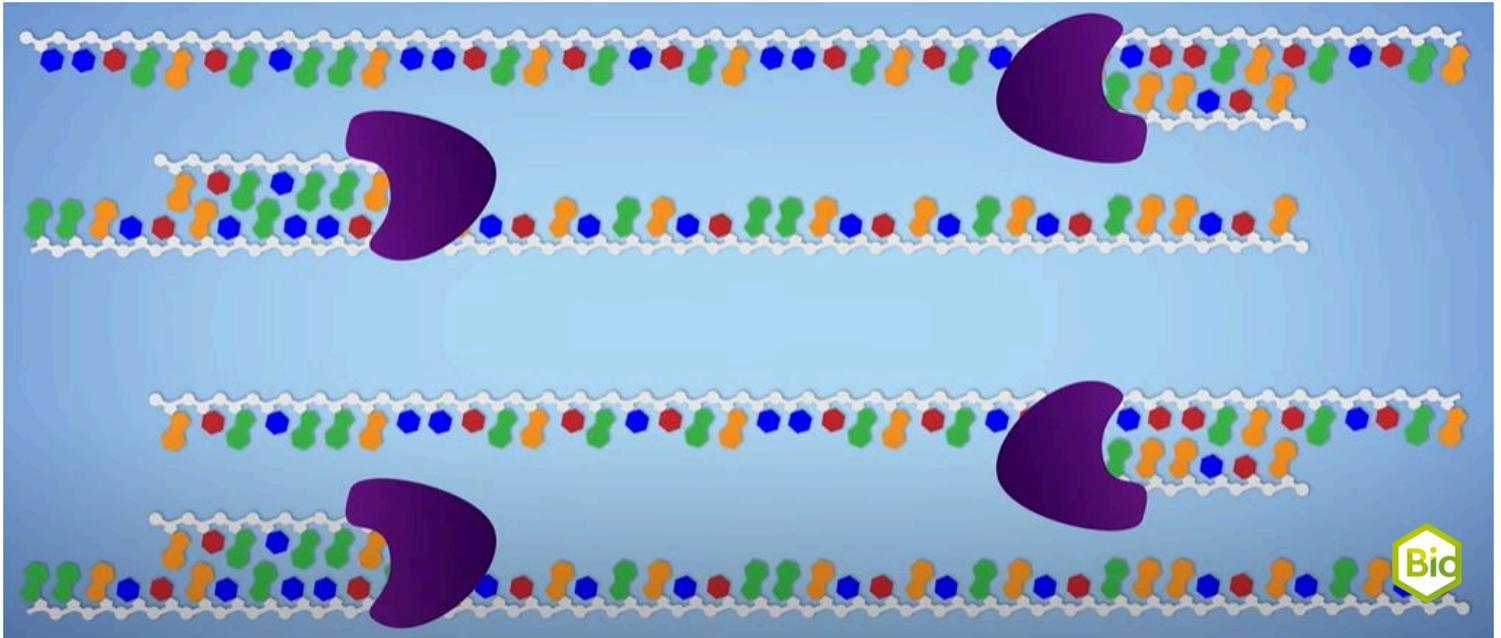


Polymerasekettenreaktion (PCR)



Dieser Versuch dient dem Erlernen der PCR-Labortechniken mit kriminaltechnischer Fragestellung. Dabei erforschen die Lernenden nebenbei auch noch die Erbkrankheit Mukoviszidose und die Zusammenhänge zwischen Genen und Krankheit, die persönliche Identifizierung und den Einsatz der Biotechnologie für genetische Analysen.

