

Gen - Welten Prometheus im Labor?

Laboratorium

Experiment 4
DNA-Fingerprinting

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



Vorbereitung

1) am Vortag o.ä.:

- 1.1 Arbeitsblätter kopieren / bereitlegen.
fertiges (Ergebnis-)Gel überprüfen
Vorratslösungen überprüfen: Elektrophorese-Puffer, Aqua dest., Färbelösung
- 1.2 ggfs. Elektrophoresepuffer neu ansetzen:
TBE-Puffer verdünnen: 2940 ml Aqua dest + 60 ml Puffer
- 1.3 ggfs. Agarosegele gießen:
1,6 g Agarose in 200 ml 1x TBE-Puffer lösen
ergibt 0,8% und eine Geldicke von ca 0,75 cm
Agarosepulver in 500 ml Erlenmeyerkolben geben, 250 ml TBE-Puffer dazugeben, rühren.
Kappe aus Alufolie lose auflegen, in der Mikrowelle schmelzen:
ca. 6 x 30 sec auf Stufe 3 (ausprobieren), zwischendurch rühren.
HANDSCHUHE, SCHUTZBRILLE und KITTEL tragen! Gefahr von SIEDEVERZUG!

2) Gerätschaften bereitstellen:

- Eisbehälter füllen,
Enzymmischung, Restriktionspuffer, DNA-Proben aus Gefrierschrank holen.
je Gruppe: 8 Edding-Stifte oder Folienschreiber,
5 farbige Epps in Styroporständern
Färbeschale, Elektrophoresegerät,
1 Abimed-Pipette mit Pipettierspitzen,
Einmalhandschuhe,
1 Schutzbrille, Kittel? für Laborant zum Agarose-Kochen
Kochplatte, 500 ml Erlenmeyer, Alufolie, Rührstab
1 - 3 Wasserbäder auf **37°** vorheizen.

3) Lösungen / Proben vorbereiten:

- 3.1 je Gruppe: **10** µl des Enzym-Mix in ein klares Epp pipettieren, beschriften
- 3.2 je Gruppe: **15** µl des 10 x Restriktionspuffers in ein klares Epp pipettieren, beschriften
Alles auf Eis stellen bzw. lassen!!, 1 Gefäß / Gruppe austeilen

4) Durchführungshinweise:

- 4.1 Prinzip erklären: Ablauf mit Zeitplanung und Gerätschaften
- 4.2 Pipettieren üben mit Aqua dest.!

Gen - Welten Prometheus im Labor?

Laboratorium

Experiment 4
DNA-Fingerprinting

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



5) Ergänzende Information:

Aus Handbuch von BIO-RAD S.41ff (© 1996 Stanford University):

Weitere dokumentierte Anwendungen des DNA-Fingerprintings; genaue Verweise s.BIO-RAD

5.1 Fleischidentifizierung:

Besteht der Hamburger aus reinem Rindfleisch? Wurde im Sushi Wal- oder Delphinfleisch von geschützten Arten verwendet?

5.2 Aufklärung von Justizirrtümern:

Ein Verurteilter wurde mit Hilfe des Fingerprintings als unschuldig entlassen - nach 10 Jahren Haft, da zur Zeit seiner Verurteilung der Test noch nicht zur Verfügung stand.

Ein Drittel aller Verdächtigen von Sexualdelikten können durch DNA-Fingerprinting entlastet werden.

5.3 Identifizierung historischer Persönlichkeiten:

Die Knochen der letzten Zarenfamilie wurden als solche identifiziert - Die Überführung nach Petersburg steht bevor (1998)

Kaspar Hauser konnte auf Grund von Blutuntersuchungen an seiner Unterhose als badischer Erbprinz ausgeschlossen werden (Wissenschaft live, Deutsches Museum Bonn, 30.3.98)

5.4 Verwandtschaftsnachweise:

Vgl. <http://www.gentestlabs.com/>

Firma Reiliagene, die kommerziell Verwandtschafts- und Vaterschaftsnachweise anbietet

<http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Rechtsmedizin/molgen/forensik.htm>

Juristische Verwendung des Fingerprintings mit weiteren Verweisen

u.v.a.m.

Gen - Welten Prometheus im Labor?

