Schiller-Schule Bochum Jahrgangsstufe Q1.1

Schuljahr 2013/14

FACHARBEIT

Im Leistungskurs BI/1 Sauerwald

Thema: Döner-PCR

Verfasser: Konstantin P. Weitkämper

Kursleiter: Herr Schaller

Bearbeitungszeit: 21.10.2013 – 02.12.2013

Abgabetermin: Montag, 02.12.2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Materialien 1

2.1 Geräte 1

2.2 Chemikalien 2

3 Methoden 2

4 Diskussion 3

5 Bearbeitung der DNA 3

5.1 Exraktion der DNA aus der Zelle 3

5.2 Reinigung der DNA 4

6 PCR und Gel-Elektro-Phorese 4

6.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 4

6.2 Gel-Elektrophorese 5

7 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) 5

7.1 RFLP-Erläuterung & REBsites 6-10

8 Anhang 11

8.1 Zusammenfassung und Ausblick 11

8.2 Glossar/ verwendete Literatur 11

8.3 Gel-Elektro-Phorese Bilder

Einleitung

Da es in letzter Zeit häufig zu Vebrauchertäuschung kam, bei der Inhaltsstoffe falsch angegeben oder verschwiegen wurden, habe ich beschlossen, diesen Fällen, wie zum Beispiel dem Pferdefleischskandal, nachzugehen und diese Forschung zum Thema meiner Facharbeit zu machen.

Dank unserer Kenntnis der molekular-Biologie, ist es uns möglich die Döner-DNA mit der DNA von Rind, Schwein, Huhn und Pferd zu vergleichen. Dazu extrahierten wir von allen fünf Fleischproben die DNA und werden dazu die Primer identifizieren, eine PCR durchführen und eine Gel-Elektro-Phorese durchführen.

Mit dieser Arbeit möchte ich nicht nur die Inhaltsstoffe von Nahrungsmitteln ermitteln, sondern auch mein Verständnis der Methoden zu verfestigen, um im Unterricht und hoffentlich auch im späteren Leben einen Nutzen daraus hervor zutragen.

Materialien

Geräte

Zentrifuge: „Perfect Spin 24 plus“	PEQLAB Biotech. GmbH D-Erlangen
Thermocycler: „peqSTAR 96 Universal Gradient“	“
Gleichspannungsquelle: „EV265“	Kisker Biotech GmbH u. Cokg D-Steinfurt
Agarosegelkammer: „MSCHOICETRIO“	“
UV-Illuminator: „TFX-20M“	Vilber Lourmat F-Marine la Valle’e

Chemikalien

Taq-Polymerase: „pwg Gold-Pölymerase“

Primer: „Primer“ Primer Eurofins MWG-Synthesis GmbH D-Erbach

Agarose: „Agarose“ Carl Roth, GmbH und Cokg D-Karlsruhe

DNA-Leiter: „DNA-Leiter“ “

Agarose: „Agarose“ “

dnTP’s: „dnTP“ “

Methoden

-Gendatenbanken

-Sequenzaligment

-Extraktion der DNA aus der Zelle

-Reinigung der DNA

-PCR

-Agarose Gel-Elektro-Phorese

Diskussion

Für mich war das Thema Döner-PCR so interessant, weil ich mich auch in den Nachrichten das Thema Verbrauchertäuschung und –schutz verfolgt habe. Hier hatte ich nun die Möglichkeit mich mit diesem Thema noch enger zu befassen. Ziel der Testreihe war die DNA eines Döners zu bestimmen und herauszufinden, was wir essen, wenn wir einen Döner bestellen. Das Thema ermöglichte mir und den anderen Teilnehmern uns ausführlich mit den Vorgängen der PCR und Gel-Elektro-Phorese zu beschäftigen und so auch einen Einblick in die Arbeit eines Kriminalpolizisten und die eines Verbraucherschützers zu erhalten. Desweiteren war es spannend die Versuche selber durchzuführen und nicht dem Lehrer dabei zuzusehen. Folglich bin ich sehr froh diese Chance ergriffen zu haben.

Bearbeitung der DNA

Extraktion der DNA aus der Zelle

Wenn man die DNA aus einer eukariotischen Zelle extrahieren möchte, so benötigt man zuerst ca. zwei Gramm des, in diesem Fall, Fleisches. Darüber hinaus brauchen wir einen ml Spülmittel, eine Spatelspitze Salz sowie eine Spatelspitze Waschmittel. Alle diese Komponenten gibt man in einen Mörser zusammen und stampft diese, bis man eine Masse ohne große Teile des Fleisches erhält. Auf dieses Material geben wir 9 µl Wasser, welches man mit dem bereits erstellten Material mischt. Das nun entstandene Material wird nun in zwei gleich große Teile getrennt und in zwei Eppendorf-Gefäße gegeben. Die eine Hälfte wird eine Minute zentrifugiert, die andere wird lediglich filtriert und inkubiert bei 65°C. Danach werden beide Proben im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Brennspiritus übergossen, wodurch sich 3 Phasen im Gemisch entwickeln. Man entnimmt nun die mittlere Phase, welche die DNA beinhaltet.

.

Reinigung der DNA

Diese DNA ist allerdings noch mit einigen Proteinen verunreinigt, welche erst noch entfernt werden müssen, bevor die DNA der einzelnen Tiere und des Döners vergleichen kann. Um diese Trennung von Proteinen und DNA zu erreichen, verwendet man die Phenol-Chloroform-Extraktion. Man überschüttet die extrahierte DNA mit 500 µl Chloroform und 500µl Phenol. Danach zentrifugiert man dieses Gemisch eine Minute bei 10.000 g. Während der Zentrifugation entwickeln sich erneut drei Phasen heraus, von denen man die oberste entnimmt, denn in dieser ist die DNA enthalten. Nun wird der Vorgang noch einmal widerholt. Danach fügt man einmal nur Chloroform hinzu und zentrifugiert das Gemisch fünf Minuten. Danach entnimmt man erneut die oberste Schicht und verwirft den Rest. Diese DNA mischt man nun mit der 1,5-fachen Menge an eiskaltem Ethanol. Dieses Gemisch zentrifugiert man 15 Minuten. Danach entnimmt man ein letztes Mal die oberste Phase und so erhalten wir eine saubere DNA zusammen mit etwas Wasser. Das Wasser kippt man das Wasser einfach weg und die DNA bleibt am Boden des Gefäßes zurück. Das Gefäß lässt man nun austrocknen.

PCR und Gel-Elektro-Phorese

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die nun frisch extrahierte DNA wird nun mit 17,5 µl Wasser übergossen und danach durch 2,5 µl 10x Puffer, einem µl dNTPs, sowie jeweils einem µl forward Primer, reverse Primer (spezifisch für jedes einzelne untersuchte Spezies), DNA-Template und taq-Polymerase ergänzt. Die andere Probe wird mit Actin-Primern versetzt, danach werden beide Proben 1,5 Stunden in einen Thermo-Cycler gegeben.

