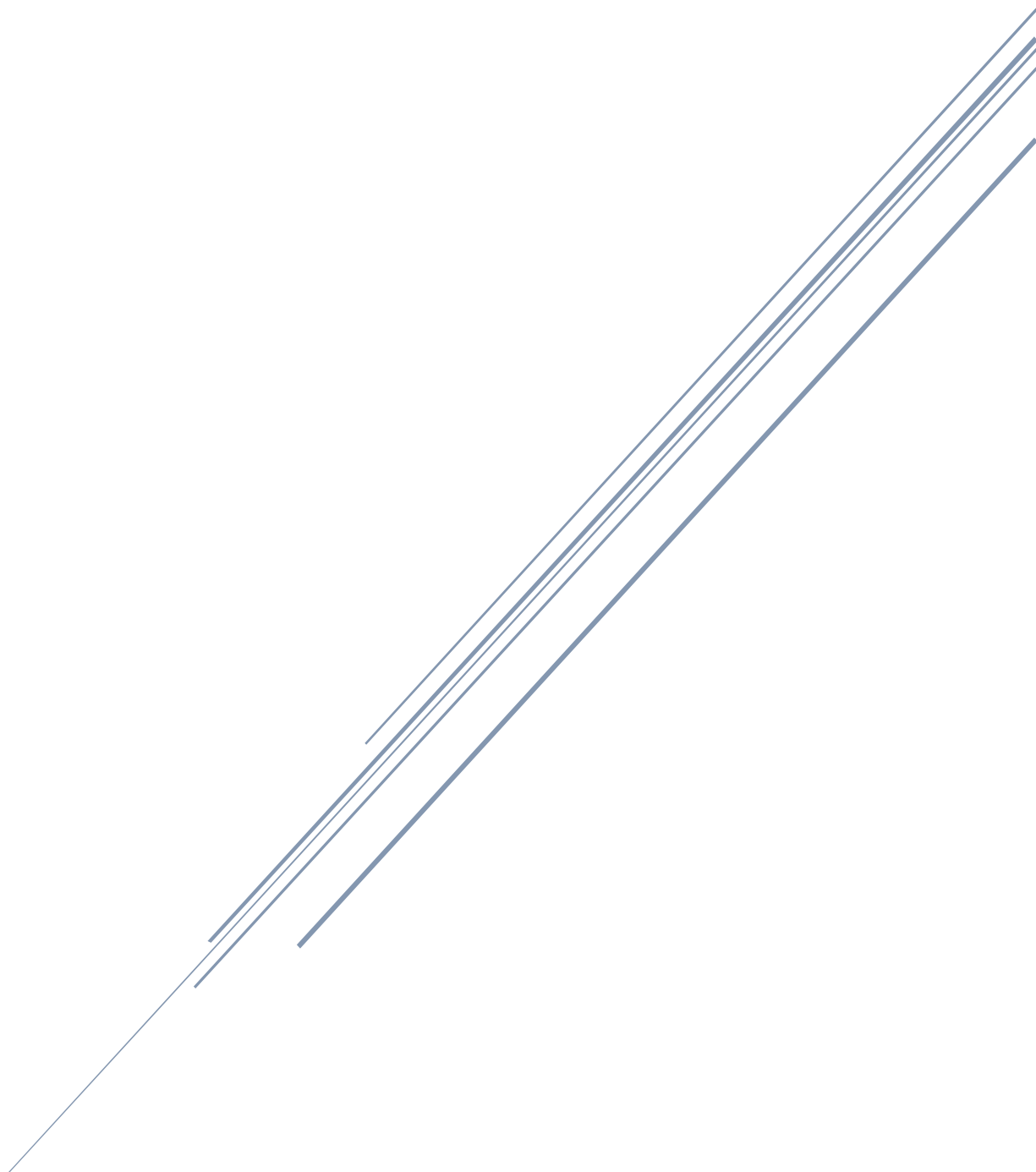


Handbuch (Lehrer)



