

Thema Gentechnologie

Erwin R. Schmidt

Institut für Molekulargenetik

3. VL

05. 05. 2009

Plasmide als Vektoren

Der Replikationsursprung
bestimmt die Art der Replikation

ColE1- ori:

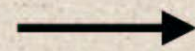
relaxierte Replikation



multicopy Plasmide

F-Plasmid - ori:

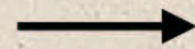
Stringente Replikation



„single copy“ Plasmide

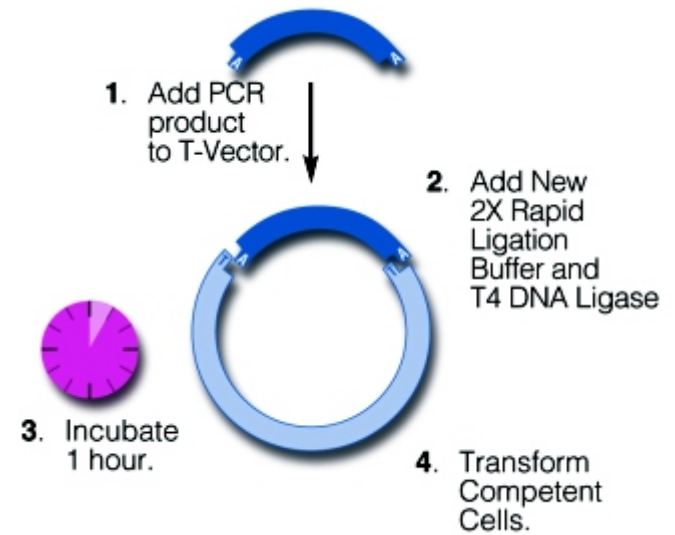
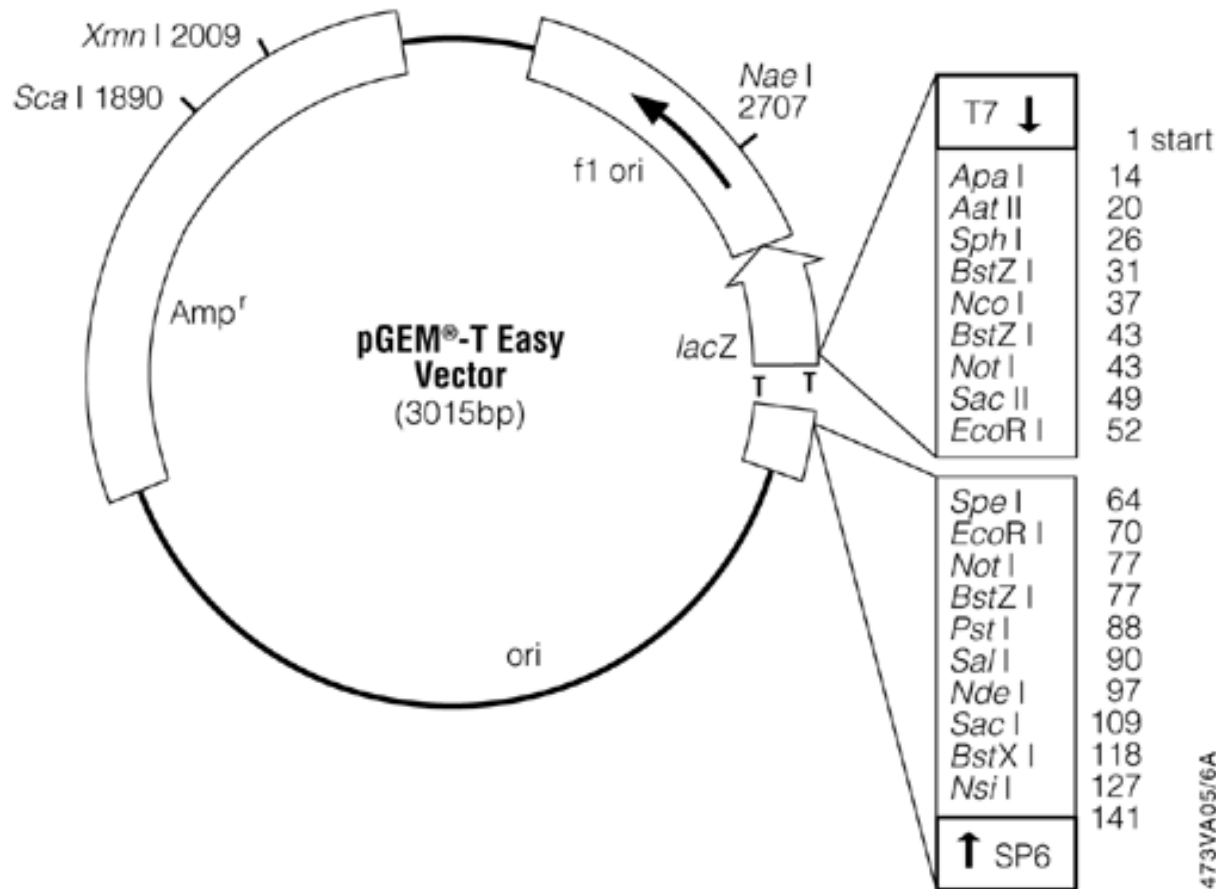
f1-Phagen - ori:

