



Bestimmung von Tierarten mittels PCR

Einführung

- Grundlage der Untersuchung ist der Nachweis von Tierart-spezifischer Erbsubstanz.
- Fleisch, Milch sowie deren Verarbeitungsprodukte enthalten DNA-Anteile der verwendeten Tierarten.
- Die DNA ist so stabil, dass sie auch nach umfangreichen Produktionsprozessen in ausreichend vorhanden ist, um eindeutige Tierartidentifizierungen durchzuführen.



Einführung

Die Untersuchung gliedert sich in drei Abschnitte, in denen verschiedene grundlegende Techniken der DNA-Analytik angewandt werden:

- DNA-Isolation
- Polymerasekettenreaktion
- Gelelektrophorese



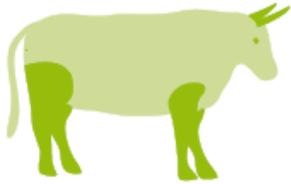
Einführung

Die Analyse erfolgt in 4 Gruppen:

- a) Gruppe 1 untersucht eine Probe auf Rinder-DNA (Probe 1)
- b) Gruppe 2 untersucht eine Probe auf Schweine-DNA (Probe 2)
- c) Gruppe 3 untersucht eine Probe auf Huhn-DNA (Probe 3)
- d) Gruppe 4 untersucht eine Probe auf Puten-DNA (Probe 4)



Einführung



Untersuchung auf Rind-Anteile:

- Salami, Leberwurst, Bierschinken,
- Gehacktes mit Rindfleischanteil,
- Käse mit Kuhmilchanteilen



Untersuchung auf Schweine-Anteile:

- Salami, Leberwurst, Würstchen,
- Gehacktes, verschiedene Frischwurstartikel



Untersuchung auf Huhn-Anteile:

- Geflügelfleisch und Geflügelleberwürste,
- Pasteten



Untersuchung auf Puten-Anteile:

- Geflügelfleisch und Geflügelleberwürste,
- Pasteten

Die folgenden Produkte beinhalten in der Regel DNA in ausreichender Qualität und Quantität zur Untersuchung.

Versuchsablauf / Zeitschema

		Zeitbedarf	anschließend Lagerung bei -18°C möglich	davon Zeit für Theorie
DNA-Isolation	Vorbereitung des Arbeitsplatzes	10 min		
	Vorbereitung der Kit-Komponenten: Inkubation des Elutionspuffers E; ggf. Lösen von ausgefallenen Komponenten im Lysepuffer A	10 min		
	Probenvorbereitung: Zerkleinern der Proben und Abfüllen in zuvor beschriftete Reaktionsgefäße	10 min		
	Lyse-Vorbereitung der Proben mit Lysepuffer und Proteinase K	5 min		
	Lysieren der Proben im Wasserbad	30 min		25 min
	Zentrifugation, Waschschritte und Elution der DNA von den Säulen	10 min	X	

Versuchsablauf / Zeitschema

PCR	Programmierung des Thermocyclers und Auftauen der PCR-Komponenten	15 min		
	Pipettieren der PCR-Ansätze	20 min		
	Dauer des PCR-Programms	2,5 h	X	2,5 h
Gel-Elektrophorese	Vorbereitung des Gels: Agarose auflösen, Gel gießen, Polymerisation des Gels, Überschichten mit Puffer	60 min		30 min
	Vorbereitung der Proben für das Auftragen: Proben werden mit Gel-Ladepuffer in Reaktionsgefäßen oder einer Mikrotiterplatte gemischt	20 min		
	Auftragen der Proben und des DNA-Längenstandards auf das Gel	15 min		
	Elektrophoretische Auftrennung bei 90 V Gleichspannung (geglättet)	30 min		20 min
	Färbung des Gels und Entfärbung des Hintergrunds	45 min		15 min

Stundenorganisation

Unterrichtseinheit 1 (45 min)

- Einführung in das Thema „Isolation von DNA“
- Praktische Übungen zum Umgang mit den Mikropipetten



Unterrichtseinheit 2 (45 min)

- DNA-Isolation aus den mitgebrachten Proben

Nach DNA-Isolation: Lagerung der DNA bei -18°C .



