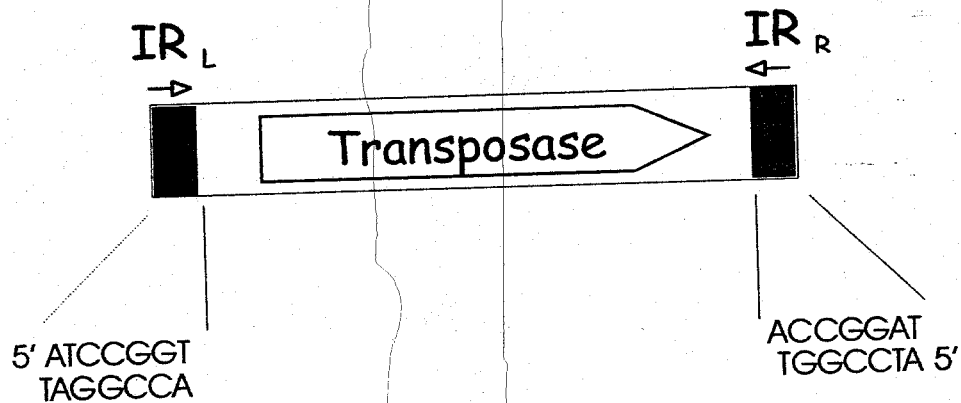
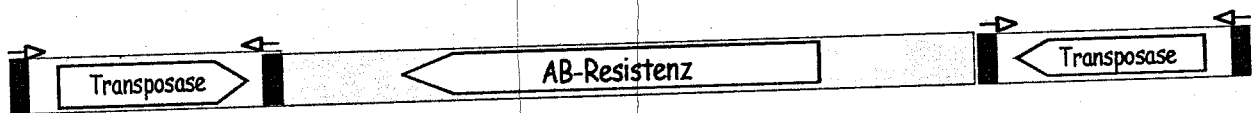


Transponierbare DNA Elemente

Insertionssequenzen (IS)



Zusammengesetztes Transposon (z.B. Tn5)



Einfaches Transposon (z.B. Tn3)

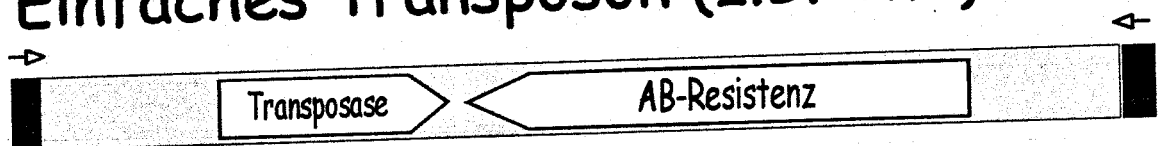
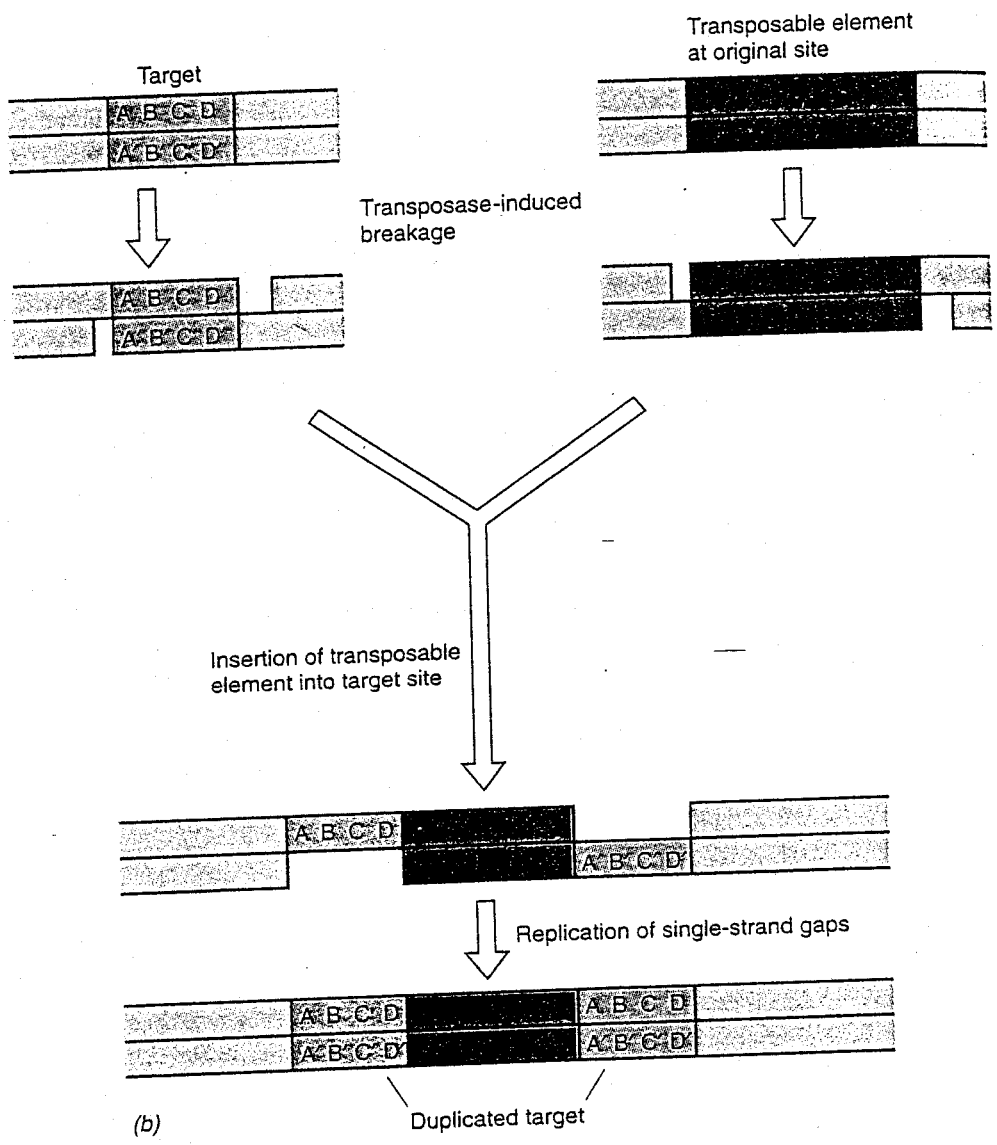


Table 14.5 Examples of composite bacterial transposons

Transposon	Length (bp)	Terminal structure	IS orientation	IS relationship	Functional IS	Resistance gene for:	Transposition mechanism
Class I							
Tn5	5820	IS50 R/IS50 L	Inverted	1-bp change	IS50 R	Kanamycin	Nonreplicative
Tn9	2650	IS1	Direct	Identical	Both	Chloramphenicol	Nonreplicative
Tn10	9300	IS10 R/IS10 L	Inverted	Differ 2.5%	IS10 R	Tetracycline	Nonreplicative
Tn903	3094	IS903	Inverted	Identical	Both	Kanamycin	Nonreplicative
Class II							
Tn3	4957	38-bp inverted repeats				Ampicillin	Replicative
Tn1000 (=γδ)	5981	38-bp inverted repeats				None	Replicative

Table 14.4 Common insertion sequence elements (IS) of *Escherichia coli*

IS element	Length (bp)	Inverted terminal repeats (bp)	Direct target repeats (bp) †	Target selection	Copies per <i>E. coli</i> genome
IS1	768	23	9	random	5-10
IS2	1327	41	5	hot spots	4-8
IS3	1258	40	3	hot spots	5
IS5	1195	16	4	hot spots	10-12
IS10	1329	22	9	NGCTNAGCN	2
IS50	1531	9	9	hot spots	0