Laboratorium

Experiment 4
DNA-Fingerprinting

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



Theoretischer Hintergrund

DNA-Fingerprinting in der Gerichtsmedizin:

Der Nachweis der Täterschaft kann erbracht werden, indem DNA aus Blutspuren, Sperma, Haarfollikeln o.ä., die am Tatort gefunden wurden und daher vom Täter stammen müssten, mit DNA-Proben von Verdächtigen verglichen wird. Die DNA-Analyse kann auch mit getrocknetem Material (z.B. Blutflecken oder mumifiziertem Gewebe) durchgeführt werden. Wenn die DNA-Menge zu gering ist, so kann sie mit PCR (Polymerase-Chain-Reaction) vermehrt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung bei verschiedenen Personen kann durch die Anzahl der untersuchten VNTRs (s.u.) bis 10^{-11} (= 1 : 100 Milliarden!) oder sogar 10^{-22} gesenkt werden.

RFLP-Analyse (= Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) (Watson et al. 1993, S.490f, S.527ff)

Unterschiede zwischen Personen können darin bestehen, daß Restriktionsschnittstellen verändert sind und daher bei Restriktionsverdauung verschieden lange DNA-Fragmente entstehen oder daß die Anzahl tandemförmig wiederholter DNA-Sequenzen (VNTR = variable-number tandem repeat) zwischen zwei Restriktionsstellen verschieden ist (ca 3 - 20 Wiederholungen).

Für Gen-Datenbanken müssen die VNTR-Loci (11 - 22 Stück) international festgelegt werden. Sie werden per Hybridisierungs-sonden und Southern-Blotting in den Elektrophorese-Banden gesucht und die Ergebnisse in der Datenbank festgehalten. Die VNTRs stammen aus Introns, spielen für die exprimierten Gene (Persönlichkeitsmerkmale) also keine Rolle.

Im Schülerexperiment wird die RFLP-Analyse ohne Southern-Blotting verwendet. Die Schüler müssen dabei Bandenmuster von DNA-Fragmenten vergleichen, die bei der Auftrennung von 5 DNA-Proben auf einem Agarosegel entstehen und per DNA-Färbung mit einem nicht mutagenen Farbstoff sichtbar gemacht werden. Die Proben stammen einmal vom „Tatort“, zum anderen von 4 „Verdächtigen“. (Hier mit Lambda DNA simuliert).

Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme können DNA an spezifischen Schnittstellen aus 4 - 8 Basen, meist Palindromen schneiden.

Hier verwendet: BamHI, Herkunft **Bacillus amylo**liquifaciens, Schnittstelle:



Hind III, Herkunft **Haemophilus influenzae**, Schnittstelle:



Gelelektrophorese

Gelelektrophorese trennt Gemische aus geladenen, hochmolekularen Stoffen in einem elektrischen Feld nach ihrer relativen Größe auf. Kleine Moleküle wandern schneller als große.

Polyacrylamid-Gele für DNA-Fragmente bis 1000BP = 1kilobase (kb) (ca. 0,34µm)

Hier: Agarose-Gel: Trennung von DNA Fragmenten im Bereich von 150 - 20.000 BP

Agarose ist die Reinform eines linearen Polysaccharides aus alternierenden D-Galactose- und 3,6-Anhydro-L-Galactose-Einheiten, wird aus Agar isoliert, der wiederum aus Algen gewonnen wird.;

An einem Ende der Gelschicht sind kleine, rechteckige Taschen. Diese werden durch Zähne eines Kamms geformt, der vor dem Gießen des Gels angebracht wird. Nach dem Erstarren des Gels wird Puffer in die Elektrophoresekammer eingefüllt und das Gel mit Puffer überschichtet. Der Puffer stellt den Kontakt zwischen den Elektroden auf beiden Seiten des Gels her. Die Ionen in der Lösung leiten den elektrischen Strom. Außerdem bewahrt die Lösung das Gel vor dem Austrocknen.

Vor dem Auftrag werden die DNA-Proben mit einer farbigen Markerlösung gemischt. Der Marker bewirkt, daß sich die DNA auf dem Boden der Taschen sammelt und zeigt die Front der wandernden Stoffproben an: Er wandert schneller durch das Gel als alle DNA-Fragmente, die kleiner als 300 Basenpaare sind. Die Elektrophorese wird gestoppt, sobald der Marker durch das Gel gewandert ist.

