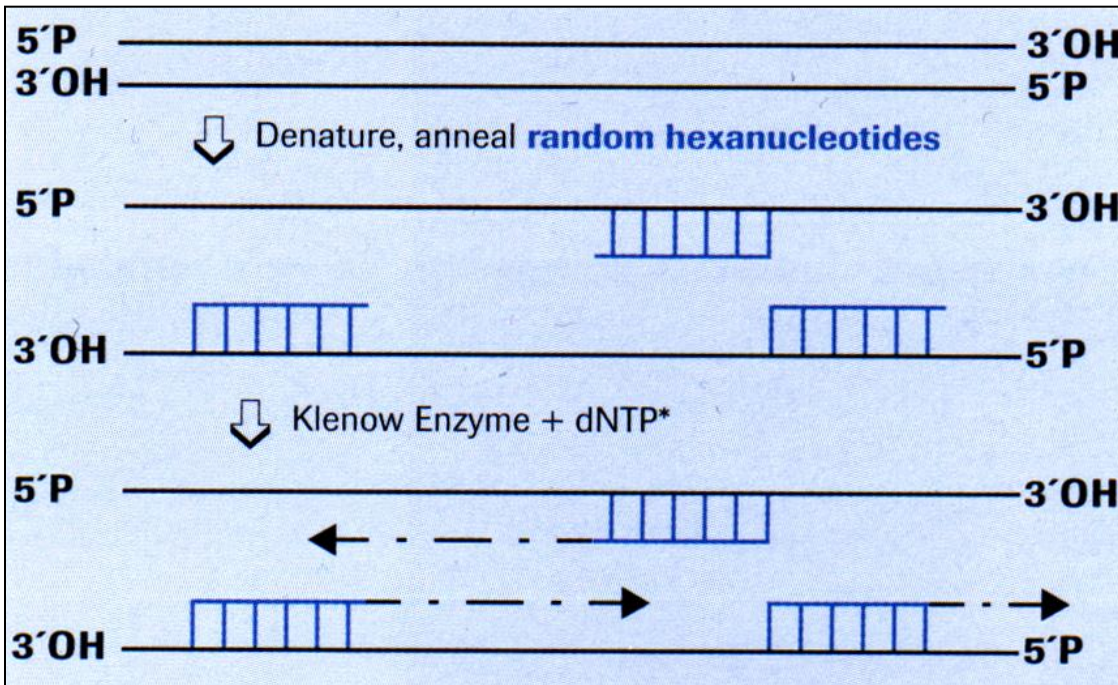


Markierung von DNA

Methoden zur Herstellung markierter Sonden

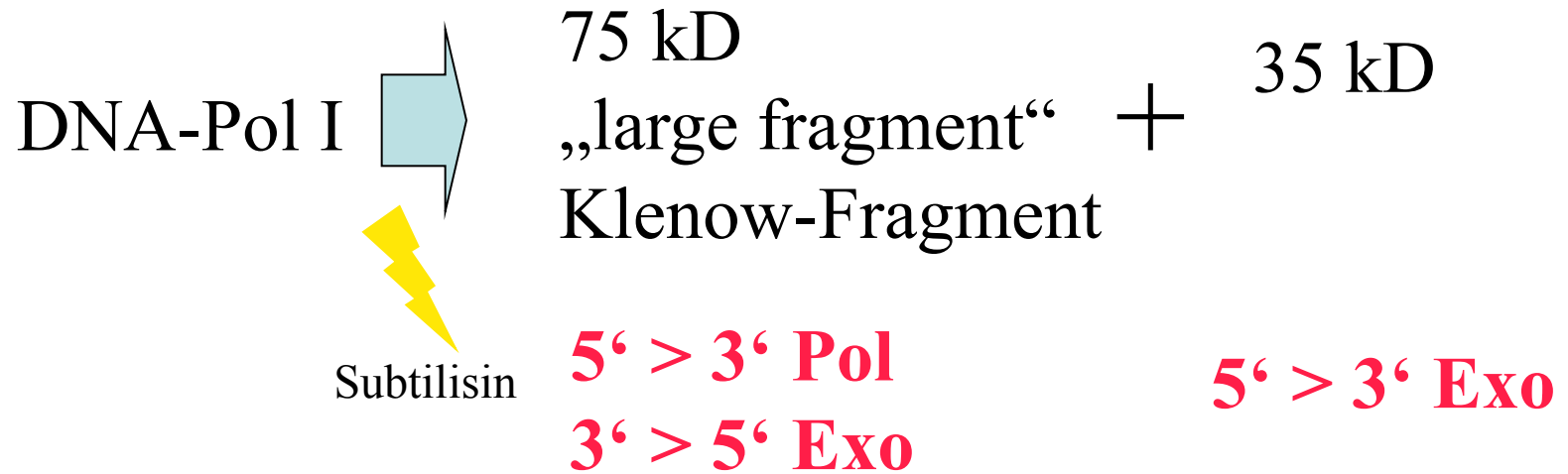
- > Markierung durch „random priming“
- > Nick-Translation
- > 3'-Endmarkierung
- > 5'-Endmarkierung

