

Dechiffrieren der DNA



- Was ist Gentechnik?
- Polymerasekettenreaktion (PCR)
- Sequenzierung
 - Didesoxymethode bzw. Kettenabbruchverfahren
 - Gelelektrophorese
- DNA-Chips

Themen dieses Referats können klausurrelevant sein. Zuhören!

Was ist Gentechnik?

- Neukombination von Nukleinsäuren
 - Herstellung von Proteinen (Insulin)
 - Herstellung transgener Pflanzen/Tiere
 - Gendiagnostik
 - Somatische Gentherapie (Anticaline gegen Krebs)

Was ist Gentechnik **nicht**?

- Klassische Züchtungsverfahren
- (Extrakorporale) Befruchtungen
- Übertragung von Embryonen auf Leihmütter

Polymerasekettenreaktion (PCR) (1)

- **P**olymerase-**C**hain-**R**eaction
- Entwickelt in den achtziger Jahren von Kary Banks Mullis
- Vervielfältigung von DNA
- Nur Abschnitte, maximale Länge 40 kbp

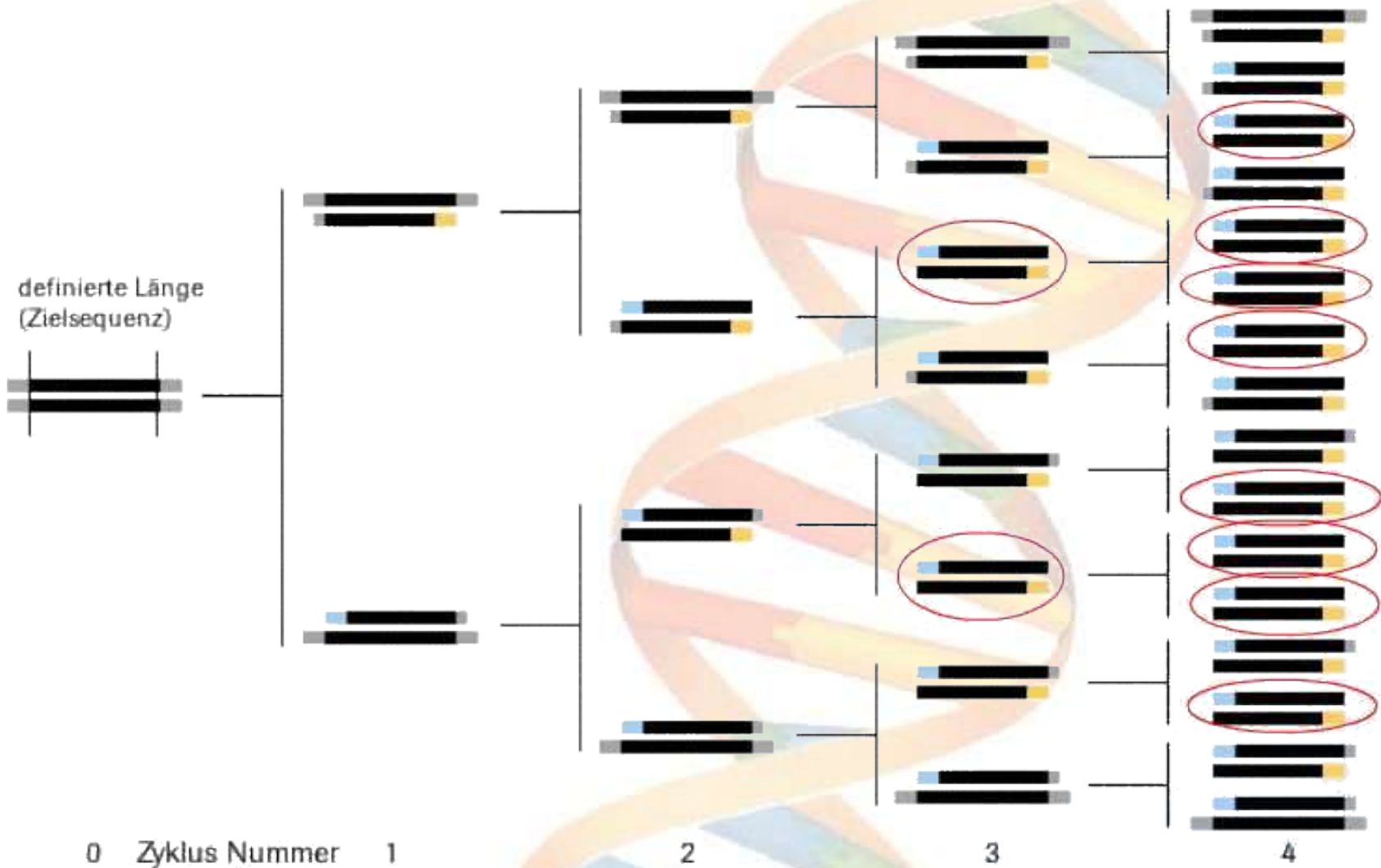
Polymerasekettenreaktion (PCR) (2)