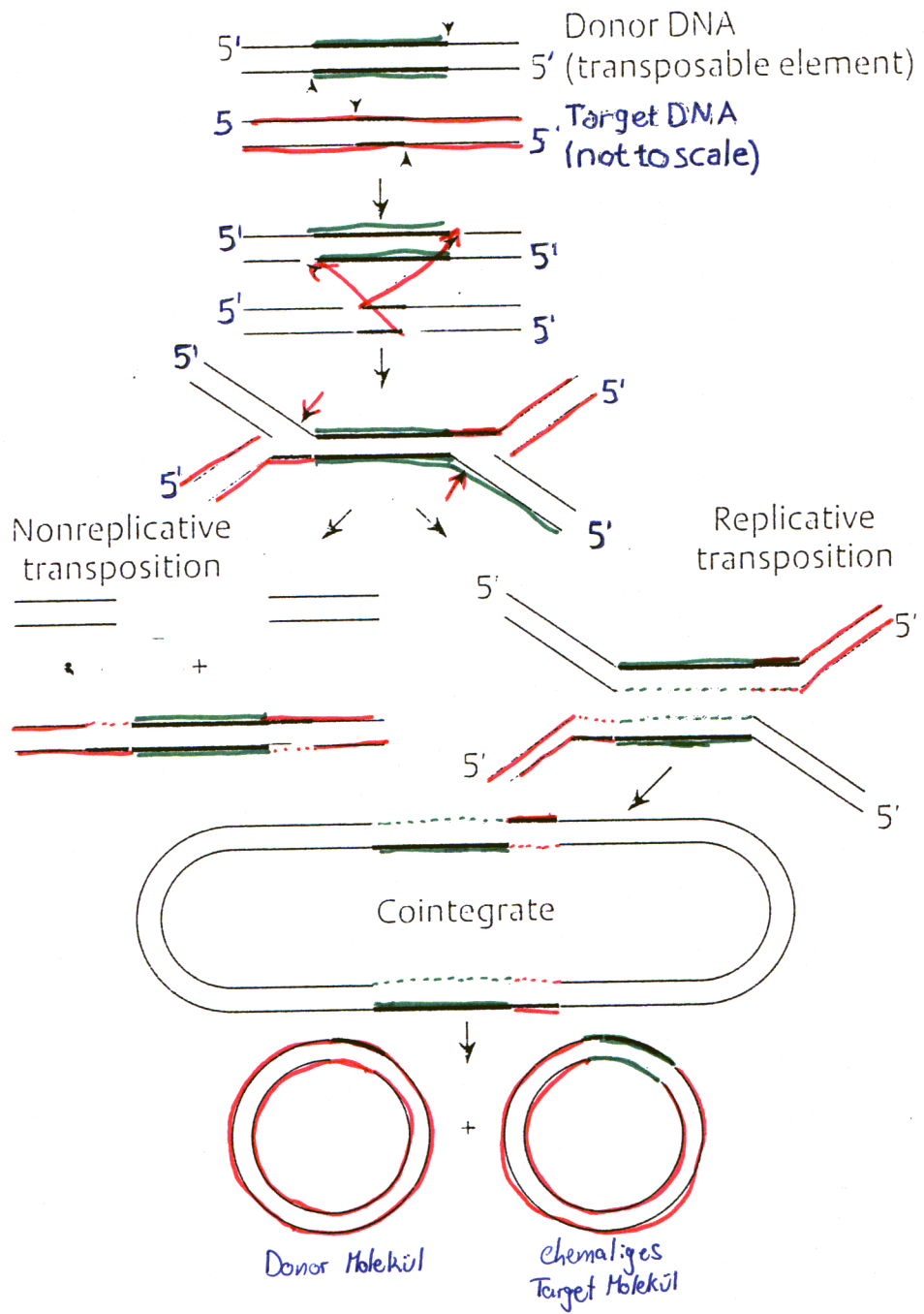
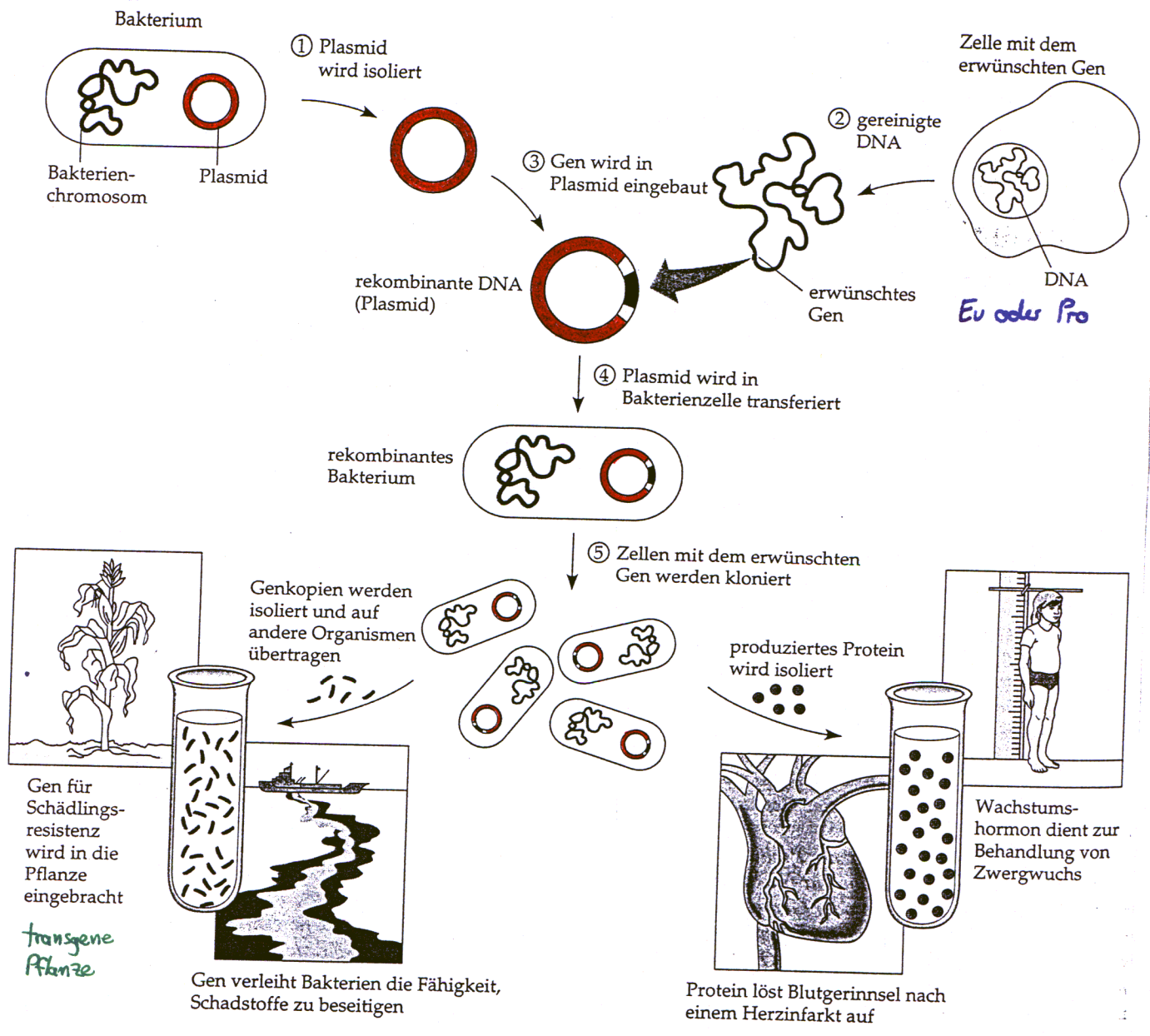


Table 8.1 Major biotechnological products made by recombinant DNA techniques*

Product	Function
Blood Proteins	
Tissue plasminogen activator	Dissolves clots
Factors VII, VIII, IX	Promote clotting
Erythropoietin	Red cell growth
Urokinase	Blood clotting
Hormones	
Insulin	Treatment of diabetes
Human growth hormone	Treat dwarfism
Epidermal growth factor	Wound healing
Parathyroid hormone	Calcium regulation
β -Endorphin	Pain relief
Bone growth factor	Osteoporosis
Atriopeptin	Diuretic, antihypertensive
Immune modulators	
Interferons	Antiviral and potential anticancer agents
Interleukin-2	T-cell stimulator
Tumor necrosis factor	Antitumor agent
Colony stimulating factor	Treatment of infections and cancer
Lysozyme	Anti-inflammatory
Vaccines	
Hepatitis B	Prevention of serum hepatitis
Cytomegalovirus	Prevention of infection
Measles	Prevention of measles
Cholera	Prevention of cholera
AIDS	Prevention of AIDS
Rabies	Prevention of rabies

*Although research is currently progressing in all of these areas, not all of the listed products are yet on the market.



