Versuch zur Hundegenetik (Vaterschaftstest)

Unmengen von Labradoodles

Inhalt

Erste Schritte
Auf einen Blick
Anforderungen an die Unterrichtszeit
Komponenten des Kits
Zusätzlich benötigte Materialien
Vorbereitung für Lehrkräfte

Leitfaden für Lernende
Hintergrundinformationen
Der heutige Versuch
Laborprotokoll für Lernende
Fragen zum Studium vor dem Versuch
Fragen nach dem Versuch

Leitfaden für Lehrkräfte
Erwartete Ergebnisse
Troubleshooting
Hinweise zur Versuchsdurchführung
Bibliographie

Auf einen Blick

Molly, der Labradoodle, hat dich mit einem Wurf Welpen überrascht! Untersuche mit Hilfe der Genetik die Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp bei Mollys Welpen zu bestimmen und dabei den wahrscheinlichsten Vater.

Übersicht zur Versuchsdurchführung

Dieser Versuch bietet den Lernenden eine Einführung in die Mendelsche Genetik. Die Lernenden analysieren mithilfe der Gelelektrophorese DNA-Proben aus dem Überraschungswurf der Welpen, um die Vererbung eines einzelnen Merkmals zu verfolgen, und verwenden diese Informationen dann, um den Vater der Welpen zu bestimmen (**Vaterschaftstest**).

TECHNIKEN	THEMEN
Mikropipettieren	Mendelsche Vererbung
Gelelektrophorese	Vom Genotyp zum Phänotyp
	Biotechnologie

Planen Sie Ihre Zeit

Vorbereitung für die Lehrkraft: 30 min.
Gelelektrophorese + Ergebnisanalyse: 45 min.

Anforderungen an die Unterrichtszeit

Schritte des Protokolls		Erforderliche Zeit
Davor	Gele herstellen	Wir empfehlen, dass die Lehrkraft die Gele außerhalb des Unterrichts vorbereitet (siehe Seite 7). Planen Sie 30 Minuten Unterrichtszeit ein, wenn Sie die Schüler die Gele vorbereiten lassen wollen.
1	Gel laden	10 Minuten
2	Gel laufen lassen	15-25 Minuten Das Gel muss während dieser Zeit nicht aktiv überwacht werden.
3	Ergebnisse interpretieren	5 Minuten

Bestandteile des Kits

Wird im Kit geliefert (Art.-Nr. 15312-04, Versuch P8110801)

- Der Kit enthält DNA-Proben für acht Laborgruppen.
- Bei Aufbewahrung im Gefrierschrank können die Reagenzien nach Erhalt 12 Monate lang gelagert werden. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank können die Reagenzien bis zu 6 Monate nach Erhalt gelagert werden.
- Reagenzien für die Zubereitung von Gelen, Plastikröhrchen für die Verteilung der Proben an einzelne Gruppen und Pipettenspitzen sind separat erhältlich. Einzelheiten finden Sie auf der nächsten Seite.

Inhalt	Zur Verfügung gestellt	Erforderlich pro Gruppe	Lagerung
Simulierte DNA-Proben • DNA von Astro • DNA von Buster • DNA von Chewy • DNA von Daisy • DNA von Elsa • DNA von Flora • DNA von Ginger • DNA von Hugo	je 150 µl	je 15 µl	Gefrierschrank
DNA-Leiter 1	150 µl	15 µl	Gefrierschrank

Zusätzlich benötigte Materialien

Elektrophorese-Reagenzien und Kunststoffe separat erhältlich

- Für dieses Labor werden 2%ige Agarosegele mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (*z.B.* SeeGreen™, Art.-Nr. 35018-71 oder 35018-72) benötigt.
- 1,5 ml Einzelgefäße oder 0,2 ml Einzelgefäße (Röhrchen)
- TBE-Elektrophoresepuffer (z.B. TBE-Elektrophoresepuffer, 1000 ml, 10-fach konz. Lösung, Art-Nr. 35018-73)

Erforderliche Ausrüstung

- Dieses Labor kann mit jedem horizontalen Gelelektrophorese-System in Kombination mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (*z. B.* SeeGreen™) und einem Transilluminator, der mit dem verwendeten DNA-Farbstoff kompatibel ist, durchgeführt werden.
- Fluoreszierende DNA-Färbungen erfordern in der Regel eine Beleuchtung mit blauem Licht (~470 nm) oder UV-Licht (~260 nm).
- Dafür eignet sich am einfachsten das blueGel-Gelelektrophoresegerät (35017-99), denn es enthält neben der Elektrophoreseeinheit, dem Gelgießstand und dem Stromversorgungsgerät auch den Transilluminator, alles in einem Gerät.

Andere vom Benutzer bereitgestellte Materialien

- Destilliertes Wasser
- Mikrowelle oder Kochplatte
- Hitzebeständiger Kolben oder Becher
- Einweg-Laborhandschuhe
- Schutzbrillen
- Permanentmarker mit feiner Spitze

Vorbereitung für Lehrkräfte

Übersicht

Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die Vorbereitung der Lehrkräfte, und die folgenden Seiten enthalten detaillierte Anweisungen.

Vorbereitung	Erforderliche Zeit	Zeitleiste
Reagenzien dosieren	10 Minuten	Kann bis zu einer Woche vor der Verwendung fertiggestellt werden.
Vorbereitung von Elektrophoresepuffer und Agarosegelen	20 Minuten	Unterschiedlich - Bei Verwendung der Gelreagenzien von miniPCR können die Gele bis zu fünf Tage vor der Verwendung vorbereitet werden. Bei Verwendung des oben erwähnten TBE-Pufferkonzentrats kann dieser Schritt auch von den Lernenden durchgeführt werden, denn es ist lediglich ein Messkolben und eine Pipette erforderlich.

Reagenzien dosieren

- Die DNA-Proben können bis zu einer Woche im Voraus entnommen und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- Dieses Kit enthält ausreichend Reagenzien für acht Laborgruppen.

