STÄDT. ST. MICHAEL - GYMNASIUM

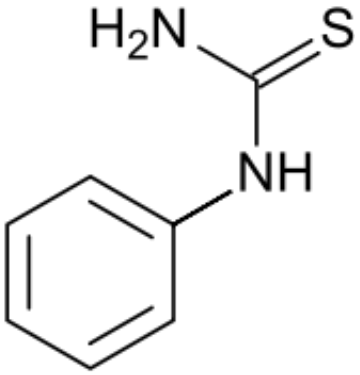
Entwicklung eines Schulversuches zur Restriktionsfragment-längenpolymorphismus-Analyse

Maike Dunkelberg, Katharina Garrelfs, Franziska Keutgen

Jugend forscht 2015

1

2



[1] http://www.5amtag.ch/5-am-tag/gemuse/rosenkohl/ entnommen am 11.01.2015
[2] http://www.abcam.com/tas2r38-antibody-ab65509.html entnommen am 11.01.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Kurzfassung 3
2 Einleitung 3
3 Hauptteil 4
3.1 Problematik 4
3.2 Auswahl eines geeigneten Gens 5
3.3 Problembereich 1: Kann man die DNA sichtbar machen? 6
3.3.1 Die Blaulichtkammer
3.3.2 Die Gel-Herstellung
3.3.3 Unser optimiertes Protokoll zur Gel-Herstellung
3.4 Problembereich 2: DNA Isolieren 9
3.4.1 Unser Protokoll zur DNA-Isolation
3.4.2 Auswertung
3.5 Problembereich 3: DNA-Vervielfältigung via PCR 12
3.5.1 Wahl der primer und Restriktionsenzyme
3.5.2 Die PCR
3.5.3 Die Gelelektrophorese
4 Kostenübersicht 18
5 Fazit und Ausblick 20
6 Danksagung 20
7 Abbildungsverzeichnis 20
8 Literaturverzeichnis 21
8.1 Bücherquellen 21
8.2 Internetquellen 21
9 Anhang 22

1 Kurzfassung

Molekulargenetische Arbeitstechniken spielen in der Biotechnologie eine herausragende Rolle.

Praktische Anwendungen dieser Techniken finden sich bspw. in Genomanalysen, der Erstellung genetischer Fingerabdrücke oder in der Herstellung rekombinanter DNA.

Die Zielsetzung unseres Projektes ist die Entwicklung eines qualitativ hochwertigen, aber im schulischen Rahmen durchführbaren Versuches, mit dessen Hilfe Schülerinnen und Schüler ihre eigene DNA praktisch und selbstständig untersuchen und qualitativ analysieren können, um so eigene Erfahrungen in diesem komplexen Arbeitsfeld sammeln und einen individuellen Bezug zu dieser relativ abstrakten Thematik herstellen können.

2 Einleitung

In der Q1 besuchten wir zusammen mit unserem Biologie-Leistungskurs den „Köln PUB“, ein Ausbildungs- und Informationslabor für Biotechnologie. Durch diese Erfahrungen haben wir großes Interesse im Bereich der molekulargenetischen Arbeitstechniken entwickelt. Somit sind wir mit Hilfe unseres Betreuungslehrers auf die Idee gekommen bei dem Wettbewerb Jugend forscht mit einem molekularbiologischen Thema teilzunehmen. Da wir extra nach Köln in das Ausbildungs- und Informationslabor für Biotechnologie fahren mussten, kamen wir auf die Idee, dass es doch leichter wäre, wenn man den Schülerinnen und Schülern das molekulargenetische Arbeiten in der Praxis direkt an der Schule im Experiment nahebringen könnte.

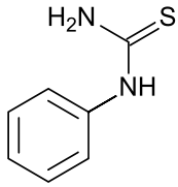
Die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse, abgekürzt RFLP (engl.: Restriction Fragment Length Polymorphism) ist eine Methode zur Ermittlung des Genetischen Fingerabdrucks. Dabei werden DNA-Fragmente durch Restriktionsenzyme geschnitten und mithilfe einer Gelelektrophorese ihrer Länge nach geordnet, wodurch zwei verschiedene DNA-Proben miteinander verglichen werden können.

Dies erfordert zunächst eine Vervielfältigung des zu untersuchenden DNA-Abschnitts mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), womit identische „Klone“ eines Gens in hoher Kopienzahl entstehen und für die weitere Untersuchung zur Verfügung stehen.

Das Prinzip der anschließenden RFPL-Analyse funktioniert wie folgt: Eine Sequenz enthält beispielsweise bei Person 1 eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, in

der Sequenz bei Person 2 kommt diese nicht vor. Werden nun diese Sequenzen mit einem Restriktionsenzym geschnitten, entstehen bei Person 1 zwei Fragmente und bei Person 2 nur ein Fragment. Werden nun die Längen der Sequenzen verglichen, kann ein RFLP festgestellt werden, die Fragmente sind unterschiedlich lang, der Locus ist polymorph. Hiermit kann man unter der Voraussetzung, dass die Sequenz eines zu untersuchenden Gens bekannt ist, eine Aussage über das in der untersuchten DNA vorhandene Allel treffen.

[3]Bei der Auswahl eines geeigneten Gens, anhand dessen man geeignete Untersuchungen im schulischen Rahmen durchführen könnte, haben wir uns für das Rezeptorgen TAS2R38[4] entschieden. Es befindet sich auf dem humanen Chromosom 7. Dieses ist für die Entwicklung von Geschmacksrezeptoren verantwortlich, die das Schmecken von Phenylthiocarbamid (PTC), einem Bitterstoff, der z.B. in Pflanzen der Familie der Kohlgewächse vorhanden ist, ermöglichen.[5]



Strukturformel Phenylthiocarbamid

Der vom TAS2R38-Gen kodierte Rezeptor erkennt die chemische Gruppe des Thioharnstoffes N-C=S, welches man in PTC findet. Phenylthiocarbamid beeinträchtigt die Funktion der Schilddrüse. In der Evolution war es ein Vorteil diesen Bitterstoff zu erkennen, um die Funktion der Schilddrüse aufrechtzuerhalten. Innerhalb der Evolution des Menschen ist es jedoch zu Mutationen innerhalb dieses Gens gekommen, die dazu führen, dass das gebildete Rezeptorprotein funktionslos ist. Betroffene Personen können den Bitterstoff nicht mehr schmecken, während das nicht-mutierte Allel Menschen ermöglicht, PTC wahrzunehmen. Innerhalb der menschlichen Population kommen nur diese beiden Allele (taster und non-taster) vor[6].

Mit dem folgenden Verfahren ist es den Schülern möglich, selbstständig zu ermitteln, welches Allel des TAS2R38-Gens in ihrer DNA vorhanden ist.

3 Hauptteil

3.1 Problematik

Molekulargenetische Arbeitstechniken im schulischen Rahmen durchzuführen, ist wegen des hohen Kostenaufwandes fast unmöglich. Somit gibt es zurzeit nur wenige Möglichkeiten, wie z.B. den Besuch einer speziellen Einrichtung wie dem KölnPuB, um den Schülerinnen und Schülern diese Thematik durch selbständiges, praktisches

[3] http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1102998 entnommen am 08.01.2015
[4] http://omim.org/entry/607751 entnommen am 08.01.2015
[5] Von Broccoli und Genen, Ein Bericht von Benedict Simlinger, 17.01.2008
[6] http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_Mendelian_traits_in_humans entnommen am 10.01.2015

Arbeiten näher zu bringen. Deswegen wollen wir dem amerikanischen Trend[7] folgen und einen Schulversuch entwickeln, welcher

a) keine gesundheitsgefährdenden Reagenzien beinhaltet

b) unter geringen finanziellen Mitteln durchgeführt werden kann,

c) den Schülerinnen und Schülern aber dennoch das Sammeln von Erfahrungen durch selbständiges, praktisches Arbeiten im Bereich der Genetik ermöglicht.

3.2 Auswahl eines geeigneten Gens

Am Anfang unseres Projektes standen wir vor der Frage, was wir in einem Schulversuch überhaupt betrachten können. Denn viele Aspekte müssen beachtet werden, sodass man ein Experiment ohne jegliche Hindernisse starten kann. Aus ethischen und moralischen Gründen fallen viele geeignete Optionen weg. In den einzelnen Genen befinden sich Erbanlagen, die Erbinformation eines Lebewesens. Untersucht man zum Beispiel die Gene im Hinblick auf das Risiko einer Krankheit der Schülerinnen und Schüler und trifft auf ein „positives“ Ergebnis, ist dieser Versuch schwer vertretbar und führt zu moralischen und ethischen Problemen. Man kann hier noch viele weitere Beispiele nennen, die zum selben Resultat führen. Blutgruppen zu untersuchen ist auch eine gute Möglichkeit, da sie monogenetisch vererbt werden und sie so auch einfach zu untersuchen und zu vergleichen sind. Doch das Arbeiten mit Blut bringt eine Infektionsgefahr mit sich, die man bei Schulversuchen nicht verantworten kann. Da nun solche Gene durch das Raster fallen, mussten wir uns erneut auf die Suche nach unbedenklichen Untersuchungsmöglichkeiten machen. Das erste, auf welches wir stießen, war die Genexpression der Augenfarbe. Doch auch hier wurden wir vor Schwierigkeiten gestellt. Denn das Merkmal der Augenfarbe wird von mehreren verschiedenen Genabschnitten bestimmt, es ist polygenetisch. Für uns ist es aber notwendig, ein monogenetisches Merkmal zu finden, da wir im schulischen Bereich nicht die Mittel einer Untersuchung eines polygenetischen Merkmals besitzen. Nach langer Suche entschlossen wir uns für das Rezeptorgen TAS2R38. Moralisch und ethisch ist es unbedenklich zu erkunden, ob jemand eine Mutation in dem Gen hat oder nicht. Die sogenannten taster schmecken die Bitterkeit auf PTC-Teststäbchen, während sogenannte non-taster, welche eine Mutation im Gen TAS2R38[8] haben, keinen Bittergeschmack auf der Zunge bekommen. So kann man ganz einfach und ohne große Ausgaben zu betätigen eindeutig zuordnen, ob eine Mutation vorliegt oder nicht. Man hat hier ein Ergebnis, welches sofort überprüft und verglichen werden kann. Es eignet sich daher gut als Schulversuch, da es keiner Bewertung unterliegt, oder einer komplexen Untersuchung bedarf.

