

# **Praktikumsbericht**

**01.10.2018-05.10.2018**

**Molekulargenetisches Laborpraktikum in der Abteilung  
Verhaltensgenetik des Forschungsinstituts Psychobiologie der  
Universität Trier**

**Anna Kollete**

**Stefan-Andres-Gymnasium Schweich**

**MSS 12 Biologie LK1**

## Praktikumsbericht

Die Abteilung für Verhaltensgenetik des Forschungsinstituts für Psychobiologie der Universität Trier bot Schülern Trierer Gymnasien die Möglichkeit an einem molekulargenetischen Laborpraktikum in den Herbstferien vom 01.10.2018 bis 05.10.2018 teilzunehmen.

Das Praktikum gewährte einen tieferen Einblick in die Genetik, besonders in die Molekulargenetik, aber auch in die Laborarbeit, sowie den biologischen Beruf, während Analysen zur Bestimmung des Genotyps eines bestimmten Gens durchgeführt wurden.

### Grundinformationen

Die **DNA** (Desoxyribonucleic acid)/DNS (Desoxyribonukleinsäure) ist eine Nukleinsäure und eines der wichtigsten Biomoleküle auf der Welt. Sie enthält die gesamte Erbinformation eines lebenden Organismus oder einer lebenden Zelle, das Genom, und ist die materielle Basis der Gene.

Zusammengesetzt ist das Polynukleotid aus einer Kette von vielen Nukleotiden, die wiederum je aus dem Zucker Desoxyribose, einer Phosphatgruppe und einer der vier organischen Basen (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin) bestehen. Da Adenin und Thymin, sowie Guanin und Cytosin komplementär zueinander und durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind, entsteht eine schraubenförmige Doppelhelix aus zwei antiparallelen Einzelsträngen (bei Eukaryoten). Aufgrund der Basenpaarung kommen die Basen im selben Mengenverhältnis vor (Chargaff-Regel).

Die DNA befindet sich im Zellkern des Organismus und liegt in bestimmten Phasen der Mitose, ein Abschnitt des Zellzyklus, in Form von hoch kondensierten Chromosomen vor. Insgesamt umfasst das Genom 22 Autosomenpaare und ein Gonosomenpaar, also 46 Chromosomen. Lediglich für die Verdopplung der DNA, die Replikation, ist eine entspiralisierte DNA notwendig, das heißt während der Interphase des Zellzyklus (G1-, G2-, und S-Phase) ist die DNA nicht in Chromosomen verpackt.

Die „Verpackung“ der DNA erfolgt über mehrere Strukturebenen. Die Doppelhelix ist zunächst um basische Proteine, sogenannte Histone, gewickelt, die einen hohen Anteil positiv geladener Aminosäuren haben. Dies trägt zur festen Bindung an das negativ geladene Zuckerphosphatrückgrat der Doppelhelix bei. Acht Histonmoleküle bilden ein Nukleosom. Die Nukleosomenkette wickelt sich weiter auf zu Schleifen und Rosetten, bis sie schließlich zu einem Chromosom kondensiert ist. Das Chromosom besteht aus zwei Schwesterchromatiden, die über ein Centromer verbunden sind. Dadurch erhält es eine X-Form, wobei je Chromatid ein p-Arm (kurzer Arm) und ein q-Arm (langer Arm) vorhanden ist.

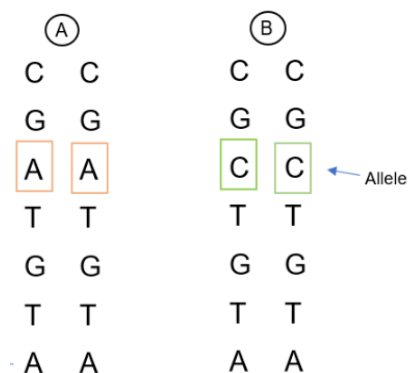
Die innerhalb der DNA befindlichen Gene, die zusammen den genetischen Code bilden, enthalten die Information zur Herstellung der Ribonukleinsäuren (RNA/RNS). Innerhalb der codierenden Gene bilden jeweils drei der Basen ein sogenanntes Basentriplett oder Codon. Jedes der Triplets codiert eine Aminosäure, jedoch können für eine Aminosäure aufgrund der Redundanz des genetischen Codes mehrere Codons codieren. Die Reihenfolge der Basen bestimmt somit auch die Reihenfolge der Aminosäuren.

Die mRNA ist eines der wichtigsten RNA-Moleküle, denn die Information der DNA wird bei der Proteinbiosynthese zunächst durch die Transkription im Zellkern in mRNA-Moleküle überschrieben.

