

# GeneProfile™

**Der Genetische Fingerabdruck:  
Verwandtschaftsnachweis mit PCR**

Experimentierkit für den Biologieunterricht  
in der Oberstufe an Gymnasien

## **Lehrerhandbuch**

Entwickelt in Zusammenarbeit mit dem

Oberschulamt Karlsruhe

und dem

Zentrum für Molekulare Biologie  
der Universität Heidelberg



**Oberschulamt  
Karlsruhe**

**ROLF LUTZ  
BIOTEACH**  
TEACHING SCIENCE-LIVE

Impressum:

---

GeneProfile™: Dr.Rolf Lutz, bioteach

Texte, Glossar: Hans Stobinsky, Dr. Rolf Lutz

Grafik, Layout: Rolf Büchsenstein

Text, Layout und Grafiken sind urheberrechtlich geschützt.

Jede kommerzielle Verwendung ist untersagt. Die Verwendung der Experimentier-  
vorschriften oder Grafiken in anderen Publikationen erfordert die Zustimmung des  
Vertreibers.

Der Einsatz zu Unterrichtszwecken in der Schule ist gestattet.

# GeneProfile™

**Der Genetische Fingerabdruck:  
Verwandtschaftsnachweis mit PCR**

Experimentierkit für den Biologieunterricht  
in der Oberstufe an Gymnasien

**Lehrerhandbuch v6.11**

Entwickelt in Zusammenarbeit mit dem

Oberschulamt Karlsruhe

und dem

Zentrum für Molekulare Biologie  
der Universität Heidelberg (ZMBH)

---

Vertrieb:

Dr. Rolf Lutz bioteach, Franz-Holzmann-Str.18, 69214 Eppelheim,

Tel. 06221 - 796906, Mail: info @ bioteach.de

# Inhaltsverzeichnis

---

## 1 Konzeption und Gestaltung der biotech-Experimentierkits

Inhalt der CD ROM zum Kit .....	5
---------------------------------	---

---

## 2 Molekularbiologie des Genetischen Fingerabdrucks

2.1 Allgemeines .....	7
2.2 VNTR als individuelle Kennzeichen .....	9
2.3 Anwendung auf das Experiment .....	9
2.4 Nachweis der genetischen Unterschiede .....	11

---

## 3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction)

3.1 Prinzip der PCR .....	12
3.2 Der Ablauf der PCR .....	12
3.3 Material für die PCR .....	16

---

## 4 Die Gelelektrophorese

4.1 Prinzip der Elektrophorese .....	17
4.2 Anwendung für DNA-Trennungen .....	18
4.3 Trägermaterialien für die Elektrophorese .....	18
4.4 Farbstoffe für die Gel-Elektrophorese von DNA-Proben .....	19

---

## 5 Organisatorische und technische Hinweise

5.1 Zeitkalkulation für das Experiment .....	21
5.2 Tipps zum erfolgreichen Experimentieren .....	22
5.3 Bestandteile des Kits .....	23
Die Reagenzien für die PCR-Reaktion .....	23
Die Reagenzien für die Gelelektrophorese .....	24
Der Gerätesatz .....	25

---

## 6 Experimentieranleitungen

6.1	Durchführung der PCR .....	26
	Vorbereiten der DNA-Proben für den Thermocycler .....	26
	Start der PCR Reaktion im Thermocycler .....	28
6.2	Gelelektrophorese der vervielfältigten DNA .....	29
	Vorbereiten der Gelkammer .....	29
	Vorbereiten der Proben für den Gelauftrag .....	31
	Auftragen der Proben und Start des Gel-Laufes .....	32
6.3	Sichtbarmachung der DNA im Gel .....	34
	Färbung mit ungiftigem DNA-Farbstoff .....	34
6.4	Auswertung des Experiments .....	35
	Ergebniss der Elektrophorese .....	35
	Auflösung der Fragestellung .....	36
6.5	Fehlersuche („Troubleshooting“) .....	37

---

## 7 Anhang

7.1	Chemikalien und Puffer .....	38
7.2	Sicherheitseinstufung von Ethidiumbromid .....	39

---

## 8 Glossar .....

40

---

## 9 Notizen: .....

44

## 1 Konzeption und Gestaltung der bioteach-Experimentierkits

Die Experimentierkits aus der bioteach Serie erlauben es, Experimente aus der modernen Biologie durchzuführen und damit die theoretischen Inhalte der schulischen Ausbildung praktisch zu begleiten.

Die Experimente können mit den aktuellen Lehrplänen der Oberstufe in den Fächern Biologie oder Chemie kombiniert werden und bieten Anknüpfungspunkte zu bereits bekannten Lerninhalten zum Beispiel aus der Genetik oder der Biochemie.

Die Konzeption und Gestaltung der Kits wird vom **Oberschulamts Karlsruhe** und dem **Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH)** im Rahmen einer Kooperation wissenschaftlich-pädagogisch unterstützt.

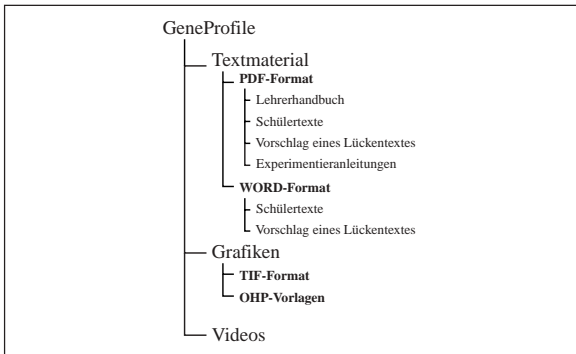
Ein bioteach-Experimentierkit enthält neben den Materialien und Geräten zur Durchführung der Experimente zusätzlich ein ausführliches Begleitheft für die Lehrkraft sowie eine CD ROM mit umfangreichem Zusatzmaterial.

Diese ist gegliedert in einen „**Lehrertext**“ und einen „**Schülertext**“. Die ausführlichere Lehrerversion enthält neben ausführlichen **Hintergrundinformationen** zum Thema auch **Präsentationsvorlagen** und die **Experimentieranleitung** mit den erwarteten Versuchsergebnissen.

Die kompakte Schülerversion dagegen ist auf Übersichtlichkeit und Einfachheit optimiert. Durch die Möglichkeit der Bearbeitung von **Lückentexten** vor dem eigentlichen Experiment können die Schülerinnen und Schüler zum aktiven Durchdenken und zum bewussten Durchführen des Experiments angeregt werden, was die Gefahr des Abarbeitens von Versuchsprotokollen nach „Kochrezeptmanier“ minimiert. Alle Dokumente auf der CD ROM sind im PDF-Format gespeichert und können bei Bedarf ausgedruckt werden.

Zur Veranschaulichung der Experimentieranleitung sind die wichtigsten Abläufe des Experiments zusätzlich in einem **Begleitfilm** dargestellt, der über Computer oder DVD-Player abgespielt werden kann.

Auf der CD im Kit sind zusätzlich Filmsequenzen vorhanden, die in eine Powerpoint-Präsentation eingebaut werden können um die Handgriffe bei der praktischen Durchführung des Experiments zu verdeutlichen.



*Abb. 1 Inhalt der Beigleit-CD zum Experimentierkit.*

## Inhalt der CD ROM zum Kit

### Theoretischer Hintergrund des Experiments

Dieser Teil enthält die Zielsetzung und Strategie des Versuchs, die erwarteten Ergebnisse sowie die Erklärung der verwendeten Methoden. Dieser Teil sollte vor der Versuchsdurchführung mit den Schülern, eventuell vom Praktikumstermin zeitlich getrennt, besprochen werden. Er liefert die Grundlage für die Bearbeitung des Lückentextes.

### Experimentieranleitung

Bei der Konzeption der Experimente wurde Wert auf eine zügige und einfache Durchführbarkeit gelegt. Ebenso wurde der Darstellung grundlegender biologischer Prinzipien Vorrang gegenüber dem Erlernen von Experimentiertechniken eingeräumt.

Deshalb enthält das Kit die Verbrauchsmaterialien und - soweit möglich und sinnvoll - Chemikalien, Enzyme in vorportionierter Form. Dies soll Lehrern und Schülern helfen, den Überblick nicht zu verlieren. Mit den im Kit enthaltenen Verbrauchsmaterialien können sechs oder zwölf Arbeitsplätze (Version S bzw. L) komplett ausgestattet werden, ein Experiment kann also zum Beispiel in sechs Dreiergruppen durchgeführt werden.

Die Arbeitsanleitungen sind bildhaft, mit wenig Text, möglichst realitätsnah gestaltet („Arbeitsplatz auf dem Papier“). Alle Beschriftungen der Gefäße finden sich auch in der Anleitung wieder.

□ -Kästchen erleichtert die Dokumentation der einzelnen Schritte.

Ein Übersichtsschema dient der kompakten Zusammenfassung der theoretischen Erklärung und bietet während des Arbeitens eine ständige Orientierung über den Fortgang des Experiments.

**Arbeitsblätter / Lückentext**

Damit die Schüler vor der Durchführung den Ablauf aktiv durchspielen können, ist die Schülerversion der Anleitung zusätzlich als Lückentext gestaltet. Alle entscheidenden Begriffe (Vorgänge, Substanzen) müssen vom Schüler eingefügt werden.

Die Beschreibung wird parallel zur Anleitung auf dem gleichen Blatt dargestellt. Der Schüler erinnert sich dadurch beim Abarbeiten der Anleitung an die von ihm selbst eingesetzten Begriffe.

**Glossar**

Das Glossar enthält eine Zusammenstellung der wichtigsten Begriffe, die in der Anleitung vorkommenden. Dies erleichtert das Bearbeiten und Verstehen der theoretischen Beschreibung sowie das Ausfüllen des Lückentextes.

Die Entscheidung über den Einsatz der Arbeitsblätter ist der Lehrkraft überlassen.