Biologie

Mikrobiologie & Genetik

Molekulare Genetik



Schwierigkeitsgrad

mittel



Gruppengröße

2



Vorbereitungszeit

30 Minuten



Durchführungszeit

45+ Minuten

Diese Inhalte finden Sie auch online unter:

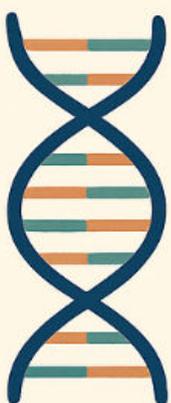


<https://www.curriculab.de/c/682362ffc06fdf0002663832>



Lehrerinformationen

Anwendung



**Normale
DNA**



**Mutierte
DNA**

Nachweis einer genetischen Erkrankung mit PCR – am Beispiel Mukoviszidose

- Im Versuch wird die PCR eingesetzt, um eine spezifische Deletion im CFTR-Gen nachzuweisen, die häufigste Ursache für Mukoviszidose. Dabei wird ein bestimmter Abschnitt des CFTR-Gens vervielfältigt.
- Je nachdem, ob dieser Abschnitt vollständig oder verkürzt vorliegt, unterscheiden sich die PCR-Produkte in ihrer Länge: Normale DNA oder mutierte DNA.
- Durch den Vergleich dieser Längen lässt sich erkennen, ob eine Person gesund, Träger oder betroffen ist. Die PCR ermöglicht somit eine zielgerichtete Diagnose genetischer Defekte, wie sie bei Mukoviszidose auftreten.

Sonstige Lehrerinformationen (1/3)

PHYWE
excellence in science

Vorwissen



Die Lernenden sollten die grundlegenden Eigenschaften der DNA kennen. Außerdem sollten sie den Ablauf der PCR verstehen, insbesondere die drei Hauptschritte: Denaturierung, Annealing und Elongation.

Prinzip



Die Lernenden führen eine PCR durch und bereiten die Reaktionsansätze selbstständig vor. Der Ablauf der PCR kann über die miniPCR-App gesteuert und beobachtet werden. Die Live-Daten werden dabei grafisch dargestellt, so dass sich die Lernenden den Vorgang der PCR plastisch vorstellen können. Die Visualisierung der Ergebnisse durch Gel-Elektrophorese ist nicht Teil dieses Versuchs. Die PCR-Produkte können aber direkt in eine Gelelektrophorese-Einheit pipettiert werden.

Sonstige Lehrerinformationen (2/3)

PHYWE
excellence in science

Lernziel



Die Lernenden sollen durch diesen Versuch die Funktionsweise der PCR kennen und verstehen lernen. Dabei erfahren sie, wie mithilfe dieser Methode DNA gezielt vervielfältigt wird.

Aufgaben



Die Lernenden dosieren die DNA-Proben und PCR-Reagenzien. Dazu werden Primer-Mix, Master-Mix und die DNA-Probe in ein beschriftetes Röhrchen pipettiert und sorgfältig gemischt. Anschließend erfolgt die PCR im Thermocycler mit festgelegten Temperaturzyklen für Denaturierung, Annealing und Extension.

Sonstige Lehrerinformationen (3/3)

PHYWE

Vorbereitung der Reagenzien für die Lernenden. Reagenzien aus dem Gefrierschrank entnehmen und auf Raumtemperatur bringen. Pipettieren Sie dann die folgenden Reagenzien gemäß der nachstehenden Tabelle in beschriftete Plastikröhrchen. Anschließend die Proben wieder einfrieren. **Wichtig:** Um Kontaminationen zu vermeiden, verwenden Sie für jede Zugabe eine neue Pipettenspitze.



Inhalt	Zur Verfügung gestellt	Erforderlich pro Gruppe
Simulierte DNA-Proben	je 100 µl	je 10 µl
<input type="checkbox"/> DNA Verdächtiger A <input type="checkbox"/> DNA Verdächtiger B <input type="checkbox"/> Kontroll-DNA C <input type="checkbox"/> Kontroll-DNA D		je 10 µl
2X EZ PCR Master Mix Load Ready™	700 ml	75 µl
3X Primer-Mix	500 µl	50 µl