Benötigte Materialien

Aus dem Kit (im Gefrierschrank aufbewahrt):

- DNA von Astro
- DNA von Buster
- DNA von Chewy
- DNA von Daisy
- DNA von Elsa
- DNA von Flora
- DNA von Ginger
- DNA von Hugo
- DNA-Leiter 1

Vom Benutzer zur Verfügung gestellt:

- Kunststoffröhrchen für die Abgabe von Reagenzien (es können 1,5 ml oder 0,2 ml Röhrchen verwendet werden)
- 2-20 µl-Mikropipette und Spitzen
- Permanentmarker mit feiner Spitze

1. Tauen Sie die Reagenzien auf, indem Sie die Röhrchen auf Raumtemperatur bringen.
2. Fangen Sie die Flüssigkeit am Boden jedes Röhrchens auf. Entweder kurz in einer Mikrozentrifuge schleudern oder die Flüssigkeit mit einer kräftigen Handbewegung nach unten schütteln.
3. Prüfen Sie beim Öffnen jedes Röhrchens, ob Flüssigkeit in der Kappe steckt. Falls nötig, setzen Sie die Kappe wieder auf und wiederholen Sie Schritt 2.
4. Geben Sie für jede Laborgruppe die folgenden Reagenzien in beschriftete Plastikröhrchen. Es können 1,5 ml oder 0,2 ml Plastikröhrchen verwendet werden.
   - DNA von Astro (Röhrchen mit "A" beschriften) 15 µl
   - DNA von Buster (Röhrchen B) 15 µl
   - DNA von Chewy (Röhrchen C) 15 µl
   - DNA von Daisy (Röhrchen D) 15 µl
   - DNA von Elsa (Röhrchen E) 15 µl
   - DNA von Flora (Röhrchen F) 15 µl
   - DNA von Ginger (Röhrchen G) 15 µl
   - DNA-Leiter (Röhrchen L) 15 µl
5. Wenn Sie die DNA-Proben mehr als 24 Stunden vor dem Unterricht vorbereiten, bewahren Sie die Röhrchen bis zur Verwendung im Kühlschrank auf. Abgegebene DNA-Proben können bis zu einer Woche vor der Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Vorbereitung der Gelelektrophorese-Reagenzien

1. Bereiten Sie den Elektrophoresepuffer vor.
    - Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers zur Herstellung der Pufferlösung.
    - Die benötigte Puffermenge hängt von dem von Ihnen verwendeten Gelelektrophorese-System ab.
        - Für das blueGel-Elektrophorese-System ist 600 ml TBE-Puffer für mindestens acht Gelläufe ausreichend.
        - Für andere Systeme lesen Sie bitte die Anweisungen des Herstellers:
            (1) Das für die Herstellung von Agarosegelen erforderliche Puffervolumen.
            (2) Das für die Verwendung als Laufpuffer benötigte Puffervolumen.
2. Bereiten Sie 2%ige Agarosegele mit fluoreszierender DNA-Färbung vor.
    - Sie benötigen acht Spuren plus eine Spur für die DNA-Leiter pro Gruppe.
    - Dieses Labor-Kit ist mit jeder Agarose von molekularer Qualität und jedem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (*z. B.* SeeGreen™) kompatibel.
    - Die benötigte Gelmenge hängt von dem von Ihnen verwendeten Gelelektrophorese-System ab. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers.

Einrichtung eines Arbeitsplatzes

Zu Beginn dieses Experiments sollte jede Laborgruppe über die erforderlichen Mittel verfügen:	Betrag
DNA-Proben: • DNA von Astro • DNA von Buster • DNA von Chewy • DNA von Daisy • DNA von Elsa • DNA von Flora • DNA von Ginger • DNA von Hugo • DNA-Leiter 1	15 µl pro Stück
DNA-Leiter 1	15 µl
2-20 µl-Mikropipette oder 10 µl-Mikropipette mit festem Volumen	1
Mikropipettenspitzen	Mindestens 9
Elektrophorese-Puffer *Volumen hängt von Ihrem Elektrophorese-System ab	30 ml TBE bei Verwendung eines blueGel
9 Vertiefungen in einem 2%igen Agarosegel mit fluoreszierender DNA-Färbung	

