

Tierart-Kit SK1-12

Tierart-Kit

Identifizierung von Tierarten mittels
Polymerasekettenreaktion (PCR)
unter Verwendung artspezifischer Primer

DNA-Nachweis der Tierarten Rind, Schwein, Huhn und Pute
in Fleisch- und Milchprodukten

Je 3 Untersuchungen pro Tierart · inklusive DNA-Isolation

Lehrerheft



Inhalt

Einleitung	3
Bestandteile des Tierart-Kit SK1-12	4
Erforderliche Ausstattung	5
Untersuchungsmaterial und Gruppenarbeit	6
Praktische Grundlagen	7
• Arbeiten mit Mikropipetten	7
• Aufbau der Mikropipette	7
Versuchsablauf und Zeitschema	8
Stundenorganisation	9
Vorkenntnisse der Schüler	10
Lernziele der Schüler	11
Arbeitsblatt 1 (Aufgaben für den Schüler)	12
Arbeitsblatt 1 (Musterlösungen für die Lehrkraft)	13
Arbeitsblatt 2 (Aufgaben für den Schüler)	14
Arbeitsblatt 2 (Musterlösungen für die Lehrkraft)	15
Arbeitsblatt 3 (Bestimmung der Fragmentgrößen)	16
Durchführung der Untersuchung	18
• DNA-Isolation	18
• PCR	20
• Gel-Elektrophorese	22
• Auswertung der Untersuchung	27
Probleme, mögliche Ursachen und Lösungen	28
Sicherheit und Entsorgung	29
Hinweise zum Umgang und zur Entsorgung der Lösungen	30
• aus der DNA-Isolation	30
• aus der Gel-Elektrophorese	31
• R+S-Sätze	32
• H+P-Sätze	33
Platz für Notizen	34
Impressum	36

Einleitung

Der Tierart-Kit SK1-12 enthält die notwendigen Materialien, um verarbeitete Tierarten in gängigen Fleisch- und Milchprodukten, z.B. Wurst oder Käse zu bestimmen.

Ein Lehrerheft und fünf Schülerhefte, alle durchgehend farbig illustriert, ergänzen den Kit. Das Lehrerheft umfasst insgesamt 36 Seiten und gliedert sich in einen theoretischen und praktischen Teil. Im theoretischen Teil werden arbeitstechnische Grundlagen, Unterrichtsorganisation und didaktische Hinweise aufgeführt. Arbeitsblätter mit Aufgaben für die Schüler und Antworten für die Lehrkräfte vervollständigen den Theorieteil. Anschließend wird im praktischen Teil die Versuchsdurchführung ausführlich dargestellt. Hinweise zur Sicherheit, Entsorgung und dem Umgang mit Gefahrstoffen bilden den Abschluss des Lehrerheftes.

Das Schülerheft umfasst insgesamt 8 Seiten. Einleitend werden die fachlichen Grundlagen der Polymerasekettenreaktion erläutert. Es folgt wiederum eine ausführliche Versuchsbeschreibung, bevor die Sicherheitshinweise den Abschluss des Schülerheftes bilden.

Praktische Grundlage

Grundlage der Untersuchung ist der Nachweis von Tierart-spezifischer Erbsubstanz (DNA). Sowohl Fleisch als auch Milch sowie deren Verarbeitungsprodukte enthalten DNA-Anteile der verwendeten Tierarten. Die DNA ist so stabil, dass sie auch noch nach umfangreichen Produktionsprozessen in ausreichender Quantität und Qualität vorhanden ist, um eindeutige Tierartidentifizierungen durchführen zu können.

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

(1) DNA-Isolation

Im ersten Teil wird aus der zu untersuchenden Probe, z.B. kleine Wurst- oder Käsestücke, DNA isoliert. Diese Proben werden zunächst enzymatisch aufgelöst, um die DNA-Moleküle aus den Zellen freizusetzen. Im Anschluss wird die DNA von den übrigen Bestandteilen abgetrennt und steht dann für die PCR-Analyse zur Verfügung.

(2) PCR

Im zweiten Teil erfolgt eine PCR mit Tierart-spezifischen PCR-Primern. Diese Primer sind so konstruiert, dass sie nur mit der DNA einer bestimmten Tierart (Rind, Schwein, Huhn oder Pute) PCR-Produkte bilden, sofern sich diese in der Probe befinden. Es spielt keine Rolle, ob weitere Tierarten in den Lebensmitteln verarbeitet wurden.

(3) Gel-Elektrophorese

Im dritten Teil wird überprüft, ob Tierart-spezifische PCR-Produkte gebildet wurden, d.h. ob eine bestimmte Tierart in der untersuchten Probe verarbeitet worden ist. Die Prüfung erfolgt mittels Agarose-Gel-Elektrophorese, wonach synthetisierte PCR-Produkte durch Anfärbung sichtbar gemacht und dokumentiert werden können.

Als Untersuchungsmaterial eignen sich gängige rohe, gebrühte und gekochte Produkte. Bis zu einer Nachweisgrenze von ca. 0,5% lassen sich die 4 Tierarten Rind, Schwein, Huhn und Pute in Produkten identifizieren.

Die gesamte Untersuchung kann auf drei bis vier verschiedene Unterrichtseinheiten aufgeteilt werden. Sowohl nach der DNA-Isolation als auch nach der PCR können die Proben beliebig lange eingelagert werden, so dass bei der Durchführung im Unterricht eine große Flexibilität gegeben ist.



Bestandteile des Tierart-Kit SK1-12

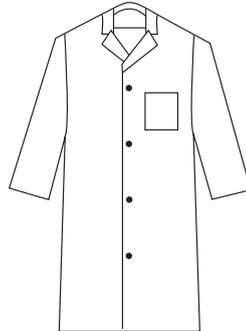
(für 3 mal je 4 Gruppen)

(1) DNA-Isolation

(für 12 Isolationen)

- Säulen inkl. Auffanggefäße (12 Stück)
- Zusätzliche Auffanggefäße (24 Stück)

-  Lysepuffer A (14 ml)
-  Proteinase K (260 µl)
-  Bindepuffer B (7 ml)
-  Waschpuffer C (6 ml)
-  Waschpuffer D (9 ml)
-  Elutionspuffer E (2 ml)



Da die oben angegebenen Binde- und Waschpuffer Detergentien bzw. Guanidin enthalten, muss Schutzkleidung (Laborkittel, Handschuhe, Schutzbrille) getragen werden.

(2) PCR-Reaktionen

(für je 3 PCR-Nachweise von Rind-, Schwein, Huhn- und Puten-DNA und den zugehörigen Positiv- und Negativ-Kontrollen)

- Kontroll-DNA von Rind, Schwein, Huhn und Pute: je 20 µl
- Reaktionsmix (bestehend aus DNA-Polymerase, MgCl₂, Puffer, dNTPs): 1,8 ml
- PCR-Primer von Rind, Schwein, Huhn und Pute: je 50 µl
- H₂O (steril): 1 ml

(3) Gel-Elektrophorese

(Auswertung der Untersuchung)

- Gel-Ladepuffer (6fach-konzentriert) für die Gel-Elektrophorese: 120 µl
- DNA-Längenstandard (ausreichend für 12 Agarose-Gele á 15 µl DNA-Längenstandard): 200 µl
- DNA-Färbelösung (200fach-konzentriert): 6 ml
- Agarose: 6 g
- TAE-Elektrophoresepuffer (25fach-konzentriert): 5 x 20 ml

Lagertemperatur beachten!

Wichtig: Säulen, Auffanggefäße und Puffer für die DNA-Isolierung sind bei Raumtemperatur, alle anderen Lösungen und Referenzen sind bei -18°C zu lagern!

Erforderliche Ausstattung

In der folgenden Tabelle sind Geräte, Materialien und Chemikalien aufgeführt, die für die Untersuchungen benötigt werden, aber *nicht* im Kit enthalten sind!

	optimale Ausstattung	Alternative
Geräte	Laborwaage (bis 1 mg)	Abschätzung der Menge (2–5 mm ³)
	Tisch-Zentrifuge für 1,5 ml oder 2,0 ml Reaktionsgefäße (mind. bis 10.000 x g)	
	Wasserbad (bis 70°C) mit Thermometer	
	Probenmischer (z.B. Vortex)	Mischen per Hand: längere Zeit mit dem Finger anschnipsen und auf den Labortisch klopfen
	PCR-Thermocycler (möglichst mit Deckelheizung)	3 Wasserbäder + Öl zum Überschichten der PCR-Ansätze
	Agarose-Gel-Apparatur + Spannungsgerät mit geglätteter Gleichspannung	
	Digitalkamera + Durchlichtgerät	
	Gefrierfach / -schrank -18 °C	
	Mikrowelle (600 W für 1–3 min)	Herdplatte + Kochtopf
Sonstiges Labormaterial	Kittel, Einmalhandschuhe, Laborbrille	
	Küchenkrepp	
	Petrischalen + Skalpelle	Untertasse o.ä., kleines Küchenmesser
	Mikropipette 20 µl, verstellbar	
	Mikropipette 100 µl, verstellbar	
	Mikropipette 1000 µl, verstellbar	mehrfach mit 100 µl-Pipette pipettieren
	1,5 ml Reaktionsgefäße, steril	
	PCR-Reaktionsgefäße (steril), passend zum Thermocycler	
	Pipettierspitzen für Mikropipetten, steril (für die PCR-Ansätze im Idealfall mit Filter)	
	Ständer für Reaktionsgefäße	Selbstanfertigung aus Schaumgummi, Styropor o.ä.
	Erlenmeyerkolben (ca. 100 ml)	
	Messzylinder (ca. 40 ml)	
	Mikrotiterplatten	Reaktionsgefäße
	Färbeschale für das Gel	
	Küchen-Pfannenwender für die Entnahme der Gele	
	Abfallbehälter	
	<ul style="list-style-type: none"> • Zur Reinigung der Arbeitsflächen: Spülmittel und Ethanol (70%ig) • Für die Auswertung: Lineal, Millimeterpapier und halblogarithmisches Papier 	

Hinweis: Die im Handel erhältlichen Kunststoffartikel sind produktionssteril und müssen nicht zusätzlich sterilisiert werden.