Die von der mRNA übermittelte Information wird anschließend durch Translation im Cytoplasma an Ribosomen in eine Polypeptidkette übersetzt. Die mRNA enthält also die Information zu Synthese von Proteinen und somit auch von Enzymen. Jedoch trägt auch die tRNA, eine weitere RNA, während der Translation eine große Bedeutung und wird von Genen codiert.

Im Genom gibt es jedoch auch weitere Varianten der DNA. Dazu gehören Mutationen und Polymorphismen. Mutationen sind Veränderungen in der Erbinformation, die zu veränderten Eigenschaften, beziehungsweise veränderten Funktionsweisen eines Proteins führen (können). Polymorphismen hingegen kommen häufiger als 1 % in einer Population vor (wenn <1 % werden die Erscheinungen als Mutation bezeichnet) und beschreiben die Vielgestaltigkeit von Individuen, also die verschiedenen Ausprägungen innerhalb einer Population.

Es gibt zwei große Klassen, die Sequenzwiederholungen, zum Beispiel Mikrosatelliten ( $CACACA_n$ ) und Einzelbasenpaaraustausche, zum Beispiel die sogenannten **SNPs** (Single Nucleotid Polymorphism, dt.: Einzelnucleotid-Polymorphismus). Um SNPs besser zu verstehen, sollten zunächst die Allele betrachtet werden. Ein Allel ist die Zustandsform/Ausprägung eines Gens an einem bestimmten Ort auf einem Chromosom. Im Prinzip beschreibt eine Base ein Allel. Bei einem SNP liegt dort ein Austausch einer Base vor. Durch die vollständige Kombination von Allelen entstehen verschiedene mögliche Genotypen (Allele von mütterlichem und väterlichem Chromosomen) (im Beispiel der rechts-stehenden Abbildung: AA, CC oder AC). Der Haplotyp ist eine Abfolge von Allelen entlang eines DNA Stranges (entweder auf dem mütterlichen oder auf dem väterlichen Chromosom). (Abgelesen wird nur der Strang 5'→3')



Mögliche Genotypen: AA, CC, AC  
 bspw.: A=Wildtyp C=mutierte Form  
 Abb.1: vereinfacht: Allele und Genotypen (Quelle: Praktikum Tafel)

Wie schon beschrieben wird als SNP eine Variation eines Basenpaares bezeichnet. Dies sind geerbte und vererbare genetische Varianten. Sie stellen ca. 90 % der genetischen Variabilität dar, sind meist aber unauffällig. Etwa alle 1000bp (base pairs) tritt ein SNP auf, wobei ein Austausch der Base Cytosin durch Thymin am Häufigsten vorkommt. SNPs können auf nichtcodierenden Abschnitten (Introns) und codierenden Abschnitten (Exons) der Gene liegen. Sie werden unter anderem auch als „erfolgreiche Punktmutation“ bezeichnet, da sie sich in Teilen des Genpools der Population einer Art durchgesetzt und manifestiert haben. Der Austausch der Aminosäure, aufgrund der Basenpaarsubstitution, kann zu Veränderungen und somit zur eingeschränkten Funktion oder auch zu einem Funktionsausfall und damit einhergehenden Erkrankungen oder Individualität der Merkmalsausprägung (Phänotyp) führen. Mittlerweile ist bekannt, dass SNPs in Verbindung mit bestimmten Erkrankungen stehen und diese sogar beeinflussen können.

Im Praktikum wurde in diesem Zusammenhang das *CBG* (Corticosteroid-Binding-Globulin; dt.: Transcortin) besprochen und analysiert. Das *CBG* codiert das Protein CBG von Säugetieren und besitzt Bindestellen und Transportfunktionen für Steroide (Glukokortikoiden), vor allem für (wasserunlösliches) Kortisol, ein wichtiges Stresshormon, das bei Stress in der Nebennierenrinde gebildet wird. Es dient aber auch als Puffer bei zu niedriger und Reservoir bei zu hoher Kortisolsekretion. Chromosomal ist das CBG beim Menschen auf dem langen Arm des Chr. 14, 14q32.1 lokalisiert und besteht aus fünf Exons (entsprechend 19 kb genomischer DNA). Der Polymorphismus im *CBG* ist ein G/T Polymorphismus im Exon 3, der zum Austausch der Aminosäure führt.