Einzelstrang Replikation



„single strand“ Phagen

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten



1473VA05/6A

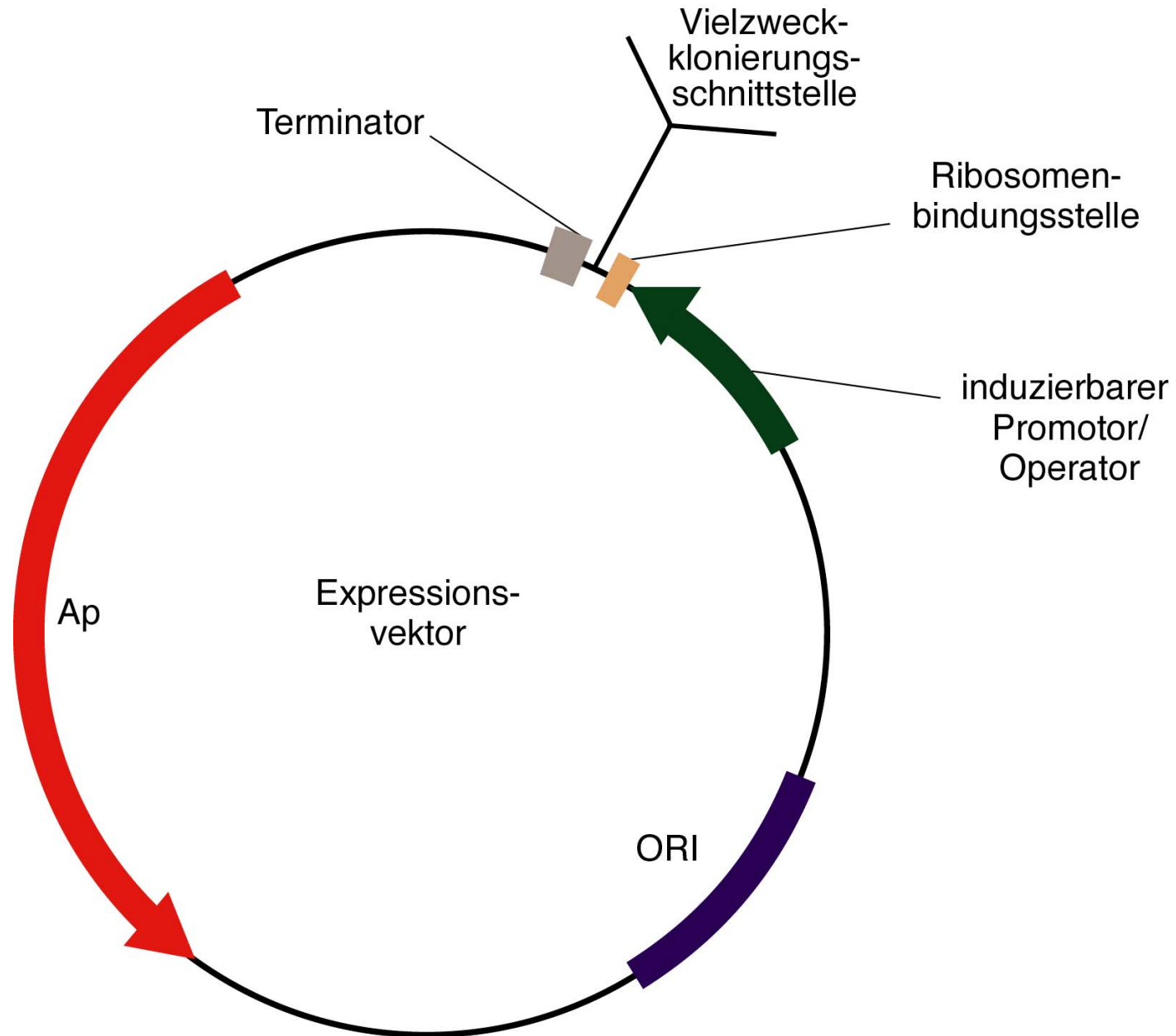
Eigenschaften einiger PCR-Polymerasen

Table 1. Comparison of PCR Product Properties for Some Thermostable DNA

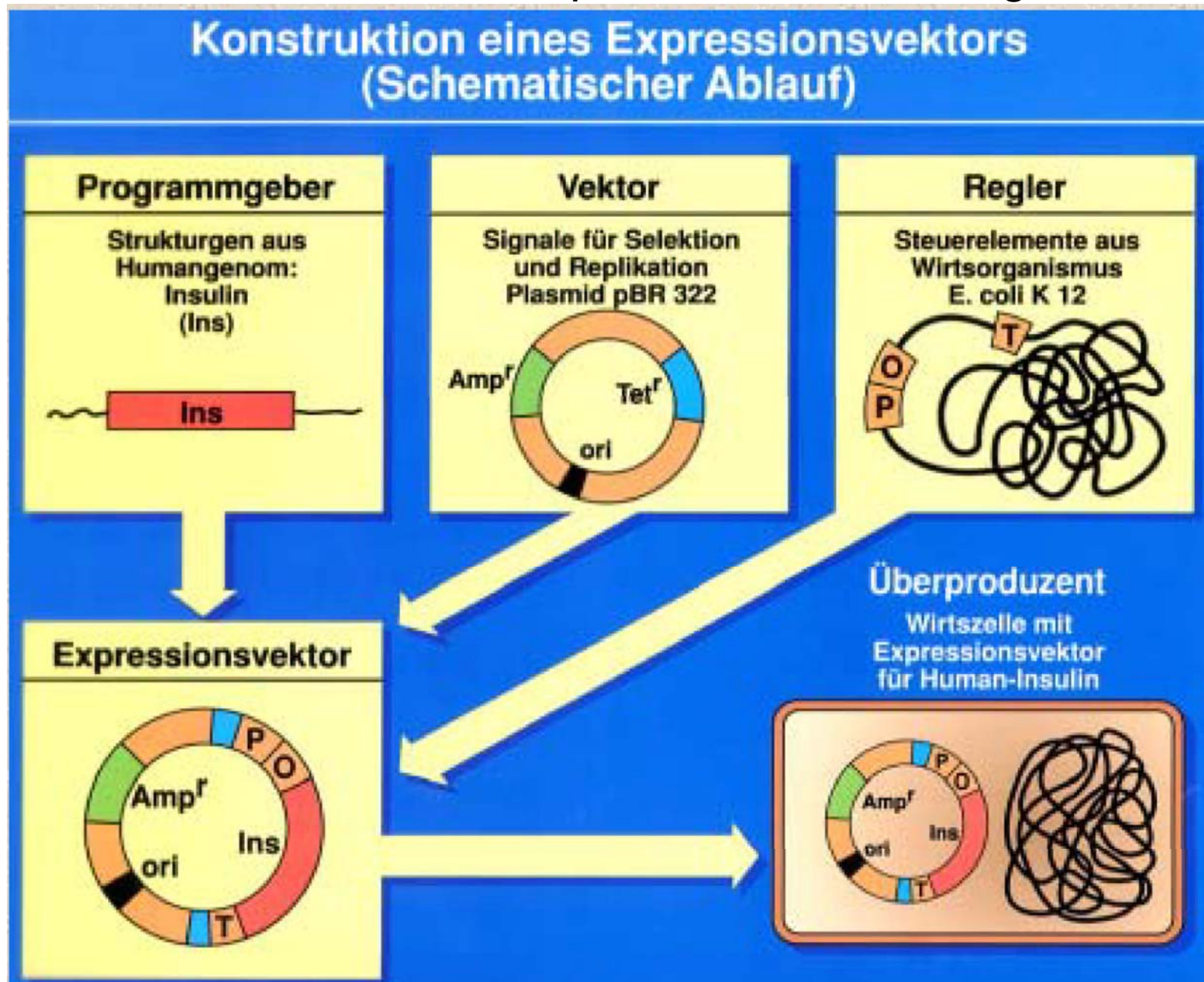
Characteristic	Polymerases.						
	Taq/ AmpliTaq®	VentR®/ Tfl	Tth	Deep (Tli)	VentR®	Pfu	Pwo
Resulting DNA ends	3' A	>95% 3' A	>95% 3' A	Blunt	Blunt	Blunt	
5'→3' exonuclease Activity	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No
3'→5' exonuclease activity	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes

N.A.: not available

Für die Expression fremder Gene gibt es spezielle Expressionsvektoren mit Signalsequenzen für die korrekte Transkription und Translation in Bakterien



Plasmidvektoren, zur Expression von Fremdgenen



Komponenten eines bakteriellen Expressionsvektors

Künstliche Promotoren verstärken die Expression

	-35 Region	-10 Region
Konsensus-sequenz	... TTGACA 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17	TATAAT ...
<i>lac</i>	GGCTTTACA	CTTTATGCTTCCGGCTCGTATATTGT
<i>trp</i>	CTGTTGACA	ATTAATCAT CGAACTAG TTA ACTAG
λP_L	GTGTTGACA	TAAATACCA CTGGCGGT GATACTGA
<i>rec A</i>	CAC TTGATA	CTGTATGAA GCATACAG TATAATTG
<i>tac I</i>	CTGTTGACA	ATTAATCAT CGGCTCG TATAATGT
<i>tac II</i>	CTGTTGACA	ATTAATCAT CGAACTAG TTTAATGT

} x8, x11

Abb. 2.70 Nucleotid-Sequenz der -10- und -35-Regionen von vier natürlichen Promotoren und zwei Hybrid-Promotoren

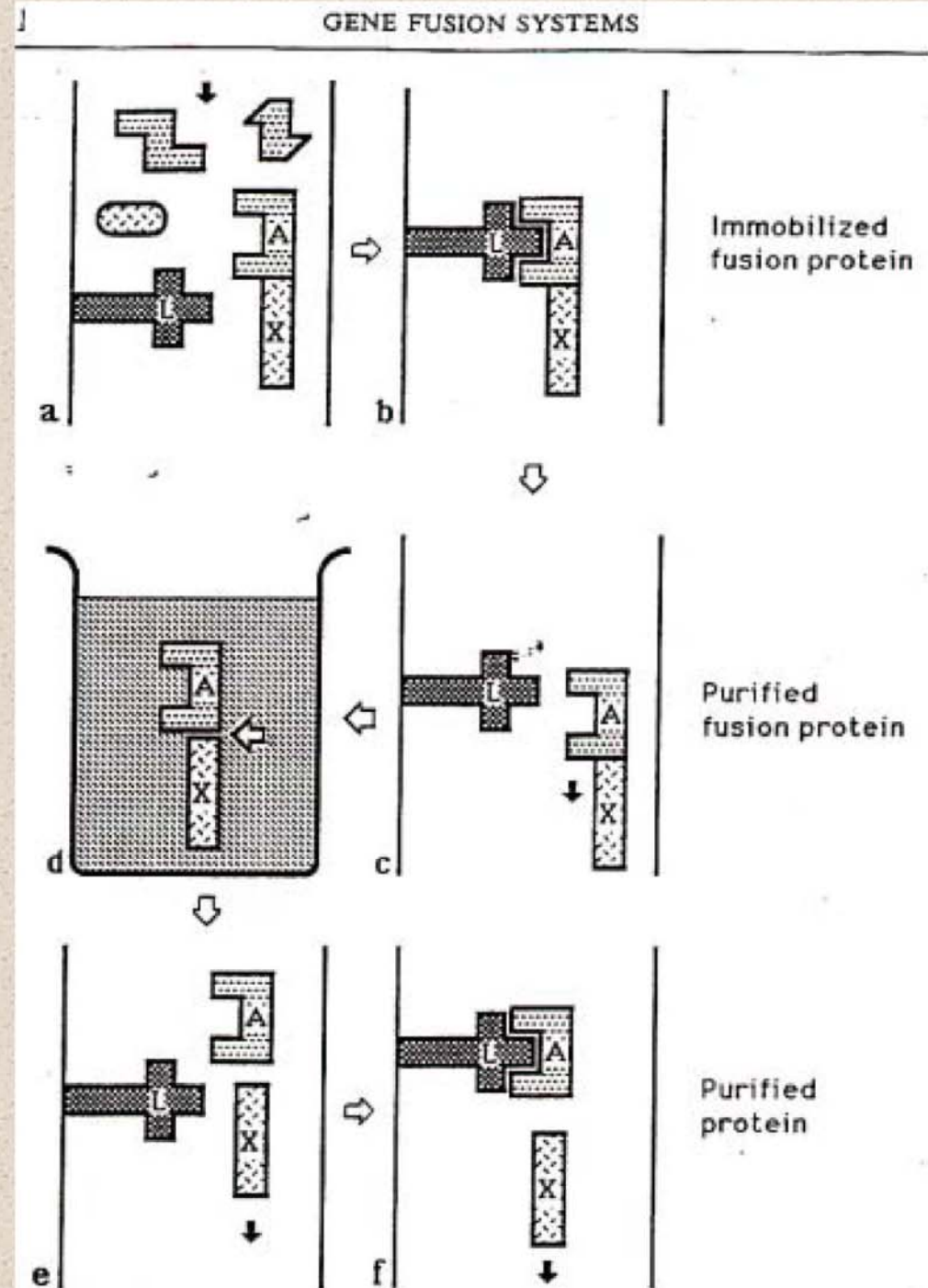
Komponenten eines bakteriellen Expressionsvektors

