

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

Schülerheft



„Grillparty am Wochenende!“

Die Einkaufsliste für Getränke, Salate, Knabberereien und Grillfleisch ist schnell geschrieben. Im Supermarkt füllt sich nun zügig der Einkaufswagen. Zuletzt stehen die Freunde vor der Fleischtheke und wundern sich über ihre unterschiedlichen Fleischvorlieben: Nele isst nur weißes Fleisch von Huhn und Pute, da sie sich vor rotem Fleisch gruselt. Mark weiß, dass richtige Männer rotes Fleisch essen, denn alles andere ist „hormonverseucht“, während Jörg seit dem BSE-Skandal vor einigen Jahren jegliche Rindfleischprodukte ablehnt. Und Selma und Mehmet verzichten aus religiösen Gründen grundsätzlich auf den Verzehr von Schweinefleisch.

Unschlüssig studieren sie die Etikettierungen der verschiedenen Fleischprodukte. Können sie den Angaben trauen? In der Vergangenheit gab es schon einige Fleischskandale. Gibt es eigentlich heutzutage die Möglichkeit, in verarbeiteten Lebensmitteln noch eine bestimmte Tierart nachzuweisen? Zu Hause recherchieren sie im Internet ...

Geschichte

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction = PCR) ist ein biochemisches Verfahren zur Vervielfältigung definierter Abschnitte der Desoxyribonukleinsäure (DNA), der Erbinformation von Lebewesen. Das Verfahren wurde im Jahre 1983 vom Biochemiker Kary B. Mullis aus Kalifornien eher zufällig erfunden und bescherte ihm wegen der vielfältigen Anwendbarkeit in der Molekularbiologie 1993 den Nobelpreis für Chemie.



Anwendung

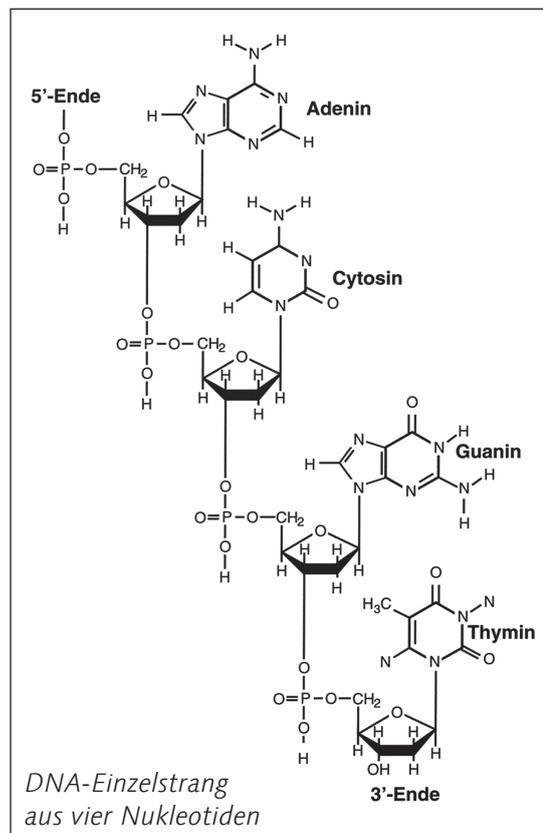
Die PCR wird eingesetzt, wenn die DNA, die man analysieren möchte, nicht in ausreichender Menge vorliegt. Sie ist ein Testverfahren mit höchster Empfindlichkeit, um eine bestimmte DNA-Sequenz nachzuweisen. Die PCR ist heute aus der Gerichtsmedizin, bei der Diagnose von Erbkrankheiten, Krebs und bakteriellen Infektionen wie Tuberkulose oder Lyme-Borreliose sowie aus der Archäologie nicht mehr wegzudenken. Sie dient darüber hinaus auch dem Nachweis von Fremdgenen in Organismen und der Überwachung von Lebensmitteln.

