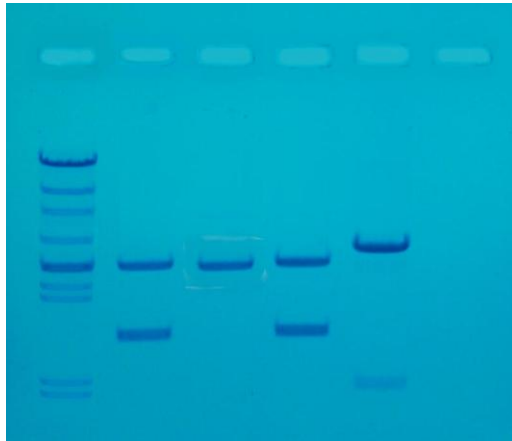


PCR-Amplifikation von DNA zwecks Fingerprinting



Alle Komponenten des Kits sind ausschließlich für die pädagogische Forschung bestimmt. Sie können nicht zu diagnostischen Zwecken – weder am Menschen noch am Tier – verwendet werden.

Dieses KIT beinhaltet KEINE menschlichen DNS-Samples, noch stammen andere Komponenten aus humanen Quellen!

Was ist im Kit enthalten?

Was wird zusätzlich benötigt?

Hintergrundinformationen

Experimentelle Verfahrensanweisungen

Erstellen von Familienstammbäumen

Experimenteller Überblick

Allgemeine Hinweise

Elektrophorese

Gel-Vorbereitung

Durchführung der Elektrophorese

Färbung und Visualisierung von DNS

Methode 1: One-Step Färben und Entfärben mit InstaStain® Methylenblau

Methode 2: Färbung mit InstaStain® Methylenblau

Methode 3: Liquid Färbung mit Methylenblau Plus™

Fragen

Leitlinien für den Lehrer

Erläuterungen

Vorbereitungen

Vorbereitungen zur Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese
Ergebnisse und Analyse

Fragen und Antworten

Sicherheitsdatenblätter

Inhalt des Kits

Ready-to-Load™ DNS-Proben für die Gelelektrophorese

- A Standard DNA Fragments
- B Probe des Tatorts
- C Verdächtige Probe 1
- D Verdächtige Probe 2
- E Verdächtige Probe 3

Erforderliches Zubehör (im KIT enthalten)

- UltraSpec-Agarose™ Pulver
- Konzentrierter Elektrophorese-Puffer
- InstaStain® Methylenblau
- Methylenblau Plus™
- Gel-Lade-Puffer
- 1 ml Pipette
- 100 ml Messzylinder (Verpackungen für Proben)
- Transferpipetten

Erforderliches Zubehör (nicht im KIT enthalten)

- Horizontale Gelelektrophorese-Apparatur

- Gleichstrom-Netzteil
- Automatische Mikropipetten mit Tipps
- Waage
- Mikrowelle, Heizplatte oder Brenner
- Peleusball
- 250 ml Flaschen oder Becher
- Hitzestabile Handschuhe
- Schutzbrille und Einweg-Labor -Handschuhe
- Kunststoff-Färbewannen
- DNS-Visualisierungssystem (optimal: weißes Licht mit Bernsteinfilter)
- Destilliertes oder de-ionisiertes Wasser

Die im Kit enthaltenen DNS-Proben können bis zu einem Monat ungekühlt gelagert werden. Möchten Sie den Versuch erst später durchführen, so empfiehlt es sich die Proben und Pufferlösungen bei -4°C zu lagern. Die Lösungen und Proben sind gekühlt bis zu 2 Jahren haltbar.

Lernziele

Mit diesem Experiment lernen die Kursteilnehmer das Aufbereiten von DNS-Samples mit nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese. Die abschließende Analyse dieses Experimentes ermöglicht eine konkrete Erklärung zu einer recht abstrakten Problemstellung zu erstellen.

Zeitaufwand

Gel-Vorbereitung: Für die Vorbereitung des Gels (unabhängig ob Sie selbst oder Ihre Schüler das Gel gießen) sollten Sie rund 30-40 Minuten einplanen. Weitere 20 Minuten benötigt das Gel für die vollständige Erstarrung.

Sie können die gegossenen Gele bis zum eigentlichen Gebrauch für ein bis zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahren. Wickeln Sie hierfür die Gele in Frischhaltefolie ein oder legen Sie sie in einen Plastikbeutel mit Druckverschluss. Geben Sie zuvor ein bisschen Puffer auf das Gel – so können Sie vermeiden, dass das Gel austrocknet.

Wenn Sie am Ende der Unterrichtseinheit noch ungebrauchte, ausgehärtete Agarose(gele) haben, können Sie diese wieder in die Flasche zurückgeben und beim nächsten Mal nach Erwärmen/Schmelzen wiederverwenden. Agarose kann in einer Laborflasche aufbewahrt und ohne Probleme nach Bedarf erhitzt/geschmolzen werden.

Versuchsablauf: Die Agarose-Gelelektrophorese eines Gels dauert ca. 40 min. Die Färbung kann entweder über Nacht oder innerhalb von 3 Stunden erfolgen.

Hintergrundinformationen

Als genetischer Fingerabdruck wird ein DNA-Profil eines Individuums bezeichnet, das für dieses in hohem Maße charakteristisch ist. Die DNA wird aus Zellen gewonnen, die aus Gewebeteilen, zum Beispiel Sperma, Hautzellen oder Speichel stammen. Das Verfahren wird in der Molekularbiologie auch als Genetic Fingerprinting oder DNA Fingerprinting bezeichnet. Alec Jeffreys war 1984 durch Zufall auf das Verfahren gestoßen. In Deutschland wurde es erstmals 1988, als Beweis in einem Strafprozess, vor Gericht anerkannt.

