

Polymerase Ketten Reaktion (PCR) zur Analyse eine *Wolbachia* Infektion

PCR Primer zur Amplifikation eines 438 bp Fragments des 16S ribosomale RNA Gens **16S rDNA** (ubiquitär in allen *Wolbachia* Arten, codiert für die kleine Untereinheit der bakteriellen Ribosomen)

WSPEC-F: 5' -CATACCTATTTCGAAGGGATAG-3'

WSPEC-R: 5' -AGCTTCGAGTGAAACCAATTC-3'

PCR Primer zur Amplifikation eines 708 bp Fragments des CO1 cytochrome c oxidase I Gens: **CO1** (ubiquitär in der mitochondrialen DNA von Arthropoden)

LCO1490: 5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

HCO2198: 5' -TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Der **Thermocycler** (PCR Maschine) muss mit folgendem **Programm** programmiert sein:

1 Zyklus	2min @ 94°C	Denaturierung (=schmelzen der DNA)
30 (- 40) Zyklen	30sec @ 94°C	Denaturierung
	45sec @ 55°C	Primer Annealing (= Primer hybridisieren mit der Zielsequenz)
	1min @ 72°C	Polymerisation der neuen DNA Stränge
1 Zyklus	10min @ 72°C	Vollständige Polymerisation aller DNA Stränge
Stand by	4°C	

Durchführung:

- Nehmen Sie pro zweier Gruppe 6 PCR Ready tubes. Jedes dieser Tubes enthält ein Kügelchen mit dem „Master Mix“ für ein Endvolumen von 25µl: Taq Polymerase, MgCl₂, Puffer, dNTPs (Nukleotide: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Beschriften Sie die Tubes sorgfältig:

Tube #	
1	Eigenes Insekt A
2	Eigenes Insekt B
3	+ Kontrolle 1 (von Ihnen isolierte genomische DNA von <i>Wolbachia</i> infizierter <i>Drosophila</i>)
4	- Kontrolle 1 (von Ihnen isolierte genomische DNA von <u>nicht</u> <i>Wolbachia</i> infizierter <i>Drosophila</i>)
5	+ Kontrolle 2 (genomische DNA von <i>Wolbachia</i> infizierter <i>Drosophila</i>)
6	- Kontrolle 2 (steriles, destilliertes Quarz Wasser: QH ₂ O)

- Stellen Sie einen Primer Master Mix her, indem Sie die Primer mischen:
 - 15µl Primer WSPEC-F (5µM)
 - 15µl Primer WSPEC-R (5µM)
 - 15µl Primer LCO1490 (5µM)
 - 15µl Primer HCO2198 (5µM)
- Geben Sie zu jedem PCR Ready tube die folgenden Komponenten in der gegebenen Reihenfolge. **Wechseln Sie jedes Mal die Pipettenspitze!**
 - 15µl QH₂O
 - 8µl Primer Master Mix (enthält von jedem Primer jeweils 2µl)

- 2µl des korrekten DNA „Templates“ für das entsprechend angeschriebene Tube.
- Schliessen Sie die Tubes und tippen Sie sorgfältig an den Tube Grund zum mischen. Stellen Sie die Tubes in den Thermocycler und Notieren Sie auf dem Cycler Sheet wo sich Ihre Proben befinden.
- Wenn alle Proben der Klasse im Thermocycler sind, kann das Programm gestartet werden. Es läuft ca. 2 Stunden.
- Nach der PCR werden die Proben bei -20°C aufbewahrt bis zur Analyse mit Agarose Gel Elektrophorese.
- Räumen Sie Ihren Arbeitsplatz auf.

(Haus-) Aufgaben und Ziele (nehmen Sie Ihr Biologie Buch zur Hilfe):

- Sie wissen was bei jedem Schritt bei der Isolation der genomischen DNA passiert.
- Sie kennen den Ablauf der PCR und können diesen erklären.
- Weshalb sind die Primer mit 5' und 3' an den Enden angeschrieben?
- Sie kennen die Funktion der einzelnen Komponenten, die Sie für die PCR gemischt haben.
- Sie haben zwei Positive und zwei Negative Kontrollen: was kontrollieren Sie überhaupt mit diesen Kontrollen?
- **Zeichnen Sie** ein Agarose Gel mit den Banden, so wie Sie diese erwarten wenn alle Kontrollen den Erwartungen entsprechend funktionieren, Ihr Insekt A positiv für und Ihr Insekt B negativ für eine *Wolbachia* Infektion ist. Nehmen Sie als Marker: 100bp, 200bp, 400bp, 600bp und 1000bp. Begründen Sie das Resultat für jede Reaktion (Tube 1-6 in oben stehender Tabelle)

Hypothese bezüglich Agarose Gel:

