



UNIVERSITÉ DE FRIBOURG
UNIVERSITÄT FREIBURG

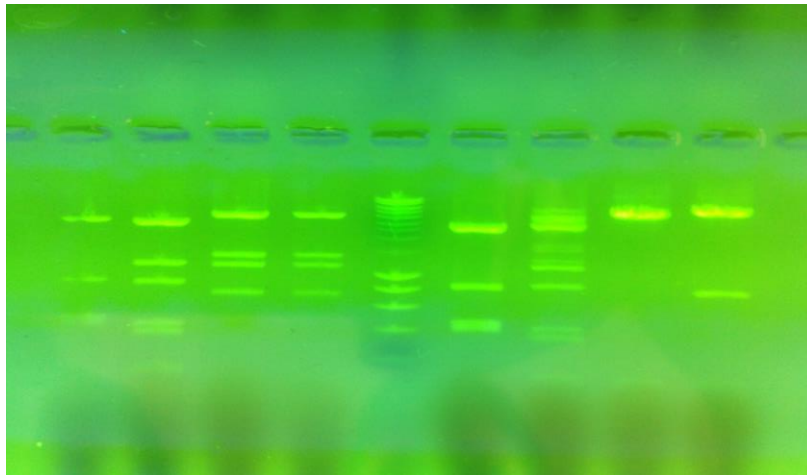
Themenkoffer: DNA

Eine Zusammenarbeit der Universität Freiburg
und dem Naturhistorischen Museum Freiburg

DNA in medizinischen Diagnosen

Leitfaden für die Lehrperson

Léonard Cardinaux, Adrien Pairraud, Marie-Pierre Chevron



Überarbeitung : Luc Le Grand, Catherine Pfister Aspert, Lisa Schild
Dank : D^r Peter Wandeler, Jean-Christophe Lallement

Einführung

Mit dem Themenkoffer « DNA » und dem Kit der « École de l'ADN de Nîmes » kann in der Klasse die Technik des RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) erprobt werden. Vier Szenarien werden angeboten (zwei davon nur auf Französisch):

- Szenarium A (nur auf Französisch):
L'ADN dans la **résistance bactérienne aux antibiotiques** : Identification d'une souche bactérienne grâce à son profil ADN
- Szenarium B :
DNA in medizinischen Diagnosen: Erkennung einer genetischen Krankheit beim Patienten und Analyse der Mutation.
- Szenarium C :
DNA in kriminalistischen Untersuchungen: Erstellung des genetischen Profils von drei Verdächtigen, welche mit der an einem Tatort gefundenen genetischen Probe verglichen wird.
- Szenarium D (nur auf Französisch):
L'ADN dans l'**identification et classification d'espèces**: Identification d'une espèce grâce à son profil ADN et construction d'un arbre phylogénétique

Die Dossiers für die SchülerInnen beinhalten Experimentprotokolle, begleitet von Theorie. Sie sind auf der Website des Museums verfügbar: <http://www.fr.ch/mhn/de/pub/ecoledna-koffer.htm>

Dieser Leitfaden für LehrerInnen greift detailliert jeden Schritt des Experiments des Szenariums C „DNA in medizinischen Diagnosen“ auf. Indem er auf heikle Punkte hinweist, sollte er Ihnen ermöglichen, Probleme vorzusehen und während der Arbeit intervenieren zu können

Informationen über das Material, die Produkte und ihre Funktion im Experiment sind in Blau geschrieben. Es wird geraten, insbesondere die Punkte, die die Sicherheit der SchülerInnen betreffen (Midori Green, UV-B Strahlung), genau zur Kenntnis zu nehmen.

Auch eine Interpretation der Resultate ist in diesem Dokument enthalten.

Wir hoffen, Themenkoffer und Dossiers entsprechen Ihren Erwartungen und denjenigen Ihrer SchülerInnen und wünschen Ihnen, geschätzte Kolleginnen und Kollegen, gelungene Untersuchungen als Gen-Experten.

Ablauf (Vorschläge) :

Vorschlag 1

- ⤴ Teil 1 : (90 min)
 - Lektüre des Protokolls
 - Enzymatische Verdauung
 - Theorie

- ⤴ Teil 2 : (90 min)
 - Vorbereitung des TAE-Buffer
 - Vorbereitung des Agarose-Gels
 - Elektrophorese
 - Theorie
 - Visualisierung der Fragmente

- ⤴ Teil 3 : (45 min)
 - Analyse der Resultate

Vorschlag 2

- ⤴ Teil 1 : (45 min)
 - Theorie
 - Lektüre des Protokolls
 - Gebrauch der Mikropipetten
 - Beschriftung der Microtubes

- ⤴ Teil 2 : (90 min)
 - Vorbereitung des TAE-Buffer
 - Vorbereitung des Agarose-Gels
 - Enzymatische Verdauung
 - Elektrophorese
 - Visualisierung der Fragmente

- ⤴ Teil 3 : (45 min)
 - Analyse der Resultate

Material:

Koffer 1 (schwarz) :