Leitfaden für Lernende

Hintergrundinformationen

Der Versuch

Laborprotokoll für Lernende

Fragen zur Vorbereitung auf den Versuch

Fragen nach dem Versuch

Behauptung – Beweise – Begründungen

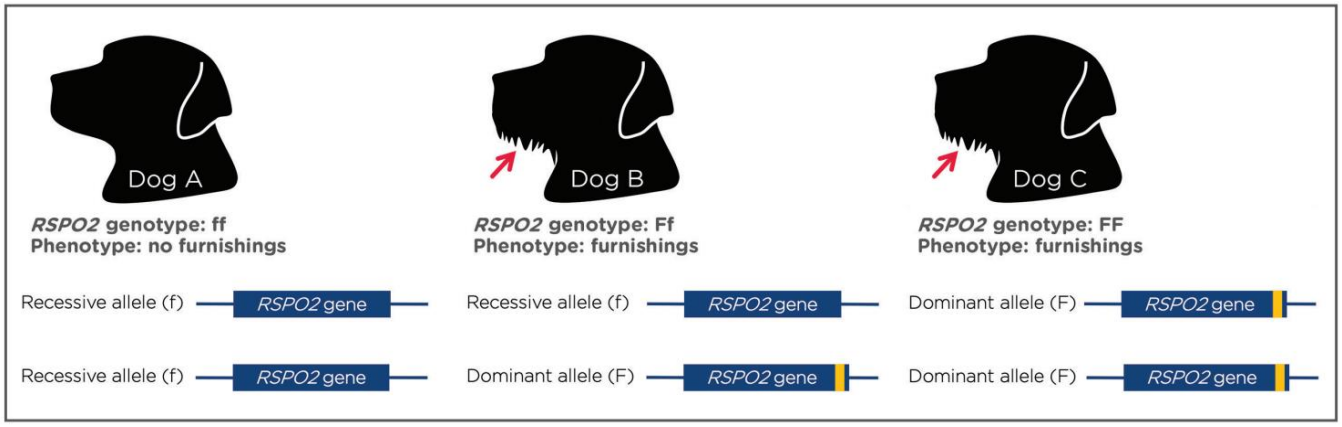
Hintergrundinformationen

Genotyp und Phänotyp

Seit Tausenden von Jahren züchtet der Mensch Tiere und Pflanzen, um sie mit Eigenschaften auszustatten, die er für wünschenswert hält. Dies ist möglich, weil wir wissen, dass viele Eigenschaften von den Eltern an die Nachkommen weitergegeben werden. Haushunde sind ein hervorragendes Beispiel dafür, wie die selektive Zucht Organismen von ihren wilden Vorfahren zu den domestizierten Haustieren von heute gemacht hat.
Der Mensch züchtet Hunde, um die von ihm gewünschten Eigenschaften zu erhalten, und viele dieser Eigenschaften haben mit dem Aussehen der Hunde zu tun. Es gibt Hunderte von anerkannten Hunderassen, die eine extreme körperliche Vielfalt aufweisen, vom winzigen Chihuahua bis zur massigen Deutschen Dogge. Jede Hunderasse hat ein charakteristisches Aussehen, das auf ihre Genetik zurückzuführen ist.
Die DNA enthält die Anweisungen für das Leben, und es ist die DNA eines Hundes, die das Aussehen des Hundes bestimmt. Allgemeiner ausgedrückt: Die in der DNA kodierten Informationen bestimmen, wie sich ein Organismus entwickelt und funktioniert. Ein Großteil der Informationen in der DNA ist in Segmenten organisiert, die Gene genannt werden. Das Wort "Gen" lässt sich nicht immer genau definieren, aber in diesem Labor verwenden wir es für einen Abschnitt der DNA, der die Anweisungen für die Herstellung eines bestimmten Proteins enthält. Die Anweisungen werden aus den vier Bausteinen der DNA, den Basen, geschrieben: Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G). Da Proteine die meisten Funktionen in einem Organismus ausüben, kann eine Änderung der Art und Weise, wie Proteine hergestellt werden, indem die Basenfolge in den entsprechenden Genen geändert wird, den Organismus verändern.
Wir bezeichnen die genetische Ausstattung eines Organismus als Genotyp. Mit dem Wort Phänotyp werden die beobachtbaren Merkmale des Organismus bezeichnet. Ein Grundprinzip der Genetik ist, dass der Genotyp eines Organismus seinen Phänotyp bestimmt, aber der Phänotyp wird oft durch eine Kombination aus Genetik und Umwelt beeinflusst. So hängt beispielsweise die Gesamtgröße eines Hundes von mehreren Genen sowie von Umweltfaktoren, wie der Ernährung, ab.
Der Phänotyp des Hundes, den Sie heute untersuchen werden, wird durch ein einziges Gen bestimmt. Wissenschaftler verwenden den Begriff Allel, um verschiedene Versionen eines Gens zu beschreiben. Verschiedene Allele desselben Gens unterscheiden sich in ihrer DNA-Sequenz, was sich darauf auswirken kann, wie das entsprechende Protein hergestellt wird. Während sich Allele desselben Gens um nur eine einzige DNA-Base unterscheiden können, können Allele aufgrund von Insertionen oder Deletionen vieler DNA-Basen auch wesentlich unterschiedliche Sequenzen aufweisen - dies ist der Fall bei dem Gen, das Sie heute untersuchen werden.

Fellstruktur von Hunden

Der Phänotyp, den Sie heute untersuchen werden, hat mit der Länge der Gesichtsbehaarung eines Hundes zu tun. Manche Hunde haben buschigere Augenbrauen und längeres Fell an der Schnauze, so dass sie aussehen, als hätten sie einen Schnurrbart. Der Begriff Fellstruktur (englisch: furnishings) wird hier verwendet, um dieses Muster von längerem Gesichtsfell zu beschreiben. Einige Hunderassen, wie z. B. Pudel, haben diese Behaarung, während andere, wie z. B. Labrador Retriever, keine haben.
Kürzlich haben Wissenschaftler entdeckt, dass ein einziges Gen dafür verantwortlich ist, ob ein Hund Behaarung hat oder nicht (Cadieu et al., 2009). Das Gen heißt *RSPO2* und hat zwei Allele: ein dominantes Allel, das zu einer Behaarung führt, und ein rezessives Allel, das zu einer fehlenden Behaarung führt. Auf genetischer Ebene besteht der Unterschied zwischen den beiden RSPO2-Allelen in einer Insertion. Das dominante Allel enthält eine Insertion von 167 Basenpaaren (bp) nahe dem Ende des Gens (Cadieu et al., 2009). Wissenschaftler verwenden manchmal Ein-Buchstaben-Abkürzungen für Allele - in diesem Labor werden wir den Buchstaben "F" (für Fellstruktur) verwenden und ein großes F für das dominante RSPO2-Allel und ein kleines f für das rezessive RSPO2-Allel verwenden.
Wie der Mensch hat auch der Hund zwei Kopien jedes Gens, jeweils eine von jedem Elternteil geerbt. Nur eine Kopie eines dominanten Allels muss vorhanden sein, um einen dominanten Phänotyp zu erzeugen. Wenn beide Kopien eines Allels rezessiv sind, wird der rezessive Phänotyp zum Ausdruck kommen. Das bedeutet, dass ein Hund, der zwei Kopien des dominanten RSPO2-Allels (FF) oder eine Kopie jedes RSPO2-Allels (Ff) trägt, diese spezielle Fellstruktur hat. Auf der anderen Seite werden nur Hunde mit zwei Kopien des rezessiven RSPO2-Allels (ff) diese spezielle Fellstruktur nicht haben.

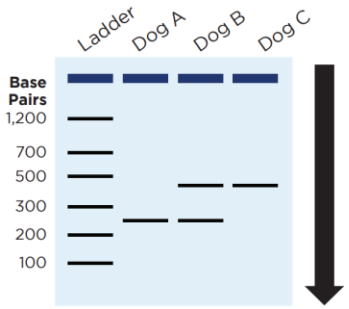


Genotypisierung

Bei einigen Merkmalen kann man aus der Beobachtung des Phänotyps eines Organismus auf den zugrunde liegenden Genotyp schließen. Oft muss man jedoch die DNA testen, um den Genotyp eines Organismus mit größerer Sicherheit zu bestimmen. Bei der Genotypisierung handelt es sich um eine Art von Gentest, der Aufschluss über die Allele gibt, die ein Organismus in einer oder mehreren Regionen des Genoms trägt.
Jede Art von Gentest beginnt mit einer biologischen Probe wie Blutzellen oder einem Haarfollikel. Die Wissenschaftler brechen die gesammelten Zellen auf und extrahieren die DNA für die Analyse. Mit einer Technik namens Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erstellen die Wissenschaftler viele Kopien der spezifischen DNA-Region, die sie untersuchen möchten. Anschließend wird die kopierte DNA mit einer weiteren Methode analysiert. Bei Genen wie *RSPO2*, deren Allele sich in der Länge unterscheiden, kann eine Technik namens Gelelektrophorese die verschiedenen Allele identifizieren. Mit der Gelelektrophorese können Wissenschaftler DNA-Fragmente nach ihrer Länge trennen.

