

Vaterschaftsanalyse über DNA-Profile

I. Einleitung

Diese Anleitung erläutert das genetische Verfahren der Vaterschaftsanalyse, so wie es heute zum Einsatz kommt. Im vorliegenden Experimentier-Kit sind unter anderem verschiedene DNA-Proben enthalten, die in der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. So werden individuelle DNA-Muster dargestellt und verwandtschaftliche Verhältnisse können analysiert werden.

Die DNA-Proben, die hier in der Gelelektrophorese zum Einsatz kommen, sind zuvor bereits durch das DNA-Vervielfältigungsverfahren Polymerasekettenreaktion (PCR) generiert worden, so dass dieser erste Teil der Analyse nicht Bestandteil dieses Experimentier-Kits ist.

II. Theoretische Grundlagen

Jeder Mensch besitzt im Normalfall 46 Chromosomen, 23 davon erbt er von der Mutter und 23 vom Vater. Jeweils 2 Chromosomen tragen die gleichen Erbinformationen, allerdings häufig mit kleinen Variationen. Das heißt viele Erbinformationen liegen in unterschiedlichen Allelen vor. Bei 2 der 46 Chromosomen handelt es sich um sogenannte Geschlechtschromosomen X und Y, wobei Frauen die Kombination XX und Männer die Kombination XY aufweisen.

Kleine Variationen in den Genen und insbesondere Unterschiede in den nichtcodierenden Bereichen der DNA führen dazu, dass das DNA-Profil eines Menschen individuell ist (Ausnahme: eineiige Zwillinge). Diese nichtcodierenden DNA-Bereiche, die besonders große individuelle Unterschiede aufweisen werden auch als polymorphe DNA-Regionen bezeichnet.

Im Bereich der nichtcodierenden DNA findet man häufig sich wiederholende Sequenzen von zwei oder mehr Nukleotiden, die man als Repeats bezeichnet. Von VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) ist die Rede und meint damit Sequenzwiederholungen von 10 bis 150 Nukleotiden. Sind die repetitiven Sequenzen kürzer (2 bis 7 Nukleotide) so spricht man von STRs (Short Tandem Repeats). Die Anzahl der Repeats ist von Individuum zu Individuum verschieden und kann zur Ausprägung individueller DNA-Profile genutzt werden. Diese DNA-Profile können zum Beispiel zur Identifizierung von Individuen (genetischer Fingerabdruck) eingesetzt werden, aber auch zur Klärung verwandtschaftlicher Verhältnisse beispielsweise zur Vaterschaftsanalyse.



Abb. 1: Schematische Darstellung polymorpher DNA-Bereiche

Polymorphe DNA-Bereiche, die bekanntermaßen solche VNTRs oder STRs aufweisen werden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Als Bindungsstellen für ein Primerpaar nutzt man konservierte DNA-Regionen links und rechts neben einem solchen hochvariablen DNA-Bereich. Das Resultat sind unterschiedlich lange PCR-Fragmente, die links und rechts durch das eingesetzte Primerpaar begrenzt werden und praktisch einzigartig für jedes Individuum sind (Ausnahme: eineiige Zwillinge).

Für ein Primerpaar ergeben sich bei der PCR genau genommen meistens 2 individuelle DNA-Fragmente pro Vervielfältigungsstelle, da die DNA in Körperzellen in der Regel diploid vorkommt. Dies hängt damit zusammen, dass die homologen Stellen in der polymorphen DNA-Region oft heterozygot vorliegen. Sind beide Allele gleich (Homozygotie) ergeben sich gleich lange PCR-Produkte für diese Positionen (Abb.2).

Liegt lediglich ein einfacher Chromosomensatz vor, z.B. in Spermaspuren, so findet man natürlich nur einen Alleltyp pro Locus. Bei der Vervielfältigung von DNA dieser Stelle kann sich somit nur eine DNA-Fragmentlänge ergeben.