UV-Kammer
UV-Lampe
Zentrifuge
Micropipetten (5x 20µl, 5x 200µl)
Microtubes-Halter (2x)
Kabel
Generator für Elektrophorese
Heizbares Trockenbad mit Aluminiumblock
UV-Kammer-Scheibe mit Lichtblende
Elektrophoresenkuvette
Gel-Giessform (1x) mit Kämmen (2x)
Pipetten-Spitzen
Microtubes
Latex-Handschuh
Agarose
Midori Green
Buffer TAE **50X** (Tris-Acetate, EDTA)



Koffer 2 (orange):

LED Illuminator
Magnetrührer/Heizplatte
Zentrifuge
Micropipetten (6x 20µl, 6x 200µl)
Microtubes-Halter (2x)
Kabel
Generator für Elektrophorese
Heizbares Trockenbad mit Aluminiumblock (2x)
Unterlage für das Giessen des Gels
Elektrophoresenkuvette
Gel-Giessform (6x) mit Kämmen (4x)
Pipetten-Spitzen
Microtubes
Latex-Handschuh
Agarose
Midori Green
Buffer TAE **50X** (Tris-Acétate, EDTA)



Zusätzliches Material (nicht im Koffer enthalten) :

Mikrowellenherd, Präzisionswaage, Erlenmeyer, destilliertes steriles Wasser

Inhalt des Kits :

Bei der „École de l'ADN de Nîmes“ zu bestellen: <http://www.ecole-adn.fr/>

Kit « Empreinte et diagnostic génétiques: polymorphisme et restriction »

- ♣ DNA (3 Typen)
- ♣ Verdauungspuffer 10X
- ♣ Restriktionsenzyme (PstI, XhoI)
- ♣ Ladepuffer
- ♣ Grössenmarker

Das Kit "Empreinte et diagnostic génétique: polymorphisme de restriction" enthält verschiedene DNA-Probe. Dabei handelt es sich um genetische Konstrukte aus DNA-Plasmiden mit verschiedenen DNA-Fragmenten von Mäusen. Dank diesen Konstrukten können im Unterricht die Benutzung der RFLP-Technik zur Herstellung eines DNA-Profiles demonstriert werden. Diese Profile werden in der Praxis in der Identifikation von Personen (kriminalistische Untersuchungen), bei der Suche nach Mutationen (Diagnostik von genetischen Krankheiten) oder zur Bestimmung von Verwandtschaft (Stammbaum, Vaterschaftstests,...) verwendet.

Anleitung

Vorbereitung des TAE

Der erste Schritt besteht darin, den TAE-Puffer, der für das Agarose-Gel und das Elektrophorese-Bad, in welchem das Gel liegen wird, benötigt wird, vorzubereiten.

✦ TAE :

TAE besteht aus einer ionischen Lösung (Tris, Acetat, EDTA), welche Strom leitet. Es ist ein basischer Puffer mit der Eigenschaft, die DNA in ihrer entprotonierten (negativ geladenen) Form zu erhalten und den Zerfall der DNA mittels Deaktivierung gewisser Enzyme teilweise zu verhindern.

Aus Transportgründen wird der Puffer konzentriert geliefert (TAE 50X). Er muss daher mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1/50 verdünnt werden (10ml TAE 50X auf 500ml H₂O -> TAE 1X). Es werden benötigt: 60 ml für das Gel, 500 ml, um das Elektrophorese-Gefäss anzufüllen (wiederverwendbar, nach Gebrauch aufzubewahren). Da ein Teil des Puffers durch das Verdunsten, die Elektrolyse und bei der Handhabung des Gels verloren geht, sollten insgesamt etwa 600 ml vorbereitet werden. Für einen zweiten Gebrauch reichen im Normalfall 100 ml für die Vorbereitung des Gels und die Vervollständigung des wiederverwerteten Puffers aus dem Elektrophorese-Gefäss.

Zubereitung des Agarose-Gels

✦ Agarose:

Agarose ist ein Agar-Agar-Polymer. In einem Lösungsmittel erwärmt, bildet es durch seine Repolymerisierung ein (je nach Konzentration) mehr oder weniger festes Gel. In diesem Gel werden später die DNA-Fragmente nach ihrer Grösse getrennt. Die Agarose-Konzentration für die Zubereitung des Gels hängt von verschiedenen Faktoren ab: Grösse der zu trennenden Fragmente, gewünschte Qualität der Auflösung, verfügbare Zeit. Für das vorliegende Experiment wird ein Agarosegel zu 0.67% empfohlen.

Benötigte Mengen (hängt von der Grösse der Gel-Giessform ab):

| Gel-Giessform | Agarose | TAE 1X | Midori Green |
|-------------------|---------|--------|--------------|
| 100 ml (Koffer 2) | 0.65 g | 100 ml | 10 µl |
| 80 ml (Koffer 2) | 0.55 g | 80 ml | 8 µl |
| 60 ml (Koffer 1) | 0.4 g | 60 ml | 6 µl |
| 50 ml (Koffer 2) | 0.35 g | 50 ml | 5 µl |
| 20 ml (Koffer 2) | 0.15 g | 20 ml | 2 µl |

Agarose mit TAE 1X mischen und zum Kochen bringen (zum Beispiel im Mikrowellenherd). Um das Verdampfen möglichst zu begrenzen, wird vorzugsweise ein Erlenmeyer-Kolben von 100 ml verwendet. ACHTUNG: Die Lösung schäumt beim Kochen auf und überläuft schnell! Sie muss daher aufmerksam überwacht und bei Blasenbildung sofort dem Ofen entnommen werden (Achtung vor möglichen Spritzern, lange Ärmel und Handschuhe tragen). Agarose kann einen Gelatine-artigen Satz am Boden des Gefässes bilden. Dieser kann durch leichtes Kreisen aufgelöst werden. Danach die Lösung nochmals zum Kochen bringen bis eine klare Lösung entsteht.

