

Polymerasekettenreaktion (PCR) mit eigener DNA



Dieser Versuch dient der authentischen Untersuchung zur Genetik des Schlafs und der circadianen Uhren. Mit Hilfe der PCR kann der eigene Genotyp an einem Locus, der mit einer Präferenz für den Morgen oder den Abend in Verbindung gebracht wird, bestimmt werden. Dazu verwenden die Lernenden ihre eigene DNA.

Biologie

Mikrobiologie & Genetik

Molekulare Genetik



Schwierigkeitsgrad



Gruppengröße



Vorbereitungszeit



Durchführungszeit

mittel

2

20 Minuten

45+ Minuten

Diese Inhalte finden Sie auch online unter:

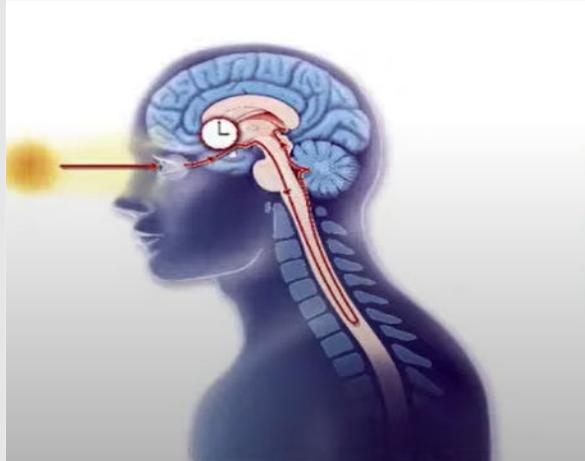


<https://www.curriculab.de/c/680f7a19df0fa40002f5980d>



Lehrerinformationen

Anwendung



Lichtsignale erreichen über die Augen den suprachiasmatischen Nukleus (SCN) im Hypothalamus

Die zirkadiane Uhr ist ein innerer Zeitmesser, der Körperfunktionen wie Schlaf, Stoffwechsel und Hormonausschüttung im 24-Stunden-Rhythmus steuert. Sie wird hauptsächlich durch Sonnenlicht synchronisiert, damit unser Körper im Einklang mit dem Tag-Nacht-Zyklus bleibt. Auf zellulärer Ebene basiert sie auf genetischen Rückkopplungsschleifen, die die Genaktivität täglich regulieren. Beim Menschen steuert der suprachiasmatische Nukleus (SCN) im Gehirn die Hauptuhr, unterstützt durch Gene wie Clock, BMAL1, Period und Cryptochrom.

Mit der **PCR** werden gezielt bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigt, um genetische Unterschiede sichtbar zu machen. Dadurch kann untersucht werden, ob genetische Variationen mit dem Schlaf-Wach-Rhythmus zusammenhängen.

Sonstige Lehrerinformationen (1/2)

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 (2/2)

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 gewinnen ihre DNA aus ihrer Mundschleimwand und bereiten nach der DNA-Isolierung ihre PCR-Proben vor. Dazu werden Primer-Mix, Master-Mix und DNA-Probe in ein beschriftetes Röhrchen pipettiert und sorgfältig gemischt. Anschließend erfolgt die PCR im Thermocycler mit festgelegten Temperaturzyklen für Denaturierung, Annealing und Extension.

Sicherheitshinweise



- 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 (1/4)



Hatten Sie schon einmal einen Jetlag, nachdem Sie weit weg von zu Hause gereist sind, und konnten nur schwer schlafen? Fühlen Sie sich normalerweise jeden Tag zur gleichen Tageszeit müde?

Diese beiden Phänomene werden von Ihrer zirkadianen Uhr gesteuert. Circadiane Uhren sind interne Zeitmesser, die die Physiologie und das Verhalten unseres Körpers in einem sich täglich wiederholenden Zyklus regulieren. Unsere innere Uhr bestimmt, zu welchen Tageszeiten wir uns schlaftrig, energiegeladen oder hungrig fühlen und steuert wichtige Körperfunktionen. Die zirkadiane Uhr steuert in jeder Zelle einen 24-Stunden-Rhythmus durch eine genetische Rückkopplung von Proteinen, die abwechselnd

Motivation (2/4)



Morgenlerche oder eine Nachteule

Ihre Gene können beeinflussen, ob Sie eher eine Morgenlerche oder eine Nachteule sind!

