



# Bestimmung von Tierarten mittels PCR

# Einführung

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



# Einführung

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

- DNA-Isolation
- Polymerasekettenreaktion
- Gelelektrophorese



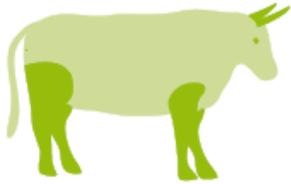
# Einführung

Die Analyse erfolgt in 4 Gruppen:

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



# Einführung



## Untersuchung auf Rind-Anteile:

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



## Untersuchung auf Schweine-Anteile:

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



## Untersuchung auf Huhn-Anteile:

- Geflügelfleisch und Geflügelleberwürste,
- Pasteten



## Untersuchung auf Puten-Anteile:

- Geflügelfleisch und Geflügelleberwürste,
- Pasteten

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

# Versuchsablauf / Zeitschema

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

# Versuchsablauf / Zeitschema

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

# Stundenorganisation

## Unterrichtseinheit 1 (45 min)

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



## Unterrichtseinheit 2 (45 min)

- DNA-Isolation aus den mitgebrachten Proben

Nach DNA-Isolation: Lagerung der DNA bei  $-18^{\circ}\text{C}$ .



# Stundenorganisation



## Unterrichtseinheit 3 (2 x 45 min)

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

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

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



# Stundenorganisation



## Unterrichtseinheit 4 (2 x 45 min)

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

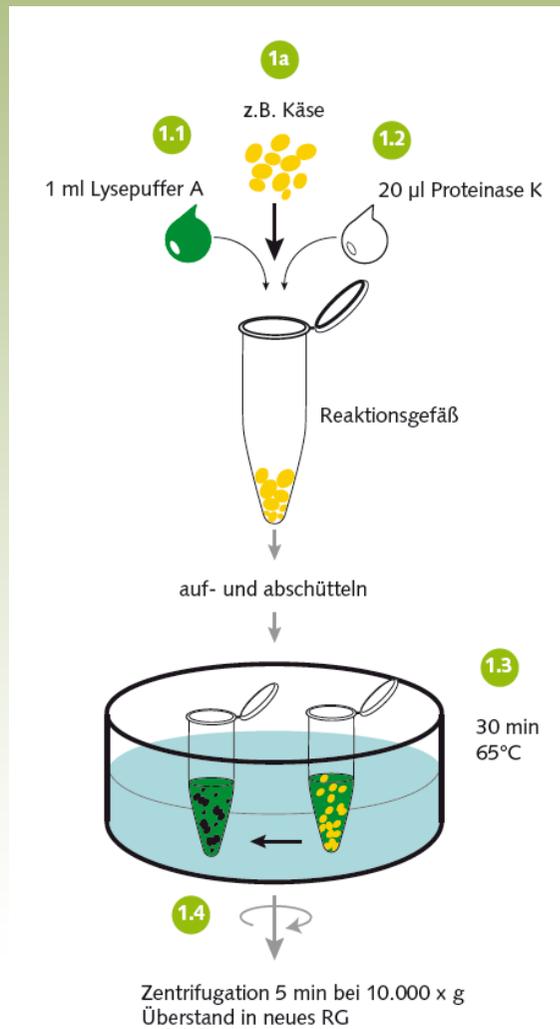
Die Unterrichtseinheiten 1 + 2 können auch als *eine* Einheit gestaltet werden.