Hier ist eine kleine Auswahl von Herstellern aufgelistet, die oben genannte Geräte, Materialien und Chemikalien vertreiben:

CONATEX-DIDACTIC Lehrmittel GmbH, Internet: www.conatex.com

Biozym Diagnostik GmbH, Steinbrinksweg 27, D-31833 Hessisch Oldendorf
Tel.: +49 (0) 5152 / 9020, FAX: +49 (0) 5152 / 2070, Internet: www.biozym.com

Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstraße 1-5, D-76185 Karlsruhe
Tel.: +49 (0) 721 / 56060, FAX: +49 (0) 721 / 5606149, Internet: www.carlroth.de

Untersuchungsmaterial und Gruppenarbeit

Die Durchführung der Analysen kann beispielsweise in 4 Gruppen erfolgen, wobei jede Gruppe eine mitgebrachte Fleisch-, Wurst- oder Käseprobe auf eine der Tierarten Rind, Schwein, Huhn oder Pute untersucht.

Gruppe 1 untersucht eine Probe auf Rind-DNA (Probe 1)

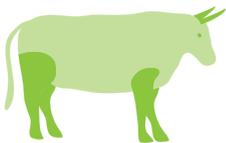
Gruppe 2 untersucht eine Probe auf Schweine-DNA (Probe 2)

Gruppe 3 untersucht eine Probe auf Huhn-DNA (Probe 3)

Gruppe 4 untersucht eine Probe auf Puten-DNA (Probe 4)

Mit einem Kit kann die Untersuchung in der beschriebenen Form insgesamt dreimal durchgeführt werden. Es ist natürlich auch möglich, pro Gruppe gleichzeitig 2 oder 3 Proben zu untersuchen. Bei gleichzeitiger Bearbeitung mehrerer Proben pro Gruppe sollten jedoch schon Erfahrungen im Umgang mit den Geräten und im Arbeiten mit einer Mikropipette vorhanden sein.

Als Proben für die Untersuchung bieten sich folgende Produkte an:



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

Praktische Grundlagen

Arbeiten mit Mikropipetten

Da die Pipettierschritte der Untersuchungen unter Verwendung von Mikropipetten durchgeführt werden sollten, ist der Umgang damit vor dem eigentlichen Versuch zu üben. So wird nicht nur sichergestellt, dass die richtigen Volumina eingesetzt werden, sondern es reduziert sich auch der Zeitbedarf für die Pipettierschritte.

Hinweis:

Das Pipettieren kann mit verdünnter Tinte geübt werden. So haben die Schüler zu Beginn des Pipettierens eine gute optische Kontrolle ihrer Tätigkeit.

Um das Befüllen der Taschen eines Agarose-Gels einzuüben, wird anteilig der beiliegende 6fach-konzentrierte Ladepuffer mit H₂O (10 µl Puffer + 50 µl H₂O) verdünnt und in die nicht für die eigentlichen Elektrophorese der PCR-Produkte benötigten Taschen pipettiert.

Für die Teilschritte „DNA-Isolation“ und „Gel-Elektrophorese“ können normale sterile Spitzen verwendet werden. Für die PCR-Ansätze sollten (im Idealfall) Spitzen mit Filter verwendet werden, um Kontaminationen zu vermeiden.



Aufbau der Mikropipette

Mikropipetten werden von vielen verschiedenen Herstellern angeboten. Meist werden Pipetten verwendet, die variable Füllmengen zulassen. So sind beispielsweise Pipetten im Handel, die für Volumina von 2–20 µl, 5–100 µl oder 100–1000 µl geeignet sind.

Für die experimentelle Durchführung sind drei Pipetten mit unterschiedlichen, maximalen Pipettierervolumina notwendig:

- | | | |
|----|----------------------------------|---------|
| 1. | Pipette bis zu einem Volumen von | 20 µl |
| 2. | -----"----- | 100 µl |
| 3. | -----"----- | 1000 µl |

Die Pipetten werden immer mit aufgesteckten, passenden Spitzen verwendet.

Jede Spitze darf nur einmal benutzt werden!

Die aufgesteckte Spitze ist steril und darf daher nur mit der zu pipettierenden Lösung in Berührung kommen. Pipetten mit gefüllter Spitze dürfen nicht auf dem Tisch abgelegt werden, da sonst Flüssigkeit in die Pipettenschäfte eindringt. Die Pipettenspitze darf auf keinen Fall mit den Fingern in Kontakt kommen, da die Haut DNAsen enthält, die die Versuchsansätze zerstören.

Nach dem Gebrauch werden die Spitzen in einem Abfallbehälter für die Entsorgung gesammelt.

Pipettierschema

1. Gewünschtes Volumen durch Drehen am Bedienungsknopf einstellen.
2. Spitze aufstecken.
3. Bedienungsknopf bis zum **1. Druckpunkt** herunterdrücken und festhalten.
4. Spitze in die Lösung halten.
5. Bedienungsknopf langsam loslassen, die Spitze füllt sich.
6. Spitze an die Wand des zu füllenden Reaktionsgefäß halten.
7. Bedienungsknopf langsam bis zum **2. Druckpunkt** herunterdrücken und festhalten, Spitze leert sich.
8. Spitze mit *gedrücktem* Bedienungsknopf aus dem Gefäß herausziehen.
9. Bedienungsknopf loslassen und Pipette über Abfallbehälter halten.
10. Spitzenabwerfer herunterdrücken und Spitze abwerfen.

Versuchsablauf und Zeitschema

Die folgende Tabelle gibt den ungefähren zeitlichen Ablauf der Untersuchung wieder. Der tatsächliche Zeitbedarf kann z.B. in Abhängigkeit von der Gruppengröße oder praktischem Vorwissen schwanken.

		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	
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

Das unten stehende Fließdiagramm skizziert einen möglichen Unterrichtsgang.

Beachten Sie bitte, dass die praktische Durchführung, wenn dies erforderlich ist, an verschiedenen Stellen unterbrochen und in späteren Stunden fortgeführt werden kann.

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 .



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 Ansätze bei 4°C .

Nach Aushärtung der Gele: Lagerung der Gele mit etwas Puffer in einer Folie bei 4°C .



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

Anmerkung: Unterrichtseinheiten 1 und 2 können auch als *eine* Unterrichtseinheit gestaltet werden!

Vorkenntnisse der Schüler

1. Aufbau eines DNA-Nukleotids und eines DNA-Makromoleküls.

(DNA-Nukleotid = Phosphatrest, Desoxyribose und eine Base z.B. Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin;
DNA-Makromolekül = 2 Polynukleotidstränge)

2. Grundlage des Zusammenhalts zwischen den 2 Polynukleotidsträngen und die Ladung des DNA-Makromoleküls in einer alkalischen Pufferlösung im elektrischen Feld.

(Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den gegenüberliegenden Basen; DNA-Makromolekül trägt negative Ladung aufgrund der Phosphorsäure)

3. Lokalisation der DNA bei Eukaryoten und Prokaryoten.

(Eukaryoten = DNA im Zellkern; Prokaryoten = DNA liegt ungeordnet in der Zelle vor)

4. Ablauf der Replikation im lebenden Organismus.

(Abschnittsweise reißverschlussartige Öffnung der wie eine Kordel verdrehten DNA; Verknüpfung der Bruchstellen nach der Entschraubung; Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen durch das Enzym Helicase; Anlagerung der komplementären Nukleotide an die freigewordenen DNA-Abschnitte; Katalysierung der Reaktion durch das Enzym DNA-Polymerase; als Bindungs- und Startstelle wird ein Primer benötigt, der durch das Enzym Primase hergestellt wird; DNA-Synthese erfolgt in 5' → 3' – Richtung, daher an einem Strang kontinuierliche Synthese, am anderen Strang fragmentweise; Verknüpfung der Fragmente durch das Enzym DNA-Ligase)

5. Entwicklungsjahr und Erfinder der Polymerasekettenreaktion = polymerase chain reaction = PCR.

(1983 durch Kary B. Mullis)

6. Einsatz und Funktion der in der PCR benötigten Substanzen.

(Vorlagen-DNA = Template-DNA; hitzestabile DNA-Polymerase z.B. *Taq*-Polymerase; desoxyribo-Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotide = Forward- und Reverse-Primer)

7. Ablauf und korrekte Bezeichnung der einzelnen Schritte innerhalb eines PCR-Zyklus.

(Aufschmelzen/Auftrennen der DNA-Makromoleküle = Denaturierung; Primer-Anlagerung = Hybridisierung = Annealing; DNA-Synthese = Kettenverlängerung = Elongation)

8. Richtige Bezeichnung des erhaltenen Ergebnisses.

(PCR-Produkt = Ziel-DNA = Target-DNA)

Lernziele der Schüler

1. Einen bestätigenden Versuch durchführen, der die Phasen:
 - a) Fragestellung / Hypothesenbildung
 - b) Planung und Versuchsaufbau
 - c) Versuchsdurchführung
 - d) Registrieren des beobachtbaren Ergebnisses
 - e) Auswertung bzw. Interpretation des Ergebnisses, Möglichkeit des Transfers beinhaltet.
2. Die Replikation und die PCR hinsichtlich ihrer Gemeinsamkeiten und Unterschiede vergleichen können.
3. Die korrekte Bezeichnung und die Funktion der Komponenten einer PCR wiedergeben.
4. Die korrekte Bezeichnung und die Funktion der einzelnen Schritte eines PCR-Zyklus wiedergeben.
5. Die Visualisierung der DNA in einem Agarose-Gel darstellen.
6. Den Versuch anhand des Schülerheftes eigenständig unter Berücksichtigung der Sicherheitshinweise durchführen.
7. Bei Versuchsaktivitäten wie Zentrifugation der Proben und PCR-Reaktionen im Thermocycler eine Absprache mit den Mitschülern zur gemeinsame Benutzung der Gerätschaften treffen (Kooperation, Teamarbeit).
8. Eine korrekte Abschätzung der visualisierten DNA-Bandengrößen vornehmen.
9. Die Wanderungsstrecken der Gelbanden mit Hilfe eines Lineals ausmessen.
10. Ein Diagramm erstellen für den DNA-Längenstandard mit der X-Achse „Wanderungsstrecke [mm]“ und der Y-Achse „Basenpaare [bp]“.
11. Eine korrekte DNA-Bandengrößenbestimmung der eigenen PCR-Produkte anhand des erstellten Diagramms vornehmen.
12. Ergebnisse objektiv, also wahrheitsgemäß, ermitteln und an die Mitschüler weitergeben.
13. Die Erkenntnis gewinnen, dass die vier Tierarten Rind, Schwein, Huhn und Pute mittels PCR aus verarbeiteten, tierischen Lebensmittel nachzuweisen sind.
14. Nach Ende des Versuchs die Entsorgung der Gebrauchsmaterialien gemäß den Angaben durchführen, um die Gefährdung des eigenen Lebens bzw. anderer Menschen zu vermeiden.