[7] https://thebiologist.societyofbiology.org/biologist-features/158-biologist/features/893-the-unlikely-labs entnommen am 09.08.2014
[8] http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1102998 entnommen am 08.01.2015

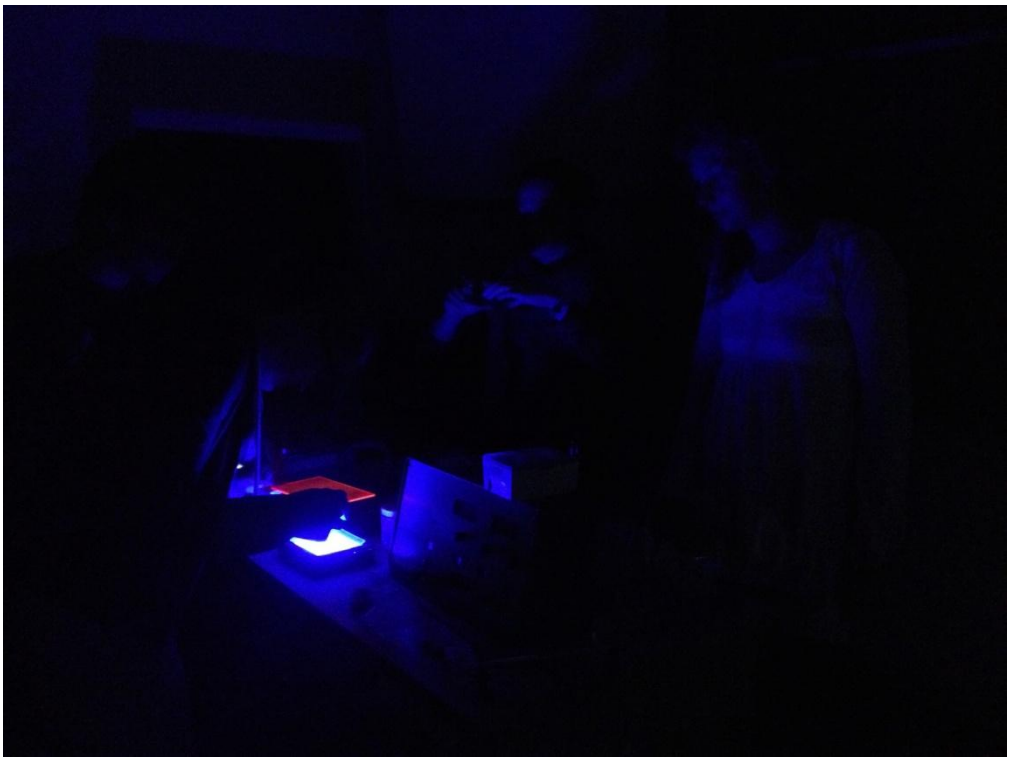
3.3 Problembereich 1: Kann man die DNA sichtbar machen?

Um DNA sichtbar zu machen, benötigt man zunächst eine Blaulichtkammer mit einem entsprechenden Filter und eine Gelelektrophorese mit einem passenden Gel.

3.3.1 Die Blaulichtkammer

Die Blaulichtkammer stellte uns somit vor die erste praktische Herausforderung. Im Handel erhältliche Kammern sind sehr teuer und kosten alleine schon 1600€[9], manchmal sogar mehr. Doch wir bauten eine Kammer für einen Bruchteil dieser Summe, die vier blaue LED-Panels beinhaltet, welche von einer 9 Volt Batterie betrieben werden. Darüber, im Deckel befindet sich eine blaue Plexiglasscheibe, welche das Licht mit einer Wellenlänge von 470 nm durchlässt. Auf diese Scheibe wird das Gel mit den DNA-Banden gelegt. Letztendlich wird eine orangefarbene Plexiglasscheibe darüber gehalten. Sie absorbiert das Licht von 470 nm. Somit bleibt nur noch ein durch den von uns verwendeten DNA-Floureszenzfarbstoff hervorgerufenes, gelb-grünes Licht mit einer Wellenlänge von 500-580 nm übrig, das durch die Blaulichtanregung von der DNA emmittiert wird, und die DNA-Banden werden somit sichtbar[10].

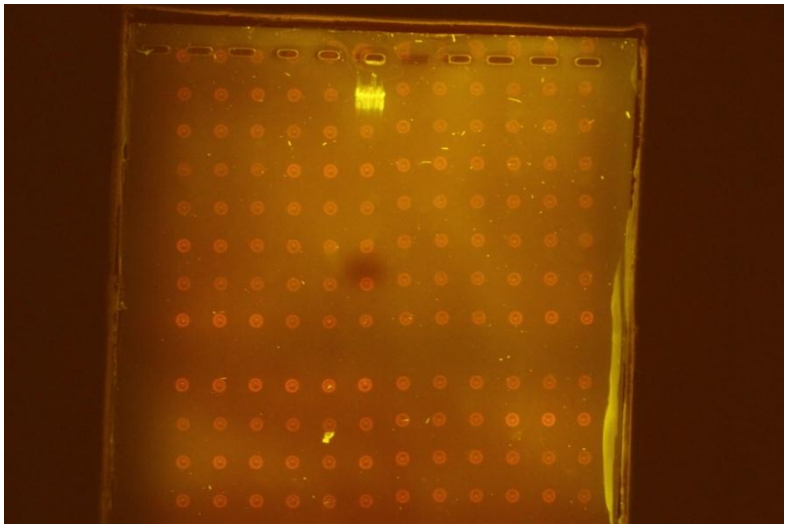
Zusammenfassend ist es uns gelungen mit einem Holzkasten, zwei Plexiglasscheiben und vier LED-Panels (6,40 €) eine Blaulichtkammer[11] zu bauen, die es normalerweise erst ab mehreren hundert oder tausend Euro zu kaufen gibt.[12]



[9] http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/G6600EU entnommen am 30.08.2014
[10] http://www.werner-knoben.de/rossleben2001/doku/kurs72web/node3.html entnommen am 08.01.15
[11] Zeichnung siehe Anhang ab Seite 24
[12] http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/G6600EU entnommen am 30.08.2014

3.3.2 Die Gel-Herstellung

Eine weitere Schwierigkeit sahen wir bei der Herstellung des Gels. Die Gelelektrophoresekammer und ein passendes Netzgerät waren schon in der Schule vorhanden. Bei der Auswahl der Chemikalien für das Gel, entschieden wir uns für ein Agarose Gel, da dieses keine Gefahr für die Schülerinnen und Schüler birgt und somit für einen Schulversuch perfekt geeignet ist. Die Herstellung des Agarose Gels stelle sich als äußerst schwierig dar. Bei der von SERVA Electronics empfohlenen Gelkonzentration von 0,8%-1,0% konnte man die DNA-Leiter und die DNA nicht erkennen. Zunächst wechselten wir den alten Farbstoff, GelRED(TM) Nucleic Acid Gel Stain – 10000X gegen den neuen SERVA DNA Stain Clear G aus. So konnten wir bei einer Gel Konzentration von 0,8% sehr leichte Schlieren der DNA-Leiter erkennen.



Des Weiteren haben wir versucht durch das Erhöhen der Konzentration eine bessere Aufteilung zu erreichen. Die DNA läuft langsamer, weil sie aufgrund des höheren Wiederstandes schwieriger durch das Gel gelangen kann. Aus diesem Grund haben wir auch die Durchlaufzeit erhöht. Wir begannen bei 20 Minuten Durchlaufzeit. Es stellte sich jedoch heraus, dass bei der höheren Konzentration ein größerer Zeitraum sinnvoller ist. Nach einigen Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen und Durchlaufzeiten erwies sich die bestmöglichste Auftrennung der DNA-Leiter und der DNA-Proben bei einer Konzentration von 2% und einer Durchlaufzeit von 45 Minuten.

Zusammenfassend können wir sagen, dass durch das Modifizieren der Protokolle vom Agarose Gel, es uns nun möglich ist, die DNA mithilfe unserer selbstgebauten Blaulichtkammer sichtbar zu machen.

