

Einführung in die Gentechnologie

Erwin R. Schmidt

- Vorlesung # 9
- 10. 06. 2008

Neues Thema: Klonierung von Genen

„wie finde ich ein Gen?“

- „screening“ einer Gen/DNA-Bibliothek
- Immunoscreening einer Expressionsgenbank
- Mikroklonierung
- Chromosomenspezifische Genbank
- „chromosome walking“ und positionelle Klonierung-
- cDNA-Bibliotheken
- Komplementation z. B. von Hefemutanten
- Subtraktionshybridisierung
- Polymerasekettenreaktion

Genbibliotheken/Genbanken

Was ist eine Genbank?

- Gemisch an klonierten DNA-Fragmenten, die ein komplettes Genom oder Teile davon repräsentieren
- unsortierte Genbanken
- sortierte („gridded“) Genbanken
- cDNA-Banken
- Mikro-Genbanken

Genbibliotheken/Genbanken

Wie viele Klonen muss eine Genbank enthalten, um ein Genom vollständig zu repräsentieren?

Berechnung nach der Carbon-Clark-Formel

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$

N = Anzahl der Klone

p = Wahrscheinlichkeit

f = Klongröße/Genom

Berechnung nach der Carbon-Clark-Formel

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$

N = Anzahl der Klone

p = Wahrscheinlichkeit

f = Klongröße/Genom

Beispiel: λ – Klone mit ca. 2×10^4
Genomgröße Mensch 3×10^9

$$f = \frac{2 \times 10^4}{3 \times 10^9} = 0.66 \times 10^{-5}$$

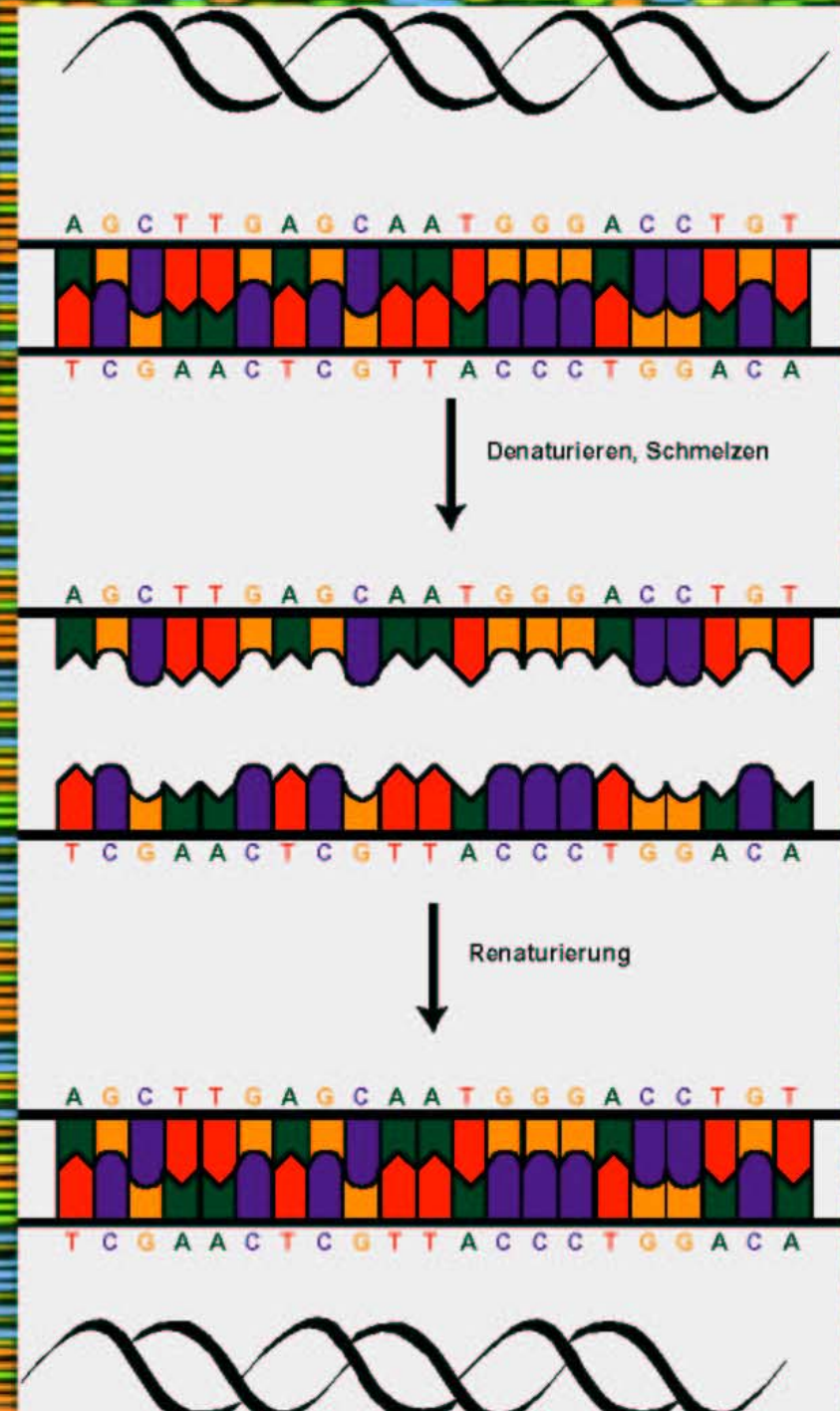
für p = 0,99:

$$N = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln(1-0.66 \times 10^{-5})} = \mathbf{690\ 819\ Klone}$$

