



miniPCR Sleep Lab™
Lark or Owl?

Morgenlerche
oder
Nachtschwärmer?



Inhalt

Erste Schritte

Auf einen Blick
Anforderungen an die Unterrichtszeit
Benötigte Materialien
Vorbereitung für Lehrkräfte
Einrichtung eines Arbeitsplatzes

Leitfaden für Lernende

Hintergrundinformationen
Der Versuch
Versuchsprotokoll für Lernende
Fragebogen zur Morgenmüdigkeit und Nachtaktivität
Fragen vor dem Versuch
Fragen nach dem Versuch

Leitfaden für Lehrkräfte

Erwartete Ergebnisse
Troubleshooting
Zusätzliche Unterstützung für Lernende
Lernziele und entwickelte Fähigkeiten

Auf einen Blick

Übersicht über den Versuch

Nehmen Sie an einer authentischen offenen Untersuchung über die genetischen Grundlagen des Schlafs teil. Die Lernenden werden ihren Genotyp für ein Gen bestimmen, das mit dem Schlafverhalten beim Menschen in Verbindung gebracht wurde. Die Lernenden werden auch ihre Schlafphänotypen mit Hilfe eines einfachen Fragebogens über die zirkadiane Uhr und die Untersuchung genetischer Zusammenhänge bewerten.

TECHNIKEN	THEMEN
Mikropipettieren	Vererbung
DNA-Extraktion	Genetische
PCR	Assoziationen
Gelelektrophorese	Zirkadiane Rhythmen

Erforderliche Laborkenntnisse

- Die Studierenden müssen Flüssigkeiten im Bereich von 2-20 µl genau pipettieren können.

Planen Sie Ihre Zeit

- Diese Aktivität besteht aus drei Teilen, die sich wahrscheinlich über mehrere Tage erstrecken werden.
- Das gesamte Experiment kann in einem einzigen 150-Minuten-Block durchgeführt werden.
- Auf der nächsten Seite finden Sie detaillierte Informationen zur Aufteilung dieser Aktivität in mehrere Klassen.
- Der gängigste Zeitplan für die Umsetzung im Klassenzimmer ist folgendermaßen:
 - Vorbereitung für die Lehrkraft: 30 min.
 - DNA-Extraktion + PCR ansetzen: 45 min.
 - PCR: 60 min.
 - Gelelektrophorese + Ergebnisanalyse: 45 min.

Anforderungen an die Unterrichtszeit

Dieses Protokoll bietet eine gewisse Flexibilität, damit Sie die benötigte Unterrichtszeit besser einteilen können.

Schritte des Protokolls	Erforderliche Zeit
1 DNA-Extraktion	15 Minuten
 Optionaler Haltepunkt: Der DNA-Extrakt kann bis zu acht Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden, bevor die PCR durchgeführt wird.	
2 PCR	
A. Proben ansetzen und PCR-Programm starten	20 Minuten
B. PCR durchführen	60 Minuten Das PCR-Programm kann während des Unterrichts gestartet und unbeaufsichtigt laufen gelassen werden. Sobald das Programm abgeschlossen ist, sind die Proben bei Raumtemperatur mehrere Tage lang stabil und können im Gerät verbleiben.
 Optionaler Haltepunkt: Das PCR-Produkt ist bei Raumtemperatur mehrere Tage lang stabil. Für eine längerfristige Lagerung legen Sie es in den Gefrierschrank.	
3 Gelelektrophorese	
A. Gel laden	10 Minuten
B. Gel laufen lassen	20-30 Minuten
C. Ergebnisse interpretieren	5 Minuten

Benötigte Materialien

Wird im Kit geliefert (Art.-Nr. 35018-04)

- Das Kit enthält PCR-Reagenzien für 32 Lernende.
- Bei Aufbewahrung im Gefrierschrank können die Reagenzien nach Erhalt 12 Monate lang gelagert werden. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank sind die Reagenzien nach Erhalt 1 Monat lang haltbar.
- Reagenzien für die Vorbereitung von Gelen, Plastikröhren für die Verteilung von Reagenzien an einzelne Gruppen, Plastikröhren für PCR und Pipettenspitzen sind separat erhältlich. Siehe unten für Details.

Inhalt	Zur Verfügung gestellt	Erforderlich pro Lernenden	Lagerung
X-Tract™ Puffer	1.200 µl x zwei Röhrchen	50 µl	Gefrierschrank
5X EZ PCR Master Mix, Load-Ready™	240 µl	5 µl	Gefrierschrank
Sleep Lab Primer	960 µl	20 µl	Gefrierschrank
100 bp DNA-Leiter, Load-Ready™	100 µl	12 µl pro Gel	Gefrierschrank

Elektrophorese-Reagenzien und Kunststoffe separat erhältlich

- Dieser Versuch erfordert:
 - 2%ige Agarosegele mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (z.B. SeeGreen™, Art.-Nr. 35018-71 oder 35018-72).
 - Plastikröhren für die Verteilung der Reagenzien an die einzelnen Gruppen und 0,2 ml PCR-Gefäße für die Durchführung der PCR.
 - PCR Einzelgefäß, 0,2 ml (35928-01 oder 35928-00)
 - Einmalreaktionsgefäß, 1,5 ml (37653-02 oder 37653-00)
 - Ständer für 8 x 0,2 ml Einmalreaktionsgefäß (37652-01)
 - Ständer für 20 x 1,5 ml Einmalreaktionsgefäß (37652-00)
 - Mikroliterpipette 2-20 µl (47141-10)
 - Mikroliterpipette 20-200 µl (47141-11)
 - Pipettenspitzen, 2-200 µl (47148-01 oder 47148-11)
 - TBE-Elektrophoresepuffer (35018-73)
- Gelelektrophorese-Reagenzien und Kunststoffe können auch von anderen Anbietern bezogen werden.

Erforderliche Ausrüstung

- Dieser Versuch kann mit jedem Thermocycler durchgeführt werden.
- Empfohlene Thermocycler:
 - miniPCR mini16X (35014-99)
 - miniPCR mini8X (35013-99)
- Dieser Versuch ist mit jedem horizontalen Gelelektrophorese-System kompatibel in Kombination mit:
 - Fluoreszierender DNA-Farbstoff (z. B. SeeGreen™)
 - Ein Transilluminator, der mit dem verwendeten DNA-Farbstoff kompatibel ist. Fluoreszierende DNA-Färbungen erfordern in der Regel eine Beleuchtung mit blauem Licht (~470 nm) oder UV-Licht (~260 nm).
- Empfohlenes Gelelektrophorese-System (inkl. Gelgießstand, Transilluminator und Netzgerät):
 - o blueGel (35017-99)
 - o Set Schülerversuche TESS Genetik (15311-88)

Andere vom Benutzer bereitgestellte Materialien

- Destilliertes Wasser
- Mikrowelle oder Kochplatte
- Hitzebeständiger Kolben oder Becher
- Einweg-Laborhandschuhe
- Schutzbrillen
- Permanentmarker mit feiner Spitze

Vorbereitung für Lehrkräfte

Übersicht

- Diese Aktivität besteht aus drei Teilen, die sich wahrscheinlich über mehrere Tage erstrecken werden.
- Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die Vorbereitung für Lehrkräfte, und die folgenden Seiten enthalten detaillierte Anweisungen.

Vorbereitung	Erforderliche Zeit	Zeitleiste
Reagenzien dosieren	10 Minuten	Kann bis zu einer Woche vor der Verwendung fertiggestellt werden.
Vorbereitung von Elektrophoresepuffer und Agarosegelen	20 Minuten	Unterschiedlich - Bei Verwendung der empfohlenen Gelreagenzien können die Gele vorbereitet und bis zu fünf Tage vor der Verwendung gelagert werden.

