

Novartis Pharma AG
Schullabor



SNP-Genotyping

Am Beispiel eines Rezeptors für den Geschmack „Bitter“

2016

Contents

Einführung	3
1. Die Fähigkeit „Bitter“ zu schmecken	3
2. Die hTAS2R38 Genetik	5
3. Genotypisierung des SNPs bei Basenpaar 886	6
4. Definitionen am Beispiel des Merkmals „blonde Haare“	8
5. Die Experimente	10
Experiment 1: Extraktion von genomischer DNA	11
Experiment 2: DNA Amplifizierung mittels PCR	12
Experiment 3: Schneiden des PCR Produkts mit dem Enzym AatII	13
Experiment 4: Analyse der Restriktionsfragmente mittels Gel Elektrophorese	14
Experiment 5: Bestimmung des PTC Phänotyps	15
6. Diskussion	15

Einführung

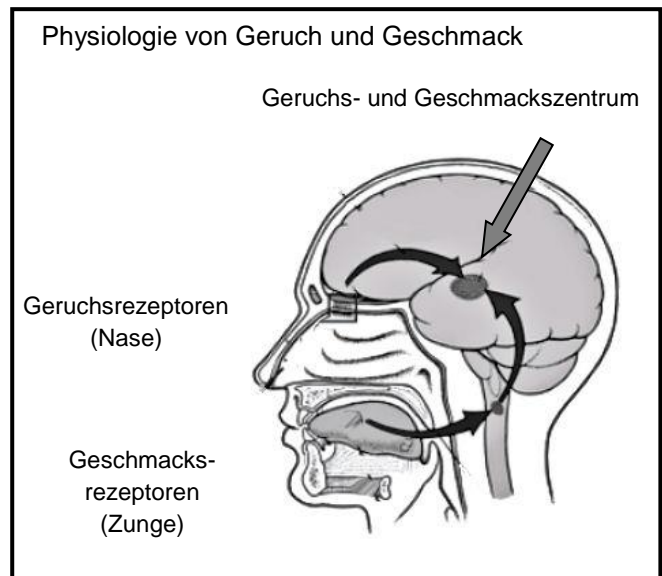
SNPs (single nucleotide polymorphisms) sind Varianten einzelner Basenpaare in verschiedenen Allelen desselben Gens.

In der biomedizinischen Forschung werden mittels SNP-Genotyping SNPs untersucht, die die Wirkung von Arzneimitteln beeinflussen. Ein SNP im genetischen Code eines Rezeptors kann bei einem Patienten bewirken, dass ein körpereigener Botenstoff nicht mehr erkannt wird. Eventuell lässt sich der Botenstoff jedoch chemisch so verändern, dass er wieder auf den mutierten Rezeptor passt. Der Patient erhält dann seinen „persönlichen“ Botenstoff als Medikament. Für den Arzt ist es dabei wichtig, den SNP-Genotyp des Patienten zu kennen, um das richtige Medikament zu geben. Man spricht dann von personalisierter Medizin.

In diesem Kurs wird die Methode des SNP-Genotypings am Beispiel des TAS2R38-Gens erprobt. Das TAS2R38-Gen kodiert für einen von ca. 25 – 30 Rezeptoren, die der Mensch hat, um den Geschmack „Bitter“ wahrzunehmen.

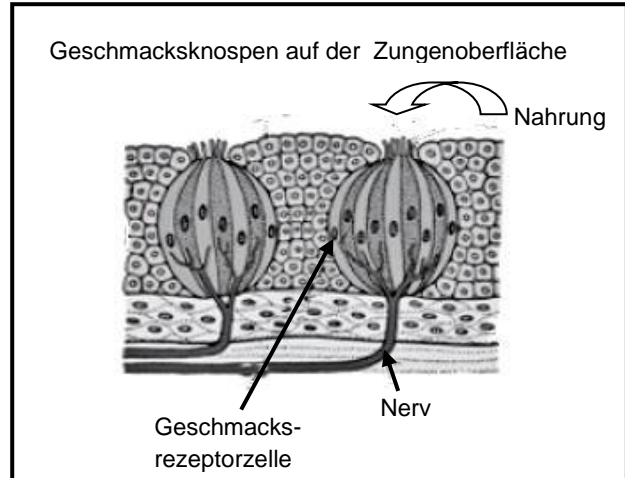
1. Die Fähigkeit „Bitter“ zu schmecken

Die Empfindung „Bitter“ gehört zu den fünf bekannten Sinneseindrücken (Süss, Sauer, Salzig, Bitter und Umami), die der Mensch mit der Zunge herauschmecken kann. Giftige und schädliche Substanzen schmecken meistens bitter. Menschen haben eine Aversion gegen bitteren Geschmack. Das Herausschmecken dieser Gifte war sicherlich ein evolutionärer Vorteil, den unsere Vorfahren uns vererbt haben. Von allen Geschmacksrichtungen ist der Geschmack für „Bitter“ am komplexesten.