## 2 Molekularbiologie des Genetischen Fingerabdrucks

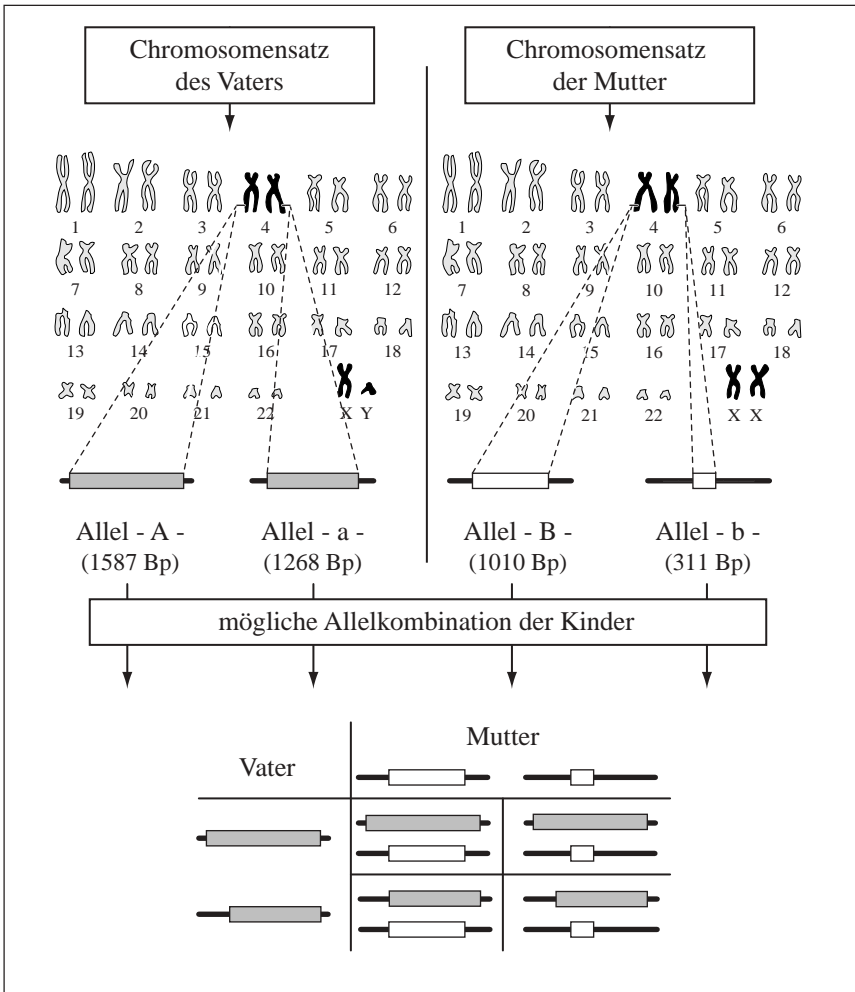
### 2.1 Allgemeines

Die Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen ist sicherlich eine der ältesten biologischen Fragestellungen. Spätestens mit der Entwicklung von Theorien, welche die Entstehung der Artenvielfalt als einen historischen Prozess beschreiben, war klar, dass die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Arten oder Individuen einer Art im Erbgut niedergelegt sein müssen. Eine genaue Analyse wurde aber erst mit den modernen Techniken der Molekularbiologie möglich.

Während man bei den ersten genetisch begründeten Verwandtschaftsuntersuchungen (zum Beispiel durch Chromosomenvergleiche) meist nur Unterschiede zwischen Arten aufdecken konnte, kann mit der Analyse der DNA das einzelne Individuum auf molekularer Ebene charakterisiert werden. In Anlehnung an einen Fingerabdruck, der einen einzelnen Menschen eindeutig wiedererkennen lässt, wurde der Begriff „Genetischer Fingerabdruck“ (engl. fingerprint) geprägt.

Waren die früheren Verwandtschaftsanalysen weitgehend akademischer Natur, so wurde der „Genetische Fingerabdruck“ sehr schnell zu einem Teil unseres alltäglichen Lebens, da er in zunehmendem Maße bei der Aufklärung von Verbrechen (Forensik), aber auch für Vaterschaftsnachweise eingesetzt wird.

An die Stelle des individuellen Verlaufes der Hautleisten und des Stempelkissens, das sich auf Papier übertragen und damit dokumentieren lässt, treten beim „Genetischen Fingerabdruck“ Unterschiede in der DNA, die mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen werden.



**Abb. 2 Vererbungsmuster eines VNTR Polymorphismus.**

Die unterschiedlichen Allele (A, a, B, b) des in diesem Experiment untersuchten VNTR-Polymorphismus liegen an einem Genort auf Chromosom 4 des menschlichen Genoms. Die möglichen Allelkombinationen der Nachkommen sind in der Tabelle dargestellt.

---

## 2.2. VNTR als individuelle Kennzeichen

---

Beim genetischen Fingerabdruck macht man sich die individuelle Unterschiede (Heterogenität) der Genome höherer Eukaryoten zunutze.

In Übertragung eines Begriffes aus der beschreibenden Biologie (Morphologie) spricht man von „Polymorphismen“. In nicht-kodierenden DNA-Abschnitten eukaryotischer Genome, wie zum Beispiel dem des Menschen, findet man häufig mehrfache Wiederholungen von DNA-Sequenzen (repetitive Sequenzen). Es handelt sich um kurze Abfolgen von 2 bis 6 Basenpaaren, die an vielen Genorten (Loci) im Genom vorkommen und deren Anzahl stark variieren kann. Man bezeichnet diese Polymorphismen als „variable number of tandem repeats“ oder kurz VNTR (deutsch: variable Anzahl benachbarter Sequenzwiederholungen).

Die Wiederholungseinheiten können mehrere hundertmal hintereinander vorkommen und über tausende von Loci im Genom verstreut vorliegen. Jedes Individuum besitzt eine charakteristische **Anordnung dieser repetitiven Sequenzen** und eine charakteristische **Anzahl dieser Wiederholungsbereiche**. Jedem Individuum könnte damit eine Art „Nummernschild“ zugeordnet werden.

Da VNTR-Polymorphismen wie (kodierende) Gene vererbt und von Vater und Mutter in nahezu gleichen Teilen auf die Nachkommen weitergegeben werden, können sie auch als genetische Kennzeichnungen (Marker) für die Genomkartierung oder für die Erstellung von Stammbäumen eingesetzt werden.

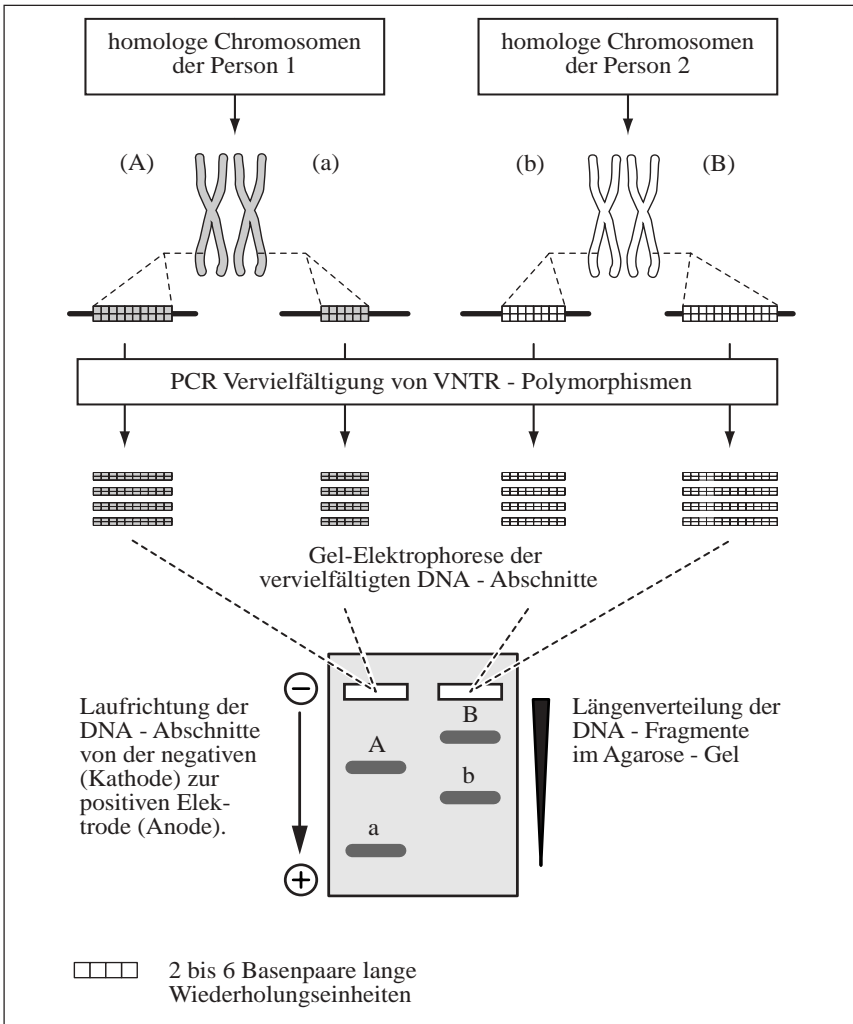
---

## 2.3. Anwendung auf das Experiment

---

Im Experiment wird in vereinfachter Form das Prinzip einer Vaterschaftsuntersuchung durchgeführt (Abb. 3). Das gewählte Beispiel hat folgende Kennzeichen:

- a. Es treten zunächst 4 Polymorphismen unterschiedlicher Länge auf:  
1587 bp, 1268 bp, 1010 bp und 311 bp
- b. Die VNTR-Polymorphismen stellen 4 verschiedene Allele (**A, a, B, b**) für einen Genort dar; es liegt also ein Beispiel für multiple Allelie vor.
- c. Der Genort liegt auf Chromosom Nr. 4.
- d. Untersucht wird ein Elternpaar mit zwei Kindern, wobei die Vaterschaft des Mannes überprüft werden soll.



**Abb. 3 Prinzip der Erstellung des genetischen Fingerabdrucks mithilfe der PCR und Gelelektrophorese.**

Gezeigt sind je zwei Chromosomen zweier Personen, die unterschiedlich lange VNTR-Polymorphismen aufweisen. In diesem Beispiel werden 2 Polymorphismen einer Person analysiert. Zum deren Nachweis muss jeweils ein eigenes Primerpaar eingesetzt werden.

---

## 2.4. Nachweis der genetischen Unterschiede

---

Für die Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks können zwei methodische Strategien verfolgt werden:

### a. Southern Blot

Grundlage für die individuelle Charakterisierung sind kleine Basensequenzunterschiede in bestimmten DNA-Abschnitten, wodurch diese sich in ihrer Länge etwas unterscheiden (RFLP, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus). Zunächst wird die gesamte DNA in kleine Bruchstücke zerschnitten, die danach durch Elektrophorese aufgetrennt werden. Zur Detektion der RFLPs werden markierte DNA-Sonden eingesetzt. Diese Methode wird hier nicht weiter besprochen.

### b. PCR

Zur Charakterisierung einzelner Individuen auf genetischer Ebene dienen VNTR-Polymorphismen, die zunächst in großer Zahl vervielfältigt werden. Damit steht soviel DNA-Material für die Elektrophorese zur Verfügung, dass die verschiedenen Abschnitte auf dem Gel unmittelbar durch Anfärbung sichtbar gemacht werden können.

Das dabei entstehende charakteristische Muster aus DNA-Fragmenten unterschiedlicher Längen bezeichnet man auch als „Genetisches Profil“ und das Verfahren demzufolge als „genetic profiling“.

Je nach Anzahl und Variabilität der untersuchten VNTR-Polymorphismen liegt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen - sofern es sich nicht um eineiige Zwillinge handelt - den gleichen genetischen Fingerabdruck besitzen, bei etwa  $1$  zu  $10^5$  bis  $10^8$ .

