

ANALYSE EINES DNA-ABSCHNITTES: ALU-SEQUENZ

1. Einführung zur PCR – Polymerase Ketten Reaktion

Sie werden in Kürze eine Analyse durchführen, die als PCR bekannt ist – die Amplifikation einer spezifischen Sequenz Ihrer eigenen DNA in einem Teströhrchen. Dieses spezielle Stück DNA kommt in den Genen vieler, aber nicht aller Leute vor. Eine Analyse der Daten, die in diesem Labor gewonnen werden, ermöglicht es Ihnen festzustellen, ob Ihre genomische DNA dieses DNA-Stück enthält oder nicht.

Das Genom, bestehend aus DNA, ist Ihre Erbsubstanz. Das ist die sogenannte „Schaltzentrale“, der Plan der grossenteils unser Aussehen unser Handeln und die Art und Weise unseres Handelns bestimmt. **Molekulare Genetik** ist das Studium von Genen und deren molekularen Details, die den Fluss der genetischen Information von DNA zur RNA und den Proteinen und von Generation zu Generation festlegt. Die Biotechnologie setzt diese Kenntnisse ein, um die DNA von Organismen (Mikroben, Pflanzen oder Tieren) zu manipulieren und bei der Lösung menschlicher Probleme zu helfen.

Im molekularen Rahmen der Biologie hängen DNA, RNA und Proteine nahe zusammen. Weil Proteine und Enzyme letztendlich so eine entscheidende Rolle im Lebensprozess spielen, haben Wissenschaftler viel Zeit in das Studium der Proteine investiert, um ihrer Funktionen zu verstehen. Man hat geglaubt, dieses Verständnis könnte helfen, Krankheiten zu behandeln, verhindern und bezwingen, sowie eine exakte Erklärung dafür liefern, wie und warum Organismen existieren, sich fortpflanzen und sterben. Jedoch liegt die komplette Antwort auf die Frage wie und warum nicht nur in der Kenntnis der Funktionsweise der Enzyme, man muss auch verstehen, wie sie entstehen. Wenn jedes Enzym verschieden ist, was kontrolliert dann diese Unterschiede und welcher Plan für diese Unterschiede steckt dahinter? Die Antwort darauf liefert unser Genom oder genetischer Kode.

So bekommt man ein Verständnis dafür, warum heutzutage die Wissenschaft sowohl Nukleinsäuren als auch Proteine untersucht, um das Bild vom Mechanismus, der hinter verschiedenen biologischen Prozessen steckt, zu vervollständigen. In den letzten 20 Jahren haben viele Fortschritte auf den Gebieten der Techniken mit Nukleinsäuren den Wissenschaftlern die Mittel an die Hand gegeben, die Rolle der Nukleinsäuren in der Biologie zu studieren. Es erforderte das Vorstellungsvermögen und die harte Arbeit vieler Wissenschaftler, die Antwort auf eines der geheimnisvollsten Puzzles des Lebens zu enthüllen, - das Verständnis des Mechanismus, der kontrolliert, wie die DNA in lebenden Zellen in Proteine übersetzt wird.

PCR legte den Grundstein für eine wissenschaftliche Revolution

1983 entwickelte Kary Mullis an der Cetus Corporation die Technik der molekularen Biologie, die seither die genetische Forschung revolutioniert hat. Diese Technik, genannt Polymerase Kettenreaktion („**Polymerase Chain Reaction**“, **PCR**), verwandelte innerhalb von 5 Jahren die Molekularbiologie in ein multidisziplinäres Forschungsfeld. Vor der Einführung von PCR erforderten die zum Studium der DNA nötigen Techniken der Molekularbiologie einen so hohen Kenntnisstand, dass sie nur von wenigen Wissenschaftlern eingesetzt werden konnte. Das Ziel von PCR besteht darin, grosse Mengen DNA in einem Reaktionsgefäss („in vitro“) aus einer sehr kleinen Ausgangsmenge zu produzieren. Technisch gesprochen bedeutet dies, die kontrollierte enzymatische Amplifikation einer DNA Sequenz, oder eines Gens von Interesse. Die Matrizen Stränge können jede Art von doppelsträngiger DNA, wie z.B. genomische DNA sein. Ein Forscher kann Spuren genomischer DNA aus einem Tropfen Blut, einem einzelnen Haarfollikel, oder einer Mundschleimhautzelle (theoretisch ist nur ein einziger Matrizen Strang nötig, um ihn zu kopieren und Millionen neuer identischer DNA Moleküle herzustellen) einsetzen und daraus genug für eine Untersuchung herstellen. Vorher wäre dies unmöglich gewesen. Es ist die Möglichkeit, die genaue Sequenz der zu untersuchenden DNA amplifizieren zu können, die die wahre Stärke der PCR ausmacht.

PCR hat Einfluss auf die vier Hauptgebiete der genetischen Forschung: Gen Kartierung, Klonierung, DNA Sequenzierung und Gen Detektion. PCR wird eingesetzt als diagnostisches Mittel in der Medizin, um spezifische Mutationen erkennen zu können, die evtl. Genkrankheiten auslösen. Die Methode wird auch eingesetzt in kriminologischen Untersuchungen und Gerichtsverhandlungen, um Verdächtige auf molekularer Ebene identifizieren zu können. Sie ist schliesslich eine wirksame Methode zur Sequenzierung des menschlichen Genoms. Vor der Entwicklung von PCR war die Anwendung von Techniken der Molekularbiologie zu therapeutischen, forensischen, pharmazeutischen, landwirtschaftlichen, oder medizinischen diagnostischen Zwecken nicht praktikierbar oder kostenintensiv. Durch die Entwicklung der PCR

Technologie wurde die Molekularbiologie von einer komplizierten Wissenschaft zu der zugänglichsten und am weitläufigsten angewandten Disziplinen der **Biotechnologie**.

Im folgenden Versuch werden Sie nun Ihre eigene DNA extrahieren.

2. DNA EXTRAKTION UND MATRIZEN PRÄPARATION

Um DNA für die Polymerase Kettenreaktion zu erhalten, werden Sie DNA aus Ihren eigenen lebenden Zellen extrahieren. Es ist interessant zu wissen, dass DNA auch aus mumifizierten und fossilen Dinosaurier Knochen extrahiert werden kann. In dieser Laborarbeit werden Sie DNA aus den epithelialen Zellen der Innenseite Ihrer Wange isolieren. Dies geschieht, indem Sie mit einer Pipettenspitze vorsichtig auf den beiden Wangeninnenseiten ca. 10 mal auf- und abfahren, um Zellen abzuschaben, die die Oberfläche bilden. Die Zellen werden dann gekocht, um sie aufzubrechen und die DNA freizusetzen, die sie enthalten. Um reine DNA für die PCR zu erhalten, führen Sie folgende Prozedur durch.

