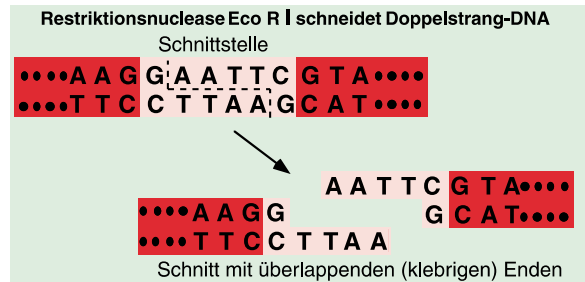
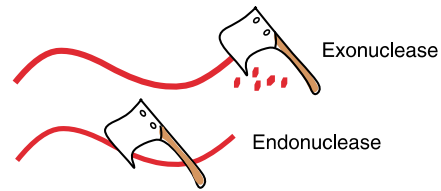


4.6 Methoden der Molekularbiologie.

4.6.1 Restriktionsnucleasen schneiden DNA an ganz bestimmten Stellen.

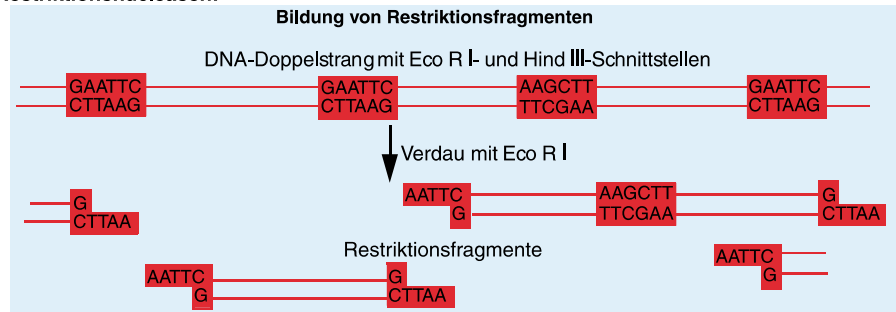
Enzyme, die Nucleinsäuren hydrolysieren, heißen Nucleasen. Es gibt Desoxyribonucleasen (DNAsen, spalten DNA) und Ribonucleasen (RNAsen, spalten RNA). Zudem unterscheidet man zwischen Exo- und Endonucleasen. Exonucleasen schneiden nach dem Salamiprinzip, also am Ende der Nucleinsäure; Endonucleasen schneiden im Inneren.

Endonucleasen sind oft sequenzspezifisch, d.h. sie spalten Doppelstrang-DNA nur an einer bestimmten Sequenz, z.B. GAATTC. Derart sequenzspezifische Endonucleasen heißen Restriktionsnucleasen. Restriktionsnucleasen gibt es nur für DNA. Beispiel: Eco R I schneidet nur in der Sequenz GAATTC. GAATTC ist die Restriktionsstelle von Eco R I. Die beiden Einzelstränge werden versetzt geschnitten. Die so entstandenen überlappenden, einzelsträngigen Bereiche bezeichnet man als klebrige Enden (sticky ends).

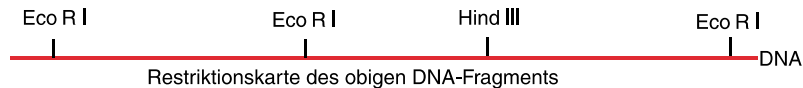


Zum Gebrauch von Restriktionsnucleasen:

- Jede Restriktionsnuclease spaltet nur an ihrer Restriktionsstelle; z.B. Eco R I nur bei GAATTC, Hind III nur bei AAGCTT. Es entstehen sog. Restriktionsfragmente.

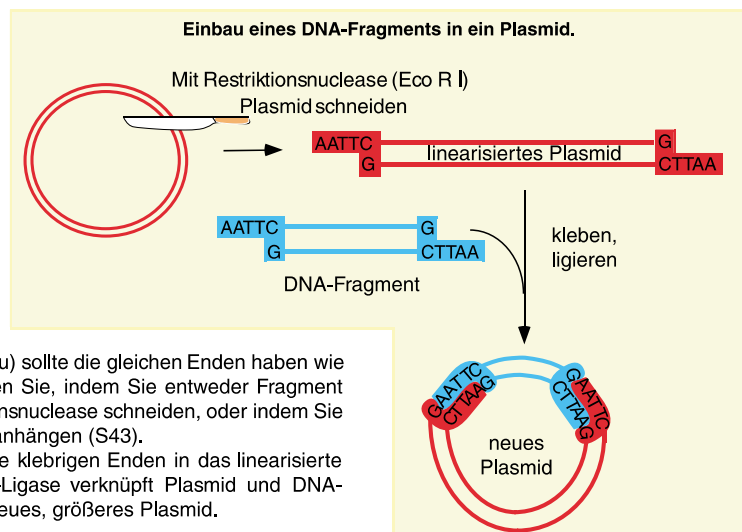


- Von jeder DNA können Sie eine Restriktionskarte anlegen, d.h. ein Verzeichnis der Schnittstellen von Restriktionsnucleasen. Dies kennzeichnet die DNA und ermöglicht es, verschiedene DNA-Fragmente zu vergleichen, ohne sie zu sequenzieren (d.h. die Abfolge ihrer Basen bestimmen zu müssen).



- Mit Restriktionsnucleasen können Sie DNA-Fragmente in Plasmide einbauen.

Dazu schneiden Sie das gereinigte Plasmid (rot) mit einer Restriktionsnuclease zu einer linearen DNA mit klebrigen Enden auf. Für viele Plasmide, wie pBR 322, gibt es Restriktionskarten, in denen die Schnittstellen verschiedener Restriktionsnucleasen verzeichnet sind.



Das einzubauende DNA-Fragment (blau) sollte die gleichen Enden haben wie das linearisierte Plasmid. Das erreichen Sie, indem Sie entweder Fragment und Plasmid mit der gleichen Restriktionsnuclease schneiden, oder indem Sie an das DNA-Fragment einen Adaptor anhängen (S43). Das Fragment lagert sich nun über die klebrigen Enden in das linearisierte Plasmid ein (es annealt). Eine DNA-Ligase verknüpft Plasmid und DNA-Fragment kovalent. Es bildet sich ein neues, größeres Plasmid.