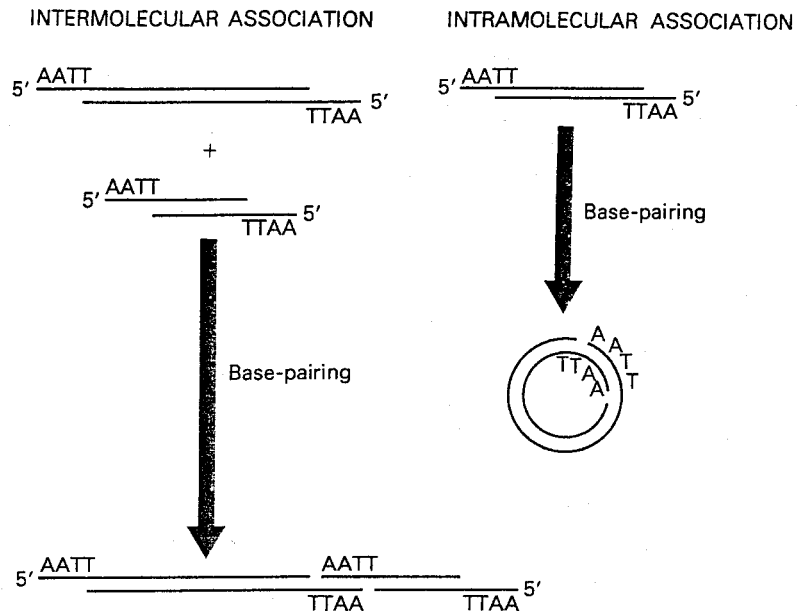


Fig. 2.2 Cohesive ends of DNA fragments produced by digestion with *Eco* RI.

Tabelle 5.1: Einzelne Restriktionsenzyme und ihre Spaltsequenzen

Mikroorganismus	Enzymkürzel	Spaltsequenz	Anmerkungen*
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	5' ... G G C C ... 3' 3' ... C C G G ... 5'	1
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	5' ... T C G A ... 3' 3' ... A G C T ... 5'	2
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>HhaI</i>	5' ... G C G C ... 3' 3' ... C G C G ... 5'	3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>DdeI</i>	5' ... C T N A G ... 3' 3' ... G A N T C ... 5'	4
<i>Moraxella bovis</i>	<i>MboII</i>	5' ... G A A G A (N) ₈ ... 3' 3' ... C T T C T (N) ₇ ... 5'	5
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRV</i>	5' ... G A T A T C ... 3' 3' ... C T A T A G ... 5'	1
	<i>EcoRI</i>	5' ... G A A T T C ... 3' 3' ... C T T A A G ... 5'	2
<i>Providencia stuarti</i>	<i>PstI</i>	5' ... C T G C A G ... 3' 3' ... G A C G T C ... 5'	3
<i>Microcoleus</i>	<i>MstII</i>	5' ... C C T N A G G ... 3' 3' ... G G A N T C C ... 5'	4
<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	<i>NotI</i>	5' ... G C G G C C G C ... 3' 3' ... C G C C G G C G ... 5'	6

* Anmerkungen:

1. Enzym erzeugt stumpfe Enden.
2. Das 5'-Ende hängt über.
3. Das 3'-Ende hängt über.
4. N kann entweder ein Purin oder ein Pyrimidin sein.
5. Das Enzym schneidet nicht innerhalb der Erkennungssequenz, sondern in beliebiger Sequenz 8 Nucleotide vom 3'-Ende der Erkennungsstelle entfernt.
6. *NotI* besitzt eine achtbasige Erkennungssequenz und schneidet Säuger-DNA äußerst selten.

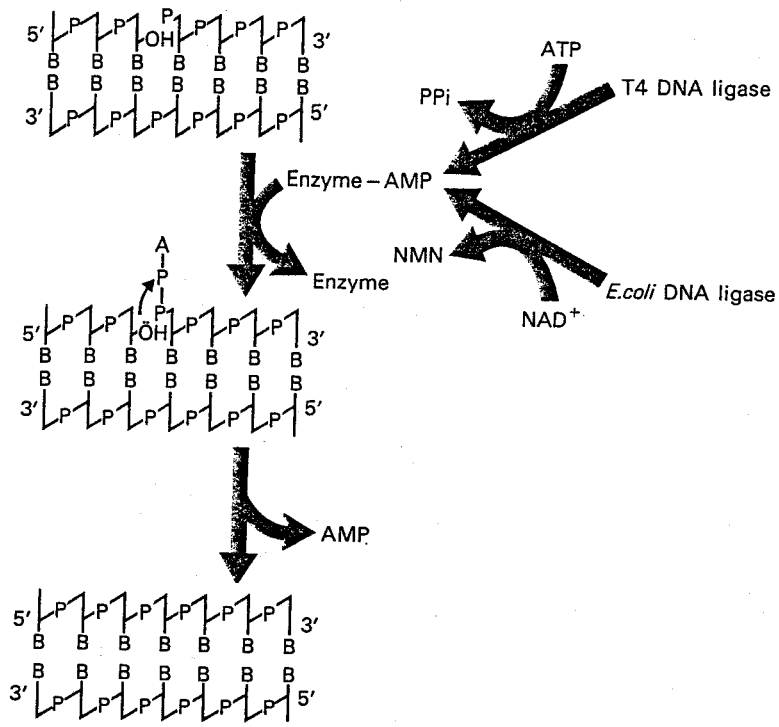


Fig. 2.4 Action of DNA ligase. An enzyme-AMP complex binds to a nick bearing 3'-OH 5'-P groups. The AMP reacts with the phosphate group. Attack by the 3'-OH group on this moiety generates a new phosphodiester bond which seals the nick.

