

Vaterschaftsanalyse mit blueGel Elektrophoresekammer



Dieser Versuch schlägt eine Brücke zwischen der klassischen Genetik mit ihren Mendelschen Regeln und dem Konzept der Allele auf der einen Seite und der molekularen Genetik auf der anderen Seite. Darin geht es um das genetische Verfahren der Vaterschaftsanalyse, so wie es heute zum Einsatz kommt. Dabei helfen wir einer Meute von Junghunden auf der Suche nach ihrem Vater.

Biologie

Mikrobiologie & Genetik

Klassische Genetik

Biologie

Mikrobiologie & Genetik

Molekulare Genetik



Schwierigkeitsgrad

mittel



Gruppengröße

-



Vorbereitungszeit

10 Minuten



Durchführungszeit

30 Minuten

Diese Inhalte finden Sie auch online unter:



<https://www.curriculab.de/c/67ecf82e55012900024493ff>



Lehrerinformationen

Anwendung



Gos d'Atura (katalanischer Hütehund)

Ein gesunder Hund besitzt in der Regel **78 Chromosomen** (39 Chromosomenpaare). Mit Ausnahme der Geschlechtschromosomen trägt jedes Paar **dieselben Erbinformationen**. Dennoch treten innerhalb der Gene häufig **kleine Unterschiede** auf – sogenannte **Allele** –, die entweder **dominant** oder **rezessiv** vererbt werden können. Solche **genetischen Variationen** führen zu **heterozygoten Genotypen** und machen die **Individualität jedes Hundes** aus. Unterschiede dieser Art lassen sich gezielt für **Vaterschaftstests** nutzen.

Bei einer Vaterschaftsanalyse vergleicht man die DNA des Welpen mit der DNA der möglichen Vater. Eine wichtige Methode, um Unterschiede in der DNA sichtbar zu machen, ist die **Gelelektrophorese**.

Sonstige Lehrerinformationen (1/4)

Vorwissen



Die Lernenden sollten bereits mit den **Eigenschaften der DNA** vertraut sein und die Begriffe **Chromosom, Genom, Genotyp, Phänotyp** und **Allel** kennen und anwenden können. Weiterhin sollten sie bereits wissen, wie eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) funktioniert und das Prinzip der Gelelektrophorese kennen. Auch sollten die Schülerinnen und Schüler vorab das Pipettieren üben.

Prinzip



Die DNA-Proben von **Rüde (möglicher Vater)** und **Welpen (Nachkommen)** werden auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Bandenmuster werden miteinander verglichen und so bestimmt, ob der Welpe das Erbgut in sich trägt. Verwendet man die SeeGreen 3-in-1 Agarosetabletten, interkaliert der in den Tabletten enthaltene SYBR-Green Fluoreszenzfarbstoff mit der DNA. Der Farbstoff wird durch das spezielle Licht der blueGel™ Gelkammer angeregt und bringt so die DNA zum Leuchten.

Sonstige Lehrerinformationen (2/4)

Lernziel



Die Lernenden sollen durch diesen Versuch die Funktionsweise der Gelelektrophorese kennen und verstehen lernen. DNA wird mit Hilfe dieser Methode der Größe nach aufgetrennt und sichtbar gemacht.

Aufgaben



Die Lernenden stellen ein Agarosegel der vorgegebenen Konzentration her und tragen die verschiedenen DNA-Proben auf. Die Auftrennung kann live beobachtet und mit Hilfe der Kamera eines Smartphones oder Tablets selbstständig dokumentiert werden. Die Lernenden können anschließend bestimmen, ob die einzelnen Welpen das Erbgut des Rüden in sich tragen.

Sonstige Lehrerinformationen (3/4)



blueGel-Elektrophoresegerät mit
Dunkelhaube und Live-Bild

Hinweise zur Vorbereitung und Durchführung

- Das Video links zeigt die Herstellung eines Gels, den Zusammenbau des Systems und ein Beispiel einer DNA-Auftrennung.
- Bei Verwendung der SeeGreen-Tabletten bitte beachten, dass in der Tablette bereits TBE-Salz enthalten ist. Es darf kein weiteres Salz zusätzlich hinzugegeben werden. Zur Tablette muss lediglich die in dem Beipackzettel angeführte Menge deionisiertes Wasser zugegeben werden.
- Der Laufpuffer muss ebenfalls ein TBE-Puffer sein und sollte eine Konzentration von 1x haben. Wir empfehlen dem Lehrpersonal den Puffer vorab zu verdünnen und an die Schüler Aliquots zu verteilen.