Das *Period 3 (Per3)* ist ein wichtiges Gen der zirkadianen Uhr und zeigt beim Menschen genetische Vielfalt (Polymorphismus). Eine spezielle Variation, die Variable Number Tandem Repeat (VNTR), beeinflusst die innere Uhr. Dabei wiederholt sich eine 54-Basenpaare-Sequenz im *Per3*-Gen entweder vier- oder fünfmal. Diese Unterschiede können beeinflussen, ob jemand eher ein Morgen- oder Abendtyp ist. Vier Wiederholungen stehen eher mit abendlicher Aktivität, fünf Wiederholungen mit morgendlicher Aktivität in Verbindung.

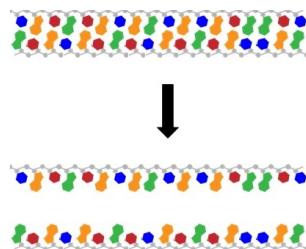
Mithilfe der PCR kann diese genetische Variation sichtbar gemacht und untersucht werden.

Motivation (3/4)

Für die PCR 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.

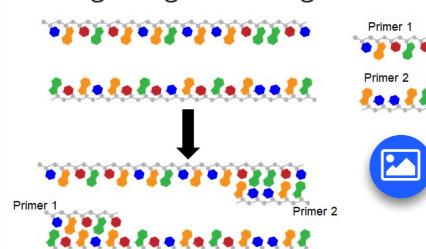
Die PCR besteht aus drei Schritten, die in Zyklen wiederholt werden:

1. Denaturierung



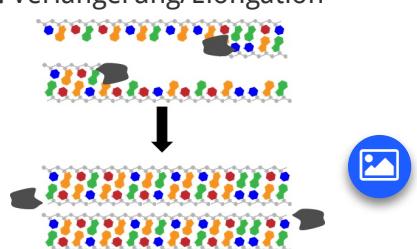
Durch Erhitzen werden die DNA-Doppelstränge vereinzelt.

2. Anlagerung/Annealing



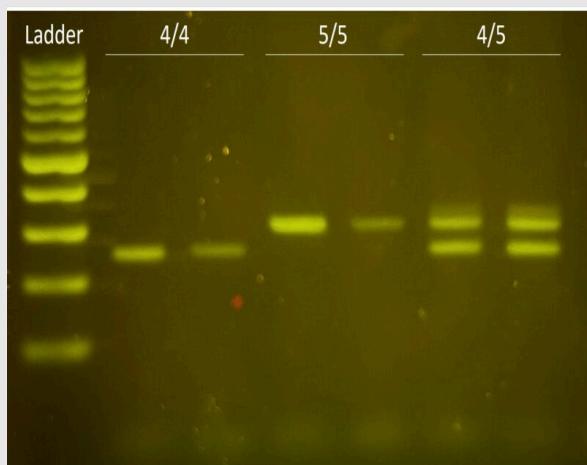
Primer lagern sich an die einzelsträngige DNA an.

3. Verlängerung/Elongation



Die Polymerase generiert den komplementären DNA-Strang.

Motivation (4/4)



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 Einzelgefäß, 0,2 ml, 100 Stück, im Beutel	35928-01	1
6	Mikroliterpipette 20-200 µl, autoklavierbar	47141-11	1
7	Einmalreaktionsgefäß 1,5 ml, 50 Stück	37653-02	1
8	Ständer für 20 x 1,5 ml Einmalreaktionsgefäß	37652-00	1
9	Ständer für 8 x 0,2 ml Einmalreaktionsgefäß	37652-01	1

Aufbau (1/1)



miniPCR-Thermocycler mit den Kitkomponenten

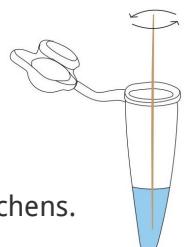
- Die Gruppen benötigen Zugang zu einem miniPCR-Thermocycler.
- Laden Sie die miniPCR-App aus dem App Store herunter (für alle mobilen Endgeräte und Computer).
- Die Maschinen können im Voraus von der Lehrkraft oder während des Unterrichts von den Lernenden programmiert werden.
- Sobald das Programm 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 (1/5)

DNA-Extraktion aus den Zellen der Mundschleimhaut

Mindestens 20 Minuten vorher: Nichts essen oder Kaugummi kauen.