Für den genetischen Fingerabdruck werden derzeit zwischen 8 und 15 Abschnitte aus der DNA mit Hilfe der PCR-Methode vervielfältigt. Untersucht werden nicht die Gene an sich - also nicht die verhältnismäßig wenigen Abschnitte der menschlichen DNA (ein bis zwei Prozent), die Proteine kodieren und schließlich den Phänotyp bestimmen - sondern kleine, sich wiederholende Abschnitte im Erbgut, die Minisatelliten VNTR (variable number tandem repeats) oder STRs (Short tandem repeats). Bei diesen DNA-Abschnitten handelt es sich um tandemartige Wiederholungen einer bestimmten Sequenz (Repeats), die im Genom aller Säugetiere vorkommen. Variabel ist dabei die Anzahl der Wiederholungen. Diese Anzahl wird bei dem genetischen Fingerabdruck untersucht. Je nach Anzahl der Wiederholungen hat der vervielfältigte Abschnitt also eine bestimmte Länge, die sich etwa über eine Gel-Elektrophorese im Agarosegel als einzelne Bande darstellen lässt. Ist ein Mensch an einem Genort heterozygot (besitzt also beispielsweise ein Allel mit zehn Wiederholungen und eines mit 15), so entstehen zwei Banden unterschiedlicher Länge. Es handelt sich hierbei also nicht um eine Sequenzierung, sondern um eine reine Fragmentlängen-Analyse (ähnlich wie RFLP).

Bei den VNTRs ist der repetitive Anteil länger (10 bis 150 Basenpaare) als bei den STR (2 bis 7 Basenpaare).

Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen an einem VNTR oder einem STR-Locus eine unterschiedliche Anzahl von Wiederholungen haben, ist sehr hoch. Wenn mehrere dieser Regionen untersucht werden, ergibt sich somit ein Bandenprofil, das mit einer bestimmten Häufigkeit in der Gesamtpopulation vertreten ist. Hierüber kann dann eine statistische Aussage getroffen werden, wie viele Menschen untersucht werden müssen, um zufällig einen zu treffen, der genau dieses Muster aufweist. Bei den oben genannten 8 bis 15 untersuchten VNTR-Systemen liegt diese Zahl häufig in einem Bereich von mehreren Milliarden. Die gewonnenen Informationen werden in ein mathematisches Modell umgewandelt, das sich digital verarbeiten und somit automatisiert vergleichen lässt. Das mathematische Modell ist ein reiner aggregierter Zahlencode.

Im Gegensatz zu anderen DNA-Analysen, bei denen mittels Sequenzierungen Gene aus den codierenden Bereichen der DNA untersucht werden, die durchaus Rückschlüsse etwa auf eventuelle Krankheiten des Individuums zulassen, lassen sich aus dem Zahlencode der Fragmentlängen-Analyse keine Eigenschaften des Individuums ableiten. Über einen zusätzlichen Locus wird allerdings das Geschlecht bestimmt. Bestimmte Abweichungen in der Anzahl der Chromosomen, wie die dem Down-Syndrom zugrundeliegende werden ebenfalls offenbart.

Eine weitere Methode ist die RFLP: Hier wird die DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten. Diese Restriktionsenzyme erkennen spezifische Abschnitte in der DNA. Je nachdem, wie oft ein solcher Abschnitt in einem Chromosom vorhanden ist, ergeben sich unterschiedlich viele und unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Diese können anschließend wiederum durch Gelelektrophorese usw. sichtbar gemacht werden.

Ein genetischer Fingerabdruck darf in Deutschland nur auf richterlichen Beschluss hin genommen werden. Hierbei sind zwei unterschiedliche Ansätze möglich:

* Die Untersuchung von Spurenmaterial und Körperzellen des Beschuldigten im Rahmen der Untersuchungen einer konkreten Straftat (§ 81a StPO in Verbindung mit § 81e StPO)

* Die DNA-Analyse zum Zwecke der Identitätsfeststellung in künftigen Strafverfahren (§ 81g StPO).

Letztere Untersuchung darf der Richter nur dann anordnen, wenn die Voraussetzung einer Straftat von erheblicher Bedeutung im Sinne des StGB gegeben ist, bei deren Wiederholung ein genetischer Fingerabdruck zur Ermittlung des Täters hilfreich sein kann (Grundsätzlich ist die richterliche Anordnung auch bei Volksverhetzung oder Betrug möglich).

Die Untersuchung erfolgt, wenn Grund zu der Annahme besteht, dass gegen den Beschuldigten auch künftig Strafverfahren zu führen sein werden. Bei Ersttätern wird daher oft von einem genetischen Fingerabdruck abgesehen. Das Gericht muss generell für einen solchen Beschluss den Einzelfall umfangreich und gründlich prüfen und das Recht auf informationelle Selbstbestimmung (Art. 2 Abs. 1 GG) berücksichtigen.[1][2] Dies muss auch aus der Begründung hervorgehen.[1][2] Hohe Anforderungen an die Begründung sind insbesondere zu stellen, wenn gleichzeitig eine Freiheitsstrafe zur Bewährung ausgesetzt wird, weil für diese Strafaussetzung eine günstige Prognose getroffen werden muss.[1][2]

Die Zellen für den genetischen Fingerabdruck dürfen nach Anordnung der Untersuchung durch einen Arzt (§ 81a Absatz 1 Satz 2 StPO) entnommen werden. In einigen

Bundesländern ist es der Polizei erlaubt, zur freiwilligen Abgabe eines genetischen Fingerabdrucks aufzufordern (z. B. Bayern, Nordrhein-Westfalen und Hamburg). In anderen Bundesländern ist auch dazu eine richterliche Erlaubnis nötig.

Im polizeilichen Bereich werden (üblicherweise staatliche) Laboratorien damit beauftragt, aus DNA-Proben die für die Identifizierung wichtigen Teile herauszufiltern und der polizeilichen DNA-Datenbank des BKA zur Verfügung zu stellen, die dann unbekannte DNA-Profile (etwa von Tatortspuren oder unbekanntem Leichen) mit gespeicherten DNA-Profilen von bekannten Personen vergleicht. Die bekannten Profile stammen von Straftätern, bei denen man durch Mundhöhlenabstrich (freiwillig) oder Hautabrieb (wenn die Person ein Eindringen in eine Körperöffnung verweigert) eine biologische Probe abgenommen hat. In Deutschland erhalten die beauftragten Laboratorien aus datenschutzrechtlichen Gründen keine Personendaten, Proben (Spuren) erhalten lediglich eine eindeutige Kennzeichnung. Durch diese Trennung ist es nur der Polizeibehörde möglich, einen kausalen Zusammenhang zwischen Untersuchungsergebnissen und Personen herzustellen.

Voraussetzung für die Abnahme des daktylischen Fingerabdrucks und des genetischen Fingerabdrucks ist die Begehung einer Straftat nach dem StGB.

* Die Abnahme eines genetischen Fingerabdrucks kann nur bei schweren Straftaten durch richterlichen Beschluss erlaubt werden (§ 81g Abs. 1 Nr. 1 und 2, Abs. 3 Satz 1 in Verbindung mit § 81f Abs. 1 S. 1 Strafprozessordnung).