- Drei immer wieder zu wiederholende Schritte
- 1. Schritt:
 - "Melting": Auftrennen der DNA
 - Temperatur ca. 96 °C
- 2. Schritt:
 - "Annealing": Anlagern von Primern
 - Temperatur ca. 50 - 62 °C
- 3. Schritt:
 - "Extension": taq-Polymerase baut die Stränge auf
 - Temperatur ca. 68 - 72 °C

Was ist Taq-Polymerase?

- DNA-Polymerase des Bakteriums „**Thermophilus aquaticus**“
 - lebt in heißen Geysiren
- Seine DNA-Polymerase hat die größte Effizienz bei 72 °C
- Jedoch keine Reperaturmechanismen

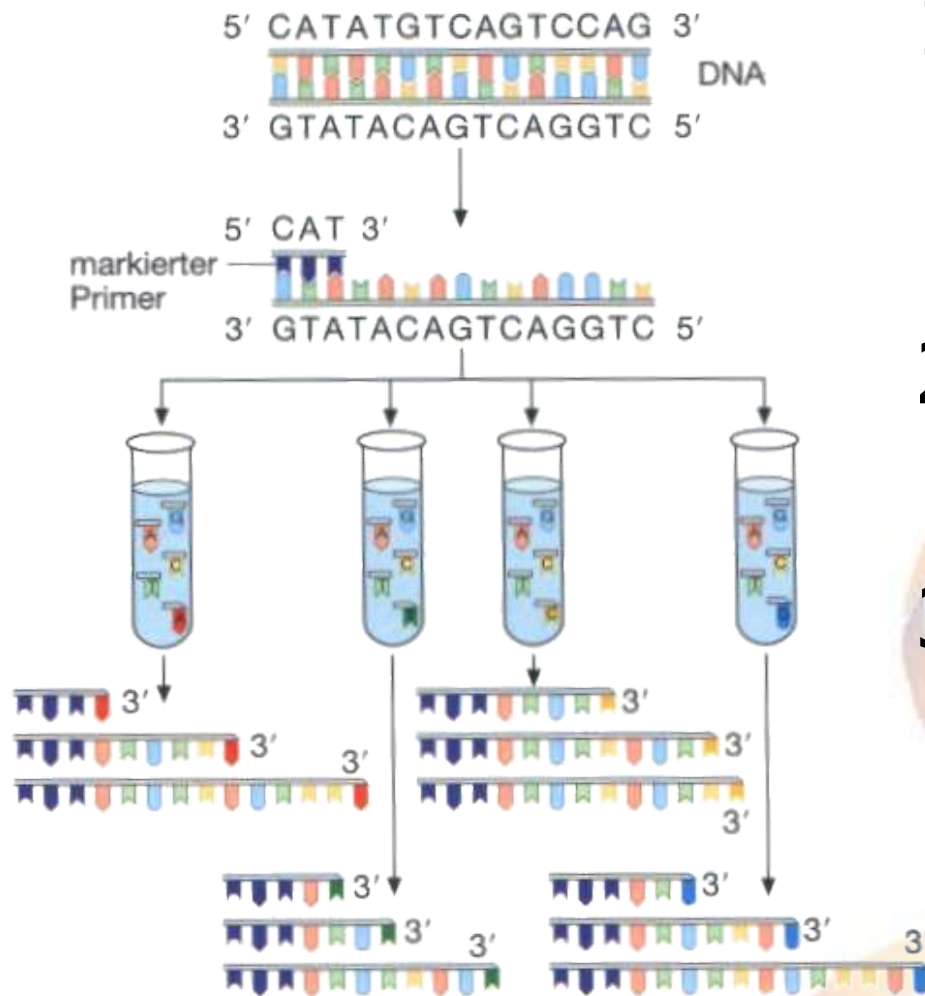
Polymerasekettenreaktion (PCR) (3)



Sequenzierung nach Sanger

- Auch Didesoxy-Sequenzierung oder Kettenabbruchverfahren genannt.
- Um 1975 entwickelt, 1977 mit erster vollständiger Sequenzierung eines Genoms vorgestellt.
- Verdrängte die zeitgleich und unabhängig entstandene Methode nach Maxam & Gilbert, da die nach Sanger schneller und leichter automatisierbar ist.