Psychomedizinische Studien zeigen daher auch grosse Unterschiede in der individuellen Geschmackswahrnehmung für „Bitter“. Die Empfindung „Bitter“ ist immer dieselbe. Ob Brokkoli, Kaffee, Bittermandel, Schokolade oder Rotwein, es gibt nur eine Empfindung für deren Bitterkeit. Die Sensibilität für Bitterkeit kann jedoch von Mensch zu Mensch variieren: stärker, schwächer oder gar nicht sensibel. Verfeinert wird die Sinneswahrnehmung vor allem durch flüchtige Aromen, die von den Geruchszellen der Nase wahrgenommen werden. Im Gehirn werden Geschmack und Geruch im gleichen Zentrum verarbeitet, sodass es uns schwer fällt, beide Sinne voneinander zu trennen.

Die Geschmacksrezeptoren befinden sich auf der Zellmembran von speziellen Geschmackszellen der Zunge. Geschmackswahrnehmung findet in zwei Schritten statt. Zuerst wird ein Geschmacksmolekül an einen Rezeptortyp gebunden. Dann generiert die Geschmackszelle einen Nervenimpuls, der vom Gehirn interpretiert wird. Alle bekannten Rezeptoren für den Geschmack „Bitter“ sind Proteine, die zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören. Die Rezeptoren werden von einer so genannten Gen-Familie kodiert, d.h. auch die Rezeptorproteine sind in ihrer Struktur ähnlich, aber nicht gleich.



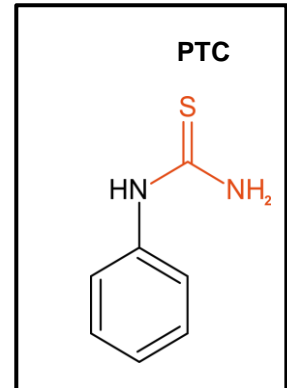
Ganz unterschiedliche chemische Substanzen, die sich in Grösse, Form und Funktion unterscheiden, können so an den für sie spezifischen Rezeptor binden. Das jeweilige Geschmacksmolekül passt als Ligand auf seinen speziellen Rezeptor wie ein Schlüssel ins Schloss. Daraufhin wird über die G-Proteine eine zelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die letztlich einen Nervenimpuls auslöst.

2. Die hTAS2R38 Genetik

Eines der ersten nachgewiesenen vererbaren Merkmale beim Menschen war die Geschmacksblindheit für Substanzen mit einer N-C=S-Gruppe, wie sie in der bitteren Chemikalie Phenylthiocarbamid (PTC) vorhanden ist. PTC schmecken zu können ist ein Merkmal, das sich nach Vorgabe der klassischen Vererbungslehre verhält, d.h. einem dominant-rezessiven Erbgang entspricht.

Personen, die PTC nicht schmecken (non-taster) haben zwei rezessive Allele (tt). Personen, die PTC schmecken können (taster) haben zumindest ein dominantes Allel (T). Die weltweite Verteilung des Merkmals haben Populationsgenetiker untersucht und herausgefunden, dass

nur 3% der Menschen in West Afrika, aber 40% der Inder für PTC geschmacksblind sind. In Europa können etwa 25% der Bevölkerung PTC nicht schmecken.



Das menschliche Gen für den PTC-empfindlichen Rezeptor ist bekannt und wird als hTAS2R38 (h steht für „human“) bezeichnet. Fast identische Gene wurden auch bei unseren nächsten Verwandten, den Primaten, gefunden. Das Gen hTAS2R38 befindet sich auf Chromosom 7, Locus q34. Das einzige kodierende Exon ist 1002 Basenpaare lang. Es wurden drei SNP's identifiziert, die offenbar gemeinsam vererbt werden, und bei der Geschmackswahrnehmung eine Rolle spielen. Diese Mutationen sind bei Basenpaar 145 wo das Nukleotid C gegen G (C→G) ausgetauscht wurde, bei Basenpaar 785 (C→T) sowie bei Basenpaar 886 (G→A) festgestellt worden. Durch den Basenaustausch ändert sich an allen drei Stellen das Codon für eine Aminosäure. Die Aminosäurekette wird dabei so verändert, dass als 49ste Aminosäure statt Prolin nun Alanin eingebaut wird (P49A) und an den beiden anderen Stellen A262V und V296I. Die hier jeweils zuerst genannte Aminosäure scheint die ursprüngliche Variante zu sein, PAV, während AVI die spätere – mutierte - Version darstellt. In der DNA von Schimpansen und Gorillas konnte nur der PAV/PAV-Genotyp gefunden werden.