Stundenorganisation



Unterrichtseinheit 3 (2 x 45 min)

- Einführung in das Thema „PCR“
- Auftauen der PCR-Komponenten
- Programmierung des Thermocyclers
- Pipettieren der PCR-Ansätze
- Start des PCR-Programms (ca. 2,5 h)
- Agarose-Gele gießen

Nach PCR-Lauf: Lagerung der Proben bei 4°C

Nach Aushärten der Gele erfolgt die Lagerung in Cellophan bei 4°C



Stundenorganisation



Unterrichtseinheit 4 (2 x 45 min)

- Einführung in das Thema „Gel-Elektrophorese“
- Praktische Übungen zum Befüllen der Geltaschen
- Auftragen der PCR-Ansätze und des DNA-Längenstandards
- Gel-Elektrophorese
- Färbung / Entfärbung der Gele
- Analyse der Ergebnisse

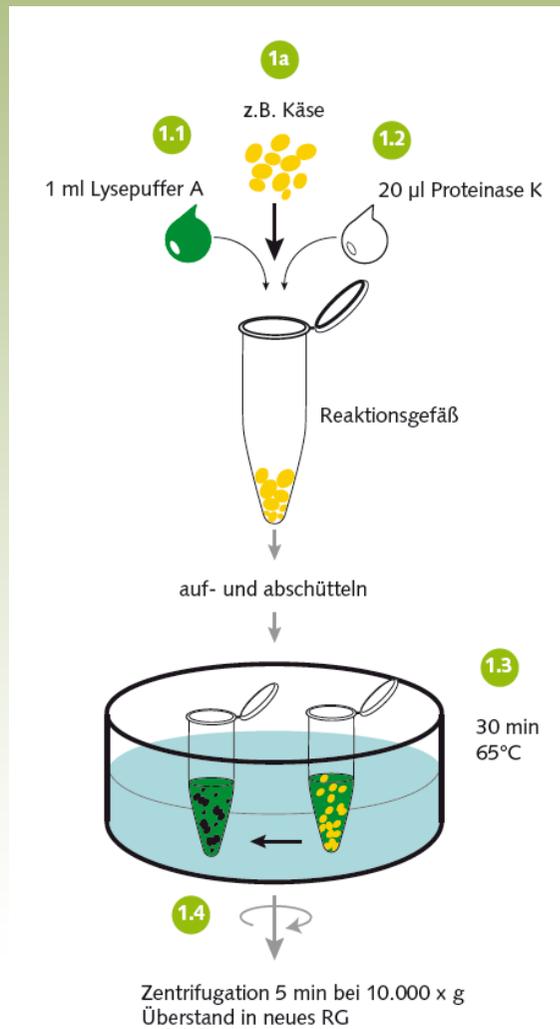
Die Unterrichtseinheiten 1 + 2 können auch als *eine* Einheit gestaltet werden.

Lernziele Schüler

Die Schüler führen ein wissenschaftliches Experiment durch (Fragestellung / Planung / Durchführung / Beobachtung / Auswertung / Diskussion)

- Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Replikation und PCR erkennen
- Ablauf einer PCR selbstständig darlegen (Zyklen)
- Wanderstrecken im Agarosegel vorhersagen, auswerten und interpretieren

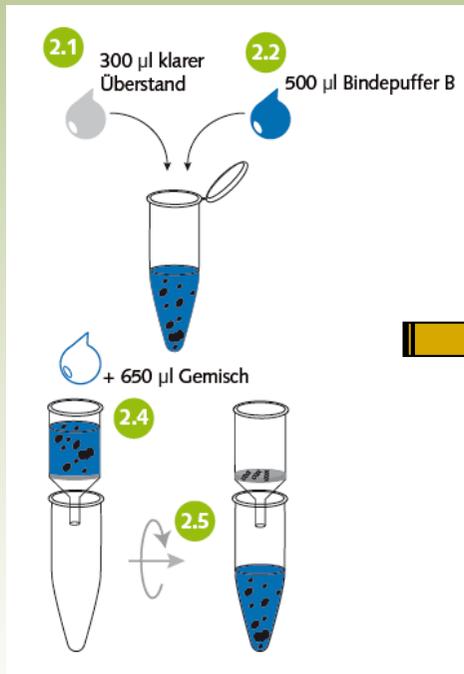
DNA-Isolation



Vorbereitung
und Lyse der
mitgebrachten
Proben.

DNA-Isolation

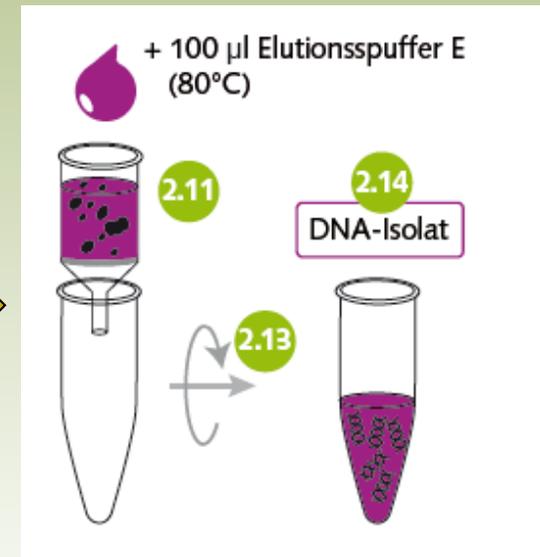
Gewinnung von DNA aus den lysierten Produkten



