

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



Zentrifugen sollten immer austarant werden. Gewichte der Röhren, die im Rotationsüberstehen müssen, identisch sein.

3. Die Lösung bis auf einen kleinen Rest abformen (auskippen oder mit der Pipette ca. 40µl abnehmen) und das Pellet insammeln.
4. Das verschlossene Tube vorserven und dabei die Lösung resuspendieren. Wenn kein Vorserver vorhanden ist, das Eppendorf Tube etwa 10-mal mehrmals über ein Rack ziehen.
5. Ein bereits mit 100 µl InstaGene™ Matrix behaltten Eppendorf Tube mit den eigenen Initialen beschriften.
6. 10 µl der resuspendierten Zellen in das InstaGene™ Tube pipettieren.
7. Das verschlossene Tube vorserven 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 94°C inkubieren. Hierfür den miniPCR™ Thermocycler als Thermoblock verwenden (siehe miniPCR™ User's guide).
10. Das PCR-Röhchen aus der miniPCR™ Thermocycler entnehmen und vorserven oder mehrmals über das Rack ziehen.
11. Das PCR-Röhchen erneut für 15 min bei 94°C inkubieren.
12. Das PCR-Röhchen aus der miniPCR™ Thermocycler entnehmen und vorserven oder mehrmals über das Rack ziehen.

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

13. Das PCR-Röhrchen für 5 min bei 95°C in dem miniPCR™-Thermocycler inkubieren.
14. Für 5 min bei 5000 ug (2000 rpm in miniPCR™-Zentrifugen) zentrifugieren. Hierfür die PCR-Röhrchen-Einsätze in die Zentrifuge setzen.

15. Das PCR-Röhrchen vorsichtig aus der Zentrifuge entfernen und in das 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. PCR-Rack auf Eis stellen oder bei 4°C lagern.

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

ENTZEHUNGSDIEMION

InstalGene™ Matrizen sind ein auf Chitosan basierendes Harz, das für die PCR-fertige DNA-Aufreinigung verwendet wird. Die InstalGene™ Matrix dient dazu die DNA für die PCR vor Verdünnungen und vor dem Abbau zu schützen. Hierfür werden zweiwertige Ionen, wie beispielsweise Mg^{2+} , chelatiert. Diese dienen als Co-Faktoren von DNAasen. Durch das Binden der Mg^{2+} -Ionen an die IG-Matrix wird die Aktivität des Enzyms gestoppt und die DNA vor dem Abbau geschützt.



1. Zentrifugieren der Zellen durch Zentrifugieren



2. Bindung der Chelatliganden an die IG-Matrix



3. Bindung der Zellbestandteile und Denaturierung der Enzyme



4. Trennung der freien Bestandteile und PCR-Verfahrenen (gebunden an die IG-Matrix) von der DNA überstehend



Abbildung 1 Funktionsweise der InstalGene™ Matrix.

8. Polymerase-Kettenreaktion mittels miniPCR

MINIPCR® EINSTELLEN

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

• <https://www.minipcr.com/help-center/uploads/miniPCR-quick-start-manual-cycler-1-Manual-12018.pdf>

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

The screenshot shows the miniPCR app interface for creating a PCR protocol. The protocol is named 'PCR protokoll' and is for 'Wolfschia'. The settings are as follows:

Parameter	Temperature	Time
Initial Denaturation	94.0 °C	120 s
Denaturation	94.0 °C	30 s
Annealing	49.0 °C	45 s
Extension	72.0 °C	60 s
Number of cycles		30
Final extension	72.0 °C	600 s

Abbildung 2: PCR-Protokoll für das Wolfschia-Experiment.

2. Auf „Save“ drücken.

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

VORBEREITUNG DER ANSÄTZE

1. PCR-Röhrchen für den Ansatz „DNA-Barcode“ Cytoschrom *c* Sequenz Unterabschnitt 1 (COI) (LC0149/HC0219) und für den Ansatz *Wolkecke* (Wsp) beschriften.