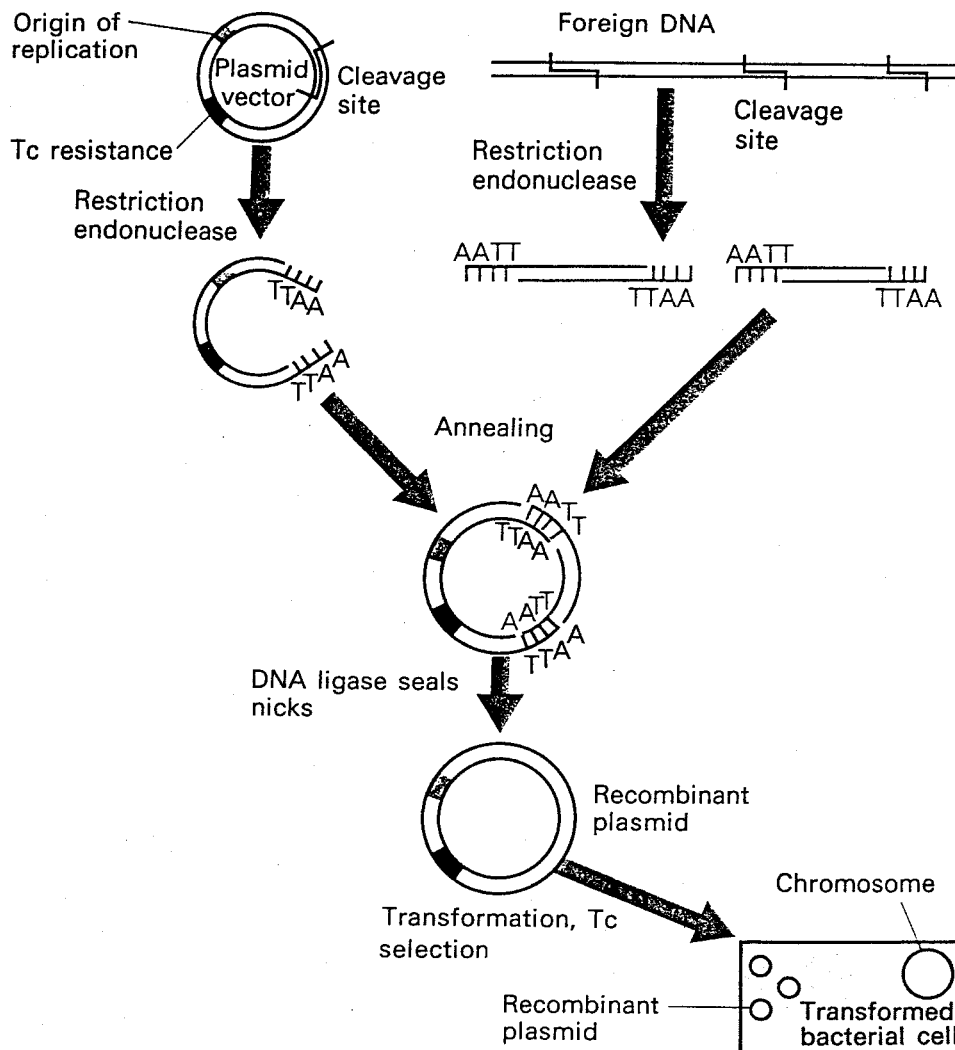
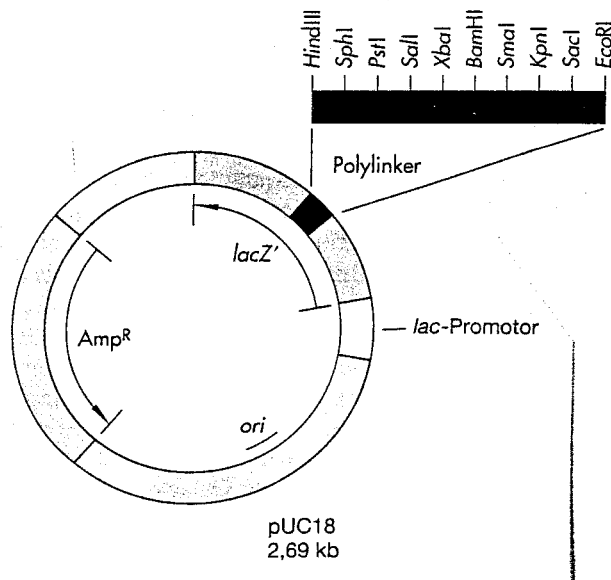


Fig. 2.5 Use of DNA ligase to create a covalent DNA recombinant joined through association of termini generated by *Eco* RI.



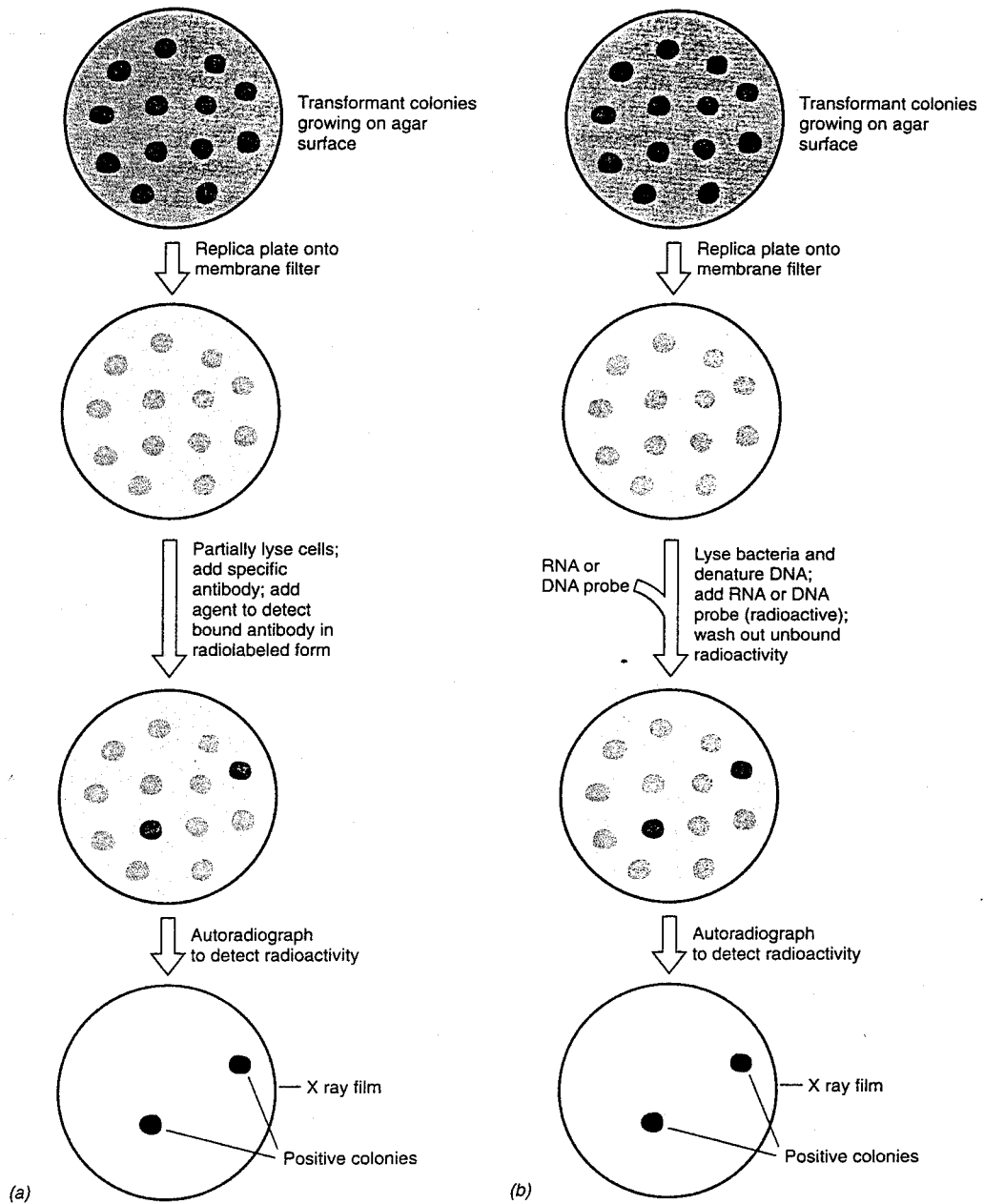


FIGURE 8.7 Finding the right clone. (a) Method for detecting production of protein by use of specific antibody. (b) Method for detection of recombinant clones by colony hybridization with a radioactive nucleic acid probe.