UAAGGAGGU

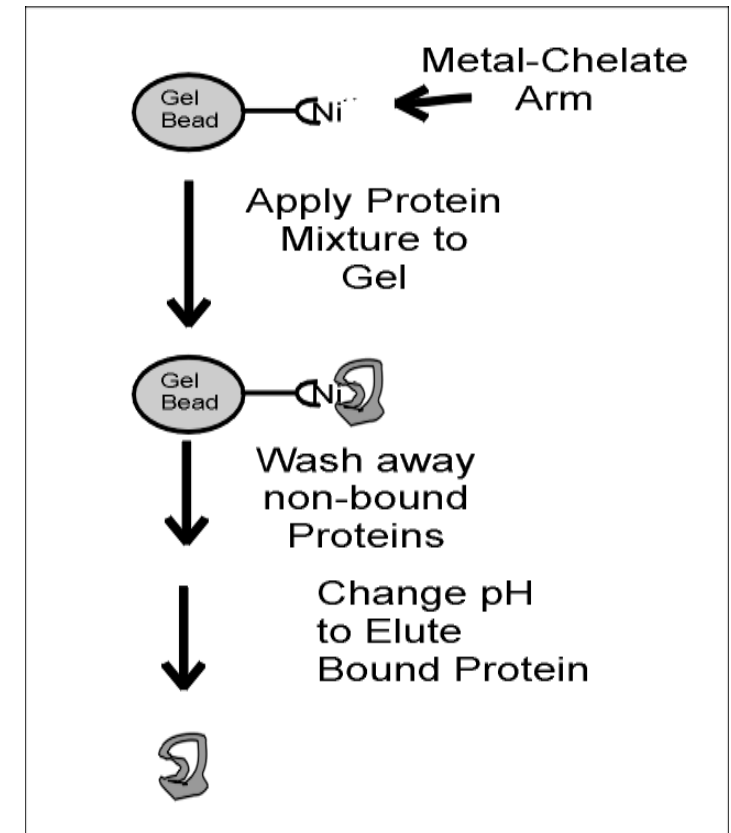
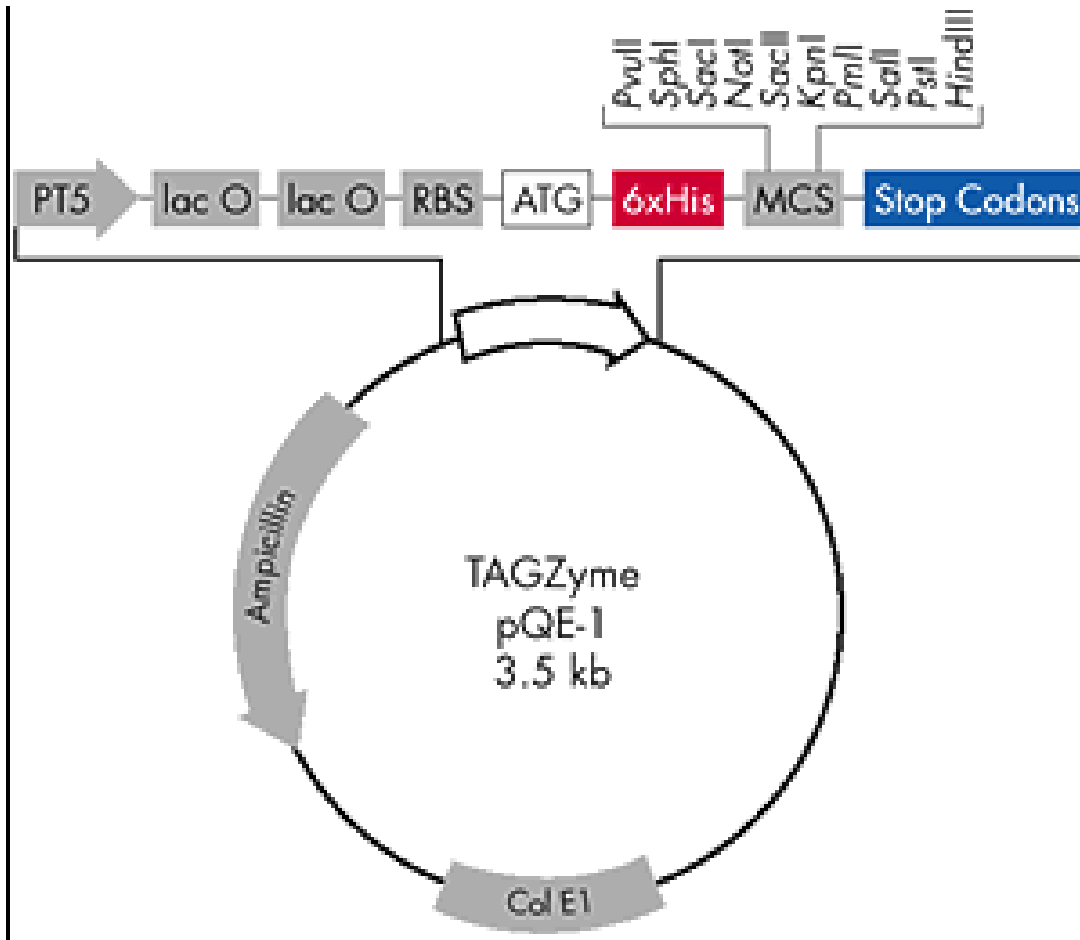
Die Shine-Dalgarno-Sequenz am Anfang der mRNA ist notwendig, um die Ribosomenbindung an die mRNA zu ermöglichen

Bakterielle Expression

Zur schnellen
Reinigung des
exprimierten
Proteins dienen
Fusionskonstrukte

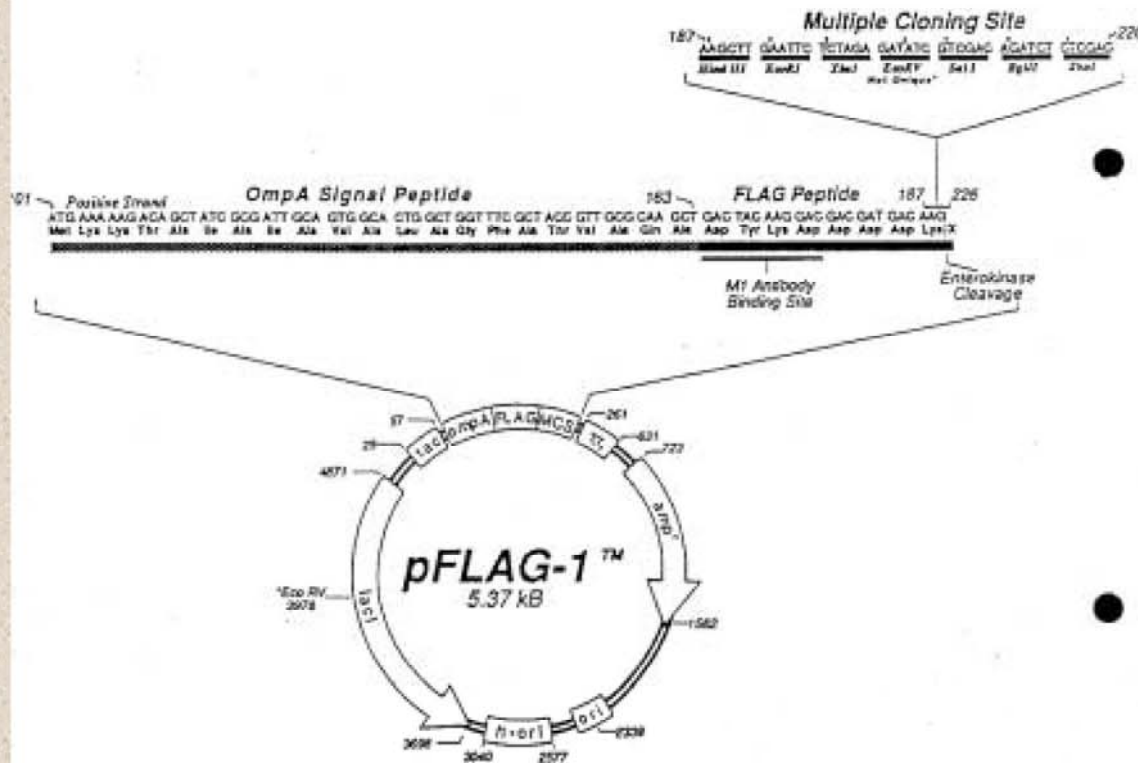


Expression von Fusionsproteinen mit sog. „His-tag“

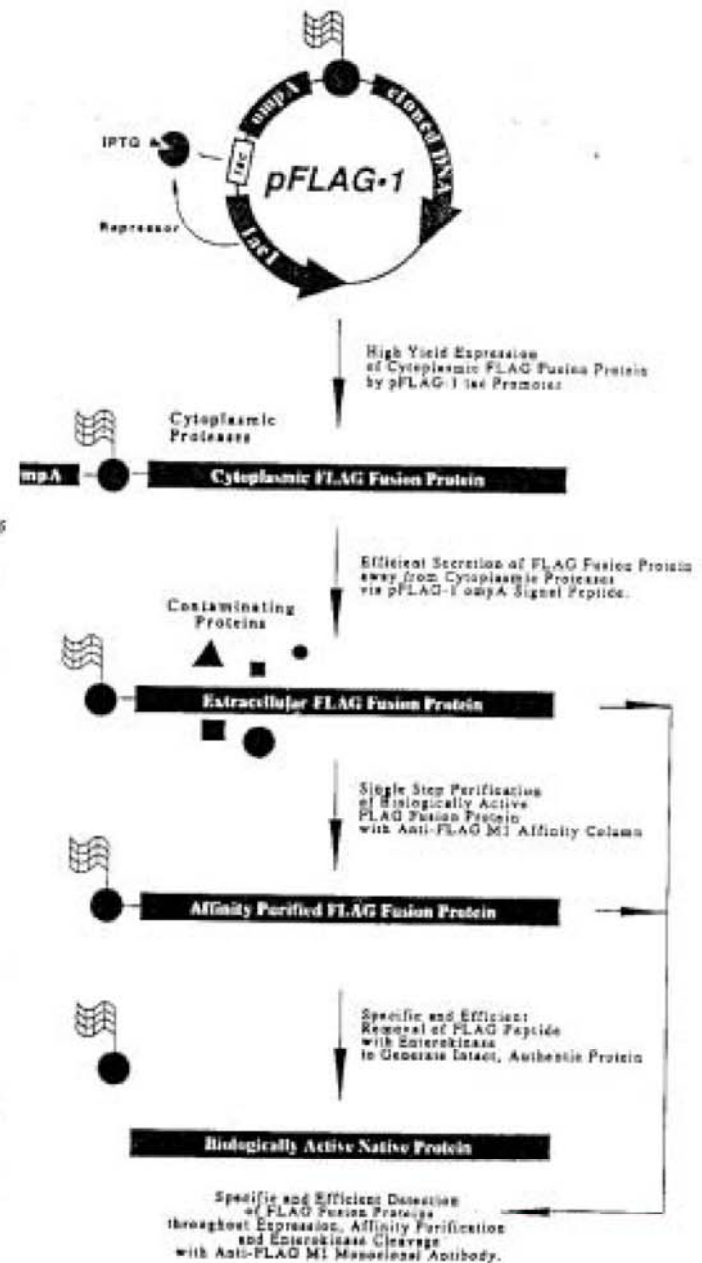


„Flag“-Vektoren dienen der Expression und schnellen Reinigung von Fusions-Proteinen in Bakterien