Reagenzien dosieren

- Die Reagenzien können bis zu einer Woche im Voraus dosiert und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- Dieser Kit enthält ausreichend Reagenzien für 32 Lernende (am besten 8 Gruppen zu je 4 Lernenden)

Benötigte Materialien

Aus dem Kit (im Gefrierschrank aufbewahrt):

- X-Tract DNA-Extraktionspuffer
- 5X EZ PCR Master Mix
- Sleep Lab Primer
- 100 bp DNA-Leiter

Vom Benutzer zur Verfügung gestellt:

- Kunststoffröhren für die Abgabe von Reagenzien (es können 1,5 ml oder 0,2 ml Röhren verwendet werden)
- PCR-Gefäße (0,2 ml)
- 2-20 µl-Mikropipette und Spitzen
- Permanentmarker mit feiner Spitze

1. Tauen Sie die Reagenzien auf, indem Sie die Röhren auf Raumtemperatur bringen.
Hinweis: Die Bestandteile des Kits sind bei Raumtemperatur mehrere Stunden lang stabil und müssen nicht auf Eis gelagert werden, während Sie die Reagenzien dosieren.
2. Fangen Sie die Flüssigkeit am Boden jedes Röhrens auf. Schleudern Sie die Flüssigkeit entweder kurz in einer Mikrozentrifuge oder schütteln Sie sie mit einer Bewegung aus dem Handgelenk.
3. Prüfen Sie beim Öffnen jedes Röhrens, ob Flüssigkeit in der Kappe steckt. Falls nötig, setzen Sie die Kappe wieder auf und wiederholen Sie Schritt 2.
4. Geben Sie für jeden **Lernenden** 50 µl des X-Tract-DNA-Extraktionspuffers in ein beschriftetes Kunststoffröhren, das zu Ihrer 95 °C-Wärmequelle passt. Wenn Sie einen miniPCR-Thermocycler für die DNA-Extraktion verwenden, benutzen Sie 0,2 ml PCR-Gefäße.
5. Geben Sie für jede **Gruppe von vier Lernenden** die folgenden Reagenzien in beschriftete Plastikröhren. Es können 1,5 ml oder 0,2 ml Plastikröhren verwendet werden.
 - 5X EZ PCR Master Mix 25 µl
(Röhren mit "M" beschriften)
 - Schlaflabor-Primer (Röhren P) 100 µl
 - 100 bp DNA-Leiter (Röhren L) 12 µl
6. Wenn Sie die Reagenzien mehr als 24 Stunden vor dem Unterricht abgeben, bewahren Sie die Röhren bis zum Gebrauch im Kühlschrank auf. Die Reagenzien können eine Woche lang im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Vorbereitung von Elektrophoresepuffer und Agarosegelen

1. Bereiten Sie den Elektrophoresepuffer vor.
 - Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers zur Herstellung der Pufferlösung.
 - Die benötigte Puffermenge ist je nach Gelelektrophorese-System unterschiedlich.

- Für das blueGel-Elektrophorese-System sind 600 ml TBE-Puffer für mindestens acht Gelläufe ausreichend.
 - Für andere Systeme lesen Sie bitte die Anweisungen des Herstellers:
 - (1) Das für die Herstellung von Agarosegelen erforderliche Puffervolumen.
 - (2) Das für die Verwendung als Laupuffer benötigte Puffervolumen.
2. Bereiten Sie 2%ige Agarosegele mit fluoreszierender DNA-Färbung vor.
- Sie benötigen eine Spur pro Lernenden plus eine Spur für die DNA-Leiter pro Gruppe. Wenn die Gruppen sich die Gele teilen, ist eine einzige Spur für die Leiter pro Gel ausreichend.
 - Dieser Kit ist mit jeder Agarose von molekularer Qualität und jedem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (z. B. SeeGreen™) kompatibel.
 - Die benötigte Gelmenge hängt von dem von Ihnen verwendeten Gelelektrophorese-System ab. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers.
 - Wenn Sie Gelelektrophorese-Reagenzien für das blueGel verwenden, können die Gele bis zu fünf Tage im Voraus vorbereitet werden. Lagern Sie die vorbereiteten Gele bei Raumtemperatur in einem luftdichten, lichtgeschützten Behälter. Weichen Sie die Gele NICHT in Puffer ein und wickeln Sie sie NICHT in Papiertücher ein.

Einrichtung eines Arbeitsplatzes

Teil 1: DNA-Extraktion

Pro Lernenden

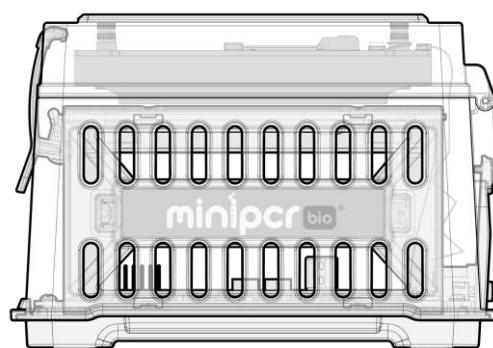
X-Tract DNA-Extraktionspuffer (Tube E)	50 µl
Zahnstocher mit flachem Ende	1
2-20 µl-Mikropipette und Spitzen	
Permanentmarker mit feiner Spitze	
Zugang zu einer Wärmequelle von 95 °C (Sie können einen miniPCR im Wärmeblockmodus verwenden)	

Teil 2: PCR

	Pro Lernenden	Pro Gruppe von 4 Personen
DNA-Extrakt aus dem vorherigen Schritt	Jeder Lernende hat seine persönliche Probe	
5X EZ PCR Master Mix, Load-Ready™	5 µl	25 µl
Sleep Lab Primer	20 µl	100 µl
PCR-Gefäße (0,2 ml)	1	4
2-20 µl-Mikropipette und Spitzen		
Zugang zu einem Thermocycler 2-20 µl-Mikropipetten und Spitzen		

Bei Verwendung von miniPCR-Thermocyclern:

- Die Gruppen benötigen Zugang zu einem miniPCR-Thermocycler und einer Stromversorgung.
- Laden Sie die miniPCR-App aus dem App Store herunter.
- Die Maschinen können im Voraus von der Lehrkraft oder während des Unterrichts von den Lernenden programmiert werden.
- Sobald das Programm gestartet wurde, führt der 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.



Teil 3: Gelelektrophorese

Pro Gruppe

PCR-Proben aus der vorherigen PCR	Jeder Lernende hat seine persönliche Probe
100 bp-Leiter (Röhrchen L)	12 µl
Elektrophorese-Puffer Das Volumen hängt von Ihrem Elektrophorese- System ab	30 ml TBE bei Verwendung eines blueGel
2-20 µl-Mikropipette und Pipettenspitzen	
2% Agarosegel mit fluoreszierender DNA-Färbung	1 Spur pro Lernenden plus eine zusätzliche Spur für Leiter



Leitfaden für Lernende

Hintergrundinformationen

Der Versuch

Versuchsprotokoll für Lernende

Fragebogen zur Morgenmüdigkeit und Nachtaktivität

Fragen vor dem Versuch

Fragen nach dem Versuch

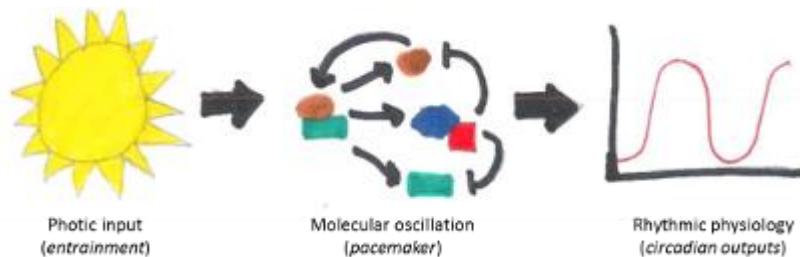


Hintergrundinformationen

Zirkadiane Uhren

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 wie unseren Blutdruck, unsere Körpertemperatur, die Hormonausschüttung und den Stoffwechsel. Beim Menschen ist die zirkadiane Uhr auf etwas mehr als 24 Stunden eingestellt. Auch andere Tiere, Pflanzen, Pilze und sogar einzellige Organismen haben eine zirkadiane Uhr, die ihnen hilft, den täglichen Wechsel zwischen Licht und Dunkelheit vorauszusehen.