Der PAV Haplotyp assoziiert mit dem Phänotypen „tasting“ (T), während AVI mit „non-tasting“ (t) einher geht. Theoretisch sind sieben Varianten zum PAV Haplotyp möglich, allerdings finden sich beim Menschen fast nur die Varianten PAV oder AVI. Homozygot AVI/AVI Genotypen sind „non-tasters“. Heterozygot AVI/PAV Genotypen sind „tasters“ und PAV/PAV homozygote Genotypen sind „tasters“

Tabelle: Zusammenhang Phänotyp–Genotyp–SNPs–RFLP für das Gen hTAS2R38

Phänotyp	Schmecker (taster)	Schmecker (taster)	Nicht-Schmecker (non-taster)
Genotyp	TT (homozygot)	Tt (heterozygot)	tt (homozygot)
Aminosäuren codiert durch die SNP-Region für beide Allele	PAV / PAV	PAV / AVI	AVI / AVI
RFLP: Fragments V/I	92 bp, 48 bp, da AatII-Schnittstelle vorhanden ist	140 bp 92 bp + 48 bp	140 bp wird nicht geschnitten

3. Genotypisierung des SNPs bei Basenpaar 886

Da die drei SNPs im hTAS2R38 Gen assoziiert sind, reicht für eine Genotypisierung die Untersuchung eines SNPs aus.

Durch eine Punktmutation (G→A) bei Basenpaar 886 im hTAS2R38 Exon wird ein Aminosäure Codon erzeugt, das statt Valin nun für Isoleucin codiert. Auf dem exprimierten Rezeptorprotein ist die 296. Aminosäure ausgetauscht. Die Schreibweise ist V296I.

Erste elektronische Strukturanalysen lassen vermuten, dass dieser Austausch die Signalübertragung des Rezeptors an die G-Proteine in der Zelle beeinträchtigt. Die G-Proteine wiederum vermitteln das Signal an die Nervenzellen. Ist die Signalübertragung an die Nerven unterbrochen, kann keine Wahrnehmung erfolgen und „Bitter“ wird nicht geschmeckt.

Eine Region von 140 Basenpaaren um das Basenpaar 886 im TAS2R38 Gen wird mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Der Primer, der der Sequenz in Leserichtung entspricht, ist der Forward Primer. Der andere, zum oberen Strang komplementäre Primer ist entgegen der Leserichtung gerichtet und wird als Reverse Primer bezeichnet. Die DNA-Polymerase hängt die neuen Nukleotide am 3' Ende der Primer an.

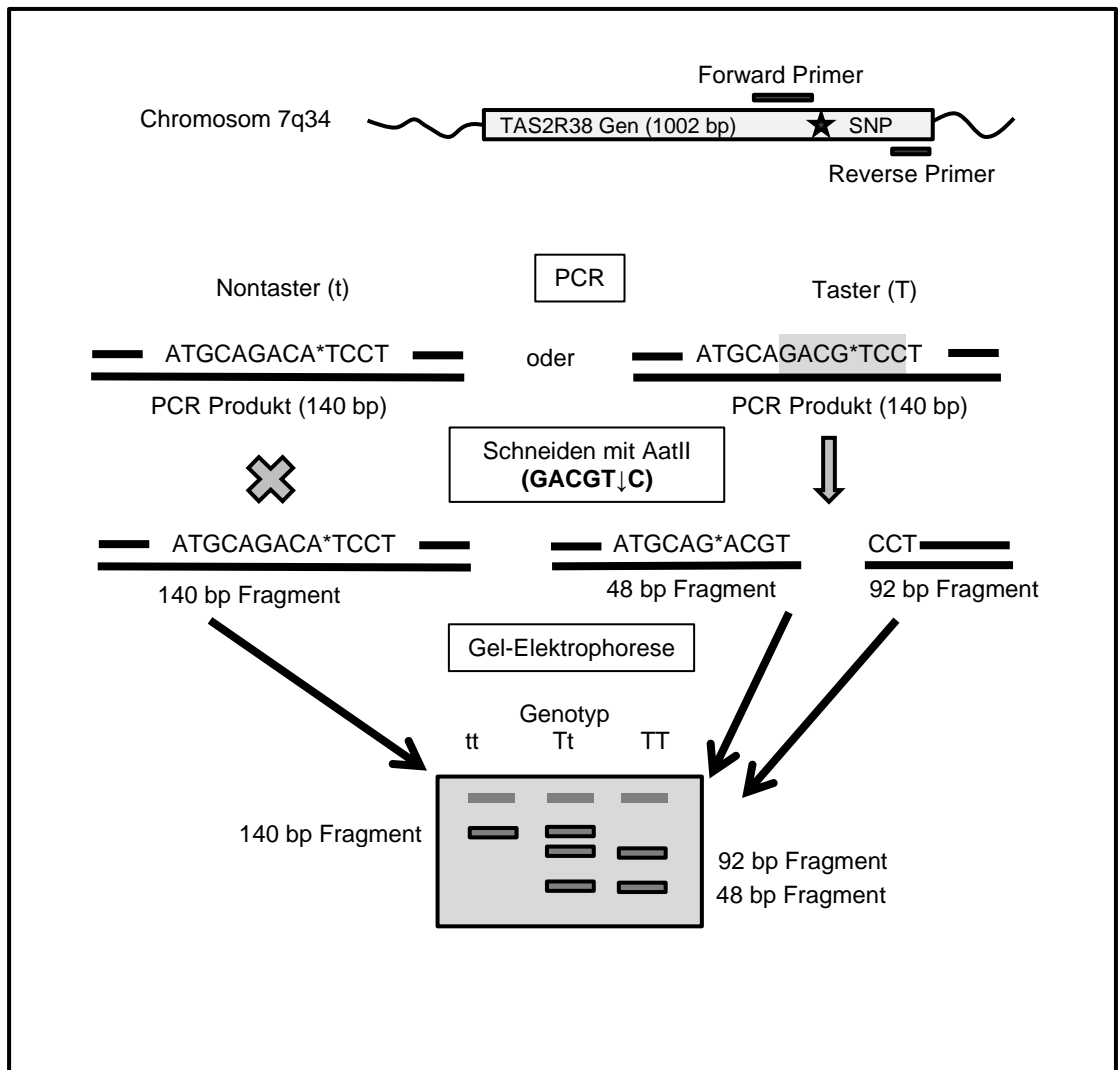
Eine Base im Forward Primer ist gegenüber der richtigen komplementären Sequenz verändert (markiert mit*). Man erhält dadurch genau bei Basenpaar 886 eine Schnittstelle des Restriktionsenzym AatII. Das amplifizierte PCR Produkt für den PAV Haplotyp kann mit dem Restriktionsenzym AatII geschnitten werden, sodass zwei Fragmente entstehen. Das PCR Produkt des AVI Haplotyps dagegen hat keine AatII Erkennungsstelle und wird nicht geschnitten.

