

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!

A. DNA-Extraktion

1. 1cm³ Fleischprobe + 0,5 ml 0,5%ige Kochsalzlösung in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube geben.
2. Fleischprobe mit Plastikspatül mischern.
3. Probe in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 9 ml 0,5%iger Kochsalzlösung füllen, Zentrifugenröhrchen schließen und kräftig vorwischen oder mehrmals über das Rack ziehen.
4. 200 µl des Überstandes in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube pipettieren.
5. Bei 4.000 ug (2.000 rpm bei miniPCR™ Zentrifugen) für 2 min zentrifugieren.



Zentrifugenröhrchen immer austarieren werden. Gewichte der Röhrchen, die auf einem Rack gegenüberstehen müssen, identisch sein.

6. Überstand entfernen (ca. 200 µl abpipettieren).
7. Pellet resuspendieren.
8. 20 µl der resuspendierten Zelle in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube mit 200 µl InstaGene™-Matrix geben.
9. Vorwischen oder mehrmals über das Rack ziehen.
10. Bei 1200 rpm und 56 °C für 10 min in den Thermomixer.
11. Vorwischen oder mehrmals über das Rack ziehen.
12. Bei 1200 rpm und 70 °C für 5 min in den Thermomixer.
13. Vorwischen oder mehrmals über das Rack ziehen.
14. Bei 5.000 ug (2.000 rpm bei miniPCR™ Zentrifugen) für 5 min zentrifugieren.
15. Das PCR-Röhrchen vorsichtig aus der Zentrifuge entfernen und in PCR-Rack stellen.



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

16. Auf Eis stellen oder bei 4°C lagern.
17. Überstand als Template für die PCR nutzen.

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

HINTERGRUNDINFORMATION

InstaGene™ Matrix ist ein Chelator-basierender Harz, das für die PCR-fertige DNA-Aufreinigung verwendet wird. Die Insta-Gene-Matrix dient dazu die DNA für die PCR aufzureinigen und vor dem Abbau zu schützen. Hierfür werden zweiwertige Kationen, wie beispielsweise Mg^{2+} , immobilisiert. Diese dienen als Co-Faktoren von DNAasen. Durch das Binden von Mg^{2+} -Ionen an die IG-Matrix wird die Aktivität des Enzyms gesenkt und die DNA vor dem Abbau geschützt.

- 1. Immobilisierung des Enzyms durch Zugabe von Mg^{2+}
- 2. Anreicherung der DNA an der IG-Matrix
- 3. Anreicherung der Zellbestandteile und Immobilisierung der Enzyme
- 4. Trennung der festen Bestandteile und PCR-Komponenten (gelöst) an die IG-Matrix von der DNA überstand

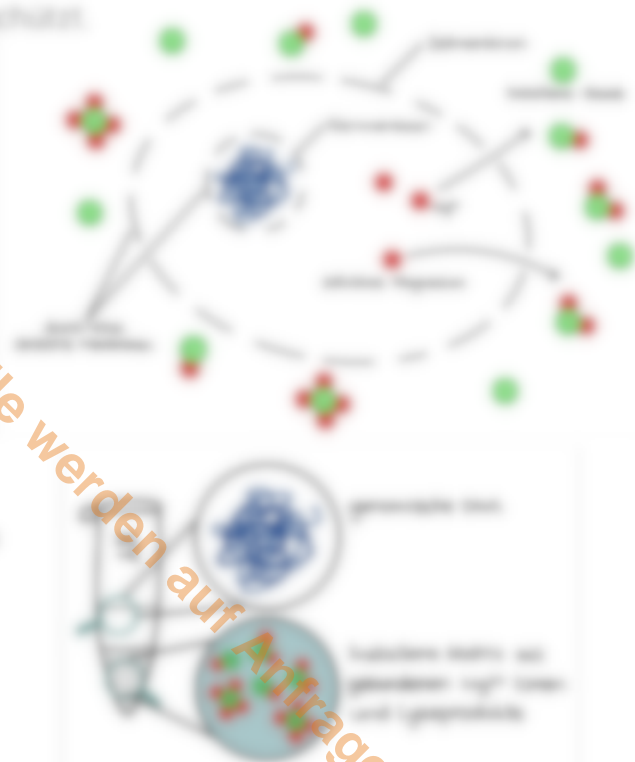


Abbildung 1 Funktionsweise der InstaGene™ Matrix.