Es stellte sich die Frage, wie die Genotypen der teilnehmenden Schüler ermittelt werden können. Ziel war es, diese Genotypen zu bestimmen, und währenddessen einen tieferen Einblick in die Molekulargenetik, sowie die molekulargenetische Arbeit zu erlangen. Die Frage lässt sich mithilfe verschiedener Analysen, die während dem Praktikum durchgeführt wurden, lösen.

Grundsätzlich muss dafür, nach der Isolation der DNA, zunächst der Abschnitt des Gens vervielfältigt werden, der für die weitere Analyse relevant ist, da dieser die Veränderung trägt. Anschließend werden sogenannte Restriktionsenzyme verwendet, um die DNA, wenn möglich zu schneiden. Dies ist abhängig von der jeweiligen Variante des Gens. Dadurch erhält man die unterschiedlichen Genotypen.

Die Vervielfältigung des Genabschnittes erfolgt mithilfe der **PCR** (engl.: Polymerase Chain Reaction, dt.: Polymerase-Ketten-Reaktion). Dafür sind ebenso wie bei der natürlichen DNA-Replikation Enzyme notwendig. Für die PCR wird das Template, also die Vorlage des Abschnittes der vervielfältigt werden soll, zwei DNA-Primer, die den zu vervielfältigenden Bereich begrenzen und als Ausgangspunkt für die Polymerase dienen, die dNTPs (Nukleotide), ein Puffer mit  $Mg^{2+}$  Ionen, sowie die Polymerase, die den Primer mit Nukelotiden komplementär zum Template (Vorlage) verlängert, benötigt. Die Polymerase ist die sogenannte *Taq*-Polymerase, isoliert aus einem hitzeliebenden Bakterium, das bei 70°C wächst und Temperaturen von 50°C bis 80°C überlebt. Ohne diese, wäre die PCR nicht möglich. Neben den genannten Materialien, sind ebenso natürlich Reaktionsgefäße und ein Thermocycler notwendig.

Die PCR besteht aus 3 Phasen, die wiederholend ablaufen, denn die Endprodukte des vorrangegangenen Zyklus dienen als Ausgangsprodukte für den nächsten. Somit entsteht eine Kettenreaktion mit

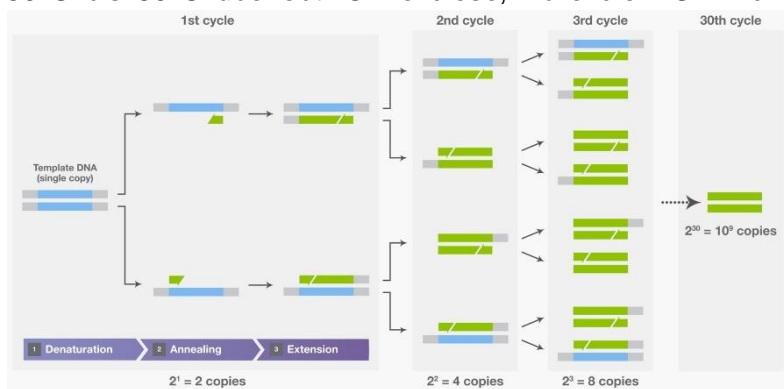


Abb.2: PCR (Quelle: <https://www.acsh.org/sites/default/files/1467741138261.jpg>)

exponentiellem Anstieg der Vervielfältigung (Abb.2). Im Thermocycler werden zunächst die Doppelstränge während der Denaturierung bei 95°C aufgetrennt. Bei 50°C-65°C erfolgt die Primer Hybridisierung, das heißt die Primer lagern sich komplementär an. Zuletzt verlängert die Polymerase in der Elongationsphase bei 72°C den DNA-Strang entsprechend der Vorlage. Insgesamt laufen 30-50 Zyklen ab, währenddessen die DNA vervielfältigt wird.

Für die weitere Ermittlung des Genotyps sind die **Restriktionsenzyme** wichtig. Restriktionsenzyme, oder auch Restriktionsendonukleasen, sind in Bakterien vorkommende Enzyme, die dort der Phagenabwehr dienen. Jedoch erkennen die Enzyme aufgrund des Methylierungsmusters oder einer für sie unbekanntes DNA-Sequenz die fremde DNA und können sie schneiden. Unterschieden werden drei Klassen von Restriktionsenzyme, Typ I: schneidet DNA an zufälliger Stelle, weit entfernt von Erkennungssequenz, Typ II: schneidet DNA innerhalb/unmittelbar in der Nähe der Erkennungssequenz, Typ III: schneidet DNA 20-25 Basenpaare entfernt von Erkennungssequenz. In der Molekularbiologie finden meist Typ II Restriktionsenzyme Verwendung, deren Namen ihre Herkunft bezeichnen.