Ablauf der Sequenzierung (1)

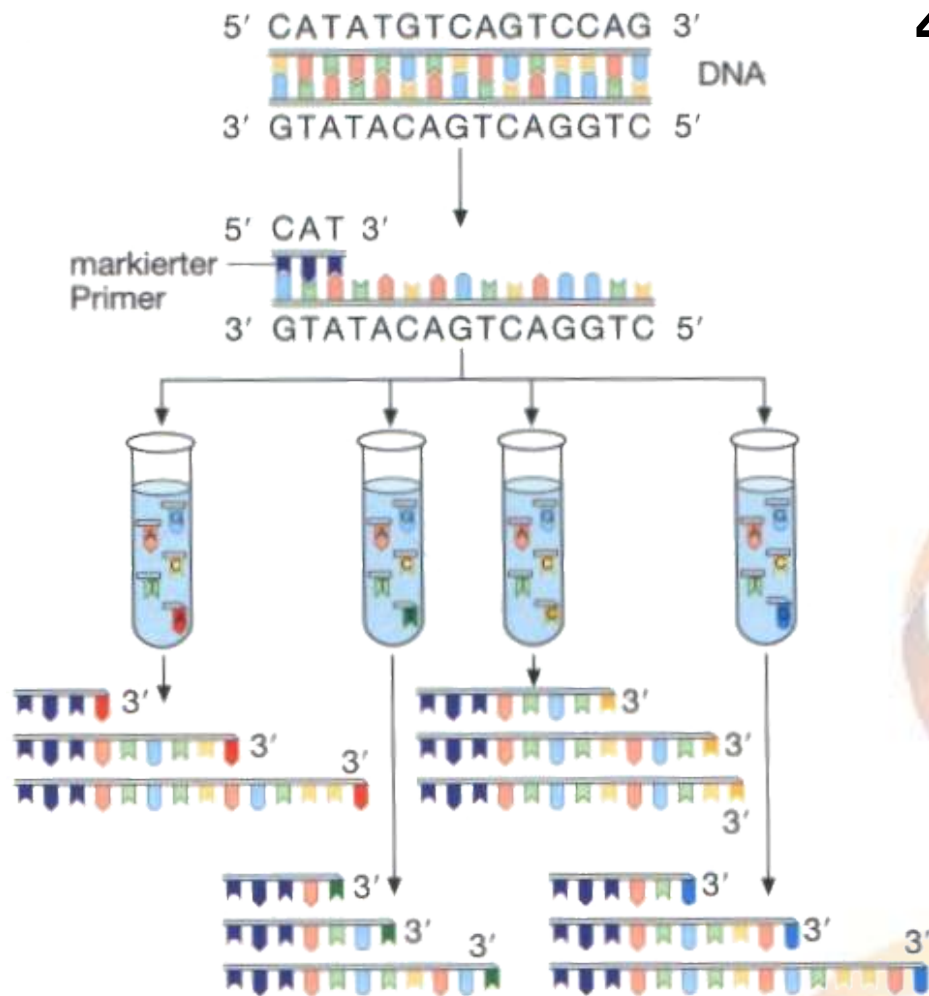


1) Mit Hilfe der PCR genügend DNA herstellen.

2) Denaturierung der DNA.

3) Hybridisierung der DNA mit radioaktiv oder fluoreszierend markierten Primern.

