Kinase in den vom Hersteller des Enzyms angegebenen Endkonzentrationen in ein gemeinsames Reagenzglas geben und Reagenzien durchmischen. T4-Polynucleotide-Kinase vorher gründlich vortexen. Zum Verdünnen Reinstwasser benutzen.
2. für $1h$ bei $+37^{\circ}C$ halten (Inkubationszeit), danach
3. für $20min$ bei $+65^{\circ}C$ halten (Enzymdeaktivierung)
4. bei $-20^{\circ}C$ tiefrieren

Labeling (5'-Phosphorylierung) – mögliche Seiteneffekte im Labor

- unvollständige Reaktion (unphosphorylierte freie 5'-Enden bleiben zurück)
- DNA-Konzentration der 5'-phosphorylierten Stränge nimmt ab und kann für Folgereaktionen zu gering sein
- deaktiviertes Enzym, ADP (Adenosindiphosphat) und AMP (Adenosinmonophosphat) als Verunreinigungen im Ergebnisreagenzglas
- DNA-Doppelstränge sollten so beschaffen sein, daß sie während der thermischen Deaktivierung nicht denaturieren
- Enzyme altern und verlieren an Aktivität
- Reaktionspartner müssen sich in räumlicher Nähe zueinander befinden

Polymerisation

- Synonyme: Blunting

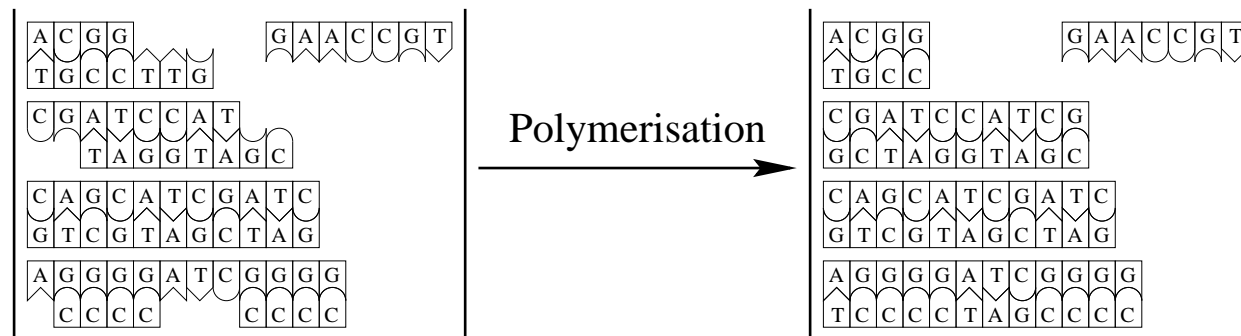


- Auffüllen/Abbauen von Einzelstrangüberhängen

Polymerisation

Definition:

Polymerisation: Unter *Polymerisation* versteht man eine biochemische Reaktion, bei der 5'-Überhänge von DNA-Doppelsträngen zu blunt-Enden aufgefüllt und 3'-Überhänge von DNA-Doppelsträngen zu blunt-Enden abgebaut werden. Die aufzufüllenden 3'-Enden müssen mit Hydroxylgruppen markiert sein. Die Reaktion wird durch eine DNA-Polymerase katalysiert.



Polymerisation – biochemischer Prozeß

- Enzym Vent DNA-Polymerase katalysiert die Erweiterung des 3'-Endes gemäß der DNA-Template-Vorgabe um ein Nucleotid nach dem anderen (Nucleotidtransferase-Aktivität) und besitzt gleichzeitig 3'-5'-Exonuclease-Aktivität
- Vent DNA-Polymerase entstammt dem Bakterium *Thermococcus litoralis*, das in heißen Quellen unter der Meeresoberfläche lebt und bei einer Umgebungstemperatur von bis zu $98^{\circ}C$ überleben kann
- eingebaute Nucleotide werden durch Zugabe von dNTP (Gemisch aus den 4 Desoxyribonucleosiden und Triphosphat; Nucleosid: Desoxyribose+Base) bereitgestellt
- Vent DNA-Polymerase hat maximale Aktivität bei pH 7,4, über geeigneten Puffer gewährleistet
- keine thermische Enzymdeaktivierung möglich!

Polymerisation – ein mögliches Laborprotokoll

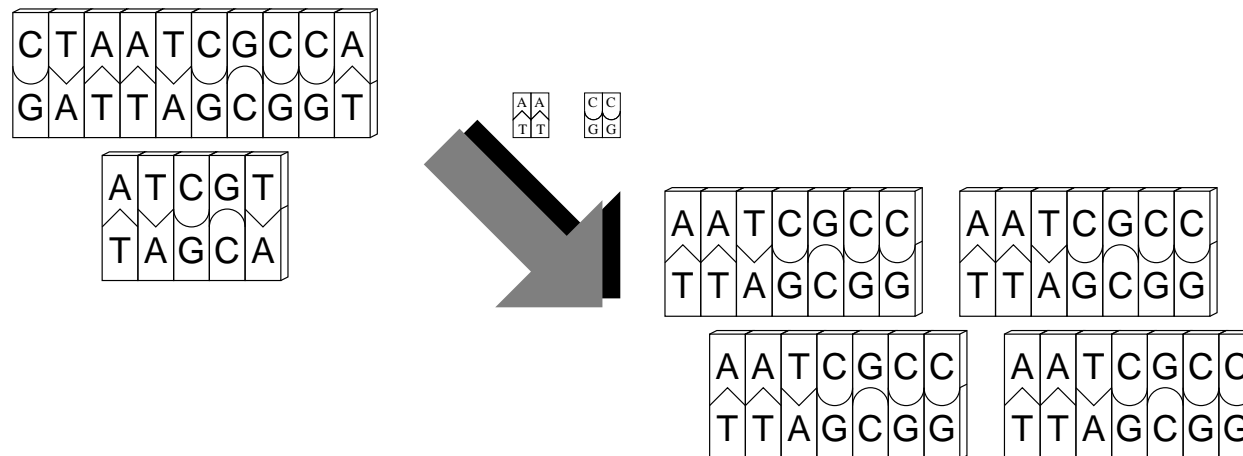
1. die zu polymerisierenden DNA-Doppelstränge, dNTP (Endkonzentration $10mM$), Vent DNA-Polymerase-Puffer und Vent DNA-Polymerase in den vom Enzymhersteller angegebenen Endkonzentrationen in ein gemeinsames Reagenzglas geben und Reagenzien durchmischen. Zum Verdünnen Reinstwasser benutzen.
2. für $30min$ bei $+72^{\circ}C$ halten (Inkubationszeit)
3. bei $-20^{\circ}C$ tiefrieren

Polymerisation – mögliche Seiteneffekte im Labor

- Einbau falscher Nucleotide, die dann zu Loops im DNA-Doppelstrang führen (Fehlerrate etwa 1:800)
- nach Polymerisation sollte eine Agarosegel-Elektrophorese erfolgen, um die noch aktive Polymerase abzuscheiden. Auch danach verbleiben noch aktive Polymerasereste sowie dNTP als Verunreinigungen im Ergebnisreagenzglas
- DNA-Doppelstränge sollten so beschaffen sein, daß sie während der Inkubation nicht denaturieren
- Enzyme altern und verlieren an Aktivität
- Reaktionspartner müssen sich in räumlicher Nähe zueinander befinden