Binden der DNA an
das Säulenmaterial



Waschen

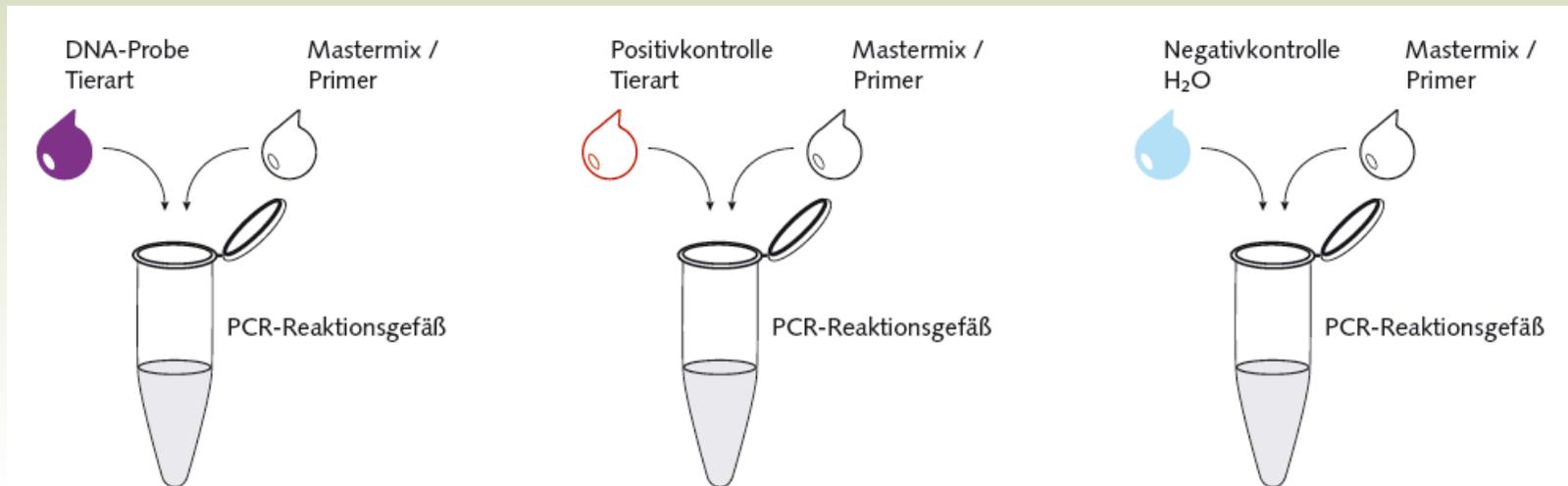


Herauslösen aus dem
dem Säulenmaterial

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Reaktionsansätze für die PCR bestehen aus folgenden Komponenten:

- DNA-Proben (Negativ-, Positivkontrolle, Probe)
- zwei artspezifischen Oligonukleotiden (Primer)
- Reaktionsmix (Puffer, Polymerase, Nukleotidmix)

