

## Genetischer Fingerabdruck : Die DNA-Fingerprint - Technik

(entwickelt 1985 von Alex Jeffreys, Universität Leicester)

### Molekularbiologische Informationen zu dieser Technik:

In kriminaltechnischen (= forensischen) Laboratorien werden genetische Fingerabdrücke untersucht, um die Überführung oder die Entlastung eines Verdächtigen an Hand von am Tatort gefundenen Spuren zu ermöglichen. Auch Verwandtschaftsverhältnisse (z.B. Vaterschaftsgutachten) lassen sich durch diese Methode klären (basierend auf der Tatsache, dass der genetische Fingerabdruck nach den Mendelschen Regeln je zur Hälfte von jedem Elter ererbt wird.)

Mit dem genetischen Fingerabdruck (auch "DNA-Profil" oder "DNA-Fingerprinting" genannt) haben die Strafverfolgungsbehörden seit Mitte der 80er Jahre ein ausgesprochen wirksames Mittel zur eindeutigen Identifizierung einer Person in der Hand.

Wichtig: Der genetische Fingerabdruck erlaubt zwar eine Aussage über die Identität von Spurenverursacher und Tatverdächtigem. Nähere Aussagen zu Persönlichkeitsmerkmalen des Spurenverursachers (also z.B. Haar- oder Augenfarbe, Statur, Herkunft, Charakter etc.) erlaubt das Verfahren jedoch nicht, da die DNA aus Bereichen stammt, die keine Informationen codieren. Für den genetischen Fingerabdruck reichen Minispuren ( 5-10 µg DNA) aus, solange sie noch Erbmateriale enthalten beispielsweise die Blutspur an einem Glassplitter, die Wurzel eines ausgefallenen Haares oder Speichel- und Zellreste an einer Zigarettenkippe.

Man vergleicht nicht das gesamte Erbgut, sondern nur charakteristische "Schnipsel", die sehr variabel sind, weil sie keine genetische Information tragen. (siehe unten)

In der Fachliteratur wird eine Wahrscheinlichkeit von  $4 \times 10^{-11}$  dafür genannt, dass zwei nicht verwandte Personen das gleiche Bandenmuster haben; bei Verwandten liegt sie immer noch unter  $4 \times 10^{-5}$ . Nur bei eineiigen Zwillingen scheidet das Verfahren, denn die haben identische Erbanlagen.

Seit 1998 wird beim BKA eine Gendatei aufgebaut. In ihr sollen die genetischen Fingerabdrücke bestimmter Tätergruppen auf Verdacht gespeichert werden.

Im Fall Christina Nytsch (11) hatte man am Opfer Spermaspuren gefunden und suchte über einen Speicheltest nach dem passenden genetischen Muster des Täters. 1998 wurden ca. 12000 Männer zwischen 18 und 30 Jahren aus allen Nachbardörfern zum Speicheltest gebeten (-unter ihnen auch der dadurch überführte Mörder).

### Das RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)- Verfahren:

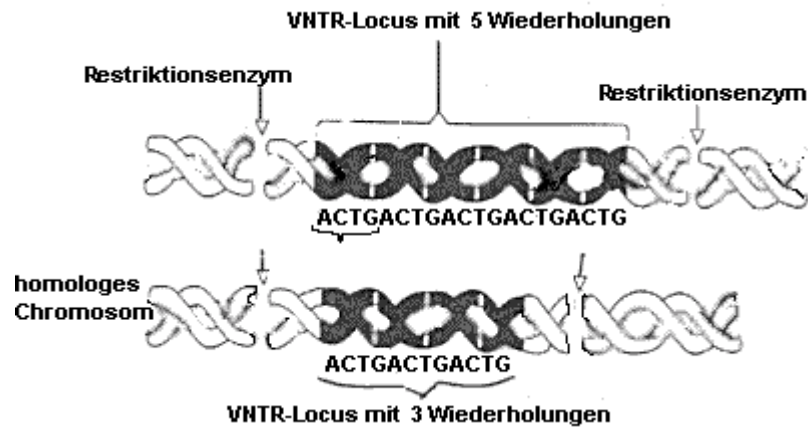
(Benötigt werden 50.000 bis 500.000 Zellkerne)

In jeder Zelle tragen wir zwar unsere komplette Erbinformation (ca.3 Milliarden Basenpaare), doch in nur ca. 3 Prozent der DNA steckt der Bauplan unseres Körpers, 97 Prozent sind ohne bekannte Funktion (= nicht kodierende DNA). Auf verschiedene dieser "funktionslosen" Abschnitte (sog. Introns) haben es die Biologen abgesehen, denn ihre Längen sind von Mensch zu Mensch verschieden.

Innerhalb dieser Abschnitte gibt es viele verschiedene sog.VNTR-Loci (Variable Number of Tandem Repeats), die aus Wiederholungen derselben kurzen Basensequenz (z.B. ACTG) bestehen. Diese Wiederholungssequenzen sind unterschiedlich lang, da sie bei verschiedenen Menschen in unterschiedlicher Anzahl vorliegen und von daher zur Identifizierung einer DNA-Probe herangezogen werden können.

Man erwartet pro VNTR-Locus und untersuchter Person 2 Banden, die von den beiden homologen Chromosomen (eins vom Vater, eines von der Mutter) stammen.

### Schema: Homologes Chromosomenpaar mit VNTR-Loci verschiedener Länge



Diese VNTR-Loci werden durch spezifische Schneide-Enzyme = **Restriktionsenzyme** als "Schnipsel" = DNA- **Fragmente** verschiedener Länge herausgeschnitten. Um sie der Länge nach zu sortieren und um sie sichtbar zu machen müssen noch eine Reihe weiterer Schritte folgen.

### So läuft der Test im kriminaltechnischen Labor ab: (vereinfacht)

**1) Gewinnung des DNA-haltigen Materials vom Tatort.** (mindestens 50.000 Zellkerne)

**2) Herstellung der Restriktionsfragmente.**

Diese VNTR-Abschnitte sind von einer bestimmten Basenfolge eingerahmt, und können deshalb von **spezifischen Schneideenzymen** erkannt werden. Man spaltet also die DNA-Proben mit Restriktions- Enzymen, die ihre Erkennungssequenzen vor und hinter dem untersuchten VNTR-Locus, nicht aber innerhalb haben.

**3) Gelelektrophorese:**

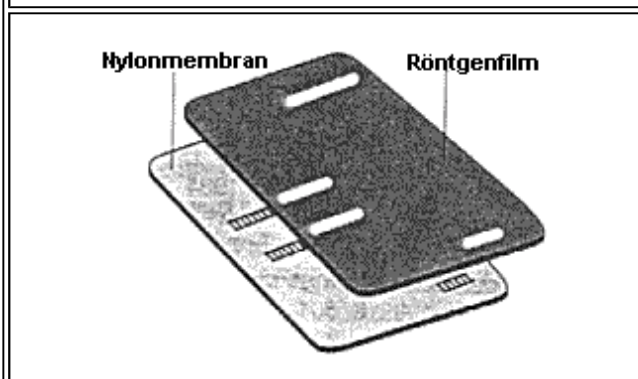
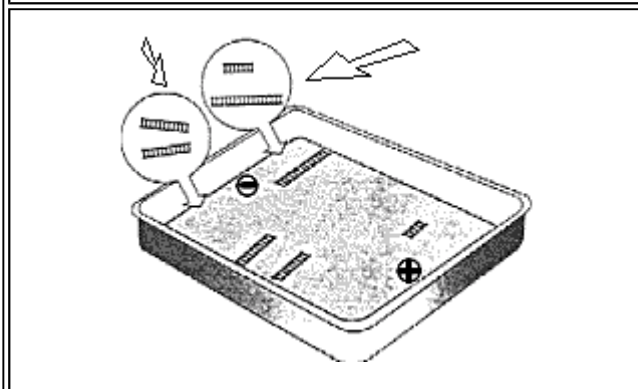
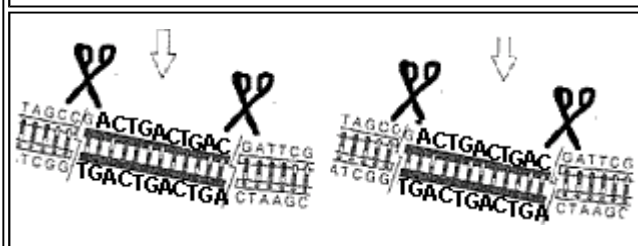
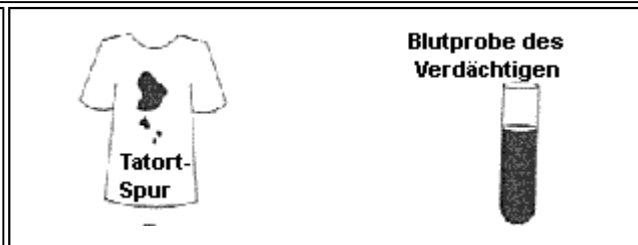
Nach der Spaltung werden die DNA-Fragmente auf einem Agarose-Gel im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Die DNA-Stücke sind wegen der Phosphat- Gruppe negativ geladen und wandern zum Pluspol. Große Fragmente wandern langsamer als kleine.