Arbeitsblatt 1 (Aufgaben für den Schüler)

DNA-Isolation

- 1) Nennen Sie die Bausteine eines DNA-Nukleotids.
- 2) Nennen Sie die Bausteine eines DNA-Makromoleküls und erläutern Sie dessen Zusammenhalt.
- 3) Erläutern Sie begründet, warum Sie Ihre mitgebrachte Probe nicht direkt in die PCR einsetzen.

PCR

- 1) Begründen Sie den Einsatz der PCR.
- 2) Nennen Sie die Komponenten, die in der PCR benötigt werden.
- 3) Nennen Sie die Schritte in einem PCR-Zyklus und erläutern Sie deren Funktion.

Gel-Elektrophorese

- 1) Begründen Sie die elektrische Ladung eines DNA-Makromoleküls in einer alkalischen Pufferlösung und erläutern Sie die Wanderungsrichtung des DNA-Makromoleküls im elektrischen Feld.
- 2) Nachdem die PCR-Produkte in die Geltaschen pipettiert werden, wandern sie durch die Gelmatrix. Begründen Sie die Wanderungsgeschwindigkeiten von großen und kleinen Produkten und leiten Sie daraus ab, an welcher Stelle die jeweiligen Produkte auf dem Agarose-Gel zu finden sind.
- 3) Beschreiben Sie die Visualisierung der DNA im Agarose-Gel.

Arbeitsblatt 1 (Musterlösungen für die Lehrkraft)

DNA-Isolation

- 1) Nennen Sie die Bausteine eines DNA-Nukleotids.

Ein DNA-Nukleotid besteht aus einem Phosphatrest, einer Desoxyribose und einer Base (Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin).

- 2) Nennen Sie die Bausteine eines DNA-Makromoleküls und erläutern Sie dessen Zusammenhalt.

Ein DNA-Makromolekül besteht aus zwei Polynukleotidsträngen, die über die Wasserstoffbrücken der sich gegenüberliegenden Basen zusammengehalten werden.

- 3) Erläutern Sie begründet, warum Sie Ihre mitgebrachte Probe nicht direkt in die PCR einsetzen.

Die Probe enthält Proteine und Fette, die eine PCR stören und die DNA liegt nicht frei in der Probe vor, sondern muss erst aus den Zellen isoliert werden.

PCR

- 1) Begründen Sie den Einsatz der PCR.

Da die DNA in geringer Menge vorliegt, muss sie in großer Menge vermehrt werden, um sie mittels Gel-Elektrophorese mit anschließender Färbung nachweisen zu können.

- 2) Nennen Sie die Komponenten, die in der PCR benötigt werden.

Es werden ein Template (eine Vorlagen-DNA), eine hitzestabile DNA-Polymerase (Enzym), (desoxyribo-) Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, Vorwärts- und Rückwärts-Primer und eine Pufferlösung benötigt.

- 3) Nennen Sie die Schritte in einem PCR-Zyklus und erläutern Sie deren Funktion.

Ein PCR-Zyklus besteht aus 3 Schritten:

Im 1. Schritt werden die Wasserstoffbrücken der sich gegenüberliegenden Basen bei 94°C aufgebrochen und es entstehen komplementäre Einzelstränge der DNA = Denaturierung.

Im 2. Schritt binden die beiden Primer bei Temperaturen zwischen 40 bis 60°C an den jeweiligen komplementären Einzelstrang der DNA = Annealing.

Im 3. Schritt synthetisiert die DNA-Polymerase bei 72°C von den 3'OH-Enden der Primer ausgehend Template-abhängige neue DNA-Stränge (Ziel-DNA = Target-DNA) = Elongation.

Gel-Elektrophorese

- 1) Begründen Sie die elektrische Ladung eines DNA-Makromoleküls in einer alkalischen Pufferlösung und erläutern Sie die Wanderungsrichtung des DNA-Makromoleküls im elektrischen Feld.

Ein DNA-Makromolekül ist negativ geladen aufgrund der freien negativen Ladungen der Phosphatreste und wandert daher zum Pluspol (Anode).

- 2) Nachdem die PCR-Produkte in die Geltaschen pipettiert werden, wandern sie durch die Gelmatrix. Begründen Sie die Wanderungsgeschwindigkeiten von großen und kleinen Produkten und leiten daraus ab, an welcher Stelle die jeweiligen Produkte auf dem Agarose-Gel zu finden sind.

Die kleineren Produkte wandern am schnellsten und befinden sich am Ende des Gels, da sie bei ihrer Wanderung durch die Gelmatrix den geringsten Widerstand erfahren. Die größeren Produkte wandern langsamer wegen des größeren Widerstandes und befinden sich am oberen Ende des Gels.

- 3) Beschreiben Sie die Visualisierung der DNA im Agarose-Gel.

Nach der Gel-Elektrophorese wird ein Farbstoff, z.B. Methylenblau, auf das Gel gegeben, der sich an die DNA bindet und dadurch die Banden sichtbar macht.

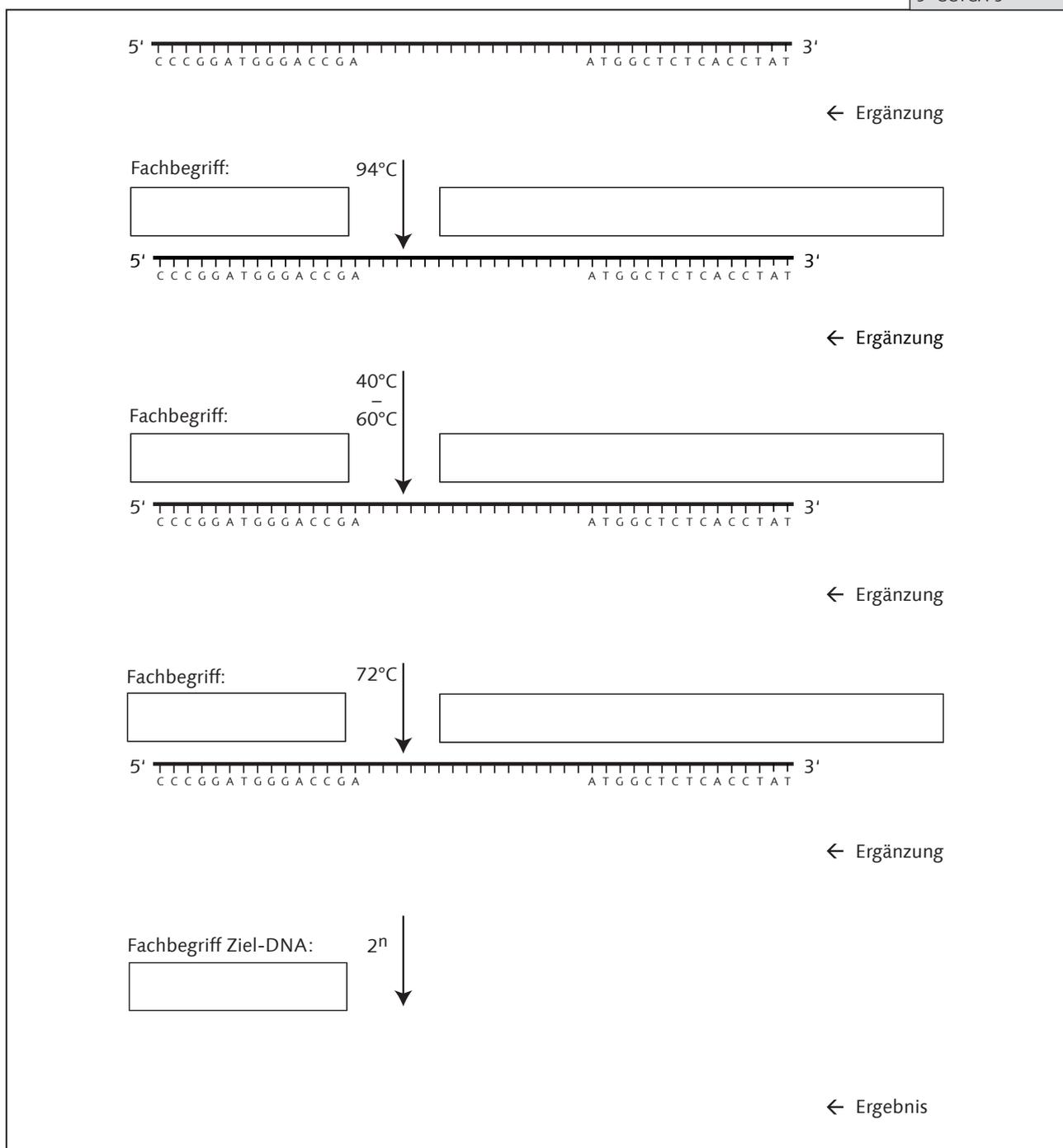
Arbeitsblatt 2 (Aufgaben für den Schüler)

Unten ist ein unvollständiger PCR-Zyklus schematisch abgebildet:

- Ergänzen Sie die fehlenden DNA-Abschnitte in dem PCR-Schema unter Verwendung der Modell-Primer A und B.
- Benennen Sie die Schritte eines PCR-Zyklus mit den internationalen Fachbegriffen in den zugehörigen Kästchen.
- Tragen Sie die Funktion dieser Schritte in den zugehörigen Kästchen ein.
- Nach 2^n Zyklen entstehen als Ergebnis der PCR viele DNA-Fragmente. Nennen Sie den internationalen Fachbegriff dieser Ziel-DNA.
- Zeichnen Sie als letztes die Ziel-DNA des gewählten Beispiels ein.