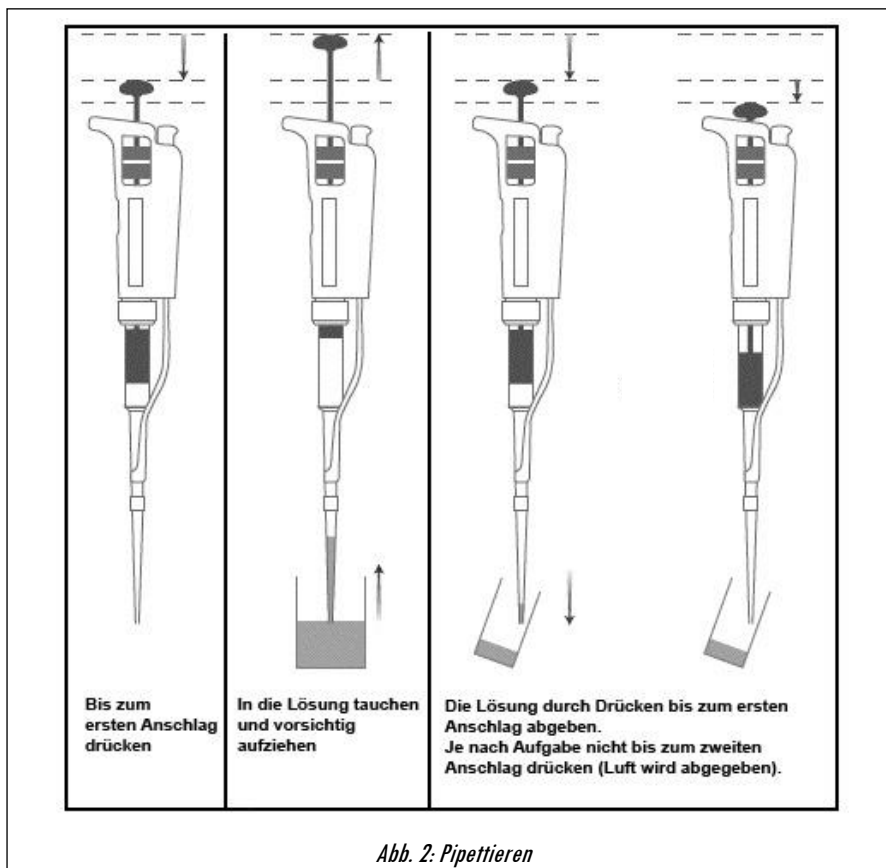
Die Agaroselösung 1 bis 2 Minuten abkühlen lassen und dann Midori Green der Lösung hinzufügen und durch Bewegung darunter mischen. Das Gel wird in die Form gegossen und die Kämme zur Bildung der Slots befestigt. Das Ganze wird bei Raumtemperatur auf einer ebenen Fläche bis zur Polymerisierung stehen gelassen. (In Koffer 1 wird die Giessform direkt im Elektrophoresengefäss gegossen. Dabei muss die Giessform um 90 Grad gedreht werden, damit die Agaroselösung nicht rausfließen kann. Vergessen Sie nicht, das Gel vor dem Füllen in Migrationsposition zu bringen.)

✧ MIDORI GREEN

Midori Green wird als DNA-Marker verwendet. Es hat die Eigenschaft, sich an DNA zu binden und bei Bestrahlung mit UV-Licht zu fluoreszieren. Die Fähigkeit zur Interkalation (Einlagerung zwischen zwei Stückchen DNA) dieser Substanz rührt von seiner **mutagenen Wirksamkeit** her. Sie kann daher auch krebserregend und teratogen sein. Die Exposition beim Umgang mit dem Gel ist relativ schwach (sehr schwache Konzentration, was aber nicht von der absoluten Pflicht, Handschuhe zu tragen, befreit). Dagegen muss bei der Vorbereitung des Gels eine konzentrierte Lösung MidoriGreen pipettiert werden. Ich rate Ihnen daher, diesen Schritt selbst durchzuführen.

Dadurch, dass Midori Green farbig ist, eignet es sich gut, den SchülerInnen damit das Pipettieren vorzuzeigen, so dass sie sich vorstellen können, wie ein μl -Volumen in einer Pipettierspitze aussieht. So können spätere Mess-Fehler verhindert werden. Es ist wichtig, genügend Zeit für die Einführung in dem Umgang mit Mikropipetten aufzuwenden (Abb. 2).

Zu Übungszwecken können die SchülerInnen versuchen $1\mu\text{l}$ Wasser auf eine glatte Oberfläche (Tisch, Tischset) zu pipettieren. So können sie sich mit den Pipetten und den Volumen vertraut machen.

