

DNA-Extraktion

Auf dem Weg zum Helden

A. Wenzel, K. Röllke

Universität Bielefeld, Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld, annkathrin.wenzel@uni-bielefeld.de

Dieser Beitrag thematisiert eine Möglichkeit, Schülerinnen und Schülern der 9. und 10. Jahrgangsstufe einen kleinen Einblick in einen biomedizinischen Kontext zu geben und dabei selber experimentieren zu können. Grundlage ist ein Schnupperkurs des teutolab-biotechnology, welcher sich mit der medizinischen Anwendung einer DNA-Extraktion befasst. Es werden neben dem benötigten Hintergrundwissen auch verschiedene Variationen für eine praktische, individuelle Umsetzung in der Schule aufgezeigt.

Stichwörter: DNA-Extraktion, Leukämie, Stammzellenspende, DKMS, NanoDrop, Gelelektrophorese.

1 Theoretischer Hintergrund

1.1 Leukämie

Bei Leukämie handelt es sich um eine bösartige Erkrankung des Knochenmarks bzw. des blutbildenden Systems. Durch Mutationen kommt es dazu, dass der Reifungsprozess der Leukozyten unterbrochen wird. Dadurch sind diese fehlerhaft und können ihre Funktion im Immunsystem nicht mehr erfüllen. Allerdings vermehren sie sich so stark, dass die Erythrozyten verdrängt werden und es somit zu einem veränderten Blutbild kommt (Michl, 2013). Durch das Blut gelangen die fehlerhaften Leukozyten in den ganzen Körper, daher wird Leukämie als Systemerkrankung bezeichnet. Es werden mehrere Arten von Leukämie unterschieden. „Je nach Art der weißen Blutkörperchen, aus denen die Leukämiezellen hervorgehen, werden die myeloischen und die lymphatischen Leukämien unterschieden“ (krebsgesellschaft.de). Myeloische Leukämien gehen von Vorläuferzellen der Granulozyten aus (krebsgesellschaft.de), diese dienen normalerweise der unspezifischen Abwehr von Krankheitserregern wie Bakterien, Parasiten und Pilzen (Kaufmann, 2014). Lymphatische Leukämien haben als Vorläuferzellen die Lymphozyten (krebsgesellschaft.de), dazu gehören die B-Zellen, die T-Zellen und die natürlichen Killerzellen. Die Hauptaufgabe der Lymphozyten ist die Erkennung von Fremdstoffen (Kaufmann, 2014). Desweiteren werden beide Leukämiearten noch einmal in akute und chronische Leukämie unterschieden. Die akute Leukämie zeichnet sich durch schwere Krankheitssymptome aus. Diese Form führt unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tod. Die chronische Leukämie hingegen

hat einen langsameren Krankheitsverlauf. Jede Leukämieerkrankung wird individuell bewertet und behandelt. Meistens setzt sich die Behandlung aus verschiedenen Komponenten zusammen. Dazu gehört die Chemotherapie, die Strahlentherapie oder die Stammzellentransplantation bzw. Knochenmarktransplantation (Michl, 2013).

1.2 Stammzellenspende

Bei der Stammzellentransplantation bzw. Knochenmarktransplantation wird unterschieden zwischen der allogenen und der autologen Transplantation. Bei der autologen Transplantation werden dem Patienten selbst Stammzellen entnommen und nach einer Therapie wieder zurückgeführt. Der größte Vorteil dabei ist, dass es nicht zu einer Abstoßungsreaktion kommt. Bei der allogenen Transplantation werden Stammzellen oder Knochenmark von einer anderen Person übertragen.

Die Auswahl des Spenders kann jedoch nicht zufällig geschehen, entscheidend ist das HLA-System (Humane Leukozyten-Antigene). Dieses legt die Strukturen auf den Oberflächen der Körperzellen fest, wodurch das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen unterscheiden kann (zkrd.de). Das HLA-System ist ein wichtiger Bestandteil des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), welcher erstmals 1964 von J. Dausset und R. Payne beschrieben wurde und für die Immunerkennung und Gewebeverträglichkeit verantwortlich ist (medizinische-genetik.de). Die Gene des HLA-Systems sind auf dem kurzen Arm des sechsten Chromosoms lokalisiert. Es werden zwei Klassen unterschieden, Klasse I enthält HLA-A,-B und -C und die Klasse II HLA-DR, -DQ und -DP, wobei jeder Genort polymorph ist (medizinische-genetik.de). Die Benennung der HLA-Allele erfolgt durch eine aus drei Teilen bestehende Codierung. Der erste Teil bezeichnet den Genort, der zweite Teil die zweistellige Allelfamilie und der dritte Teil nummeriert fortlaufend die Varianten innerhalb der Allelfamilie (zkrd.de). Für die Stammzellenspende sind Übereinstimmungen bei den Genorten HLA-A, B, C, DQB1 und DRB1 notwendig. Allerdings haben viele retrospektive Studien positive Auswirkungen der Berücksichtigung zusätzlicher Genorte (z.B. DPB1, KIR, MICA und HLA-E) für die Spenderselektion gezeigt (Lange, 2018).