Die Wangenzellen auf dem Wattestäbchen werden in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, das 200 µl **InstaGene Matrix** enthält. Diese spezielle Matrix besteht aus negativ geladenen mikroskopisch kleinen Perlen, die "Chelate" bilden und Metallionen aus der Lösung holen. Sie funktioniert als Ionenfalle und "fischen" so z.B. Mg^{2+} aus der Lösung heraus, das als Katalysator oder **Cofaktor** in Enzymreaktionen gebraucht wird und in dieser Konzentration die nachfolgende PCR Reaktion stören würde.

Die Wangenzellen werden dann durch Erhitzen lysiert oder aufgebrochen, damit sie die zellulären Bestandteile freisetzen, inklusive der Enzyme, die ursprünglich in den Lysosomen der Wangenzellen enthalten waren. Lysosomen sind Säckchen im Zellzytoplasma, die wirksame Enzyme enthalten, wie z.B. **DNasen**, die von den Zellen benutzt werden, um die DNA von angreifenden Viren zu verdauen. Wenn man die Zellen aufbricht, können diese DNasen die freigesetzte DNA, die untersucht werden soll, ebenfalls verdauen. Werden jedoch die Zellen in Gegenwart der Chelat bildenden Perlen lysiert, werden die Kofaktoren adsorbiert und stehen den Enzymen nicht mehr zur Verfügung. Dies blockiert allen enzymatischen Abbau der extrahierten DNA und führt zu einer Population intakter genomischer DNA Moleküle, die in der PCR Reaktion als Matrize eingesetzt werden können.

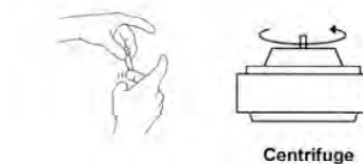
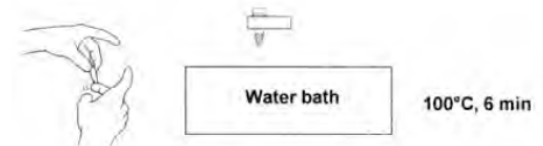
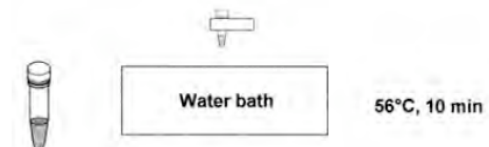
Die isolierten Wangenzellen werden als erstes in der InstaGene Matrix suspendiert und 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Dieser „Vorinkubationsschritt“ hilft, die Plasma Membranen aufzuweichen und Klumpen von Zellen aufzulösen. Die erhöhte Temperatur bewirkt auch, dass Enzyme, wie z.B: DNasen, die die Matrizen DNA abbauen, inaktiviert werden. Nach dieser 10-minütigen Inkubationsperiode, werden die Zellen 6 Minuten lang in ein kochendes Wasserbad (100°C) gestellt. Das Kochen zerstört die Zellen und setzt die DNA aus dem Zellkern frei. Die extrahierte genomische DNA wird dann als Ziel Matrize für die PCR Amplifikation eingesetzt.

Kernfragen zur DNA Extraktion und Matrizen Präparation

1. Warum ist es nötig, die Metallionen aus der Lösung der Wangenzellen vor dem Koch/Lyse Schritt bei 100°C herauszufangen? Was würde passieren, wenn Sie nicht die InstaGeneTM Matrix zugeben würden?
2. Was benötigt man für die Polymerase Kettentreaktion aus den Wangenzellen?
3. Welche Struktur muss aufgebrochen werden, um DNA aus einer Zelle freizusetzen?
4. Warum wird die aus den Wangenzellen extrahierte DNA in der InstaGene Matirx nach dem Kochen kühl aufbewahrt?

Anleitung Präparation der DNA

1. Beschriften Sie ein Schraubdeckel-Röhrchen mit 200µl **InstaGene-Matrix** mit Ihren Initialen.
2. Schaben Sie nach Vorgabe mit einer Pipettenspitze sanft das Innere Ihrer beiden Backen einige Male ab. Es sollte sich etwas weiße Zellmasse in der Pipettenspitze gesammelt haben.
3. Stellen Sie die Pipettenspitze in das Röhrchen mit 200µl **InstaGene-Matrix**.
4. Stossen Sie das Zellmaterial an der Spitze sorgfältig mit einer automatischen Pipette aus, ziehen Sie danach die Flüssigkeit vorsichtig rauf und raus, so dass die Zellen gut mit der InstaGene-Matrix gemischt werden.
5. Wiederholen Sie den Vorgang mit einer zweiten Pipettenspitze.
6. Verschliessen Sie das Röhrchen und schütteln Sie für einige Sekunden auf dem Vortex.
7. Stellen Sie die Röhrchen in einen Schaumgummi-schwimmer und inkubieren Sie bei 56° C für 10' im Wasserbad. Nach 5' mischen Sie noch einmal auf dem Vortex.
8. Entnehmen Sie die Röhrchen dem Wasserbad, schütteln Sie erneut (Vortex) und inkubieren Sie das Röhrchen für 6 Min. im siedenden Wasserbad (ca. 100°C).
9. Entnehmen Sie das Röhrchen und mischen Sie erneut auf dem Vortex. Zentrifugieren Sie anschliessend 5 Min. bei 6000g (oder 10 Min. bei 2000g), um die Matrix zu sedimentieren. **ACHTUNG: ARBEITEN SIE ZUSAMMEN, FÜLLEN SIE DIE ZENTRIFUGE VOR DEM START!**



3. PCR AMPLIFIKATION

Es wird angenommen, dass es 30.000 – 50.000 verschiedenen Gene im menschlichen Genom gibt. Die wahre Bedeutung der PCR liegt darin, dass ein spezielles Stück DNA (oder ein Gen) aus dem kompletten Genom ausgewählt und amplifiziert werden kann.

Das Rezept für eine PCR Amplifikation von DNA erfordert eine einfache Mischung von verschiedenen Inhaltsstoffen. Um ein vorgegebenes Stück DNA zu replizieren, muss die Reaktionsmischung folgendermassen zusammengesetzt sein.

1. Intakte DNA Matrize – die die Sequenz der DNA enthält, die amplifiziert werden soll.
2. Einzelne Desoxynukleotidbasen (A, T, G und C) – der Rohstoff der DNA.
3. DNA Polymerase – ein Enzym, das die Nukleotide zu einer neuen DNA Kette zusammensetzt.
4. Magnesiumionen – ein Kofaktor (Katalysator), der von der DNA Polymerase benötigt wird, um die DNA Kette herzustellen.
5. Oligonukleotidprimer – DNA Stücke, die zur Matrize komplementär sind, und der DNA Polymerase genau anzeigen, wo sie beginnen muss, die Kopien zu machen.
6. Salz Puffer – garantiert die optimale Ionenumgebung und pH für die PCR Reaktion.