Primer A (Vorwärts)
5'-GGATG-3'

Primer B (Rückwärts)
5'-GGTGA-3'



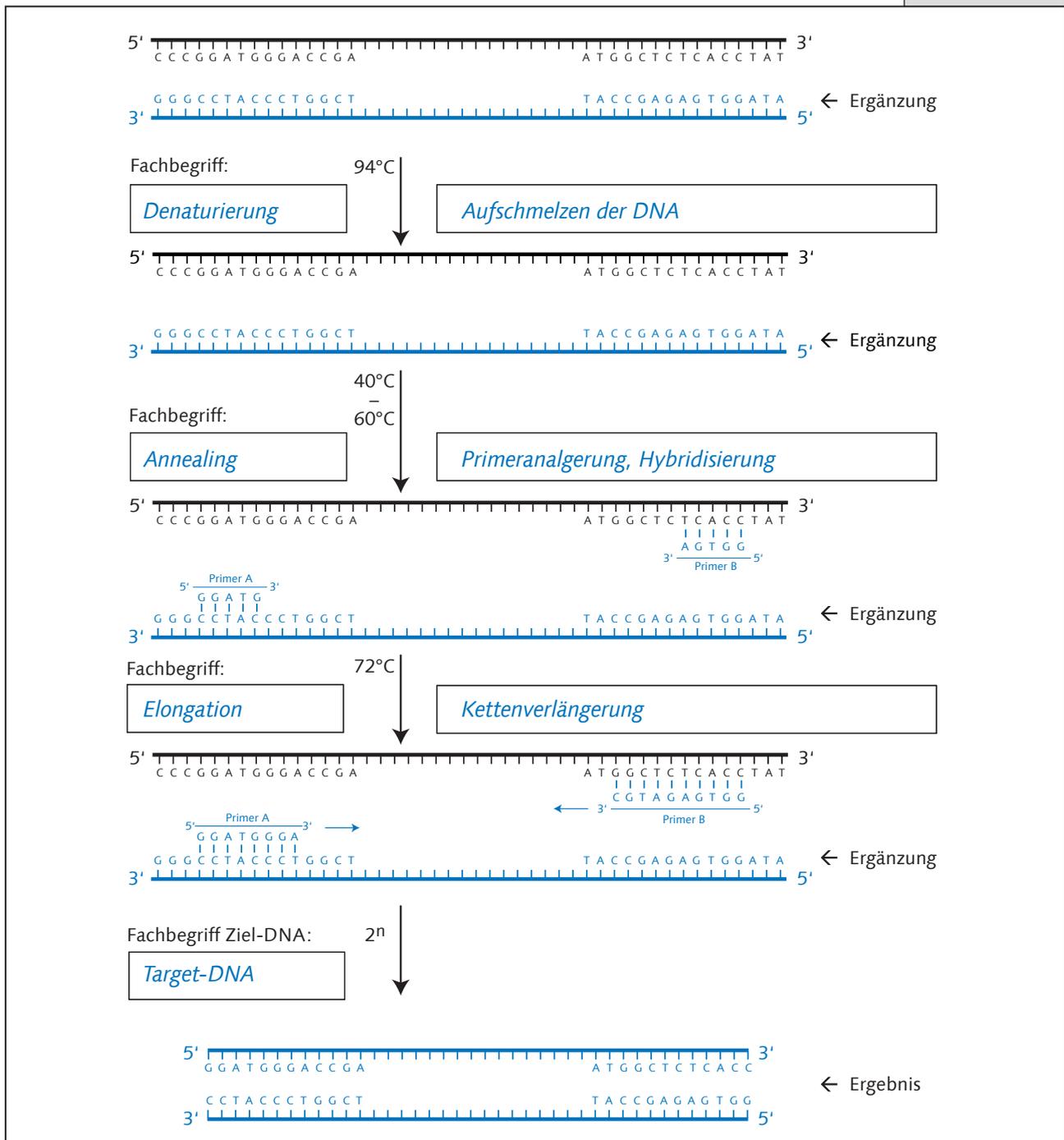
Arbeitsblatt 2 (Musterlösungen für die Lehrkraft)

Unten ist ein unvollständiger PCR-Zyklus schematisch abgebildet:

- Ergänzen Sie die fehlenden DNA-Abschnitte in dem PCR-Schema unter Verwendung der Modell-Primer A und B.
- Benennen Sie die Schritte eines PCR-Zyklus mit den internationalen Fachbegriffen in den zugehörigen Kästchen.
- Tragen Sie die Funktion dieser Schritte in den zugehörigen Kästchen ein.
- Nach 2^n Zyklen entstehen als Ergebnis der PCR viele DNA-Fragmente. Nennen Sie den internationalen Fachbegriff dieser Ziel-DNA.
- Zeichnen Sie als letztes die Ziel-DNA des gewählten Beispiels ein.

Primer A (Vorwärts)
5'-GGATG-3'

Primer B (Rückwärts)
5'-GGTGA-3'

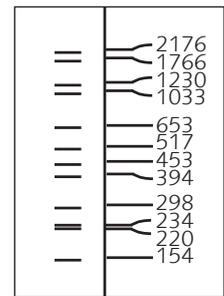


Arbeitsblatt 3

Bestimmung der Fragmentgrößen:

a) Abschätzen der Größe des PCR-Produktes mit Hilfe des DNA-Längenstandards

Der DNA-Längenstandard enthält 10 Einzelbanden und eine Doppelbande mit den entsprechenden Größen in Basenpaaren (siehe Bild rechts). Durch Vergleich der Laufstrecken aller untersuchten Tierart-PCR-Produkte, also auch die von Ihren Mitschülern, mit den Banden des DNA-Längenstandards lassen sich die ungefähren Größen (in Basenpaaren = bp) abschätzen.



Ergebnisse:

Das PCR-Produkt „Rind“ hat etwa eine Größe von bp.

Das PCR-Produkt „Schwein“ hat etwa eine Größe von bp.

Das PCR-Produkt „Huhn“ hat etwa eine Größe von bp.

Das PCR-Produkt „Pute“ hat etwa eine Größe von bp.

b) Grafische Ermittlung der Fragmentgröße

Genauer kann die Größe einer PCR-Bande aufgrund der im elektrischen Feld zurückgelegten Wanderungsstrecke bestimmt werden:

Mit einem Lineal oder Millimeterpapier wird die Wanderungsstrecke der jeweiligen PCR-Bande ausgemessen. Dafür messen Sie die Strecke (in Millimetern) von der Unterkante der Geltasche bis zur Mitte der entsprechenden PCR-Bande und tragen sie in die Tabelle auf der Seite 17 ein. Dafür werden zuerst die Wanderungsstrecken der Banden 1 bis 11 des DNA-Längenstandards ausgemessen und in die Tabelle eingetragen. Nun tragen Sie für die Banden 1 bis 11 die Wanderungsstrecken in Abhängigkeit von den Basenpaaren sowohl auf Millimeterpapier als auch auf halblogarithmischem Papier auf. Verbinden Sie mit einem Lineal die Datenpunkte in allen Diagrammen mit einer Linie und verlängern diese bis zur rechten Seite des Diagramms. Jetzt messen Sie die Wanderungsstrecken aller untersuchten Tierart-PCR-Produkte aus, also auch die von Ihren Mitschülern, und bestimmen nun mit Hilfe der gezeichneten Kurve bzw. Geraden und der zurückgelegten Wanderungsstrecke die Größe des jeweiligen PCR-Produktes.

Ergebnisse:

Die Größe des PCR-Produktes „Rind“ beträgt nach grafischer Ermittlung bp.

Die Größe des PCR-Produktes „Schwein“ beträgt nach grafischer Ermittlung bp.

Die Größe des PCR-Produktes „Huhn“ beträgt nach grafischer Ermittlung bp.

Die Größe des PCR-Produktes „Pute“ beträgt nach grafischer Ermittlung bp.

Hinweis: Ein Gel mit den DNA-Banden aller 4 Tierart-PCR-Produkte im Vergleich zum DNA-Längenstandard ist auf Seite 27 abgebildet.

XXXX



Bande Nr.	DNA- Längenstandard		PCR-Produkt „Rind“		PCR-Produkt „Schwein“		PCR-Produkt „Huhn“		PCR-Produkt „Pute“	
	Strecke [mm]	Größe [bp]	Strecke [mm]	Größe [bp]	Strecke [mm]	Größe [bp]	Strecke [mm]	Größe [bp]	Strecke [mm]	Größe [bp]
1		2176								
2		1766								
3		1230								
4		1033								
5		653								
6		517								
7		453								
8		394								
9		298								
10		234 / 220								
11		154								

DNA-Isolation

Im ersten Schritt wird hochmolekulare DNA aus einem kleingeschnittenen Teil der Probe isoliert. Zunächst werden die Zellen, die die DNA enthalten, in den Proben lysiert und im Anschluss erfolgt die eigentliche DNA-Isolierung. Dazu wird das Lysat auf eine Säule gegeben, die spezifisch die DNA bindet. In zwei Waschschrritten werden alle Probenbestandteile – außer der DNA – entfernt. Zum Schluss wird die gereinigte DNA von der Säule abgelöst und aufgefangen. Bis auf die Reaktionsgefäße sind alle für die DNA-Isolierung erforderlichen Lösungen, Säulen und Auffanggefäße im Tierart-Kit SK1-12 enthalten.

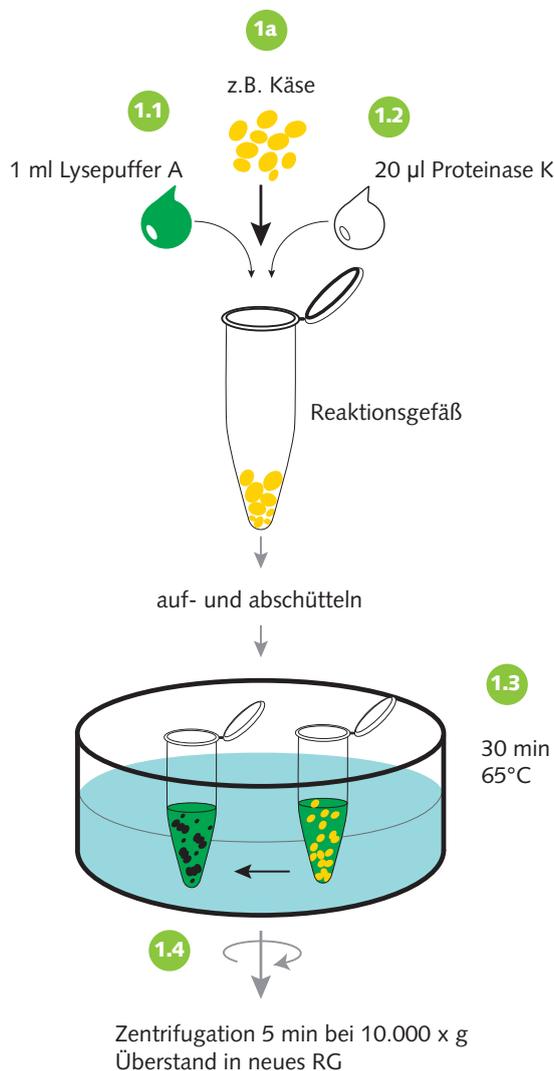
Wichtig: Alle Puffer müssen vor der Verwendung vollkommen klar sein. Eventuell ausgefallene Bestandteile – sichtbar durch milchige Trübung und Schlierenbildung – werden durch Erwärmen bei ca. 37 °C aufgelöst. Der Elutionspuffer E sollte vor der Verwendung auf ca. 80 °C erwärmt werden, um die DNA-Ausbeute bei der Isolation zu erhöhen.