* Der daktylische Fingerabdruck wird durch einen Polizisten genommen, wenn dieser der Ansicht ist, dass es sich um eine Straftat, also einen Verstoß gegen das Recht handelt, bei dem angenommen wird, dass die Wahrscheinlichkeit der Tatwiederholung höher ist als die, dass eine nicht überführte Person diese Straftat begeht.

Im Zusammenhang mit der Ermordung des Modemachers Rudolph Moshammer wurde in Deutschland eine Ausweitung der Anwendungsmöglichkeiten des genetischen Fingerabdrucks diskutiert. Ein Gesetzentwurf mehrerer Bundesländer, der am 18. Februar 2005 in den Bundesrat eingebracht worden war, sah unter anderem die Aufhebung des Richtervorbehalts und die Ausweitung des Straftatenkatalogs vor.

Datenschützer und Bürgerrechtsorganisationen sprachen sich gegen die Gesetzesänderung aus. Die Konferenz der Datenschutzbeauftragten des Bundes und der Länder hält die von den Bundesländern angestrebte Gleichsetzung von klassischem und genetischem Fingerabdruck für bedenklich.

Das Ergebnis eines DNA-Tests, eines Fingerabdrucks oder einer sonstigen Spur alleine kann nicht über Schuld oder Nichtschuld eines Verdächtigen entscheiden. Es wird nur als Indiz gewertet, das durch weitere ergänzt werden muss. Viele Verdächtige legen allerdings ein Geständnis ab, wenn man sie mit dem Ergebnis konfrontiert. Ist das nicht der Fall, muss das Ergebnis interpretiert werden, wobei Fehlschlüsse nicht auszuschließen sind.

Als falsch-positives Ergebnis wurde unter anderem auch der Fall eines 28-jährigen Arbeiters bekannt, der ein halbes Jahr unschuldig wegen Mordes in Haft saß. Das Berliner Humboldt-Institut hatte bei der Analyse die Proben verunreinigt; der Staatsanwalt entschuldigte sich schriftlich. Der Psychologe Jonathan Koehler schätzt den Anteil der falsch-positiven Ergebnisse, die in einem DNA-Labor vorkommen in der Größenordnung von 1:100 (Schlamperei, irreführende DNA-Muster, falsche Bezeichnungen der Proben). Die Schlussfolgerungskette wird durch falsch-positiv-Fehler schon unter Punkt 1 durchbrochen und der Rest der Kette wird ungültig. Regelmäßig sind strafprozessuale Maßnahmen aufgrund eines DNA-Treffers nur nach genauer Prüfung erlaubt. Die Verifizierung der ersten Probe durch eine zweite ist vorgeschrieben.

Bei Patienten mit einer Knochenmarkstransplantation findet sich bei Blutuntersuchungen in der Regel der genetische Fingerabdruck des Spenders, in seltenen Fällen auch eine gemischte Chimäre. Bei einem Mundschleimhautabstrich findet sich in der Regel eine gemischte Chimäre, während in den Haarwurzeln die ursprüngliche genetische Information erhalten bleibt.[3][4]

Eineiige Zwillinge haben mit Ausnahme der V(D)J-Regionen in den Gedächtniszellen des Immunsystems (B-Lymphozyten) den exakt gleichen genetischen Code. Bei einem „positiven“ Ergebnis kann deshalb die Tatortspur durchaus auch vom nicht getesteten Zwilling stammen, wenn der genetische Fingerabdruck die genannten Regionen nicht miteinschließt.[5]

Im März 2009 musste ein Zwillingpaar freigelassen werden, das im Verdacht steht, am 25. Januar 2009 in das Kaufhaus des Westens eingebrochen zu sein und eine Beute mit einem Wert in Millionenhöhe gemacht zu haben. Die Analyse von Spuren an einem am Tatort gefundenen Handschuh ergab eine Übereinstimmung mit der DNA beider Zwillinge. Obwohl feststeht, dass mindestens einer der beiden am Tatort war, konnte keinem der beiden eine Tatbeteiligung nachgewiesen werden, da die Spur vom jeweils anderen stammen könnte.

Referenzen (Quelle Wiki)

1. ↑ a b c Bundesverfassungsgericht (Pressestelle): Pressemitteilung Nr. 62/2009. Bundesverfassungsgericht, 17. Juni 2009, abgerufen am 17. Juni 2009.

2. ↑ a b c Bundesverfassungsgericht: 2 BvR 287/09 (und 2 BvR 400/09). 22. Mai 2009, abgerufen am 17. Juni 2009 (Beschluss der 2. Kammer des Zweiten Senats des Bundesverfassungsgerichts).
3. ↑ Y.C. Hong, H.M. Liu, P.S. Chen, Y.J. Chen, J.Y. Lyou, H.Y. Hu, M.F. Yi, J.S. Lin, C.H. Tzeng.: Hair follicle: a reliable source of recipient origin after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: Nature Publishing Group (Hrsg.): Bone Marrow Transplantation. 40, S. 871–874. doi:doi:10.1038/sj.bmt.1705823.
4. ↑ Leiche mit männlicher und weiblicher DNA entdeckt, Focus Online, 19. Oktober 2008
5. ↑ Mark Benecke: Genetischer Fingerabdruck / DNA-Typisierung. F.A. Brockhaus, Leipzig 2005/2006, S. 449-454.

Zielsetzung:

Welcher Verdächtige hat sich tatsächlich am Tatort befunden?



SICHERHEIT IM LABOR:

1. Handschuhe und Schutzbrille tragen
2. Besondere Vorsicht beim Umgang mit Heizgeräten
3. Nicht mit dem Mund pipettieren
4. Vorsicht bei der Verwendung von elektrischen Betriebsmitteln im Labor
5. Hände immer gründlich nach dem Umgang mit Reagenzien und biologische Materialien waschen.

Laborbuch:

Folgende Arbeitsschritte und Vorgehensweisen sollten unbedingt im Laborbuch festgehalten werden:

Vor dem Experiment:

- Schreiben Sie eine Hypothese, die das Experiment widerspiegelt!



PCR-Amplifikation von DNA zwecks Fingerprinting – Best.-Nr.1093127

- Welche Ergebnisse erwarten Sie?
- Notieren Sie Ihre Anmerkungen und/oder fotografieren Sie die Ergebnisse!