Genbankscreening durch Hybridisierung mit einer Sonde

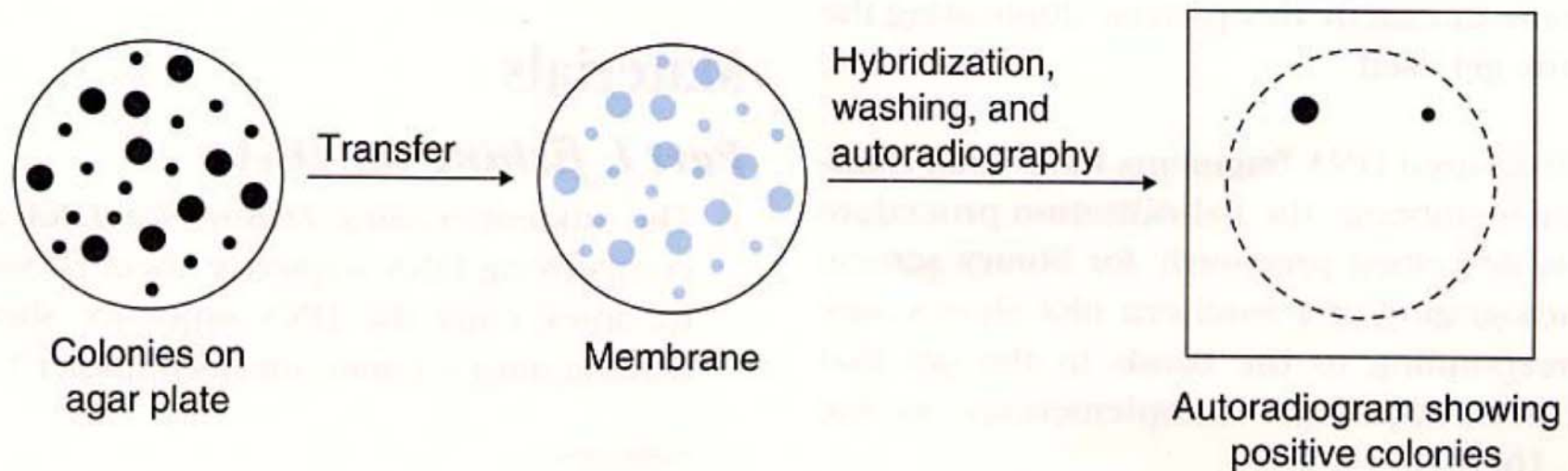
die molekulare
Hybridisierung:

Identifizierung von
Genen anhand von
Sequenzähnlichkeiten



Genbankscreening durch Koloniefilter-Hybridisierung

Figure 16.1 Colony hybridization.

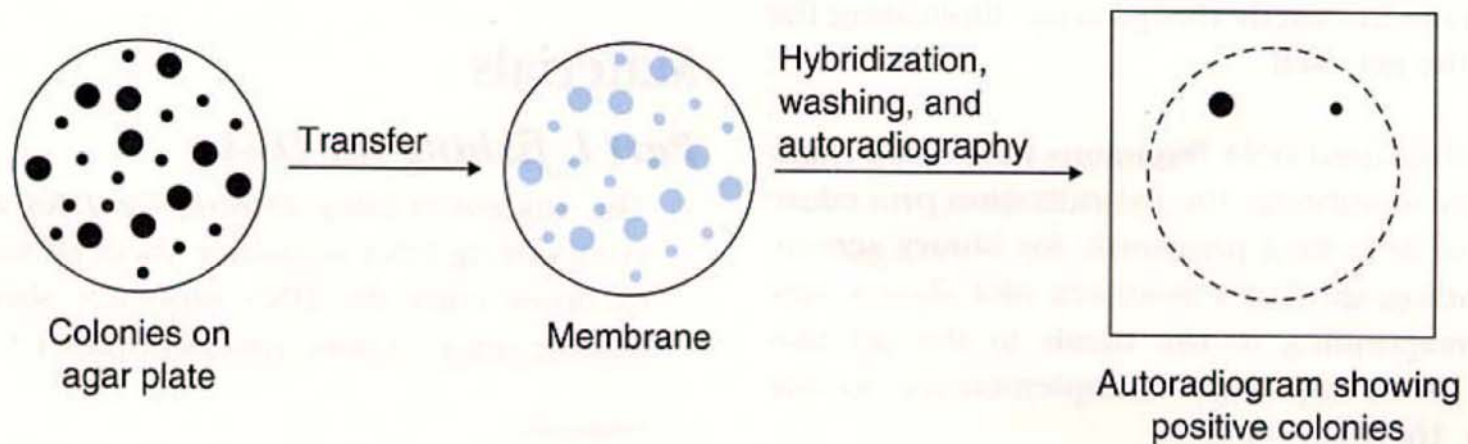


Immunoscreening

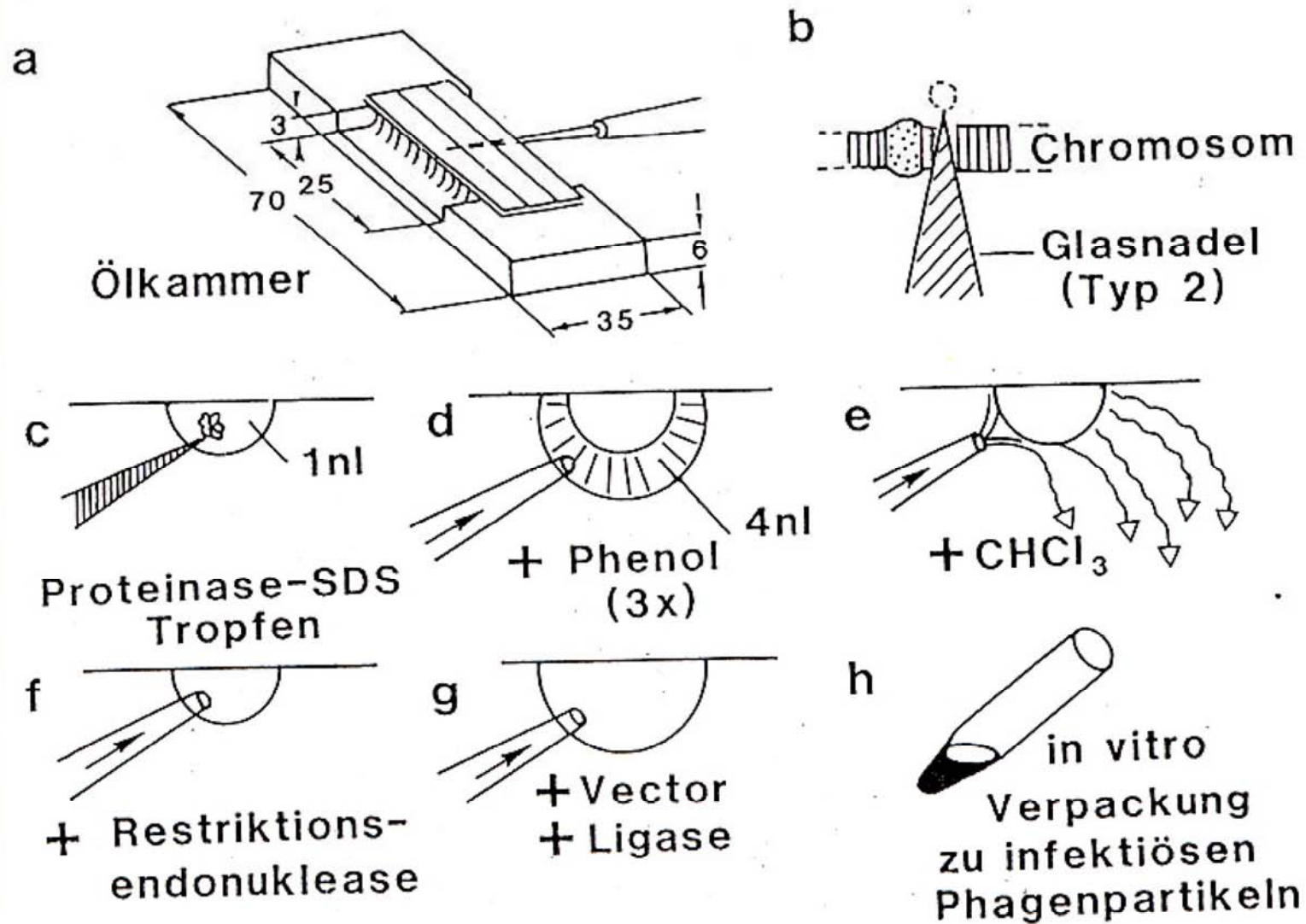
Voraussetzung:

1. Expressionsgenbank
2. Antikörper

Figure 16.1 Colony hybridization.



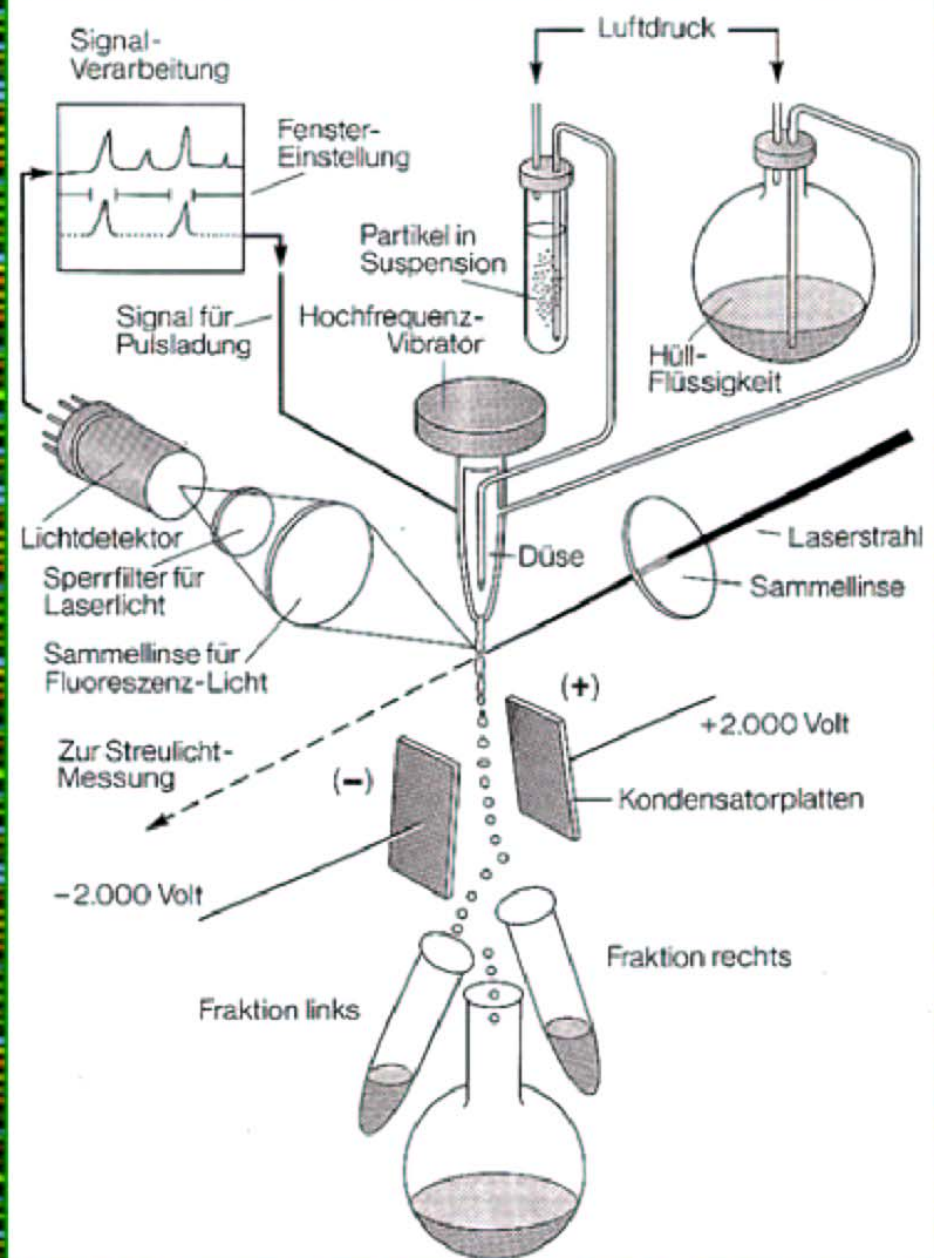
Mikroklonierung



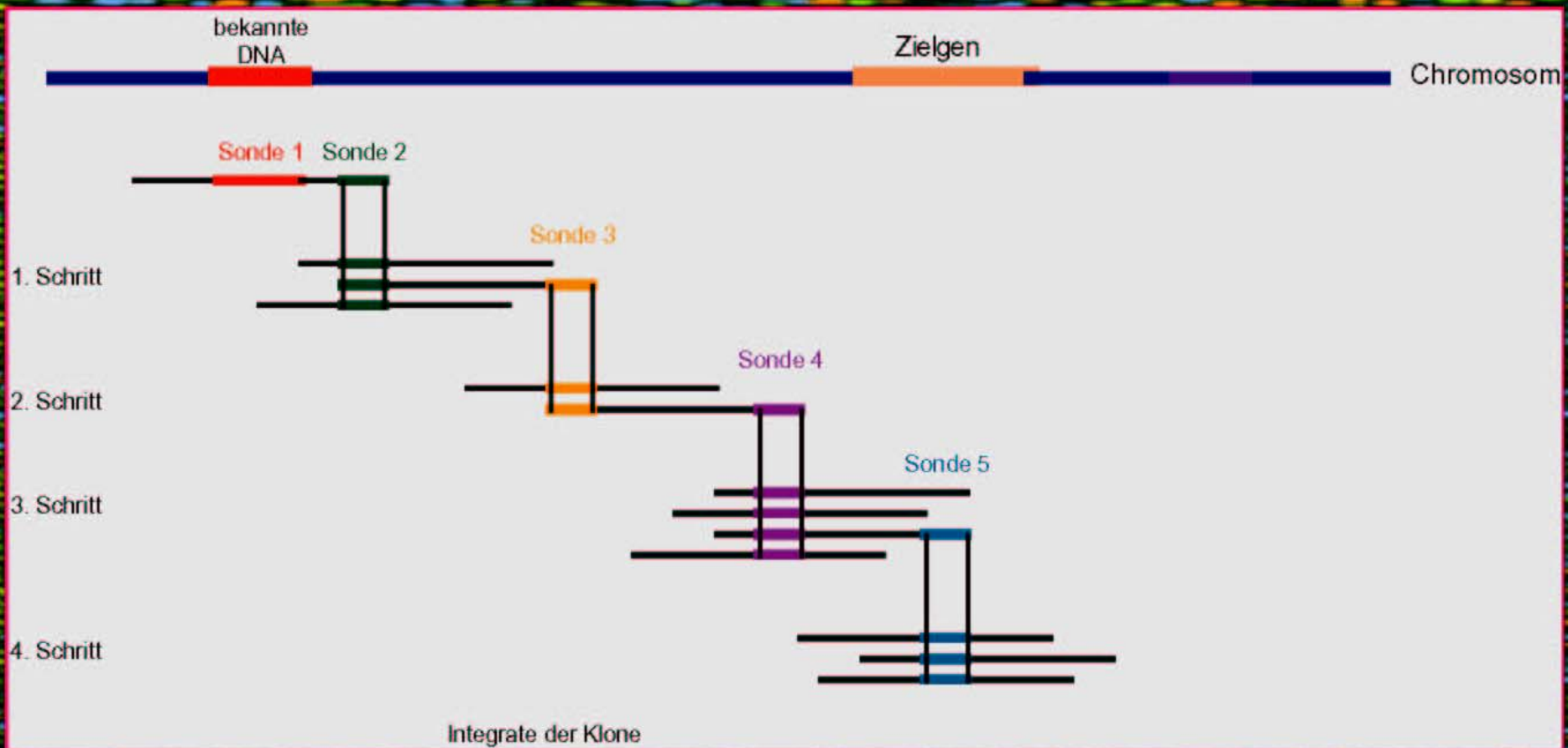
Chromosomen- sortierung mit Hilfe des FACS

(fluorescence activated cell
sorting)