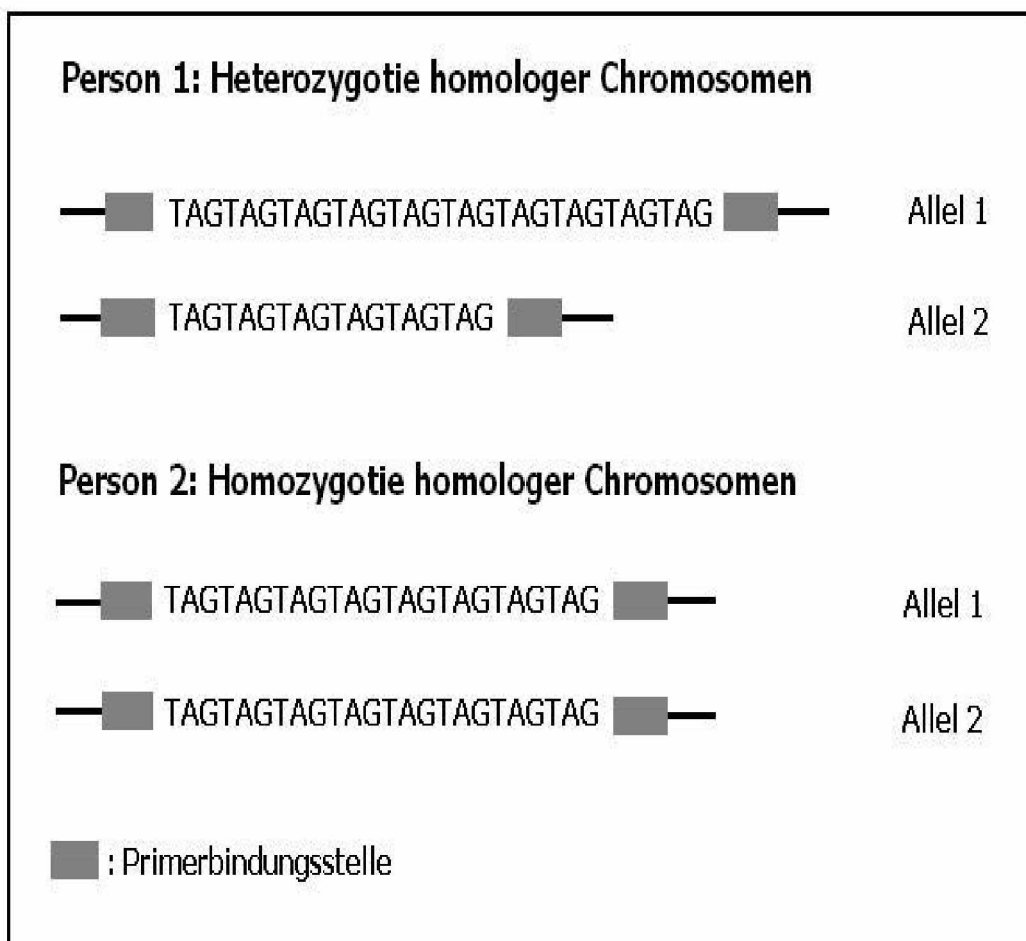


Abb.2: VNTR-Loci zweier Personen, jedes Allel ist nur einzelsträngig dargestellt.

Vervielfacht man mehrere dieser repeathaltigen DNA-Bereiche, indem man verschiedene PCR-Primerpaare einsetzt, so erhält man entsprechend viele PCR-Produkte mit unterschiedlichen Längen. Diese PCR-Produkte ergeben nach Größenauftrennung in der Elektrophorese eine Art DNA-Strichcode.

Standardmäßig werden 10 bis 13 Primerpaare eingesetzt, um ein hohes Maß an Sicherheit bei der genetischen Analyse zu gewährleisten. In der Abb. 3 wird beispielhaft die PCR für 4 DNA-Regionen gezeigt. Läge jede DNA-Region doppelt vor (Diploidie) und bestünde für alle 4 Loci Heterozygotie, dann würde das unten gezeigte DNA-Profil komplexer sein und aus 8 DNA-Fragmenten bestehen.

