

Die rekombinante DNA-Technologie 7

Die DNA-Sequenzierung – Lesen im Buch des Lebens

Barbara C. Biedermann

Nebst der präzisen Bearbeitung der DNA durch in der Natur vorkommende Enzyme und der unbegrenzten Amplifizierbarkeit durch die Polymerase-Kettenreaktion ist die buchstabengenaue Entzifferung der DNA durch Sequenzierung ein weiteres, wichtiges Element der DNA-Technologie. Auch wenn der technologische Fortschritt in den letzten 15 Jahren die DNA-Sequenzierung um Grössenordnungen effizienter gemacht hat, blieb das Verfahren der enzymatischen DNA-Sequenzierung im wesentlichen gleich. Die DNA-Sequenzierung basiert auf dem Einsatz der DNA-Polymerase, welche – von einem dem Reaktionsgemisch zugegebenen Primer ausgehend – den zu sequenzierenden DNA-Strang kopiert. Im Nukleotidgemisch aus dATP, dCTP, dTTP und dGTP (d steht hier für desoxy-Adenosintriphosphat) sind Spuren von Dideoxynukleosidtriphosphaten (= ddNTPs) beigemischt, die am 3'-Ende keine Hydroxylgruppe besitzen und von der DNA-Polymerase nicht verlängert werden können. Der zufällige Einbau dieser

ddNukleotide führt zum vorzeitigen Abbruch des synthetisierten DNA-Strangs. Wird diese DNA-Abschrift nun in 4 parallelen Reaktionen durchgeführt: einmal in Gegenwart von ddATP, einmal in Gegenwart von ddTTP, einmal in Gegenwart von ddCTP und einmal in Gegenwart von ddGTP, resultiert in den 4 Reaktionsgefässen ein Gemisch von unterschiedlich langen DNA-Abschriften, die immer an einem A, einem T, einem C oder einem G enden. Sind die ddNukleotide markiert (früher radioaktiv, heute fluoreszierend), können die unterschiedlich langen DNA-Moleküle mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Und die Rangliste der mit den 4 ddNukleotiden unterschiedlich terminierten DNA-Abschriften in der Wanderdistanz reflektiert direkt die DNA-Sequenz. Während früher das Ablesen von DNA-Sequenzierergelen eine ausserordentlich mühsame Angelegenheit war, liefern heutige Sequenziergeräte die DNA-Sequenz in angenehm farbmarkierten Wellenmustern.

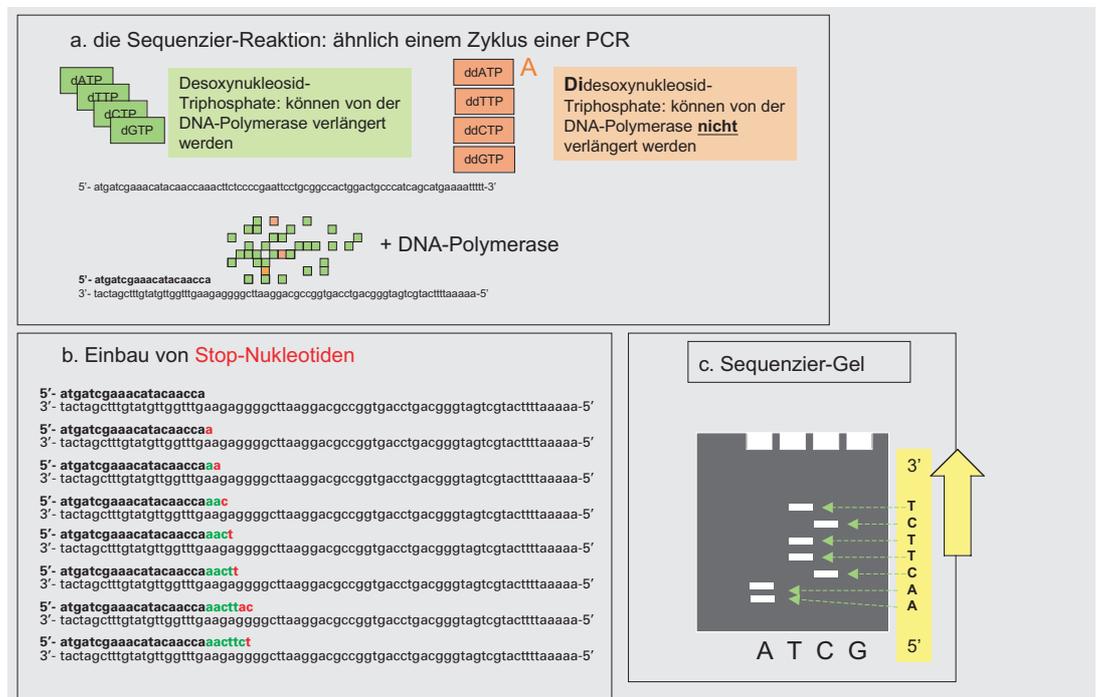


Abbildung 1. Das Prinzip der enzymatischen DNA-Sequenzierung mit Hilfe der DNA-Polymerase. a. Die enzymatische DNA-Sequenzierung basiert auf dem zufälligen Einbau eines STOP-Nukleotids (das ist die Dideoxyvariante der 4 sonst verwendeten Deoxynukleosidtriphosphate) durch die DNA-Polymerase während der Abschrift der zu sequenzierenden DNA-Vorlage. b. Je nachdem, wann bei der entsprechenden DNA-Abschrift dieser STOP-Nukleotid-Einbau erfolgt, ist die Abschrift länger oder kürzer. Dieser Grössenunterschied kann auf einem Sequenziergel (c) sichtbar gemacht werden. c. Wenn man die Sequenzierreaktion 4mal ansetzt und jeder Reaktion jeweils eines der STOP-Nukleotide (d.h. ddATP oder ddTTP oder ddCTP oder ddGTP) beifügt, entspricht die Reihenfolge der sichtbar gemachten Abschriftfragmente in der jeweiligen Reaktion der DNA-Sequenz der Vorlage. Abkürzungen: dATP/ddATP = Deoxy-/Dideoxyadenosintriphosphat; dTTP/ddTTP = Deoxy-/Dideoxythymidintriphosphat; dCTP/ddCTP = Deoxy-/Dideoxycytidintriphosphat; dGTP/ddGTP = Deoxy-/Dideoxyguanosintriphosphat.

Korrespondenz:
 PD Dr. med.
 Barbara C. Biedermann
 Medizinische Universitätsklinik
 Kantonsspital
 CH-4101 Bruderholz
barbara.biedermann@unibas.ch