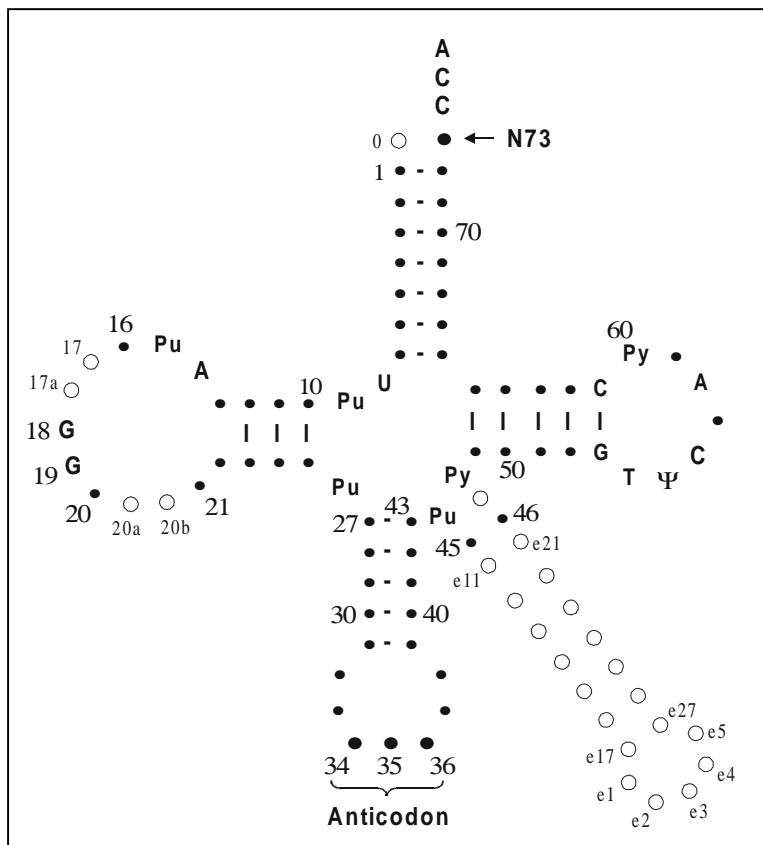


## 10. Anhang

### 10.1. Nummerierung der Nukleotide in tRNAs (nach Sprinzl et al. 1996):

Die in allen tRNAs konservierten Nukleotide sind innerhalb der dargestellten Sekundärstruktur durch Fettdruck gekennzeichnet. Das Anticodon der tRNA und die bei vielen tRNAs für die Aminoacylierung bedeutende Diskriminatorbase N73 sind durch dickere Punkte hervorgehoben.

Punkte stehen für Nukleotide, die allen tRNAs gemeinsam sind; Kreise representieren Nukleotide, die nicht in allen tRNAs vorkommen: Hierzu gehören a) das Nukleotid 0 am 5'-Ende der tRNA, b) die Nukleotide vor und nach den beiden invarianten GMP-Resten 18 und 19 des D-Arms und c) die Nukleotide des variablen Arms. Innerhalb des variablen Arms werden die Nukleotide des Stammes mit e11 bis e17 sowie e21 bis e27 bezeichnet. Bis zu 5 Nukleotide gehören der Schlaufe des variablen Arms an (e1 bis e5).



## 10.2 Sequenzen der *amber*-Suppressor-tRNA-Gene

Alle tRNA-Gene wurden als Genkassetten über PCR hergestellt und in den Vektor pSP64 (ACCESSION X65327, NID g58229; erhältlich bei Promega) kloniert. Für die Klonierung wurden verschiedene Strategien angewendet. Ein Teil der Genkassetten wurde über EcoRI/BamHI kloniert. Hierfür mußten die entsprechenden PCR-Produkte mit den beiden Enzymen geschnitten werden. Ein anderer Teil der Genkassetten wurde über SmaI "blunt end" kloniert. Hierzu wurden die äußeren in der PCR verwendeten Oligos vor der Zugabe in die PCR-Reaktion phosphoryliert. Im Falle von tPhe, S.c., die eine EcoRI-Schnittstelle innerhalb der tRNA-Sequenz enthält, wurde die entsprechende Genkassette über PvuII/BamHI in den Vektor kloniert. Dargestellt sind nur die in den Vektor klonierten Gensequenzen. Die für die Klonierung verwendeten Schnittstellen sind am Anfang und am Ende der dargestellten Genkassetten angegeben. Die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsschnittstellen sind, sofern in den neuen Konstrukten noch vorhanden, kursiv gedruckt. Wurde "blunt end" kloniert (SmaI, PvuII), ist folglich nur noch ein Teil der Erkennungssequenz des entsprechenden Restriktionsenzym dargestellt. Die Sequenzen der tRNAs sind fett gedruckt, das Anticodon ist zudem unterstrichen. Der T7-Promotor für die Transkription der tRNAs ist ebenfalls unterstrichen. Die Lage der tRNA-Gene relativ zum SP6-Promotor des pSP64-Vektors ist durch Pfeile angegeben.

(←SP6-Promotor): Das tRNA-Gen ist entgegengesetzt zum SP6-Promotor des pSP64-Vektors orientiert. (SP6-Promotor→): Das tRNA-Gen hat dieselbe Orientierung wie der SP6-Promotor des pSP64-Vektors.