Der entscheidende Vorteil des DNA-profilings mittels PCR liegt in der extrem hohen Empfindlichkeit der Methode: während die Nachweisgrenze bei der klassischen Analyse mittels Southern Blot bei etwa  $20 \text{ ng}$  ( $20 \cdot 10^{-9} \text{ g}$ ) DNA liegt, reicht für die PCR-Analyse der DNA-Gehalt einer einzigen Zelle (etwa  $3 \cdot 10^{-12} \text{ g}$ ) aus. Die Methode ist zudem noch schneller und kostengünstiger als der Southern Blot.

### 3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction)

---

#### 3.1 Prinzip der PCR

---

Die PCR stellt ein Verfahren dar, mit dessen Hilfe milliardenfache Kopien einer bestimmten DNA-Sequenz erzeugt werden können. Sie beruht auf der Laboranwendung natürlich vorkommender Enzyme. Mit ihrer Hilfe laufen im Laborgefäß ( „in vitro“) Reaktionen ab, die der DNA-Replikation in der Zelle ( „in vivo“) sehr ähnlich, wenngleich deutlich einfacher sind.

#### 3.2 Der Ablauf der PCR

---

Für den Ablauf der PCR müssen für die einzelnen Reaktionsschritte jeweils bestimmte Zeiten und Temperaturen eingehalten werden. Kernstück des Verfahrens ist eine Reaktionsfolge zur Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes, die ständig wiederholt wird (Amplifikationszyklen).

Zu Beginn einer Anwendung läuft ein prinzipiell ähnlicher Startzyklus ab, in dem aus der gesamten DNA der gesuchte Bereich „herauskopiert“ wird (Vergleich: Der Lehrer kopiert aus einem Buch einen bestimmten Abschnitt heraus und druckt diesen danach als Klassensatz für die Schüler).

In einem Abschlusszyklus werden alle unvollständig synthetisierten DNA-Stränge komplettiert (Der Lehrer ergänzt von Hand unvollständig gedruckte Kopien).

Ein Amplifikationszyklus setzt sich aus drei Schritten zusammen:

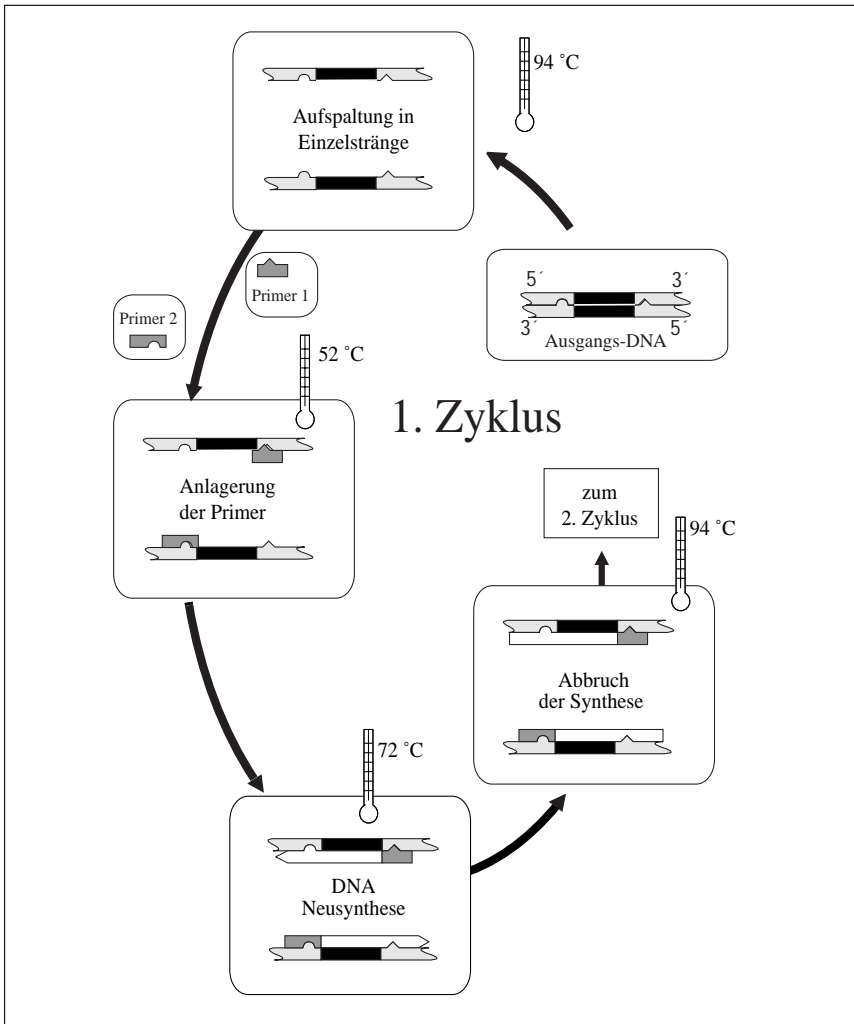
##### **a. Aufspaltung der DNA-Doppelhelix in ihre Einzelstränge (Denaturierung)**

Die doppelsträngig vorliegende DNA („Matrize“) wird durch Erhitzen auf 94°C in ihre Einzelstränge aufgetrennt.

##### **b. Annealing**

Die anschließend eingesetzte DNA-Polymerase benötigt eine Startsequenz aus 15-20 Nukleotiden, den sogenannten Primer, der bereits an dem Matrizenstrang komplementär angelagert sein muss.

Die Notwendigkeit eines Primers wird im PCR-Verfahren intelligent genutzt: Da der eingesetzte Primer nur zu den Basensequenzen am Anfang der gewünschten Abschnitte passt, wird damit auch diese Sequenz gezielt aus der gesamten DNA „herausgesucht“. Diese Basenabfolgen müssen eventuell in Vorversuchen ermittelt wer-

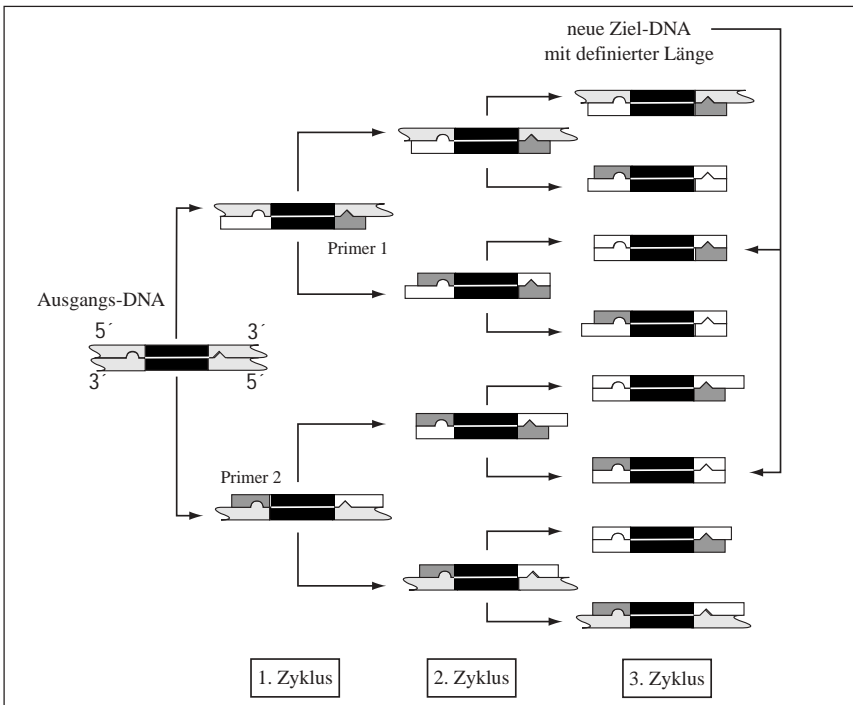


**Abb. 4 Prinzip der DNA-Vermehrung durch die PCR-Reaktion**

Es folgen jeweils drei Schritte aufeinander: 1. Aufspaltung der doppelsträngigen DNA bei  $94^{\circ}\text{C}$ . 2. Anlagerung der Primer (Annealing). Die DNA-Polymerase benötigt zu Anfang der Synthese eine Startsequenz, den Primer. Für seine Anlagerung durch komplementäre Basenpaarung muss die Temperatur auf  $52^{\circ}\text{C}$  erniedrigt werden. 3. DNA-Neusynthese. Durch eine DNA-Polymerase werden bei  $72^{\circ}\text{C}$  die gewünschten DNA-Abschnitte an beiden Teilsträngen neu synthetisiert.

den. Für jeden Abschnitt wird ein Primerpaar für die beiden komplementären Matrizenstränge benötigt.

Die Temperatur muss auf 50-60°C abgesenkt werden, damit die Primer mit ihren Wasserstoffbrücken komplementär koppeln können. Die genaue Temperatur ist von der Primerlänge und ihrem Gehalt an AT- beziehungsweise GC-Basenpaaren abhängig. Es gilt die Faustregel, dass ein AT-Basenpaar mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen 2°C, ein GC-Basenpaar mit drei Wasserstoffbrückenbindungen 4°C zur Stabilität des Primer-Matrizen Hybridstranges beiträgt.



**Abb. 5 Die ersten drei Vermehrungszyklen einer PCR-Reaktion**

Die Gesamtzahl der DNA-Moleküle ( $2^n$ ) steigt exponentiell mit der Anzahl der Vermehrungszyklen.

Man beachte, dass bei der Vervielfältigung von Teilbereichen von DNA-Molekülen (Ziel-DNA) erst beim dritten Syntheszyklus Fragmente der gewünschten Länge entstehen. Die Bildungsrate dieser Fragmente verläuft exponentiell und wird beschrieben durch die Formel  $(2^n - 2n)$  ( $n$ =Anzahl der Vermehrungszyklen). Die DNA-Moleküle mit unerwünschter Länge werden hingegen nur linear amplifiziert ( $2n$ ).



**c. Synthese neuer DNA-Halbstränge** (Elongation)

Unter der Einwirkung einer DNA-Polymerase wird an jedem Matrizenstrang ein neuer, komplementärer Strang synthetisiert, die DNA-Menge also verdoppelt.

Damit nicht nach jeder Denaturierungsphase neue Polymerase zugesetzt werden muss, werden besonders temperaturstabile Enzyme eingesetzt. Solche Enzyme konnten aus Bakterien gewonnen werden, die in heißen Quellen leben, wie zum Beispiel *Thermus aquaticus*. Von seinem Namen leitet sich die Bezeichnung „Taq-Polymerase“ ab.

Die neusynthetisierte DNA besitzt ebenfalls wieder die Bereiche zur Anlagerung der Primer. Für den folgenden Zyklus sind aber nur die Anlagerungsstellen an den 3'-Enden des gewünschten DNA-Abschnittes von Bedeutung, da die Polymerase nur an diesen ihre Synthesearbeit beginnt. (Polymerasen lesen die Matrize in 3' > 5'-Richtung ab und synthetisieren in entgegengesetzter, also in 5' > 3'-Richtung.)