Eine gute Uhr hat zwei wichtige Eigenschaften. Erstens muss sie die Zeit regelmäßig anzeigen, und zweitens muss sie eingestellt und zurückgestellt werden können. Unsere zirkadiane Uhr verfügt über beide Eigenschaften. Unsere Uhren sind auf etwa 24 Stunden eingestellt, können aber auch durch äußere Faktoren, insbesondere durch Sonnenlicht, zurückgestellt werden. Dadurch wird sichergestellt, dass unser interner Zeitmesser (der von Natur aus etwas länger als 24 Stunden ist) mit dem natürlichen Tag (24 Stunden) synchronisiert bleibt. Dies ist auch der Grund dafür, dass bei einer Reise in eine andere Zeitzone die innere Uhr zunächst nicht richtig geht, was zu einem Jetlag führt, sich aber innerhalb weniger Tage auf die neue Zeitzone einstellt, in der man sich befindet. Wir

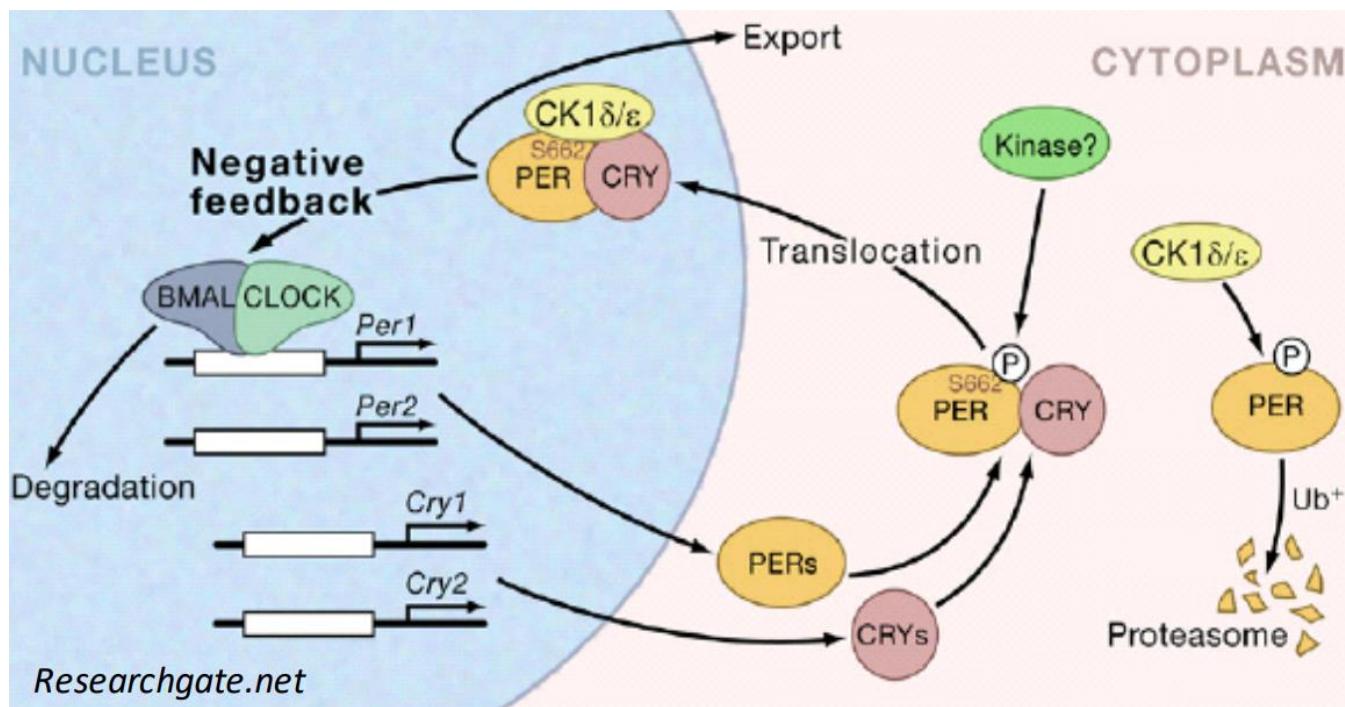


nennen diese Fähigkeit der zirkadianen Uhr „Synchronisation“ (Kopplung, Entrainment). Das Faszinierende an der zirkadianen Uhr ist, dass sie auf zellulärer Ebene funktioniert; ja, einzelne Zellen in Ihrem Körper können die Zeit messen und anzeigen! Dies ist möglich, weil die zirkadiane Uhr durch eine genetische Rückkopplungsschleife gesteuert wird, in der Proteine die Genexpression mit einer Periodizität von 24 Stunden regulieren. Die Proteine der zirkadianen Uhr weisen eine negative Rückkopplung auf, d. h. die von den Uhren-Genen produzierten Proteine schalten ihrerseits die Gene aus, die sie produziert haben. Die Produktion der zirkadianen Uhrenproteine wird daher so lange fortgesetzt, bis die Proteine eine bestimmte Konzentration in der Zelle erreicht haben, woraufhin ihre Produktion eingestellt wird. Im Laufe der Zeit, wenn diese zirkadianen Uhrenproteine regelmäßig abgebaut werden, sinkt die Konzentration der Uhrenproteine, bis sie so niedrig ist, dass die Genexpression wieder aufgenommen werden kann. Hier setzt sich der Zyklus fort - Produktion von Proteinen, bis die Expression gestoppt wird, Abbau von Proteinen, bis die Expression wieder beginnt. Erstaunlicherweise ist der tägliche Zyklus von Expression und Abbau dieser Proteine von der Evolution so fein abgestimmt worden, dass er einem 24-Stunden-Tag auf der Erde sehr nahe kommt.

Molekularer Mechanismus der Uhr

Wir leben in einer Umwelt, die aufgrund der Rotation der Erde um ihre Achse zyklisch ist. Viele verschiedene lebende Systeme haben *biologische Uhren* entwickelt, die die Erdrotation und den 24-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus vorhersagen können. Diese biologische Uhr steuert den Stoffwechsel, die Biochemie und viele Funktionen im Körper, einschließlich unseres Aktivitäts-Ruhe-Zyklus.

Einzelne Zellen in unserem Körper haben innere Uhren. Beim Menschen und anderen Säugetieren ist die Hauptuhr eine winzige Struktur im Hypothalamus, der so genannte *suprachiasmatische Nukleus* (SCN). Die Zellen im SCN (und in vielen anderen Geweben des Körpers) können jeweils mit einer Periode von etwa 24 Stunden schwingen. In den 1990er Jahren halfen Mutanten den Wissenschaftlern bei der Entdeckung von *Uhren-Genen* (wie *Clock*, *BMAL*, *Period* usw.), die für die Erzeugung zirkadianer Rhythmen von grundlegender Bedeutung sind. Heute verstehen wir die Genetik des zirkadianen Verhaltens in bemerkenswerten Details. Der molekulare Mechanismus der Uhr umfasst negative Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleifen mehrerer Gene. Die Transkriptionsfaktoren *BMAL1* und *CLOCK* bilden Heterodimere, die die Transkription von *Cryptochrom*- (*Cry*) und *Period*-Genen (*Per*) durch Bindung an deren Promotoren aktivieren. *CRY*- und *PER*-Proteine reichern sich allmählich im Zytoplasma an. *CRY*, *PER* und andere Proteine bilden Komplexe, die sich in den Zellkern verlagern und die *BMAL1-CLOCK*-vermittelte Expression der *Cry*- und *Per*-Gene abschalten. Diese negative Rückkopplungsschleife zwischen Transkription und Translation wiederholt sich alle 24 Stunden in Ihren Zellen!



Genetische Variation und die Uhr

Ein wichtiges Gen in diesen Rückkopplungsschleifen ist das Gen für die zirkadiane Uhr Period 3 (*Per3*). Die Forschung hat herausgefunden, dass dieses Gen bei Menschen unterschiedlich ausgeprägt ist, d. h. es ist polymorph. Weitere Studien haben ergeben, dass eine bestimmte Form der Variation in diesem Gen, eine Variable Number Tandem Repeat (VNTR) in *Per3*, die Einstellung der zirkadianen Uhr des Menschen beeinflussen kann. Ein VNTR ist eine kurze Sequenz, die sich innerhalb eines Gens mehrmals hintereinander wiederholt. Im Fall von *Per3* handelt es sich um eine 54 Basenpaare lange Sequenz, die in einem Allel viermal und in einer anderen Variante fünfmal wiederholt wird. Untersuchungen haben ergeben, dass das Vorhandensein von 4 Kopien dieser Wiederholung mit einer Vorliebe für abendliche Aktivitäten in Verbindung gebracht werden kann, während das Vorhandensein von 5 Wiederholungen mit einer Vorliebe für Aktivitäten am Morgen in Verbindung gebracht werden kann. Aus diesen Studien geht hervor, dass Ihre Gene beeinflussen können, ob Sie eher eine Morgenlerche (engl. Lark) oder eine Nachteule (engl. Owl) sind! Da Polymorphismen (Variationen) in dieser Wiederholung die Länge dieses Gens verändern, kann der Unterschied zwischen *Per3*-Genen mit 4 Wiederholungen und 5 Wiederholungen in der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Natürlich müssen wir dieses Gen zunächst amplifizieren (viele Kopien herstellen), um es auf einem Gel sichtbar zu machen.