### tAla

EcoRI – *GAATTCTAATACGACTCACTATAGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCTTGCATCTAAAGCAAGAGGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTTAGCTCCACCA*  
GGTGATCCATCCGGATCC – BamHI (←SP6-Promotor)

### tArg

SmaI – *CCCACCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGCATCCGTTAGCTCAGCTGTAGAGTACTCGGCTCTAAACCGAGCGGTCGGAGGTTTCGAATCCTCCCGGATGCACCAGGTGATCCATCCGGATCCGCGGGG* – SmaI (←SP6-Promotor)

### tCys

EcoRI – *GAATTCTAATACGACTCACTATAGGCGCGTTAACAAGCGGTTATGTAGCGGATTCTAAATCCGTCTAGTCCGGTTCGACTCCGGAACGCGCCTCCAGGTGATCCATCCGGATCC* – BamHI (←SP6-Promotor)

### tGly1

SmaI – *CCCACCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGCGGGCGTAGTTCAATGGTAGAACGAGAGCTTCTAAAGCTCTATACGAGGGTTCGATTCCCTTCGCCCGCTCCAGGTGATCCATCCGGATCCGCGGGG* – SmaI (←SP6-Promotor)

### tHisA

EcoRI – *GAATTCTAATACGACTCACTATAGGTGGCTATAGCTCAGTTGGTAGAGCCCTGGATTCTAAATCCAGTTGTCGTGGGTTTCGAATCCATTAGCCACCCCA*  
TTGGTGATCCATCCGGATCC – BamHI (←SP6-Promotor)

### tLeu(5)

EcoRI – *GAATTCTAATACGACTCACTATAGCCCGGATGGTGGAATCGGTAGAC*

**ACAAGGGATTCTAAATCCCTCGGCGTTCGCGCTGTGCGGGTTCAAGTCCCGC  
TCCGGGTACCAGGTGATCCATCCGGATCC – BamHI (←SP6-Promotor)**

**tLeu, su+6**

**SmaI – CCCACCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGCCGAAGTGGCGAAATCG  
GTAGACGCAGTTGATTCTAAATCAACCGTAGAAATACGTGCCGGTTCGAGTC  
CGGCCTTCGGCACCAGGTGATCCATCCGGATCCGCGGGG – SmaI (←SP6-  
Promotor)**

**tLys (su+5)**

**EcoRI – GAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTCGTTAGCTCAGTTGGTAGAG  
CAGTTGACTCTAAATCAATTGGTCGCAGGTTCGAATCCTGCACGACCCACCAG  
GTGATCCATCCGGATCC – BamHI (←SP6-Promotor)**

**tPhe, E.c.**

**EcoRI – GAATTCTAATACGACTCACTATAGCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAG  
CAGGGGATTCTAAATCCCCGTGTCCTTGGTTCGATTCCGAGTCCGGGCACCAG  
GTGATCCATCCGGATCC – BamHI (←SP6-Promotor)**

**tPheY**

**PvuII – CAGCCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGCGGATTTAGCTCAGTTGG  
GAGAGCGCCAGACTCTAAATCTGGAGGTCCTGTGTTCGATCCACAGAATTCG  
CACCAGGTGATCCATCCGGATCC – BamHI (←SP6-Promotor)**

**tSer (su+1)**

**(SP6-Promotor →) SmaI – CCCACCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGAGAGA  
TGCCGGAGCGGCTGAACGGACCGGTCTCTAAAACCGGAGTAGGGGCAACTCT  
ACCGGGGGTTCAAATCCCCCTCTCTCCGCCAGGTGATCCATCCGGATCCGCGGG  
G – SmaI**

**tTyr (su+3)**

**SmaI – CCCACCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGTGGGGTTCCCGAGCG  
GCCAAAGGGAGCAGACTCTAAATCTGCCGTCATCGACTTCGAAGGTTTCGAAT  
CCTCCCCCACCACCAGGTGATCCATCCGGATCCGCGGGG – SmaI (SP6-Promotor  
←); [zweite Version: (SP6-Promotor →)]**

