

Praktikumsbericht

Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie, Plön
Abteilung Evolutionsökologie

8. Oktober bis 26. Oktober 2007

Erstellt von: Maren Büttner

1 Einleitung

In diesem Bericht möchte ich auf meine Tätigkeit während meines dreiwöchigen Praktikums am Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie eingehen und einige persönlichen Eindrücke und Erfahrungen wiedergeben.

Ich besuche das Carl-Zeiss-Gymnasium mit mathematisch-naturwissenschaftlich-technischen Spezialklassen in Jena. Dort wurde ich 2004 nach einer Eignungsprüfung aufgenommen. Im Frühjahr 2008 werde ich das Abitur ablegen. Im Sommer 2005 absolvierte ich ein dreitägiges Praktikum am ökologischen Institut der Universität Jena.

Ich interessiere mich sehr für naturwissenschaftliche Fragestellungen, im Besonderen im Fachbereich Biologie.

Ich nahm an den Auswahlrunden zur 18. Internationalen Biologieolympiade 2007 teil und erreichte in der 3. Runde den 15. Platz.

Das Praktikum fand am Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie, früher Limnologie, in Plön vom 8.10.07 bis zum 26.10.07 statt. Das Institut unterhält derzeit zwei Abteilungen und zwei unabhängige Arbeitsgruppen, die sich auf die Forschungsgebiete Evolutionsökologie, Ökologie fließender Gewässer und Tropenökologie konzentrieren [1].

Mein Praktikum fand in der Abteilung für Evolutionsökologie statt. Die Arbeitsgruppe, in der ich tätig war, beschäftigt sich hauptsächlich mit der Evolution von Anpassungen, vorrangig mit der Parasit-Wirt-Koevolution.

An dreistachligen Stichlingen (*Gasterosteus aculeatus*) wird mit immunologischen, immungenetischen, parasitologischen und verhaltensökologischen Methoden untersucht, ob Partnerwahl die Resistenz der Nachkommen gegen die vorherrschenden natürlichen Parasiten optimiert und ob dadurch der bei Wirbeltieren üblicherweise enorme Polymorphismus in den MHC-Genen erhalten werden kann [2].

Da es zum Zeitpunkt des Praktikums nicht möglich war, mir ein eigenes Projekt zur Weiterführung zu übergeben, habe ich hauptsächlich an den Projekten meines Praktikumsbetreuers Tobias Lenz mitgearbeitet. Seine Projekte fokussieren die molekulare Charakterisierung der MHC-Gene des dreistachligen Stichlings (*Gasterosteus aculeatus*) und deren funktionale Aspekte.

Neben dieser Tätigkeit hatte ich die Möglichkeit, an verschiedenen Projekten der Arbeitsgruppe teilzunehmen und zum Teil mitzuarbeiten. Ich konnte so eine Vielzahl an verschiedenen Projekten begleiten. Ich möchte diese Projekte in ihrem Inhalt und ihrer Fragestellung kurz vorstellen, werde mich im weiteren Bericht aber nur auf zwei Hauptprojekte beziehen.

Zum einen arbeitete ich an der Etablierung der Vettorette-Methode. Ziel war es dabei, das Exon 2 des MHC II primer-unabhängig sequenzieren zu können, da die bisherigen PCR-Primer möglicherweise nicht alle Allele bei einer PCR amplifizieren. Daher soll der Reverse-Primer des Exons durch einen Vettorette-Primer ersetzt werden. Bis zum Zeitpunkt meiner Abreise waren die Ergebnisse dabei eher unbefriedigend, da sich keine spezifische Amplifikation ergab.

Zum anderen arbeitete ich an der Entwicklung von Mikrosatelliten, um die Lage der MHC-II-Loci im Genom zu bestätigen bzw. zu korrigieren. Dazu mussten zunächst entsprechende Primer mittels Onlinere Ressourcen des Ensemble-Genome-Browsers gefunden werden und auf ihre Verwendbarkeit geprüft werden. Dazu führte ich zwei

Vortests durch. In deren Ergebnis konnten zwei Mikrosatelliten für die weitere Untersuchung ausgewählt werden.