# Lernziele Schüler

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

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

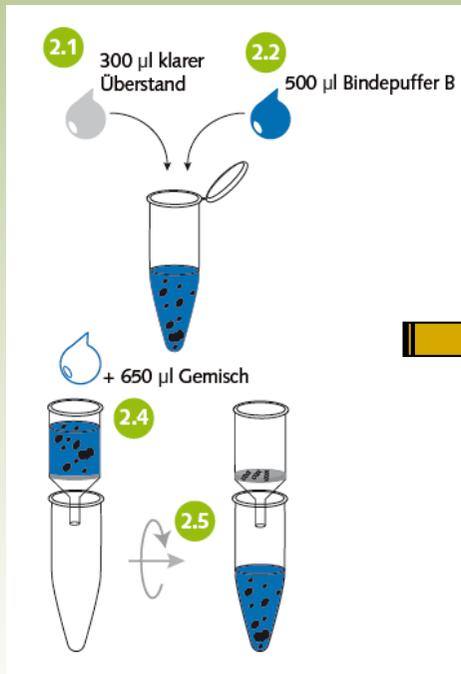
# DNA-Isolation



Vorbereitung  
und Lyse der  
mitgebrachten  
Proben.

# DNA-Isolation

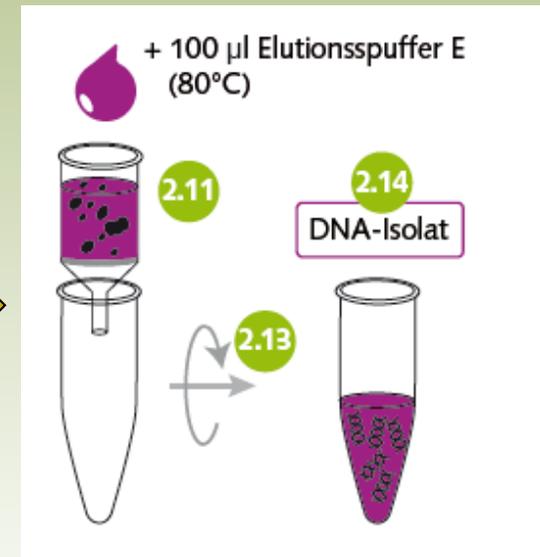
## Gewinnung von DNA aus den lysierten Produkten