Gel-Elektro-Phorese

Um eine Gel-Elektro-Phorese durch zu führen muss man ein Gel in die Phorese-Kammer gießen und einen „Kamm“ in diesen setzen um die sogenannten Taschen zu erstellen, diese Taschen befinden sich am negativen Pol der Kammer und wird zu Beginn der Phorese werden die negativen DNA-Fragmente sich zum positiven Pol bewegen und sich dadurch voneinander trennen . Die zentrifugierte DNA wird erneut mit Chloroform versetzt und sehr kurz zetrifungiert. Danach werden jeweils neun µl dieser Lösung auf einen Streifen Parafilm aufgetragen. Diese neun µl werden mit jeweils einem µl blauen Farbstoffs versehen. Anschließend werden diese zehn µl in die Taschen des Gels gegeben, zum direkten Vergleich wird auch zehn µl puren Farbstoffes in eine Tasche gegeben. Nun wird das Gel unter 120 mVolt eine halbe Stunde lang gestellt.

Restriktionsfragmentlängenpolymor-phismus (RFLP)

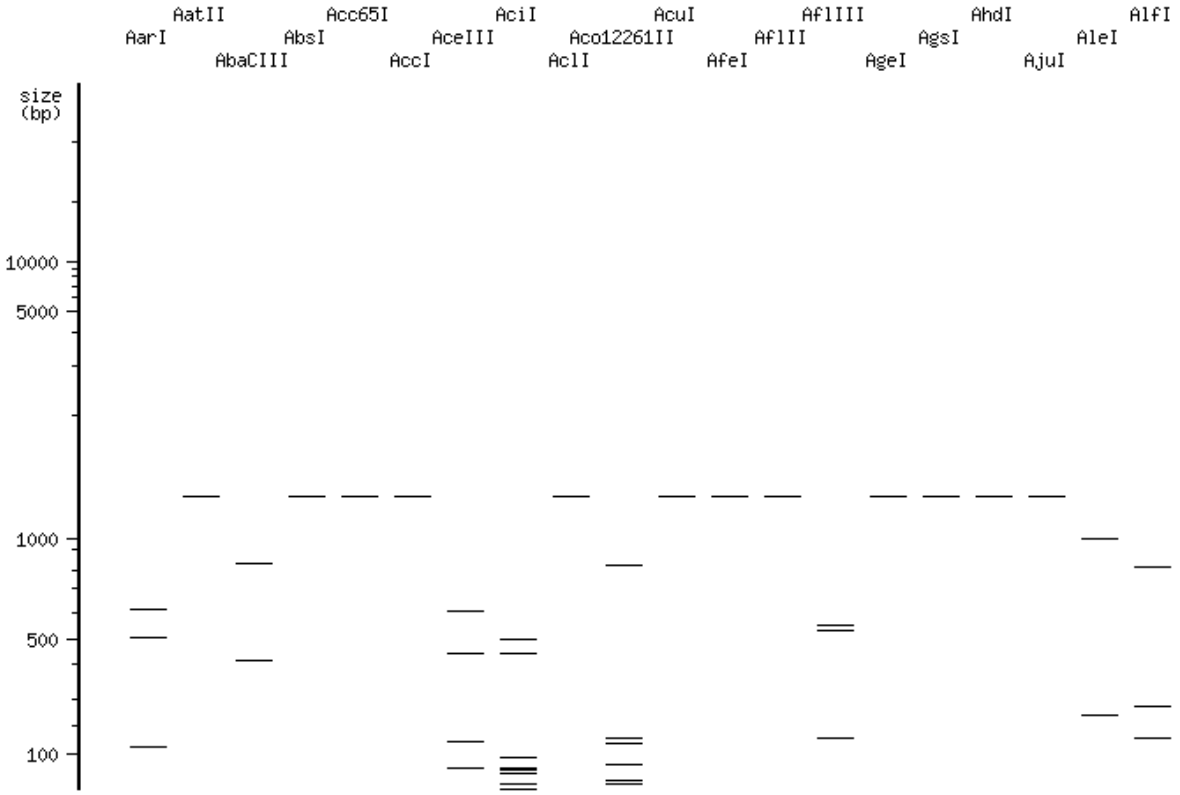
Ein weiterer Aspekt meiner Facharbeit war der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Leider konnte ich aus Zeitmangel diese Verfahren nicht durchführen, weswegen ich hier nun das Prinzip erklären werde.

Dieses Verfahren dient ebenfalls der DNA-Bestimmung und funktioniert ähnlich wie die PCR. Die RFLP ist ein älteres Verfahren, diente aber auch hauptsächlich zur Täterbestimmung bei der Kriminologie und als Vaterschaftstest. Das Prinzip basiert darauf, dass Restriktionsenzyme Die DNA-Stränge schneiden und, wie bei einer PCR, eine Gel-Elektro-Phorese die unterschiedlich langen DNA-Stränge sichtbar macht. So kann man in dem Gel verschiedene DNA’s mit einander vergleichen. Außerdem dient die RFLP als genetischer Marker bei der Genkartierung und bei der Suche nach Chromosom-Abschnitten mit spezieller Ausprägung. Eine weitere Anwendung, ist die Terminale-RFLP (T-RFLP). Dabei werden die Ziel-Gene bei der PCR amplifiziert mit einem fluoreszens-markiertem Primer. Nun nutzt man wieder Restriktionsenzyme und lässt eine automatisierten Sequenzer analysiert, und dieser detektiert nun die fluoreszierenden Fragmente.

[New DNA]

REBsites

gallus acrosin



Gel type:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 [Next >>]

Die Enzyme die uns interessieren sind „PvuII“ und „KpnI“ (s. folgende Seiten), klickt man auf die jeweilige Enzym wird die Fragmentgröße in einem Fenster angezeigt.

[Print]

Order by:

Für die Erklärung solltest du für alle Spezies die Fragmentgrößen tabellarisch aber auch als „fiktives-Gel (RFLP)“ darstellen (%tigkeit des Agarosegels kann man auch einstellen) und gut verständlich erläutern.

http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
ovis            ------------------------------------------------------------
bos             ------------------------------------------------------------
equus           ATGTGTCATACTCTGGGAGGTGAGATGCTGCCTCCTGACAACCAGAGGAAATACGTCATG
sus             ----------------GAGGTCA--------------------------------CTGG
gallus          ------------------------------------------------------------AG

ovis            ---------------------------TTGGCAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTCTGC-T
bos             ---------------------AGGACTTTGGCAGAGATGCTGCCAACTGCCATTCTGC-T
equus           ATATTCAGGCCGTGCTGGGGCAGGAGTCTGGTAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTCTGC-T
sus             GCTTCCAGGCCAGGCCGGCG-AGGAGCGCGGTAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTC----T
gallus          CCGGGCGCGATGGGCTGCCGTGCGCCTCCGGGAGCGATGGTGCTG-CTGCTGCCCCTCGC
                                             ** ** **** ***   ****    *

ovis            GGTCTTGGCAGT-ATCTGTGGTCGCCAGAG-ATAACACCACGTGTG---ATGGCCCCTGC
bos             GGTCTTGGCAGT-ATCTGTGGTCACCAGAG-ATAACACCACGTGTG---ATGGCCCCTGT
equus           GGTCTTGGCAGT-GTCTGTGGTGGCCAATG-ATAACATCACGTGTG---ATGGTCCCTGT
sus             GGTCCTGGCAGT-GTCTGTGGCGGCCAGAG-ATAACGCCACGTGTG---ATGGCCCCTGC
gallus          GGTGCTGCTGGCCGTCTGC--CGGCCTGGGCACGGCTCCTCCGGCGCCTGCGACACCTGC
                ***  **   *   ****      **   * *   *  * *  * *     *   ****