8. Polymerase-Kettenreaktion miniPCR

MINIPCR™ EINSTELLEN

→ siehe miniPCR™ User's guide für eine genaue Anleitung!

https://www.minipcr.com/help-content/uploads/miniPCR_minicr_thermal_cycler_User's_Manual_12119.pdf

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

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

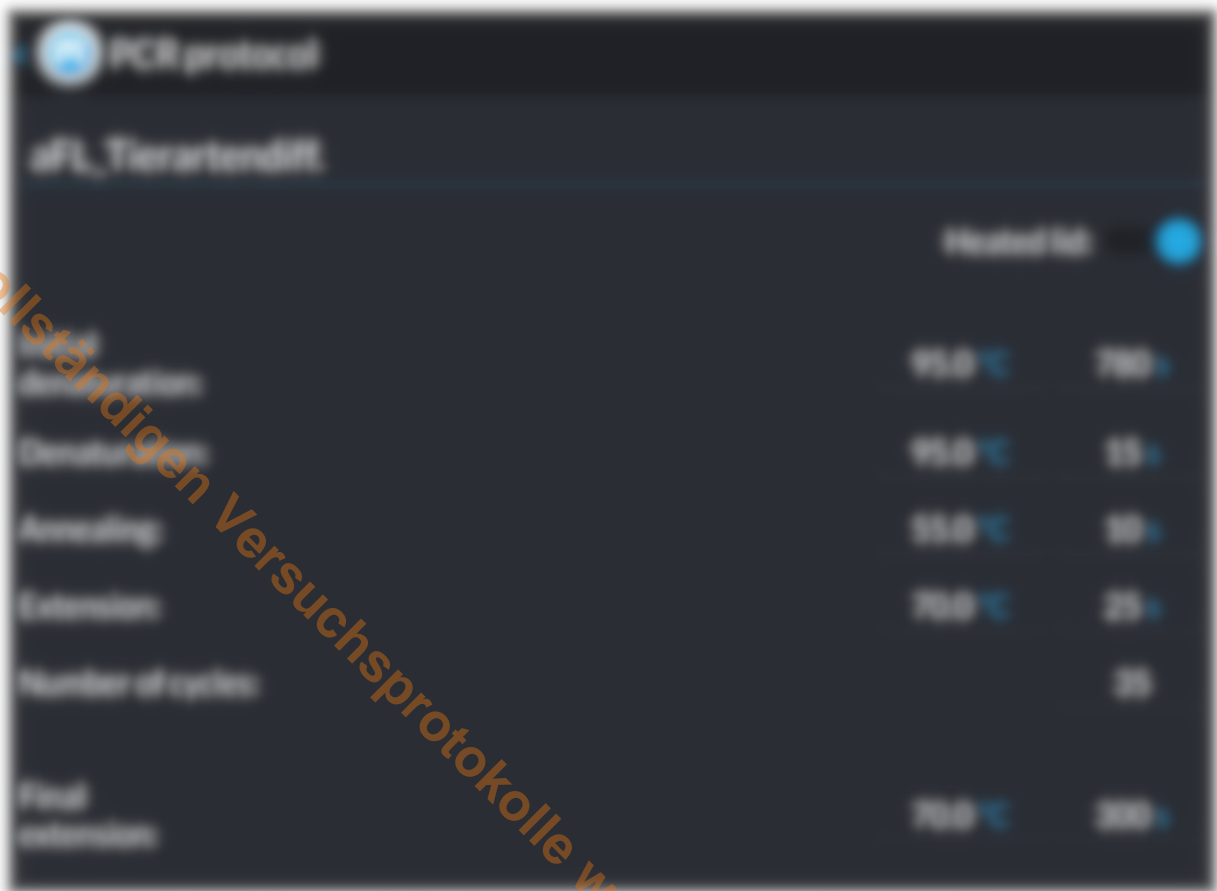


Abbildung 2 PCR-Protokoll für die molekulargenetische Tierartendifferenzierung.

