

Synthese von DNA

- chemisch

de novo-Synthese

Synthese von Oligonukleotiden bis 20-50 bp

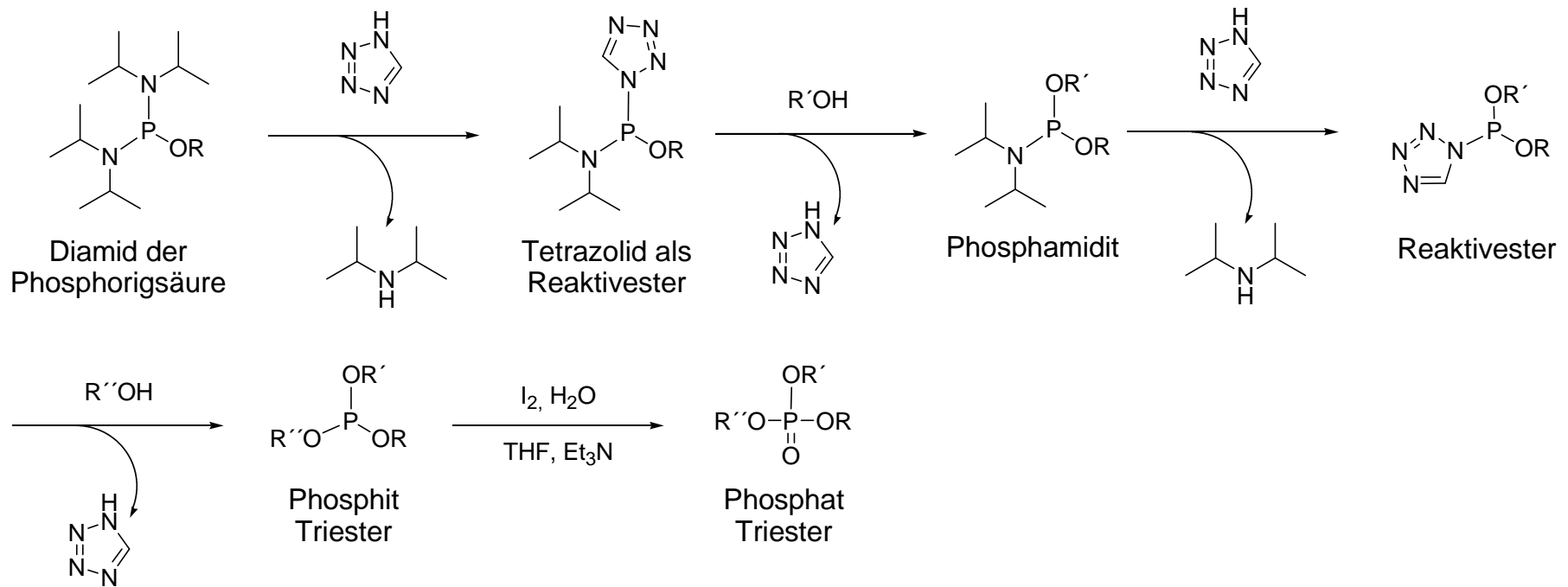
- molekularbiologisch

Vermehrung bekannter DNA

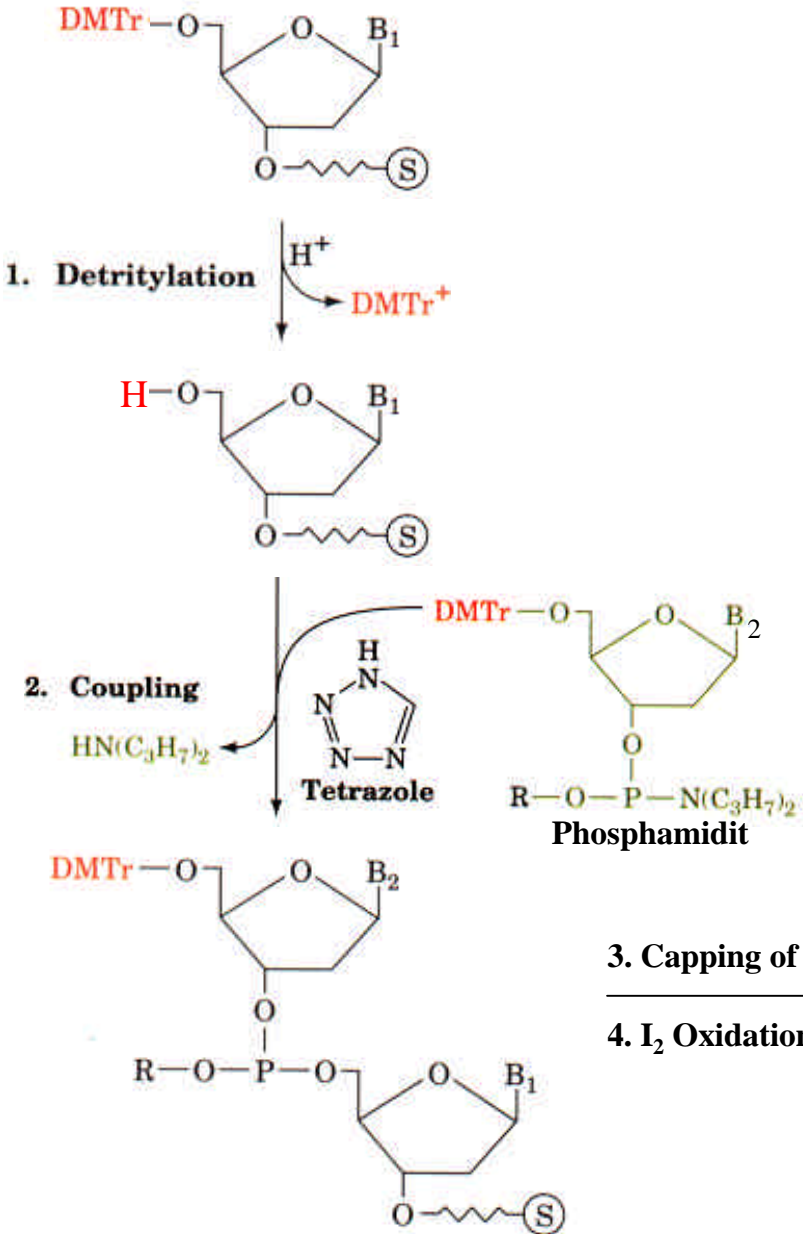
Synthese des Gegenstranges: Polymerasekettenreaktion (PCR)

Chemische Synthese von DNA

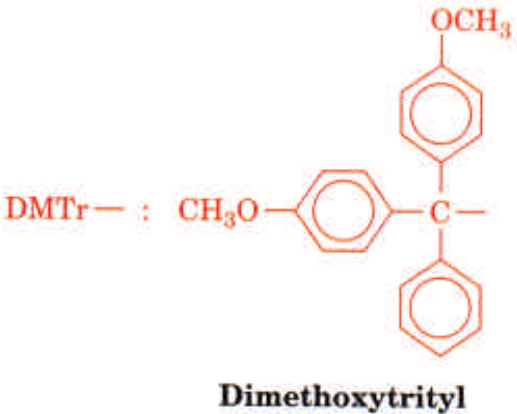
Viele DNA-Synthese laufen über den Phosphor in der Oxidationsstufe III, also über die Phosphit-Triester. P(III) ist reaktiver als P(V).



Chemische Synthese von DNA

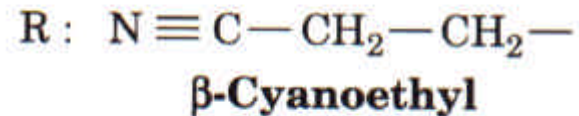


Ⓢ : Polymerer Träger



R : N≡C-CH₂-CH₂-
β-Cyanoethyl

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



β-Eliminierung

Unterschiede zur Peptidsynthese:

Temporäre Schutzgruppe: Säure labil (DMTr)

Stabile Schutzgruppe: Basen labil

Aktivierung und Kupplung: voraktivierte Nukleotide/Oxidation

Polymerasekettenreaktion (PCR)