Molekulare Grundlagen

Die doppelsträngige DNA kann man sich wie eine Leiter in Gestalt einer Wendeltreppe (Helix) vorstellen, deren Seiten fest miteinander verbunden sind, während die Sprossen aus schwachen Wasserstoffbrückenbindungen gebildet werden. Durch hohe Temperaturen oder Enzyme lassen sich die schwachen Bindungen trennen. Die resultierenden Einzelstränge sind zueinander komplementär, also wie Bild und Negativ in der Fotografie, und enthalten somit die gleichen Informationen.

Die beiden komplementären Stränge weisen eine entgegengesetzte Ausrichtung auf. In der Nomenklatur wird die Ausrichtung eines Einzelstranges anhand seines Endes definiert. International üblich erfolgt die Leserichtung jedes Einzelstranges und jedes Primers immer in 5' – 3' -Richtung.

5'- bzw. 3'-Enden leiten sich von den am Aufbau der DNA beteiligten Zuckermolekülen (Desoxyribosen, C5-Zucker) ab, an deren fünften und dritten C-Atomen das fortlaufende Rückgrat der DNA anknüpft. Am Ende eines Einzelstrangs bleibt dementsprechend das fünfte bzw. dritte C-Atom eines Zuckers unverknüpft, so dass vom 5'- bzw. 3'-Ende gesprochen wird. Einem 5'-Ende liegt immer ein komplementärer Gegenstrang, ein 3'-Ende, gegenüber.



Durchführung

Um eine PCR durchführen zu können, benötigt man eine sogenannte DNA-Polymerase, Primer und Nukleotide. Die DNA-Polymerase ist ein (natürlich vorkommendes) Enzym, das anhand einer einzelsträngigen DNA-Vorlage (der sogenannten Matrize oder dem „Template“) aus Nukleotiden (Bausteine der DNA) den komplementären Gegenstrang synthetisiert, und zwar durch Kondensation (Abspaltung eines Pyrophosphatmoleküls) der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs).

DNA-Polymerasen arbeiten immer vom 5'- zum 3'-Ende des neuen Stranges. Sie benötigen als Starthilfe ein Stück DNA, das in der Praxis auch als Primer bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um ein circa 15 bis 30 Basenpaar langes einzelsträngiges DNA-Stückchen, das für die beiden komplementären DNA-Matrizen jeweils in 5' – 3' – Leserichtung (Vorwärts-Primer; Rückwärts-Primer) hergestellt wurde.

Jeder Primer koppelt an die entsprechende 5'- Stelle seines DNA-Einzelstranges und wird von der Polymerase zum neuen Gegenstrang in 3'-Richtung verlängert.

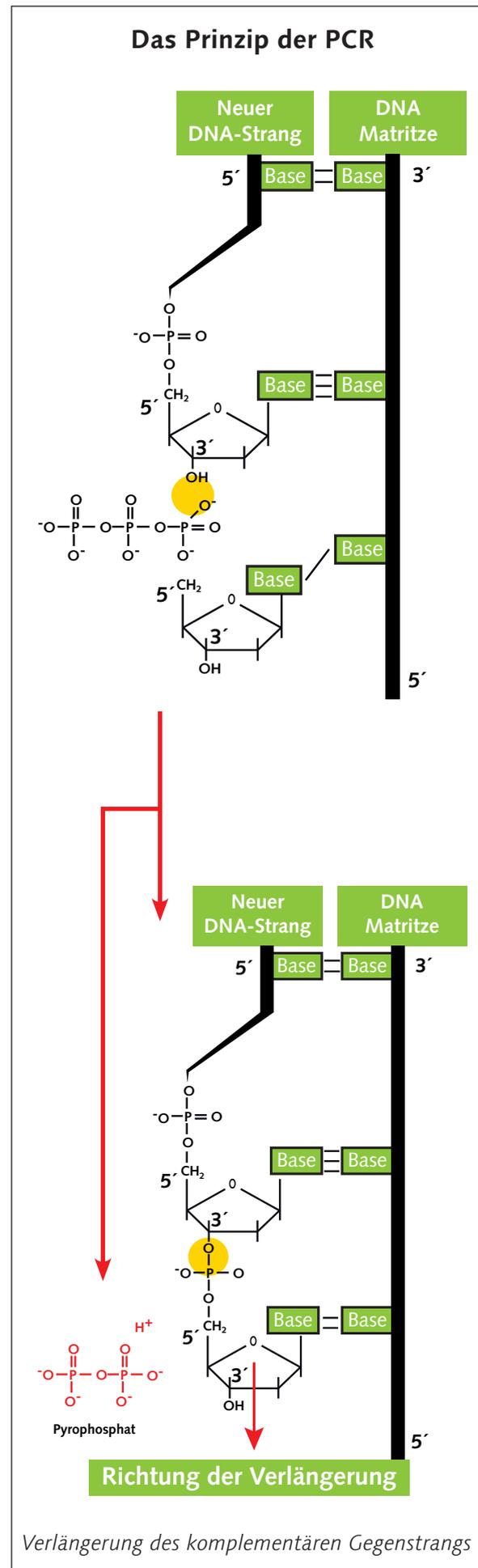
Das Prinzip der PCR ist eine vielfache Wiederholung der Vorgänge:

- 1) **Trennung/Denaturierung** der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge durch Erhitzen auf 95°C,
- 2) **Anlagerung/Annealing** der jeweiligen Startsequenz (Primer) an die passende 5'-Stelle des entsprechenden Einzelstrangs bei Temperaturen zwischen 40 und 60°C,
- 3) **Verlängerung/Elongation** des komplementären DNA-Stranges in 3'-Richtung durch die DNA-Polymerase bei 72°C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase.

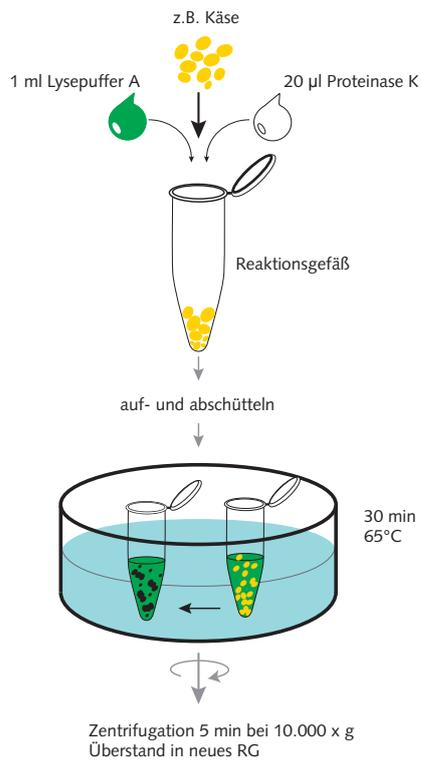
Trennung, Anlagerung, Verlängerung, ... PCR als Drei-Schritt-Methode

Je nach gewünschter DNA-Menge werden 15 bis 45 Wiederholungen, Zyklen genannt, durchgeführt. Jeder Zyklus verdoppelt prinzipiell die Menge an Ziel-DNA.

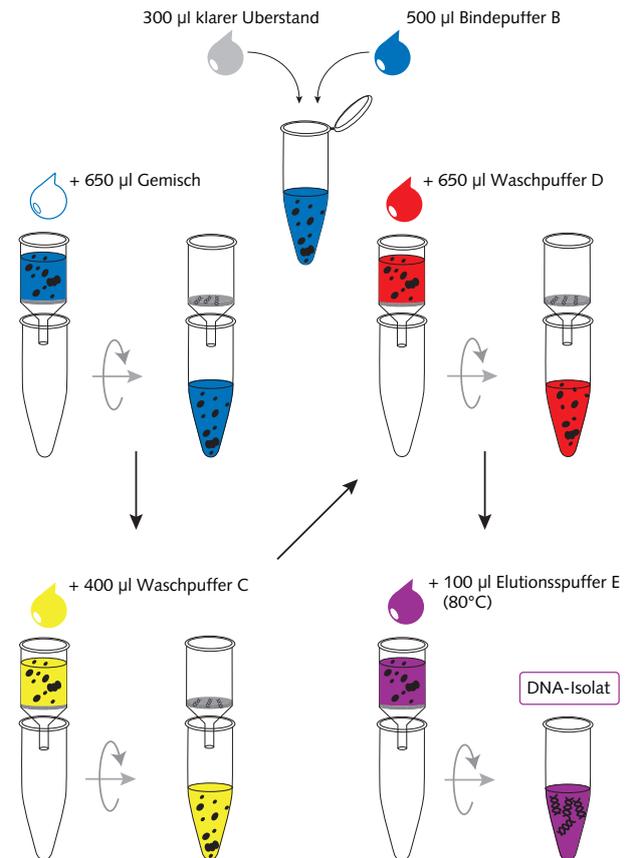
Nach diesem Prinzip kann innerhalb von 20 Zyklen, d. h. in einem Zeitraum von nur einer Stunde, aus einem DNA-Fragment gut eine Million (2^{20}) des gleichen Fragments entstehen; in 30 Zyklen etwa 1 Milliarde!