hTAS2R38 codierende Region

```
5'
ATGTTGACTCTAACTCGCATCCGCACTGTGTCCATGAAGTCAGGAGTACATTTCTGTTTCATTCAGTCCTGGAG
TTTGCAGTGGGGTTTCTGACCAATGCCTTCGTTTTCTGGTGAATTTTGGGATGTAGTGAAGAGGCAG(C→G)C
ACTGAGCAACAGTGATTGTGTGCTGCTGTGTCTCAGCATCAGCCGGCTTTTCTGCATGGACTGCTGTTCTCTGA
GTGCTATCCAGCTTACCCACTTCCAGAAGTTGAGTGAACCACTGAACCACAGCTACCAAGCCATCATCATGCTAT
GGATGATTGCAAACCAAGCCAACCTCTGGCTTGCTGCCTCAGCCTGCTTACTGCTCCAAGCTCATCCGTT
TCTCTCACACCTTCTGATCTGCTTGCAAGCTGGGTCTCCAGGAAGATCTCCAGATGCTCCTGGGTATTATTC
TTTGCTCCTGCATCTGCACTGTCTCTGTGTTTGGTGTCTTTTAGCAGACCTCACTTCACAGTCACAACCTGTGCT
ATTCATGAATAACAATACAAGGCTCAACTGGCAGATTAAGATCTCAATTTATTTTATTCTTTCTCTTCTGCTATC
TGTGGTCTGTGCCTCCTTCTATTGTTTCTGGTTCTTCTGGGATGCTGACTGTCTCCCTGGGAAGGCACATGA
GGACAATGAAGGTCTATACCAGAACTCTCGTGACCCAGCCTGGAGGCCACATTAAAGCCCTCAAGTCTCTT
GTCTCCTTTTTCTGCTTCTTTGTGATATCATCTGTG(C→T)TGCCTTCATCTCTGTGCCCTACTGATTCTGTGGC
GCGACAAAATAGGGGTGATGGTTGTGTTGGGATAATGGCAGCTTGTCCCTCTGGGCATGCAGC*(G→A)TCC
TGATCTCAGGCAATGCCAAGTTGAGGAGAGCTGTGATGACCATTCTGCTCTGGGCTCAGAGCAGCCTGAAGGTA
AGAGCCGACCACAAGGCAGATTCCCGGACACTGTGCTGA 3'
```

Primer sind fett gedruckt, SNPs sind grau unterlegt

Bei der Genotyp-Variante AVI/AVI besitzen alle PCR-Produkte keine AatII-Erkennungsstelle und sind nach der Inkubation mit dem Restriktionsenzym unverändert 140 bp lang. Anders beim Genotyp PAV/PAV. Hier werden sämtliche PCR-Produkte durch das Enzym in zwei Fragmente der Grösse 48 bp und 92 bp geschnitten. Bei der heterozygoten Variante PAV/AVI erhält man sowohl die geschnittenen Fragmente (48 bp, 92 bp), als auch das ganze PCR Produkt mit 140 bp.



Schema: PCR des Gen-Abschnitts mit anschliessender RFLP Analyse

4. Definitionen am Beispiel des Merkmals „blonde Haare“

Zur Information: Das Merkmal „blonde Haare“ wird gegenüber braunem Haar rezessiv vererbt

Allel: Ein Allel ist eine individuelle Variante eines Gens, z. B. Menschen mit zwei Allelen für blondes Haar sind blond. Eine Person mit einem oder mehr Allelen für dunkles Haar ist braunhaarig. Dominante Allele werden mit Grossbuchstaben bezeichnet (B = Allel für braune Haare) und rezessive Allele werden mit Kleinbuchstaben bezeichnet (b= Allel für blonde Haare).