3.3.3 Unser optimiertes Protokoll zur Gel-Herstellung

Material:

Feinwaage, Spatel, Schutzbrillen, Handschuhe, Becherglas (100ml), Meßzylinder, Gelkammer, Netzgerät, Mikrowelle, Mikropipette, Blaulichtkammer (Wellenlänge 470nm) orangefarbenes Plexiglas (absorbiert 470nm blaues Licht)

Chemikalien:
Destilliertes Wasser, TAE – Puffer, Agarose Standard – Pulver, SERVA DNA Stain Clear G (DNA und RNA Farbstoff)

Durchführung[13]:
Die Agarose wird auf 0,7g abgewogen. 3,1 ml des 50fach konzentrierten TAE – Puffer verdünnen wir mit 155 ml destilliertem Wasser. Anschließend gibt man das abgewogene Agarosepulver zu 35 ml des 1%-igen TAE-Puffers. Nun wird das gesamte Gefäß abgewogen. In der Mikrowelle wird die Agaroselösung kurzzeitig bis zum Kochen erhitzt. Man entnimmt sie für kurze Zeit und rührt sie um. Diese beiden Schritte werden so lange wiederholt bis die Lösung klar ist (ca.1min). Das Gefäß wird nun erneut gewogen und die Differenz mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Danach muss die Lösung auf 50-60°C abgekühlt werden, um dann 2µl DNA-Farbstoff hinzuzufügen. Anschließend wird die Lösung sofort in die Gelkammer gegossen. In dieser muss das Gel zunächst abkühlen. Nun wird die Elektrophorese-Kammer mit

[13] http://www.carlroth.com/media/_de-de/usage/3810.pdf entnommen am 28.08.2014

120 ml Pufferlösung (1%-ige TAE-Lösung) gefüllt. 5µl von den DNA-Proben + je 1µl Ladepuffer (40% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau + dH2O) sowie von der DNA-Leiter werden mit der Mikropipette in die Geltaschen gefüllt. Die Gelkammer wird dann an das Netzgerät angeschlossen, wobei die Proben in Richtung der positiven Ladung „laufen“ müssen. Das Gel muss bei 120V für 45min laufen gelassen werden. Nach 45 Minuten entnimmt man vorsichtig mit Handschuhen das Gel aus der Kammer und legt es auf die Blaulichtkammer. Um die bestmöglichste Sicht zu erreichen, verdunkelt man den kompletten Raum. Das orangefarbende Plexiglas wird in einem individuellen Abstand darüber gehalten, um die Ergebnisse zu betrachten.

3.4 Problembereich 2: DNA Isolieren

Um die DNA isolieren zu können, benötigt man diverse Materialien und Chemikalien. Dabei war es uns sehr wichtig, unschädliche Lösungen zu nutzen, um diesen Versuch in der Schule optimal durchführen zu können. Ein Beispiel dafür ist das Natriumlaurylsulfat, auch SDS abgekürzt. Dieser Stoff wird normalerweise zu DNA-Isolation genutzt, jedoch ist er sehr giftig und hochentzündlich. Aus diesem Grund eignet er sich nicht für einen Schulversuch. Stattdessen haben wir uns für Guanidin-Hydrochlorid entschieden, dieser Stoff stellt keine Gefahr für die Schüler dar. Die Silicium-Oixid-Lösung, welche nur unter Einfluss der Lysis-Lösung bindet, stellt auch keine Gefahr dar. In der folgenden Tabelle sind alle Materialien und Chemikalien mit ihren Verwendungen aufgeführt, die zur DNA-Isolation notwendig sind.

Materialien:	**Verwendung**
-15ml Falcon	-Aufbewahrung der Proben
-Zentrifuge	-Falcon zentrifugieren
-Dremel mit Mikrozentrifugenaufsatz	-Eppis zentrifugieren
-Pipetten (0-10µl; 20-200µl; 100-1000µl)	-geringe Mengen pipettieren
-65°C heißes Wasserbad	-Denaturieren unerwünschter Proteine, Zerstörung der Zellmembranen
-57°C heißes Wasserbad	-komplette Anbindung der Silciumdioxidlösung an Nucleinsäuren
Chemikalien:	
-Mundschleimhautzellen (DNA)	-Probe
-0,9%ige isotonische Kochsalzlösung	-Umspülen des Mundes
-6M Guanidin-Hydrochlorid-Lösung	-Zerstörung der Zellmembran, damit die DNA freiliegt
-Silicium–Oxid-Lösung	-In Verbindung mit der Lysis Lösung bindet sie DNA
- EDTA (0,5 M, pH 8,0)	-dient der Herstellung von Tris/EDTA

-Natriumchlorid	-dient der Herstellung des Wash Buffers
- Tris/EDTA Puffer	-dient der Herstellung des Wash Buffers
-Tris – HCl (1M, pH 8,0 und (,3)	-dient der Herstellung von Tris/EDTA
-Wash Buffer	-Auswaschung der übrigen Zellbestandteile

3.4.1 Unser Protokoll zur DNA-Isolation

Materialien:
Becherglas, 2 Eppis (1,5ml), Mikrozentrifuge, Mikropipetten mit Spitze (2-1000µl), Wasserbad (65°C-57°C)

Chemikalien:
Mundschleimhautzellen (DNA), destilliertes/ deionisiertes Wasser, 6M Guanidin-Hydrochlorid-Lösung, Silicium–Oxid-Lösung, Wash Buffer, 0.9% Kochsalzlösung (1,8g auf 200ml)

Durchführung[14]:
Zu Beginn spült man den Mund ungefähr eine Minute mit 10ml einer 0,9%-igen isotonischen Kochsalzlösung um, wobei es wichtig ist das man vor dem spülen den Speichel herunterschluckt. Anschließend füllt man diese in ein 15ml großes Falcon. Diese muss dann für fünf Minuten bei 3500 Umdrehungen zentrifugiert werden. Den entstandenen Überstand schüttet man in einem Zug ab, wobei es wichtig ist, dass das Pellet unversehrt am Boden bleibt. Bei einem Restgehalt von weniger als 0,5ml füllt man mit 0,9%-iger NaCl Lösung bis zu einem Zielvolumen von 0,5ml auf. Bleibt mehr als 0,5ml Lösung übrig, so entnimmt man mit der Pipette entsprechend etwas von der übrig gebliebenen Flüssigkeit. Das entstandene Pellet muss nun resuspendiert werden (durch pipettieren oder vortexen). Von der verflüssigten Substanz entnimmt man 300µl mit der Pipette und füllt diese in ein 1,5ml-großes Eppendorf Reaktionsgefäß. Im nächsten Schritt gibt man 300µl von der Guanidin-Hydrochlorid-Lösung (Lysis- Lösung) hinzu. Diese führt dazu, dass die Zellmembranen zerstört werden, sodass die DNA freiliegt. Um diesen Vorgang zu beschleunigen, vortext man die Lösung mit dem Finger. Als Nächstes hält man die Lösung zehn Minuten in ein 65°C-heißes Wasserbad. Dadurch werden unerwünschte Proteine (wie z.B. DNAsen) denaturiert und zusätzlich die Zellmembranen schneller zerstört. Damit sich die „schweren“ Zellbestandteile von der DNA trennen lassen, zentrifugiert man die Lösung anschließend eine Minute lang bei mindestens 18000 Umdrehungen. Anschließend entnimmt man 150µl von der Lösung. Hierbei sollte man darauf achten, dass man keinen Bestand von unten entnimmt, da in diesem nicht die DNA vorhanden ist sondern die Zellüberreste. Die entnommene Lösung gibt man nun in ein neues Eppi und versetzt diese mit 3µl

[14] http://www.dnabarcoding101.org/protocol_isolating_dna.html entnommen am 29.11.2014

Silicium-Oxid-Lösung. Die Silicium-Oxid-Lösung bindet die DNA aufgrund ihrer Polarität und ermöglicht es so die DNA von den noch vorhandenen, restlichen Verunreinigungen zu trennen. Zur Beschleunigung dieses Vorgangs sollte wieder gevortext werden. Nachfolgend legt man das Gefäß mit der Lösung für sieben Minuten in ein 57°C-heißes Wasserbad, um die vollständige Bindung des Siliciumdioxides an die Nucleinsäuren zu erreichen. Um abschließend das DNA-Pellet vom restlichen Überstand trennen zu können, muss man die Lösung für 45 Sekunden bei 10000 Umdrehungen zentrifugieren. Es werden anschließend 150µl von dem Überstand entfernt, womit wieder unerwünschte Zellkomponenten entfernt werden. Hier sollte man jedoch darauf achten, dass man das Pellet nicht berührt, um es nicht zu zerstören. Anschließend werden 500µl Wash Buffer zugegeben, der der Auswaschung der übriggebliebenen Zellbestandteilen am Pellet dient. Zur Durchmischung der Lösung wird mit dem Finger gevortext oder mehrfach auf- und abpipettiert. Folgend wird die Lösung erneut für 45 Sekunden mikrozentrifugiert. Der Wash Buffer muss wieder vollständig entnommen werden, ohne das Pellet zu berühren. Die Schritte, beginnend ab dem Hinzufügen der 500µl des Wash Buffers, werden erneut wiederholt. Zudem muss man darauf achten, dass bei der erneuten Entnahme des Wash Buffers keine Rückstände verbleiben. Wiederholtes Mikrozentrifugieren für 30 Sekunden sorgt dafür, dass im nächsten Schritt der wiederentstandene Überstand komplett entnommen werden kann. Dafür verwendet man eine 100µl Mikropipette. Um das Pellet wieder zu verflüssigen, fügt man 100µl destilliertes Wasser hinzu und vortext diese Flüssigkeit mit dem Finger oder pipettiert sie auf und ab. In Abwesenheit der Lysis-Lösung und in Anwesenheit von Wasser löst sich die DNA vom Silicat und liegt wieder frei in Lösung vor. Um diesen Schritt zu beschleunigen, wird nach Zufügen des Wassers das Eppi wiederrum für 5min in ein 57°C warmes Wasserbad gegeben. Um die DNA anschließend von der Silicatlösung zu trennen. Damit zentrifugiert man die Lösung zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit. Nun ist es möglich 90µl des DNA-haltigen Überstandes zu entnehmen ohne das Silicat, das nun als Pellet am Boden des Eppis vorliegt, zu berühren. Diesen Überstand gibt man anschließend in ein neues Eppi. Verwendet man die Probe nicht direkt, so sollte sie bei -20°C aufbewahrt werden. Erfolgt die Verwendung direkt, so ist keine gekühlte Lagerung notwendig.