Sonstige Lehrerinformationen (4/4)

Versuchsvarianten und Anmerkungen



- Zum Aufkochen des Gels wird der Gebrauch einer Mikrowelle empfohlen, es kann aber auch eine Heizplatte verwendet werden.
- Der Versuch kann auch mit Gelen aus einzelnen Komponenten (Agarose, TBE oder TAE) durchgeführt werden und die DNA-Banden mit einer Methylenblau-Lösung angefärbt werden. Allerdings ist hier die Beobachtung der Auftrennung in Echtzeit nicht möglich.
- Da Pipettieren kleinster Mengen nicht einfach ist, wird empfohlen diese Prozedur vorab mit den Lernenden zu üben.
- Wenn Sie die DNA-Proben mehr als 24 Stunden vor dem Unterricht vorbereiten, lagern Sie die Röhrchen bis zur Verwendung im Kühlschrank.

Sicherheitshinweise

PHYWE
excellence in science



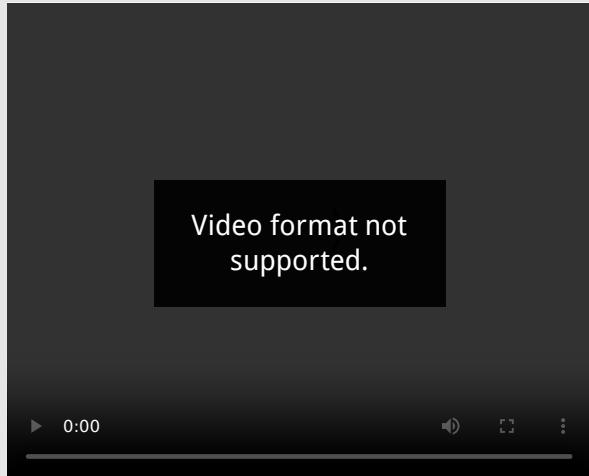
- Für diesen Versuch gelten die allgemeinen Hinweise für das sichere Experimentieren im naturwissenschaftlichen Unterricht.
- Für H- und P-Sätze bitte das Sicherheitsdatenblatt der jeweiligen Chemikalie hinzuziehen.
- Das in den SeeGreen-Tabletten verwendete SYBR-Green stellt eine sichere Alternative zum herkömmlichen Ethidiumbromid dar. Es kann nicht die Haut, aber durch offene Wunden in das Gewebe eindringen. Daher wird zum Gebrauch von Nitril-Handschuhen geraten.
- Agarosegele, die den Inhalt der SeeGreen-Tabletten enthalten, können im regulären Hausmüll entsorgt werden.

PHYWE



Schülerinformationen

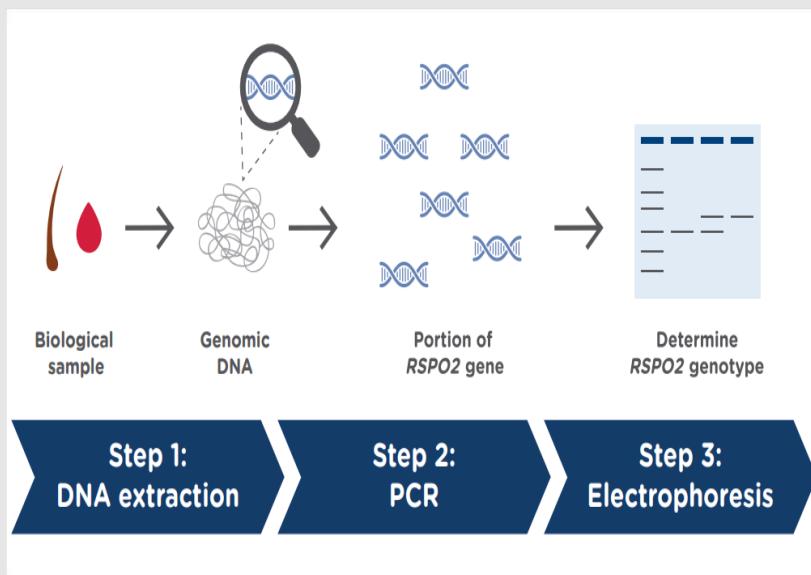
Motivation (1/4)



Molly, der Labradoodle, hat dich mit einem Wurf Welpen überrascht! – aber wer ist der Vater? Auf diese Fragen können molekularbiologische Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Agarose-Gelektrophorese eine eindeutige Antwort geben.