Binden der DNA an  
das Säulenmaterial



Waschen

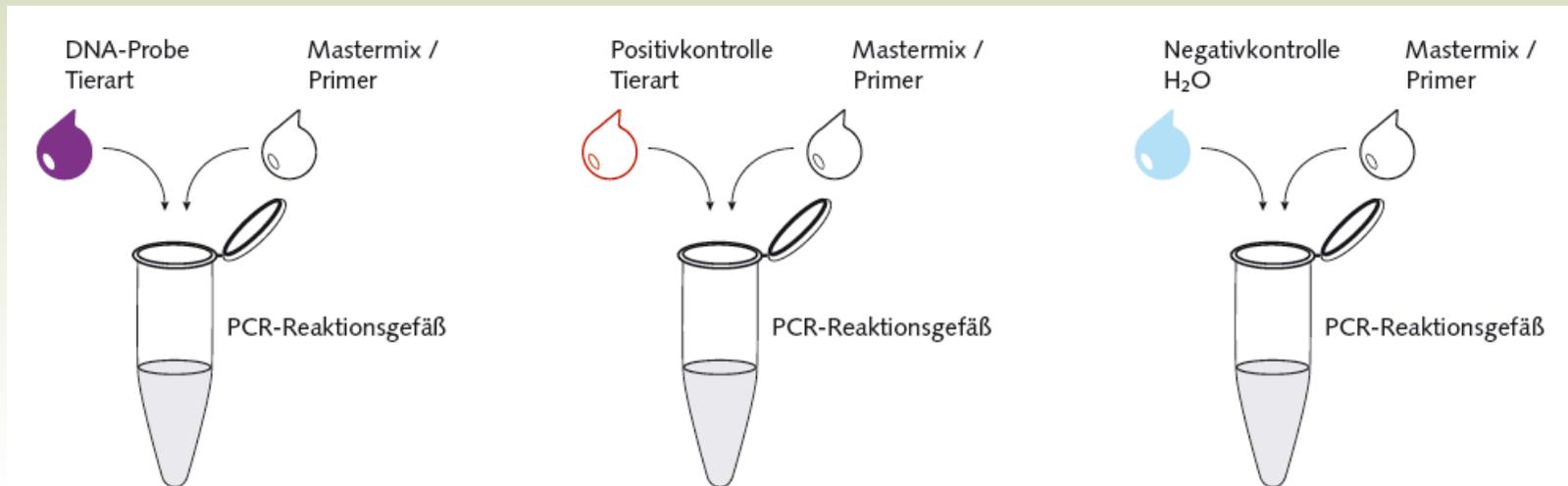


Herauslösen aus dem  
dem Säulenmaterial

# Polymerasekettenreaktion (PCR)

Reaktionsansätze für die PCR bestehen aus folgenden Komponenten:

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

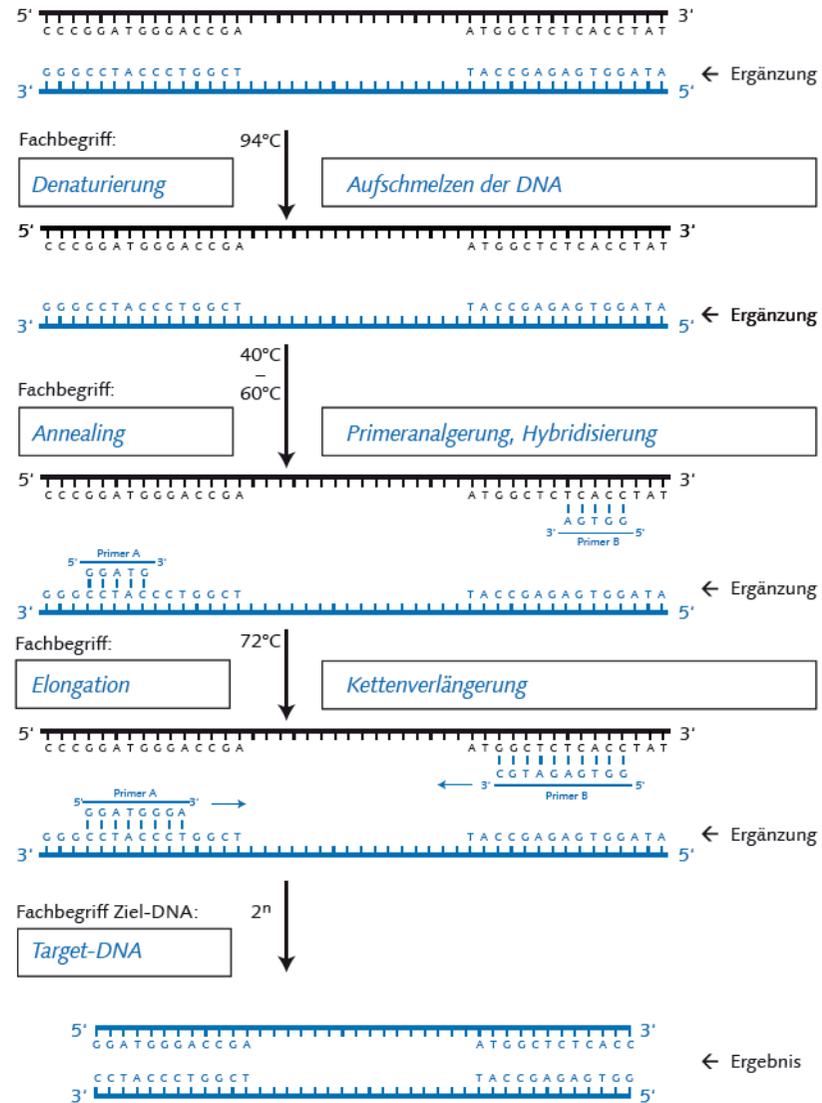


# PCR-Programmierung

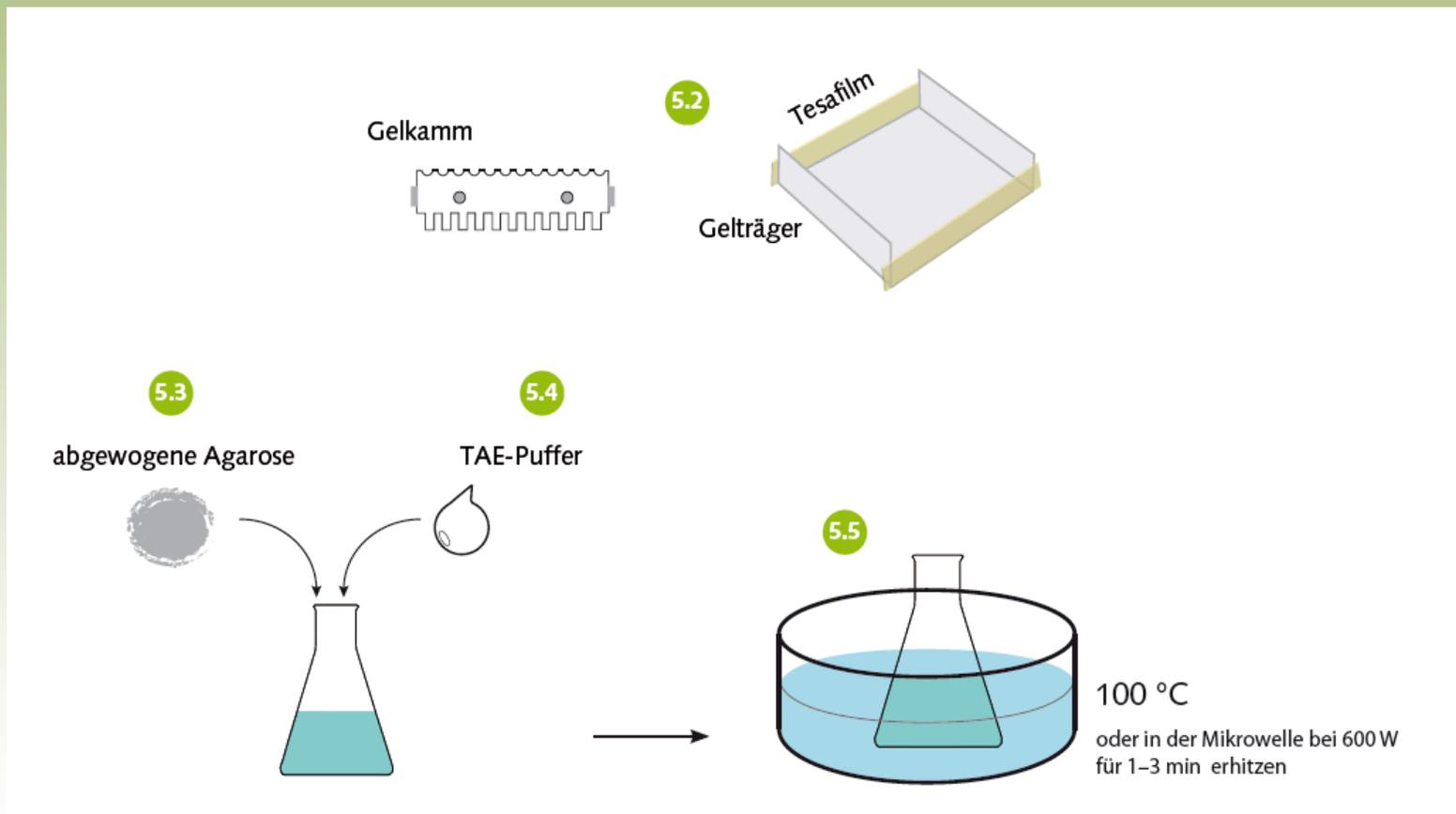
PCR-Proben können entweder direkt für die Gelelektrophorese verwendet werden oder für 4 Wochen bei  $-4^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