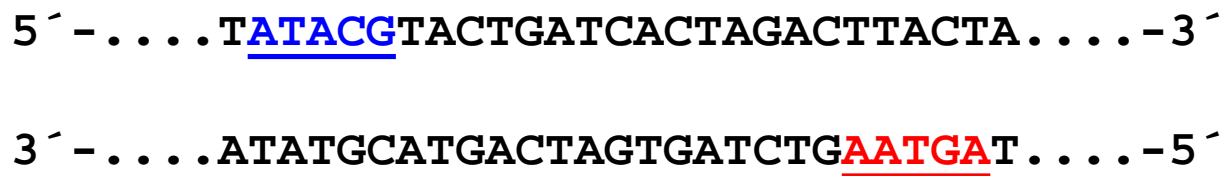
1. Kleine DNA-Mengen können gereinigt und vermehrt werden;
2. Nur eine kurze DNA-Senquenz soll bekannt sein;
3. Thermostabile Polymerase und Temperaturzykler sind kommerziell erhältlich;
4. Die Technik ist sehr schnell.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Target DNA

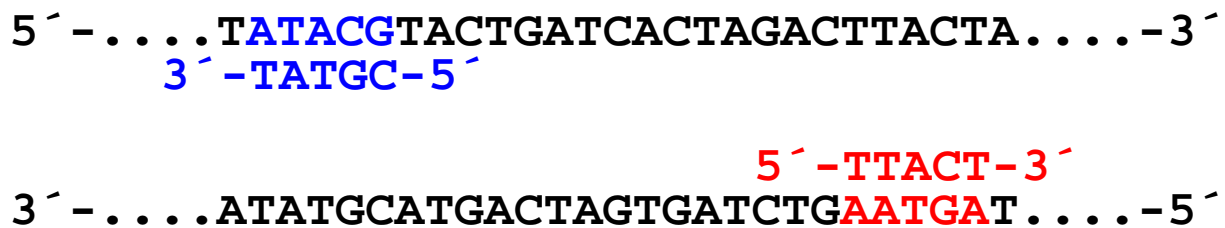


Schmelzen $> 90^\circ$



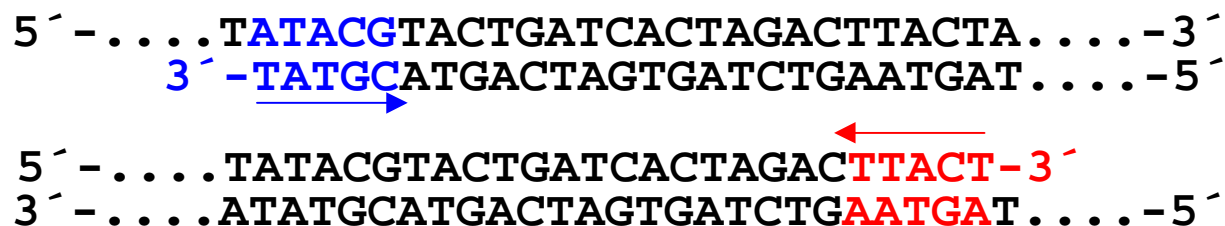
Primer A: 3'-TATGC-5'
 Primer B: 5'-TTACT-3'