Interpretation der Gelelektrophorese-Ergebnisse

In diesem Experiment wird mit PCR nur das Ende des RSPO2-Gens kopiert, da sich dort die 167 bp-Insertion des dominanten Allels befindet. Das PCR-Produkt für das rezessive Allel hat eine Länge von ca. 250 bp und das PCR-Produkt für das dominante Allel von ca. 400 bp. Mit Hilfe der Gelelektrophorese kann die DNA dann nach Länge getrennt und zwischen den beiden Allelen unterschieden werden.
Das Gel zeigt die Ergebnisse der Untersuchung beider Allele des RSPO2-Gens. Hund A hat nur die kleinere Bande (~250 bp), was uns sagt, dass Hund A nur das rezessive Allel hat und sein RSPO2-Genotyp ff ist. Hund B hat zwei unterschiedlich große Banden (~400 bp und ~250 bp), was uns sagt, dass Hund B eine Kopie jedes RSPO2-Allels hat und den Genotyp Ff besitzt. Hund C hat nur die größere Bande (~400 bp), was uns sagt, dass Hund C zwei Kopien des dominanten Allels und den Genotyp FF hat.
Da der Genotyp *RSPO2* direkt den Phänotyp der Fellstruktur bestimmt, können wir anhand dieser Information feststellen, ob ein Hund diese spezielle Fellstruktur hat oder nicht. Die Ausstattung ist ein dominantes Merkmal, daher führt eine Kopie des dominanten Allels - entweder der Genotyp Ff oder FF - zu einem Hund mit dieser Fellstruktur. Daraus können wir schließen, dass sowohl Hund B (Ff) als auch Hund C (FF) diese Fellstruktur haben werden, während Hund A (ff) sie nicht hat.



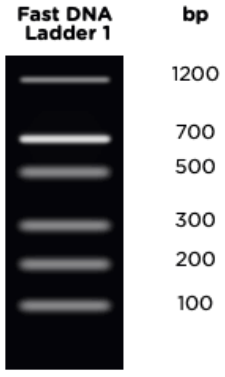
Der Versuch

Sie haben einen Labradoodle namens Molly. Der Begriff Labradoodle wird allgemein verwendet, um Hunde zu beschreiben, die zum Teil Pudel und zum Teil Labrador sind.
Sie überlegen, Molly zu züchten, und bringen sie zu zwei potenziellen Partnern: Zeus, ein Pudel, und Otto, ein anderer Labradoodle. Sie beschließen, sich etwas Zeit zu nehmen, um sich für einen geeigneten Partner zu entscheiden, aber es stellt sich heraus, dass Molly eine eigene Meinung zu diesem Thema hat, und sie überrascht Sie mit einem Wurf Welpen!
Heute werden Sie die Genetik nutzen, um zu bestimmen, ob Zeus oder Otto der wahrscheinlichere Vater von Mollys Welpen ist. Es gibt zwar verschiedene Phänotypen, anhand derer Sie feststellen können, ob der Vater von Mollys Welpen ein Pudel oder ein Labradoodle war, aber im heutigen Versuch konzentrieren wir uns auf die Behaarung. Wenn Welpen jung sind, kann man nicht erkennen, ob sie diese Fellstruktur am Unterkiefer haben oder nicht, weil ihr Fell zu kurz ist. Wenn Sie feststellen möchten, ob Zeus oder Otto der Vater ist, bevor das Fell der Welpen ausgewachsen ist, können Sie ihre DNA testen, um den RSPO2-Genotyp der Welpen zu bestimmen. Der Vergleich des Genotyps eines Welpen mit dem Genotyp des potenziellen Vaters ist eine Art **Vaterschaftstest**, da er Aufschluss darüber geben kann, wer der wahrscheinlichere Vater ist.

Laborprotokoll für Lernende

Dieser Versuch kann mit jedem horizontalen Gelelektrophorese-System durchgeführt werden. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers für den Betrieb Ihres Gelelektrophorese-Systems.

1. Legen Sie das vorbereitete Gel in die Elektrophoresekammer.
2. Geben Sie genügend Elektrophoresepuffer hinzu, um die Kammer zu füllen und das Gel gerade zu bedecken. Nicht zu viel, da ansonsten die Elektronen nicht durch das Gel wandern, sondern darüber hinweg.
    - Sie benötigen 30 ml TBE-Puffer für ein blueGel™ Elektrophorese-System. Füllen Sie die Kammer nicht zu voll.
    - Wenn Sie ein anderes Elektrophorese-System verwenden, entnehmen Sie den empfohlenen Puffertyp und das empfohlene Volumen den Anweisungen des Herstellers.
3. Verwenden Sie eine Mikropipette, um die Proben in der folgenden Reihenfolge zu laden. Um Kontaminationen zu vermeiden, verwenden Sie für jede Probe eine neue Spitze.
    - Spur 1: 10 µl DNA-Leiter 1
    - Spur 2: 10 µl DNA von Astro
    - Spur 3: 10 µl DNA von Buster
    - Spur 4: 10 µl DNA von Chewy
    - Spur 5: 10 µl DNA von Daisy
    - Spur 6: 10 µl DNA von Elsa
    - Spur 7: 10 µl DNA von Flora
    - Spur 8: 10 µl DNA von Ginger
    - Spur 9: 10 µl DNA von Hugo
4. Lassen Sie das Gel 15-25 Minuten lang laufen.
    - Das blueGel(™)-Elektrophorese-Systeme arbeitet mit einer festen Spannung.
    - Wenn Sie ein anderes Gelelektrophorese-System verwenden, stellen Sie die Spannung im Bereich von 70-90 V ein.