Die Matrizen DNA ist in dieser Übung genomische DNA, die aus den Wangenzellen extrahiert wurde. Werden alle anderen Komponenten richtig kombiniert, entsteht eine Kopie des originalen doppelsträngigen Matrizen DNA Moleküls – wodurch die Anzahl der Matrizen Stränge verdoppelt wird. Bei jeder Wiederholung dieses Zyklus, werden von den Kopien wieder Kopien hergestellt und die Anzahl der Matrizen Stränge verdoppelt sich – von 2 auf 4 auf 8 auf 16 und so weiter – bis nach 20 Zyklen genau 1048554 exakte Kopien der Ziel Sequenz vorliegen.

PCR wendet einige grundlegende Prozesse an, die in Zellen beim Verdoppeln ihrer DNA ablaufen.

1. Komplementäre DNA Strang Hybridisierung

2. DNA Strang Synthese mittels DNA Polymerase

Die zwei DNA Primer, die im Kit enthalten sind, wurden so hergestellt, dass sie eine DNA Sequenz im Genom flankieren oder einklammern und so der DNA Polymerase das genaue Startsignal am Nullpunkt geben und dort die Synthese (Replikation) der Kopien der Matrizen DNA beginnt.

Komplementäre Stranghybridisierung findet statt, wenn die zwei verschiedenen **Primer** an ihre jeweils komplementären Basenpaarsequenzen auf dem Matrizen DNA Molekül anbinden, oder hybridisieren.

Die Primer sind zwei kurze einzelsträngige DNA-Moleküle (23 Basenpaare lang), wobei das eine komplementär zu einem Abschnitt auf dem 5'-3' DNA Strang ist und das andere komplementär zu einem Abschnitt auf dem 3'-5' DNA-Strang ist. Diese Primer hybridisieren mit den getrennten Matrizen Strängen und dienen als Startpunkte für die DNA Amplifikation.

Das Enzym, genannt *Taq* DNA Polymerase, verlängert die angeknüpften Primer Sequenzen, indem sie den Strang „abliest“ und die komplementäre Sequenz synthetisiert. So repliziert *Taq* die/den Matrizen DNA Stränge/Strang. Diese Polymerase wurde aus einem hitzestabilen Bakterium (*Thermus aquaticus*) isoliert, das in Wirklichkeit in den dampfenden Kratern im Yellowstone Nationalpark vorkommt. Daher haben sich die Enzyme in diesen Bakterien dahingehend entwickelt, dass sie hohe Temperaturen (94°C), wie sie auch in jedem Zyklus der PCR Reaktion vorkommen, widerstehen.

PCR – Schritt für Schritt

Die PCR Amplifikation beinhaltet drei Hauptschritte, einen **Denaturierungs** Schritt, einen **Annealing** Schritt und einen **Extension** Schritt (diese drei Schritte sind in Abb. 9 zusammengefasst). Während der Denaturierung wird die Reaktionsmischung eine Minute lang auf 94°C aufgeheizt, wodurch die doppelsträngige DNA Matrize in zwei einzelsträngige Moleküle aufgeschmolzen wird. In der PCR Amplifikation muss die DNA Matrize aufgetrennt sein, ehe die Polymerase eine neue Kopie anfertigen kann. Die strengen Temperaturen, die nötig sind, um die DNA Stränge aufzuschmelzen würden die Aktivität der meisten Enzyme zerstören, aber da die *Taq* Polymerase aus Bakterien isoliert wurde, die bei den hohen Temperaturen heisser Quellen gedeihen, bleibt sie aktiv.

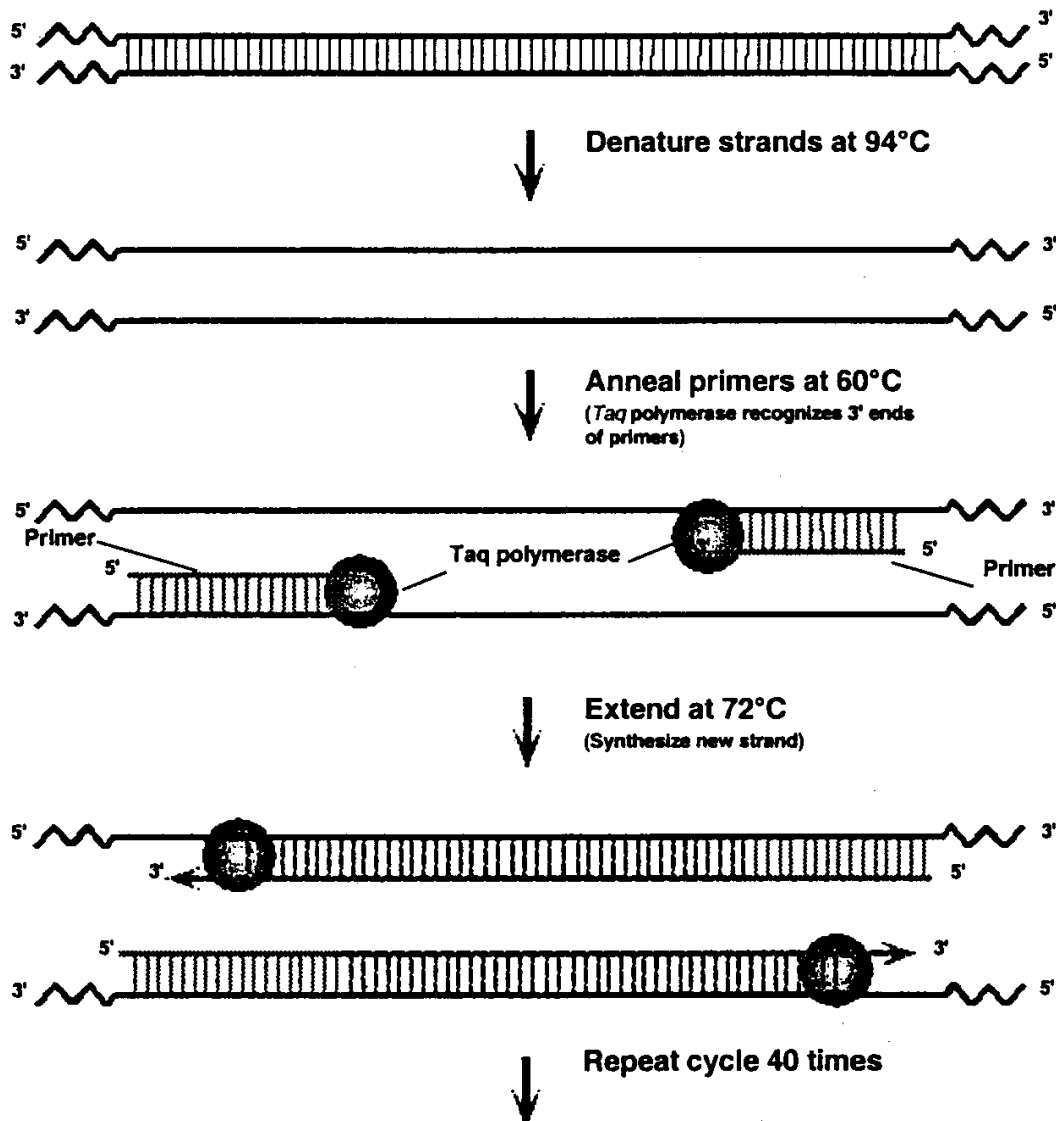


Abb. 9. Ein kompletter Zyklus von PCR.