**5) Denaturierung und Blotting:**

Aufspaltung der doppelsträngigen DNA-Bruchstücke in Einzelstränge (=Denaturierung) und Auftragung / Fixierung (=Blotting) auf einer speziellen Nylon- Membran.

**6) Sichtbarmachung durch Gensonden:**

Zugabe radioaktiv markierter **Gensonden**, das sind einsträngige DNA-Stücke, die eine komplementäre Basensequenz zu Nachbar-Bereichen des VNTR-Locus enthalten, und sich deshalb an die gesuchten DNA-



Fragmente anlagern.

### 7) Autoradiographie:

Durch Auflegen eines Röntgenfilms ist es anschließend möglich, die Fragmente auf der Membran durch Schwärzung zu identifizieren. Es entstehen die charakteristischen Bandenmuster.

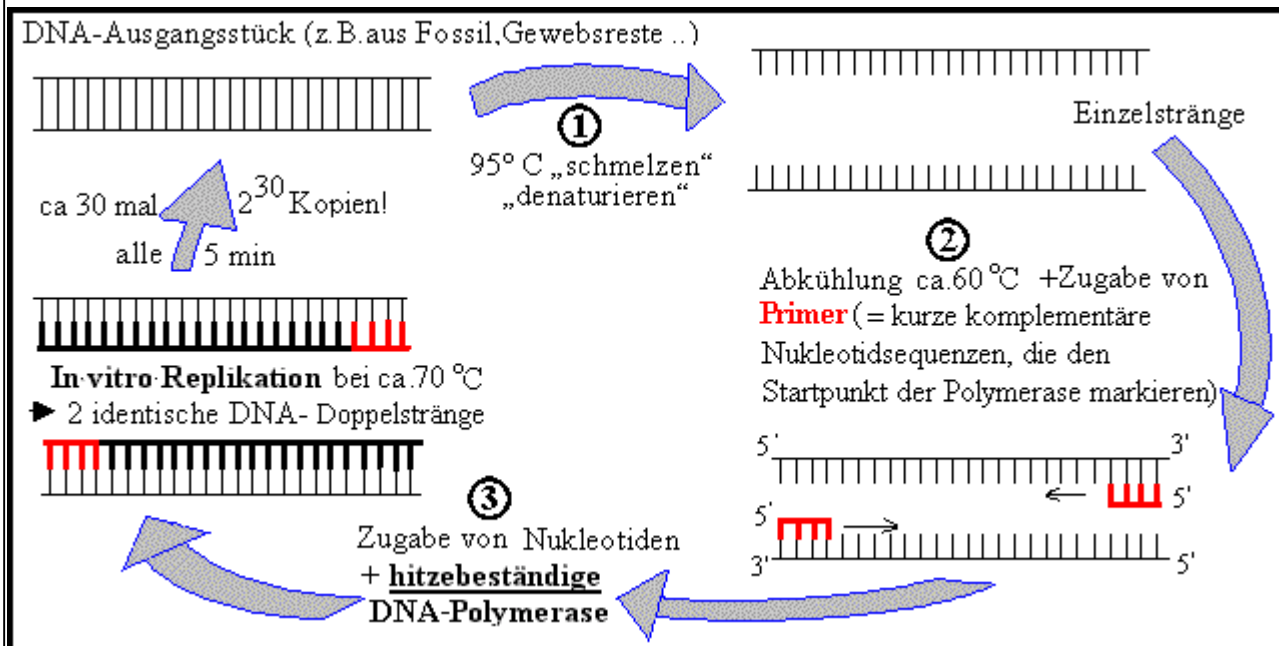


Führt man diesen Test bei hinreichend vielen verschiedenen VNTR-Loci durch, kann man eine Gewebeprobe mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Person zuordnen. Deshalb spricht man hier auch von einem **genetischen Fingerabdruck**.

## Das PCR-Verfahren: DNA-Vervielfachung durch die Polymerase-Kettenreaktion

( Benötigt werden nur ca. 50-100 Zellkerne, das entspricht ca. 1milliardstel Gramm DNA )

Meist sind die Tatort-Spuren so winzig, dass für die RFLP-Methode zu wenig DNA vorliegt. Deshalb wird heute meist das **PCR-Verfahren** angewendet, für dessen Entwicklung *Kary Mullis* 1993 den Nobelpreis erhielt.. Hier werden ebenfalls die für jeden Menschen charakteristischen kurzen DNA-Loci mit Wiederholungssequenzen (s.o.) gesucht. Nur diese werden dann aber millionenfach im Reagenzglas vervielfacht (**polymerase-chain-reaction**). Dies ist möglich durch geeignete Startermoleküle. Als Ausgangsmaterial reichen wenige Zellkerne (max.500 Nukleotide). Anschließend werden die DNA-Fragmente -wie oben- der Länge nach durch Gelelektrophorese sortiert und nach Anfärbung ausgewertet.





## 2) Versuchsanleitung für die Simulation eines DNA-Fingerabdrucks:

(c) Jan Brix, Chris Meisinger Inst. f. Biochemie und Mol.Genetik Univ. Freiburg

- Der hier beschriebene Schulversuch simuliert die RFLP (**R**estriktions- **F**ragment- **L**ängen- **P**olymorphismus)- Methode. Es soll der genetische Fingerabdruck von fünf DNA-Proben (für einen VNTR-Locus) verglichen werden.
- Eine dieser Proben soll direkt vom "Tatort" d.h. "Täter" stammen, vier weitere DNA-Proben sollen "Verdächtigen" entnommen worden sein. Diese Proben könnten aus Mundschleimhautzellen, Körperflüssigkeiten (Blut, Sperma), Haarwurzeln oder sogar aus mumifiziertem Gewebe von Fossilien gewonnen werden.
- Statt menschlicher DNA nehmen wir (harmlose) **Bakterien-DNA**, und zwar vier verschiedene DNA- **Plasmide**, die jeweils einen "Verdächtigen" repräsentieren sollen.

Jedes Plasmid wird mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen in charakteristische DNA-Fragmente zerlegt, durch Gelelektrophorese werden die DNA-Fragmente der Länge nach sortiert und mit einem Farbstoff sichtbar gemacht.  
Durch Vergleich der vier erhaltenen Bandenmuster der "Verdächtigen"- Plasmide mit dem Bandenmuster des "Tatort"-Plasmids lässt sich dann einer der "Verdächtigen" als Spurenleger d.h. "Täter" überführen.

