

Die Anleitung

Version Mai 2004

Inhaltsverzeichnis

I. Über diese Anleitung.....	3
1. Konventionen.....	3
2. Copyright.....	3
3. Kontakt.....	3
4. Benutzer-Meinungen.....	3
II. DNS.....	4
1. Anzeigen von DNS-Sequenzen.....	4
2. Toolbar.....	4
3. Detail-Baum.....	4
4. Kartendarstellung.....	4
5. Sequenzdarstellung.....	7
III. Peptide.....	8
1. Toolbar.....	8
2. Funktionen.....	8
3. Sequenzdarstellung.....	8
IV. PCR und Primer Design.....	9
1. Das PCR-Modul.....	9
2. Dialog „Primer bearbeiten“.....	10
3. Dialog „Stille Mutation“.....	11
V. Sequenzierung.....	12
1. Darstellung.....	12
2. Bearbeitung.....	12
3. Toolbar.....	12
VI. Alignments.....	13
1. Starten des Alignment-Moduls.....	13
2. Dialog „Einstellungen“.....	13
3. Das Alignment-Modul.....	13
VII. Rechner.....	15
1. Rechner „Ligation“.....	15
2. Rechner „DNS-Konzentration“.....	15
VIII. Bildbetrachter.....	15
IX. Werkzeuge und Dialoge.....	16
1. Ligation.....	16
2. Einstellungen.....	16
3. Öffnen/Speichern/Datenbank verwalten.....	16
4. Importieren.....	18
5. Sequenz eingeben.....	18
6. Sequenz-Editor.....	18
7. Restriktions-Assistent.....	19
8. Projekte.....	20
9. Drucken.....	20
10. Sequenzdarstellung.....	20
11. Restriktionsenzym-Editor.....	20
X. FAQ.....	20

I. Über diese Anleitung

1. Konventionen

- Tasten werden wie folgt markiert : **Taste**
- Menüs, Regler und Buttons werden wie folgt markiert : **MENÜ**
- *Doppelklick* bezieht sich stets auf die *linke* Maustaste.
- *Kontextmenü* ist das Menü, das sich beim Klicken mit der *rechten* Maustaste öffnet.

2. Copyright

GENTle ist ©2004 by Magnus Manske, lizenziert unter GPL

Diese Anleitung ist ©2004 by Magnus Manske, lizenziert unter GFDL

3. Kontakt

Magnus Manske

AG Klein, Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Otto-Fischer-Straße 12-14

50674 Köln

0221 – 470 3222

magnus.manske@uni-koeln.de

4. Benutzer-Meinungen

- „Damit hätten wir unsere speziellen Bio-Anwendungen rechtzeitig fertig gehabt!“
- S. Hussein, ehemaliger Staatschef
- „Die konsequente Fortführung meiner Arbeit!“
- J. Mengele, bekannter Mediziner
- „Ausgezeichnet!“
- M. Burns, Manager
- „Magnus!!!“
- diverse illustre Mitglieder der AG Klein

II. DNS

Im DNS-Modul können DNS-Sequenzen angezeigt, annotiert und bearbeitet werden.















1. Anzeigen von DNS-Sequenzen

DNS-Sequenzen können auf mehrere Arten im DNS-Modul geöffnet werden:

1. Öffnen von Datenbankeinträgen (→[IX.3](#)).
2. Öffnen von Dateien (→[IX.4](#)).
3. Manuelle Eingabe (→[IX.5](#)).
4. Aus einer Teilsequenz eines anderen DNS-Moduls

2. Toolbar

Die Toolbar (1) bietet verschiedene Funktionen und Einstellungen:

-  Neue Sequenz manuell eingeben (→[IX.5](#)).
-  Sequenz öffnen (→[IX.3](#)).
-  Sequenz speichern (→[IX.3](#)).
-  Undo (letzte Aktion rückgängig machen).
-  Ausschneiden (Strg-X).
-  Kopieren (Strg-C).
-  Einfügen (Strg-V).
-  Circularär/linear umschalten (nur für Sequenzen ohne *sticky ends*).
-  Open reading frames anzeigen/verbergen.
-  Features anzeigen/verbergen.
-  Restriktionen anzeigen/verbergen.
-  Nur Kartendarstellung anzeigen.
-  Sequenz bearbeiten.
-  Zoom Zoomen der Kartendarstellung.

3. Detail-Baum

Die Baumdarstellung (2) links oben im Modul zeigt Eigenschaften der DNS-Sequenz, der Features und der Restriktionsschnittstellen. Features und Restriktionsschnittstellen können per Doppelklick ein- bzw. ausgeblendet werden. Weitere Aktionen sind über das jeweilige Kontextmenü abrufbar.

4. Kartendarstellung

Die Kartendarstellung (3) zeigt eine Übersicht der gesamten DNS-Sequenz. Features und Restriktionsschnittstellen werden angezeigt.

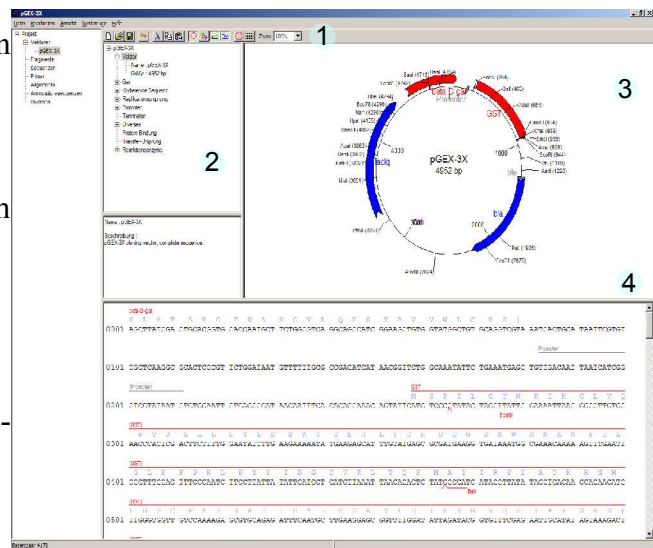


Abbildung II.1: Das DNS-Modul.