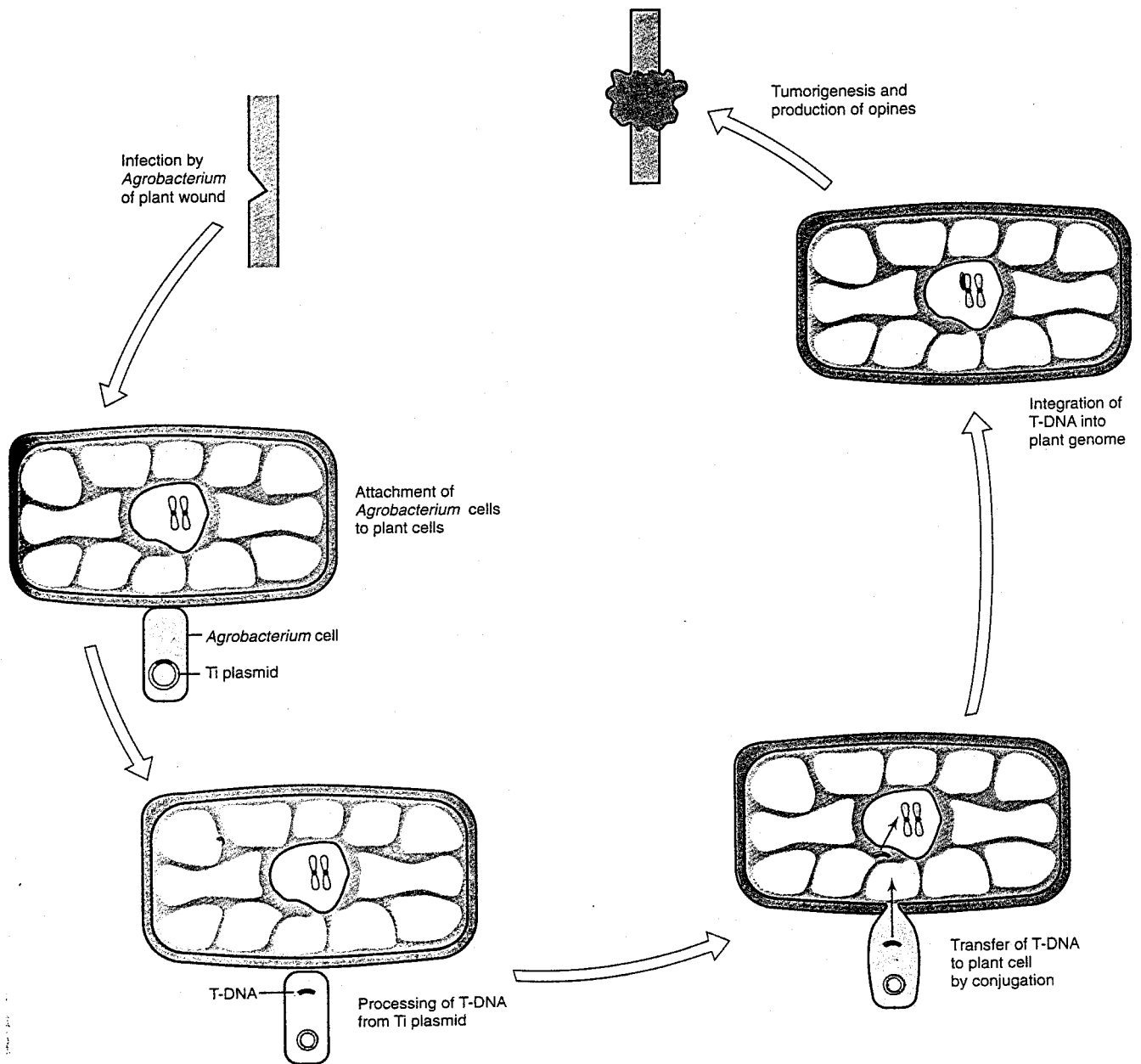


FIGURE 17.62 Overview of events in crown gall disease following infection of a susceptible plant by *Agrobacterium tumefaciens*.