Sicherheitshinweise

PHYWE
 excellence in science


- Für diesen Versuch gelten die allgemeinen Hinweise für das sichere Experimentieren im naturwissenschaftlichen Unterricht.
- Für H- und P-Sätze bitte das Sicherheitsdatenblatt der jeweiligen Chemikalie hinzuziehen.
- Das in den GelGreen-Tabletten verwendete SYBR-Green bei der Gelelektrophorese stellt eine sichere Alternative zum herkömmlichen Ethidiumbromid dar. Es kann nicht durch die Haut, aber durch offene Wunden in das Gewebe eindringen. Daher wird zum Gebrauch von Nitril-Handschuhen geraten.
- Agarosegele hergestellt aus den GelGreen-Tabletten können im regulären Hausmüll entsorgt werden.



Schülerinformationen

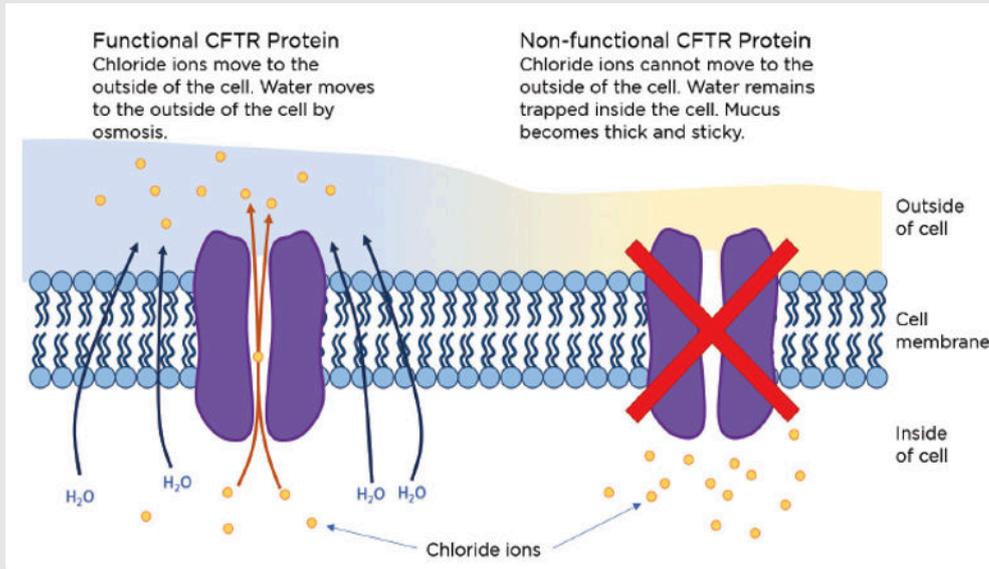
Motivation (1/5)



Missy Baker ist verschwunden!

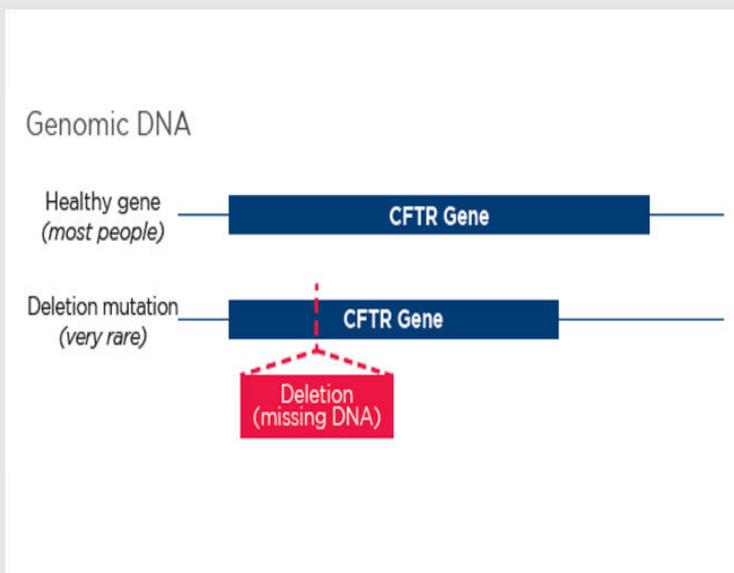
- Zwei rivalisierende Bäcker, Alan Torte und Brenda Biscotti, werden verdächtigt etwas mit dem Verschwinden zu tun zu haben. Haarproben, die aus dem Auto der beiden Verdächtigen entnommen wurden, könnten mit dem Haar von Missy Baker übereinstimmen. Sie müssen mithilfe der DNA-Analyse helfen sie zu finden!
- Jeder Mensch trägt in nahezu jeder Zelle eine einzigartige DNA, die als Spurenlräger dient. Diese Eigenschaft macht DNA zu einem wertvollen Hilfsmittel in der Forensik, etwa zur Identifikation von Personen an einem Tatort.
- Da Missy Baker an Mukoviszidose leidet, lässt sich ihre DNA durch eine spezifische Deletion im CFTR-Gen eindeutig nachweisen.