Jeder der drei Schritte läuft bei einer bestimmten Temperatur ab. Dadurch ist es möglich, durch Einstellen der jeweiligen Temperaturen die verschiedenen Reaktionen gezielt „einzuschalten“, ohne das Reaktionsgemisch verändern zu müssen. Früher musste man die Versuchsansätze von Hand in Wasserbäder mit den drei Temperaturen einstellen. Durch den Einsatz von programmierbaren Heizblöcken, sogenannten Thermocyclern, kann die PCR-Reaktion heute automatisiert ablaufen.

Die sich mehrfach wiederholenden Reaktionsfolgen (Zyklen) werden von einer Startphase, in der zunächst die gesamte DNA denaturiert wird und einer Abschlussphase, in der unvollständig synthetisierte DNA-Abschnitte noch fertig gestellt werden, eingeraht. So kann beispielsweise folgendes Temperaturprofil entstehen:

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
<b>Denaturierungszyklus</b> .....	94°C .....	3 min .....	1
<b>Amplifikationszyklen</b> .....			25
Denaturierung .....	94°C .....	30 s	
Annealing .....	52°C .....	30 s	
Elongation .....	72°C .....	60 s	
<b>Abschlusszyklus</b> .....	72°C .....	3 min .....	1

**Abb. 6 Programmeinstellungen des Thermocyclers**

**3.3 Material für die PCR**

---

Um für die Auftrennung durch Gelelektrophorese ausreichende Mengen an DNA zu erhalten, wird die kleine Menge der Probe durch PCR vervielfältigt.

Für die PCR werden benötigt:

**1. DNA-Proben****2. Taq-Polymerase**

Ein Enzym, das nach dem Prinzip der semikonservativen Replikation einen DNA-Halbstrang zu einem DNA- Doppelstrang ergänzt.

**3. Primer**

Kurze DNA-Sequenzen an denen die Polymerase zu arbeiten beginnt (alle Polymerasen lesen die vorhandene DNA in 3' > 5' -Richtung ab, synthetisieren dabei in 5' > 3' -Richtung neue DNA).

**4. DNA-Nukleotide**

als Baumaterial für die Synthese neuer DNA-Stränge.

**5. Puffer-Lösung**

Stellt den für die Polymerase geeigneten pH-Wert ein und enthält die von der Taq Polymerase benötigten  $Mg^{2+}$ -Ionen.

(Die Komponenten 3 bis 5 sind zusammen im „PCR-Mix“ enthalten.)

## 4 Die Gelelektrophorese

### 4.1 Prinzip der Elektrophorese

Die Elektrophorese ist ein Trennverfahren, das darauf beruht, dass sich geladene Teilchen in einem elektrischen Feld bewegen. Daher das Wort: phorein (gr.) = wegtragen; die Teilchen werden im Feld transportiert; vergleiche: Phosphor = „Lichtträger“ oder „Semaphor“: Zeichenträger, Zeichentelegraf.

Die Auftrennung kommt dadurch zustande, dass die Geschwindigkeit, mit der ein Teilchen im elektrischen Feld bewegt wird, proportional zur seiner Ladung ist. Der Trenneffekt wird dadurch verstärkt, dass die Wanderung der Teilchen in einem Trägermaterial abläuft, das ein mehr oder weniger engmaschiges Netzwerk darstellt (Trägermatrix). Seine Porengröße bremst die Geschwindigkeit verschiedener Teilchen unterschiedlich stark. Dabei ist die zurückhaltende Kraft im Prinzip umgekehrt proportional zur Teilchenmasse. Ein Vergleich zwischen der bekannten Chromatografie und der Elektrophorese kann die Zusammenhänge verdeutlichen:

	<b>Chromatografie</b>	<b>Elektrophorese</b>
<b>treibende Kraft</b>	kapillare Bewegung des Laufmittels mittels Löslichkeit im Laufmittel (Ähnlichkeit zur Polarität)	elektrisches Feld, Ladung der Proben- teilchen
<b>zurückhaltende Kraft</b>	zwischenmolekulare Kräfte zwischen Probe und Trägermaterial	Porengröße des Träger- materials, Größe der Probenteilchen
<b>trennend wirkende Eigenschaften der Probenteilchen</b>	Polarität (Löslichkeit beziehungsweise Ad- häsion, Teilchengröße	Ladung und Größe der Teilchen

*Abb. 7 Vergleich von Chromatografie und Elektrophorese*

## **4.2 Anwendung für DNA-Trennungen**

---

Im physiologischen pH-Bereich, der im Trennverfahren durch geeignete Pufferlösungen eingestellt wird, trägt jede Phosphatgruppe eine negative Ladung. Damit ist die Gesamtladung des Moleküls direkt proportional zur Länge der DNA-Kette (konstantes Masse / Ladungsverhältnis).

Auf Grund dieses konstanten Verhältnisses ist die Durchlaufgeschwindigkeit durch die Poren des Trägermaterials umgekehrt proportional zur Teilchenmasse und damit auch zur Zahl der Basenpaare.

## **4.3 Trägermaterialien für die Elektrophorese**

---

Die Elektrophorese wurde in den dreißiger Jahren von Tiselius (schwedischer Biochemiker, 1902-1971) entwickelt, wofür er 1948 den Nobelpreis erhielt. Er arbeitete mit wässrigen Lösungen, die aber bald durch feste Trägermaterialien ersetzt wurden, um Konvektionen und andere unerwünschte Störeffekte zu verhindern.

Ähnlich der Chromatographie setzte man zunächst Papier ein. Damit konnte die vor allem für die Medizin interessant Auftrennung der verschiedenen Proteine im Blutplasma durchgeführt werden. In den fünfziger Jahren kam die Agarose, etwa zehn Jahre später das Polyacrylamid als die heute vorwiegend eingesetzten Materialien hinzu.

### **Agarose**

Agarose ist ein linear gebautes Polysaccharid. In den Ketten folgen abwechselnd D-Galaktopyranose in  $\beta$ -1-3-Verknüpfung und 3,6-Anhydro-L-Galaktopyranose in  $\alpha$ -1-4-Verknüpfung aufeinander. Sie ist ein Bestandteil des für Bakterienkulturen bekannten Agar, der aus den Zellwänden von Rotalgen gewonnen wird.

Agar wird auch zur Herstellung von Geleemassen (zum Beispiel Aspik für Fleischsülzen oder eingelegten Fisch) sowie als Quellmittel für „Schlankheitsdrinks“ verwendet, da es zwar den Magen füllt, aber unverdaulich, und damit kalorienfrei ist.

Das pulverförmige Material wird durch Erhitzen in Wasser in Lösung gebracht. Beim Abkühlen lagern sich die Ketten bereichsweise zu helikalen Strukturen zusammen, zwischen diesen bilden sich Quervernetzungen aus, wodurch ein Gel mit einem molekularen Netzwerk entsteht. Die Dichte dieser Vernetzungen und damit die Größe der Poren dieses Netzes kann durch die Konzentration des Gels gesteuert werden (die Struktur ist mit der eines teilkristallinen Kunststoffes vergleichbar).

Die Porengröße liegt in einem 1%-igen Gel bei 150 nm und wächst bei einem 0,16%-igen Ansatz auf 500 nm an. Agarosegele sind zur Auftrennung großer Moleküle (größer 2000 kDa, entspricht  $2 \cdot 10^6$  u) geeignet und werden daher bei hochmolekularer DNA (größer  $2 \cdot 10^2$  bis  $2 \cdot 10^4$  bp) eingesetzt. Die im Experiment aufgetrennten DNA-Stücke haben eine Länge von weniger als 400 nm (etwa 1200 bp).

In Agarosegelen ist es auch möglich, topologische Isomere, wie superhelikale und lineare DNA voneinander zu unterscheiden.

### **Polyacrylamid**

Polyacrylamid ist ein dreidimensional vernetztes Polymer, das aus Acrylamid durch radikalische Polymerisation bei gleichzeitiger Vernetzung mit N,N'-Methylbisacrylamid („Bis“, ein bifunktionelles Molekül) hergestellt wird. Vom Aufbau ist es also mit einem vernetzten Polyurethan-Kunststoff vergleichbar.

Im Gegensatz zur Agarose, wo der Vernetzungsgrad nur durch die Konzentration beeinflusst werden kann, ist die Menge an zugesetztem Vernetzungspartner (Bis) ein fein dosierbares Steuerungsmittel.

Die Poren des Gels sind kleiner als die von Agarose, es eignet sich für die Trennung von Teilchen zwischen 5 und 2000 kDa. Polyacrylamid-Gele werden daher zur Trennung kleiner DNA-Stücke (10-500 bp) und von Proteinen eingesetzt.

## **4.4. Farbstoffe für die Gel-Elektrophorese von DNA-Proben**

---

Da DNA im sichtbaren Licht keine Absorption zeigt, müssen die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Banden durch Anfärbungen sichtbar gemacht werden. Bewährt haben sich dafür zwei Verbindungen:

### **Ethidiumbromid**

Das positiv geladene Ethidium-Ion besteht aus 4 kondensierten heterozyklischen Ringen und ähnelt damit in seiner Raumstruktur den ebenfalls planar gebauten Ringmolekülen der DNA-Basen.

Diese Ähnlichkeit lässt verstehen, weshalb das Ethidium-Ion sich zwischen zwei Basenpaare eines DNA-Stranges einlagern („interkalieren“) kann. Diese Interkalation kann aber zu Mutationen führen, weshalb dieser Farbstoff nur unter Beachtung entsprechender Sicherheitsvorschriften verwendet werden darf. Der Farbstoff fluo-

resziert im UV-Licht, die DNA-Banden werden somit erst bei Betrachtung unter einer UV-Lampe (250-350nm) sichtbar.

Da die DNA bereits während des Gel-Laufs gefärbt wird, kann der Lauf unterbrochen werden, um zu sehen, ob die DNA-Banden bereits ausreichend aufgetrennt wurden. Die Färbung mit Ethidiumbromid ist etwa 5 bis 10 mal sensitiver als die mit Methylblau. Die DNA bleibt im Gel intakt, kann aus dem Gel wieder isoliert und weiter verarbeitet werden.

### **Methylenblau**

Auch mit dem ungiftigen Farbstoff Methylenblau ist eine Anfärbung möglich, jedoch benötigt sie mehrere Arbeitsschritte, erfordert mehr Zeit und ist weniger empfindlich. Während des Laufes ist die DNA nicht nachweisbar, da die Färbung erst nach Beendigung der Elektrophorese erfolgen kann.

Nach Färbung mit Methylenblau ist die DNA nicht mehr funktionstüchtig.

Zusätzlich werden den Probeansätzen Markierungsfarbstoffe beigemischt, um das Einpipettieren der Proben und den Fortschritt der Elektrophorese optisch verfolgen zu können.