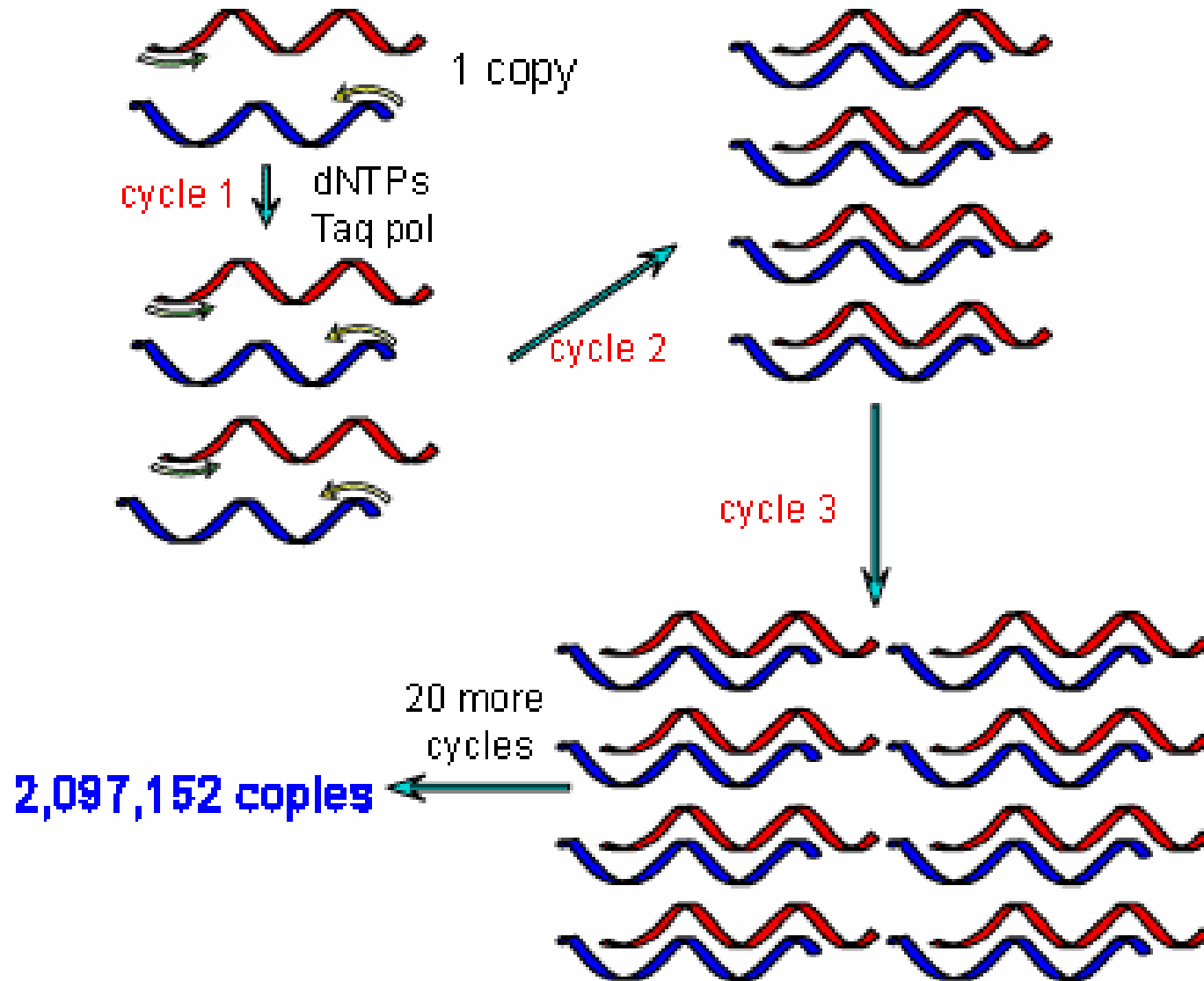
= Chromosomen-spezifische
Genbanken



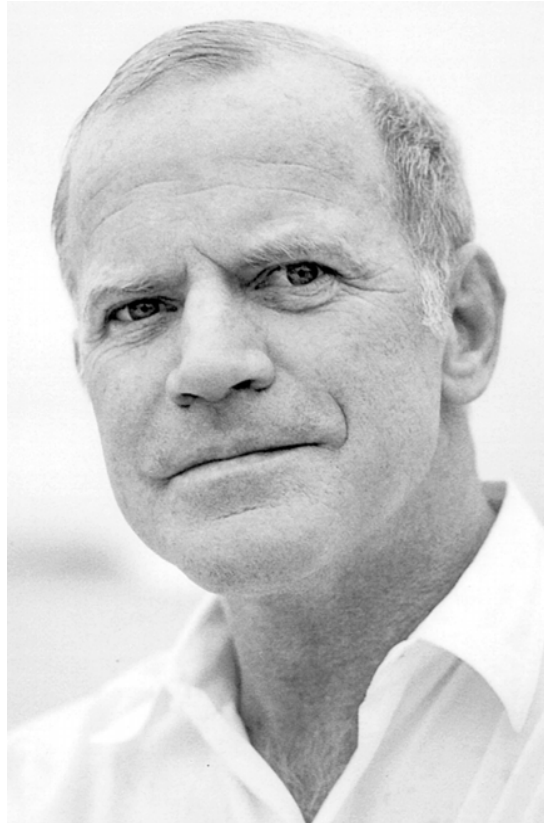
Chromosomenmarsch



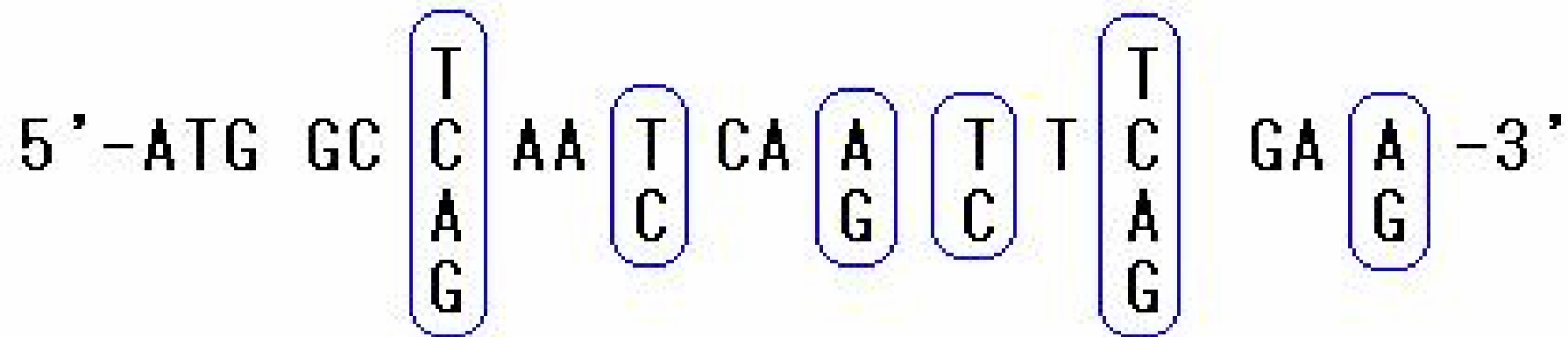