Polymerase Chain Reaction

- Synonyme: Polymerase-Kettenreaktion, PCR, Amplify, Duplizieren

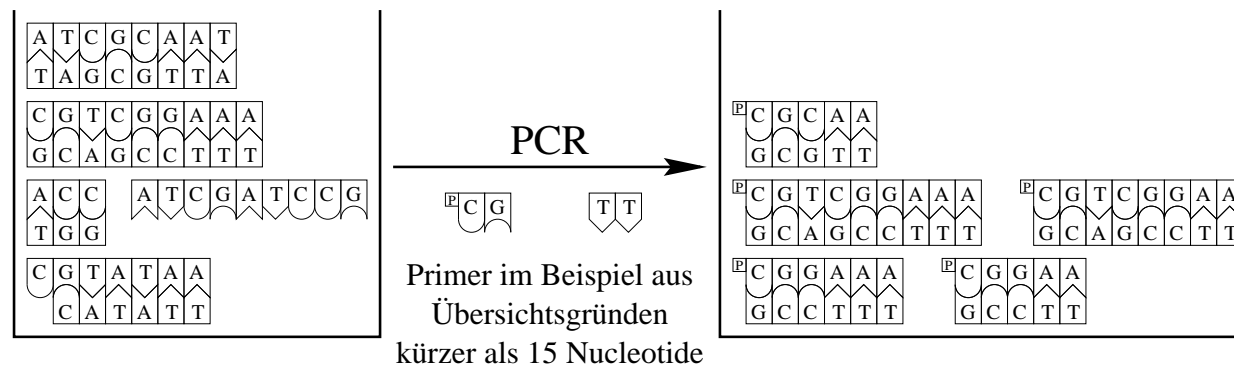


- Duplizieren von DNA-Doppelsträngen oder -abschnitten

Polymerase Chain Reaction

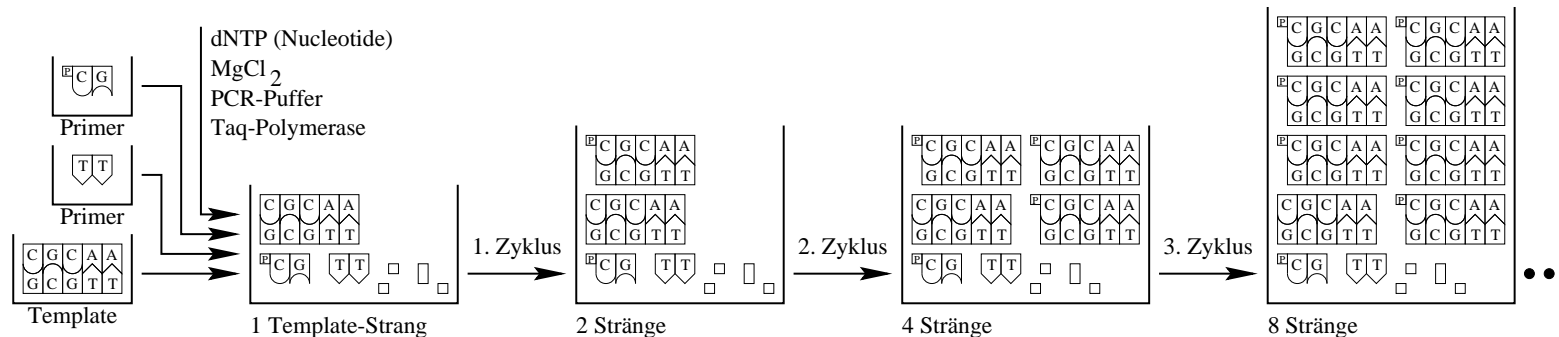
Definition:

PCR: Unter *PCR* versteht man eine biochemische Reaktion, bei der Abschnitte doppelsträngiger DNA exponentiell dupliziert werden. Von jedem zu duplizierenden DNA-Abschnitt müssen Sequenzbeginn und -ende bekannt sein; angegeben durch eine Folge von jeweils mindestens 15 Nucleotiden (Primer). Jeder DNA-Doppelstrangabschnitt, der von den beiden Primern und ihrem Komplement begrenzt ist, wird durch die PCR exponentiell dupliziert. Die Strangduplikate tragen an den 5'-Enden die Markierungen der jeweiligen Primer. Die Reaktion wird durch eine thermisch stabile DNA-Polymerase katalysiert.



Polymerase Chain Reaction – biochemischer Prozeß

- „exponentiell duplizieren“ heißt: PCR läuft in Zyklen ab (deshalb *Kettenreaktion*); in jedem Zyklus Verdopplung der DNA-Doppelstranganzahl
- üblich: etwa 35 bis 40 Zyklen (erzeugt bis zu 10^{12} Strangduplikate), danach Sättigung (keine exponentielle Vervielfältigung mehr)
- Zyklenabarbeitung erfolgt automatisch in einem Cycler
- Durchsatz: PCR erfordert je nach Zyklenanzahl etwa 2 ... 3 Stunden
- Entwickler der PCR, Kary B. Mullis, 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet



Polymerase Chain Reaction – Ablauf eines Zyklus

Jeder Zyklus besteht aus drei aufeinanderfolgenden Einzelreaktionen:

1. Denaturieren der DNA-Doppelstränge (Melting)

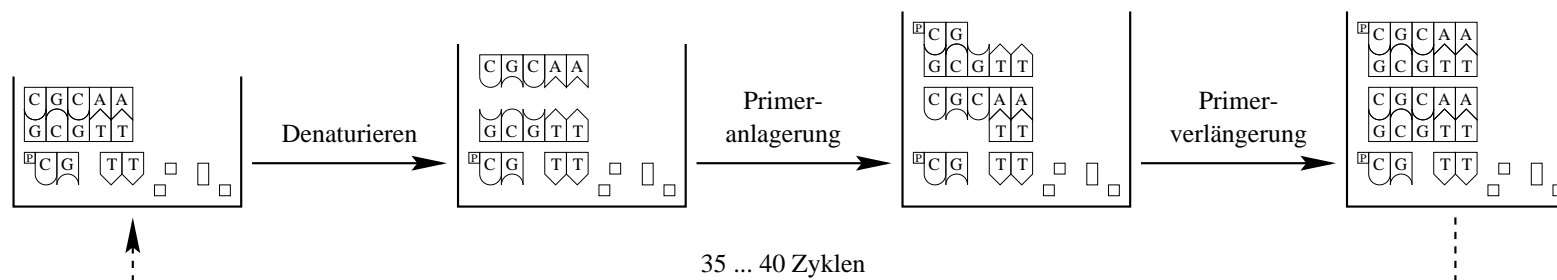
- alle DNA-Doppelstränge in DNA-Einzelstränge aufgespalten ($+94^{\circ}\text{C}$ für 60s)

2. Primeranlagerung (Annealing)

- Primer annealen 2°C unterhalb ihrer Schmelztemperatur (z.B. $+55^{\circ}\text{C}$ für 50s)

3. Primerverlängerung (Extension, Polymerisation)

- thermisch stabiles Enzym Taq DNA-Polymerase baut vom 3'-Ende schrittweise komplementäre Nucleotide ein, bis Strangende erreicht ($+72^{\circ}\text{C}$ für 40s)



Polymerase Chain Reaction – biochemischer Prozeß

- PCR ist „fortgesetzte Polymerisation“ und läßt sich auch mit den (Einzel)Operationen Union, Melting, Annealing und Polymerisation nachbilden
- Enzym Taq DNA-Polymerase katalysiert die Erweiterung des 3'-Endes gemäß der DNA-Template-Vorgabe um ein Nucleotid nach dem anderen und besitzt gleichzeitig 3'-5'-Exonuclease-Aktivität
- Taq DNA-Polymerase entstammt dem Bakterium *Thermus aquaticus*, das in heißen Quellen unter der Meeresoberfläche lebt und bei einer Umgebungstemperatur von bis zu $96^{\circ}C$ überleben kann
- Taq DNA-Polymerase und Vent DNA-Polymerase wirken gleich und sind auch prinzipiell austauschbar; Taq DNA-Polymerase für Verwendung im Cycler (häufige Temperaturwechsel) aufgrund empirischer Studien besser geeignet
- keine thermische Enzymdeaktivierung möglich!
- Cycler: Gerät, das einen programmierbaren Temperatur-Zeit-Verlauf gewährleistet.

Polymerase Chain Reaction – ein mögliches Laborprotokoll

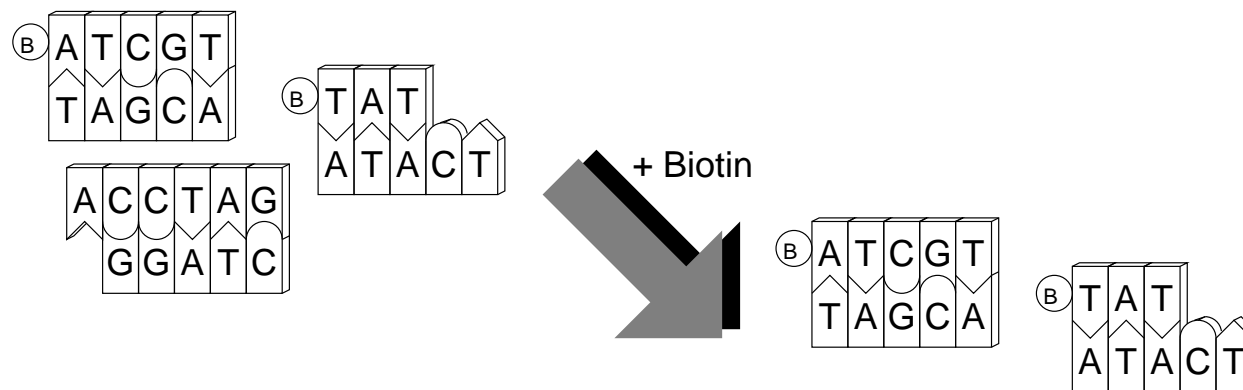
1. gewünschten Temperatur-Zeit-Verlauf am Cycler programmieren; z.B.
 $94^{\circ}C, 5min \rightarrow (94^{\circ}C, 30s \rightarrow 55^{\circ}C, 30s \rightarrow 72^{\circ}C, 30s) \times 40 \rightarrow 72^{\circ}C, 7min \rightarrow 4^{\circ}C, „\infty“$
2. die Primer und das DNA-Template, dNTP, Taq DNA-Polymerase-Puffer, $MgCl_2$ und Taq DNA-Polymerase in den vom Enzymhersteller angegebenen Endkonzentrationen in ein gemeinsames Reagenzglas geben und Reagenzien durchmischen. Zum Verdünnen Reinstwasser benutzen.
3. Reagenzglas kurz zentrifugieren
4. Reagenzglas in den Cycler stellen und Cycler starten
5. nach Cycler-Programmende Reagenzglas aus dem Cycler nehmen und bei $-20^{\circ}C$ tiefrieren