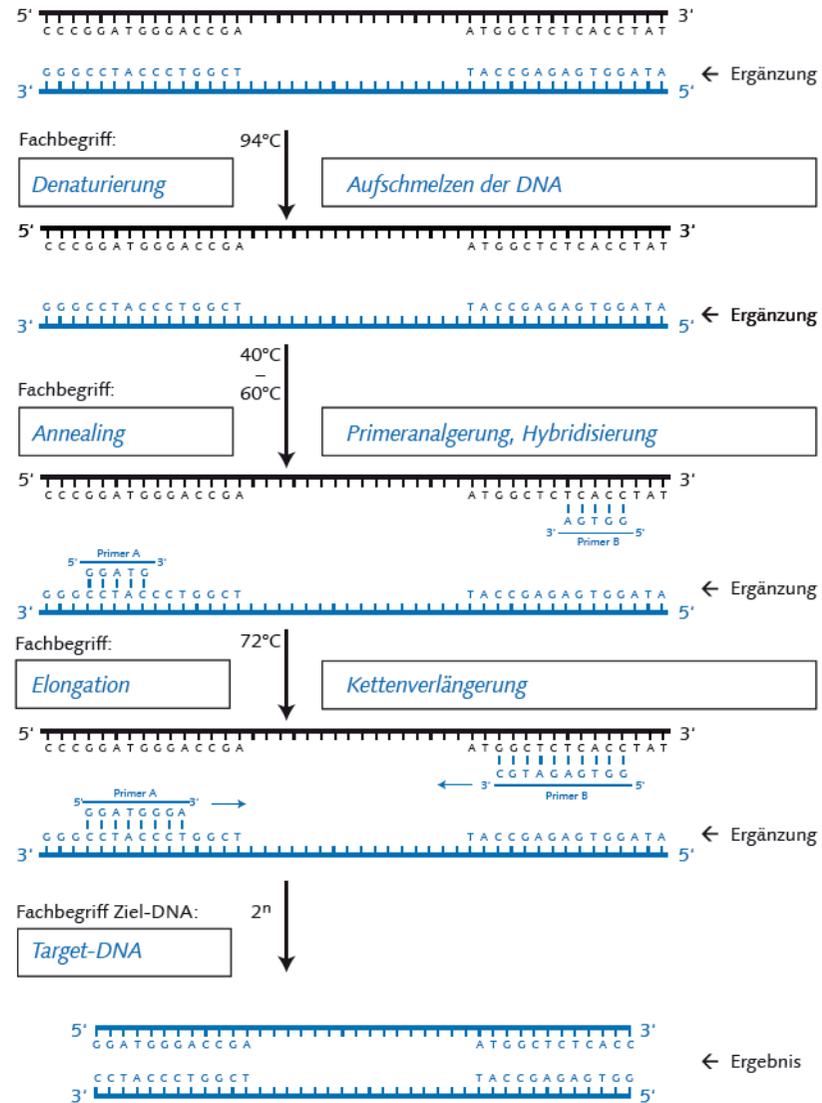


PCR-Programmierung

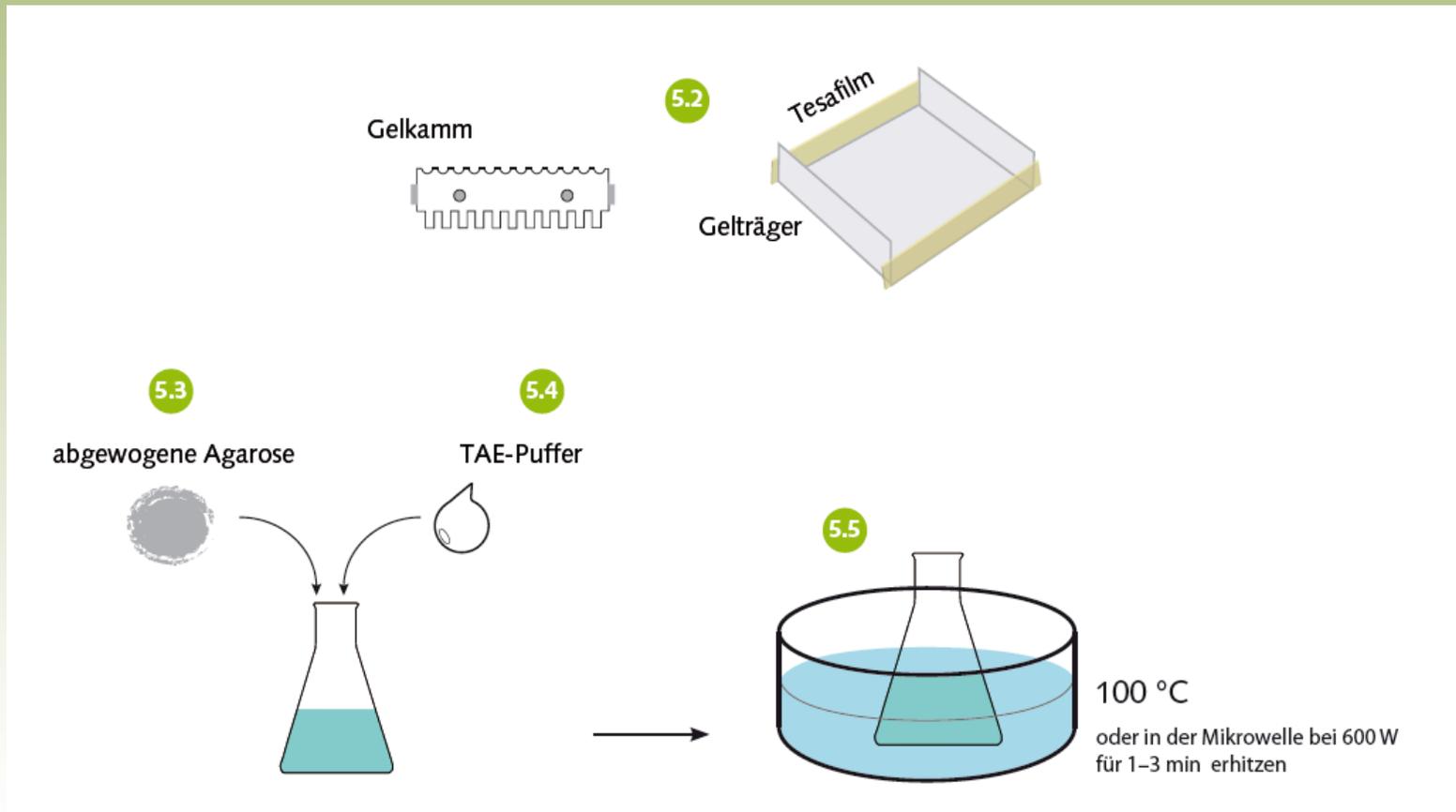
PCR-Proben können entweder direkt für die Gelelektrophorese verwendet werden oder für 4 Wochen bei -4°C gelagert werden.