3.4.2 Auswertung

Da wir am Anfang nicht bedacht haben, dass die DNA von dem Siliciumdioxid getrennt werden muss, konnten wir keine größeren Mengen an DNA gewinnen. Doch nach weiterem Recherchieren und Optimieren ist es uns gelungen, diesen Schritt zu beheben. Zu Beginn unserer Arbeit suchten wir nach einem Protokoll zur Gewinnung von Mundschleimhautzellen. Da wir kein für den Schulgebrauch geeignetes fanden, hielten wir uns dabei an das Protokoll zur DNA-Gewinnung aus Pflanzen, Fleisch und

Insekten[15]. So verwendeten wir zuerst viel weniger der 0,9%-igen isotonischen Kochsalzlösung zum Umspülen als nötig. Die umgespülte Lösung haben wir anschließend direkt mit der Guanidin-Hydrochlorid-Lösung vermischt. Durch dieses Verfahren konnten wir feststellen, dass wir von Beginn an zu wenig DNA isoliert haben, um es in der Gelelektrophorese sichtbar zu machen. Durch die obengenannte Optimierung unseres Protokolls haben wir nun eine Methode gefunden, größere Mengen DNA aus dem Speichel zu gewinnen. Die Informationen dazu gewannen wir aus weiteren Experimenten und Recherchen. Nun sieht man schon nach dem ersten Zentrifugieren einen deutlichen Unterschied. Bei der neuen Methode sieht man ein ungefähr 0,5ml großes Pellet, welches bei der vorigen Methode nicht sichtbar war.

3.5 Problembereich 3: DNA-Vervielfältigung via PCR

In unserem Projekt verwenden wir die Polymerase-Kettenreaktion, um die isolierte DNA anschließend zu vervielfältigen. Bei dieser wird mithilfe von Primern und Enzymen der gewünschte DNA-Abschnitt vervielfältigt, um ihn anschließend in größeren Mengen weiter zu verwenden.

3.5.1 Wahl der Primer und Restriktionsenzyme

Primer sind einzelsträngige Oligonukleotide[16]. An sie setzt während der PCR die DNA-Polymerase an und synthetisiert den jeweiligen DNA-Einzelstrang. Da sie an einen Einzelstrang binden, müssen zwei Primer gewählt werden, weil die DNA doppelsträng ist. Somit muss ein forward primer und ein reverse primer ausfindig gemacht werden. Diese dienen als Startsequenz für die DNA Synthesereaktion.

Unsere Primer müssen so gewählt werden, dass ein geeigneter Abschnitt des Genes TAS2R38 mit nur einer Schnittstelle für das von uns verwendete Restriktionsenzym Fnu4H1 ausgeschnitten wird. Ebenfalls müssen bei der Primerwahl noch zwei Grundlegende Bedingungen erfüllt sein. Die Primer sollten mindestens 17 Basen lang sein (hierzu folgt eine Rechnung) und die Hybridisierungstemperatur der Beiden darf sich nur geringfügig unterscheiden, damit es keine ungewollte Hybridisierung an anderen Stellen wie der spezifischen Sequenz gibt. Solch ein Fall würde eintreten, wenn beispielsweise einer der Primer eine sehr hohe Schmelztemperatur hat und sich während eines starken Temperaturabfalls an eine Basensequenz bindet die nicht hundertprozentig komplementär ist. Außerdem ist es ratsam, dass die Primer einen hohen Anteil an Guanin und Cytosin aufweisen, weil diese zwei Basen drei statt zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und die Bindung somit stabiler bei

[15] The iPlant Collaborative, DNA Learning Center, Cold spring Habor Laboratory, Jermel Watkins, staff molecular biologist & educator

[16] http://www.schule bw.de/unterricht/faecher/bioinformatik/material/unterricht_bioinf/jahrgangsstufe_1/Mustererkennung/pcr/LB_01.pdf entnommen am 05.01.2015

einer höheren Temperatur erfolgen kann, was die PCR-Reaktion beschleunigt. Ebenfalls dürfen die Primer nicht komplementär zueinander sein, da sie sich sonst gegenseitig binden.

Unsere Primer :

Bestellt bei biomers.net (siehe Anhang)

5´-CAA TAC AAG GCT CAA CTG GCA-3´ forward primer Tm= 54°C

5´-CCA TCA CCC CTA TTT TGT CGC-3´ reverse primer Tm=56°C

Tm= Schmelztemperatur

Beweis der Spezifität (Rechnung)

Reverse primer: 3 000 000 000 /4^21= 0,000682121

Diese Rechnung besagt, dass die Hybridisierungsmöglichkeiten im menschlichen Genom bei 0,000682121 liegen, also deutlich <1 sind. Resultierend wird der Primer nur an der gewünschten Stelle binden. Man dividiert die Anzahl an Basenpaaren im menschlichen Genom (3 000 000 000) durch die Wahrscheinlichkeit mit welcher die passende Stelle gefunden wird. Bei einem Primer mit 21 Basen ist dies jede 4^21-ste Stelle der Fall. 4 steht hier für die vier verschiedenen Basen der DNA und 21 für die Länge des Primers in Basen. Da 4^21>3 000 000 000 ist das Ergebnis <1, so gibt es statistisch nur eine Hybridisierungsmöglichkeit.

Die vorhin genannten Primer sind in der folgenden Abbildung farblich markiert. Der forward primer ist grün eingefärbt. Wobei zu beachten ist, dass dieser jedoch drei Basen früher als in der Abbildung angegeben anfängt und zwei Basen früher aufhört, um die Schmelztemperatur an den reverse primer anzupassen. Der reverse primer ist rot markiert.

TAS2R38- Gen (human) - Sequenz 1 (full Exon)

```
   1 cctttctgca ctgggtggca accaggtctt tagattagcc aactagagaa gagaagtaga
  61 atagccaatt agagaagtga catcatgttg actctaactc gcatccgcac tgtgtcctat
 121 gaagtcagga gtacatttct gttcatttca gtcctggagt ttgcagtggg gtttctgacc
 181 aatgccttcg ttttcttggt gaatttttgg gatgtagtga agaggcaggc actgagcaac
 241 agtgattgtg tgctgctgtg tctcagcatc agccggcttt tcctgcatgg actgctgttc
 301 ctgagtgcta tccagcttac ccacttccag aagttgagtg aaccactgaa ccacagctac
 361 caagccatca tcatgctatg gatgattgca aaccaagcca acctctggct tgctgcctgc
 421 ctcagcctgc tttactgctc caagctcatc cgtttctctc acaccttcct gatctgcttg
 481 gcaagctggg tctccaggaa gatctcccag atgctcctgg gtattattct ttgctcctgc
 541 atctgcactg tcctctgtgt ttggtgcttt tttagcagac ctcacttcac agtcacaact
 601 gtgctattca tgaataacaa tacaaggctc aactggcaga ttaaagatct caatttattt
 661 tattcctttc tcttctgcta tctgtggtct gtgcctcctt tcctattgtt tctggtttct
 721 tctgggatgc tgactgtctc cctgggaagg cacatgagga caatgaaggt ctataccaga
 781 aactctcgtg accccagcct ggaggcccac attaaagccc tcaagtctct tgtctccttt
 841 ttctgcttct ttgtgatatc atcctgtgtt gccttcatct ctgtgcccct actgattctg
 901 tggcgcgaca aaataggggt gatggtttgt gttgggataa tggcagcttg tccctctggg
 961 catgcagcca tcctgatctc aggcaatgcc aagttgagga gagctgtgat gaccattctg
1021 ctctgggctc agagcagcct gaaggtaaga gccgaccaca aggcagattc ccggacactg
1081 tgctgagaat ggacatgaaa tgagctcttc attaatacgc ctgtgagtct tcataaatat
1141 gcc
```

Referenz: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000007.14?report=fasta&from=141972631&to=141973773&strand=true

Polymorphismen **Non-Taster vs Taster**

1. Stelle:	G ODER C	→	GCA (Ala)	ODER	CCA (Pro)
2. Stelle:	T oder C	→	GTT (Val)	ODER	GCT (Ala)
3. Stelle:	A ODER G	→	ATC (Isl)	ODER	GTC (Val)