### 10.3 Sequenz des Expressions-Vektors pHMFA<sub>Amb88</sub>:

	10	20	30	40	50	60
1	TCGCGCGTTT	CGGTGATGAC	GGTGAAAACC	TCTGACACAT	GCAGCTCCCG	GAGACGGTCA
61	CAGCTTGTCT	GTAAGCGGAT	GCCGGGAGCA	GACAAGCCCG	TCAGGGCGCG	TCAGCGGGTG
121	TTGGCGGGTG	TCGGGGCTGG	CTTAACATAG	CGGCATCAGA	GCAGATTGTA	CTGAGAGTGC
181	ACCATATGCG	GTGTGAAATA	CCGCACAGAT	CCGTAAGGAG	AAAATACCGC	ATCAGGCGCC
241	ATTTCGCCATT	CAGGCTGCGC	AACTGTTGGG	AAGGGCGATC	GGTGCGGGCC	TCTTCGCTAT
301	TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGGCGATT	AAGTTGGGTA	ACGCCAGGGT
361	TTTCCCAGTC	ACGACGTTGT	AAAACGACGG	CCAGTGCCAA	GCTTGCATGC	AAGGAGATGG
421	CGCCCAACAG	TCCCCCGGCC	ACGGGGCCTG	CCACCATAACC	CACGCCGAAA	CAAGCGCTCA
481	TGAGCCCGAA	GTGGCGAGCC	CGATCTTCCC	CATCGGTGAT	GTCGGCGATA	TAGGCGCCAG
541	CAACCGCACC	TGTGGCGCCG	GTGATGCCGG	CCACGATGCG	TCCGGCGTAG	AGGATCGAGA
601	TCTCGATCCC	GCGAAATTAA	TACGACTCAC	TATAGGGAGA	CCACAACGGT	TTCCCTCTAG
661	AAATAATTTT	GTTTAACTTT	AAGAAGGAGA	TATACCATGG	TGGACGCCTT	CGTGGGTACC
721	TGGAAGTTAG	TGGACAGCAA	GAATTTTCGAT	GACTACATGA	AGTCACTCGG	TGTCGGTTTT
781	GCTACCAGGC	AGGTGGGCAA	TATGACCAAG	CCTACCACAA	TCATCGAAGT	GAATGGGGAC
841	ACAGTCATCA	TAAAAACACA	AAGCACCTTC	AAGAACACAG	AGATCAGCTT	CAAGCTGGGA
901	GTCGAGTTCG	ATGAGACCAC	AGCAGATGAC	AGGAAAAGTCA	AGTCCATCGT	GACGCTGTAG
961	GGCGGCAAAC	TTGTCCACGT	GCAGAAGTGG	AATGGACAAG	AGACATCACT	TGTGCGGGAG
1021	ATGGTTGACG	GGAAACTCAT	TCTGACACTC	ACCCACGGCA	CTGCAGTTTG	CACTCGTACT
1081	TACGAGAAAC	AGGCATGACC	TGCCCTCTCC	TCCCACCTGAC	TGCTCTTCTG	TCAGTGGGCT
1141	ACTCCTGGAC	TCGGCACCAG	ATTGCCTCAT	TTTTCTCCTC	TGGCATTTTG	TATAAATCCA
1201	CCTTGACTGG	GGAAATTCTC	CTGGGGTCAG	GTGGCACCAG	CCTGGATCCG	GCTGCTAACA
1261	AAGCCCGAAA	GGAAGCTGAG	TTGGCTGCTG	CCACCCTGTA	GCAATAACTA	GCATAACCCC
1321	TTGGGGCCTC	TAAACGGGTC	TTGAGGGGTT	TTTTGCTGAA	AGGAGGAACT	ATATCCGGAT
1381	ATCCACAGGA	CGGGTGTGGT	CGCCATGATC	GCGTAGTCGA	TAGTGGCTCC	AAGTAGCGAA
1441	GCGAGCAGGA	CTGGGCGGCG	GCCAAAGCGG	TCGGACAGTG	CTCCGAGAAC	GGGTGCGCAT
1501	AGAAATTGCA	TCAACGCATA	TAGCGCTAGC	AGCACGCCAT	AGTGACTGGC	GATGCTGTCC
1561	GAATGGACGA	TATCCCGCAA	GAGGCCCGCC	AGTACCGGCA	TAACCAAGCC	TATGCCTACA
1621	GCATCCAGGG	TGACGGTGCC	GAGGATGACG	ATGAGCGCAT	TGTTAGATTT	CATACACCGT
1681	GCCTGACTGC	GTTAGCAATT	TAAGTGTGAT	AAACTACCGC	ATTTAAAGCTT	ATCGATGATA
1741	AGCTGTCAAA	CATGAGAATT	CGTAATCATG	GTCATAGCTG	TTTTCTGTGT	GAAATTGTTA
1801	TCCGCTCACA	ATTCCACACA	ACATAACGAG	CGGAAGCATA	AAGTGTAAG	CCTGGGGTGC
1861	CTAATGAGTG	AGCTAACTCA	CATTAATTGC	GTTGCGCTCA	CTGCCCGCTT	TCCAGTCGGG
1921	AAACCTGTCT	TGCCAGCTGC	ATTAATGAAT	CGGCCAACGC	GCGGGGAGAG	GCGGTTTGCG
1981	TATTGGGCGC	TCTTCCGCTT	CCTCGCTCAC	TGACTCGCTG	CGCTCGGTCG	TTCCGGCTGCG
2041	CGCAGCGGTA	TCAGTCACT	CAAAGGCGGT	AATACGGTTA	TCCACAGAA	CAGGGGATAA
2101	CGCAGGAAAG	AACATGTGAG	CAAAAGGCCA	GCAAAAAGCC	AGGAACGGTA	AAAAGGCCGC
2161	GTTGCTGGCG	TTTTTCCATA	GGCTCCGCCC	CCCTGACGAG	CATCACAAAA	ATCGACGCTC
2221	AAGTCAGAGG	TGGCGAAACC	CGACAGGACT	ATAAAGATAC	CAGGCGTTTC	CCCCTGGAAG
2281	CTCCCTCGTG	CGCTCTCCTG	TTCCGACCCT	GCCGCTTACC	GGATACCTGT	CCGCTTTTCT
2341	CCCTTCGGGA	AGCGTGGCGC	TTTCTCATAG	CTCACGCTGT	AGGTATCTCA	GTTTCGGTGT
2401	GGTCGTTCCG	TCCAAGCTGG	GCTGTGTGCA	CGAACCCCC	GTTTCAGCCG	ACCGCTGCGC
2461	CTTATCCGGT	AACTATCGTC	TTGAGTCCAA	CCCGGTAAGA	CACGACTTAT	CGCCACTGGC
2521	AGCAGCCACT	GGTAACAGGA	TTAGCAGAGC	GAGGTATGTA	GGCGGTGCTA	CAGAGTTCTT
2581	GAAGTGGTGG	CCTAACTACG	GCTACACTAG	AAGGACAGTA	TTTGGTATCT	GCGCTCTGCT
2641	GAAGCCAGTT	ACCTTCGGAA	AAAGAGTTGG	TAGCTCTTGA	TCCGGCAAAC	AAACCACCGC
2701	TGGTAGCGGT	GGTTTTTTTT	TTTGCAAGCA	GCAGATTACG	CGCAGAAAAA	AAGGATCTCA
2761	AGAAGATCCT	TTGATCTTTT	CTACGGGGTC	TGACGCTCAG	TGGAACGAAA	ACTCACGTTA
2821	AGGGATTTTG	GTCATGAGAT	TATCAAAAAG	GATCTTCACC	TAGATCCTTT	TAAATTAATA
2881	ATGAAGTTTT	AAATCAATCT	AAAGTATATA	TGAGTAAACT	TGGTCTGACA	GTTACCAATG
2941	CTTAATCAGT	GAGGCACCTA	TCTCAGCGAT	CTGTCTATTT	CGTTCATCCA	TAGTTGCCCTG
3001	ACTCCCCGTC	GTGTAGATAA	CTACGATACG	GGAGGGCTTA	CCATCTGGCC	CCAGTGCTGC
3061	AATGATACCG	CGAGACCCAC	GCTCACCGGC	TCCAGATTTA	TCAGCAATAA	ACCAGCCAGC
3121	CGGAAGGGCC	GAGCGCAGAA	GTGGTCCTGC	AACTTTATCC	GCCTCCATCC	ACCTATTTAA
3181	TTGTTGCCGG	GAAGCTAGAG	TAAGTAGTTC	GCCAGTTAAT	AGTTTGCGCA	ACGTTGTTGC
3241	CATTGCTACA	GGCATCGTGG	TGTCACGCTC	GTCGTTTGGT	ATGGCTTCAT	TCAGTCCCGG
3301	TTCCCAACGA	TCAAGGCGAG	TTACATGATC	CCCCATGTTG	TGCAAAAAAG	CGGTTAGCTC
3361	CTTCGGTCCT	CCGATCGTTG	TCAGAAGTAA	GTTGGCCGCA	GTGTTATCAC	TCATGGTTAT
3421	GGCAGCACTG	CATAATTCTC	TTACTGTGAT	GCCATCCGTA	AGATGCTTTT	CTGTGACTGG
3481	TGAGTACTCA	ACCAAGTCAT	TCTGAGAATA	GTGTATGCGG	CGACCGAGTT	GCTCTTGCCC
3541	GGCGTCAATA	CGGGATAATA	CCGCGCCACA	TAGCAGAACT	TTAAAAGTGC	TCATCATTGG
3601	AAAACGTTCT	TCGGGGCGAA	AACTCTCAAG	GATCTTACCG	CTGTTGAGAT	CCAGTTTCGAT

```

3661 GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
3721 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG
3781 TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT
3841 CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC
3901 ATTTCCCGGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA
3961 TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTCG TC