ovis            GGGGTCCGGTTCA-GGCAGAAC-CGGCAGGGGGGCGTACGGATCATCGGTGGGCAAGA-C
bos             GGGACACGGTTCC-GGCAGAAC-CGTCAGGGGGGCATGCGGATCATCGGCGGGCAAGA-C
equus           GGGTTACGATTCA-GGCAGAAC-CTACAAGGGACCCTCCGCATCATCGGAGGGCAGGA-C
sus             GGCTTACGGTTCA-GGCAGAAA-TTAGAGTCAGGCATGCGTGTGGTTGGCGG-CATGAGT
gallus          GGGCTCCGGCCCATGGCTTATCACTACGGGGGAAC--GCGTGTCGTGGGCGG-CACGGAC
                **    **   *  ***  *              *   **  *  * ** ** ** *

ovis            GCCGCCCACGGGGCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAGATCTTCACGTACCACAACAAC
bos             GCTGCCCACGGGTCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAGATCTTCACATACCACAACAAC
equus           GCGGCACTTGGAGCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAAGTCTTCACTTACCACAACAAG
sus             GCAGAACCGGGCGCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAGATCTTTATGTACCACAACAAC
gallus          GCCCCGCAGGGGGCCTGGCCGTGGATTGTCAGCCTCCAAAGC---ACGTGGTATG-TGGG
                **    *  **  ******* ***** ***********   *   *  *   *

ovis            CGGCGGTACCACGTGTGCGGGGGCTCCCTGCTGAACTCCCAGTGGCTGCTCACGGCCGCT
bos             CGGCGGTACCACGTGTGTGGGGGCTCCCTGCTGAACGCCCACTGGCTGCTCACTGCCGCT
equus           CGGAGGTATCATGCCTGCGGAGGCACATTGCTGAACTCCCACTGGCTGGTGACAGCTGCT
sus             CGGAGGTACCACACGTGCGGGGGCATCTTGCTGAACTCGCACTGGGTGCTCACTGCTGCT
gallus          CA-CGGGA-CACATCTGTGGAGGATCTCTCATCACCCCGCAGTGGGTCCTCACGGCAGCG
                *   ** * **    ** ** **     *  * * * * ** *** *  * ** ** **

ovis            CACTGCTTCAGGATCAAAAAAAAAGTGACCGACTGGAG-GC-TGATCTTCGGAGCTAAGG
bos             CACTGCTTCAGGATCAAAAAAAAAGTGACCGACTGGAG-GC-TGATCTTTGGAGCTAAGG
equus           CACTGCTTCAGGACCAAAAAAAAAGCGTATGACTGGAG-AC-TGATTTTTGGAGCAAGGG
sus             CACTGCTTCAAGAACAAAAAAAAAGTTACTGACTGGAG-AC-TGATTTTCGGAGCAAACG
gallus          CACTGCTTC--GACCATGCAACCCCCGACACGCCGTGGCACGTGGTGATCGGTGGCCACG
                *********  ** **   **           * *  *  * ** *  * ** *     *

ovis            AAGTTGAGTGGGGGACCAATAAGCCAGTGAAGCCGCCTCTGCAGGAGAGATATGTTGAGA
bos             AAGTTGAGTGGGGGAGCAATAAGCCAGTGAAGCCGCCTCTGCAGGAGAGATATGTTGAGA
equus           AAATTCAATATGGCAGCAATAAGCCAGTGAAGCCACCTCTGCAGGAGAGACGTGTTGAGA
sus             AAGTTGTGTGGGGAAGCAATAAGCCGGTGAAGCCACCCCTGCAGGAGAGATTTGTTGAGG
gallus          A--TC---TGAAACGCC--TGGGCCC-CGAAGCTGTCG-TGC----GCAACGTGATACGG
                *  *    *       *  *  ***   *****   *  ***    *  *  ** *  *

ovis            AAATCATCATTCATGAGAAATACTCCGCGAGCTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCATGA
bos             AAATCATCATTCATGAGAAATACTCGGCGAGCTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCATAA
equus           AAATCATCATTCATGAAAATTACTCCCCTCGTTCAGAGGCAAACGACATTGCTCTCTTGA
sus             AGATCATCATTCATGAAAAATACGTTTCAGGGTTAGAGATAAATGACATTGCTCTCATAA
gallus          A--TAATCCCCCACGAATACTATCACAGAAACAACATGGCCAATGACATCGCGCTGCTTG
                *  * ***   ** **  * **               *   ** ***** ** **  *

ovis            AGATCACCCCTCCTGTTACCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGATGCCTGCCTCA-GTTT
bos             AGATCACCCCTCCTGTTATCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGCTGCCTGCCTCA-GTTT
equus           AGATCACCCCTCCCGTTCCCTGTGGGCACTTCATTGGACCGGGCTGCCTGCCCCA-ATTT
sus             AGATCACCCCTCCTGTTCCATGCGGGCCCTTCATCGGACCAGGCTGCCTGCCCCA-GTTT
```

```
gallus          AGCTGGACCAACCTGTCCAGTGCAGCTACTACATCCAGCTCGCCTGCGTGCCCGATGCCT
                ** *   **  ** **    **  *   ** ***    *  *  *** ****  *    *

ovis            AGG-GCAGGCCCACCCAGAGTTCCCCAGACATGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTACA
bos             AGG-GCAGGCCCACCCAGAGTTCCCCAGACATGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTACG
equus           AAG-GCAGGCCCACCTAGAGTTCCTCAGACCTGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTAAA
sus             AAG-GCTGGCCCGCCCAGAGCGCCCCAGACATGCTGGGTGACTGGCTGGGGCTACTTAAA
gallus          CGCTGCGAGTGT---CAGAGCTCA-CAGAC-TGCTATGTCAGTGGCTGGGGACACATGGG
                    **  *       ****  *  ***** ****  **   *********   * *

ovis            AGAGA-ATGCCCGCAGGA-----------CATCCCCTATGCTGCAGGAGGCGCGCGTGGA
bos             TGAGA-ATGCCCGCAGGA-----------CATCACCTGTGCTGCAGGAGGCGCATGTGGA
equus           AGAGA-ATGCCCGCAAGA-----------CATCACCTATACTGCAGGAGGCGCCTGTGGA
sus             AGAGA-AAGGCCCCAGGA-----------CGTCACCTACACTGCAGGAGGCACGTGTGGC
gallus          GCTGAGATCTCTACAGGAATATGTCGAACCATACCGTGTCCTGCAGGAGGCCAAGGTCCA
                   ** *   *  ** **           * *  * *   ***********    **