Restriktionsenzyme:

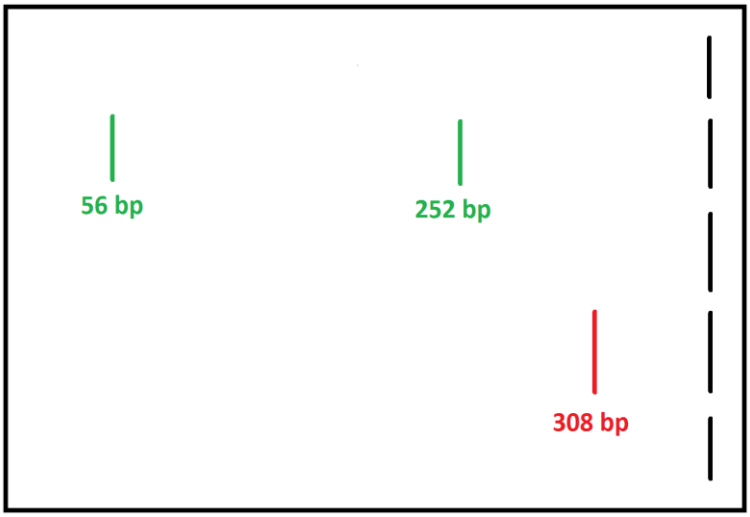
Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, welche aus vielen verschiedenen Bakterienarten isoliert werden können. Im Bakterium selbst dienen sie generell dem Schutz vor eingedrungener Fremd-DNA, indem sie diese wieder aus dem Genom herausschneiden. Dies funktioniert, weil Fremd-DNA im Gegensatz zur eigenen DNA nicht methyliert ist. Isoliert können Restriktionsenzyme, oder auch Restriktionsendonukleasen genannt, verwendet werden um DNA an genau festgelegten Abschnitten zu schneiden. Sie erkennen spezifisch 4-8 Basenpaare lange Sequenzen und trennen dort den kompletten DNA-Doppelstrang[17]. Gibt es im Genom viele Schnittstellen, wird die DNA in eine große Menge kleiner Fragmente zerschnitten. Sind im Umkehrschluss wenige Schnittstellen vorhanden, gibt es auch größere Fragmente. Bekannte Restriktionsendonukleasen sind EcoR1 oder BamH1. Es gibt verschiedene Typen von Restriktionsenzymen, beispielsweise schneiden

[17] http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/restriktionsenzyme/56404 entnommen am 04.01.15

Restriktionsenzyme des Typs 1 unter ATP-Verbrauch bis zu 1000 Basen nach der Erkennungssequenz.[18].

Wir verwenden ein Enzym vom Typ 2, welches die DNA innerhalb der Erkennungssequenz schneidet. Außerdem ist es so gewählt, dass wenn eine Schnittstelle vorhanden ist (Taster) sich zwei unterschiedlich lange DNA-Fragmente bilden, welche durch die Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Es ist dabei wichtig, dass die Fragmente unterschiedlich lang sind, um nach der Gelelektrophorese 2 Banden auf einer unterschiedlichen Höhe erkennen zu können. Dies ist bei Polymorphismus 2 der Fall weshalb die anderen zwei Schnittstellen weg fallen (siehe oben).

Unser Restriktionsenzym heißt Fnu4H1 und die Sequenz an der es schneidet lautet GCNGC. N steht hier für eine beliebige Base. Taster weisen an dieser Stelle die Sequenz GCTGC auf, somit wird geschnitten. Während Non-Taster dort die Frequenz GTTGC aufweisen und das Enzym nicht aktiviert wird.

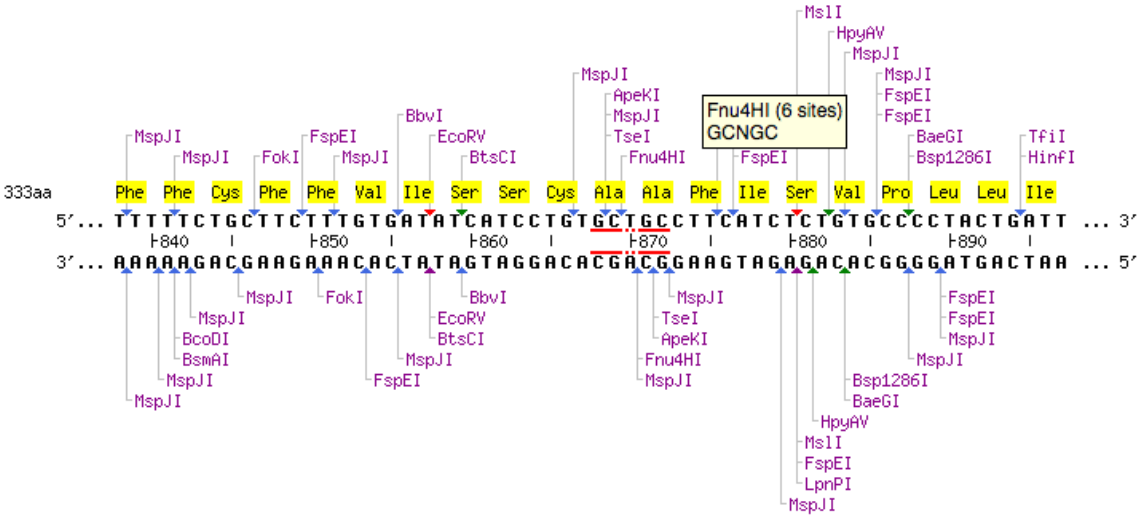


Erwartetes Bandenmuster nach Restriktionsverdau (Taster grün, Non-Taster rot)

Dieses Enzym haben wir gewählt, da wir mit dem Gen TAS2R38 eine Analyse potentieller Restriktionsstellen mit Hilfe einer dafür vorgesehenen Internetseite[19]durchgeführt haben. Fnu4H1 schneidet das PCR-Produkt in 2 unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Ein Fragment mit 252 Basenpaaren und ein zweites mit 56 Basenpaaren. Zudem ist es in der unteren Hälfte der Preisklassen

[18] http://www.bionity.com/de/lexikon/Restriktionsenzyme.html entnommen am 28.12.14
[19] http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php entnommen am 04.01.15

aufzufinden. Folglich ist dieses für unseren Versuch geeignet und wir haben es bei New England Bio Labs[20] bestellt.



Grafik mit möglichen Schnittstellen anderer Restriktionsenzyme.

3.5.2 Die PCR

Die Polymerasekettenreaktion[21] (PCR, polymerase chain reaction) ist eine Vervielfältigungsmethode, mit welcher man minimale DNA-Spuren vervielfältigen kann. Der PCR-Ansatz enthält die Proben-DNA, welche in unserem Fall aus menschlichem Speichel entnommen wurde, ausreichend Nucleotide (A, T, G, C), hitzestabile DNA-Polymerase und zwei DNA-Primertypen.

Der Ansatz wird bei 94°C zum Denaturieren gebracht. Die Doppelhelix trennt sich auf. Man kühlt das Ganze auf 50° - 60°C ab, um die komplementären Stränge zu hybridisieren. In diesem Schritt setzen nun die Primer komplementär an den aufgetrennten Strängen an. Die hitzeresistenten Polymerasen verlängern die Stränge bei 68° - 72°C, indem sie die DNA-Synthese an gewünschter Stelle, an welcher die Primer angesetzt haben, starten. Durch erneutes Erhitzen werden die DNA-Duplikate getrennt und folgend wieder verdoppelt. Man verfolgt diesen PCR-Zyklus mehrere Durchgänge, um nach etwas 35 Zyklen genügend Kopien des interessierenden DNA-Abschnittes für eine weitere Analyse vorliegen zu haben.

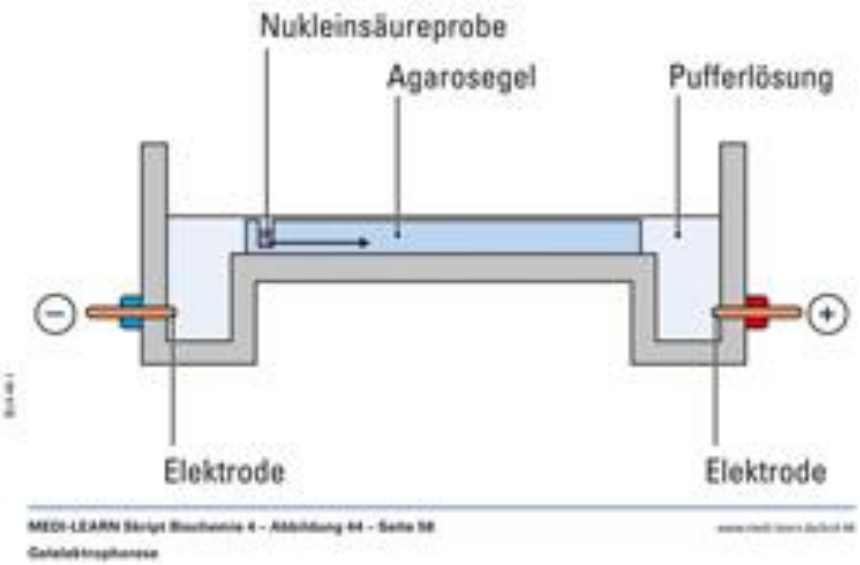
[20] http://shop2.neb-online.de/4DCGI/ezshop?action=Direktanzeige&Artikelnummer=r0178%40&WorldNr=01&ButtonName=website&skontaktid=1084921&skontaktkey=1SeyhMns3AIK3CySFjWV0KdSnLYjGW entnommen am 04.01.15