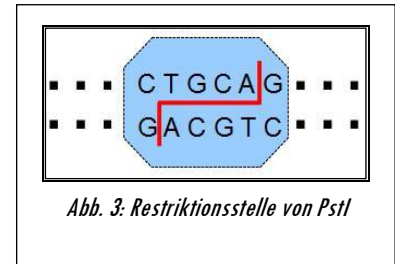


Wegwerfbares Material, welches in Kontakt mit Midori Green kam, muss direkt in den Behälter für kontaminierte Abfälle (Plastikbehälter) gelegt werden. Wieder verwendbares Material mit Ausnahme der Mikropipetten müssen gründlich mit Seife und demineralisiertem Wasser gereinigt werden (das Tragen von Handschuhen ist auch hier obligatorisch).

Enzymatische Verdauung:

✦ **Restriktionsenzyme:**

DNA kann mit verschiedenen Restriktionsenzymen in Fragmente geschnitten werden. Jedes dieser Enzyme erkennt eine spezifische Restriktionsstelle (üblicherweise palindromische Nukleotiden-Sequenz, Abb. 3), bindet sich an dieser Stelle an und katalysiert eine Hydrolyse-Reaktion. Temperatur und pH-Wert werden kontrolliert, um die Kinetik der Reaktion zu begünstigen: Sie wird bei 37°C in einer auf einen pH von 7,5 gepufferten Lösung durchgeführt. Bemerkenswerterweise haben die meisten in Laboratorien benutzten Enzyme eine optimale Kinetik bei sogenannten „physiologischen“ Konditionen.



Vor der Präparierung der Proben müssen die Microtubes mit Etiketten beschriftet oder mit permanentem Stift nach einer zuvor erstellten Inhalts-Liste nummeriert werden. Jede Gruppe braucht einen handlichen Abfallbehälter für die gebrauchten Pipetten-Spitzen und Microtubes. Dafür können einfache Bechergläser verwendet werden, welche am Schluss der Stunde in den Behälter für kontaminierte Abfälle geleert werden.

✦ **Produkte und Konzentrationen:**

Die Menge an Verdauungs-Lösung wird durch das Volumen der Slots bestimmt, in unserem Fall 20 µl. Die Menge an zu verdauender DNA wiederum wird in Funktion zum Volumen der Slots und der Größe der zu trennenden Fragmente gewählt. Bei unseren Parametern sind etwa 100 ng DNA pro Slot (8 µl der im Kit gelieferten Lösung) nötig. Von der Verdauungspuffer-Lösung schliesslich, welche 10x konzentriert ist, werden 2 µl beigefügt. Bei diesen Bedingungen ist 1 µl konzentrierte Enzym-Lösung genügend für eine effiziente Verdauung.

Für ein Gesamtvolumen von 20 µl heisst die Zusammensetzung also: 9 µl destilliertes Wasser, 8 µl DNA, 2 µl de Verdauungspuffer und 1 µl Enzym. Die präparierten Lösungen mit den verschiedenen DNAs und verschiedenen Enzymen werden einige Sekunden zentrifugiert, damit sie sich gut durchmischen.

✦ **Zentrifugierung:**

Dieser Arbeitsschritt entfernt Luftbläschen aus dem Gemisch und treibt die an der Wand der Microtubes klebenden Mikrotröpfchen zusammen. Beim Arbeiten im Mikroliter-Bereich ist dieser Schritt essenziell für die Homogenität der verschiedenen Bestandteile in der Lösung. Bei jeder Zentrifugierung ist es wichtig, darauf zu achten, dass jedes Muster dort am Rotor angehängt wird, wo gegenüber ein Muster mit derselben Masse hängt (Gegengewicht). Ein schlechtes Gleichgewicht führt zu Vibrationen, welche den Rotor beschädigen können.

Nach der Zentrifugierung werden die Proben 45 Minuten bei 37°C inkubiert (minimal 20 Minuten). Danach können sie im Tiefkühler gelagert oder direkt für die Elektrophorese verwendet werden.

✦ **Verdauungszeit:**

Die Lieferanten empfehlen normalerweise eine Inkubationszeit von mindestens 45 Minuten, um sicherzustellen, dass die Verdauung komplett ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit, abhängig von der Begegnungsfrequenz von Substrat (nicht hydrolysierte DNA) und Enzymen, ist in den ersten Minuten besonders hoch und nimmt dann rapide ab. Um unser Experiment in einer Praktikums-Stunde von 90 Minuten durchzuführen, kann die Verdauungszeit deutlich reduziert werden, ohne das Endresultat zu sehr zu beeinträchtigen.

Elektrophorese:

Wenn das Agarose-Gel polymerisiert ist, können die Kämme, welche die Slots formen, vorsichtig entfernt und das Gel in Migrations-Position in den Behälter gesetzt werden. Das Gel ist sehr glitschig und empfindlich – daher muss dieser Arbeitsschritt vorsichtig ausgeführt werden (das Gel auf der Seite mit dem Finger sichern, **Handschuhe sind obligatorisch**). Die beiden Seiten des Gefäßes werden mit TAE bis auf Höhe des Gels angefüllt. Das Gel wird nun ein paar Millimeter hoch mit TAE bedeckt. Allfällige Luftblasen in den Slots können mit einem leichten Ruck resp. Klopfen oder durch Absaugen mit der Pipette entfernt werden.

