# Qualifikationsphase – LK UV G1 und GK UV G1(Speicherung und Expression genetischer Information)

**Leitfragen***Wie können sich Veränderungen der DNA auf die Genprodukte und den Phänotyp auswirken?*[Teil A für GK und LK]

*Mit welchen molekularbiologischen Verfahren können zum Beispiel Genmutationen festgestellt werden?*[Teil B für LK]

**Didaktisch-methodische Anmerkungen***Kontext:* Resistenzen bei Eukaryoten (z. B. Herzglykosid-Resistenz beim Monarchfalter) [GK und LK]

*Kontext:* Analyse von Genmutationen (z. B. Diagnose von Resistenzen) [LK]

**Informationen für Lehrkräfte**Am Beispiel der Resistenz des Nordamerikanischen Monarchfalters (*Danaus plexippus*) gegen Ouabain können verschiedene Aspekte der oben genannten Leitfragen thematisiert werden. Zunächst werden hier Sachinformationen zur Unterstützung der Gestaltung des Unterrichts zusammengefasst. Im dann folgenden Material für die Lerngruppe sind Zusatzinformationen für die Lehrkraft in blau dargestellt.

Für Grund- und Leistungskurs (Teil A)

*zentrale Unterrichtssituationen:*

* Formulierung theoriegeleiteter Hypothesen zur Ursache der Resistenz unter Berücksichtigung der verschiedenen Systemebenen (molekulare Ebene bis Ebene des Organismus)
* Ableitung der Genmutationen unter Berücksichtigung der molekularen Ebenen (DNA, RNA, Protein) sowie der phänotypischen Auswirkungen auf Ebene der Zelle bzw. des Organismus (Einbezug der Basiskonzepte Struktur und Funktion und Information und Kommunikation)
* Reflexion der Ursache-Wirkungsbeziehungen unter sprachsensiblem Umgang mit funktionalen und kausalen Erklärungen

Zusätzlich im Leistungskurs (Teil B)

*zentrale Unterrichtssituationen:*

* Erläuterung der PCR-Methode unter Berücksichtigung der Funktionen der Komponenten eines PCR-Ansatzes und des Ablaufs der PCR
* Diskussion der möglichen Fehlerquellen und der Notwendigkeit von Negativkontrollen bei Anwendungen der PCR

**Sachinformationen für Lehrkräfte**Der Nordamerikanische Monarchfalter (*Danaus plexippus*) ist eine sehr gut untersuchte Schmetterlingsart. Die Monarchfalter überwintern in Mittelamerika und fliegen in großen Schwärmen im Frühjahr nach Norden, zum Teil bis nach Kanada. Die Monarchfalter sind auffällig orange-schwarz gezeichnet, ihre Raupen tragen eine auffällige schwarz-weiß-gelbe Ringelung. Die Monarchfalter-Weibchen suchen zur Eiablage bevorzugt Pflanzen der Gattung *Asclepias* auf. Diese Pflanzen enthalten verschiedene Giftstoffe, welche die Natrium-Kalium-Ionenpumpe hemmen und zur Gruppe der Herzglykoside zählen. Die Raupen von *Danaus plexippus* nehmen diese Giftstoffe mit der Nahrung auf und speichern sie. Raupen, Puppen und auch Falter enthalten daher deutlich höhere Herzglykosid-Konzentrationen als die *Asclepias*-Pflanzen. Während die Monarchfalter gegen das Gift resistent sind, bewirkt das gespeicherte Herzglykosid einen geringeren Fraßdruck durch potenzielle Fressfeinde wie etwa Vögel, Echsen oder Frösche. (<https://de.wikipedia.org/wiki/Monarchfalter#Larven>)

Mögliche Vernetzungen

* Neurobiologie: Natrium-Kalium-Ionenpumpe
* Stoffwechselphysiologie: Transportproteine
* Ökologie: Räuber-Beute Beziehungen, ökologische Nische, Bedeutung und Erhalt der Biodiversität
* Evolution: Selektion, vergleiche auch Zusatzmaterial zu molekularbiologischen Konvergenzen

### Materialien zur Erarbeitung Teil A (GK und LK)

### Möglicher Einstieg

#### Monarchfalter gefressen: Blauhäher muss brechen

Der Nordamerikanische Monarchfalter ist ungenießbar für die meisten Vögel in Nordamerika. Etwa der Blauhäher, ein häufiger Fressfeind von Schmetterlingen, meidet den Monarchfalter (*Danaus plexippus*) aufgrund von Vergiftungserscheinungen wie Erbrechen. Die Monarchfalter enthalten neben Bitterstoffen ein Herzglykosid, das die Schmetterlingsraupen aus ihren Futterpflanzen aufnehmen und speichern. Herzglykoside hemmen die Natrium-Kalium-Ionenpumpe.