Annelieren 90° - 60°

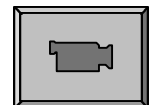


dNTPs, Puffer, Mg^{2+} ,
 thermostabile DNA-Polymerase

Verlängerung der Primer, 72° - 75°



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

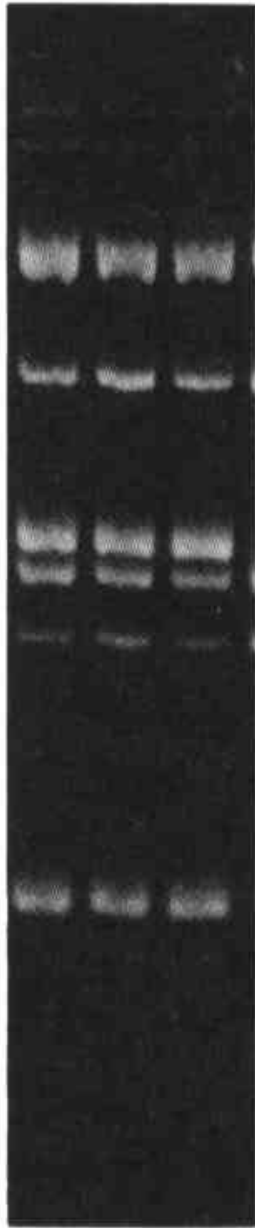
Stabilität, G/C-Gehalt

Infrarot-Spektroskopie

Identifizierung der Wechselwirkungen/Basenpaarung

DNA-Sequenzierung

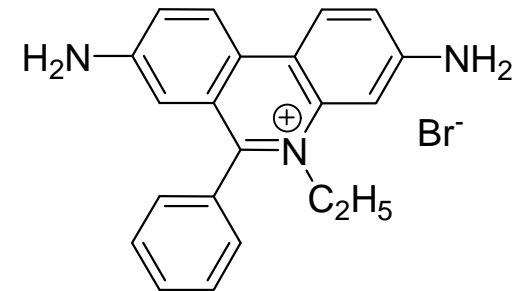
Identifizierung jeder DNA



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

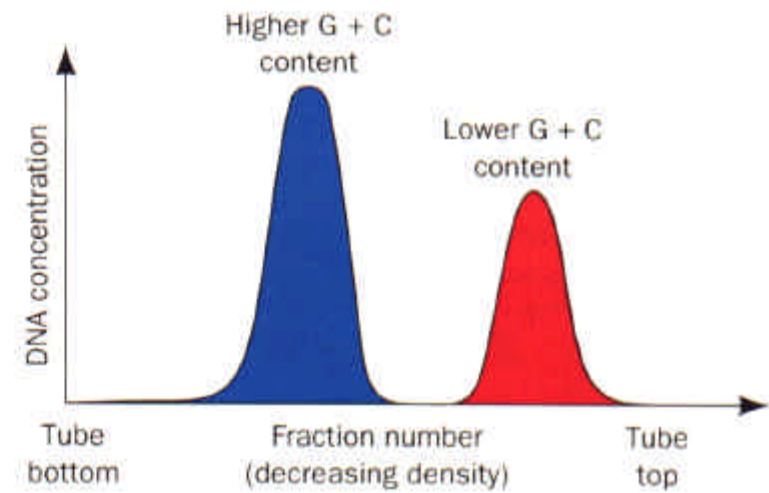
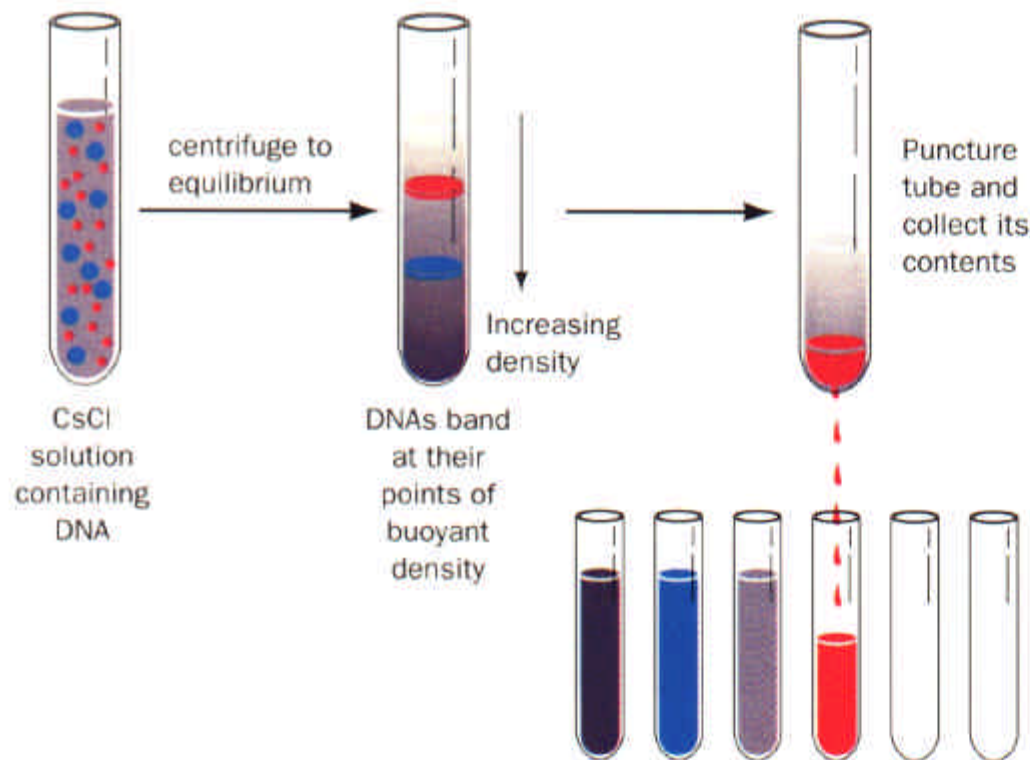
Achtung: **Ethidiumbromid** ist sehr toxisch!