ovis            CCTCATCGACCTCGGCTTGTGTAACTCGACCAGATGGTACAACGGGCGCATTCGT-TCAA
bos             CCTTATCGACCTCGACTTGTGTAACTCGACCAGATGGTACAATGGGCACATTCGT-TCAA
equus           GCTCATCGACCTCGACTTATGTAACTCGACCCAGTGGTACAATGGGCGCATTCGT-TCAA
sus             CCTCATCGACCTCGAATTATGTAACTCGACCCAGTGGTACAATGGGCGTGTCACG-TCAA
gallus          GCTCATTGACCTCAACATCTGCAACAGCAGCAACTGGTATGCTGGGGCTGTCCATATCCA
                 ** ** ******    * ** ***   * *   *****    ***    *     ** *

ovis            CCAACGTGTGCGCAGGGTACCCTGAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCG
bos             CCAATGTGTGCGCAGGGTACCCTGAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCG
equus           CCAATGTGTGTGCAGGGTATCCTCAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCG
sus             CTAATGTGTGCGCAGGGTATCCTAGAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCG
gallus          C-AACGTGTGTGCTGGTTACCCGCAGGGCGGCATCGACACCTGCCAGGGTGACAGCGGTG
                * ** ***** ** ** ** **    ***   ** ************** ******** *

ovis            GGCCTCTCATGTGCAAAGACAGCGCGGAAAACAGCTATGTGG-TCGTGGGAATCACAAGC
bos             GGCCTCTCATGTGCAAAGACAGCGTGGAAAACAGCTATGTGG-TCGTGGGAATCACAAGC
equus           GGCCTCTCATGTGCAGAGACAGCATGGAAAACGCCTATGTGG-TCGTGGGAGTCACGAGC
sus             GGCCTCTCATGTGCAGAGACAGAGCGGAAAACACCTTTGTGG-TCGTGGGCATCACAAGC
gallus          GTCCTCTCATGTGCAAAGATAAAACTGCTGACTACT-TCTGGCTCATTGGTGTGACCAGC
                * ************* *** *     *   **  ** * *** ** * **  * ** ***

ovis            TGGGGGGTAGGCTGTGCCCGAGCTAAGCGCCCCGGAGTCTACACGTCTACCTGGTCCTAT
bos             TGGGGGGTAGGCTGTGCCCGAGCTAAGCGCCCCGGAGTCTACACGTCTACCTGGTCCTAT
equus           TGGGGGGTAGGCTGTGCCCGTGCTAAGCGCCCTGGAGTCTACACGGCTACCTGGCCCTAT
sus             TGGGGGGTAGGCTGCGCCCGAGCTAAGCGCCCTGGAGTCTACACGTCTACCTGGCCCTAT
gallus          TGGGGGAAAGGCTGTGGGAGAATACAGCAGCCTGGAGTCTATGCCTCCACTCAGTACTTT
                ******  ****** *   *     ***  ** ********  *  * **   *  ** *

ovis            CTGAACTGGATCGCCTCCA-AGATAGGCTCTACCGCCGTGCACATGATTCAGTTGCCCAC
bos             CTGAACTGGATTGCCTCCA-AGATAGGCTCTAACACGGTGCACATGATTCAGTTGCCCAC
equus           CTGAATTGGATTGCTTCCA-AGATCGGTTCTAACGCCTTGCACATGATTCAACTGGGCAC
sus             CTGAACTGGATTGCTTCCA-AGATTGGTTCTAATGCCTTGCAGATGGTTCAACTGGGCAC
gallus          CGCAACTGGATC-CTGGTACAGATGGGATT--GCTTCCAGCAGAAGCGCCTACTACA-AC
                *  ** *****  *    * **** ** *          *** * *   *   *    **

ovis            CGCCTCCCCCGCTTCTACTCCAGGGGCCCAAGCGAGCCCTGGCTCCGTCCAGCCTTCCGT
bos             CGCTCCCCCTGCTTCTACTCCAGCAGCCCAAGCGAGCCCTGGCTCCGTTCAGCCTTCCAT
equus           CCCTCCCCCTCCTACTACTCAAGCACTCCCGGCTAGACTCCCCTCTATTCAACCT---AT
sus             CCCTCCCCGTCCTTCTACTCCAGCACCCCCTGTCAGACCCCCCTCTGTTCAGACTCCTGT
gallus          GCCATATCCAGTCTATATCTCA--ACCTCCTACCAGA---GGCCAAAACCAACAT---AC
                  *    *       **    *      *     **      *      **   *

ovis            TCG--CCCACCTTGGTTCTTCCAACACGTTCCTCGACCACCTCCC-----TCTCAGCAAG
bos             TCG--CCCACCTTGGTTCTTCCAACACGTTCCTCAACCACCTCCC-----TCTCAGCAAG
equus           TCA--CCCTCTTTGGTCCTTCCAACGCCCTCCTCAACCACCTCCC-----CCT-------
sus             TCG--CCCACCTTGGTACTTCCAACGCCCTCCTGGAC--CCTCCCAGCAACCTGGGTC--
gallus          TCGAGCCCATTTAGACCATGCCCAT---TTCCACG-------------------------
                **   ***   * *    * ** *     ***

ovis            CTATTGCCGTGGCCCAA--CCCCTAGATCCCTCAAACCTCCGACCCTC---CATCCCATC
bos             CTATTGCCGTGGCCCAA--CCCTCACGTCCCTCAAGCCCCCGGTCCTC---AGTCCCACC
equus           ----------GGATCA---CCTGCA-----CCCAAACC-CCAACCCCC---AGCCCCACC
sus             CCGCCCCCGCCCCCCAGCTCCCCCCCCTGCCCCGCCCCCCCCGCCCCCCCCACCCCCACC
```

```
gallus          -------------CCAG----------------AAGCTCCTGGATTTC-----TTTAATC
                              **                  *  *       *         * *

ovis            TGCCACCCCCTCCCGACGACCACCCCCACCGCAGCCGTCCACTAGGCCTCCCCAGGCGCT
bos             TGCCCCCCGACCCCCACGACCACCCCCACCGCAGCCTTCCACTAGGCCTCCCCAGGCACT
equus           T-----------------CCACCCCCACACCAAACTTCCACCAAACCTCCTCAAGCACT
sus             GCCTCCACCACCCCCACCCCCACCCCCACAGCAAGTTTCCGCTAAACCTCCCCAAGCACT
gallus          TG--------------------CTCCAG---GAGCTCCTGC-AGGGTTTAAGAGGAAAG
                                     * ***          *  * *    *    * *

ovis            CTCCTTTGCCAAGCGACTGCAGCAGCTCATAGAGGTCTTGAAGGGA--AAGGCCTTTCTG
bos             CTCCTTTGCCAAGCGACTGCAGCAGCTCATAGAGGTCTTGAAGGGA--AAGACCTTTCTT
equus           TTCTTTTGCCAAGCGACTACAGCAACTCATAGAGGACTTGAAGGGG--AAGTCCTTTTCG
sus             TTCCTTTGCCAAGCGACTGCAGCAGCTCATAGAG---CTGAAGGGG--ACGGCATTCTCT
gallus          AAAGCTT---AATTAGCTGCA-TGACCCAGAGCAGGCTGCAATGCATTGCGACCCTTTTC
                     **   **    ** **    * ** **        ** *      * *  *