2. Auf „Save“ drücken.

VORBEREITUNG DER ANSÄTZE

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

	Volumen für eine Probe	Volumen für fünf Proben
Schweini_Mix	10 µl	50 µl
Schweini_Cat	10 µl	50 µl
Mix_M1	10 µl	50 µl
Mix_M2	10 µl	50 µl
Mix_M3	10 µl	50 µl
Mix_M4	10 µl	50 µl
Mix_M5	10 µl	50 µl
Mix_M6	10 µl	50 µl
Mix_M7	10 µl	50 µl
Mix_M8	10 µl	50 µl
Mix_M9	10 µl	50 µl
Mix_M10	10 µl	50 µl
Gesamt	+ 100 µl	+ 500 µl

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

3. Je 10,5 µl Primer-Mix pro beschriftetem PCR-Röhrchen pipettieren.
4. 2 µl Farnsch-DNA (aus der oberen, klaren Phase entnehmen) in das mit dem Primer-Mix befüllte PCR-Röhrchen hinzu pipettieren (Bei Negativkontrolle werden dagegen 2 µl H₂O statt DNA hinzu pipettiert). PCR-Röhrchen anschließend auf Eis stellen.
5. Je 1 µl KODR Hot Tag[®] Red-Mix pro PCR-Röhrchen hinzu pipettieren.

BEI-FINDUNG

Der KODR Hot Tag[®] Red-Mix muss als letztes hinzu pipettiert werden. Auch bei niedrigen Temperaturen ist die Tag-DNA-Polymerase aktiv, daher nicht zugeben pipettieren und PCR-Röhrchen zusehendurch auf Eis stellen, bis diese in die „miniPCR“ platziert werden.

STARTEN DER PCR

1. Die fertig pipettierten Ansätze zugeb in die „miniPCR“ 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 Reaktionen zu beobachten (Langzeit wird Temperatur gegen Zeit - Plot, Protokoll, 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. 3A.1).
3. Den Kamm am oberen Ende der Gelfachale positionieren (nicht in der Mitte). Dabei soll die Kammsseite mit den breiteren Zähnen nach unten schauen, so dass breite Taschen entstehen (Abb. 3A.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).
2. 0,4 g Agarosepulver (im Eppendorf Tube bereits portioniert) in den Erlenmeyerkolben mit dem TAE-Puffer geben.
3. Agarosepulver im Erlenmeyerkolben unter der Verwendung von Hitze auflösen. Hierfür einen Heizrührer oder eine Mikrowelle verwenden.

WECHSELN

Option 1. Heizrührer

Dem Erlenmeyerkolben einen Rührfisch beauflegen.

Erlenmeyerkolben auf dem Heizrührer positionieren und diesen einschalten.

Rotationsgeschwindigkeit so einstellen, dass das Gemisch ordentlich verrührt wird.

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

Option 2. Mikrowelle

Die Öffnung des Erlenmeyerkolbens mit einem Füllstich 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 herausheben und leicht schwenken. Diese Schritte wiederholen, bis sich 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!

GIEßEN 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 ml **propDNA™**-Lösung zur Agarose-Lösung geben und vorsichtig durch Umrühren des Erlennmeyerkolbens verrühren.
4. Agarose-Lösung vorsichtig und langsam in die vorbereitete Gellapparat mit Gel- und Kamm geben (Abb. 3A.2).