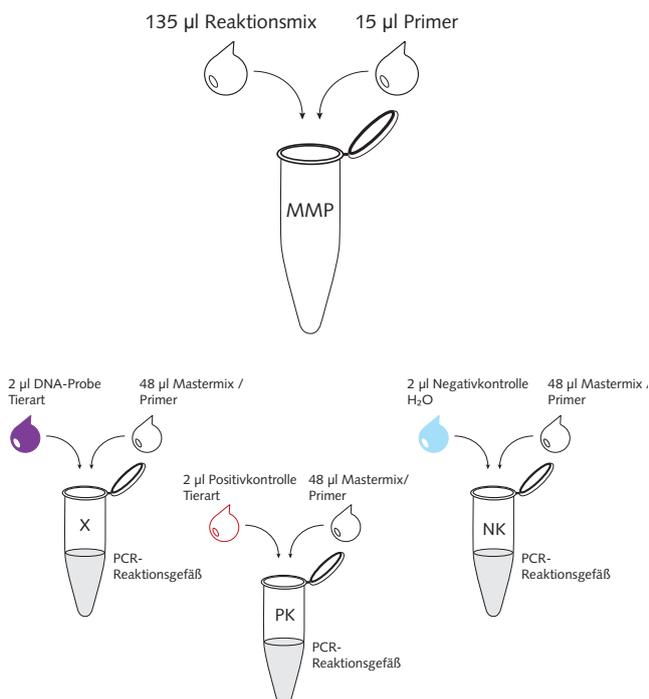
(1) Vorbereitung und Lyse der mitgebrachten Produkte



(2) Gewinnung der DNA aus den lysierten Produkten



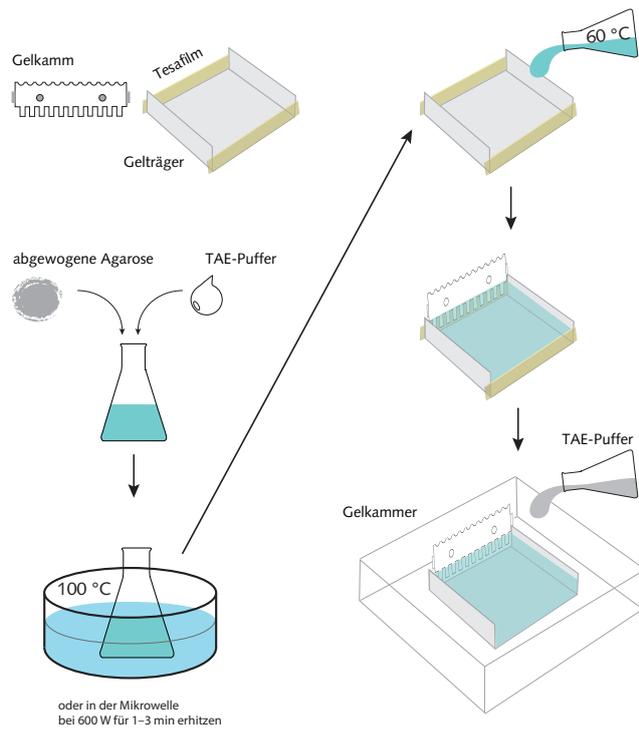
(3) Herstellung des Mastermix mit Primer (MMP) sowie der PCR-Ansätze