Motivation (2/5)



Mukoviszidose wird durch Mutationen im CFTR-Gen verursacht. Dieses Gen steuert die Bildung eines Proteins in der Zellmembran, das für den Transport von Chloridionen aus der Zelle zuständig ist. Wenn das CFTR-Protein defekt ist, bleiben Chloridionen und Wasser in der Zelle, und der Schleim wird dick und klebrig. Dieser Schleim verstopft die Atemwege und kann zu Infektionen und Organschäden führen.

Motivation (3/5)



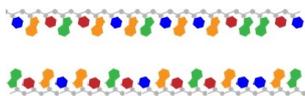
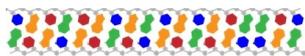
- Es sind über 1500 verschiedene Mutationen bekannt, die zu einem nicht funktionsfähigen CFTR-Protein und damit zu Mukoviszidose führen können. Die häufigste Mutation ist eine Deletion, bei der ein Abschnitt der normalen DNA-Sequenz fehlt.
- Je nachdem, welcher Teil fehlt, kann die Mutation dazu führen, dass das CFTR-Protein fehlerhaft gebildet wird oder gar nicht entsteht.
- Mukoviszidose ist eine rezessive Erbkrankheit. Das bedeutet: Eine Person erkrankt nur, wenn sie zwei defekte CFTR-Gene besitzt – also eine Mutation auf beiden Chromosomen geerbt hat.

Motivation (4/5)

PHYWE
excellence in science

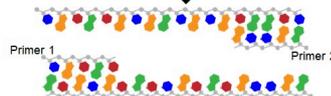
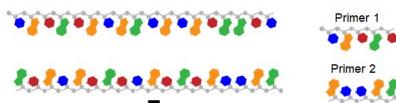
Für die Vervielfältigung der DNA-Probe des Betroffenen wird die PCR angewandt. Es werden hierzu Primer verwendet, die in konservierten Bereichen links und rechts neben den polymorphen Bereichen binden. Das Resultat sind unterschiedlich lange PCR-Fragmente. Betrachtet man mehrere solcher Bereiche, erhält man ein Muster, das praktisch einzigartig für jedes Individuum ist. Die PCR besteht aus drei Schritten, die in Zyklen wiederholt werden:

1. Denaturierung



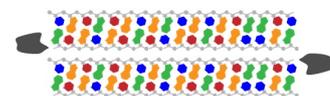
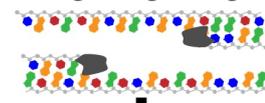
Durch Erhitzen werden die DNA-Doppelstränge vereinzelt.

2. Anlagerung/Annealing



Primer lagern sich an die einzelsträngige DNA an.

