

LaboraTri
Lehr-Lern-Labor



DAS WOLBACHIA PROJEKT

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



A. DNA-Extraktion

TIP

Bei großen Tieren nicht das komplette Tier zur DNA-Extraktion einsetzen, sondern nur ein Körperteil (zum Beispiel das Abdomen, bei reiner COI-Analyse genügt selbst ein Bein).

1. In ein Reagenzglas Wasser und ein Exemplar einer gesammelten Tierart in das 1,5 ml Eppendorf Tube denugen und anschließend mit Plastikspatül mischern.
2. Das verschlossene Eppendorf Tube bei 4.000 ug (12.000 rpm in miniPCR™-Zentrifugen) für 1 min zentrifugieren. Ein Pellet (= weißer Niederschlag am Boden des Eppendorf Tube) sollte im Anschluss sichtbar sein.



Zentrifugen sollten immer austariert werden. Gewichte der Röhren, die im Rotationsüberstrahl müssen, übertracht sein.

3. Die Lösung bis auf einen kleinen Rest (ca. 100 µl) abpipettieren (auskippen oder mit der Pipette ca. 400 µl abnehmen) und das Pellet insubrieren.
4. Das verschlossene Tube vortexen und dabei 10 Sekunden resuspendieren. Wenn kein Vortexer vorhanden ist, das Eppendorf Tube etwa 10-mal mehrmals über ein Rack ziehen.
5. Ein bereits mit 100 µl InstaGene™-Matrix befülltes Eppendorf Tube mit den eigenen Initialen beschriften.
6. 10 µl der resuspendierten Zellen in das InstaGene™-Tube pipettieren.
7. Das verschlossene Tube vortexen oder mehrmals über das Rack ziehen.
8. Die Flüssigkeit in dem Eppendorf Tube mit der Hand nach unten schleudern.
9. Das PCR-Röhchen für 15 min bei 95°C inkubieren. Hierfür den miniPCR™-Thermocycler als Thermoblock verwenden (siehe miniPCR™-User's guide).
10. Das PCR-Röhchen aus der miniPCR™-Thermocycler entnehmen und vortexen oder mehrmals über das Rack ziehen.
11. Das PCR-Röhchen erneut für 15 min bei 95°C inkubieren.
12. Das PCR-Röhchen aus der miniPCR™-Thermocycler entnehmen und vortexen oder mehrmals über das Rack ziehen.

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

13. Das PCR-Rohrchen für 5 min bei 95°C in dem miniPCR™-Thermocycler inkubieren.
14. Für 5 min bei 5.000 ug (20.000 rpm in miniPCR™-Zentrifugen) zentrifugieren. Hierfür die PCR-Rohrchen-Einsätze in die Zentrifuge setzen.

15. Das PCR-Rohrchen vorsichtig aus der Zentrifuge entfernen und in das PCR-Rack stellen.



Das PCR-Rohrchen 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. PCR-Rohrchen auf Eis stellen oder bei 4°C lagern.

8. Polymerase-Kettenreaktion mittels miniPCR

MINIPCR™ EINSTELLEN

→ siehe miniPCR™ user's guide für die genaue Anleitung!

<https://www.minipcr.com/wp-content/uploads/miniPCR-micro-thermal-cycler-users-manual-1219.pdf>

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



Abbildung 1: PCR-Protokoll für das Wellbache-Experiment.

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

2. Auf „Save“ drücken.

VORBEREITUNG DER ANSÄTZE

1. PCR-Röhrchen für den Ansatz „DNA-Barcoding“ (Cytoschrom *c* Deletase Untereinheit 1 (CD1) (HCC0279) und für den Ansatz *Wolfschädel* (Wol) beschriften.



Abbildung 2: Beschriftung der PCR-Röhrchen

2. Primer in einem PCR-Röhrchen vorbereiten:

Tabella 1: Pipettierschema für den CD1 Primer-Mix. Volumenangabe für eine Probe.

	Volumen für eine Probe
CD1495	2 µl (10 µM)
HCC0279	2 µl (10 µM)
H ₂ O	3,5 µl
Gesamt	7,5 µl



Tabella 2: Pipettierschema für den Wolpec Primer-Mix. Volumenangabe für eine Person.