Durch diese Enzyme kann der sogenannte **Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus** (RFLP) nachgewiesen werden (Durchführung: Seite 5-6 „Restriktionsschnitt mit *HinfI*“). Wenn ein Restriktionsenzym die DNA Sequenz schneidet, anschließend die Längen der Stücke verglichen werden und die Fragmente unterschiedlich lang sind, liegt ein RFLP vor; der Locus ist polymorph, also verschieden/vielgestaltig.

### Durchführung der Genotyp-Analyse

Um Analysen durchführen und Ergebnisse feststellen zu können, musste zunächst das wichtigste Material, die **DNA isoliert** werden. Jeder Teilnehmer entnahm mithilfe eines Bürstchens eigene Mundschleimhautzellen, die DNA enthalten, indem die Wangenseite jeweils 10mal gebürstet wurden. Anschließend wurde der Mund mit Listerine 30 Sekunden ausgespült, die Lösung danach zurück in das vorbeschriftete Röhrchen gegeben und das Bürstchen darin ausgewaschen.

Daraufhin begann das Arbeiten im Labor. Die Röhrchen der Teilnehmer wurden zunächst für 5 min bei 2000g zentrifugiert, damit sich die Zellen am Boden absetzten. Der Überstand wurde danach verworfen. Die *Cell Lysis Solution* wurde zu dem Zellpellet pipettiert, vermischt und 15 min inkubiert. Damit sich die in den Zellen befindliche DNA von den Histonen, um die sie gewickelt ist löst, musste die Proteinase K hinzu pipettiert werden. Die Proteinase K ist ein Enzym, das Peptidbindungen angreift und zur Freisetzung von Nukleinsäuren verwendet wird. Anschließend musste das Probengefäß schwenkend gemischt, 20sek in den Vortexer gestellt und 1 Std. bei 55°C inkubiert werden. Im weiteren Verlauf wurde eine Präzipitationslösung hinzugegeben, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4000g zentrifugiert. Anschließend wurden neue Proberöhrchen benötigt, in die 1 ml 100% Isopropanol und 5 µl Glykogen pipettiert wurden. Der Überstand des zentrifugierten Probenröhrchens wurde zum Isopropanol-Glykogen-Gemisch gegeben. Danach wurde das Gemisch leicht schwenkend gemischt und erneut bei 4000g 5 min zentrifugiert. Der dadurch entstandene Überstand wurde wieder verworfen. Zum zurückgebliebenen Pellet wurde 1 ml 70% Ethanol pipettiert. Im Anschluss daran musste alles in ein neues beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Nachdem 2 min bei 4000g zentrifugiert wurde, wurde der Überstand erneut verworfen und das Röhrchen über Kopf auf Zellstoff gestellt, damit der restliche Ethanol abfließen konnte, jedoch musste darauf geachtet werden, dass das Pellet am Boden des Gefäßes bleibt. Zuletzt wurde das Pellet mit 100 µl Hydrationslösung resuspendiert, sodass sich die DNA über Nacht lösen konnte.

Damit der PCR-Ansatz CBG Exon 3 rs2228541 am folgenden Tag hergestellt werden konnte, musste zuvor mithilfe der **Photometrie** eine DNA-Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden. Der Soll-Wert der DNA Menge beträgt 20ng/µl. Da zweimal die Eigen-DNA pipettiert wurde und der Partner auch zweimal diese DNA pipettierte, wurden 20 µl der DNA je Teilnehmer benötigt (je Probe 5µl). Aufgrund des Ergebnisses der Photometrie erhielt man die Konzentration der DNA der eigenen Probe, sowie einen Ratio-Wert. Die Ratio gibt an, wie rein die Probe ist, also ob zusätzlich zur DNA Protein oder Ethanolreste in der Lösung sind. Daraufhin konnte der Verdünnungsfaktor, sowie die Menge Wasser, die zugegeben werden musste, ermittelt werden.

Beispiel: gemessene DNA-Konzentration 402ng/µl, Ratio 1,69. Der Verdünnungsfaktor beträgt 20,1, da die Konzentration durch den Sollwert geteilt werden muss (402ng/µl: 20ng/µl = 20,1). Da die DNA im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnt werden muss, müssen 191 µl H<sub>2</sub>O zu 10 µl hinzugegeben werden, damit der Sollwert von 20ng/µl erreicht wird.