Polymerase Chain Reaction – mögliche Seiteneffekte im Labor

- Seiteneffekte der Operationen Union, Annealing, Melting und Polymerisation
- Primer sollten nicht – auch nicht abschnittsweise – komplementär sein, Gefahr von Primer-Dimeren
- Primer sollten ähnliche (gleiche) Schmelztemperatur besitzen, sonst unterschiedlich gute Qualität der Primeranlagerung
- optimale Reaktionsparameter schwer im voraus berechenbar, müssen experimentell ermittelt werden für bestmögliche spezifische Amplifizierung
- Gefahr der Artefaktbildung (Artefakte: weder DNA-Einzelstränge noch DNA-Doppelstränge gemäß der angegebenen Definition)

Affinity Purification

- Synonyme: Auswaschen, Reinigen

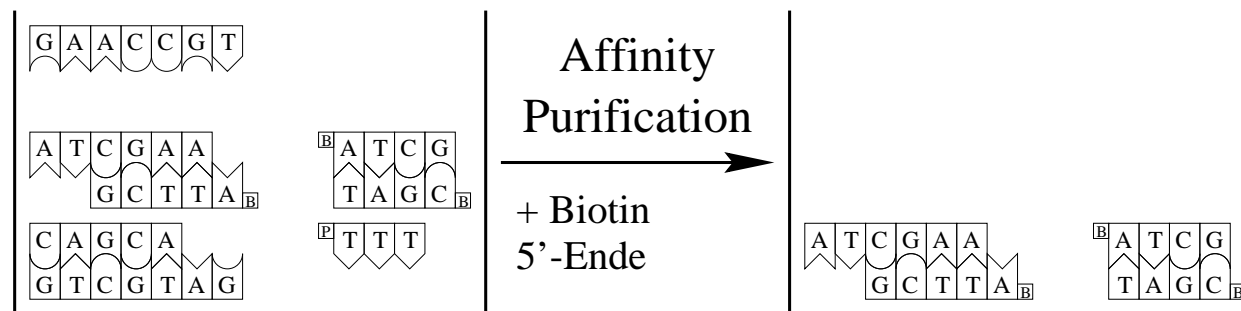


- Separieren nach Strangendenmarkierung bzw. Subsequenz

Affinity Purification

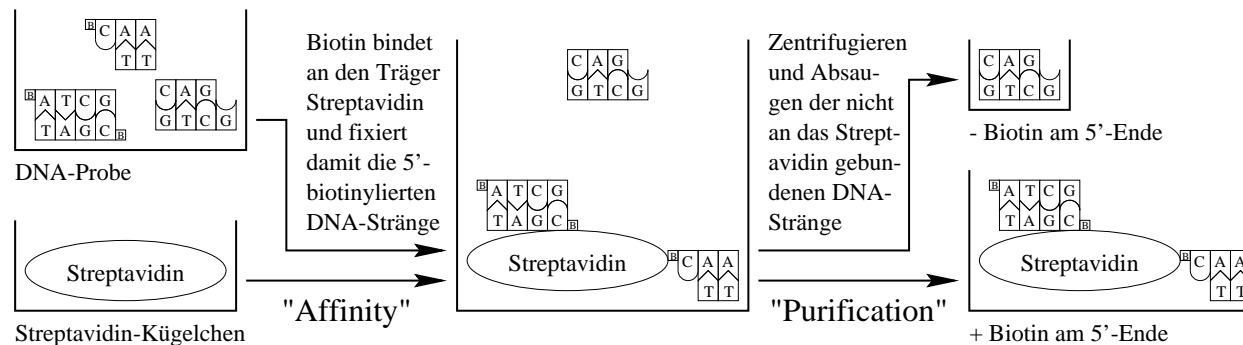
Definition:

Affinity Purification: Unter *Affinity Purification* versteht man eine Separationstechnik, bei der genau die DNA-Stränge, die an keinem 5'-Ende mit Biotin markiert sind, von den anderen DNA-Strängen getrennt und in einem gesonderten Reagenzglas aufgefangen werden. Die DNA-Stränge, die an mindestens einem 5'-Ende mit Biotin markiert sind, liegen ebenfalls in einem Reagenzglas vor.



Affinity Purification – biochemischer Prozeß

- Biotin: ein Vitamin des Vitamin-B-Komplexes, das sich an 5'-Enden von DNA binden kann (5'-Labeling mit Biotin, auch als 5'-Biotinylierung bezeichnet)
- Streptavidin: ein Protein, isoliert aus *Streptomyces avidin II*, das eine hohe Bindungskraft (Affinität) für Biotin besitzt und in Form sog. „Magnetkügelchen“ (magnetic beads) als Träger für die Fixierung von DNA-Strangenden angeboten wird
- Biotin und die daran „hängende“ DNA bindet an Streptavidin. Die entstandene Verbindung setzt sich nach Zentrifugieren am Boden des Reagenzglas ab, die nicht biotinylierte DNA befindet sich im Überstand, dadurch räumliche Trennung.



Affinity Purification (+Biotin) – ein mögliches Laborprotokoll

Auszug aus den Protokollen für Adleman's HPP-Algorithmus:

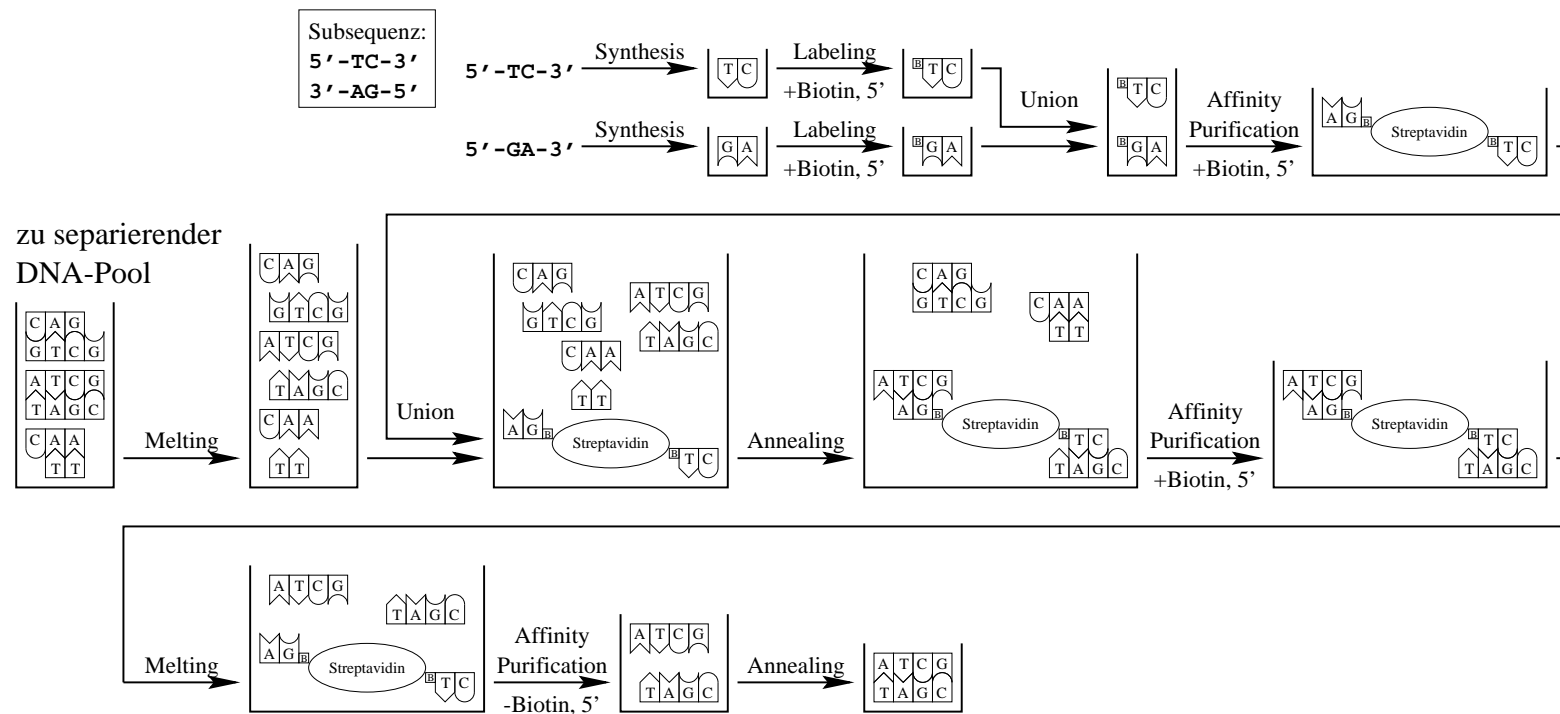
1. Streptavidin-Kügelchen in ein neues Reagenzglas geben
 - Hilfsreagenzglas; Richtwert: $\frac{1}{3}$ des Ansatzvolumens
2. DNA-Probe in $100\mu\text{l}$ $0,5\text{ M}$ -Sodiumsalz (SSC) lösen und in das Hilfsreagenzglas geben
3. für 45 min bei $+20^\circ\text{C}$ halten, dabei permanent schütteln
 - Anbindung des Biotins an das Streptavidin
4. 4-maliges Waschen; jeweils $400\mu\text{l}$ $0,5\text{ M}$ -SSC hinzugeben, vortexen, zentrifugieren, Überstand absaugen und in gesondertes Reagenzglas geben
 - Aussondern der nicht an das Streptavidin gebundenen DNA-Stränge
5. dem Hilfsreagenzglas $100\mu\text{l}$ Reinstwasser hinzugeben und durchmischen
6. Hilfsreagenzglas bei -20°C tiefrieren