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

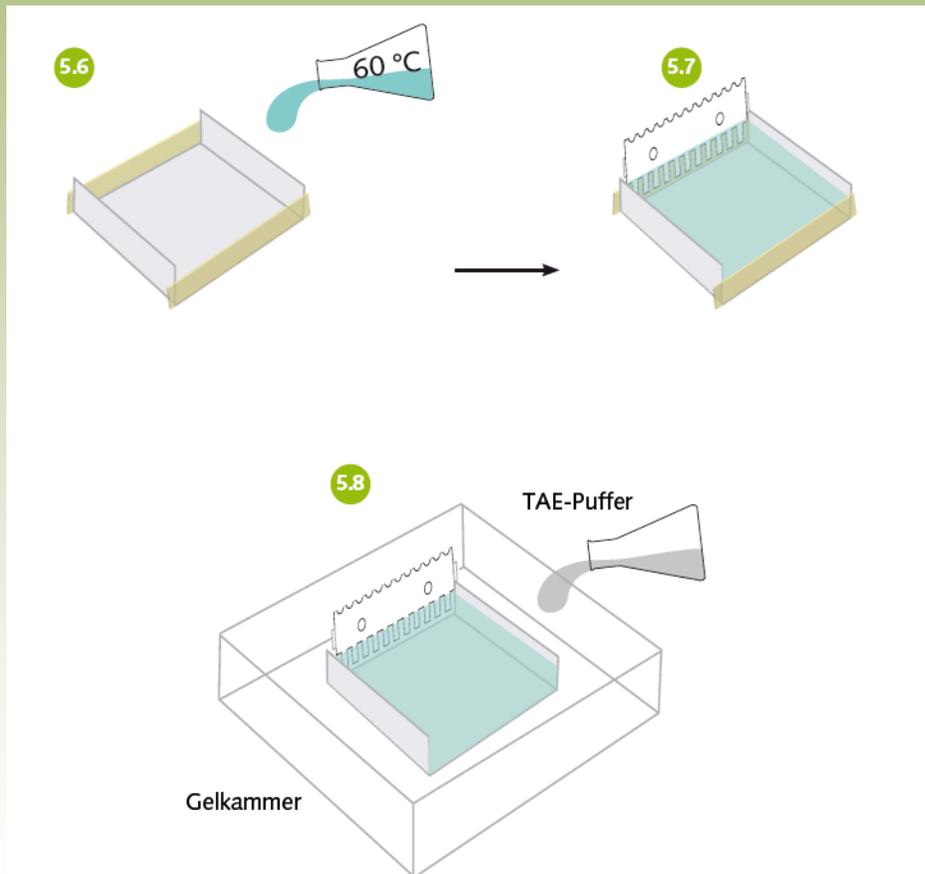
# PCR-Zyklus



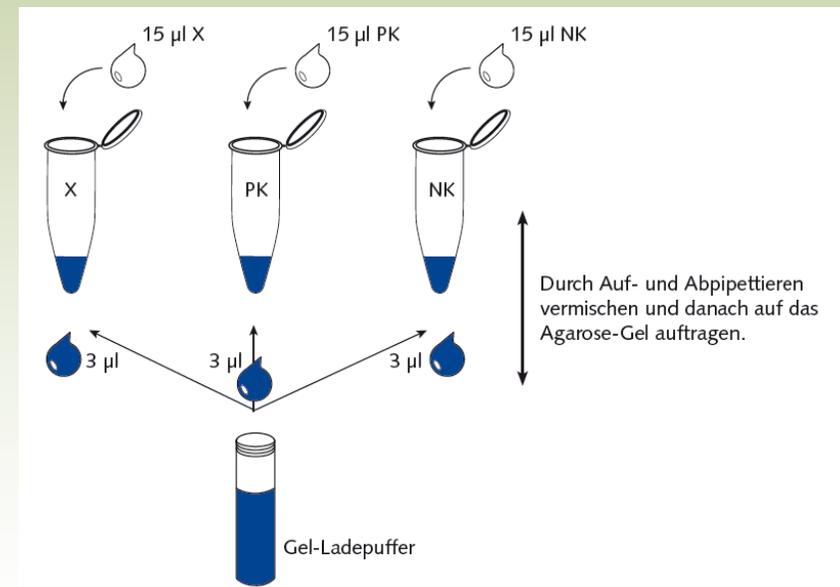
