

**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 0,1Miger 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 (12 000 rpm bei miniPCR™ Zentrifugen) für 2 min zentrifugieren.
-  **Zentrifugen sollten immer austariert werden. Gewichte der Rotorbecheln im Rotor gegenüberstehen, müssen identisch sein.**
4. Den Überstand bis zu einem klaren Rest entfernen (etwa 900 µl abpipettieren). Dabei das Pellet (= weißer Niederschlag am Boden des Eppendorf Tubes) nicht entfernen!
  5. Das verschlossene Eppendorf Tube vertreiben und dabei das Pellet resuspendieren. Wenn kein Vertreiber vorhanden ist, Eppendorf Tube alternativ mehrmals über das Rack ziehen.
  6. Das bereits mit 100 µl InstaGene™ Matrix beladene Eppendorf Tube mit den eigenen Initialen beschriften.
  7. 10 µl der resuspendierten Zellen in das InstaGene™ Matrix Tube pipettieren.
  8. Das verschlossene Eppendorf Tube vertreiben oder mehrmals über das Rack ziehen.
  9. Die Flüssigkeit im Tube mit der Hand nach unten schleudern.
  10. Das PCR-Röhrchen für 12 min bei 94°C inkubieren. Hierbei 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 vertreiben 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 vertreiben oder mehrmals über das Rack ziehen.

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

15. Das PCR-Röhrchen für 5 min bei 95°C inkubieren.
  16. Das PCR-Röhrchen vorsichtig oder mehrmals über das Rack ziehen.
  17. Für 5 min bei 5000 ug (10000 rpm bei miniPCR™-Zentrifugen) zentrifugieren. Hierfür die PCR-Röhrchen-Einsätze in die Zentrifuge setzen.
  18. Das PCR-Röhrchen vorsichtig aus der Zentrifuge entfernen und in das PCR-Rack stellen.
- !** Das PCR-Röhrchen nicht schütteln, da zwei Phasen entstanden sein könnten. Die obere und untere Phase sollten nicht miteinander vermischt werden! Die obere Phase als Template für die PCR nutzen.
19. Auf Eis oder bei 4°C lagern.

### ENTZEHUNGSMODUS

InstalGene™ Matrix ist eine auf Chelax basierende Matrix, die für die PCR-fertige DNA-Aufreinigung verwendet wird. Die InstalGene™ Matrix dient dazu die DNA für die PCR aufzubereiten und vor dem Abbau zu schützen. Hierfür werden zweiwertige Kationen, wie beispielsweise  $Mg^{2+}$ , chelatiert. Diese dienen als Co-Faktoren beim DNA-Schnitt. Durch das Binden der  $Mg^{2+}$ -Ionen an die IG-Matrix wird die Aktivität des Enzyms gestoppt und die DNA vor dem Abbau geschützt.

-  Identifizierung der Zellen durch Zentrifugieren
-  Anreicherung der Chelatliganden in der IG-Matrix
-  Zerschneidung der Zellmembran und Freisetzung der Erbgüter
-  Zerschneidung der beiden Restriktionsenzyme und PCR-Verfahren gebunden an die IG-Matrix von der DNA überwand

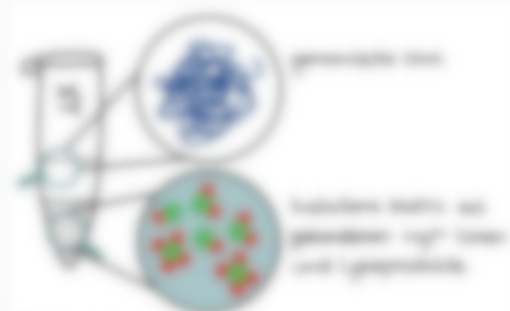
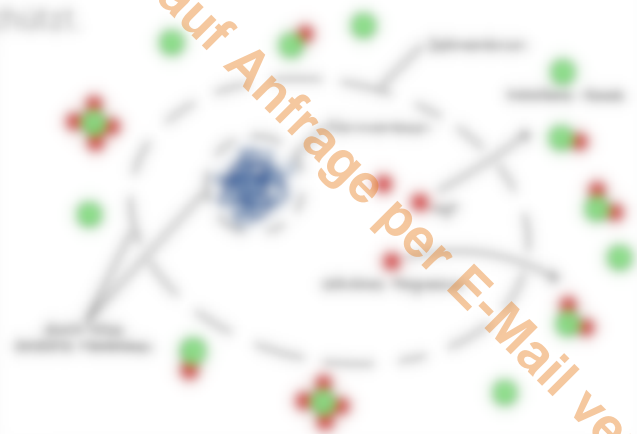


Abbildung 1 Funktionsweise der InstalGene™ Matrix.