Genetische Assoziationen

Die meisten Phänotypen sind komplexe Merkmale mit mehreren genetischen und umweltbedingten Komponenten (d. h. sie werden nicht durch ein einzelnes Gen bestimmt). Genetische Assoziationsstudien werden eingesetzt, um Kandidatengene oder Genomregionen zu finden, die zu einem bestimmten Merkmal beitragen, indem eine Korrelation zwischen diesem Merkmal und der genetischen Variation getestet wird. Eine höhere Häufigkeit eines bestimmten Allels (oder Genotyps) in einer Stichprobe von Personen, die das Merkmal ausprägen, kann dahingehend interpretiert werden, dass das Allel die Wahrscheinlichkeit erhöht, dieses spezifische Merkmal zu haben. Assoziationen lassen sich nur schwer eindeutig nachweisen und erfordern den Erhalt großer Datensätze, um das statistische Vertrauen in die mögliche Assoziation zu erhöhen. Bei den herkömmlichen Genetikverfahren wird in der Regel nach mutierten oder nicht funktionsfähigen Versionen von Genen gesucht, um die Funktion des Gens zu bestimmen. Dies ist zwar ein fruchtbare Ansatz, doch war er bis vor kurzem auf Modellorganismen beschränkt, die im Labor gezüchtet wurden. Dies schränkt die Möglichkeiten der Wissenschaftler ein, die Humangenetik auf diese Weise zu untersuchen. Außerdem erfassen herkömmliche genetische Verfahren in der Regel keine realen Variationen, die sich auf reale Phänotypen auswirken. Die Stärke von Assoziationsstudien liegt darin, dass sie die phänotypische Variation beim Menschen mit der tatsächlichen genetischen Variation in Populationen in Verbindung bringen können. Es kann jedoch schwierig sein, Zusammenhänge herzustellen, da die meisten Merkmale von vielen Faktoren gesteuert werden. Nehmen wir ein Merkmal wie die Körpergröße als Beispiel. Während Sie zweifellos gelernt haben, dass Phänotypen durch dominante und rezessive Allele gesteuert werden, werden komplexe Merkmale wie die Körpergröße von Hunderten von Genen gesteuert. Jedes dieser Gene hat verschiedene Allele, die dazu beitragen können, dass Sie etwas größer oder etwas kleiner sind. Bei der überwiegenden Mehrheit dieser Gene wissen wir nicht, ob ein Allel dominant oder rezessiv ist oder eine andere Dominanzbeziehung aufweist. Sie wissen vielleicht, dass Sie für ein bestimmtes Gen ein Allel besitzen, das mit einer größeren Körpergröße in Verbindung gebracht wurde. Aber erst wenn man die Wirkung aller Allele für all diese Gene zusammenzählt und äußere Einflüsse wie die Ernährung einbezieht, lässt sich die tatsächliche Körpergröße feststellen. Dies versuchen wir heute zu testen. Es gibt Berichte über einen Zusammenhang zwischen den *Per3*-Allelen und der Vorliebe für den Morgen oder den Abend, während in anderen Studien kein Zusammenhang festgestellt wurde. Ob es sich dabei um einen echten Zusammenhang handelt und wie stark er sein könnte, ist noch offen. Wie bei allen Assoziationsstudien sind eine ausreichende Stichprobengröße und statistische Tests erforderlich, um eine echte Korrelation festzustellen. In diesem Versuch kann Ihre Klasse mit den von Ihnen gesammelten Daten dazu

beitragen, herauszufinden, wie wichtig das Per3-Gen für die Vorliebe für den Morgen oder den Abend ist!

Der Versuch

In diesem Versuch werden Sie mittels PCR ein Segment des Per3-Gens (aus Ihrer eigenen DNA) amplifizieren und mittels Gelelektrophorese direkt feststellen, ob Sie den 4-Repeat- oder 5-Repeat-Genotyp in diesem VNTR innerhalb eines Gens der zirkadianen Uhr tragen. 4-Repeat-Allele werden als ~250 Basenpaar-Fragment amplifiziert, während 5-Repeat-Segmente als ~300 Basenpaar-Fragment amplifiziert werden. Wir werden auch einen einfachen Fragebogen zur Selbsteinschätzung ausfüllen, der uns helfen wird, unseren Chronotyp oder unsere phänotypische zirkadiane Präferenz zu bestimmen (ob Sie ein Morgen- oder Abendtyp sind).

Wir hoffen, dass der Abgleich der Chronotypen mit den Genotypen vieler Lernender und die spätere Zusammenführung der Daten uns dabei helfen wird, die Frage nach dem berichteten genetischen Zusammenhang zwischen dem *Per3* VNTR und zirkadianen Präferenzen zu klären. Durch dieses Versuch kann jeder ein Forscher der zirkadianen Biologie werden!

Bitte denken Sie daran, dass Ihre zirkadiane Uhr und Ihr Schlafverhalten - wie viele andere Merkmale auch - nicht allein genetisch bedingt sind. Die moderne Gesellschaft ist geprägt von künstlichem Licht, Koffein, wechselnden Essenszeiten, beruflichen oder schulischen Verpflichtungen und anderen externen Signalen, die mit dem intrinsischen Schlafverhalten (Chronotyp) des Menschen interagieren. Auch wenn Ihre Gene Sie für ein bestimmtes Schlafverhalten prädisponieren, verändert Ihre Umwelt diese Muster in einer Weise, die Sie vielleicht nicht erwarten.

Versuchsprotokoll für Lernende

DNA-Extraktion

Die besten Ergebnisse erzielen Sie, wenn Sie ~20 Minuten vor der Entnahme der Wangenzellen nichts mehr essen oder Kaugummi kauen.

1. Jedes Gruppenmitglied sollte ein Röhrchen mit Extraktionspuffer (Röhrchen E) erhalten. Beschriften Sie das Röhrchen mit Ihren Initialen. Schreiben Sie auf die obere Seitenwand des Röhrchens.
2. Sammeln Sie Wangenzellen, indem Sie die Innenseite Ihrer Wange 3-4 Mal (nicht mehr!) mit einem Zahnstocher mit flachem Ende vorsichtig abkratzen. Es sollte nicht wehtun.
3. Tauchen Sie das Ende des Zahnstochers mit Ihren Wangenzellen in den Extraktionspuffer in Ihrem individuellen Röhrchen. Schwenken Sie den Zahnstocher, um die Zellen zu lösen, und entsorgen Sie den Zahnstocher dann.
4. Schließen Sie die Kappe auf dem Röhrchen. Wenn sie richtig geschlossen ist, sollten Sie spüren, wie die Kappe einrastet.
5. Inkubieren Sie das Röhrchen für 10 Minuten bei 95 °C. Sie können einen miniPCR-Thermocycler im Heat Block-Modus, ein Wasserbad oder einen anderen Heizblock verwenden.
6. Nehmen Sie das Röhrchen vom Heizblock und fahren Sie mit dem Aufbau der PCR fort.

Optionaler Haltepunkt: Der DNA-Extrakt kann bis zu acht Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden, bevor die PCR durchgeführt wird.

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 unten stehenden Tabelle in das beschriftete Röhrchen. Um Kontaminationen zu vermeiden, verwenden Sie für jede Zugabe eine neue Pipettenspitze.

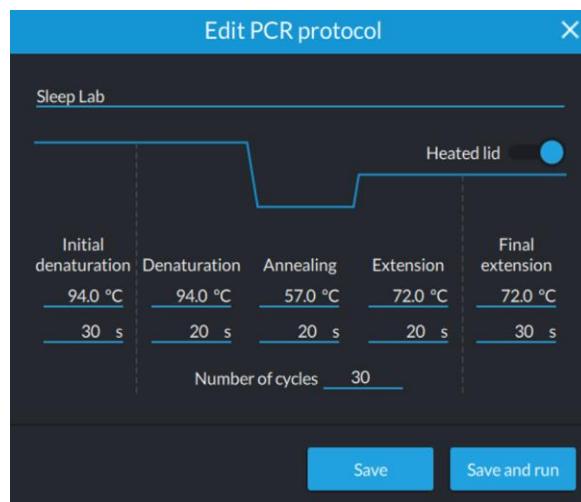
Primer-Mix (Röhrchen P)	20 µl
Master-Mix (Röhrchen M)	5 µl
DNA-Probe des Lernenden aus dem vorherigen Schritt	3 µl
Gesamtvolumen	28 µl

3. Schließen Sie die Kappe auf dem Röhrchen. Wenn sie richtig geschlossen ist, sollten Sie spüren, wie die Kappe einrastet.
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. Wenn Flüssigkeit an den Seiten des Röhrchens klebt, schütteln Sie es mit einer kräftigen Handbewegung oder einer kurzen Drehung in der Mikrozentrifuge ab.
6. Fahren Sie **sofort** mit dem nächsten Abschnitt des Protokolls fort.