Auf einen Blick

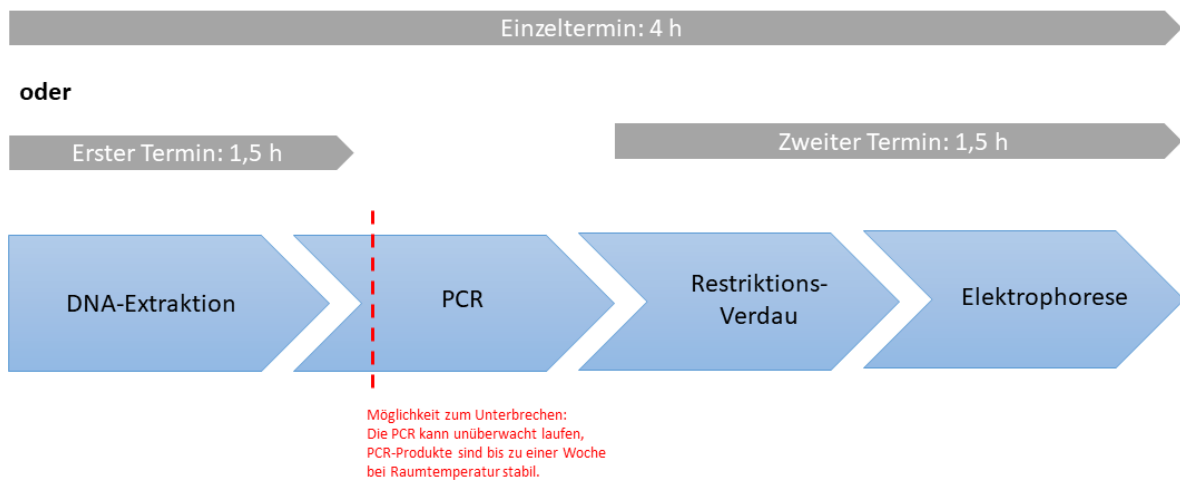
Schüler und Schülerinnen können ihre Fähigkeit, **PhenylThioCarbamid (PTC)** zu schmecken mittels molekularbiologischer Methoden überprüfen und so ihren Genotyp zum Phänotyp korrelieren.

Was wird gemacht?	Welche Themen werden behandelt?	Altersempfehlung
Pipettieren	Genotyp/Phenotyp	Oberstufe
DNA Extraktion	Vererbungslehre	Gymnasium
PCR	Biotechnologie	Leistungskurs
Restriktionsverdau	Biochemie	Universität
Gelelektrophorese	Molekularbiologie	

Zeitplanung

Der Versuch kann entweder in einer Einheit (Dauer: 3-4 h) oder in zwei separaten Einheiten zu je ca. 1,5 h durchgeführt werden.

Eine Möglichkeit zur Unterbrechung ergibt sich nach Aufsetzen der PCR – diese kann unüberwacht laufen, die PCR-Produkte sind mindestens eine Woche bei Raumtemperatur stabil.



Materialliste

Reagenzien (im Kit enthalten)	Menge	Benötigte Menge	Lagerung
Extraktionspuffer I	2,0 mL	50 µL (pro Person)	+25 °C
Extraktionspuffer II	2,0 mL	50 µL (pro Person)	+25 °C
2X Hot-Start Mastermix	500 µL	12,5 µL (pro Person)	-20 °C
PTC-Primer	500 µL	12,5 µL (pro Person)	-20 °C
BtsCI-Restriktionsenzym	25 µL	0,5 µL (pro Person)	-20 °C
CutSmart Puffer	125 µL	2,5 µL (pro Person)	-20 °C
Gel-Loading-Dye (6X)	100 µL	2 µL (pro Person)	+25 °C
100 bp DNA-Ladder	100 µL	10 µL (pro Gel)	-20 °C
SYBR Green I (10 000x)	25 µL	2 µL (pro Gel)	+25 °C
Agarose	2 g	0,4 g (pro Gel)	+ 25 °C
TBE-Puffer	20 g	20 g (pro Workshop ²)	+ 25 °C

¹ Gel = Minigel, 9,5 x 6 cm, 8 Taschen

² Workshop = 30 Teilnehmer

Nicht im Kit enthalten:

Laborgeräte:

- Thermocycler
- Geräte zur Gelelektrophorese
- Transilluminator
- Mikrowelle
- Zentrifuge
- Waage

Mikroliterpipetten und Pipettenspitzenboxen:

- 2-20 µL Mikroliterpipetten
- Pipettenspitzenboxen (2-200 µL)
- 20-200 µL Mikroliterpipetten

Verbrauchsgegenstände:

- PCR-Gefäße (1 mL und 0,2 mL)
- Spritzen (1 mL)
- Pipettenspitzen (2-200 µL)
- Kunststoff-Schnapsgläser 40 cl
- Handschuhe
- Kochsalz
- Dest. Wasser

Sonstiges

- Permanentmarker
- Kunststoffracks
- Styroporbox mit Eis
- Becher (Entsorgen d. Pipettenspitzen)
- Schutzbrillen

Vorbereitung

Die folgenden Vorbereitungen sollten vom Lehrer vor Beginn des Workshops durchgeführt werden. Generell sind alle Chemikalien – bis auf das Restriktionsenzym – für eine Woche im Kühlschrank bei 4 °C stabil, für längere Zeiträume empfehlen wir die Lagerung bei -20 °C. Die Reagenzien können darüber hinaus mind. 15-mal (Restriktionsenzym: 3-mal) aufgetaut und wieder eingefroren werden, ohne dass es zu einem Aktivitätsverlust kommt.

Generelle Vorbereitungen

1. Aufbauen der Laborgeräte (Thermocycler, Geräte zur Gelelektrophorese, Zentrifuge)
2. Materialien pro Tisch (= 2 Teilnehmer):
 - ✓ 1x Mikroliterpipette (2-20 µL)
 - ✓ 1x Mikroliterpipette (20-200 µL)
 - ✓ 50 Stk. Pipettenspitzen (2-200 µL)
 - ✓ Becher (zur Entsorgung der Pipettenspitzen)
 - ✓ 2x Kunststoff-Schnapsgläser 40 cl
 - ✓ Permanentmarker
 - ✓ 2x Kunststoffracks
 - ✓ 2x Spritzen (1 mL)
 - ✓ 2x PCR-Reaktionsgefäß (1,5 mL)
 - ✓ 8 x PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)

Vorbereitung für die DNA Extraktion

1. Herstellung einer 0,9 % Kochsalzlösung (0,9 g NaCl auf 100 mL dest. Wasser)
2. Aliquotieren von 20 mL Kochsalzlösung (c = 0,9 %) pro Teilnehmer.
3. Aliquotieren von 125 µL Extraktionspuffer I und II in zwei 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäße pro Tisch

Vorbereitung für die PCR

1. Aliquotieren von 30 µL 2X Hot Start Mastermix in ein 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäß pro Tisch.
2. Aliquotieren von 30 µL PTC Primer in ein 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäß pro Tisch.