Affinity Purification – mögliche Seiteneffekte im Labor

- unscharfe Separierung (biotinylierte Stränge verbleiben im -Biotin-Ergebnisreagenzglas, nicht biotinylierte Stränge verbleiben im +Biotin-Ergebnisreagenzglas)
- Verlust von DNA-Strängen, der eine Verringerung der DNA-Konzentration hervorruft
- Verunreinigungen durch fehlerhaft separierte Stränge, Streptavidin und Salz
- hinzugefügtes Salz verändert die Schmelztemperatur der DNA-Stränge und beeinflusst nachfolgende Annealing- oder Melting-Operationen
- biotinylierte DNA-Stränge im Ergebnisreagenzglas geclustert und nicht gleichverteilt

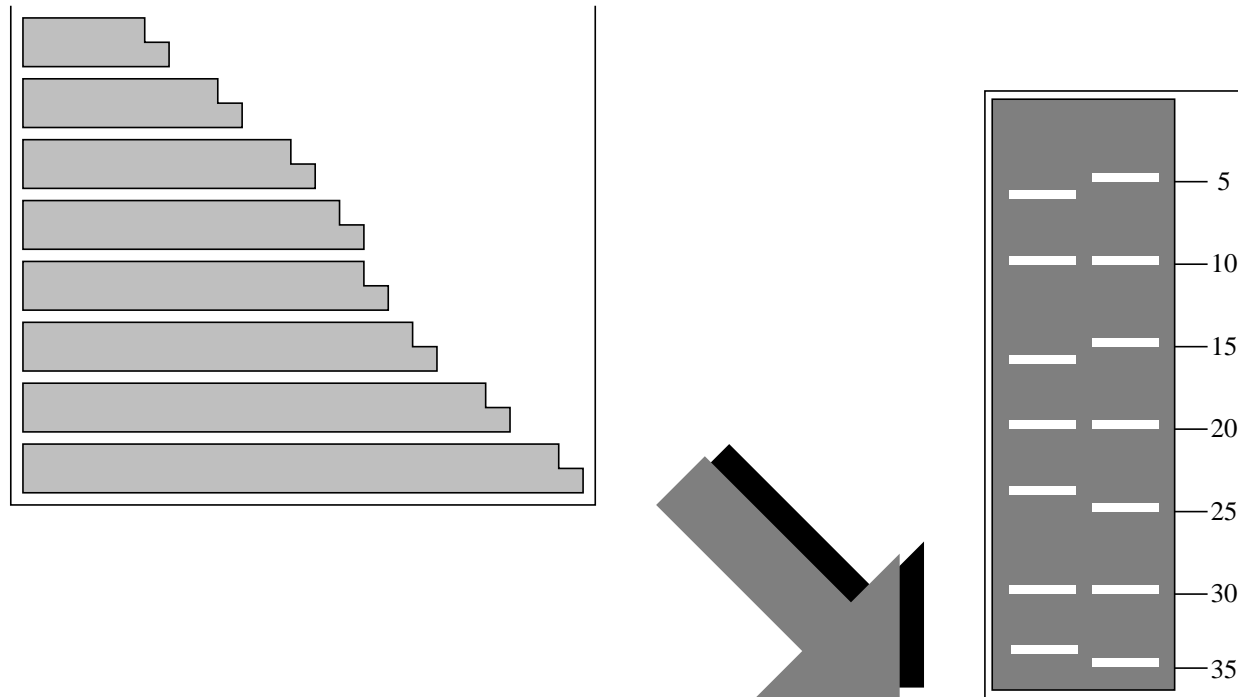
Affinity Purification – Nutzung zur Separation nach Subsequenz

- Subsequenz: DNA-Doppelstrang ohne Einzelstrangüberhänge und -abschnitte
- Technik in Adleman's Algorithmus zur Lösung des Hamiltonkreis-Problems angewandt, hier Operationsfolge am Beispiel gezeigt:



Agarose Gel Electrophoresis

- Synonyme: Detect, Agarosegel-Elektrophorese

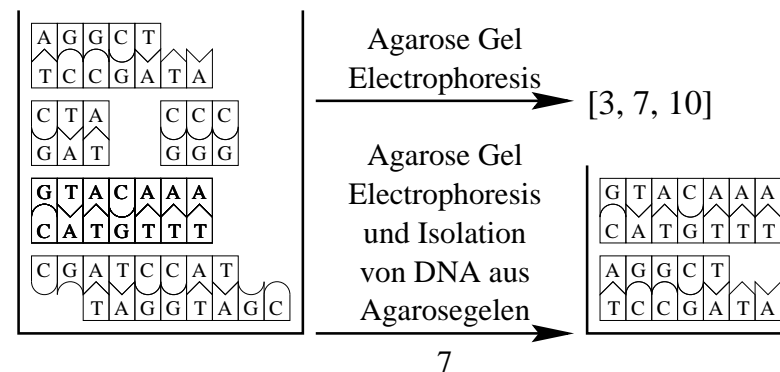


- Stranglängenbestimmung, Längenseparation

Agarose Gel Electrophoresis

Definition:

Agarose Gel Electrophoresis: Unter *Agarose Gel Electrophoresis* versteht man eine Separationstechnik, mit der die Längen der in einem DNA-Pool enthaltenen DNA-Doppelstränge bestimmt werden können und die den DNA-Pool nach Doppelstranglängen separiert. Unter Nutzung einer zusätzlichen Methode zur Isolation von DNA aus Agarosegelen ist es möglich, DNA-Stränge ausgewählter Längen aus dem Agarosegel zurückzugewinnen.