Arbeitsschritte:	Material:	Erläuterungen:
<b>A) Restriktions- spaltung der Plasmide</b>	5 Eppendorf-Gefäße und Eppendorfständer	Minireagenzgläser aus Plastik
	2 Gilson-Pipetten(gelb) 2 Gilson-Pipetten(blau)	gelb=20µl bzw.100µl blau =1000µl
	Pipettenspitzen (gelb und blau)	nicht an der Spitze anfassen!
	Mini-Zentrifuge	Zur Vermischung der Tropfen
	Thermoblock	Erhitzen der Eppendorf-Gefäße
	Stoppuhr	Dauer der DNA-Spaltung messen
	5 Plasmid-DNA-Proben (A,B,C,D und Tatort)	Aufbewahrung: -20°C !
	Pufferlösung B (Aufbewahrung: -20°C)	sorgt für zellähnliches Milieu
	Restriktionsenzym BamH I (Aufbewahrung:-20°C)	Erkennungssequenz: 
	Restriktionsenzym Hind III (Aufbewahrung:-20°C)	Erkennungssequenz: 
	Nucleic Acid Sample Loading Buffer (Aufbewahrung:-20°C)	blauer Farbstoff für Elektrophorese
	Dest. steriles Wasser (autoklaviert)	Lösungsmittel
<b>B) Gel- elektrophorese</b>	Elektrophoresekammer	Siehe unten
	Spannungsgerät	" "
	Mikrowellengerät	Erhitzen: Agarose/Wassergemisch
	Erlenmeyer 100ml, Messzylinder	Ansetzen des Gels
	Agarose-Pulver	Gel-Rohstoff (Agar)
	elektron. Waage	Abwiegen der Agarose
	TAE-Puffer-Lösung	Lösungsmittel, Leitfähigkeit
	Marker-DNA	Aufbewahrung: -20°C !
<b>C) Färbung</b>	Schutzhandschuhe	
	Azur-B-Chloridlösung, Färbeschale	Färbung der DNA-Fragmente
	dest. Wasser	Entfärbung des Gels
	Schutzhandschuhe	


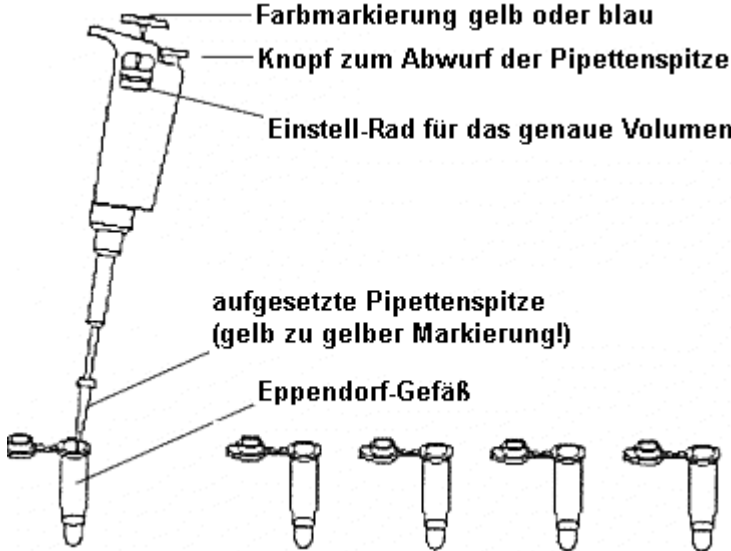

**Durchführung:****A) Restriktionsspaltung der DNA-Plasmide**

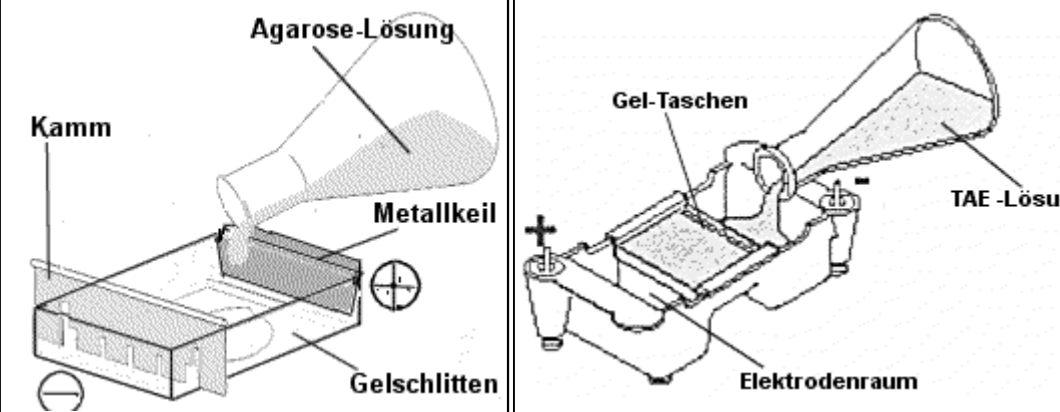
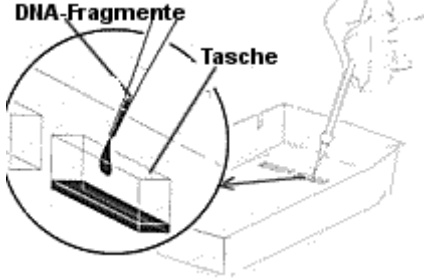
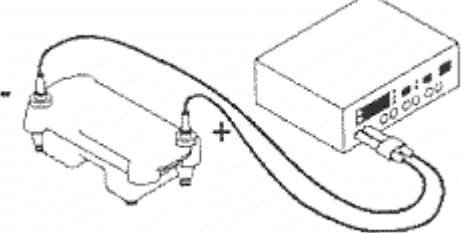
*Thermoblock auf 37Grad vorheizen (s.A5)*

**A1)** Stellen Sie die 5 Plasmid-DNA-Proben bereit.

Kühl halten bis zum Gebrauch!

**A2)** Stellen Sie ebenfalls 5 leere

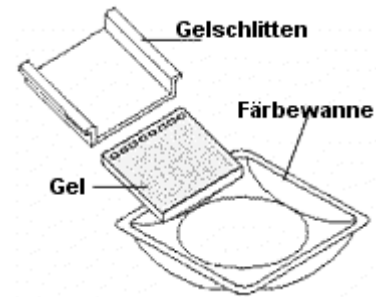
Eppendorf-Gefäße bereit und beschriften Sie diese wasserfest mit A, B, C, D, und Tatort.	
<b>A3)</b> Pipettieren Sie nacheinander in jedes Eppendorf-Gefäß: (gelbe Pipette, gelbe P.Spitzen)	10µl DNA-Lösung (jeweils aus einer <b>anderen</b> Plasmidprobe) 2µl Pufferlösung B 2µl Schneide-Enzym BamH I 2µl Schneide-Enzym Hind III 4µl dest. Wasser (autoklaviert) 20µl Gesamtvolumen
<b>Hinweise zum Pipettieren:</b> - Pipetten nie an der Spitze anfassen. - Pipettenspitze bei Wechsel der Substanz immer wegwerfen. - Werden mehrere Substanzen in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, nicht mit der Pipettenspitze in den vorigen Tropfen tauchen. Zur Sicherheit durch kurzes Zentrifugieren den Tropfen auf den Gefäß-Boden treiben. - Der letzte Tropfen Lösung in der Spitze der Mikropipette wird dadurch entfernt, dass die Innenwand des Gefäßes mit der Pipettenspitze berührt wird.	
<b>A4)</b> Zentrifugieren (5Sek.) und vermischen der Substanzen durch vorsichtiges Antippen mit den Fingerspitzen.	
<b>A5)</b> Anschließend werden die Eppendorf-Gefäße für 1 h bei 37 <sup>0</sup> C im Thermoblock inkubiert, bis der "Restriktionsverdau" abgeschlossen ist. <b>Stoppuhr</b> einstellen! (Evtll. zwischendurch erneut mischen)	
<i>Während die Plasmide im Thermoblock gespalten werden, kann mit <b>B1)</b>, der Herstellung des Agarose-Gels begonnen werden.</i>	
<b>A6)</b> Danach wird zu jeder Lösung 4µl "Nucleic Acid Sample Loading Buffer" pipettiert und zentrifugiert/gemischt. Bei Bedarf könnte man jetzt die Proben einige Tage bei -20 <sup>0</sup> C einfrieren.	
<b>B) Gelelektrophorese: Sortieren der DNA-Fragmente der Länge nach.</b>	
	Zunächst wird die <b>TAE-Pufferlösung</b> angesetzt: 7ml TAE (kl.Messzylinder) werden mit dest. Wasser auf 350 ml Lösung aufgefüllt (gr.Messzylinder) <b>Gelherstellung:</b> 0,3 g Agarose-Pulver wird mit 30 ml TAE in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgeköcht. (Einstellung: 400 Watt 1min)