Im Folgenden stelle ich noch die weiteren Projekte vor.

Einmal wöchentlich kontrollierten Tobias Lenz und ich Käfige im Freiland. Jeweils 19 dieser Käfige befanden sich in einem Fluss und im Großen Plöner See. Die darin gehaltenen Stichlinge stammten aus beiden Habitaten, wurden im Labor gezüchtet und zum Teil gekreuzt. An ihnen soll die Auswirkung der habitatspezifischen Parasitbelastung in natürlicher Umgebung untersucht werden. Da die aus verschiedenen Umweltbedingungen stammenden Fische unterschiedliche MHC-II-Allele besitzen, geht man davon aus, dass die See-, Fluss- und Hybridfische von habitatspezifischen Parasiten unterschiedlich stark befallen sind.

In einem anderen Projekt wurden Stichlingseier künstlich befruchtet und in einer keimfreien Umgebung aufgezogen. Unter diesen keimfreien Bedingungen sollen sich die Fische entwickeln, ohne ein adaptives Immunsystem aufzubauen. Ziel ist es, die Immunkompetenz der Fische zu ermitteln.

Ein sehr zeitaufwändiges Projekt umfasste die Analyse aller Gene, die bei infizierten Stichlingen aktiv sind. Dazu wurden Fische aus See- und Flusspopulation im Labor gezüchtet und gezielt mit drei verschiedenen Parasiten, zwei Nematodenarten (*Camallanus lacustris* und *Anguillicola crassus*) und eine Cercarienart (*Diplostomum pseudospathaceum*), infiziert. Dazu wurden unter anderem Copepoden genutzt, die Nematoden als Zwischenwirt benötigen. Diese mussten alle zwei Tage mit Artemien gefüttert werden. Letztlich mussten die Fische seziiert und aus den entnommenen Organen mRNA isoliert werden. Diese wird in cDNA transkribiert, welche dann analysiert wird. Dabei half ich bei der Fütterung der Copepoden, bei der Sektion der Fische und beim Auszählen von Parasiten.

Eine weitere Tätigkeit, die ich während meines Praktikums durchführte, war die Bearbeitung einer Sequenzdatenbank von bidirektional sequenzierten Klonen des Exon 2 und Intron 2 des MHC-II-Locus. Dazu habe ich den automatischen Basecallingalgorithmus mit den originalen Chromatogrammen überprüft und Consensusdateien erzeugt, wenn es möglich war. Dies diente der Erfassung der Nukleotidsequenzen und ermöglichte die spätere Analyse von Unterschieden in der Evolutionsrate zwischen Exon und Intron.

2 Theoretische Grundlagen

Die Untersuchung des MHC ist in die Immungenetik einzuordnen, da zur Charakterisierung der MHC-Gene und -Allele die Verwendung molekularbiologischer Methoden unumgänglich ist. Die übergeordnete Fragestellung ist eine evolutionsbiologische.

Die Evolution der sexuellen Fortpflanzung und der Partnerwahl kann bisher nicht genau erklärt werden, ebenso wenig, weshalb sich sexuelle Fortpflanzung bei den meisten Spezies durchgesetzt hat. Ein sexuell erzeugter Nachkomme müsste durch die genetische Rekombination mindestens doppelt so fit sein wie ein asexuell erzeugtes Individuum. Sexuelle Fortpflanzung muss demnach kurzfristig einen sehr großen Vorteil bieten können. Dafür sind die sich verändernden Umwelteinflüsse aber zu gering. So müsste sich ein Regenwald beispielsweise innerhalb einer Generation in eine Wüste und wieder zurück „verwandeln“, um ein ausreichend starker Faktor zu sein. Dagegen ist der Einfluss der Parasitenbelastung durchaus als ein möglicher starker Selektionsdruck denkbar [3]. Ein Weibchen muss also durch gezielte Partnerwahl ein Männchen finden, das resistent gegen die zum Zeitpunkt auftretenden Parasiten ist, um resistente Nachkommen zu zeugen. Des Weiteren erfordert das Auftreten einer Vielzahl von unterschiedlichen Parasiten einen großen Polymorphismus von Immungenen.