Nach der Inkubation werden den hydrolisierten DNA-Proben 4µl Ladepuffer hinzugefügt.

⤴ Ladepuffer:

Der Ladepuffer erhöht die Dichte der Lösung, damit sie unten in den Slots bleibt. Er enthält auch einen Farbstoff, damit man das Einfüllen visuell kontrollieren und den Fortschritt der Migration beobachten kann. Man präpariert einen Überschuss (in unserem Fall 24 µl für eine Füllung von 20 µl), um die Verdunstung zu kompensieren. Im Labor umgeht man dieses Problem, indem auf Eis (bei Temperaturen um 0°C) gearbeitet wird.

Die Proben können nach kurzem Zentrifugieren (einige Sekunden) in die Slots gefüllt werden. Man fügt normalerweise einen Grössenmarker (in einem separaten Slot) hinzu, anhand dessen man die Grösse der durch die Verdauung erhaltenen Fragmente ermitteln kann.

⤴ Grössenmarker:

Ein Grössenmarker ist eine Lösung, welche zusätzlich zu den Proben in einen weiteren Slot gegeben wird. Er enthält DNA-Fragmente bekannter Grösse. Nach der Migration werden diese mit den untersuchten Fragmenten verglichen (Abb. 4). Der Grössenmarker wird üblicherweise in einen Slot am Rand gefüllt, direkt gefolgt von den zu analysierenden Proben (nicht vergessen, die Reihenfolge der Proben zu notieren).

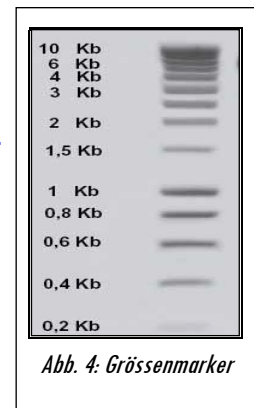


Abb. 4: Grössenmarker

Die Phase des Einfüllens ist heikel und muss sorgfältig durchgeführt werden. Das gewünschte Volumen (5 µl Grössenmarker, 20 µl jeder Probe) wird langsam pipettiert, so dass sich keine Luftbläschen in der Pipetten-Spitze bilden. Letztere führt man vorsichtig in den Slot ein, möglichst tief, aber ohne Boden und Ränder zu beschädigen. Die Füllung wird ganz langsam aus der Pipette entleert, um die Flüssigkeit möglichst wenig zu verwirbeln. Es ist wichtig, beim ersten Einrasten des Pipettenkolbens (oder minim später) das Füllen zu stoppen, um keine Luftblase in den Slot zu injizieren – das hätte zur Folge, dass die Füllung in den TAE verdrängt und stark verdünnt würde.

Nach dem Füllen der Slots wird der Deckel möglichst ohne Erschütterung und Verschieben des Systems geschlossen. Sobald nun die Spannung aktiviert wird, wandert die negativ geladene DNA in Richtung Anode.

⤴ Anode, Kathode und Elektrolyse:

Sobald der Apparat unter Spannung steht, findet bei den Elektroden eine Elektrolyse von Wasser statt (beobachtbar durch die Blasen-Bildung: Sauerstoff bei der Anode, Wasserstoff bei der Kathode). Man spricht von der Anode in ihrer chemischen Definition als Stelle, an der oxidierende Prozesse ablaufen. Die Anode ist mit dem positiven Pol des Generators verbunden.

Der Apparat wird also auf der Seite der Slots mit dem negativen Pol verbunden. Die Spannung ist auf 100 V einzustellen (die Stromstärke passt sich automatisch dem Widerstand des Mediums an). Die verwendete Agarose-Konzentration und die Art der in dieser Untersuchung verwendeten Fragmente ergibt eine Migrationszeit von ungefähr 30 Minuten. Danach sind die Fragmente genügend geteilt.

Visualisierung der Fragmente:

Koffer 1 -> UV-Licht:

⤴ **UVB-Strahlung:**

Das in die DNA eingebettete Midori Green fluoresziert im UVB-Licht (270 – 290 nm). Diese Strahlen verursachen eine Bräunung und Alterung der Haut und es können je nach Exposition (Dauer, Intensität) schwere Verbrennungen auftreten. Die Strahlung schädigt auch die Augen (Zerstörung der äusseren Zellen des Augapfels, was bis zur Erblindung führen kann). **Die UV-Lampe darf darum nur in der dafür vorgesehenen UV-Kammer eingeschaltet werden.**

⤴ **UV-Kammer:**

Die UV-Kammer des Koffer 1 besteht aus einer Lampe auf einer Plastik-Box, welche mit Schutzglas und Abdeckung ausgerüstet ist, um zu verhindern, dass während dem Beobachten Licht von aussen in die Kammer eindringt. Die zu untersuchenden Gels werden durch einen Vorhang in die Kammer gelegt. Dieser verhindert ebenfalls das Eindringen von Umgebungslicht und schützt die Beobachtenden vor UV-Strahlung.

Wenn die Migration durch Abschalten des Generators gestoppt worden ist, wird das Gel (immer noch gleich glitschig und empfindlich) vorsichtig auf dem Träger aus dem Bad genommen und man lässt es vom Träger in die UV-Kammer.