ENTZUFERNEREN

Um die elektrisch durchgeladene DNA sichtbar zu machen, muss diese mit einem Farbstoff gefärbt werden. Zu den ersten und bekanntesten DNA-Farbstoffen zählt der rote Farbstoff Ethidiumbromid, welcher in Nukleinsäuren eingebettet. Ein oranges Fluoreszenzsignal kann bei Anregung mit UV-Licht (365 nm) hervorgerufen werden. Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid-Molekülen zwischen den Basen der DNA, verändert sich das Absorptionsspektrum, wodurch bei Anregung mit UV-Licht die Fluoreszenz sichtbar wird. Ethidiumbromid ist jedoch als toxisch und mutagen eingestuft worden, weshalb Fluoreszenzfarbstoffe von geringerer Toxizität entwickelt worden sind, wie beispielsweise SYBR Green oder **propDNA™**.

D. Gelelektrophorese blueGel

1. PCR-Rohrchen nach der beendeten PCR auf Eis stellen.
2. Das 2%ige Agarosegel innerhalb der blueGel™-Gelkammer platzieren (Abb. 3B.4).
3. blueGel™-Gelkammer mit 20 ml TAE-Puffer befüllen (Abb. 3B.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.

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

4. 10 µl DNA-Größenmarker (z.B. λ-PstI) in die erste Gelkammer pipettieren (Abb. 20.6).
5. 10 µl PCR-Produkt der jeweiligen Probe in eine Gelkammer pipettieren (Abb. 20.6).
6. Den orangenen Deckel auf die Elektrophoresekammer setzen (Abb. 20.7) und auf den Power-Knopf drücken (Abb. 20.8), um die Elektrophorese zu starten (Kontrollleuchte leuchtet grün auf).
Das Gel für etwa 20 min laufen lassen.
7. Elektrophoresekammer ausschalten (Power-Knopf drücken) und die Durckammer auf die Elektrophoresekammer setzen.
8. Um das Licht anzuschalten, auf das Lüftersymbol drücken.
9. Smartphone in die Durckammer positionieren, um ein Gelbild aufzunehmen.

TIP

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

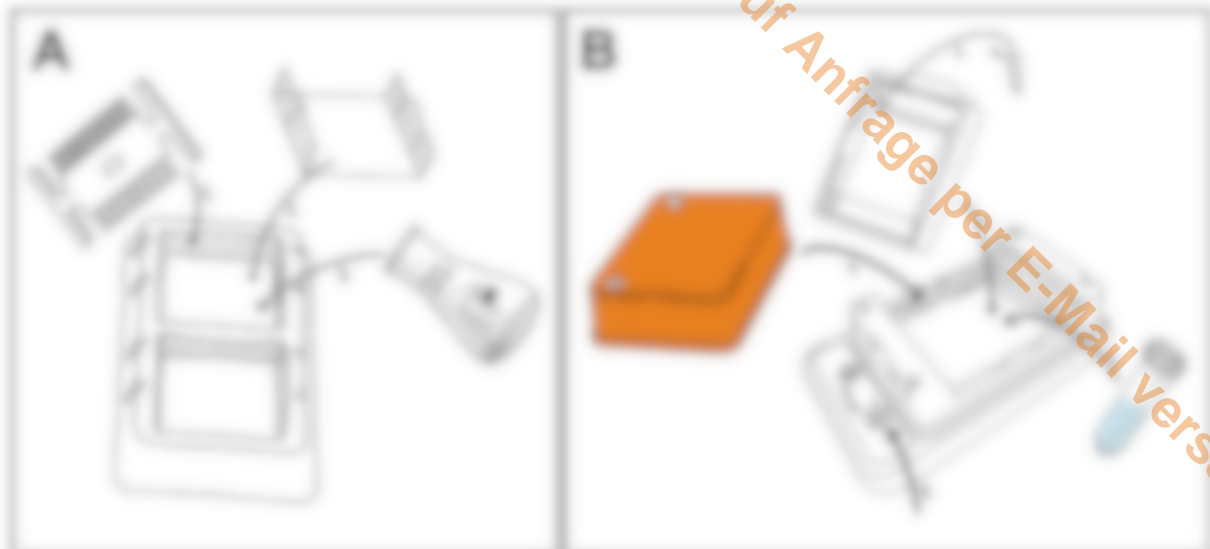


Abbildung 3: Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese unter Verwendung der blueGel™-Apparatur.
(A) Herstellung eines Agarosegels. (B) Laden der Proben und Start der Elektrophorese.