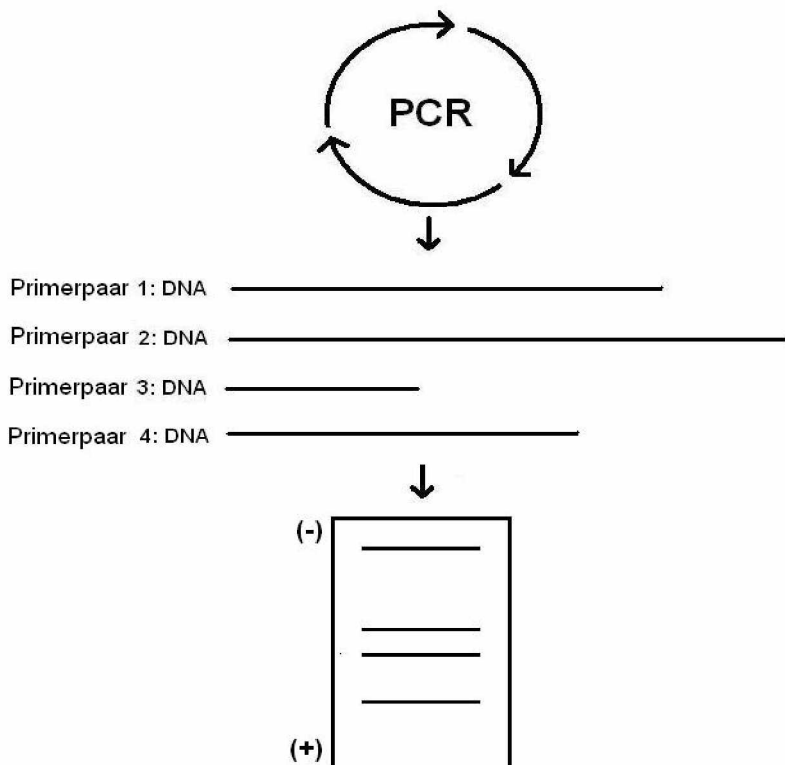


Abb.3: Durch Vervielfältigung verschiedener Bereiche polymorpher DNA ergeben sich unterschiedlich lange PCR-Produkte. Trennt man diese in der Elektrophorese der Größe nach auf, ergibt sich ein DNA-Strichcode.

III. Bestandteile des Kits

- DNA von der Mutter, 120 µl
- DNA vom Kind, 120 µl
- DNA vom pot.Vater, 120 µl
- Elektrophoresepuffer, 50-fach konz., 50 ml
- Agarose, 6 g
- DNA-Färbelösung, 200-fach konz., 1,5 ml

Anmerkung: Die DNA-Proben sind gebrauchsfertig und können direkt in der Gelelektrophorese eingesetzt werden. Für eine längere Lagerung der DNA-Proben sollten diese bei -18°C eingefroren werden.

Die DNA-Proben beinhalten den Farbstoff Bromphenolblau (BPB). Dieser Indikator-Farbstoff dient dazu, den Fortgang der Gelelektrophorese verfolgen zu können.

Die Anfärbung der DNA-Fragmente geschieht im Anschluß an die Gelelektrophorese mit Hilfe der beiliegenden DNA-Färbelösung.

Die zum Kit gehörenden DNA-Proben sind nicht-humanen Ursprungs und dienen lediglich der Simulation tatsächlicher Untersuchungsergebnisse.

IV. Geräte, Hilfsmittel und Lösungen, die benötigt werden

Elektrophoresekammer inkl. Netzgerät

Mikroliterpipette inkl. Pipettenspitzen

Schutzkleidung (Laborkittel, Schutzbrille, Handschuhe)

Mikrowelle und Erlenmeyerkolben (zur Herstellung des Agarosegels)

V. Vorbereitung des Experiments

Elektrophoresepuffer

Der 50-fach konz. Elektrophoresepuffer (oder ein Teil davon) wird mit dest. Wasser auf die 1-fache Konzentration verdünnt. Dieser 1-fach konzentrierte Elektrophoresepuffer wird dann im Experiment eingesetzt und kann mehrfach verwendet werden.

Agarosegel gießen

Für die Elektrophorese der DNA-Fragmente wird ein 1%iges Agarosegel empfohlen. Je nach verwendeter Elektrophoresekammer werden unterschiedliche Gelvolumina benötigt. Die Mengen müssen daher der Beschreibung der jeweiligen Elektrophoresekammer entnommen werden.