Wenn der Vorhang geschlossen ist, kann die Lampe eingeschaltet und das Gel durch das Schutzglas beobachtet werden. Das Gel wird vertikal gelesen, die Slots oben. Es ist auch möglich, für eine spätere Analyse der Resultate durch das Schutzglas fotografische Aufnahmen zu machen.

Koffer 2 -> LED-Licht:

Im Koffer 2 ist es nicht nötig das Gel aus dem Bad herauszunehmen. Der LED-Illuminator kann einfach auf die Kuvette gelegt werden.

Das Gel wird vertikal gelesen, die Slots oben. Es ist auch möglich, für eine spätere Analyse der Resultate durch das Schutzglas fotografische Aufnahmen zu machen.

Aufräumen:

Die Handschuhe, Pipettenspitzen und Tubes können im normalen Abfall entsorgt werden.

Alles Material **mit Ausnahme der Pipetten** wird gründlich mit Seife gewaschen (Handschuhe tragen), getrocknet und am richtigen Ort im Koffer verstaut.

Der TAE des Bades kann im Elektrophorese-Gefäss für weiteren Gebrauch kühl gelagert werden. Falls er nicht nochmals benutzt wird, muss er mit den kontaminierten Abfällen entsorgt werden.

Das Gel kann ebenfalls kühl gelagert werden, bedeckt von TAE, um die Austrocknung zu verhindern. Dazu nicht allzu viel TAE verwenden, um die Diffusion von Midori Green möglichst gering zu halten. Es kann zum Beispiel in die Giessform gelegt und mit 5ml TAE bedeckt werden. Falls das Gel nicht nochmals benutzt wird, muss es mit den kontaminierten Abfällen entsorgt werden.

Interpretation der Resultate:

Für die Analyse der Resultate können Fotografien vom Gel im UV-Licht gemacht werden. Es ist aber möglich, dass ihre Qualität nicht allzu gut ist und auf den Bildern bestimmte Banden, welche man von Auge sieht, nicht sichtbar sind. Es ist daher empfehlenswert, die SchülerInnen auf einem Rasterpapier die Banden aufzeichnen zu lassen (mit Grössenmarker beginnen, dann Positionen der verdauten Fragmente im Verhältnis dazu).

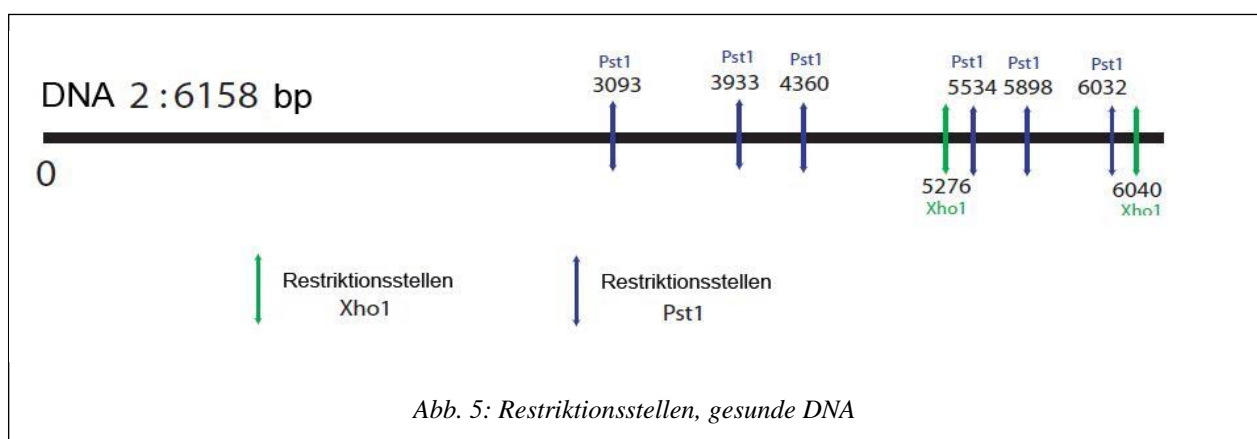
- ✦ **DNA-Profil für den Nachweis von Mutationen im Genom (Substitutionen, Deletionen, Duplikationen):** Hier wird mit kodierenden und sehr konservierten DNA-Regionen gearbeitet (Im Gegenteil zur Identifikation von Individuen, wo möglichst variable Regionen angeschaut werden, siehe Protokoll C – kriminalistische Untersuchungen).
- ✦ Um ein DNA-Profil zum Nachweis von Mutationen herzustellen, arbeitet man mit DNA, welche durch **PCR** vervielfältigt wurde:
Bei einer genetischen Krankheit sind heute die implizierten Gene meist bekannt und sequenziert. Man kennt also die genaue DNA-Sequenz der verantwortlichen Gene und kann sie durch PCR amplifizieren. Bei dieser Methode wird die gewünschte DNA-Sequenz durch kleine, künstlich hergestellte DNA-Sequenzen als Anfangsstücke (Primer) und einem Enzym (DNA-Polymerase) vervielfältigt, damit man sie anschliessend studieren kann.

DNA1 ist die durch PCR vervielfältigte DNA des Patienten.