<p><b>B1)</b> <b>Herstellung</b> <b>des</b> <b>Agarose-Gels</b></p>	<p>Das Gel ist fertig, wenn die Lösung klar und ohne Schlieren und Klumpen ist! Kur abkühlen lassen, bis ca. 55 Grad (Handrücktentst!)</p> <p><b>Gießen des Gels:</b> Das flüssige Gel wird in den <b>Gelschlitten</b> eingefüllt. Durch zwei schwarze <b>Metallkeile</b> wird verhindert, dass Gel in die benachbarten Elektrodenräume fließt. Der Schlitten muss so orientiert sein, dass die Bohrungen für den <b>Kamm</b> in Richtung des Minuspols (schwarz) liegen!</p> <p>Nach Einstecken des Kamms mit 15 Zähnen härtet das Gel in ca. 15 min aus. Anschließend werden die <b>Dichtungskeile</b> gezogen und die restliche TAE-Puffer-Lösung (ca.300ml) wird in die Elektrodenkammern geschüttet, bis das Gel mit Pufferlösung bedeckt ist.</p>	
<p><i>Achtung: A.6 nicht vergessen!</i></p>	<p>Kamm vorsichtig herausziehen. Zum Probenauftrag nimmt man die <b>blaugefärbten</b> Proben ggf. aus dem Gefrierschrank, lässt sie auftauen und zentrifugiert/ mischt sie kurz. Mit frischen Pipettenspitzen lässt man je 10µl DNA-Lösung in die <b>Taschen</b> des Gels hineinlaufen. Die Taschen dürfen nicht verletzt werden! Zum besseren Kontrast einen schwarzen Keil unter die Apparatur legen!</p> <p>Um die Größe der DNA-Fragmente abschätzen zu können, lässt man in der linken und rechten Rand-Tasche einen DNA-Marker mitlaufen.</p>	
<p><b>B2)</b> <b>Auftragen der</b> <b>Proben</b></p>	<p>Der Deckel der Apparatur wird geschlossen und an das Spannungsgerät angeschlossen. Bei 100 Volt läuft die Elektrophorese ca.40-60min. Dann sollte die blaue Bande (Bromphenolblau) am unteren Ende (Pluspol) angekommen sein.</p>	
<p><b>C) Färbung der DNA - Banden</b></p>		
<p>Nach Ausschalten der Spannung und Ziehen des Netzsteckers wird der Deckel der Apparatur wieder entfernt. Nun wird das Gel vorsichtig in eine kleine Färbeschale überführt. <b>Vorsicht:</b> Das Gel ist glitschig und brüchig!</p> <p>Es wird ca. 100ml der Azur-B-Chlorid- Färbelösung zugegeben und für ca.10 min gefärbt. (Immer wieder</p>		

schwenken!)

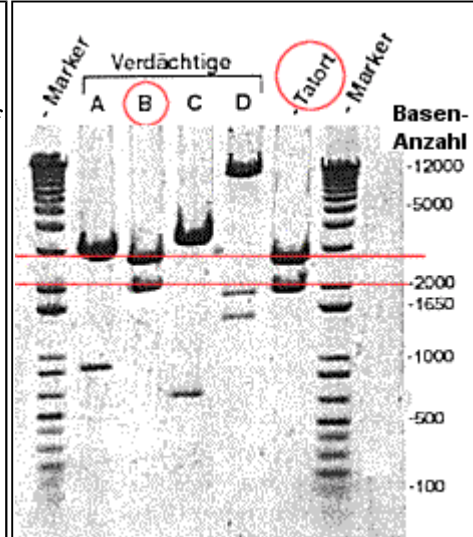
Die Färbelösung wird zurückgeschüttet. Anschließend werden zum Entfärben der Gelmatrix 100ml dest. Wasser zugegeben. Unter ständigem Schwenken und Erneuern des Wassers entfärbt sich die Gelmatrix. (Evtll. das Wasser in Mikrowelle erwärmen)

Das Gel kann jetzt zur Archivierung auf dem OH-Projektor fotografiert werden oder gescannt werden.

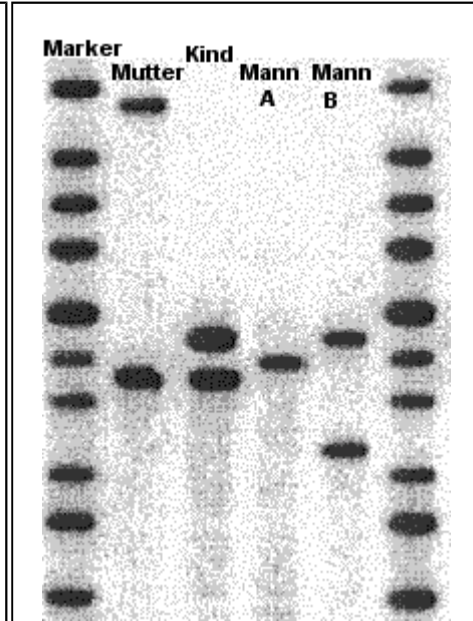


**D) Auswertung**

Das Ergebnis des Versuchs "Genetischer Fingerabdruck durch RFLP (Simulation)" sollte sich in etwa so darstellen wie in der Abbildung. Die beiden Banden in jeder Bahn auf dem Gel (die dritte Bande bei Verdächtigem D mit ca. 12000 Basenpaaren (bp) wird vernachlässigt) mit unterschiedlichen Molekulargewichten (der Marker in der ganz rechten Bahn erlaubt ein Abschätzen der Fragmentgrößen) sollen die beiden VNTRs-Abschnitte der untersuchten Personen repräsentieren. Man erhält zwei Banden, da auf den zwei homologen Chromosomen in jedem menschlichen Genom das väterlich und mütterlich vererbte Erbgut enthalten ist. Ein gleiches Bandenmuster mit exakt gleichen Fragmentgrößen bedeutet mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit identische Personen.



Mit Hilfe des genetischen Fingerabdrucks lassen sich auch Verwandtschaftsverhältnisse nachweisen, z.B. in **Vaterschaftstests**. Hier muss beim Kind **eine** Bande mit der Mutter, die **zweite** mit dem Vater identisch sein. Man betrachte dazu die Abbildung. Wer ist der Vater?



In einem Mordfall in Arizona wurde zum ersten Mal in der Justizgeschichte der DNA-Fingerabdruck einer Pflanze benötigt.

Im Auto eines Verdächtigen fand man zwei Samen des Palo-Verde-Baumes, einer Baumart, die auch am Tatort gefunden wurde. Der Verdächtige bestreitet, je am Tatort gewesen zu sein. Durch Vergleich der auch bei Pflanzen vorkommenden hochvariablen VNTRs konnte der Same einem bestimmten Baum in der Einfahrt zum Tatort zugeordnet werden.