PCR durchführen

- Programmieren Sie Ihren Thermocycler mit den folgenden Parametern:

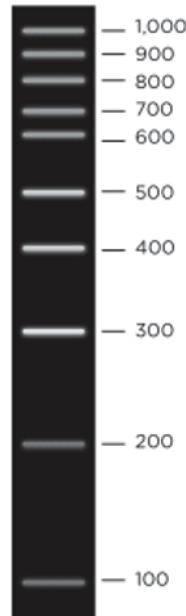
Initiale Denaturierung	94°C, 30 Sekunden
Denaturierung	94°C, 20 Sekunden
Annealing	57°C, 20 Sekunden
Extension	72°C, 20 Sekunden
Anzahl der Zyklen	30
Finale Extension	72°C, 60 Sekunden
- Die PCR dauert etwa 60 Minuten, wenn ein miniPCR® Thermocycler verwendet wird.
- Optionaler Haltepunkt: Das PCR-Produkt ist bei Raumtemperatur mehrere Tage lang stabil. Für eine längerfristige Lagerung sollten die Röhrchen in den Gefrierschrank gestellt werden.



Gelelektrophorese

1. Legen Sie das vorbereitete Gel in die Elektrophoresekammer.
2. Geben Sie genügend Elektrophoresepuffer hinzu, um die Kammer zu füllen und das Gel gerade zu bedecken.
 - Sie benötigen 30 ml TBE-Puffer für ein blueGel Elektrophorese-System. Füllen Sie die Kammer nicht zu voll, da ansonsten die Elektroden nicht durch das Gel wandern, sondern darüber.
 - Wenn Sie ein anderes Elektrophorese-System verwenden, entnehmen Sie den empfohlenen Puffertyp und das empfohlene Volumen den Anweisungen des Herstellers.
3. Verwenden Sie eine Mikropipette, um die Proben in der folgenden Reihenfolge zu laden. Um Kontaminationen zu vermeiden, verwenden Sie für jede Probe eine neue Spitze. Notieren Sie unten die Reihenfolge, in der Sie die Proben Ihrer Gruppe geladen haben:
 - Vertiefung 1: 10 µl DNA-Leiter (Röhrchen L)
 - Vertiefung 2: 14 µl Name des Lernenden _____
 - Vertiefung 3: 14 µl Name des Lernenden _____
 - Vertiefung 4: 14 µl Name des Lernenden _____
 - Vertiefung 5: 14 µl Name des Lernenden _____
4. Lassen Sie das Gel 30 Minuten lang laufen.
 - Die blueGel Elektrophorese-System arbeitet mit einer festen Spannung.
 - Wenn Sie ein anderes Gelelektrophorese-System verwenden, stellen Sie die Spannung im Bereich von 70-90 V ein.

100 bp Ladder



5. Um die DNA-Proben sichtbar zu machen, schalten Sie das blaue Licht in Ihrem Elektrophorese-System ein oder stellen Sie das Gel auf einen Transilluminator.
6. Falls erforderlich, lassen Sie das Gel so lange laufen, bis eine ausreichende Trennung zwischen den 200-400 bp Banden in der Leiter vorhanden ist, um die Ergebnisse zu interpretieren.
7. Falls gewünscht, machen Sie ein Foto, um das Ergebnis zu dokumentieren.
8. Vergleichen Sie die Banden der DNA-Proben mit der DNA-Leiter, um Größenschätzungen zu erhalten.

Fragebogen zur Morgen- und Abendaktivität

Dieser Fragebogen zur Selbsteinschätzung dient dazu, Ihren *Chronotyp* des circadianen Rhythmus zu bestimmen. Bitte wählen Sie für jede Frage die Antwort aus, die Sie am besten beschreibt, indem Sie den Punktwert einkreisen, der am besten angibt, wie Sie sich in den letzten Wochen gefühlt haben. (In Anlehnung an Horne & Ostberg, 1976)

1. Um wie viel Uhr würden Sie aufstehen, wenn Sie Ihren Tag völlig frei planen könnten?
[5] 5:00-6:30 Uhr
[4] 6:30-7:45 Uhr
[3] 7:45-9:45 Uhr
[2] 9:45-11:00 Uhr
[1] 11:00-12:00 Uhr

2. Um wie viel Uhr würden Sie ins Bett gehen, wenn Sie Ihren Abend frei gestalten könnten?
[5] 20:00-21:00 Uhr
[4] 21:00-22:15 Uhr
[3] 22:15-00:30 h
[2] 00:30-01:45 Uhr
[1] 01:45-03:00 Uhr

3. Wenn Sie normalerweise morgens zu einer bestimmten Zeit aufstehen müssen, wie sehr sind Sie dann von einem Wecker abhängig?
[4] Überhaupt nicht
[3] Geringfügig
[2] einigermaßen
[1] Sehr viel

4. Wie leicht fällt es Ihnen, morgens aufzustehen (wenn Sie nicht unerwartet geweckt werden)?
[1] Sehr schwierig
[2] Etwas schwierig
[3] Ziemlich einfach
[4] Sehr einfach

5. Wie wach fühlen Sie sich in der ersten halben Stunde nach dem Aufwachen am Morgen?
[1] Überhaupt nicht aufmerksam
[2] Leicht wachsam
[3] Ziemlich aufmerksam
[4] Sehr aufmerksam

6. Wie hungrig fühlen Sie sich in der ersten halben Stunde nach dem Aufwachen?
[1] Überhaupt nicht hungrig
[2] Leicht hungrig
[3] Ziemlich hungrig
[4] Sehr hungrig

7. Wie fühlen Sie sich in der ersten halben Stunde nach dem Aufwachen am Morgen?
[1] Sehr müde
[2] Ziemlich müde
[3] Ziemlich erfrischt
[4] Sehr erfrischt

8. Wenn Sie am nächsten Tag keine Verpflichtungen hätten, wie spät würden Sie zu Bett gehen, verglichen mit Ihrer üblichen Schlafenszeit?
[4] Seltener oder nie später
[3] Weniger als 1 Stunde später
[2] 1-2 Stunden später
[1] Mehr als 2 Stunden später

9. Sie haben beschlossen, Sport zu treiben. Ein Freund schlägt Ihnen vor, dies zweimal pro Woche für eine Stunde zu tun, und die beste Zeit ist für ihn zwischen 7 und 8 Uhr morgens (07-08 Uhr). Wie würden Sie sich verhalten, wenn Sie nur an Ihre eigene innere "Uhr" denken würden?
[4] Wäre in guter Form
[3] Wäre in angemessener Form
[2] würde es schwierig finden
[1] würde es sehr schwierig finden

10. Zu welcher Zeit am Abend fühlen Sie sich ungefähr müde und brauchen deshalb Schlaf?
[5] 20:00-21:00 Uhr
[4] 21:00-22:15 Uhr
[3] 22:15-00:45 Uhr
[2] 00:45-02:00 Uhr
[1] 02:00-03:00 Uhr

11. Sie wollen für eine Prüfung, von der Sie wissen, dass sie geistig anstrengend sein und zwei Stunden dauern wird, in Bestform sein. Sie können Ihren Tag völlig frei planen. Wenn Sie nur Ihre "innere Uhr" berücksichtigen, welche der vier Prüfungszeiten würden Sie wählen?
[6] 08-10 Uhr
[4] 11-13 Uhr
[2] 15-17 Uhr
[0] 19-21 Uhr

12. Wenn Sie um 23 Uhr ins Bett gehen würden, wie müde wären Sie dann?
[0] Überhaupt nicht müde
[2] Ein wenig müde
[3] Ziemlich müde
[5] Sehr müde