5. Um die DNA-Proben sichtbar zu machen, schalten Sie das blaue Licht in Ihrem BlueGel(™)-Elektrophorese-System an oder stellen Sie das Gel in einen Transilluminator.
6. Falls gewünscht, machen Sie ein Foto, um das Ergebnis zu dokumentieren.
7. Vergleichen Sie die Banden der DNA-Proben mit der DNA-Leiter, um Größenschätzungen zu erhalten.

Fragen zur Vorbereitung auf den Versuch

Überprüfung

1. Beschreiben Sie die Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp.

2. Was ist ein Allel?

3. Was bedeutet es für einen Hund, eine besondere Fellstruktur zu haben?

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

5. Füllen Sie die nachstehende Tabelle mit den folgenden Wörtern und Ausdrücken aus: keine spezielle Fellstruktur, spezielle Fellstruktur, FF, ff, Ff.

Phänotyp	Mögliche(r) Genotyp(en)

6. Erläutern Sie, warum einige Phänotypen mit mehr als einem Genotyp in Verbindung gebracht werden können und andere Phänotypen nur mit einem Genotyp in Verbindung gebracht werden können.

7. Beschreiben Sie den genetischen Unterschied zwischen dem dominanten Allel (F) und dem rezessiven Allel (f) des RSPO2-Gens.

8. Warum ist die Gelelektrophorese ein gutes Mittel, um zwischen Allelen des RSPO2-Gens zu unterscheiden?

9. Welche Größe von DNA-Fragmenten würden Sie auf einem Gel für Hunde mit den folgenden RSPO2-Genotypen erwarten?

    a. FF

    b. ff

    c. Ff

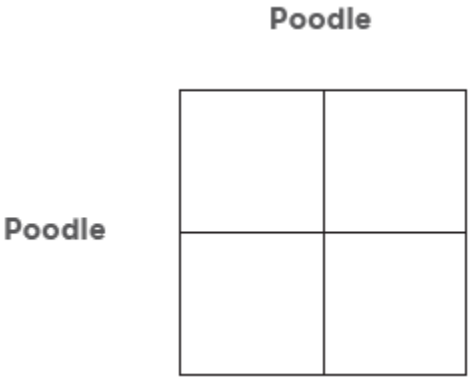
Kritisches Denken

10. Pudel haben *immer* diese spezielle Fellstruktur. Jedes Mal, wenn Sie zwei Pudel züchten, haben alle ihre Welpen diese spezielle Fellstruktur.

    a. Was erwarten Sie auf der Grundlage dieser Informationen vom Genotyp *RSPO2* eines Pudels? Verwenden Sie die Symbole F und f zur Darstellung der Allele.

    b. Belege deine Behauptung, indem Sie das Punnett-Quadrat für eine Kreuzung zwischen zwei Pudeln ausfüllen.

Cross: _____ (Poodle genotype) x _____ (Poodle genotype)

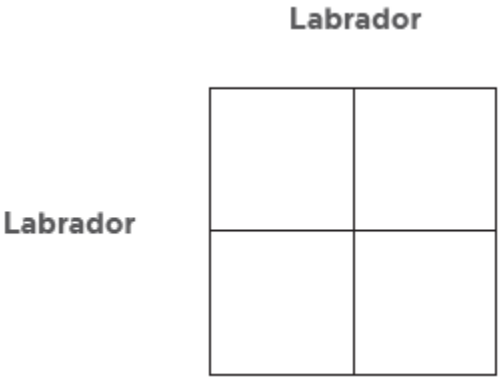


11. Labradore haben diese spezielle Fellstruktur nicht. Wenn Sie zwei Labradore miteinander verpaaren, hat keiner der Welpen eine solche Fellstruktur.

    a. Welchen RSPO2-Genotyp erwarten Sie auf der Grundlage dieser Informationen bei einem Labrador? Verwenden Sie die Symbole F und f zur Darstellung der Allele.

    b. Unterstützen Sie Ihre Behauptung, indem Sie das Punnett-Quadrat für eine Kreuzung zwischen zwei Labradoren ausfüllen.

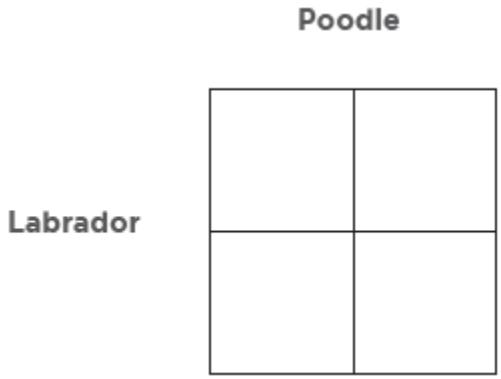
Cross: _____ (Labrador genotype) x _____ (Labrador genotype)



12. Hunde, die zum Teil Pudel und zum Teil Labrador sind, werden Labradoodles genannt. Labradoodles der ersten Generation werden durch die Verpaarung eines Pudels und eines Labradors erzeugt.

    a. Füllen Sie auf der Grundlage Ihrer Antworten auf die Fragen 1 und 2 das Punnett-Quadrat für eine Kreuzung zwischen einem Pudel und einem Labrador aus. Verwenden Sie die Symbole F und f, um die RSPO2-Allele darzustellen.

Cross: _____ x _____
Poodle genotype | Labrador genotype



b. Welches sind die zu erwartenden genotypischen Verhältnisse bei einem Wurf von Labradoodle-Welpen der "ersten Generation"?

c. Was sind die zu erwartenden phänotypischen Verhältnisse für einen Wurf von Labradoodle-Welpen der ersten Generation?

13. Anhand der Antworten auf die vorangegangenen drei Fragen können Sie auf die Genotypen von Molly, Zeus und Otto schließen.

a. Ihr Hund Molly ist ein Labradoodle der ersten Generation, das heißt, ihre Eltern waren ein Pudel und ein Labrador. Wie lautet nun der RSPO2-Genotyp von Molly?

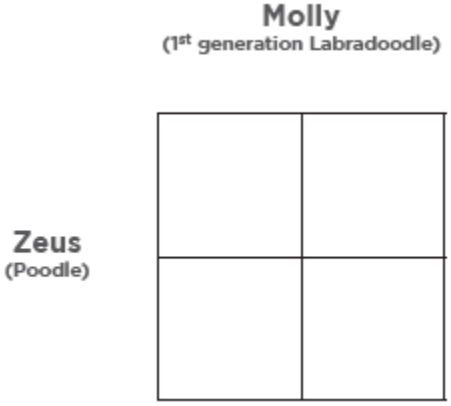
b. Zeus ist ein Pudel. Was ist der RSPO2-Genotyp von Zeus?

c. Otto ist, wie Molly, ein Labradoodle der ersten Generation. Was ist Ottos RSPO2-Genotyp?