Aktionen per Maus

<i>Aktion mit</i>	<i>Maustaste</i>	<i>Funktion</i>
Hintergrund	Links	Sequenz markieren
	Links (Doppelklick)	Sequenz-Editor öffnen
	Mitte	Sequenz anzeigen
	Rechts	Kontext-Menü
Feature	Links	Verschieben
	Links (Doppelklick)	Feature bearbeiten
	Mitte	Feature-Sequenz markieren und anzeigen
	Rechts	Kontext-Menü
Restriktionsschnittstellen	Links	Verschieben
	Links (Doppelklick)	Enzymliste bearbeiten
	Mitte	Restriktions-Assistent (→ IX.7)
	Rechts	Kontext-Menü
Open reading frame	Links	ORF-Sequenz markieren
	Links (Doppelklick)	ORF-Sequenz markieren und anzeigen
	Rechts	Kontext-Menü
Gesamte Karte	Links (+Strg-Taste)	Gezoomten Ausschnitt verschieben

Kontext-Menü

Hintergrund

- SEQUENZ BEARBEITEN
- SEQUENZ TRANSFORMIEREN
- ENZYME LIMITIEREN
- PCR

- PCR
- VORWÄRTS
- RÜCKWÄRTS
- BEIDE
- MUTATION

- AUSWAHL

- AUSSCHNEIDEN
- KOPIEREN
- ALS NEUE SEQUENZ
- ENZYME, DIE HIER SCHNEIDEN
- AUSWAHL ALS NEUES FEATURE
- AMINOSÄUREN EXTRAHIEREN
- BLAST DNS
- BLAST AMINOSÄUREN

Öffnet den Sequenz-Editor (→[IX.6](#)).

Sequenz invertiert und/oder komplementär.

Zeigt nur noch Enzyme, die höchstens n -mal schneiden.

Startet das PCR-Modul (→[IV.](#)).

PCR-Modul mit 3'-Primer.

PCR-Modul mit 5'-Primer.

PCR-Modul mit 3'- und 5'-Primer.

PCR-Modul mit Mutagenese-Primern.

Markierte Sequenz ausschneiden.

Markierte Sequenz in die Zwischenablage kopieren.

Ein neues DNS-Modul aus der Markierung erzeugen.

Enzyme, die in der Markierung schneiden (→[IV.3](#)).

Ein neues Feature aus der Markierung erzeugen.

Ein neues AS-Modul aus der Markierung erzeugen.

BLAST-Suche nach der DNS-Sequenz der Markierung.

BLAST-Suche nach der AS-Sequenz der Markierung.

- SEQUENZKARTE
 - IN DIE ZWISCHENABLAGHE KOPIEREN
 - SEQUENZKARTE DRUCKEN
- ORFs ANZEIGEN/VERBERGEN
- ORFs BEARBEITEN

Kopiert die Sequenzkarte in die Zwischenablage.

Druckt die Sequenzkarte.

Schaltet die Open reading frame-Darstellung an/aus.

ORF-Darstellungsoptionen.

Restriktionsschnittstellen

- RESTRIKTIONSENZYM BEARBEITEN
- ENZYM ANZEIGEN/AUSBLENDEN
- ENZYM ENTFERNEN
- RESTRIKTIONS-SITE MARKIEREN
- RESTRIKTIONS-SITE MARKIEREN UND ANZEIGEN
- ENZYM-INFORMATION ONLINE
- ZUM COCKTAIL HINZUFÜGEN
- ZUM COCKTAIL HINZUFÜGEN UND SCHNEIDEN

Restriktionsenzyme entfernen/hinzufügen/organisieren.

Alle Restriktionsschnittstellen des Enzyms anzeigen.

Das Restriktionsenzym entfernen.

Die Restriktions-Site in der Sequenz markieren.

Die Restriktions-Site in der Sequenz anzeigen.

Enzym-Information bei Rebase (Internet-Verbindung!).

Enzym zur Restriktion vorbereiten.

Restriktion mit Enzym vorbereiten und starten.

Features

- FEATURE BEARBEITEN
- FEATURE AUSBLENDEN
- FEATURE LÖSCHEN
- DNS-SEQUENZ
 - MARKIEREN
 - MARKIEREN UND ANZEIGEN
 - KOPIERE (KODIERENDE) SEQUENZ
 - FEATURE ALS NEUE SEQUENZ
 - BLAST DNS
- AMINOSÄURESEQUENZ
 - KOPIERE AMINOSÄURESEQUENZ
 - ALS NEUEN EINTRAG
 - BLAST AMINOSÄUREN

Das Feature bearbeiten (→[IX.6](#))

Das Feature ausblenden.

Das Feature löschen.

Die DNS-Sequenz des Features markieren.

Die DNS-Sequenz des Features anzeigen.

Die (kodierende) DNS-Sequenz des Features kopieren.

Ein neues DNS-Modul aus dem Feature erzeugen.

BLAST-Suche nach Feature-DNS.

Die Aminosäuresequenz des Features kopieren.

Die Aminosäuresequenz als neues Peptid-Modul.

BLAST-Suche nach Feature-AS-Sequenz.

ORFs

- ALS NEUES FEATURE
- DNS-SEQUENZ
 - KOPIERE DNS-SEQUENZ
 - ALS NEUE SEQUENZ
 - BLAST DNS
- AMINOSÄURESEQUENZ
 - KOPIERE AMINOSÄURESEQUENZ
 - ALS NEUE SEQUENZ
 - BLAST AMINOSÄUREN

Aus dem ORF ein neues Feature erzeugen.

Die DNS-Sequenz des ORFs kopieren.

Ein neues DNS-Modul aus dem ORF erzeugen.

BLAST-Suche nach ORF-DNS.

Die Aminosäuresequenz des ORFs kopieren.

Ein neues Peptid-Modul aus dem ORF erzeugen.

BLAST-Suche nach ORF-Aminosäuresequenz.

5. Sequenzdarstellung

Die Sequenzdarstellung (4) wird von vielen Modulen verwendet. Sie wird hier exemplarisch vorgestellt.

Darstellungsoptionen

Zusätzlich zur DNS-Sequenz können Features, Restriktionsschnittstellen, codierte Aminosäuresequenzen und deren Protease-Schnittstellen dargestellt werden:

- Features können per Menü, Toolbar oder **F6** ein- bzw. ausgeblendet werden.
- Restriktionsschnittstellen können per Menü, Toolbar oder **F7** ein- bzw. ausgeblendet werden.
- Aminosäuresequenzen können per Menü oder Tastenkürzel in ihrer Darstellung verändert werden:
 - **Strg+0** Aminosäuren ausblenden.
 - **Strg+1** Aminosäuren in der gesamten Sequenz mit reading frame 1 anzeigen.
 - **Strg+2** Aminosäuren in der gesamten Sequenz mit reading frame 2 anzeigen.
 - **Strg+3** Aminosäuren in der gesamten Sequenz mit reading frame 3 anzeigen.
 - **Strg+4** Aminosäuren in der gesamten Sequenz mit reading frame -1 anzeigen.
 - **Strg+5** Aminosäuren in der gesamten Sequenz mit reading frame -2 anzeigen.
 - **Strg+6** Aminosäuren in der gesamten Sequenz mit reading frame -3 anzeigen.
 - **Strg+7** Aminosäuren nur bei bekanntem reading frame anzeigen.
 - **Strg+8** Aminosäuren ausblenden.
 - **Strg+Q** Aminosäuren als ein-Buchstaben-Code anzeigen.
 - **Strg+W** Aminosäuren als drei-Buchstaben-Code anzeigen.