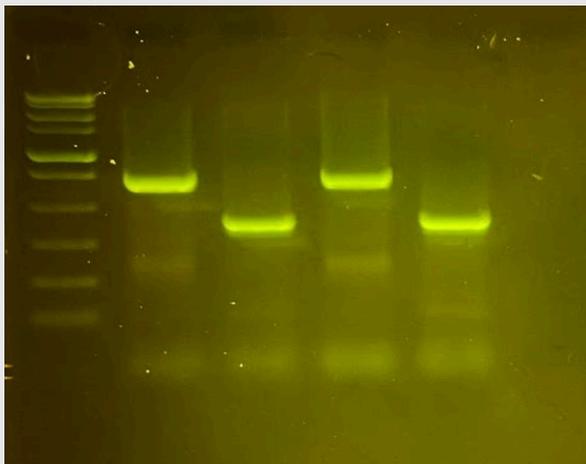
3. Verlängerung/Elongation



Die Polymerase generiert den komplementären DNA-Strang.

Motivation (5/5)

PHYWE
excellence in science



DNA-Banden im Agarosegel

Nach Abschluss der PCR wird die Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei können die bei der PCR entstandenen DNA-Fragmente aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Die Elektrophorese ermöglicht die Auftrennung und das Sichtbarmachen der DNA-Fragmente. Hierbei nutzt man die negative Ladung der Nukleinsäuren, die im elektrischen Feld zum Pluspol (Anode) wandern. Als stationäre Phase dient das Agarosegel, das wie ein Netz funktioniert: je höher die Agarosekonzentration im Gel, desto enger werden die Maschen des Netzes. Kleine DNA-Fragmente haben es leichter als große, sich durch dieses Netz zur Anode zu bewegen und wandern demnach über die Zeit weiter im Gel. Nukleinsäuren sind von alleine nicht im Gel sichtbar. Deshalb setzen wir einen fluoreszierenden Farbstoff ein. Das blaue Licht unter der Elektrophoresekammer regt den Farbstoff zum Leuchten an und macht so die DNA sichtbar.

Material

Position	Material	Art.-Nr.	Menge
1	Thermocycler miniPCR mini16X für 16 Proben, PCR-Gerät	35014-99	1
2	Forensischer Versuchskit für die PCR (Crime Lab: Missy Baker Missing)	35018-03	1
3	Mikroliterpipette 2-20 µl, autoklavierbar	47141-10	1
4	Spitzen, Kunststoff (PP), in Box, 2-200 µl, gelb, 96 Stück	47148-11	1
5	PCR Einzelgefäße, 0,2 ml, 100 Stück, im Beutel	35928-01	1
6	Mikroliterpipette 20-200 µl, autoklavierbar	47141-11	1
7	Einmalreaktionsgefäße 1,5 ml, 50 Stück	37653-02	1
8	Ständer für 20 x 1,5 ml Einmalreaktionsgefäße	37652-00	1
9	Ständer für 8 x 0,2 ml Einmalreaktionsgefäße	37652-01	1

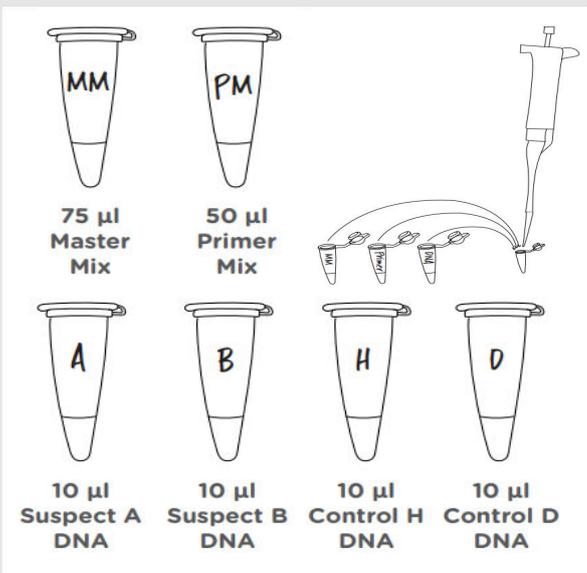
Aufbau (1/1)



Thermocycler miniPCR

- Laden Sie die miniPCR-App für den miniPCR-Thermocycler aus dem App Store herunter (für alle mobilen Endgeräte und Computer).
- Der Thermocycler kann im Voraus von der Lehrkraft oder während des Unterrichts von den Lernenden programmiert werden.
- Sobald das Programm gestartet wurde, führt das miniPCR das Programm auch dann zu Ende, wenn die Verbindung zum Gerät, auf dem die App läuft, unterbrochen wird.
- Wenn Sie die Reaktion während des Laufs in Echtzeit überwachen möchten, muss der miniPCR-Thermocycler mit dem Endgerät verbunden bleiben, auf dem die App läuft.