1.3 Deutsche Knochenmarkspenderdatei (DKMS)

Um die Suche nach einem geeigneten Spender zu vereinfachen, gibt es verschiedene Spenderdateien. Diese gleichen die Werte der Patienten mit denen der potentiellen Spender ab. Dabei ist die DKMS der größte Verbund von Stammzellenspenderdateien. Seit der Gründung 1991 wurden über 8,5 Millionen Spender registriert. So konnte schon knapp 75000 Patienten mit dem Auffinden eines geeigneten Spenders geholfen werden (dkms.de (a)). Die Arbeit der DKMS ist wichtig, da in Deutschland jede 15 Minuten ein Mensch die Diagnose Blutkrebs erhält. Immer noch findet jeder zehnte Patient keinen geeigneten Spender. Da die DKMS ihre Untersuchungen und

Arbeit über Spenden finanziert, müssen sie eine hohe Öffentlichkeitsarbeit leisten. Die DKMS stellt grundlegende Informationen frei und anschaulich zur Verfügung. Dabei sind sie immer bestrebt, neue Spender zu finden. Auch durch das Schulprogramm „Dein Typ ist gefragt!“ sollen junge Menschen auf die Thematik hingewiesen werden und den Kampf gegen Blutkrebs unterstützen. Dazu gehören auch diverse Spendenaktionen, da sich die Kosten einer Registrierung auf 35 € belaufen. Viele Schülerinnen und Schüler kennen bereits das Motto „Wir besiegen Blutkrebs“ oder den Werbeslogan „Mund auf, Stäbchen rein, Spender sein“ (dkms.de (b)). Um sich bei der DKMS registrieren zu lassen, ist es möglich ein kostenloses Typisierungsset zu bestellen. Dieses enthält Informationsmaterial, eine Anleitung, zwei Wattestäbchen und den Umschlag für den Rückversand. Wenn die Probe der Mundschleimhaut entnommen wurde, wird sie in dem DKMS Life-Science-Lab in Dresden untersucht. Zuerst wird die DNA extrahiert. Dieses erfolgt mittels der Magnetic Beads Methode, einem auf der Nutzung von Silicagel basierenden Verfahren. Danach werden die entsprechenden Gene mittels Next-Generation Sequencing (NGS) sequenziert und die ABO-Blutgruppe, sowie der Rhesusfaktor bestimmt (Lange, 2018). Nähere Informationen zum NGS finden sich in der ersten Ausgabe von BU praktisch, im Artikel *Next Generation Sequencing (NGS) von DNA - Mehr Informationen durch mehr Daten?* Als letztes wird die Registrierung abgeschlossen, indem die entsprechenden Daten in die Datei aufgenommen werden. Ab diesem Zeitpunkt können sie mit den Daten der Patienten verglichen werden. Vereinfacht kann die Registrierung wie in Abbildung 1 dargestellt werden:

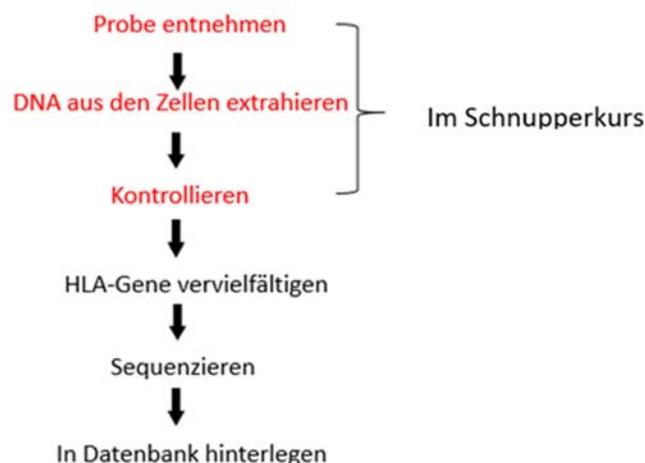


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Registrierungsschritte bei der DKMS (Quelle: *teutolab-biotechnologie*)

Wie in Abbildung 1 zu erkennen, wird nur der Teil der benötigten Registrierungsschritte im folgenden Schnupperkurs umgesetzt, der Anschluss an den Lehrplan der Zielgruppe findet und in der Schule praktisch durchführbar ist.

2 Fachlicher Hintergrund

2.1 DNA-Extraktionen

Im Folgenden werden zwei verschiedene DNA-Extraktionsmethoden vorgestellt. Beide Methoden sind durch Schülerinnen und Schüler, in einer entsprechend ausgestatteten und vorbereiteten Umgebung, selbstständig durchführbar. Zu beachten ist, dass die verschiedenen Lösungen Stoffe wie Isopropanol oder Guanidinhydrochlorid enthalten, welche Haut- und Augenreizungen verursachen können (Macherey-Nagel, 2014). Deswegen müssen während der DNA-Extraktion Handschuhe und eine Schutzbrille getragen werden.

Bei dem benötigten Probematerial handelt es sich um eigene Mundschleimhautzellen der Schülerinnen und Schüler. Die Extraktion kann in der Schule im Fachraum durchgeführt werden, es ist kein biotechnologisch ausgestattetes Labor nötig.

