

# Laborbesuch Biologie-Leistungskurs in der Helene-Lange-Schule: Genetischer Fingerabdruck

## Protokoll des Laborbesuchs in der Helen-Lange-Schule vom 22.02.2022

**Anlass:** Behandlung des Themas „Genetik“ Ende Semester 1/ Anfang Semester 2. Der Kurs soll eine praktische Vorstellung davon bekommen, wie unsere eigene DNA aufgebaut ist, eine PCR funktioniert und wie man damit die eigene DNA schnell und unkompliziert untersuchen und vergleichen kann.

**Ort:** Labor der Helene-Lange-Schule

**Datum:** 22.02.2022

**Zeit:** 09:00 Uhr – 13:00 Uhr

### **Anwesende:**

Lehrer: Herr Kossenjans

Schüler: Frederik Junk, Jordan Weiß, Bosch Selo, Johannes Messow, Ronja Rickert, Lisa Wüstefeld, Pia Wendel, Gwen Ehm, Letje Beckmann, Mareen Lange, Jari Kiel, Lara Thoms, Mieke Siefert, Louisa Plinke

### **TOP 1 - Laborregeln und Geräte kennenlernen**

Der Kurs wird über die Regeln in einem Labor aufgeklärt. Es muss immer ein Kittel getragen werden, um Fremd-DNA in Form von Dreck, Staub oder Haaren auf der Kleidung zu vermeiden. Sollte diese in die Substanzen gelangen, kann dies somit das Ergebnis verfälschen.

Der Kurs wird mit den Kolbenhubpipetten, auch Mikropipetten genannt, bekannt gemacht. Diese funktionieren nach dem Verdrängungsprinzip. Sie unterscheiden sich in den Maximalvolumina. Die gelbe Pipette hat ein Volumen von 10 $\mu$ -100 $\mu$ , die grauen einmal von 100 $\mu$ -1000 $\mu$  und von 1000 $\mu$ -10000 $\mu$ . Da Mikropipetten Präzisionsgeräte sind, soll mit ihnen vorsichtig umgegangen werden.

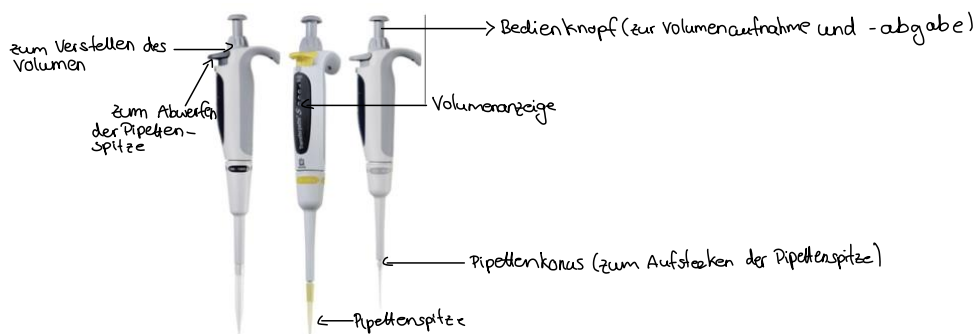


Abb.1 – 1000 $\mu$ L-Pipette

### **TOP 2 - Pipettieren lernen**

Die Schüler beginnen mit dem Pipettieren lernen mit Reaktionsgefäßen. Die Plastikspitze wird mit der Pipette aufgenommen. Der Knopf wird vor dem Eintauchen in die Substanz bis zum ersten Widerstand heruntergedrückt. Die Spitze wird nun in die Substanz gehalten, der Knopf wird losgelassen. Die Substanz wird in ein Reaktionsgefäß pipettiert, indem der Knopf ganz heruntergedrückt wird.

### TOP 3 - Isolierung von DNA aus Mundschleimhautzellen

Der Kurs beginnt mit dem Isolieren der eigenen DNA aus den Mundschleimhautzellen. Jeder Schüler beschriftet ein 2µL Reaktionsgefäß mit seinem Anfangsbuchstaben und der Tischnummer.