<b>Zeitplanung:</b>	<b>Experiment: DNA-Fingerabdruck</b>		
Arbeitsschritt			
Restriktionsspaltung der Plasmide	<b>A1)-A4)</b>	Pipettieren	15'
	<b>A5)</b>	Schneiden der DNA	60'
Gelelektrophorese	<b>B1)</b>	Herstellung des Agarose-Gels	30'
	<b>B2)</b>	Auftragen der DNA-Fragmente	15'
			<b>B1) zeitgleich mit A5)</b>
			Pause/ Theorie

	<b>B3)</b>	Elektrophorese	<b>40'</b>	Aufräumen
Färben/Entfärben	<b>C)</b>	Anfärben der DNA-Banden	<b>15'</b>	
		Herauswaschen der Hintergrundfärbung	<b>20'</b>	
Auswertung	<b>D)</b>		<b>10'</b>	
Gesamtdauer:			ca. 3h	

### Zahl der Schüler :

Das NaT-Working -Set zur **DNA-Untersuchung** enthält **3** Elektrophoresekammern. Somit können **drei Schüler-Arbeitsgruppen** zeitgleich die Arbeitsschritte zur DNA-Spaltung und Elektrophorese durchführen.

### Lernvoraussetzungen: Bau der Bakterienzelle, Plasmide, Bau und Funktion der DNA

#### Restriktionsenzyme:

Funktion der Restriktionsenzyme: Ein Restriktionsenzym (genauer: Restriktionsendonucleasen) erkennt eine ganz bestimmte Nukleotidsequenz in der DNA und kann die DNA an dieser Stelle spalten (schneiden). Es gibt verschiedene Sorten von Restriktionsenzymen für unterschiedliche Schnitte. Sie werden aus Bakterien gewonnen. Ihre biologische Aufgabe ist es, die eingedrungene DNA von Phagen unschädlich zu machen.

#### Elektrophorese:

Trennprinzip der Gelelektrophorese: Unter Elektrophorese versteht man eine Trennmethode für biologische Moleküle (Proteine, DNA, RNA) mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Die in der Pufferlösung negativ geladenen DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld, wobei die kleineren DNA-Stücke schneller durch das Maschenwerk des Agarose-Gels gelangen als die größeren. Nach der Elektrophorese wird das Gel mit einem speziellen Farbstoff angefärbt, um die einzelnen DNA-Banden sichtbar zu machen. Jede Bande enthält Millionen von DNA-Bruchstücken von einer ganz bestimmten Größe.

#### Sicherheit:

**DNA und Enzyme:** Die Plasmid-DNA sowie die Restriktionsenzyme, die in diesem Versuch verwendet werden, können gefahrlos gehandhabt werden. Es werden keine lebenden Organismen verwendet, so dass keine Maßnahmen zur Desinfektion getroffen werden müssen. Sauberkeit ist jedoch wichtig, um Kreuzkontaminationen innerhalb der Versuchsansätze (darunter fällt z.B. die unbeabsichtigte Übertragung von Enzymen zwischen verschiedenen Reaktionsröhrchen) zu vermeiden und gute Ergebnisse zu erzielen. Einwegspitzen und Mikroröhrchen können gefahrlos im Abfalleimer für Kunststoff-Recycling entsorgt werden.

**Agarose-Gel:** Wenn ein Mikrowellengerät zum Schmelzen des Agarose-Geles eingesetzt wird, ist es wichtig, das Gel in ein unverschlossenes Gefäß zu stellen. Um ein Anbrennen oder Verklumpen zu verhindern, muss das Gel gerührt werden.

**VORSICHT!** Heiße, geschmolzene Agarose kann plötzlich überkochen (Siedeverzug!). Sie muss daher vorsichtig gehandhabt werden.

**DNA-Färbemittel:** Es müssen Schutzhandschuhe getragen werden, um zu verhindern, dass die DNA-Färbelösung mit der Haut in Berührung kommt. Sie ist zwar nicht giftig-, die Haut nimmt aber vorübergehend den Farbstoff an.

**VORSICHT!** Die Gelelektrophorese-Apparatur arbeitet mit 100 Volt Gleichspannung.

#### Literatur:

-Experimente zur molekularen Biologie: Jan Brix / Chris Meisinger Inst. f. Biochemie Universität Freiburg 2001

-Dokumentation der Lehrerfortbildung "Gentechnik bei Pflanzen" Stuttgart März 2000

-Schlüter Biologie: Genetischer Fingerabdruck / -ChiuZ 1994 Nr.2 / -UB Nr.246/Juli1999 / -PdN-Bio Nr.7 1995 u.Nr.2 2000

## Protein-Versuche: Protein-Fingerabdruck

Begriffe wie Genomanalysen oder "**Genomics**" haben mittlerweile Eingang in den normalen Wortschatz erhalten. Hierbei werden Chromosomen von verschiedener Organismen (u.a. Mensch)

in ihrer Basenabfolge analysiert und katalogisiert. ("HUGO"= humanes Genomprojekt). Diese Gensequenzen sind für die Wissenschaft jedoch so lange nutzlos, bis man ihre Genprodukte - die Proteine - kennt. Aber über das Zusammenspiel verschiedener Proteine in der Zelle, oder darüber, welche Proteine überhaupt exprimiert ("translatiert") werden, sagt "Genomics" nichts aus. Proteine sind die wichtigsten Bausteine des Lebens und übernehmen im Körper viele Funktionen: Enzyme, Membranproteine, Transportproteine, Hormone..). Die DNA hat hierbei lediglich die Aufgabe eines Informationsspeichers. Ein noch schwierigeres Vorhaben als die fast abgeschlossene Entschlüsselung des **Genoms** ist die Entschlüsselung des menschlichen **Proteoms**, der Gesamtheit aller menschlichen Proteine. Bisher sind jedoch nur ca. 5000 Proteine (von ca. 500.000) bekannt. Zu diesem Problem hat sich aktuell ein neuer Wissenschaftszweig, die "**Proteomics**" entwickelt. Hierbei wird die Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt (z.B. vor und nach einer Medikamenteneinnahme), unter ganz bestimmten Bedingungen (z.B. Stresseinwirkung) und an einem ganz bestimmten Ort (z.B. einer Tumorzelle) vorhandenen Proteine analysiert. Durch **Vergleich des Protein-Profiles** einer kranken Zelle mit ihrer gesunden Nachbarzelle lassen sich oft erste Hinweise über **Krankheitsursachen** gewinnen. Die Entzifferung der Proteine verspricht also Heilungschancen für viele Krankheiten.

In der **Lebensmittelüberwachung** ist die Bedeutung des Protein-Profiles besonders gewachsen: Ist in Kalbsleberwurst auch drin, was auf dem Etikett steht? Nicht selten entdeckten Lebensmittelkontrolleure in Rindersalami nur Schweinefleisch oder Hühnerbrühe wurde mit billigerem Putenfleisch gestreckt.

Angesichts der BSE-Gefahren wollen viele Verbraucher sicher sein, dass z.B. kein Rindfleisch in ihrer gekauften Wurstsorte enthalten ist. Auch der Nachweis **gentechnisch veränderter Lebensmittel** erhält in Zukunft große Bedeutung. Transgene Pflanzen mit artfremden Genen enthalten auch neue Proteine. Man wird in Zukunft z.B. gentechnisch veränderte Lebensmittel sehr einfach mit dieser Methode identifizieren können. Dazu wird das Vorhandensein eines Fremdproteins (z.B. eines Selektionsmarkerproteins) oder das Fehlen eines bestimmten endogenen Proteins untersucht.

In der **Evolutionsforschung** spielt der Vergleich der Proteine ebenfalls eine große Rolle: Je ähnlicher die Proteinausstattung z.B. des Blutserums, desto ähnlicher muss auch die zugrundeliegende DNA sein, d.h. je geringer die genetische Distanz, desto enger die Verwandtschaft.

### **Die Erstellung eines Protein-Fingerabdrucks (z. B. Fleischsorten, Fruchtsäfte, Kartoffelsorten..)**

Da die Sequenz und Struktur eines jeden Proteins durch eine spezifische kodierende DNA-Sequenz festgelegt wird, können auch Protein-Fingerprints letztlich Aussagen über die genetische Ausstattung einer Art machen. Ähnlich wie beim DNA-Fingerprinting kann man durch Protein-Fingerprinting also evolutionäre Verwandtschaftsverhältnisse beschreiben.