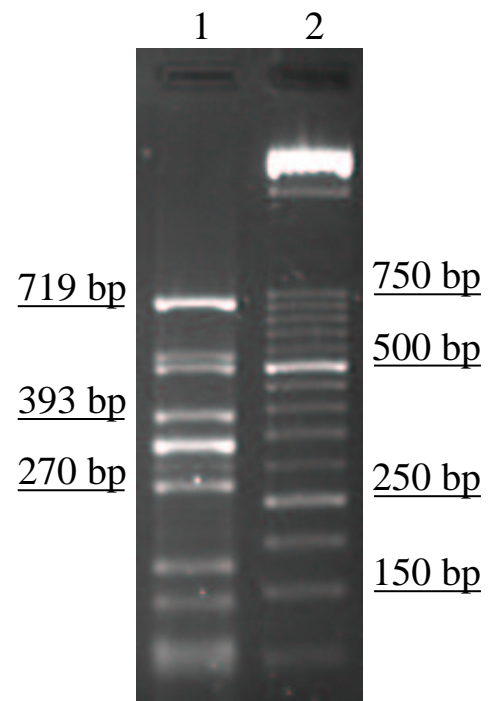
Agarose Gel Electrophoresis – physikalischer Prozeß

- **Begriff:** electron → griech. Bernstein (Ladung), phore → lat. Träger
- elektrophoretische Methoden beruhen auf el. Ladungen, die die Moleküle „tragen“
- **Prinzip:** negativ geladene Moleküle (wie DNA) wandern im elektrischen Feld innerhalb eines geeigneten Mediums zur positiven Elektrode
- Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von
 - Molekülgröße und -gestalt (Länge der DNA-Stränge!!!)
 - Medium, durch welches sich die DNA bewegt (hier: Agarosegel)
 - angelegte elektrische Spannung und resultierende Feldstärke ($\frac{\text{Spannung}}{\text{Elektrodenabstand}}$)
- **Anwendungen:**
 - kürzere DNA-Stränge wandern schneller als längere → Längenseparation
 - unterschiedlich geformte el. neg. Moleküle (Proteine, RNA, ...) wandern mit anderer Geschwindigkeit als DNA-Stränge → Reinigung der DNA von Fremdstoffen

Aufnahme eines Agarosegels

Lane 1: durch Digestion eines Plasmids erzeugte DNA-Doppelstränge definierter Längen

Lane 2: 50bp-Längenstandard (Skala aus DNA-Fragmenten der Längen 50, 100, ..., 750bp)



Das Medium Agarosegel

- Flüssigkeiten oder Gase wegen zu geringer Trennleistung nicht als Medium geeignet
- **Agarose:** langkettiges Polysaccharid mit repetitiven Untereinheiten aus d-Galactose und 3,6-Anhydro-1-Galactose
 - Grundsubstanz Agar aus Meeresalgen (Seetang) extrahiert
 - als weißes Pulver kommerziell angeboten
- Agarose versetzt mit einer **Pufferlösung (Tris Acetat, TAE)**, die H^+ und OH^- -Ionen bereitstellt und aufgrund ihrer Fähigkeit zur Elektrolyse das Wandern der DNA im Gel ermöglicht
 - gut durchmischt, gleichverteilte Bildung von Poren
 - variierbare Agarosekonzentrationen für Zoom bestimmter DNA-Längenbereiche
- **Ethidiumbromid** hinzugegeben, Zusatzstoff, der sich an die Wasserstoffbrücken doppelsträngiger DNA bindet und unter UV-Licht fluoresziert; macht die DNA sichtbar!
 - Ethidiumbromid im Gel statt in der DNA-Probe für Hintergrundfluoreszenz

Agarose Gel Electrophoresis – Vorbereitung, Prozeß und Auswertung

1. Agarosegel gießen

- zähflüssiges Agarose-TAE-Gemisch durch Erhitzen ($+65^{\circ}C$) und Schütteln gut durchmischt (keine Agarosecluster)
- mit Ethidiumbromid versetzt und
- in Gelkammer gegossen zum Abkühlen und Aushärten
- durch Kamm Taschen im Gel erzeugt, in die die DNA-Proben gegeben werden.

2. DNA-Probe vorbereiten

- DNA-Probe mit dem Farbstoff Dye angereichert, der mit bloßem Auge unter Tageslicht im Gel erkennbar ist und etwa so schnell wandert wie DNA-Doppelstränge der Länge 20bp.
- dadurch optimaler Abschaltzeitpunkt der Spannung bestimmbar

Agarose Gel Electrophoresis – Vorbereitung, Prozeß und Auswertung

3. DNA-Probe in die Geltaschen füllen und Elektrophoresevorgang

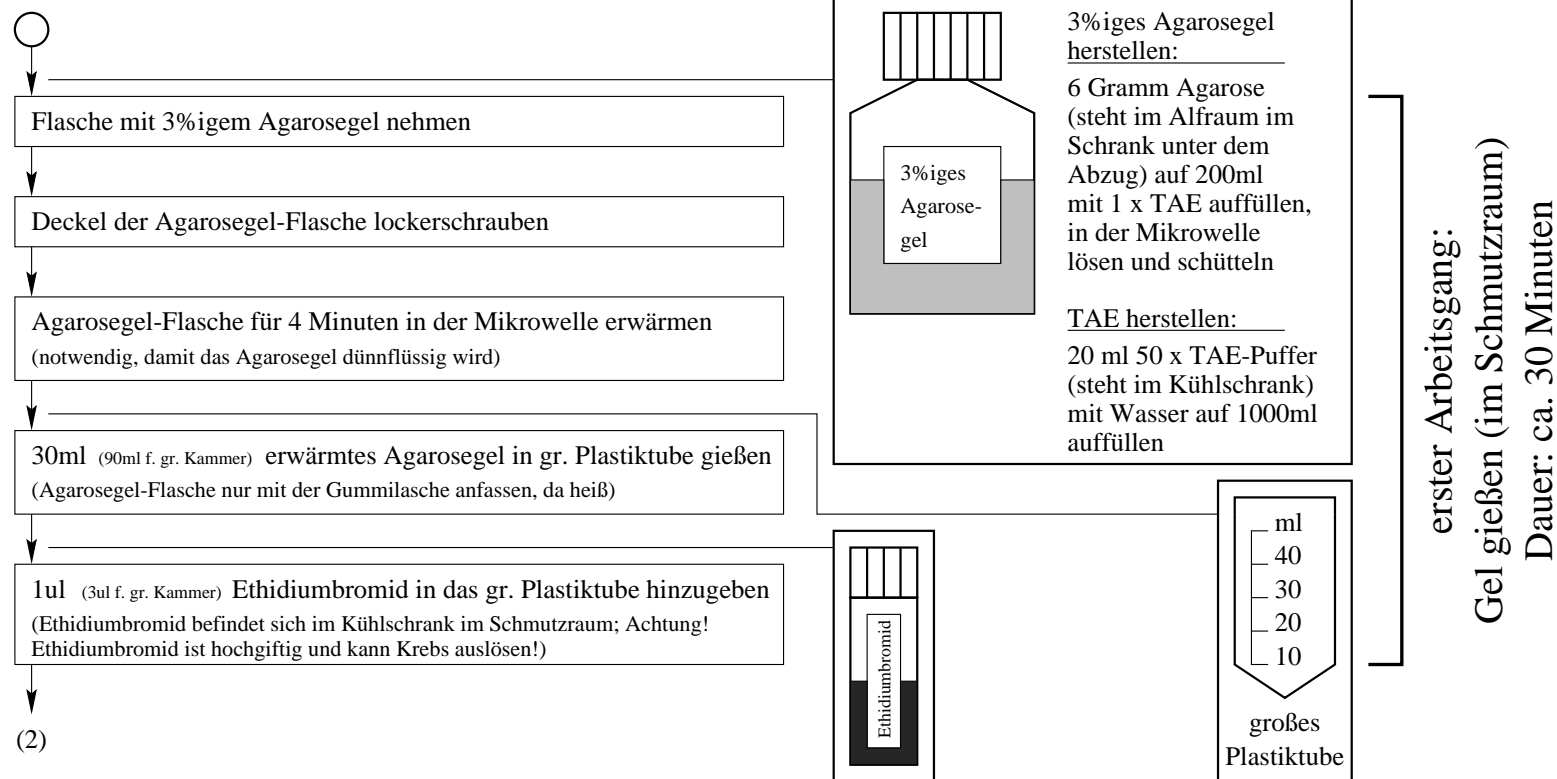
- Gelkammer in Elektrodenapparatur gesetzt,
- DNA-Probe eingefüllt und
- elektrische Spannung angelegt
- DNA bewegt sich von der Tasche aus durch die Poren des Gels zur positiven Elektrode

4. Gel-Auswertung unter UV-Licht

- Spannung abgeschaltet, wenn Dye das Gelende nahezu erreicht hat
- Gel unter UV-Licht betrachtet, fotografiert und ggf. DNA-Banden gewünschter Längen mit Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten

Agarose Gel Electrophoresis – ein mögliches Laborprotokoll

Ablauf der Agarosegel-Elektrophorese im Labor



Agarose Gel Electrophoresis – ein mögliches Laborprotokoll

Ablauf der Agarosegel-Elektrophorese im Labor

(2)