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

E. Ergebnisse

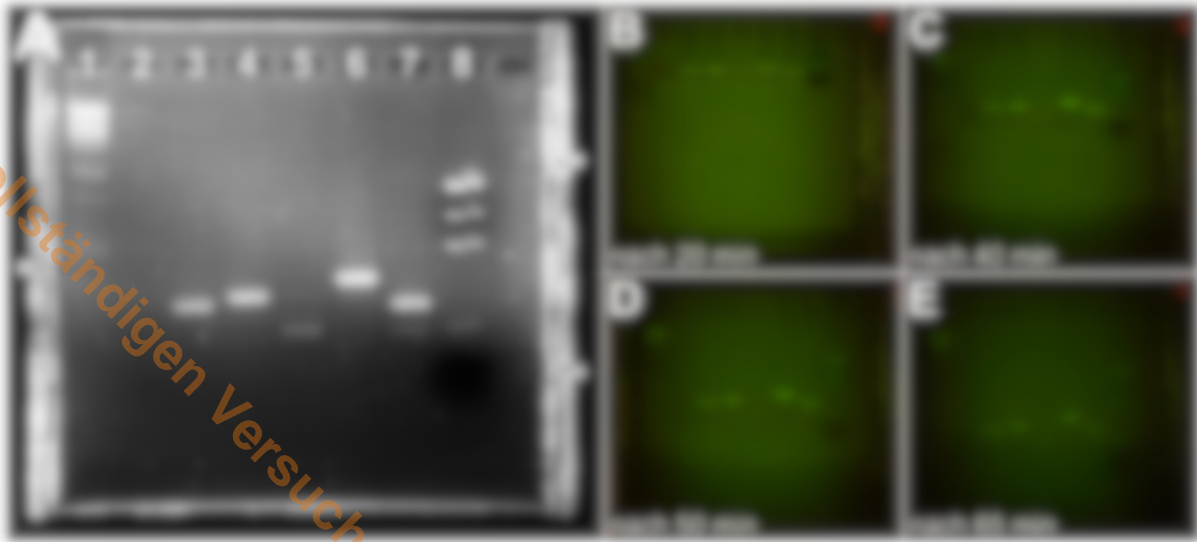


Abbildung 4: Ergebnisse der Amplified Fragment Length Analysis.

(A) Gelbildokumentation mittels einem Blaulicht-Transilluminator mit Kamera. (1) Lambda DNA Pst I Digest, (2) Negative Kontrolle, (3) Schwein, (4) Pute, (5) Rind, (6) Pferd, (7) Unbekannte Probe, (8) 115 bp Precision Molecular Mass Ruler. (B-E) Direkte Gelbildokumentation direkt in der Quasar™ Elektrophoresekammer mit einem Smartphone nach (B) 20 min, (C) 30 min, (D) 40 min und (E) 60 min.

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

F. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Copyright
Abbildung 1: Funktionsweise der InstaGene™ Matrix.	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim
Abbildung 2: PCR-Protokoll für die molekulargenetische Tierartendifferenzierung.	Screenshot miniPCR App
Abbildung 3: Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese unter Verwendung der blueGel™ - Apparatur.	Zeichnung Valentina Trivigno; verändert nach „blueGel™ Electrophoresis System User's guide“
Abbildung 4: Ergebnisse der Amplified Fragment Length Analysis.	Valentina Trivigno, Universität Hohenheim

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.