# Gelelektrophorese



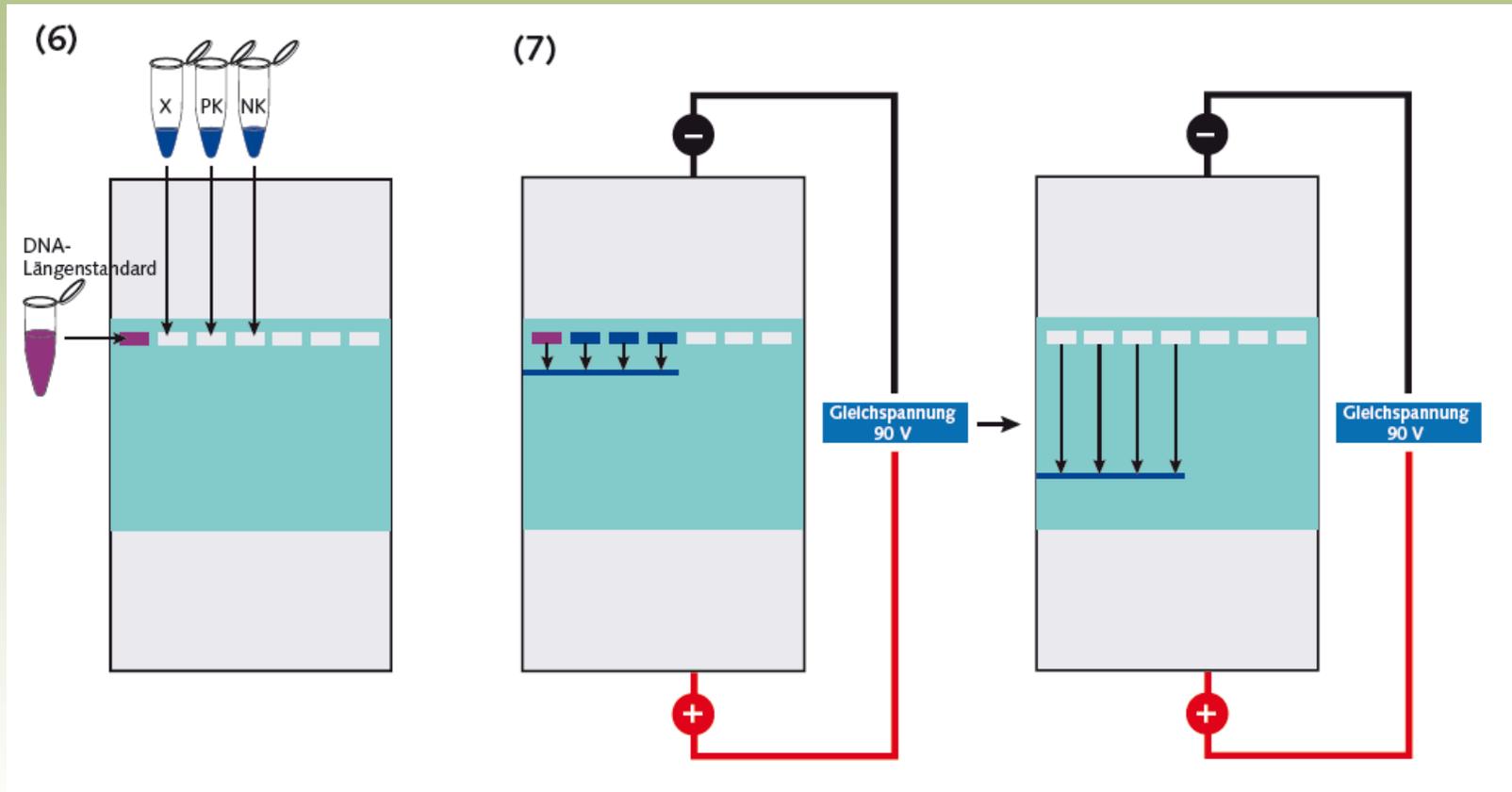
# Gelelektrophorese



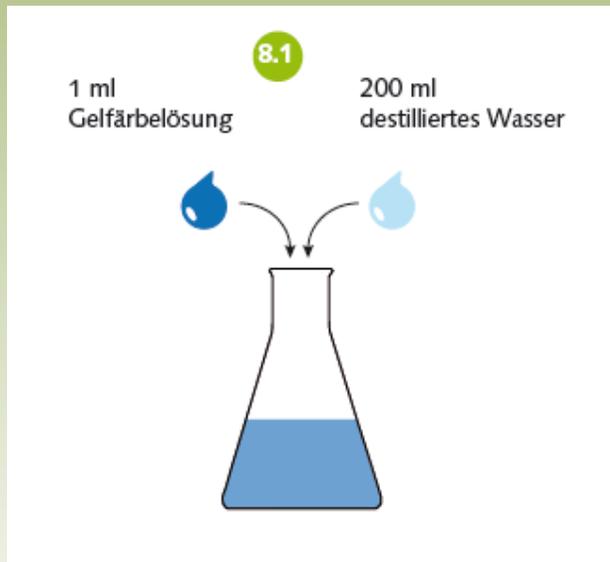
## Vorbereiten der Proben für die Gelelektrophorese



