

# Synthese von DNA

---

- chemisch

*de novo*-Synthese

Synthese von Oligonukleotiden bis 20-50 bp

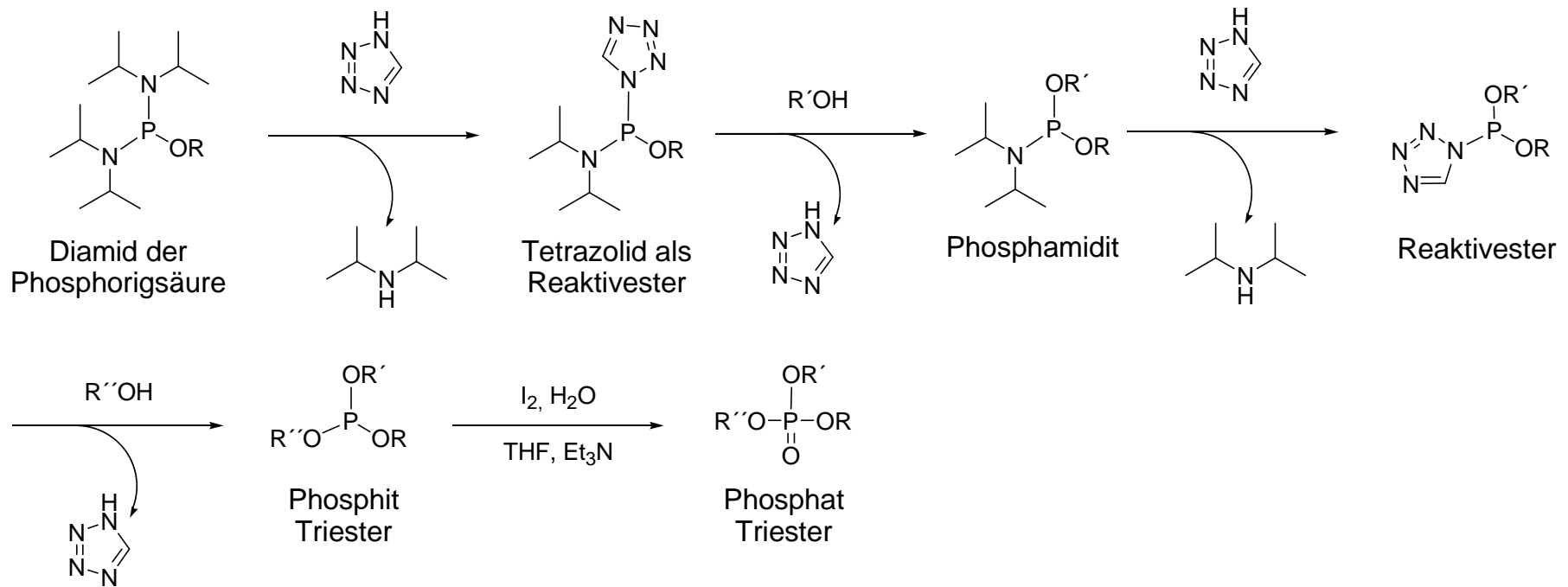
- molekularbiologisch

Vermehrung bekannter DNA

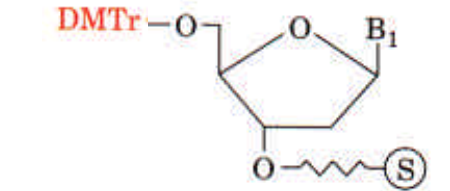
Synthese des Gegenstranges: Polymerasekettenreaktion (PCR)

# Chemische Synthese von DNA

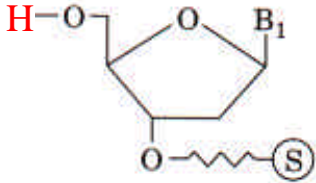
Viele DNA-Synthese laufen über den Phosphor in der Oxidationsstufe III, also über die Phosphit-Triester. P(III) ist reaktiver als P(V).

