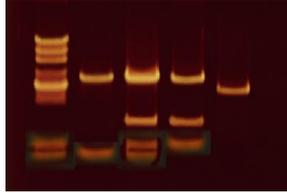


Das Prinzip der DNA-Sequenzierung



Allgemeine Informationen

Prinzip der DNA-Sequenzierung

Ziel dieses Versuchs ist einen genauen Überblick über die Verfahrensweise der DNA-Sequenzierung zu erhalten.

Der Schüler erhält ein wirkliches Autoradiogramm (ein Film der Röntgenstrahlen ausgesetzt worden ist) eines Sequenzanalysesegels, um es selbst zu analysieren. Die aus dem Autoradiogramm abzuleitende Sequenz wird sich in einem einzigen Nukleotid von der Sequenz des Wildtyps unterscheiden. Dieser Unterschied ist durch eine Mutation im DNA-Molekül verursacht worden. Die Schüler sollen die Position des mutierten Nukleotid bestimmen. Auf Grundlage ihrer (richtigen) Schlussfolgerungen können die Schüler in Gruppenarbeit die Sequenz lesen und ihre Ergebnisse vergleichen.

Die schnelle DNA-Sequenzanalyse wurde in den 70er Jahren von Forschungsgruppen aus Großbritannien und den Vereinigten Staaten entwickelt. Seitdem wurden diese Methoden weiter verbessert und automatisiert.

Es gibt zwei Annäherungen an die DNA-Sequenzierung:

- basierend auf organisch-chemischen Reaktionen mit den DNA-Basen
- unter Enzymwirkung

Die chemische Methode ist genau und schwierig durchzuführen, während die Enzym-Methode, die oft als Di-deoxy-Methode bezeichnet wird, um einiges einfacher ist. Autoradiogramme wie die, die Sie für diesen Versuch erhalten haben, sind das Ergebnis dieser zweiten Methode. Bei der Enzym-Methode werden Klenow-Fragmente der DNA-Polymerase von *E. coli* benutzt um eine Kopie der zu sequenzierenden Region herzustellen. Eine DNA-Polymerase oder deren Äquivalent wird zur DNA-Sequenzierung benutzt.

Ein spezieller Klon-Vektor (M13), der aus dem Virus *E. coli* hergestellt wird, erleichtert eine schnelle Analyse der DNA-Sequenz. Dieses Virus enthält eine Polylinker-Stelle, eine kleine DNA-Region von ungefähr 57 Basenpaaren, die mehrere einmalige Restriktionsstellen enthält. Die DNA-Segmente, die sequenziert werden sollen, sind durch eine standardisierte Klonierungs-Prozedur in die Polylinker-Region eingebettet (Abbildung 1).

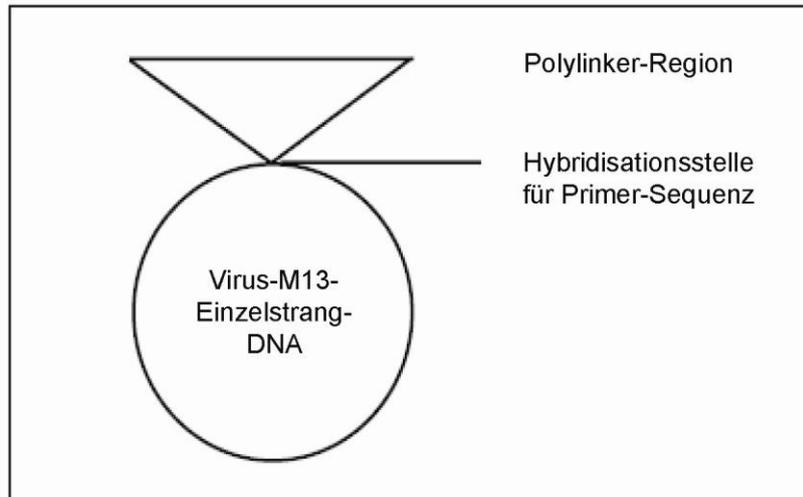


Abbildung 1

Das Virus M13 hat ein einfaches Genom aus einem runden Einzelstrang bzw. Ringgenom von ungefähr 7200 Nukleotiden. Es infiziert E. coli-Zellen des Stamms JM101, die Fruchtbarkeitsfaktoren enthalten.