2.1.1 DNA-Extraktion „per Hand“

Die Präparationsmethode kann in folgende Hauptschritte unterteilt werden:

1. Lyse der Zellen,
2. Deproteinisierung,
3. Gewinnung der DNA (Hagemann, 1990).

Die Mundschleimhautzellen werden durch das Ausspülen der Mundhöhle mit einer Kochsalzlösung gewonnen. Danach werden zuerst die durch Zentrifugation gesammelten Zellen aufgeschlossen. Um die Zellmembran zu zerstören wird Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 2 % SDS) hinzugegeben und die Zellen vollständig resuspendiert. Das enthaltende Ethylendiamintetraacetat (EDTA) entfernt die für die Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur der Zellhüllen unentbehrlichen Magnesiumionen, außerdem hemmt es die DNAasen. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein Detergens, welches Lipidmoleküle entfernt und somit die Zellmembran zerstört (Brown, 2011). Dieser Vorgang wird unterstützt durch eine Inkubation im Thermoblock bei 65 °C (Bártulos, 2012). Anschließend werden, mithilfe verschiedener Detergenzien, die Proteine ausgefällt. Dazu wird ein Fällungspuffer (8 M Kaliumacetat) auf die Probe gegeben, durchmischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Kaliumionen bilden zusammen mit dem Dodecylsulfat (Anion aus dem SDS) ein unlösliches Salz. Da die Dodecylsulfatmoleküle mit ihrem hydrophoben Teil an die Proteine binden, werden diese durch das unlösliche Kaliumdodecylsulfat ausgefällt (Becker, 2017). Durch Zentrifugation lassen sich die ausgefallenen Proteine von der DNA, welche sich in der wässrigen Lösung befindet, abtrennen. Um die DNA zu reinigen und sie zu konzentrieren, wird sie zunächst ausgefällt. Für die Fällung wird Isopropanol in die Lösung gegeben. Das Isopropanol verdrängt die Wasserhülle der DNA, so dass die negativ geladenen Phosphatgruppen freigesetzt werden. Die noch in der Lösung befindlichen Kationen neutralisieren die negative Ladung der DNA und somit fällt sie aus (Reineke, 2004). Durch Zentrifugieren wird die DNA im Pellet gesammelt und kann mithilfe von 70 % Ethanol gewaschen

werden. Im letzten Schritt wird die DNA in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8; 1 mM EDTA) gelöst, dieser ist eine schwache Pufferlösung (Bártulos, 2012). Eine detaillierte Anleitung mit allen Arbeitsschritten befindet sich in dem beigefügten Arbeitsmaterial A.

2.1.2 DNA Extraktion mithilfe des Kits

Zunächst werden die benötigten Proben mithilfe von sterilen Wattestäbchen aus dem Mundraum entnommen. Dazu sollte das Wattestäbchen ca. 10 Sekunden an der Innenseite der Wange entlanggekratzt werden. Zur Extraktion der DNA mithilfe eines Kits kann das NucleoSpin® Tissue-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet werden. Mit diesem Kit kann genomische DNA aus Geweben, Zellen und weiteren Quellen gewonnen werden (siehe Abbildung 2). Das Prinzip beruht darauf, dass die Zellen zuerst durch Inkubation mit einem Lysepuffer und Proteinase K, welches Polypeptide zu kleineren Molekülen abbaut, aufgeschlossen werden (Brown, 2011). Danach werden die Proteine denaturiert und die flüssige Phase wird auf die Kieselsäuremembran gegeben. Das in dem entsprechenden Puffer enthaltene Guanidinhydrochlorid denaturiert und löst alle biochemischen Substanzen mit Ausnahme der Nucleinsäuren und sorgt später für eine enge Bindung an die Silicapartikel der Kieselsäulenmembran. Nach der Bindung der DNA wird diese durch mehrmaliges Waschen mit zwei alkoholbasierten Puffern gereinigt. Am Ende wird die DNA von der Kieselsäurenmembran unter Verwendung eines Elutionspuffers gelöst. Unter Niedrigsalzbedingungen, werden die Wechselwirkungen zwischen den DNA-Molekülen und dem Silica destabilisiert (Brown, 2011).



Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der einzelnen Versuchsschritte der DNA Extraktion mit dem NucleoSpin® Tissue- Kit (Quelle: mn-net.com)

Die gewonnenen DNA-Lösungen können so bei -20 °C längere Zeit aufbewahrt werden (Reineke, 2004).

Eine detaillierte Anleitung mit allen Arbeitsschritten befindet sich in dem beigegefügtten Arbeitsmaterial B.

2.2 Nachweismethoden

Um DNA nachzuweisen, wird häufig eine Elektrophorese durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Technik, bei der geladene Teilchen aufgrund eines elektrischen Feldes wandern und so voneinander getrennt werden (Reineke, 2004). Da die Gelelektrophorese ein trägergebundenes System ist, erfolgt die Separierung der einzelnen Substanzen nicht nur durch ihre Ladung, sondern zusätzlich durch einen Siebeffekt des Gels aufgrund der Größe und der Gestalt (Dechert, 2012). Die DNA Fragmente wandern aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrestes immer zur Anode. Dabei sind kleinere Fragmente schneller als Größere, da sie besser durch die Poren des Molekularsiebes gelangen (Reineke, 2004). Durch die Gelelektrophorese lässt sich nicht nur erkennen ob DNA vorhanden ist. Es lässt sich außerdem die Größe und Konzentration bestimmen (Dechert, 2012). Die Größe kann bestimmt werden, da sich lineare doppelsträngige DNA Moleküle proportional zum \log_{10} ihres Gewichtes bewegen (Hagemann, 1990). Für eine Gelelektrophorese werden ein Gel und ein Laufpuffer benötigt. Das benötigte Gel wird aus einem Puffer und Agarose gekocht (Dechert, 2012). Da die DNA nach dem Gellauf wegen ihrer Farblosigkeit im Gel nicht zu erkennen ist, muss diese noch angefärbt werden. Dazu wird häufig Ethidiumbromid genutzt. Nach der Einfärbung fluoreszieren die DNA Banden unter ultraviolettem Licht (UV Licht) und können dadurch sichtbar gemacht werden. Allerdings ist Ethidiumbromid ein starkes Mutagen, da es sich als interkalierende Substanz in die DNA setzt, wodurch die Replikation und Transkription gestört werden. Auch das UV Licht kann zu gesundheitlichen Schäden führen. Daher wird versucht, alternative Methoden zu verwenden (Brown, 2011).