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

## 8. Polymerase-Kettenreaktion miniPCR

### MINIPCR™ EINSTELLEN

• A useful miniPCR™ User's guide for some general information!

<https://www.minipcr.com/help-content/uploads/miniPCR-quick-start-manual-cycler-12018-Manual-12018.pdf>

1. Installieren Sie die miniPCR™ App am Produkt angeschlossen. Folgende Werte eingeben:



Abbildung 2: PCR-Protokoll für das Lerne oder Eule Experiment

2. Auf „Save“ drücken.

### VORBEREITUNG DER ANSÄTZE

1. PCR-Rohrchen beschriften.
2. Primer-Mix in einem PCR-Rohrchen vorbereiten.

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

Tabella 1: Pipettierschema für den Primer-Mix. Volumenangaben für eine Probe und insgesamt für einen Mastermix für fünf Proben.

	Volumen für eine Probe	Volumen für fünf Proben
Primer-Mix <sub>for</sub>	1 µl	5 µl
Primer-Mix <sub>rev</sub>	1 µl	5 µl
H <sub>2</sub> O	8,5 µl	42,5 µl
<b>Gesamt</b>	<b>+ 10,5 µl</b>	<b>+ 52,5</b>

3. 1 µl Primer-Mix pro beschriftetem PCR-Röhrchen pipettieren.
4. 1 µl Template-DNA (aus der oberen, klaren Phase) in das mit dem Primer-Mix befüllte PCR-Röhrchen hinzu pipettieren (der Negativkontrolle werden dagegen 2 µl H<sub>2</sub>O statt Template-DNA zugefügt). PCR-Röhrchen anschließend auf Eis stellen.
5. 10,5 µl RTTIP-PCR-Primer-Mix pro PCR-Röhrchen dazu pipettieren.

#### HERZUGUNG DER REAKTION

Der RTTIP-PCR-Tag-Red-Mix als letztes hinzu pipettiert werden. Auch bei moderaten Temperaturen ist die Tag-DNA-Polymerase aktiv, daher recht zügig pipettieren und Röhrchen zwischendurch auf Eis stellen, bis diese in die miniPCR™ gehen 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 „Run“ 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 ...).

## C. Herstellung eines 2%igen Agarose-Gels

#### VORBEREITUNG DER GELKAMMER

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

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

- 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. 3A.2).

## HERSTELLUNG DER AGAROSE-LÖSUNG

1. 20 ml TAE-Puffer (befindet sich im 50 ml Falcon-Tube) per Augenschätz 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 Rührer 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 Papierfuch 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 herausziehen 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 Erlennmeyerkolben werden heiß. Die Lösung kann überkochen. Mit einem hitzebeständigen Handschuh den Erlennmeyerkolben vom Heizrührer/ von der Mikrowelle entfernen, wenn die Lösung zu kochen beginnt.

### SCHRITT 2: GIEßEN DES GELLS

1. Erlennmeyerkolben mit einem hitzebeständigen Handschuh vom Heizrührer oder aus der Mikrowelle entnehmen.
2. Die Lösung abkühlen lassen, bis diese nicht mehr kochend heiß ist.
3. Teil *pcqDNA*-Lösung zur Agarose-Lösung geben und vorsichtig verrühren.
4. Agarose-Lösung vorsichtig und langsam in die vorbereitete Gießapparatur mit Gießschale und Kamm einfüllen (Abb. 3A.2).

### ENTWICKLUNG DER DNA

Um die elektrophoretisch aufgetrennte DNA sichtbar zu machen, muss diese mit einem Farbstoff gefärbt werden. Zu den ersten und bekanntesten DNA-Farbstoffen zählt der Farbstoff Ethidiumbromid, welcher in Nukleinsäuren interkalariert. Ein geringes Fluoreszenzsignal kann bei Anregung mit UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) herbeigeführt werden. Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid-Molekülen zwischen den Basen der DNA, verändert sich das Anregungsspektrum, wodurch bei Anregung mit UV-Licht die Fluoreszenz stark erhöht wird. Ethidiumbromid ist jedoch als toxisch und mutagen eingestuft worden, weshalb Fluoreszenzfarbstoffe von geringerer Toxizität entwickelt wurden sind, wie beispielsweise SYBR Green oder *pcqGREEN*.

## D. Gelelektrophorese blueGel™

1. PCR-Rohrchen nach der beendeten PCR auf Eis stellen.
2. Das 25µg Agarosegel innerhalb der blueGel™-Gelkammer platzieren (Abb. 3B.4).

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

3. blueGel™-Geltankammer mit 20 ml TAE-Puffer befüllen (Abb. 38.5).



Das Gel kann schmelzen, wenn es nicht ausreichend mit TAE-Puffer bedeckt ist. Um sicherzustellen, dass genügend TAE-Puffer in der Elektrophoresekammer vorhanden ist, sollte man zwischendurch die Elektrophorese pausieren und diese überprüfen.