Gleiches gilt generell für den Umgang mit der Elektrophoresekammer. Viele Elektrophoresekammern erlauben auch das Gießen des Gels 1-2 Tage vor dem eigentlichen Experiment. Dies kann aus zeitlichen und organisatorischen Gründen sehr günstig sein.

Tipp: Für die Herstellung des Agarosegels wird eine entsprechende Menge Agarose abgewogen und in einen Erlenmeyerkolben gegeben und ein entsprechendes Volumen an Elektrophoresepuffer hinzugegeben und mit einem Wattestopfen leicht verschlossen. Vor dem Erhitzen in der Mikrowelle sollte das Gesamtgewicht des Erlenmeyerkolbens (Kolben inkl. Inhalt) notiert werden, damit nach dem Auflösen der Agaroselösung der Siedeverlust mit dest. Wasser entsprechend ausgeglichen werden kann. So wird sichergestellt, dass die gewünschte Prozentigkeit des Agarosegels erreicht wird. Das Gel sollte möglichst nicht zu dick gegossen werden, da sich dies ungünstig auf die Anfärbung der DNA-Fragmente nach Abschluß der Gelelektrophorese auswirkt. Ein 3-4 mm dickes Gel ist ideal für diesen Versuch.

DNA-Färbelösung vorbereiten

Die 200-fach konz. Färbelösung wird mit dest. Wasser verdünnt, so dass eine 1-fach konz. Färbelösung entsteht. Das heißt, 1 Vol. 200-fach konz. Färbelösung wird zu 199 Vol. dest. Wasser gegeben, um die gebrauchsfertige Färbelösung herzustellen. Die Aufbewahrung erfolgt lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank. Die DNA-Färbelösung kann mehrfach benutzt werden.

VI. Versuchsdurchführung

Tip: Erfahrungsgemäß macht das Pipettieren mit der Mikroliterpipette zu Anfang etwas Schwierigkeiten. Das Pipettieren und Auftragen von Proben in die Geltaschen eines Agarosegels sollte daher vor dem Experiment geübt werden. Als Übungslösung eignet sich eine Lösung aus blauer Tinte (2 Volumen) und Glycerin (1 Volumen). Diese Übungslösung hat in etwa die Viskosität der beiliegenden DNA-Proben und lässt sich für Übungszwecke hervorragend einsetzen.

Häufig auftretende Fehler: Die Geltaschen werden zu Anfang schlecht getroffen und überfüllt. Es kommt auch vor, dass die Pipettenspitze zu tief in die Geltasche eingeführt und so der Boden der Geltasche beschädigt wird. Das Herausziehen der Pipettenspitze aus der Geltasche erfolgt zu schnell und die gerade eingefüllte Probe wird teilweise herausgewirbelt. Der Druckknopf der Mikropipette bleibt beim Herausziehen der Pipettenspitze nicht gedrückt und saugt so die Probe wieder an.

Elektrophorese der DNA-Proben

Die DNA-Proben werden in folgender Reihenfolge mit einer Mikroliterpipette in die Geltaschen des Agarosegels pipettiert

- DNA – Mutter
- DNA – Kind
- DNA – pot. Vater

Wird mit der im Kit befindlichen Färbelösung gearbeitet, so werden 12 µl DNA pro Geltasche benötigt. Wird ein empfindlicherer Farbstoff zur Anfärbung eingesetzt, können auch 8 bis 10 µl DNA-Probe ausreichen.

Es ist darauf zu achten, dass der Boden der Geltaschen nicht beschädigt wird, indem beim Pipettieren die Pipettenspitze zu tief in die Geltasche eingetaucht wird.

Die Elektrophorese wird sofort nach dem Auftragen der DNA-Proben gestartet. Die einzustellende Gleichspannung ist abhängig von der verwendeten Elektrophoresekammer. Als Faustregel gilt eine Spannung von 5 Volt/ cm Elektrodenabstand.

Die Elektrophorese wird beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau in den DNA-Proben den unteren Rand des Agarosegels erreicht hat.