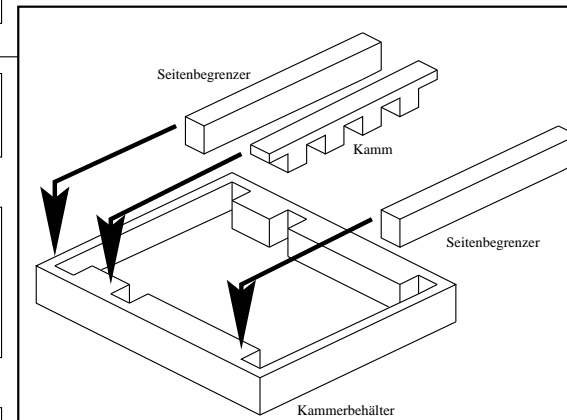
großes Plastiktube verschließen und leicht schütteln
(notwendig, damit sich das Ethidiumbromid möglichst gleichmäßig im
Agarosegel verteilt)

einen Kammerbehälter bereitstellen; Kamm und Seitenbegrenzer
einstecken

Plastiktubeinhalt (Agarosegel mit Ethidiumbromid) vorsichtig in den
Kammerbehälter gießen. Luftblasen mit einem der ungenutzten
Seitenbegrenzer behutsam an den Behälterrand bewegen und nach
außen drücken. Ziel: keine Luftblasen mehr im Gel

Gel für etwa 15 Minuten aushärten lassen (Kammerbehälter mit
dem eingefüllten Gel im Schmutzraum stehenlassen)

(3)



erster Arbeitsgang:
Gel gießen (im Schmutzraum)
Dauer: ca. 30 Minuten

Agarose Gel Electrophoresis – ein mögliches Laborprotokoll

Ablauf der Agarosegel-Elektrophorese im Labor

(3)

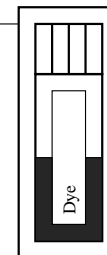
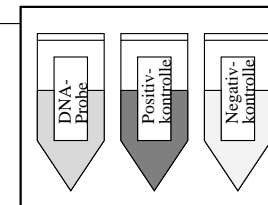
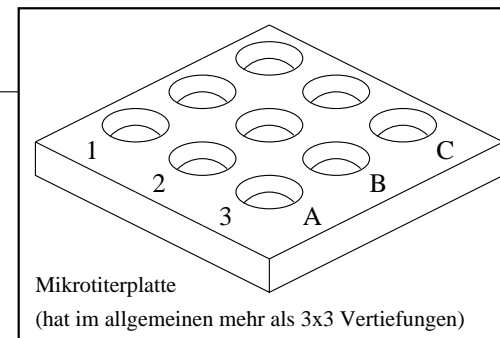
Mikrotiterplatte bereitlegen

Kammeraufteilung und Volumina der Kammerfüllungen festlegen
(Bei der Agarosegel-Elektrophorese laufen die DNA-Stränge von der Kammer aus durch das Gel. Es muß festgelegt werden, welche DNA-Probe in welche Kammer gegeben wird. Typische DNA-Proben-Volumina liegen zwischen 3ul und 9ul pro Kammerfüllung.)

Längenstandard, DNA, Kontrollsubstanzen (Positiv- und Negativkontrolle) usw. entsprechend der festgelegten Kammeraufteilung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben

jeder genutzten Vertiefung der Mikrotiterplatte Dye hinzugeben
(Dye ist ein Farbstoff, der während des Elektrophoresevorganges mit geringfügig höherer Geschwindigkeit als alle DNA-Stränge durch das Gel läuft. Auf diese Weise kann man mit bloßem Auge erkennen, wann der Elektrophoresevorgang beendet werden muß, damit alle DNA-Stränge im Gel bleiben. Typische Dye-Volumina liegen zwischen 1ul und 3ul pro Kammerfüllung. Dye befindet sich im Kühlschrank im Schmutzraum.)

(4)



zweiter Arbeitsgang: Kammerfüllungen bereitstellen
("normales" Labor)
Dauer: ca. 20 Minuten

Agarose Gel Electrophoresis – ein mögliches Laborprotokoll

Ablauf der Agarosegel-Elektrophorese im Labor

(4)

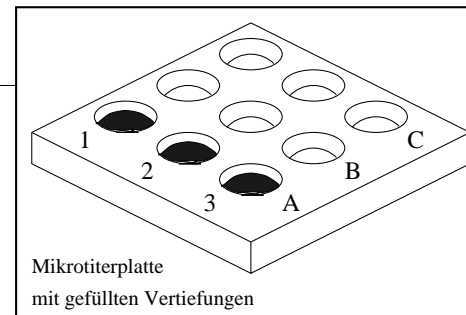
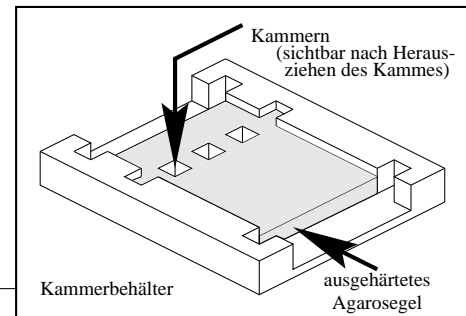
Kamm vorsichtig aus dem Agarosegel im Kammerbehälter herausziehen, ohne die entstandenen Kammern zu beschädigen

Seitenbegrenzer aus dem Kammerbehälter herausnehmen

Kammerbehälter in die TAE-Lösung der Elektroden-Apparatur stellen, so daß das Agarosegel vollständig von TAE-Lösung bedeckt wird (ggf. zusätzliche TAE-Lösung einfüllen)

Inhalte der Vertiefungen der Mikrotiterplatte auf die Kammern verteilen (jeden Vertiefungsinhalt vollständig in eine eigene Kammer); dabei nicht die Kammerwände mit der Pipettenspitze anstechen

(5)



dritter Arbeitsgang:
Kammern des Gels füllen und
Elektrophoresevorgang
(im Schmutzraum)
Dauer: ca. 70 Minuten

Agarose Gel Electrophoresis – ein mögliches Laborprotokoll

Ablauf der Agarosegel-Elektrophorese im Labor

(5)

Deckel mit den Elektroleitungen auf die Elektroden-Apparatur aufsetzen

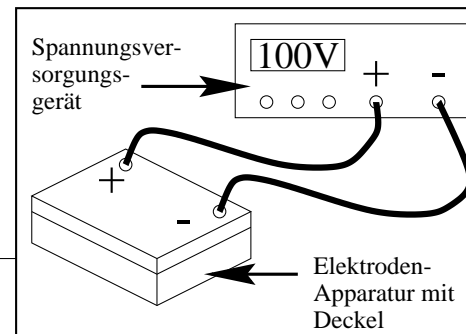
Elektroleitungen an das Spannungsversorgungsgerät anschließen

am Spannungsversorgungsgerät 100V einstellen und "Start" drücken

warten, bis das Dye weit genug im Gel gelaufen ist
(ca. 30 ... 40 Minuten)

Spannungsversorgungsgerät abschalten

(6)



dritter Arbeitsgang:
Kammern des Gels füllen und
Elektrophoresevorgang
(im Schmutzraum)
Dauer: ca. 70 Minuten

Agarose Gel Electrophoresis – ein mögliches Laborprotokoll

Ablauf der Agarosegel-Elektrophorese im Labor

(6)

Gel vorsichtig aus dem Kammerbehälter nehmen
(dazu Gummihandschuhe anziehen, dann das Gel langsam und behutsam mit der Hand vom Kammerbehälter abziehen und auf ein Papierhandtuch legen)

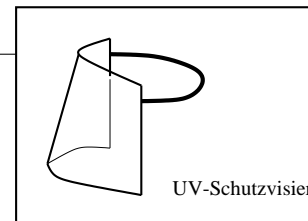
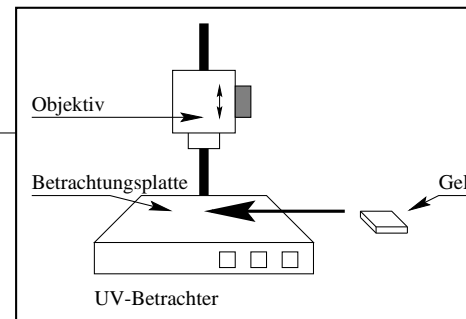
Gel auf die Betrachtungsplatte des UV-Betrachters legen, weißes Licht des UV-Betrachters einschalten und Gel so positionieren, daß es im Objektiv gut sichtbar ist
(ggf. Objektiv scharfstellen. Falls das Gerät "EagleEye" genutzt wird, die Auswertesoftware "Stratagene EagleEye" starten, das weiße Licht ausschalten, das Schutzvisier aufsetzen, den Raum abdunkeln, das transiente Licht einschalten, mit dem Touchpen auf den Button "R" (Real Time Measurement) klicken, obere Klappe öffnen und Gel solange verschieben, bis es optimal sichtbar ist)

weißes Licht des UV-Betrachters abschalten
(Falls das Gerät "EagleEye" genutzt wird, ist dieser Schritt bereits erfolgt.)