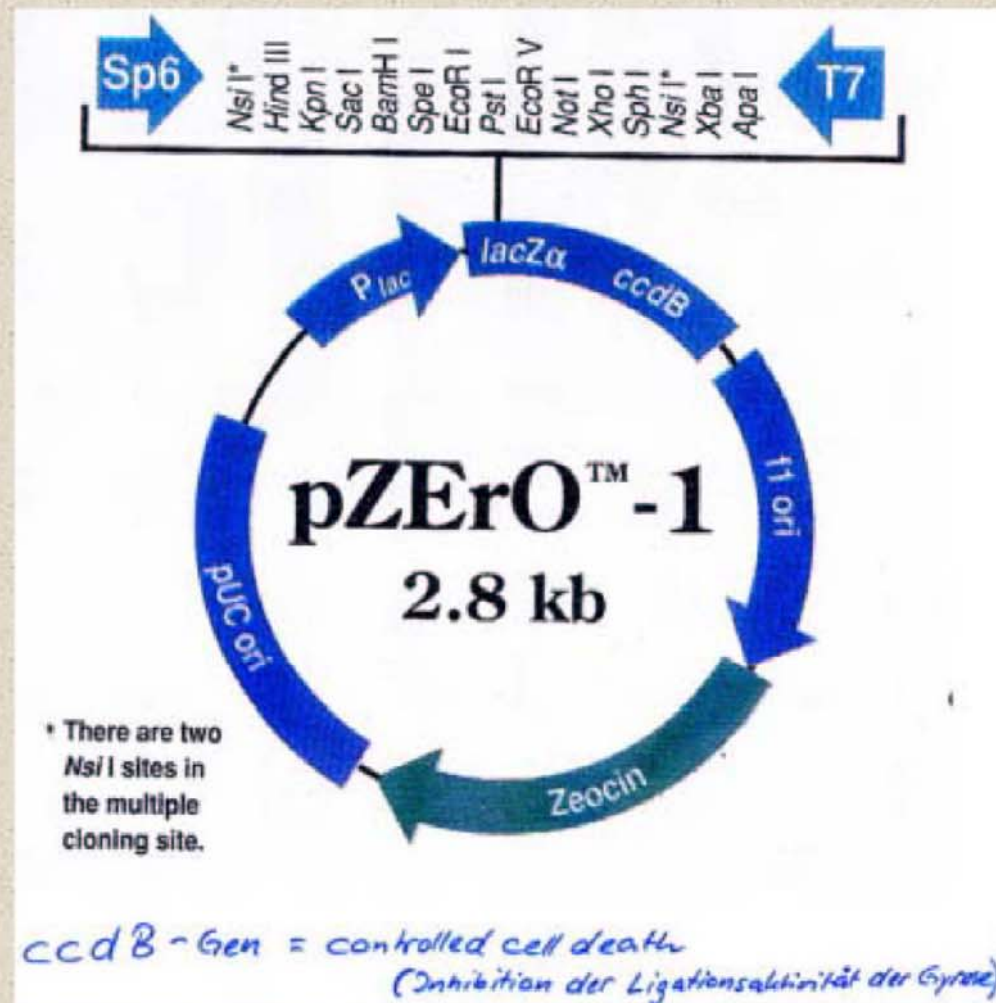
Figure 5
pFLAG-1 Expression Vector



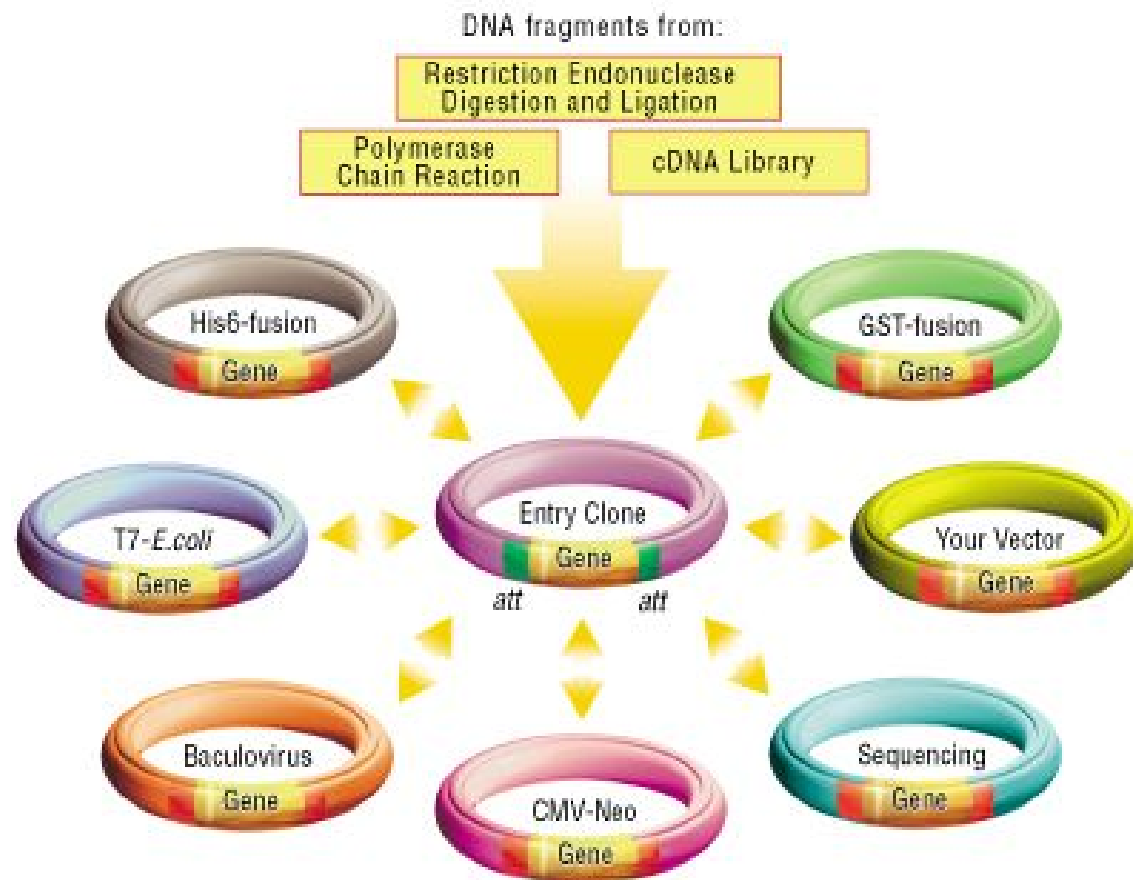
FLAG Strategy for Protein Expression, Detection and Purification



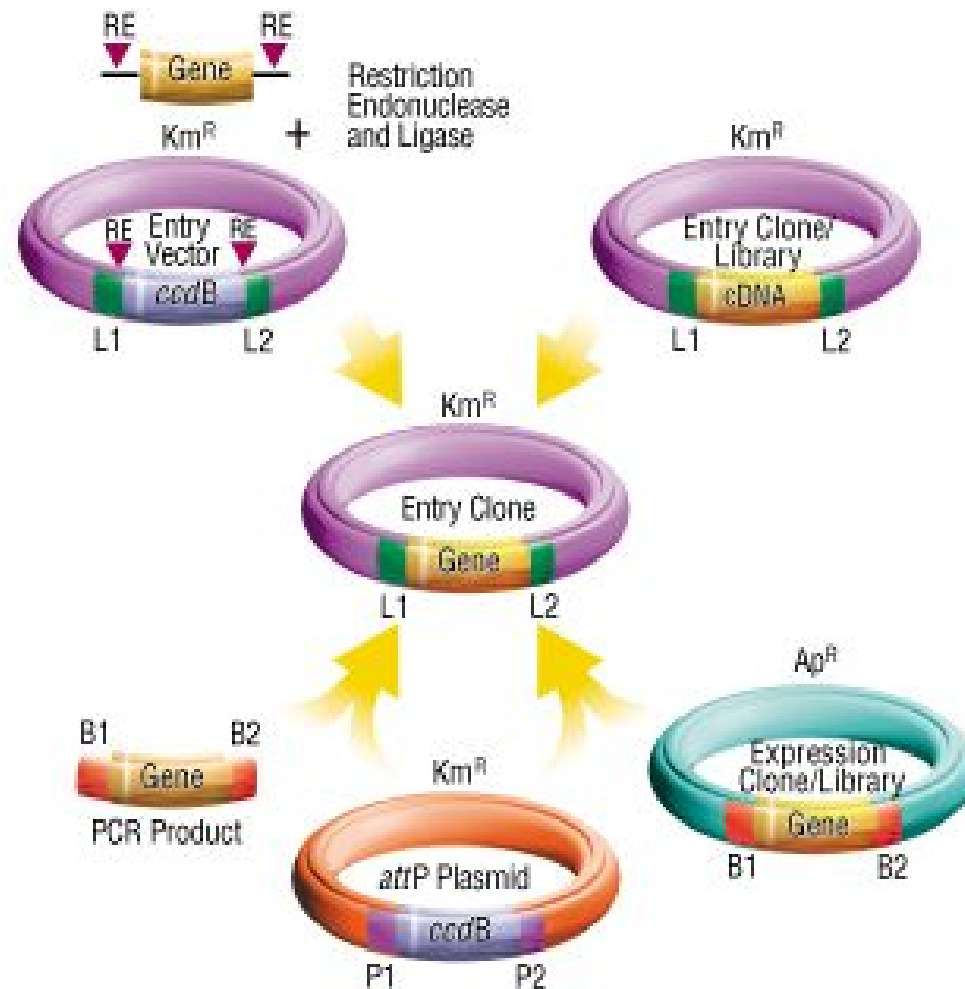
Suizidvektoren bringen alle Zellen um, die nicht gentechnisch verändert sind