14. Angenommen, Zeus ist der Vater von Mollys Welpen.

a. Füllen Sie das Punnett-Quadrat für eine Kreuzung zwischen Molly und Zeus aus. Verwenden Sie die Symbole F und f, um die RSPO2-Allele darzustellen.

Cross: _____ x _____
Molly's genotype | Zeus's genotype

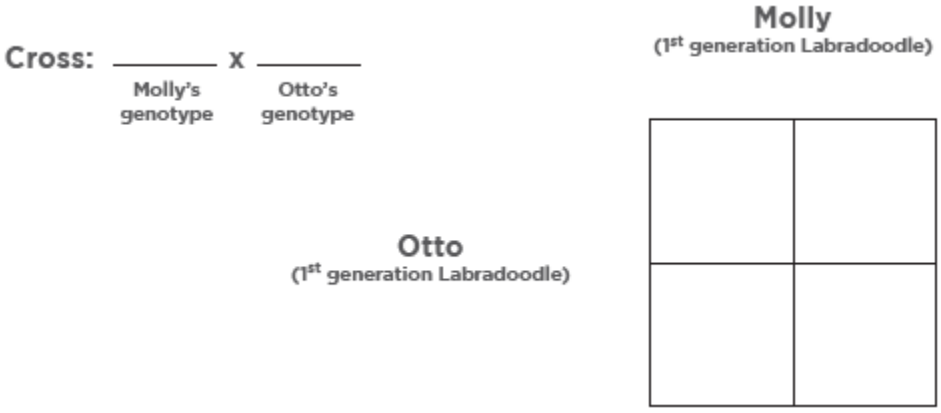


b. Was sind die erwarteten genotypischen Verhältnisse für einen Wurf von Welpen, die von Molly und Zeus geboren werden?

c. Was sind die erwarteten phänotypischen Verhältnisse für einen Wurf von Welpen, die von Molly und Zeus geboren werden?

15. Angenommen, Otto ist der Vater von Mollys Welpen.

a. Füllen Sie das Punnett-Quadrat für eine Kreuzung zwischen Molly und Otto aus. Verwenden Sie die Symbole F und f, um die RSPO2-Allele darzustellen.



b. Was sind die erwarteten genotypischen Verhältnisse für einen Wurf von Welpen, die von Molly und Otto geboren werden?

c. Was sind die erwarteten phänotypischen Verhältnisse für einen Wurf von Welpen, die von Molly und Otto geboren werden?

Fragen nach dem Versuch

Interpretation der Ergebnisse

1. Zeichnen Sie in diese Vorlage ein, wie Ihr Gel aussieht. Zeichnen Sie für jede Probe die Banden ein, die Sie auf Ihrem tatsächlichen Gel sehen.

2. Neben jeder Bande:
   a. Schreiben Sie ungefähr auf, wie lang (in Basenpaaren) die DNA in dieser Bande ist. Benutzen Sie die vorhergehende Abbildung der Leiter als Hilfe.
   b. Kennzeichnen Sie, ob die Bande F oder f entspricht.

3. Verwenden Sie die Ergebnisse der Gelelektrophorese, um die Tabelle unten mit den Ergebnissen der Genotypisierung zu vervollständigen, und verwenden Sie dann diese Informationen, um vorherzusagen, ob die einzelnen Welpen die spezielle Felleigenschaft haben oder nicht, sobald ihr Fell länger wird. Wenn Sie Hilfe benötigen, sehen Sie sich Abbildung 7 auf Seite 13 an.

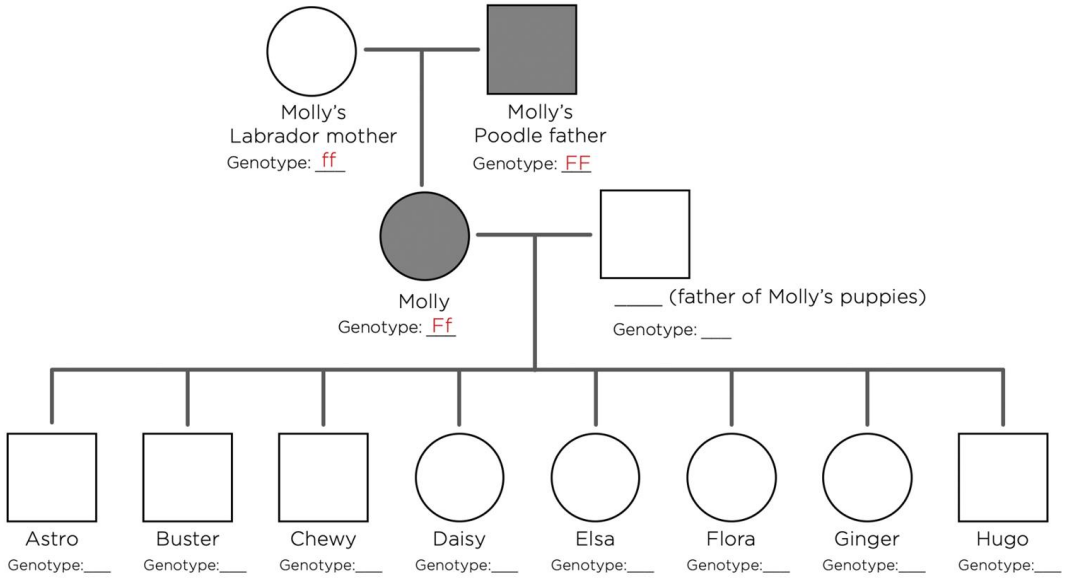
	Astro	Buster	Chewy	Daisy	Elsa	Flora	Ginger	Hugo
Dominant F allele (400 bp)								
Recessive f allele (250 bp)								
RSPO2 genotype (FF/Ff/ff)								
Predicted phenotype (Furnishings/ no furnishings)								

Kritisches Denken

4. Wer ist wahrscheinlich der Vater von Mollys Welpen? Zeus oder Otto? Erläutern Sie Ihre Überlegungen. Wenn Sie Hilfe brauchen, schauen Sie sich Ihre Antworten auf die Fragen 5 und 6 zum kritischen Denken vor dem Vorsuch an.