1 x	initiale Denaturierung	95°C	3 min
45 x	Denaturierung	95°C	45 s
	Annealing	45°C	45 s
	Elongation	72°C	60 s
1 x	finale Elongation	72°C	5 min
1 x	Kühlung	15°C	∞

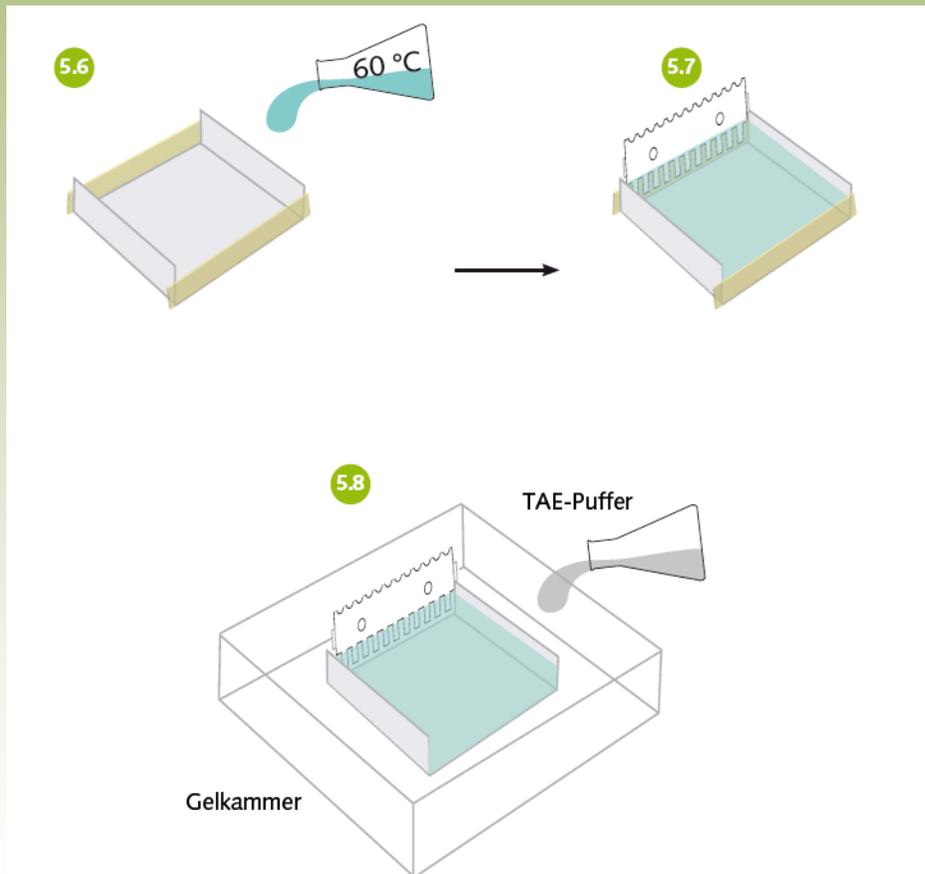
PCR-Zyklus



