

**LaboraTri**  
Lehr-Lern-Labor



LERCHE ODER EULE: WELCHER SCHLAFTYP BIST DU?  
PERIOD CIRCADIAN PROTEIN HOMOLOG 3 (PER3)

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung



UNIVERSITÄT  
HOHENHEIM



PH Ludwigsburg  
University of Education

Die vollständigen Versuchsprotokolle werden auf Anfrage per E-Mail versandt!

## A. DNA-Extraktion

1. Den Mundraum etwa 30 s lang mit 10 ml 0,1%iger Kochsalzlösung spülen und die Lösung anschließend in ein Schnapsglas spucken (evtl. die Backen etwas „massieren“, um mehr Zellen der Mundschleimhaut zu erhalten).

2. 100 µl der Speichelösung in ein LS mit Eppendorf Tube pipettieren.

3. Die Eppendorf Tube bei 4 °Kü (10 000 rpm bei miniPCR™ Zentrifugen) für 2 min zentrifugieren.



Zentrifugen sollten immer austariert werden. Gewichte der Rotoren, die im Rotor gegenüberstehen, müssen identisch sein.

4. Den Überstand bis zu einem klaren Rest entfernen (etwa 100 µl abpipettieren). Dabei das Pellet (= weißer Niederschlag am Boden des Eppendorf Tubes) nicht entfernen!

5. Das verschlossene Eppendorf Tube vortexen und dabei das Pellet resuspendieren. Wenn kein Vortexer vorhanden ist, Eppendorf Tube alternativ mehrmals über das Rack ziehen.

6. Das bereits mit 100 µl InstaGene™ Matrix beschriebene Eppendorf Tube mit den eigenen Initialen beschriften.

7. 10 µl der resuspendierten Zellen in das InstaGene™ Matrix pipettieren.

8. Das verschlossene Eppendorf Tube vortexen oder mehrmals über das Rack ziehen.

9. Die Flüssigkeit im Tube mit der Hand nach unten schleudern.

10. Das PCR-Röhrchen für 10 min bei 94°C inkubieren. Hierfür das miniPCR™-Thermocycler als Thermoblock verwenden (siehe miniPCR™-User's guide).

11. Nach 4-6 min das Protokoll in der App pausieren/stoppen.

12. Das PCR-Röhrchen rausnehmen und vortexen oder mehrmals über das Rack ziehen.

13. Das PCR-Röhrchen erneut in dem miniPCR™-Thermocycler positionieren, Deckel schließen und das Protokoll in der App bis zum Ende fortführen.

14. Das PCR-Röhrchen aus der miniPCR™-Thermocycler entnehmen und erneut vortexen oder mehrmals über das Rack ziehen.

Die vollständigen Versuchsprotokolle werden auf Anfrage per E-Mail versandt!

15. Das PCR-Rohrchen für 5 min bei 95°C inkubieren.
16. Das PCR-Rohrchen vorsichtig oder mehrmals über das Rack ziehen.
17. Für 5 min bei 5.000 ug (10.000 rpm bei miniPCR™-Zentrifuge) zentrifugieren. Hierfür die PCR-Rohrchen-Einsätze in die Zentrifuge setzen.
18. Das PCR-Rohrchen vorsichtig aus der Zentrifuge entfernen und in das PCR-Rack stellen.



Das PCR-Rohrchen nicht schütteln, da zwei Phasen entstanden sein könnten. Die obere und untere Phase sollten nicht miteinander vermischt werden! Obere Phase als Template für die PCR nutzen.

19. Auf Eis in oder bei 4°C lagern.

## 8. Polymerase-Kettenreaktion miniPCR

### MINIPCR™ EINSTELLEN

→ siehe miniPCR™ user's guide für eine detaillierte Anleitung!

<https://www.minipcr.com/wp-content/uploads/2019/06/miniPCR-remote-thermal-cycler-users-Manual-1219.pdf>

1. Innerhalb der miniPCR™ App ein Protokoll erstellen. Folgende Werte eingeben:

Parameter	Value	Unit
Initial Denaturation	95	°C
Denaturation	95	°C
Annealing	50	°C
Extension	72	°C
Number of cycles	30	
Final extension	72	°C

Abbildung 1 PCR-Protokoll für das Larche oder Eute Experiment.

Die vollständigen Versuchsprotokolle werden auf Anfrage per E-Mail versandt!

2. Auf „Start“ drücken.

## VORBEREITUNG DER ANSÄTZE

1. Das PCR-Röhrchen mit den eigenen Initialen beschriften.  
Der „Primer-Mix“ ist vorbereitet und enthält das Primer-Paar in Wasser gelöst.  
2. 12,5 µl Primer-Mix pro beschriftetem PCR-Röhrchen pipettieren.  
3. 2 µl Vorhanden-DNA (aus der oberen, klaren Phase) in das mit dem Primer-Mix besetzte PCR-Röhrchen hinzu pipettieren. (Bei Negativkontrolle werden dagegen 2 µl H<sub>2</sub>O statt DNA hinzugefügt). PCR-Röhrchen anschließend auf Eis stellen.  
4. 12,5 µl RTTP (Fast-Mix) pro PCR-Röhrchen dazu pipettieren.