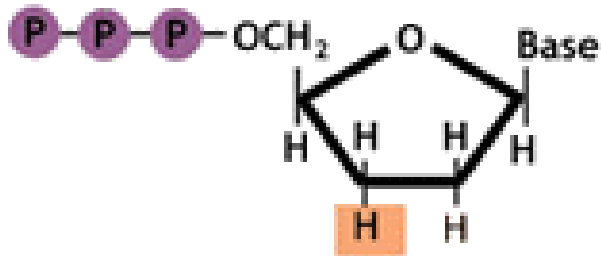
Ablauf der Sequenzierung (2)



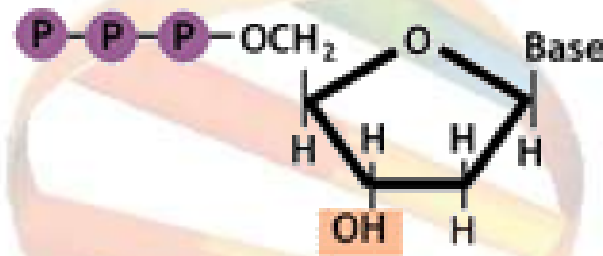
4) Verteilung auf vier Ansätze mit:

- Den vier verschiedenen Nukleotiden (A, C, G, T)
- Je einem anderen ddNTP (Dideoxynukleotid), 1 – 4%
- DNA-Polymerasen

Was ist ein ddNTP?



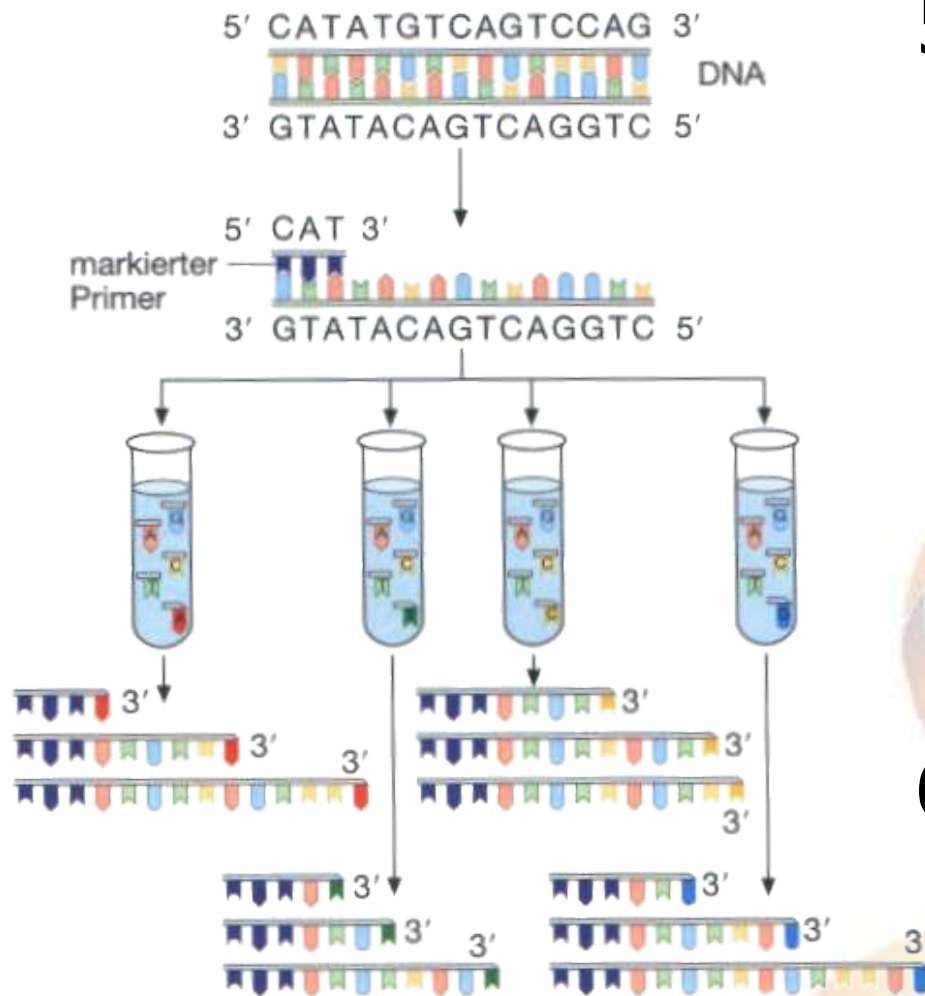
dideoxynucleotide (ddNTP)



deoxynucleotide (dNTP)

- ddNTP ist die Abkürzung für **D**idesoxynukleosid-**T**riphosphat oder kurz Didesoxy-Nukleotid
- Nukleotid ohne OH-Gruppe am 3'-Ende
- Synthese der DNA bricht ab, wenn ein ddNTP eingebaut wird.