Der Haupthistokompatibilitätskomplex, kurz MHC, ist die am meisten polymorphe bekannte Genfamilie. MHC-Moleküle sind membrangebundene Glykoproteine. Sie binden Peptidfragmente aus dem Stoffwechsel der Zelle und präsentieren diese auf der Zelloberfläche. Diese Peptide werden, stammen sie von einem Pathogen ab, von T-Zellen erkannt. Es gibt mehrere Klassen von MHC-Molekülen, MHC Klasse I und MHC Klasse II.

Die hier beschriebenen Untersuchungen befassen sich ausschließlich mit dem MHC II. Dieser besteht aus zwei etwa gleich großen, membranverankerten Untereinheiten, der α - und β -Kette. Beide bestehen aus zwei verschiedenen Domänen. So bilden die α_1 - und β_1 -Domäne zusammen den für die Antigenpräsentation wichtigen Spalt und sind dementsprechend variabel, während α_2 - und β_2 -Domäne sehr konservierte Regionen darstellen. Die für die Untersuchungen interessante β_1 -Domäne gilt als variabler als die α_1 -Domäne.

Beide MHC-Typen kommen auf unterschiedlichen Zelltypen vor. So gibt es MHC-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen.

Bindet eine cytotoxische T-Zelle mit einem CD4-Rezeptor an ein von MHC I präsentiertes Peptid, schüttet die T-Zelle Perforin aus, die Zellmembran der betreffenden Zelle wird durchlöchert und die Zelle stirbt ab. Dadurch werden infizierte Zellen abgetötet.

Der MHC II findet sich dagegen zum Beispiel auf Makrophagen und B-Lymphocyten. Bindet eine T-Zelle mit einem CD8-Rezeptor an ein von MHC II präsentiertes Peptid, werden andere Effektorzellen des Immunsystems aktiviert [4]. So wird die humorale und zellvermittelte Immunantwort stimuliert [5].

So werden Parasiten begünstigt, deren Oberflächenmoleküle so stark mutieren, dass sie der MHC-Antigenpräsentation entgehen. Umgekehrt muss der Wirt sich ständig an variierende Parasiten anpassen. Dieses „gegenseitige Wettrüsten“ hat vermutlich den Polymorphismus des MHC zur Folge. Die meisten Wirbeltiere verfügen über mehrere MHC-I- und MHC-II-Loci, um so ein möglichst breites Spektrum an Peptiden präsentieren zu können. Allerdings ist die Parasitbelastung und –diversität nicht bei

Individuen am geringsten, die eine hohe Anzahl von MHC-Allelen besitzen, sondern es existiert ein Optimum [3].

Es wird vermutet, dass während der T-Zell-Reifung im Thymus zur Erzeugung einer Selbsttoleranz bei einer sehr großen Anzahl von MHC-Allelen die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass eine T-Zelle durch negative Selektion ausselektiert wird und abstirbt. Das T-Zell-Repertoire könnte dadurch so stark reduziert sein, dass weniger Variabilität der CD4- und CD8-Rezeptoren vorliegt als bei einer optimalen Anzahl von MHC-Allelen.

3 Material und Methoden

3.1 Vectorette-Methode

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Dabei werden zwei DNA-Primer verwendet, sodass eine bestimmte Sequenz amplifiziert wird. Die Vectorette-Methode wird benutzt, wenn nur ein Primer für eine DNA-Sequenz bekannt ist.

Zunächst wird eine Vectorette-Library erstellt. Dazu wird mittels Restriktionsendonukleasen genomische DNA verdaut, an die entstandenen Enden werden Vectorette-Einheiten ligiert [6]. Diese „Adapter“ bestehen aus doppelsträngiger, teilweise nicht komplementärer DNA. Dazu wird ein Vectorette-Primer hinzugefügt, dessen spezifische Erkennungssequenz mit der Sequenz einer der DNA-Stränge der Vectorette-Einheit identisch ist. Dadurch wird erreicht, dass der Vectorette-Primer erst binden kann, wenn durch den unspezifischen Primer die komplementäre Sequenz der Vectorette-Einheit synthetisiert wurde. Theoretisch wird nur die Sequenz amplifiziert, an die beide Primer binden können.

