



Virtuelle Restriktionsanalyse

Zu den wichtigsten Handwerkszeugen der Gentechnik oder „synthetischen Biologie“^[1] gehören Restriktionsendonukleasen, d.h. Enzyme, mit deren Hilfe DNA-Sequenzen erkannt und gespalten werden können. Die bei weitem größte Bedeutung besitzen spezifische Endonukleasen des Typs II, die Tetra-, Penta- oder Hexanucleotidsequenzen mit meist zweizähliger Symmetriearchse, d.h. mit palindromischer Sequenz, erkennen, zum Beispiel die Endonuklease von *Bacillus amyloliquefaciens* H (BamHI, zur Nomenklatur siehe Lit. [2]): 5'-G/GATCC-3'. Die Hydrolyse von Doppelstrang-DNA durch BamHI erfolgt hinter dem 5'-G jedes der beiden Stränge, sodass das entstehende 3'-Ende eine Hydroxygruppe, das 5'-Ende eine Phosphatgruppe trägt. Durch diese versetzte Spaltung werden überhängende Enden (kohäsive Enden, sticky ends) produziert. Bei einigen anderen Endonukleasen entstehen hingegen glatte Enden (blunt ends). Gegenwärtig sind nahezu 3000 Restriktionsendonukleasen bekannt, von denen einige hundert kommerziell erhältlich sind. Das Erzeugen von DNA-Fragmenten ist die wichtigste Voraussetzung für die Neukombination genetischen Materials und

Confirmation		Include	Response Info	
Circular C Line 4	Select Employee by Name	No non-labor letters Numbers and spaces OK		
Sort By:	Part Sequence Info			
<input checked="" type="checkbox"/> Employee # <input type="checkbox"/> Name <input type="checkbox"/> Address <input type="checkbox"/> City <input type="checkbox"/> State <input type="checkbox"/> Zip <input type="checkbox"/> Phone	<input type="button" value="Add Sequence Item"/> <input type="button" value="Delete Sequence Item"/> <input type="button" value="View Details"/> <input type="button" value="Print Form"/>			
All Commercial * <input type="checkbox"/> UCL only *				
T rectangle * <input type="checkbox"/> T rectangle * <input type="checkbox"/> Blank *				
Maximum Qty <input style="width: 100px; height: 20px; border: 1px solid black; border-radius: 5px; padding: 2px; margin-right: 10px;" type="text" value="1000"/> Number at *				
Minimum Qty <input style="width: 100px; height: 20px; border: 1px solid black; border-radius: 5px; padding: 2px; margin-right: 10px;" type="text" value="1"/> Length []		Enter a name for your response <input style="width: 200px; height: 20px; border: 1px solid black; border-radius: 5px; padding: 2px; margin-top: 10px;" type="text" value="Jacket"/>		
Prototype Only				
All In One Master				

Abbildung 1. Homepage von Restriction Mapper (Ausschnitt).

dessen Einführung und Vermehrung in neuer, nichtnatürlicher Umgebung. Um diesen Prozess planen zu können, benötigt man eine genaue Kenntnis der Nucleotidsequenzen der beteiligten Fragmente und Vektoren (Plasmide, „Genfährten“) und der Positionen, an denen Restriktionsendonucleasen angreifen können. Dazu muss man den Nucleinsäuretext nach den Mustern der Erkennungssequenzen absuchen – ohne Zweifel eine langweilige Beschäftigung, die jeder Computer zuverlässiger und schneller erledigen kann: Bereits in der Ära vor Windows gab es Software, mit deren Hilfe Restriktionsanalysen von DNA-Fragmenten und Plasmiden vorgenommen werden konnten, darunter die Programme Map und Mapsort des leistungsstarken GCG Wisconsin Package, das sich allerdings nur wenige Institutionen leisten. Inzwischen gibt es eine Reihe an teilweise umfangreicher (und teurer) Windows-Software für die Restriktionsanalyse sowie – ideal für kleine Budgets – auch einige Web-basierte Programme. Restriction Mapper vom Molekularbiologen Peter Blaiklock ist eines davon: schnörkellos, intuitiv leicht erfassbar und nun in einer überarbeiteten dritten Version verfügbar (Abbildung 1).