```

Total number of bases is: 3992.

DNA sequence composition: 1009 A; 1013 C; 1040 G; 930 T; 0 OTHER;

### 10.3.1 Sequenz von mFA<sub>Amb88</sub>:

(Die mRNA "mFA<sub>Amb88</sub>" wird durch T7-Transkription des mit EcoRV linearisierten Vektors pHMFA<sub>Amb88</sub> erzeugt.)

```

          10          20          30          40          50          60
          |          |          |          |          |          |
1  GGGAGACCAC AACGGTTTCC CTCTAGAAAT AATTTTGTTT AACTTTAAGA AGGAGATATA
61 CCATGGTGGA CGCCTTCGTG GGTACCTGGA AGTTAGTGGA CAGCAAGAAT TTCGATGACT
121 ACATGAAGTC ACTCGGTGTC GGTTTTGCTA CCAGGCAGGT GGGCAATATG ACCAAGCCTA
181 CCACAATCAT CGAAGTGAAT GGGGACACAG TCATCATAAA AACACAAAAGC ACCTTCAAGA
241 ACACAGAGAT CAGCTTCAAG CTGGGAGTCG AGTTCGATGA GACCACAGCA GATGACAGGA
301 AAGTCAAGTC CATCGTGACG CTGTAGGGCG GCAAACCTGT CCACGTGCAG AAGTGGAAATG
361 GACAAGAGAC ATCACTTGTG CGGGAGATGG TTGACGGGAA ACTCATTCTG ACACTCACCC
421 ACGGCACTGC AGTTTGC ACTGACTTACG AGAAACAGGC ATGACCTGCC CTCTCCTCCC
481 ACTGACTGCT CTTCTGTCAG TGGGCTACTC CTGGACTCGG CACCAGATTG CCTCATTTTTT
541 CTCCTCTGGC ATTTTGTATA AATCCACCTT GACTGGGGAA ATTCTCCTGG GGTGAGGTGG
601 CACCAGCCTG GATCCGGCTG CTAACAAAAG CCGAAAAGGAA GCTGAGTTGG CTGCTGCCAC
661 CGCTGAGCAA TAACTAGCAT AACCCCTTGG GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA GGGGTTTTTTT
721 GCTGAAAGGA GGA ACTATAT CCGGAT

```

Total number of bases is: 746.