	Volumen für eine Probe
Wolpec_for	2 µl
Wolpec_rev	2 µl
H ₂ O	3,5 µl
Gesamt	7,5 µl

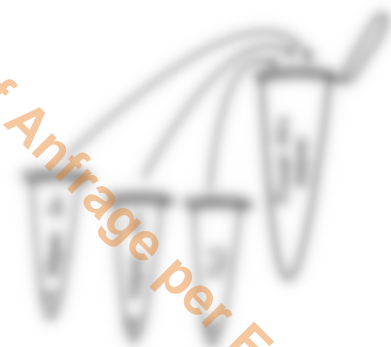


Abbildung 3: Herstellung Primer-Mix

3. Pro beschriftetem PCR-Röhrchen je 7,5 µl Primer-Mix pipettieren.
4. 5 µl Arthropoden-DNA (aus der oberen, klaren Phase) in das mit dem Primer-Mix befüllte PCR-Röhrchen pipettieren (der Negativkontrolle werden dagegen 5 µl H₂O statt DNA hinzugefügt). PCR-Röhrchen anschließend auf Eis stellen.
5. 12,5 µl HOT19 Fast Tag5 Red-Mix pro PCR-Röhrchen dazu pipettieren.

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

COE Ansatz

Wolbachia Ansatz



Abbildung 4. Herstellung des COE und Wolbachia Ansatzes.

WICHTIGES HINWEIS

Der iQ100 Hot Tagc Real Time muss als letztes hinzu pipettiert werden. Auch bei moderaten Temperaturen ist die Tagc DNA-Polymerase aktiv, daher nicht zügig pipettieren und die Reagenzienflaschen zusehends durch auf Eis stellen, bis diese in die miniPCR™ platziert werden.

STARTEN DER PCR

1. Die fertig pipettierten Ansätze zügig in die miniPCR™ platziert werden.
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 1%igen Agarose-Gels

VORBEREITUNG DER GELKAMMER

1. Den Gel-Kammern von der Unterseite der weißen Deckplatte entnehmen.

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

2. Den transparenten Deckschlitten in die weiße Gießschale positionieren (Abb. SA.1).
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 Täuschen entstehen (Abb. SA.2).

HERSTELLUNG DER AGAROSE-LÖSUNG

1. 20 ml TBE-Puffer befindet sich im 50 ml Falcon-Tube) per Augenmaß in einen Erlenmeyerkolben überführen (es verbleiben 30 ml im Falcon-Tube).
2. 0,2 g Agarosepulver (im Eppendorf Tube bereits passend portioniert) in den Erlenmeyerkolben mit dem TBE-Puffer geben.
3. Das Agarosepulver im Erlenmeyerkolben unter der Verwendung von Hitze auflösen. Hierzu einen Heizrührer oder eine Mikrowelle verwenden.

WEITERE OPTIONEN

Option 1. Heizrührer

Dem Erlenmeyerkolben einen Rührfisch hinzufügen.

Erlenmeyerkolben auf den 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 Papierfuch 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.

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



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

SCHRITT 2: HERSTELLUNG DES GELS

1. Erleimagerkollben mit einem hitzebeständigen Handschuh vom Heizrührer oder aus der Mikrowelle entnehmen.
2. Die Lösung abkühlen lassen bis der Erleimagerkollben ohne Handschuh angefasst werden kann.
3. Tul **agarose**™-Lösung zur Agarose-Lösung geben und vorsichtig verrühren.
4. Agarose-Lösung vorsichtig und langsam in die vorbereitete Gelkammer mit Gelschale und Kamm geben (Abb. 5A,B).



Abbildung 5. Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese mit Verwendung der **blueGel**™ - Apparatoren.

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

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

D. Gelelektrophorese blueGel™

1. PCR-Rohrchen nach der beendeten PCR auf Eis stellen.
2. Das Nige Agarosegel innerhalb der blueGel™ -Gelkammer platzieren (Abb. 18.4).
3. blueGel™ -Gelkammer mit 20 ml TAE-Puffer befüllen (Abb. 18.5).
Sicherstellen, dass das Gel vollständig in Laufpuffer eingetaucht ist.



Das Gel kann schmelzen, wenn es nicht ausreichend mit TAE-Puffer eingetaucht ist. Um sicherzustellen, dass genügend TAE-Puffer in der Elektrophoresekammer vorhanden ist, sollte man zusehends durch die Elektrolyse passieren und diese überprüfen.

5. 10 µl DNA-Droben (z.B. 1 µl/µl) in die 1. Gelkammer pipettieren (Abb. 18.6).
6. 10 µl PCR-Produkt der jeweiligen Probe in eine Gelkammer pipettieren (Abb. 18.6).
7. Den orangefarbenen Deckel auf der Elektrophoresekammer setzen (Abb. 18.7) und auf den Power-Knopf drücken (Abb. 18.8), 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 stellen.
10. Um das Blaulicht anzuschalten, auf das Dichtermenü drücken.
11. Smartphone auf die Dunkelkammer positionieren, um ein Bild aufzunehmen.