### ENTZÜNDUNG DES TEGS

Der RTTP Fast-Mix muss als letztes hinzu pipettiert werden.  
Auch bei moderaten Temperaturen ist die Tag-DNA-Polymerase aktiv,  
daher nicht zügig pipettieren und PCR-Röhrchen zureichend auf Eis  
stellen, bis diese in die miniPCR™ gegeben werden.

## STARTEN DER PCR

1. Die fertig pipettierten Ansätze zügig in die miniPCR™-Thermocycler platzieren.
2. In der miniPCR™-App auf „Library“ gehen und das gewünschte Protokoll auswählen. Anschließend auf „Start“ drücken und die PCR wird gestartet.
3. Während der PCR auf „Monitor“ drücken, um die Reaktion zu beobachten (angezeigt wird Temperatur gegen Zeit - Plot, Protokoll Parameter, Anzahl Zyklen).

## C. Herstellung eines Zzigen Agarose-Gels

### VORBEREITUNG DER GELKAMMER

1. Den Gel-Kamm von der Unterseite der weißen Gelfachschale entnehmen.
2. Den transparenten Gelschichten in die weiße Gelfachschale positionieren (Abb. 2A.5).

Die vollständigen Versuchsprotokolle werden auf Anfrage per E-Mail versandt!

3. Den Kamm am oberen Ende der Gießschale positionieren (nicht in der Mitte). Dabei soll die Kammspitze mit den breiteren Zähnen nach unten schauen, so dass breite Taschen entstehen (Abb. 2A.2).

## HERSTELLUNG DER AGAROSE-LÖSUNG

1. 10 ml TAE-Puffer (befindet sich im 50 ml Falcon-Tube) per Augenmaß in einen Erlenmeyerkolben überführen (es verbleiben 30 ml im Falcon-Tube).
2. 0,4 g Agarosepulver (im Eppendorf Tube bereits passend portioniert) in den Erlenmeyerkolben mit dem TAE-Puffer geben.
3. Das Agarosepulver im Erlenmeyerkolben unter der Verwendung von Hitze auflösen. Hierzu ein Heizrührer oder eine Mikrowelle verwenden.

### WEITERE OPTIONEN

#### Option 1: Heizrührer

Dem Erlenmeyerkolben einen Heizrührer hinzufügen.

Erlenmeyerkolben auf den Heizrührer positionieren und diesen einschalten.

Rotationsgeschwindigkeit so einstellen, dass das Gemisch ordentlich verrührt wird.

Gemisch auf ca. 90°C erhitzen, bis sich Agarosepulver aufgelöst hat und die Lösung klar wird.

#### Option 2: Mikrowelle

Die Öffnung des Erlenmeyerkolbens mit einem Papiertuch verschließen (um das Verdampfen des Gemisches zu verhindern).

Erlenmeyerkolben in die Mikrowelle positionieren und Mikrowelle einschalten.

Mikrowelle stoppen, sobald das Gemisch anfängt zu kochen.

Erlenmeyerkolben mit einem hitzebeständigen Handschuh herausholen und leicht schwenken. Diese Schritte wiederholen, bis sich Agarosepulver aufgelöst hat und die Lösung klar wird.

Die vollständigen Versuchsprotokolle werden auf Anfrage per E-Mail versandt!



Gemisch und Erntemeyererkulben werden heiß. Die Lösung kann überkochen. Mit einem hitzebeständigen Handschuh den Erntemeyererkulben vom Heizrührer/von der Mikrowelle entfernen, wenn die Lösung zu kochen beginnt.

### WEITEN DES GELLS

1. Erntemeyererkulben mit einem hitzebeständigen Handschuh vom Heizrührer oder aus der Mikrowelle entnehmen.
2. Die Lösung abkühlen lassen, bis diese nicht mehr kochend heiß ist.
3. 1 µl puc2013-PCR-Lösung zur Agarose-Lösung geben und vorsichtig verrühren.
4. Agarose-Lösung vorsichtig und langsam in die vorbereitete Gellösung mit Gelschale und Kamm einfüllen (Abb. 2A.3).

## D. Gelelektrophorese BlueGel™

1. PCR-Röhrchen nach der beendeten PCR in Eis stellen.
2. Das 20 µg Agarosegel innerhalb der BlueGel™-Gellösungskammer platzieren (Abb. 2B.4).
3. BlueGel™-Gellösungskammer mit 20 ml TAE-Puffer füllen (Abb. 2B.5).
4. Sicherstellen, dass das Gel vollständig in Laufpuffer eingetaucht ist.



Das Gel kann schrumpfen, wenn es nicht ausreichend TAE-Puffer bedeckt ist. Um sicherzustellen, dass genügend TAE-Puffer in der Elektrophoresenkammer vorhanden ist, sollte man zwischen der Elektrophorese passieren und diese überprüfen.