ovis            AACGAAAAG-AGCAGTTATGAAATGGAAACCACAGACCTTCCA-GGACGACACGCCTCCT
bos             AACGAGAAG-AGCAATTATGAAATGGAAACCACAGGCCTTCCA-GGACAACATGCCTCCT
equus           AATGCAAAG-CGCTATTATGAAATGGAGACCACAGACCTCCCA-GAAC------------
sus             AGTGGAAAGGAGCTATTATGAAACAGAGACCACAGACCTCCGAAGAACTGCCCGCCTCCT
gallus          TTTGGGG------TAATGCCCAATGGCAGCCCCAG---TACCA-AAGC---------CCT
                  *           *    **  *   ** ***   * * *    *

ovis            ---GATCTGAGCCCATTCTTGGC------GGACCCAGCGAAGCCCTCACTCCTGAGGGAA
bos             CCTGATCTGAACCCATTCTCAAC------GGACCCAGTGAAGCCCTCACTCCTGAGGGAA
equus           -------TGA--CCGCT------------------------GCC-----TCCTGA-----
sus             ---GATTTGACCTCATTTTCACCTGATTTGGACCCATTGCACACCTCATCCCTGAGAAAA
gallus          ---GCTCTGT-CCCATCC----------------------ACCCTC-CTCTTGACTGCA
                       **    *                           *      * ***

ovis            AAA--A-GACGCAATAAATGGATATAAATACAAATATAAATATATATGCACTAA------
bos             AAA--AAGATGAAATAAATGGATATAAATACAAATATAAATATATATACACTAAAAAAAA
equus           ------------------------------------------------------------
sus             AAA--AGGATGAAATAAATGACTATAAATACAAATATAAATATATATACATAAAG-----
gallus          CACCCAGGTTTACTCAGTTGG--------ACAAATA-AAGCTTATTTTCACAGCTA----