Komplett-Markierung durch „random-primed oligo-labeling“ (Feinberg und Vogelstein, 1983)

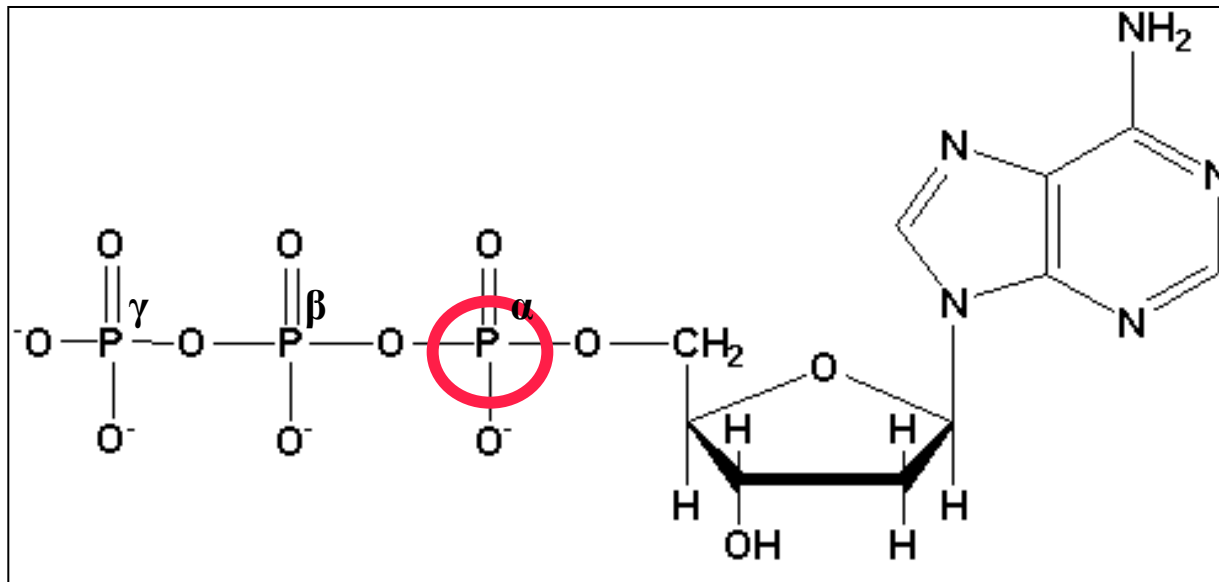


- Verwendung von Hexanukleotiden statistischer Zusammensetzung als Primer (→ „random primed“)
- Verwendung des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I
- α ^{32}P dATP