„Die Konzentrationsbestimmung über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ist schnell und einfach und daher sehr beliebt“ (Mühlhardt, 2013, S. 40f.) und stellt eine weitere Möglichkeit dar DNA nachzuweisen. Bei diesem Verfahren wird die Extinktion der Probe, in einem Wellenlängenbereich zwischen 190 - 840 nm, gemessen. Aufgrund der Absorption in einem bestimmten Wellenlängenbereich können verschiedene Konzentrationen bestimmt werden. So wird DNA im ultravioletten Bereich bei 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) von 1 entspricht dabei ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA (Reineke, 2004). Für die Messung mit dem NanoDrop, einem speziellen Photometer für kleine Volumina, werden nur 0.5 - 2 μl Probe benötigt (siehe Abbildung 3). Die Probe bildet dabei eine Flüssigkeitssäule und überwindet damit den Zwischenraum zwischen der Empfängerfaser und dem absendenden Faserkabel (Thermo SCIENTIFIC, 2009). Das Computerprogramm berechnet die DNA Menge auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes.



Abbildung 3: Auftragung einer DNA-Probe auf den NanoDrop (Quelle: *teutolab*-biotechnologie)

Des Weiteren kann neben der DNA-Menge auch die Verunreinigung mit Proteinen ermittelt werden. Dazu wird das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Proteine bei 280 nm ihr Absorptionsmaximum haben (Bártulos, 2012). Eine proteinfreie Probe weist ein Verhältnis zwischen 1.8 und 2.0 auf. Ein geringerer Wert deutet auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin (Mühlhardt, 2013 und Brown, 2011). Allerdings zeigen Erfahrungen, dass selbst hochreine DNA Proben oft nur ein OD_{260}/OD_{280} Verhältnis von 1.5 aufweisen. Außerdem sind sich DNA und RNA sehr ähnlich, sodass dieses Messverfahren hier keine wirkliche Unterscheidung macht (Mühlhardt, 2013). Neben den reinen Zahlenwerten gibt der NanoDrop die ermittelten Absorptionen auch als Graph an. Im Optimalfall lässt sich bei 260 nm ein globales Maximum erkennen mit einem charakteristischen Kurvenverlauf (siehe Abbildung 4).

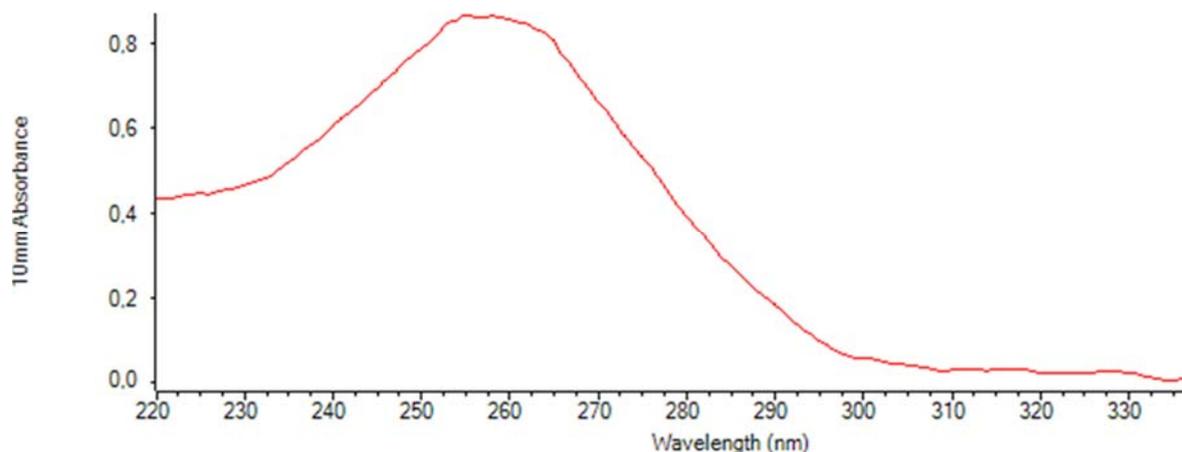


Abbildung 4: Graphische Darstellung der Messung einer DNA-Probe mit einer DNA-Menge von 102.2 ng/ μ l DNA und einem OD_{260}/OD_{280} Verhältnis von 1,38 (Quelle: *teutolab*-biotechnologie)

Falls die extrahierte DNA unrein ist, verändert sich der Kurvenverlauf, teilweise erheblich (siehe Abbildung 5).