400µL PBS werden mit einer 1000µL-Pipette in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Danach werden 25µL PK mit einer 100µL-Pipette dazugegeben. Anschließend werden die Substanzen kurz gevortext, damit sich die Substanzen mischen.

Die Schüler machen einen Wangenabstrich ihrer Mundschleimhaut mit einem steril verpackten Wattestäbchen, indem sie für mindestens 30 Sekunden gründlich an der Innenseite ihrer Wange reiben.

Das Wattestäbchen wird nun in das Reaktionsgefäß mit den gemischten Substanzen PBS und PK gehalten, der Stiel wird abgebrochen, damit das Reaktionsgefäß geschlossen werden kann.

Der nächste Schritt besteht aus dem Vortexen des Gefäßes. Nun werden alle Gefäße für 20 Minuten bei 56°C in den Heizblock gestellt.



Abb. 2 – Heizblock

Die Lehrerin erklärt uns, wozu dieser Schritt benötigt wird. Die Proteinase K baut Proteine ab und setzt die DNA frei. Dabei liegt die optimale Arbeitstemperatur des Enzyms PK zwischen 55°C und 65°C.

In der Wartezeit beschriften alle Schüler die DNA-bindende Säule im Sammelgefäß. Die Säule mit der grünen Farbmarkierung enthält eine DNA-bindende Silica-Membran.

Nach den 20 Minuten werden die Reaktionsgefäße mit den Wattestäbchen aus dem Heizblock entnommen und erneut kurz gevortext.



Abb.3 - Vortexer

In das zusätzliche Sammelgefäß pipettieren die Schüler 210µL Ethanol mit der 1000µL-Pipette. Die gesamte Lösung wird aus dem Gefäß mit dem Wattestäbchen nun mit derselben Pipettenspitze in die Alkohol-Lösung pipettiert und durch auf- und abpipettieren vermischt.

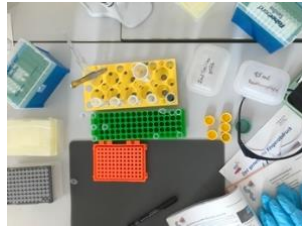


Abb.4 – Sammelgefäße und Reaktionsgefäße in Ständer

Das entstandene Alkohol-DNA-Gemisch pipettiert der Kurs in die Säule in das Sammelgefäß. Anschließend stellt die Lehrerin alle Gefäße für eine Minute bei 12000 rpm in die Zentrifuge. Wir erörtern, dass nach der Zentrifugation die DNA an das Silicagel in der Säule gebunden hat. Die durchgelaufene restliche Flüssigkeit befindet sich nun im Sammelgefäß.

Nun kippt jeder Schüler den Durchfluss in den Flüssigabfall, die Säule wird zurück ins Sammelgefäß gestellt.

Der Kurs gibt mit einer 1000µL-Pipette 500µL BW-Puffer in die Säule hinein. Dies wird bei 12.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Danach entsorgen wir den Durchfluss erneut im Flüssigabfall. Die Säule wird ins leere Sammelgefäß gestellt.

Die Schüler pipettieren 600µL B5-Puffer mit der 1000µL-Pipette auf die Säule und führen dieselben Schritte wie im Schritt zuvor aus. Die Säule wird ins Sammelgefäß gestellt und erneut für eine Minute bei 12000 rpm zentrifugiert, um die Säule zu trocknen.

Der Grund dafür wird uns erklärt. Die DNA soll sich somit im nächsten Schritt gut lösen.

Jeder Schüler beschriftet nun ein 1,5µL-Reaktionsgefäß erneut mit dem Anfangsbuchstaben und der Tischnummer. Dort wird die Säule hineingesetzt. 100µL 70°C erhitzter BE-Puffer wird zügig mittig auf die Silicia-Membran auf die Säule pipettiert.

Nach einer Minute Wartezeit wird dies für eine Minute bei 12000rpm zentrifugiert.

Es wird erläutert, dass dadurch die DNA gelöst im Eluationspuffer in das 1,5µL-Reaktionsgefäß gelangt. Der Kurs verwirft die Säule und verschließt das Gefäß mit der DNA-Lösung. In den weiteren Schritten wird diese Lösung für die PCR genutzt.