Zunächst erfolgte der DNA-Verdau mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen mind. 2 Stunden oder über Nacht. Die Restriktionsendonukleasen erzeugten ein überhängiges Ende an der DNA. Das Ende der Vectorette-Einheit ist zu diesen überhängigen Enden komplementär.

Danach wurden die Vectorette-Einheiten mit T4 DNA-Ligase unter Zusatz von ATP ligiert. Die Ligation erfolgte bei 14 °C mind. 2 Stunden oder über Nacht.

Anschließend wurde mit den 4 Proben eine PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.2 Mikrosatelliten-Vortests

Das Genom des Dreistachligen Stichlings ist komplett sequenziert, jedoch kann eine Region, Scaffold 131, keinem Chromosom zugeordnet werden, da auf ihm keine bekannten Segregationsmarker (z.B. Mikrosatelliten) liegen. Es wird vermutet, dass zwei bis drei MHC-II-Loci auf diesem Fragment liegen. Insgesamt werden bis zu sechs MHC-II-Loci im Stichlings-Genom vermutet, die auf mindestens drei verschiedene linkage groups verteilt sind.

Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Elemente und bestehen häufig aus Wiederholungen von zwei Nukleotiden und haben eine Länge von 50 bis 100 bp. Diese Mikrosatelliten können in der Nähe von Genen liegen.

Dazu mussten zunächst entsprechende Primer mittels Onlineressourcen des Ensemble-Genome-Browsers gefunden und auf ihre Verwendbarkeit geprüft werden. Die verwendeten Primer binden außerhalb dieser Regionen. Mit diesen Primern wird idealerweise ein einziger Mikrosatellit amplifiziert. Um dies zu überprüfen, müssen Vortests gemacht werden.

Der erste Vortest wurde mit zwei DNA-Proben von Dreistachligen Stichlingen unterschiedlicher Populationen durchgeführt. Diese stammen aus einem See- und einem Flusshabitat. Mit den DNA-Proben wurde mit jeweils einem Primerpaar eine PCR durchgeführt. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese auf einem 1,5%igen Agarosegel durchgeführt. Dieser Test soll die Verwendbarkeit der Primer klären, d.h.

ob sie genügend Spezifität ausweisen und die Banden auf dem Gel eine Variabilität zeigen.

Im zweiten Vortest wurden 4 der 6 im ersten Vortest verwendeten Mikrosatelliten verwendet. Der Probenumfang wurde auf je vier Fluss- und Seefische erweitert. Die Vorgehensweise entspricht der des ersten Vortests.

4 Ergebnisse

4.1 Vectorette-Methode

Bei der Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte, verdaute und unverdaute DNA aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde folgende Aufnahme des Gels gemacht, lange DNA-Fragmente befinden sich im oberen Teil des Bildes, kürzere Fragmente im unteren.