Kontext-Menü

Das Kontext-Menü der Sequenzdarstellung entspricht in weiten Teilen dem der Kartendarstellung. Hinzugekommen sind:

- **ALS BILD KOPIEREN** Die Sequenzdarstellung als Bild in die Zwischenablage kopieren.
- **ALS BILD SPEICHERN** Die Sequenzdarstellung als Bitmap speichern.
- **SEQUENZ DRUCKEN** Die Sequenzdarstellung (bzw. den ausgewählten Bereich) drucken.

Editiermodus

Zwischen Darstellungs- und Editiermodus wird über die Toolbar oder **F2** umgeschaltet. Dabei wird die Sequenzdarstellung während des Bearbeitens der Übersichtlichkeit halber maximiert. Je nach Modul können nur bestimmte Zeichen eingegeben werden, z.B. nur A, C, G oder T im DNS-Modul. Wird eine andere Taste betätigt, erfolgt eine Nachfrage, ob andere Tasten vorübergehend erlaubt werden sollen.







Der Text-Cursor kann ähnlich einer Textverarbeitung bewegt werden. Löschen von Zeichen funktioniert ebenso. Zwischen den Modi „Einfügen“ und „Überschreiben“ kann mit der **Einfg**-Taste umgeschaltet werden, wobei sich der Cursor sichtbar verändert. In manchen Modulen (z.B. PCR, Sequenzierung) ist der Modus „Überschreiben“ fest eingestellt; hier kann auch nicht gelöscht werden.

III. Peptide

Das Peptid- oder Protein-Modul ermöglicht das Darstellen, Annotieren, Analysieren und Bearbeiten von Aminosäuresequenzen.

1. Toolbar

Funktionen der Toolbar (1):

-  Neue Sequenz manuell eingeben (→IX.5).
-  Sequenz öffnen (→IX.3).
-  Sequenz speichern (→IX.3).
-  Ausschneiden (Strg-X).
-  Kopieren (Strg-C).
-  Einfügen (Strg-V).

PLOT Zeigt einen Plot in der Sequenz an.

HORIZONTAL Zeigt die Aminosäuresequenz als eine lange Zeile an.



Abbildung III.1: Das Peptid-/Protein-Modul

2. Funktionen

Eine Liste mit Funktionen (2):

- DATEN Basisdaten der Aminosäuresequenz.
- BESCHREIBUNG Beschreibung der Aminosäuresequenz.
- SCHEMA Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz.
- AS-GEWICHT Plot der Aminosäuresequenz nach Aminosäuregewicht.
- AS-PI Plot der Aminosäuresequenz nach isoelektrischem Punkt.
- HYDROPHOBIZITÄT Plot der Aminosäuresequenz nach Hydrophobizität.
- CHOU-FASMAN-PLOT Sekundärstrukturvorhersage nach Chou-Fasman-Methode.

3. Sequenzdarstellung

Die Sequenzdarstellung (3) entspricht weitgehend der des DNS-Moduls. Dabei wird die Aminosäuresequenz bearbeitet; die DNS-Darstellung entfällt offensichtlich. Beim Wechsel in den Editiermodus wird die Sequenzdarstellung *nicht* vergrößert.

Das Kontext-Menü entspricht weitgehend dem der Sequenzdarstellung im DNS-Modul.

IV. PCR und Primer Design

In diesem Modul können Primer erstellt und „virtuelle PCRs“ durchgeführt werden.








1. Das PCR-Modul

Starten des PCR-Moduls

Das PCR-Modul kann aus dem DNS-Modul gestartet werden, entweder über das Menü **WERKZEUGE/PCR**, oder über das Kontext-Menü in der Sequenz oder der DNS-Karte. Wenn eine Sequenz markiert ist, können automatisch Primer am Anfang bzw. am Ende der markierten Sequenz erstellt werden. Wenn die markierte Sequenz genau drei Nukleotide lang ist, können wahlweise auch Mutagenese-Primer erstellt werden. Anfangs-, End- und Mutageneseprimer können nur über das Kontext-Menü erstellt werden. Solche automatisch erstellten Primer sind in keiner Weise optimiert und bedürfen manueller Nachbearbeitung.

Toolbar

Die Toolbar (1) des PCR-Moduls bietet folgende Funktionen:

-  Neuen Primer manuell eingeben. Dieser kann dann zur virtuellen PCR hinzugefügt werden (→IX.5).
-  Dateien (Primer) öffnen (→IX.3).
-  Primer hinzufügen. Nur gegenwärtig geöffnete Primer können zur virtuellen PCR hinzugefügt werden. Hinzugefügte Primer annealen automatisch in der optimalen Position und Richtung an der Sequenz.
-  Primer exportieren. Basierend auf der Auswahl in der Primer-Liste wird ein neuer Primer generiert, aber noch nicht gespeichert.
-  Editiermodus (=F2).
-  Features aus-/einblenden.
-  Laufweite der (virtuellen) Polymerase. Dies ist das Äquivalent zur Elongationszeit am (realen) PCR-Gerät. Beim Start des PCR-Moduls und beim Hinzufügen von Primern wird automatisch eine optimale Laufweite geschätzt; diese kann dann bei Bedarf manuell geändert werden.

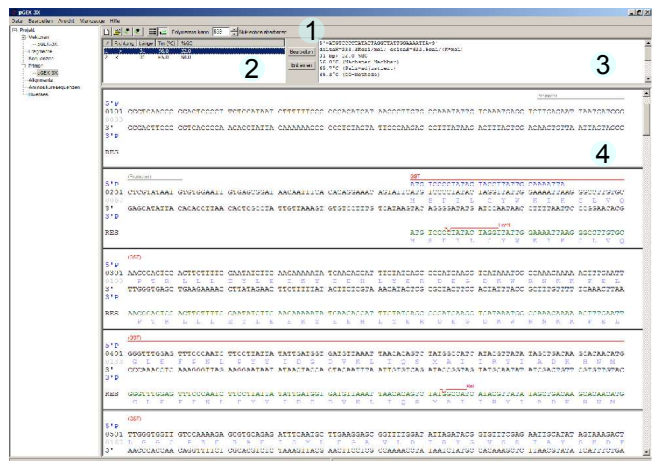


Abbildung IV.1: Das PCR-/Primer Design-Modul.