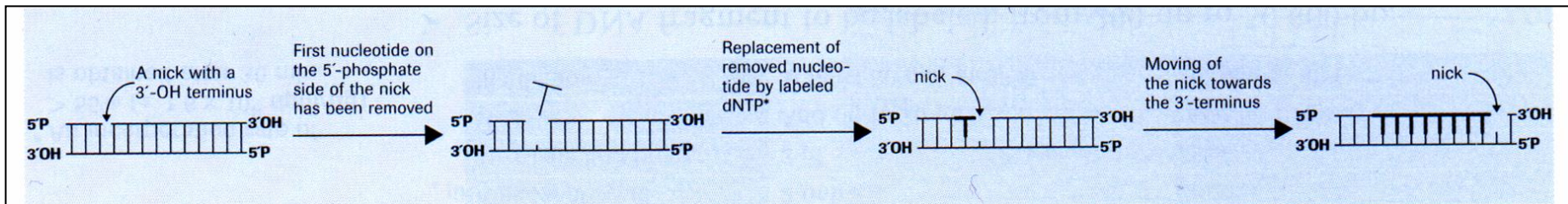
Warum Klenow-Fragment?



Welcher Baustein wird markiert?
Wo genau wird es markiert?

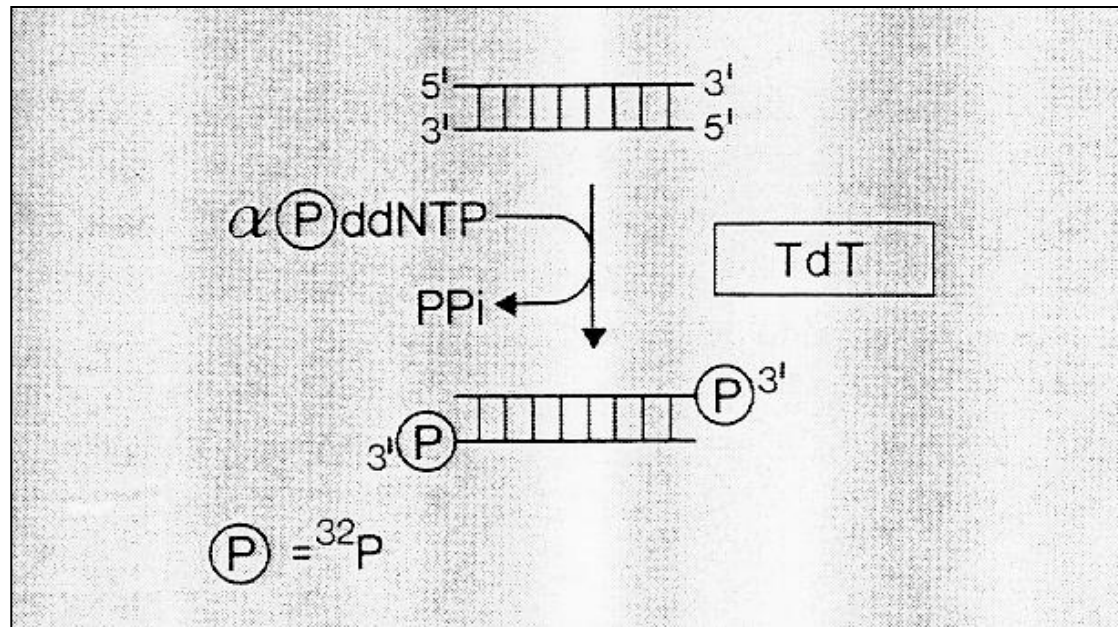


Komplett-Markierung durch „Nick-Translation“ (Rigby, 1977)



- DNase I in geringer Konzentration und in Gegenwart von Mg^{2+} → an zufälliger Position in ds DNA entstehen Einzelstrangbrüche („nicks“)
- 3'OH-Enden der „nicks“ als Primer für *E.coli* DNA-Polymerase I → 5' > 3' Polymeraseaktivität, Einbau von $\alpha^{32}P$ dATP
- 5' > 3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Pol I entfernt gleichzeitig Nukleotide → nick „wandert“ Richtung 3' Ende
- $\alpha^{32}P$ dATP