Durch Anschließen an eine Gleichspannungsquelle wird ein elektrisches Feld aufgebaut. Phosphatgruppen geben der DNA eine negative Ladung, so daß sie vom Minus- zum Pluspol wandert (von der Kathode zur Anode).

Gen - Welten Prometheus im Labor?

Experiment 4
DNA-Fingerprinting

Laboratorium

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



Sichtbarmachen der DNA-Restriktions-Fragmente

Die DNA-Fragmente sind farblos, also im Gel unsichtbar.

Das Gel wird in eine Färbelösung gebracht, um die DNA zu färben. Die Farbmoleküle heften sich an die DNA-Moleküle im Gel, so daß diese ebenfalls sichtbar werden. Um besseren Kontrast zu erreichen, wird nach dem Färben das Gel mit Wasser entfärbt, so daß die Banden hervortreten. Dann können die Schüler die Muster der geschnittenen DNA-Proben miteinander vergleichen.

Im Wissenschaftsbetrieb wird i.a. Ethidiumbromid verwendet, das mutagen ist.

Für Praktika verwendet man i.a. Methylenblau, das keine Sicherheitsprobleme aufwirft und über Hausabwässer entsorgt werden kann. (IPN 1997)

Zuverlässigkeit des DNA-Nachweises

Die Zuverlässigkeit hängt von der Auswahl und der Anzahl der verwendeten VNTRs ab. Diese Daten werden zur Zeit (1998) international für gerichtsverwertbare Datenbanken genormt. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Häufigkeit einiger VNTRs in verschiedenen Populationen unterschiedlich sind und damit auch die Wahrscheinlichkeit von Übereinstimmungen bei verschiedenen Personen.

Die größten juristischen Bedenken betreffen Verunreinigungen - am Tatort oder im Labor

Weitere Anwendungsgebiete des DNA-Fingerprinting:

Familienzusammenführung: In Argentinien suchen Großeltern, deren Kinder durch die Militärdiktatur verschleppt wurden, ihre Enkel mit Hilfe einer Gen-Datenbank (Nature 327 (1987), S.552-553, zitiert nach DIFF 1991)

Literatur:

Watson, J.D. et al: Rekombinierte DNA. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg 1993²

Herder-Lexikon der Biologie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg 1994 (Taschenbuchausgabe)

Hafner, L.; Hoff, P.: Genetik. Schroedel Verlag. Hannover 1995^{3?}

Stryer, L.: Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg 1996⁴

DIFF: Molekularbiologie. Aufbaublok IV: Gentechnik. Tübingen 1991

IPN/EIBE: Lambda-Kit. Kiel 1997 (vgl. Internet - Adresse)

Ergänzende Internet - Adressen:

<http://www.gentestlabs.com/>

Firma Reliagenes Technology Inc., die Vaterschaftsgutachten, gerichtsmedizinische Gutachten u.a. anbietet.

<http://www.yahoo.com/Science/Biology/Genetics/>

Die „Genetics-Site“ der bekannten Suchmaschine

<http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Rechtsmedizin/molgen/forensik.htm>

Informationen und Literaturverweise zur forensischen Verwendung des DNA-Fingerprinting

<http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Rechtsmedizin/info/links.htm#Deutsch>

Tabelle mit weltweiten Links zur Forensik

<http://eibe.reading.ac.uk:8001>

Etliche ausgearbeitete Unterrichtseinheiten, z.T. mit Experimentiervorschlägen zur Biotechnologie.

z.Z. meist auf Englisch; z.T. französisch, spanisch, dänisch; Übersetzung in Arbeit (IPN-Projekt)

Direkte Bestellmöglichkeiten für Restriktionsanalyse („Lambda-Kit“), ELISA-Test u.a.

Gen - Welten Prometheus im Labor?

