

LaboraTri
Lehr-Lern-Labor



WELL DONE – MOLEKULARGENETISCHE
TIERARTENDIFFERENZIERUNG

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



UNIVERSITÄT
HOHENHEIM



PH Ludwigsburg
University of Education

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

1. DNA-Lösung

1. Zwei Reagenzglasröhrchen (RGR) mit je 20 µl 10% Natriumacetat-Lösung in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
2. Reagenzglasröhrchen mit Reagenzglasröhrchen verbinden.
3. 20 µl 10% Natriumacetat-Lösung in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) mit je 20 µl 10% Natriumacetat-Lösung in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen und sorgfältig verbinden und zentrifugieren (10000 U/min, 5 min).
4. 20 µl 10% Natriumacetat-Lösung in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
5. 20 µl 10% Natriumacetat-Lösung in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.



Die DNA-Lösung wird durch Zugabe von Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) gefällt.

6. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
7. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
8. 20 µl 10% Natriumacetat-Lösung in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen und sorgfältig verbinden.
9. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
10. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
11. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
12. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
13. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
14. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
15. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
16. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
17. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
18. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.



Die DNA-Lösung wird durch Zugabe von Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) gefällt. Die DNA wird durch Zugabe von Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) gefällt.

19. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.
20. 20 µl Ethanol in den 10 ml Reagenzglasröhrchen (RGR) füllen.

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

8. Polymerase-Kettenreaktion miniPCR

MINIPCR® EINSTELLEN

• Siehe miniPCR® User's guide für eine genaue Anleitung!

• <https://www.minipcr.com/help-content/uploads/miniPCR-manual-2019.pdf>
[MiniPCR Manual 2019.pdf](#)