Primer-Liste

Die Primer-Liste (2) befindet sich unter der Toolbar. Sie zeigt alle in der PCR verwendeten Primer, zusammen mit einigen Eckdaten wie Länge, Schmelztemperatur und Richtung, in welcher der Primer gegenwärtig an die Sequenz annealt.

Wird ein Primer aus der Liste ausgewählt, werden weitere Details des Primers (Primersequenz, self-annealing etc.) im rechten Textfeld (3) dargestellt. Ein Doppelklick auf einen Primer in der Primer-Liste markiert diesen in der Template-Sequenz und zeigt ihn dort an.

Ein ausgewählter Primer kann

- über die Toolbar exportiert werden
- bearbeitet werden (→Dialog „Primer bearbeiten“)
- entfernt werden

Sequenz

Die Sequenzdarstellung (4) umfasst folgende Zeilen:

1. Features des Templates (diese Zeile kann ausgeblendet werden).
2. 5'-Primer.
3. Template-DNS-Sequenz (5'→3').
4. Template-Aminosäure-Sequenz. Der reading frame kann wie im DNS-Modul eingestellt werden.
5. Template-DNS-Sequenz (komplementär, 3'→5').
6. 3'-Primer.
7. Restriktionsschnittstellen der resultierenden Sequenz.
8. Resultierende Sequenz (in grün, 5'→3').
9. Resultierende Aminosäure-Sequenz. Der reading frame entspricht dem der Template-Sequenz.

Primersequenzen

Nur die beiden Primersequenzen (2. & 6. Zeile) können markiert und bearbeitet werden, wobei der „Überschreiben“-Modus fest eingestellt ist. Nukleotide können mit Hilfe der Leertaste gelöscht werden. Ein Druck auf die „Punkt“-Taste kopiert das jeweilige Nukleotid aus der Template-Sequenz.

Nukleotide, die der Template-Sequenz entsprechen, werden blau dargestellt, „Mismatches“ rot.

Ist ein „leerer“ Bereich der Primer-Sequenz ausgewählt, kann über das Kontext-Menü **AUSWAHL ALS**

NEUEN PRIMER der entsprechende Bereich der Template-DNS als neuer Primer hinzugefügt werden.

Eingeben einer Nucleotidsequenz in einen leeren Bereich der Primer-Sequenz erzeugt *keinen* neuen Primer.

Resultierende Sequenzen

Resultierende DNS- und Aminosäure-Sequenzen können über das Kontext-Menü in die Zwischenablage kopiert oder als neue DNS-/Aminosäure-Sequenz erzeugt werden. Beim Kopieren bleibt *nur* die Sequenz erhalten, Features und Restriktionsenzyme gehen verloren.

2. Dialog „Primer bearbeiten“

Dieser Dialog wird aufgerufen, indem ein Primer aus der →Primer-Liste markiert wird, und dann der Dialog über **BEARBEITEN** gestartet wird. Er dient der computergestützten Optimierung von Primern.

Rechts werden in einem Textfeld detaillierte Information zum aktuellen Primer dargestellt. Dies entspricht der Anzeige der Primer-Liste.

Links finden sich mehrere Grenzwerte, innerhalb derer automatisch Primer-Variationen erzeugt, untersucht und bewertet werden. Einstellbar sind:

- Die Variation des 5'-Endes des Primers nach links bzw. rechts. (1)
- Die Variation des 3'-Endes des Primers nach links bzw. rechts. (2)
- Die minimale bzw. maximale Länge des Primers. (3)
- Die minimale bzw. maximale Schmelztemperatur des Primers. (4)

Bei jeder Änderung dieser Werte erfolgt eine sofortige Neuberechnung möglicher Primer unter Berücksichtigung der neuen Grenzwerte. Die berechneten Primer werden intern bewertet, und, nach

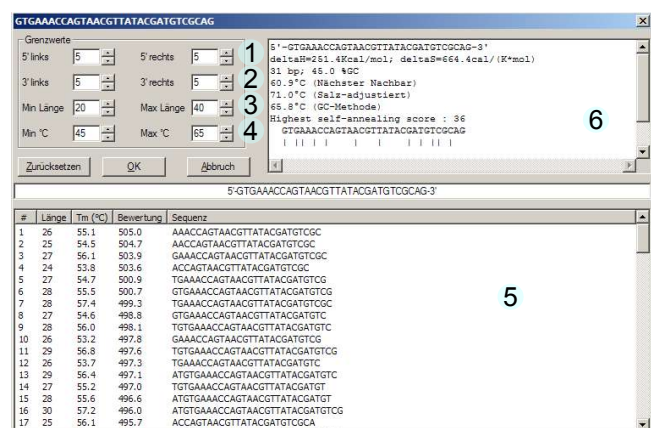


Abbildung IV.2: Dialog "Primer bearbeiten"

absteigender Bewertung sortiert, zusammen mit einigen Eckdaten in einer Liste in der unteren Hälfte des Dialogs (5) angezeigt. Ein Doppelklick auf einen dieser Einträge legt die ausgewählte Variante als neuen Primer fest; dieser wird dann in der mittleren Zeile des Dialogs angezeigt, und das Textfeld (6) zeigt detaillierte Daten des neuen Primers an.

Mit ZURÜCKSETZEN wird der ursprünglich in der Primer-Liste ausgewählte Primer wieder hergestellt.

Mit OK wird der aktuelle Primer in das PCR-Modul übernommen. Er ersetzt dabei den ursprünglich in der Primer-Liste ausgewählten Primer.

ABBRUCH kehrt zum PCR-Modul zurück, ohne dieses zu ändern. Änderungen aus dem Dialog werden dabei verworfen.

3. Dialog „Stille Mutation“

Dieser Dialog wird aufgerufen, indem ein Primer (oder ein Teil eines Primers) in der Sequenz markiert wird. Der Dialog wird dann über das Kontext-Menü STILLE MUTATION aufgerufen.