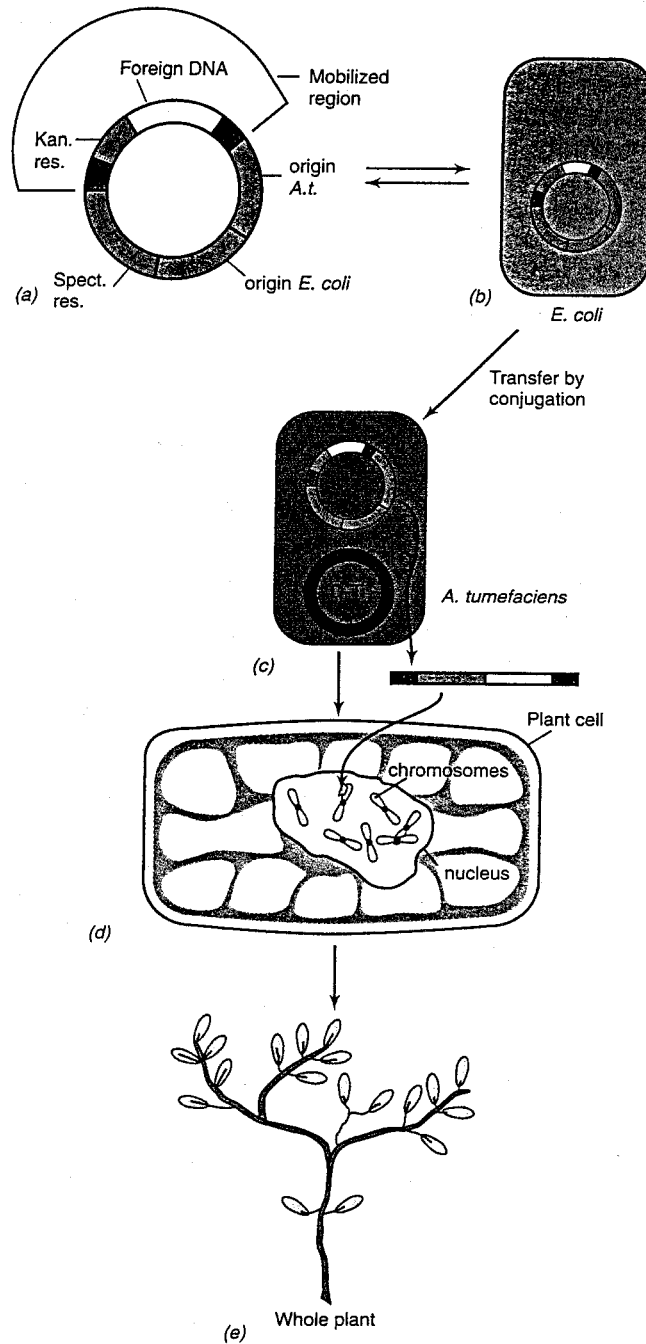
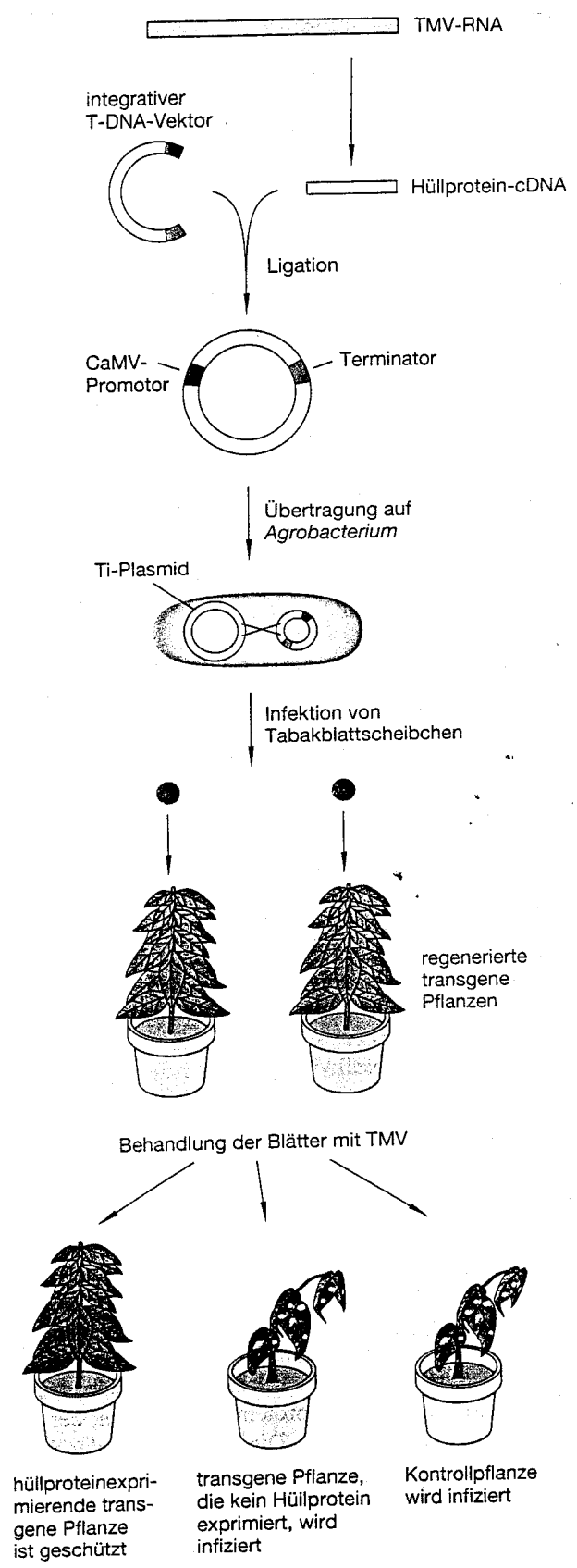
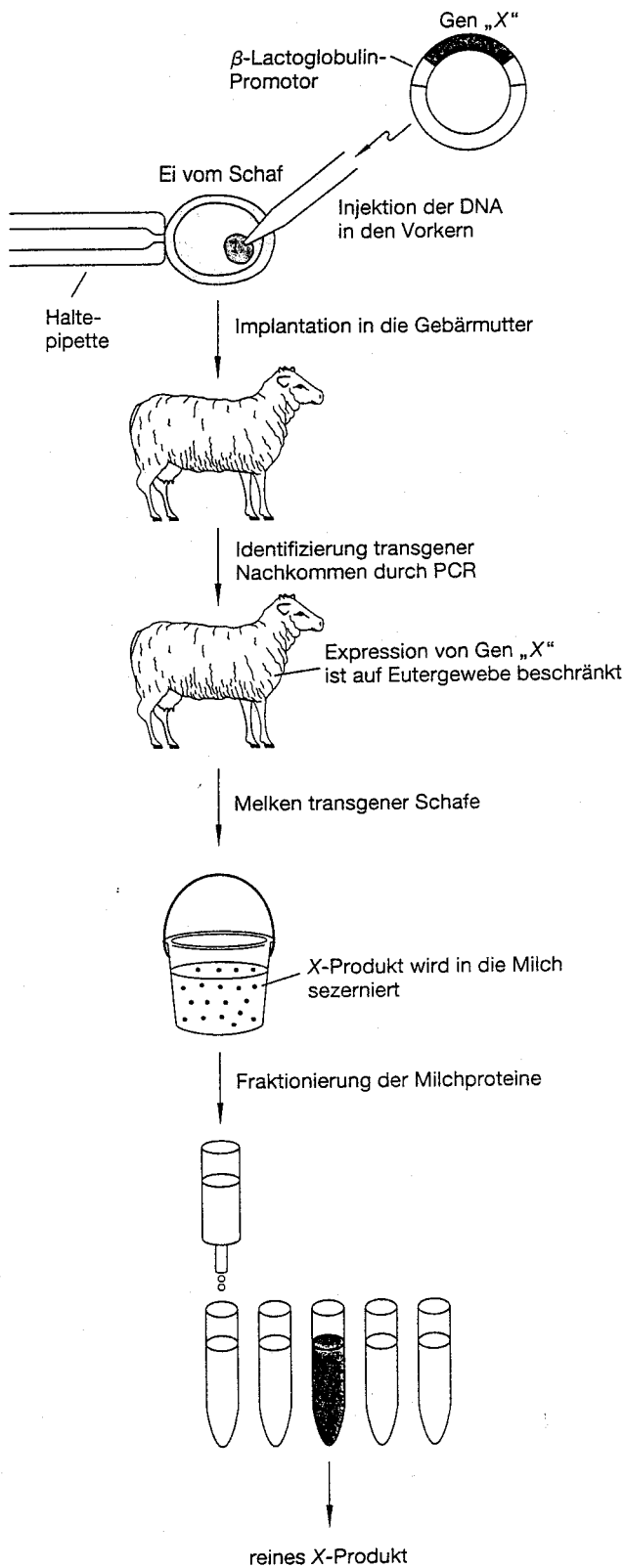
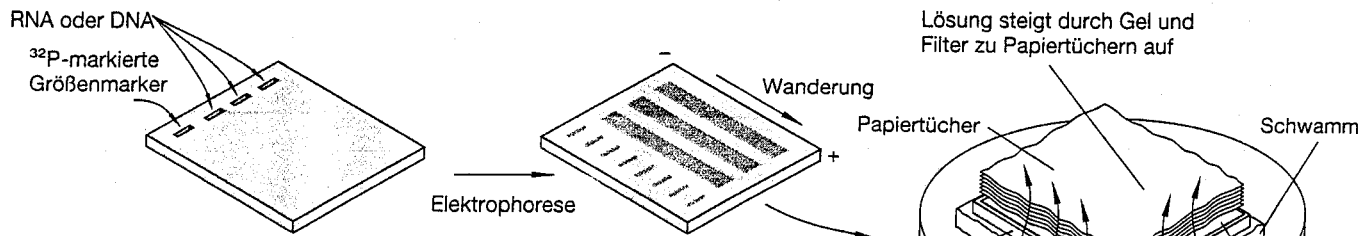


FIGURE 8.18 Production of transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. (a) Generalized plant transfection vector containing ends of T-DNA (in red), foreign DNA (in yellow), origin of replication elements for both *E. coli* and *A. tumefaciens*, and spectinomycin and kanamycin resistance markers. The kanamycin resistance marker can be selected for in plants. (b) The vector can be put into *E. coli* for cloning purposes and then transferred to *A. tumefaciens* by conjugation. (c) The resident Ti plasmid used for transferring the vector to the plant (D-Ti) is itself genetically engineered to remove key pathogenesis genes. (d) However, D-Ti can mobilize the T-DNA region of the vector for transfer to plant cells grown in tissue culture. From the recombinant cell, whole plants can be regenerated.





24.6 Die Produktion eines pharmazeutisch bedeutsamen Proteins in der Milch transgener Schafe. Das Gen „X“ codiert ein therapeutisch verwendbares Protein, etwa den Gewebeplasminogenaktivator, mit dem Blutgerinnsel in der Blutbahn des Menschen aufgelöst werden (Kapitel 23). Das Gen unterwirft man der Regulation durch den β -Lactoglobulin-Promotor, der nur in Brustdrüsengewebe aktiv ist, und anschließend bringt man es durch Mikroinjektion des Expressionsvektors in den Kern von Schafoocyten. Diese Eizellen setzt man in die Gebärmutter von Ammentieren ein. Nachkommen, die das Transgen exprimieren, identifiziert man durch PCR-Amplifikation chromosomaler DNA, wobei man Primer aus der Sequenz des Gens „X“ verwendet. Transgene Schafe exprimieren X nur in Brustdrüsengewebe und sezernieren große Mengen des X-Proteins in die Milch, aus der sich das Produkt reinigen läßt.