Markierung glatter 3'OH-Enden mittels Terminaler Transferase



TdT = terminale Desoxynucleotidyl-Transferase

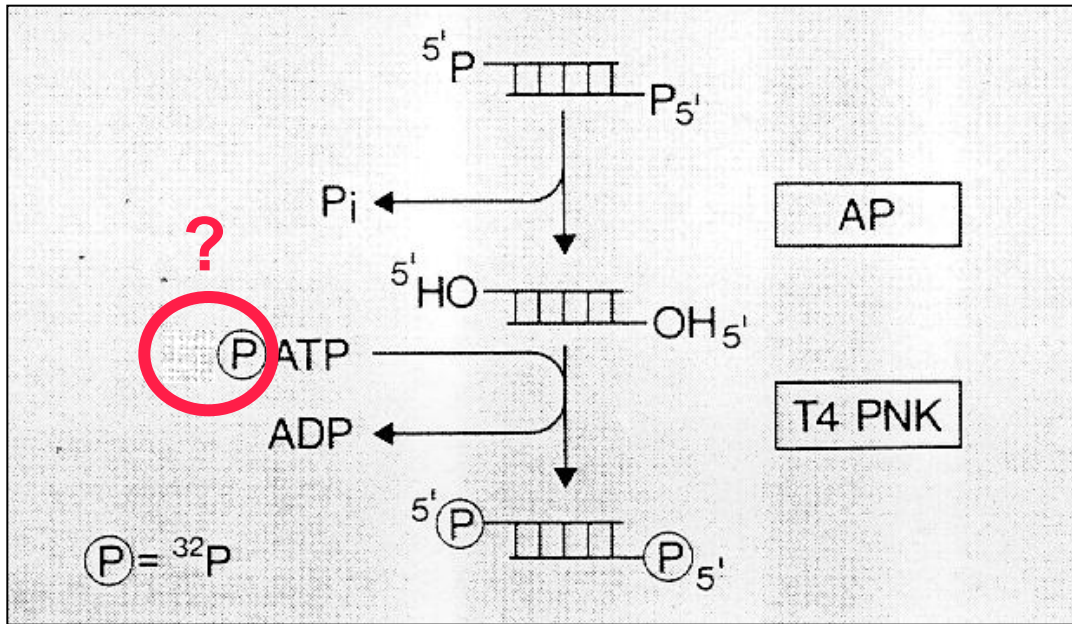
- fügt sequenzunspezifisch Nukleotide (z.B. ddNTP = 2'3'-Dideoxynukleotide) an das 3' Ende an
- braucht keinen Gegenstrang

Markierung zurückhängender 3'OH-Enden

Lösung:

„endfilling“ mit passendem
P³²-dNTP und Klenowenzym

Markierung von glatten/überhängenden 5'P-Enden



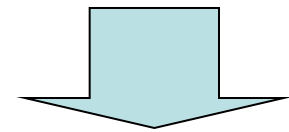
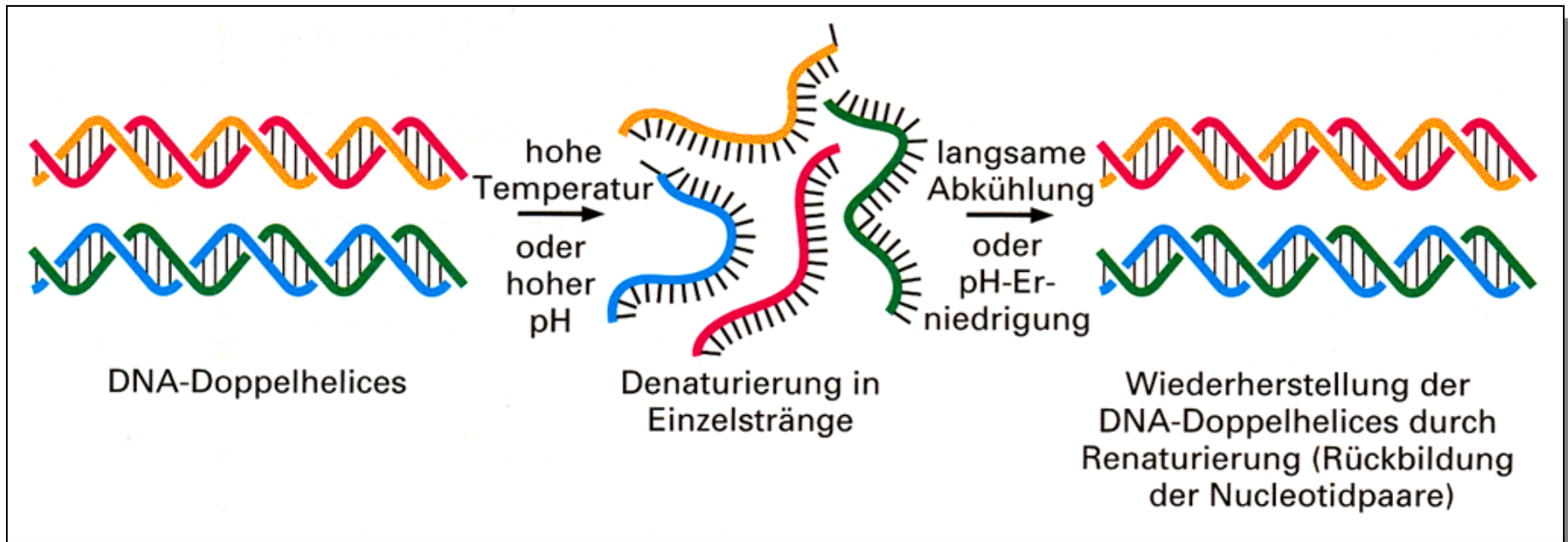
Alkalische
Phosphatase