Während des Annealing-Schritts binden die Oligonukleotid-Primer an ihre komplementären Sequenzen auf den zwei einzelsträngigen Matrizen DNA Strängen. An diesen angedockten Positionen können sie als „Primer“ für die *Taq* DNA-Polymerase fungieren. Sie werden Primer genannt, weil sie die einzelsträngigen DNA Moleküle „primen“, indem sie der *Taq* Polymerase ein kleines Stück doppelsträngiger DNA zur Verfügung stellen, die dann einen neuen komplementären Strang verlängern und bauen kann. Das Anbinden der Primer an die Matrizen-Sequenzen ist auch sehr temperaturabhängig. In diesem Laborversuch sind 60°C optimal für das Anbinden des Primers.

Während des Extension Schritts, ist es die Aufgabe der *Taq* DNA Polymerase, Nukleotide (A, T, G oder C) eines nach dem anderen an den Primer anzufügen, um eine komplementäre Kopie der DNA Matrize herzustellen. Während der Polymerisation wird die Reaktionstemperatur auf 72°C erhöht, die Temperatur, die eine optimale Aktivität der *Taq* Polymerase gewährleistet. Die drei Schritte Denaturierung, Annealing

und Extension werden zu einem „Zyklus“ der PCR kombiniert und eine komplette PCR Amplifikation durchläuft 40 Zyklen.

Die 40 Schritte umfassende Reaktion wird in einem Testgefäß durchgeführt, das in einen Thermal Cycler (auch genannt Gene Cycler) steckt. Der Gene Cycler enthält einen Aluminium Block, der die Proben hält und schnell zwischen extremen Temperaturdifferenzen aufgeheizt und abgekühlt werden kann. Das schnelle Aufheizen und Abkühlen dieses Heizblocks wird „**temperature cycling**“ oder „**thermal cycling**“ genannt.

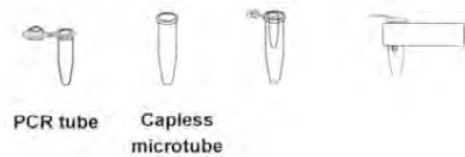
Temperature Cycle = Denaturation Step (94°C) + Annealing Step (60°C) und Extension Step (72°C).

Kernfragen zur PCR Amplifikation

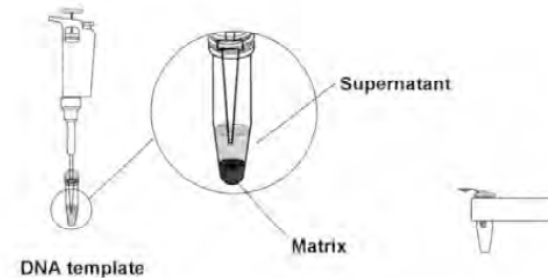
1. Warum braucht man einen Primer auf jeder Seite des DNA Segments, das amplifiziert werden soll?
2. Wie erhielt die *Taq* Polymerase Ihren Namen?
3. Warum sind die Nukleotide (A, T, G, und C) im Master Mix enthalten? Was sind die anderen Bestandteile des Master Mix und was sind ihre Funktionen?
4. Beschreiben Sie die drei Hauptschritte jedes Zyklus der PCR Amplifikation und geben Sie an, welche Reaktionen bei der jeweiligen Temperatur ablaufen.
5. Erklären Sie, warum die exakte Länge der Matrizen DNA Sequenz erst im dritten Zyklus amplifiziert wird. Benutzen Sie evtl. ein zusätzliches Blatt Papier und eine Zeichnung zur Beantwortung der Frage.

PCR Amplifizierung

10. Beschriften Sie ein PCR-Röhrchen (ganz klein!) und ein deckellooses Eppendorf Röhrchen mit Ihren Initialen. Stellen Sie das PCR-Röhrchen ins Eppendorf Röhrchen und dieses in den Schaumgummiständer.



11. Überführen Sie 20 µl des DNA-Templates (Ihres Überstandes aus dem Röhrchen mit Ihrer DNA) an den Boden des PCR-Röhrchens. Achten Sie streng darauf, dass **keine Kügelchen der Matrix** ins PCR-Röhrchen gelangen!



12. Sie finden ein Eppendorf Röhrchen mit **gelbem** Master Mix auf Eis. Transferieren Sie 20 µl davon in das PCR-Röhrchen. Mischen Sie durch 2-3-maliges Auf- und Abpipettieren. Verschliessen Sie das PCR-Röhrchen fest. Die Mischung sollte nun gelb sein.



13. Stellen Sie das PCR-Röhrchen zusammen mit allen anderen in den Cyclor. Die Reaktion wird 40 PCR-Zyklen umfassen.



WICHTIG: NOTIEREN SIE AN DER ZUTREFFENDEN STELLE IHREN NAMEN AN DER STELLE IHRES RÖHRCHENS (KOORDINATEN) AUF DER AUFLIEGENDEN LISTE, SO DASS WIR IHNEN SPÄTER DAS RESULTAT IHRES VERSUCHES MITTEILEN KÖNNEN.

4. ANALYSE DER DNA-PROBE MITTELS GEL ELEKTROPHORESE

Was können uns Gene und DNA erzählen?

Es wird vermutet, dass die 23 Paare oder 46 **Chromosomen** des menschlichen Genoms (23 Chromosomen stammen von der Mutter und die anderen 23 kommen vom Vater) ca. 30.000 – 50.000 Gene enthalten. Jedes Chromosom enthält eine Reihe spezifischer Gene. Die grösseren Chromosomen enthalten mehr DNA, und daher mehr Gene, als die kleineren Chromosomen. Jedes von den homologen Chromosomen (Paaren) enthält ähnliche Gene.

Jedes Gen beinhaltet den Kode für ein spezielles Protein. Interessanterweise machen die 30.000 – 50.000 Gene nur 5% der gesamten chromosomalen DNA aus. Die anderen 95% sind nicht kodierende DNA. Diese nicht kodierende DNA ist in Blöcken verteilt zwischen funktionellen Segmenten von Genen und zwischen den Genen, wobei sie diese in Segmente spaltet. Die genaue Funktion von nicht kodierender DNA ist noch nicht bekannt, obwohl man annimmt, dass nicht kodierende DNA die Akkumulation von Mutationen und Variationen innerhalb eines Organismus ermöglicht.