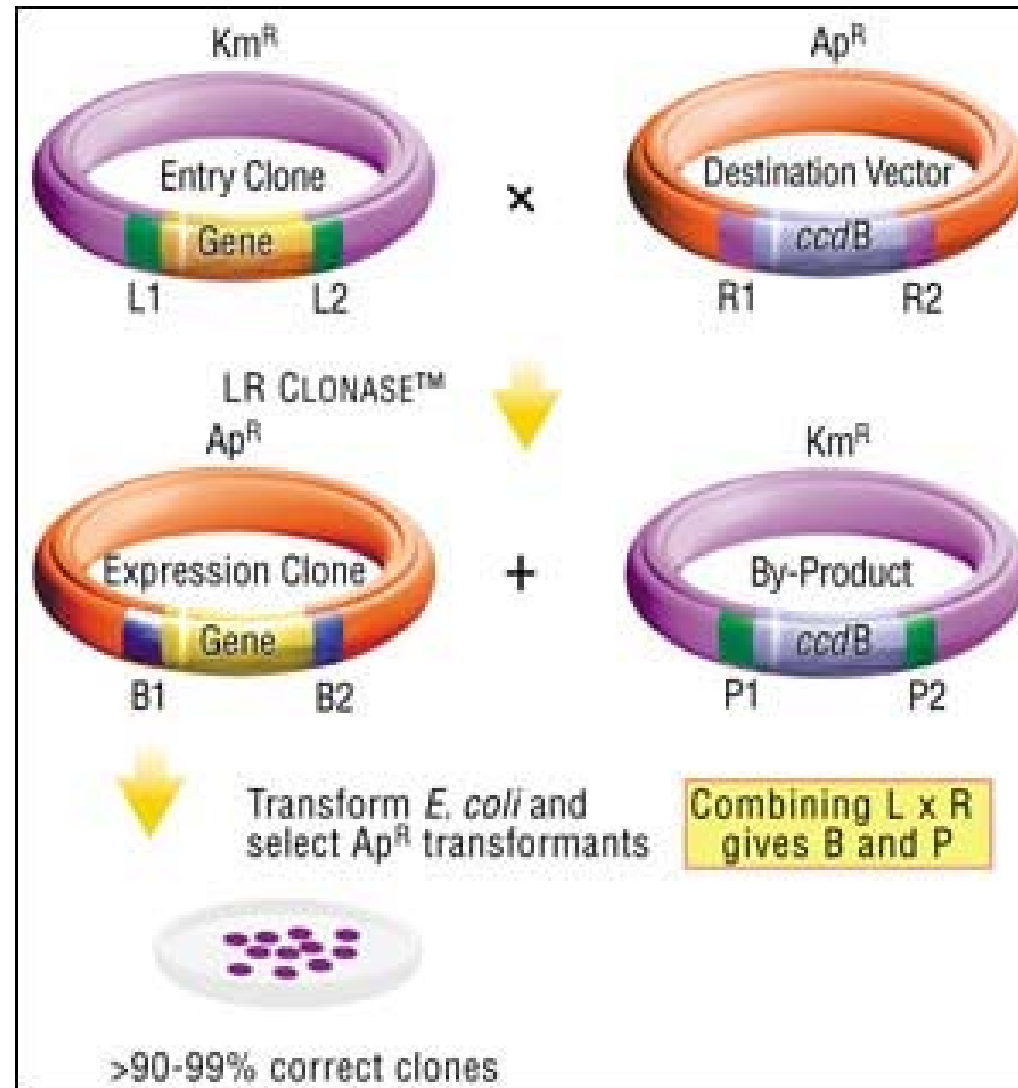
„Gateway“-Klonierungssystem



„Gateway“-Klonierungssystem

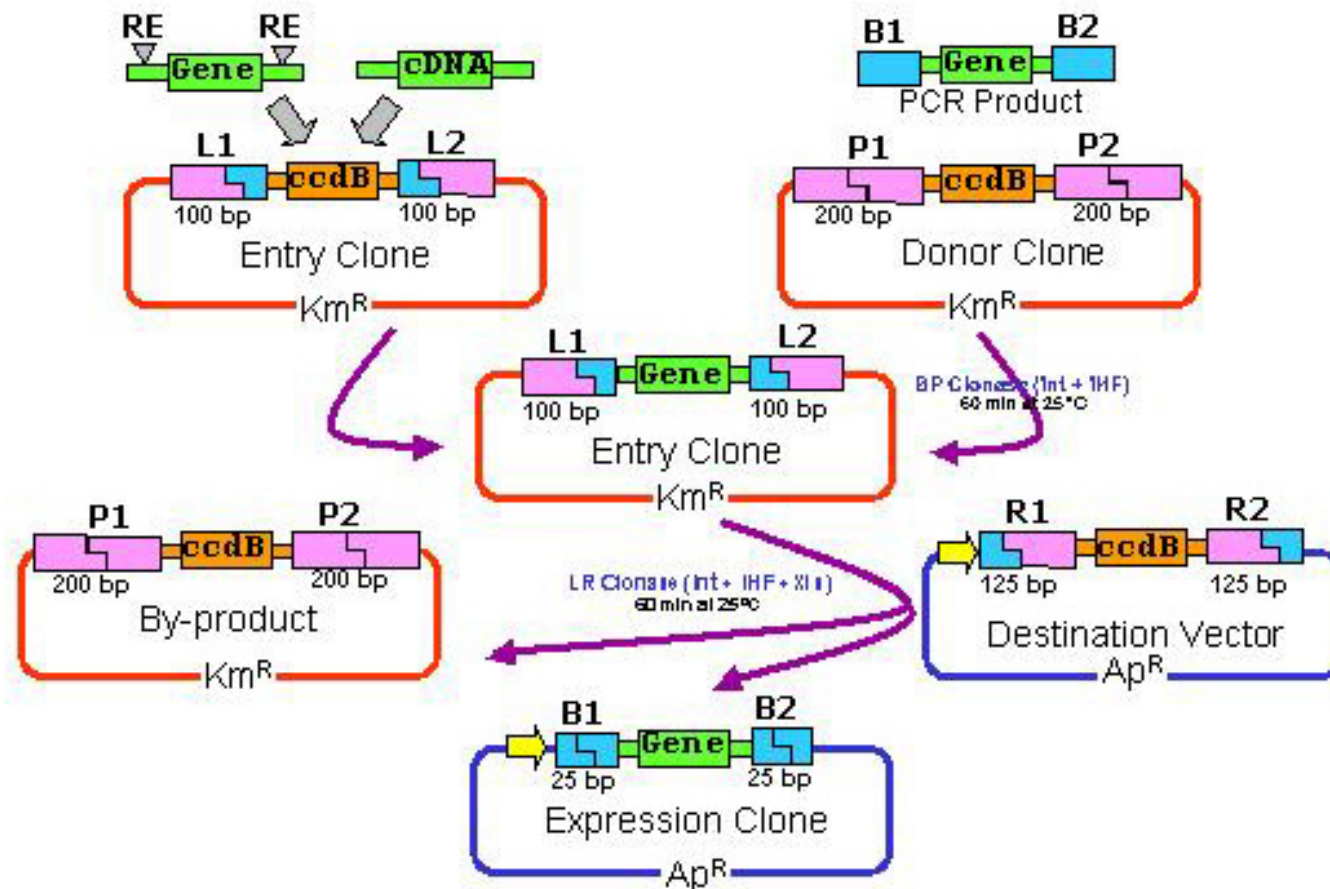


„Gateway“-Klonierungssystem



„Gateway“-Klonierungssystem

GATEWAY SYSTEM



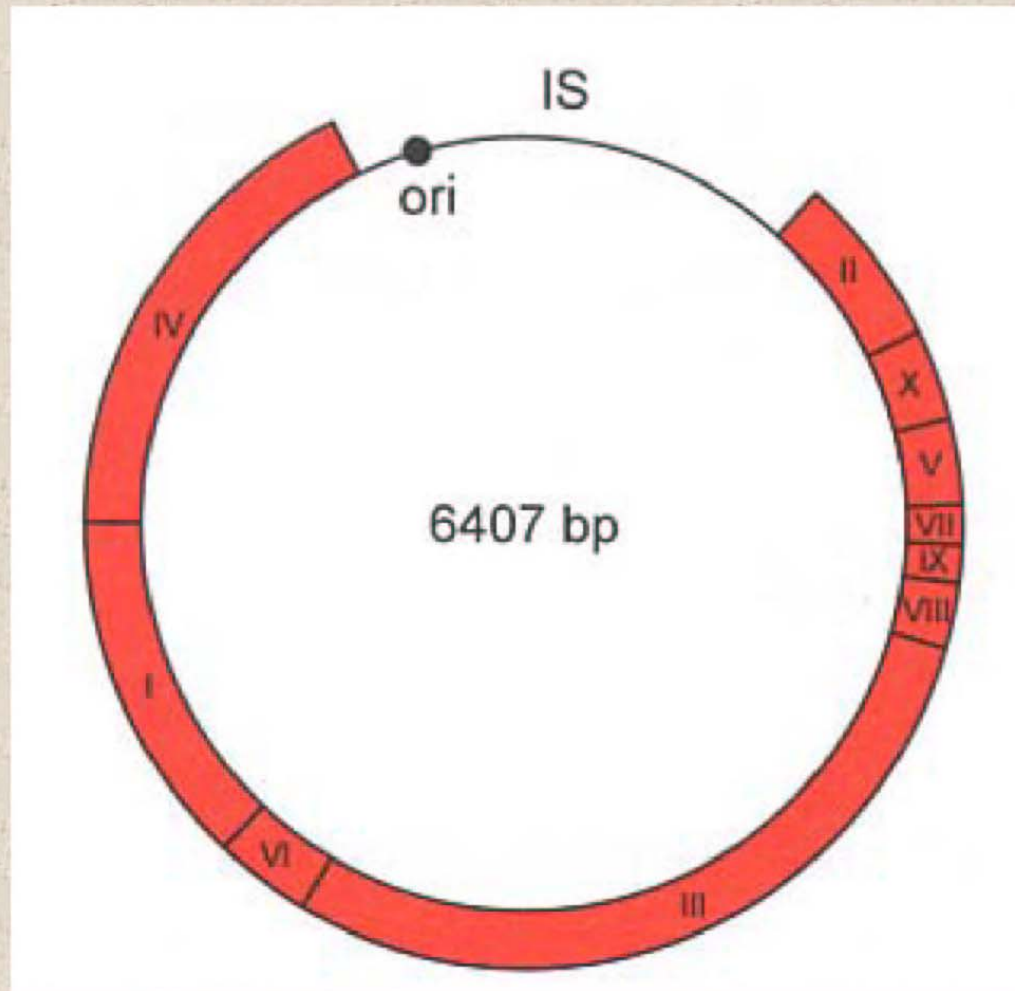
Vektoren auf der Basis von Bakteriophagen