Polynukleotid-
Kinase

- Markierung durch Austausch des Phosphatrestes am 5'Ende durch radioaktives Phosphat

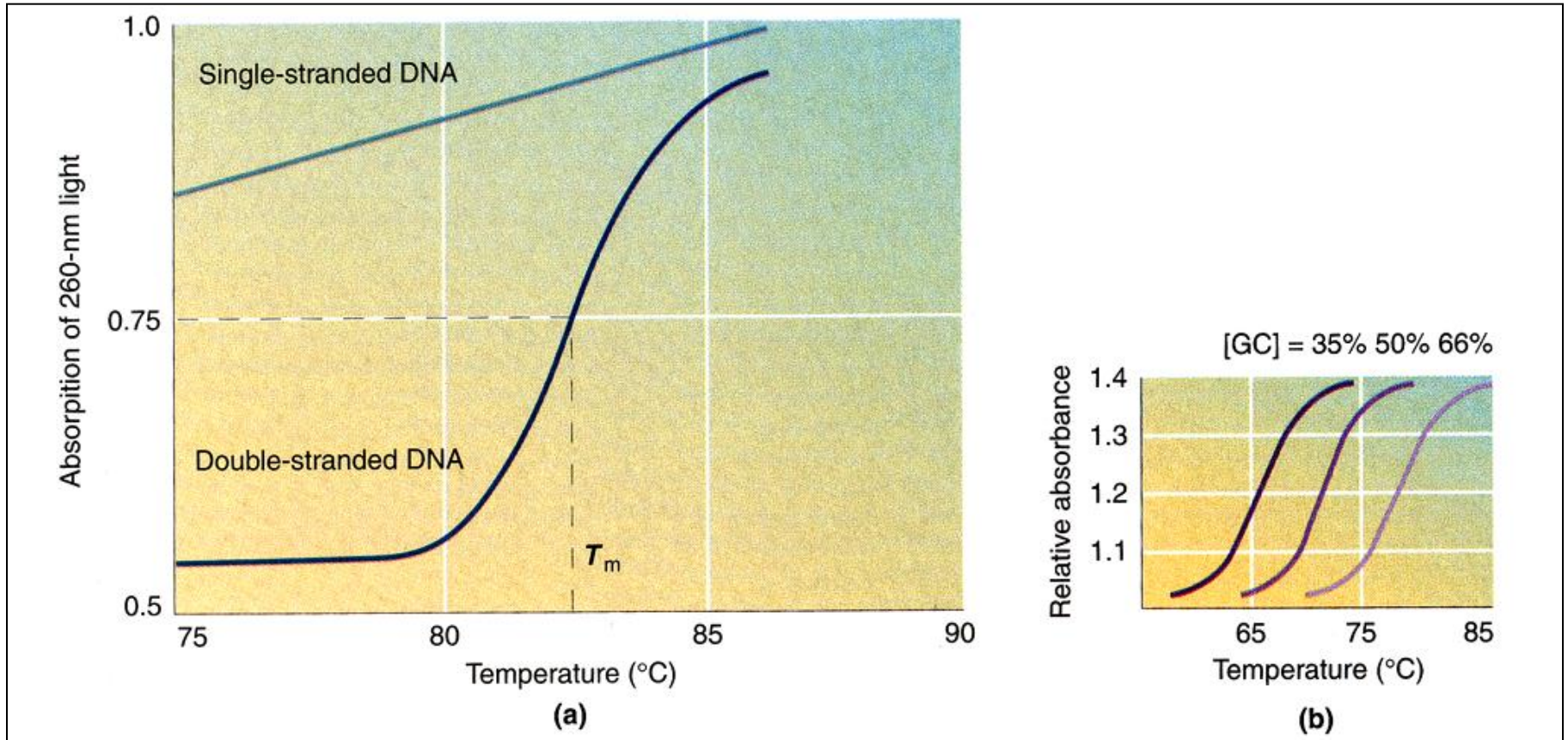
→ Dephosphorylierung mit anschließender Phosphorylierung