#### **TOP 4 - Ansetzen der PCR**

Jeder Schüler beschriftet ein PCR-Mix wie in den vorherigen Schritten mit seinem Anfangsbuchstaben und der Tischnummer.

Die selbst isolierte DNA-Lösung wird eine Sekunde gevortext, um die Lösung zu vermischen. 5µL dieser Lösung mit der 10µL-Pipette zu dem Mix hinzugeben. Das PCR-Reaktionsgefäß wird nun in den PCR-Cycler gestellt, das Programm „Fingerprint“ wird laufen gelassen.

Der Kurs spricht über die Inhaltsstoffe der PCR-Lösung. Enthalten sind Primer, welches kurze DNA-Einzelstränge sind, die spezifisch neben den untersuchten DNA-Abschnitten an diese binden und damit den Startpunkt für Taq-Polymerase festlegen. Die Polymerase ist daher auch enthalten. Sie ist ein Enzym und ist für die Verdopplung der DNA-Stränge zuständig (Mehr dazu in Top 7). Außerdem sind in der PCR-Mischung Farbstoffe, Glycerin, ein Puffer, Magnesiumchlorid und dNTP enthalten.



Abb.5 – PCR-Cycler

### **TOP 5 - Theorie: Fingerabdrücke klassisch und genetisch**

Der Kurs spricht zunächst darüber, wie man Menschen voneinander unterscheiden kann. Es gibt phänotypische (äußeres Erscheinungsbild) und genotypische (Alle Erbanlagen, auch nicht sichtbare) Merkmale. Wir sammeln Beispiele von DNA-Spuren an einem Tatort: Haare, Sperma, Fingerabdrücke oder Blut.

Wir werden über die Unterschiede des klassischen und genetischen Fingerabdrucks aufgeklärt. Bei dem klassischen Fingerabdruck geht es um das rein Äußerliche. Jede Fingerkuppe hat linienförmige Erhebungen, die man Papillarleisten nennen. Feiner Merkmale dieser Muster nennt man Minuzien. Diese Muster können zu einer Identifikation eines Individuums führen, denn die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fingerabdruck sich doppelt, liegt bei 1:64 Milliarden. Jedoch kann es bei der Sicherung oder Auswertung der klassischen Fingerabdrücke zu Fehlern kommen, sodass es zu einer Fehlerrate von 3-22% kommt.

Der Kurs spricht darüber, dass die DNA eines Menschen in allen Zellkernen die Gleiche ist. Diese Erbsubstanz besteht nur zu 1,5% aus Genen, die Proteine kodieren oder die Genexpression regulieren. Des Weiteren gibt es noch verschiedene DNA-Abschnitte, wie Mikro- und Minisatelliten, sowie Exons und Intron. Exons und Introns sind mit Genen verwandt. Ein Exon wird als Nukleinsäuresequenz bezeichnet, die im RNA-Molekül repräsentiert ist. Introns werden andererseits als Nukleotidsequenzen bezeichnet, die innerhalb der Gene zu sehen sind, die durch RNA-Spleißen zur Erzeugung eines reifen RNA-Moleküls entfernt werden.

Die Grundkonstruktion eines genetischen Fingerabdrucks ist immer gleich. Jedoch unterscheiden sich diese auch an den Introns jedes Individuums.



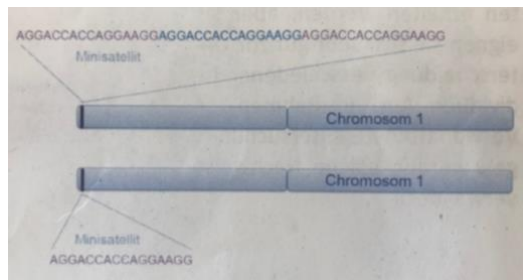


Abb. 8 – Minisatelliten D1S80 auf Chromosom 1

Wir werden aufgeklärt, dass Minisatelliten kurze Abschnitte in der gesamten DNA des Menschen sind. Verschiedene Arbeitsschritte sind notwendig, um deren Länge zu untersuchen. Nach der Isolierung der DNA müssen die Minisatelliten-Abschnitte durch die PCR kopiert und vermehrt werden. Die vermehrten Abschnitte können dann mithilfe der Agarosegelelektrophorese auf ihre Längen untersucht werden.