Tipp

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

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

E. Sequenzierung

VORBEREITUNG DER ANSÄTZE

Ansatz-Protokoll für die Sequenzier-Reaktion eines PCR-Produktes

Verteilen Sie folgende Bestandteile in ein korisches (möglichst steriles) 1,5 ml Eppendorf Tube:

- 1 µl H₂O (steril und wass. DNase-free)
- 1 µl PCR-Produkt (unaufgereinigt, direkt aus der QDI-PCR)
- 5 µl L1219-Primer oder HCC2796-Primer (20 µM, 1:10 Verdünnung der Stammlösung)

F. Sequenz-Analyse mittels BLAST

1. Ein Computer/Tablet mit Internet-Anschluss wird benötigt.
2. Zur Analyse der Sequenzierung kann die erhaltene „Fastq“ Datei mit Text-Editor oder Word geöffnet und weiter analysiert werden (siehe unten).
3. Bei der unten beschriebenen Analyse wird mit der angegebenen Sequenz über einen Such-Algorithmus die Gen-Datenbank (GenBank) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchsucht, und mit dort hinterlegten Sequenzen verschiedener Tierarten verglichen.

ERGÄNZENDINFORMATION

GenBank® ist die umfangreichste Gen-Datenbank, in die und aus der Wissenschaftler innen weltweit neue Sequenzen eintragen oder existierende herausziehen können. Hier werden auch neu sequenzierte QDI-Abschnitte aller Tierarten hinterlegt.

4. Zur PCR-basierten Bestimmung einer Tierart mittels QDI-spezifischen Primern wird mit der durch Sequenzierung erhaltenen Sequenzreihenfolge eine BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Analyse durchgeführt.

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

- Der Direkt-Link zur BLAST-Suche ist <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Hier kann „Nucleotide BLAST“ mit Standard-Einstellungen genutzt werden.



Abbildung 6: Ausschnitt aus der Startseite der BLAST-Suche.

- Das BLAST-Eingabefenster:
Die Referenzsequenz aus der 1. Datei wird in das Eingabefenster kopiert und auf „BLAST“ gedrückt. Änderungen an den Einstellungen sind nicht nötig. Es kann einige Minuten dauern, bis man ein Ergebnis erhält.



Abbildung 7: Das BLAST-Eingabefenster.

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

3. Exemplarisches Ergebnis einer BLAST-Suche



Abbildung 8: Ergebnisse der BLAST-Suche

In „Description“ sieht man die erhaltenen Datenbankbeiträge sortiert nach prozentualer Übereinstimmung (P/Per Identity). Der Eintrag mit der höchsten Übereinstimmung repräsentiert meist die spezifische Art. Der Reiter „Alignments“ führt zur Auflistung der Treffer mit einem Sequenzvergleich mit der einzelnen Treffer auf Ebene der Basenpaaren.

INTERPRETATIONSHILFE

Eine Trefferübereinstimmung von 99% (evtl. 98%) bis 100% zeigt meist die exakte Tierart.

Bei einer Übereinstimmung von <math> < 99\% </math> handelt es sich wahrscheinlich um eine eng verwandte Art. Dies ist zum Beispiel möglich, wenn die gesuchte Art nicht in der Datenbank vorhanden ist (zu selten oder zu unbekannt zum Beispiel). Manchmal sind die Sequenzen dieses

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

Grenzschnitte innerhalb einer Tier-Gattung so ähnlich, dass die Arten nicht sicher unterschieden werden können mit dieser Methode (dann wäre ein Ergebnis nicht *Haematopoda pluvialis*, wie im obigen Beispiel, sondern *Haematopoda spec.*)

Bei einer hoch-prozentualen Übereinstimmung mit zwei Arten kann durch Heranziehen von ökologischen Informationen, wie Abgleich des Fundort-Fangortes mit der natürlichen Verbreitung einer Tierart, dennoch die genauere Art durch Ausschluss-Prinzip interpretativ bestimmt werden (als Beispiel können hier nah verwandte europäische und nordamerikanische Schwesterarten genannt werden).

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

G. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Copyright
Abbildung 1: PCR-Protokoll für das Wolbachia-Experiment.	Screenshot miniPCR App
Abbildung 2: Beschriftung der PCR-Röhrchen	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim
Abbildung 3: Herstellung des Primer-Mix.	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim
Abbildung 4: Herstellung des COI und Wolbachia Ansatzes.	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim
Abbildung 5: Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese unter Verwendung der blueGel™ - Apparatur.	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim verändert nach „blueGel™ Electrophoresis System User's guide“
Abbildung 6: Ausschnitt aus der Startseite der BLAST-Suche.	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA
Abbildung 7: Das BLAST-Eingabefenster.	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA
Abbildung 8: Ergebnisse der BLAST-Suche.	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

Protokoll: Philipp Vick und Valentina Trivigno

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.