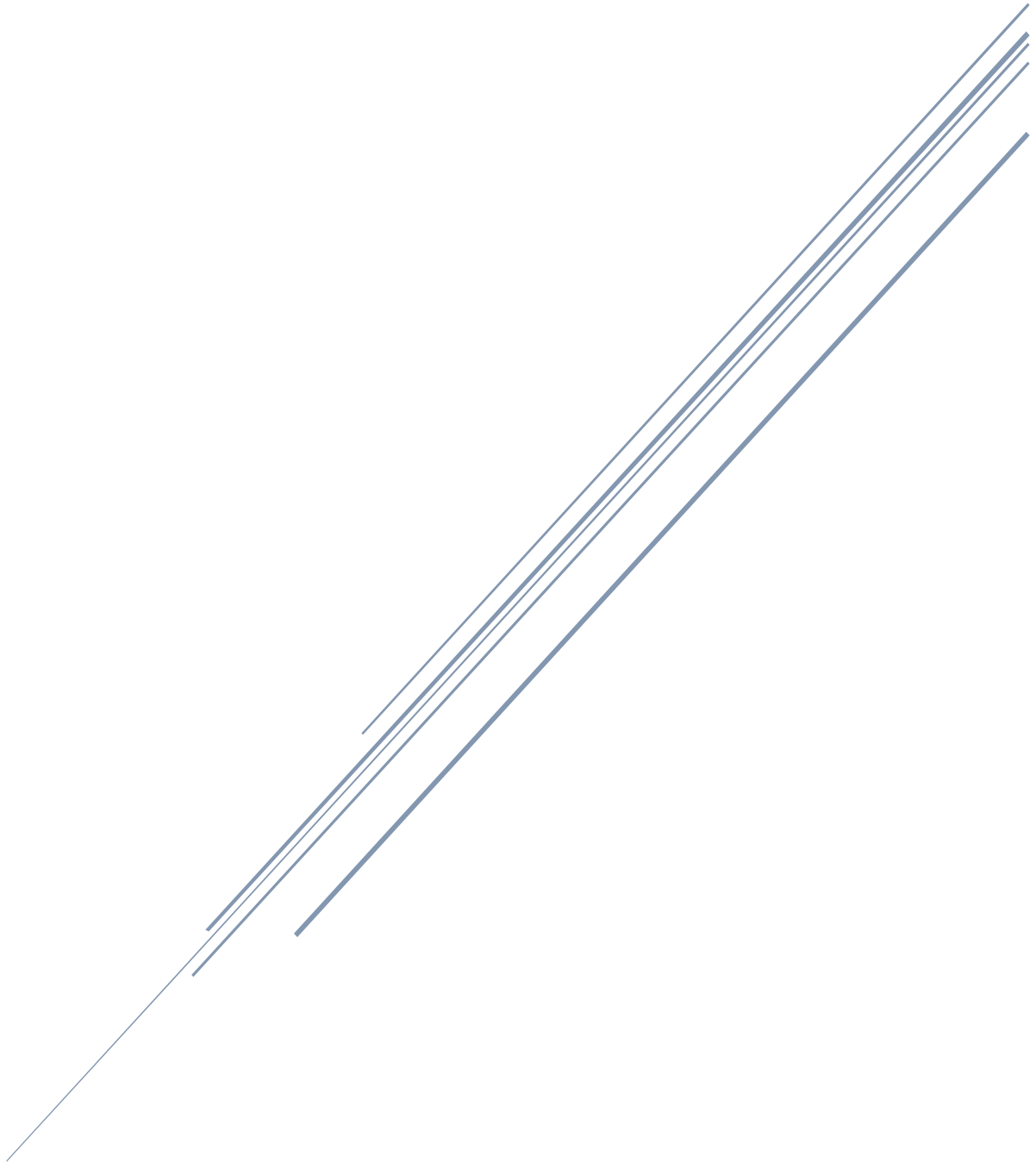
Vorbereitung für den Restriktionsverdau (Achtung, lediglich kurz davor vorbereiten!)

1. Für 30 Teilnehmer werden 25 µL BtsCI Restriktionsenzym mit 125 µL CutSmart Puffer vermischt und pro Tisch 10 µL in 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäße aliquotiert und auf Eis gelagert.

Vorbereitung für die Gelelektrophorese

1. Lösen des TBE-Pulvers in 1000 mL Wasser für 1X TBE-Puffer
2. Für die Gelelektrophorese wird ein 2,0 % Agarose-Gel mit ausreichend Kapazität für alle Teilnehmer benötigt. Dieses kann entweder am Vortag vorbereitet und eingeschlagen in feuchtem Papier über Nacht im Kühlschrank gelagert werden oder auch kurz vor dem Workshop vorbereitet werden (Anleitung siehe unter „Gelelektrophorese“). Für optimale Ergebnisse empfehlen wir die Herstellung eines frischen Gels während der Wartezeit für die PCR.

Anleitung (Schüler)



Hintergrundinformation

Genetische Variation

Es ist kaum zu glauben, dass 99 % der DNA in Menschen exakt gleich ist und nur 1 % für die gesamte Variabilität zwischen Menschen verantwortlich ist - dieses 1 % ist es, was uns alle einzigartig macht. Die Unterschiede in der DNA sind über das ganze Genom verteilt und können in unterschiedlichsten Formen auftreten. Die häufigste Form ist der sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP = single nucleotid polymorphism) bei welchem sich die DNA-Sequenz eines Gens nur durch den Austausch einer Base unterscheidet.