Außerdem wird dem Kurs erzählt, dass die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Menschen ein identisches D1S80-Muster haben, 1:100 beträgt. Es ist also nicht unwahrscheinlich, dass nichtverwandte Menschen das gleiche Muster besitzen.

### TOP 7 - Theorie zu PCR

Die Schüler sprechen nun über den Vorgang der Polymerasekettenreaktion (PCR), die DNA-Abschnitte vervielfältigen kann. Zu Beginn wird die DNA-Lösung auf 95°C erhitzt. Dadurch werden die Wasserstoffbrücken voneinander getrennt, der Doppelstrang spaltet sich in zwei Einzelstränge. Es handelt sich hierbei um eine reversible Strukturveränderung, man spricht von einer Denaturierung.

Nun wird die Lösung abgekühlt, sodass sich die Primer bei ungefähr 62°C über die Wasserstoffbrücken an komplementäre Stellen der DNA-Einzelstränge anlagern. Dies wird *primer annealing* genannt.

Die optimale Arbeitstemperatur des Enzyms Taq-Polymerase liegt bei 72°C. Die Lösung wird also erneut erhitzt. Dieses Enzym synthetisiert ausgehend von den angelagerten Primern in 5' → 3' – Richtung neue komplementäre DNA-Stränge, sodass am Ende wieder ein DNA-Doppelstrang entsteht. Dafür benötigt es die desoxy-Nucleosid-triphosphate dATP (Adenin), dTTP (Thymin), dGTP (Guanin) und dCTP (Cytosin), die vier Bausteine der DNA. Diesen Vorgang bezeichnet man als Elongation.

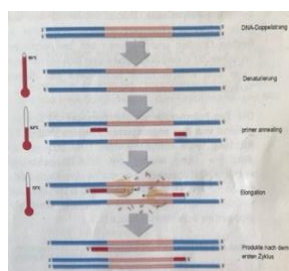


Abb.9 – Ablaufschema des ersten Zyklus einer PCR

Im ersten Zyklus werden aus einem Doppelstrang zwei Stränge, in den weiteren Verläufen werden die DNA-Moleküle immer verdoppelt, sodass die DNA exponentiell vermehrt wird. So können nach 35 Zyklen viele Millionen DNA-Moleküle gebildet werden.

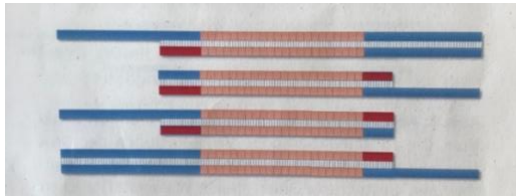


Abb. 10 – PCR-Produkte nach 2 Zyklen

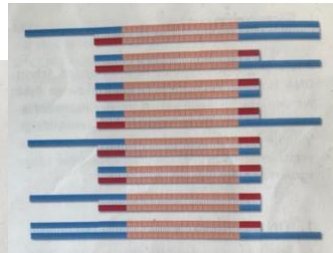


Abb.11 – PCR-Produkte nach 3 Zyklen

### TOP 8 - Gießen eines Agarosegels

Zu Beginn dieses letzten Schrittes führt der Kurs die Schritte vorerst mit einem Probegel aus. Das Probegel befindet sich in einer Petrischale. Diese wird, sodass die Taschen des Gels bedeckt sind, mit Wasser gefüllt.

Nun werden 25 $\mu$ L der Probelösung mit der 100 $\mu$ L-Pipette aufgenommen und mit der gefüllten Pipettenspitze vorsichtig senkrecht in einer der Taschen des Probegels eingetaucht (ca.2 mm tief). Dabei soll das Gel nicht durchstochen werden.