Nach dem Experiment:

- Formulieren Sie Ergebnisse
- Wurden Änderungen im Versuchsablauf vorgenommen?

Chematische Darstellung der PCR-Reaktion:

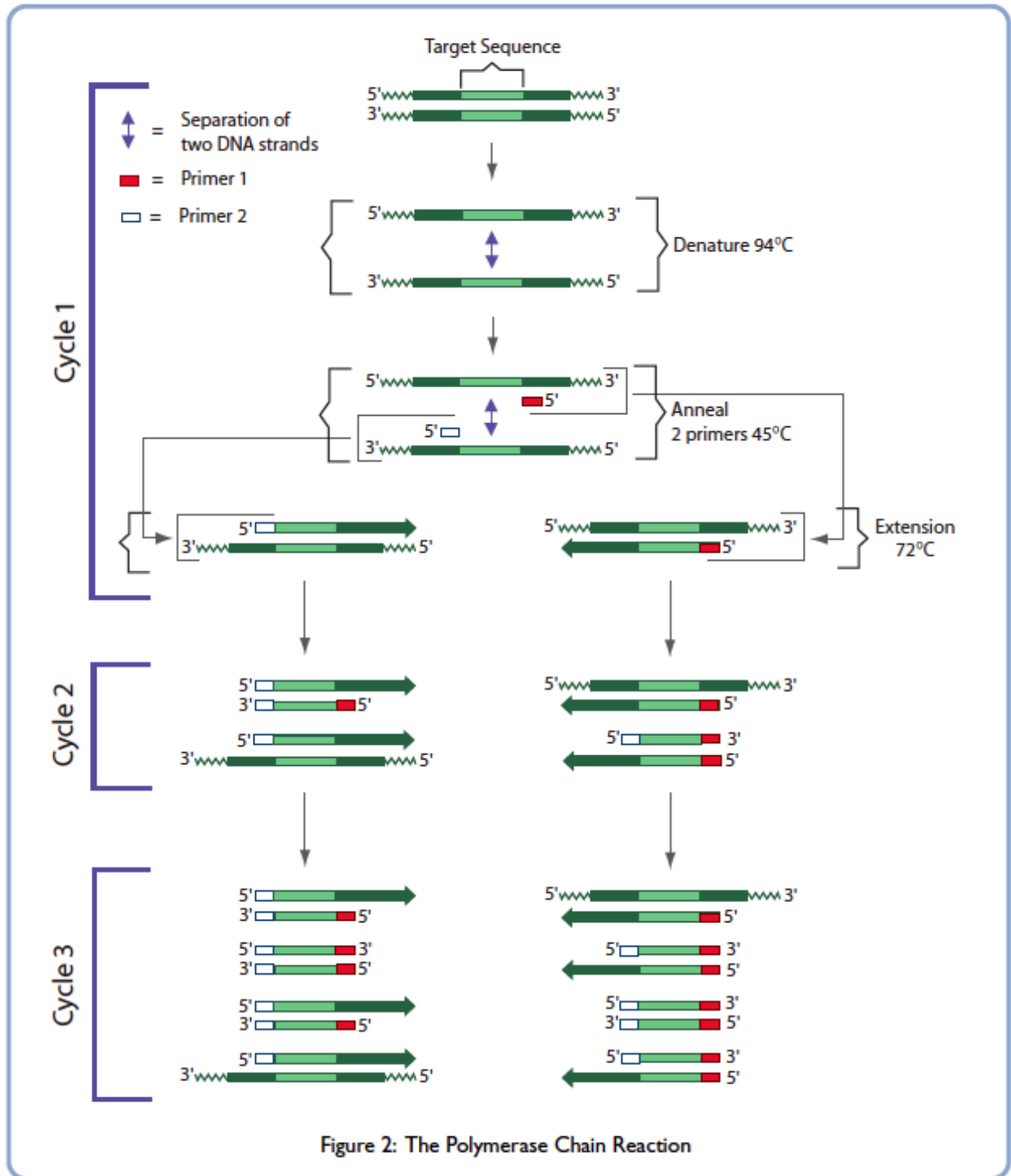
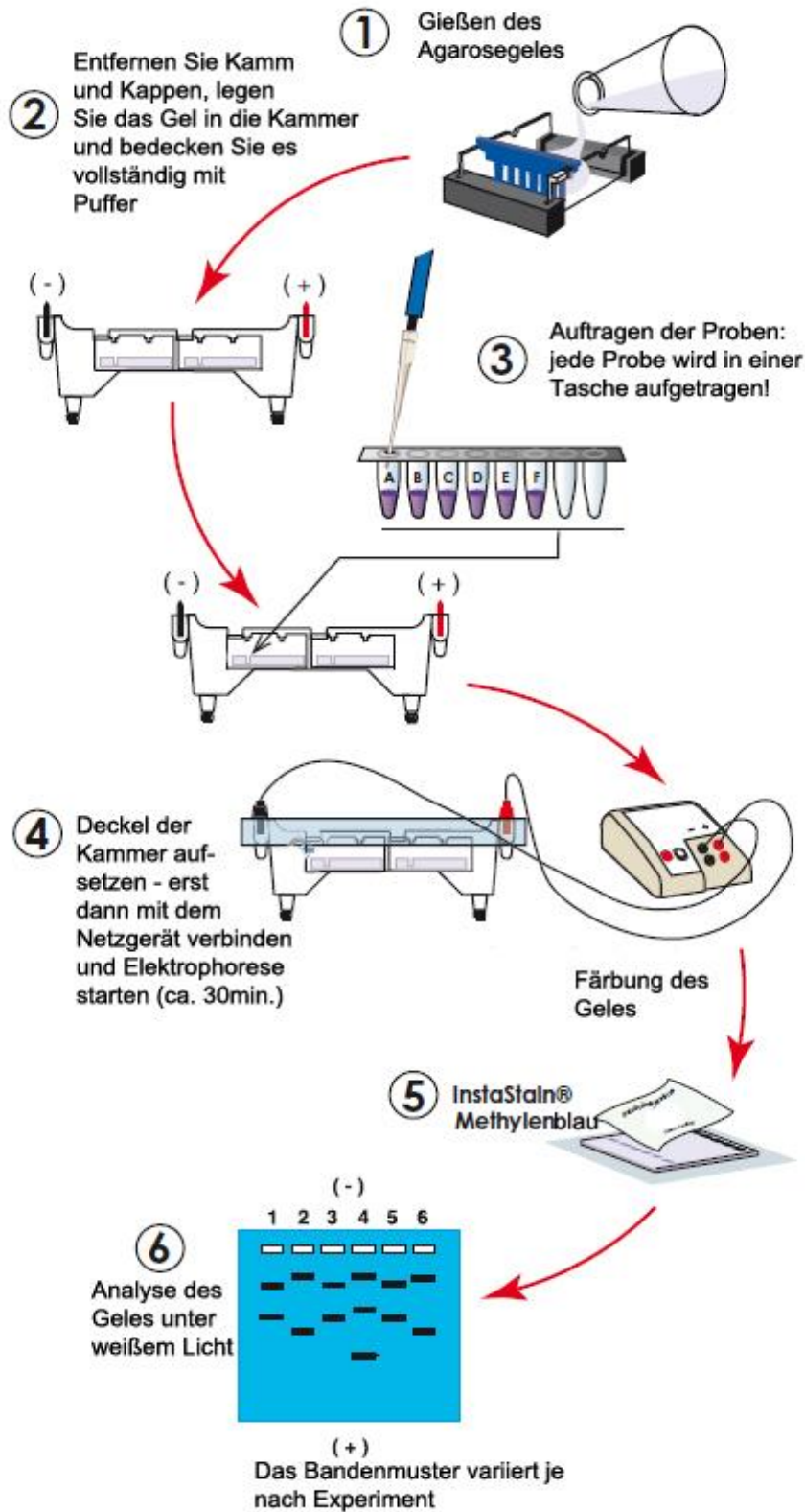