Abbildung 1 99% der DNA ist unter allen Menschen gleich. Am häufigsten manifestieren sich die Unterschiede als sogenannter Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP). In der Sequenz im Bild - ein Ausschnitt aus dem TAS2R38 Gen - kommt bei 970 bp ein SNP vor.

In diesem Experiment soll es um diese SNPs gehen. Durch die unterschiedlichen Nukleotide entstehen unterschiedliche Varianten eines Gens, welche auch als Allele bezeichnet werden. Unterschiedliche Allele eines Gens unterscheiden sich also in ihrer Sequenz, wodurch schlussendlich die Funktion von Proteinen beeinflusst wird. Eines der prominentesten Beispiele ist der Einfluss dreier SNPs auf das TAS2R38 Gen, welche Einfluss auf die phänotypische Geschmackswahrnehmung nehmen.

Genotyp und Phänotyp

Menschen weisen einen diploiden Chromosomensatz auf, das heißt jedes Chromosom und dadurch auch jedes Gen liegt doppelt vor. Jeweils ein Chromosomensatz wird von der Mutter und einer vom Vater vererbt. Diese zwei Kopien werden Genotyp genannt, während die daraus resultierenden beobachtbaren Merkmale (Augenfarbe oder auch z.B. Blutgruppe) Phänotyp heißen. Die meisten Phänotypen ergeben sich durch eine komplexe Mischung mehrerer Gene und auch durch den Einfluss von Umweltfaktoren. Es ist nicht immer einfach, diese Einflüsse klar zu trennen – so hängt z.B. die Körpergröße sowohl vom Genotyp aber auch vom Nährstoffangebot (und damit von Umweltfaktoren) ab.

Manche Phänotypen sind sehr direkt vom Genotyp abhängig, unter anderem sei an dieser Stelle die Fähigkeit, Phenylthiocarbamid (PTC) als bitter wahrzunehmen erwähnt: In diesem Workshop soll der eigene Phänotyp zum mittels PCR und Restriktionsverdau bestimmten Genotyp korreliert werden.

Geschmacksinn

Durch spezielle Geschmacksknospen auf der Zunge wird die Wahrnehmung von Geschmack ermöglicht. Diese Knospen bestehen aus bis zu hundert Geschmackssinneszellen, die auf ihrer Oberfläche unterschiedliche Rezeptor-Proteine tragen. Eine Vielzahl chemischer Verbindungen, die in den Mund gelangen, bindet an diese Rezeptor-Proteine, welche dadurch schlussendlich ein Signal ans Gehirn weiterleiten. Der genaue Mechanismus der Informationsübertragung von den Geschmackszellen zum Gehirn ist aber noch ungeklärt.

Unabhängig davon bestimmt die Aminosäuresequenz des Rezeptorproteins maßgeblich wie und auch welche Chemikalien am Protein binden und dadurch auch welche Stoffe als Geschmack oder auch in welcher Intensität ein Geschmack wahrgenommen werden kann. Da die Aminosäuresequenz durch die Information in der DNA festgelegt wird, besteht in diesem Fall ein sehr direkter Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp.

Menschen können mehrere Geschmacksrichtungen wahrnehmen: süß, sauer, bitter, salzig und umami. Es existieren unterschiedliche Familien an Geschmackssinneszellen, die durch eine Reihe an Geschmackrezeptoren darauf spezialisiert sind, eine spezifische Geschmacksrichtung wahrzunehmen.

Es existieren z.B. 25 bekannte Rezeptor-Proteine für bitteren Geschmack, jedes einzelne davon schlägt auf unterschiedliche Moleküle oder auch unterschiedliche Stoffgruppen an. Eine Vielzahl an Molekülen wird als bitter wahrgenommen, alle jene Moleküle werden durch diese 25 G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR) detektiert. Ein spezifischer Rezeptor ist das TAS2R38 Protein, welches für die Wahrnehmung mehrerer Bitterstoffe verantwortlich ist, einer davon ist Phenylthiocarbamid.

TAS2R38-Gen



TAS2R38 Position [bp]	Schmecker Allel (T)		Nicht-Schmecker Allel (t)	
	Codon	Aminosäure	Codon	Aminosäure
230	CCA	Pro	GCA	Ala
870	GCT	Ala	GTT	Val
970	GTC	Val	ATC	Ile

Das menschliche TAS2R38 Gen ist 1148 Basenpaare lang. Drei Nukleotid-Positionen variieren dabei am häufigsten zwischen Personen: 230 bp, 870 bp und 970 bp. Diese drei Variationen treten mit einer Wahrscheinlichkeit von 96 % zusammen entweder als PAV (Pro-Ala-Val) oder AVI (Ala-Val-Ile) auf, lediglich zu 4 % wird das Allel AAV beobachtet.

Weil jedes Gen doppelt vorhanden ist (diploider Chromosomensatz), ergeben sich drei mögliche Kombinationen, sofern man sich nur auf die mit 96 % Wahrscheinlichkeit auftretenden Allele PAV (dominant) und AVI (rezessiv) bezieht:

TAS2R38 Genotyp			Phänotyp
PAV/PAV	T/T	homozygot	Starker Schmecker
PAV/AVI	T/t	heterozygot	Milder Schmecker
AVI/AVI	t/t	homozygot	Nicht-Schmecker

Von 170 Personen mit dem Allel PAV (homozygot und heterozygot) gaben 166 (98%) an, Phenylthiocarbamid als bitter wahrzunehmen, während von 73 Personen mit dem Allel AVI/AVI 59 Personen (81 %) Phenylthiocarbamid nicht wahrnehmen konnten¹.

¹ 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 Feb 21;299(5610):1221-5. doi: 10.1126/science.1080190. PMID: 12595690.

In aller Kürze:

Das Kernprinzip in der Genetik besagt, dass der Phänotyp eines Organismus durch den Genotyp -und damit durch die DNA - bestimmt wird. Meistens ist diese Erklärung zu einfach, viele Phänotypen (z.B. Körpergröße) werden durch ein komplexes Wechselspiel von Umweltfaktoren und Gene bestimmt.

Das in diesem Workshop untersuchte TAS2R38 Gen ist eines der raren Beispiele, wo der Genotyp sehr spezifisch den Phänotyp festlegt. Generell ist Geschmack eine sehr subjektive und komplexe Erfahrung, aber die spezifische Betrachtung von nur einem Molekül – Phenylthiocarbamid – erlaubt die direkte Korrelation von Genotyp und Phänotyp.

Am häufigsten kommt genetische Variabilität durch Einzelnukleotid-Polymorphismen zustande, also einzelne Positionen in einem Gen die sich lediglich um eine Base unterscheiden. Das TAS2R38 Gen weist drei Positionen für SNPs auf, wodurch zwei mögliche Allele (PAV/AVI) entstehen.

Diese Korrelation von Genotyp und Phänotyp ist nicht perfekt, so kommen die Allele PAV/AVI „nur“ mit einer Wahrscheinlichkeit von 96 % vor, 4 % sind andere Kombinationen dieser SNPs. Beinahe alle Personen mit dem Allel PAV/PAV (TT) geben an, PTC schmecken zu können und immerhin 80 % der Personen mit dem Allel AVI/AVI (tt) geben an, dies nicht zu können.

Wie bestimmt man den Genotyp?

Beinahe jede Zelle im Körper enthält das gesamte Genom - dies ermöglicht es die DNA aus fast jeder beliebigen Zelle isolieren und untersuchen zu können. Die Verwendung von Mundschleimhautzellen bietet sich insofern an, als dass diese nicht-invasiv „geerntet“ werden können.

Der TAS2R38 Genotyp wird mit einem Verfahren namens PCR-RFLP (Polymerase-Chain Reaction – restriction fragment length polymorphism) bestimmt. Dabei wird mittels PCR ein 269 bp langer Abschnitt des TAS2R38 Gens rund um die Position 970 amplifiziert.

Um nun zwischen den beiden Allelen zu unterscheiden, wird ein Restriktionsenzym verwendet. Diese Enzyme erkennen kurze DNA-Sequenzen (4-8 bp) und schneiden die DNA an dieser Stelle. Das verwendete Restriktionsenzym heißt BtsCI und schneidet die DNA, wenn die Sequenz CATCC vorkommt. Dies ist lediglich im AVI-Allel der Fall, da beim PAV-Allel an der Stelle CGTCC steht. Je nach dem welches Allel vorliegt, wird die amplifizierte DNA in zwei Teile geschnitten (97 bp + 163 bp) oder verbleibt ungeschnitten mit einer Länge von 299 bp in der Probe. Mittels Gelelektrophorese werden dann die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt und der Genotyp kann bestimmt werden.

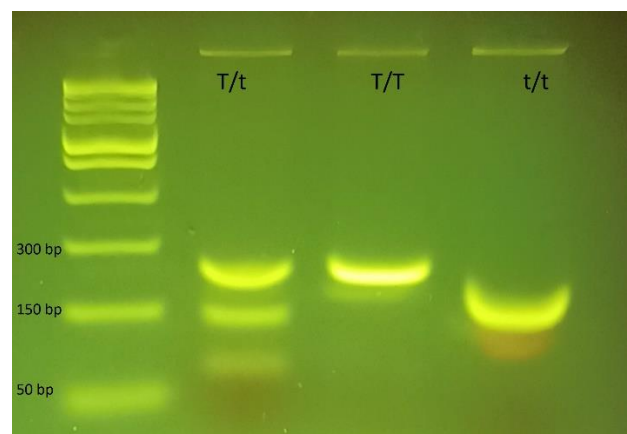
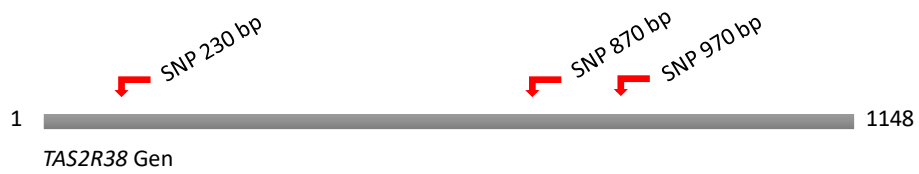
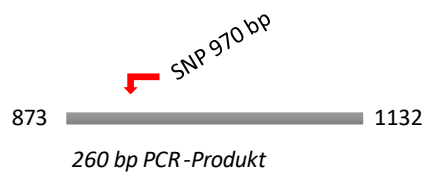


Abbildung 2: Gelelektrophorese der Genotypen T/t, T/T und t/t.

DNA Extraktion:



PCR:



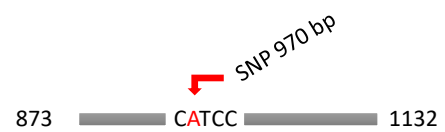
Restriktionsverdau:

Schmecker:



260 bp

Nicht-Schmecker:



97 bp 163 bp

DNA-Extraktion

1. Auf deinem Platz sollte ein Plastik-Schnapsglas mit 20 mL Kochsalzlösung stehen. Spüle deinen Mund für 30 Sekunden (insbesondere die Innenseite der Wange) mit dieser Lösung.
2. 1 mL der Spüllösung wird danach mit einer Spritze in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt (beschriften!).
3. Das PCR-Reaktionsgefäß wird bei 12 000 RPM für 2 min zentrifugiert, damit sich die Zellen am Boden des Gefäßes sammeln.
4. Der klare Überstand wird verworfen, die letzten verbleibenden Reste können mit einer Mikroliterpipette entfernt werden.
5. Es sollte nun ein deutliches Zellpellet sichtbar sein, ist dies nicht der Fall, muss erneut 1 mL der Spüllösung in das PCR-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert werden.
6. Anschließend werden 50 µL Extraktionspuffer I auf das Zellpellet pipettiert und durch Schütteln homogenisiert.
7. Diese Zellsuspension wird für 10 min auf 95 °C erhitzt.
8. Nach dem Erkalten werden 50 µL Extraktionspuffer II hinzugefügt und 2 min bei 12000 RPM zentrifugiert, damit sich die restlichen Zellbestandteile von der gelösten DNA separieren.
9. Die DNA ist nun isoliert und sollte möglichst zeitnah (innerhalb von 30 min) für die PCR verwendet werden.