Jeder der Teilnehmer pipettierte zweimal Eigen-, zweimal Partner- und einmal Kontroll-DNA à 5µl und eine Wasserprobe als Negativprobe (auch 5 µl), somit mussten sechs PCR-Gefäße beschriftet werden, bevor diese mit der jeweiligen Probe befüllt wurden (Gefäß 1 und 2: Eigen-DNA, Gefäß 3 und 4: Partner-DNA, Gefäß 5: Kontroll-DNA, Gefäß 6: Wasserprobe)

Anschließend wurde ein Mastermix (x7) des **PCR-Ansatzes** hergestellt. Dafür wurde nacheinander 260 µl H<sub>2</sub>O, 35 µl Puffer D, 7 µl Primer #87 (10pmol), 7 µl Primer #88 (10pmol), 7 µl dNTPs (10mM), 2,1 µl Taq (5 U/µl) (Polymerase) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Die eingesetzten Primer sind genau für die Sequenz des CBG festgelegt, damit diese vervielfältigt werden kann.

Daraufhin wurde vom Mastermix 45 µl zu jeder der vorgelegten DNA-Proben und der Wasserprobe gegeben. Die Probengefäße mussten anschließend in den Thermocycler gestellt werden, damit die PCR gestartet werden konnte (grundlegender Ablauf der PCR: Seite 3). Zunächst lief die PCR bei 94°C für 5min, damit die Doppelstränge aufgetrennt wurden. Anschließend lief 35x der PCR-Zyklus ab, das heißt 30sek. bei 94°C (Denaturierung), 30sek. bei 52°C (Hybridisierung), 30sek. bei 72°C (Elongation). Nach 35 Zyklen hielt der Thermocycler die Temperatur weiterhin auf 72°C für 10min. Danach wurden die PCR-Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Mithilfe der **Agarosegelelektrophorese** wurden die PCR-Produkte dargestellt und überprüft. Dafür musste zunächst ein 2%iges Agarose-Gel gekocht werden. Dazu wurden 6g Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgemessen und 300ml TBE Puffer (0,5fach Tris-Borat-EDTA-Puffer) hinzugegeben. Außerdem ein Rührfisch. Dieser darf aufgrund des Siedeverzuges nicht erst nach dem Kochen dazu gegeben werden. Als die Agarose mit dem Puffer vermischt war, wurde der Kolben zweimal 2min zum Kochen in die Mikrowelle gestellt. Die Agarose muss ganz gelöst sein. Nach dem Kochen wurden 5 µl Midori-Green als Farbstoff dazugegeben. Das Gel musste etwas abkühlen, jedoch sollte es nicht fest werden, bzw. sollte sich auf der Oberfläche keine Haut bilden. Deshalb wurde der Kolben auf eine magnetische Rührplatte gestellt. Zudem wurde die Gelform für die später folgende Gel-Elektrophorese vorbereitet. Sobald das Gel etwas abgekühlt war, wurde es in die Gelform gegossen und erneut 1Std. abkühlen gelassen.

Im nächsten Schritt wurde das Agarose-Gel beladen. Dazu mussten zunächst 10 µl PCR Produkt mit 3 µl Ladepuffer versetzt werden. Die Pipette darf nur bis zum ersten Anschlag gedrückt werden, da sonst Luft mit eingemischt wird. So wurde mit allen sechs PCR-Produkten verfahren. Anschließend wurden je Probe 10 µl des PCR-Ladepuffergemischs in je eine Geltasche pipettiert. Damit die Größen der Abschnitte aus den PCR-Produkten besser ermittelt werden konnten, musste vor die Proben in eine Geltasche 4 µl eines Größenstandards gegeben werden. Die Gel-Elektrophorese wurde gestartet, indem eine Spannung von 120V für ein bis zwei Stunden angelegt wurde.

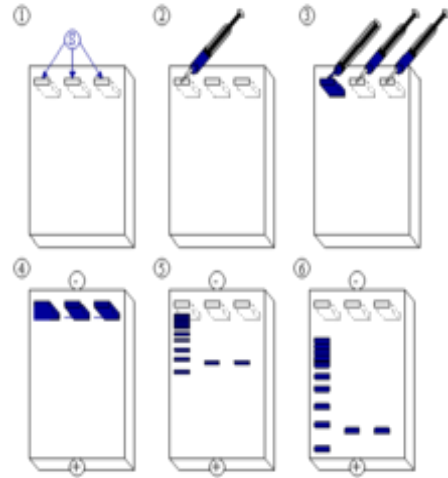


Abb.3 schematische Darstellung der Elektrophorese  
(Quelle: <https://de.wikipedia.org/wiki/Agarose-Gelelektrophorese>)

Durch die Agarosegelelektrophorese können die Nukleinsäurestränge (DNA, RNA) nach ihrer Größe getrennt werden, um die Größe durch Vergleich mit DNA-Strängen bekannter Größe (in diesem Fall die Größe des vervielfältigten Abschnittes des *CBG* 366bp zu bestimmen.