UV-Schutzbrille oder UV-Schutzvisier aufsetzen!
(unbedingt notwendig, da UV-Licht die Augen schädigen kann! Falls das Gerät "EagleEye" genutzt wird, ist dieser Schritt bereits erfolgt.)

Raum abdunkeln
(Falls das Gerät "EagleEye" genutzt wird, ist dieser Schritt bereits erfolgt.)

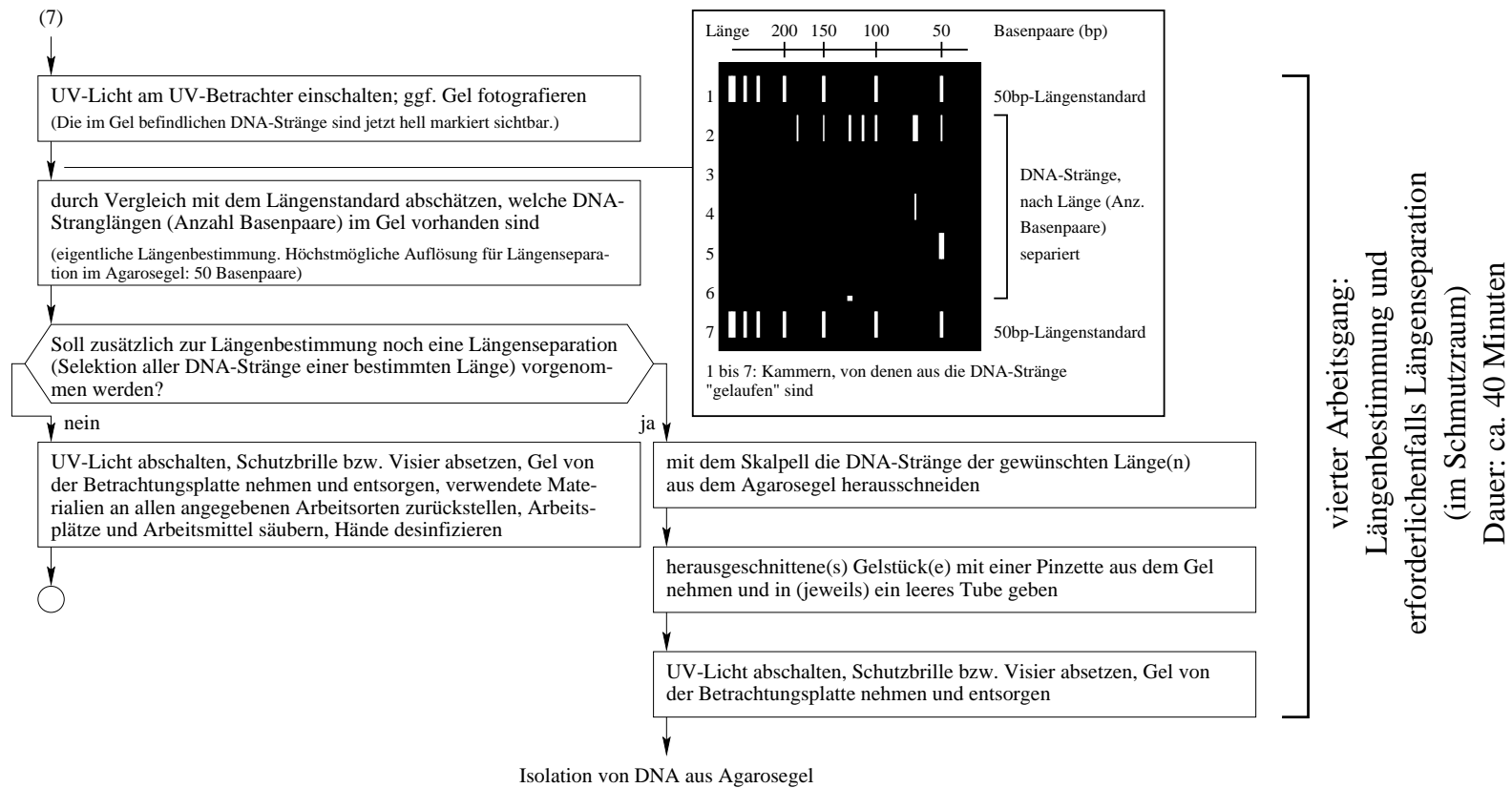
(7)



vierter Arbeitsgang:
Längenbestimmung und
erforderlichenfalls Längenseparation
(im Schmutzraum)
Dauer: ca. 40 Minuten

Agarose Gel Electrophoresis – ein mögliches Laborprotokoll

Ablauf der Agarosegel-Elektrophorese im Labor



Agarose Gel Electrophoresis – mögliche Seiteneffekte im Labor

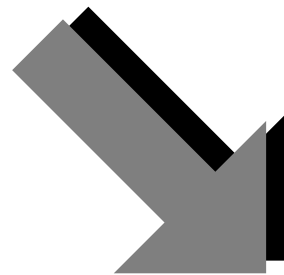
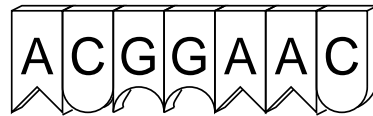
- unscharfe und verwischte DNA-Banden durch Agarose-Cluster oder Luftblasen im Gel
- unscharfe Separation (Trennleistung des Gels ist begrenzt, sowohl hinsichtlich Auflösung als auch hinsichtlich DNA-Menge pro Lane)
- Auflösungsgrenze von Agarosegel: etwa 10bp (3% Agarose)
- Ethidiumbromid wandert entgegengesetzt zur DNA, bei zu später Spannungsabschaltung kaum noch Fluoreszenz
- DNA-Doppelstrang-Ringe (Plasmide), linearisierte DNA-Stränge und überspiralisierte (supercoiled) DNA-Stränge haben jeweils anderes Laufverhalten
- Sichtbarkeitsgrenze (DNA-Banden mit weniger als 10ng DNA nicht mehr wahrnehmbar)
- Wärmeentwicklung beim Elektrophoresevorgang, hervorgerufen durch Reibung der DNA am Gel, kann zur Denaturierung der DNA führen
- DNA-Verluste während der verschiedenen Arbeitsschritte

Isolation von DNA aus Agarosegelen

- verschiedene Methoden bekannt, die die unterschiedliche Dichte von DNA und Agarosegel ausnutzen und durch Erhitzen und Zentrifugieren eine räumliche Trennung von Gel und DNA bewirken
- i.a. im Kit angeboten, d.h., Zusammenstellung aller Reagenzien und des Abarbeitungsprotokolls
- Rückgewinnungsgrad der DNA je nach genutzter Methode (und Geschick) zwischen ca. 50% (Filtersäulen) und ca. 80% (GeneClean auf Basis von Glasmilch und Waschpuffer)

Sequencing

- Synonyme: Sequenzieren



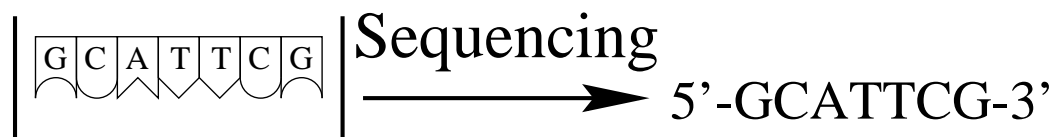
5' -ACGGAAC- 3'

- Strangsequenzbestimmung

Sequencing

Definition:

Sequencing: Unter *Sequencing* versteht man eine Technik, mit der die Nucleotidfolge von DNA-Einzelsträngen in einer vorgegebenen Leserichtung bestimmt werden kann.