7.23 Die Analyse von DNA und RNA durch Gelelektrophorese und Blotting. DNA, die mit Restriktionsenzymen geschnitten wurde, oder aus Zellen gewonnene RNA wird auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt. Die Nucleinsäuren überträgt man aus dem Gel auf ein Nitrocellulosefilter, so daß ein präziser Abklatsch des Gels entsteht. Zu diesem Zweck legt man das Gel gewöhnlich auf einen Schwamm, der in einer Pufferschale liegt. Das Filter legt man über das Gel und bedeckt es mit einem Stapel Papierhandtücher, der seinerseits wie ein Schwamm wirkt und den Puffer durch den Schwamm, das Gel und das Filter anzieht. DNA- oder RNA-Fragmente werden aus dem Gel auf das Filter geschwemmt, wo sie haften bleiben. Man entfernt das Filter und hybridisiert es mit einer radioaktiv markierten Sonde. Die Hybridisierung macht speziell die gesuchte Sequenz sichtbar, selbst wenn sie nur einen kleinen Bruchteil der Nucleinsäuren auf dem Filter ausmacht. Dies ist der Grund für die außergewöhnliche Selektivität der Methode. Nicht gebundene Sondenmoleküle wäscht man ab, und dann wird das Filter auf einen Röntgenfilm gelegt. Die Lage eines DNA- oder RNA-Fragments, das komplementär zur Sonde ist, erscheint als Bande auf dem Film. Diese Verfahren nennt man *Southern Blotting*, wenn DNA auf die Nitrocellulose übertragen wird, *Northern Blotting*, wenn es sich um RNA handelt, und *Western Blotting*, wenn Protein von einem SDS-Polyacrylamidgel transferiert wird. Beim Western Blotting macht man das gesuchte Protein mit Hilfe eines Antikörpers sichtbar, der es spezifisch vor dem Hintergrund anderer Zellproteine erkennt.

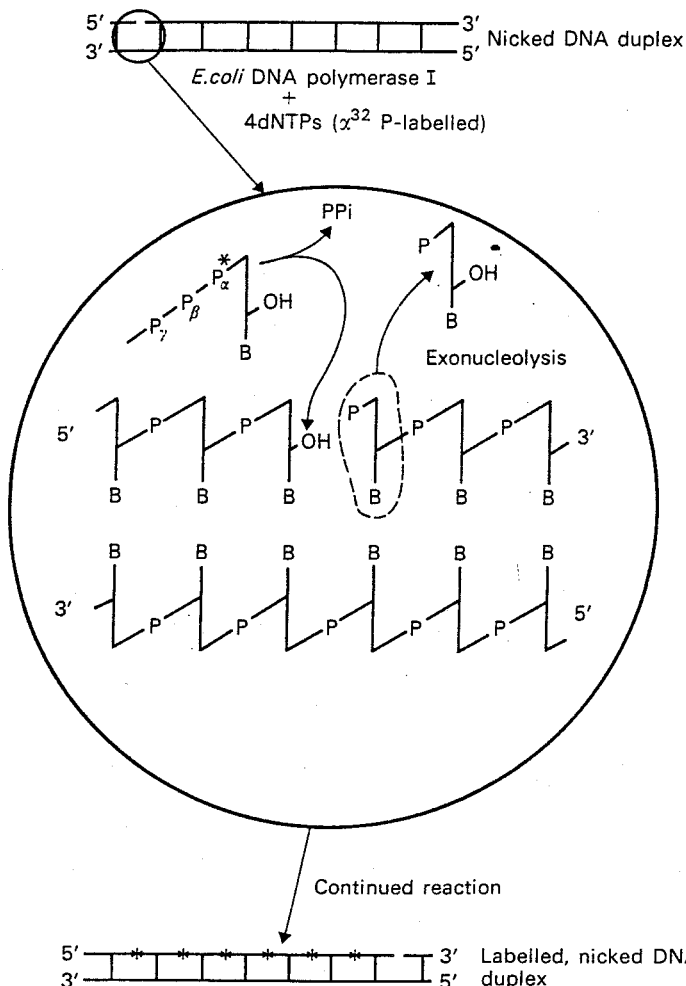
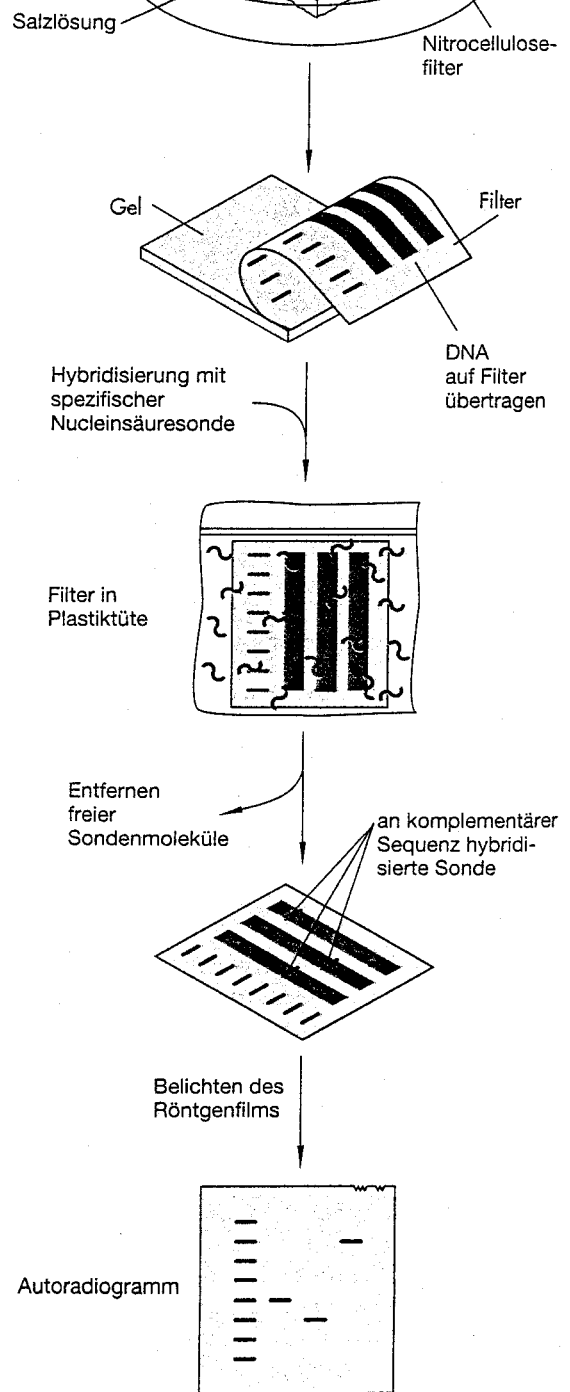
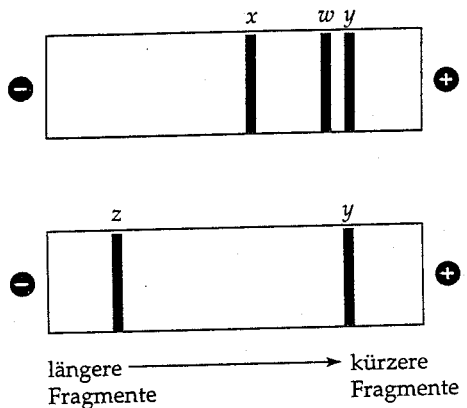
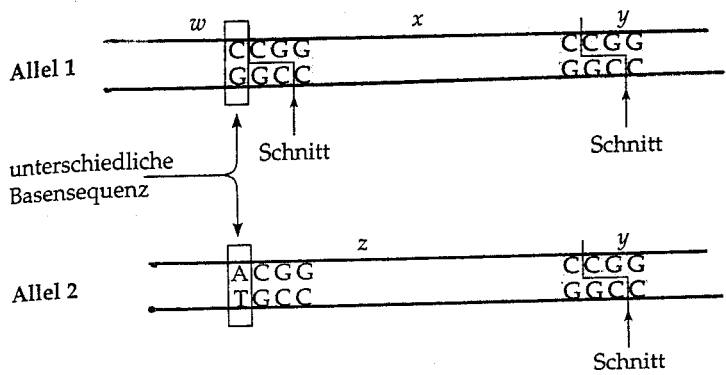


Fig. 15.1 ^{32}P -labelling of duplex DNA by nick translation. Asterisks indicate radiolabelled phosphate groups.