4. 1 µl DNA-Diagnostikmarker (z.B. λ-PstI) in die 1. Geltauche pipettieren (Abb. 38.6).
5. 10 µl PCR-Produkt der jeweiligen Probe in eine Geltauche pipettieren (Abb. 38.6).
6. Den orangenen Deckel auf die Elektrophoresekammer setzen (Abb. 38.7) und auf den Power-Knopf drücken (Abb. 38.8), um die Elektrophorese zu starten (Kontrollleuchte leuchtet grün auf).
7. Das Gel für etwa 10 min laufen lassen.
8. Die Elektrophoresebox ausschalten (Power-Knopf drücken) und die Dunkelkammer auf die Elektrophoresekammer setzen.
9. Um das Blaulicht anzuschalten, das Stützkorn-Symbol drücken.
10. Smartphone auf die Dunkelkammer positionieren, um ein Gelbild aufzunehmen.

### TIP

Während der Elektrophorese kann Kondenswasser am orangenen Deckel entstehen. Um die Sichtbarkeit zu verbessern und ein schöneres und saubereres Bild zu erhalten, das Kondenswasser an der Innenseite des orangenen Deckels vorsichtig mit dem Linsenreinigungs Tuch abwischen. Außerdem ergibt sich durch eine Kontrastverstärkung am Smartphone ein besseres Foto.

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





Abbildung 3 Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese unter Verwendung der BlueGel™-Apparatur.  
(A) Herstellung eines Laufsystems. (B) Laden der Proben und Start der Elektrophorese.

## E. Ergebnisse

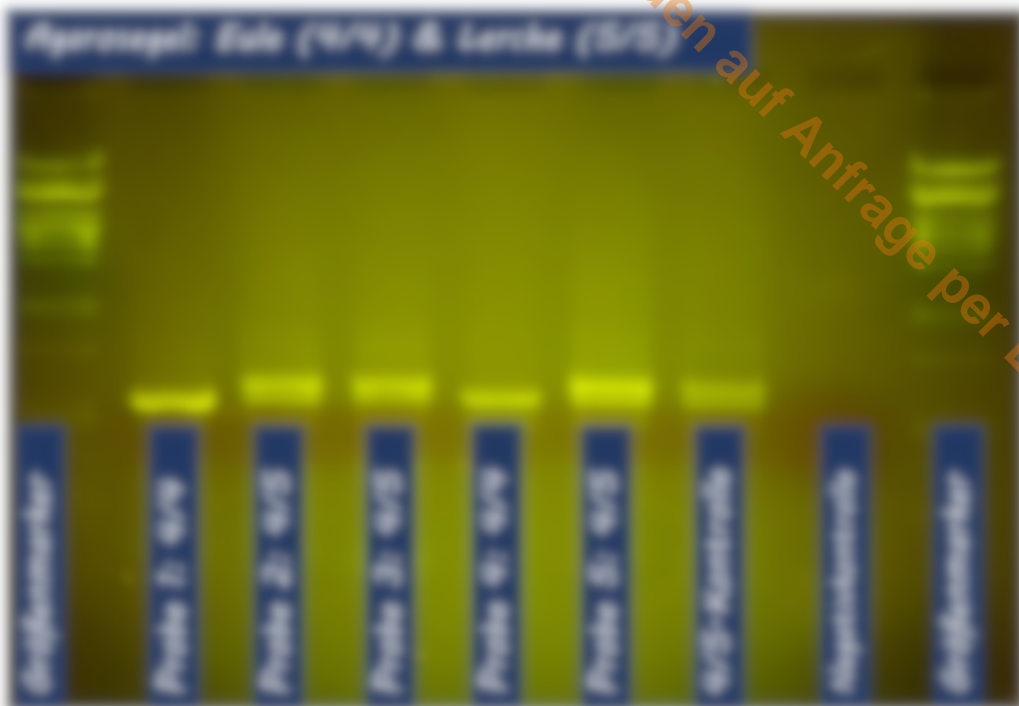


Abbildung 4 Ergebnisse des Larche/Eule-Experiments mittels BlueGel™.

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

## F. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Copyright
<a href="#">Abbildung 1: Funktionsweise der InstaGene™ Matrix.</a>	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim
<a href="#">Abbildung 2: PCR-Protokoll für das Lerche oder Eule Experiment.</a>	Screenshot miniPCR App
<a href="#">Abbildung 3: Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese unter Verwendung der blueGel™ - Apparatur.</a>	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim verändert nach „blueGel™ Electrophoresis System User's guide“
<a href="#">Abbildung 4: Ergebnisse des Lerche/Eule-Experiments mittels blueGel™.</a>	Maren Meissner, Pädagogische Hochschule Ludwigsburg

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!