Diese Zellen sind f+ und männlich. Das Virus infiziert die Zellen, indem es sich an ihren Sexual-Pilus anhängt. Nach der Infektion wird die virale DNA schnell zu einer doppelsträngigen Form ergänzt. Diese Form dient als Vorlage zur Herstellung einzelsträngiger DNA-Moleküle, die anschließend synthetisiert werden.

Die DNA verbindet sich mit den ebenfalls gebildeten viralen Proteinen. Das so zusammengefügte ausgereifte Virus (Self-Assembling) und verlässt die Zelle durch Exocytose; die Zelle wird nicht lysiert. Zur Klonierung und Sequenzierung wird die doppelsträngige DNA in die Polylinker-Region des Virus M13 eingebracht. Daraufhin können J101 Zellen gebildet werden. Die Zellen beginnen das Virus zu produzieren.

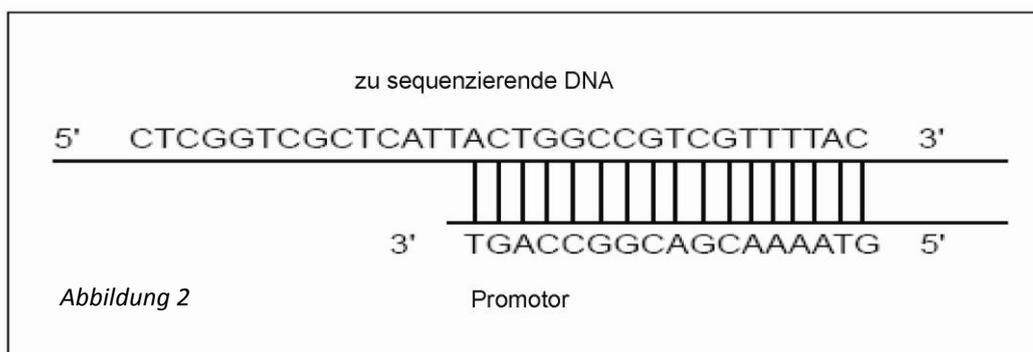


Abbildung 2

Zur Sequenzierung der DNA, die in die Polylinker-Region von M13 eingeschleust worden ist, wird die einzelsträngige DNA so vorbereitet, dass sie von viralen Plaques aus starten kann. In diesem Versuch kann ein aus 17 Basen bestehender (also ziemlich kurzer) DNA-Einzelstrang sich mit einer einzigen Stelle hybridieren (Bildung von Basenpaaren). Dieses

aus 17 Basen bestehende Oligonukleotid dient der DNA-Syntheseaufnahme durch Klenow-Fragmente der DNA-Polymerase 1, die keine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt.

Zur Analyse der Sequenz werden vier getrennte enzymatische Reaktionen durchgeführt, je Nukleotid eine Reaktion. Jede dieser Reaktionen enthält das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1, das einzelsträngige DNA-Modell, an das das aus 17 Basen bestehende Oligonukleotid hybridisiert worden ist, die 4 Deoxynucleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), ^{32}P -dATP und Pufferlösung, die für eine in vitro DNA-Synthese geeignet ist. Außerdem enthält die Reaktion "G" Dideoxy-GTP, die Reaktion "C" Dideoxy-CTP, die Reaktion "A" Dideoxy-ATP und die Reaktion „T“ Dideoxy-TTP.

Die Konzentrationen der Di-deoxynucleotide sind sorgfältig ausgewählt, so dass sie in zufälliger Reihenfolge in den DNA-Strang eingebaut werden. Sobald ein Di-deoxynucleotid in einen DNA-Einzelstrang eingebaut wurde, ist dort die DNA-Synthese beendet (Abbildung 3).

