

# Die rekombinante DNA-Technologie 8

## Die Gen-Klonierung mit Hilfe fleissiger Haustierchen

Barbara C. Biedermann Offenendige Doppelstrang-DNA kann in ein Plasmid eingebaut werden. Plasmide kommen in Bakterien natürlicherweise vor. Es sind kleine, zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle (Grösse 2000 bis 5000 Basenpaare = 2–5 Kilobasen [kb]), die nicht in das bakterielle Genom (zum Grössenvergleich: das Genom von *Escherichia coli* ist 1000 kb gross) integriert sind. Plasmide werden von Bakterium zu Bakterium, d.h. horizontal, und nicht nur vertikal (durch Zellteilung) weitergegeben. In der Natur vorkommende Plasmide enthalten oft bakterielle Virulenzfaktoren, wie z.B. Antibiotikaresistenzgene. In der Molekularbiologie sind Plasmide ausserordentlich wertvolle und nützliche Werkzeuge. Man kann nämlich in Plasmide (anstelle von bakteriellen Virulenzfaktoren) Doppelstrang-DNA (z.B. auch genomische DNA-Fragmente) einer menschlichen Zelle einbauen, um sich diese DNA dann von einem Bakterium (in der Regel handelt es sich um *E. coli*, einem harmlosen Vertreter unserer Darmflora) in reiner Form vermehren zu

lassen. Die Plasmide sind der Buchband dieser Genbibliotheken – die Bakterien die Buchdrucker. Plasmide im Werkzeugkasten des Molekularbiologen sind genauestens charakterisiert. Von ihrer DNA-Sequenz existieren genetische Karten. Die Stelle, an der ein Fremdgen in ein Plasmid eingebaut werden kann, heisst engl. «multiple cloning site» (MCS). Dieser Plasmidabschnitt enthält eine grosse Anzahl von Restriktionsenzym-schnittstellen, die aber nur genau einmal im Plasmid vorkommen. Wenn man also mit einem dieser Restriktionsenzyme das zirkuläre Plasmid schneidet, resultiert ein linearisiertes Plasmid. Gibt man nun ein offenendiges Doppelstrang-DNA-Gemisch, welches beispielsweise durch Restriktionsenzymverdauung aus genomischer DNA hergestellt wurde, in einem bestimmten Verhältnis und in Gegenwart einer DNA-Ligase zum linearisierten Plasmid, bauen sich die einzelnen DNA-Moleküle in ein Plasmid ein. Das Plasmid schliesst sich nun wieder zu einem ringförmigen DNA-Molekül. Die Verbindung von DNA-Molekülen verschiedenen Ursprungs nennt man Rekombination – ein rekombiniertes Plasmid ist entstanden. Bringt man dieses Plasmidgemisch in einem bestimmten Verhältnis mit *E. coli* zusammen, welches die Aufnahme von genau einem Plasmid durch mindestens ein Bakterium begünstigt, wird dieses Bakterium das im Plasmid inkorporierte Gen mitvermehren. Diesen Vorgang nennt man Transformation. Wenn man diese gemischte Bakterienpopulation so auf eine Agarplatte ausbreitet, dass die Bakterien in Einzelkolonien wachsen können, kann man sie voneinander trennen. Das menschliche Gen, das durch eine solche Einzelkolonie produziert wird, ist somit kloniert worden.

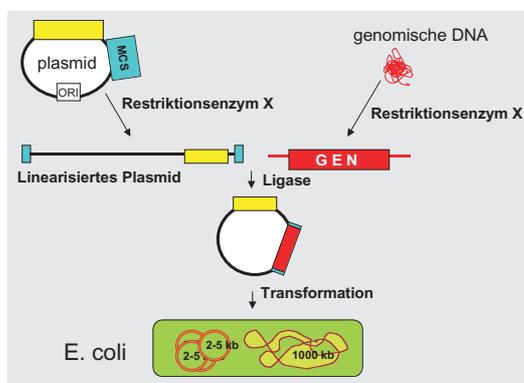


Abbildung 1.

Die Klonierung eines menschlichen Gens mit Hilfe von Plasmiden und *E. coli*. MCS: «multiple cloning site», enthält eine ganze Vielzahl von Restriktionsenzym-schnittstellen, die nur einmal im Plasmid vorkommen, und in die man entsprechend vorbehandelte DNA hineinligieren kann. ORI: «origin of replication», Replikationsursprung des Plasmids. Kb = Kilobasen (1000 Basen).

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