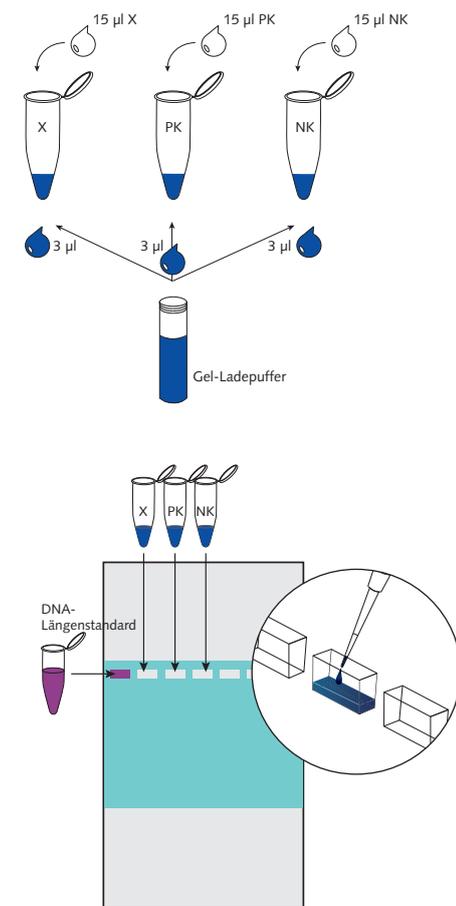
(4) PCR-Programmierung



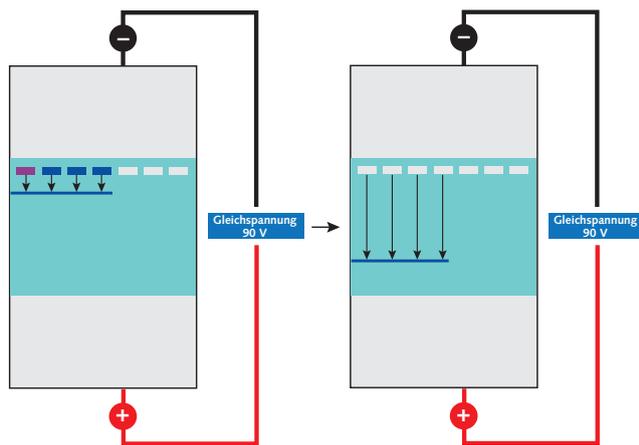
(5) Vorbereitung des Agarose-Gels



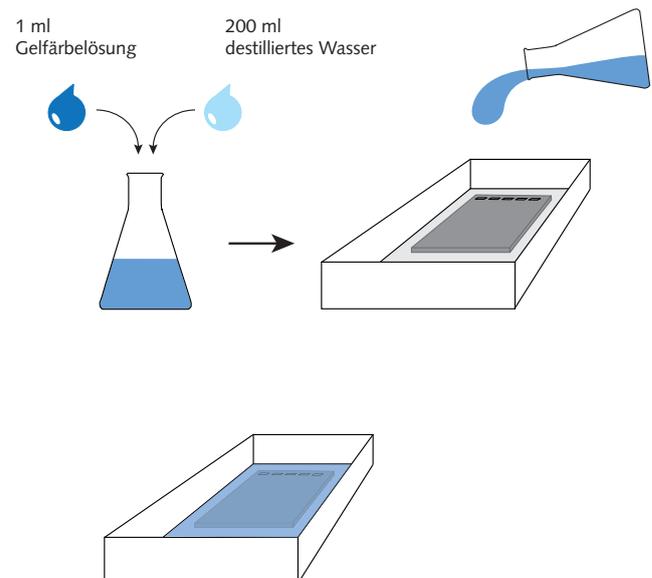
(6) Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese



(7) Durchführung der Elektrophorese



(8) Färbung des Gels



Bevor Sie beginnen, lesen Sie bitte die einzelnen Arbeitsschritte und die Sicherheitshinweise auf der letzten Seite!