[21] Markl Biologie. Oberstufe. Ernst Klett Verlag GmbH. Stuttgart 2010. Seite 216 – 217

3.5.3 Die Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese kann man die zuvor vervielfältigten und durch die Restriktionsenzyme zerschnittenen DNA-Sequenzen miteinander vergleichen. Da die DNA negativ geladen ist, wird sie vom Pluspol angezogen. Dieses Phänomen kann man sich bei diesem Verfahren zu Nutze machen. Man setzt die Nucleinsäureproben (DNA-Proben) in die „Taschen“ im Agarosegel ein[22]. Das Agarosegel selbst bildet hierbei eine Polymermatrix, die einen mechanischen Widerstand für die DNA darstellt. So können lange DNA-Proben nur sehr schwer in die Richtung mit der positiven Ladung „laufen“, während kürzere DNA-Abschnitte schneller durch das Gel „wandern“ können und so in der selben Zeit eine größere Strecke zurücklegen. So erkennt man ein Bandenmuster, in welchem die kurzen weiter gewandert sind, als die langen. Man setzt zu den zu vergleichenden Proben meist noch eine sogenannte DNA-Leiter ein, welche als Referenzwert zur Bestimmung der aufgetrennten Fragmentlänge dient.

Aufbau:



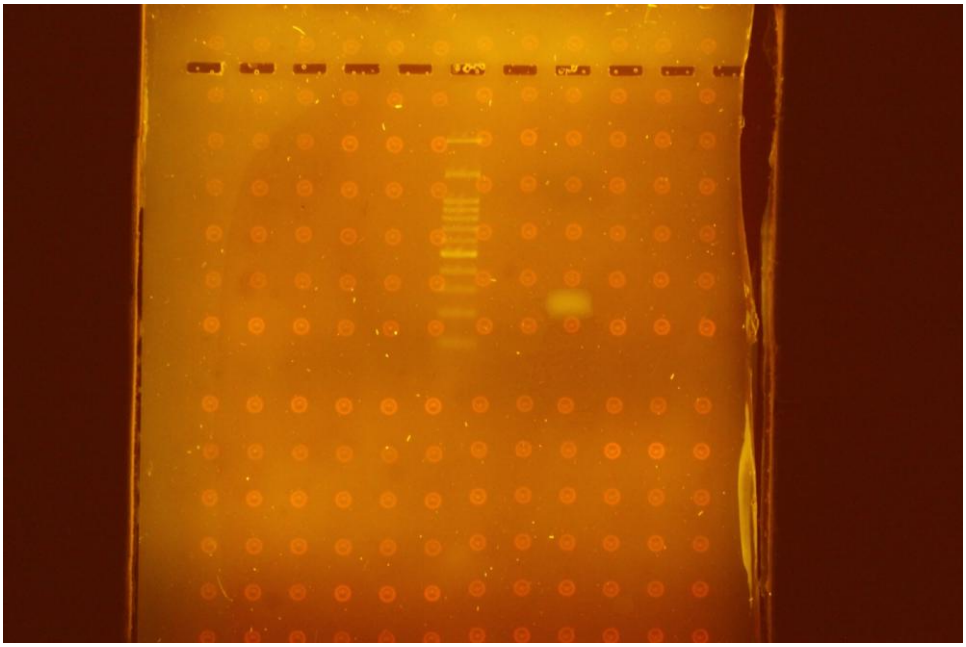
[23]

Ergebnis:

Nach vielen Versuchen kamen wir endlich zu einem zufriedenstellenden Ergebnis. Die zu erwartende DNA-Bande mit einer Länge von 308 Basenpaaren, kann man nach durchgeführter PCR in der Gelelektrophorese sehr gut erkennen. Unsere ausgesuchten Primer kopieren nur unseren gewünschten DNA-Abschnitt, welcher den gewünschten Ausschnitt des Rezeptorgens enthält. Der Farbstoff macht sie in

[22] Protokoll zur Herstellung siehe ab Seite 22
[23] http://www.medi-learn.de/seiten/suche/media/auflage_2013/thumbs/Bc4-44-1.jpg entnommen am 02.01.2015

unserer selbstgebauten Blaulichtkammer kenntlich. Wie wir erwartet haben, sehen wir die gesamte Länge des betrachtenden Genabschnittes, da wir noch nicht das Restrikitonsenzym Fnu4H1 auf unsere DNA gegeben haben. Doch in weiteren Versuchen werden wir diesen Schritt gehen und zu diesem Zeitpunkt dann hoffentlich zwei, wenn keine Mutation vorliegt, beziehungsweise eine Bande, wenn eine Mutation vorliegt, sehen.



Dies ist unser jetziger Status: Wir können die DNA-Leiter erkennen und sehen auch an der Stelle von 308 Basenpaaren unseren durch die PCR gelaufene DNA-Abschnitt. An diesem Punkt werden wir nun weiterarbeiten. Auf die DNA-Proben werden wir nun das ausgesuchte Restriktionsenzym geben, um eine mögliche Mutation zu untersuchen.

4 Kostenübersicht

Bei der Übersicht der Gesamtkosten wird von einer vorhandenen Basisaustattung von folgenden Geräten / Reagenzien ausgegangen:

- Gelelektrophoresekammer + Netzgerät
- Agarose + TAE-Puffer
- Mikropipetten (10-1µl, 100-1000µl) + Pipettenspitzen
- 1,5ml Eppendorf- & 15ml Falcon-Reaktionsgefäßen
- Heizblock für Wassserbad

I. spezielle Materialien

DIY-PCR-Maschine	→	€ 150,53
Blaulicht-Transilluminator:		
- 4x 48er Blaulicht-LED-Panel (470nm Peakemission)[24]	→	€ 13,16
- Plaxiglasplatten blau & orange (15x20cm)[25]	→	€ 27,20
- 9V Blockbatterie	→	€ 2,49
Dremelfuge [26]*)	→	ca. € 35,-

*) wenn online bestellt → bei vorhandenem 3D-Drucker: nur Materialkosten, Datei ist als Freeware im Internet erhältlich

II. spezielle Reagenzien

→ 1ml DNA-Fluoreszenzfarbstoff „Clear G“ (SERVA)[27]	→	€ 72,25
→ 1ml 100bp DNA-Leiter (SERVA)[28]	→	€ 41,25
→ Forward + Backward-Primer für TAS2R38[29]	→	€ 18,30
→ Restriktionsenzym „Fnu4HI“ + „Cutsmart-Buffer“ (NEB)[30]	→	€ 62,-
→ Kapa 2G fast ready PCR-Mastermix [31]	→	€ 17

Gesamtsumme: € 422,18

[24] https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=http%3A%2F%2Fwww.ebay.de%2Fitm%2FAuto-Innenraum-Weis-Blau-Rot-48-SMD-LED-Panel-Bleuchtung-Lampe-T10-BA9s-Soffitte-%2F361000867110%3Fpt%3DDE_M%C3%B6bel_Wohnen_Leuchtmittel%26var%3D630339002890%26hash%3Ditem540d541526

[25] https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=http%3A%2F%2Fwww.plexiglas-shop.com%2FDE%2Fde%2Findex.htm%3Fexpa%3Dgoogle.DE2%26gclid%3DCN7o7ZaLj8MCFWTHtAodMBMAig

[26] Datei zum selbstdrucken (umsonst): http://www.thingiverse.com/thing:1483/#files //online bestellen: http://www.shapeways.com/model/77306/dremelfuge-classic.html

[27] https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=http%3A%2F%2Fwww.serva.de%2FenDE%2FProductDetails%2F4503_39804_SERVA_DNA_Stain_Clear_G.html

[28] https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=http%3A%2F%2Fwww.serva.de%2FenDE%2FProductDetails%2F5028_39316_SERVA_FastLoad_100_bp_DNA_ladder.html

[29] https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=https%3A%2F%2Fwebstore.biomers.net%2FOligoOrder%2FOligoOrder.aspx

[30] https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=http%3A%2F%2Fshop2.neb-online.de%2F4DCGI%2Fezshop%3Faction%3DDirektanzeige%26Artikelnummer%3Dr0178%40%26WorldNr%3D01%26ButtonName%3Dwebsite%26skontaktid%3D1084921%26skontaktkey%3D1SeyhMns3AIK3CySFjWV0KdSnLYjGW

[31] http://www.peqlab.de/wcms/de/produkte/index.php?do=getArticlesByGroup&which=FASTMM

5 Fazit und Ausblick

Unser Projekt kann man nach den schon oben genannten Gründen gut in den Unterricht integrieren, ohne unbezahlbare Ausgaben zu tätigen und die Schülerinnen und Schüler durch toxische Chemikalien zu gefährden. Hiermit wird den Schülerinnen und Schülern der Fachbereich der Genetik auf anschauliche und verständliche Weise mit selbständig durchführbaren Versuchen näher gebracht.