Figure 2: The Polymerase Chain Reaction

Das Experiment

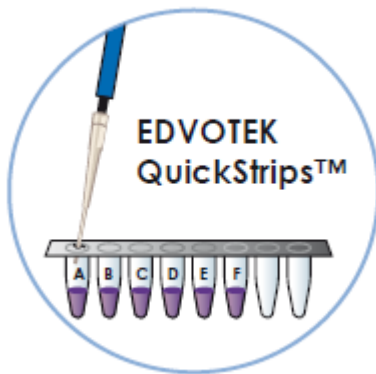


Experimenteller Überblick und generelle Informationen

Vorbereitung der Proben

Sie finden die Proben für unsere Kits entweder als Pre-aliquotierte QuickStrip™ Tubes oder in 1,5 ml oder 0,5 ml Röhrchen Eppendorf-Gefäßen:

Pre-aliquotierte QuickStrip™ Tubes



Jeder Satz QuickStrip™ Stripes enthält mehrere Tubes mit genau richtig vor-aliquotierten Mengen an „Ready-to-load“-Proben für ein Gel. Die Stripes sind durch eine schützende Folie verschlossen und müssen lediglich geöffnet und aufgetragen werden. Klopfen Sie die Proben vor dem Öffnen sanft auf den Tisch um zu garantieren, dass sich die Flüssigkeit auf dem Boden des Eppendorf-Gefäßes sammelt.

Schneiden Sie eine Reihe bereits aliquotierter QuickStrip Proben für jede Laborgruppe ab. Wenn Sie mit Reaktions-gefäßen arbeiten, lassen Sie die Probengefäße rumgehen oder pipettieren Sie für jede Laborgruppe 50 µl von jeder Probe in ein Reaktionsgefäß. Jede Laborgruppe erhält 6 Proben.

Individuelle 1,5ml oder 0,5ml Tubes

Aliquotieren Sie die Proben entweder für Ihre Schüler vor, oder lassen Sie die Schüler selbst die Proben aus den entsprechenden Röhrchen entnehmen.



Überprüfen Sie das Probenvolumen. Manchmal bleibt eine kleine Menge der aufzutragenden Probe an den Wand des Eppis zurück.

Stellen Sie sicher, dass die gesamte Probe aufgetragen wird und zentrifugieren Sie die Probengefäße vor dem Auftragen kurz ab.

Jede Laborgruppe benötigt:

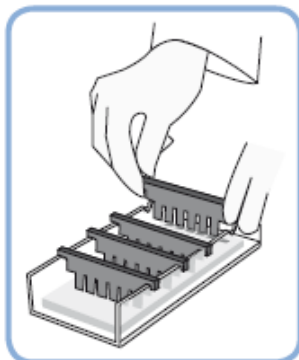
1 Gel

1 Satz DNA Proben

1 Mikropipette (40 µl Fixvolumen oder 5 bis 50 µl einstellbar oder Transferpipette mit Mikrospitze)

1 InstaStain Methylenblau Färbekarten

1 Becherglas mit warmem Leitungswasser (37°C)

Praktische Hinweise zum Beladen eines Geles

Sorgfältiges Bearbeiten der Proben führt zu den bestmöglichen Ergebnissen im Gel. Pipettierfehler können dazu führen, dass die Probe verwässert oder mit Puffer verunreinigt werden kann. Daher sollte beim Auftragen darauf geachtet werden, dass Sie je Probe eine neue Pipettenspitze verwenden. Außerdem sollte die Pipettenspitze NIEMALS so tief in die Geltasche versenkt werden, dass dies zu einem Schaden des Geles führt. Lassen Sie Ihre Schüler die Technik des Beladens zuvor an einem „Probegel“ üben.

1. Stellen Sie zunächst ein Gel mit der maximalen Anzahl von Taschen her
2. Nachdem das Gel erstarrt ist, legen Sie es unter Puffer in eine Färbewanne.
3. Tragen Sie die Proben auf – hierbei ist wichtig die Probe langsam in die Geltasche „einlaufen zu lassen“ ohne das Gel selbst oder die Gel-Tasche mit der Pipettenspitze zu punktieren oder zu beschädigen.

→ Ziel dieser Übung ist es, Ihren Schülern das Pipettieren IN einer Flüssigkeit beizubringen!

Auftragen der Proben:**Pipettieren mit der 40 µl Minipipette:**

- Klopfen Sie behutsam die QuickStrip™ Stripes vorsichtig auf den Labortisch, um sicherzustellen, dass die Proben sich am unteren Ende der Tubes sammeln
- Durchstechen Sie die Schutzfolie der Tubes vorsichtig mit einer frischen Pipettenspitze
Drücken Sie den Pipettenkolben bis zum ersten Anschlag, tauchen Sie die Spitze in die Probe und lassen Sie den Pipettenkolben vorsichtig los (die Probe wird in die Spitze aufgenommen).
- Tauchen Sie die Pipettenspitze mit der Probe in eine Geltasche und lassen Sie die Probe LANGSAM durch behutsames Senken des Pipettenkolbens in die Tasche laufen.
- Wechseln Sie die Pipettenspitze.
- Wiederholen Sie diese Schritte mit einer frischen Pipettenspitze für jede Probe.