1. Pipettieren Sie 50µl Extraktionspuffer in ein 0,2 ml-Röhrchen.
2. Beschriften Sie das Röhrchen mit "E" und Ihren Initialen auf der oberen Seitenwand des Röhrchens.
3. Vorsichtig 3 bis 4 Mal mit flachem Zahnstocher die Innenseite der Wange abkratzen (sollte nicht wehtun).
4. Zahnstocher in das Röhrchen mit Puffer tauchen, Zellen durch Schwenken lösen, Zahnstocher entsorgen.
5. Röhrchen fest verschließen. Sie sollten spüren, wie die Kappe einrastet.
6. Röhrchen 10 min. bei 95 °C inkubieren (z. B. im miniPCR, Heizblock oder Wasserbad).
7. Röhrchen vom Heizblock nehmen und mit der PCR beginnen.



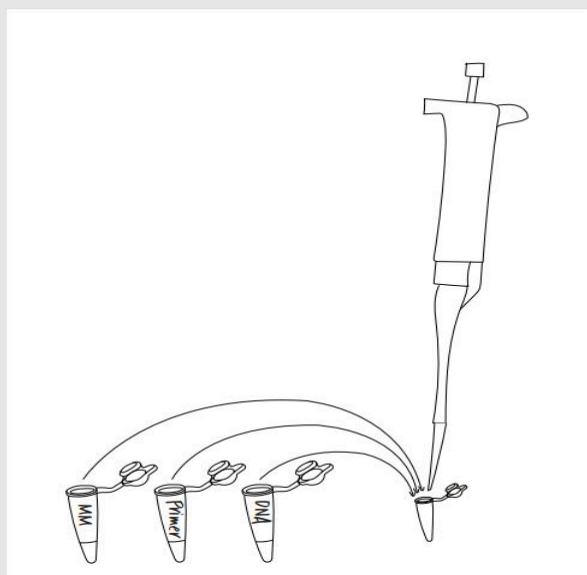
Durchführung (2/5)



PCR-Proben vorbereiten

1. Beschriften Sie ein neues 0,2-ml-PCR-Gefäß mit Ihren Initialen, gefolgt von "P" für PCR, und schreiben Sie es auf die obere Seitenwand des Gefäßes.
2. Geben Sie die PCR-Reagenzien gemäß der Tabelle (**siehe nächste Folie**) in das entsprechend beschriftete Röhrchen.
3. Schließen Sie die Kappe auf dem Röhrchen. Wenn sie richtig geschlossen ist, sollten Sie spüren, wie die Kappe einrastet.

Durchführung (3/5)

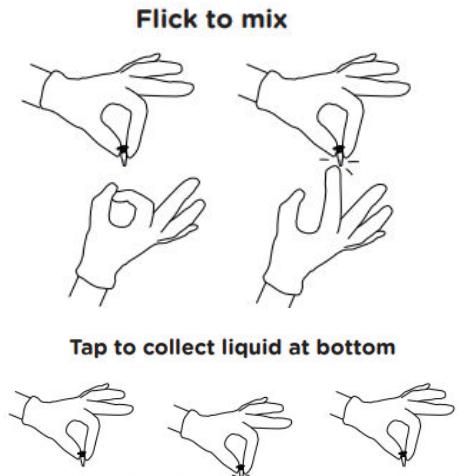


Die PCR-Reagenzien werden gemäß der unten stehenden Tabelle in das beschriftete Röhrchen gegeben.

Wichtig: Um Kontaminationen zu vermeiden, verwenden Sie für jede Zugabe eine neue Pipettenspitze.