Sichtbarmachen der DNA
durch Interkalation von
Ethidiumbromid

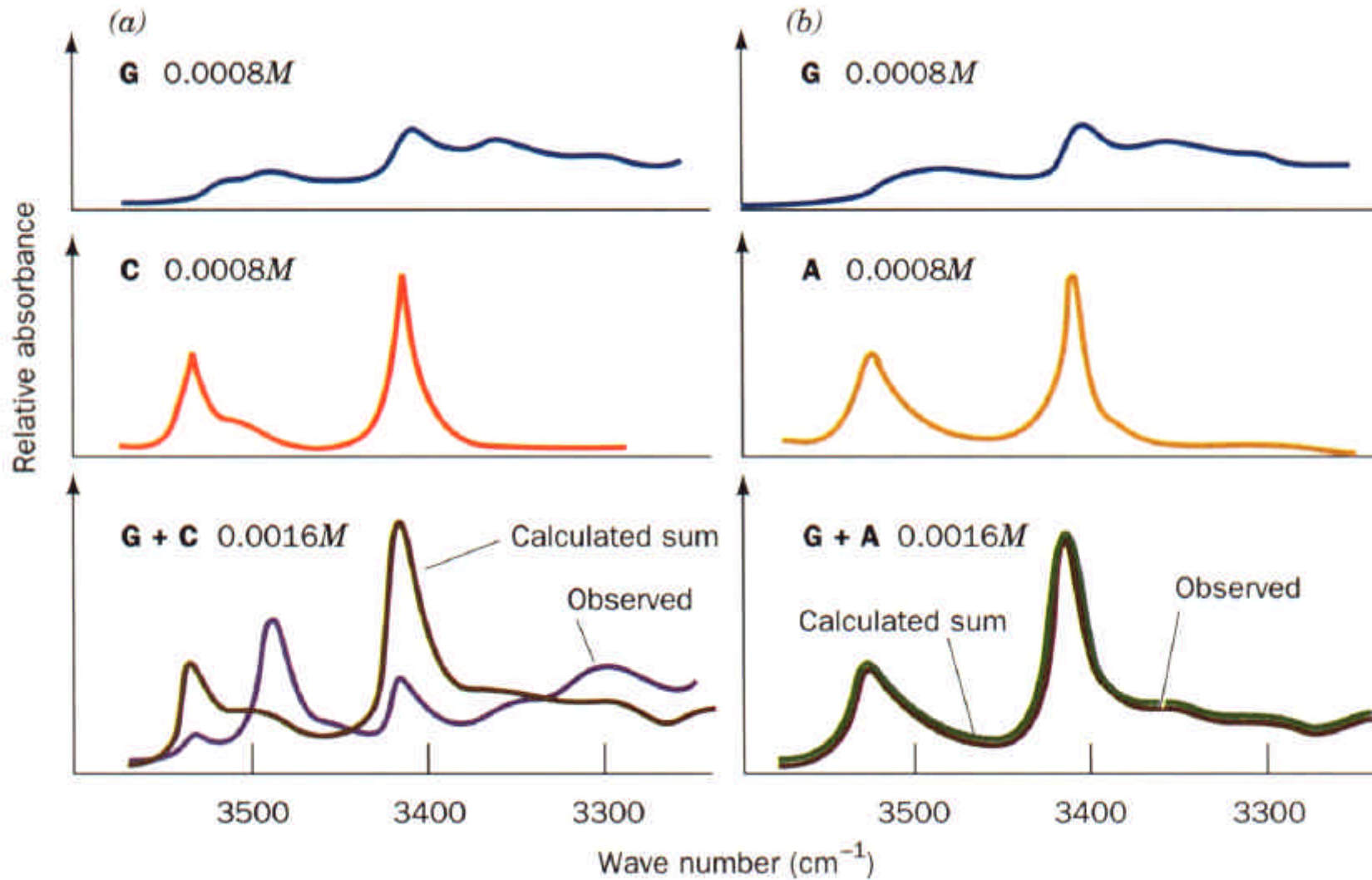


Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten

Detektion bei 260 nm



Infrarot-Spektren der N-H-Schwingung



DNA-Sequenzierung nach Sanger