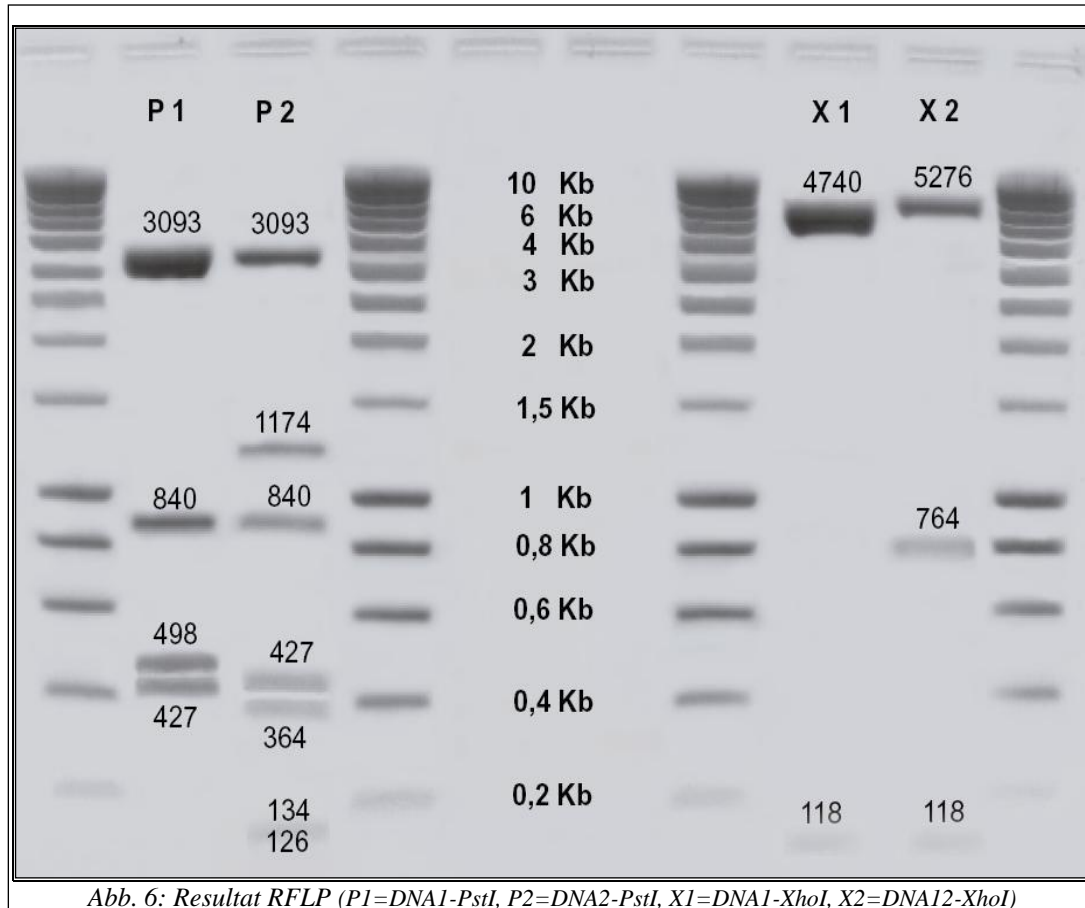
DNA2 ist die Referenz-Probe einer gesunden Person.

DNA1 ist eine DNA-Probe einer von einer monogenen Erbkrankheit wie der Duchenne-Muskeldystrophie betroffenen Person. Bei einer qualitativen Auslesung der Resultate kann bestimmt werden, dass DNA 1 mutiert ist (einfacher Vergleich der RFLP-Profile, da die kodierenden Regionen des Genoms in der Regel von Individuum zu Individuum stark konserviert sind.)

In Klassen mit hohem Niveau kann von den SchülerInnen eine weitergehende Interpretation verlangt werden. Tatsächlich kann aus der Analyse der Restriktionsprofile die Restriktionskarte von DNA 1 rekonstruiert werden. Die SchülerInnen können somit die Art der Mutation bestimmen (hier eine Deletion), indem sie die Grösse und die Stelle der Mutation auf der DNA ermitteln. Dafür brauchen sie die Restriktionskarte von DNA 2, der Referenz-DNA (Abb.5).



Gewisse Fehlerquellen können die Resultate verzerren und ihre Interpretation erschweren. In einem solchen Fall kann den SchülerInnen ein typisches Resultat (Abb. 6) zur Verfügung gestellt werden.



⤴ **Fehlerquellen :**

In manchen Fällen ist es möglich, dass die Banden, welche zu den DNA-Fragmenten mit kleinem Molekular-Gewicht gehören, nicht oder nur schwach auf dem Agarose-Gel sichtbar sind, konkret die Fragmente zu 118 bp und 317 bp. Das kommt vor allem davon, dass, je kleiner die Fragmente sind, umso kleiner auch die Quantität (Masse) an DNA in den Banden ist. Des Weiteren diffundieren die kleinen Fragmente leicht ins Gel, was die Sichtbarkeit nochmals abschwächt.

Es kann auch vorkommen, dass die DNA-Hydrolyse durch die Restriktions-Enzyme nur teilweise abläuft. Dieses Phänomen äussert sich in überzähligen, normalerweise nur schwach sichtbaren Banden von Fragmenten mit hohem Molekular-Gewicht (6158 oder 4858 bp).