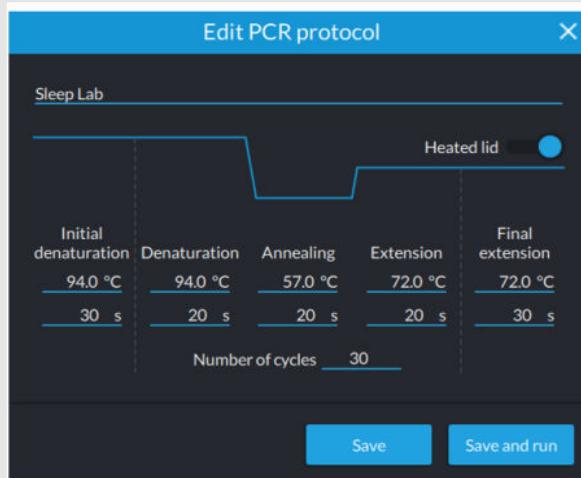
Primer-Mix (Röhrchen P)	20 µl
Master-Mix (Röhrchen M)	5 µl
DNA-Probe des Lernenden aus dem vorherigen Schritt	3 µl
Gesamtvolumen	28 µl

Durchführung (4/5)



4. Schütteln Sie das Röhrchen, um den Inhalt zu mischen. Falls vorhanden, kann ein Vortex-Mixer verwendet werden.
5. Vergewissern Sie sich, dass sich die gesamte Flüssigkeit am Boden des Röhrchens befindet.
6. 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.
7. Fahren Sie anschließend sofort mit dem nächsten Abschnitt des Protokolls fort.

Durchführung (5/5)



Programmierung des PCR-Geräts

Programmieren Sie Ihren Thermocycler mit den folgenden Parametern:

Initiale Denaturierung: 94°C, 30 Sekunden

Denaturierung: 94°C, 20 Sekunden

Annealing: 57°C, 20 Sekunden

Extension: 72°C, 20 Sekunden

Anzahl der Zyklen: 30

Finale Extension: 72°C, 60 Sekunden

Die PCR dauert etwa 60 Minuten, wenn ein miniPCR-Thermocycler verwendet wird.

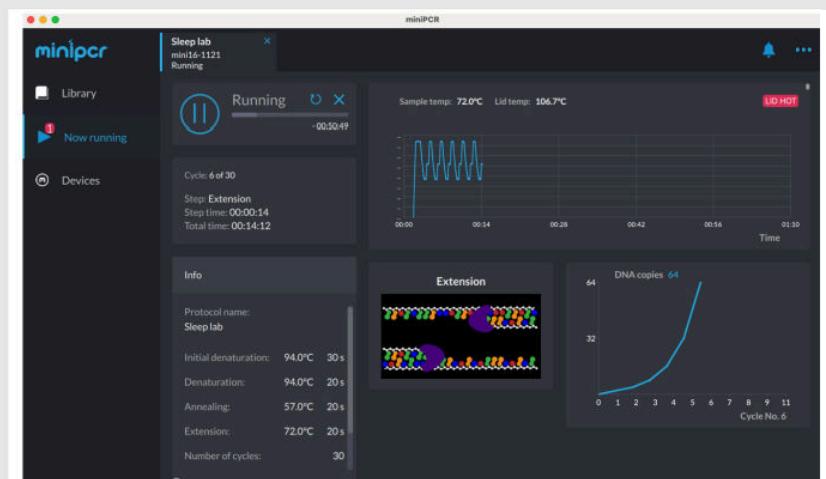


Protokoll

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 Zyklen der PCR sind: 1. Denaturierung 2. Elongation 3. Annealing
- Die DNA-Polymerase fragmentiert DNA.

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

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

Überprüfen

Aufgabe 4

Hängt es nur von der inneren Uhr ab, ob man ein „Morgenmensch“ oder ein „Abendmensch“ ist?

- Nein, nur äußere Faktoren wie Licht und Zeitpläne beeinflussen den Chronotyp.
- Ja, die innere Uhr bestimmt ausschließlich den Chronotyp.
- Nein, der Chronotyp wird sowohl durch die innere Uhr als auch durch Umweltfaktoren wie Licht und soziale Verpflichtungen beeinflusst.

 Überprüfen

Aufgabe 5

Welches Gen ist mit dem Chronotyp (Morgen- oder Abendtyp) verbunden?

- Per3
- Cryptochrom
- Clock
- BMAL1

 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****14/14**