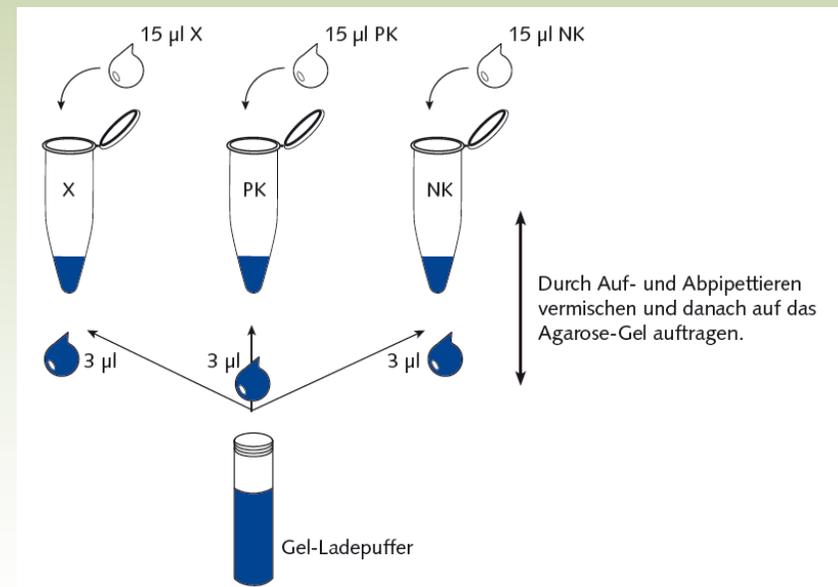
Gelelektrophorese



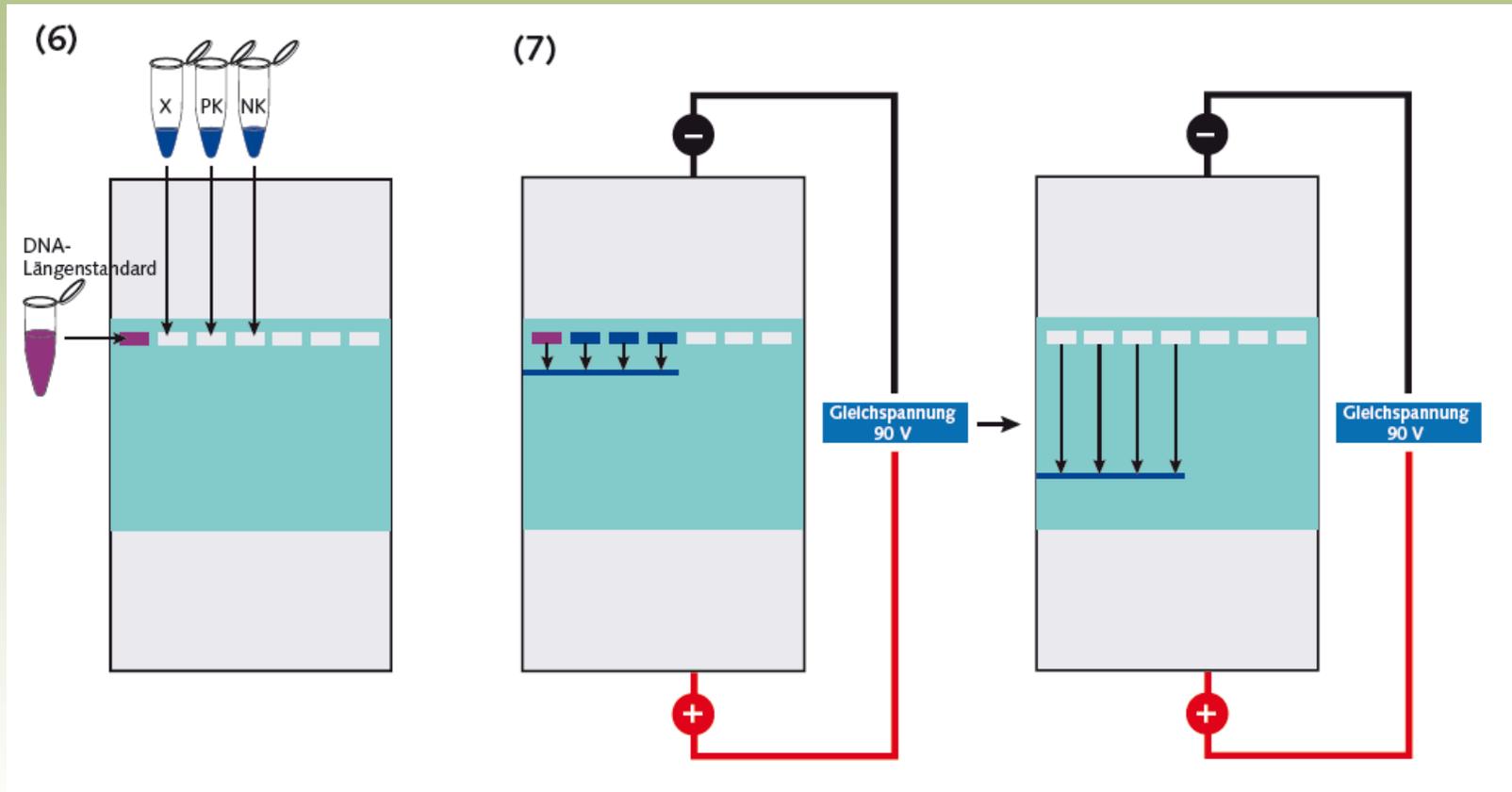
Gelelektrophorese



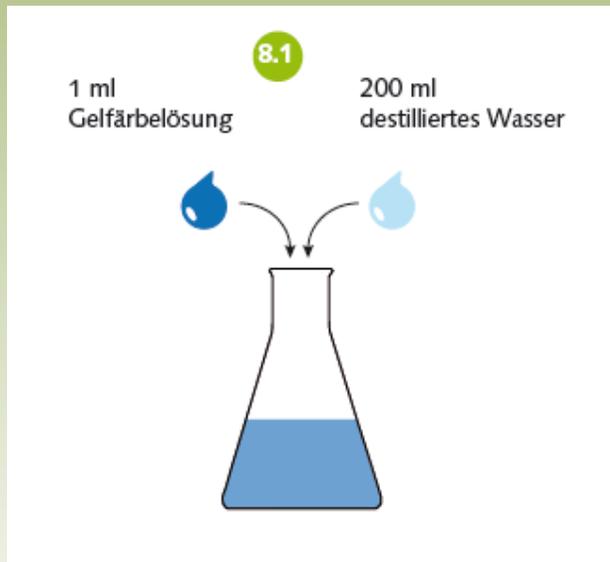
Vorbereiten der Proben für die Gelelektrophorese