Wird DNA zum ersten Mal in RNA transkribiert, sind die Exons voneinander durch Introns getrennt. Während sich die RNA immer noch im Nukleus befindet, werden intergene Sequenzen, oder Introns (**in** = verbleibt **im** Kern) aus der RNA entfernt, während Exons (**ex** = **Exit** vom Kern) zusammengespleisst werden und so die komplette Messenger RNA bilden, die die Proteine kodieren (vgl. Abb.10). Dieser Prozess wird „**RNA Spleissen**“ genannt und wird von spezialisierten Enzymen, den „**Spliceosomen**“ durchgeführt.

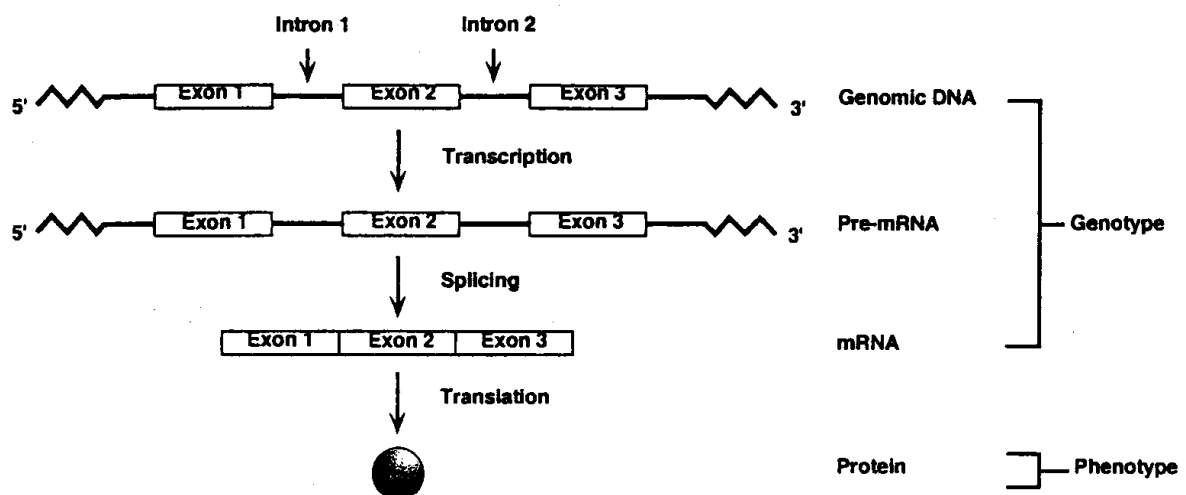


Abb. 10. Spleissen der Introns von den Genen.

Überraschender Weise variieren Introns oft in Grösse und Sequenz zwischen den Individuen, während Exons das nicht tun. Diese Variation wird für das Ergebnis differentieller Akkumulation von DNA Mutationen während der Evolution gehalten. Diese Mutationen werden unbemerkt an die Nachkommen weitergegeben. Mutationen in der nicht kodierenden DNA bleiben unbemerkt, da sie den Phänotyp nicht beeinflussen. Diese Unterschiede in unserer DNA stellen jedoch die molekulare Basis des DNA Fingerprintings dar, das zur Identifizierung von Menschen und Studien in der Populationsgenetik angewandt wird.

Die Ziel Sequenz – kann man sagen „Alu“?

Das Genom enthält kleine repetitive DNA Elemente, die über Millionen von Jahren per Zufall in das menschliche Genom verteilt wurden. Ein solches repetitives Element heisst „Alu-Sequenz“ (vgl. Abb. 11). Dies ist eine ca. 300 Basenpaare lange DNA Sequenz, die mit jeweils einer Kopie fast 500.000 Mal im menschlichen Genom wiederholt wird. Der Ursprung und die Funktion dieser zufällig wiederholten Sequenzen sind noch nicht bekannt.

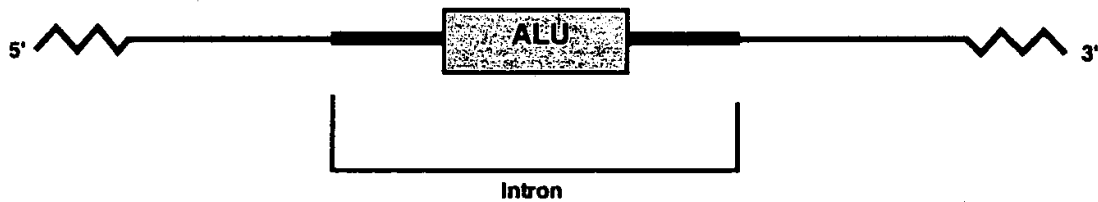


Abb. 11. Lage eines Alu repetitiven Elements innerhalb eines Introns.

Einige dieser Alu-Sequenzen haben Charakteristika, die sie für Genetiker sehr nützlich machen. Wenn sie in Introns von bestimmten Genen vorkommen, können sie entweder mit einer Krankheit in Verbindung gebracht werden, oder dazu benutzt werden, die Verwandtschaft zwischen Individuen zu bestimmen. In diesem Versuch wird die Analyse einer einzigen Alu-Wiederholung dazu benutzt, seine Häufigkeit in der Population abzuschätzen und als einfaches Mass für die molekulare genetische Variation – **ohne Verbindung zu einer Krankheit oder zur Verwandtschaft zwischen Individuen.**

In diesem Laborversuch suchen Sie ein Alu Element in der PV92 Region von Chromosom 16. Dieses spezielle Alu Element ist dimorph, was bedeutet, dass es in manchen Individuen vorkommt, in anderen wieder nicht. Einige Leute haben das Insert in einer Kopie ihres 16-ten Chromosoms (ein Allel), andere haben vielleicht das Insert in beiden Kopien des Chromosoms 16 (zwei Allele), während einige kein Insert in beiden Kopien der Chromosomen haben können (vgl. Abb. 12). Die An- oder Abwesenheit dieses Inserts kann festgestellt werden, indem man die Polymerase Kettenreaktion mit anschliessender Agarose Gel Elektrophorese einsetzt.

Da Sie eine Region der DNA amplifizieren, die sich innerhalb eines Introns befindet, wird diese DNA nie wirklich im Körper benutzt. So brauchen Sie sich keine Gedanken zu machen, wenn Sie sie nicht besitzen.

Die Primer in diesem Kit sind so zusammengestellt, dass sie eine Region innerhalb der PV92 Region einschliessen, die 641 Basenpaare lang ist, wenn das Intron die Alu Insertion nicht enthält, bzw. 941 Basenpaare lang ist, wenn die Alu Insertion vorhanden ist. Die Grössenzunahme ist auf die 300 Basenpaare zurückzuführen, die von der Alu Insertion stammen. Wenn Ihre PCR Produkte mit einer Agarose Gel Elektrophorese aufgetrennt werden, können drei unterschiedliche Ergebnisse auf dem Gel zu sehen sein.