Sequencing – biochemischer Prozeß

- erste nutzbare Sequenziertechnik nach Maxam/Gilbert heute kaum noch angewandt
- etabliert: Methode nach Sanger (Didesoxy-Methode), erstveröffentlicht 1975
- inzwischen fast vollautomatisiert
- Durchsatz: etwa 80 Basen pro Stunde
- F. Sanger für seine Sequenziermethode 1980 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet

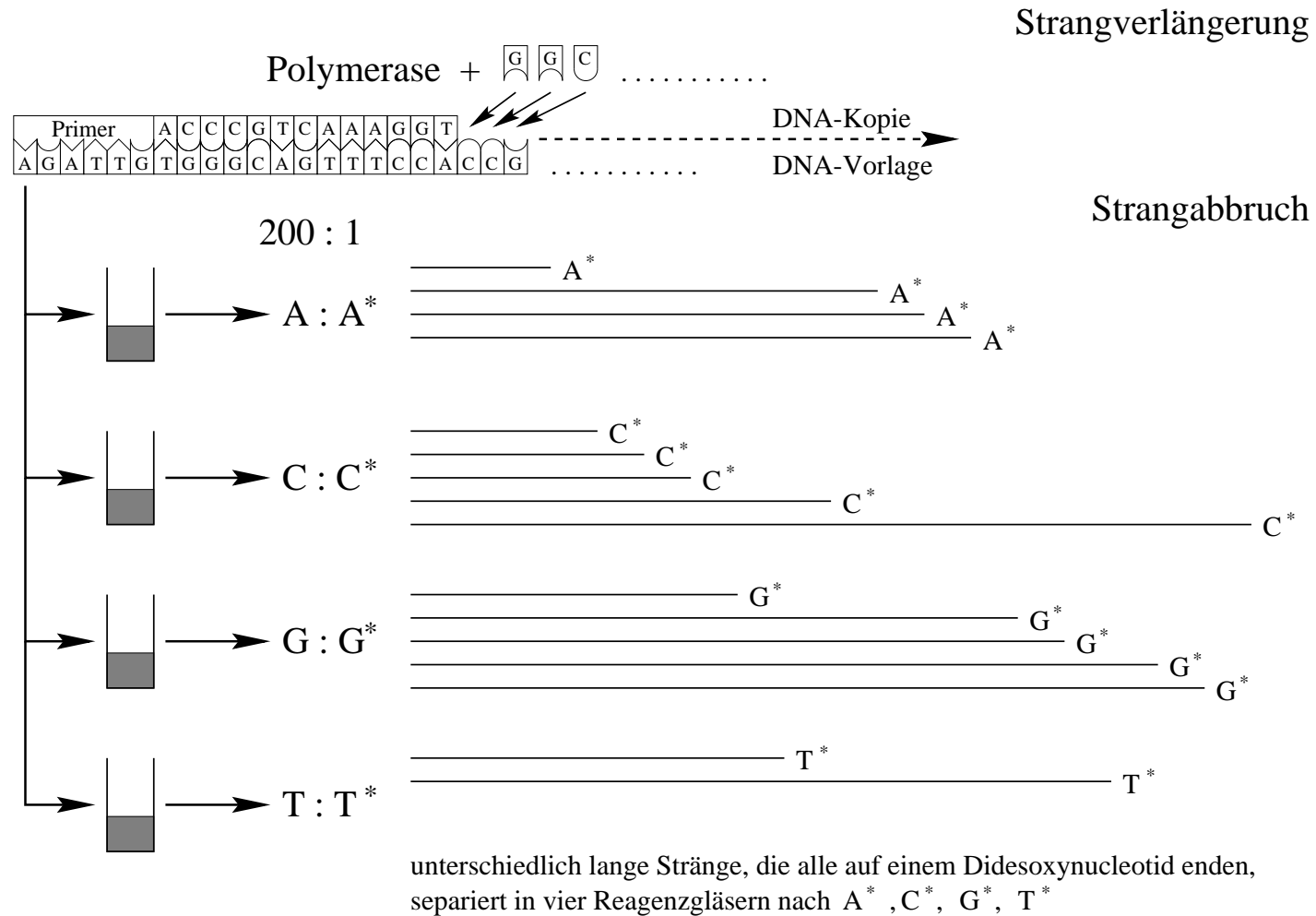
DNA-Sequenzierung nach Sanger – Didesoxy-Methode

- Voraussetzung: nur identische DNA-Einzelstränge oder DNA-Doppelstränge, beidseitig blunt endend und ohne Einzelstrangabschnitte im Eingangsreagenzglas
1. Melting (DNA-Einzelstränge unverändert, DNA-Doppelstränge denaturiert)
 2. Primer (kurzer DNA-Einzelstrang, antiparallel komplementär zum Beginn des zu sequenzierenden Stranges, etwa 20 Basen lang) annealt an den zu sequenzierenden DNA-Einzelstrang
 3. Hinzugabe der Desoxynucleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Bausteine)

DNA-Sequenzierung nach Sanger – Didesoxy-Methode

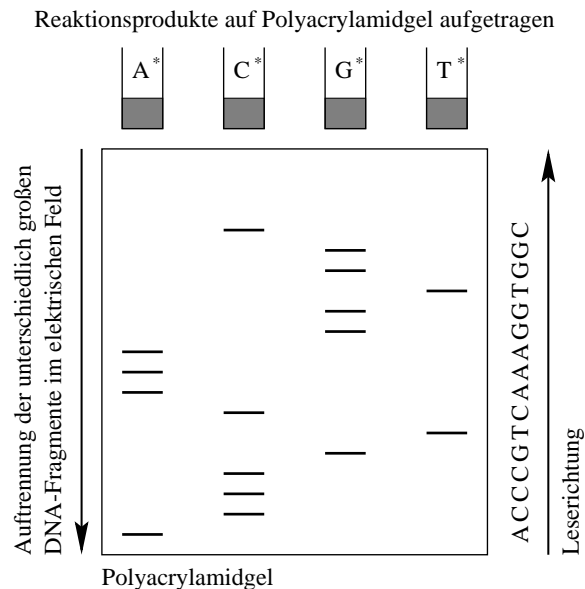
4. Aufteilung auf vier Reagenzgläser T1 bis T4
5. in T1 Hinzugabe des Didesoxynucleotids ddATP (im folgenden A*) im Verhältnis 1:200 zum dATP
6. analog ddCTP (C*) in T2, ddGTP (G*) in T3 und ddTTP (T*) in T4
7. dann Hinzugabe von Puffer und DNA-Polymerase, anschließend Polymerisation parallel in T1 bis T4
8. randomisiert anstelle des Desoxynucleotids das entsprechende Didesoxynucleotid eingebaut, das einen Abbruch der Strangverlängerung bewirkt.
9. in T1 entstehen unterschiedlich lange DNA-Stränge, die alle mit A* enden; analog in T2 bis T4

DNA-Sequenzierung nach Sanger – Didesoxy-Methode



DNA-Sequenzierung nach Sanger – Didesoxy-Methode

10. durch Polymerisation entstandene unterschiedlich lange DNA-Stränge auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel in einem elektrischen Feld aufgetrennt, wobei sich kürzere DNA-Stränge schneller vorwärtsbewegen als längere Stränge. Es entsteht ein Bandenmuster.
11. im Bandenmuster Reihenfolge von kürzerer zu jeweils nächstlängerer Bande betrachtet und jeder Bande das entsprechende Nucleotid zugeordnet



Sequencing – mögliche Seiteneffekte im Labor

- Seiteneffekte der Operationen Union, Melting, Annealing und Polymerisation
- Seiteneffekte der Operation Synthesis (liefert den Primer)
- Seiteneffekte der Operation Agarose Gel Electrophoresis, die sich auf Polyacrylamidgelen übertragen lassen. Auflösungsgrenze des Polyacrylamidgels: 1bp
- Mehrdeutigkeiten bei der Zuordnung der Nucleotidfolge, die allein aus der Gelanalyse nicht bereinigt werden können und eine Wiederholung der Sequenzierung notwendig machen
- Das zur Sequenzierung eingesetzte DNA-Material steht nach der Sequenzierung nicht mehr zur Verfügung!

Referenzen (Auswahl)

Alphay L.: DNA-Sequenzierung. Spektrum Akademischer Verlag
Heidelberg, Berlin, 1998

Berg P., Singer M.: Die Sprache der Gene. Grundlagen der
Molekulargenetik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg,
Berlin, Oxford, 1993

Dressler D., Potter H.: Katalysatoren des Lebens: Struktur und Wirkung
von Enzymen. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin,
New York, 1992

Hagemann R., Baldauf F.: Gentechnologische Arbeitsmethoden: ein
Handbuch experimenteller Techniken und Verfahren.
Akademie-Verlag Berlin, 1990

Referenzen (Auswahl)

Karlson P., Doenecke D., Koolman J.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1994

Letsinger R.L., Mahadevan V.J.: Oligonucleotide synthesis on a polymer support. J.Am.Chem.Soc. 87:3226-3227, 1965

Letsinger R.L., Finnan J.L., Heavner G.A., Lunsford W.B.: Phosphite coupling procedures for generating internucleotide links. J.Am.Chem.Soc. 97:3278, 1975

Martin R.: Elektrophorese von Nucleinsäuren. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1996

Referenzen (Auswahl)

Newton C.R., Graham A.: PCR. Spektrum Akademischer Verlag
Heidelberg, Berlin, 1997

Watson J.D., Crick F.H.: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.
Nature 171:737, 1953

Watson J.D.: Rekombinierte DNA. Spektrum Akademischer Verlag
Heidelberg, 1993