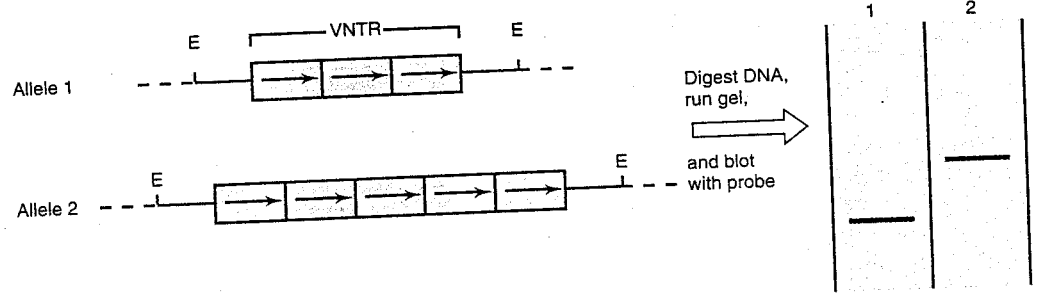


(a) DNA zweier Allele

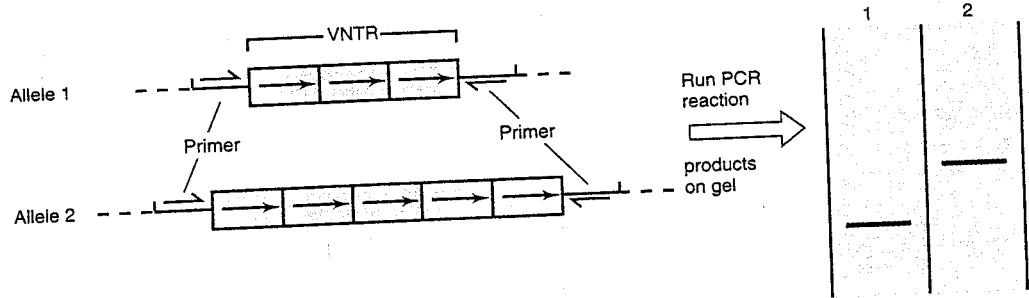
(b) Elektrophorese der Restriktionsfragmente

19.7 Verwendung von Restriktionsfragment-Mustern zur Unterscheidung verschiedener Allele. a) Die DNA zweier Allele unterscheidet sich in bestimmten Restriktionsschnittstellen (hier sind nur die relevanten Basen gezeigt). Das Restriktionsenzym, dessen Erkennungssequenz hier zu sehen ist, schneidet die DNA des Allels 1 in drei Stücke (w, x und y), die DNA des Allels 2 dagegen nur in zwei (z und y). b) Die Restriktionsfragmente der DNA jedes Allels werden durch Elektrophorese

in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. (Sie wandern im elektrischen Feld in Richtung des Pfeils.) Man erkennt einen klaren Unterschied des Bandenmusters im Gel. Die DNA des Allels 1 zeigt in der Elektrophorese drei Banden, die den Fragmenten w, x und y entsprechen. Die DNA des Allels 2 ergibt nur zwei Banden, entsprechend der Fragmente z und y.

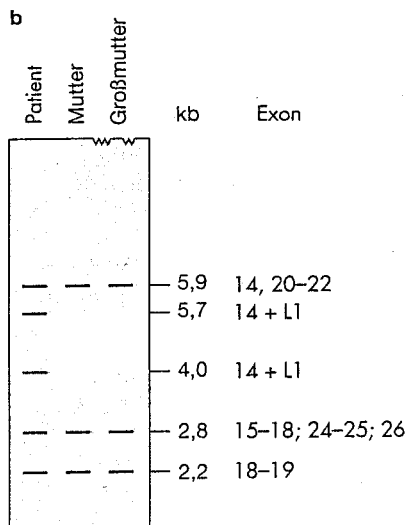
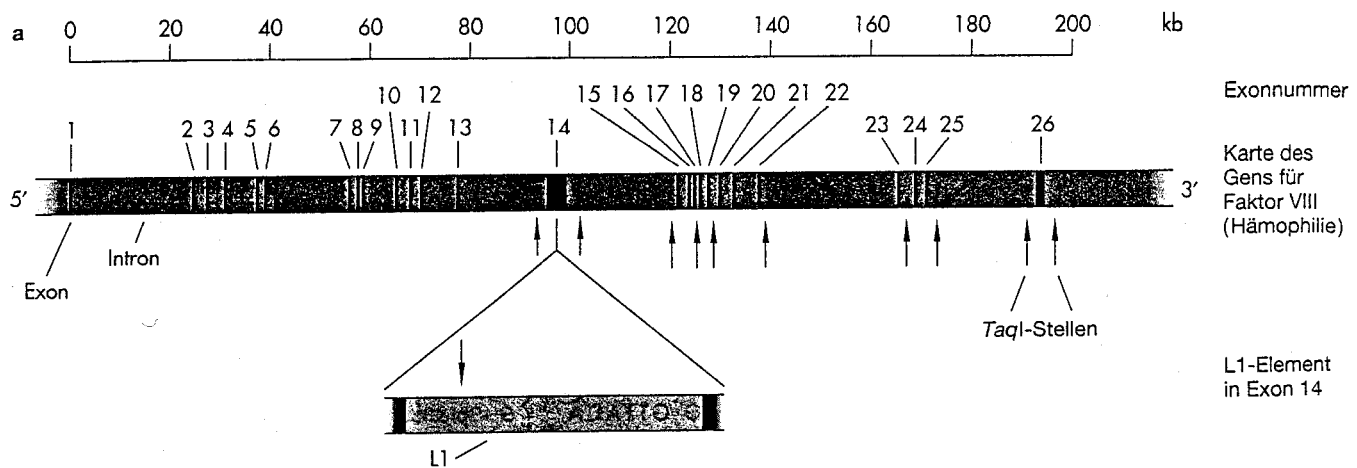


(a)



(b)

DNA fingerprinting. (a) Two different alleles of a region of a single chromosome. The alleles differ only in the number of repeats in the VNTR. DNA from cells containing these chromosomes can be cut with the restriction enzyme *EcoRI* (which does not cut within the VNTR) and the fragments separated on an agarose gel. The fragments containing the VNTR are then identified after Southern blotting by hybridization with a probe specific to the VNTR. (For simplicity, the figure shows only the result from individuals whose two chromosomes each have the same allele at this site.) (b) The same alleles, but this time with primers that could be used to amplify the VNTR segments by PCR. The products of the PCR reaction can be loaded directly onto the gel without restriction digestion.



27.4 Die Mutation im Hämophiliegen (Faktor VIII), die durch die Insertion eines L1-Elements verursacht wird. (a) Eine Karte des Hämophiliegens mit der Lage seiner Exons (bezeichnet mit 1-26) und der TaqI-Stellen (Pfeile). Das L1-Element liegt im Exon 14 und enthält eine TaqI-Stelle (Pfeil). (b) Bei Spaltung normaler DNAs (von Mutter und Großmutter) mit TaqI, gefolgt von einer Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde für die Exons 14 bis 26, erkennt man drei Fragmente des Hämophiliegens. Ihre Größe beträgt 5,9, 2,8 und 2,2 kb. Die Bande bei 5,9 kb enthält in Wirklichkeit zwei Fragmente ähnlicher Größe. Eines enthält Exon 14, und das andere umfaßt Exons 20-22. Die DNA des Patienten enthält das letztere Fragment, denn das Fragment mit Exon 14 wird in zwei Bruchstücke geteilt, weil das hier eingefügte L1-Element eine TaqI-Stelle enthält. Das L1-Element läßt die Größe dieses Exon-14-Fragments von 5,9 auf 9,7 kb steigen. Seine beiden Teilstücke haben eine Länge von 5,7 und 4,0 kb. (Nach Kazazian et al., 1988.)