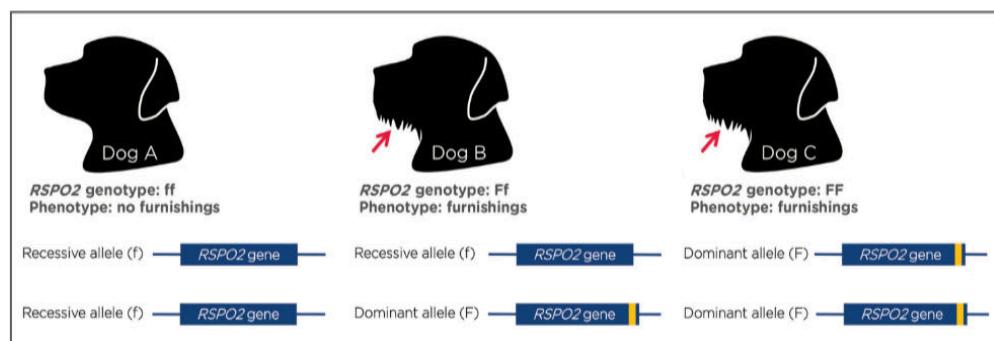
Die **DNA enthält Gene**, die als Bauplan für Proteine dienen und Merkmale wie das **Aussehen eines Hundes** bestimmen. Der **Genotyp** beschreibt die genetische Ausstattung, der **Phänotyp** die sichtbaren Merkmale, die auch von Umweltfaktoren beeinflusst werden können. Im Experiment wird die **Fellstruktur im Gesicht** („furnishings“) untersucht, die vom **RSPO2-Gen** gesteuert wird. Es gibt zwei Allele: ein dominantes Allel (F), das zur Ausbildung der Fellstruktur führt, und ein rezessives Allel (f), das zu keiner speziellen Fellstruktur führt.

Motivation (2/4)



Um den **Genotyp** eines Hundes zu bestimmen, reicht es oft nicht aus, nur das Aussehen zu beobachten. Deshalb wird ein **Gentest** durchgeführt. Zuerst wird DNA aus einer biologischen Probe (z.B. Haar oder Blut) entnommen. Diese DNA wird mithilfe der **PCR (Polymerase-Kettenreaktion)** vervielfältigt. Danach erfolgt eine Analyse über die **Gelektrophorese**, bei der DNA-Fragmente nach ihrer **Länge getrennt** werden. Da sich die beiden Allele des RSPO2-Gens in ihrer Länge unterscheiden, kann man so feststellen, welche Allele ein Hund trägt.

Motivation (3/4)



Das RSPO2-Gen bestimmt die Fellstruktur bei Hunden und besitzt zwei Varianten (Allele): ein dominantes Allel (F) mit einer Insertion von 167 Basenpaaren, das zur Ausbildung einer speziellen Fellstruktur führt, und ein rezessives Allel (f) ohne diese Insertion, das zum Fehlen der speziellen Fellstruktur führt. Hunde erben jeweils ein Allel von jedem Elternteil. Bereits eine Kopie des dominanten Allels (F) reicht aus, damit die Fellstruktur ausgebildet wird. Nur Hunde mit zwei rezessiven Allelen (ff) zeigen keine Fellstruktur.