Pipettieren mit einer einstellbare Mikropipette:

- Diese Pipetten verfügen über zwei Druckpunkte: Einen ersten weichen Druckpunkt und einen zweiten festen Druckpunkt.
- Setzen Sie eine saubere gelbe Mikropipettenspitze auf das Ende Ihrer Pipette.
- Stellen Sie die Mikropipette auf 40 µl ein (greifen Sie hierfür bei Bedarf auf die Gebrauchsanweisung der Pipette zurück).
- Entfernen Sie den Deckel von dem Gefäß mit dem Übungs-Ladepuffer.
- Drücken Sie den Kolben bis zum ersten Druckpunkt hinunter und tauchen Sie erst dann mit der Spitze in die Flüssigkeit ein.
- Tauchen Sie mit dem Ende der Mikropipettenspitze in den Übungs-Ladepuffer und ziehen Sie 40 µl der dunkelblauen Flüssigkeit durch langsames Nachgeben/Loslassen des Kolbens in die Pipettenspitze auf.
- Beladen Sie damit eine der Geltaschen des Gels („Trockenbeladung“): Drücken Sie hierfür den Kolben bis zum zweiten festen Druckpunkt hinunter. Wenn Sie alle Flüssigkeit aus der Pipettenspitze hinaus gedrückt haben, ziehen Sie die Pipette mit gedrücktem Kolben aus der Geltasche heraus.

Transferpipetten mit feiner Spitze:

Ein vorsichtiges Drücken des Pipettenstamms im Vergleich zum Saugballg ermöglicht Ihnen eine bessere Kontrolle beim Pipettieren.

**Erforderliches Zubehör für dieses Experiment**

- Agarosegele in der Größe: 7 x 7 cm or 7 x 14 cm

- Anzahl der Taschen: 5
- Konzentration der Agarosegele: 0.8%

Vorbereitung eines Agarosegeles

Verschließen Sie die offenen Enden eines sauberen und trockenen Gel-Schlitten mit Gummikappen oder Klebeband:

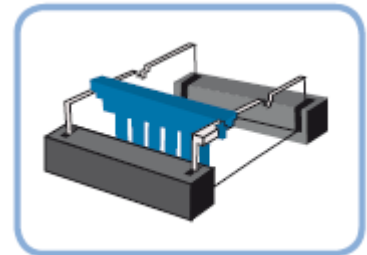
A. Verwendung von Gummikappen:

Stecken Sie je eine Gummikappe auf jedes Ende des Gelschlitten und stellen Sie sicher, dass die Kappen fest mit dem Schlitten verbunden sind.

B. Taping mit TESA oder Klebeband:

Verschließen Sie die Enden des Gelschlittens mit Tesaband und erweitern Sie das

Band über die Seiten und den unteren Rand des Bettes.
Falten Sie die erweiterten Ränder des Bandes



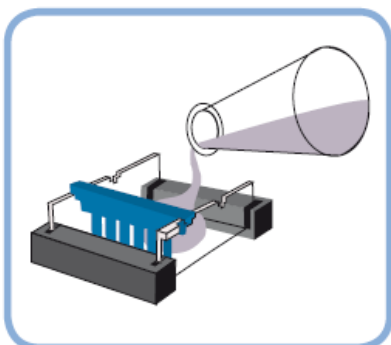
Stecken Sie den Kamm in die dafür vorgesehenen Kerben und achten Sie auf einen festen Sitz.

Mischen Sie die Agarose in einer mikrowellensicheren Flasche:

- 3 g UltraSpec Agarose
- 375 ml verdünnten Elektrophoresepuffer

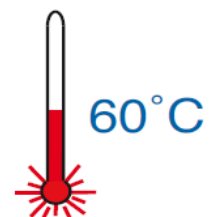
Schwenken Sie die Flasche zum Durchmischen.

Erhitzen Sie die Flasche für eine Minute in der Mikrowelle, schwenken Sie die Flasche erneut und wiederholen Sie diesen Vorgang, bis die Agarose im Puffer gelöst ist. Wenn Sie keine Mikrowelle zur Verfügung haben, können Sie hierfür auch einen Autoklaven oder eine Heizplatte verwenden.



VORSICHT – Die Agarose ist nun heiß und kann Überlaufen (Siedeverzug)!

Lassen Sie die Agaroselösung vor dem Gießen unbedingt bis auf 60°C abkühlen, sonst laufen Sie Gefahr Ihre Gelkammer irreparabel zu beschädigen.



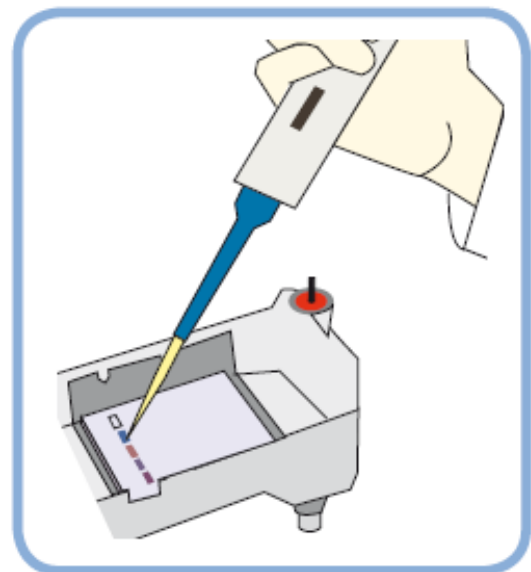
Lassen Sie die Agarose-Lösung langsam und vorsichtig in die versiegelte Gelkammer einfließen. Das Gel ist fertig, wenn es vollständig erkaltet und milchig trüb ist. Erst jetzt werden Gummikappen (Tesa-Film) und Kamm entfernt (Vorsicht, bei diesem Schritt rutscht das Gel sehr schnell aus dem Schlitten und man beginnt von vorne!)

Das Laden der Proben

Tipp: Wenn Sie auf einer Arbeitsbank mit heller Oberfläche arbeiten, sollten Sie zum einfacheren Beladen des Gels ein Stück dunkles Papier unter das Gel / die Geltaschen legen.