Zusatzfragen

5. Füllen Sie einen Stammbaum für Mollys Familie aus, der das RSPO2-Gen nachweist, indem Sie den Genotyp jedes Hundes angeben und ggf. die Form im Stammbaum schattieren, um den Phänotyp der Einrichtung nachzuvollziehen. Mollys Mutter, Mollys Vater und Molly sind bereits als Beispiel ausgefüllt worden. Verwenden Sie die Symbole F und f, um die RSPO2-Allele darzustellen.



6. Nehmen Sie stattdessen an, dass Sie die folgenden Versuchsergebnisse erhalten haben. Ist es möglich, dass Molly einen solchen Wurf hat? Wenn ja, was könnten Sie über den Vater von Mollys Welpen sagen? Erläutern Sie Ihre Überlegungen. Wenn Sie Hilfe brauchen, sehen Sie sich Ihre Antworten auf die Fragen 5 und 6 zum kritischen Denken vor dem Labor an.

Puppy	Genotype
Astro	FF
Buster	FF
Chewy	FF
Daisy	Ff
Elsa	FF
Flora	FF
Ginger	FF
Hugo	FF

Behauptung – Beweise – Begründungen

Beantworten Sie die Fragen auf der Grundlage Ihrer Ergebnisse aus dem Versuch. Beziehen Sie sich auf die Rubriken auf der nächsten Seite.

Frage:
Ausgehend von Ihren Ergebnissen, wer ist der wahrscheinlichste Vater von Mollys Welpen?

Behauptung
Machen Sie eine klare Aussage, die die obige Frage beantwortet

Beweise
Legen Sie Daten aus dem Labor vor, die Ihre Behauptung belegen

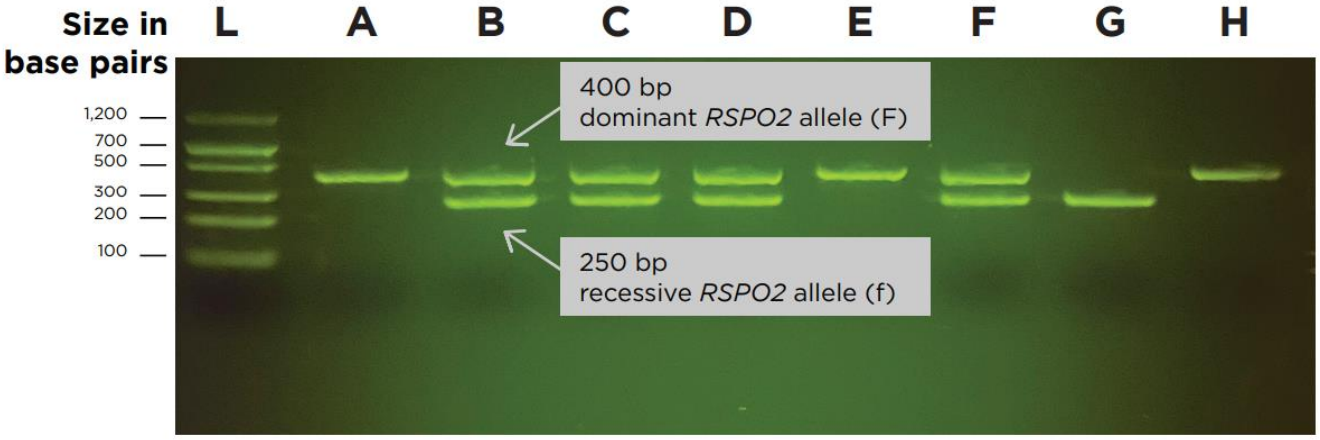
Begründungen
Erklären Sie deutlich, warum die von Ihnen vorgelegten Daten Ihre Behauptung stützen. Geben Sie die zugrunde liegenden wissenschaftlichen Prinzipien an, die Ihre Belege mit Ihrer Behauptung verbinden.

Leitfaden für Lehrkräfte

Erwartete Ergebnisse
Troubleshooting
Hinweise zur Versuchsdurchführung
Bibliographie

Erwartete Ergebnisse

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese sollten dem nachstehenden Gelbild ähneln:



Dieses Bild zeigt die Ergebnisse, die nach einem 15-minütigen Lauf mit einem blueGel™ erzielt wurden.

Ergebnisse und Interpretation

Welpe	Dominantes RSPO2-Allel (~400 bp)	Rezessives RSPO2-Allel (250 bp)	Genotyp	Vorausgesagter Phänotyp
Astro	✓		FF	Spezielle Fellstruktur
Buster	✓	✓	Ff	Spezielle Fellstruktur
Chewy	✓	✓	Ff	Spezielle Fellstruktur
Daisy	✓	✓	Ff	Spezielle Fellstruktur
Elsa	✓		FF	Spezielle Fellstruktur
Flora	✓	✓	Ff	Spezielle Fellstruktur
Ginger		✓	ff	Keine
Hugo	✓		FF	Spezielle Fellstruktur

Troubleshooting

Wenn auf dem Gel keine fluoreszierenden DNA-Banden zu sehen sind, kann Folgendes passiert sein:

- Fehlende Verwendung einer fluoreszierenden DNA-Färbung: Dieses Labor erfordert Agarosegele, die mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (*z. B.* SeeGreen™) hergestellt

wurden. DNA-Färbemittel, die DNA mit einer sichtbaren blauen Verbindung sichtbar machen, sind weniger empfindlich und mit diesem Kit nicht kompatibel.

- Falsche Visualisierungsbedingungen: Fluoreszierende DNA-Färbungen (*z. B.* SeeGreen™) müssen mit einem Blaulicht- oder UV-Transilluminator betrachtet werden. Das blueGel System verfügt über einen integrierten Blaulichttransilluminator. Vergewissern Sie sich, dass Sie für die DNA-Visualisierung das blaue Licht des blueGel-Systems durch Drücken der entsprechenden Taste eingeschaltet haben.
- Die Proben sind aus dem Gel herausgelaufen: Wenn Sie das Gel zu lange laufen lassen, können die DNA-Proben aus dem Gel herauswandern. Überwachen Sie den Fortschritt, indem Sie die DNA-Proben gelegentlich unter einem Transilluminator überprüfen oder den Ladefarbstoff verfolgen, der mit dem Auge sichtbar ist. Beenden Sie den Lauf, bevor der farbige Ladefarbstoff das Ende des Gels erreicht.
- Die Reagenzien wurden unsachgemäß gelagert und/oder sind abgelaufen: DNA-Proben können bis zu zwölf Monate nach Erhalt im Gefrierschrank oder sechs Monate im Kühlschrank gelagert werden. Eine Lagerung unter anderen Bedingungen oder über diesen Richtwert hinaus kann die Leistung beeinträchtigen.