Der Dialog hilft bei der Suche nach *stillen Mutationen*. Das sind Mutationen, welche eine neue Restriktionsschnittstelle einführen, die resultierende Aminosäuresequenz jedoch nicht verändern. Stille Mutationen sind hilfreich, um den Erfolg einer PCR zu überprüfen. Dabei wird die während der PCR erzeugte DNS mit dem gewählten Restriktionsenzym geschnitten. Die Anzahl bzw. Länge der resultierenden DNS-Fragmente zeigt, ob durch die PCR eine neue Restriktionsschnittstelle erzeugt wurde, was den Erfolg der PCR nachweist.

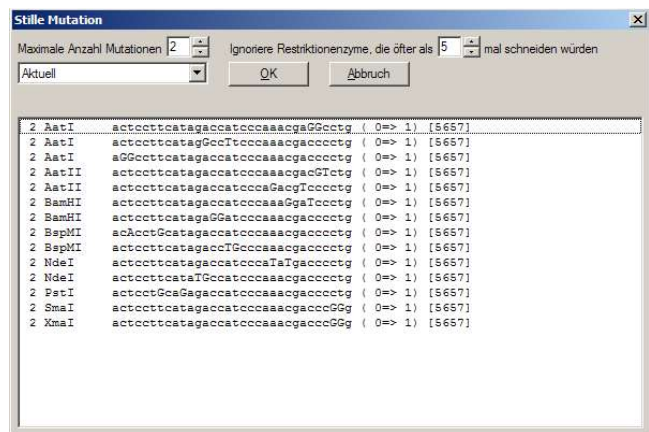


Abbildung IV.3: Dialog "Stille Mutation"

Die Suche nach stillen Mutationen kann im Dialog wie folgt begrenzt werden:

- *Maximale Anzahl Mutationen.* Da Primer möglichst gut zu ihrer Zielsequenz passen sollen, ist die Zahl der eingeführten Mutationen möglichst gering zu halten.
- *Ignoriere Restriktionsenzyme, die öfter als X mal schneiden würden.* Wird der gesamte Vektor von einem Restriktionsenzym in viele Fragmente zerschnitten, ist eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle nur schwer oder gar nicht zu erkennen.
- Die Gruppe der Enzyme, für die stille Mutationen gesucht werden, kann bestimmt werden. Alle Enzyme zu durchsuchen kann auf langsamen Computern lange dauern, und bringt viele „gute“ Resultate, die in der Praxis oft am Fehlen der Enzyme scheitern. Daher ist beim Start des Dialogs die Gruppe der aktuellen Enzyme ausgewählt.

Wird eine dieser Einstellungen verändert, werden alle passenden stillen Mutationen sofort neu berechnet. Die Liste der stillen Mutationen zeigt in jeder Zeile

- die Anzahl der nötigen Mutationen zur Einführung dieser Schnittstelle,
- den Namen des Restriktionsenzyms,
- die mutierte Sequenz, wobei die originalen Nukleotide als Kleinbuchstaben und die Mutationen als Großbuchstaben dargestellt werden,
- die Anzahl der Schnittstellen dieses Enzyms, vor und nach den Mutationen, in der Form „vorher => nachher“, sowie
- die (bei erfolgreicher PCR) entstehenden DNS-Fragmente (in eckigen Klammern).

Ein Doppelklick auf eine der Zeilen (bzw. die Auswahl einer Zeile und das Betätigen von OK) übernehmen die Mutation(en) der ausgewählten Zeile; ausserdem wird das ausgewählte Restriktionsenzym, sofern nötig, zur Anzeige der PCR hinzugefügt.

V. Sequenzierung

Das Sequenzierungs-Modul kann Sequenzierungs-Dateien im ABI-Format lesen, darstellen und bietet die Möglichkeit, diese zu bearbeiten. Es werden Informationen über die Sequenzierung angezeigt (1).

1. Darstellung

Folgende Darstellung-Optionen (2) für die Sequenz (3) werden angeboten:

- **HILFSLINIEN** sind graue, senkrechte Linien, die erkannte Nukleotide mit den Peaks der Grafik zu verbinden suchen.
- **INVERS & KOMPLEMENTÄR** kann einen sequenzierten 3'→5'-Strang in die entsprechende 5'→3'-Sequenz umwandeln. Dadurch kann das Alignment mit der „erwarteten“ Sequenz aligned werden.
- **HÖHENSKALIERUNG** gibt an, wie viele Textzeilen für die Darstellung der Grafik genutzt werden sollen.
- **BREITENSKALIERUNG** gibt an, wie dicht die einzelnen Peaks aufeinander folgen sollen.
- **ZOOM** vergrößert die Darstellung, damit auch kleinere Peaks gesehen werden können.
- Ein Textfenster zeigt Details der Sequenzierung an.



Abbildung V.1: Das Sequenzierungs-Modul

2. Bearbeitung

Im Editiermodus können Nukleotide ersetzt werden; ein Einfügen oder Entfernen von Nukleotiden ist *nicht* möglich. Beim Speichern der Sequenzierung wird nur die Sequenz gespeichert, die Grafik geht verloren.

3. Toolbar

Funktionen der Toolbar (4):

- Neue Sequenz manuell eingeben (→[IX.5](#)).
- Dateien öffnen (→[IX.3](#)).
- Sequenz speichern. Sequenzierungs-Dateien werden nur als Sequenz in der Datenbank gespeichert; die Daten (Peaks) werden *nicht* mit gespeichert (→[IX.3](#)).
- Markierung bzw. komplette Sequenz als Text in die Zwischenablage kopieren.

VI. Alignments

Das Alignment-Modul ermöglicht die Berechnung und Darstellung von DNS- und Aminosäure-Sequenz-Alignments.

1. Starten des Alignment-Moduls

Das Modul kann über das Menü WERKZEUGE/ALIGNMENT oder das Tastenkürzel **Strg-G** aufgerufen werden.

Beim Start des Moduls erscheint der Einstellungs-Dialog, der auch später über den entsprechenden Button aufgerufen werden kann. Beim Import eines Alignments aus einer Datei (über DATEI/IMPORTIEREN) wird dieser Dialog nicht aufgerufen, da bereits ein Alignment vorliegt, das nur noch dargestellt werden muss.