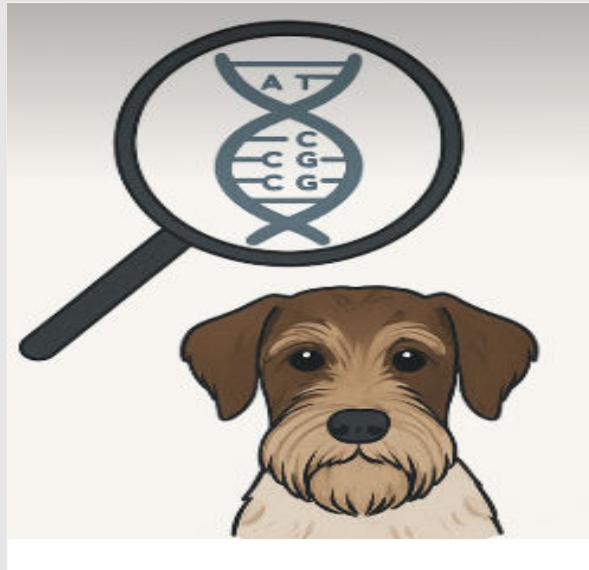
Motivation (4/4)



DNA-Banden der Hundeproben im Agarosegel

Die **Gelelektrophorese** ist ein wichtiges Verfahren, um **DNA-Fragmente** sichtbar zu machen und **nach ihrer Größe zu trennen**. DNA-Moleküle sind **negativ geladen**, weil sie Phosphatgruppen enthalten. Wenn man ein elektrisches Feld anlegt, **wandern sie durch ein Gel in Richtung des Pluspols (Anode)**. Dabei bewegen sich **kleinere Fragmente schneller und weiter** als größere, wodurch sich ein typisches **Bandenmuster** ergibt. Nach dem Lauf wird die DNA eingefärbt, sodass die Banden sichtbar werden. Jede Bande steht für ein DNA-Stück bestimmter Größe. Durch den **Vergleich der Bandenmuster** von verschiedenen Proben kann man z. B. feststellen, ob ein Welpe mit einem bestimmten Hund verwandt ist.

Aufgaben

PHYWE

1. Gieße ein 2%-iges Agarosegel: beachte, dass die Agarose-Tablette bereits Agarose, den Fluoreszenzfarbstoff und TBE-Salz beinhaltet, es also nur deionisiertes Wasser zugegeben werden muss.
2. Lade die DNA-Proben in die Geltaschen und starte die Elektrophorese.
3. Vergleiche die Bandenmuster und versuche zu bestimmen, ob der Genotyp des Welpen mit dem des möglichen Vaters übereinstimmt.

Material

Position	Material	Art.-Nr.	Menge
1	blueGel™ Gel - Elektrophoresekammer mit Netzteil und eingebauter Belichtungseinheit	35017-99	1
2	Vaterschaftsanalyse über DNA-Profile, Elektrophorese	15312-04	1
3	SeeGreen™ Agarose Tabs™, 3-in-1 Agarose Tabletten, für Gel-Elektrophorese, für 16 Gele	35018-71	1
4	Mikroliterpipette 2-20 µl, autoklavierbar	47141-10	1
5	Spitzen, Kunststoff (PP) 2-200 µl, 1000 Stück	47148-01	1
6	Erlenmeyerkolben, Boro, Weithals, 100 ml	46151-00	1
7	Messzylinder, Boro, hohe Form, 100 ml	36629-00	1
8	PCR Einzelgefäße, 0,2 ml, 100 Stück, im Beutel	35928-01	1
9	Ständer für 8 x 0,2 ml Einmalreaktionsgefäße	37652-01	1
10	TBE-Elektrophoresepuffer, 1000 ml, 10-fach konz. Lösung	35018-73	1
11	Wasser, destilliert, 5 l	31246-81	1
12	Schutzbrille "classic" - OneSize, Unisex	39316-00	1
13	Handschuhe, Gummi, Größe M, Paar	39323-00	1
14	Messpipette, 25 ml, Teilung 0,1 ml	36602-00	1
15	Pipettierball, Flip-Modell, Pipetten bis 100 ml	36592-00	1

Aufbau (1/2)

PHYWE



Video: Gießen eines Gels

- Das 10x konzentrierte TBE-Laufpufferkonzentrat mit deionisiertem Wasser auf 1x verdünnen (für ein Gel werden etwa 30 ml Puffer benötigt).
- Gieße ein 2%iges Agarosegel (beachte hierzu auch das Video 1). Ein 2%iges Agarosegel ist etwas schwieriger zu gießen, eignet sich aber besser für die Trennung kleinerer DNA-Fragmente.
- Entnehme ein SeeGreen Agarose Tab aus der Packung und gib sie in den Erlenmeyerkolben.
- Gib 40 ml deionisiertes Wasser zur Tablette und koch sie beides auf (Mikrowelle oder Heizplatte).
- Stecke eine Gelschale in die Gießplattform und einen Kamm in die Gelschale (Kamm befindet sich unterhalb der Gießplattform).