(1) Vorbereitung und Lyse der mitgebrachten Produkte

- 1a. Feste Lebensmittelprobe (z.B. Wurst oder Käse) wird vorbereitet: Probenmaterial aus verschiedenen Probenbereichen wird homogenisiert und 100–200 mg (ca. 2–5 mm³) des vorbereiteten Probenmaterials in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (RG) überführt.
- 1.1 1 ml klarer Lysepuffer A und
- 1.2 20 µl Proteinase K-Lösung werden in das RG pipettiert. 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 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 werden auf die Säule inkl. Auffanggefäß pipettiert.
- 2.5 Die Säule inkl. Auffanggefäß wird für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Danach wird das Auffanggefäß inkl. Durchfluss verworfen.
- 2.6 Die Säule wird auf 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 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 Elutionspuffers E werden auf die Säule pipettiert.
- 2.12 Das RG wird für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.
- 2.13 Das RG wird für 30 s bei 10.000 x g zentrifugiert.
- 2.14 **ACHTUNG:** jetzt wird nur die Säule verworfen, denn das Eluat im RG enthält die isolierte DNA.
- 2.15 Für die PCR wird die DNA in neuem RG 1:10 verdünnt (z.B.: 5 µl Eluat + 45 µl Elutionspuffer).

(3) Herstellung des Mastermix mit Primer (MMP) sowie der PCR-Ansätze

- 3.1 Ein steriles 1,5 ml RG wird mit „MMP“, dem Kürzel für die jeweilige Tierart (R=Rind; S=Schwein; H=Huhn; P=Pute) und der Gruppennummer beschriftet.
- 3.2 135 µl des Reaktionsmix werden in das beschriftete RG pipettiert.
- 3.3 15 µl Primer der jeweiligen Tierart werden hinzu pipettiert. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren werden die Lösungen vermischt.
- 3.4 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.

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

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

(4) PCR-Programmierung

Die Programmierung des Thermocyclers wird von der Lehrkraft vorgenommen und sieht wie folgt aus:

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	∞

Das PCR-Programm dauert ca. 2,5 Stunden.

Die PCR kann auch mit 3 Wasserbädern durchgeführt werden.



(5) Vorbereitung des Agarose-Gels

- 5.1 Der 25fach-konzentrierte TAE-Elektrophoresepuffer wird mit destilliertem Wasser verdünnt (1 ml TAE + 24 ml dest. H₂O).
- 5.2 Der Gelträger wird nach jeweiliger 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 bereitgelegt.
- 5.3 Die Agarosemenge für ein 1%iges Gel wird 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 Küchenschuhe getragen. **ACHTUNG:** Die Agarose kann durch Siedeverzug plötzlich herausspritzen.
- 5.6 Die flüssige Agarose lässt man auf ca. 60°C abkühlen. Anschließend wird sie in den Gelträger gegossen.
- 5.7 Danach wird der Kamm gerade eingesteckt. Die Zähne des Kamms dürfen dabei nicht aufliegen. 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 steckendem Kamm wird in die Gelkammer gelegt und vollständig mit TAE-Puffer überschichtet.
- 5.9 Dann wird der Kamm vorsichtig herausgezogen. Durch die Zähne des Kamms sind in der festen Agarose Geltaschen entstanden, in die später die Proben pipettiert werden.

(6) Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

- 6.1 Pro Gruppe bzw. pro Tierart werden 3 µl Gel-Ladepuffer in die entsprechende Anzahl von kleinen, beschrifteten RGs pipettiert.
- 6.2 Anschließend werden je 15 µl von jedem PCR-Ansatz in die mit Gel-Ladepuffer versehenen RGs pipettiert.
- 6.3 Vor dem Auftragen auf das Gel wird die Lösung in jedem RG vorsichtig zur Durchmischung auf- und abpipettiert.
- 6.4 Die Pipettenspitze mit der Lösung wird über die Öffnung der Geltasche gehalten und die Lösung vorsichtig in die Geltasche pipettiert.
- 6.5 In eine weitere Tasche werden 15 µl des DNA-Längenstandards pipettiert.