Durchführung (1/3)



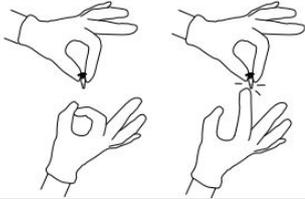
1. Pipettieren Sie die PCR-Reagenzien gemäß der nachstehenden Tabelle in die beschrifteten Gefäße. Um Kontaminationen zu vermeiden, verwenden Sie für jede Zugabe eine neue Spitze.

	Röhrchen A	Röhrchen B	Röhrchen H	Röhrchen D
2X EZ PCR Master Mix	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
3X Primer-Mix	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
DNA-Probe	Verdächtiger A 5 µl	Verdächtiger B 5 µl	Kontrolle H 5 µl	Kontrolle D 5 µl

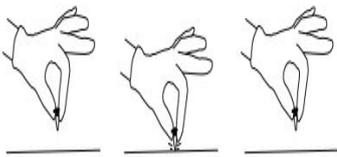
Durchführung (2/3)

PHYWE
excellence in science

Flick to mix



Tap to collect liquid at bottom



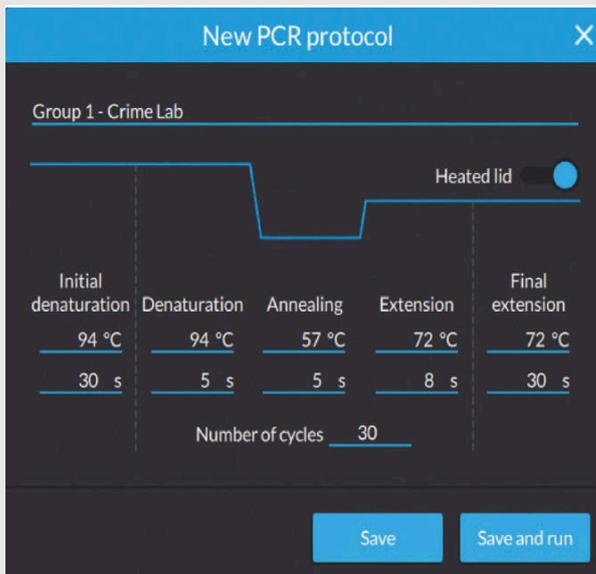
2. Schütteln Sie das Röhrchen, um den Inhalt zu mischen. Falls vorhanden, kann ein Vortex-Mixer verwendet werden.

3. Vergewissern Sie sich, dass sich die gesamte Flüssigkeit am Boden des Röhrchens befindet.

4. Falls Flüssigkeit an den Röhrchenwänden oder im Deckel haftet, entfernen Sie diese durch kräftiges Ausschütteln per Hand oder, wenn eine Minizentrifuge vorhanden sein sollte, durch kurzes Zentrifugieren in der Mikrozentrifuge.

5. Fahren Sie anschließend sofort mit dem nächsten Abschnitt des Protokolls fort.

Durchführung (3/3)

PHYWE
excellence in science

Programmierung des PCR-Geräts

Programmieren Sie Ihren Thermocycler mit den folgenden Parametern:

Initiale Denaturierung: 94°C, 30 Sekunden

Denaturierung: 94°C, 5 Sekunden

Annealing: 57°C, 5 Sekunden

Extension: 72°C, 8 Sekunden

Anzahl der Zyklen: 30

Finale Extension: 72°C, 30 Sekunden

Die PCR dauert etwa 35 Minuten, wenn ein miniPCR-Thermocycler verwendet wird.