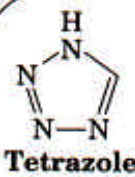
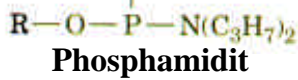


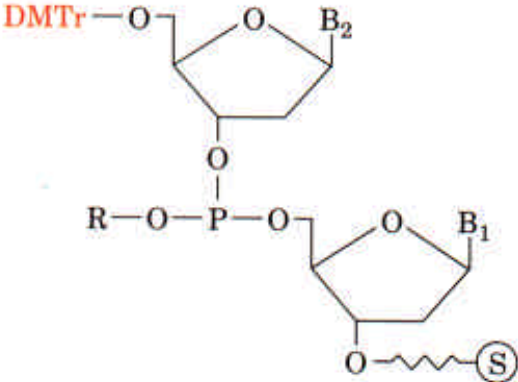
# Chemische Synthese von DNA



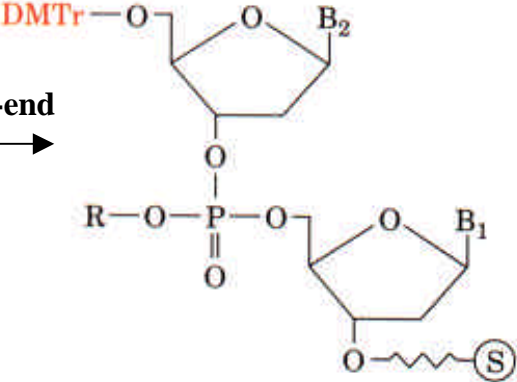
1. **Detritylation**  $\xrightarrow{H^+}$   $DMTr^+$



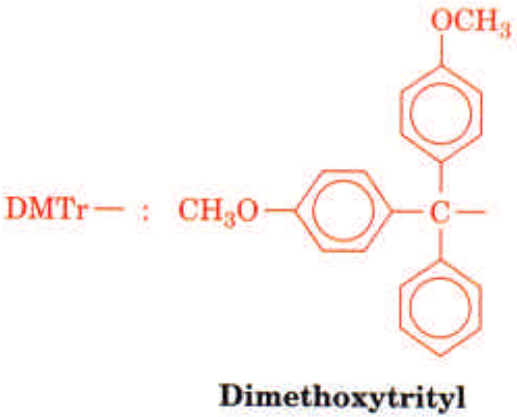
2. **Coupling**  
 $HN(C_3H_7)_2$   
  
**Tetrazole**  
 $DMTr-O-Deoxyribose(B_2)$   
  
**Phosphamidit**



3. **Capping of unreacted 5'-end**  
 4. **I<sub>2</sub> Oxidation**

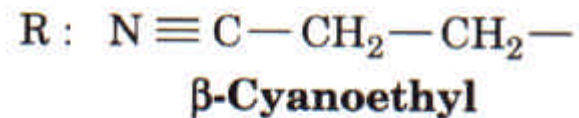


(S) : Polymerer Träger



R :  $N \equiv C - CH_2 - CH_2 -$   
 **$\beta$ -Cyanoethyl**

Abspaltung vom polymeren Träger mit Ammoniak.  
Gleichzeitige Abspaltung der Cyanoethyl-Schutzgruppen



$\beta$ -Eliminierung

Unterschiede zur Peptidsynthese:

Temporäre Schutzgruppe: Säure labil (DMTr)

Stabile Schutzgruppe: Basen labil

Aktivierung und Kupplung: voraktivierte Nukleotide/Oxidation

# Polymerasekettenreaktion (PCR)

---

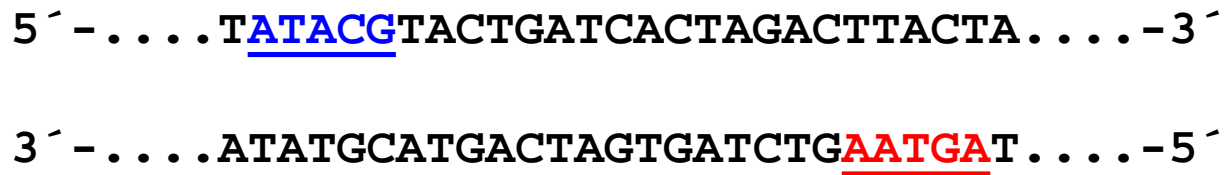
1. Kleine DNA-Mengen können gereinigt und vermehrt werden;
2. Nur eine kurze DNA-Senquenz soll bekannt sein;
3. Thermostabile Polymerase und Temperaturzykler sind kommerziell erhältlich;
4. Die Technik ist sehr schnell.