M13/f1-Phage

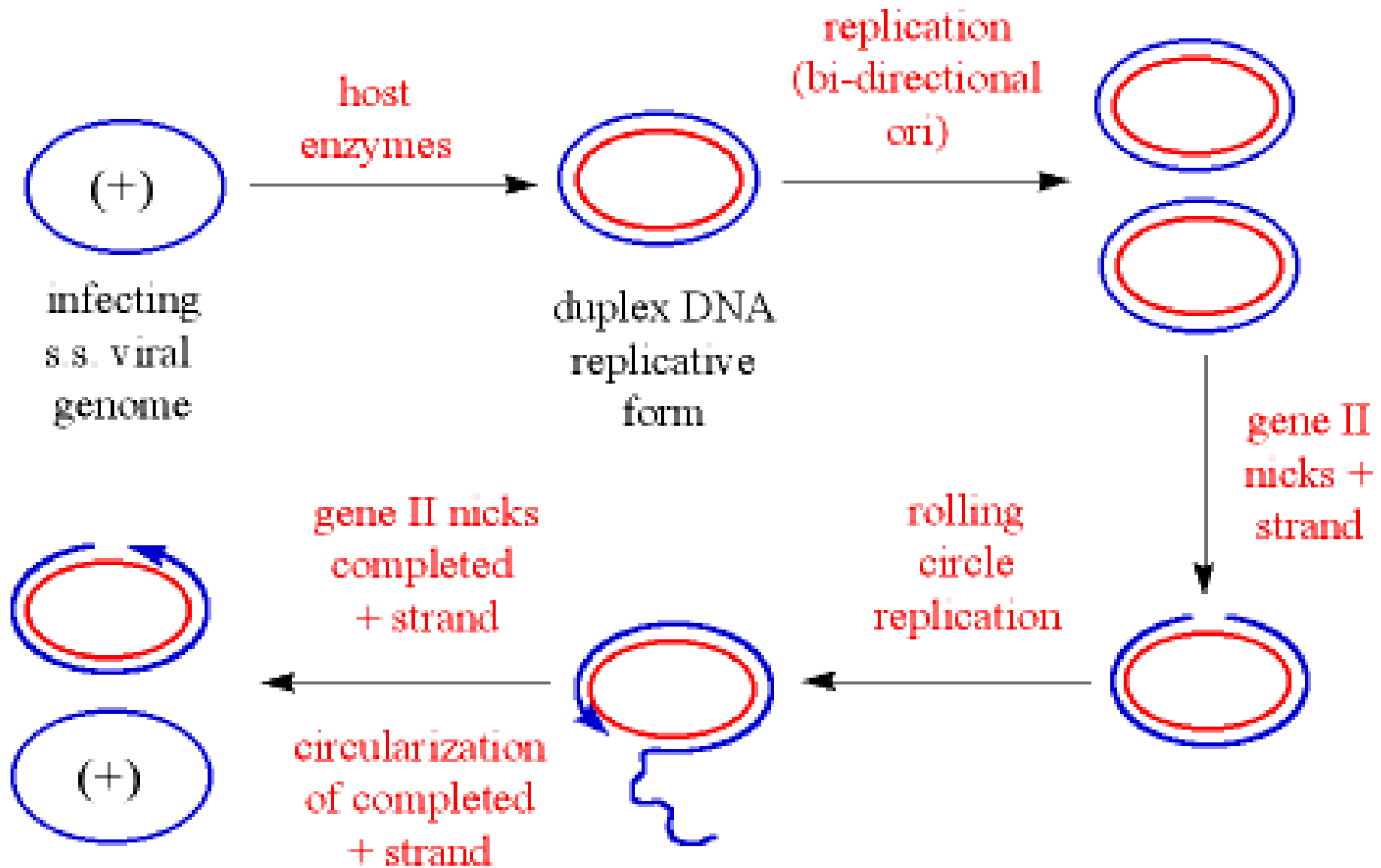
λ -Phage

P1-Phage

Bakteriophage- M13



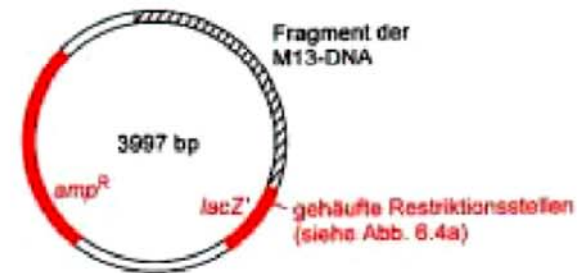
Replikation M13-Bakteriophage



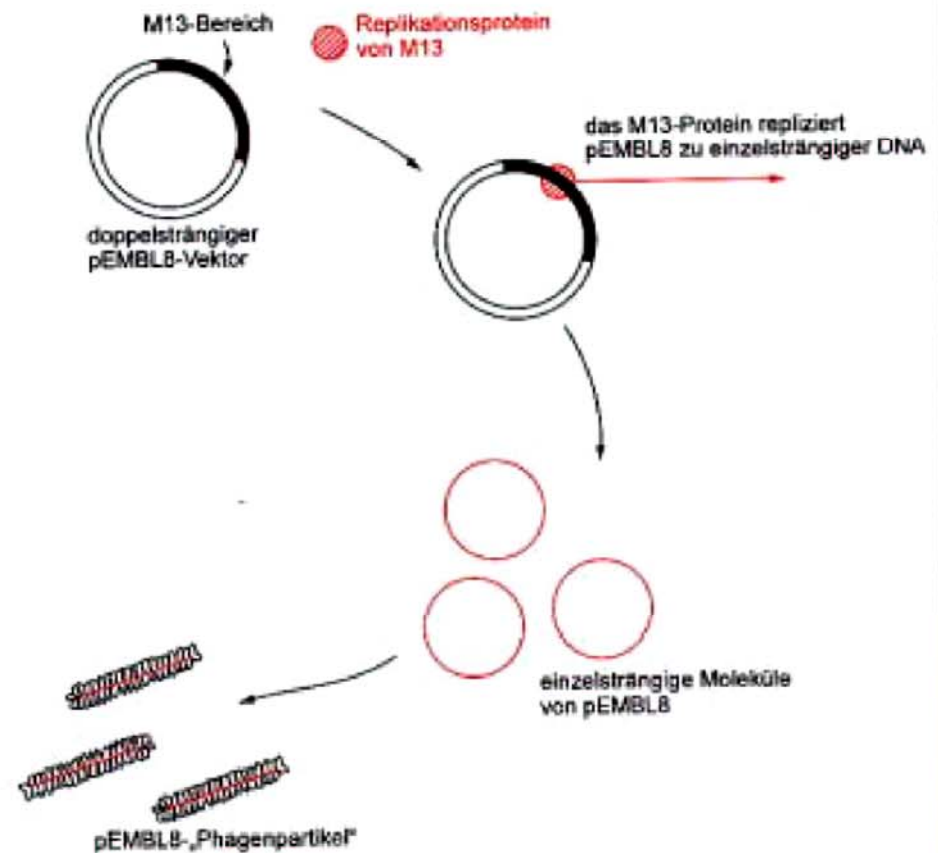
Konstruktion eines Phagemids

I. Grundprinzipien der DNA-Klonierung

a. pEMBL8



b. Umwandlung von pEMBL8 in einzelsträngige DNA



Bluescript, ein klassisches Phagemid

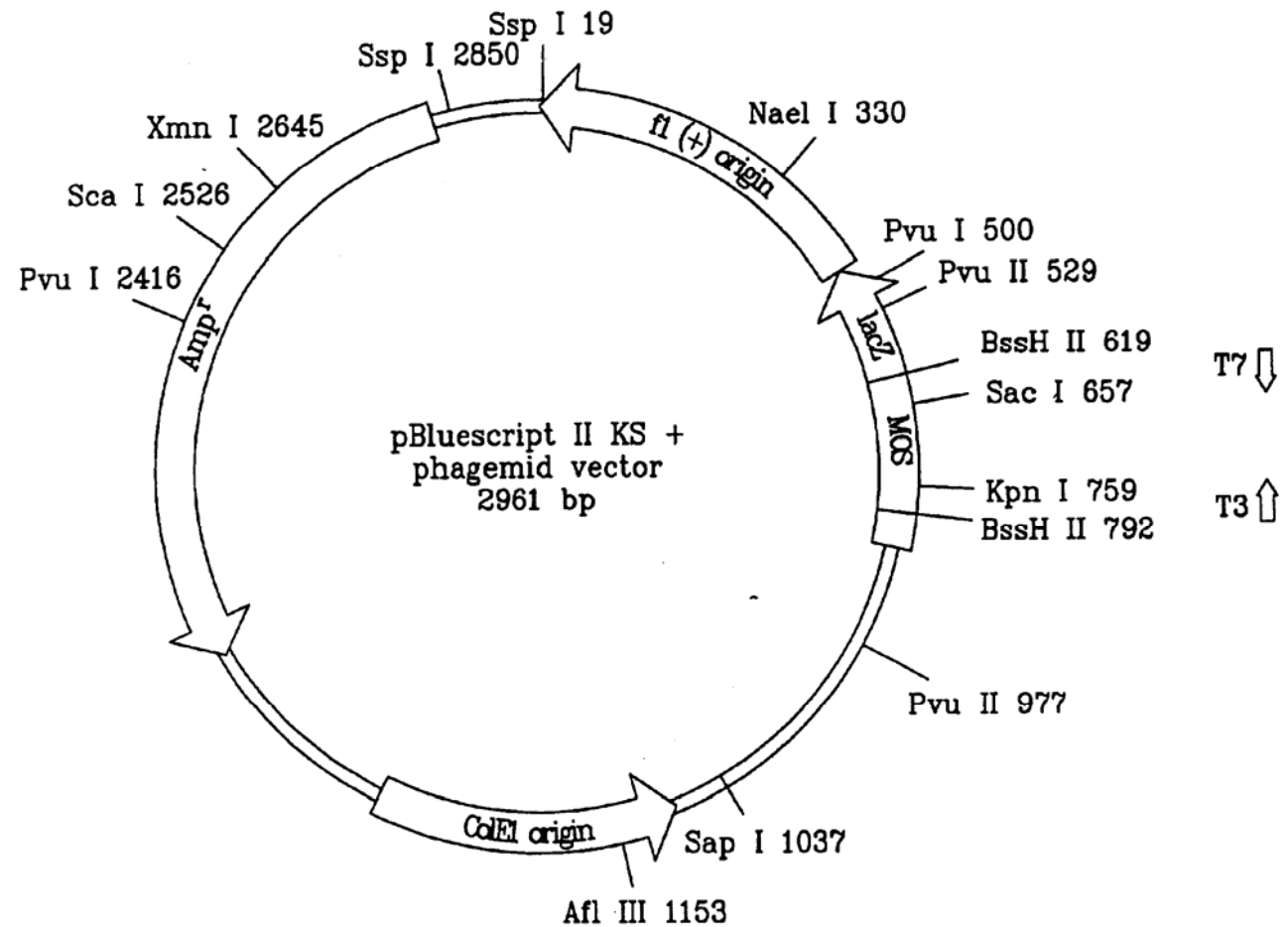


FIG. 1

United States Patent 6803230

Inventors:

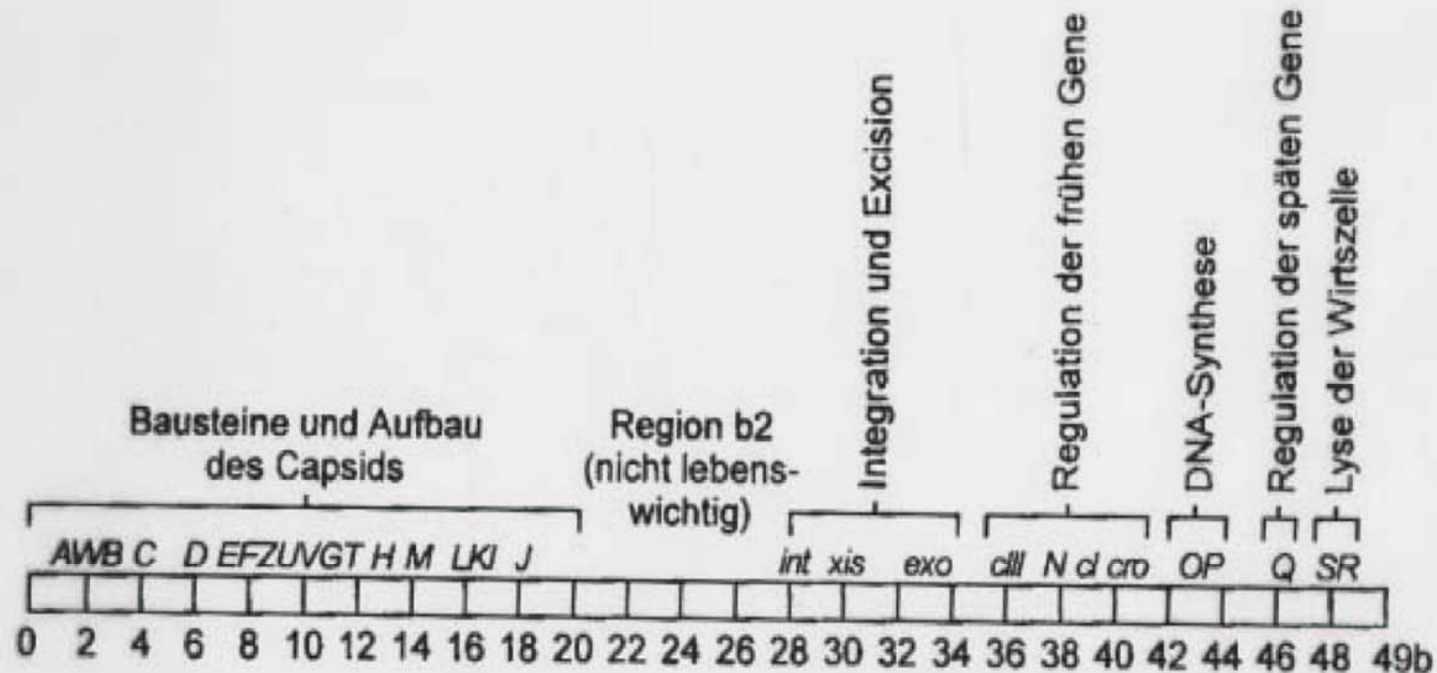
Bowdish, Katherine S. (Del Mar, CA)