Jeder Schüler pipettiert die Probelösung langsam in eine Tasche des Gels, der Pipettenknopf soll nur bis zum ersten Druckpunkt heruntergedrückt werden. Der Knopf bleibt gedrückt und die Pipettenspitze wird aus der Tasche herausgezogen. Danach kann der Knopf losgelassen werden.

Diesen Vorgang führt jeder Schüler in mehreren Taschen durch.

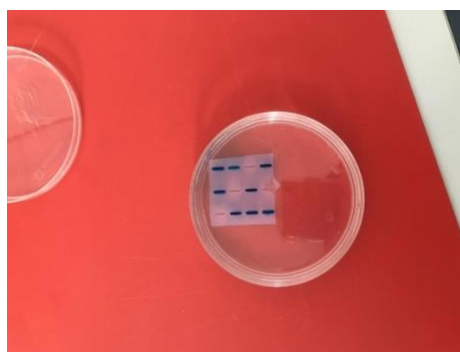


Abb.12 – Probegel mit gefüllten Taschen

Nun beginnt der Kurs mit dem Beladen des Agarosegels mit den PCR-Produkten.

Das Agarosegel in der Gelapparatur wird mit so viel TAE-Puffer übergossen, dass alle Geltaschen mit dem Puffer bedeckt sind.



Jeder Schüler pipettiert 25 $\mu$ L seiner eigenen PCR-Probe in eine Geltasche des Agarosegels. Dabei wird die Reihenfolge der Proben der jeweiligen Schüler auf dem Gelauftragsbogen notiert.



Abb.13 – Schülerin befüllt Tasche des Agarosegels mit PCR-Lösung

Außerdem wird in jede Reihe zusätzlich ein Längenstandart aufgetragen.

Alle Schüler haben ihre Proben in die Geltaschen gefüllt. Nun wird die Elektrophorese durch das Anlegen der elektrischen Spannung von 100 V gestartet.

Nach 30 Minuten wird diese durch das Abschalten der Spannung beendet.

Das Gel wird nun im letzten Schritt unter UV-Licht gelegt, wodurch die DNA-Banden sichtbar gemacht werden.

### **TOP 9 - Theorie: Gelelektrophorese**

Der Kurs unterhält sich nun über die Abläufe und Funktionsweise der Gelelektrophorese. Mit dem Verfahren der Agarosegelelektrophorese kann man die Länge der vererbten DNA-Abschnitte feststellen und unterscheiden. Dabei werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe sortiert. Agaroselösungen gelieren nach dem Abkühlen, daher gießt man sie in eine Form, aus der man sie nach dem Erstarren lösen kann. Bei diesem Vorgang bilden die langkettigen Polysaccharide ein feinmaschiges Netz.

Nachdem man die DNA-Probe in eine vorgeformte Tasche des Gels pipettiert hat, wird eine elektrische Spannung eingelegt. Nun bewegt sich die negativ geladene DNA im elektrischen Feld zum Pluspol. Bei diesem Vorgang muss die DNA durch das Netz aus Polysaccharidketten wandern, wobei sich kleinere DNA-Stücke schneller bewegen, als längere. Nach 30 Minuten wird die Spannung entfernt, wodurch die DNA-Stückchen in ihrer Position verharren.



Durch einen speziellen Farbstoff können die nach ihrer Länge getrennten DNA-Stückchen sichtbar gemacht werden, indem er sich an die DNA angelagert und fluoresziert. Wird das eingefärbte Gel mit UV-Licht durchstrahlt, zeigen sich die getrennten DNA-Stücke als fluoreszierende Banden.

### TOP 10 – Auswertung der Experimente



Abb.14 – Bandenmuster unter UV-Licht

Die Schüler werten zuletzt ihre Bandenmuster aus. Links ist der Längenstandard zu sehen. Anhand der Position der DNA-Stückchen kann man die Anzahl der Basenpaare erkennen. Längere Basenpaare sind oben und kürzere weiter unten zu sehen, wie bereits erklärt. Außerdem wird zwischen hetero- und homozygot entschieden.



Abb.15 – Biologie-Leistungskurs, 12. Klasse im Biologielabor