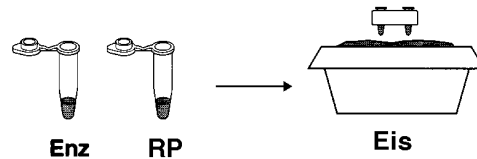
Experiment 4 DNA-Fingerprinting

Laboratorium

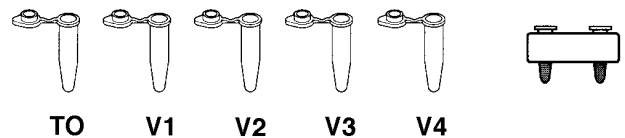
Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



1. Eppendorf-Gefäße („Epps“)
„ENZ“ (Enzymmischung Bam HI, Hind III) und
„RP“ (Restriktionspuffer)
aus dem Gefrierschrank auf Eis stellen



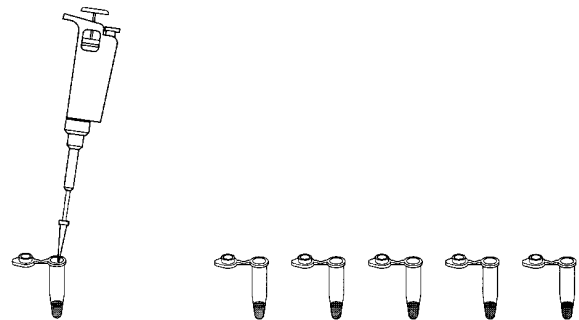
2. Farbige Epps beschriften:
mit Ihrem Namen und Datum sowie
grün: TO = Tatort
blau: V1 = Verdächtige(r) 1
orange: V2 = Verdächtige(r) 2
violett: V3 = Verdächtige(r) 3
rot: V4 = Verdächtige(r) 4



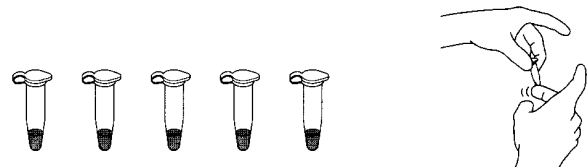
3. Pipettieren der DNA -Proben in die 5 Epps:
8 µl jeweils;
4. Dazupipettieren des Restriktionspuffers:
1 µl jeweils;
5. Dazupipettieren der Restriktionsenzyme:
1 µl jeweils;

Für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze verwenden!!

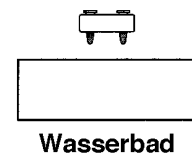
Gebrauchte Spitzen in ein Becherglas geben.
Achten Sie darauf, daß jede Probe auf den Boden
des Gefäßes gelangt!!



6. Epps verschließen und Lösungen mischen:
Schnipsen Sie leicht gegen die Gefäße (s.Bild)



7. Epps im Wasserbad inkubieren „Verdau“:
bei 37° für 45 min
dann aus dem Wasserbad nehmen und kalt stel-
len bis zur Weiterbearbeitung.



Gen - Welten Prometheus im Labor?

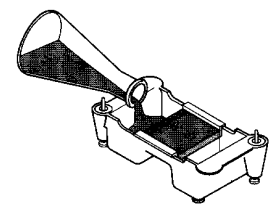
Laboratorium

Experiment 4 DNA-Fingerprinting

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998

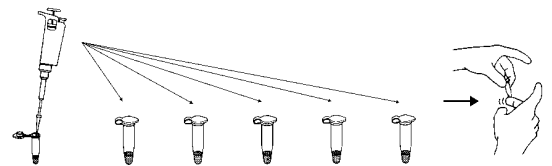


8. Agarose zubereiten:
1,6 g Agarose-Pulver und 200 ml TBE-Puffer (0,8%)
in einen Erlenmeyerkolben geben, Alukappe lose auflegen.
Vorsichtig aufkochen, dabei rühren.
Auf 60° ca. abkühlen lassen;
9. Gel gießen:
Gelschale mit Metallkeilen verschließen,
Kamm einlegen (nächst der Kathode „-“, schwarz), Agarose ca.
0,7 cm dick eingießen.
Stehen lassen, bis das Gel fest ist (wird trüb)
Kamm **vorsichtig** herausziehen

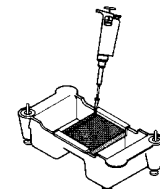


10. Elektrophoresekammer füllen:
TBE - Puffer aus Vorratsbehälter, bis das Gel gerade bedeckt ist

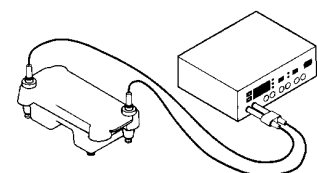
11. Dazupipettieren des Farbmarkers:
2 µl jeweils;
Für jede Probe eine neue Pipettierspitze verwenden!
Durch Fingerschnipsen gut mischen!