13. Aus irgendeinem Grund sind Sie einige Stunden später als gewöhnlich zu Bett gegangen, müssen aber am nächsten Morgen nicht zu einer bestimmten Zeit aufstehen. Welche der folgenden Möglichkeiten werden Sie am ehesten nutzen?
- [4] Wacht zur üblichen Zeit auf, schläft aber nicht wieder ein
 - [3] Wacht zur üblichen Zeit auf und schläft danach ein
 - [2] Wacht zur üblichen Zeit auf, schläft dann aber wieder ein
 - [1] Wacht erst später als gewöhnlich auf
14. In einer Nacht müssen Sie zwischen 04-06 Uhr morgens wach bleiben, um eine Nachtwache zu übernehmen. Am nächsten Tag haben Sie keine zeitlichen Verpflichtungen. Welche der Alternativen würde Ihnen am besten passen?
- [1] Würde nicht zu Bett gehen, bevor die Wache vorbei ist
 - [2] Würde vorher ein Nickerchen machen und danach schlafen
 - [3] Würde vorher ausschlafen und danach ein Nickerchen machen
 - [4] Würde nur vor der Wache schlafen
15. Sie haben zwei Stunden harte körperliche Arbeit. Sie können Ihren Tag völlig frei planen. Wenn Sie nur an Ihre innere "Uhr" denken, welche der folgenden Zeiten würden Sie wählen?
- [4] 08-10 Uhr
 - [3] 11-13 Uhr
 - [2] 15-17 Uhr
 - [1] 19-21 Uhr
16. Sie haben beschlossen, Sport zu treiben. Eine Freundin schlägt Ihnen vor, dies zweimal pro Woche für eine Stunde zu tun. Die beste Zeit für sie ist zwischen 22-23 Uhr. Wenn Sie nur Ihre innere "Uhr" berücksichtigen, was glauben Sie, wie gut Sie abschneiden würden?
- [1] Wäre in guter Form
 - [2] Wäre in angemessener Form
 - [3] würde es schwierig finden
 - [4] würde es sehr schwierig finden
17. Angenommen, Sie können Ihre Arbeitszeiten selbst bestimmen. Angenommen, Sie arbeiten fünf Stunden am Tag (einschließlich Pausen), Ihre Arbeit ist interessant und Sie werden nach Leistung bezahlt. Um wie viel Uhr würden Sie ungefähr anfangen?
- [5] 5 Stunden, beginnend zwischen 05-08 Uhr
 - [4] 5 Stunden, beginnend zwischen 08-09 Uhr
 - [3] 5 Stunden, beginnend zwischen 09-14 Uhr
 - [2] 5 Stunden, beginnend zwischen 14-17 Uhr
 - [1] 5 Stunden, beginnend zwischen 17-04 h
18. Zu welcher Tageszeit fühlen Sie sich normalerweise am wohlsten?
- [5] 05-08 Uhr
 - [4] 08-10 Uhr
 - [3] 10-17 Uhr
 - [2] 17-22 Uhr
 - [1] 22-05 Uhr

19. Man hört von "Morgentypen" und "Abendtypen". Zu welchem dieser Typen zählen Sie sich?
- [6] Eindeutig ein Morgentyp
 [4] Eher ein Morgentyp als ein Abendtyp
 (2) Eher ein Abendtyp als ein Morgentyp
 [1] Eindeutig ein Abendtyp

Interpretation Ihres Morgenmuffel-Scores

Dieser Fragebogen enthält 19 Fragen, die jeweils mit einer Punktzahl versehen sind. Addieren Sie zunächst die Punkte, die Sie eingekreist haben, und tragen Sie hier Ihre Gesamtpunktzahl für die Morgenmüdigkeit ein: _____

Die Punktzahl kann von 16-86 reichen.

- Punktzahlen von *41 und darunter* bedeuten "Abendtypen".
- Werte zwischen *42 und 58* bezeichnen "mittlere Typen".
- Werte von *59 und mehr* weisen auf "Morgentypen" hin.

16-30	31-41	42-58	59-69	70-86
Definitiv Abend	Mäßiger Abend	Zwischentyp	Mäßiger Vormittag	Definitiv Morgen

Gelegentlich hat eine Person Probleme mit dem Fragebogen. Zum Beispiel sind einige der Fragen schwierig zu beantworten, wenn Sie im Schichtdienst gearbeitet haben, wenn Sie nicht arbeiten oder wenn Ihre Schlafenszeit ungewöhnlich spät. Ihre Antworten können durch eine Krankheit oder Medikamente, die Sie einnehmen, beeinflusst werden.

Eine Möglichkeit, dies zu überprüfen, besteht darin, sich zu fragen, ob Ihr Morgen-Abend-Wert ungefähr mit den unten aufgeführten Einschlaf- und Aufwachzeiten übereinstimmt:

Ergebnis	16-30	31-41	42-58	59-69	70-86
Schlafbeginn	2.00 Uhr - 3.00 Uhr	12.45 Uhr - 2.00 Uhr	22.45 Uhr - 12.45 Uhr	21.30 Uhr - 22.45 Uhr	21.00 Uhr - 21.30 Uhr
Aufwachen	10.00 Uhr - 11.30 Uhr	8.30 Uhr - 10.00 Uhr	6.30 Uhr - 8.30 Uhr	5.00 Uhr - 6.30 Uhr	4.00 Uhr - 5.00 Uhr

Frage vor dem Versuch

1. Welche physiologischen Prozesse werden von der zirkadianen Uhr gesteuert?
 2. An Wochentagen müssen die Menschen oft früher aufstehen als am Wochenende. Aus diesem Grund gehen die Menschen an Wochentagen oft früh ins Bett, bleiben aber am Wochenende lange auf. Was halten Sie auf der Grundlage dessen, was Sie über zirkadiane Uhren gelernt haben, von einem unterschiedlichen Zeitplan für verschiedene Zeiten in der Woche?
 3. Bei Menschen, die in Nachschichten arbeiten, wird häufig eine so genannte "Schichtarbeitsstörung" diagnostiziert. Diese Störung ist dadurch gekennzeichnet, dass sie übermäßig schlaftrig sind, wenn sie versuchen, wach zu sein (während sie nachts arbeiten), und dass sie nicht schlafen können, wenn sie es versuchen (während des Tages). Und das, obwohl diese Arbeitnehmer oft versuchen, über lange Zeiträume hinweg denselben Zeitplan einzuhalten. Warum kann es schwierig sein, den zirkadianen Rhythmus so umzustellen, dass man nachts wach ist und tagsüber schläft, selbst wenn man versucht, die gleiche Gesamtschlafmenge wie normal zu bekommen?
 4. Die zirkadiane Uhr wird als "Transkriptions-Translations-Schleife mit negativer Rückkopplung" beschrieben. Was ist eine negative Rückkopplungsschleife? Können Sie eine Transkriptions-Translations-Gegenkopplungsschleife mit einfachen Worten beschreiben?
 5. Um welche beiden Allele handelt es sich in diesem Labor? Wie unterscheiden sie sich genetisch?

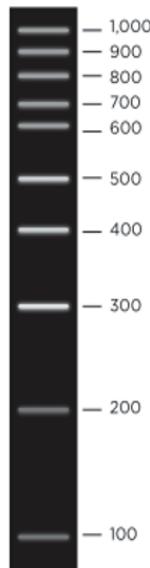
6. Was sind einige Gründe dafür, dass ein Allel, das mit einem bestimmten Merkmal assoziiert ist, nicht bedeutet, dass eine Person dieses Merkmal tatsächlich aufweist?
 7. Hängt es nur von der inneren Uhr ab, ob man ein "Morgenmensch" oder ein "Abendmensch" ist?
 8. Bei der reversen Genetik werden Techniken wie das Ausschalten eines Gens angewandt, um zu erfahren, welche Auswirkungen dies auf den Organismus hat. Welche Vorteile könnte die Durchführung von Assoziationsstudien gegenüber reversen genetischen Techniken haben? Wo könnten die Grenzen liegen?

Fragen nach dem Versuch

Interpretation der Ergebnisse

1. Zeichnen Sie ein schematisches Gel um zu zeigen, wie Ihre Ergebnisse aussehen. Zeichnen Sie für jede Probe die Banden ein, die Sie auf Ihrem tatsächlichen Gel sehen.

100 bp Ladder



2. Schreiben Sie neben jede Bande, wie lang (in Basenpaaren) die DNA in dieser Bande ungefähr ist. Nimm die Abbildung der Leiter zur Hilfe.

3. Verwenden Sie Ihre Gelelektrophoreseergebnisse, um die folgende Tabelle zu vervollständigen:
 - A. Tragen Sie die Ergebnisse der Gelelektrophorese durch Ankreuzen in die ersten beiden Zeilen der Tabelle ein.
 - B. Erfassen Sie den Genotyp und Chronotyp jeder Person (aus der Umfrage).