DNA-Polymorphismen: Stellen, an denen die Nukleotidsequenz nicht bei allen Angehörigen einer Population genau gleich ist. Sie sind Grundlage des Genotypings, bei dem verschiedene Methoden angewandt werden können. Zu diesen Methoden gehören die Untersuchung der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs), von kurzen Sequenzwiederholungen (STRs, short tandem repeats) und der Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs). Diese Polymorphismen kommen sowohl in Genen als auch in den intergenen Abschnitten vor.

DNA Template: Das ist in diesem Kurs Ihre eigene genomische DNA. Sonst ist das Template die DNA Probe, die die gewünschte (Target) Sequenz enthält. Am Anfang der PCR wird in einem extra Schritt bei 94°C die genomische DNA aus dem Chromatinverband gelöst und in einzelsträngige DNA geteilt.

Gel-Elektrophorese: Gel-Elektrophorese ist eine Standardmethode, um biologische Makromoleküle (Proteine, DNA) nach Grösse zu trennen. Dabei dient das Gel als Sieb für die aufzutrennenden Moleküle. Elektrophorese ist die Wanderung eines geladenen Partikels in einem elektrischen Feld. DNA Gel-Elektrophorese ist die analytische Anwendung nach Methoden wie RFLP, PCR oder DNA Sequenzierung.

Genotyp: Als Genotyp wird die Kombination von Allelen eines Individuums bezeichnet. Eine blonde Person hat den Genotypen „bb“, d.h. zwei Allele für „blond“.

Phänotyp: Der Phänotyp bezeichnet die Erscheinungsform des Genotyps. Eine Person mit dem Genotyp „Bb“ hat als Phänotyp braune Haare. Das dominante Allel bestimmt den Phänotyp.

Haplotyp: Ein Haplotyp beschreibt nur eine Variante eines Chromosomenpaares, d.h. B oder b. Eizellen und Spermien haben einen haploiden Chromosomensatz.

Ligand: In der Biologie ein Signalmolekül, das von einem Rezeptor gebunden werden kann. Der Rezeptor-Ligand-Komplex entspricht dem Schlüssel-Schloss Prinzip.

Klassische Vererbung/ Genetik (nach Mendel): Sie basiert auf zwei Prinzipien. Das erste Prinzip besagt, dass von jedem Elternteil ein Allel stammt. Ein Individuum besitzt somit immer zwei Allele (diploid). Das zweite Prinzip beschreibt das Verhältnis der Allele zueinander. Hat jemand zwei gleiche Allele (homozygot) für ein Merkmal, wird dieses Merkmal gezeigt. Sind die Allele in einem Individuum unterschiedlich (heterozygot), kommt es darauf an, welches die dominante Variante ist. Der Phänotyp ist dann der der dominanten Variante. Der Phänotyp der rezessiven Variante zeigt sich nicht. So sind zum Beispiel Menschen mit den Allelen Bb oder BB braunhaarig, Menschen mit den Allelen bb blond.

Master Mix: enthält die folgenden für die PCR wichtigen Bestandteile

A) DNA Polymerase (Taq-Polymerase) – ein Enzym, das komplementär zur Target Sequenz neue DNA Stränge synthetisiert.

B) Nukleotide (dNTPs oder Deoxynukleotidtriphosphate) – die Bausteine für den neuen DNA-Strang.

C) Den für die Reaktion optimalen Puffer (Salze, pH und Mg²⁺ Ionen)..

PCR: Polymerase Chain Reaction oder Polymerasekettenreaktion ist eine Methode DNA zu vervielfältigen, d.h. zu amplifizieren. Eine hitzestabile DNA Polymerase (Taq-Polymerase) synthetisiert den neuen DNA Strang komplementär zu dem vorgelegten Template Strang. Da die DNA Polymerase die neuen Nukleotide nur an eine bereits existierende 3'-OH anknüpfen kann, muss am Template Strang ein Primer den Anfang des neu synthetisierten Stranges bestimmen. Somit kann der Forscher über die Primer genau den Abschnitt der DNA definieren, der amplifiziert werden soll.

Primers: Einzelsträngige DNA-Stücke mit etwa 20 Nukleotiden werden dazu genutzt, in der PCR auf beiden DNA-Strängen die Startpositionen der Polymerase festzulegen. Da die Polymerase nur vom 3' Ende her synthetisieren kann, werden für die Amplifizierung des Doppelstrangs zwei Primer benötigt.

Restriktionsenzym (Restriktionsendonuklease): Aus Bakterien gewonnenes Enzym, das eine ganz bestimmte Nukleotidsequenz in der DNA erkennen und die DNA an dieser Stelle schneiden kann..

Rezeptor: Molekularbiologisch ein Protein, an das Liganden binden. Dadurch werden in der Zelle Signalprozesse in Gang gesetzt. G-Protein gekoppelte Rezeptoren befinden sich in der Regel in der Zellmembran und dienen dazu Signale von aussen in das Innere der Zelle weiter zu leiten.

RFLP: Restriktions Fragment Längen Polymorphismus liegt vor, wenn DNA sich in einer oder mehreren Erkennungsstellen eines Restriktionsenzym unterscheidet. Das Enzym schneidet nur die perfekten Erkennungsstellen und damit entstehen bei den untersuchten DNA Varianten geschnittene und ungeschnittene Fragmente unterschiedlicher Länge.

SNP: Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs, ausgesprochen "snips") sind Varianten einzelner Basenpaare an einer bestimmten Stelle in der DNA Sequenz. So unterscheiden sich zum Beispiel homologe Chromosomen verschiedener Menschen an dieser Stelle in nur einem einzigen Nukleotid – A, T, C oder G.

Referenzen:

Kim UK, Jorgenson E, Coon H, Leppert M, Risch N, Drayna D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. Science 2003;299: 1221-1225

Kim UK, Drayna D. Genetics of individual differences in bitter taste perception: lessons from the PTC gene. Clin Genet 2004;67:275-280

Biarnes X, Marchiori A., Giorgetti A, Lanzara C, Gasparini P, Carloni P, Born S, Brockhoff A, Behrens M, Meyerhof W Insights into the binding of phenylthiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor. Plos one 2010;5:8:e12394

5. Die Experimente

Das Ausgangsmaterial für die in diesem Kurs durchgeführten Experimente sind menschliche Mundschleimhautzellen. Sie werden geerntet, indem der Mund mit Kochsalzlösung ausgespült wird. Die DNA der Mundschleimhautzellen wird durch Erhitzen im Beisein von InstaGene Matrix extrahiert. Die InstaGene Matrix bindet kontaminierende Magnesiumionen und trägt so zur Stabilität der DNA bei.

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wird eine kurze Sequenz innerhalb des TAS2R38 Gens amplifiziert. Das amplifizierte PCR Produkt wird mit dem Restriktionsenzym AatII geschnitten. Die Erkennungsstelle dieses Enzyms ist genau im Bereich eines SNPs. Eine Allelvariante wird vom Enzym erkannt und geschnitten, die andere Variante nicht. Dieser Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) kann durch Auftrennung mittels Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden.

Jeder Kursteilnehmer und jede Kursteilnehmerin analysiert den eigenen Genotypen, trifft eine Vorhersage der eigenen Geschmackswahrnehmung für bestimmte Bitterstoffe und kann den eigenen Phänotypen mit einem PTC-Teststreifen überprüfen.

Das Ergebnis der ganzen Gruppe zeigt, wie gut der theoretische Ansatz der klassischen Vererbungslehre mit dem PTC-Geschmackssinn einhergeht. Beispielhaft kann so das moderne Konzept der individualisierten Medizin (Pharmakogenetik) veranschaulicht werden. Der individuelle SNP-Genotyp beeinflusst den Wirkmechanismus von Medikamenten. Die Kenntnisse über SNP- Genotypen können dem Arzt helfen, die massgeschneiderte Therapie für den Patienten zu finden.

Experiment 1: Extraktion von genomischer DNA

Verwenden Sie für jeden Pipettiervorgang eine frische Spitze!

1. Beschriften Sie ein 2ml-Röhrchen mit Ihren Initialen.
2. Beschriften Sie einen der Plastikbecher, der 3 ml isotone Kochsalzlösung enthält, mit Ihren Initialen. Spülen Sie 30 Sekunden lang Ihren Mund mit isotoner Kochsalzlösung. Spucken Sie die Kochsalzlösung zurück in den Plastikbecher.
3. Schwenken Sie die Lösung mit Ihren Zellen leicht und pipettieren Sie dann 2000 μ l davon in das 2ml-Röhrchen.
4. Zentrifugieren Sie das gefüllte 2ml-Röhrchen für 90 Sekunden. Achten Sie darauf, dass die Zentrifuge ausbalanciert ist.
5. Im Pellet sind Ihre Mundschleimhautzellen. Entleeren Sie den flüssigen Inhalt vorsichtig in den Plastikbecher. Dabei bleibt ein kleiner Rest der Flüssigkeit mit dem Zellpellet im Röhrchen.
6. Mischen Sie das Pellet mit der restlichen Flüssigkeit auf dem Vortex-Mischer.
7. Beschriften Sie ein gelbes Röhrchen mit Ihren Initialen.
8. Schütteln Sie anschliessend die InstaGene Matrix (steht im Eis) mit dem Vortex-Mischer und pipettieren Sie 100 μ l davon in das gelbe Röhrchen.
9. Nehmen Sie 30 μ l von der Zellsuspension aus dem 2ml-Röhrchen ab und geben Sie diese in das gelbe Röhrchen mit der InstaGene Matrix. Das 2ml-Röhrchen kann dann entsorgt werden.
10. Mischen Sie die InstaGene Matrix mit Ihren Zellen 5 Sekunden auf dem Vortex-Mischer.
11. Inkubieren Sie das geschlossene gelbe Röhrchen 10 Minuten lang bei 95°C im Thermoblock.
12. Entnehmen Sie das Röhrchen und schütteln es noch einmal durch, danach zentrifugieren Sie das Röhrchen während 90 Sekunden.
13. Beschriften Sie ein neues, diesmal weisses, Röhrchen, mit Ihren Initialen.
14. Pipettieren Sie 30 μ l des Überstands vom gelben Röhrchen in das neue Röhrchen. Achten Sie darauf, dass Sie dabei keine Zellreste und Matrix übertragen.
15. Dies ist die Probe mit Ihrer genomischen DNA, die Sie in Experiment 2 verwenden.
16. Stellen Sie die Probe auf Eis bis Sie mit Experiment 2 fortfahren.