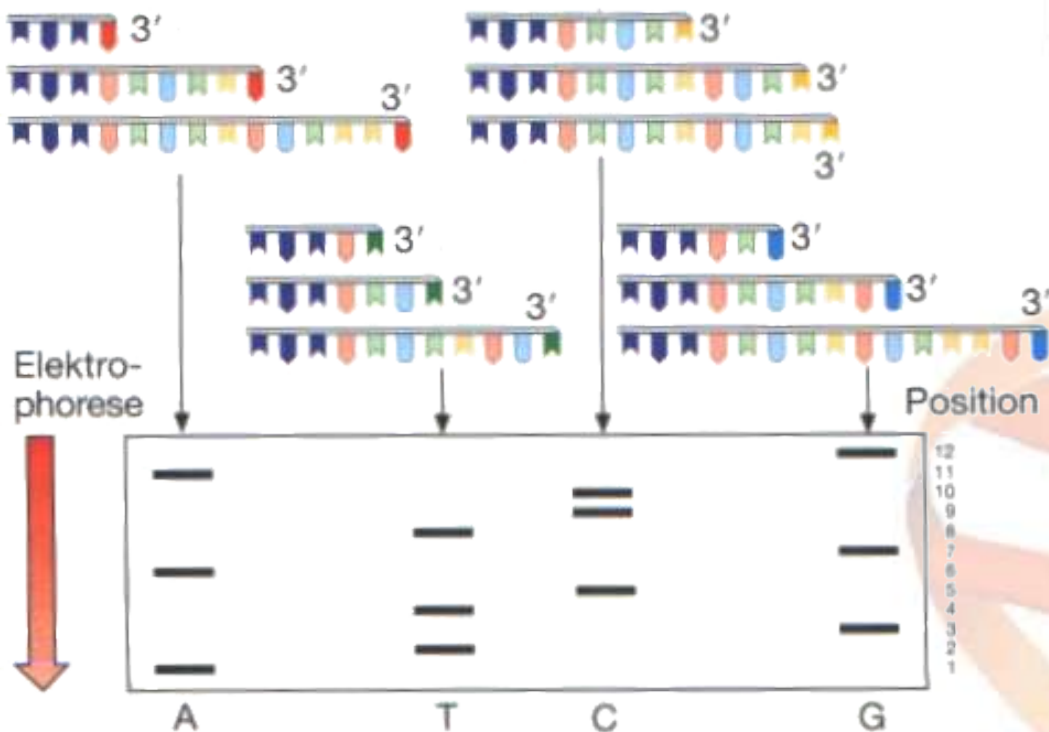
Ablauf der Sequenzierung (3)



5) DNA-Polymerase synthetisiert verschieden lange DNA-Bruchstücke, die immer hinter einem bestimmten Nukleotid abbrechen.