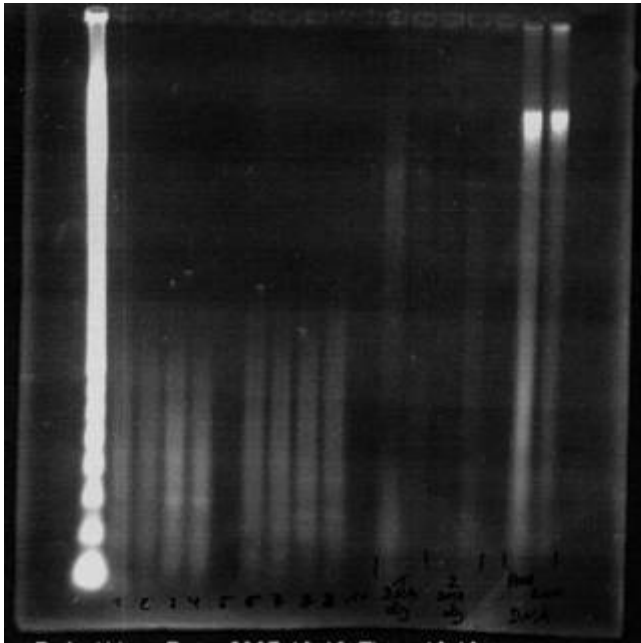


Abb. 1: Gelelektrophorese der PCR 202

Die unverdaute DNA ist rechts deutlich durch die zwei hellen Banden zu erkennen. Links neben der unverdauten DNA befinden sich 4 Proben verdauter DNA. Die Positionen 1 bis 10 sind die PCR-Produkte. Die Positionen 5 und 10 sind die Kontrollproben. Die anderen PCR-Produkte sind als Schmier ohne Banden zu erkennen. Links wurde eine DNA-Leiter aufgetragen.

4.2 Mikrosatelliten-Vortests

Der erste Vortest ergab, dass bei zwei Mikrosatelliten keine Bande oder mehr als zwei Banden auf dem Gelbild zu erkennen waren. Die vier anderen zeigten eine bzw. zwei Banden, die zum Teil auf unterschiedlicher Höhe lagen. Die Gelelektrophorese des zweiten Vortests ergab folgendes Bild.

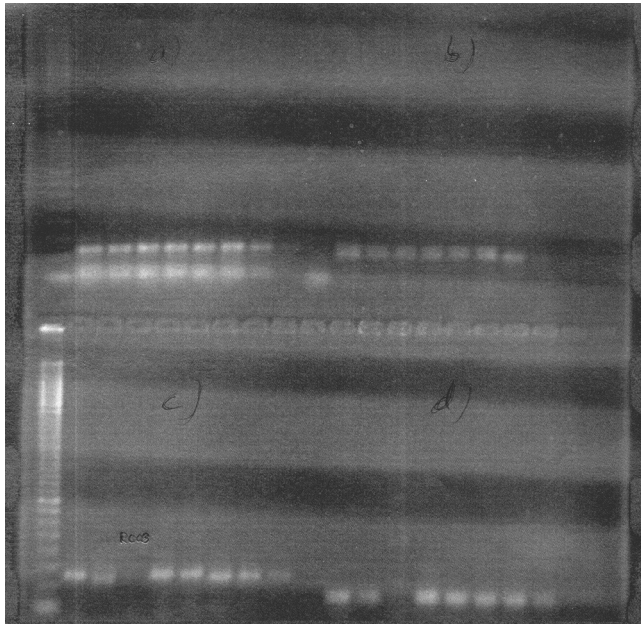


Abb. 2: Gelelektrophorese der PCR 204

In Abb. 2 sind die verwendeten Mikrosatelliten mit a,b,c,und d gekennzeichnet. Es handelt sich stets um kurze DNA-Fragmente. Die Kontrolle ist bei allen Proben leer. Bei Mikrosatelliten a sind stets 2 Banden zu erkennen, die alle auf gleicher Höhe im Gel liegen. Bei b ist je eine Bande zu erkennen, wobei die Bande von R012 an einer anderen Höhe liegt, als alle anderen. Bei c ist außer bei R003 stets eine Bande zu sehen, deren Lage leicht variiert. Bei d ist ebenfalls bei R003 keine Bande zu sehen, alle anderen Proben weisen je eine Bande auf gleicher Höhe auf.

5 Diskussion

5.1 Vectorette-Methode

Laut der Theorie ergibt sich durch die Vectorette-Methode eine geringe Anzahl von Banden. Das Ergebnis der Vectorette-PCR ergab jedoch nur unspezifische Produkte. Im Vergleich zur verdauten DNA wird deutlich, dass eine Amplifikation von DNA-Fragmenten statt fand, da die PCR-Produkte heller sind als die verdaute DNA. Allerdings lässt sich mit diesen PCR-Produkten nicht weiter arbeiten, da klare Banden fehlen.