Fredrickson, Shana (Solana Beach, CA)

Wild, Martha (Solana Beach, CA)

Bakteriophage λ

Genkarte



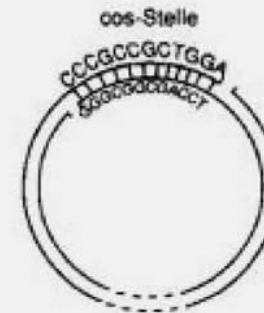
2.9 Die Genkarte von λ . Eingetragen sind die Positionen der wichtigsten Gene und die Funktionen der Gengruppen.

Bakteriophage λ Infektion und Replikation

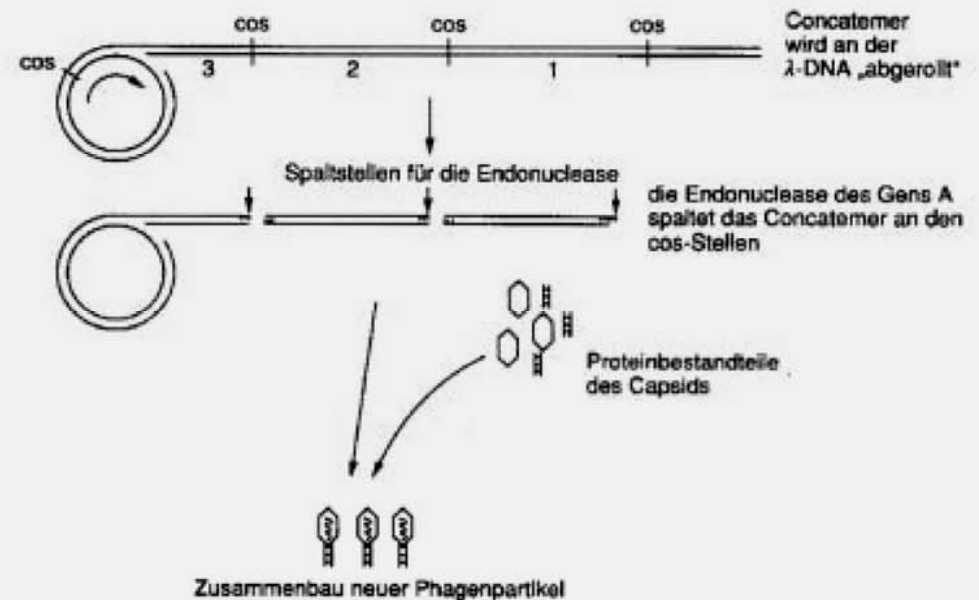
a. λ -DNA in gestreckter Form



a. λ -DNA in Ringform

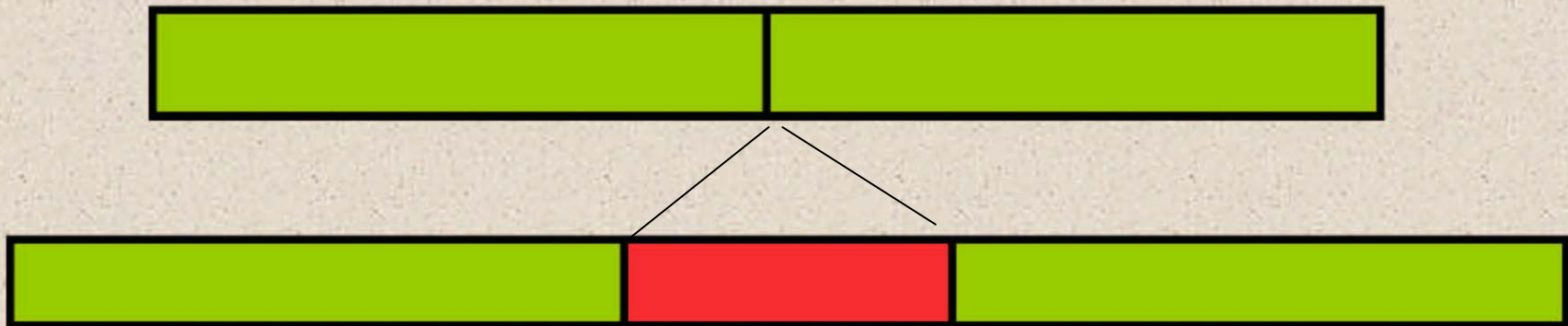


c. Replikation und Verpackung der λ -DNA

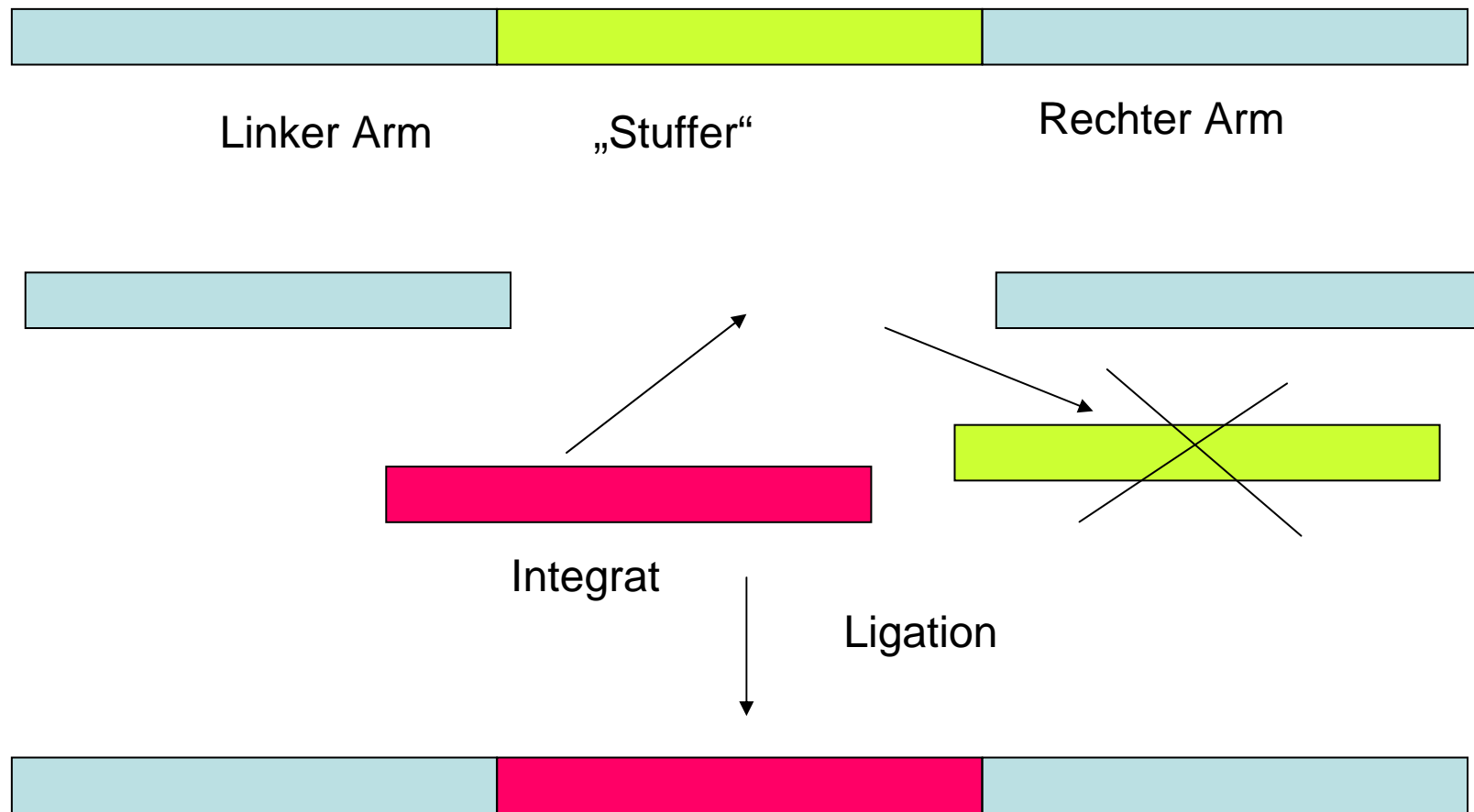


Bakteriophage λ

Integrationsvektoren



Substitutionsvektoren



Lambda gt10/11

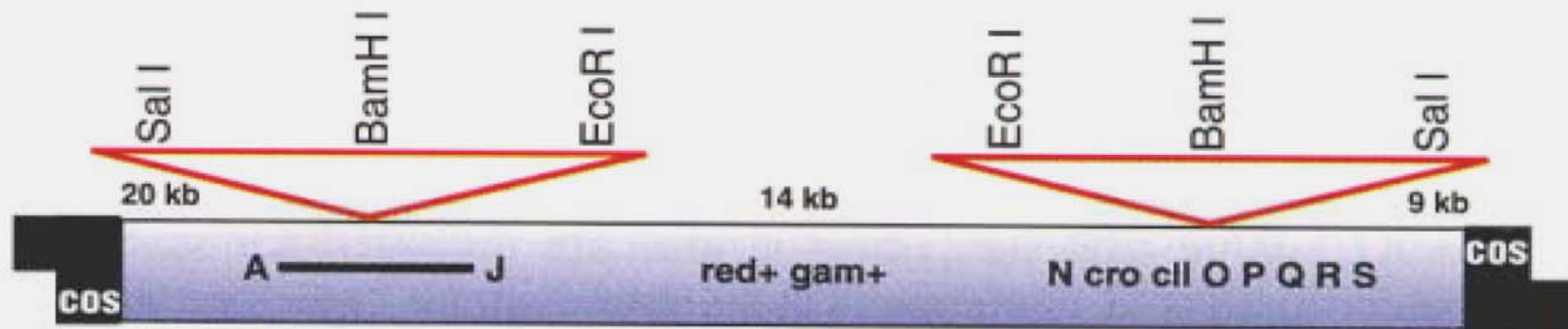
The Lambda gt11 Vector