In vitro Amplifikation von Genabschnitten mittels PCR und degenerierten Primern



K. Mullis, Erfinder der PCR Nobelpreis Chemie 1993

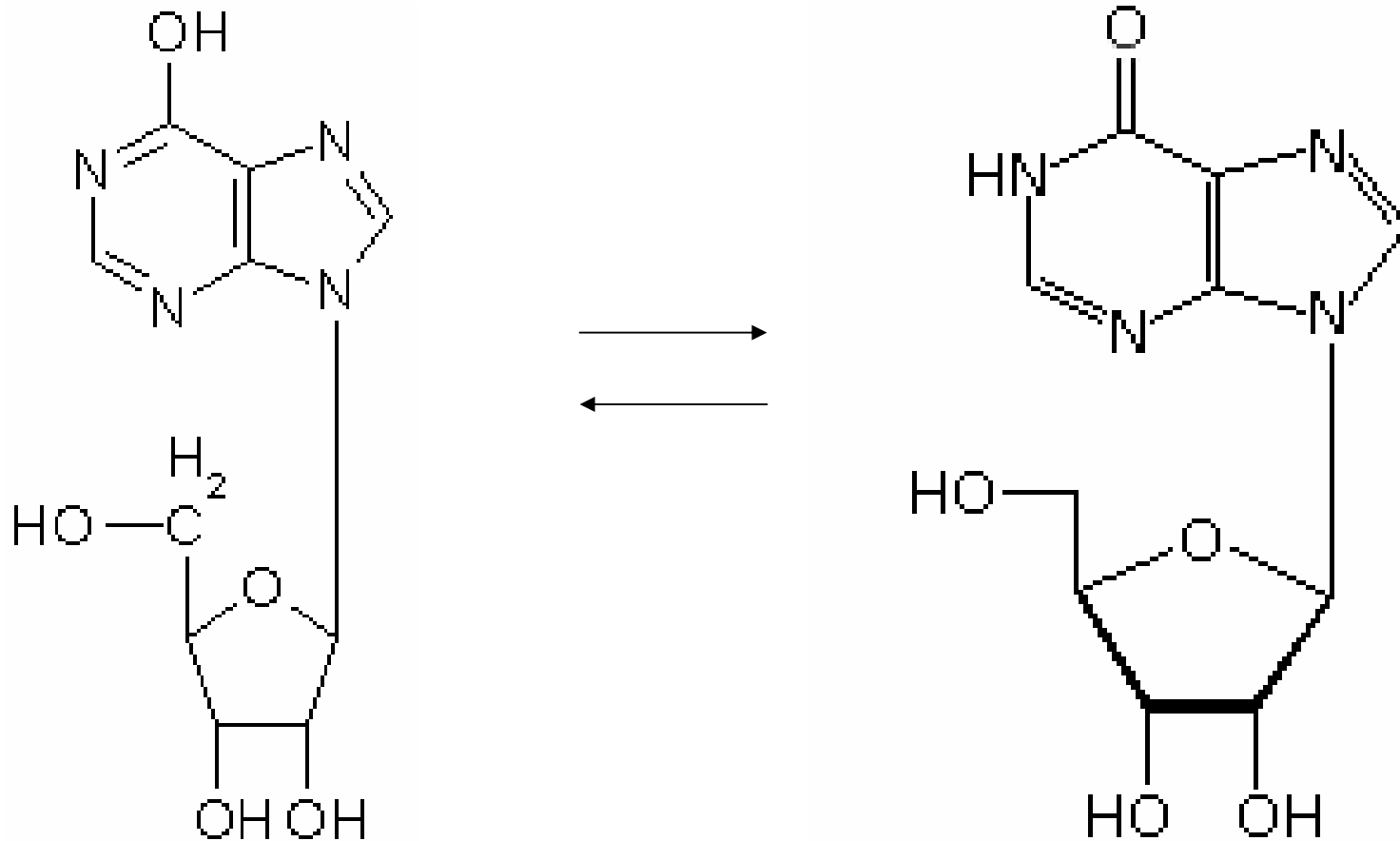


Degenerierte Primer



Oder Primer mit Inosin;