Färbung der DNA-Banden

Nach der Elektrophorese wird das Agarosegel vorsichtig in eine passende Färbeschale überführt. Als Färbeschale kann eine Kunststoff- oder Glasschale zum Einsatz kommen. Das Überführen des Gels in diese Schale kann z.B. mit einem haushaltsüblichen Pfannenwender oder einem breiten Spatel erfolgen.

Das Gel wird mit der Färbelösung überschichtet und für ca. 10-15 Min. gefärbt. Die Schale dabei etwas schwenken, damit eine gleichmäßige Färbung erzielt wird. Anschließend wird die Färbelösung zurück in die Aufbewahrungsflasche gegossen und das Gel mit Leitungswasser solange entfärbt bis der Hintergrund ausreichend entfärbt ist und die DNA-Banden sichtbar sind. Idealerweise fotografiert man das Gel bei Durchlicht auf einem Leuchtkasten.

Das Gel kann in Haushaltsfolie eingewickelt für ein paar im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die DNA-Banden zeigen sich nach Lagerung über Nacht im Kühlschrank häufig sogar noch deutlicher und schärfer als am Vortag.

VII. Auswertung

Bei der Auftragung der DNA-Proben von links nach rechts

- DNA-Mutter
- DNA-Kind
- DNA-pot. Vater

zeigen sich unter optimalen Elektrophoresebedingungen und optimaler Färbung der DNA folgende Fragmentlängen (Angaben in Basenpaaren, bp):

DNA Mutter	DNA Kind	DNA pot. Vater
21.200	23.100	23.100
7.400	21.200	9.400
5.800	9.400	6.500
5.600	7.400	4.300
4.800	6.500	2.300
3.500	5.800	2.000
	5.600	560
	4.800	120
	4.300	
	3.500	
	2.300	
	2.000	
	560	
	120	

Bei einer Gellänge von ca. 8 cm ergibt sich im Agarosegel bei Anfärbung mit dem beiliegenden Farbstoff Methylenblau meistens folgendes DNA-Muster (Abb.4).

Die kleinen DNA-Fragmente sind häufig nicht zu sehen, da die Anfärbung mit dem beiliegenden Farbstoff nicht die hohe Empfindlichkeit aufweist, um relativ kurze DNA-Stücke darzustellen.

Bei zu kurzen Trennwegen können DNA-Fragmente mit ähnlichen Längen unter Umständen nicht voneinander getrennt werden und es treten Doppelbanden auf.

Für die Auswertung und das prinzipielle Verstehen der Methodik sind beide Effekte jedoch unerheblich.



Abb. 4: DNA-Fragmente nach der Gelelektrophorese und Anfärbung der DNA. Spur 1: DNA-Probe der Mutter, Spur 2: DNA-Probe Kind, Spur 3: DNA-Probe pot. Vater.

Im vorliegenden Fall weist das Kind alle Allele der Mutter und des potentiellen Vaters auf. Dies spricht dafür, dass der potentielle Vater auch der leibliche Vater des Kindes ist.

VIII. Anregungen und Fragen für die Einbindung in den Unterricht

Vorbereitende Aufgaben zur Unterrichtsstunde

1. Recherchieren Sie zum Thema „Vaterschaftstest, Vaterschaftsanalyse“. Alternativ kann auch ein Schüler- oder Lehrervortrag zum Thema vorbereitet werden.
2. Diskutieren Sie mit Ihren Schülern über die sozialen, ethischen und rechtlichen Aspekte der DNA-Analytik. Welche Auswirkungen sind gegebenenfalls zu befürchten, wenn genetische Analysen von staatlichen Behörden, Versicherungsgesellschaften oder Arbeitgebern verwendet werden.
3. Wie steht es mit der Sicherheit des Verfahrens? Ist der genetische Vaterschaftstest wirklich so eindeutig und was sind die Gründe?
4. Wie funktioniert die Agarose-Gelelektrophorese?

Aufgaben während des Unterrichts

1. Das Pipettieren und Auftragen von Proben in die Geltaschen eines Agarosegels kann geübt werden, indem Sie sich eine Lösung aus blauer Tinte und Glycerin herstellen. Nehmen Sie 2 Volumen blaue Tinte und geben Sie 1 Volumen Glycerin hinzu. Diese Übungslösung hat etwa die Viskosität der beiliegenden DNA-Proben und lässt sich zum Einüben des Pipettierens gut einsetzen.