Überdies hinaus fördert die Schule auf diese Weise das wissenschaftliche Arbeiten und den Umgang mit Labortechniken schon von Anfang an. Man kann dies auch als Vorbereitung für manche Berufe sehen. Man ermöglicht den Schülerinnen und Schülern einen Einblick in diesen Themenbereich, der ihnen Spaß am Lernen und an Teamarbeit geben kann. Außerdem werden Anreize für aufbauende Forschungsprojekte gegeben.

6 Danksagung

Wir bedanken uns recht herzlich bei unserem Betreuungslehrer Herrn Nebe, der uns mit viel Geduld auch in chaotischen und erfolglosen Situationen unterstützt und aufgemuntert hat. Außerdem wollen wir auch Herrn Stein dafür danken, dass er uns immer die verschiedensten Räume aufgeschlossen hat und nie die Geduld bei längerem Warten verlor.

7 Abbildungsverzeichnis

- http://www.5amtag.ch/5-am-tag/gemuse/rosenkohl/ entnommen am 11.01.2015
- http://www.abcam.com/tas2r38-antibody-ab65509.html entnommen am 11.01.2015
- http://www.medi-learn.de/seiten/suche/media/auflage_2013/thumbs/Bc4-44-1.jpg entnommen am 02.01.2015

8 Literaturverzeichnis

8.1 Bücherquellen

- Von Broccoli und Genen, Ein Bericht von Benedict Simlinger, 17.01.2008
- The iPlant Collaborative, DNA Learning Center, Cold spring Habor Laboratory, Jermel Watkins, staff molecular biologist & educator
- Markl Biologie. Oberstufe. Ernst Klett Verlag GmbH. Stuttgart 2010. Seite 216 – 217

8.2 Internetquellen

- http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1102998 entnommen am 08.01.2015
- http://omim.org/entry/607751 entnommen am 08.01.2015
- http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_Mendelian_traits_in_humans entnommen am 10.01.2015
- https://thebiologist.societyofbiology.org/biologist-features/158-biologist/features/893-the-unlikely-labs entnommen am 09.08.2014
- http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1102998 entnommen am 08.01.2015
- http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/G6600EU entnommen am 30.08.2014
- http://www.werner-knoben.de/rossleben2001/doku/kurs72web/node3.html entnommen am 08.01.15
- http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/G6600EU entnommen am 30.08.2014
- http://www.carlroth.com/media/_de-de/usage/3810.pdf entnommen am 28.08.2014
- http://www.dnabarcoding101.org/protocol_isolating_dna.html entnommen am 29.11.2014
- http://www.schule bw.de/unterricht/faecher/bioinformatik/material/unterricht_bioinf/jahrgangsstufe_1/Mustererkennung/pcr/LB_01.pdf entnommen am 05.01.2015
- http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/restriktionsenzyme/56404 entnommen am 04.01.15
- http://www.bionity.com/de/lexikon/Restriktionsenzyme.html entnommen am 28.12.14
- http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php entnommen am 04.01.15
- http://shop2.neb-online.de/4DCGI/ezshop?action=Direktanzeige&Artikelnummer=r0178%40&WorldNr=01&ButtonName=website&skontaktid=1084921&skontaktkey=1SeyhMns3AIK3CySFjWV0KdSnLYjGW entnommen am 04.01.15
- https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=http%3A%2F%2Fwww.ebay.de%2Fitm%2FAuto-Innenraum-Weis-Blau-Rot-48-SMD-LED-Panel-Bleuchtung-Lampe-T10-BA9s-Soffitte-

%2F361000867110%3Fpt%3DDE_M%C3%B6bel_Wohnen_Leuchtmittel%26var%3D630339002890%26hash%3Ditem540d541526
- https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=http%3A%2F%2Fwww.plexiglas-shop.com%2FDE%2Fde%2Findex.htm%3Fexpa%3Dgoogle.DE2%26gclid%3DCN7o7ZaLj8MCFWTHtAodMBMAig
- Datei zum Selbstdrucken (umsonst): http://www.thingiverse.com/thing:1483/#files //online bestellen: http://www.shapeways.com/model/77306/dremelfuge-classic.html
- https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=http%3A%2F%2Fwww.serva.de%2FenDE%2FProductDetails%2F4503_39804_SERVA_DNA_Stain_Clear_G.html
- https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=http%3A%2F%2Fwww.serva.de%2FenDE%2FProductDetails%2F5028_39316_SERVA_FastLoad_100_bp_DNA_ladder.html
- https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=https%3A%2F%2Fwebstore.biomers.net%2FOligoOrder%2FOligoOrder.aspx
- https://3c.web.de/mail/client/dereferrer?redirectUrl=http%3A%2F%2Fshop2.neb-online.de%2F4DCGI%2Fezshop%3Faction%3DDirektanzeige%26Artikelnummer%3Dr0178%40%26WorldNr%3D01%26ButtonName%3Dwebsite%26skontaktid%3D1084921%26skontaktkey%3D1SeyhMns3AIK3CySFjWV0KdSnLYjGW
- http://www.peqlab.de/wcms/de/produkte/index.php?do=getArticlesByGroup&which=FASTMM

9 Anhang

Herstellung der einzelnen Lösungen

EDTA (0,5 M, pH 8,0)

Man fügt 18,6g EDTA (MW = 372,24) und 80ml destilliertes Wassers in ein Behältnis und schwenkt dieses, damit sich die Stoffe schneller vermischen. Danach wird der pH-Wert langsam auf ca. 8,0 durch Zugabe von NaOH erhöht. Anschließend ist eine gute Durchmischung erforderlich. Destilliertes Wasser fügt man so lange hinzu, bis man auf ein Volumen von 100ml Lösung kommt. Diese muss dann mit losem Deckel für 15min bei 121°C autoklaviert werden. Nach dem Autoklavieren wird die Lösung zuerst abgekühlt, um sie dann bei Raumtemperatur lagern zu können.

6 M Guanidinhydrochlorid – Lösung

Man löst 57,32g Guanidinhydrochlorid (MW = 95,53) in 50ml destilliertem Wasser auf. Folgend wird so viel destilliertes Wasser hinzugefügt bis man auf ein Volumen von 100ml Lösung kommt. Für sechs Monate kann man diese Lösung bei Raumtemperatur lagern.

Silciumdioxidlösung (Glasmilch)

Man löst 25g Silicondioxid (MW = 60,08) in 35ml destilliertem Wasser auf. Anschließend fügt man destilliertes Wasser, so lange hinzu bis man auf eine 50ml-Lösung kommt. Die Lösung muss bei 4°C gelagert werden.

Natriumchlorid

Man löst 146,1g NaCl (MW = 58,44) in 250ml destilliertem Wasser auf und fügt so viel destilliertes Wasser hinzu, bis man auf eine 500ml-Lösung kommt. Diese kann für unbestimmte Zeit bei Raumtemperatur gelagert werden.

Tris/EDTA Puffer

Man mischt 99ml destilliertes Wasser, 1ml von 1M Tris mit pH 8,0 und 200µl der 0,5M EDTA-Lösung in einem 200ml-Becherglas zusammen. Diese 100ml kann man anschließend bei Raumtemperatur lagern.

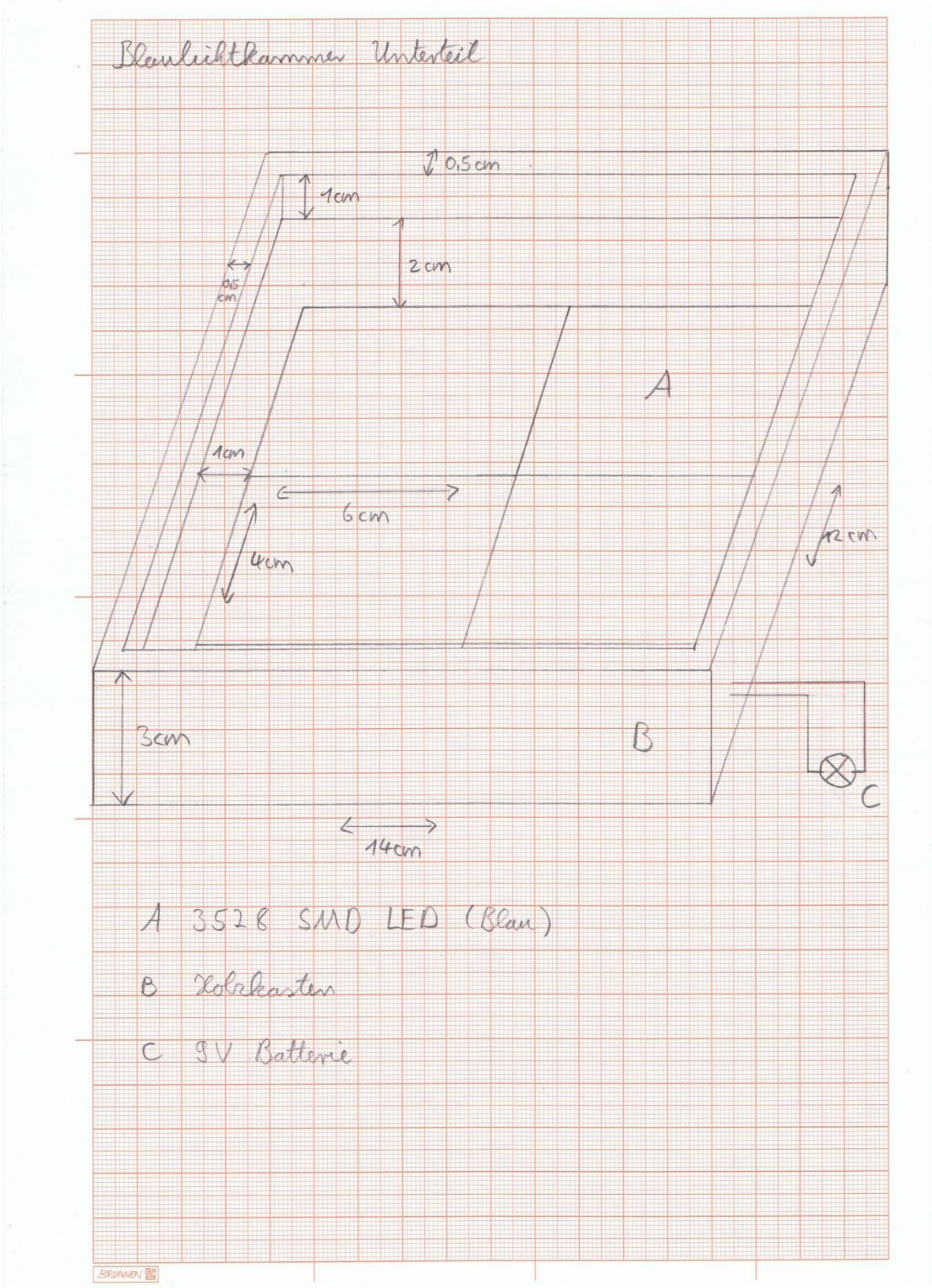
Tris – HCl (1M, pH 8,0 und (,3)