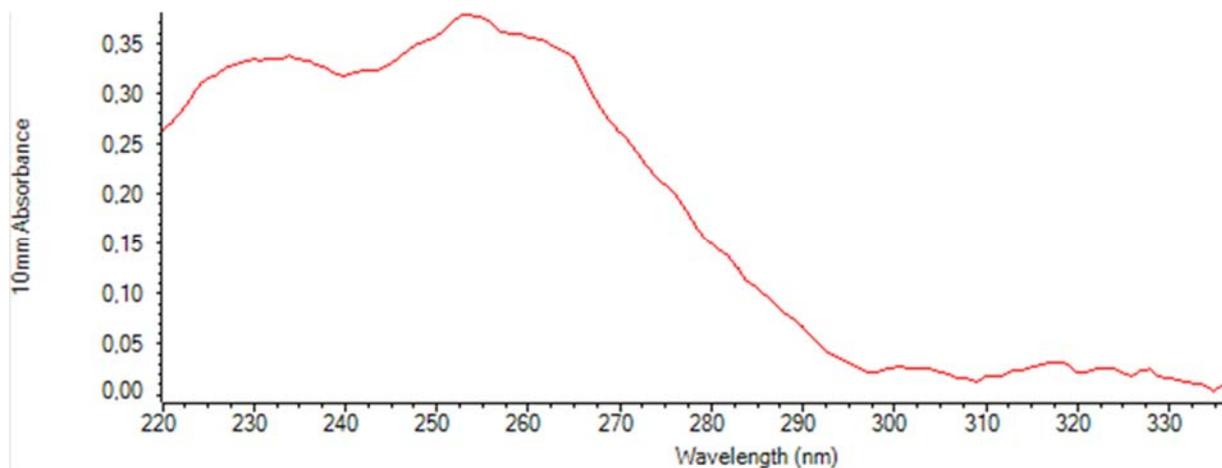


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Messung einer DNA-Probe mit einer DNA-Menge von 17,8 ng/μl DNA und einem OD₂₆₀/OD₂₈₀ Verhältnis von 2,38 (Quelle: *teutolab*-biotechnologie)

In dieser Probe lässt sich neben dem Maximum bei 260 nm ein weiteres lokales Maximum bei 230 nm erkennen und verschiedene Unregelmäßigkeiten. Dieses spricht für Verunreinigungen durch Stoffe mit anderen Absorptionsspektren.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Nachweismethode durch den NanoDrop überzeugt, da sie schnell ist, konkrete Zahlenwerte für die Menge und die Reinheit der DNA und zusätzlich einen Graphen zur eigenständigen Überprüfung der Ergebnisse liefert. Zudem können die Schülerinnen und Schüler diese Methode eigenständig anwenden und es gibt keine Sicherheitsbedenken. Allerdings ist dieses in der Schule kaum umsetzbar, da die Anschaffung eines NanoDrops mit erheblichen Kosten verbunden ist. Eine Alternative für die Schule ist im Kapitel 5 aufgeführt.

3 Didaktische Überlegungen

Bei der Planung des Schnupperkurses wurde explizit darauf geachtet, einen Bezug zu den Kernlehrplänen der Biologie herzustellen. So sollen sich die Schülerinnen und Schüler von Gymnasien mit der „Anwendung moderner medizinischer Verfahren“ (MSW NRW, 2008, S. 37) auseinandersetzen und vereinfacht erklären können. Außerdem behandelt der ausgewählte Kontext eine übergeordnete Fragestellung mit Bezug zur Gesundheit (MSW NRW, 2008). An Haupt- und Realschulen ist das Thema dem Inhaltsfeld „Biologische Forschung und Medizin“ zuzuordnen (MSW NRW, 2011a; MSW NRW, 2011b). An Gesamtschulen könnte der Kurs bei der Auseinandersetzung mit der Organspende, im Inhaltsfeld „Stationen eines Lebens“, eingebettet werden (MSW NRW, 2013). Denn auch bei der Stammzellenspende ist eine Aufklärung notwendig, um eine bewusste und reflektierte Entscheidung treffen zu können. Eine weitere Einbindung wäre bei der Behandlung des Immunsystems möglich, da dieses durch eine Leukämie geschwächt ist.

Zudem bietet der Schnupperkurs die Möglichkeit, prozessbezogene Kompetenzen weiter zu entwickeln. Beispielsweise sollen die Schülerinnen und Schüler von Gymnasien eigene Hypothesen aufstellen und diese durch experimentell gewonnene Daten bewerten können (Kompetenzbereich Erkenntnisgewinnung). Dabei soll strukturiert, reflektiert, auch als Team, gearbeitet werden und die Ergebnisse sollen situationsgerecht und adressatenbezogen dargestellt werden (Kompetenzbereich Kommunikation) (MSW NRW, 2008). Da der Schnupperkurs einen Forschungsauftrag enthält, können zu Beginn Hypothesen generiert werden. Am Ende soll eine abschließende Empfehlung der Schülerinnen und Schüler ausgesprochen werden, welche mehrere Aspekte berücksichtigt und auf Grundlage der ermittelten Daten gebildet wurde. Das Arbeiten im Team wird durch die praktischen Tätigkeiten trainiert, da diese im Schülerlabor sowie in der Schule in Kleingruppen stattfinden. Zudem soll durch die Betreuer darauf geachtet werden, dass die Kommunikation ein hohes Maß an Fachsprache enthält.