(7) Durchführung der Elektrophorese

Die Spannungsquelle mit der geglätteten Gleichspannung wird angeschlossen, dabei befinden sich der Minuspol an der Seite mit den Taschen und der Pluspol an der entgegengesetzten Seite. Die Elektrophorese wird sofort nach dem Auftragen der Proben gestartet. Die angelegte, geglättete Gleichspannung ist abhängig von der verwendeten Gelkammer.

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

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

Beispiel: 90 V für 30 min

(8) Färbung des Gels

- 8.1 Vorbereitung der DNA-Färbelösung: 1 ml des Konzentrats der Gelfärbelösung wird mit 200 ml destilliertem Wasser verdünnt.
ACHTUNG: Um Verfärbungen von Kleidung oder Haut vorzubeugen, wird mit Handschuhen und Laborkittel gearbeitet.
- 8.2 Nach der Elektrophorese wird das Agarose-Gel mit dem Küchen-Pfannenwender vorsichtig in die Gelfärbeschale übergeführt und mit der Färbelösung übergossen.
- 8.3 Das Gel wird 10–15 min gefärbt. Damit eine gleichmäßige Färbung erzielt wird, sollte die Schale während des Färbens hin und wieder leicht geschwenkt werden.
- 8.4 Anschließend wird die Färbelösung in eine Aufbewahrungsflasche 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.





Sicherheit

DNA und Enzyme

Die isolierte DNA, die Kontroll-DNA sowie die Primer und Enzyme, die in diesem Versuchskit verwendet werden, können gefahrlos gehandhabt werden. Es werden keine lebenden Organismen benutzt, so dass keine Maßnahmen zur Desinfektion getroffen werden müssen. Sauberkeit ist jedoch wichtig, um gute Ergebnisse zu erzielen. Einwegspitzen und Reaktionsgefäße können gefahrlos im Abfalleimer für Kunststoff-Recycling entsorgt werden.

Agarose-Gel

Wenn ein Mikrowellengerät zum Schmelzen des Agarose-Gels eingesetzt wird, ist es wichtig, ein offenes Gefäß dafür zu benutzen. Ist keine Mikrowelle vorhanden, kann stattdessen auch ein kochendes Wasserbad oder eine Kochplatte benutzt werden. Um ein Anbrennen oder Verklumpen zu vermeiden, muss das Gel gerührt werden. Zum Schmelzen des Gels ist der Gebrauch eines Bunsenbrenners nicht empfehlenswert, weil dabei die Agaroselösung leicht lokal anbrennt.

ACHTUNG: Heiße, geschmolzene Agarose kann durch Siedeverzug plötzlich überkochen. Sie muss daher vorsichtig gehandhabt werden.

DNA-Färbelösung

Die DNA-Färbelösung ist entflammbar und darf nicht mit offenen Flammen in Berührung gebracht werden. Es müssen Schutzhandschuhe getragen werden, um zu verhindern, dass die DNA-Färbelösung mit der Haut in Berührung kommt. Die Lösung ist zwar nicht giftig, die Haut nimmt aber vorübergehend den Farbstoff an.

Die Färbelösung sollte auch nicht direkt in den Abfluss gegossen werden, da sich dadurch das Waschbecken verfärben kann. Sie kann in ein großes Sammelgefäß geschüttet werden, das neben dem Waschbecken stehen sollte.

Verhalten im Labor

Im Labor ist diszipliniertes Verhalten obligatorisch. Grundlegende hygienische Anforderungen wie nicht essen, nicht trinken, nicht rauchen und nicht schminken, sind einzuhalten. Dem Tragen von Schutzkleidung wie Laborkittel, Einmalhandschuhen und Schutzbrille muss der Schüler nach Aufforderung durch die Lehrkraft nachkommen. Arbeitsflächen und Geräte sind zu säubern und gegebenenfalls zu desinfizieren. Beim Verlassen des Labors bzw. nach Beendigung des Versuchs ist das Händewaschen notwendig.