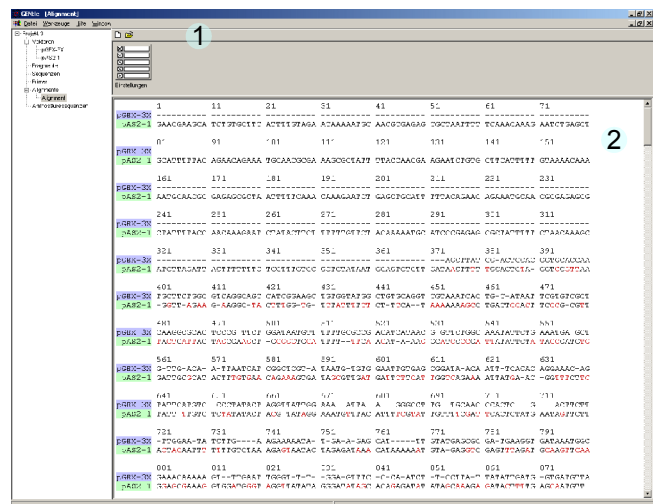


Abbildung VI.1: Das Alignment-Modul

2. Dialog „Einstellungen“

Der Einstellungs-Dialog wird entweder automatisch oder über den entsprechenden Button aufgerufen. Hier können die zu alignenden Sequenzen und deren initiale Reihenfolge, sowie der zu verwendende Alignment-Algorithmus und dessen Parameter festgelegt werden. Als Algorithmen stehen zur Verfügung:

1. **Clustal-W.** Dieser Algorithmus ist standardmäßig ausgewählt und benutzt ein externes Programm zur Berechnung. Clustal-W erzeugt *globale Alignments* (Sequenzen, die etwa gleich lang sind) von hoher Qualität.
2. **Smith-Waterman.** Ein interner Algorithmus für *lokale Alignments* (mehrere kurze Sequenzen werden gegen eine längere aligned). Dabei ist die erste Sequenz die lange „Master“-Sequenz, gegen die alle anderen Sequenzen aligned werden. Der Algorithmus ist schneller als Clustal-W, eignet sich aber nur für einfache Alignments, insbesondere zur Überprüfung von Sequenzierungen.
3. **Needleman-Wunsch.** Ein interner Algorithmus für globale Alignments. Der Algorithmus ist schneller, aber qualitativ schlechter als Clustal-W. Wie bei Smith-Waterman werden alle Sequenzen gegen die erste Sequenz aligned, *nicht* untereinander. Der Algorithmus eignet sich zum schnellen Vergleich mehrerer, (sehr) ähnlicher Sequenzen.

Achtung: Das Beenden des Dialogs mit OK führt zur Neuberechnung des Alignments. Alle manuell im Alignment vorgenommenen Änderungen (eingefügte Lücken etc.) gehen dabei verloren!

3. Das Alignment-Modul

Toolbar (1)



Neue Sequenz manuell eingeben (→[IX.5](#)).



Dateien öffnen (→[IX.3](#)).



Alignment speichern (→[IX.3](#)).

HORIZONTAL

Zeigt das Alignment als eine lange Zeile an. Das kann die Übersichtlichkeit beim Alignment vieler Sequenzen erhöhen.

MITTLERE MAUSTASTE

Aktion beim Betätigen der mittleren Maustaste. Alle Aktionen können auch in der Sequenz über das Kontext-Menü ausgewählt werden.

EINSTELLUNGEN

Öffnet den Einstellungs-Dialog.

Menü „Ansicht“

- FETT Stellt alle Zeichen fett dar.
- MONO Monochrom-Darstellung (keine Farben).
- KONSERVIERT Stellt einen Punkt '.' dar, falls die Base/Aminosäure der in der 1. Sequenz entspricht.
- NORMAL Standard-Darstellung
- INVERTIERT Weiße Schrift auf farbigem Hintergrund (Ausnahme: Lücken)
- STÄRKE DES ALIGNMENTS [nicht implementiert]
- STÄRKE DES ALIGNMENTS (INVERTIERT) [nicht implementiert]
- ÄHNLICHKEIT [nicht implementiert]
- FREQUENZ [nicht implementiert]
- FEATURES [nicht implementiert]
- RNA [nicht implementiert]
- IDENTITÄT Markiert gleiche/ähnliche Basen/Aminosäuren in einer zusätzlichen „Sequenz“.

Sequenzdarstellung (2)

Die Sequenzdarstellung des Alignments kann über das Kontextmenü angepasst werden. Dabei wird das Alignment *nicht* neu berechnet, lediglich die Darstellung wird verändert.

- Zeilen können umgeordnet werden.
- Features der Sequenz können angezeigt bzw. ausgeblendet werden. Standardmäßig werden die Features der ersten Sequenz angezeigt, die der anderen Sequenzen werden ausgeblendet.
- Lücken können eingefügt bzw. entfernt werden (in einer Zeile bzw. in allen anderen).

Ein Doppelklick auf eine Base/Aminosäure (*nicht* auf eine Lücke) öffnet das entsprechende Fenster und markiert die Stelle dort. Das kann z.B. bei der Überprüfung von Sequenzierungen hilfreich sein.

Sequenzen können in der Alignment-Darstellung *nicht* direkt bearbeitet werden. Dazu müssen die Originalsequenz bearbeitet und ein neues Alignment errechnet werden.

VII. Rechner

Das Rechner-Modul kann über das Menü `WERKZEUGE/RECHNER` aufgerufen werden. Es umfasst mehrere spezialisierte Rechner für typische molekularbiologische Aufgaben. Dabei werden generell vom Benutzer einzugebende Werte blau unterlegt, sowie die Ergebnisse der Berechnung in roter Schrift dargestellt.

1. Rechner „Ligation“

Dieser Rechner ermittelt die zu pipettierenden Mengen von Insert und Vektor für eine Ligation. Einzugeben sind die Länge von Insert bzw. Vektor, deren jeweils vorliegende Konzentration, sowie das gewünschte Verhältnis von Insert zu Vektor (typischerweise 4:1 oder 5:1).

Ebenfalls anzugeben ist die gewünschte Gesamtmasse der ligierten Moleküle. Ist keine bestimmte Gesamtmasse erforderlich, kann über diesen Wert auch das Ergebnis dahingehend beeinflusst werden, dass „pipettierbare“ Mengen entstehen (z.B. 2µl statt 0.34µl).

2. Rechner „DNS-Konzentration“

Aus Photometerwerten der Absorption einer DNS-Lösung bei 260 bzw. 280 nm können Reinheit und Menge der DNS errechnet werden. Wurde eine verdünnte DNS-Lösung gemessen, kann über die Angabe der Verdünnung die DNS-Menge der Stammlösung errechnet werden; für unverdünnte DNS-Lösung ist ein Verhältnis 1:1 (Eingabe „1“) zu verwenden.

Bei der Messung von einzelsträngiger DNS/RNA bzw. Oligonukleotiden ist der entsprechende Korrekturfaktor einzugeben.