# Polymerasekettenreaktion (PCR)

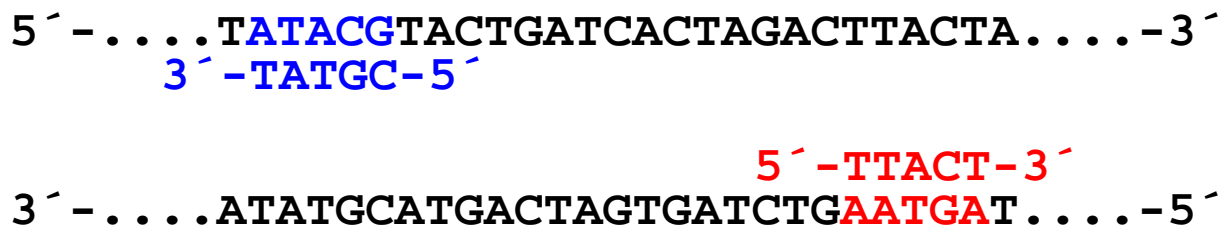
## Target DNA



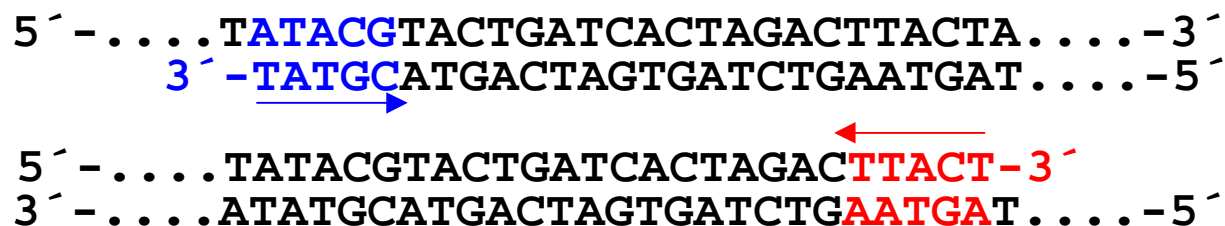
Schmelzen  $> 90^\circ$



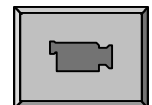
Primer A: 3'-TATGC-5'  
 Primer B: 5'-TTACT-3'  
 Annelieren  $90^\circ-60^\circ$



dNTPs, Puffer,  $Mg^{2+}$ ,  
 thermostabile DNA-Polymerase  
 Verlängerung der Primer,  $72^\circ-75^\circ$



Nach 30 Zyklen:  
 60 längere Doppelstränge  
 +  
 $>10^9$  Target Doppelstränge



## Analytik der DNA:

---

Agarose-Gel Elektrophorese, Anfärbung mit Ethidiumbromid

Grösse, Trennung und Reinigung

Ultrazentrifugation

Grösse, Trennung und Reinigung

Schmelztemperatur

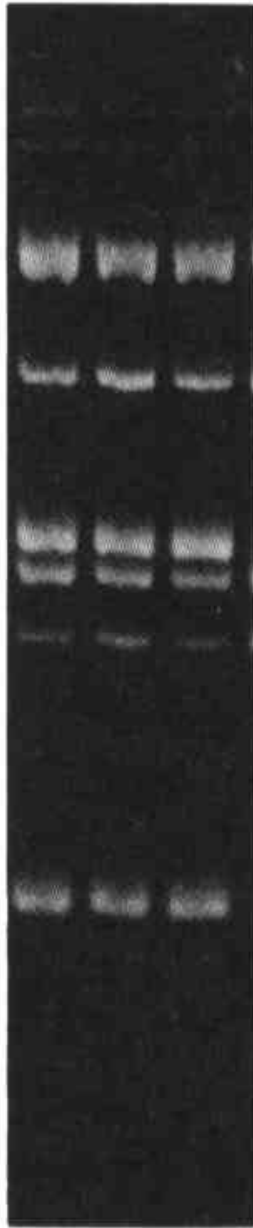
Stabilität, G/C-Gehalt

Infrarot-Spektroskopie

Identifizierung der Wechselwirkungen/Basenpaarung

DNA-Sequenzierung

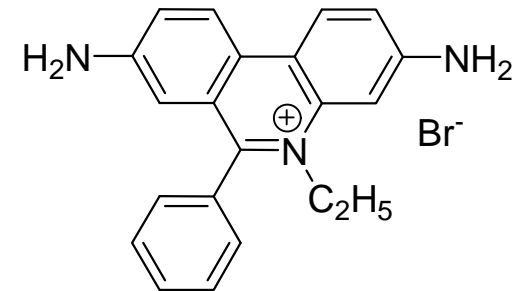
Identifizierung jeder DNA



Agarose-Gel-Elektrophoretogramm  
von Doppelstrang-DNA,  
Färbung mit Ethidiumbromid,  
Detektion im UV-Licht