Wenn einige oder alle Banden schwach erscheinen, kann Folgendes der Fall sein:

- Fehler beim Laden der DNA-Proben: Das Laden der DNA-Proben für die Gelelektrophorese erfordert ein wenig Übung. Die Banden erscheinen schwach, wenn die Schüler nicht die gesamte Probenmenge in die Vertiefungen einbringen.
- Nicht optimale Visualisierungsbedingungen: Wenn Sie das Licht im Raum dimmen, kann die fluoreszierende DNA-Färbung im Transilluminator besser zu sehen sein. Bei Verwendung von blueGel liefert die Betrachtung des Gels mit der beigefügten Dokumentationshaube und einer Smartphone-Kamera die besten Ergebnisse.
- Alte oder unsachgemäß gelagerte Gele: Agarosegele können im Allgemeinen im Voraus vorbereitet werden, aber die Lagerungszeit und -bedingungen hängen von dem verwendeten fluoreszierenden DNA-Farbstoff ab. Wenn Sie SeeGreen™ DNA-Färbemittel verwenden, können die Gele bis zu fünf Tage im Voraus vorbereitet werden. Bewahren Sie die Gele bei Raumtemperatur in einem luftdichten, lichtgeschützten Behälter auf. Weichen Sie die Gele nicht in Puffer ein und wickeln Sie sie nicht in Papiertücher ein.
- Alter oder falsch zubereiteter Puffer: Mängel bei der Gelvisualisierung, die nicht direkt auf andere Ursachen zurückzuführen sind, können durch die Verwendung von frisch zubereitetem Puffer, der mit Ihrem Gelelektrophorese-System kompatibel ist, behoben werden. Bei Verwendung des blueGel wird TBE-Puffer empfohlen.

Hinweise zur Versuchsdurchführung

Dieser Versuch dient als Einführung in die Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp. Wir glauben, dass dieser Ansatz das richtige Gleichgewicht zwischen intellektuellem Engagement, Untersuchung und Zugänglichkeit bietet. Um diese Ziele zu erreichen, wurden bei der Konzeption dieses Labors bestimmte Elemente vereinfacht. Einige dieser Elemente sind:

- In diesem Labor wird präparierte DNA verwendet, um die Ergebnisse der PCR-Amplifikation eines Abschnitts des RSPO2-Gens aus genomischer Hunde-DNA zu simulieren.
- Bei Vaterschaftstests werden in der Regel mehrere genetische Loci analysiert, um die Abstammung zu bestimmen. Wir haben die Analyse vereinfacht und uns auf ein einziges

Gen mit zwei Allelen konzentriert, die mit einem eindeutigen physischen Phänotyp verbunden sind. Es gibt zwar einige Ansätze zur Verwendung von DNA zur Bestimmung der Abstammung, aber die meisten Vaterschaftstests bei Menschen und Hunden entsprechen der forensischen Wissenschaft. Dabei werden Bereiche des Genoms untersucht, die eine variable Anzahl von kurzen Tandemwiederholungen enthalten.

- Der Einfachheit halber haben wir auf eine Diskussion der spezifischen Art des genetischen Unterschieds zwischen den RSPO2-Allelen verzichtet. Je nach Niveau Ihrer Klasse kann es jedoch sinnvoll sein, diese Information zu diskutieren. Die 167 bp-Insertion im dominanten Allel des RSPO2-Gens befindet sich nicht in der proteinkodierenden Region, sondern in der 3'-untranslatierten Region. Die Wissenschaftler gehen davon aus, dass das dominante Allel mit einer erhöhten Expression des RSPO2-Proteins verbunden ist (Cadieu et al., 2009).
- Wir haben auch die Funktion des RSPO2-Proteins nicht besprochen, obwohl diese Information je nach dem Niveau Ihrer Klasse sinnvoll sein könnte. Das RSPO2-Protein ist an einem Signalweg beteiligt, der in die Entwicklung der Haarfollikel involviert ist.
- Das dominante Allel des RSPO2-Gens steht in Zusammenhang mit der speziellen Fellausprägung am Unterkiefer, kann aber auch das gesamte Fell eines Hundes beeinflussen. Bei Hunden, die kein langes Fell haben, führt das Vorhandensein von einer oder zwei Kopien des dominanten RSPO2-Allels zu einem "drahtigen" Fell, das etwas länger ist und eine gröbere Textur aufweist (Cadieu et al., 2009). Ein Vergleich zwischen einem Drahtdackel und einem glatten Dackel zeigt dieses Merkmal. Obwohl der RSPO2-Genotyp eines Hundes mit dem Vorhandensein von Drahthaar assoziiert ist, haben wir uns entschieden, den Phänotyp des Drahthaars nicht zu diskutieren, da Drahthaar nicht immer mit dieser speziellen Fellstruktur einhergeht (siehe nächster Punkt).
- Wie im vorigen Punkt beschrieben, verleiht das dominante RSPO2-Allel dem Hund Fell und Drahthaar. Hunde mit langem Fell und Behaarung sind eine Ausnahme. Bei Hunden mit dem dominanten RSPO2-Allel und zwei Kopien des rezessiven FGF5 ist die Behaarung vorhanden, aber das Fell ist lang und glatt statt drahtig (Cadieu et al., 2009). Dieser Phänotyp kann bei Bearded Collies beobachtet werden. Dieses Beispiel zeigt, dass die Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp komplizierter sein kann als ein einzelnes Gen, das immer nur ein einziges Merkmal spezifiziert.

Bibliographie

Cadieu, E., Neff, M.W., Quignon, P., Walsh, K., Chase, K., Parker, H.G., VonHoldt, B.M., Rhue, A., Boyko, A., Byers, A., et al. (2009). Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes. Science 326, 150–153.