	Lernender 1	Lernender 2	Lernender 3	Lernender 4
Per3 5 Allel (308 bp)				
Per3 4 Allel (254 bp)				
Per3-Genotyp (5,5 / 5,4 / 4,4)				
Chronotyp (Morgen/Zwischenzeit/Abend)				

Kritisches Denken

4. Sind Sie dem Fragebogen zufolge ein "Abendtyp", ein "Morgentyp" oder ein "Zwischentyp"? Stimmt Ihr Ergebnis mit dem überein, was Sie normalerweise von sich denken?

5. Wie lautet Ihr Genotyp, und wenn die genetische Assoziation zutrifft, was sagt dies über Ihren zu erwartenden Phänotyp aus?

6. Was sind die Gründe dafür, dass Ihr Genotyp und der wahrgenommene Phänotyp nicht übereinstimmen?

Fortgeschrittene Fragen

7. Betrachten Sie nun die Daten Ihrer Klasse. Wie hoch ist der durchschnittliche Wert für die morgendliche Gleichmäßigkeit bei Lernenden, die 4/4-Homozygoten, 4/5-Heterozygoten und 5/5-Homozygoten sind? Warum ist es wichtiger, den Gruppendurchschnitt zu betrachten als die individuellen Werte?

8. Wie viele Allele **mit** insgesamt **4 Wiederholungen** gab es in den Daten Ihrer Klasse? Denken Sie daran, dass 4/4 Homozygote jeweils 2 Allele haben. 4/5 Heterozygote haben nur ein Allel.

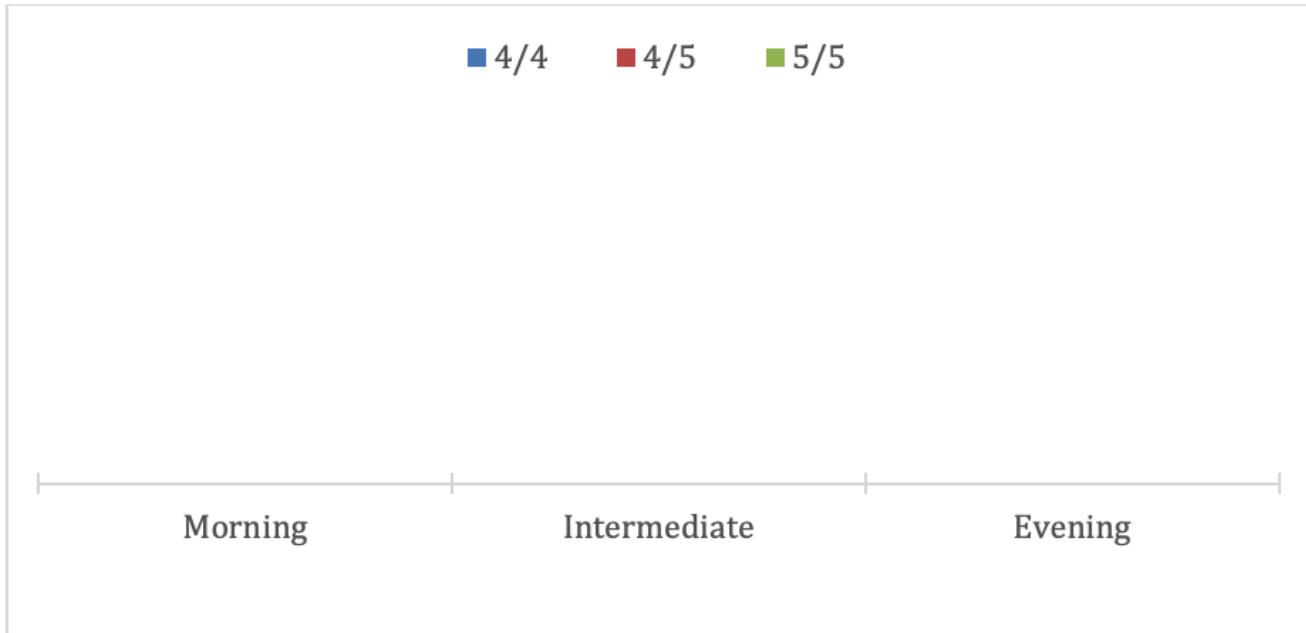
9. Wie viele Allele **mit** insgesamt **5 Wiederholungen** gab es in Ihren Klassendaten? Denken Sie daran, dass 5/5 Homozygote jeweils 2 Allele haben. 4/5 Heterozygote haben nur ein Allel.

10. Berechnen Sie die Prozentsätze:
 - A. Wie viel Prozent der Gesamtallele für jeden Phänotyp sind 4-Wiederholungsallele?
 - B. Wie viel Prozent der Gesamtallele für jeden Phänotyp sind 5-Wiederholungsallele?
 - C. Vergleichen Sie die beiden Sätze von Prozentsätzen. Erkennen Sie einen Trend in den Daten?

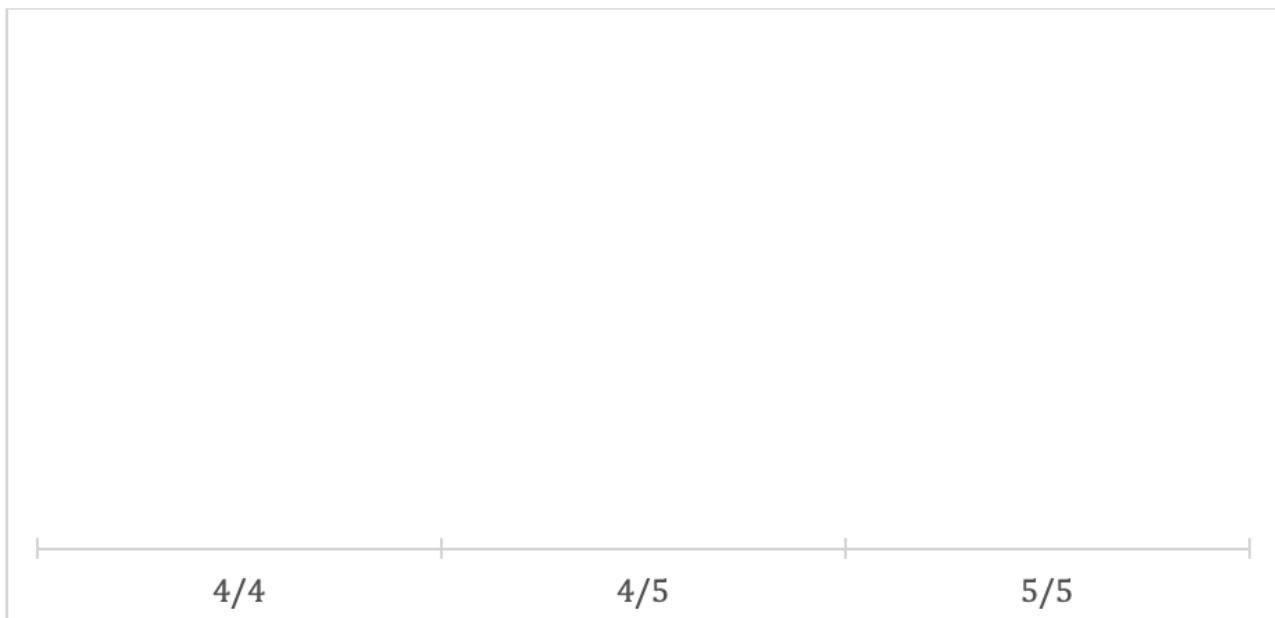
11. Zeigen Ihre Klassendaten einen möglichen Zusammenhang zwischen einem der beiden Per3-Allele und der Morgen- oder Abendpräferenz?

12. Warum sollte man große Stichproben und einen statistischen Test verwenden, um festzustellen, ob ein Zusammenhang besteht oder nicht?

13. Erstellen Sie ein Balkendiagramm mit den Daten Ihrer Klasse. Stellen Sie für jeden Chronotyp dar, wie viele der einzelnen Genotypen in Ihrer Klasse vorhanden waren. (Jeder Chronotyp sollte drei Balken haben.)