Um Kontaminationen zu vermeiden, müssen alle verwendeten Geräte und Arbeitsflächen vor Beginn des Versuchs mit Einmalpapier sorgfältig gereinigt werden. Dafür zunächst warmes Wasser mit etwas Spülmittel und anschließend Ethanol (70%) verwenden.

Um Verunreinigungen durch DNA-Verschleppung zu verhindern, ist – insbesondere bei gleichzeitiger Bearbeitung mehrerer Proben – das Tragen von Einmalhandschuhen zu empfehlen.

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte ausführlich beschrieben. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollte die Anleitung zunächst vollständig durchgelesen und besprochen werden.

(1) Vorbereitung und Lyse der mitgebrachten Produkte



1a. Feste Lebensmittelpunkte (z.B. Wurst oder Käse) wird vorbereitet:

Um ein repräsentatives Untersuchungsergebnis zu erhalten, wird zunächst eine größere Menge an Probenmaterial aus verschiedenen Probenbereichen homogenisiert. Anschließend werden 100–200 mg (ca. 2–5 mm³) des vorbereiteten Probenmaterials in ein Reaktionsgefäß (RG) überführt.

1b. Flüssige Lebensmittelpunkte (z.B. Milch) wird vorbereitet:

Zur Untersuchung von Milch werden 5 ml Probe für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert und das Sediment zur weiteren Untersuchung eingesetzt.

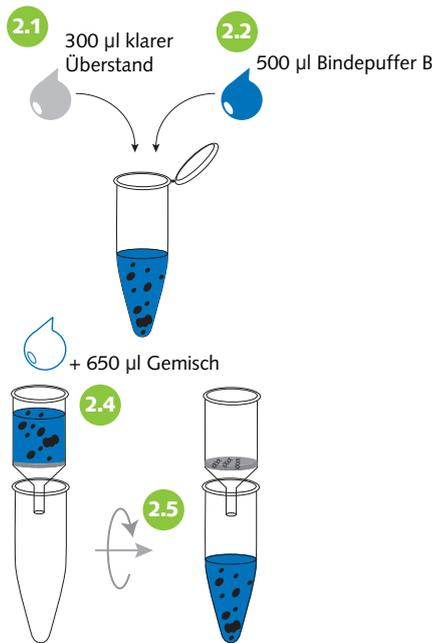
1.1 Zum RG mit Probe 1a oder 1b werden **1 ml klarer Lysepuffer A** und

1.2 20 µl Proteinase K-Lösung gegeben. Der Deckel des RGs wird geschlossen, das RG wird zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten und mehrfach auf- und abgeschüttelt.

1.3 Das RG wird für 30 min im Wasserbad bei 65°C inkubiert und dabei ab und zu auf- und abgeschüttelt.

1.4 Die lysierte Probe wird für 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert, um nicht-lysierte Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wird in ein neues RG pipettiert.

(2) Gewinnung der DNA aus den lysierten Produkten



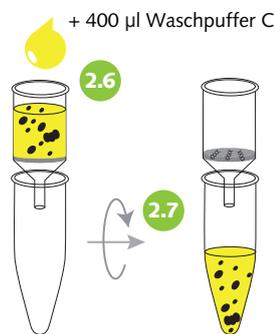
2.1 300 µl des relativ klaren Überstandes werden in ein neues 1,5 ml RG pipettiert.

2.2 Dazu werden 500 µl Bindepuffer B pipettiert und alles für 30 s **ohne Schaumbildung** kräftig gemischt.

2.3 Ein Auffanggefäß und eine Säule werden kombiniert und der Deckel der Säule mit der Gruppennummer beschriftet.

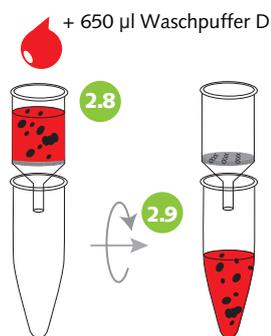
2.4 650 µl des Gemisches aus Überstand und Bindepuffer werden auf eine Säule inkl. Auffanggefäß pipettiert.

2.5 Die Säule inkl. Auffanggefäß wird für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Anschließend wird das Auffanggefäß inkl. Durchfluss verworfen.



2.6 Die Säule wird auf ein neues Auffanggefäß gesetzt und 400 µl Waschpuffer C werden hinzu pipettiert.

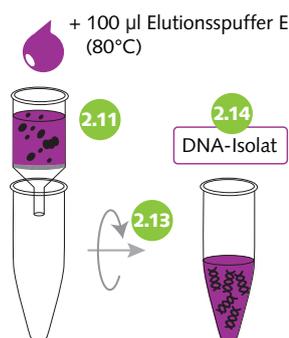
2.7 Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g (s.o.). Das Auffanggefäß inkl. Durchfluss wird verworfen.



2.8 Die Säule wird auf ein neues Auffanggefäß gesetzt und 650 µl Waschpuffer D werden hinzu pipettiert.

2.9 Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g (s.o.). Das Auffanggefäß inkl. Durchfluss wird verworfen.

2.10 Die Säule wird auf ein steriles und beschriftetes 1,5 ml RG gesetzt.



2.11 100 µl des auf 80°C erwärmten Elutionspuffer E werden auf die Säule pipettiert.

2.12 Das RG wird für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

2.13 Zentrifugation, 30 s bei 10000 x g, **Achtung:** jetzt wird nur die Säule verworfen.

2.14 Das Eluat im RG enthält die isolierte DNA.

2.15 Für die PCR wird die DNA in einem neuem RG 1:10 verdünnt (z.B.: 5 µl Eluat + 45 µl Elutionspuffer).

Das DNA-Isolat kann direkt für die PCR-Reaktion eingesetzt oder bei -18°C längerfristig gelagert werden.

PCR

Mit einem Teil der DNA-Isolate werden PCR-Reaktionen im Thermocycler durchgeführt. Hierbei werden die Tierart-spezifischen PCR-Primer eingesetzt, mit denen entweder Rind-, Schwein-, Huhn- oder Puten-DNA nachgewiesen wird.

Die PCR-Ansätze bestehen prinzipiell aus folgenden Komponenten:

- A) Reaktionsmix (besteht aus Pufferlösung, $MgCl_2$, *Taq*-Polymerase, dNTPs)
- B) PCR-Primer (Lösung mit jeweils 2 artspezifischen Oligonukleotiden)
- C) DNA aus Probe und DNA aus Positivkontrolle

Pro Arbeitsgruppe sollte auch eine Negativkontrolle durchgeführt werden. Dabei wird anstelle von DNA destilliertes Wasser im gleichen Volumen zugegeben.

Als sehr sensitive Methode erfordert die PCR eine entsprechende Sorgfalt. Daher ist im Pipettierbereich auf absolute Sauberkeit zu achten. Das Tragen von Einmalhandschuhen sowie die Verwendung von Pipettenspitzen mit Filtern sind unbedingt zu empfehlen. Weiterhin muss der Arbeitsbereich vor Beginn des Arbeitens gut gereinigt werden.

Um Verwechslungen zu vermeiden, müssen alle verwendeten Reaktionsgefäße wasserfest beschriftet werden. Sie sollten mit der Gruppenbezeichnung und der nachzuweisenden Tierart gekennzeichnet sein. Bei den PCR-Ansätzen müssen die Positiv- und Negativkontrolle und die Probe unterschieden werden.

Im Schulexperiment könnte die Aufteilung auf 4 Gruppen wie folgt aussehen:

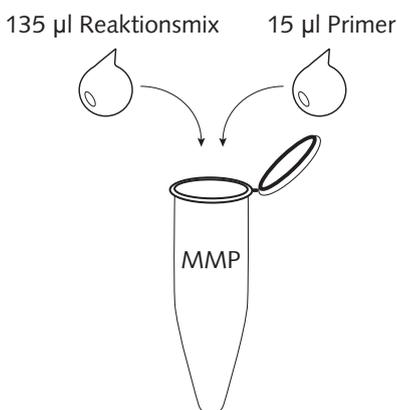
Gruppe 1 testet auf Rind und verwendet die Primer und die Kontroll-DNA „Rind“ aus dem Kit.

Gruppe 2 testet auf Schwein und verwendet die Primer und die Kontroll-DNA „Schwein“ aus dem Kit.

Gruppe 3 testet auf Huhn und verwendet die Primer und die Kontroll-DNA „Huhn“ aus dem Kit.

Gruppe 4 testet auf Pute und verwendet die Primer und die Kontroll-DNA „Pute“ aus dem Kit.

(3a) Herstellung des Mastermix inklusive Primer (MMP)



Ein steriles 1,5 ml RG wird mit „MMP“, dem Kürzel für die jeweilige Tierart



und der Gruppennummer beschriftet.

135 µl des Reaktionsmix werden in das beschriftete RG pipettiert.

15 µl Primer der jeweiligen Tierart werden hinzu pipettiert. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren werden die Lösungen vermischt.

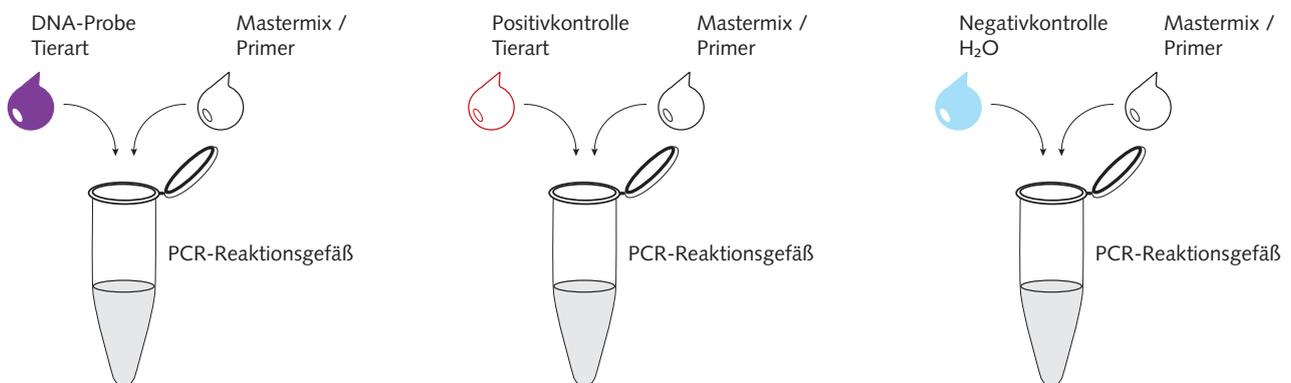
Die Flüssigkeit wird evtl. ganz kurz zentrifugiert oder es wird vorsichtig auf den Tisch geklopft, so dass sich die gesamte Flüssigkeit wieder am Boden des RGs befindet.