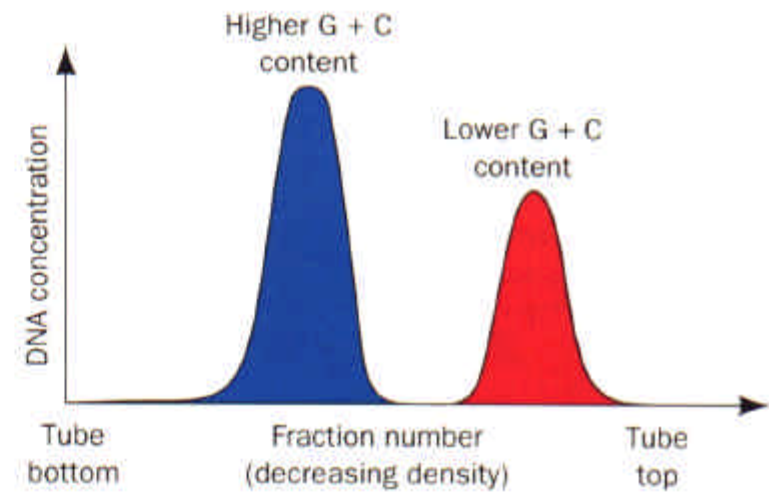
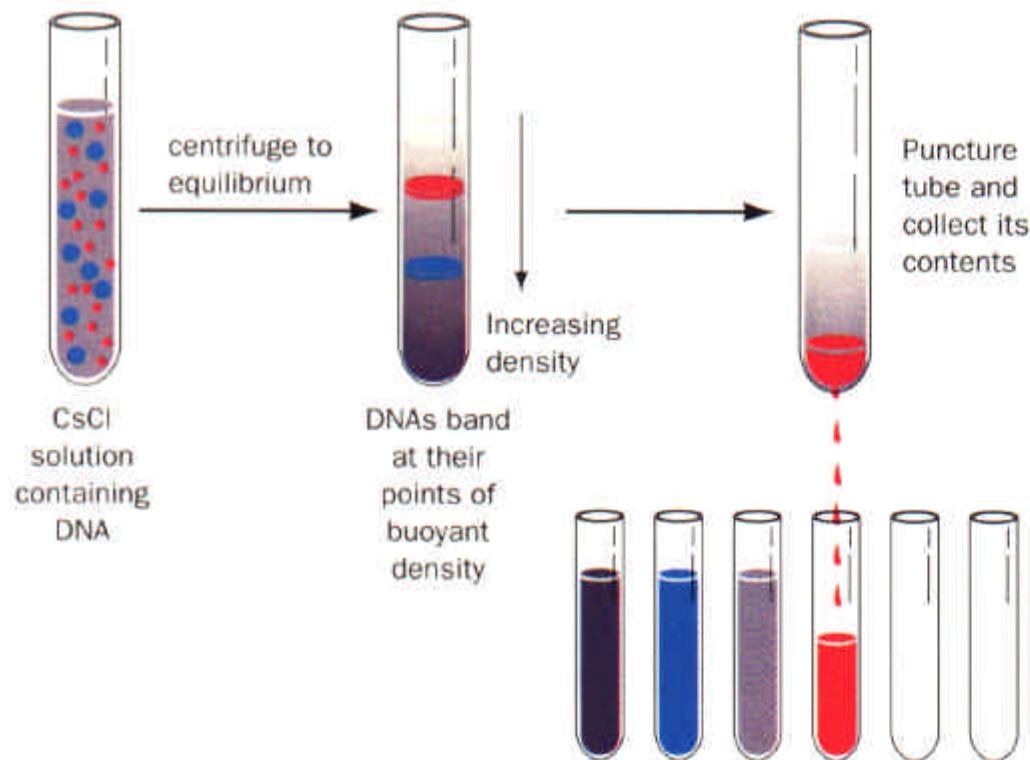
Achtung: **Ethidiumbromid** ist sehr toxisch!