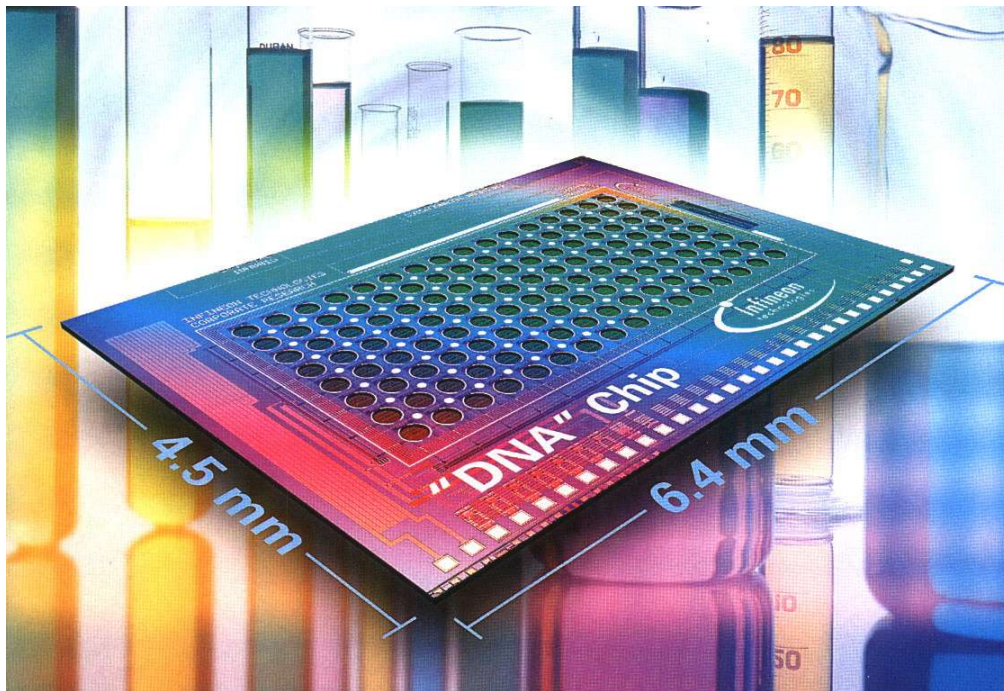
6) Gelelektrophorese

Gelelektrophorese



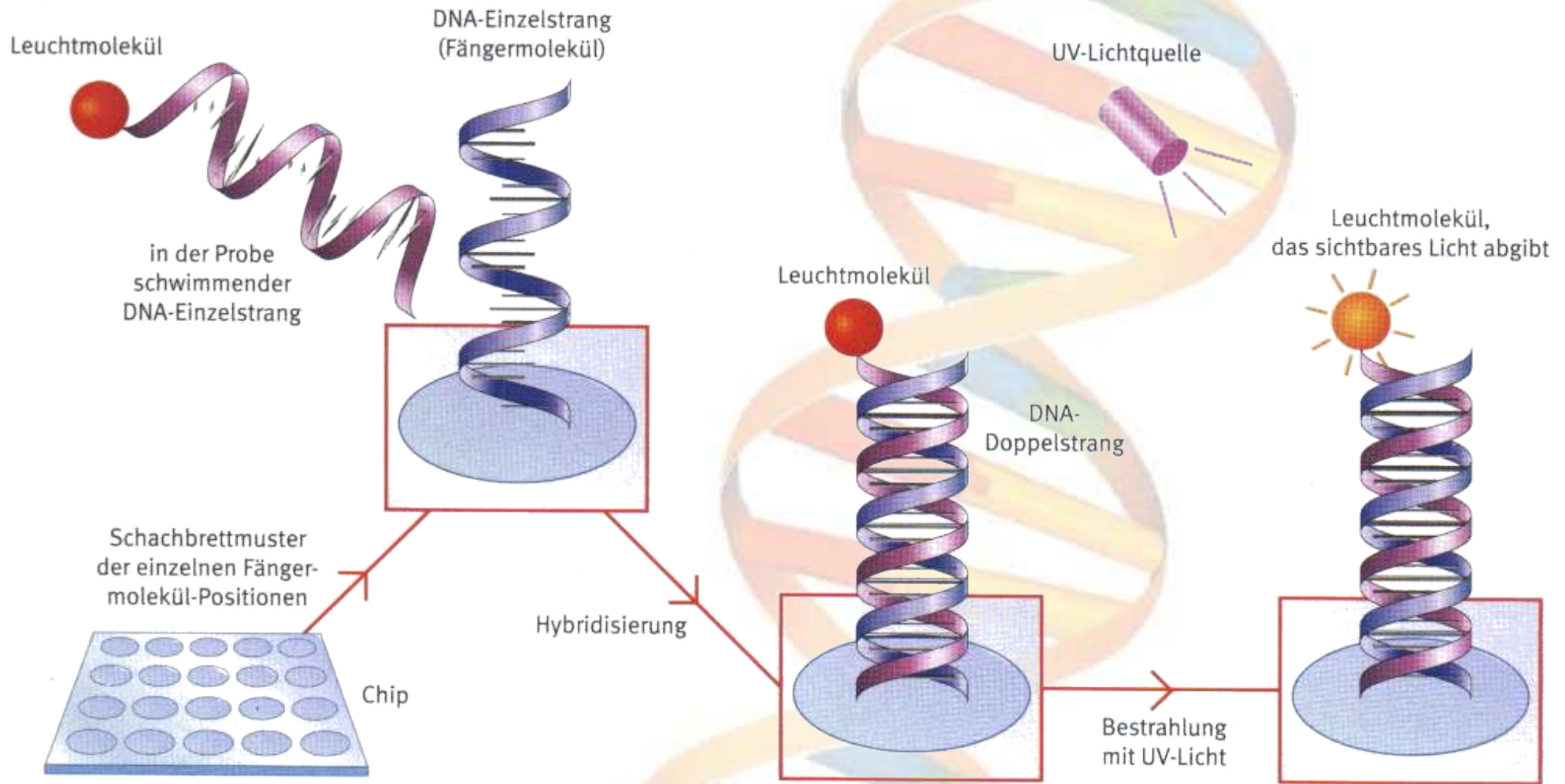
- An einem Gel wird eine Spannung angelegt.
- Da die DNA-Fragmente negativ geladen sind wandern diese durch das Gel.
- Kleine sind dabei schneller als große.