Um z.B. Lachs, Forelle, Stör, Wels und Zander zu unterscheiden, muss man die verschiedenen Fischmuskelfleisch-Proben in ihrem **Proteinmuster** vergleichen. Muskel-Protein besteht überwiegend aus den Proteinen Actin und Myosin - diese Proteinausstattung ist also bei den verschiedenen Fischarten sehr ähnlich. Viele andere Muskelproteine sind jedoch selbst bei eng verwandten Arten sehr verschieden und dienen in unserem Versuch als arttypischer **Protein-Fingerabdruck**.

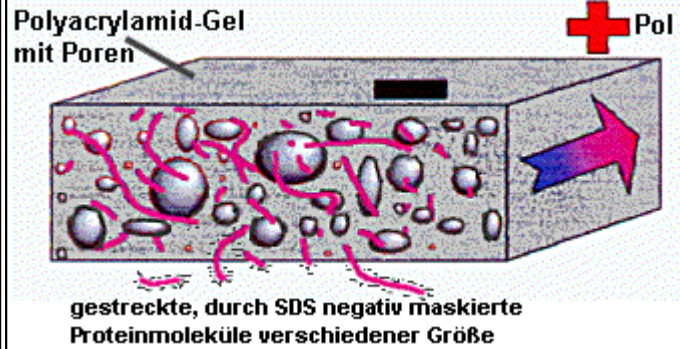
Wie beim DNA-Fingerabdruck wird wieder eine **Sortierung nach der Molekülgröße** vorgenommen. Man lässt die Proteinmoleküle -unzerschnitten, aber hitzedenaturiert- in einem elektrischen Feld durch die Poren eines **Gels** wandern, und erhält wie bei der DNA ein **charakteristisches Bandenmuster**.

in diesem Fall handelt es sich um ein **SDS-Polyacrylamid-Gel**. Es trennt, ähnlich wie ein Agarose-Gel Proteingemische nach Molekülgröße.

Die von verschiedenen **Fleischsorten** (z.B. Rind, Schwein, Pute) oder Fleischgemischen (z.B. Lyoner, Salami) erhaltenen Protein-Fingerprints werden anhand von bestimmten **typischen Banden** z.B. als Rindfleisch identifiziert.

## Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Gemische verschiedener Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteinproben werden durch Zugabe des starken Detergens (=Seife) **SDS** (Natriumdodecylsulfat) und  $\beta$ -Mercaptoethanol (=Reduktionsmittel) und anschließendes Erhitzen (95°C) denaturiert. Alle Proteine liegen im Anschluss an diese Denaturierung in einer ähnlichen, stäbchenartigen Form vor und sind durch das SDS stark negativ geladen. Das  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert, d.h. spaltet eventuell vorhandene Disulfidbrücken innerhalb oder zwischen den Molekülen.



Legt man nach Auftrag der Proben auf das Gel ein elektrisches Feld an, wandern die Proteine zur Anode (+). Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine hängt dabei fast nur von ihrem Molekulargewicht ab; ihre Eigenladung ist durch das SDS völlig überdeckt. Das SDS-PAGE kann man sich als eine Art Molekularsieb vorstellen, das aus langen Polymeren des Acrylamids besteht und durch Bisacrylamid quervernetzt wurde. Größere Proteine werden im Geflecht stärker zurückgehalten, wandern also langsamer.

Die zu untersuchende Proteinprobe wird mit **Laemmli-Puffer** versetzt, der neben  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS noch Bromphenolblau enthält, das den Fortlauf der Elektrophorese anzeigt. Bromphenolblau wandert aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften immer vor der Proteinfront. Glycerin als weiterer Bestandteil sorgt durch seine hohe Dichte für einen einfachen Probenauftrag auf das Gel.

Trägt man parallel zur Proteinprobe einen Molekulargewichtsstandard (**Proteinmarker**) mit Proteinen bekannter Molekulargewichte auf, kann man über einen Bandenvergleich Molekulargewichte in der Probe grob abschätzen.

SDS-PAGE werden oft angewandt, um Ergebnisse biochemischer Protein-Experimente auswerten zu können oder auch um die Reinheit isolierter Proteine überprüfen zu können.

Um die Trennung der Proteinmoleküle zu verbessern, wird mit 2 verschiedenen großen Porengrößen im Gel gearbeitet: Sammelgel und Trenngel. (s.Durchführung)

### Material und Chemikalien:

Thermoblock	Hitzenaturierung	
Stoppuhr	Zentrifuge, Elektrophorese	
Elektrophoreseapparatur	Trennung der Proteine	
Gel-Gießstand	Hilfe zum Gießen der Platten	
Gilsonpipetten		
Hamiltonpipette	Einfüllen der Proben in die Geltaschen	
Schutzhandschuhe		
Laemmli-Buffer + $\beta$ ME	Lösungsmittel, Denaturierung der Proteine, Farbstoff, <b>Fertiglösung</b> Lagerung bei 4° C	SDS: $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$
		$\beta$ Mercaptoethanol: $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$
		Bromphenolblau
Laufpuffer: BioRad	Tris/Glycin/SDS- <b>Fertiglösung</b> : Leitfähigkeit	Lagerung bei Raumtemperatur
Proteinmarker ( <b>fertig</b> )	Zur Abschätzung der Molekülgrößen	Lagerung bei -20° C

Trenngel-Lösung (fertig)	Rotiphorese Gel <b>Fertig-Lösung</b> (Acrylamid)	8 mL	Lagerung bei 4° C ca. 1 Woche
	SDS-Lösung 10% (Sodiumdodecylsulfat)	170 µL	
	dest. Wasser	5,3 mL	
	Tris 1,88 M, pH 8,8 (Puffer)	3,5 mL	
Starter	APS-Lösung 10% (Ammoniumperoxodisulfat): Starter	100 µL	Zugabe bewirkt Polymerisation zu Polyacrylamid
	TEMED (Tetramethylethylen-diamin) Radikalbildner	10 µL	
Sammelgel-Lösung (fertig)  Im Bereich der Geltaschen zur besseren Auftrennung	Rotiphorese Gel 30 Lösung (Acrylamid)	830µL	Lagerung ca. 1 Woche bei 4°C möglich
	Tris 0,5 M, pH 6,8 (Puffer)	500 µL	
	dest. Wasser	3,6 mL	
	SDS-Lösung 10% (Sodiumdodecylsulfat)	50 µL	
Starter	APS-Lösung 10% (Ammoniumperoxodisulfat) : Starter	40 µL	Zugabe bewirkt Polymerisation zu Polyacrylamid
	TEMED(Tetramethylethylen-diamin) Radikalbildner	5 µL	
Isopropanol	Glätten des Gels		
Coomassie- Färbelösung (fertig)	Ethanol 40% , Essigsäure7% , Coomassie Brilliant-Blue R250 0,4% dest. Wasser ad 100%		Raumtemperatur ( <b>Abzug</b> )
Coomassie- Entfärbelösung (fertig)	Ethanol 30% , Essigsäure10% dest. Wasser ad 100%		Raumtemperatur ( <b>Abzug</b> )

### Durchführung:

#### A) Herstellung der verschiedenen Protein-Proben: Rindfleisch, Schweinefleisch, Putenfleisch und unbekannte Probe

1) Stellen Sie die Proben der verschiedenen Fisch- bzw. Fleischarten bereit. Es genügt eine Menge, die einer Messerspitze entspricht (ca. 100 mg).

**Fettbestandteile sollten möglichst entfernt werden, da sie das Laufverhalten der Proteine in der Gelelektrophorese stark beeinträchtigen!**

Stellen Sie ebenfalls das Eppendorfgefäß mit dem Proteinmarker bereit.