ovis            --------
bos             AAAAAAAA
equus           --------
sus             --------
gallus          --------
```

Primersequenzen:

ovis: CCCTCAAACCTCCGACCCTCCA GACACGCCTCCTGATCTGAGCC 214 bp

ovis-for: CCCTCAAACCTCCGACCCTCCA

ovis-rev: GGCTCAGATCAGGAGGCGTGTC

bos: CCCTCAAGCCCCCGGTCCTCAG AACATGCCTCCTCCTGATCTGA 214 bp

bos-for: CCCTCAAGCCCCCGGTCCTCAG

bos-rev: TCAGATCAGGAGGAGGCATGTT

sus: CCCCCTCTGTTCAGACTCCTGT TTGCACACCTCATCCCTGAGAA 366 bp

sus-for: CCCCCTCTGTTCAGACTCCTGT

sus-rev: TTCTCAGGGATGAGGTGTGCAA

equus: GACTCCCCTCTATTCAACCTATTCA CCCAGAACTGACCGCTGCCTCCTG 266 bp

equus-for: GACTCCCCTCTATTCAACCTATTCA

equus-rev: CAGGAGGCAGCGGTCAGTTCTGGG

gallus: GGGAAAGGCTGTGGGAGAATAC G------TAATGCCCAATGGCAGCCCCA 392 bp

gallus-for: GGGAAAGGCTGTGGGAGAATAC

gallus-rev: TGGGGCTGCCATTGGGCATTAC

actin-for: GGCATCACACTTTCTACAACGAGCT
actin rev: CGACGTAGCACAGCTTCTCCTTGAT

c

Zusammenfassung und Ausblick

Abschließend lässt sich sagen, dass viele der Ergebnisse nicht eindeutig waren oder fehlten, dass wir aber trotzdem dem Verfahren zur Bestimmung der DNA durch PCR und RFLP näher gekommen sind. Damit habe ich also mein Ziel, mich mit diesem Thema auseinander zu setzen erreicht. Ich hoffe, dass das Problem mit der Verbrauchertäuschung ein Ende nimmt und dass wir, wenngleich wir keine handfesten Ergebnisse haben diesem Problem etwas näher kamen. Auch kann ich nun sagen, dass die gewonnen Erkenntnisse mir in meinem weiteren Leben helfen werden und dass sie uns auch im Unterricht hoffentlich helfen werden.

Glossar

Primer

C&T&G&A

molekular Biologie

DNA

Enzyme

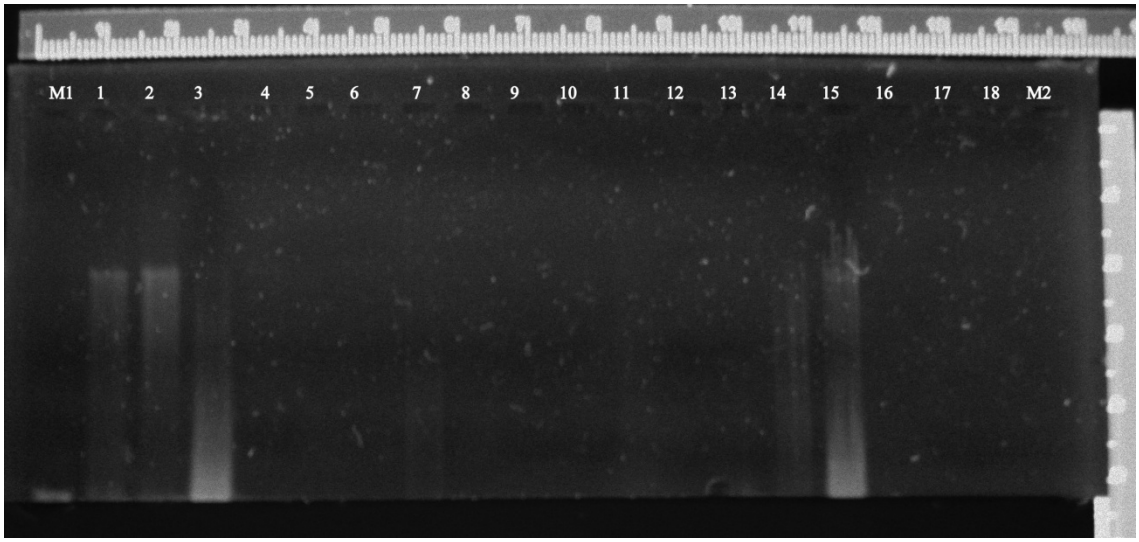
verwendete Literatur

-Grüne Reihe Materialien SII Genetik Schroedel

-Markl BIOLOGIE Oberstufe Klett

-wikipedia Die Freie Enzyklopädie

21.10



M1 Marker

1 Schwein

2 Lamm

3 Huhn

4 Pferd

5 Geflügelleberwurst

6 Rind

7 Geflügelwurst

8 Pferdefleischwurst

9 Döner

10 Pferdewurst

11 Rind (GK)

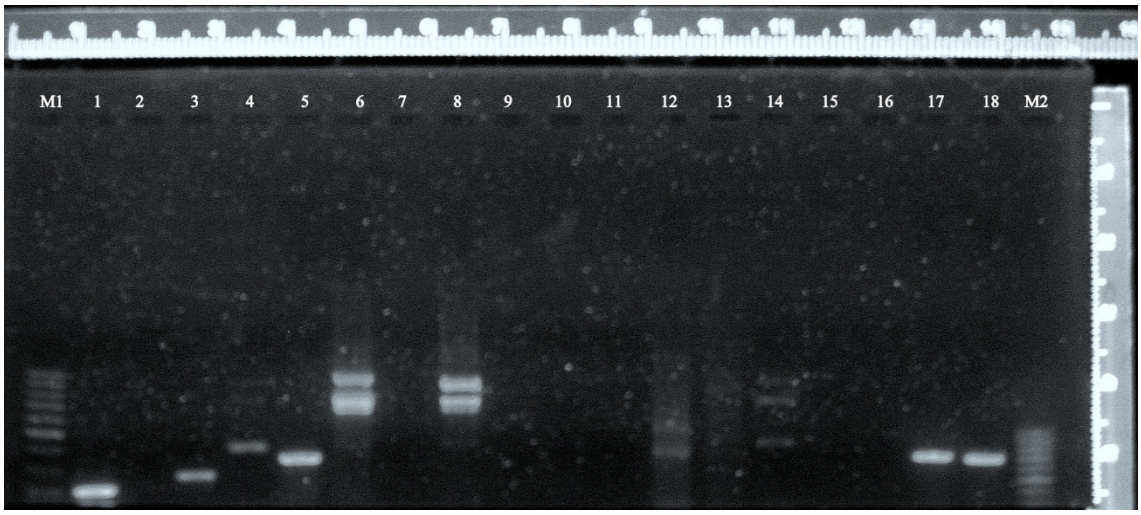
12 Schwein (GK)

13 Huhn (GK)

14 Lamm (GK)

15 Huhn (GK)

22.10



1 Marker

2 Lamm Spez Primer – DNA vorhanden

3 Lamm Actin Primer – Actin nicht vorhanden (vermutung Actin Primer haben nicht funktioniert

4 Pferd Spez Primer – DNA vorhanden

5 Pferd spez Primer – Actin vorhanden

6 Huhn spez Primer – DNA vorhanden

7 Huhn Actin Primer – Actin vorhanden

8 Schwein Spez Primer – keine DNA zu sehen

9 Schwein Actin Primer – Actin vorhanden

10 Rind Spez Primer – keine DNA zu sehen

11 Rind Actin Primer – kein Actin zu sehen

12 Geflügelwurst RFLP primer/ Tierunspezifische Primer – keine DNA zu sehen

13 Geflügelwurst Actin primer – Actin vorhanden

14 Döner RFLP Primer – DNA vorhanden

15 Döner Actin Primer – Actin vorhanden

16 Pferdewurst RFLP Primer – keine DNA zu sehen

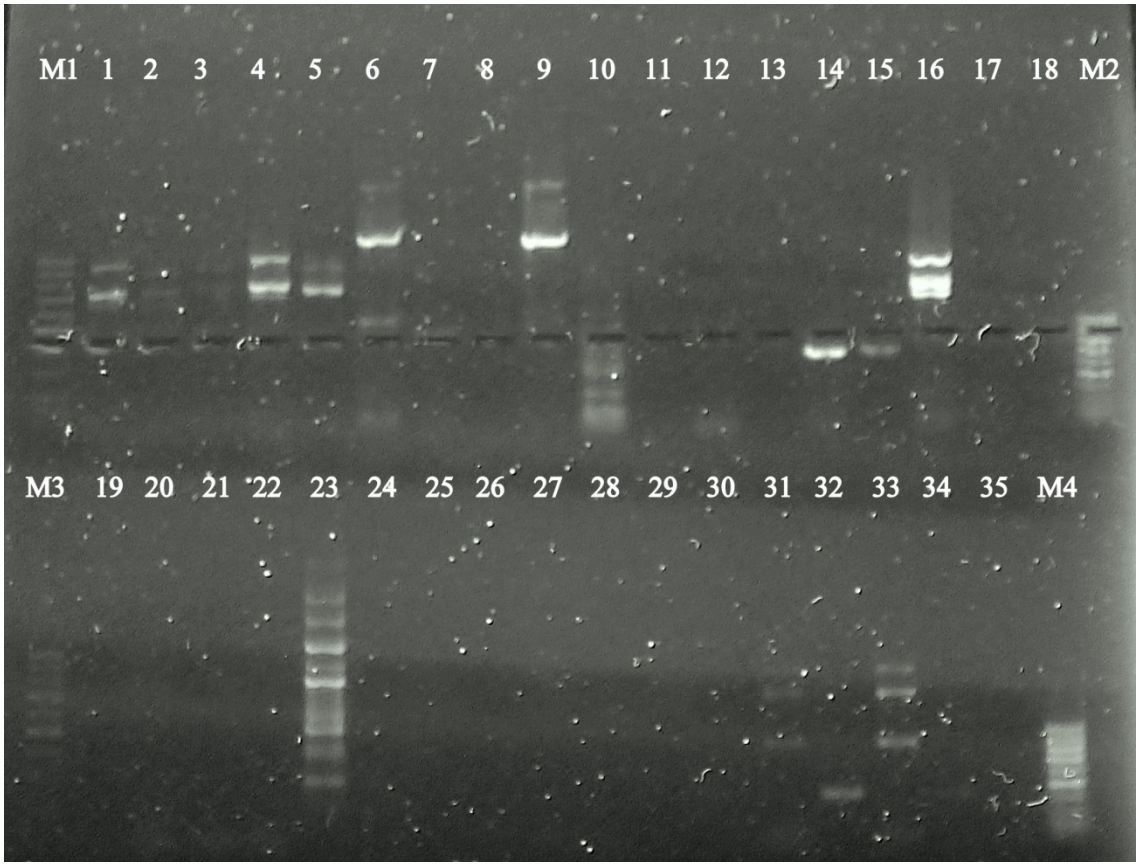
17 Pferdewurst Actin Primer – kein Actin vorhanden

18 Schaller Huhn spez, pol neu – Pol funktioniert

19 Schaller Huhn spez, pol alt - Pol funktioniert

20 Marker

23.10.



M1 Marker

1 Schaller Geflügelwurst

2 Schaller

3 Schaller

4 Schaller

5 Schaller

6 Schaller Pferdewurst