Falls beide Chromosomen die Alu Inserts enthalten, wird jedes amplifizierte PCR Produkt 941 Basenpaare lang sein. In einem Gel werden sie mit derselben Geschwindigkeit wandern, so dass eine Bande entstehen wird, die zu den 941 Basenpaaren gehört. Falls kein Chromosom ein Insert enthält, wird jedes amplifizierte Produkt 641 Basenpaare lang sein und wird als eine Bande laufen, die zu 641 Basenpaaren gehört. Existiert ein Alu Insert in einem Chromosom, aber nicht im anderen, entsteht ein PCR Produkt mit 641 Basenpaaren und eins mit 941. Das Gel wird schliesslich zwei Banden aufweisen.

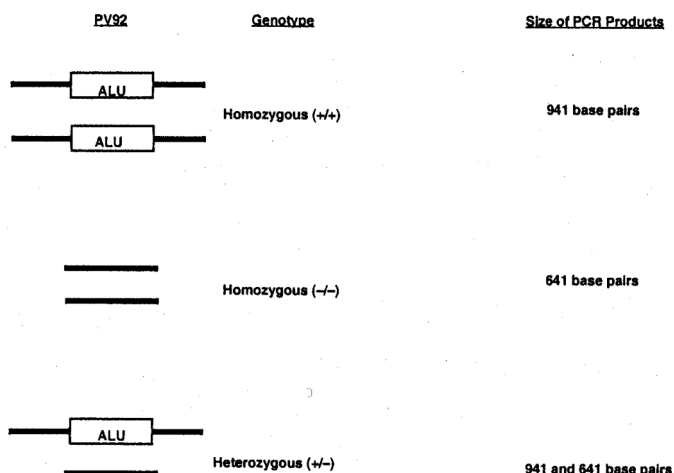


Abb. 12. Die An- oder Abwesenheit von Alu Inserts in der PV92 Region des Chromosoms 16.

Bei der Elektrophorese werden die DNA-Fragmente nach ihrer relativen Grösse (Molekulargewicht) getrennt. Die DNA-Fragmente werden auf ein Agarose Trenngel geladen, das in eine Kammer kommt, die mit einer elektrisch leitenden Pufferlösung gefüllt ist. Zwischen zwei Drahtelektroden an den beiden Enden der Kammer wird Gleichstrom angelegt. DNA-Fragmente sind negativ geladen und werden daher im elektrischen Feld vom positiven Pol angezogen und vom negativen abgestossen. Die Matrix des Agarosegels dient dabei als molekulares Sieb, durch das kürzere DNA-Fragmente leichter hindurch wandern können als grössere. Pro Zeiteinheit wandern kleinere Fragmente weiter als grössere. Fragmente der gleichen Grösse bleiben zusammen und wandern als separate DNA-„Banden“ im Gel. Im unten abgebildeten Gel (Abb. 13) werden PCR amplifizierte Banden mit 941 Bp und 641 Bp nach ihrer Grösse aufgetrennt.

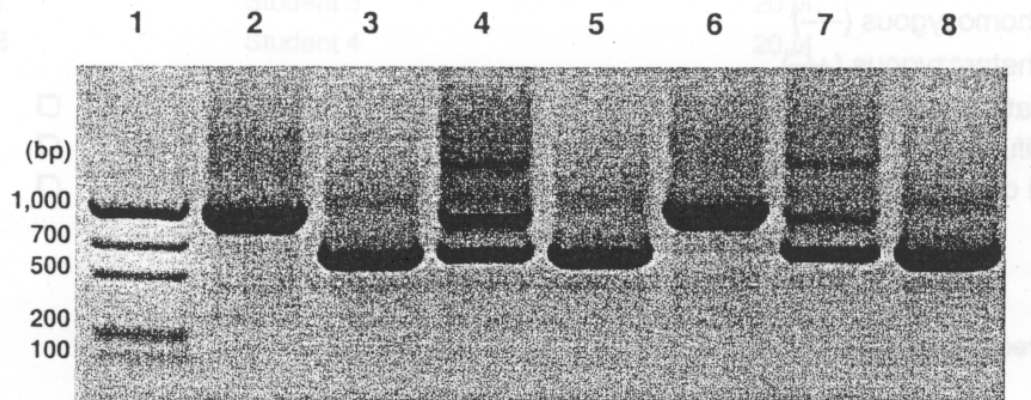


Abb. 13. Auftrennung der DNA Banden nach ihrer Grösse. Diese Gel veranschaulicht die elektrophoretische Auftrennung des EZ Load DNA molekular Massen Markers, der 1000 Bp, 700 Bp, 500 Bp, 200 Bp und 100 Bp Fragmente enthält (Reihe 1), zwei homozygote (+/+) 941 Bp Fragmente (Reihe 2 und 6), drei homozygote (-/-) 641 Bp Fragmente (Reihe 3, 5 und 8) und zwei heterozygote (+/-) 941/641 Bp Fragmente (Reihe 4 und 7).

Kernfragen zur Analyse der DNA mittels Gel Elektrophorese

1. Erklären Sie den Unterschied zwischen Intron und Exon.

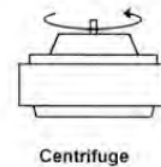
2. Warum unterscheiden sich die zwei möglichen PCR Produkte in der Grösse um 300 Basenpaare?

3. Erklären Sie, wie die Agarose Elektrophorese die DNA-Fragmente von Interesse auftrennt. Warum wandert ein kleines DNA Fragment schneller als ein grosses?

4. Welche Art Kontrollen werden in diesem Experiment eingesetzt? Warum sind Sie wichtig?

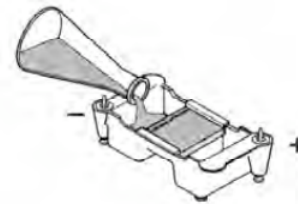
Gelelektrophorese der PCR-Produkte

14. Holen Sie Ihre PCR-Probe und stellen Sie diese in ein deckellooses Eppendorf Röhrchen. Zentrifugieren Sie kurz (5'') bei 2'000g, um alles festen Besandteile zu sedimentieren. (Die kleine Zentrifuge kann ebenfalls benützt werden).



15. Pipettieren Sie 10µl Loading Dye (Beladungsfarbe) in Ihr PCR-Röhrchen und mischen Sie sorgfältig.

16. Stellen Sie ein Agarosegel (30ml) in der Elelektrophoresekammer bereit. (Das ist für Sie bereits gemacht). Überprüfen Sie, ob die Taschen auf der Seite der schwarzen (-) –Elektrode und das Ende des Gels bei der roten (+) –Elektrode liegen.