Inosin kann mit A, C oder U (T) paaren



PCR mit degenerierten Primern

5out
64-fold 20mer, with 5 Is

5inE and 5inR
96-fold 21mers, 2x 3 Is

```

BL34 (64-191) AEVMDWSQSLEKLLANQTSINVFGSFLKSEFSEENLEFWLACEDYKRTESOLL-PCKAEELVKAIVHSIDAAKQ-I 136
egl10 (413-541) RRLKLVWEDSFEELLAADSLGRETLOKFLDREYSGENLRFWWEVQKLRKC-SSRMVPMVTELYNEFIDTMAATSPV 486
G0S8 (75-203) EEAQLWSEAFDELLASKYGLAAFRFLKSEFCENLEFWLACEDFKRTKSPQKLSKARKIYTDIFIEKEAPKE-I 148
Consensus .E..LWS.SFEELLA...G...F...FLKSEFSEENLEFWLACED.KRT.S...P.KA.EIV...EI...AAK.-I 75
    
```

3T and 3A
32 and 64-fold 19mers, 2 and 1Is

```

BL34 (64-191) MIDFRTRESTAKKIKAPTPTCFDEADKVIYMLMKNDSYPRFLMSDIYLMNLNDLQ
egl10 (413-541) MVDCKVMEVTEDMLKNPNRWSEDEADHIVCLMKNDSYPRFLRSEIYKDLVLSQR
G0S8 (75-203) MIDFQKTLIAQNIQEATSGCFTTADKRWVSLMKNDSYPRFLESEFYDLCCKPQ
Consensus MIDF.T.E.TA.NIK.PT..CFDEADK.IY.LMKNDSYPRFL.SEIY.DL....Q
    
```

5out: 64-fold degenerate 20mer, with 5 Is

```

N S/A F/L D/E K/E L L A C
5' GCI TTI GAI GAG TTI TTI GC 3'
T C A A C C
    
```

5inE and 5inR: 96-fold degenerate 21mers

```

N E/G E N I/L E/R F W C
5inE 5' GGI GAG AAT TTI GAG TTT TGG 3' 2 Is
A A C C A C
A
5inR 5' GGI GAG AAT TTI CGI TTT TGG 3' 3 Is
A A C C A C
A
    
```

3T and 3A: 32 and 64-fold degenerate 19mers

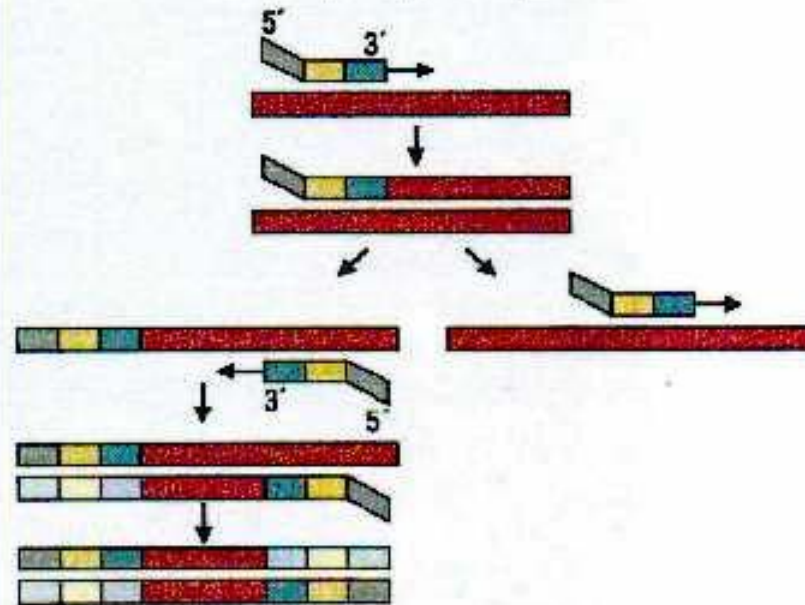
```

3T N M E/K N/K D/N S Y P/Q C
5' ATG GAG AAI GAT TCI TAT C 3' REVERSE 5' G GTA IGA GTT ITT TTT CAT 3' 32-fold, 2
A A A C C A C C
3A 5' ATG GAG AAI GAT AGT TAT C 3' COMPLEMENT 5' G GTA GCT GTT ITT TTT CAT 3' 64-fold, 1
A A A C C C C
    
```

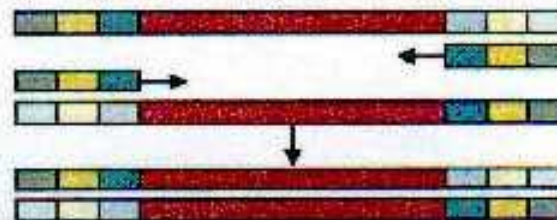
Degenerate Oligonucleotide Primer PCR

5' **CCGACTCGAG** | NNNNNN | **ATGTAG** 3'