Auf der Suche nach einer möglichen Fehlerquelle, wurde neue T4 DNA-Ligase verwendet, weil die vorherige möglicherweise schon funktionsunfähig war. Weiterhin wurde die Anzahl der PCR-Zyklen erhöht, wobei das Ergebnis ähnlich ausfiel. Eine dritte Vermutung war, dass die Annealing-Temperatur für einen der Primer zu hoch gewählt war und wurde auf 55 °C reduziert. Die PCR-Produkte wurden noch unspezifischer.

Die Vermutung liegt nahe, dass die Ligation nicht richtig funktioniert. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Vectorette-Einheit eine andere Struktur hat als theoretisch angenommen, sodass das „sticky end“ eine andere Sequenz aufweist.

Unwahrscheinlicher ist, dass der Vectorette-Primer unspezifisch bindet.

Bei diesem Verfahren muss noch eine Optimierung vorgenommen werden, sodass die genannten und bisher nicht untersuchten Fehlerquellen ausgeschlossen werden können.

Die Etablierung dieser Methode könnte die Sequenzierung des Exon 2 des MHC-II-B-Gens erleichtern, da ein bisher verwendeter Primer möglicherweise nicht alle Allele erfasst. Dadurch ließe sich der genannte Primer verifizieren und eine Tiefenanalyse des Exon 2 durchführen.

5.2 Mikrosatelliten-Vortests

Aus dem ersten Vortest ergab sich, dass zwei Mikrosatelliten nicht spezifisch genug waren bzw. kein Allel anzeigten. Diese wurden in den folgenden Test nicht mit einbezogen.

Aus Abb. 2 ist ersichtlich, dass die Mikrosatelliten b und c eine ausreichende Variabilität zeigen. Daraus kann auf individuelle Unterschiede geschlossen werden, die sich in der Länge der Sequenz des Mikrosatelliten äußert. Differenzen in der Nukleotidsequenz sind bei einer Gelelektrophorese nicht erkennbar.

Die verwendeten Primerpaare b und c wurden mit Farblabel bestellt. Diese können funktionierende Mikrosatelliten amplifizieren.

Ziel ist es, eine linkage map der MHC-II-Loci und der Mikrosatelliten zu erstellen.

Mittels der Mikrosatelliten und der MHC-Typisierung kann im Kreuzungsexperiment der Abstand der Mikrosatelliten und der MHC-Loci bestimmt werden. Dabei wird die Mikrosatelliten-Segregation mit der Segregation der MHC-Allele verglichen.

Dazu wird dann der MHC von F2-Individuen typisiert. Anhand der Häufigkeit des Auftretens eines bestimmten Mikrosatelliten und eines MHC-Allels kann deren Abstand auf einem Chromosom bestimmt werden. Je häufiger Mikrosatellit und MHC-Allel gemeinsam auftreten, desto näher liegen sie auf einem Chromosom.

6 Fazit

Abschließend möchte ich zum Ausdruck bringen, welchen Eindruck ich von der Arbeit als Wissenschaftler gewonnen habe.

Allgemein empfand ich das entspannte Arbeitsklima sehr angenehm und kollegial. So wurde ich zu Beginn allen Mitgliedern der Abteilung vorgestellt und fühlte mich von Anfang an in der Arbeitsgruppe integriert. Die Arbeit war sehr abwechslungsreich. Die Laborarbeit war mir zwar vollständig unbekannt, jedoch wurden mir an meinen Kenntnisstand angepasst Hilfestellungen gegeben, sodass ich verschiedene Arbeiten auch selbstständig ausführen konnte. Dabei fühlte ich mich von den Tätigkeiten zwar heraus-, aber nicht überfordert.

Schwierig fiel es mir, angesichts der Vielzahl an Projekten, den Überblick zu behalten. Insgesamt waren die Arbeitsthemen für mich sehr spannend und es war erstaunlich, was zur Klärung eines einfach anmutenden Sachverhalts für umfangreiche Fragestellungen geklärt werden müssen. Dabei war die Organisation verschiedener parallel laufender Projekte recht beachtlich. So war es immer Ziel, eine Arbeitsphase mit der Vorbereitung eines maschinell getätigten Vorgangs, der viel Zeit beanspruchte, zu beenden, um möglichst geringe Wartezeiten zu erreichen. Außerdem musste ich feststellen, dass Geduld doch eine nützliche Tugend in diesem Berufsfeld ist, da sich lebende Organismen im Allgemeinen nicht nach dem Zeitplan richten.