### **Bromphenolblau**

Blau, in der Chemie auch als Indikator eingesetzt (verwandt mit Bromthymolblau).

### **Orange G**

Gelb, auch als Mikroskopierfarbstoff bekannt; zeigt zusammen mit Bromphenolblau die „Front“ der elektrophoretischen Wanderung an.

### **Xylencyanol**

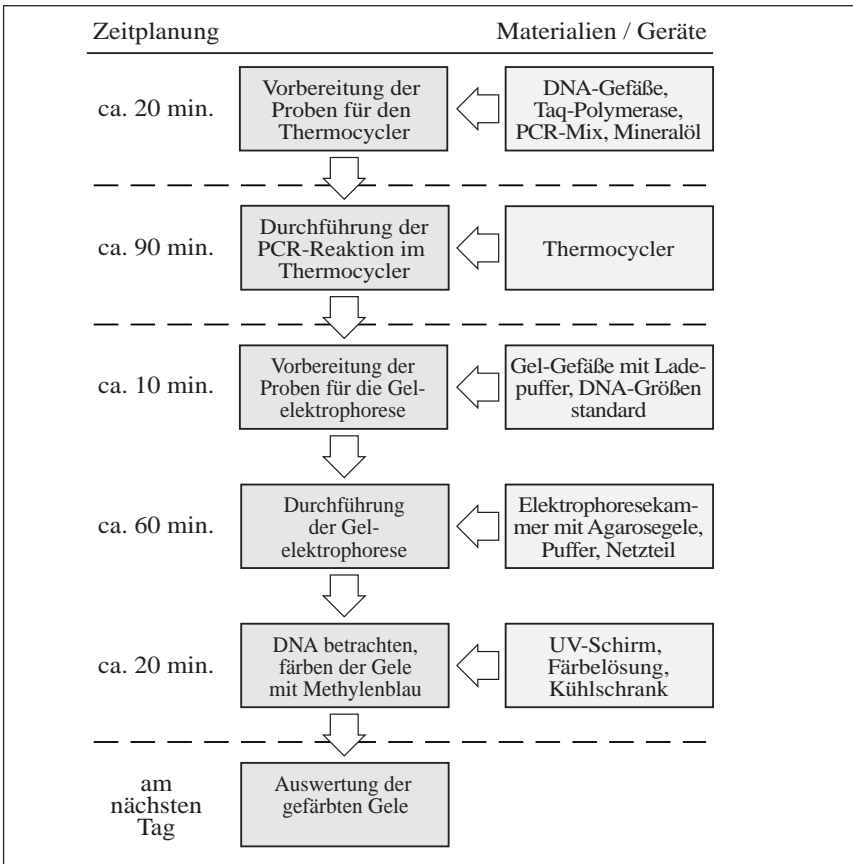
Hellblau, in diesem Experiment eigentlich nicht zwingend erforderlich, aber Bestandteil eines „Standardpuffers“, der auch für andere Kits Verwendung findet.

**5 Organisatorische und technische Hinweise**

**5.1 Zeitkalkulation für das Experiment**

**Bitte beachten Sie:**

Die Zeitangaben können je nach Anzahl der parallel durchgeführten Experimente, der Teilnehmerzahl und der experimentellen Erfahrung der Schüler variieren.



**Abb. 8 Zeit- und Materialplanung für das Experiment**

An den gestrichelten Linien kann das Experiment unterbrochen werden, also nachdem die Proben im Thermocycler stehen, nach der PCR-Reaktion im Thermocycler und nach der Färbung mit Methylenblau.

**5.2 Tipps zum erfolgreichen Experimentieren**

---

1. Machen Sie sich zunächst mit den **Experimentieranleitungen vertraut**.
2. Planen Sie für die Experimente **ausreichend Zeit** ein.  
Rechnen Sie mit Zwischenfällen.
3. Besprechen Sie vorher mit der Gruppe die benötigten theoretischen Grundlagen. Die Teilnehmer sollten bereits die Experimente kennen, um nicht einfach nur „nach Kochbuch“ zu arbeiten.
4. Achten Sie auf **Sauberkeit am Arbeitsplatz** (kein Essen oder Getränke!), es muss jedoch bei keinem Arbeitsschritt steril gearbeitet werden.
5. Dem Kit liegen **Minipipetten** bei, die an Stelle von Mikroliterpipetten eingesetzt werden können und mit denen Sie - in Kombination mit den Pipettenspitzen - alle benötigten Volumina pipettieren können.  
**Üben Sie vor dem eigentlichen Experiment das Pipettieren:**  
1 Röhrchen und 1 Spitze zum Üben vor Versuchsbeginn sind vorhanden.

Für den **Volumenbereich unter 150 µl** benutzen Sie bitte die Minipipette mit den **gelben Pipettenspitzen**. Sie können anhand der Gradierung auf den Spitzen 4 exakte Volumina (10, 50, 100 und 150 µl) und Vielfache hiervon messen (z.B. 20 µl).

Davon abweichende Volumina müssen abgeschätzt werden. Die dadurch auftretenden (minimalen) Pipetierfehler sind jedoch für das Gelingen der Versuche nicht relevant.










### 5.3 Bestandteile des Kits

Mit den im Kit enthaltenen Verbrauchsmaterialien können sechs Arbeitsplätze (Version S) komplett ausgestattet werden. Haben Sie mehr als ein Kit bestellt, erhöht sich die Anzahl entsprechend.

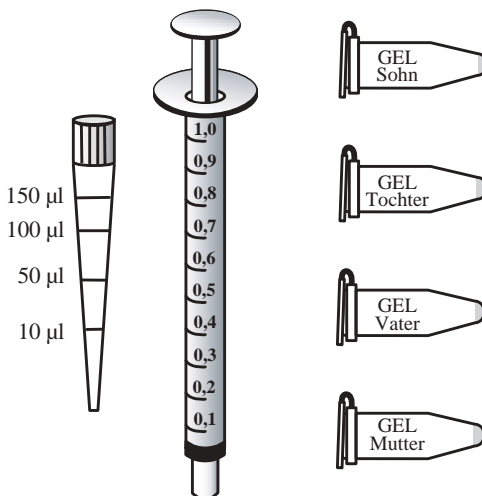
#### Die Reagenzien für die PCR-Reaktion

(Lagerung bei -15 bis -25°C)

- |                                                                                                                                                                                                      |                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 6x DNA-Probe „Sohn“                                                                                                                                                         |    |
| <input type="checkbox"/> 6x DNA-Probe „Tochter“                                                                                                                                                      |    |
| <input type="checkbox"/> 6x DNA-Probe „Vater“                                                                                                                                                        |    |
| <input type="checkbox"/> 6x DNA-Probe „Mutter“                                                                                                                                                       |    |
| <input type="checkbox"/> 6x 4 Reaktionsgefäße mit je<br>1 µl Taq Polymerase                                                                                                                          |    |
| <input type="checkbox"/> 6x Reaktionsgefäße mit PCR-Reagenzien<br>„PCR-Mix“ bestehend aus:<br>1 Primerpaar (je 50 pmol)<br>Desoxyribonukleotide (je 20 µM)<br>Reaktionspuffer für die Taq-Polymerase |   |
| <input type="checkbox"/> 6x Reaktionsgefäße mit 220 µl Mineralöl                                                                                                                                     |  |

Die Reagenzien für die Gelelektrophorese

- 6x 4 Reaktionsgefäße mit je 10  $\mu$ l **Gel-Ladepuffer** (blau), 5 fach konzentriert, Lagerung bei Raumtemperatur. „**GEL-Sohn**“, „**GEL-Tochter**“, „**GEL-Vater**“, „**GEL-Mutter**“.
- 6x Reaktionsgefäß mit 20  $\mu$ l **DNA-Größenstandard**, Lagerung bei -15 bis -25°C.
- 2x **gebrauchsfertiges Gel** mit Ethidiumbromidfärbung , Lagerung im Kühlschrank.
- 1x 60 ml **Elektrophoresepuffer**, 50 fach konzentriert, ausreichend für 3 l Elektrophoresepuffer, Lagerung bei Raumtemperatur.
- 1x 250 ml gebrauchsfertige **DNA-Färbelösung Methylenblau**. Lagerung bei Raumtemperatur.
- 6x **Minipipetten** (1 ml Volumen)
- 6x **Reaktionsgefäße zum Üben** des Umgangs mit den Pipetten
- 4x **Einweghandschuhe**



Bitte überprüfen Sie nach Erhalt die Bestandteile des Kits auf Vollständigkeit und lagern Sie die einzelnen Teile bis zum Praktikumsbeginn nach den angegebenen Bedingungen.

**Besonders bei den Enzymen und den DNA-Proben sollte ein Drei-Sterne-Gefrierfach zur Verfügung stehen.**

Die sachgerechte Lagerung ist besonders dann wichtig, wenn Sie den Reagenzien-Kit bereits besitzen, aber die übrigen Teile aus dem Gerätesatz noch nicht verfügbar sind.

### Der Gerätesatz

- 1x **Thermocycler** (vorprogrammiert) mit 52°C, 72°C und 94°C, Kühlung nach Programmende
- 1x **Netzgerät**
- 2x **Horizontal-Gelkammer** zur Agarosegelelektrophorese
- 1x **UV-Schirm** mit **Schutzabdeckung**

Zusätzlich sollte vorhanden sein:

- 1x **\*\*\*Eisfach** zur Lagerung der Enzyme.  
(Die Styroporbox mit Trockeneis ist nur ausreichend für den Transport!)