DNA sequence composition: 199 A; 182 C; 193 G; 172 T; 0 OTHER;

### 10.3.2 DNA-Sequenz des kodierenden Bereichs und Aminosäuresequenz von FABP

```

          700          710          720          730          740
          |          |          |          |          |
ATG GTG GAC GCC TTC GTG GGT ACC TGG AAG TTA GTG GAC AGC AAG
MET Val Asp Ala Phe Val Gly Thr Trp Lys Leu Val Asp Ser Lys

          750          760          770          780
          |          |          |          |
AAT TTC GAT GAC TAC ATG AAG TCA CTC GGT GTC GGT TTT GCT ACC
Asn Phe Asp Asp Tyr MET Lys Ser Leu Gly Val Gly Phe Ala Thr

          790          800          810          820          830
          |          |          |          |          |
AGG CAG GTG GGC AAT ATG ACC AAG CCT ACC ACA ATC ATC GAA GTG
Arg Gln Val Gly Asn MET Thr Lys Pro Thr Thr Ile Ile Glu Val

          840          850          860          870
          |          |          |          |
AAT GGG GAC ACA GTC ATC ATA AAA ACA CAA AGC ACC TTC AAG AAC
Asn Gly Asp Thr Val Ile Ile Lys Thr Gln Ser Thr Phe Lys Asn

          880          890          900          910          920
          |          |          |          |          |
ACA GAG ATC AGC TTC AAG CTG GGA GTC GAG TTC GAT GAG ACC ACA
Thr Glu Ile Ser Phe Lys Leu Gly Val Glu Phe Asp Glu Thr Thr

          930          940          950          960
          |          |          |          |

```

```

GCA GAT GAC AGG AAA GTC AAG TCC ATC GTG ACG CTG GAT GGC GGC
Ala Asp Asp Arg Lys Val Lys Ser Ile Val Thr Leu Asp Gly Gly

      970              980              990              1000              1010
      |              |              |              |              |
AAA CTT GTC CAC GTG CAG AAG TGG AAT GGA CAA GAG ACA TCA CTT
Lys Leu Val His Val Gln Lys Trp Asn Gly Gln Glu Thr Ser Leu

      1020              1030              1040              1050
      |              |              |              |
GTG CGG GAG ATG GTT GAC GGG AAA CTC ATT CTG ACA CTC ACC CAC
Val Arg Glu MET Val Asp Gly Lys Leu Ile Leu Thr Leu Thr His

      1060              1070              1080              1090
      |              |              |              |
GGC ACT GCA GTT TGC ACT CGT ACT TAC GAG AAA CAG GCA TGA
Gly Thr Ala Val Cys Thr Arg Thr Tyr Glu Lys Gln Ala ---

```

Die Codons, die in den *amber*-Mutanten pHMFA<sub>Amb3</sub> bzw. pHMFA<sub>Amb88</sub> gegen TAG (*amber*) ausgetauscht wurden, sind **fettgedruckt**. pHMFA<sub>Amb3</sub> entstand durch den Austausch des Codons GAC an Aminosäureposition 3, pHMFA<sub>Amb88</sub> durch den Austausch des Codons GAT an Aminosäureposition 88 gegen TAG.

#### 8.4. Sequenz des Expressions-Vektors pHMRBD<sub>w</sub>:

```

              10              20              30              40              50              60
1  TCGCGCGTTT  CGGTGATGAC  GGTGAAAACC  TCTGACACAT  GCAGCTCCCG  GAGACGGTCA
61 CAGCTTGTCT  GTAAGCGGAT  GCCGGGAGCA  GACAAGCCCG  TCAGGGCGCG  TCAGCGGGTG
121 TTGGCGGGTG  TCGGGGCTGG  CTTAACTATG  CGGCATCAGA  GCAGATTGTA  CTGAGAGTGC
181 ACCATATGCG  GTGTGAAATA  CCGCACAGAT  GCGTAAGGAG  AAAATACCGC  ATCAGGCGCC
241 ATTCGCCATT  CAGGCTGCGC  AACTGTTGGG  AAGGGCGATC  GGTGCGGGCC  TCTTCGCTAT
301 TACGCCAGCT  GGCGAAAGGG  GGATGTGCTG  CAAGGCGATT  AAGTTGGGTA  ACGCCAGGGT
361 TTTCCCAGTC  ACGACGTTGT  AAAACGACGG  CCAGTGCCAA  GCTTGCATGC  AAGGAGATGG
421 CGCCCCAACG  TCCCCCGGCC  ACGGGGCGCT  CCACCATACC  CACGCCGAAA  CAAGCGCTCA
481 TGAGCCCGAA  GTGGCGAGCC  CGATCTTCCC  CATCGGTGAT  GTCGGCGATA  TAGGCGCCAG
541 CAACCGCACC  TGTGGCGCCG  GTGATGCCGG  CCACGATGCG  TCCGGCGTAG  AGGATCGAGA
601 TCTCGATCCC  GCGAAATTAA TACGACTCAC TATAGGGAGA  CCACAACGGT  TTCCCTCTAG
661 AAATAATTTT  GTTTAACTTT  AAGAAGGAGA  TATACCATGG  ACCCGAGTAA  GACAAGCAAC
721 ACTATCCGTG  TTTTCTTGCC  GAACAAGCAA  AGAACAGTGG  TCAATGTGCG  AAATGGAATG
781 AGCTTGCATG ACTGCCTTAT GAAAGCACTC AAGGTGAGGG GCCTGCAACC AGAGTGCTGT
841 GCAGTGTTCA  GACTTCTCCA  CGAACACAAA  GGTAAAAAAG  CACGCTTAGA  TTGGAATACT
901 GATGCTGCGT  CTTTGATTGG  AGAAGAACTT  CAAGTAGATT  TTCTAGATGT  CGACCATCAC
961 CATCACCATC ATTAACTACTA  AGCTGATCCG  GCTGCTAACA  AAGCCCGAAA  GGAAGCTGAG
1021 TTGGCTGCTG  CCACCGCTGA  GCAATAACTA  GCATAACCCC  TTGGGGCTC  TAAACGGGTG
1081 TTGAGGGGTT  TTTTGCTGAA  AGGAGGAACT  ATATCCGGAT  ATCCACAGGA  CGGGTGTGGT
1141 CGCCATGATC  CCGTAGTCGA  TAGTGGCTCC  AAGTAGCGAA  GCGAGCAGGA  CTGGGCGGGC
1201 GCCAAAGCGG  TCGGACAGTG  CTCCGAGAAC  GGGTGCAT  AGAAATGCA  TCAACGCATA
1261 TAGCGCTAGC  AGCACGCCAT  AGTACTGGC  GATGCTGTCG  GAATGGACGA  TATCCCGCAA
1321 GAGGCCCGGC  AGTACCGGCA  TAACCAAGCC  TATGCCTACA  GCATCCAGGG  TGACGGTGCC
1381 GAGGATGACG  ATGAGCGCAT  TGTTAGATTT  CATAACCGGT  GCCTGACTGC  GTTAGCAATT
1441 TAACTGTGAT  AAACTACCGC  ATTAAGCTT  ATCGATGATA  AGCTGTCAAA  CATGAGAATT
1501 CGTAATCATG  GTCATAGCTG  TTTCTGTGT  GAAATTGTTA  TCCGCTCACA  ATTCCACACA
1561 ACATACGAGC  CGGAAGCATA  AAGTGTAAG  CCTGGGGTGC  CTAATGAGTG  AGCTAACTCA
1621 CATTAAATTG  GTTGCCTCA  CTGCCCCTT  TCCAGTCGGG  AAACCTGTCG  TGCCAGCTGC
1681 ATTAATGAAT  CGGCCAACGC  GCGGGGAGAG  GCGGTTTGCG  TATTGGGCGC  TCTTCCGCTT
1741 CCTCGCTCAC  TGACTCGCTG  CGCTCGGTCG  TTCGGCTGCG  GCGAGCGGTA  TCAGCTCACT
1801 CAAAGGCGGT  AATACGGTTA  TCCACAGAAT  CAGGGGATAA  CGCAGGAAAG  AACATGTGAG
1861 CAAAAGGCCA  GCAAAGGCC  AGGAACCGTA  AAAAGCCGC  GTTGCTGGCG  TTTTCCATA
1921 GGCTCCGCC  CCCTGACGAG  CATCACAAA  ATCGACGCTC  AAGTCAGAGG  TGGCGAAACC
1981 CGACAGGACT  ATAAAGATAC  CAGGCGTTTC  CCCCTGGAAG  CTCCCTCGTG  CGCTCTCCTG
2041 TTCCGACCCT  GCCGCTTACC  GGATACCTGT  CCGCCTTCT  CCCTTCGGGA  AGCGTGGCGC