(3b) Herstellung der PCR-Ansätze

Jede Arbeitsgruppe beschriftet nun 3 PCR-Reaktionsgefäße (0,2 oder 0,5 ml; je nach Vorgabe des Thermocyclers) und pipettiert in der angegebenen Reihenfolge hinein:

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

***ACHTUNG:** Es wird immer neue sterile Spitze mit Filter benutzt und vorsichtig auf- und abpipettiert. Nach Zugabe der DNA wird das RG sofort verschlossen.



Wenn die PCR-Reaktionsgefäße aller Gruppen fertig sind, werden sie – nach Gruppen sortiert – in den Thermocycler gestellt und das PCR-Programm wird gestartet.

(4) PCR-Programmierung

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	∞

Die PCR-Produkte können entweder direkt für die Auftrennung in der Agarose-Gel-Elektrophorese verwendet werden oder bei 4 °C für Wochen gelagert werden (–18 °C für längerfristige Lagerung).

Gel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte werden in die Geltaschen pipettiert und die amplifizierten DNA-Fragmente im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt. Durch das Färben werden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und die entsprechende Tierart kann identifiziert werden.

Überlegungen zur Herstellung des Agarose-Gels

Die Größe der Elektrophoresekammer und die Anzahl der aufzutragenden Proben bestimmen die Größe des Agarose-Gels. Sind nur kleine Elektrophoresekammern vorhanden, müssen mehrere kleine Gele gegossen werden, sind nur große Kammern vorhanden, muss die Probenzusammenstellung sinnvoll erfolgen.

Für die hier durchgeführte Untersuchung werden pro Gruppe / Tierart 3 Probenaschen (4 Gruppen á 3 PCR-Ansätze = 12 Taschen) sowie 1 Tasche für den Längenstandard benötigt, also insgesamt 13 Geltaschen bei einem großen Gel!

Jede Elektrophoresekammer enthält einen Gelträger, dessen Maße die Menge an Agarose und das Volumen des Elektrophoresepuffers für das Gießen des Gels bestimmen.

Volumenberechnung [ml] des Elektrophoresepuffers zum Gießen des Gels:

Länge Gelträger [cm] x Breite Gelträger [cm] x Höhe Gel [cm]; dabei entsprechen $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$.

Die Höhe eines Gels beträgt gewöhnlich 0,4–0,5 cm.

Menge [g] an Agarose bei einem 1%igen Gel: $1/100 \times$ Volumen des Elektrophoresepuffers.

(5) Vorbereitung des Agarose-Gels

5.1 Der 25fach-konzentrierte TAE-Elektrophoresepuffer wird mit destilliertem Wasser verdünnt (1 ml TAE + 24 ml Wasser).

5.2 Der Gelträger wird nach der jeweiligen Betriebsanleitung vorbereitet. *Hier:* das obere und untere Ende des Gelträgers wird mit Tesafilm abgedichtet und das Band fest auf die Ecken des Gelträgers gedrückt, so dass keine Flüssigkeit austreten kann. Der Gelkamm wird bereit gelegt.

5.3 Die Agarosemenge wird für ein 1%iges Gel abgewogen und in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben.

5.4 Der 1fach-konzentrierte TAE-Puffer wird im Messzylinder abgemessen und in den Erlenmeyerkolben gegeben.

5.5 Die Agarose wird in der Mikrowelle oder im Topf mit kochendem Wasser solange erhitzt, bis sie vollständig aufgelöst und blasenfrei ist. In der Mikrowelle wird der Erlenmeyerkolben mehrmals alle 30 s vorsichtig geschwenkt. Zum Anfassen werden Küchenhandschuhe getragen.

Vorsicht: Die Agarose kann plötzlich durch Siedeverzug herauspritzen.

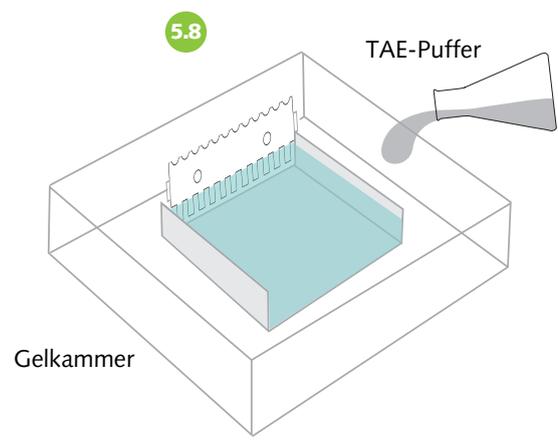
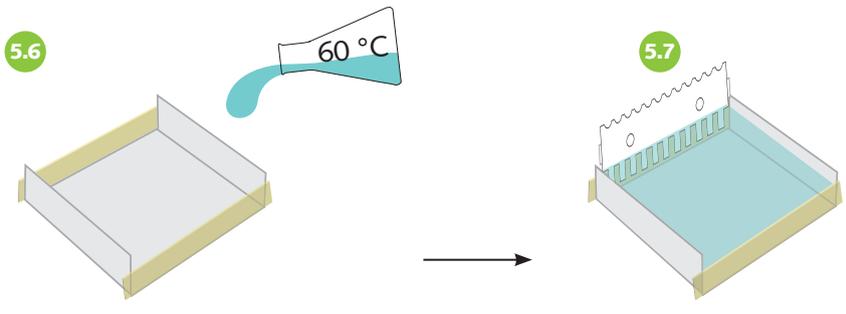
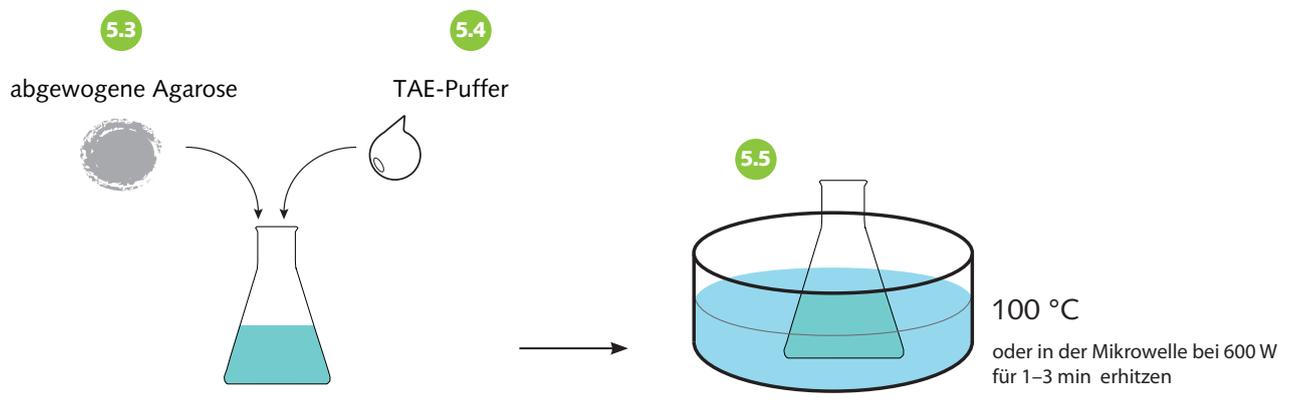
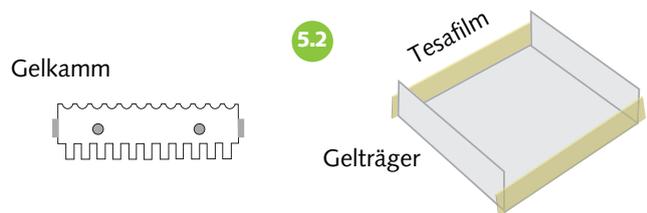
5.6 Die flüssige Agarose lässt man auf ca. 60°C abkühlen. Anschließend wird sie in den Gelträger gegossen.

5.7 Dann wird der Kamm gerade eingesteckt. Die Zähne des Kamms dürfen nicht den Boden des Gelträgers berühren. Es müssen sich Taschen mit Boden ausformen können. Die Agarose erstarren lassen (ca. 20 min). Das Gel erscheint trüb bzw. opak, wenn es gebrauchsfertig ist.

5.8 Der Gelträger mit fester Agarose und noch steckendem Kamm wird in die Gelkammer gelegt und vollständig mit TAE-Puffer überschichtet.

5.9 Erst danach wird der Kamm vorsichtig herausgezogen. Durch die Zähne des Kamms sind in der festen Agarose Geltaschen entstanden, in die später die Proben pipettiert werden.

ACHTUNG: Der gebrauchsfertige 1fach-konzentrierte TAE-Elektrophoresepuffer kann *mehrfach* verwendet werden, auch nach der Gel-Elektrophorese.



(6) Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

Dazu verwendet man entweder eine saubere Mikrotiterplatte oder jede Gruppe erhält drei nebeneinander stehende kleine Reaktionsgefäße.

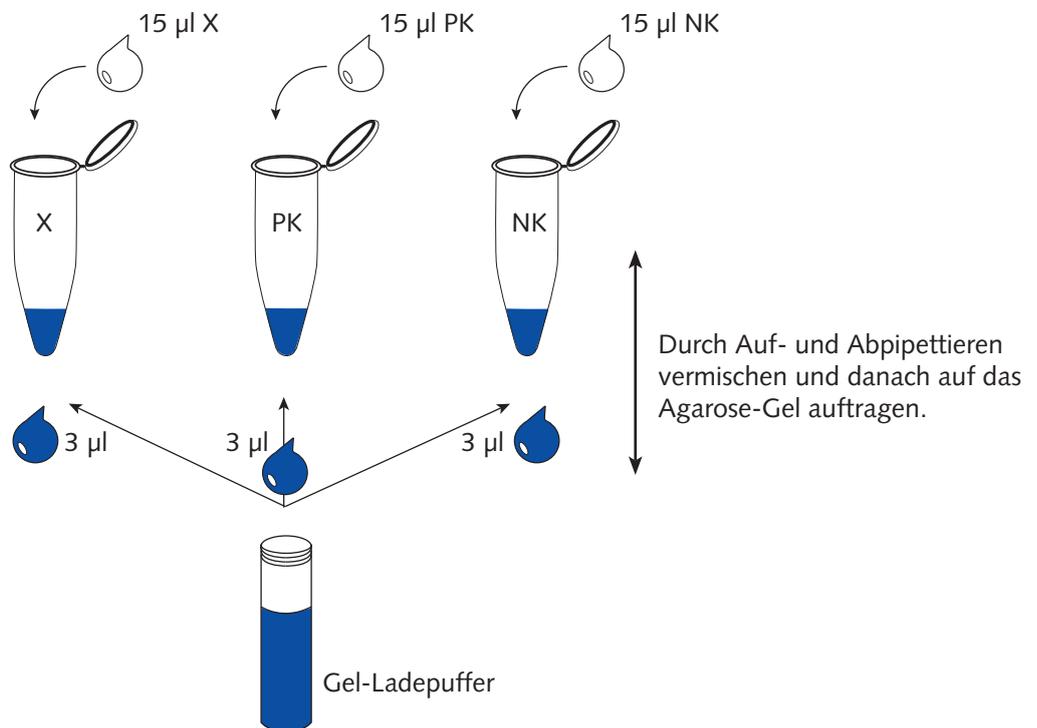
Hier die Beschreibung für die Benutzung von kleinen Reaktionsgefäßen:

Pro Gruppe bzw. pro Tierart werden 3 µl Gel-Ladepuffer in die entsprechende Anzahl von kleinen Reaktionsgefäßen (max. 4 Tierarten á 3 PCR-Ansätze) pipettiert.