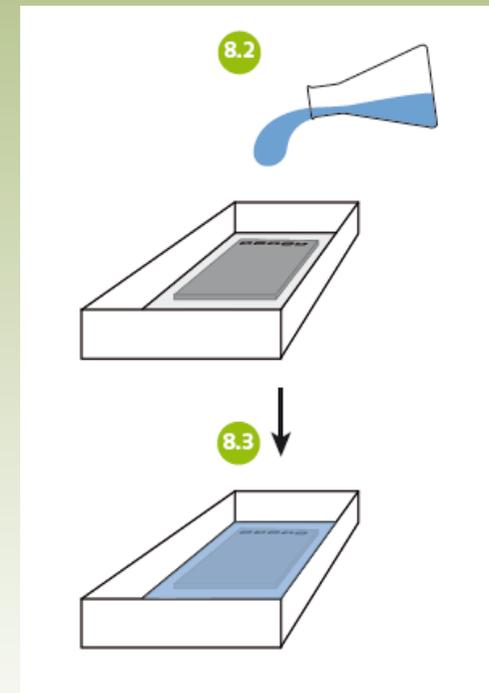
Gelelektrophorese



Färbung des Agarosegels

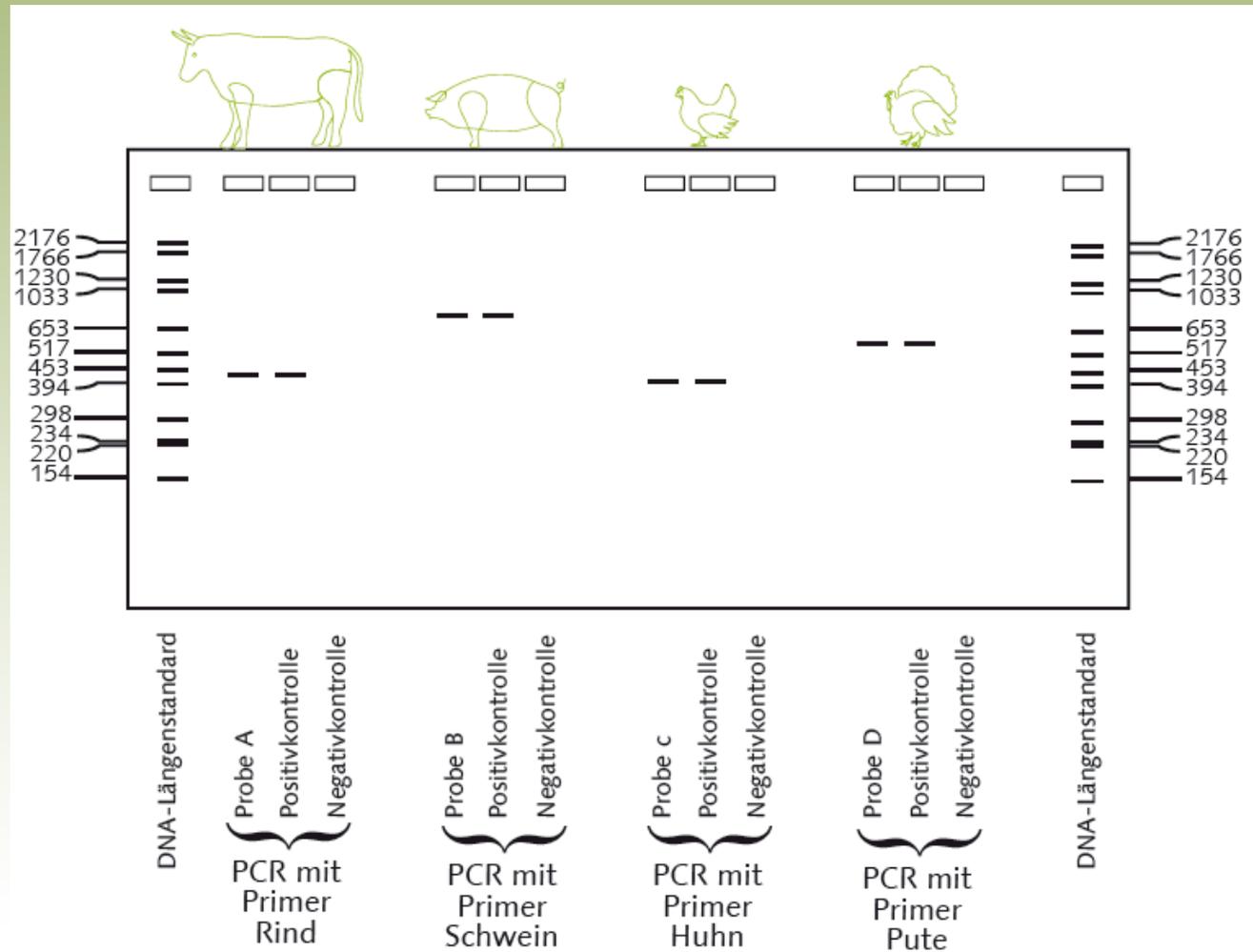


Vorbereiten der
Methylenblau-Lösung



Gel für 10-15 min färben.
Unter Leitungswasser ent-
färben bis Banden sichtbar.

Gelelektrophorese



Probleme

Problem	mögliche Ursache	Lösung
kein oder wenig DNA-Isolat	<ul style="list-style-type: none"> · zu wenig tierisches Probenmaterial verwendet · Probenmaterial nicht genügend homogenisiert · Elutionspuffer E für die DNA-Elution nicht vorgewärmt (80°C) 	<ul style="list-style-type: none"> · mehr Probe einsetzen · Probe stärker homogenisieren, um die Lyse der Zellen zu verbessern · Elutionspuffer E vorwärmen und Säulen-Kombination nach dem Auftragen des Elutionspuffers E 1–2 min im Wasserbad (70°C) inkubieren
kein PCR-Produkt in Positivkontrolle	<ul style="list-style-type: none"> · Fehler bei der Durchführung der PCR · Reaktionsmix geschädigt · Kontroll-DNA geschädigt 	<ul style="list-style-type: none"> · PCR wiederholen
schwaches PCR-Produkt in Positivkontrolle	<ul style="list-style-type: none"> · falsches Volumen pipettiert · Reaktionsmix geschädigt · Kontroll-DNA geschädigt · Falsches PCR-Programm 	<ul style="list-style-type: none"> · PCR wiederholen, Eichung der Pipetten überprüfen · Programm überprüfen, PCR wiederholen