Experiment 2: DNA Amplifizierung mittels PCR

1. Beschriften Sie ein PCR-Röhrchen und einen Adaptor mit Ihren Initialen und stellen Sie anschliessend das PCR-Röhrchen in den Adaptor.
2. Pipettieren Sie die Komponenten in folgender Reihenfolge in das PCR-Röhrchen. Nehmen Sie für jede Komponente eine neue Spitze! Pipettieren Sie sorgfältig und möglichst auf den Boden des Röhrchens.

Forward Primer	7 μ L
Reverse Primer	7 μ L
Ihre genomische DNA (Exp.1)	6 μ L
Master Mix	20 μ L

3. Zentrifugieren Sie das PCR-Röhrchen mit dem Adaptor 30 Sekunden bei 6.000 rpm, damit sich alle Bestandteile unten im Röhrchen sammeln. Im Master Mix ist unter anderem Taq-Polymerase enthalten.

Taq-Polymerase ist sehr wärmeempfindlich, solange das Substrat noch nicht gebunden ist. Deshalb sollten Sie sofort weiterarbeiten. Lagern Sie Ihre Probe gegebenenfalls auf Eis.

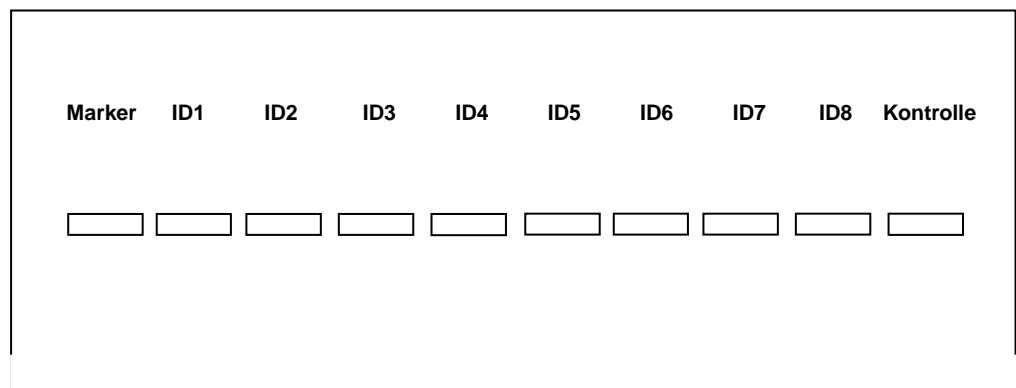
4. Stellen Sie das PCR-Röhrchen erst in die PCR-Apparatur, wenn die anderen Kursteilnehmer auch soweit sind. Wenn alle Proben in der Apparatur stehen wird diese gestartet (35 Zyklen mit 94°C, 64°C und 72°C). Die Einstellungen nimmt die Kursleitung vor.
5. Die Reaktion benötigt ca. 90 Minuten. Danach nehmen Sie Ihre Probe und beginnen mit Experiment 3.

Experiment 3: Schneiden des PCR Produkts mit dem Enzym AatII

1. Beschriften Sie ein grünes Röhrchen mit Ihren Initialen.
2. Nehmen Sie eine Pipette mit neuer Spitze und pipettieren Sie 15 µl Ihres PCR Produkts in das grüne Röhrchen.
3. Lassen Sie sich das Restriktionsenzym von der Kursleitung geben.
4. Um alle Reagenzien am Boden des Röhrchens zu sammeln, zentrifugieren Sie das Röhrchen für 15 Sekunden.
5. Inkubieren Sie Ihre Probe im Heizblock für 40 Minuten bei 37°C.
6. Starten Sie mit Experiment 4.

Experiment 4: Analyse der Restriktionsfragmente mittels Gel Elektrophorese

1. Um alle Reagenzien nach der Inkubation wieder am Boden des Röhrchens zu sammeln, zentrifugieren Sie das grüne Röhrchen für 15 Sekunden.
2. Geben Sie 3 µl Ladepuffer in das Röhrchen.
3. Überlegen Sie in der Gruppe welche Kontrollen Sie auftragen. Für die Kontrollen setzen Sie 10 µl Probe und 2 µl Ladepuffer ein. Nehmen Sie sich dafür neue Röhrchen.
4. Bestimmen Sie mit den anderen Teilnehmern die Reihenfolge Ihrer Proben und Kontrollen im Agarosegel. Tragen Sie die Positionen mit Ihren ID's in das Schema unten ein.