Ich habe die Zusammenarbeit mit Tobias Lenz sehr genossen, da er mir einen guten Einblick in die vielseitige Tätigkeit eines Biologen gab und stets mir bei Fragen und Problemen zur Verfügung stand. Organisatorische Dinge ließen sich unproblematisch klären und auch meine An- und Abreise hat reibungslos funktioniert.

Das Praktikum hat mir geholfen, einen Einblick in das mögliche Arbeitsfeld eines Biologen zu geben. Das hat mich darin bestärkt, selbst Biologie zu studieren, da ich selbst diese Vielseitigkeit in meinem Berufsleben sehr schätzen würde.

Ich danke Tobias Lenz für seine Geduld und die großartige Zusammenarbeit. Außerdem danke ich dem IBO-Verein für die Vermittlung des Praktikumsplatzes und die finanzielle Unterstützung.

7 Quellenverzeichnis

[1] www.mpi-ploen.mpg.de 15.10.07

[2] www.mpg.de 22.11.07

[3] Manfred Milinski; „The Major Histocompatibility Complex, Sexual Selection, and Mate Choice“; 2006; Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics

[4] Janeway, CA; Travers, P; Walport M; Shlomchik MJ: Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, 5.Auflage, 2002

[5] Campbell, NA; Reece, JB: Biologie, Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage, 2003

[6] vts.uni-ulm.de/docs/2001574/vts_574.pdf (22.11.07)

www.bio.psu.edu 22.11.07

8 Anhang

Protokoll der Vectorette-PCR

PCR 202

Template	: Vect-Lig	Sample #: 10	Volume: 20 µl
Templ.-Vol.:	2 µl		20 µl PCR buffer
			40 µl MgCl ₂
Program:	'MHClong-55' (35 cycles)		20 µl dNTP
Annealing-Temp:	55 °C		20 µl primer I
			20 µl primer II
			58 µl dH ₂ O
MasterMix per tube:	18 µl		2 µl taq

#	Species	Label	Primer I	Primer II	Notes
1	Gaac	R008_1	GA11F	KL5	
2		R110_1	"	"	
3		R008_2	"	"	
4		R110_2	"	"	
5		control	"	"	
6		R008_1	KL5	GAIExon2R_RSCA	
7		R110_1	"	"	
8		R008_2	"	"	
9		R110_2	"	"	
10		control	"	"	

'MHClong-55' – Programm des Thermocyclers

Schritt	Zeit	Temperatur	Vorgang
1	10 min	94 °C	HotStart-taq
35mal (PCR- Zyklus)	2	30 s	94 °C
	3	30 s	55 °C
	4	1 min	72 °C
5	3 min	72 °C	
6	Forever	4 °C	Wartezustand

Bei Primer KL5 handelt es sich um den Vectorette-Primer.

Protokoll der Mikrosatelliten-PCR (2.Vortest)

PCR 204

Template : DNA Sample #: 9 Volume: 10 µl

Templ.-Vol.: 1 µl	9 µl PCR buffer
	18 µl MgCl ₂
Program: 'MHCmicrosat'	9 µl dNTP
Annealing-Temp: 56 °C	9 µl primer I
Primer I: siehe unten	9 µl primer II
Primer II: siehe unten	26.1 µl dH ₂ O
MM per tube: 9 µl	0.9 µl taq

	a		b		c		d					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R012	control	R012	control	R012	control	R012	control				
B	R109		R109		R109		R109					
C	R008		R008		R008		R008					
D	R110		R110		R110		R110					
E	L011		L011		L011		L011					
F	L010		L010		L010		L010					
G	L147		L147		L147		L147					
H	L164		L164		L164		L164					

Verwendete Primer:

	Primer I	Primer II
a	Stn72F	Stn72R
b	Stn202F	Stn202R
c	MS_sc131_2F	MS_sc131_2R
d	MS_sc131_3F	MS_sc131_3R