1. Im Menü der miniPCR® App ein Protokoll erstellen. Folgende Werte eingeben:

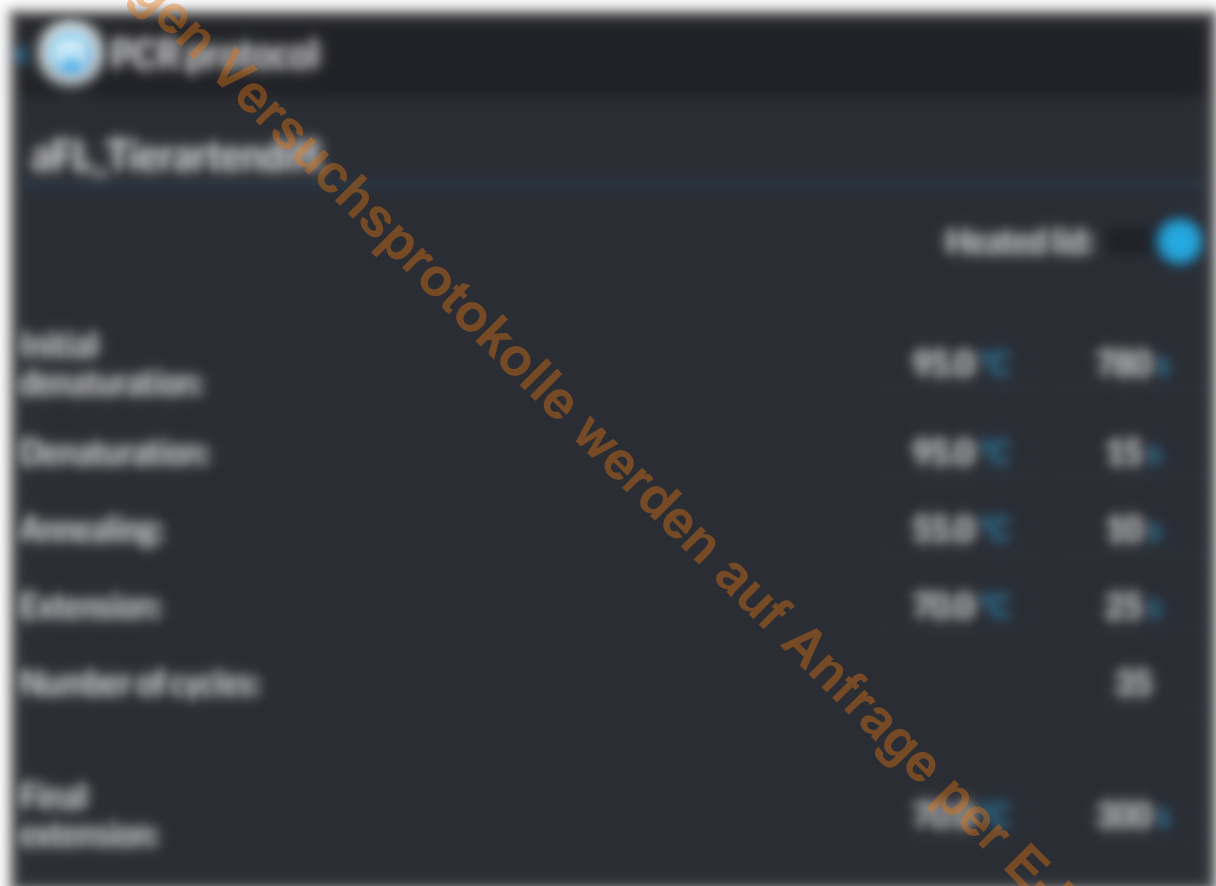


Abbildung 1 PCR-Protokoll für die molekulargenetische Tierartendifferenzierung

2. Auf „Save“ drücken.

VORBEREITUNG DER ANSÄTZE

1. Das PCR-Röhrchen mit den eigenen Initialen/ihrem Probenamen beschriften.
2. Der „Primer Mix“ ist vorbereitet und enthält alle Primer-Paare in Wasser gelöst.
3. Je 10 µl Primer Mix pro beschriftetem PCR-Röhrchen pipettieren.

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

4. 2 µl Pflanz-DNA (aus der oberen, klaren Phase entnehmen) in das mit dem Primer-Mix gefüllte PCR-Röhrchen hinzu pipettieren. Über Negativkontrolle werden dagegen 2 µl H₂O statt DNA hinzu pipettiert. PCR-Röhrchen anschließend auf Eis stellen.
5. 12,5 µl KODiF Hot Taq[®] Red-Mix pro PCR-Röhrchen hinzu pipettieren.

HINTERGRUNDINFORMATION

Das KODiF Hot Taq[®] Red-Mix muss als letztes hinzu pipettiert werden. Auch bei moderaten Temperaturen ist die Taq-DNA-Polymerase aktiv, daher rechtzeitig pipettieren und PCR-Röhrchen zersichernd durch auf Eis stellen, bis diese in die miniPCR[™] platziert werden.

STARTEN DER PCR

1. Die fertig pipettierten Ansätze in die miniPCR[™] platzieren.
2. In der miniPCR[™]-App auf „Libri“ 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, sowie Plot Parameter Animation).

C. Herstellung eines 2%igen Agarose-Gels

VORBEREITUNG DER GELKAMMER

1. Den Gel-Kamm von der Unterseite der weißen Gelfachale entnehmen.
2. Den transparenten Gelschichten in die weiße Gelfachale positionieren (Abb. 2A.1).
3. Den Kamm am oberen Ende der Gelfachale positionieren (nicht in der Mitte). Dabei soll die Kammspitze mit den breiteren Zähnen nach unten schauen, so dass breite Taschen entstehen (Abb. 2A.2).

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

HERSTELLUNG DER AGAROSE-LÖSUNG

1. 20 ml TAE-Puffer (befindet sich im 50 ml Falcon-Tube) per Augenmaß in einen Erlenmeyerkolben überführen (es verbleiben 20 ml im Falcon-Tube).
1. 0,4 g Agarosepulver (im Eppendorf Tube bereits passend portioniert) in den Erlenmeyerkolben mit dem TAE-Puffer geben.
2. In Agarosepulver im Erlenmeyerkolben unter der Verwendung von Hitze auflösen. Hierfür einen Heizrührer oder eine Mikrowelle verwenden.

ALTERNATIVEN

Option 1. Heizrührer

Dem Erlenmeyerkolben einen Rührfisch beauflegen.

Erlenmeyerkolben mit dem Heizrührer positionieren und diesen einschalten.

Rotationsgeschwindigkeit einstellen, dass das Gemisch ordentlich verrührt wird.

Gemisch auf ca. 100°C erhitzen, bis sich das Agarosepulver aufgelöst hat und die Lösung klar wird.

Option 2. Mikrowelle

Die Öffnung des Erlenmeyerkolbens mit einem Gummistopfen versehen (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 herausnehmen und leicht schwenken. Diese Schritte wiederholen, bis sich das Agarosepulver aufgelöst hat und die Lösung klar wird.



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

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

GIBEN DES GELS

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.
1 ul **postPCR™**-Lösung zur Agarose-Lösung geben und vorsichtig durch Umrühren des Erlennmeyerkolbens verrühren.
4. Agarose-Lösung vorsichtig und langsam in die vorbereitete Gelkammer mit Geldeckel und Kamm geben (Abb. 2A.2).