Abbildung 3 Beschriftung der PCR-Röhrchen

Für alle Informationen zum „Barcode of Life“ siehe <https://www.barcodeoflife.org/> und https://de.wikipedia.org/wiki/Barcode_of_Life

2. Primer-Mix in einem PCR-Röhrchen vorbereiten.

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

	Volumen für eine Probe
LC0149	2 µl (20 µM)
HC0219	2 µl (20 µM)
H ₂ O	3,5 µl
Gesamt	+ 7,5 µl

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

	Volumen für eine Probe
Wsp_For	2 µl
Wsp_Rev	2 µl
H ₂ O	3,5 µl
Gesamt	+ 7,5 µl

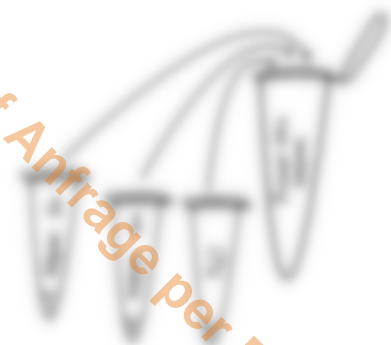


Abbildung 4 Herstellung Primer-Mix

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 (die Negativkontrolle werden dagegen 5 µl H₂O statt DNA hinzugefügt). PCR-Röhrchen anschließend auf Eis stellen.
5. 12,5 µl KODR Hot Tag5 Red-Mix pro PCR-Röhrchen dazu pipettieren.

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

COE Ansatz

Wolbachia Ansatz



Abbildung 5: Herstellung des COE und Wolbachia Ansatzes.

WICHTIGES HINWEIS

Der **ROX19 Fast Tagc Real** 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™** gegeben werden.

STARTEN DER PCR

1. Die fertig pipettierten Ansätze zügig in die **miniPCR™** geben.
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!



Demask 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.

AGAROSE GEL

1. Erlenmeyerkolben mit einem hitzebeständigen Handschuh vom Heizrührer oder aus der Mikrowelle entnehmen.
2. Die Lösung 5 Minuten lassen bis der Erlenmeyerkolben ohne Handschuhe angefasst werden kann.
3. 1 µl **psdPHEEN™** -Lösung zur Agarose-Lösung geben und vorsichtig verrühren.
4. Agarose-Lösung vorsichtig und langsam in die vorbereitete Gießapparatur mit Deckplatte und Kamm gefüllen (AA.3).

ERGÄNZEND INFORMATION

Um die elektrophoretisch aufgetrennten DNA sichtbar zu machen, muss diese mit einem Farbstoff gefärbt werden. Den ersten und bekanntesten DNA-Farbstoffen zählt der rote Farbstoff Ethidiumbromid, welcher in Nukleinsäuren interkalariert. Ein oranges Fluoreszenzsignal kann bei Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) hervorgerufen werden. Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid-Molekülen zwischen den Basen der DNA, verändert sich das Anregungsspektrum, wobei 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 worden sind, wie beispielsweise SYBR Green oder **psdPHEEN**.

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. 48 A).
3. blueGel™ -Gelkammer mit 20 ml TAE-Puffer befüllen (Abb. 48 B).



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. 10 µl DNA-Druckmarker (z.B. λ-Phage) in die 1. Geltasche platzieren (Abb. 48 C).
5. 10 µl PCR-Produkt (bzw. zu analysierende Probe) in eine Geltasche platzieren (Abb. 48 C).
6. Den orangefarbenen Deckel der Elektrophoresekammer setzen (Abb. 48 D) und auf den Power-Knopf drücken (Abb. 48 E), um die Elektrophorese zu starten (Kontrollleuchte leuchtet grün).
7. Das Gel für etwa 30 min laufen lassen.
8. Die Elektrophoresekammer ausschalten (Power-Knopf drücken) und die Dunkelkammer auf die Elektrophoresekammer setzen.
9. Um das Blaulicht anzuschalten, auf das Dürfen-Symbol drücken.
10. Smartphone auf die Dunkelkammer positionieren, um das Gelbild aufzunehmen.

TIP

Während der Elektrophorese kann Kondenswasser am orangefarbenen Deckel entstehen. Um die Sichtbarkeit zu verbessern und ein scharfes 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 Versuchprotokolle werden auf Anfrage per E-Mail versandt!



Abbildung 6. Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese unter Verwendung der $100 \times$ - Apparatur.
(A) Herstellung eines Kapillarsystems. (B) Laden der Proben und Start der Elektrophorese.