Denaturierung und Renaturierung von DNA



= Hybridisierung

Bestimmung des Schmelzpunkts der DNA durch Denaturierung



Hyperchromizität = Zunahme der Absorption von DNA bei OD260nm

T_m = Schmelzpunkt der DNA (50% einzelsträngig)

Welche Parameter bestimmen Renaturierung?

- **Temperatur** (Optimum ist bei T_m minus 25°C)
- **Konzentration** der DNA in der Lösung
- erlaubter **Zeit** für die Renaturierung
- dem **Salz**gehalt der Lösung
- der **Sequenzidentität** von Sonde und Zielsequenz

C_0t -Wert (Britten und Kohne)

- Produkt aus Anfangs-DNA-Konz. ‚ C_0 ‘ und der Zeit ‚ t ‘
- beschreibt die Renaturierungseigenschaften einer DNA (Punkt, an dem 50% doppelsträngig geworden ist; $C_0t_{1/2}$ -Wert)

Der C_{0t} -Wert einer DNA hängt von ihrer ‚Komplexität‘ ab

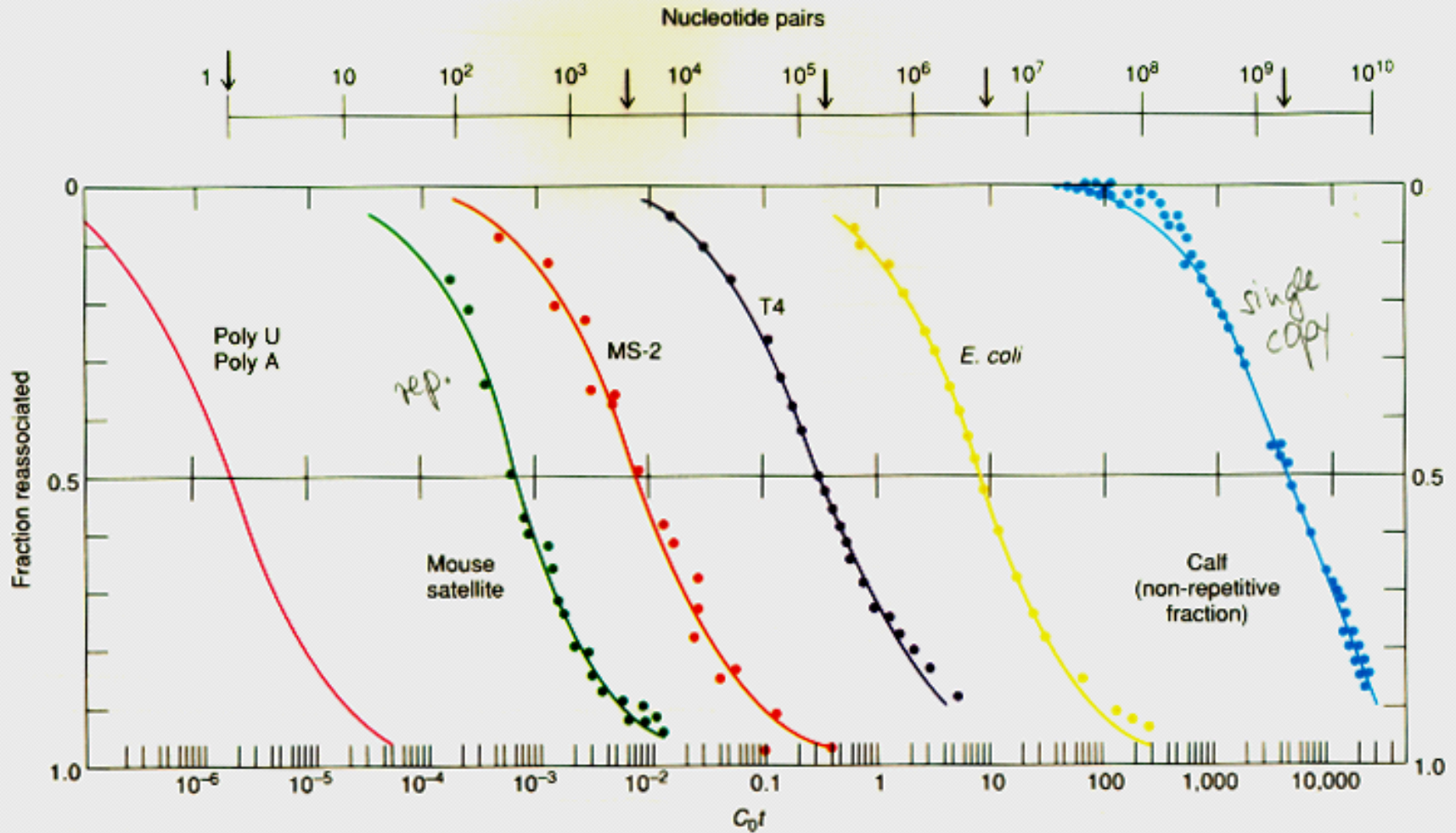


FIGURE 6.19 C_0t curves of various polynucleotides. The fraction of strands reassociated is plotted versus C_0t . Note that the descending curves actually represent reassociation. The complexity of the polynucleotides, measured in nucleotide pairs, is plotted on the upper x-axis.