12. Gel beladen:
10 µl von jeder der 5 Proben in eine Geltasche + HindIII DNA-Marker
- | Spur 1 | Spur 2 | Spur 3 | Spur 4 | Spur 5 | Spur 6 |
|----------------|---------|---------|-----------|------------|--------|
| HindIII-Marker | TO grün | V1 blau | V2 orange | V3 violett | V4 rot |



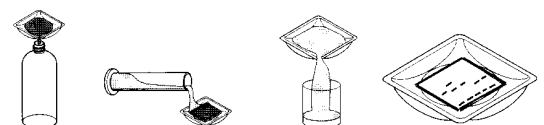
13. Elektrophorese laufen lassen:
Deckel auflegen (nach Farben); Spannung auf 120 V einstellen;
starten (Knopf mit Läufer)
Dauer ca. 30 min;
Abschalten, wenn Farbmarker am Ende des Gels angekommen!



14. Färben:
Handschuhe anziehen
Gel **vorsichtig** mit dem Daumen aus der Schale in die Färbeschale drücken. (**Achtung: rutscht leicht weg!!**)
Dauer ca. 1 Tag - u.U. am Nachmittag schon abgeschlossen



15. Entfärben (wird von den Laboranten durchgeführt)
16. Auswerten: „**Wer war der Täter?**“



ergänzende Internet - Adressen:

<http://raven.umnh.utah.edu>; <http://eibe.reading.ac.uk:8001>

Gen - Welten Prometheus im Labor?

Laboratorium

Experiment 4
DNA-Fingerprinting

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998

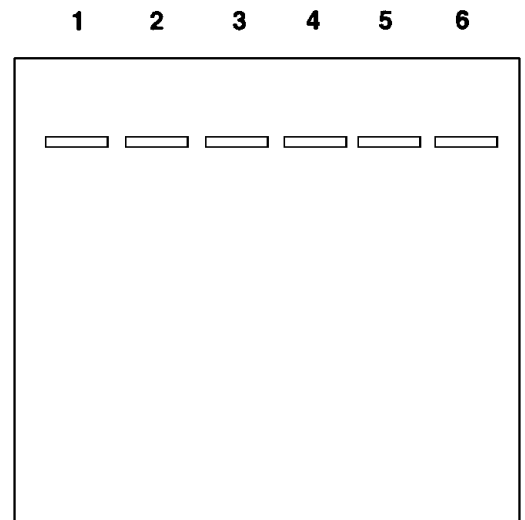


Ergebnisprotokoll:

1) Bemerkungen / besondere Vorkommnisse:

2) Gelabdruck und Analyse

Ban- de	HindIII- Marker		Tatort		V1		V2		V3		V4	
	Lauf- weite (mm)	Größe (BP)	Lauf- weite (mm)	Größe (BP)	Lauf- weite (mm)	Größe (BP)	Lauf- weite (mm)	Größe (BP)	Lauf- weite (mm)	Größe (BP)	Lauf- weite (mm)	Größe (BP)
1		23130										
2		9426										
3		6557										
4		4361										
5		2322										
6		2027										



3) Fragen zum qualitativen Ergebnis:

- 3.1 In jede Tasche wurde 1 DNA-Probe gegeben. Zu sehen sind in jeder Spur mehrere DNA-Banden. Woher stammen sie?
- 3.2 Wie viele Schnittstellen für die verwendeten zwei Restriktionsenzyme hatten die verschiedenen DNA-Proben?
- 3.3 Welche der Proben können von derselben DNA-Quelle stammen?

4) Fragen zur quantitativen Auswertung:

- 4.1 Messen Sie die Laufweiten:
Gelzugewandte Kante der Tasche bis Mitte einer Bande.
- 4.2 Tragen Sie die Werte in ein lineares und ein halblogarithmisches Diagramm ein!
(x-Achse: Laufweite in mm ; y-Achse: Fragmentgröße in BP)
- 4.3 Sie erhalten aus den gegebenen Werten und den Laufweiten des „Standards“ Standardkurven.
In welchem Diagramm kann man Zwischenwerte besser abschätzen?
Tun Sie dies!

Muster