Aufbau (2/2)

PHYWE

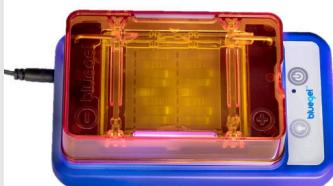


Fertiges Gel, bereit zum Beladen

- Gieße nun 20 ml des flüssigen Gels in die Schale und lasse das Gel aushärten (etwa 10 Min.). Daraus folgt, dass zwei Gele mit den 40 ml flüssigen Gels gegossen werden können.
- Nach Erkalten des Gels den Kamm vorsichtig senkrecht aus dem Gel ziehen.
- Stelle die Gelschale nun in die Pufferkammer der Basiseinheit.
- Fülle ausreichend 1x TBE Laufpuffer in die Pufferkammer, so dass das Gel überschichtet ist.

Durchführung (1/3)

PHYWE



Video: Das Gel laden und laufen lassen

Laden und Lauf des Gels (hierzu auch Video 2 beachten):

- Stelle die 2 µl – 20 µl Pipette auf 15 µl und steck eine gelbe Pipettenspitze auf die Pipette.
- Lade die DNA-Proben in folgender Reihenfolge auf das Gel: (siehe nächste Folie). Dabei ist zu beachten, dass für jede DNA-Probe eine neue Pipettenspitze aufgesetzt werden muss um Kreuzkontamination der Proben zu vermeiden.
- Sauge mit der Pipette nun 15 µl einer Probe in eine Spitze und überführe vorsichtig den Inhalt in eine Tasche.

Durchführung (2/3)

PHYWE
excellence in science

DNA-Proben

Lade die Proben in folgender Reihenfolge auf das Gel:

- Röhrchen L: 15 µl DNA-Leiter 1 → Spur 1
- Röhrchen A: 15 µl DNA von Astro → Spur 2
- Röhrchen B: 15 µl DNA von Buster → Spur 3
- Röhrchen C: 15 µl DNA von Chewy → Spur 4
- Röhrchen D: 15 µl DNA von Daisy → Spur 5
- Röhrchen E: 15 µl DNA von Elsa → Spur 6
- Röhrchen F: 15 µl DNA von Flora → Spur 7
- Röhrchen G: 15 µl DNA von Ginger → Spur 8

Durchführung (3/3)

PHYWE

Laufen des Gels

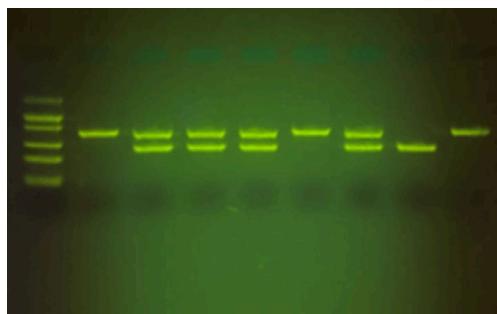
- Stecke den transparenten Deckel auf die Basiseinheit und starte den Lauf durch Drücken der „An/Aus“ Taste.
- Setze die Dunkelkammer vorsichtig über den Deckel (siehe dazu auch das Foto links).
- Durch Drücken der „Licht“ Taste aktivierst du das blaue Licht und kannst nun die Auftrennung der Proben verfolgen. Mit Hilfe eines Smartphones oder Tablets kannst du die Auftrennung auch Filmen oder durch Fotografieren dokumentieren.
- Nach etwa 20 Minuten ist die Auftrennung abgeschlossen.