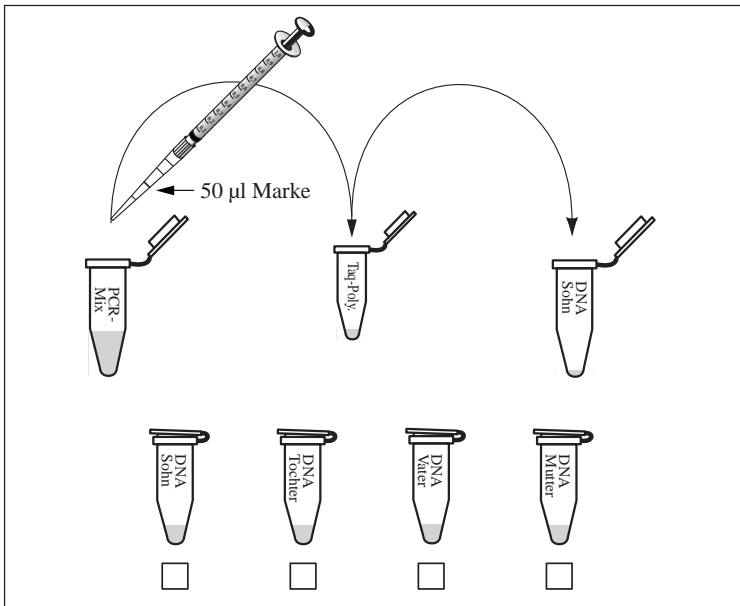
## 6 Experimentieranleitungen

### 6.1 Durchführung der PCR

#### Vorbereiten der DNA-Proben für den Thermocycler

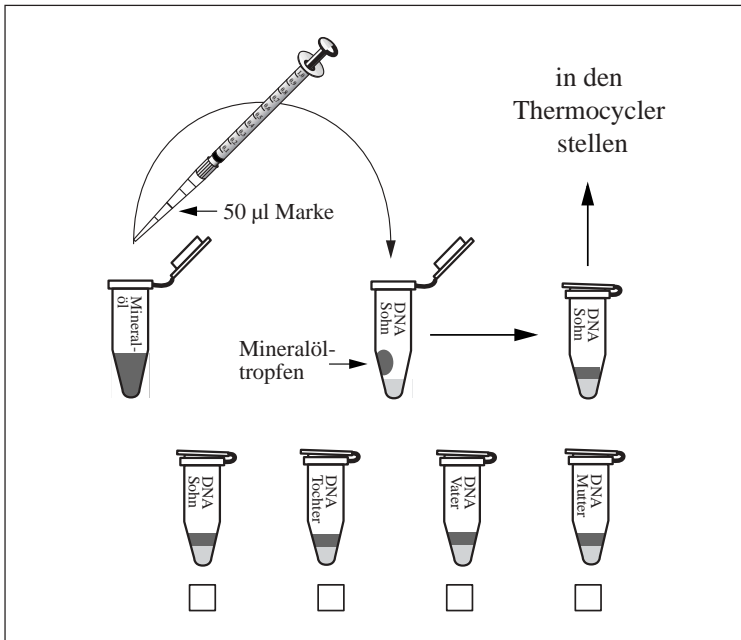
- 1. Stellen Sie folgende Reaktionsgefäße in den Styroporblock: „DNA Sohn“, „DNA Tochter“, „DNA Vater“, „DNA Mutter“. Stellen Sie davor jeweils ein Reaktionsgefäß „Taq Polymerase“.
- 2. Entnehmen Sie aus dem Gefäß „PCR Mix“ 50 µl und pipettieren Sie diese in das erste Reaktionsgefäß „Taq Polymerase“.
- 3. Aus diesem Taq-Polymerasegefäße entnehmen Sie das **gesamte Volumen** und überführen es in das Reaktionsgefäß „DNA Sohn“.

**Wichtig!** Sie können bei diesem Schritt mit der gleichen Pipettenspitze arbeiten.



**Wichtig!** Bei Schritt 4 müssen Sie vor jeder neuen DNA-Probe die Pipettenspitze wechseln um Vermischungen der einzelnen Ansätze untereinander zu vermeiden.

- ❑ 4. Wiederholen Sie diese Schritte mit den Gefäßen „DNA Tochter“, „DNA Vater“ und „DNA Mutter“



- ❑ 5. Überschichten Sie alle 4 Ansätze mit jeweils **50 µl Mineralöl** ohne den Inhalt zu berühren.  
(Den Öltropfen vorsichtig an der Gefäßwand absetzen.)

**Wichtig!** Sie können bei diesem Schritt mit der gleichen Pipettenspitze arbeiten, wenn Sie die DNA-Proben nicht berühren (sonst Pipettenspitze wechseln).

**Start der PCR Reaktion im Thermocycler**

Der Thermocycler aus dem Gerätesatz ist bereits programmiert. Um das Gerät zu starten lesen Sie die Anleitung, die dem Gerät beiliegt.

Das Programm des Thermocyclers:

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
<b>Denaturierungszyklus</b> .....	94°C .....	3 min .....	1
<b>Amplifikationszyklen</b> .....			25
Denaturierung .....	94°C .....	30 s .....	
Annealing .....	52°C .....	30 s .....	
Elongation .....	72°C .....	60 s .....	
<b>Abschlusszyklus</b> .....	72°C .....	3 min .....	1

6. Stellen Sie die Ansätze aus Schritt 5 in den **Thermocycler** und starten Sie das Programm.

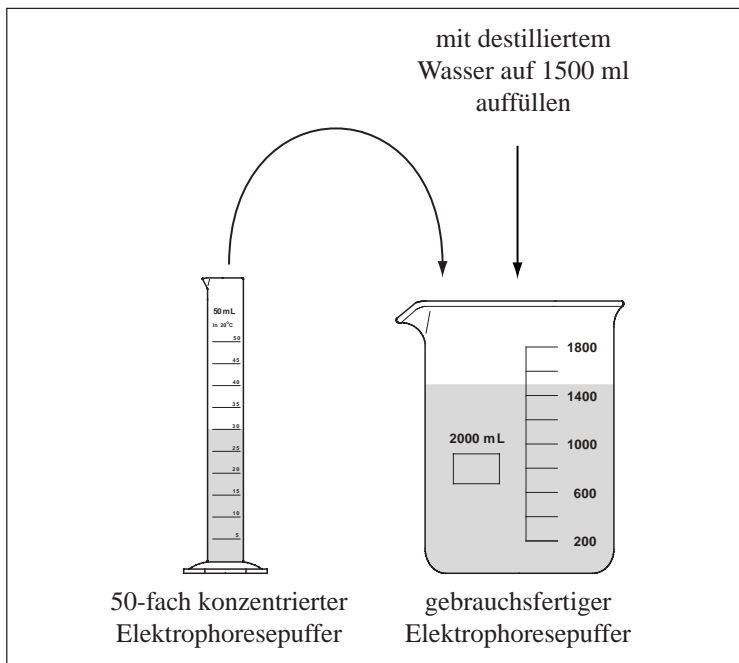
**Jetzt kann das Experiment unterbrochen werden. Der Thermocycler arbeitet nach seinem festgelegten Programm und kühlt die Proben bis zur Aufarbeitung zum Gelauftrag.**

Der Erfolg der PCR-Reaktion wird anschließend durch Gelelektrophorese in einem Agarosegel überprüft.

## 6.2 Gelelektrophorese der vervielfältigten DNA

### Vorbereiten der Gelkammer

- ❑ 1. Verdünnen Sie den 50-fach konzentrierten Agarosegel **Elektrophorese-puffer 1:50 mit destilliertem Wasser**.  
(30 ml des 50-fach Puffers in großem Becherglas auf 1500 ml auffüllen.)

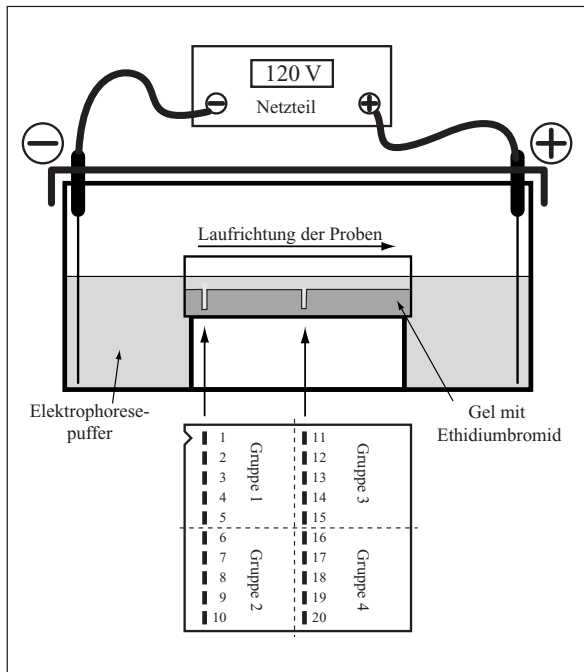


- 2. Entfernen Sie vom Agarosegel **vorsichtig (!)** die Schutzhüllen sowie die Klebebänder an den Rändern und über den Kämmen.  
(Beim Abziehen des Klebebandes die Gelkämme niederdrücken, damit sie nicht aus dem Gel gezogen werden.)
- 3. Legen Sie das Gel in die Elektrophoresekammer und verbinden die Kabel des Deckels mit dem Netzteil.
- 4. Befüllen Sie **eine Gelkammer mit ca. 1,3 Liter Elektrophoresepuffer**. Der Puffer soll **etwa 1 cm über dem Gel** stehen .
- 5. Entfernen Sie vorsichtig die „Kämme“ aus dem Gel durch **senkrecht nach oben Ziehen**.  
Die Geltaschen dürfen dabei nicht beschädigt werden.  
Beschädigte Geltaschen nicht befüllen!

**Abb. 9 Verschaltung des Deckels der Elektrophoresekammer**

Die Anordnung des Gels und die Laufrichtung der Proben wird durch die Beschaltung des Deckels festgelegt. Die Geltaschen befinden sich an der negativen Elektrode (schwarzes Kabel). Das rote Kabel wird mit dem Pluspol verbunden.

Werden mehrere Gele verwendet ist es sinnvoll die Gele an der Spur 1 durch Ausstechen einer Kerbe mit einem Spatel zu markieren.



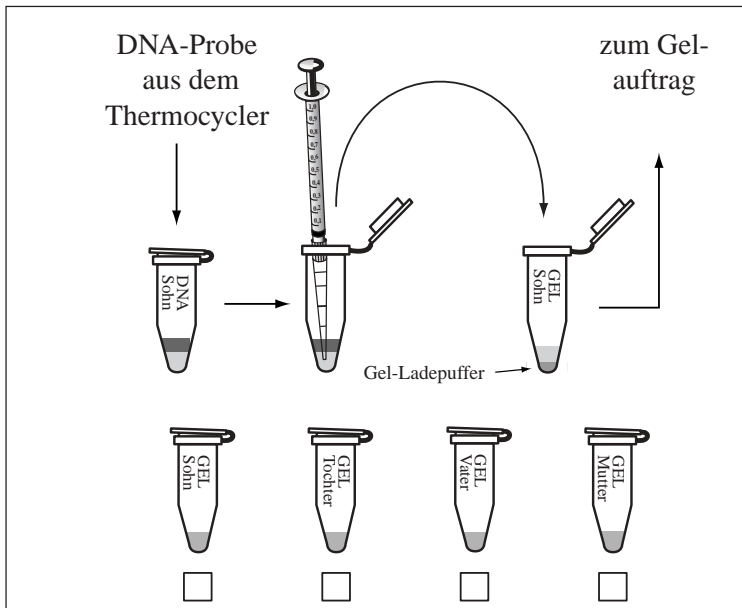


### Vorbereiten der Proben für den Gelauftrag

- ❑ 6. Entnehmen Sie nach Ablauf der PCR Reaktion die Reaktionsgefäße aus dem Thermocycler.
- ❑ 7. Pipettieren Sie aus den 4 Ansätzen jeweils **40 bis 50 µl der unteren (!) Flüssigkeitsphase** in die entsprechend beschrifteten Reaktionsgefäße („GEL Sohn“, „GEL Tochter“, „GEL Vater“, „GEL Mutter“), die bereits je 10 µl Gel-Ladepuffer (5-fach konzentriert, blau) enthalten.