7 Schaller

8 Schaller

9 Schaller

10 Schaller

11 Döner DNA + Lamm Primer spez (Filtriert)

12 Lamm + Actin Primer (Filtriert)

13 Döner + Pferd spez (Filtriert)

14 Huhn + Huhn spez Primer (Filtriert)

15 Döner + Huhn spez Primer (Filtriert)

16 Huhn + Actin (Filtriert)

17 Schwein + Schwein spez. Primer (Filtriert)

18 Schwein + Schwein spez. Primer (Zentriert)

19 Schwein + Schwein spez Primer (Filtriert)

20 Schwein + Actin Primer (Filtriert)

21 Schwein + Actin Primer (Zentrifugiert)

22 Schwein + Actin Primer (Filtriert)

23 Rind + Rind spez Primer (Filtriert)

24 Rind + Rind spez Primer (Filtriert)

25 Rind + Rind spez Primer (Filtriert)

26 Rind + Rind spez Primer (Filtriert)

27 Rind + Rind spez Primer (Filtriert)

28 Geflügelleberwurst + RFLP Primer (Filtriert)

29 Geflügelleberwurst + Actin Primer (Filtriert)

30 Döner + Rind spez Primer (Filtriert)

31 Döner + Actin (Filtriert)

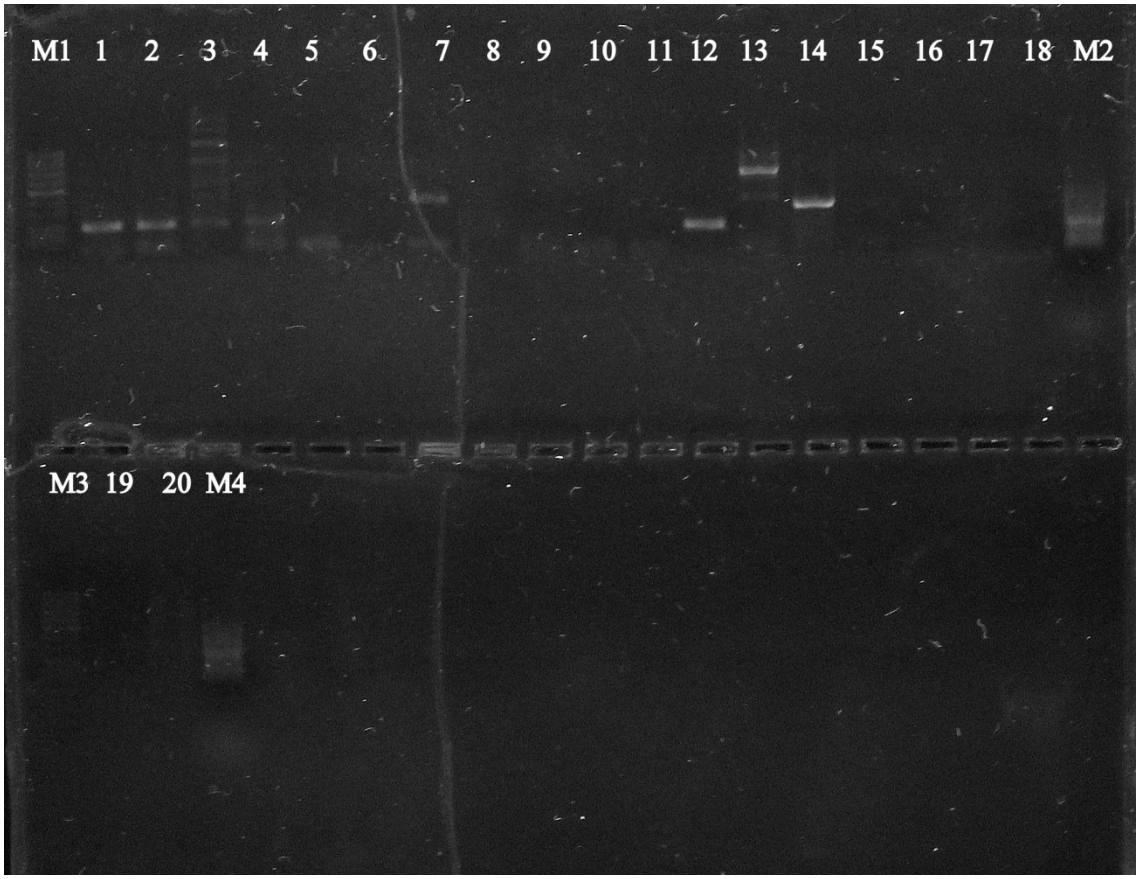
32 Döner + Rind spez. Primer (Zentriert)

33 Döner + Actin (Zentriert)

34 Döner + Rind spez. Primer (Filtriert)

35 Döner + Actin (Filtriert)

24.10.

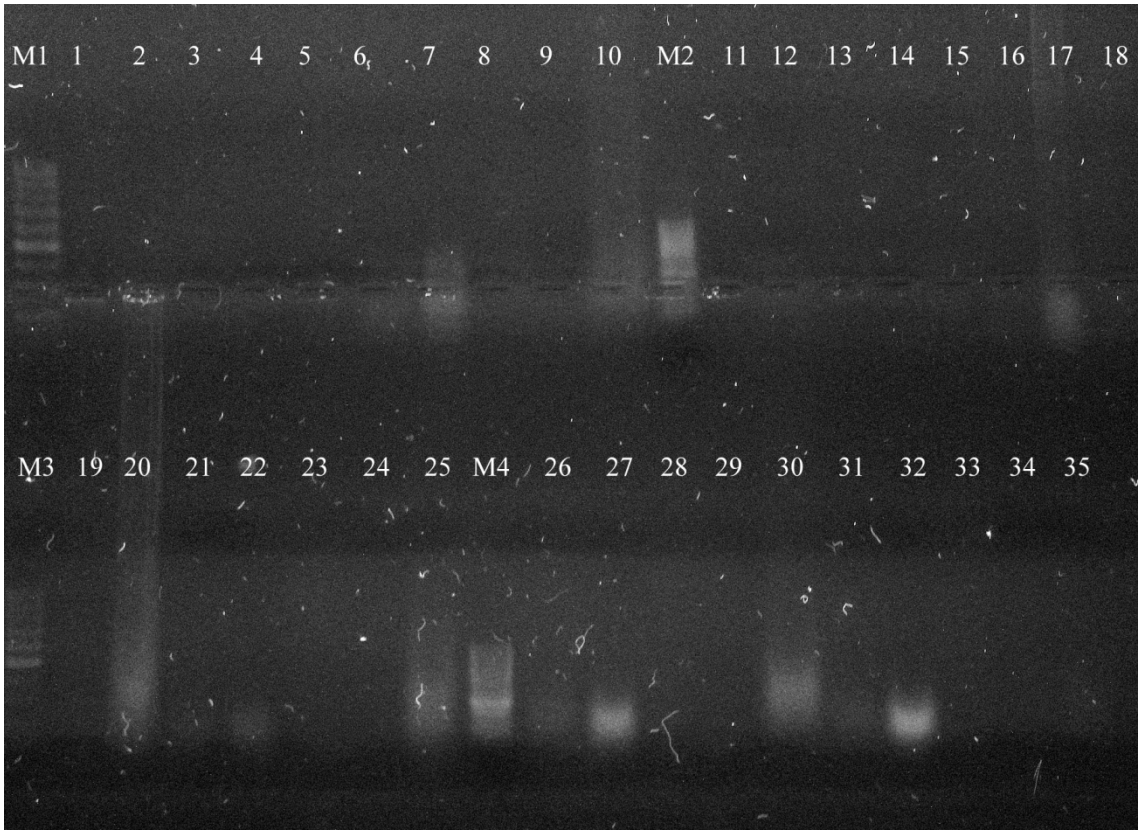


M1/M4: Marker

1. Rind zentrifugiert, spezifischer Primer
2. Rind filtriert, spezifischer Primer
3. Rind filtriert, spezifischer Primer
4. Döner mit Rindprimer
5. Döner mit Pferdeprimer
6. Pferd mit spezifischem Primer
7. Pferd mit Actinkontrolle
8. Schwein filtriert, spezifischer Primer
9. Schwein filtriert, spezifischer Primer
10. Döner mit Schweineprimer
11. Döner mit Lammprimer
12. Lamm, spezifischer Primer
13. Lamm, Actinkontrolle
14. Huhn, spezifischer Primer

15. Döner mit Huhnprimer
16. Geflügelleberwurst mit Huhnprimer
17. Geflügelleberwurst, Actinkontrolle
18. Geflügelleberwurst mit Lammprimer
19. Geflügelleberwurst mit Rindprimer
20. Geflügelleberwurst mit Schweineprimer

25.10 PCR1



M1 Marker

1 Geflügelleberwurst (NaOH-Methode) 1a

2 Geflügelleberwurst (NaOH-Methode) 1b

3 Geflügelleberwurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a

4 Geflügelleberwurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b

5 Geflügelleberwurst (TAIL extraktion)3

6 Pferdewurst (NaOH-Methode) 1a

7 Pferdewurst (NaOH-Methode) 1b

8 Pferdewurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a

9 Pferdewurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b

10 Pferdewurst (TAIL extraktion)3

M2 Marker

11 Rind (NaOH-Methode) 1a

12 Rind (NaOH-Methode) 1b

13 Rind (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a

14 Rind (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b

15 Rind (TAIL extraktion)3

16 Döner (NaOH-Methode) 1a

17 Döner (NaOH-Methode) 1b

18 Döner(Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a

M3 Marker

19 Döner (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b

20 Döner (TAIL extraktion)3

21 Pferd (NaOH-Methode) 1a

22 Pferd (NaOH-Methode) 1b

23 Pferd (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a

24 Pferd (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b

25 Pferd (TAIL extraktion)3

M4 Marker

26 Lamm (NaOH-Methode) 1a