Das trockene Beladen des Gels

- Wenn Sie Quickstrips verwenden, müssen Sie zuerst mit einer sauberen Pipettenspitze die Folienabdeckung der Probe durchstechen. Klopfen Sie gegen das Reaktionsgefäß, so dass sich die Probe unten im Gefäß sammelt. Wenn Sie mit Reaktionsgefäßen arbeiten, ziehen Sie das Probenvolumen mit einer Mikropipette auf. Klopfen Sie an das Reaktionsgefäß oder zentrifugieren Sie das Gefäß für ein paar Sekunden, so dass sich das Probenvolumen unten im Reaktionsgefäß sammelt.
- Laden Sie 40 µl der Probe A in die Geltasche 1.
- Wechseln Sie die Mikropipettenspitze (oder spülen Sie die Pipette mit Mikrospritze im Becherglas mit warmem Wasser aus).
- Setzen Sie das Laden der Proben in aufeinanderfolgende Geltaschen fort.
- Bringen Sie Ihr Gel zur Elektrophoresekammer.
- Setzen Sie das Gel vorsichtig in die Kammer ein. Achten Sie darauf, dass die Geltaschen am negativen Ende (schwarze Elektrode (Anode)) zu liegen kommen.
- Bedecken Sie das Gel VORSICHTIG UND LANGSAM mit verdünntem Elektrophoresepuffer. Achten Sie darauf, dass Sie die Proben hierbei nicht aus den Geltaschen heraus spülen.



Das nasse Beladen des Gels

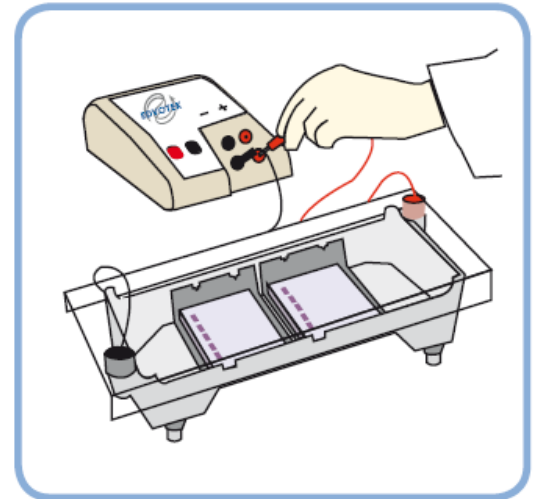
- Setzen Sie das Gel vorsichtig in die Kammer ein. Achten Sie darauf, dass die Geltaschen am negativen Ende (schwarze Elektrode (Anode)) zu liegen kommen.
- Bedecken Sie das Gel mit verdünntem Elektrophoresepuffer. Achten Sie darauf, dass das Gel vollständig mit Puffer bedeckt ist.

- Wenn Sie Quickstrips verwenden, müssen Sie zuerst mit einer sauberen Pipettenspitze die Folienabdeckung der Probe durchstechen.
- Laden Sie 40 µl der Probe A in die Geltasche 1.
- Wechseln Sie die Mikropipettenspitze (oder spülen Sie die Pipette mit Mikrospritze im Becherglas mit Wasser aus).
- Setzen Sie das Laden der Proben in aufeinanderfolgende Geltaschen fort.

Das Laufen der Gele

Setzen Sie den Deckel auf die Elektrophoresekammer und schließen Sie diese an das Netzgerät an. Schalten Sie das Gerät ein.

Kontrollieren Sie, ob an der roten positiven Elektrode (Kathode) Blasen aufsteigen.



Tipp: Wenn keine Blasen aufsteigen, sollten Sie die Verbindungskabel überprüfen und kontrollieren, ob das Netzgerät angeschaltet ist! Lassen Sie das Gel so lange laufen, bis die Proben gut aufgetrennt sind. Richtlinien hierzu finden Sie weiter unten. Lassen Sie das Gel so lange laufen, bis der blaue Farbstoff etwas mehr als die Hälfte des Gels durchlaufen hat. Richten Sie sich dabei auch nach folgenden Angaben:

Volt	M6 Kammer	M12 & HexaGel Kammer
150	15-20 Minuten	25-35 Minuten
125	20-30 Minuten	35-45 Minuten
75	35-40 Minuten	55-85 Minuten

Das Färben des Gels

Handhaben Sie Ihr Gel nun sehr vorsichtig, es ist jetzt besonders glitschig. Tragen Sie für diesen Arbeitsschritt Handschuhe!

Methode 1: Ein-Schritt-Färben und Entfärben mit Instastain® Methylenblau -Karten



Agarosegele können in einem einfachen Schritt mit InstaStain ge- und entfärbt werden. Dieses Ein-Schritt-Verfahren kann über Nacht oder innerhalb von 3 Stunden durchgeführt werden:

- Entfernen Sie die 7 x 7 cm Agarosegele aus ihrem Schlitten und legen Sie sie in ein mit 75 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser oder verwendetem

Elektrophoresepuffer gefüllte Wanne. Das Agarose-Gel sollte vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.

- Legen Sie eine 7 x 7 cm InstaStain® MethylenBlue-Karte mit der blauen Seite nach unten in die Lösung.
- Lassen Sie das Gel ungestört für ca. 3 Stunden in der Flüssigkeit. Das Gel kann auch über Nacht gefärbt werden, allerdings sollten Sie dann die Färbewanne mit Folie bedecken um ein Austrocknen zu verhindern.
- Nach dem Färben und Entfärben ist das Gel bereit für die Visualisierung.

Lagerung und Entsorgung von InstaStain® Methylenblau-Karten und Gelen:

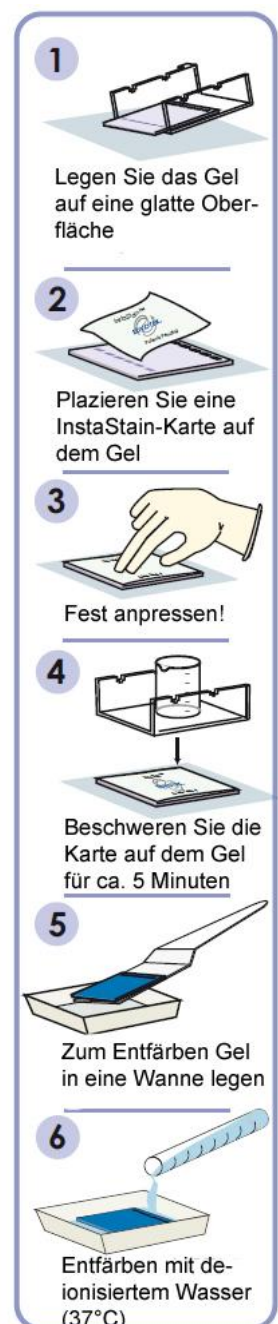
Gele können im Kühlschrank mehrere Wochen gelagert werden. Legen Sie das Gel in einen verschließbaren Plastikbeutel mit Entfärber-Flüssigkeit. NICHT EINFRIEREN!