Hier kann man eine einzelsträngige DNA-Sequenz in beliebigem Format (Text, GCG, GenBank etc.) durch Kopieren und Einfügen eingeben und auf die Erkennungssequenzen aller kommerziell verfügbaren Restriktionsendonucleasen untersuchen lassen. Das Programm ermöglicht

- die Unterscheidung von linearer und zirkulärer DNA (wichtig beim Auffinden von Erkennungssequenzen in Plasmiden),
- die selektive Auswahl von Enzymen als Prototypen oder Isoschizomere, d.h. Enzyme mit gleicher Erkennungssequenz,
- die Einschränkung auf Enzyme mit einer bestimmten Zahl an Erkennungsstellen (oftmals sind Enzyme gefragt, die nur einmal schneiden),
- das Sortieren der Ausgabe, z.B. nach Zahl oder Länge der gefundenen Erkennungsstellen, der erzeugten Schnittstelle oder alphabetisch (Abbildung 2).

Die in der Ausgabe-Tabelle eingetragenen Enzyme sind direkt mit der Datenbank REBASE der Firma New England Biolabs verknüpft, die alle bekannten Restriktionsenzyme, ihre Erkennungssequenzen, Abhängigkeit von Methylierungsmustern, Verfügbarkeit und Literaturangaben enthält. Die unter identischen Kartierungsbedingungen mit Restriction Mapper oder Map (s.o.) erhaltenen Ergebnisse stimmen weitgehend (85 %) überein. Am gewählten Beispiel (codierende Sequenz der T7-

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
BsrBI	CCCTCT	6	blunt	1	749
HpaI	GTTAAC	6	blunt	1	1260
OliI	CACNNNCITG	6	blunt	1	274
PstAI	GACNNNGTC	6	blunt	1	1717
Seal	AGTACT	6	blunt	1	1165

Abbildung 2. Typische Ergebnistabelle

DNA-Polymerase) findet das hier vorgestellte Programm 17 Erkennungssequenzen, der „Dinosaurier“ Map hingegen 20. Nicht gefunden wurden die Schnittstellen der Enzyme BspI, FspI und TaqII, von denen zumindest die ersten beiden kommerziell erhältlich sind. In vier Fällen benennt Map Isoschizomere der von Restriction Mapper aufgeführten Enzyme; diese Angaben lassen sich jedoch leicht mithilfe der Kataloge üblicher Lieferanten konvertieren.

Mit Restriction Mapper kann man DNA auch virtuell mit verschiedenen Enzymen gleichzeitig „verdauen“ lassen: Als Ausgabe erhält man den Sequenztext der resultierenden Fragmente, an den gewählten Schnittstellen entsprechend der Enzymspezifikation geteilt und nach Längen sortiert (entsprechend dem Bandenmuster bei der Gelektrophorese). Links zu einer kurzen, aber prägnanten Hilfe, zu einigen wichtigen „FAQs“ sowie interessanten Internet-Adressen runden den insgesamt guten Eindruck von dieser Website ab. Getrost ignorieren kann man jedoch den „Dilution Calculator“: Weder erscheint diese Funktion im Zusammenhang mit Restriktionsanalysen von nennenswertem Interesse, noch erschließen sich Funktionsweise und Nutzen. Da verlässt man sich besser auf den Stöchiometrie-Schein aus dem Grundstudium...

Susanne Brakmann
Institut für Zoologie,
Universität Leipzig

- [1] H. Beyer, W. Walter, W. Francke, *Lehrbuch der Organischen Chemie*, Hirzel, Stuttgart, **1998**.
 - [2] E.-L. Winnacker, *Gene und Klone*, Verlag Chemie, Weinheim **1990**.

Für weitere Informationen besuchen Sie:
<http://www.restrictionmapper.org/>

oder nehmen Sie Kontakt auf mit
pblaiklo@110.net