Sichtbarmachen der DNA  
durch Interkalation von  
Ethidiumbromid

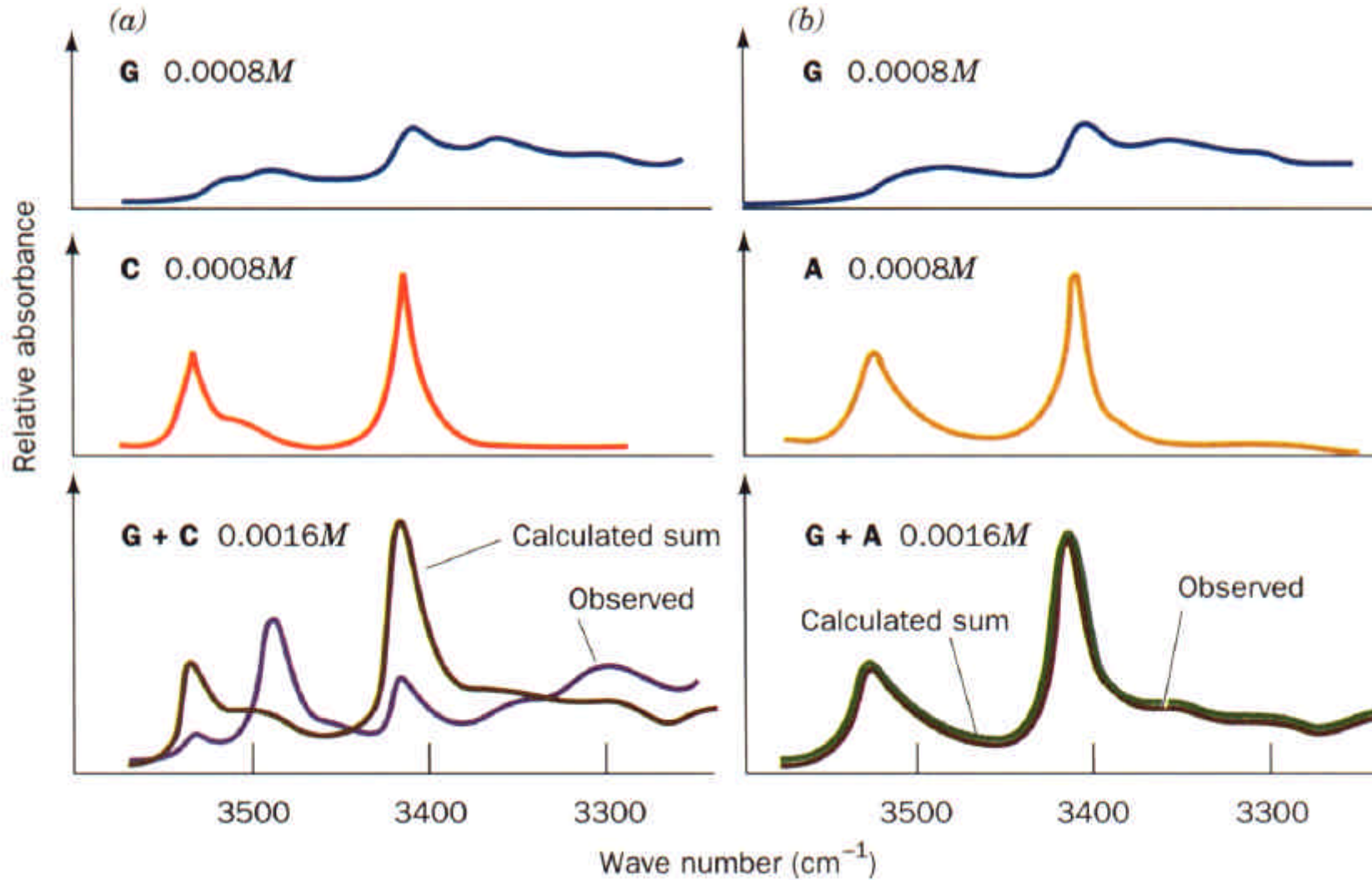


# Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten

Detektion bei 260 nm



# Infrarot-Spektren der N-H-Schwingung



# DNA-Sequenzierung nach Sanger