Da die Phosphatgruppen der DNA am Zucker-Phosphatrückgrat negativ geladen sind, ziehen diese bei Anlegen einer Spannung in Richtung Pluspol durch die Gelmaschen, während größere Moleküle eher zurückgehalten werden, als kleinere Moleküle. Dadurch wird die Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht. Nachdem die Gelelektrophorese durchlaufen ist, konnte die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und durch den gesetzten Größenstandard die Größe abgeschätzt werden. (Ergebnisse, Seite 6)

Im letzten Schritt der Genotypbestimmung der Teilnehmer wurden die Restriktionsenzyme (Seite 3) eingesetzt. Durch den **Restriktionsschnitt mit *HinfI*** wurde der G/T SNP im *CBG* nachgewiesen. *HinfI* stammt aus einem Bakterium, welches sich vor allem in Schleimhäuten wohlfühlt und dort Entzündungen auslöst. Es schneidet die 366bp Sequenz im Exon 3 des *CBG*. Die Erkennungssequenz für *HinfI* ist 5'-G' ACT'C-3'. Wenn *HinfI* diese schneidet, bedeutet das, dass die Sequenz (GACTC) einen G/T-Polymorphismus aufweist, also ein SNP vorliegt. Dies bedeutet wiederum, dass die Basenfolge entweder GACTC oder GACGC lautet. Jedoch schneidet *HinfI* nur 5'-GACT'C-3' und nicht 5'-GACG'C-3'. Somit können nach dem Schnitt drei verschiedene Schnittmuster entstehen, die den Genotyp beschreiben:

Homozygot TT: beide DNA-Stränge geschnitten, (Fragmentlänge 183bp, 183bp)  
Homozygot GG: Enzym schneidet DNA nicht (Fragmentlänge 366bp, 366bp)  
Heterozygot GT: nur ein DNA-Strang wird geschnitten (Fragmentlänge 366bp, 183bp)

Aufgrund der verschiedenen langen Fragmente, wird von einem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus gesprochen.

Zunächst musste für die Bestimmung jedoch der Restriktionsschnitt hergestellt werden. Dazu wurde ein Mastermix aus 28 µl H<sub>2</sub>O, 8 µl Puffer 4 (NEB), und 4 µl *HinfI* angesetzt – ausreichend für 4 PCR-Proben (je Probe 10 µl; 1x Eigen-, 1x Partner-, 1x Kontroll-, 1x Zusatz-). Anschließend wurden je 10 µl des Mastermix zu den PCR-Proben gegeben. Diese wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde erneut eine Gelelektrophorese gestartet, mittels dieser die entstandenen Fragmente des Restriktionsschnitts sichtbar gemacht werden konnten. Dafür mussten lediglich die PCR-Proben, mit einem Puffer versetzt und in je eine Geltasche pipettiert werden, bevor erneut eine Spannung angelegt wurde und der komplette Ansatz 2Std. auf dem 1,5%igen Agarose-Gel auftrennte. Zuletzt konnten die Ergebnisse unter UV-Licht sichtbar gemacht und die entsprechenden Genotypen (TT, GG, oder GT) der Teilnehmer abgelesen werden.

## Ergebnisse

Die Durchführung der PCR und des Restriktionsschnitts im Praktikum waren erfolgreich. Jeder der Teilnehmer erhielt vernünftige und korrekte Ergebnisse.