5. Die Kursleitung gibt die Marker DNA in die erste Tasche. Dann pipettieren Sie 15 µl Ihrer eigenen Probe mit Ladepuffer in Ihre Tasche des Agarosegels (grünes Röhrchen).
6. Pipettieren Sie 10 µl einer der Kontroll-Proben in die letzten Taschen des Agarosegels.
7. Die Kursleitung stellt die Gel-Elektrophorese an. Das Gel enthält einen Fluoreszenzfarbstoff, sodass das Gel nach dem Lauf direkt ausgewertet werden kann.
8. Sehen Sie sich das Resultat auf dem Gel an. Bestimmen Sie Ihren Genotyp!

Experiment 5: Bestimmung des PTC Phänotyps

Achtung:

PTC ist giftig. In Ratten, den empfindlichsten von allen getesteten Tieren, liegt die orale LD50 (letale Dosis, d.h. die Menge einer Substanz, die benötigt wird, um 50% der Tiere damit zu töten) bei 3 mg/kg. PTC ist für ‚Taster‘ so bitter, dass minimalste Mengen wahrgenommen werden. Ein Teststreifen enthält ca. 0,03 mg PTC und die Menge, die eine Person beim Ablecken erreicht, ist nur ein Bruchteil davon. Es gibt keinen Bericht von Vergiftungen bei diesem genetischen Test, der inzwischen bei Millionen von Personen weltweit durchgeführt wurde

Es ist Ihnen daher freigestellt, dieses Experiment zu machen!

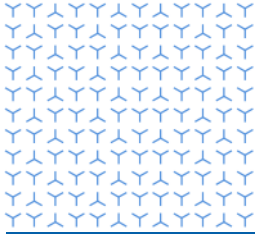
A) Legen Sie einen Streifen des PTC Papiers 3 Sekunden lang auf die Mitte der Zunge. Warten Sie kurz. Wie würden Sie nun den Geschmack des Papiers bezeichnen: Sehr bitter, bitter oder nur nach Papier schmeckend?

B) Wenn Sie Brokkoli, Kaffee ohne Zucker, herbe Schokolade nicht mögen, sind Sie vielleicht ein „Taster“ oder ein „Nontaster“, wenn Sie das sehr gern essen.

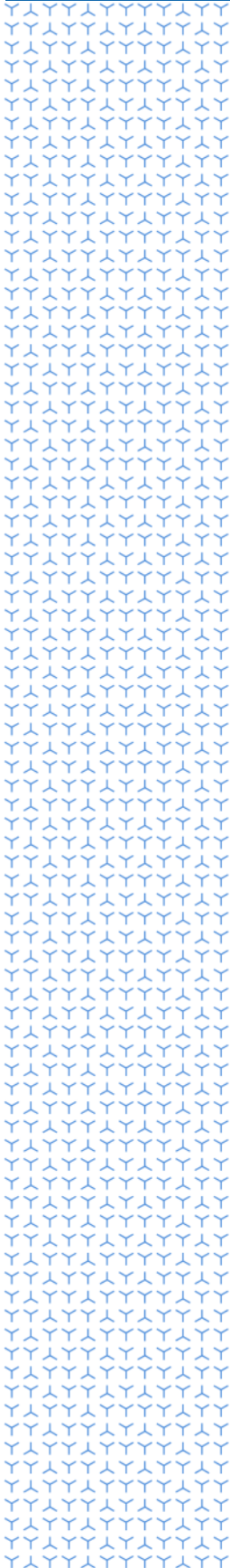
6. Diskussion

1. Stellen Sie eine Hypothese für die Korrelation von Genotyp und Phänotyp auf. Kreuzen Sie entsprechend Ihrer Überlegungen die Boxen im Diagramm an.
2. Korrelieren Sie Ihren Genotyp mit Ihrem Phänotyp. Wie gut passt das Ergebnis zu Ihrer Hypothese?
3. Wählen Sie einen Studienleiter oder eine Studienleiterin, der oder die per Strichliste das Resultat der Klasse (Population) sammelt. Wie gut stimmt dieses Ergebnis mit einem klassischen dominant-rezessiven Erbgang nach Mendel überein?

Genotyp	Phänotyp		
	Starker Taster	Taster	Nontaster
TT (homozygot)			
Tt (heterozygot)			
tt (homozygot)			



**Novartis Pharma AG
Schullabor**



Herausgeber

Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel

Kontaktadresse:

Novartis Pharma AG

Dr. Gesche Standke
Dr. Christiane Röckl Michel
WKL-122.2.26A
Postfach
CH-4002 Basel

Tel. 061/696 13 72

E-Mail: kontakt.schullabor@novartis.com
Internet: www.novartis.ch/schullabor