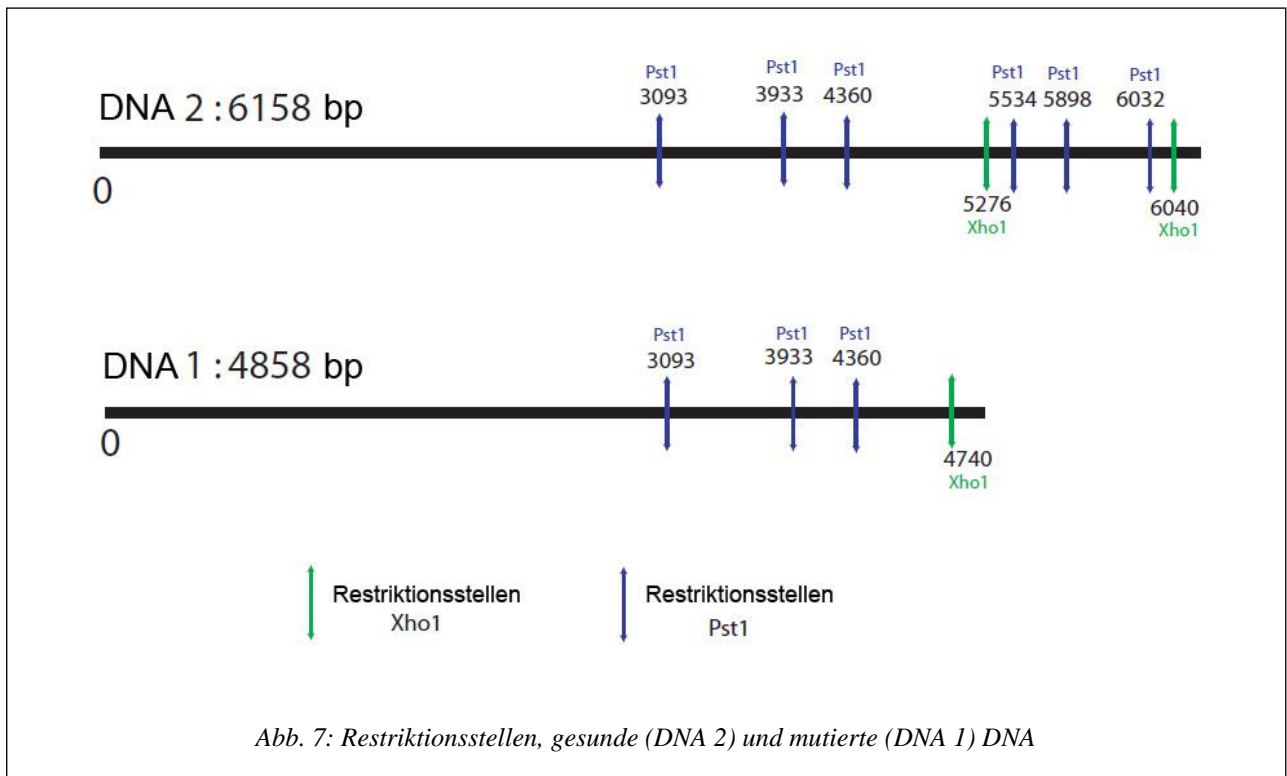
Die Elektrophorese der hydrolysierten Proben zeigt folgende Fragmente:

- ⤴ DNA1, PstI (P1) : 3093pb, 840pb, 498pb, 427pb
- ⤴ DNA2, PstI (P2) : 3093pb, 1174pb 840pb, 427pb, 364pb, 134pb, 126pb
- ⤴ DNA1, XhoI (X1) : 4740pb, 118pb
- ⤴ DNA2, XhoI (X2) : 5276pb, 764pb, 118pb

Wenn man die Grösse der durch Verdauung erhaltenen Fragmente addiert, kann man schliessen, dass DNA1 etwa 1300 bp kürzer ist als DNA2, und daraus, dass die Mutation eine **Deletion** ist.

Die Analyse der mit XhoI erhaltenen Profile zeigt, dass die XhoI-Stelle auf Position 5276 bei DNA 2 auf DNA 1 nicht vorhanden ist. Daraus kann geschlossen werden, dass die Deletion in der Nähe dieser Restriktionsstelle anzusiedeln ist.

Die mit PstI erhaltenen Profile präzisieren die Analyse. Die Fragmente zu 3093, 840 und 427 bp sind bei beiden DNAs gleich. Die Banden zu 1174, 364, 136 und 126 bp von DNA 2 fehlen beim Profil von DNA 1. Die drei letzten PstI-Restriktionsstellen sind also verloren gegangen (Abb. 7).



Da die XhoI-Stelle bei 6040 bp erhalten geblieben ist, kann man folgern, dass die Deletion zwischen 6032 und 6040 bp endet. Mittels der bekannten Größe des deletierten Fragments (1300 bp) kann der Beginn der Deletion bei 4732 - 4740 bp ermittelt werden. Schliesslich kann man noch das Vorhandensein einer Bande zu 498 bp bei DNA1 erklären, welcher auf der DNA2 Sequenz einem Teil vom Fragment zu 1174 bp, welches einem Teil des Fragments zu 126 bp zugeordnet ist, entspricht.