2) Geben Sie zu jeder Fleischprobe **500 µL Laemmli Sample Buffer +ME** und zum Proteinmarker **50 µL Laemmli Sample Buffer +ME** und lassen Sie anschließend die Eppendorfgefäße **10 min** bei **95°C** im **Thermoblock** inkubieren.

**Zur Vorbereitung der Proben sollten Einmalhandschuhe getragen werden, da die Eppendorf-Gefäße durch die Hitze aufspringen können!**

Am besten während der Inkubation bei 95 °C den Thermoblock mit einem Gewicht beschweren. Wenn man die Proben dann nach 10 min in ihrem Gestell und mit Gewicht vom Thermoblock abnimmt, kann man sie kurz abkühlen lassen.

3) Alle 4 Proben werden **1min** in der **BioRad-Zentrifuge** (bei 6000 rpm) zentrifugiert. Pipettieren Sie aus jedem Gefäß den **Überstand** in neu beschriftete Eppendorfgefäße.

4) Dieser Überstand mit dem denaturierten Proteingemisch wird weiterverwendet für die Gel-Elektrophorese. ( Bei Bedarf könnten die Proben jetzt zur Aufbewahrung eingefroren werden)

#### B) Gelelektrophorese

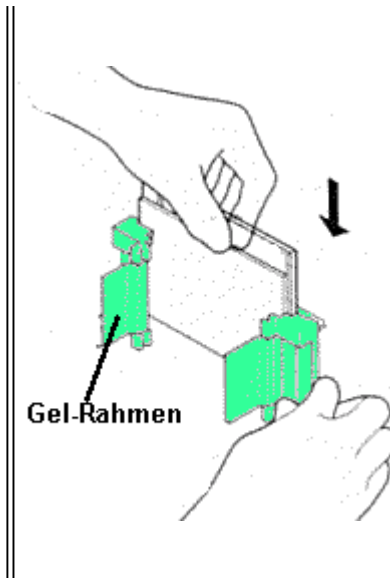
1) **Herstellung des Trenngels:** (ca. 17 mL, für 2 BioRad-Gele ausreichend)

Es ist äußerst wichtig, beim folgenden Gießen der SDS-Gele **Einmalhandschuhe** zu tragen, da Acrylamid in seiner unpolymerisierten Form **giftig** ist!

Gießen des Gels:

Eine Glasplatte mit integrierten Abstandhalter (0.75 mm) und eine plane Glasplatte werden mit Ethanol und einem weichen Papiertuch gereinigt.

Die beiden Glasplatten (kurze Platte und Platte mit aufgeklebten Abstandhaltern) werden so zusammengesetzt, dass zwischen den Platten ein flacher Hohlraum entsteht. Die beiden Platten werden zusammen als Gelkassette in den grünen **Gelrahmen** eingesetzt, so dass die kürzere Platte - wie auf dem Bild zu sehen - nach **vorne** zeigt: Die beiden Hebel des Gel-Rahmens werden nach außen gedrückt: Der Gelrahmen wird anschließend in den **Gießstand** eingesetzt, indem die Klammer am oberen Rand der Apparatur gedrückt wird. Durch die Klammer werden die Platten gegen die untere graue Gummileiste gedrückt und damit nach unten abgedichtet. Mit einem wasserdichten Filzschreiber wird ca. 1 cm unterhalb der oberen Glasplattenkante eine Markierung angebracht, um die **Trennhöhe** festzulegen.



5 mL der vorbereiteten **Trenngellösung** wird mit 30 µl der 10%igen **APS-Lösung** sowie 3 µl **TEMED** versetzt und zügig mit der 1000µl -Pipette in den Hohlraum zwischen die beiden Glasplatten pipettiert bis das Flüssigkeitsniveau bis zur Markierung angestiegen ist. Anschließend wird zur Glättung mit **Isopropanol** überschichtet (ca. 5 mm hoch). Nach ca. 10 bis 15 min ist das Trenngel polymerisiert. I Isopropanol wird weggegossen, die Oberfläche vorsichtig mit dest. Wasser gespült und mit einem Filterpapier getrocknet.

## 2) Herstellung der Sammelgellösung (ca. 5 mL, für 2 BioRad-Gele ausreichend)

Um das Sammelgel zu gießen, werden 4 mL der Sammelgellösung mit **30µL** der 10%igen **APS-Lösung** sowie **4 µL TEMED** versetzt und zügig mit der 1000µl -Pipette in den übriggebliebenen Hohlraum zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Anschließend wird sofort der Kamm eingesetzt (10 Zähne). Nach ca. 10 - 15 min ist auch das Sammel-Gel polymerisiert.

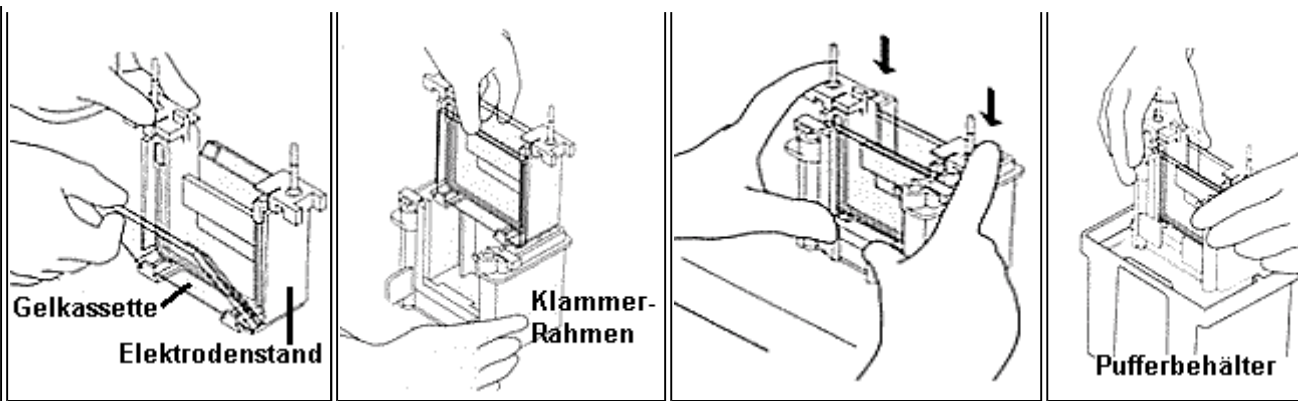
**Danach den Kamm vorsichtig entfernen!**

## 3) Zusammenbau der Gelapparatur und Elektrophorese:

Der Gelrahmen wird wieder aus dem Gießstand entfernt und die beiden Glasplatten mit dem dazwischenliegenden Gel (=Gelkassette) ihrerseits aus dem Gelrahmen entnommen (optional wird an dieser Stelle mit einem Fertiggel begonnen).

Die Gelkassette wird in den **Elektrodenstand** eingesetzt, so dass die kürzere Gelplatte **nach innen** zeigt. Auf der gegenüberliegenden Seite wird optional eine weitere Gelkassette oder eine Blindplatte/Abdeckung eingesetzt (es können also 10 oder 20 Proben in einem Gellauf untersucht werden). Dieser Aufbau wird wie auf dem Bild beschrieben in den **Klammerrahmen** eingesetzt. Durch gleichzeitiges Herunterdrücken des Elektrodenstands und Umlegen der zwei Hebel nach innen (s. Abbildung) wird die innere Kammer zusammengesetzt.

Die innere Kammer wird schließlich in den **Pufferbehälter** eingesetzt: Die innere Kammer und der Pufferbehälter werden mit Tris/Glycin/SDS-Puffer aufgefüllt, die äußere Kammer zwecks einfacherer Probenauftragung noch nicht ganz bis zum oberen Rand. Man benötigt insgesamt **1L** Tris/Glycin/SDS-P (**10x Lösung** von BioRad **muss dazu 10fach verdünnt werden, d.h. 100ml mit dest. Wasser auf 1L auffüllen**).