4 Durchführung des Schnupperkurses

Die Schülerinnen und Schüler werden am Anfang des Schnupperkurses in die oben beschriebene Thematik eingeführt. Dieses geschieht mithilfe eines Vortrages, welcher durch eine PowerPoint-Präsentation unterstützt werden kann. Am Ende dieses Vortrages erhalten die Schülerinnen und Schüler ihren Forschungsauftrag: Findet heraus, welches Verfahren für die DNA-Extraktion am besten geeignet ist. In der Wissenschaft und Wirtschaft ist es immer ein Bestreben neue, bessere, schnellere oder günstigere Methoden zu entwickeln und zu etablieren. Danach werden die praktischen Arbeiten durchgeführt. Dieses soll eigenständig durch Kleingruppen geschehen. Dazu sollten zuvor alle technischen Geräte und ihre sachgerechte Handhabung erklärt bzw. demonstriert werden. Besonders der richtige Umgang mit den Mikropipetten stellt eine große Herausforderung dar. Um einen klar nachvollziehbaren Ablauf zu gewährleisten, werden die beiden Extraktionen nacheinander umgesetzt. Das bietet auch die Möglichkeit, die zweite Extraktionsmethode in längeren Wartezeiten theoretisch einzuführen und die benötigten Schritte zu besprechen. Dieses soll Zeit sparen und mögliche Langeweile vermeiden. Aus diesem Grund bietet sich an die DNA Extraktion „per Hand“ zuerst durchzuführen, da hier längere Inkubationsschritte vorhanden sind (siehe Arbeitsmaterial A). Nach Beendigung der DNA-Extraktionen können die Schülerinnen und Schüler ihre Proben am NanoDrop messen und sich die für die abschließende Beurteilung relevanten Daten notieren. Diese sind der OD_{260} -Wert und das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} . Die abschließende Beurteilung sollte im Plenum durchgeführt werden, damit viele Daten zur Verfügung stehen und eventuelle Ausreißerdaten besser beurteilt werden können. Zusätzlich können weitere Fakten, wie die Kosten oder der Vorbereitungsaufwand, der einzelnen Methoden durch den Betreuer kommentiert werden. Auf Grundlage des Wissens und der ermittelten Daten sollten die Schülerinnen und Schüler zu der begründeten Entscheidung gelangen, dass die DNA-Extraktion mit dem Kit die zu favorisierende Methode darstellt. Sie liefert zwar weniger DNA, diese ist jedoch reiner. Die Reinheit kann in diesem Kontext stärker gewertet werden, da anschließend eine PCR folgt. Auch die höheren Kosten des Kits können durch die geringere Vorbereitungszeit und die Ergebnisse relativiert werden.

5 Umsetzung in der Schule

Eine Durchführung des oben vorgestellten Schnupperkurses ist auch in der Schule möglich. Zeitlich sollten dafür mindestens vier Stunden eingeplant werden. Dieses könnte im Rahmen eines Projektes bzw. während Projekttagen oder im Laufe einer AG geschehen. Auch sind verschiedene Abwandlungen denkbar. So könnte nur eine der DNA-Extraktionen durch die Schülerinnen und Schüler selber durchgeführt werden und der anschließende Vergleich könnte mit bereitgestellten Daten der anderen Extraktionsmethode stattfinden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, eine DNA Extraktion mithilfe der Schnellextraktionslösung InstaGene™-Matrix. Durch diese Matrix kann DNA in weniger als einer Stunde isoliert werden. Dazu sind nur wenige Arbeitsschritte notwendig (siehe Arbeitsmaterial C). Die InstaGene™-Matrix besitzt einen Chelexgehalt von 6 %. Chelex ist ein ionisches Harz, das PCR- Inhibitoren binden kann. Nach einer Entnahme von Mundschleimhautzellen, einer Inkubation und abschließender Zentrifugation können die festen Bestandteile wie denaturierte Proteine und die InstaGeneMatrix-Partikel gesammelt werden. Die DNA befindet sich im flüssigen Überstand und kann direkt weiterverwendet werden (bio-rad.com).

Der Nachweis durch den NanoDrop könnte durch eine Gelelektrophorese ersetzt werden. Hier bietet das von der Firma Lonza entwickelte FlashGel™-System eine schnelle Alternative zur Agarose-Gelelektrophorese mit selbst gegossenen Gelen, welches allerdings nach dem gleichen Prinzip funktioniert. Das System besteht aus einer Elektrophorese- und Durchleuchtungseinheit, auf die vorbereitete Gel-Kassetten gesteckt werden (siehe Abbildung 6). Dieses System erspart das Ansetzen eines Laufpuffers, das Kochen und Anfärben des Gels und zudem dauert der Gellauf maximal 10 Minuten. Allerdings lassen sich kaum Aussagen zur Menge oder Reinheit treffen. Falls ein Photometer und eine Nano-Quarzküvette zur Verfügung stehen, könnte die Reinheit in einem weiteren Schritt durch Extinktionsmessungen geprüft werden.



Abbildung 6: Elektrophorese- und Durchleuchtungseinheit des FlashGel™ Systems der Firma Lonza (Quelle: *teutolab-biotechnologie*)

Beide alternativen Methoden zeigten bei der Erprobung im Schülerlabor gute und sichere Ergebnisse und durch Kombination könnte die DNA-Extraktion im Rahmen einer Doppelstunde in der Schule umgesetzt werden.