1. Low stringency PCR ($T_a = 30^\circ\text{C}$; 5 cycles)
→ frequent priming at multiple sites



2. Higher stringency PCR ($T_a = 62^\circ\text{C}$; 35 cycles)
→ specific priming of pre-amplified sequences



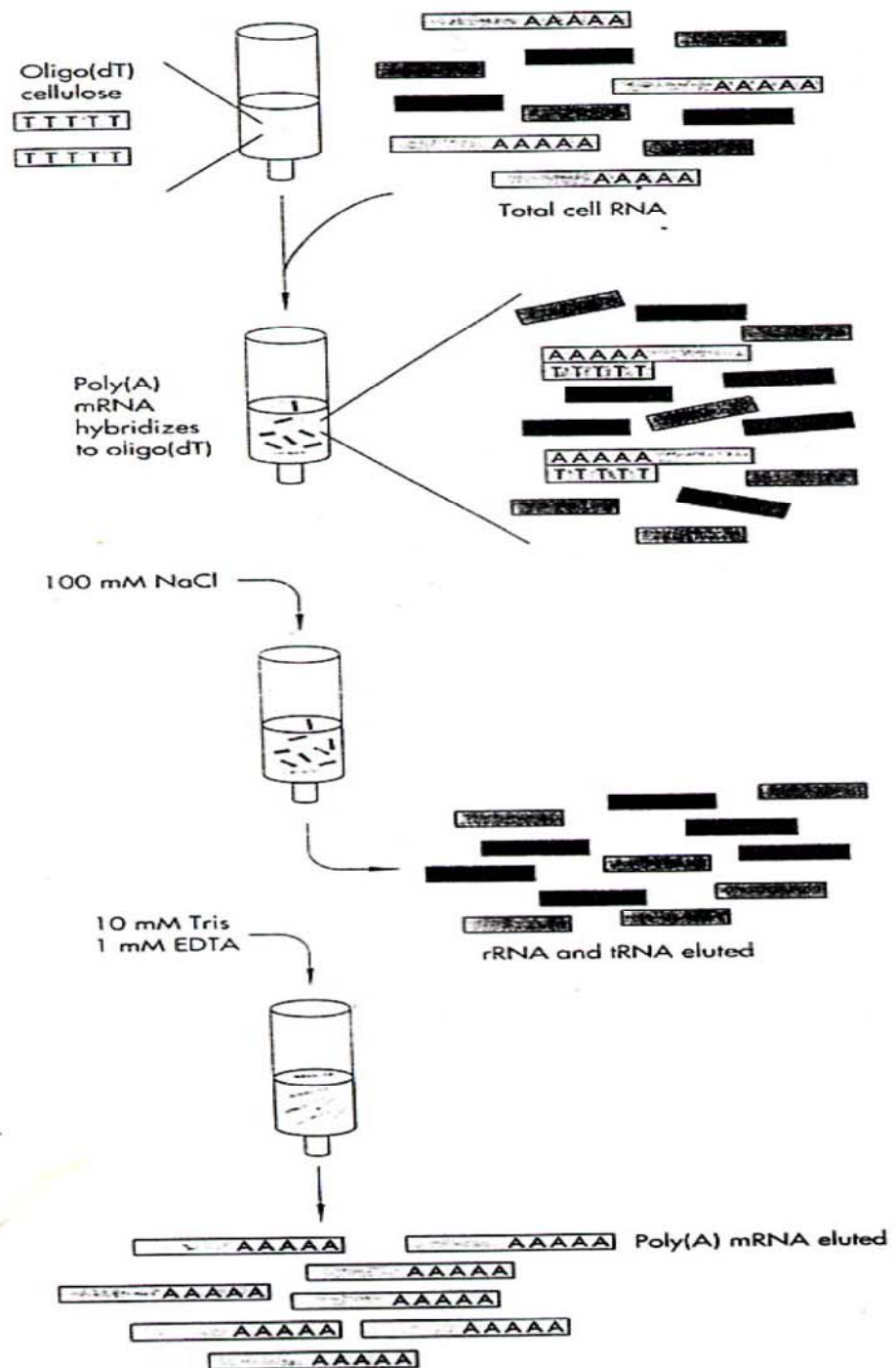
Klonierung von Genen durch screening von cDNA-Banken

cDNA = complementary DNA:
enthält alle in einem bestimmten Gewebe
oder einem bestimmten Entwicklungsstadium
exprimierten Sequenzen

Vorteil: keine Introns

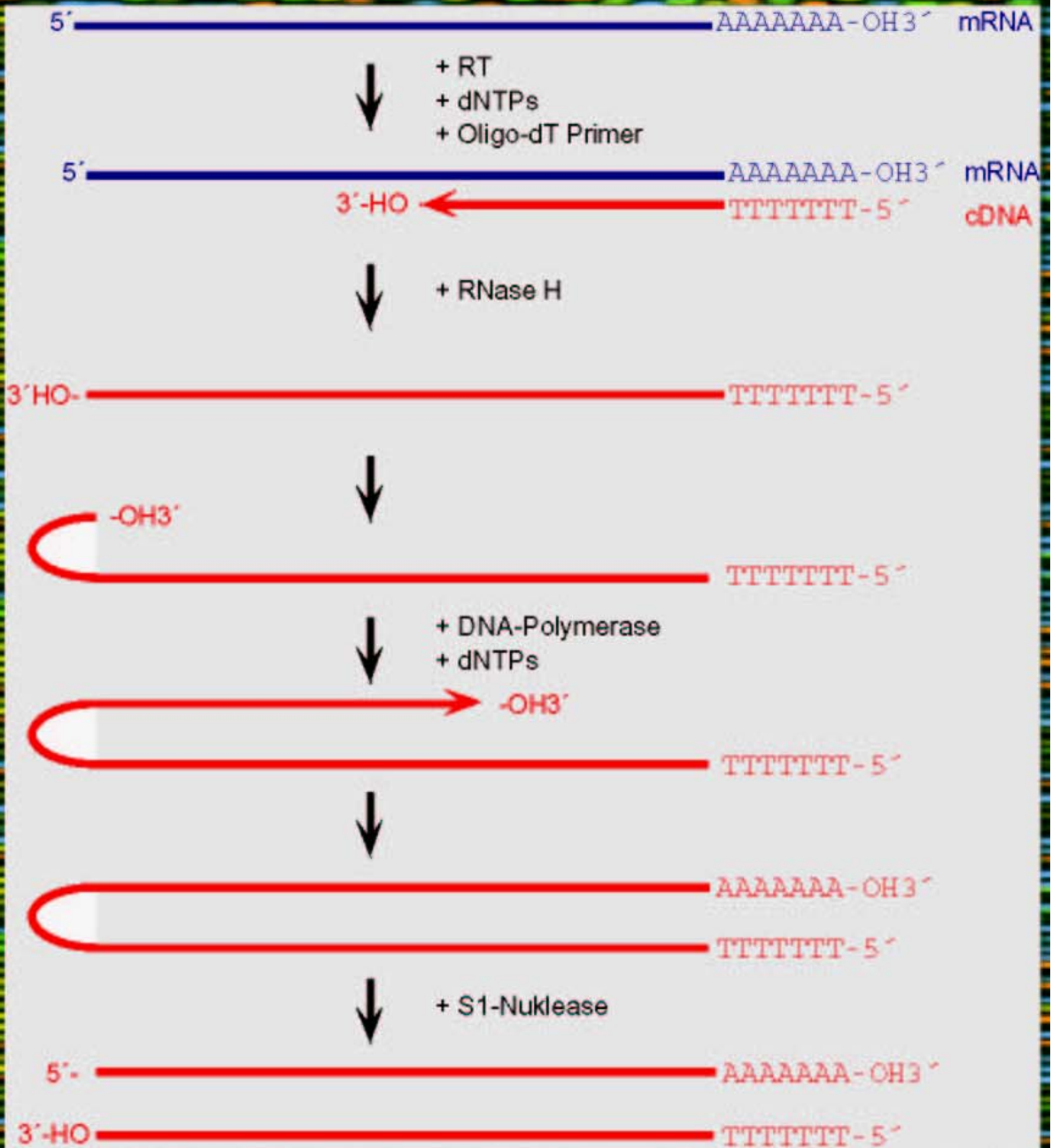
Nachteil: keine regulatorischen Elemente/z.B. Promotor