27 Lamm (NaOH-Methode) 1b

28 Lamm (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a

29 Lamm (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b

30 Lamm (TAIL extraktion)3

31 Huhn (NaOH-Methode) 1b

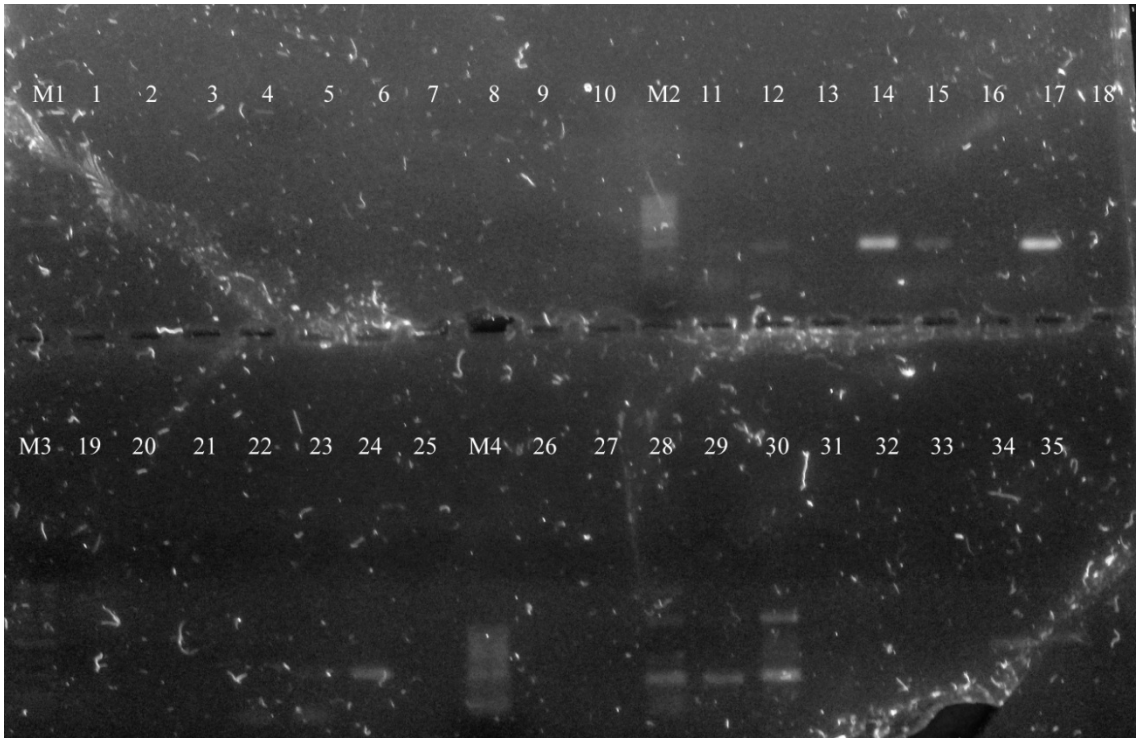
32 Huhn (NaOH-Methode) 1a

33 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a

34 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b

35 Huhn (TAIL extraktion)3

25.10. zwei



M1 Marker

1 Geflügelleberwurst (NaOH-Methode) 1a + PCR

2 Geflügelleberwurst (NaOH-Methode) 1b + PCR

3 Geflügelleberwurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR

4 Geflügelleberwurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR

5 Geflügelleberwurst (TAIL extraktion)3 + PCR

6 Pferdewurst (NaOH-Methode) 1a + PCR

7 Pferdewurst (NaOH-Methode) 1b + PCR

8 Pferdewurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR

9 Pferdewurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR

10 Pferdewurst (TAIL extraktion)3 + PCR

M2 Marker

11 Rind (NaOH-Methode) 1a + PCR

12 Rind (NaOH-Methode) 1b + PCR

13 Rind (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR

14 Rind (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR

15 Rind (TAIL extraktion)3 + PCR

16 Döner (NaOH-Methode) 1a + PCR

17 Döner (NaOH-Methode) 1b + PCR

18 Döner(Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR

M3 Marker

19 Döner (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR

20 Döner (TAIL extraktion)3 + PCR

21 Pferd (NaOH-Methode) 1a + PCR

22 Pferd (NaOH-Methode) 1b + PCR

23 Pferd (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR

24 Pferd (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR

25 Pferd (TAIL extraktion)3 + PCR

M4 Marker

26 Lamm (NaOH-Methode) 1a + PCR

27 Lamm (NaOH-Methode) 1b + PCR

28 Lamm (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR

29 Lamm (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR

30 Lamm (TAIL extraktion)3 + PCR

31 Huhn (NaOH-Methode) 1a + PCR

32 Huhn (NaOH-Methode) 1b + PCR

33 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR

34 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR

1Schwein (NaOH-Methode) 1a

2 Schwein (NaOH-Methode) 1b

3 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a

4 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b

5 Schwein (TAIL extraktion)3

6 Huhn (NaOH-Methode) 1a

7 Huhn (NaOH-Methode) 1b

8 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a

9 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b

10 Huhn (TAIL extraktion)3

11 Huhn (TAIL extraktion)3 +PCR

12 Schwein (NaOH-Methode) 1a + PCR

13 Schwein (NaOH-Methode) 1b + PCR

14 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR

15 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR

16 Schwein (TAIL extraktion)3 + PCR

17 Döner + Pferd spez Primer

18 Pferd+ Pferd spez Primer

19 Pferd + Actin

20 Döner zentrifugiert +Huhn spez. Primer

21 Döner Filtriert + Proteinase K+ Huhn spez. Primer

22 Döner Filtriert + Huhn spez. Primer

23 Döner 3 (Tail- Methode) + Huhn spez. Primer 21