Arbeitsmaterial

A) DNA-Extraktion aus der Mundschleimhaut („per Hand“)

Schritt	Tätigkeit
1. Zellen lösen	Ein/e SchülerIn pro Gruppe spült sich gründlich mit 0,9 % iger Kochsalzlösung ca. 15 sec lang den Mund aus (Dabei mit den Zähnen an der Mundhöhle entlanggehen)
2. Zellen sammeln	Mundinhalt in Greiner-Röhrchen spucken. Flüssigkeit in ein Eppi ¹ umschütten 5 min bei 13000 rpm ² zentrifugieren Den Überstand vorsichtig werfen
3. Zellmembran zerstören	Auf das Pellet 500 µl Lysepuffer pipettieren und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen vollständig resuspendieren 10 min bei 65 °C im Thermoblock inkubieren
4. Fällung der Proteine	100 µl Fällungspuffer hinzu pipettieren und durch 3-maliges Umschwenken mischen 5 min auf Eis inkubieren 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Proteine sammeln sich im Pellet)
5. Fällung der DNA	500 µl Überstand in ein neues Eppi geben 500 µl Isopropanol hinzu pipettieren und durch 3-maliges Umschwenken mischen Bei Raumtemperatur 5 min stehen lassen 5 min zentrifugieren bei 13000 rpm Überstand werfen (abkippen und das Eppi kopfüber auf ein Papiertuch stellen, um den letzten Tropfen auslaufen zu lassen)
6. Waschen der DNA	500 µl 70 % iger Ethanol ins Eppi pipettieren und durch 3-maliges Umschwenken mischen 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren Überstand vorsichtig werfen (abkippen und den letzten Tropfen auf Papiertuch auslaufen lassen) Pellet trocknen (bei Raumtemperatur ca. 5 min offen stehen lassen)
7. Hemmung der DNAasen	Je nach Größe des Pellets 30 - 50 µl TE-Puffer zugeben
8. Lösen der DNA	10 min in den Thermoblock (65 °C) geben

¹ Eppi: 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß

² rpm: rounds per minute

B) DNA-Extraktion aus der Mundschleimhaut (mit NucleoSpin® Tissue Kit)

Schritt	Tätigkeit
1. Zellen aufnehmen	Ein/e SchülerIn nimmt sich einen Tupfer und kratzt mehrmals an der Innenseite der Wange entlang
	Der Tupfer wird an der Luft getrocknet (ca. 10 min)
	Tupfer in ein Eppi geben
2. Zellen aus dem Tupfer lösen und Proteine unschädlich machen	25 µl Proteinase K und 500 µl PBS hinzugeben und durch Bewegen des Tupfers mischen
	10 min bei 56 °C inkubieren
	Tupfer entfernen
3. Zellen auflösen	500 µl B3 Puffer hinzu pipettieren und durch 3-maliges umschwenken oder durch 10 sek. Vortexen mischen
	10 min bei 70 °C inkubieren
	500 µl Ethanol hinzu pipettieren und durch 3-maliges umschwenken oder durch 10 sek. Vortexen mischen
4. Bindung vorbereiten	Säule in das Sammelröhrchen stellen
	600 µl der Probe auf die Säule pipettieren
	1 min bei 11000 rpm zentrifugieren
5. DNA bindet an der Membran	Durchfluss verwerfen
	Schritte (DNA bindet an die Membran) wiederholen bis die Probe aufgebraucht ist
	500 µl BW Puffer auf die Säule pipettieren
6. Waschen der DNA	1 min bei 11000 rpm zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
	600 µl B5 Puffer auf die Säule pipettieren
	1 min bei 11000 rpm zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
7. Letzte Pufferreste entfernen	Säule 1 min bei 11000 rpm zentrifugieren
	Säule in ein neues Eppi stellen
	100 µl BE Puffer auf die Säule pipettieren und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
8. Lösen der DNA	1 min bei 11000 rpm zentrifugieren. Säule verwerfen. Durchfluss im Eppi als DNA-Probe aufbewahren.

C) DNA-Extraktion aus der Mundschleimhaut (mit der InstaGene™-Matrix und anschließender Gelelektrophorese)

Schritt	Tätigkeit
1. Zellen entnehmen	Ein/e SchülerIn nimmt sich einen Tupfer und kratzt mehrmals an den Wangeninnentaschen entlang; Tupfer antrocknen lassen
2. Probe vorbereiten	750 µl InstaGene™ Matrix in ein Eppi pipettieren Wattestäbchen ins Eppi geben, Holzstiel abschneiden, den Deckel schließen
3. DNA gewinnen	Inkubieren für 15 min bei 56 °C Vortexen für 10 sek Inkubieren für 8 min bei 100 °C Vortexen für 10 sek Entfernen des Wattestäbchens mit der Pinzette Zentrifugieren mit 11000 rpm für 2 min
4. Probe für das Gel vorbereiten	2 µl Ladepuffer und 8 µl extrahierte DNA zusammen pipettieren
5. Gel befüllen	10 µl in die Taschen pipettieren
6. Gellauf	6 min bei 275 Volt UV-Licht anschalten und die Ergebnisse durch ein Foto dokumentieren