Der Gel-Ladepuffer hat zwei Funktionen für die Elektrophorese:

1. beschwert der darin enthaltene Glycerin-Anteil die DNA-Lösung, so dass diese nach dem Einfüllen in die Geltaschen nicht wieder heraus diffundiert und
2. zeigt der enthaltene Farbstoff den Verlauf bzw. die Geschwindigkeit der Elektrophorese an.

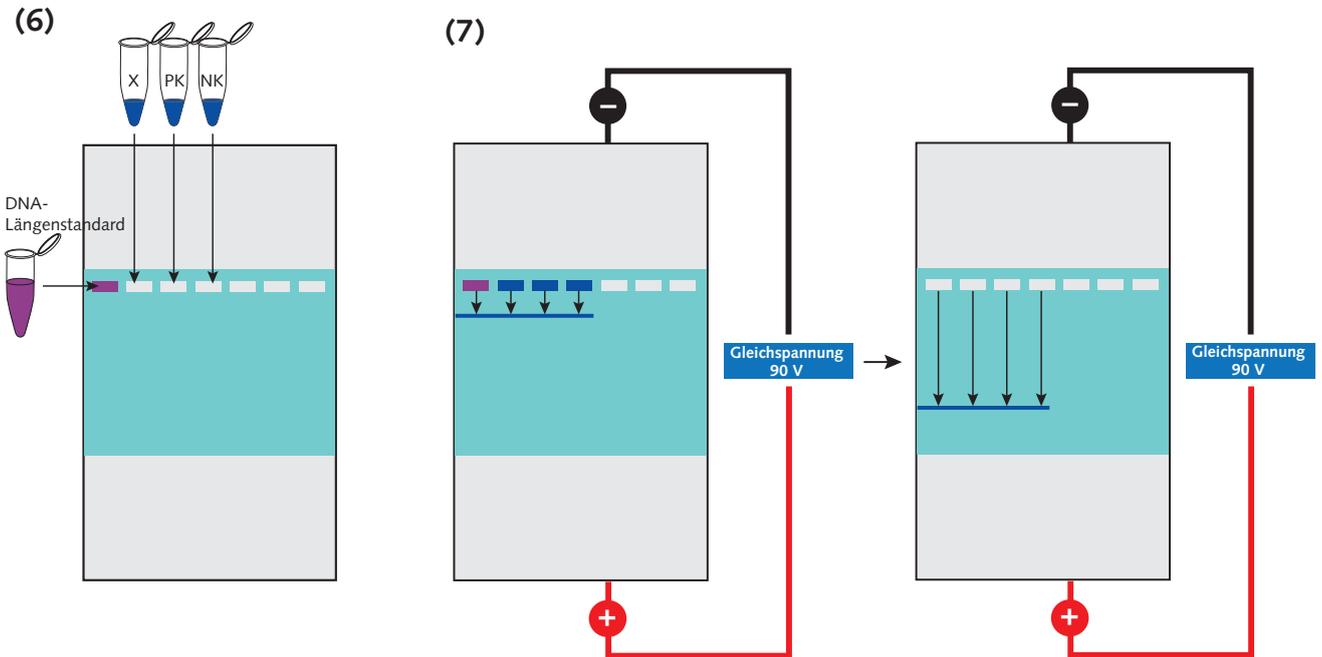
Die vorbereiteten Reaktionsgefäße werden entsprechend mit „X“ für die DNA aus Rind/Schwein/Huhn/Pute, mit „PK“ für die Positivkontrolle und „NK“ für die Negativkontrolle beschriftet. Anschließend werden 15 µl der jeweiligen PCR-Ansätze in die beschrifteten Reaktionsgefäße pipettiert.



Die entsprechend vorbereiteten Proben werden in einer protokollierten Reihenfolge in die Geltaschen pipettiert. Hierbei ist besonders darauf zu achten, dass die Taschen nicht überlaufen.

In eine Tasche (am Rand des Gels oder zwischen zwei Untersuchungsansätzen auf verschiedene Tierarten) wird zusätzlich der im Tierart-Kit SK1-12 enthaltene DNA-Längenstandard, in dem der Gel-Ladepuffer schon enthalten ist, pipettiert. Der Längenstandard ist gebrauchsfertig und es werden 15 µl aufgetragen.

Je nach Anzahl der Taschen auf einem Gel können die Proben der 4 Arbeitsgruppen auch verteilt auf 2 Gele aufgetragen werden. Die Untersuchungsansätze einer Tierart sollten aber praktischerweise auf einem Gel erfolgen und nicht auf mehrere Gele aufgeteilt werden.



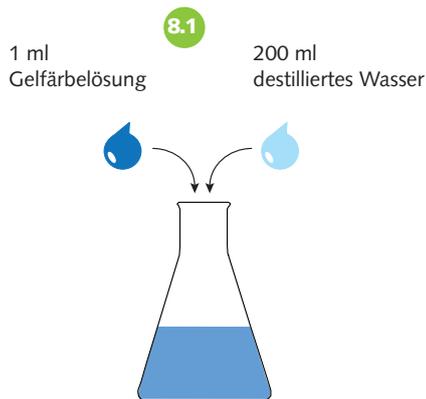
(7) Durchführung der Elektrophorese

Das Spannungsgerät mit geglätteter Gleichspannung wird nun angeschlossen, dabei befindet sich der Minuspol auf der Seite mit den Taschen und der Pluspol auf der entgegengesetzten Seite. Die Elektrophorese wird sofort nach dem Auftragen der Proben gestartet. Die angelegte Spannung ist abhängig von der verwendeten Gelkammer.

Als Faustregel gilt ein Spannungswert von 5 V pro cm Elektrodenabstand.

Der Lauf wird beendet, wenn die untere Farbstoffbande des DNA-Längenstandards ca. $\frac{3}{4}$ der gesamten Gellänge erreicht hat.

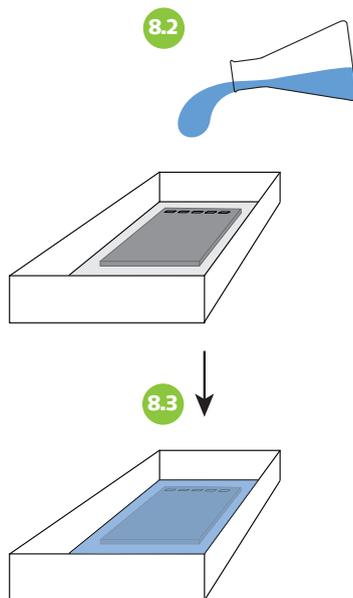
(8) Färbung des Gels



8.1 Zunächst wird die DNA-Färbelösung vorbereitet, indem 1 ml des Konzentrats der Gelfärbelösung mit 200 ml destilliertem Wasser verdünnt wird.

Um Verfärbungen von Kleidung oder Haut vorzubeugen, wird mit Handschuhen und Laborkittel gearbeitet.

Die Lösung kann mehrfach verwendet werden. Sie wird jeweils nach Verwendung in einem verschließbaren Gefäß im Kühlschrank bei ca. 4°C gelagert.



8.2 Nach der Elektrophorese wird das Agarose-Gel vorsichtig mit dem Küchen-Pfannenwender in die Gelfärbeschale übergeführt und mit der Färbelösung übergossen.

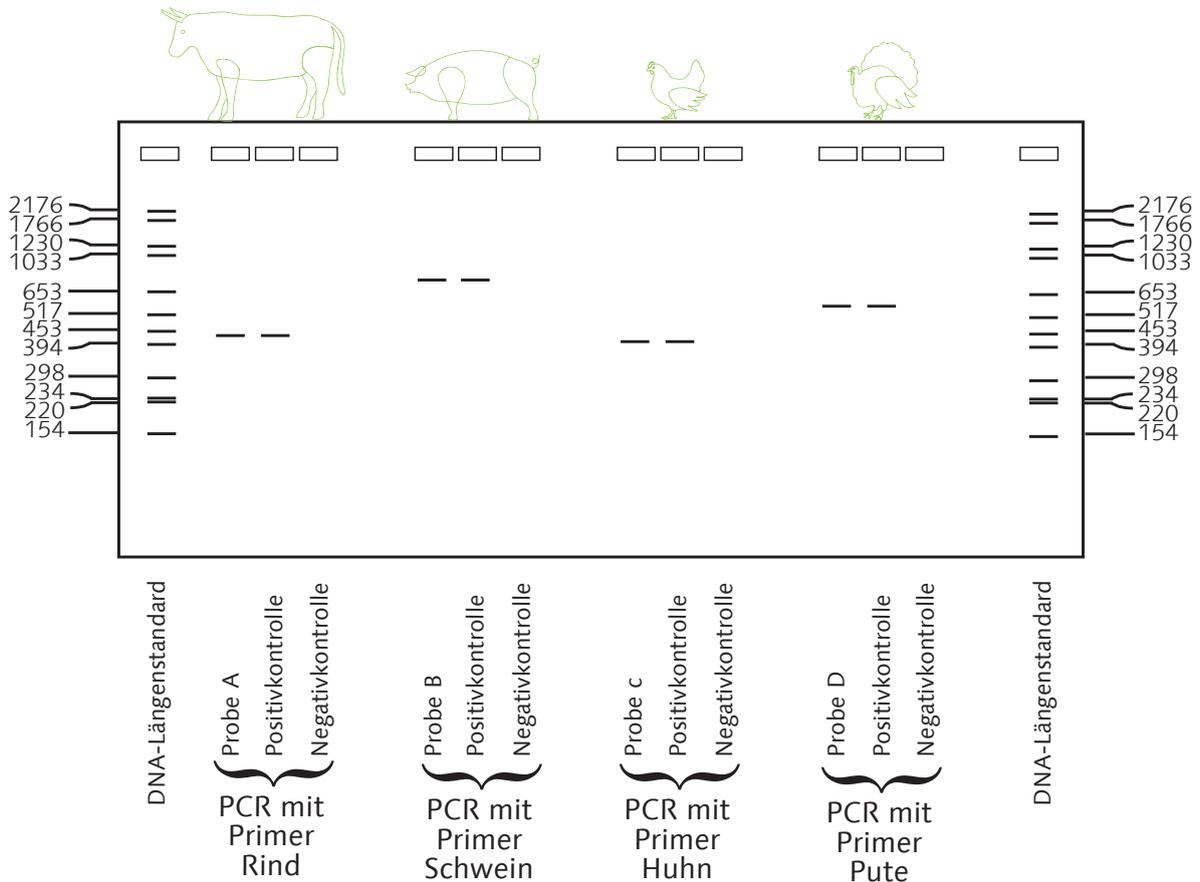
8.3 Das Gel wird 10–15 min gefärbt. Ist die Färbelösung bereits schon mehrfach eingesetzt worden, verlängert sich die Färbezeit mit jeder weiteren Verwendung um ca. 2–3 min. Damit eine gleichmäßige Färbung erzielt wird, sollte die Schale während des Färbens hin und wieder leicht geschwenkt werden.