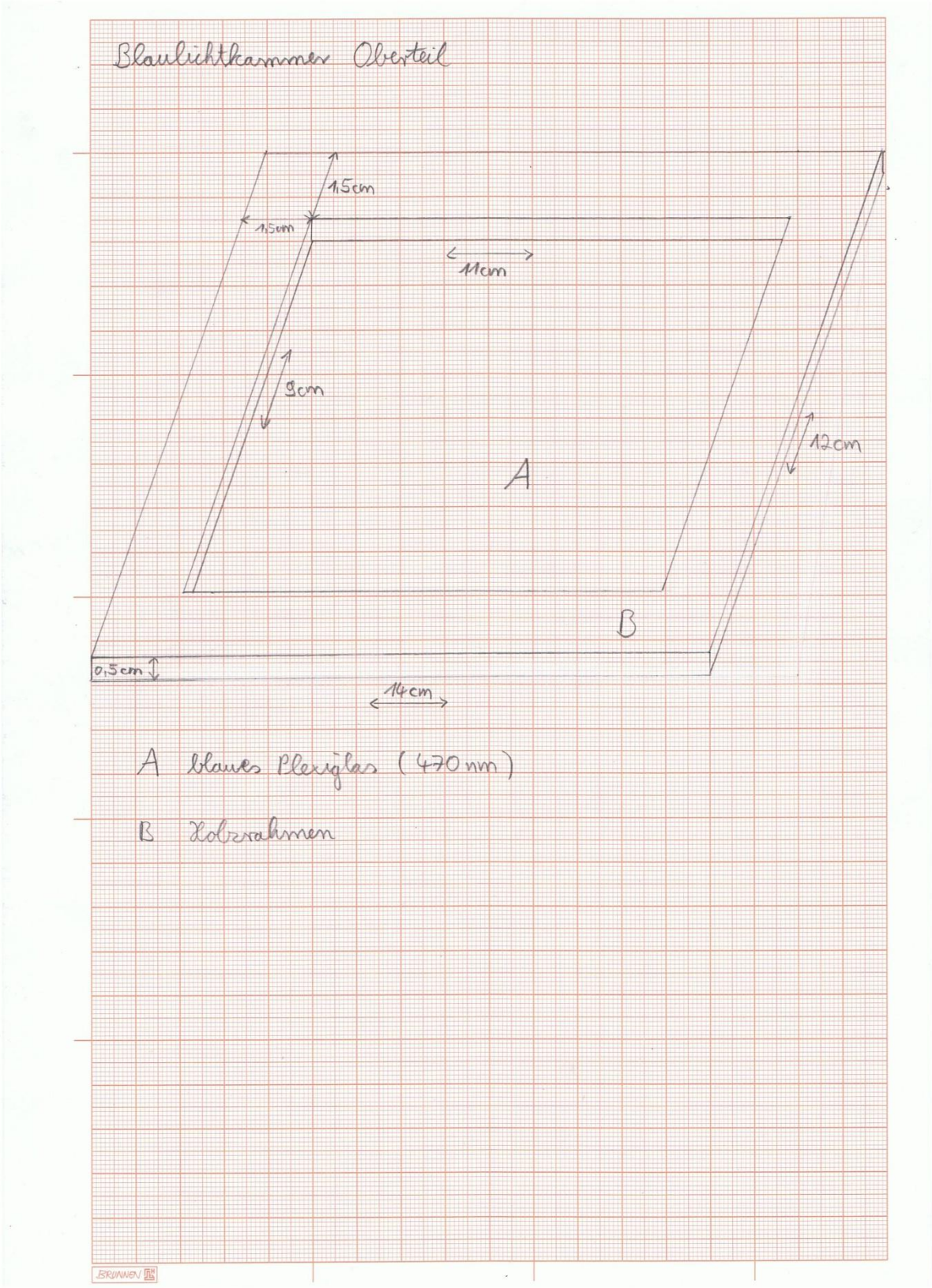
Es wird 12,1g Tris (MW = 121,10) in 70ml destilliertem Wasser gelöst, wobei durch Schwenken oder Verrühren der Vermischungsprozess beschleunigt wird. Um den pH-Wert langsam zu erhöhen, fügt man konzentriertes Hydrochlorid bis zum gewünschten pH-Wert hinzu und kontrolliert diesen mit einem pH-Meter. Danach füllt man die Lösung mit destilliertem Wasser auf 100ml auf. Dies wird dann für 15min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wird die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und kann bei dieser auch gelagert werden.

Wash Buffer

Man fügt 234ml destilliertes Wasser, 10ml von der 1M Tris (pH 7,4)-Lösung, 5ml der 5M NaCl-Lösung, 1ml der 0,5M EDTA-Lösung und 250ml 98%-igem Ethanols zusammen. Man vermischt dies gut und lagert es bei – 20°C.

Aufbau der Blaulichtkammer:




Blaulichtkammer Oberteil
1,5cm
1,5cm
11cm
9cm
12cm
A
B
0,5cm
14cm
A blaues Plexiglas (470nm)
B Holzrahmen

Unsere Versuche:

Vorbereiteter Arbeitstisch zur Herstellung der einzelnen Lösungen zur DNA-Isolation

Einzelne Schritte der DNA-Isolation:

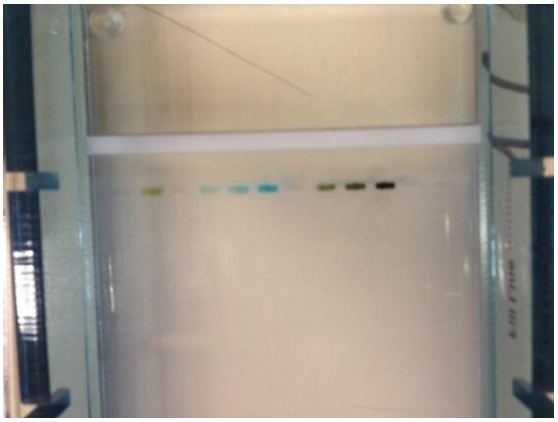
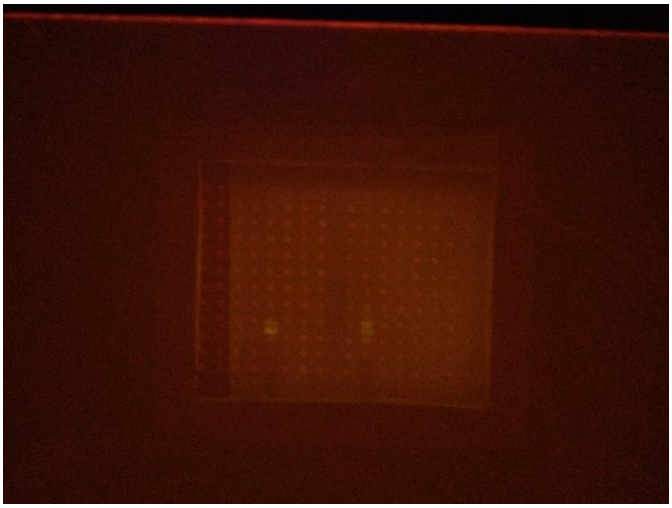
- Arbeitstisch zur DNA-Isolation

- Zentrifugierte DNA mit Kochsalzlösung

- Wasserbad von 65°C

- Mikrozentrifugieren

- DNA-Leiter, verschiedene DNA-Proben mit unterschiedlichen Mengen (5-20µl)



Gel durch Blaulichtkammer betrachten