E. Sequenzierung

VORANSETZUNGEN

Für eine qualitativ zuverlässige Sequenzierung ist es auch aktuell zum Beispiel der Sanger Sequenzier-Service der Schweizer Firma Microsynth
(<https://www.microsynth.com/home-de.html>).

Der „Economy Run“ mit ÜbernachtSERVICE ist für dieses Protokoll ausreichend und bietet die Möglichkeit, die Ergebnisse am folgenden Tag direkt mit dem Kurs-Teilnehmer innen/Schüler innen zu analysieren.

Der ÜbernachtSERVICE ist nur bei Nutzung einer nahgelegenen Microsynth-Filiale möglich. Alternativ können auch kostenlos vorfrankierte Versand-Umschläge angefordert werden (auf <https://www.microsynth.com/economy-run-DE.html>).

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

Es können sowohl PCR-Produkte direkt nach der PCR-Reaktion und ohne vorherige Aufreinigung, aber auch vorgefertigte Kontroll-Proben in Form von Klonen-Vektoren (Plasmiden) sequenziert werden.

TOPP

Die Bestellung der Sequenzierungen vorab in deren Webshop abschließen, um dass die nötigen Beschriftungsaufkleber für die Eppendorf-Tubes bereits auf Vorrat nach der PCR-Reaktion zur Verfügung stehen.

VORBEREITUNG VERSÄTZE

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

Pipettieren Sie folgende Reagenzien in ein keimreches (möglichst steriles) 1,5 ml Eppendorf Tube:

- 1 µl H₂O (steril und evtl. DNase-frei)
- 1 µl PCR-Produkt (unaufgereinigt direkt aus der QDI-PCR)
- 1 µl LICORIS-Primer oder HCC2196-Primer (10 µM, 1:10 Verdünnung der Stammlösung)

OPTIONAL

Es kann ebenfalls eine mit Hilfe der Wellbache-spezifischen Primern isoliertes PCR-Produkt mit einem der beiden Sensoren Primers (Wpac-F oder -R) sequenziert werden, z.B. um die in der Gel-Elektrophorese erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren.

Die Sequenzieransätze werden dann in einem Umschlag laut Anweisungen (siehe oben) in eine Microsynth-Droplette eingeworfen oder per Post eingeschickt.

→ <https://www.microsynth.ch/Optional/Preferences/CollectorPoints/NewwithMicrosynthPoints>

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

F. Sequenz-Analyse mittels BLAST

TIPP

Falls die PCR-Reaktion oder Sequenzierung einiger Teilstrahler immer keine Ergebnisse liefern sollte, können ersatzweise auch zur Verfügung gestellte Positive-Kontrol- Sequenzen genutzt werden (siehe Anhang)

1. Ein Computer/Tablet mit Internet-Anschluss wird benötigt.
2. Zur Arbeit der Sequenzierung kann die erhaltene ‚Fastq‘ Datei mit Text-Editor oder Word-Office und weiter analysiert werden (siehe unten)

SEQUENZIEREN

Die ab-Datei enthält die Werte aller Basenpositionen und erlaubt eine manuelle Betrachtung der Ergebnisse. Zum Öffnen benötigt man ein spezielles Programm, welches Sequenzier-Peaks darstellt. Ein einfaches, gut verständliches Programm ist beispielsweise ‚SnapGene‘, das als frei zugängliche Version auch online ist (<https://www.snapgene.com>). Es kann zusätzlich beliebige DNA-Sequenzen (Sequenzier-Ergebnisse, Klone, Primer, kodierende oder generelle genomische Sequenzabschnitte) darstellen und erlaubt virtuelle DNA-Analysen für fortgeschrittene Techniken, wenn in weiterführenden Kursen.

3. Bei der unten beschriebenen Analyse wird mit der angegebenen Software 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.

ERGÄNZENDINFORMATIONEN

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

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

- Zur PCR-basierten Bestimmung einer Target mittels COI-spezifischen Primern wird mit der durch Sequenzierung erhaltenen Basenpaarabfolge eine BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Analyse durchgeführt.
- 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 7: Ausschnitt aus der Startseite der BLAST-Suche.

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



Abbildung 8: Das BLAST-Eingabefenster.

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

3. Exemplarisches Ergebnis einer BLAST-Suche

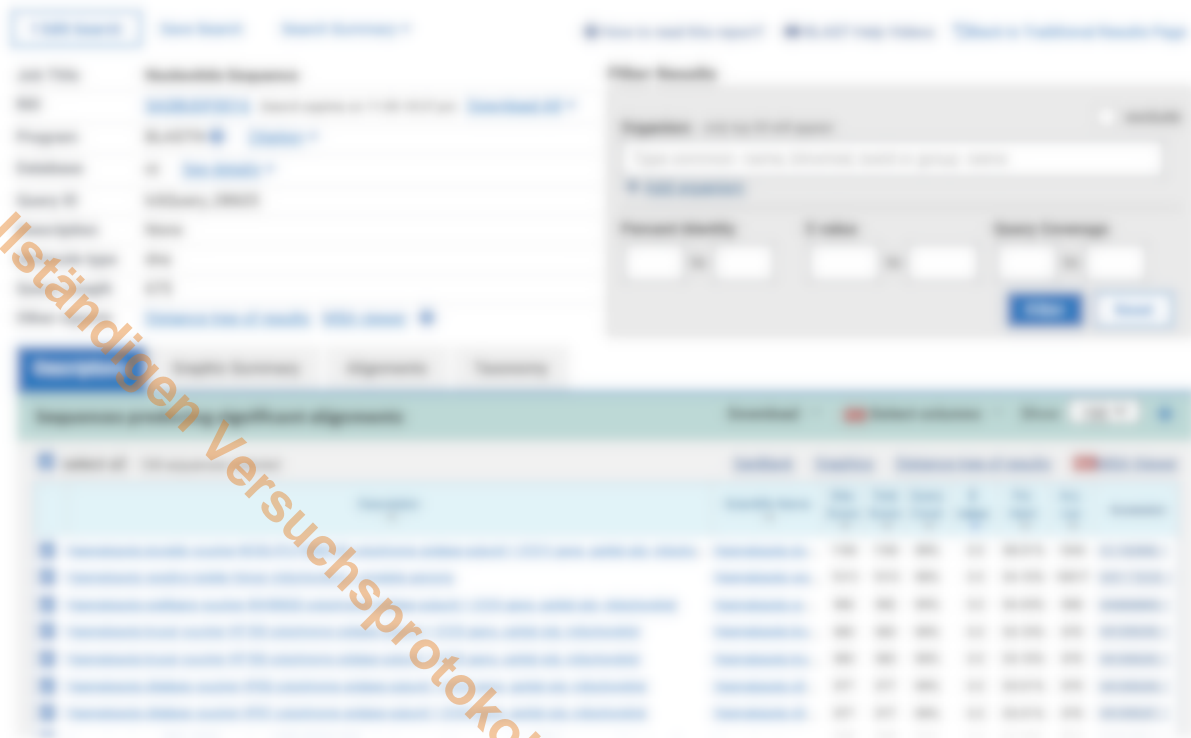


Abbildung 9 Ergebnisse der BLAST-Suche

In „Description“ sieht man die erhaltenen Datenbankbeiträge sortiert nach prozentualer Übereinstimmung (P/Per ident). 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 90% 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!



Genaubschnitts 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 Fundortes 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!

H. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Copyright
Abbildung 1: Funktionsweise der InstaGene™ Matrix.	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim
Abbildung 2: PCR-Protokoll für das Wolbachia-Experiment.	Screenshot miniPCR App
Abbildung 3: Beschriftung der PCR-Röhrchen	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim
Abbildung 4: Herstellung des Primer-Mix.	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim
Abbildung 5: Herstellung des COI und Wolbachia Ansatzes.	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim
Abbildung 6: Schematisch dargestellte Durchführung einer Gelelektrophorese unter Verwendung der blueGel™ - Apparatur.	Zeichnung Valentina Trivigno, Universität Hohenheim verändert nach „blueGel™ Electrophoresis System User’s guide“
Abbildung 7: 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 8: Das BLAST-Eingabefenster.	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA
Abbildung 9: 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.