- Predigested with *EcoR* I
- For construction of cDNA libraries

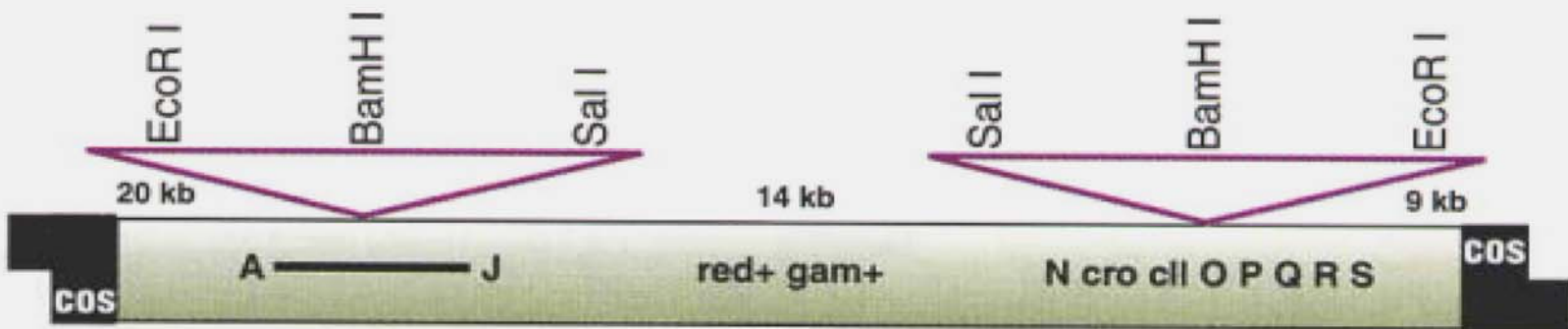


CLONING CAPACITY Capacity of 7.2 kb

Lambda EMBL3/4



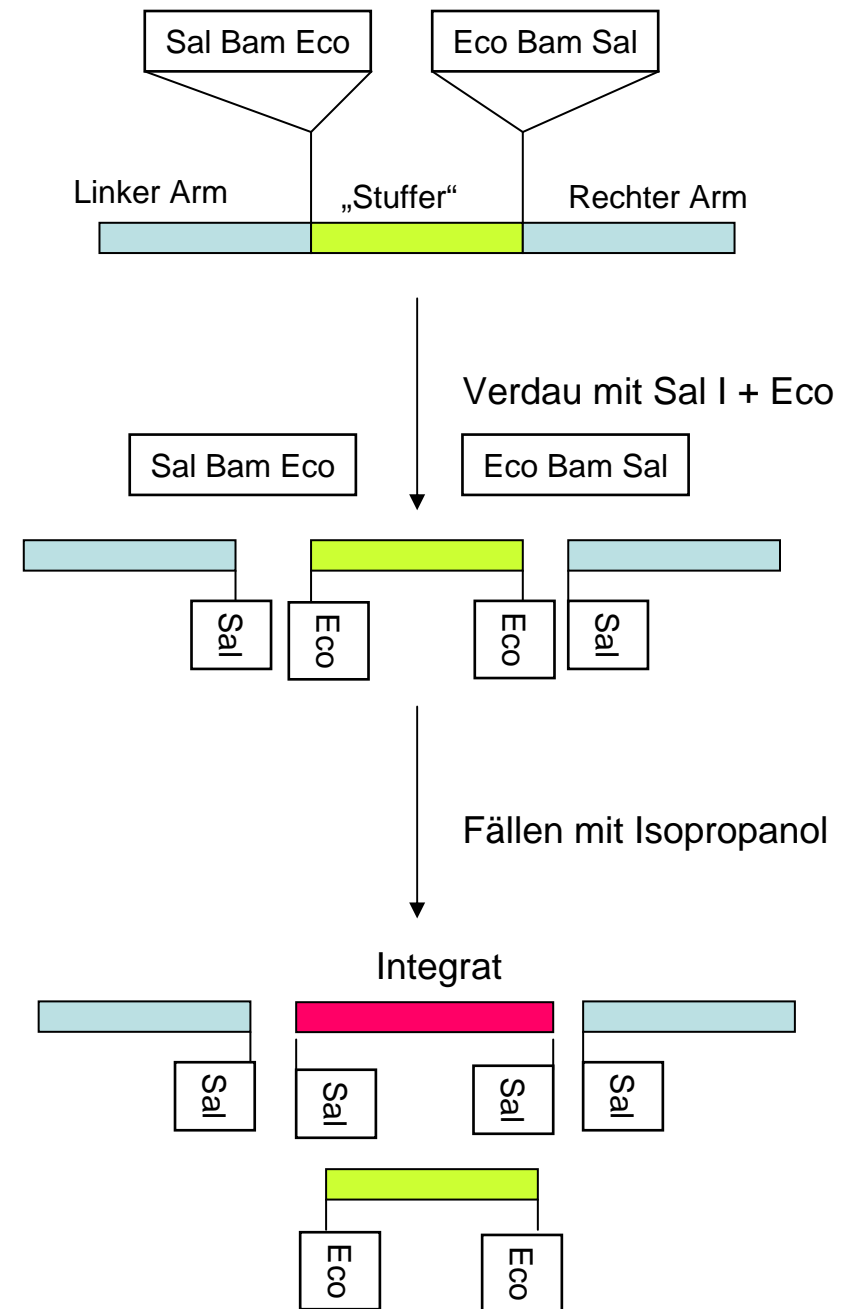
Map of Lambda EMBL3



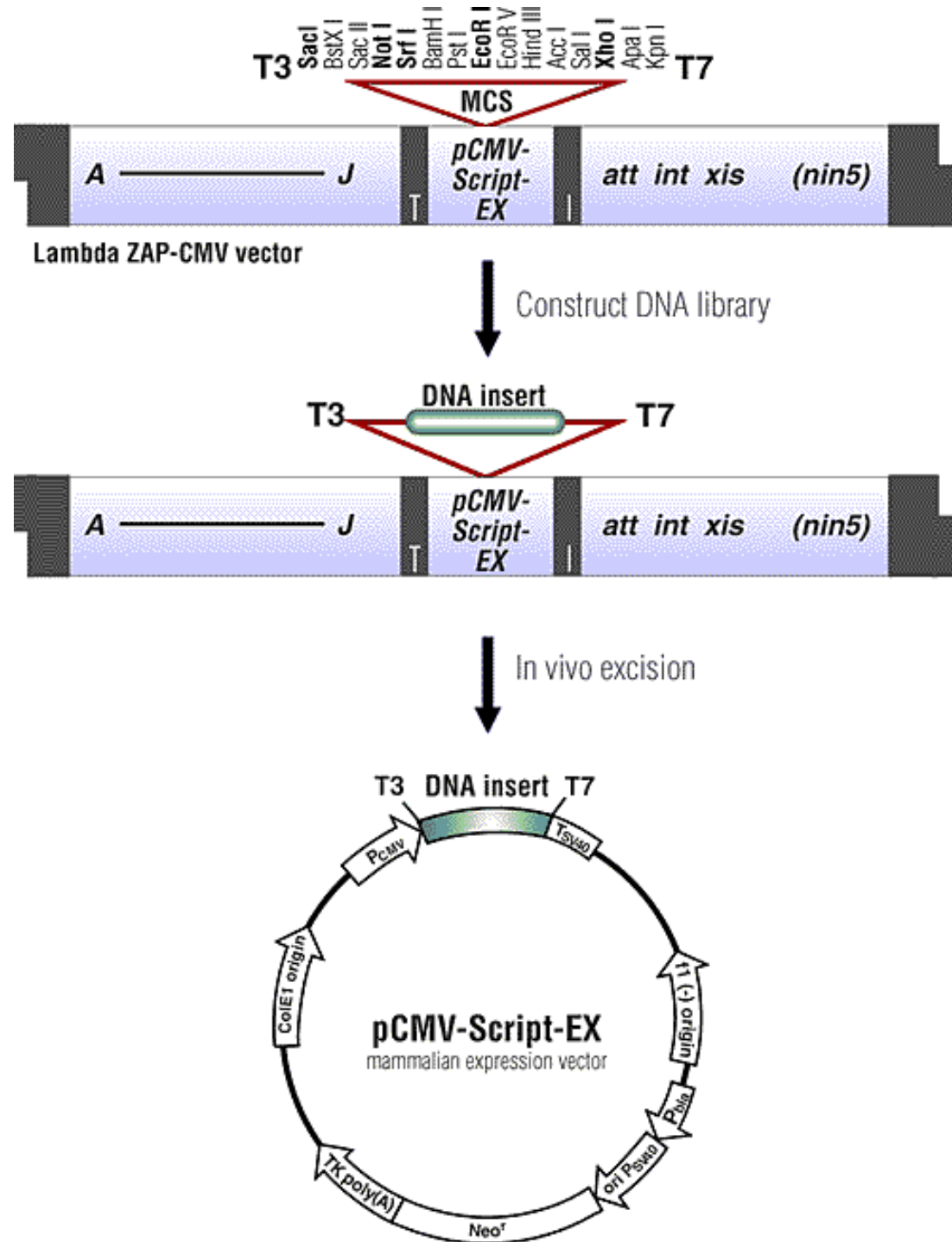
Map of Lambda EMBL4

Lambda EMBL3/4

Durch Doppelverdau mit SalI und EcoRI erhalten die Arme andere Enden als das zentrale Fragment („stuffer“), so dass eine Religation des Vektors sehr unwahrscheinlich ist, insbesondere wenn die Linker durch Fällung aus dem Gemisch entfernt werden



Lambda Zap:
 Moderne Vektoren
 Mit Phagen und Plasmid-
 eigenschaften



Lambda - „shuttle“ Expressions vektoren