B. Gelelektrophorese blueGel

1. PCR-Rohrchen nach der vollständigen PCR auf Eis stellen.
2. Das 20µl Agarosegel in der blueGel™-Gelkammer platzieren (Abb. 2B.4).
3. blueGel™-Gelkammer mit 20 ml TBE-Puffer befüllen (Abb. 2B.5).
4. Sicherstellen, dass das Gel vollständig in Laufpuffer eingetaucht ist.



Das Gel kann schmelzen, wenn es nur unzureichend mit TBE-Puffer bedeckt ist. Um sicherzustellen, dass genügend TBE-Puffer in der Elektrophoresekammer vorhanden ist, sollten Sie zureichend durch die Elektrophorese passieren und diese überprüfen.

5. 10 µl DNA-Größenmarker (z.B. λ -Pha) in die erste Geltasche positionieren (Abb. 2B.6).
6. 10 µl PCR-Produkt der jeweiligen Probe in eine Geltasche positionieren (Abb. 2B.6).
7. Den orangefarbenen Deckel auf die Elektrophoresekammer 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.
9. Die Elektrophoresekammer ausschalten (Power-Knopf drücken) und die Dunkelkammer auf die Elektrophoresekammer setzen.
10. Um das Blaulicht anzuschalten, auf das Glühbirnen-Symbol drücken.
11. Smartphone auf die Dunkelkammer positionieren, um ein Gelbild aufzunehmen.

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

Tipp

Während der Elektrophorese kann Kondenswasser am orangefarbenen Deckel entstehen. Um die Sichtbarkeit zu verbessern und ein schöneres und saubereres Bild zu erhalten, das Kondenswasser auf der Innenseite des orangefarbenen Deckels vorsichtig mit dem Linsenreinigungstuch abwischen. Außerdem ergibt sich durch eine Kontrasterhöhung am Display ein besseres Foto.

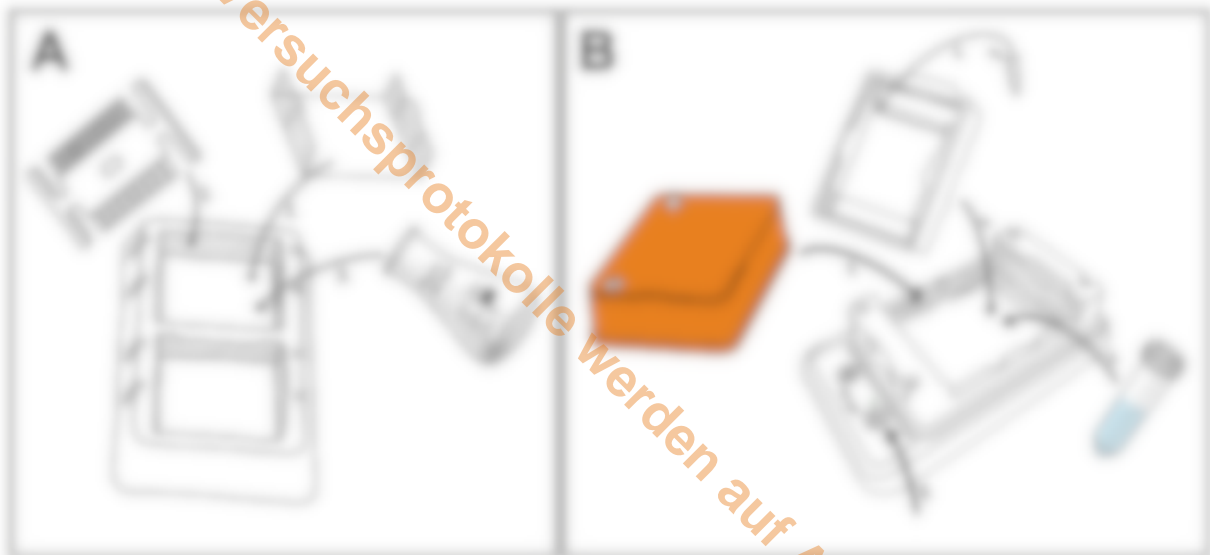


Abbildung 2: Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese unter Verwendung der blueGel™ - Apparatur.

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

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

E. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Copyright
Abbildung 1: PCR-Protokoll für die molekulargenetische Tierartendifferenzierung.	Screenshot miniPCR App
Abbildung 2: Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese unter Verwendung der blueGel™ - Apparatur.	Zeichnung Valentina Trivigno; verändert nach „blueGel™ Electrophoresis System User's guide“

Protokollerstellung: Valentina Trivigno und Philipp Vick

Protokolleditierung: 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!