Isolierung von cDNA

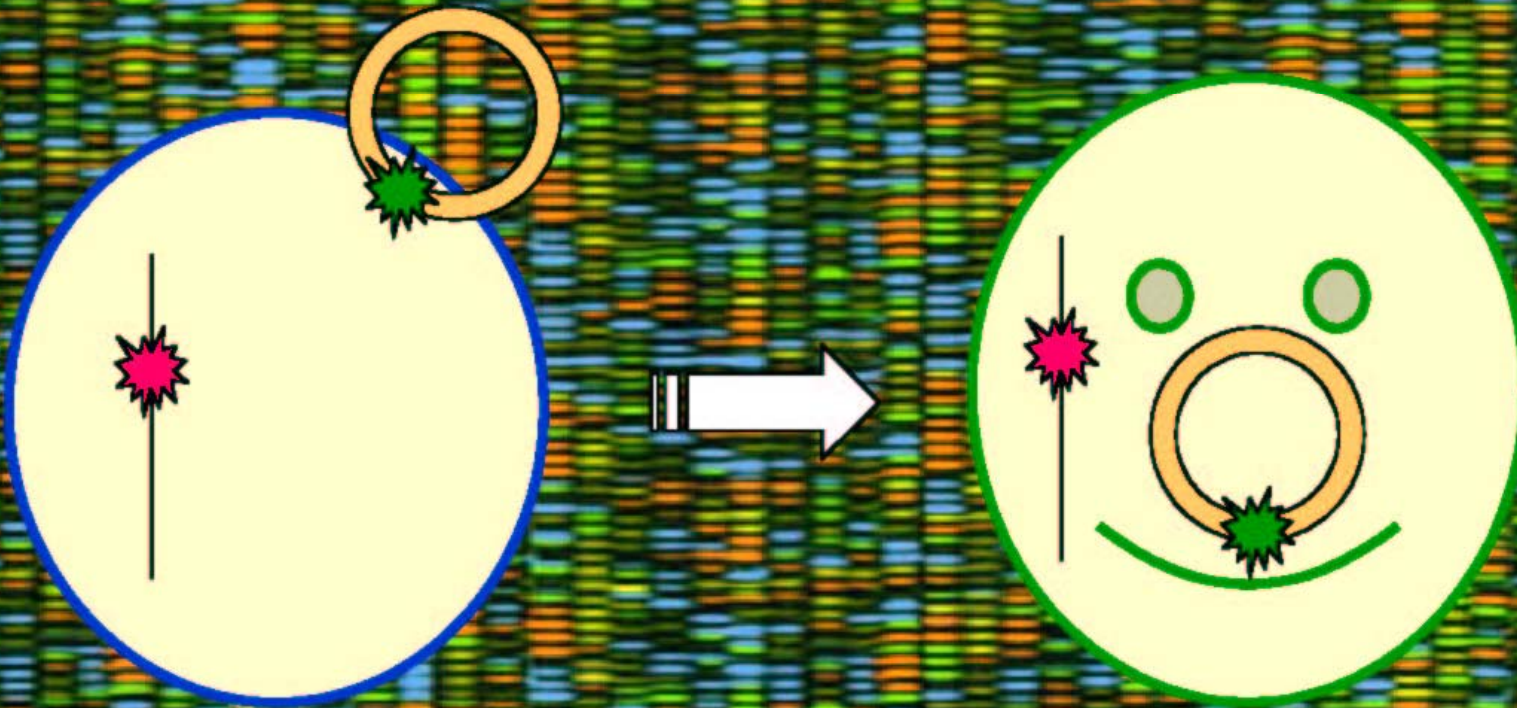


cDNA-Banken

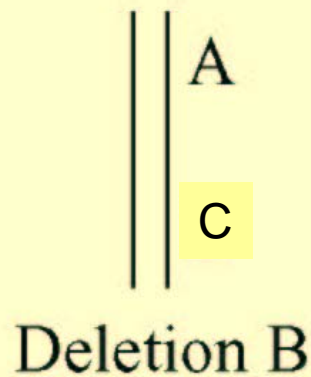
Synthese von cDNA



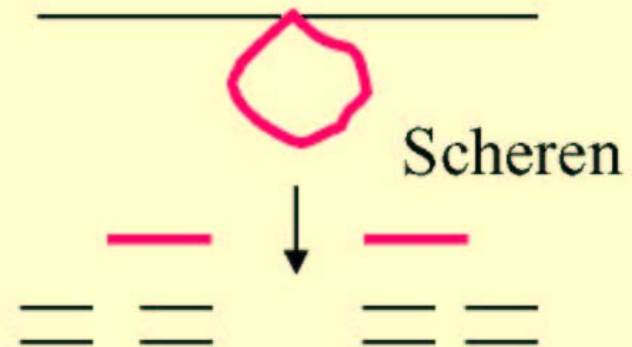
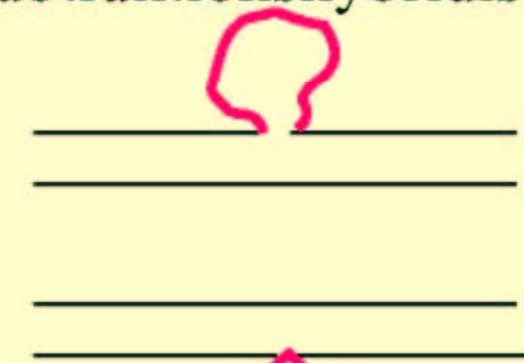
Identifizierung von Genen durch „Komplementation“



Klonierung von Genen durch Subtraktion



Subtraktionshybridisierung



Klonierung von Genen durch Subtraktion