VIII. Bildbetrachter

Das Bildbetrachter-Modul kann über das Menü `WERKZEUGE/BILDBETRACHTER` aufgerufen werden. Es dient zur Darstellung von digitalen Bildern, vornehmlich Gel-Bildern. Unterstützt wird momentan das IMG-Format von BioRad.

Über den Button in der linken oberen Ecke des Moduls kann das Verzeichnis gewechselt werden. Alle Dateien des Verzeichnisses werden in der Liste unter dem Button angezeigt. Das Auswählen einer Datei (*einfacher Klick!*) zeigt das entsprechende Bild an. Über das Kontext-Menü (*im Bild klicken*) kann das Bild in die Zwischenablage kopiert, als .BMP-Datei gespeichert oder ausgedruckt werden.

Bekannte Fehler:

- Möglicherweise wirkt das Bild bei der Darstellung gerastert. Auf einem Ausdruck erscheint es aber trotzdem normal.
- Wurde das Bild in der BioRad-IMG-Datei mit Beschriftungen versehen, werden diese möglicherweise leicht versetzt angezeigt.
- Wird die Bilddarstellung von einem anderen Fenster überlagert, verschwindet die Darstellung. Erneutes Auswählen der Datei stellt das Bild wieder korrekt dar.

IX. Werkzeuge und Dialoge

1. Ligation

Der Ligrations-Dialog dient zur virtuellen Ligation zweier oder mehrerer DNS-Fragmente. Er kann über das Menü WERKZEUGE/LIGATION oder **Strg-L** erreicht werden.

Die linke Seite des Dialogs zeigt DNS-Sequenzen, die ligiert werden können. Einige davon werden zu Beginn automatisch ausgewählt, die Auswahl kann aber manuell verändert werden.

Die rechte Seite des Dialogs zeigt die Liste aller möglichen Produkte der Ligation dar, basierend auf der Auswahl auf der linken Seite. *Bei vielen möglichen Ligrationsprodukten kann die Neuberechnung länger dauern.* Ausgewählte Ligrationsprodukte werden durch den Button **Ligieren** als neue DNS-Module erzeugt.

Bei der Berechnung möglicher Ligrationsprodukte wird jedes zur Verfügung stehende Fragment höchstens einmal verwendet. Bei circulären Ligrationsprodukten werden zwei Formen („A-B“ und „B-A“) angezeigt, die sich nicht in der Sequenz, jedoch im Layout unterscheiden. Im Zweifelsfall sollten beide erzeugt, verglichen, und dann eines gelöscht werden.



2. Einstellungen

Über das Menü WERKZEUGE/EINSTELLUNGEN können verschiedene Einstellung für das Programm gewählt werden.

- | | |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------|
| • SPRACHE | Momentan werden Englisch und Deutsch unterstützt. |
| • BESSERE ANZEIGE | Abschalten, falls die Anzeige zu langsam ist. |
| • ZEIGE SEQUENZNAME | Titel einer DNS-Sequenz in der Kartendarstellung zeigen. |
| • ZEIGE SEQUENZLÄNGE | Länge einer DNS-Sequenz in der Kartendarstellung zeigen. |
| • LETZTES PROJEKT LADEN | Beim Programmstart das letzte bearbeitete Projekt laden. |
| • METAFIle-FORMAT | Bilder für die Zwischenablage im Metafile-Format. |
| • SPLASHSCREEN | GENTle-Bild beim Programmstart. |
| • AUF NEUE VERSION PRÜFEN | Internet-Abfrage, ob eine neue GENTle-Version verfügbar ist. |
| • INTERNE HILFE | Internes Hilfe-Fenster (sonst: Standard-Web-Browser). |

3. Öffnen/Speichern/Datenbank verwalten

Dieser Dialog kann wie folgt erreicht werden:

- Über  oder  in der Toolbar
- Über **Strg-O** oder **Strg-S**
- Über die Menüs DATEI/ÖFFNEN oder DATEI/SPEICHERN
- Über das Menü WERKZEUGE/DATENBANK VERWALTEN

Verwaltung

Hier werden die Einträge in den Datenbanken angezeigt. Einträge können gesucht, umbenannt, kopiert, verschoben, gelöscht und ggf. gespeichert werden.

Hier können ganze Datenbanken neu erstellt oder existierende hinzugefügt werden. Außerdem können Einträge für Datenbanken (*nicht* die Datenbanken selbst!) entfernt (ENTFERNEN) oder zur Standard-Datenbank erklärt werden (ALS STANDARD).

Datei-Datenbanken (Sqlite) und MySQL-Datenbanken können über die entsprechenden HINZUFÜGEN-Buttons zur Liste der Datenbanken hinzugefügt werden. Bei Datei-Datenbanken wird dabei nur der Dateiname benötigt; MySQL-Datenbanken benötigen mehr Informationen. Datei-Datenbanken sind einfach anzulegen (NEU) und zwecks Transport oder Backup zu duplizieren (kopieren der Datei genügt), werden aber bei großen Datenbeständen oder beim Zugriff über Netzwerk zunehmend langsamer. MySQL-Datenbanken sind komplizierter anzulegen und zu verwalten, bieten aber einen Geschwindigkeitsvorteil. Die lokale Datenbank ist eine Datei-Datenbank. Sie wird beim ersten Programmstart automatisch angelegt und kann nicht entfernt werden.

4. Importieren

Der Importieren-Dialog kann über das Menü DATEI/IMPORTIEREN oder **Strg-I** erreicht werden. Über ihn können Sequenzen aus Dateien in GENTle geladen werden. Standardmäßig prüft GENTle jede der ausgewählten Dateien auf ihr Format (mehrere Dateien können durch das Gedrückthalten von **Strg** ausgewählt werden). Es kann aber auch ein Format vorgegeben werden. Folgende Formate können importiert werden:

- GenBank
- GenBank XML
- Clone
- ABI/AB1 (Sequenzierer-Format)
- FASTA
- Eine Reihe weiterer, einfacher Formate

5. Sequenz eingeben

Der Eingabe-Dialog kann über das Menü DATEI/SEQUENZ EINGEBEN oder über **Strg-N** erreicht werden. Über ihn können Sequenzen manuell eingegeben werden. Es können Titel der Sequenz, Format/Typ, sowie die Sequenz selbst eingegeben werden. An Formaten stehen zur Auswahl:

- DNS
- Aminosäuren
- GenBank
- GenBank-XML
- Primer

Bei den Formaten DNS und Aminosäuren werden nicht-passende Zeichen (z.B. Ziffern) automatisch entfernt. Handelt es sich bei der Sequenz um einen Primer, *muss* als Typ auch Primer angegeben werden (*nicht* DNS).