6 Literaturverzeichnis

- Bártulos, C. R., Tappe H., Rothhämel, S. (2012). Allgemeine Methoden. In M. Jansohn, S. Rothhämel (Hrsg.), *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (5. Auflage, S. 1 – 36). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Bártulos, C. R., Tappe H., Rothhämel, S. (2012). Isolierung von DNA. In M. Jansohn, S. Rothhämel (Hrsg.), *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (5. Auflage, S. 95 – 135). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Becker, K. (2017). *THEORETISCHE GRUNDLAGEN Biochemisches Praktikum 1 Grundpraktikum*. Verfügbar unter <https://docplayer.org/24711693-Theoretische-grundlagen-biochemisches-praktikum-1-grundpraktikum.html> (Stand: 11.01.2019)
- Brown, T. A. (2011). *Gentechnologie für Einsteiger* (6. Auflage). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Dechert, U. (2012). Gelelektrophoresen. In M. Jansohn, S. Rothhämel (Hrsg.), *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (5. Auflage, S. 37 – 94). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Hagemann, M. (1990). Auftrennung von DNA in Agarosegelen. In R. Hagemann (Hrsg.), *Gentechnologische Arbeitsmethoden. Ein Handbuch* (S.75-78). Stuttgart [u.a.]: Fischer.
- Hagemann, M. (1990). Präparation von Human-DNA. In R. Hagemann (Hrsg.), *Gentechnologische Arbeitsmethoden. Ein Handbuch* (S. 23-26). Stuttgart [u.a.]: Fischer.
- Kaufmann, S. H. E. (2014). *Basiswissen Immunologie*. Berlin [u.a.]: Springer.
- Lange, V., Schöfl, G., Füssel, M. Scheteling, J. & Schmidt, A. (2018). *The optimal do-nor profile in the era of next generation sequencing?* Verfügbar unter https://dkms-lab.de/dateien/EFIposter_2018_Donor_Profile.pdf (Stand: 11.01.2019)
- Macherey-Nagel (2014). *Genomic DNA from tissue. User manual*. Verfügbar unter [https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/NucleoSpin%20Tissue%20Genomic%20DNA%20Purification%20User%20Manual%20\(PT4010-1\)_Rev_13.pdf](https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/NucleoSpin%20Tissue%20Genomic%20DNA%20Purification%20User%20Manual%20(PT4010-1)_Rev_13.pdf) (Stand: 11.01.2019)
- Michl, M. (2013). *Basics Hämatologie* (3. Auflage). München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Ministerium für Schule und Weiterbildung des Landes Nordrhein-Westfalen (2008). *Kernlehrplan für das Gymnasium – Sekundarstufe I in Nordrhein-Westfalen Biologie*. Verfügbar unter <https://www.schulentwicklung.nrw.de/lehrplaene/lehrplannavigator-s-i/gymnasium-g8/> (Stand: 16.01.2019)
- Ministerium für Schule und Weiterbildung des Landes Nordrhein-Westfalen (2011a). *Kernlehrplan für die Hauptschule in Nordrhein-Westfalen Lernbereich Naturwissenschaften Biologie, Chemie, Physik*. Verfügbar unter <https://www.schulentwicklung.nrw.de/lehrplaene/lehrplannavigator-s-i/hauptschule/naturwissenschaften/index.html> (Stand: 16.01.2019)

Ministerium für Schule und Weiterbildung des Landes Nordrhein-Westfalen (2011b). *Kernlehrplan für die Realschule in Nordrhein-Westfalen Biologie*. Verfügbar unter <https://www.schulentwicklung.nrw.de/lehrplaene/lehrplannavigator-s-i/realschule/biologie/index.html> (Stand: 16.01.2019)

Ministerium für Schule und Weiterbildung des Landes Nordrhein-Westfalen (2013). *Kernlehrplan für die Gesamtschule – Sekundarstufe I in Nordrhein-Westfalen Naturwissenschaften Biologie, Chemie, Physik*. Verfügbar unter <https://www.schulentwicklung.nrw.de/lehrplaene/lehrplannavigator-s-i/gesamtschule/naturwissenschaften/index.html> (Stand: 16.01.2019)

Mülhardt, C. (2013). *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics* (7., aktualisierte Auflage). Berlin [u.a.]: Springer Spektrum.

Reineke, A. (2004). *Gentechnik*. Stuttgart: Ulmer.

Thermo SCIENTIFIC (2009). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. V1.0 User Manual*. Verfügbar unter https://mlz-garching.de/files/nanodrop_2000_user_manual.pdf (Stand: 11.01.2019)

<http://www.bio-rad.com/de-de/product/instagene-matrix?ID=6c2be54f-6c95-43de-8ce3-e9aee8229eeb> (Stand: 15.01.2019)

<https://www.dkms.de/de/%C3%BCber-die-dkms> (a) (Stand: 11.01.2019)

<https://www.dkms.de/de/grundlegende-informationen> (b) (Stand: 11.01.2019)

<https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/leukaemie/definition-und-haeufigkeit.html> (Stand: 11.01.2019)

<https://www.mn-net.com/ProductsBioanalysis/DNAandRNAPurification/DNA/DNAfromtissueandcells/NucleoSpinTissueXS/tabid/10645/language/en-US/Default.aspx> (Stand:14.01.2019)

<http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=7515> (Stand: 11.01.2019)

https://www.zkrd.de/de/informationen_fuer_knochenmarkspender/grundlagen-hla.php (Stand: 11.01.2019)