PCR-Produkte in Negativkontrolle	<ul style="list-style-type: none"> · Negativkontrolle mit DNA verunreinigt durch PCR-Ansatz, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße usw. 	<ul style="list-style-type: none"> · PCR mit neuen Lösungen wiederholen, Vorsorge gegen Kontaminationen treffen: Handschuhe tragen, Filterspitzen und Arbeitsbereich kontrollieren sowie Geräte sorgfältig reinigen
unscharfe Gelbanden	<ul style="list-style-type: none"> · Falsche Elektrophoresebedingungen 	<ul style="list-style-type: none"> · Elektrophorese wiederholen
unspezifische Banden oberhalb des PCR-Produkts (ohne Einfluss auf die Untersuchung)	<ul style="list-style-type: none"> · Kontamination eines PCR-Zusatzes oder der Probe durch z.B. menschliche Hautzellen · Falsches PCR-Programm 	<ul style="list-style-type: none"> · Experiment wiederholen · PCR-Programm überprüfen

Herstellung der PCR-Ansätze

PCR-Ansatz	Mastermix + Primer (MMP) [μ l]	DNA* [μ l]	Wasser [μ l]	Endvolumen [μ l]
Kürzel Tierart R/S/H/P + Gruppennummer	48	2 (der Probe)		50
Positivkontrolle PK + Gruppennummer	48	2 (der Kontroll-DNA)		50
Negativkontrolle NK + Gruppennummer	48		2	50

2,0 μ l DNA-Lösung (100 ng/ μ l)

2,0 μ l pro Primer (10 μ mol)

1,0 μ l 10 mmol „dNTPs“ (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

5,0 μ l 10-fach konzentrierte Polymerase-Pufferlösung

37,0 μ l H₂O

1,0 μ l Taq-Polymerase (1–5 U/ μ l)

 MasterMix

50,0 μ l Gesamtvolumen