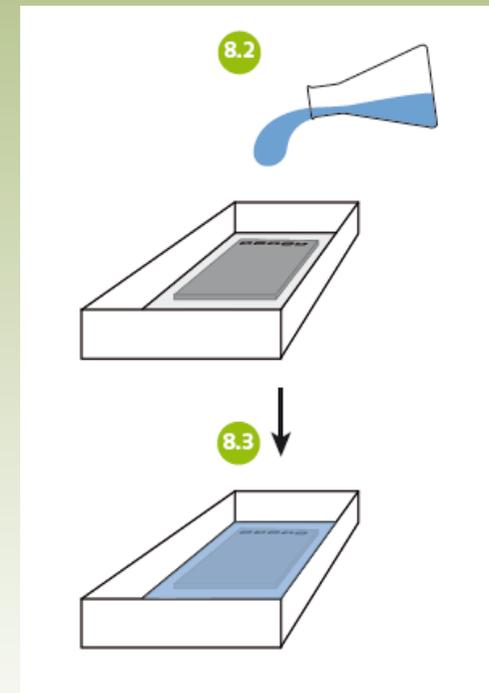
# Gelelektrophorese



# Färbung des Agarosegels

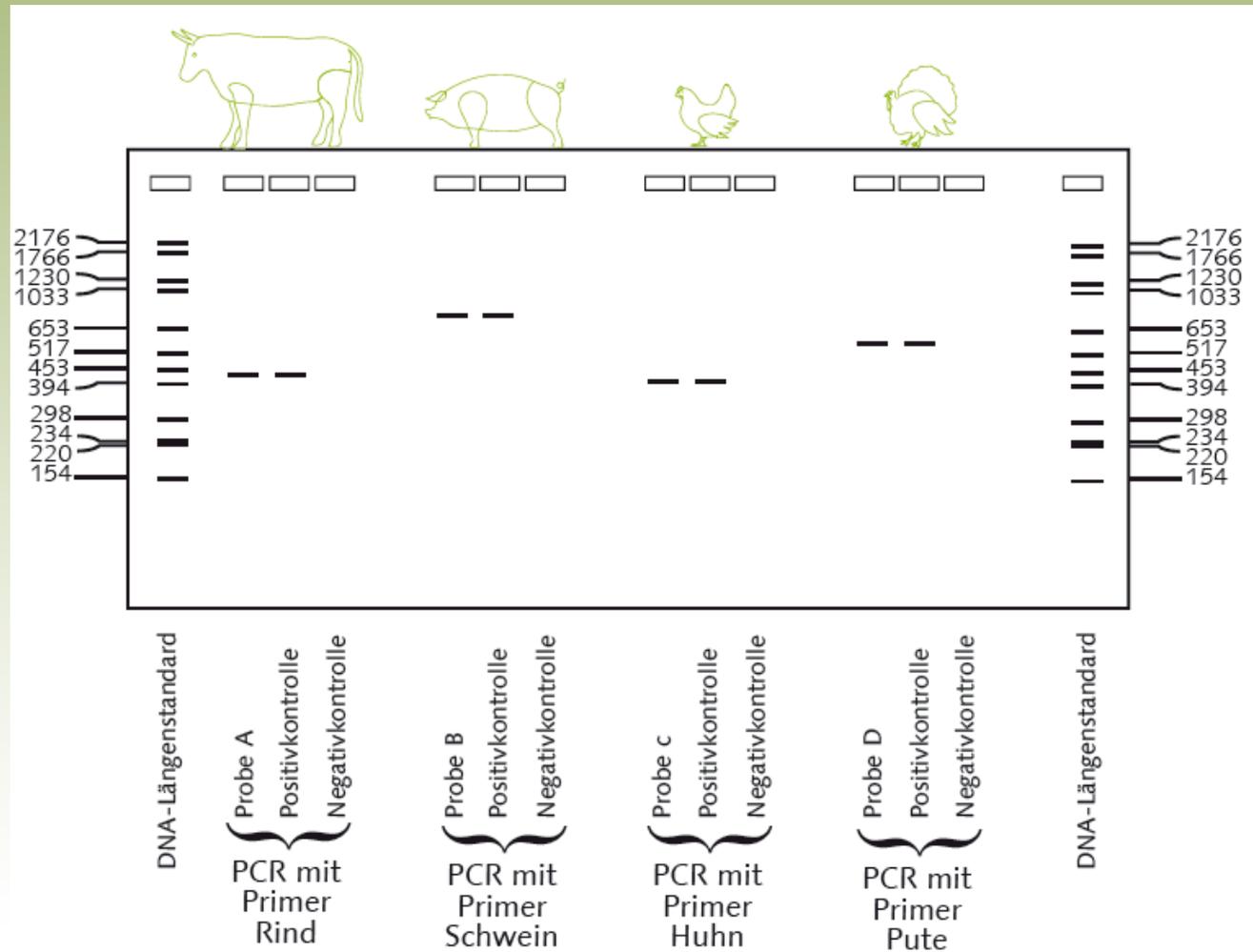


Vorbereiten der  
Methylenblau-Lösung



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

# Gelelektrophorese



# Probleme

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

# Herstellung der PCR-Ansätze

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

2,0  $\mu$ l DNA-Lösung (100 ng/ $\mu$ l)

2,0  $\mu$ l pro Primer (10  $\mu$ mol)

1,0  $\mu$ l 10 mmol „dNTPs“ (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

5,0  $\mu$ l 10-fach konzentrierte Polymerase-Pufferlösung

37,0  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

1,0  $\mu$ l Taq-Polymerase (1–5 U/ $\mu$ l)

 MasterMix

---

50,0  $\mu$ l Gesamtvolumen