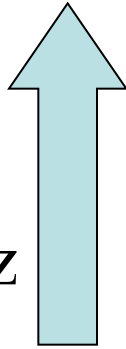
Für die DNA-DNA-Hybrisierung bedeutet dies:

- single copy-Sonden hybridisieren länger als rep. DNA
- für Oligonukleotide (< 50 Basen) als Sonden:
 $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$
jeder „mismatch“ senkt T_m um 5°C
- maximale Reassoziatiion bei $T_m - 25^\circ\text{C}$
- $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \log (\text{Konz Kationen in mol/l})$
 $+ 0,41 (\% \text{ GC}) - 500/L - 0,62 (\% \text{ Formamide})$
L = durchschnittliche Länge der DNA-Sondenmoleküle
- 1 % Fehlpaarung senkt T_m um $1^\circ\text{C} !!$

Hybridisierungs-Stringenz:

Dürfen nur identische oder auch ähnliche Sequenzen paaren?

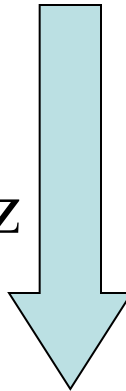
Hohe
Stringenz



Niedrig-Salz, hohe Temperatur

z.B. 0,1 x SSC, 68°C

Niedrige
Stringenz



Hoch-Salz, niedrigere Temperatur

z.B. 2 x SSC, 50-55°C