```

```

2101 TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTTCGC TCCAAGCTGG
2161 GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC
2221 TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA
2281 TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG
2341 GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA
2401 AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTTG
2461 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT
2521 CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT
2581 TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTT AAATCAATCT
2641 AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA
2701 TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA
2761 CTACGATAAG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC
2821 GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA
2881 GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCCG GAAGCTAGAG
2941 TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG
3001 TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCAACGA TCAAGGCGAG
3061 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGGTCTT CCGATCGTTG
3121 TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCCTC
3181 TTAGTGTGAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT
3241 TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA
3301 CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGCGCAA
3361 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGACCCCA
3421 ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC
3481 AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC
3541 TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG
3601 AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC
3661 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG CGTATCACGA
3721 GGCCCTTTTC TC

```

Total number of bases is: 3732.

DNA sequence composition: 956 A; 936 C; 965 G; 875 T;

Anmerkung: Die gekoppelte Transkription/Translation oder die Herstellung von mRNA wird mit dem mit EcoRV linearisierten Vektor durchgeführt. Innerhalb der dargestellten Vektorsequenz ist der transkribierte Bereich des Vektors unterstrichen. T7-Promotor, sowie Start- und Stopp-Codon des RBD-kodierenden Bereichs sind **fettgedruckt**.

#### 10.4.1 DNA-Sequenz des proteinkodierenden Bereichs und Aminosäuresequenz von RBD

```

      700          710          720          730          740
      |          |          |          |          |
ATG GAC CCG AGT AAG ACA AGC AAC ACT ATC CGT GTT TTC TTG CCG
MET Asp Pro Ser Lys Thr Ser Asn Thr Ile Arg Val Phe Leu Pro

      750          760          770          780
      |          |          |          |
AAC AAG CAA AGA ACA GTG GTC AAT GTG CGA AAT GGA ATG AGC TTG
Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Asn Val Arg Asn Gly MET Ser Leu

      790          800          810          820          830
      |          |          |          |          |
CAT GAC TGC CTT ATG AAA GCA CTC AAG GTG AGG GGC CTG CAA CCA
His Asp Cys Leu MET Lys Ala Leu Lys Val Arg Gly Leu Gln Pro

      840          850          860          870
      |          |          |          |
GAG TGC TGT GCA GTG TTC AGA CTT CTC CAC GAA CAC AAA GGT AAA
Glu Cys Cys Ala Val Phe Arg Leu Leu His Glu His Lys Gly Lys

```

```

      880           890           900           910           920
      |           |           |           |           |
AAA  GCA  CGC  TTA  GAT  TGG  AAT  ACT  GAT  GCT  GCG  TCT  TTG  ATT  GGA
Lys  Ala  Arg  Leu  Asp  Trp  Asn  Thr  Asp  Ala  Ala  Ser  Leu  Ile  Gly

           930           940           950           960
           |           |           |           |
GAA  GAA  CTT  CAA  GTA  GAT  TTT  CTA  GAT  GTC  GAC  CAT  CAC  CAT  CAC
Glu  Glu  Leu  Gln  Val  Asp  Phe  Leu  Asp  Val  Asp  His  His  His  His

      970           980
      |           |
CAT  CAT  TAA  TAC  TAA  GCT
His  His  ---  ---  ---  ---