6. Sequenz-Editor

Im Sequenz-Editor können Eigenschaften der Sequenz, Features, sowie die zu verwendenden Restriktionsenzyme und Proteasen angegeben und bearbeitet werden. Alle Änderungen werden erst durch OK in die Sequenz übernommen.

Eigenschaften

Hier können Sequenzname und -Beschreibung geändert werden. Handelt es sich um eine DNS-Sequenz, können hier auch *sticky ends* angegeben werden.

Features

Hier werden die Features der Sequenz angezeigt. Es können Features hinzugefügt, gelöscht und verändert werden. Änderungen an einem Feature müssen nicht bestätigt werden, es genügt, ein anderes Feature auszuwählen oder OK zu drücken.

Die Einstellung `LESERASTER` ist nur verfügbar, wenn als Typ „Kodierende Sequenz“ ausgewählt wurde. Wenn der Punkt `KODIEREND` angewählt ist, wird dir Sequenz 5'→3' gelesen (Standard), andernfalls 3'→5'. `AUSWAHL LÖSCHEN` bezieht sich nur auf die *Auswahl* eines Features; um ein Feature zu löschen, `FEATURE LÖSCHEN` benutzen.

Über `FEATURE BEARBEITEN` können verschiedene Darstellungs-Varianten des Features gewählt werden:

- `FÜLLFARBE` Die Farbe, mit der das Feature in der Kartendarstellung gezeigt wird.
- `DARSTELLUNG IN SEQUENZ` Die Form des Features in der Sequenzdarstellung.
- `OFFSET BENUTZEN` Aminosäure-Offset in der Sequenzdarstellung.

Restriktionsenzyme

Auf der linken Seite werden alle aktuell in der Sequenz verwendeten Restriktionsenzyme angezeigt. Auf der rechten Seite sind alle definierten Enzym-Gruppen angezeigt. Die Enzyme in der ausgewählten Gruppe werden rechts unten angezeigt. Enzyme können zwischen den Listen über die mittig angeordneten Buttons bewegt werden.

Proteasen

Hier können Proteasen ausgewählt werden, deren Schnittstellen dann in der Sequenz angezeigt werden. Neue Proteasen können zur Liste hinzugefügt werden.

- Beispiel : Thermolysin
 - Sequenz : !DE|AFILMV
 - Erklärung : „nicht D oder E“, „dann Schnitt“, „dann A, F, I, L, M oder V“
- Beispiel : Proline-endopeptidase
 - Sequenz : HKR, P|!P
 - Erklärung : „H, K oder R“, „dann P“, „dann Schnitt“, „dann nicht P“

7. Restriktions-Assistent

Der Restriktions-Assistent kann über das Menü `WERKZEUGE/RESTRIKTIONS-ASSISTENT` oder über die Auswahl einer Restriktionsschnittstelle in der Kartendarstellung einer DNA-Sequenz durch die mittlere Maustaste gestartet werden (→[II.4](#)). Im letzten Fall wird das ausgewählte Enzym automatisch markiert.

Auf der linken Seite des Dialogs werden die verfügbaren Enzyme angezeigt, abhängig von den Einstellungen unter `GRUPPE` und `UNTERAUSWAHL`. Die Liste kann nach Enzym oder Anzahl der Schnitte durch Klicken auf den entsprechenden Titel sortiert werden. Ist ein Enzym ausgewählt, werden die Schnittpositionen und Fragmente unten links angezeigt.

Die rechte Liste zeigt den Restriktions-„Cocktail“. Mit den Enzymen im „Cocktail“ wird später die Restriktion durchgeführt. Die dabei entstehenden Fragmente werden rechts unten angezeigt. Enzyme können durch `ZUM COCKTAIL` hinzugefügt und durch `RESTRIKTIONSENZYM ENTFERNEN` aus dem „Cocktail“ gelöscht werden. Über `FERTIG` gelang man zurück zur Sequenz, wobei der „Cocktail“ gespeichert wird; `ABBRUCH` verläßt den Restriktions-Assistenten und verwirft die vorgenommenen Änderungen.

`STARTE RESTRIKTION` erzeugt die Fragmente als neue DNA-Module, wobei die Originalsequenz erhalten bleibt. `KEINE FRAGMENTE UNTER ___ BASENPAARE ERSTELLEN` limitiert dabei die Fragmente auf eine Mindestgröße; diese Option ist abschaltbar.

8. Projekte

Ein Projekt ist eine Sammlung von Sequenzen, die zusammengehören. Projekte können über DATEI/PROJEKT SPEICHERN bzw. **F12** gespeichert oder über DATEI/PROJEKT LADEN bzw. **F11** geladen werden. Je nach Einstellungen (→[IX.2](#)) wird das zuletzt verwendete Projekt beim Start von GENTle automatisch geöffnet.

Projekte speichern nur die Namen/Datenbanken der Sequenzen des Projekts, *nicht* die Sequenzen selbst. Wird eine der Sequenzen des Projekts verschoben, umbenannt oder gelöscht, wird diese Sequenz beim nächsten Öffnen des Projekts nicht mit geöffnet werden. Ein entsprechender Hinweis wird dabei angezeigt.

9. Drucken

Sequenz- und Kartendarstellungen können über deren Kontext-Menü gedruckt werden. Über das Menü Datei/Bericht drucken kann auch eine Übersichtsseite gedruckt werden, auf der sowohl die Kartendarstellung als auch eine Liste der Features und Daten der Sequenz dargestellt werden. Der Bericht umfasst *nicht* die Sequenz selbst.

10. Sequenzdarstellung

- Die gesamte Sequenz kann mit **Strg-A** oder über das Menü BEARBEITEN/ALLES MARKIEREN ausgewählt werden.
- Mit **Strg-F** oder über das Menü BEARBEITEN/SUCHEN kann innerhalb einer Sequenz gesucht werden.

11. Restriktionsenzym-Editor

Dieser Dialog dient zur Verwaltung von Restriktionsenzymen. Er entspricht dem Restriktionsenzym-Teil des Sequenz-Editors (→[IX.6](#)).

X. FAQ

Frequently asked questions – Häufig gestellte Fragen

Q: Warum will GENTle sich dauernd mit dem Internet verbinden?

A: Eine Internetverbindung muss für BLAST- und Rebase-Suchen vorhanden sein.

Q: Warum kann ich bei einer ausgewählten DNA-Sequenz keine BLAST-Suche für die Aminosäuresequenz durchführen oder Aminosäuren extrahieren?

A: Es muss ein Leseraster ausgewählt sein.