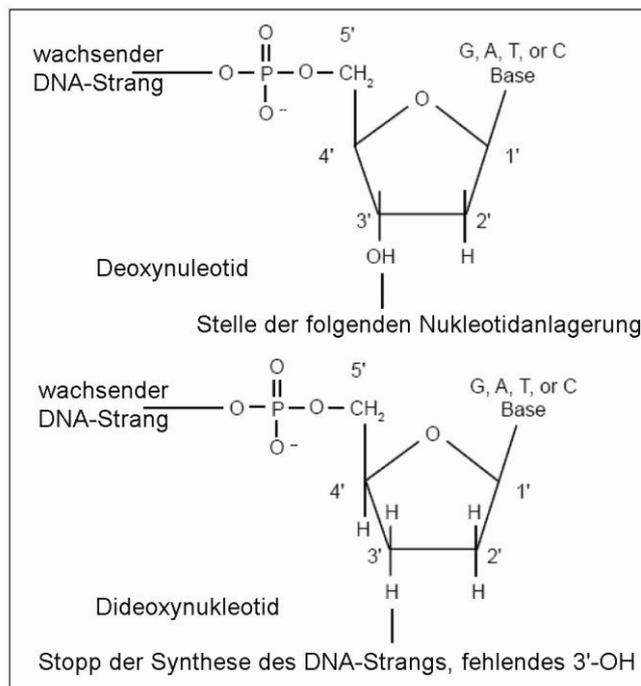


Abbildung 3

Die Di-deoxynucleotid-Einbaustelle ermöglicht es nun die genaue Position dieser Base zu bestimmen. Di-deoxynucleotide haben keine 3'-OH-Gruppe an der Ribose. Daher ist es für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase unmöglich, ein weiteres Nucleotid an den wachsenden Strang zu bauen. Die 3'-OH-Gruppe ist dafür als Reaktionsgruppe unverzichtbar.

Außer den ^{32}P -Deoxynucleotid-Triphosphate werden analoge ^{35}S -Isotope ebenfalls häufig bei der DNA-Sequenzierung benutzt. Nicht isotopische Methoden, die fluoreszierende Farbstoffe und automatische DNA-Sequenzierungsmaschinen nutzen, ersetzen immer mehr die traditionellen isotopischen Methoden.

Trotz unterschiedlicher Ortung, ist die biochemische Sequenzierungsmethode durch Di-deoxynukleotide jedoch im Großen und Ganzen das Gleiche.

Wenn eine bestimmte Reaktion Millionen von wachsenden DNA-Fragmenten enthält, erhält man ein "nested set" (eingebettetes Gefüge) von Fragmenten. Jedes Fragment ist an einer anderen Position beendet und zwar an der Stelle, an der sich zufällig ein Di-deoxynukleotid angelagert hat.