```

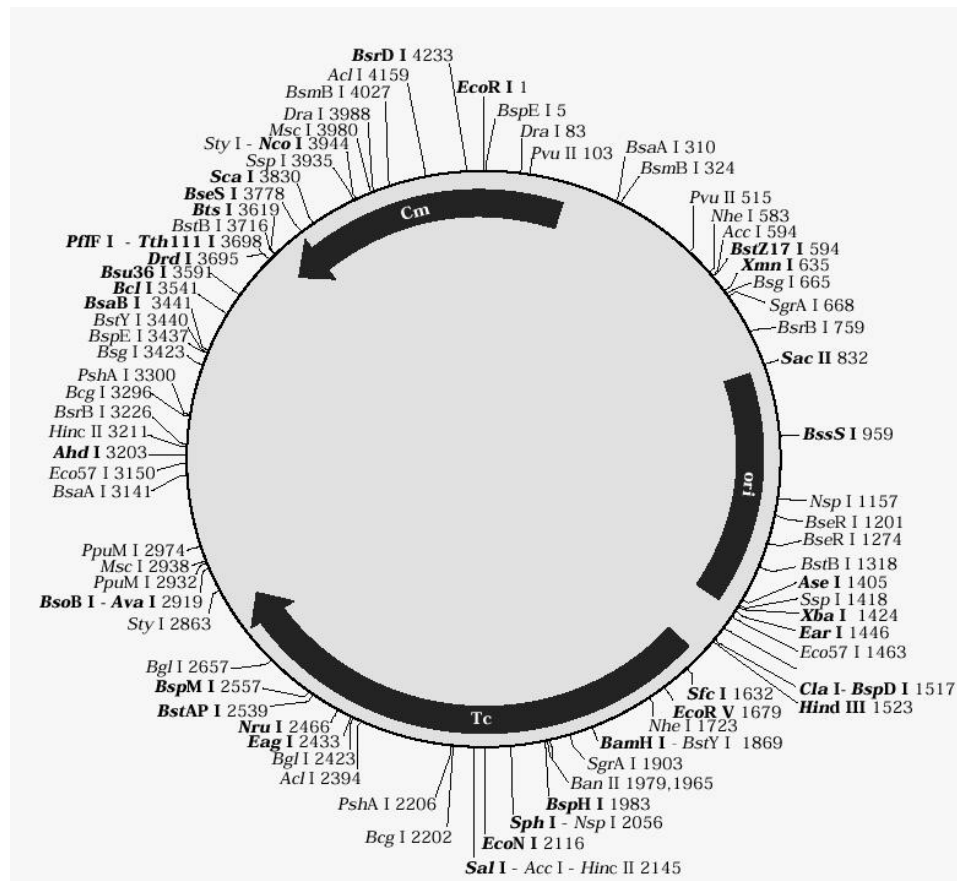
Das Codon, das in der *amber*-Mutante pRBD<sub>Amb43</sub> gegen TAG (*amber*) ausgetauscht wurde, ist **fettgedruckt**.



## 10.5 Restriktionskarte<sup>1</sup> und Sequenz<sup>2</sup> des Vektors pACYC184 (pCAT<sub>w</sub>)

- 1) aus: New England BioLab (2001) Katalog & technische Referenzen
- 2) GenBank Accession Nr.: X06403

Größe : 4245 Bp  
 Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen: 3805 (Stop) - 219 (Start)  
 (komplementäre Sequenz in **Fettdruck**)  
 (Codon 11, das in der amber-Mutante  
 pCAT<sub>Amb11</sub> gegen UAG ausgetauscht wurde,  
unterstrichen)



```

1  gaattccgga  tgagcattca  tcaggcgggc  aagaatgtga  ataaaggccg  gataaaactt
61  gtgcttattt  ttctttacgg  tctttaaaaa  ggccgtaata  tccagctgaa  cggctctggt
121  ataggtacat  tgagcaactg  actgaaatgc  ctcaaaatgt  tctttacgat  gccattggga
181  tatatcaacg  gtggtatatc  cagtgatttt  tttctccatt  ttagcttctt  tagctcctga
241  aatctcgat  aactcaaaaa  atacgcccgg  tagtgatctt  atttcattat  ggtgaaagt
301  ggaacctctt  acgtgccgat  caacgtctca  ttttcgccaa  aagttggccc  agggcttccc
361  ggtatcaaca  gggacaccag  gatttattta  ttctgcgaag  tgatcttccg  tcacaggtat
421  ttattcggcg  caaagtgcgt  cgggtgatgc  tgccaactta  ctgatttagt  gtatgatggt
481  gtttttgagg  tgctccagtg  gcttctggtt  ctatcagctg  tccctcctgt  tcagctactg
541  acggggtggt  gcgtaacggc  aaaagcaccg  ccggacatca  gcgctagcgg  agtgatact
601  ggcttactat  gttggcactg  atgagggtgt  cagtgaagtg  cttcatgtgg  caggagaaaa
661  aaggctgcac  cggtgcgctc  gcagaatatg  tgatacagga  tatattccgc  ttctcgcctc
721  actgactcgc  tacgctcggg  cgttcgcactg  cggcgagcgg  aaatggctta  cgaacggggc
781  ggagatttcc  tggagatgct  caggaagata  cttaacaggg  aagtgagagg  gccgcggcaa
841  agccgttttt  ccataggctc  cgccccctag  acaagcatca  cgaaatctga  cgctcaaatc
901  agtgggtggc  aaaccgcaca  ggactataaa  gataccaggc  gtttccccct  gtcggctccc
961  tcgtgcgctc  tctgttctct  gccttctcgt  ttaccgggtg  cattccgctg  ttatggccgc
1021  gtttgtctca  ttccacgctc  gacactcagt  tccgggtagg  cagttcgcctc  caagctggac