**Wichtig! Hier müssen Sie nach jedem Schritt die Pipettenspitze wechseln um Vermischungen der einzelnen Ansätze untereinander zu vermeiden.**

Der Saccharosegehalt (6%) des Gel-Ladepuffers erhöht die Dichte der Proben. Die Farbstoffe erlauben eine Kontrolle der zurückgelegten Laufstrecke der DNA.



Auftragen der Proben und Start des Gel-Laufes

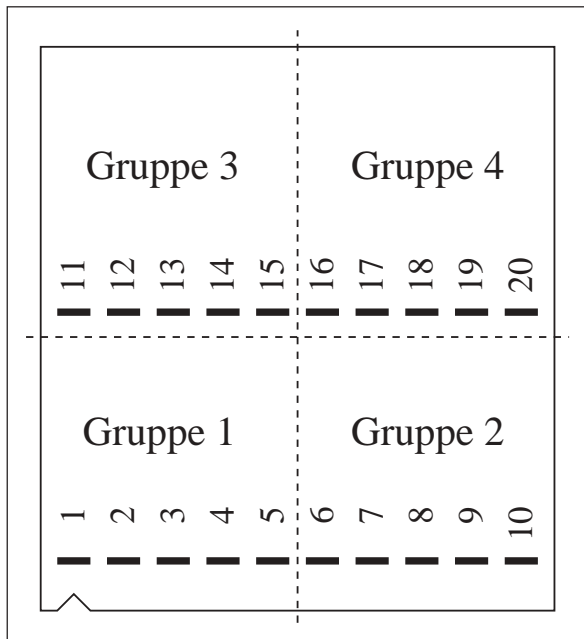
- 8. Tragen Sie **soviel wie möglich** mindestens jedoch 20  $\mu\text{l}$  der Ansätze nebeneinander auf das Gel auf. (Auftrageschema beachten!)
- 9. Tragen Sie zusätzlich **20  $\mu\text{l}$  „DNA-Größenstandard“** auf das Gel auf (jeweils auf die Spuren 1, 6, 11 und 16).
- 10. Die Elektrophorese wird für etwa **eine Stunde bei etwa 120 V** durchgeführt.

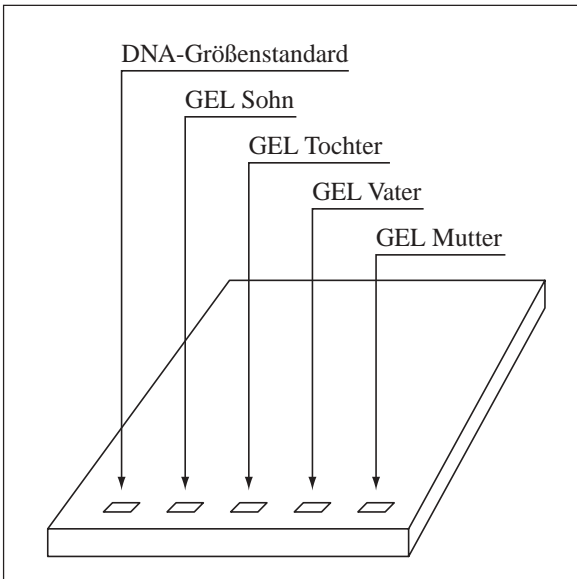
Da die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt wird, kann die Elektrophorese unterbrochen werden, um die Auftrennung der DNA zu überprüfen.

Die Elektrophorese wird beendet wenn der gelbe Farbstoff (Orange G) das Ende des Gelabschnitts erreicht hat.

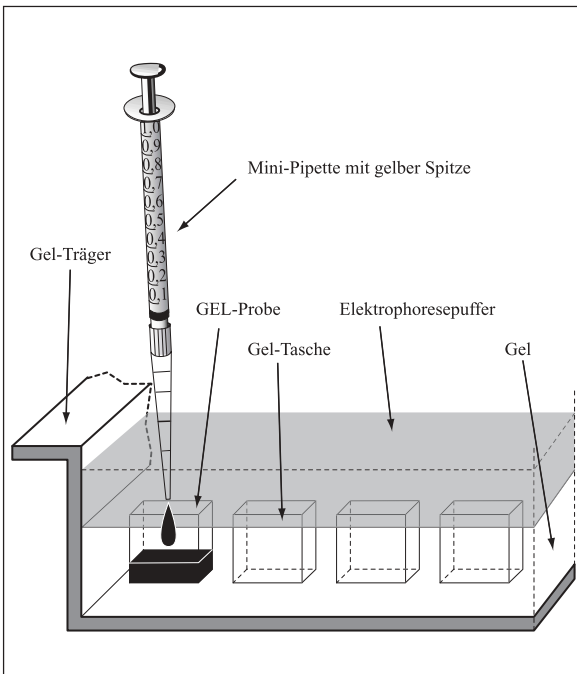
**Abb. 10 Aufteilung der Gruppen**  
Auf einem Gel mit 20 Spuren in zwei Reihen können vier Schülergruppen Proben auftrennen.

Der kleinste Kit für sechs Gruppen enthält zwei Gele. Die Spuren 16 bis 20 des zweiten Gels können verwendet werden, wenn beim Entfernen des Gelkammes einzelne Taschen beschädigt wurden.





**Abb- 11 Auftragemuster der vier Proben**  
*Jede Gruppe trägt ihre DNA-Proben nach dem gleichen Muster auf das Gel auf.  
 Die DNA-Größenstandards sind später als trennende Spuren gut zu erkennen.*



**Abb- 12 Details des Gelauftrags**  
*Mit der Minipipette vorsichtig die DNA-Proben aus den Gefäßen GEL-Sohn, Tochter, Vater, Mutter in die Geltaschen pipettieren. Dabei die Pipette senkrecht in der Faust halten und mit dem Daumen den Kolben herabdrücken. Ein schwarzes Blatt unter der Gelkammer erleichtert durch Erhöhung des Kontrastes das Einfüllen der Proben.*

**6.3 Sichtbarmachung der DNA im Gel**

---

- 11. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel auf den UV-Schirm gelegt und mit UV-Licht einer Wellenlänge von 250-350 nm bestrahlt.

**Vorsicht! UV-Schutz auf den UV-Schirm auflegen, Gel nur mit Handschuhen anfassen!**

**Vorsicht! Das Gel ist leicht zerbrechlich und kann leicht aus der Hand rutschen. Deshalb nur mit dem Gelträger transportieren und auf dem UV-Schirm vorsichtig vom Träger herunterschieben.**

**Färbung mit ungiftigem DNA-Farbstoff**

- 12. Legen Sie das **Gel in die Färbeschale** und überschichten Sie es für **genau 3 Minuten** mit der DNA-Färbelösung. Schwenken Sie die Färbewanne während des Färbeprozesses, um das Gel homogen zu färben.
- 13. Schütten Sie nach 3 Minuten die Färbelösung wieder in die Flasche zurück.
- 14. Spülen Sie das Gel mit **ausreichend destilliertem Wasser**, so dass keine Reste an Färbelösung mehr vorhanden sind und legen es in den Kühlschrank. Nach ca. 30 Minuten werden die DNA-Banden sichtbar.
- 15. Überschichten Sie das Gel für **etwa 12 Stunden** mit destilliertem Wasser und bewahren es im **Kühlschrank** auf.

**Jetzt kann das Experiment wieder unterbrochen werden und am nächsten Tag mit der Auswertung der Gele fortgesetzt werden.**

Eine Lagerung über mehrere Wochen hinweg ist möglich. Das Gel kann im Kühlschrank für mehrere Wochen gelagert werden, Austrocknung kann zum Beispiel durch Einwickeln in Frischhaltefolie verhindert werden.

Nach dem Praktikum kann das Gel mit dem Restmüll entsorgt werden.

6.4 Auswertung des Experiments

Ergebniss der Elektrophorese

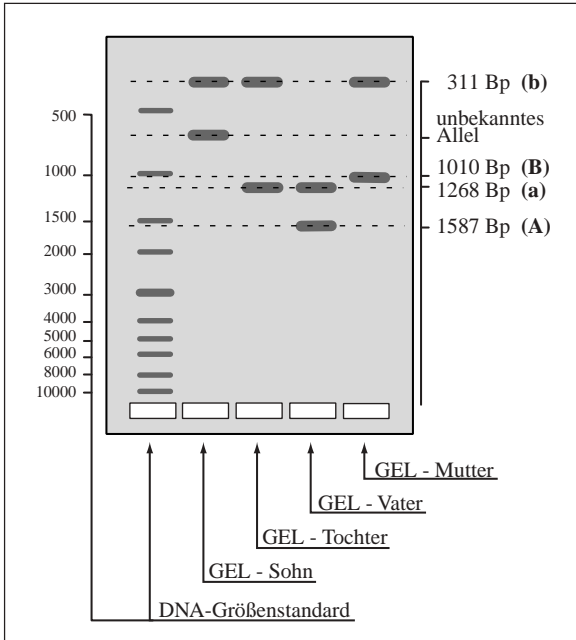


Abb- 13 Ergebnis der Elektrophorese

Nach der Färbung sollte im Gel das folgende Banden-muster erscheinen.

Vergleichen Sie das Bandenmuster der genetischen Profile von Vater, Mutter, Tochter und Sohn. Aus dem Bandenmuster kann eine Aussage getroffen werden, ob der Mann der biologische Vater der beiden Kinder ist.

Ist der Mann der biologische Vater des Sohnes?  
Begründen Sie Ihre Antwort.

### Auflösung der Fragestellung

Der Mann ist mit **hoher Wahrscheinlichkeit** der biologische Vater der Tochter, denn die Tochter besitzt sowohl ein Allel der Mutter (Allel b) als auch ein Allel des Vaters (Allel a).

Theoretisch ist es denkbar, dass die Tochter Allel a von einer anderen Person erhalten hat, die zufälligerweise die gleiche Allelausprägung wie der Vater besitzt. Um die statistische Wahrscheinlichkeit der Vaterschaft berechnen zu können, müsste die Variabilität, also die Häufigkeit des Auftretens des VNTR-Polymorphismus in der Bevölkerung bekannt sein.

Die Wahrscheinlichkeit der Vaterschaft wird umso höher, je mehr VNTR-Polymorphismen man analysiert.

Der Mann ist mit **100% iger Sicherheit nicht** der biologische Vater des Sohnes.

Der Sohn besitzt zwar ein Allel der Mutter (Allel b), jedoch keines der beiden Allele des Vaters. Das unbekannte Allel muss somit von einem anderen biologischen Vater stammen.

Der genetische Fingerabdruck kann also formal (mathematisch) nur der negativen Beweisführung dienen. Trotzdem wird er zum Beispiel vor Gericht auch zur positiven Beweisführung, etwa bei der Überführung eines Straftäters zugelassen.