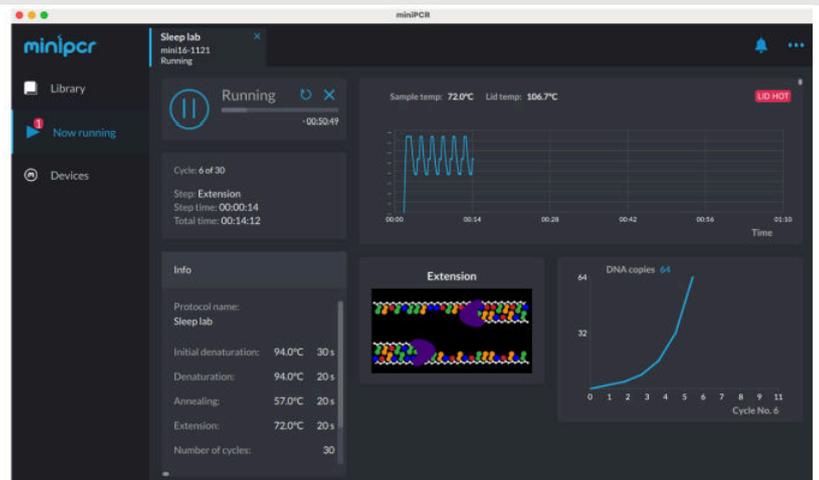


Protokoll

Aufgabe 1

Während einer laufenden PCR-Reaktion

1. Nennen Sie die drei Hauptphasen der PCR, die mit der miniPCR-App überwacht werden können.
2. Erklären Sie, was während der Phase „Extension“ geschieht.
3. Beschreiben Sie, was die blaue Kurve im rechten unteren Fenster der Software darstellt.
4. Erklären Sie, wie sich die DNA-Menge im Verlauf der PCR verändert.



Echtzeitüberwachung PCR-Reaktion mit der miniPCR®-Software

Aufgabe 2



Was trifft für die Polymerasekettenreaktion (PCR) zu?

- PCR ist eine enzymatische Reaktion.
- Durch die PCR werden DNA-Fragmente sichtbar gemacht.
- Die DNA-Polymerase fragmentiert DNA.
- Die Zyklen der PCR sind: 1. Denaturierung 2. Elongation 3. Annealing

✓ Überprüfen

Aufgabe 3

Trage die fehlenden Wörter ein!

DNA ist geladen und wandert im Feld zur . Die DNA ist eine Doppelhelix. Durch Wasserstoffbrückenbindungen paaren sich und Thymin, sowie Cytosin und .

DNA-Bereiche eignen sich, um Individuen voneinander zu unterscheiden. Diese variablen Abschnitte befinden sich hauptsächlich in , während Exons eher konserviert sind.

Um einen vollständigen genetischen zu erstellen, werden variable DNA-Bereiche analysiert.

✓ Überprüfen

Aufgabe 4

Was ist eine **Deletionsmutation**?

- Eine Mutation, bei der ein Teil der DNA-Sequenz entfernt wird.
- Eine Mutation, bei der ein zusätzliches Stück DNA eingefügt wird.
- Eine Mutation, bei der ein Basenpaar durch ein anderes ersetzt wird.

✓ Überprüfen

Aufgabe 5

In welchem Gen tritt die Mutation auf, die zur Erbkrankheit Mukoviszidose führt?

- HBB-Gen
- CFTR-Gen
- BRCA1-Gen

✓ Überprüfen

Folie	Punktzahl/Summe
Folie 20: Unbenannt: Multiple Choice	0/1
Folie 21: Unbenannt: Fill in the Blanks	0/9
Folie 22: Unbenannt: Multiple Choice	0/1
Folie 23: Unbenannt: Multiple Choice	0/1

Gesamtpunktzahl  0/12

 Lösungen anzeigen

 Wiederholen