```

1081 tgtatgcacg aaccccccg tcagtccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt  
 1141 gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca ccactggcag cagccactgg taattgattt  
 1201 agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg  
 1261 tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaagag ttggtagctc agagaacctt  
 1321 agaaaaaccg cctgcaagg cggtttttcc gttttcagag caagagatta cgcgcagacc  
 1381 aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa ttttctaga tttcagtgca  
 1441 atttatctct tcaaatgtag cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgtaattctc  
 1501 atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt aatgcggtag tttatcacag ttaaattgct  
 1561 aacgcagtca ggcaccgtgt atgaaatcta acaatgcgct catcgtcatc ctccggcaccg  
 1621 tcaccctgga tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggg actgccgggg ctcttgccgg  
 1681 atatcgtcca ttccgacagc atcggcagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgctg  
 1741 tgatgcaatt tctatgcgca cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgcggcc  
 1801 cagtcctgct cgcttcgcta cttggagcca cctatcgacta cgcgatcatg gccaccacac  
 1861 ccgtcctgtg gatcctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggg gccacagggtg  
 1921 cggttgctgg cgcctatata gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttctg  
 1981 ggctcatgag cgcttgtttc ggcgtgggta tgggtggcagg ccccgtggcc gggggactgt  
 2041 tgggcgccat ctcttgcat gcaccattcc ttggccggc ggtgctcaac ggctcaacc  
 2101 tactactggg ctgcttccca atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga ccgatgccct  
 2161 tgagagcctt caaccacagc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcggcg  
 2221 cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg  
 2281 tcattttcgg cgaggaccgc tttcgctgga gccgcacgat gatcggcctg tctgttgcgg  
 2341 tattcggaat cttgcacgcc ctcgctcaag ccttcgctac tgggtcccgc accaaaactt  
 2401 tcggcgagaa gcaggccatt atcgcggcca tggcggccga cgcgctgggc tacgtcttgc  
 2461 tggcgttcgc gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttccggcg  
 2521 gcatcgggat gccgcggtt caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg  
 2581 gacagcttca aggatcgtc gccggtctta ccagcctaac ttcgatcact ggaccgctga  
 2641 tcgtcacggc gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttggca tggattgtag  
 2701 gcgcccctt atacctgtc tgccctccc cggtgcgctc cgggtgcatgg agccgggcca  
 2761 cctcgacctg aatggaagcc ggcggcact ggcctaaccga ttcaccactc caagaattgg  
 2821 agccaatcaa ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacaatac  
 2881 catcgcgtcc gccatctcca gcagccgac gccggcgcatc tcgggcagcg ttgggtctg  
 2941 gccacgggtg cgcgatgatg tgctcctgtc gttgaggacc cggctaggct ggccgggttg  
 3001 ccttactggt tagcagaatg aatcaccgat acgcgagcga acgtgaagcg actgctgctg  
 3061 caaacgctc gcgacctgag caacaacatg aatggtcttc ggtttccgtg tttcgtaaag  
 3121 tctggaacg cggaaagccc ctacgtgctg ctgaagttgc ccgcaacaga gagtggaacc  
 3181 aaccggtgat accacgatac tatgactgag agtcaacgcc atgagcggcc tcatttctta  
 3241 ttctgagtta caacagtcg caccgctgtc cggtagctcc ttccgggtgg cgccgggcat  
 3301 gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc  
 3361 ggcagcggcc aacagtcctc cggccacggg gcctgccacc ataccacgc cgaaacaagc  
 3421 gccctgcacc attatgttcc ggatctgcat cgcaggatgc tgctggctac cctgtggaac  
 3481 acctacatct gtattaacga agcgtcaacc gtttttatca ggctctggga ggcagaataa  
 3541 atgatcatat cgtcaattat tacctccacg gggagagcct gagcaaaactg gcctcaggca  
 3601 tttgagaagc acacggtcac actgcttccg gtagtcaata aaccggtaaa ccagcaatag  
 3661 acataagcgg ctattttaaag accctgccct gaaccgacga ccgggtcgaa tttgctttcg  
 3721 aatttctgcc attcatccgc ttattatcac ttattcaggc gtagcaccag gcgtttaagg  
 3781 gcaccaataa ctgccttaaa aaaattacgc cccgccctgc cactcatcgc agtactgttg  
 3841 **taattcatta agcattctgc cgacatggaa cccatcacag acggcatgat gaacctgaat**  
 3901 **cgccagcggc atcagcacct tgtcgccttg cgtataatat ttgccatgg tgaaaaagg**  
 3961 **ggcgaagaag ttgtccatat tggccacggt taaatcaaaa ctggtgaaac tcaccagg**  
 4021 **attggctgag acgaaaaaca tattctcaat aaaccttta gggaaatagg ccaggtttct**  
 4081 **accgtaacac gccacatctt gogaatatat gtgtagaaac tgccggaaat cgtcgtggta**  
 4141 **ttcactccag agcgatgaaa acgtttcagt ttgctcatgg aaaacgggtg aacaagggtg**  
 4201 **aacactatcc catatcacca gctcaccgct tttcattgcc atacg**