5. 10 µl DNA-Dimensionmarker (z.B. λ-PstI) in die 1 Geltasche pipettieren (Abb. 2B.6).
6. 10 µl PCR-Produkt der jeweiligen Probe in eine Geltasche pipettieren (Abb. 2B.6).
7. Den orangefarbenen Deckel auf die Elektrophoresenkammer setzen (Abb. 2B.7) und auf den Power-Knopf drücken (Abb. 2B.8), um die Elektrophorese zu starten (Kontrollleuchte leuchtet grün auf).
8. Das Gel für etwa 30 min laufen lassen.

Die vollständigen Versuchsprotokolle werden auf Anfrage per E-Mail versandt!

1. Die Elektrophoresekammer ausschalten (Power-Knopf drücken) und die Dunkelkammer auf die Elektrophoresekammer setzen.
2. Um das Blaulicht anzuschalten, auf das Startknoten-Symbol drücken.
3. Smartphone auf die Dunkelkammer positionieren, um ein Gebild aufzunehmen.

**Tipp**

Während der Elektrophorese kann Kondenswasser an unregelmäßigen Stellen entstehen. Um die Sichtbarkeit zu verbessern und ein schärferes und schöneres Bild zu erhalten, das Kondenswasser auf der Innenseite des vorderen Deckels vorsichtig mit dem Linsenreinigungstuch abwischen. Außerdem ergibt sich durch eine Kontrasterhöhung am Smartphone ein besseres Foto.

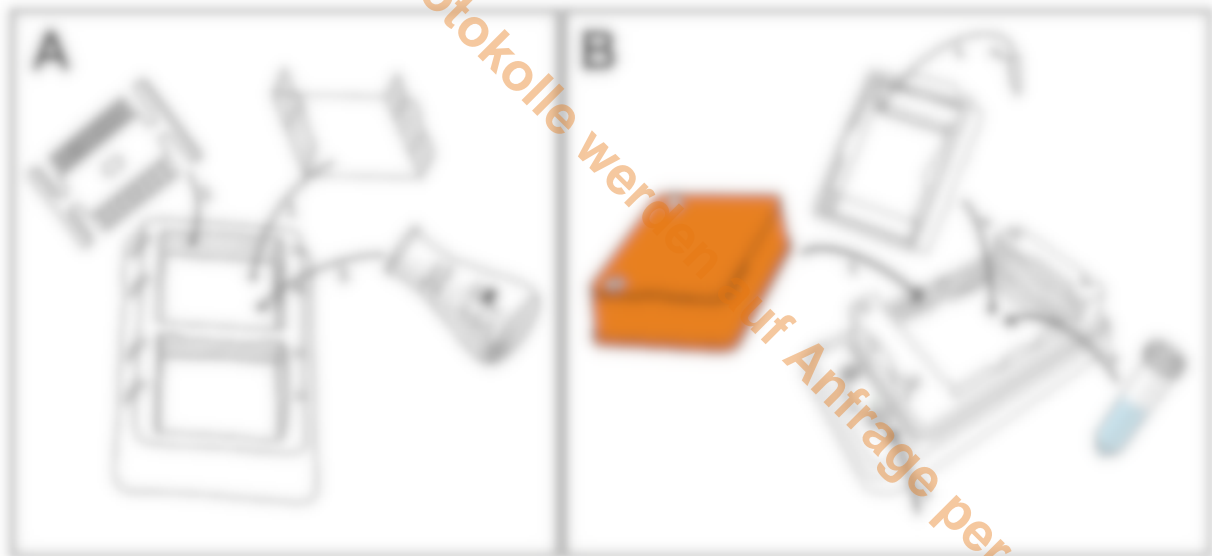


Abbildung 2: Schematisch dargestellte Durchführung einer Selektrophorese unter Verwendung der Mueller™ - Apparatur.

(A) Herstellung eines Apparatssets. (B) Laden der Proben und Start der Elektrophorese.

Die vollständigen Versuchsprotokolle werden auf Anfrage per E-Mail versandt!

## E. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Copyright
<a href="#">Abbildung 1: PCR-Protokoll für das Lerche oder Eule Experiment.</a>	Screenshot miniPCR App
<a href="#">Abbildung 2: Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese unter Verwendung der blueGel™ - Apparatur.</a>	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim verändert nach „blueGel™ Electrophoresis System User’s guide“

Protokoll: Valentina Trivigno und Philipp Vick

Editierung: Maximilian Haberbosch und Steffen Schaal

Der vorliegende Inhalt unterliegt **CC-BY-NC-SA 4.0 DE**.

Sie dürfen das Material vervielfältigen, weiterverarbeiten und teilen. Sie müssen allerdings angemessene Urheber- und Rechteangaben machen, einen Link zur Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Eine Nutzung für kommerzielle Zwecke ist untersagt. Einer Weitergabe wird lediglich unter gleichbleibenden Bedingungen zugestimmt.



Die vollständigen Versuchsprotokolle werden auf Anfrage per E-Mail versandt!