PCR

1. In ein beschriftetes 0,2 mL PCR Reaktionsgefäß werden folgende Reagenzien pipettiert:
 - 12,5 µL 2X Hot-Start Mastermix
 - 12,5 µL PTC Primer Lösung
 - 3 µL der extrahierten DNA (nur den klaren Überstand verwenden!)
2. Alle Reagenzien werden durch Schütteln gut vermischt, anschließend wird kurz zentrifugiert.
3. Die Probe wird in den Thermocycler gestellt und die PCR mit folgenden Parametern durchgeführt:
 - Initiale Denaturierung: 94 °C, 120 s
 - Denaturierung: 94 °C, 10 s
 - Annealing: 58 °C, 15 s
 - Extension: 72 °C, 40 s
 - Anzahl der Zyklen: 30
 - Finale Extension: 72 °C, 5 s
4. Die PCR dauert ca. 70 min – das PCR-Produkt ist für 24 h bei Raumtemperatur oder 7 Tage bei 4 °C stabil.

Restriktionsverdau

1. In ein beschriftetes 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäß werden 12 µL vom PCR-Produkt pipettiert
2. Danach werden 3 µL der Mischung aus CutSmart-Puffer und BtsCI hinzugefügt.
3. Durch sanftes Auf- und Abpipettieren wird der Inhalt vermischt und für 15 min auf 50 °C erwärmt.

Gelelektrophorese

Herstellung des Gels:

1. Zuerst muss 1X TBE hergestellt werden.
2. Aufbauen einer Gelkammer mit Kamm.
3. Abwiegen von 0,4 g Agarose (ausreichend für ein Minigel mit einer Größe von 9,5 x 6 cm)
4. Suspendieren der Agarose in 20 mL 1X TBE.
5. Erhitzen in der Mikrowelle (ca. 60 sek) – die Lösung muss kochen und die Agarose danach **gänzlich** aufgelöst sein.
6. Abkühlen auf 50-60 °C.
7. Hinzufügen von 2 µL SYBR Green I Farbstoff.
8. Gießen des Gels in die Gelkammer
9. Ca. 15 min warten bis sich die Agarose wieder verfestigt hat, danach wird der Kamm entfernt.

Gelelektrophorese

1. Das Gel wird mitsamt dem Gelschlitten in den Pufferbehälter gegeben und so viel 1X TBE hinzugefügt, dass das Gel gerade so bedeckt ist.
2. Die Tasche ganz links wird mit 10 µL DNA-Ladder befüllt.
3. Danach werden die Taschen sukzessive mit den Proben (15 µL) befüllt und die Reihenfolge der Proben notiert.
4. Als Faustregel wird mit einer Spannung von 5-10 V pro cm Laufstrecke gearbeitet – eine höhere Spannung führt zu einer schnelleren Auftrennung, allerdings auf Kosten der Auflösung.
5. Der violette Farbstoff läuft ca. auf derselben Höhe wie ein 50 bp DNA-Fragment – wenn der Farbstoff 1/3 der maximalen Laufstrecke erreicht hat, kann die Gelelektrophorese gestoppt und das Ergebnis im Transilluminator betrachtet werden.

Fragen und Übungsaufgaben

1. Was ist ein SNP?
2. Was ist PTC?
3. An welchen Geschmacksrezeptor bindet PTC?
4. Was sind die genetischen Unterschiede zwischen den Häufigsten Allelen des TAS2R38 Gens?
5. Wird die Möglichkeit PTC zu schmecken dominant oder rezessiv vererbt?
6. Korreliere die möglichen Genotypen (TT, Tt, tt) mit den Phänotypen.
7. Beschreibe in Stichpunkten wie die Molekularbiologischen Methoden in dem heutigen Workshop eingesetzt werden, um den Genotyp zu bestimmen.
8. Wie ist das Ergebnis der Gelelektrophorese für alle möglichen Genotypen (TT, Tt, tt) zu erwarten?