### PCR

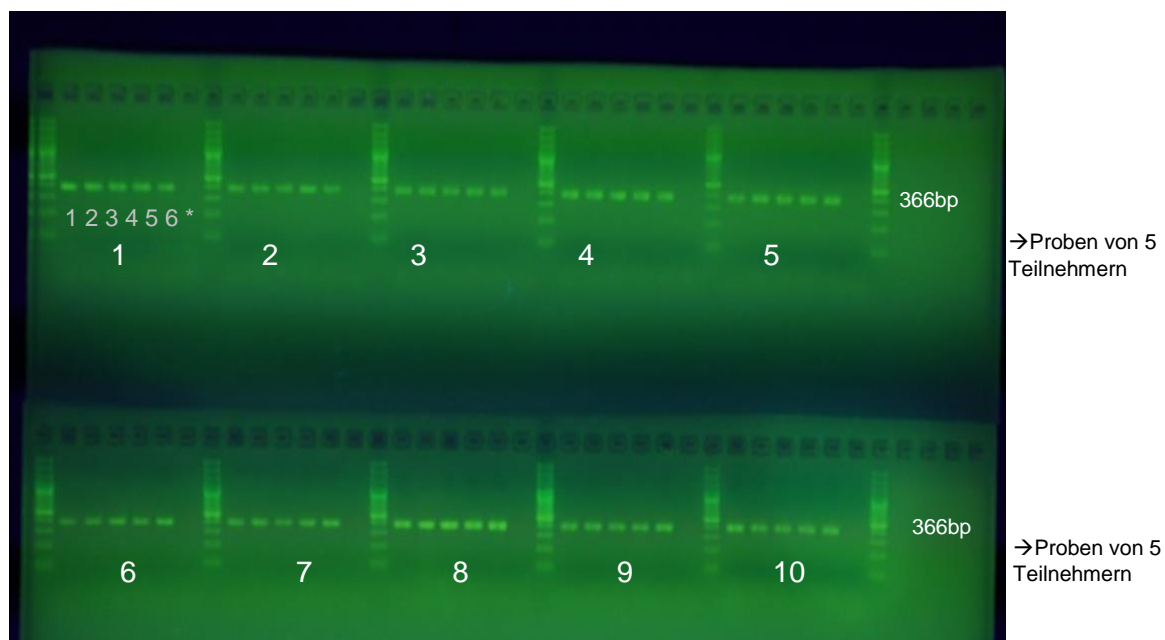


Abb.4: Ergebnisse der PCR des *CBG* Polymorphismus der Teilnehmer des molekulargenetischen Praktikums vom 01.10.2018-05.10.2018 (verändert nach Abbildung aus dem Praktikum)

In Abb.4 sind die Ergebnisse der PCR auf Gel 1 nach Abschluss der Agarose-Gelelektrophorese gezeigt. Unter UV-Licht kann die vervielfältigte DNA als Banden erkannt werden. Mithilfe des Größenstandards, der jeweils vor 6 Proben\* jedes Teilnehmers gegeben wurde, kann die Größe der DNA-Abschnitte abgelesen werden. In diesem Fall entspricht die mittels PCR amplifizierte Sequenz 366 bp aus Exon 3 des *CBG*. Diese Größe liegt bei jedem Teilnehmer vor. Da die sechste Probe (jeweils links des Größenstandards) eine Wasserprobe und somit eine Negativprobe ist, ist dort keine Bande sichtbar.

\*6 Proben: Probe 1+2: Eigen-DNA, Probe 3+4: Partner-DNA, Probe 5: Kontroll-DNA, Probe 6: Wasserprobe/Negativprobe