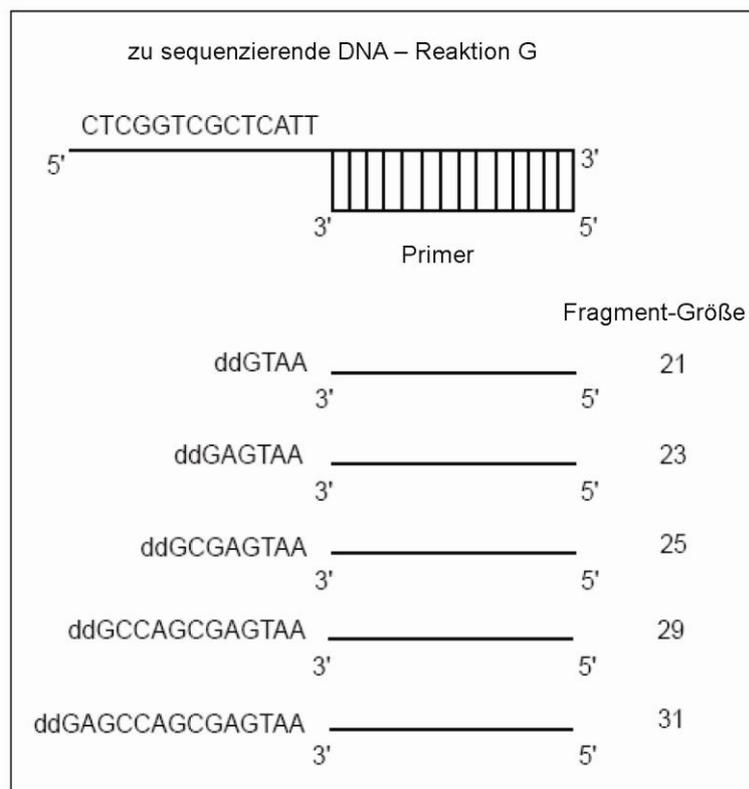


Abbildung 4

Abbildung 4 zeigt das "nested set" aus Fragmenten, das für eine hypothetische Sequenz in Reaktion G erstellt wurde. Reaktion "G" enthält dATP, dCTP, dGTP, dTTP, das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase, eine geeignete Lösung für die DNA-Synthese, ATP, welches mit ^{32}P markiert worden ist und eine kleine Menge DideoxyGTP.

Wie man sehen kann, ist durch die zufällige und seltene Einlagerung des ddGTP (Di-deoxy-GTP) ein "nested set" aus Fragmenten entstanden, die von einem ddGTP beendet werden. Das "nested set" ist komplementär zu der Region, die sequenziert wurde. Ähnliche "nested sets" erhält man in den Reaktionen "A", "T" und "C". Zum Beispiel endet das "nested set" der Reaktion "A" mit einem ddATP.

Die Gesamtheit der "nested sets" der Reaktionen "G, A, T, C" enthält folglich durch ^{32}P markierte Fragmente, die aufsteigend zwischen 19 und 31 Nukleotiden lang sind (Vergleich: Abbildung 4).

Die Reaktion "G" enthält Fragmente mit 21, 23, 25, 29 und 31 Nukleotiden Länge. Die 17 ersten Nukleotide befinden sich in dem Fragment zur Aufnahme der DNA-Synthese. Der Rest wird während der Neosynthese von dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1 hinzugefügt.

Das Sequenzierungsgel aus Polyacrylamid

Die aus den Reaktionen G, A, T und C entstandenen radioaktiven Produkte werden zur Trennung der Proben auf dem dünnen, senkrecht stehenden Polyacrylamid-Gel (Größe 14 x 17 cm) benutzt. Tasche Nummer 1 enthält die Produkte der Reaktion "G", Tasche Nummer 2 die Produkte der Reaktion "A", Tasche Nummer 3 die Produkte der Reaktion "T" und Tasche Nummer 4 die Produkte der Reaktion "C". Der Elektrophorese-Apparat, der das Polyacrylamid-Gel enthält, ist mit einem Generator verbunden, unten die positive Elektrode, oben die negative Elektrode.

Eine starke Spannung (2000 Volt, kontinuierlicher Strom), wird zur Trennung der mit ^{32}P markierten Fragmente genutzt, sie wandern von oben nach unten. Nur Sequenzierungsgels aus Polyacrylamid können Fragmente trennen, deren Größe sich nur um ein Nukleotid unterscheidet. Kleine Fragmente wandern leichter, während die größeren langsamer sind.

Sobald die Trennung durch Elektrophorese abgeschlossen ist, folgt eine Autoradiographie. Das Polyacrylamid-Gel wird in direkten Kontakt mit einem für Röntgenstrahlen empfindlichen Film gebracht. Da die DNA-Fragmente durch ^{32}P radioaktiv markiert sind, kann ihre Position aufgrund einer schwarzen Bande auf dem Film ausgemacht werden. Je Tasche erscheinen horizontale "Banden" auf senkrechten Linien, die von oben nach unten auf dem Film verlaufen. Normalerweise enthält eine Elektrophorese 12 "GATC"-Reaktionen zur Sequenzierung, weil es auf einem klassischen Gel 48 Taschen gibt.

Ein einfaches Autoradiogramm kann somit Auskunft über 1000 Nukleotide einer neuen Sequenz geben.