17. Füllen Sie die Elektrophoresekammer mit 1 x TAE-Puffer. Das Gel sollte mit Puffer überdeckt sein. (Es braucht ca. 275 ml Puffer)

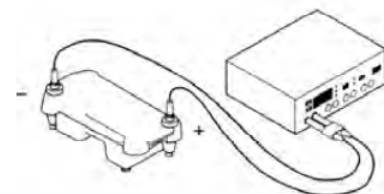
18. Beladen Sie die Taschen des Gels wie folgt, indem Sie jedes Mal eine neue Pipettenspitze verwenden:

Linie	Probe	Volumen
1	MMR (DNA-Größenstandard*)	10 µl
2	Homozygote Kontrolle (+/+)	20 µl
3	Homozygote Kontrolle (-/-)	20 µl
4	Heterozygote Kontrolle (+/-)	20 µl
5	Person 1	20 µl
6	Person 2	20 µl
7	Person 3	20 µl
8	Person 4	20 µl



* der DNA – Größenmarker besteht aus Fragmenten von 1,000 bp, 700 bp, 500 bp, 200 bp, und 100 bp.

19. Befestigen Sie den Deckel auf der Elektrophoresekammer. Schliessen Sie die Kammer mit den Kabeln an die entsprechend farbigen Eingänge des Stromgeräts an (max. 4 Elektrophoresekammern pro Gerät).



20. Stellen Sie den Strom an und lassen Sie die Elektrophorese bei 100 V für 30 Min. laufen.

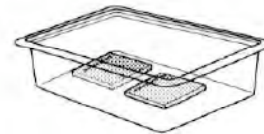


Färben des Gels

21. Wenn die Elektrophorese fertig ist, stellen Sie den Strom ab und öffnen Sie den Deckel der Kammer. Schneiden Sie die linke obere Ecke des Gels weg. Nehmen Sie sorgfältig den Einsatz mit dem Gel aus der Kammer – Vorsicht, das Gel ist sehr schlüpfrig! Schieben Sie das Gel aus dem Einsatz in eine Plastik-Färbeschale (2 Gele pro Schale).

Schnellfärbung (12 – 15 Min.)

22. Giessen Sie 120 ml 100x Fast Blast Färbelösung in Ihre Färbeschale.
23. Färben Sie das Gel für 2 Min. unter vorsichtigem Schwenken. Giessen Sie die Farbe zurück, sie kann wieder verwendet werden.
24. Überführen Sie das Gel in eine grössere Schale und waschen Sie mit warmem (40-55°C; Kontrolle mit Thermometer!) Hahnenwasser für ca. 10 Sek.
25. Entfärben Sie durch zweimaliges Waschen in warmem Hahnenwasser für je 5 Min. Schwenken Sie zwischendurch.
26. Legen Sie das fertige Gel zur Analyse auf die Durchlichtplatte und übertragen Sie die Resultate auf eine Folie. Möglicherweise dauert es eine Weile, bis die Banden gut sichtbar werden. Haben Sie etwas Geduld...;-)
27. Bestimmen Sie, ob Sie homo- oder heterozygot für das Alu-Insert sind! (+/+, +/-, -/-).
28. Die Gele können mit Klarsichtfolie abgedeckt im Kühlschrank aufbewahrt werden.



5. ANALYSE DER ERGEBNISSE

Vergleichen Sie die Banden im Gel, die ihre Proben enthalten mit den Kontrollbanden, wobei Sie den DNA Grössenmarker in beiden Gelen als Referenz einsetzen. Markieren Sie die Lage und Grösse von Fragmenten. Vergleichen Sie das Bandenmuster Ihrer DNA Proben mit dem der Kontrollen und bestimmen Sie, ob Sie homozygot (+/+), homozygot (-/-) oder heterozygot (+/-) sind. Ist Ihre Probenbahn leer, diskutieren Sie mit Ihren Klassenkameraden und der Lehrkraft die möglichen Ursachen für das Fehlen der Amplifikation.

Denken Sie daran, dass die Interpretation des Gels es Ihnen ermöglicht, Ihre genetische Konstellation nur dem **Genort** zu bestimmen, der untersucht wurde. Es gibt drei mögliche Genotypen für das Alu Insert an der Stelle, die amplifiziert wurde. Nutzen Sie die Informationen, die Sie aus dem Gel erhalten konnten und bestimmen Sie die Anzahl der Subpopulationen in der Klasse: homozygot (+/+), homozygot (-/-) oder heterozygot (+/-).

Ein bedeutender Faktor, der die Zuverlässigkeit des Nachweises durch DNA Fingerprinting in der Forensik beeinflusst, ist die Populations Genetik oder genetische Statistik. Im Menschen gibt es hunderte von Stellen oder DNA Abschnitte wie Alu, die ausgewählt und für eine Fingerprint Analyse eingesetzt werden können. Abhängig von demographischen Faktoren, wie Ethnik oder geographische Isolation, zeigen einige Populationen viel weniger Variationen in speziellen DNA-Abschnitten als andere. Der Grad der Variation hat Einfluss auf die statistischen Unterschiede, wieviel Individuen die gleiche Sequenz haben. Wenn 33% (1 von 3 Individuen) einer bestimmten Population die gleiche Häufigkeit eines bestimmten DNA Segments im Muster des DNA Fingerprints aufweisen, kann aus diesem Segment allein wenig Information über die Identität eines Individuums gewonnen werden.

Wird ein DNA Fingerprint durchgeführt, um einen Verdächtigen in einem Verbrechen oder in einer Vaterschaftsklage zu identifizieren, kann man keine 1 zu 3 ($1/3$) Chance eines Treffers in der Population einsetzen. Man braucht eine 1 zu 10 Millionen ($1/10^7$) Chance eines Treffers. Die Häufigkeit für das Auftauchen eines bestimmten DNA Patterns in einer Population wird extrem gering, wenn eine Reihe von DNA Segmenten ausgesucht und amplifiziert wird, geringer als bei nur einem Segment. Das Amplifizieren mehrerer DNA Segmente aus einer einzigen Probe genomischer DNA kann als aussagekräftige Methode dienen, um Individuen in einer Population zu unterscheiden. Damit DNA Fingerprinting als Beweis vor Gericht zugelassen wird, ist es nötig, 30 – 40 verschiedenen DNA Segmente aus mehreren Chromosomen selektiv zu amplifizieren und zu analysieren.

In der Tat wurde das Alu Insert, von dem Sie in diesem Laborversuch einen Fingerprint gemacht haben, eingesetzt, um die geographischen Wandlungsmuster verschiedener menschlicher Populationen im Verlaufe der menschlichen Evolution zu studieren. Die Daten dieser Studien wurden veröffentlicht und Ihre Proben können mit diesen Daten verglichen werden, die von viel grösseren Populationen gewonnen wurden.