## Restriktionsschnitt

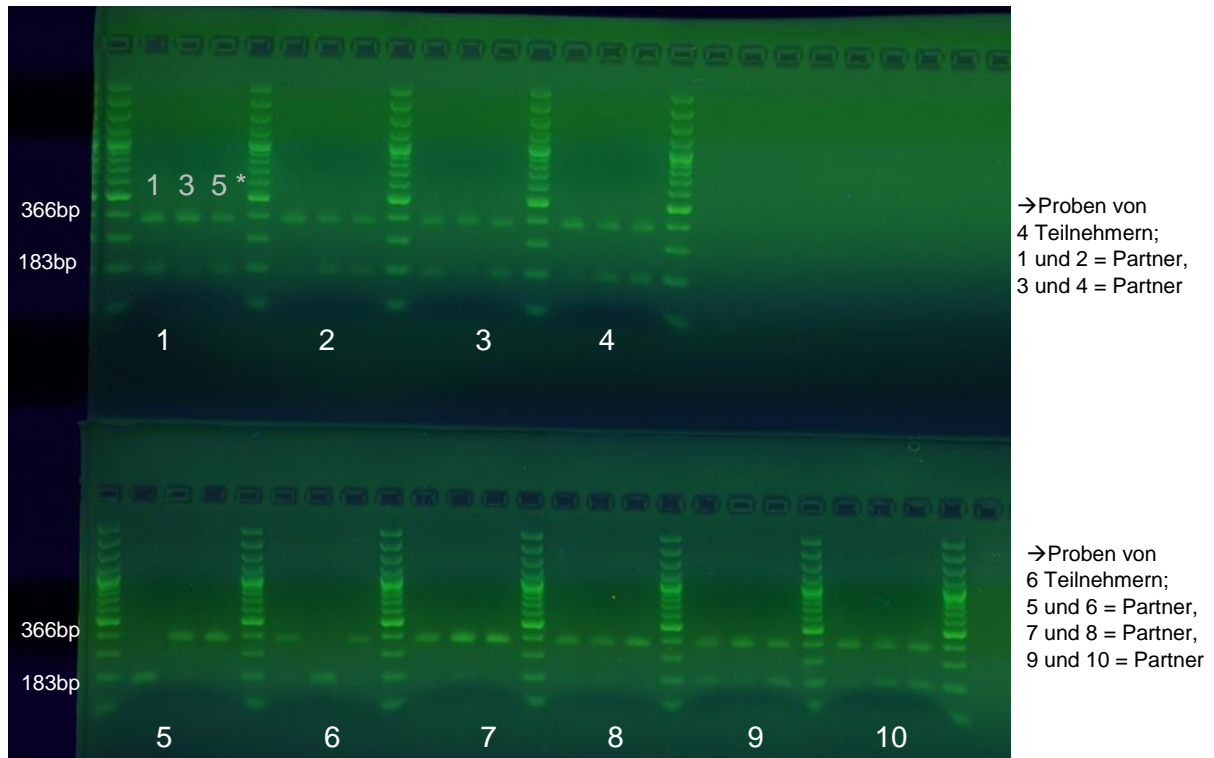


Abb.5: Ergebnisse der Restriktion der PCR-Produkte des *CBG* Polymorphismus der Teilnehmer des molekular-genetischen Praktikums vom 01.10.2018-05.10.2018 (verändert nach Abbildung aus dem Praktikum)

In Abb.5 sind die Ergebnisse des Restriktionsschnitts auf Gel 2 nach Abschluss der Agarose-Gelelektrophorese gezeigt. Unter UV-Licht können die Ergebnisse sichtbar gemacht werden. Wie bei Gel 1, lässt sich mithilfe des Größenstandards, der jeweils vor 3 Proben\* jedes Teilnehmers in die Geltasche gegeben wurde, die Fragmentgröße ablesen. Aufgrund der genetischen Variabilität sind die Ergebnisse der Teilnehmer unterschiedlich, jedoch kommt es vor, dass manche dieselben Genotypen im *CBG* aufweisen. Im oberen Bereich der Abbildung erkennt man, bei Betrachtung der 1. Probe, folgende Genotypen (von links nach rechts): 1. GT, 2. GT, 3. GT, 4. GG, im unteren Bereich der Abbildung liegen folgende Genotypen vor (von links nach rechts): 5. TT, 6. GG, 7. GT, 8. GT, 9. GT, 10. GT.

Da beim homozygoten Genotyp GG, kein DNA-Strang vom Restriktionsenzym *HinfI* geschnitten wurde, liegt eine Bande bei 366bp vor (z. B. Probe 4). Beim homozygoten Genotyp TT wurden beide DNA-Stränge geschnitten, somit liegt eine Bande nur bei 183bp vor (Probe 5). Der heterozygote Genotyp GT, ist in zwei Banden dargestellt, da lediglich ein DNA-Strang geschnitten wurde. Die Banden liegen bei 366bp und 183bp, da die Fragmente der DNA nach Restriktion dieser Länge entsprechen (z. B. Probe 1). Die zweite Probe zeigt das Ergebnis der Partner-DNA, die dritte Probe, die Kontroll-DNA (es wurden drei verschiedene eingesetzt, deren Genotypen bereits bekannt waren (1x GG, 2x GT)).

\*3 Proben: Probe 1: Eigen-DNA, Probe 3: Partner-DNA, Probe 5: Kontroll-DNA

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Genotypverteilung in der Gruppe der Teilnehmer folgendermaßen war: 70% GT, 20% GG, 10% TT. Jedoch lässt sich aufgrund der geringen Anzahl an Probanden im Praktikum kein eindeutiges Ergebnis zu einer potenziellen Verteilung der Genotypen in der Population feststellen. Diese beträgt laut vorangegangenen Analysen 32% GT, 45% GG und 23% TT. Mathematisch kann dies durch das „Hardy-Weinberg Gesetz“ beschrieben werden. Es beschreibt die Genotypfrequenzen, die über Generationen hinweg unveränderlich sind, also einen konstanten Genpool, sofern eine ideale Population, sprich kein Auftreten von Mutationen, keine Selektion, gleichwertige Allele (und weiteres) vorliegt.

Das Praktikum war zielführend, interessant gestaltet und lehrreich, da jeder Teilnehmer seine eigenen Genotypen durch selbstständig durchgeführte Analysen bestimmen konnte und viele neue Eindrücke, sowie Erkenntnisse, auch in Bezug auf das spätere Berufsleben sammeln konnte.