---

## 6.5 Fehlersuche („Troubleshooting“)

---

Auf dem mit Methylenblau gefärbten Gel ist zwar der DNA-Größenstandard aber **keine PCR Amplifikate** zu sehen.

⇒ Die PCR Reaktion hat nicht funktioniert. Es ist keine Fehlerbeseitigung möglich.

Auf dem mit Methylenblau gefärbten Gel ist **weder der DNA-Größenstandard noch PCR Amplifikate** zu sehen.

⇒ Das Gel ist nicht ausreichend gefärbt Wiederholen Sie den Färbe-Entfärbeprozess.

Das mit Methylenblau gefärbte **Gel kann nicht mehr entfärbt werden.**

⇒ Das Gel wurde zu lange gefärbt. Entfärben Sie das Gel mehrmals für einige Minuten mit handwarmem (nicht zu heißem!) Wasser, bis sich das gewünschte Ergebnis zeigt.

Halten Sie beim nächsten Experiment die Färbezeit (3 Minuten) genau ein.

Im Gel sehen die **Banden ausgefranst, unscharf** oder ungleichmäßig aus.

⇒ Die Spannung bzw. Stromstärke war zu hoch. Verringern Sie die Spannung.

⇒ Die Pufferkonzentration war falsch. Achten Sie darauf, dass der Elektrophorese-puffer 50-fach mit destilliertem (!) Wasser verdünnt werden muss und dass die Pufferkonzentration im Gel und in der Gelkammer gleich sind.

Die DNA-Banden sind nicht ausreichend voneinander getrennt.

⇒ Die Elektrophorese wurde zu früh beendet. Da das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt ist, können Sie die Elektrophorese weiterführen.

**7 Anhang****7.1 Chemikalien und Puffer**

---

**Gel-Ladepuffer (5x)**

- 30 % Saccharose
- 0,1% Bromphenolblau
- 0,1% Orange G
- 0,1% Xylencyanol

**Elektrophoresepuffer** (einfach konzentriert)

- 36 mM Tris/HCl; pH 7,6
- 0,1 % Essigsäure
- 1 mM EDTA

**Methylenblau-Lösung**

- 0,03% Methylenblau



---

## 7.2 Sicherheitseinstufung von Ethidiumbromid

---

Mutagene Eigenschaften sind wissenschaftlich belegt, es ist jedoch noch keine diesbezügliche gesetzliche Einstufung erfolgt. Auch die Hersteller und Vertreiber von Ethidiumbromid geben nicht immer einen direkten Hinweis auf diese Stoffeigenheit.

### **Fa. Roth:**

Gesundheitsschädlich beim Verschlucken (R22),  
Sehr giftig beim Einatmen (R26),  
reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut,  
Irreversibler Schaden möglich (R36-38),  
Hinweis auf mutagene Wirkung (R40)

### **Fa. Merck:**

Sehr giftig (R22-26),  
Reizend (R36-40)  
LD50 Ratte (oral): 1503 mg/kg  
zum Vergleich Kochsalz: LD 50 Ratte. 3000mg/kg

### **Entsorgung von Lösungen mit Ethidiumbromid**

Ethidiumbromidhaltige Lösungen sind nur dann als Gefahrstoff anzusehen, wenn die Konzentration an Ethidiumbromid mehr als 0,1% (1 mg/ml) beträgt.

### **Konzentration im Praktikum**

Arbeitslösung: 0,5 µg/ml (0,000 05%)

Damit liegt die eingesetzte Ethidiumbromidkonzentration zur Färbung von DNA in einem Gel etwa 2000 fach unter dem Gefahrstoffgrenzwert.

Lösungen oder Gele, in denen die Ethidiumbromidkonzentration unter 0,1% liegt, sind keine Gefahrstoffe und müssen weder als Sonderabfälle gesammelt noch als solche entsorgt werden.

## 8 Glossar

**Agarose** Polysaccharid, Bausteine D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose, gewonnen aus Agar (aus Zellwandmaterial von Rotalgen); Verwendung als \*A.gel für die \*Elektrophorese

### Amplifikation

Allgemein: Erweiterung, Vermehrung (engl. *to amplify* = vergrößern); speziell: Vervielfachung von DNA-Bereichen (natürliche Genamplifikation oder künstlich bewirkte Vermehrung von DNA-Abschnitten bei der \*PCR)

### bp

Abkürzung für Basenpaare

### Da

Einheitensymbol für die atomare Masseneinheit „1Dalton“ im angloamerikanischen Sprachgebrauch, entspricht dem deutschen „u“

### Denaturierung

a. Proteine: Reversibler oder irreversibler Prozess, bei dem ein Protein seine biologischen Eigenschaften verliert. Beruht auf einer Zerstörung der Sekundär- oder Tertiärstruktur. Denaturierend wirken Hitze und Chemikalien.  
b. DNA: Aufspaltung doppelsträngiger DNA in Einzelstränge durch Erhitzen.

### Elektrophorese

Verfahren zur Auftrennung eines Gemisches von Molekülen (z.B. DNA oder Proteine) durch Wanderung in einem elektrischen Feld. Je nach Trägermaterial als Papier- oder Gel-E.

### Elongation,

(engl. *elongation* = Verlängerung), Neusynthese von polymeren Molekülen, z.B. DNA in der \*PCR

**Ethidiumbromid** im UV-Licht fluoreszierender Farbstoff für DNA, wirksam ist das mehrringig heterozyklisch gebaute Ethidium-Ion, das sich durch \*Interkalation in die DNA einlagert.

### Fingerabdruck, genetischer

Charakterisierung eines Individuums auf der Basis der DNA, ( \*VNTR)

**fingerprint**

s. Fingerabdruck

**Forensik**

Gerichtswesen (lat. *forensis* = öffentlich, da Gericht öffentlich, auf dem *forum* gehalten wurde)

**Gel**

Mischung aus einem makromolekularen Stoff, der durch Querverknüpfungen ein dreidimensionales Netzwerk bildet und einer Flüssigkeit, die die Poren zwischen den Makromolekülen ausfüllt. Die Festigkeit reicht von hochviskos bis gallertartig fest. Beispiel: Gelatine, Stärkekleister, \*Polyacrylamid-, \*Agarose-Gel

**genetic profiling**

Erstellung eines „genetischen Profils“, ein für ein Individuum charakteristisches Muster bestimmter DNA-Abschnitte (\*VNTR-Sequenzen)

**Heterogenität**

Unterschiedlichkeit (gr. *heteros* = der andere, gr. *ginein* = entstehen; vgl. heterogene Mischungen)

**Interkalation**

Einschieben eines Fremdmoleküles zwischen zwei Basenpaare einer DNA-Doppelhelix; typischerweise durch mehrringige heterozyklische Moleküle, z.B. \*Ethidium-Ion

**kDa**

Abkürzung für 1000 \*Da.

**Locus**

Genort (lat. *locus* = Ort; vgl. lokalisieren)

**Marker**

(engl. = Kennzeichen, Markierung) Moleküle, die als Markierungen dienen:

- a. Markergene: phänotypisch leicht erkennbare Gene, z.B. als Bezugspunkte für Genkartierungen
- b. Größenstandards bei Chromatographie oder Elektrophorese
- c. Moleküle, die durch Strahlung, Fluoreszenz oder Farbe andere Moleküle anzeigen, an die sie gekoppelt wurden.

**Matrix**

(lat. *matrix* = Mutterboden v. *mater* =Mutter) Grundmasse; z.B. Trägermaterial bei der \*Elektrophorese, vgl. mitochondriale M.

**Matrize**

(von lat. *mater* =Mutter) Gussform; DNA oder RNA, die als Grundlage für die basenkomplementäre Neusynthese dient. vgl. Druckmatrize für Vervielfältigungen.

**Polyacrylamid**

dreidimensional vernetztes Polymer, hergestellt aus Acrylamid durch radikalische Polymerisation und anschließende Vernetzung mit N,N'-Methylbisacrylamid. Verwendung als \*P.-Gel für die \*Elektrophorese

**PCR (*polymerase chain reaction*)**

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung einzelner DNA-Abschnitte

**Polymerase**

Enzym für die Synthese eines aus vielen Einzelbausteinen aufgebauten (polymeren) Moleküls, z.B. DNA oder RNA

**Polymorphismus**

Vielgestaltigkeit (gr. *poly* = viel, *morphe* = Gestalt; vergleiche Metamorphose: Gestaltänderung)

**Primer**

kleine DNA-Sequenz, die als „Startbereich“ für eine DNA-Replikation durch eine \*Polymerase an einen DNA-Abschnitt komplementär anlagern kann.

**Repeats**

Basensequenzen in der DNA, die mehrfach im Genom vorkommen. Man unterscheidet verschiedene Formen:

a. direkte R.: liegen auf dem gleichen Strang mit gleichgerichteter Basenfolge (Beispiel: 5'-GATC $n$ nnnGATC-3', n=beliebige Base)

b. invertierte R.: eine Einheit liegt auf dem einen, die andere auf dem zweiten Strang der DNA, beide in gleicher Leserichtung (Beispiel: 5'-GATC $n$ nnnCTAG-3')

c. Tandem-R.: die Wiederholungen liegen unmittelbar hintereinander (Beispiel: 5'-GATCGATC-3')

d. Palindrome: Sequenzen mit doppelter Spiegelsymmetrie  
(Beispiel: 5'-GGATCC-3')

### repetitiv

sich wiederholend; z.B. repetitive Basensequenzen in der DNA

### RFLP

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus; durch Mutationen in Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen verursachte Längenveränderung von DNA-Fragmenten.

### Southern-Blot

Methode zum Nachweis bestimmter DNA-Abschnitte. Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente werden auf eine Trägermembran übertragen („blotting“) und durch Hybridisierung mit DNA-Sonden identifiziert. (E.M. SOUTHERN, 1975)

### Taq-Polymerase

Aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnene, temperaturstabile DNA-<sup>\*</sup>Polymerase

**Thermocycler** programmierbares Gerät zur automatischen Durchführung der <sup>\*</sup>PCR

**topologische Isomere (Topoisomere)** (gr. *topos* = Ort, vgl. Topologie in der Mathematik, Isotop) Moleküle gleicher Grundstruktur (z.B. DNA-Kette), die sich in ihrer Verknäuelungsform unterscheiden (z.B. linear, superhelikal, ringförmig).

### VNTR

*variable number of tandem repeat*, variable Anzahl benachbarter Sequenzwiederholungen; kurze Basenfolgen in nichtkodierenden DNA-Bereichen, werden im <sup>\*</sup>Fingerabdruck genutzt: s.a. <sup>\*</sup>Repeats

### Zyklus

(gr.-lat. = Kreis, Kreislauf); in der Biochemie für eine Reihe sich ständig wiederholender Reaktionen, z.B. Zitronensäurezyklus oder <sup>\*</sup>PCR-Zyklus

**Notizen:**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....