Gebrauchte InstaStain®-Karten und entfärbte Gele in den Abfall entsorgt werden.

Tipp: Wenn die Banden nach 30 Minuten nicht sichtbar werden, sollten Sie den Färbevorgang mit einer frischen Färbekarte wiederholen. Färben Sie in diesem Fall über Nacht (siehe Methode 1)!

Methode 2: Liquid Färbung mit Methylenblau Plus™

Verdünnen Sie die 10x Stammlösung durch Mischen von 1 Teil Lösung mit 9 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser.



Entfernen Sie das Gel aus dem Schlitten und bedecken Sie es in einer Färbewanne unter leichtem Schütteln für mindestens 30min mit einem Gemisch aus 600ml der verdünnten Methylenblau Plus™-Lösung und 600ml destilliertem Wasser, welches auf 37°C erwärmt wurde.

Anschließend entfernen Sie die Lösung und bedecken das Gel erneut mit 600ml auf 37°C vorgewärmtes, destilliertes Wasser für weitere 15 Minuten. Dann die Lösung verwerfen und diesen Schritt noch zweimal wiederholen.

Nach dem zweiten Waschschrift sollten bereits erste Banden erkennbar sein. Sie können das Gel auch über Nacht entfärben, allerdings ist hier die Gefahr recht groß, dass die Banden zu stark verblassen und ein weiterer Färbeschritt vorgenommen werden muss.

Methode 3: Färben mit Instastain ® Methylenblau-Karten

- Entnehmen Sie das Gel aus der Gießform.
- Legen Sie die InstaStain Karte mit der blauen Färbeseite nach unten auf die Oberfläche des Gels.
- Streichen Sie mit den Fingern fest über die Oberfläche der Färbekarte, um eventuell vorhandene Blasen zwischen Gel und Karte wegzustreichen.
- Setzen Sie ein leichtes Gewicht (wie zum Beispiel ein leeres Becherglas) auf die Karte und das Gel.
- Warten Sie für 5 bis 10 Minuten.
- Nehmen Sie die Färbekarte vom Gel und waschen Sie das Gel so lange in 100 ml warmem Wasser (37°C), bis die Banden sichtbar werden (zwischen 10 und 15 Minuten).

Entfärbung und Visualisierung von DNA

Legen Sie das Gel in eine Färbewanne.

Entfärben Sie mit etwa 100ml destilliertem Wasser unter leichtem Schütteln und wechseln Sie so oft wie nötig das Wasser.

Die größeren DNA-Banden werden zunächst als dunkelblaue Banden gegen einen sichtbaren, hellblauen Hintergrund abgebildet. Ist das Gel vollständig entfärbt, so erscheint der gesamte Hintergrund nur noch schwach hellblau und die Banden zeichnen sich diskreter und größer ab.

Entfernen Sie vorsichtig das Gel aus der Lösung und betrachten Sie es auf einem Visualisierungssystem mit Bernsteinfilter (Leuchtpult mit weißem Licht oder Overhead-

Projektor können ebenfalls eingesetzt werden, allerdings sind Banden hier schwieriger zu erkennen).

VORSICHT! Ist das Gel zu stark entfärbt, so verschwinden die kleineren Banden. In diesem Fall empfiehlt es sich zwei Aufnahmen des Gels zu machen (eine Aufnahme nach dem ersten Waschschrift, eine weitere nach dem zweiten Waschschrift).

Ergebnisse

Sie sollten folgendes auf Ihrem Gel sehen:

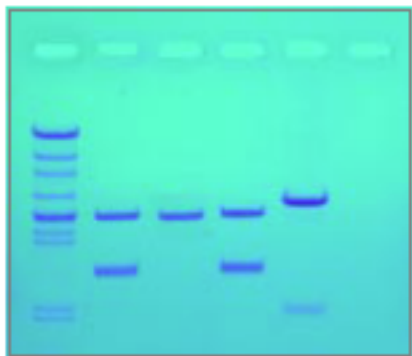
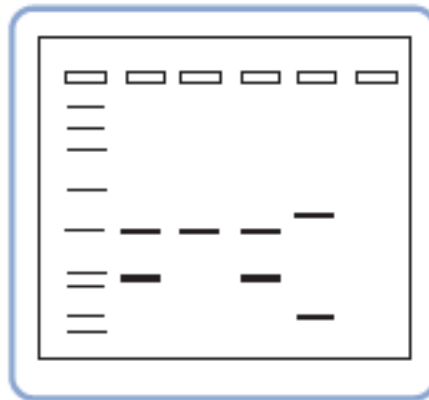


Photo of gel result



Die schematische Zeichnung rechts stellt die Position der idealisierten Banden dar – in der Realität kann sich das Bandenmuster jedoch stark verzerrt darstellen.

Fragen und Lösungen

1. Was ist polymorphe DNA? Warum wird sie zur Identifizierung verwendet?
Der Begriff polymorphe DNA bezieht sich auf die Länge von chromosomalen Regionen, die von Person zu Person sehr unterschiedlich sind. Durch die Analyse einer Reihe dieser Regionen können vermisste Personen, menschliche Überreste, oder passende Tatverdächtigen Tatorten zugeordnet werden.
2. Was sind CODIS?
CODIS ist ein Akronym für eine Computer-basierte Datenbank mit DNA-Fingerabdrücken. In dieser Datenbank befinden sich DNA-Profile von verurteilten Schwerverbrechern, welche dann zum Abgleich herangezogen werden können.

3. Was ist ein STR? Ein VNTR? Welche (STR oder VNTR) werden überwiegend bei der Strafverfolgung herangezogen? Warum?

Ein STR ist ein Akronym für einen short tandem repeat, eine DNA-Sequenz mit 2-4 Basenpaare, die sich variabel ist von Person zu Person wiederholt. VNTRs, haben mehr sich wiederholende Basenpaare (15-70). STRs werden bevorzugt verwendet, da weniger Template DNA zur Amplifikation erforderlich ist.