Anschließend wird die Färbelösung in eine Aufbewahrungsf flasche abgegossen und das Gel mit Leitungswasser solange entfärbt, bis der Hintergrund ausreichend entfärbt ist.

Während des Entfärbens werden die DNA-Banden im Gel sichtbar. Die blau-gefärbten DNA-Banden können durch Fotografieren des Gels im Durchlicht (z.B. auf einem Leuchtkasten zur Dia-Betrachtung) dokumentiert werden.

Auswertung der Untersuchung

Die untere Abbildung stellt ein Gel dar, auf dem die DNA-Banden aus der Untersuchung aller 4 Tierarten gezeigt werden:



Die Probe A enthält nach der Auswertung Rind, da mit dem Primer „Rind“ ein PCR-Fragment von der richtigen Größe mit 431 bp (bp = Basenpaar) gebildet wurde. Entsprechende Fragmente sind auch in der Positivkontrolle mit Rind-DNA aus dem Kit sichtbar.

Analog enthält die Probe B Schwein-, die Probe C Huhn- und die Probe D Puten-DNA. Die Größen der PCR-Fragmente betragen für Schwein 769 bp, Huhn 416 bp und Pute 550 bp.

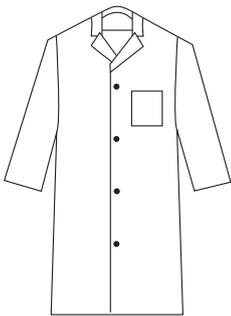
Wichtig ist auch, dass in den Negativkontrollen keine PCR-Fragmente gebildet werden, da diesen Ansätzen keine DNA zugefügt worden ist.

Probleme, mögliche Ursachen und Lösungen

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

Sicherheit und Entsorgung

Sichere Laborversuche



Der sichere Umgang mit Laborgeräten und Chemikalien setzt ein gewisses Maß an Grundwissen und Sicherheitsmaßnahmen voraus. Während des Versuchs sollten Laborkittel und Schutzbrillen getragen werden. In den Lösungen für die DNA-Isolation sind Detergentien enthalten, die zwar nicht giftig sind, aber bei direktem Kontakt zu Reizungen der Schleimhäute führen können.

Auch der Umgang mit den Geräten sowie Risiken bei der Nutzung sollten bekannt sein. So müssen z.B. lange Haare zusammengebunden werden, damit sie nicht in Kontakt mit Chemikalien oder offenen Flammen geraten.

Steriles Arbeiten



Untersuchungsmethoden auf der Basis von DNA-Analysen erfordern sterile Arbeitstechniken. DNA ist zwar relativ stabil, kann aber z.B. durch Enzyme (DNasen) abgebaut werden. Sie befinden sich nahezu überall, auch auf der Haut oder im Speichel. Aus diesem Grund sollten während der Untersuchung Labor-Einmalhandschuhe getragen werden.

Um Verunreinigungen durch Fremd-DNA zu verhindern, müssen die verwendeten Arbeitsmaterialien (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) vor Verwendung autoklaviert werden. Alternativ sind die Materialien in der Regel auch steril und DNA-frei im Handel erhältlich.



Die Arbeitsbereiche (Tische, Geräte etc.) und alle anderen nicht autoklavierbaren Gegenstände, die mit den Proben in Kontakt kommen, sind zunächst mit spülmittelhaltigem, warmen Wasser und anschließend mit Ethanol (70%ig) abzuwaschen. Es ist weiterhin empfehlenswert, den unteren Teil der Pipetten abzureiben. Zum Reinigen ist Papier von der Küchenrolle zu empfehlen.

Die dem Kit beigefügten Säulen und Auffanggefäße sowie alle Lösungen werden steril geliefert. Da die Lösungen mehrfach verwendet werden, ist insbesondere beim Pipettieren auf sorgfältiges Arbeiten zu achten. Beispielsweise darf keine Pipettenspitze mehrfach verwendet werden. Auch sollte der Pipettenschaft nicht an die Innenseiten der Gefäße stoßen.

Weitere Hinweise sind in den „Richtlinien zur Sicherheit im Unterricht“ (GUV-SI 8070-SH; Internet) zu finden.

Hinweise zum Umgang und zur Entsorgung der Lösungen aus der DNA-Isolation

alte Gefahrstoffsymbole und R + S-Sätze

neue GHS-Symbole und H + P-Sätze

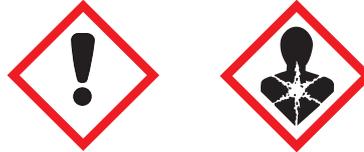
Proteinase K



Gesundheitsschädlich

R36/37/38, R42/43

S2



Gefahr

H315, H317, H319, H334, H335

P280

Bindepuffer B (enthält 2-Propanol)



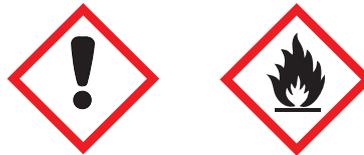
Reizend

R11, R36, R67

S7, S16, S24/25, S26



Leicht entzündlich



Gefahr

H225, H319, H336

P210, P233, P280, P305 + P351 + P338

Waschpuffer C (enthält Guanidinthiocyanat)



Gesundheitsschädlich

R20/21/22, R32, R52/53

S2, S13



Gefahr

EUH032, H301, H311, H332, H412

P270, P280

Waschpuffer D (enthält Ethanol)



Leicht entzündlich

R11

S7



Gefahr

H225

P210, P233

Entsorgung aller Lösungen: Halogenfreie, organische Lösungsmittel.

Hinweise zum Umgang und zur Entsorgung der Lösungen aus der Gel-Elektrophorese

DNA-Längenstandard und Gel-Ladepuffer

Der DNA-Längenstandard enthält einen Glycerin-Anteil sowie die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol. Der Gel-Ladepuffer enthält einen Glycerinanteil und den Farbstoff Xylencyanol.



Reizend

R36/37/38

S36/37/39

Entsorgung: Halogenhaltige, organische Lösungsmittel.



Achtung

H315, H319, H335

P280, P305 + P351 + P338

DNA-Färbelösung

Die DNA-Färbelösung besteht aus einer alkoholischen Lösung von Methylenblau.



Gesundheitsschädlich

R22

S2, S36/37/39

Entsorgung: Halogenhaltige, organische Lösungsmittel.



Achtung

H302

P270

TAE-Elektrophoresepuffer

Die TAE-Pufferlösung besteht aus einer wässrigen Lösung aus TRIS, Natriumacetat und EDTA.



Gesundheitsschädlich, reizend, ätzend

R10, R22, R35, R36/37

S24/25, S36/37/39

Entsorgung: Halogenfreie, organische Lösungsmittel.



Gefahr

H226, H302, H314, H319, H335

P270, P280, P305 + P351 + P338

Erklärung R-Sätze:

R10	Entzündlich.
R11	Leicht entzündlich.
R20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
R22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
R32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
R35	Verursacht schwere Verätzungen.
R36	Reizt die Augen.
R36/37	Reizt die Augen und die Atmungsorgane.
R36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
R42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich.
R52/53	Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
R67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

Erklärung S-Sätze:

S2	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
S7	Behälter dicht geschlossen halten.
S13	Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.
S16	Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen.
S24/25	Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.
S26	Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
S36/37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille tragen.



Erklärung H-Sätze:

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H301	Giftig beim Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H332	Gesundheitsschädlich beim Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
EUH032	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

Erklärung P-Sätze:

P210	Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P270	Bei Gebrauch dieses Produktes nicht essen, trinken oder rauchen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P305 + P351 + P338	Bei Berührung mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.



Impressum

Verantwortlich für die Entwicklung und den Inhalt des Tierart-Kit SK1-12:

BEHRENS – LABORTECHNIK

Bultmannstr. 27a
D-33330 Gütersloh

Tel.: +49 (0)5241 - 92 75 69
Fax: +49 (0)5241 - 92 75 71

E-Mail: info@behrens-labortechnik.de
Internet: <http://www.behrens-labortechnik.de>

Vertrieb des Tierart-Kit SK1-12:



CONATEX-DIDACTIC LEHRMITTEL GMBH
Rombachstrasse 65
66539 Neunkirchen / Deutschland

Tel.: +49 (0)6821 - 94 11-0
Fax: +49 (0)6821 - 44 11

E-Mail: didactic@conatex.com
Internet: <http://www.conatex.com>

Kostenfreie Rufnummern in D, CH, A und L:
Kundenservice: 00800 0266 2839 (008000 CONATEX)
Bestellfax: 00800 0266 2329 (008000 CONAFAX)
(Ihr Telefon/Fax muss für Auslandsgespräche freigeschaltet sein)

Text: Dr. Meinhard Behrens (Behrens-Labortechnik),
Dr. Birgit Heyduck und Dr. Eckhard R. Lucius (IPN)

Layout und Grafik: Verena Hane und Emanuel Kaiser (IPN)



**IPN · Leibniz-Institut für die Pädagogik
der Naturwissenschaften und Mathematik
an der Universität Kiel**