2. Lesen Sie aufmerksam die gesamte Versuchsdurchführung. Klären Sie eventuelle Fragen mit Ihrem Platznachbarn bzw. Ihrer Platznachbarin.
3. Führen Sie das Experiment durch und werten Sie dies aus.
4. Überprüfen Sie nicht erwartete Ergebnisse, indem Sie nach möglichen Fehlern bei der Durchführung suchen. Lesen Sie hierzu nochmals die Versuchsanleitung. Führen Sie das Experiment gegebenenfalls noch einmal durch.

IX. Sicherheit und Entsorgung

Der sichere Umgang mit Laborgeräten und Chemikalien setzt ein gewisses Maß an Grundwissen und Sicherheitsmaßnahmen voraus. Während des Experiments sollten generell Laborkittel und Schutzbrillen getragen werden. Handschuhe sind ebenfalls vorzuhalten und bei Bedarf anzuziehen. Beim Herstellen des Agarosegels sind isolierte Handschuhe zu tragen, damit es nicht zu Verbrennungen oder Verbrühungen an den Händen kommt.

Auch der Umgang mit den Geräten sowie Risiken bei der Nutzung sollten bekannt sein. Insbesondere auf die Gefahren von Elektrizität ist zu achten. Alle Verbindungsstecker, Netzkabel und Arbeitsflächen (aber auch die Hände) müssen trocken sein, bevor die Bedienung von elektrischen Geräten erfolgt.

Weitere Maßnahmen zur Arbeitssicherheit: Lange Haare zusammen binden, möglichst keinen Schmuck tragen, enganliegende Ärmel etc, damit kein unerwünschter Kontakt mit Geräten, Chemikalien usw. auftreten kann.

Sämtliche Abfälle sind entsprechend den Anweisungen und den örtlichen Bestimmungen zu entsorgen.

Mögliche Gefahren der Kit-Bestandteile

DNA-Proben

Die DNA-Proben enthalten einen Glycerin-Anteil von 10% sowie den Farbstoff Bromphenolblau in einer Konzentration von 0,25%.

Der Stoff bzw. das Gemisch ist nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.

Nach Richtlinie 67/548/EWG bzw. Richtlinie 1999/45/EG ist der Stoff bzw. das Gemisch nicht als gefährlich eingestuft.

Elektrophoresepuffer, 50-fach konz.

Folgende Hinweise beziehen sich auf den konzentrierten Elektrophoresepuffer und müssen nicht zwangsläufig auch für den verdünnten Puffer (Arbeitslösung) gelten.

Einstufung gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008:

Gefahrenhinweise

H315: verursacht Hautreizungen

H319: verursacht Augenreizungen

H335: kann die Atemwege reizen

Sicherheitshinweise

P280: Schutzkleidung, Augenschutz tragen

P261: Einatmen vermeiden

P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut mit viel Wasser und Seife waschen.

P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen einige Minuten lang behutsam mit Wasser Spülen, Kontaktlinsen ggf. entfernen, weiter spülen

Einstufung gemäß Richtlinie 67/548/EWG bzw. Richtlinie 1999/45/EG:

Gefahrenhinweise

R36+R37+R38: Reizt Augen, Atmungsorgane und die Haut

Sicherheitshinweise

S26: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

S28: Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser.

S37+S39: Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

Agarose

Nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 ist der Stoff als nicht gefährlich eingestuft.

Nach Richtlinie 67/548/EWG bzw. Richtlinie 1999/45/EG ist der Stoff bzw. das Gemisch nicht als gefährlich eingestuft.

Empfehlung: Handschuhe und Schutzbrille tragen, Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Staubentwicklung vermeiden, Agarose nicht einatmen.

DNA-Färbelösung, 200-fach konz.

Die wässrige Lösung ist nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.

Nach Richtlinie 67/548/EWG bzw. Richtlinie 1999/45/EG ist der Stoff bzw. das Gemisch nicht als gefährlich eingestuft.

Empfehlung: Handschuhe und Schutzbrille tragen, Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.