Abbildung 5 zeigt ein Autoradiogramm, das aus der hypothetischen Sequenzanalyse von Abbildung 4 entstanden ist. Die schwarzen Banden sind aufgrund des ^{32}P auf dem für Röntgenstrahlen empfindlichen Film entstanden. Das ^{32}P war mittels der Di-deoxynukleotide während der DNA-Synthese in die DNA-Fragmente eingebaut. Die aus dem Autoradiogramm gefolgerte Sequenz ist komplementär zu dem DNA-Einzelstrang in M13.

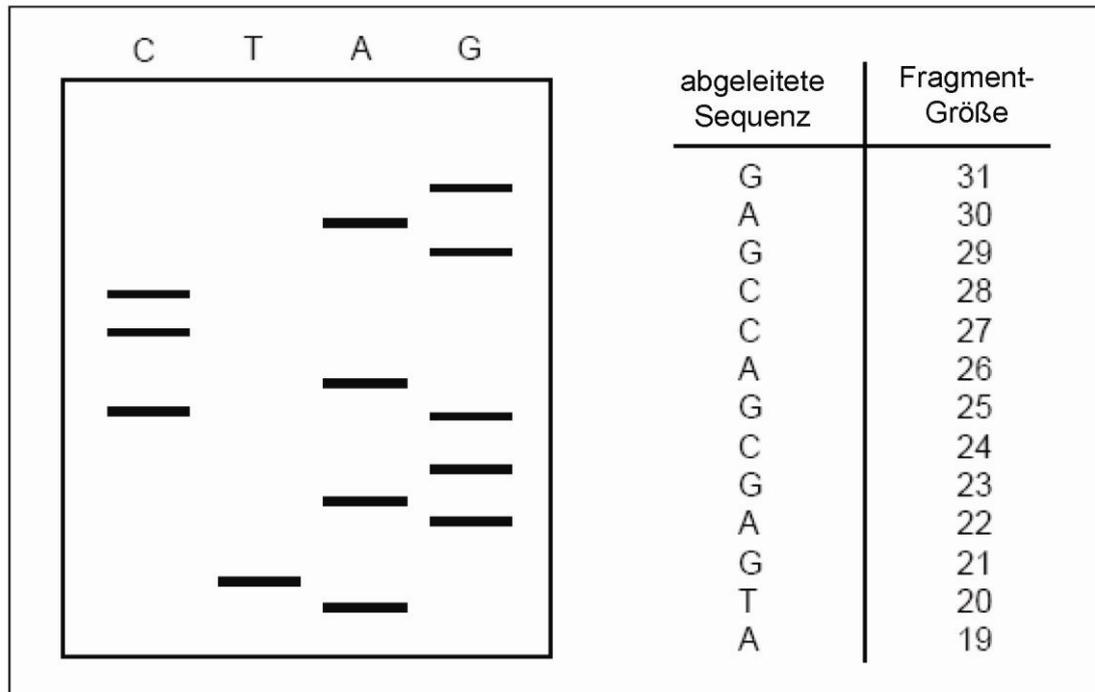


Abbildung 4

Versuchsprotokoll

Ziel des Versuchs

Ziel des Versuchs ist, ein Verständnis für das Verfahren der DNA-Sequenzierung und -Analyse zu entwickeln. Die Autoradiogramme dieses Versuchs zur DNA-Sequenzierung sind Ergebnisse einer Untersuchung, die von einem Labor aufbewahrt wurden.

1. Zur Verbesserung der Sichtbarkeit sollen die autoradiographischen Proben auf einen Leuchtkasten gelegt werden.
2. Die Reaktionen zur Sequenzierung wurden alle in folgender Reihenfolge eingebracht: G-A-T-C.
3. Beginnen Sie die DNA-Sequenzanalyse unten auf dem Autoradiogramm mit der eingekreisten Bande, die einer Reaktion "A" entspricht.
4. Vergleichen Sie die erhaltene Sequenz mit der in Abbildung 6 dargestellten Sequenz.
5. Identifikation und Lokalisierung des mutierten Nukleotid: Um welche Mutation handelt es sich? Gibt es mehr als eine Mutation?