

Molekularbiologische Methoden

Pro Gruppe werden die unter Punkt 1 und 2 aufgeführten Versuche zweifach durchgeführt. Die Präparation mit dem höchsten DNA-Gehalt wird dann für die weiteren Experimente (Punkt 3, 4 und 5) eingesetzt. Die andere Präparation wird verworfen.

Bei allen Arbeitsschritten ist auf eine ausreichende Beschriftung der Reaktionsgefäße zu achten.

Erster Versuchstag:

1. Isolierung genomischer DNA aus Mundschleimhautzellen

Zur Gewinnung der Mundschleimhautzellen wird mit einem Wattestäbchen 6x kräftig an der Innenseite der Wange entlang gestrichen. Danach läßt man das Wattestäbchen ca. 2 Stunden trocknen.

Die DNA Isolierung erfolgt mit den Materialien aus dem QIAamp DNA Blood Mini Kit.

Vorgehensweise:

- Thermomixer auf 56 °C vorheizen.
- Die Wattespitze des Stäbchens mit dem anhaftenden Mundschleimhautzellen abschneiden und in ein 2 ml Reaktionsgefäß geben. Anschließend wird 400 µl PBS zupipettieren.
- 20 µl Protease und anschließend 400 µl Puffer AL zugeben, sofort gründlich vortexen (15 sec).
- 10 min bei 56 °C inkubieren.
- 400 µl Ethanol (absolut) zugeben und erneut vortexen.
- 700 µl der Ethanol/Protease/DNA-Mischung in ein Spinsäulchen geben und 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren. Das Eluat verwerfen und die restliche Mischung wie oben durchzentrifugieren. Die DNA bleibt dabei an der Membran der Säule hängen. Das Eluat erneut verwerfen.
- 500 µl Puffer AW1 (Waschpuffer) zugeben und 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren und das Eluat verwerfen.
- 500 µl Puffer AW2 zugeben und 3 min bei voller Drehzahl zentrifugieren. Das Eluat verwerfen und erneut für 1 min zentrifugieren.

- Die Spinsäule aus dem 2 ml Auffanggefäß entnehmen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß einsetzen.
- 120 µl Aqua dest. zugeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren. Die DNA befindet sich jetzt im Eluat des Reaktionsgefäßes. Die Spinsäule verwerfen.

Die DNA wird für die nachfolgenden Versuche (Punkt 2, 3 und 4) benutzt. Die verbleibende Menge wird anschließend bis zum zweiten Versuchstag eingefroren.

2. Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Photometrie

Die Konzentration der zuvor gewonnenen, genomischen DNA wird gemessen.

Vorgehensweise

- Die DNA wird im Verhältnis 1:1 in einem Reaktionsgefäß mit Aqua dest. verdünnt (das Endvolumen soll 80 µl betragen, d.h. 40 µl Aqua dest. + 40 µl DNA).
- 75 µl dieser Verdünnung werden in eine UV-Küvette überführt. Die Extinktion (OD) wird im Spektralphotometer bei 260 nm und bei 280 nm gegen Wasser vermessen.

Für die Konzentrationsbestimmung gilt: $OD_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Für die Bestimmung der Reinheit gilt: Das Verhältnis von $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ soll zwischen 1,65 und 1,90 liegen. Ein niedrigeres Verhältnis weist auf eine Proteinkontamination hin, die zum Abbau der DNA führen kann.

3. Der genetische Fingerabdruck: Amplifikation der Region D8S1179 mittels PCR

Dazu wird die aus den Mundschleimhautzellen gewonnene DNA eingesetzt. Zur Amplifikation dieser Region (chromosomale Lokalisation: 8q24.1-24.2) wird ein Polymerase-Ketten-Reaktion angesetzt. Bei der von Kary Mullis 1985 entwickelten in vitro-Technik werden gezielt DNA-Sequenzen, die von Primern eingerahmt werden, amplifiziert.