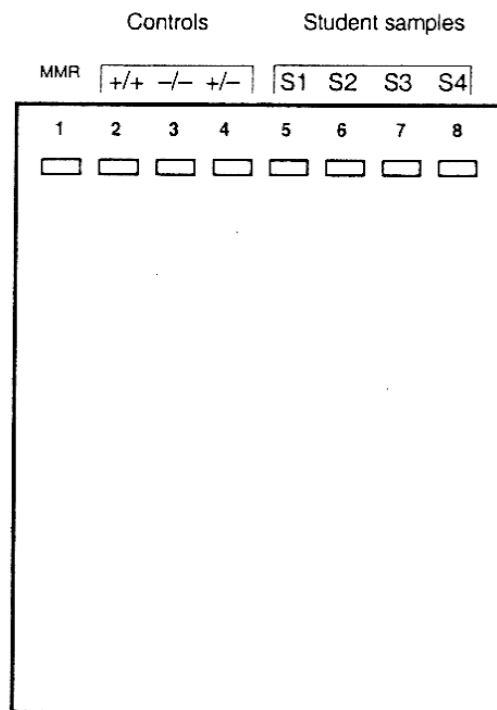
6. Anhang

Verzeichnis der wichtigsten Begriffe

Aliquot	Eine bestimmte Menge eines Materials wird in kleinere gleiche Teile aufgeteilt.
Alu	Ein kleines Stück repetitiver DNA, das die <i>Alu</i> I Restriktionsenzymstelle enthält, von der die Sequenz ihren Namen erhielt.
Annealing	Binden von Oligonukleotid Primern an komplementäre Sequenzen auf den Matrizen DNA-Strängen.
Chelatbildung	Metallionen in Lösung werden gebunden. Ein Beispiel für einen gängigen Chelatbildner ist EDTA oder Ethylen Diamin Tetraessig Säure.
Chelex™	Mikroskopisch kleine Perlen, die mit bivalenten Kationen Chelate bilden und in der InstaGene Matrix enthalten sind.
Denaturierung	Der Vorgang des Aufschmelzens von zwei komplementären DNA-Strängen. Eine in vivo Denaturierung wird von Enzymen begleitet; in der PCR Reaktion erfolgt die Denaturierung durch Hitze.
DNasen dNTPs	Verdauungsenzyme, die DNA abbauen. Gängige Abkürzungen für alle vier Desoxynukleotid Triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, DCTP), für die Synthese der DNA.
Ethidium Bromid	Ein fluoreszierendes Farbstoffmolekül, das sich zwischen die DNA Basenpaare schiebt und fluoresziert, wenn es ultraviolettem Licht ausgesetzt wird.
Eukaryonten	Organismen, die aus Zellen bestehen, die einen Nukleus besitzen, der von einer Membran umgeben ist und das genetische Material (DNA) enthält.
Exon	Die Region eines transkribierten Messenger RNA Moleküls, die zusammengespleisst wird und den Nukleus zur Translation in Proteine verlässt.
Extension	Dies bezieht sich auf einen Prozess, wobei die <i>Taq</i> Polymerase dNTPs (Desoxynukleotid Triphosphate dATP, dTTP, dCTP oder dGTP) an die Enden der Oligonukleotidprimer anhängt. Die Extension erfolgt nach den Regeln der Basenpaarung und zwar in der 5'-3'Richtung.
Genomische DNA Hardy-Weinberg Gleichung	Die Gesamtmenge an DNA, die sich in einem Zellkern befindet. Die Bedingungen, die dafür sorgen, dass eine Population seine genetischen Häufigkeiten beibehält. Diese Bedingungen sind: grosse Population, zufälliges Vermischen, keine Immigration oder Emigration, keine Mutationen und keine natürliche Selektion.
Homologe Chromosomen	Ein Paar komplementärer Chromosomen, die die gleichen genetischen Sequenzen oder Gene enthalten, wobei ein Chromosom von der Mutter und eines vom Vater vererbt wird.
InstaGene™ Matrix	Mikroskopisch kleine Perlen, die bivalente Kationen in Lösung binden. Das Binden oder Abtrennen von bivalenten Kationen verhindert, dass sie Enzymen zur Verfügung stehen, die dann die DNA Matrize abbauen könnten.
Intron	Die Region einer transskribierten Messenger RNA, die aus der mRNA gespleisst wird und nicht in Proteinsequenzen übersetzt wird.
Kofaktoren	Ionen oder kleine Moleküle, die ein Enzym benötigt, um richtig funktionieren zu können. Zum Beispiel benötigt die <i>Taq</i> DNA Polymerase Mg^{++} für seine Funktion. Mg^{++} würde daher als Kofaktor bezeichnet werden.
Lyse	Der Prozess des Aufbrechens einer Zelle, um ihre Bestandteile freizusetzen. In diesem Versuch werden menschliche Wangenzellen lysiert, um genomische DNA für die PCR Reaktionen freizusetzen.
Master Mix	Die Hauptlösung einer PCR Reaktion, die ausser der Matrizen DNA alle notwendigen Bestandteile der Reaktion enthält (dNTPs, Primer, Puffer, Salze, Polymerase, Magnesium).
Matrize	Der Strang der DNA, der die Zielsequenzen der Oligonukleotid Primer enthält und der in den komplementären Strang kopiert werden wird.
Mendel Vererbung	Zu jedem vererbten Charakteristikum besitzt ein Organismus zwei Gene, oder Allele, wobei jedes von jeweils einem Elternteil stammt. Es gibt zwei Formen von Allelen, dominant und rezessiv und dominante Allele überdecken die Expression rezessiver Allele.

Messenger RNA	Ein Typ RNA, der von genetischem Material (DNA) synthetisiert wurde und an Ribosomen bindet und in Proteine übersetzt wird.
Nukleotide	Der Grundbaustein von DNA oder RNA. Sie bestehen aus einem Zucker (Desoxyribose oder Ribose), Phosphat und Stickstoffbasen (Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin und Uracil statt Thymin in der RNA).
PCR	Polymerase Kettenreaktion („polymerase chain reaction“). Der Prozess des Vervielfachens oder der Synthese von DNA im Reaktionsgefäß.
Primer	Eine kleine Serie von Nukleotiden (normalerweise 16 – 24 Basen lang) die eine spezielle Sequenz von Nukleotiden auf der Ziel DNA erkennt. Die Primer für die Polymerase Kettenreaktion werden gewöhnlich im Labor synthetisiert.
Reagenzien	Materialien, die zur Durchführung eines Experiments benötigt werden. Es handelt sich dabei meist um Lösungen oder um Mischungen aus verschiedenen Lösungen.
Taq Polymerase	Eine hitzestabile DNA Polymerase, die aus dem hitzestabilen Bakterium <i>Thermus aquaticus</i> isoliert wurde. Diese DNA Polymerase wird für gewöhnlich in PCR Reaktionen eingesetzt.

Auftragsschema für das Gel



MMR = molecular mass ruler (DNA standard)