14. Erstellen Sie ein Diagramm, das den durchschnittlichen Wert für jeden Genotyp zeigt.





Leitfaden für Ausbilder

Erwartete Ergebnisse

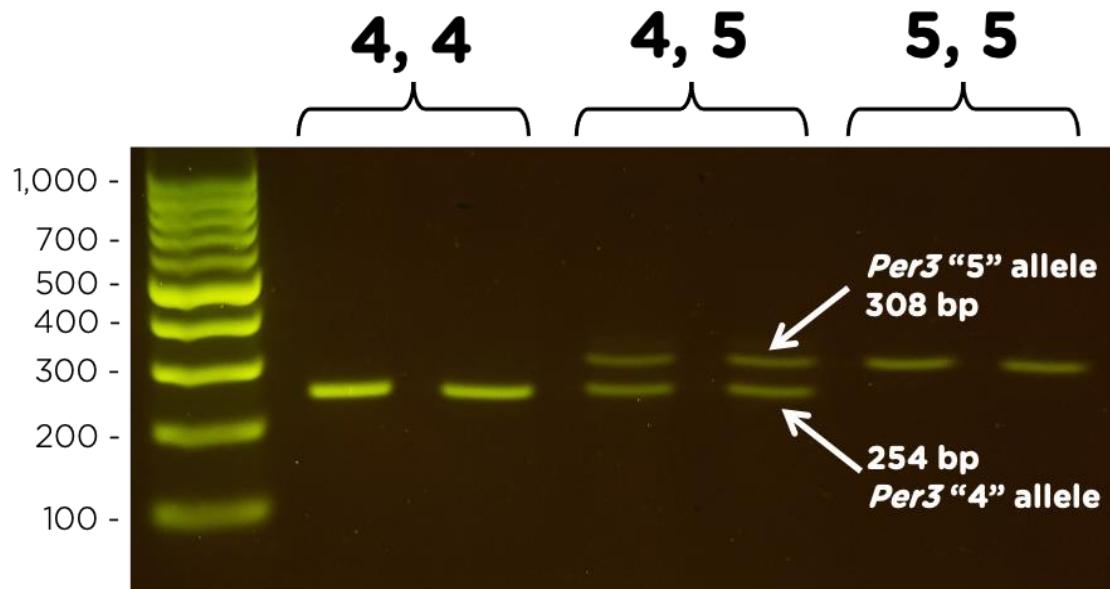
Troubleshooting

Zusätzliche Unterstützung für Lernende
Lernziele und entwickelte Fähigkeiten



Erwartete Ergebnisse

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese sollten dem unten stehenden Foto ähneln:



Dieses Foto zeigt die Ergebnisse eines 30-minütigen Gellaufs mit einem blueGel.

Beachten Sie, dass die Spitze der 100-bp-Leiter bei einem kurzen Gellauf wahrscheinlich nicht vollständig abgetrennt wird, aber das ist in Ordnung! Sie müssen die Leiter nur im Bereich von 200 bis 400 bp trennen, um die experimentellen Ergebnisse interpretieren zu können.

Denken Sie daran, dass mit dieser Aktivität ein **möglicher genetischer Zusammenhang** zwischen dem Per3-Genotyp und der Morgen-Abend-Präferenz untersucht wird. Assoziation bedeutet nicht Kausalität - es sind weitere Studien erforderlich, um zu bestätigen, dass der Per3-Genotyp einen direkten Einfluss auf den Schlafphänotyp hat. Es wird daher NICHT erwartet, dass es eine perfekte Korrelation zwischen dem Per3-Genotyp und der Morgen-Abend-Präferenz gibt!



Troubleshooting

Wenn die fluoreszierenden DNA-Banden in einer oder mehreren Versuchsproben schwach oder gar nicht vorhanden sind, kann Folgendes passiert sein:

- Zu viel Gewebe: Die häufigste Fehlerquelle bei diesem Protokoll ist die DNA-Extraktion. Wiederholen Sie die DNA-Extraktion und achten Sie darauf, dass die Lernenden ihre Wangen nur leicht abkratzen, da zu viel DNA die PCR hemmen kann.
- Suboptimale PCR-Amplifikation: Pipettierfehler beim PCR-Setup können zu einer suboptimalen Amplifikation für einzelne Proben der Lernenden führen.
- Die DNA-Proben können nicht auf das Gel geladen werden: Das Laden der DNA-Proben für die Gelelektrophorese erfordert ein wenig Übung. Die Banden erscheinen schwach, wenn die Lernenden nicht die gesamte Probenmenge in die Vertiefungen einbringen.

Wenn auf dem Gel keine fluoreszierenden DNA-Banden zu sehen sind, auch nicht für die DNA-Leiter, kann Folgendes passiert sein:

- Fehlende Verwendung einer fluoreszierenden DNA-Färbung: Dieses Labor erfordert Agarosegele, die mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (z. B. SeeGreen™) hergestellt wurden. DNA-Färbemittel, die DNA mit einer sichtbaren blauen Verbindung sichtbar machen, sind weniger empfindlich und mit diesem Kit nicht kompatibel.
- Falsche Visualisierungsbedingungen: Fluoreszierende DNA-Färbungen (z. B. SeeGreen™) müssen mit einem Blaulicht- oder UV-Transilluminator betrachtet werden. Das blueGel System verfügt über einen integrierten Blaulichttransilluminator. Vergewissern Sie sich, dass Sie für die DNA-Visualisierung das blaue Licht des blueGel-Systems durch Drücken der Glühbirnen-Taste eingeschaltet haben.
- Die Proben sind aus dem Gel herausgelaufen: Wenn Sie das Gel zu lange laufen lassen, können die DNA-Proben vom Gel abwandern. Überwachen Sie den Fortschritt, indem Sie die DNA-Proben gelegentlich unter einem Transilluminator überprüfen oder den Ladefarbstoff verfolgen, der mit dem Auge sichtbar ist. Beenden Sie den Lauf, bevor der farbige Ladefarbstoff das Ende des Gels erreicht.
- Die Reagenzien wurden unsachgemäß gelagert und/oder sind abgelaufen: Der Kit kann bis zu zwölf Monate nach Erhalt im Gefrierschrank aufbewahrt werden. Eine Lagerung unter anderen Bedingungen oder über diesen Richtwert hinaus kann die Leistung beeinträchtigen.



Lernziele und entwickelte Fähigkeiten

Lernziele für Lernende

- Erforschung der genetischen Grundlagen der zirkadianen Rhythmen
- das Konzept der genetischen Assoziationsstudien zu verstehen

Fähigkeiten zur wissenschaftlichen Untersuchung

- Identifizieren oder Stellen einer prüfbaren Fragestellung
- Hypothesen formulieren
- Befolgen Sie detaillierte Versuchsprotokolle
- Tabellen oder Diagramme erstellen, um ihre Ergebnisse zu präsentieren
- Daten in einem Diagramm oder einer Tabelle interpretieren
- Daten verwenden, um eine Hypothese zu bewerten
- Eine wissenschaftlich belegte Behauptung aufstellen
- Eine wissenschaftliche Behauptung mit Argumenten begründen

Molekularbiologische Kenntnisse

- Mikropipettieren
- DNA-Extraktion
- Grundsätze und Praxis der PCR
- Agarosegel-Elektrophorese

Bibliographie

- Archer, S.N., Robilliard, D.L., Skene, D.J., Smits, M., Williams, A., Arendt, J., and Von Schantz, M. (2003). A Length Polymorphism in the Circadian Clock Gene Per3 is Linked to Delayed Sleep Phase Syndrome and Extreme Diurnal Preference. *Sleep* 26, 413–415. <https://doi.org/10.1093/sleep/26.4.413>
- Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N., Mishima, K., Kamei, Y., Katoh, M., Watanabe, T., Sekimoto, M., Shibui, K., Kim, K., et al. (2001). Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Reports* 2, 342–346. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve070>.
- Horne, J.A., and Ostberg, O. (1976). A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol* 4, 97–110.
- Osland, T.M., Bjorvatn, B., Steen, V.M., and Pallesen, S. (2011). Association Study of a Variable-Number Tandem Repeat Polymorphism in the Clock Gene PERIOD3 and Chronotype in Norwegian University Students. *Chronobiology International* 28, 764–770. <https://doi.org/10.3109/07420528.2011.607375>.
- Viola, A.U., Archer, S.N., James, L.M., Groeger, J.A., Lo, J.C.Y., Skene, D.J., von Schantz, M., and Dijk, D.-J. (2007). PER3 Polymorphism Predicts Sleep Structure and Waking Performance. *Current Biology* 17, 613–618. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.073>.