PHYWE

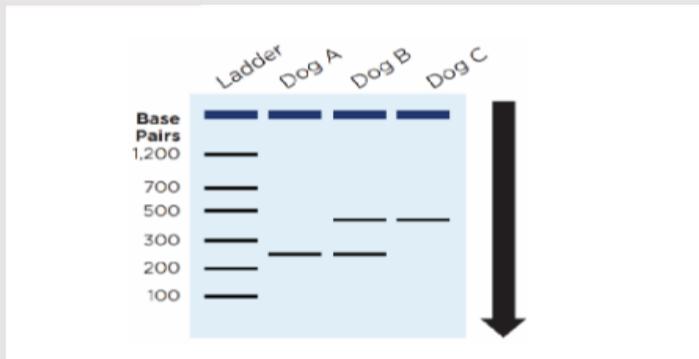
Protokoll

Aufgabe 1

Das dominante Allel enthält eine **Insertion von 167 Basenpaaren**. Dadurch ist das PCR-Produkt für (f) ca. 250 bp lang und für (F) ca. 400 bp. Die Banden im Gel zeigen dann den Genotyp: Eine Bande bei 250 bp bedeutet (ff), eine bei 400 bp bedeutet (FF), und zwei Banden (250 und 400 bp) bedeuten (Ff). Somit lässt sich aus dem Gelbild sowohl der **Genotyp** als auch der **Phänotyp** eines Hundes klar ablesen. Vergleiche deine Ergebnisse mit dieser Information.



DNA-Banden im Agarosegel



Aufgabe 2

Was geschieht während einer Gelelektrophorese?

- Auf trennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe.
- Je höher die Agarosekonzentration, desto schlechter wird der Strom durch die Kammer geleitet.
- DNA-Fragmente werden ohne Farbstoff sichtbar.
- Auf trennung der DNA-Fragmente nach ihrer Ladung.

Überprüfen

Aufgabe 3

Was ist ein Genotyp?

- Die genetische Ausstattung eines Tieres – also welche Gene bzw. Allele es besitzt
- Die Umweltbedingungen, unter denen ein Tier lebt
- Das Verhalten eines Tieres im Alltag
- Die sichtbaren Merkmale eines Tieres, zum Beispiel Fellfarbe oder Augenform

Überprüfen

Aufgabe 4

Welches Gen bestimmt, ob ein Hund diese besondere Fellstruktur hat?

- MYO5A-Gen
- RSPO2-Gen
- OCA2-Gen
- MC1R-Gen

Überprüfen

Aufgabe 5

PHYWE

Ergänze die korrekten Wörter

DNA ist [] geladen und wandert im elektrischen Feld zur []. Die DNA ist eine Doppelhelix.

Durch Wasserstoffbrückenbindungen paaren sich [] und Thymin, sowie Cytosin und [].

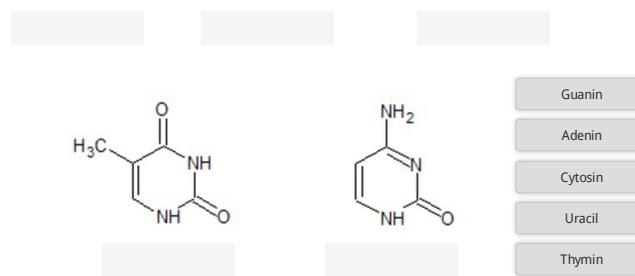
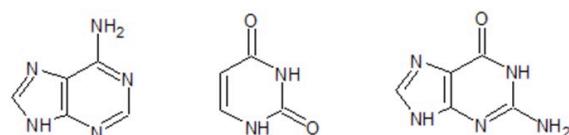
Das kurz mit [] abgekürzte Laborverfahren ermöglicht die millionenfache Vervielfältigung von DNA-Abschnitten in kurzer Zeit.

Überprüfen

Aufgabe 6

PHYWE

Ordne den Basen ihren Namen zu



- Guanin
- Adenin
- Cytosin
- Uracil
- Thymin

Überprüfen

Folie	Punktzahl / Summe
Folie 22: Prinzip Gelelektrophorese	0/1
Folie 23: Unbenannt: Multiple Choice	0/1
Folie 24: Unbenannt: Multiple Choice	0/1
Folie 25: Eigenschaften DNA	0/5
Folie 26: Ordne den Basen ihren Namen zu	0/5

Gesamtsumme

 **0/13** Lösungen Wiederholen**16/16**