DNA-Chips

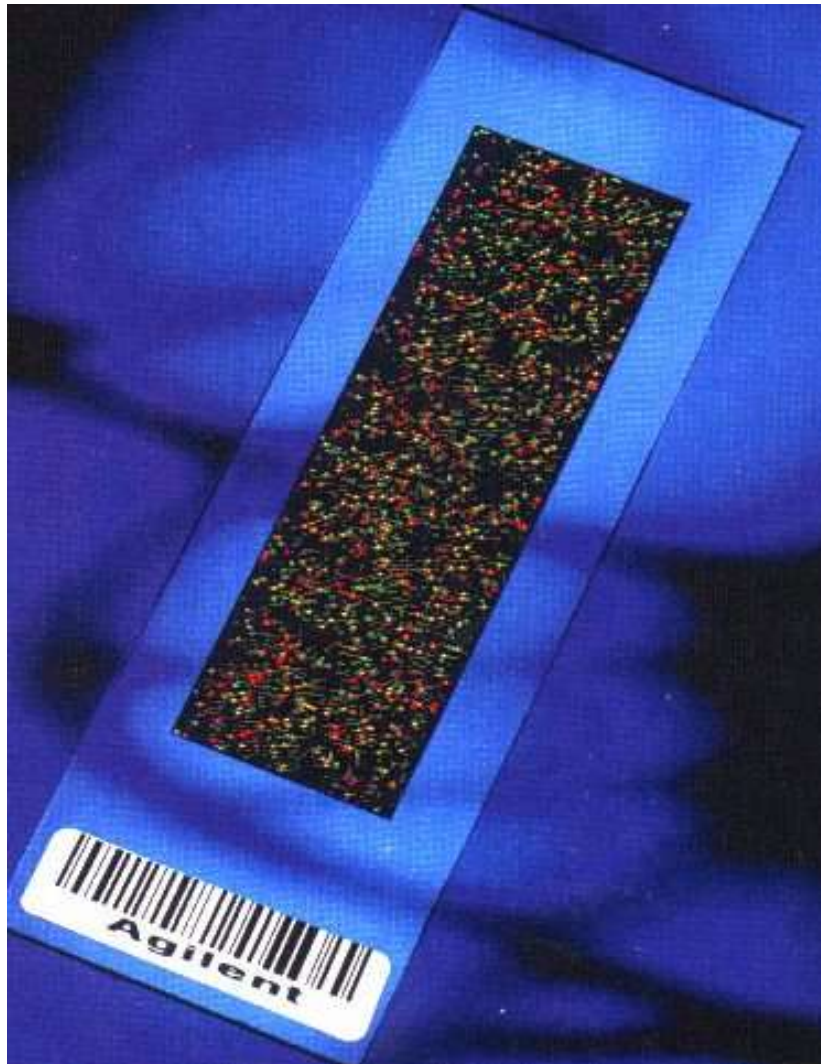


- Kleine Plättchen aus Trägermaterial (i.d.R. Glas oder Kunststoff)
- Schachbrettartiges Raster von verschiedenen, bekannten DNA-Oligonukleotiden

Funktionsweise von DNA-Chips



Auswertung eines DNA-Chips



- Bei geeigneter Beleuchtung (i.d.R. UV-Licht) kann die Aktivität unterschiedlicher Gene abgelesen werden.
- Vor kurzem wurde auch ein elektrisches Auswertungssystem entwickelt.

Vorteile und Anwendung

- Schnelle und kostengünstige Analyse von Genaktivität.
- Mikrobielle Diagnostik (Nachweis von Keimen in Wasser, Lebensmitteln etc.)
- Vergleich von eng verwandten pathogenen und nicht pathogenen Bakterienstämmen.
- Personalisierte Medizin

Noch Fragen?

**Wir bedanken uns für eure
Aufmerksamkeit!**