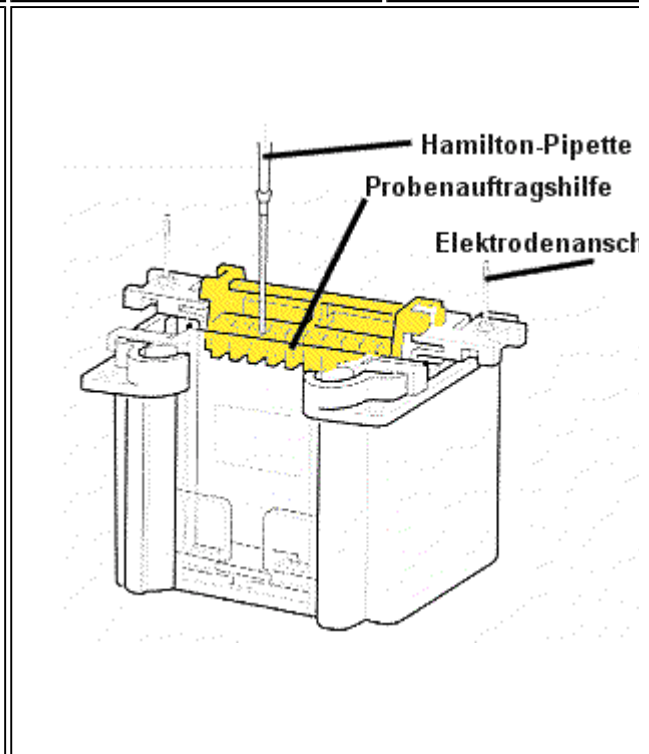
#### 4) Probenauftrag:

Die **Probenauftragshilfe** wird auf die Apparatur aufgesteckt. Mit einer **Hamiltonspritze** können jetzt die aufbereiteten Proben vorsichtig - d.h. ohne aus Versehen einen Teil der Flüssigkeit in Nachbar- Taschen zu bringen - in die Geltaschen aufgetragen werden. Es empfiehlt sich, auf den beiden Platten verschiedene Mengen zu versuchen: **5µL** bzw. **10µL**

**Reihenfolge protokollieren: Proteinmarker, Probe A bis X.**

Hamiltonpipette nach jeder Probe in der **vorderen Pufferkammer spülen!**

Probenauftragshilfe entfernen! Der Deckel wird auf den Pufferbehälter aufgesetzt (Falschpolung ausgeschlossen) und an das Spannungsgerät angeschlossen. Die Elektrophorese wird 45 - 60 min bei 200 V durchgeführt. Die Elektrophorese sollte abgeschaltet werden, wenn die blaue Bromphenolblau-Bande am unteren Gelrand angelangt ist.



#### C) 1) Coomassie-Färbelösung:

Alle Bestandteile der Apparatur werden in umgekehrter Reihenfolge wieder auseinandergenommen man die Gelkassette mit dem SDS-Gel vor sich liegen hat. Diese wird unter Zuhilfenahme eines Sp oder grünen Keils von BioRad **vorsichtig** aufgehebelt und das Gel in die Coomassie-Färbelösung (ca. 1 mL) überführt. Nachdem die Lösung in der Mikrowelle auf ca. 80°C gebracht wurde, wird für ca. 20 min unter ständigem Schwenken gefärbt.

#### 2) Coomassie-Entfärbelösung:

Anschließend wird der Färber in das Vorratsgefäß zurückgegossen und das Gel mit 100 mL Entfärbelösung erneut in der Mikrowelle erwärmt. Nach ca. 30 - 60 min ist das Ergebnis der SDS-PAGE auf einem Leuchttisch (Tageslichtprojektor) zu erkennen. Ein Austausch der Entfärbelösung gegen frische Entfärbelösung beschleunigt den Entfärbeprozess.

#### 3) Archivierung

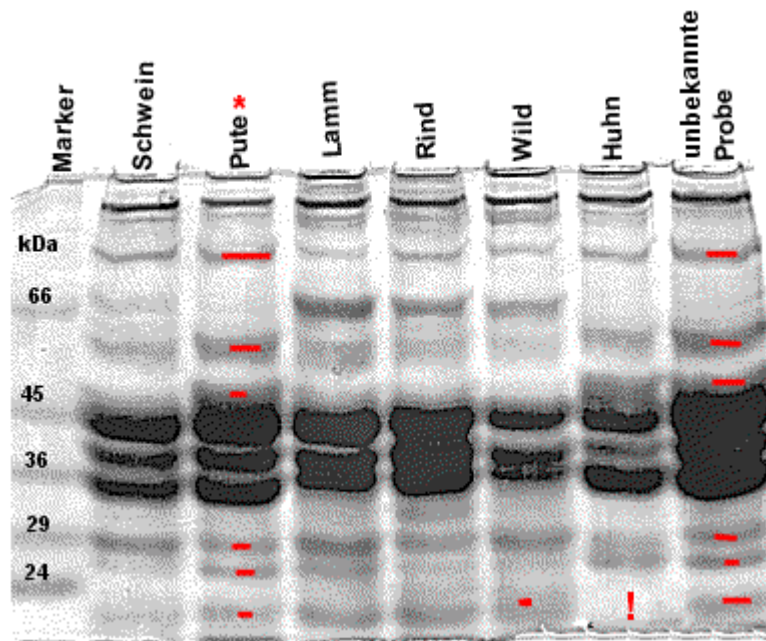
Zur Archivierung wird das Gel ca. 30 min in einer Ethanol/Glycerin-Lösung inkubiert, zwischen zwei derselben Lösung (angefeuchtete Zellophan-Folien gelegt und in den Trockenrahmen (NOVEX) eingespannt. Das Gel ist nach ca. 12 h getrocknet und kann aus dem Rahmen entnommen werden.

#### D) Auswertung : "Erstellung eines Proteinfingerabdrucks (hier verschiedene Fleischproben)"

Das Ergebnis des Versuchs

"Erstellung eines Proteinfingerabdrucks (z.B. Fisch oder Fleisch)" sollte in etwa so aussehen wie in der Abbildung. Die zahlreichen Banden, die im SDS-PAGE sichtbar werden sollten, repräsentieren einen Teil der Proteine der untersuchten Fleischproben. Nicht alle Proteine können mit Coomassie angefärbt werden, da die Sensivität für gering exprimierte (=translatierte) Proteine beschränkt ist.

Man erkennt, dass jede Fleischart (Pute, Rind, Schwein) ein ganz charakteristisches Muster an Proteinbanden zeigt. Bestimmte Banden kommen **nur** in einer der untersuchten Fleischsorten vor und können so auch zur Identifikation von Fleischsorten dienen (s. "unbekannte Probe"). Auch in Fleischgemischen lässt sich so die Frage beantworten, ob z.B. Rindfleisch enthalten ist. (Vgl. auch Text in der Einleitung zu diesem Versuch)



**Schülerzahl:**

3 (max.4) Schülergruppen, da **drei** Elektrophorese-Apparaturen mit max. 3 Gelplatten

**Lernvoraussetzungen:**

Aufbau und Funktion von Proteinen, Proteinbiosynthese,

**Sicherheit:**

Unpolymerisiertes Acrylamid ist giftig! **Schutzhandschuhe, Schutzbrille**

<b>Zeitplanung:</b>		<b>Experiment: SDS-PAGE</b>	
Arbeitsschritt			
Proteindenaturierung	A1) - A2)	Pipettieren, Inkubieren	15'
	A3) - A4)	Zentrifugieren, Pipettieren	5'
Gelelektrophorese	B1) - B2)	Herstellung des Polyacrylamid-Gels	45'
	B3)	Auftragen der Protein-Proben	15'
	B4)	Elektrophorese	60'
Färben/Entfärben	C1) - C3)	Anfärben der Protein-Banden	20'
		Herauswaschen der Hintergrundfärbung	30'
		Archivierung	20'
Auswertung	D)		5'

Gesamtdauer:	ca. 3,5h
--------------	----------