Basensequenz von D8S1179:

Beispiel: 12 x TCTA (von Base 44 bis 91)

| | | | | | | |
|-----|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 5' | | 11 | 21 | 31 | 41 | 51 |
| 1 | TGGCAACTTA ACCGTTGAAT | TATGTATTTT ATACATAAAA | TGTATTTTCAT ACATAAAGTA | GTGTACATTC CACATGTAAG | GTATCTATCT CATAGATAGA | ATCTATCTAT TAGATAGATA |
| 61 | CTATCTATCT GATAGATAGA | ATCTATCTAT TAGATAGATA | CTATCTATCT GATAGATAGA | ATTCCCCACA TAAGGGGTGT | GTGAAAATAA CACTTTTATT | TCTACAGGAT AGATGTCCTA |
| 121 | AGGTAATAAA TCCATTTATT | ATTAAGGCAT TAATTCCGTA | ATTCACGCAG TAAGTGCCTT | TGGGATACGN ACCCATATGCN | TACAGTGATG ATGTCACTAC | AAAATGAACT TTTTACTTGA |

Basensequenz der Primer:

Primer FOR (25 Basen lang): 5' – TTT TTG TAT TTC ATG TGT ACA TTC G – 3' (von Base 17 bis 41)

Primer REV (25 Basen lang): 5' – CGT AGC TAT AAT TAG TTC ATT TTC A – 3' (von Base 193 bis 169)

Ein 96 bp langes DNA-Fragment wird mittels dieser Primer amplifiziert.

Vorgehensweise:

Der Reaktionsansatz wird in einem 0,2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert.

Anmerkung: das Volumen der DNA kann sich nach aktueller DNA-Konzentrationsbestimmung ändern. Entsprechend muß das Volumen des Wassers angepaßt werden, um das Gesamtvolumen von 50 µl bei zu behalten.

| Komponente | Volumen |
|-----------------------------|---------|
| Aqua dest. | 8,5 µl |
| 5x PCR-Puffer | 10 µl |
| Primer FOR (10 pmol/µl) | 2,5 µl |
| Primer REV (10 pmol/µl) | 2,5 µl |
| dNTP-Mix (10 mM) | 1,0 µl |
| genomische DNA | 25 µl |
| Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl) | 0,5 µl |

Den Deckel gut verschließen und eventuell vorhandene Luftblasen am Boden des Gefäßes entfernen. Das entsprechende PCR-Programm (s.u.) wird im Thermocycler gestartet und sobald die Temperatur 95 °C erreicht hat, wird das Reaktionsgefäß in den Thermocycler

gestellt. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz bis zum zweiten Versuchstag gekühlt aufbewahrt.

PCR-Program:

| Temperatur | Zeit | Zyklus |
|------------|--------|--------|
| 95 °C | 3 min | 1 x |
| 95 °C | 30 sec | 30 x |
| 55 °C | 1 min | |
| 72 °C | 1 min | |
| 72 °C | 3 min | 1 x |
| 4 °C | 48 h | 1 x |

4. Restriktions-Analyse genomischer DNA

Die genomische DNA der Mundschleimhautzellen wird mit dem Restriktionsenzym EcoR1 geschnitten. EcoR1 schneidet doppelsträngige DNA an der Basensequenz 5`GAATTC3`.

Vorgehensweise:

In einem 0,2 ml Reaktionsgefäß werden folgende Komponenten pipettiert.

- 17 µl DNA
- 2 µl Puffer (10x)
- 1 µl Restriktionsenzym EcoR1

Der Restriktionsansatz wird 2 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert und dann bis zum zweiten Praktikumstag gekühlt aufbewahrt.

Zweiter Versuchstag:

5. Agarose-Gelelektrophorese

Die beim ersten Praktikumstag gewonnenen Proben werden nun ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt.

Vorgehensweise

- 15 µl der genomischen DNA (Punkt 1), 15 µl des PCR-Ansatzes (Punkt 3) und 15 µl des Restriktionsansatzes (Punkt 4) werden jeweils in einem 1,5 ml Gefäß mit 3 µl 6x Probenpuffer (6xPP) versetzt und auf ein vorbereitetes Agarosegel aufgetragen.
- zusätzlich werden je 10 µl zweier DNA-Längenstandards (werden bereitgestellt) aufgetrennt. Pro Gruppe ergeben sich somit 5 Proben.
- nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel unter UV-Licht ausgewertet.