Bildquelle (gemeinfrei) <https://de.wikipedia.org/wiki/Monarchfalter#/media/Datei:BBGMonarchButterflyWings.jpg>

### Mögliche Problemfrage

Wie kommt es zustande, dass dieses Herzglykosid dem Monarchfalter nicht schadet?

Aspekte

* Sachinformationen zur Bedeutung der Natrium-Kalium-Ionenpumpe müssen ergänzt werden, sofern Neurobiologie noch nicht unterrichtet worden ist
* ggf. Reaktivierung von Vorwissen zur Bedeutung der Natrium-Kalium-Ionenpumpe
* Bezüge zur Enzymaktivität und Raumstruktur herstellen (evtl. Hilfekarten)
* Code-Sonne bereitstellen

Überblick:

* Aus den Nukleotidsequenzen/Aminosäuresequenzen lassen sich eine Missense-Mutation an Triplett 122 bei der Sequenz des Monarchfalters und eine Missense-Mutation an Triplett 119 bei der Sequenz des Bärenspinners ableiten. Ansonsten handelt es sich um stumme Mutationen. Hier kann die Bedeutung der Mutationen exemplarisch herausgearbeitet werden, da aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Ouabain gezielt nach Abweichungen zwischen der Sequenz des Monarchfalters und den Sequenzen der beiden anderen Insekten gesucht werden muss. Anschließend kann noch einmal der Bezug zur Problemfrage hergestellt werden. Dann schließt sich eine Klassifizierung der verschiedenen Typen von Genmutationen, Einordnung von Punktmutationen und deren Auswirkungen an.

Zusätzlich im Leistungskurs: Teil B

* Anschließend kann an diesem Beispiel die Methode der PCR im LK thematisiert werden. Dazu gibt das Material B Hinweise und Anregungen. Nach dem Einstieg sollte die methodische Vorgehensweise des Verfahrens PCR erarbeitet werden. Anschließend kann auf Basis der vorliegenden Sequenzdaten exemplarisch das Verfahren nachvollzogen werden.

### Materialien zur Erarbeitung Teil A (GK und LK)

Aufgaben

1. Erklären Sie die Bedeutung der Natrium-Kalium-Ionenpumpe und werten Sie Abbildung 1 aus.
2. Ermitteln Sie für alle in Tabelle 1 angegebenen Sequenzausschnitte die Aminosäuresequenzen unter Verwendung der Code-Sonne.
3. Entwickeln Sie eine Hypothese zur Erklärung der Resistenz des Monarchfalters gegen die Herzglykoside seiner Futterpflanzen.

Herzglykoside wie zum Beispiel Ouabain hemmen die Natrium-Kalium-Ionenpumpe, die unter ATP-Verbrauch Natriumionen aus dem Zellinneren heraus und Kaliumionen in das Zellinnere transportiert. Ouabain bindet, wie auch andere Herzglykoside, an einen 12 Aminosäuren langen Bereich der katalytischen Untereinheit der Natrium-Kalium-Ionenpumpe, der in den Extrazellulärraum ragt.

Um die Wirkung von Ouabain auf die Natrium-Kalium-Ionenpumpe von Monarchfalter (*Danaus plexippus*) und anderen Insekten zu vergleichen, wurden die Natrium-Kalium-Ionenpumpen von Tabakschwärmer (*Manduca sexta*), Bärenspinner (*Creatonotus transiens*) und Monarchfalter untersucht (Abbildung 1).

Abbildung 1: Wirkung von Ouabain auf die Natrium-Kalium-Ionenpumpen verschiedener Insekten

Die Nukleotidsequenzen der Ouabain-Bindestelle wurden für alle drei Insektenarten bestimmt. Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt des nicht-codogenen DNA-Strangs unter Angabe der Triplett-Nummern (Tabelle 1). Für *M. sexta* und *C. transiens* sind jeweils nur die von *D. plexippus* abweichenden Nukleotide angeben.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Art 5ʹ... | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 |  |
| *D. plexippus* | C | A | G | G | C | G | A | G | T | A | C | T | G | T | T | G | A | A |  |
| *M. sexta* |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | C |  |  | A |  |  |  |  |
| *C. transiens* |  |  |  |  |  | T |  |  |  |  |  | C |  |  | A |  |  | G |  |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Art | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | … |
| *D. plexippus* | G | A | A | C | C | C | T | C | G | G | A | C | G | A | C | C | A | C |  |
| *M. sexta* |  |  |  |  |  |  |  |  | C |  |  | T |  |  | T | A |  |  |  |
| *C. transiens* |  |  |  |  |  | A | G |  |  |  |  | T |  |  |  | A |  | T |  |

Abbildung 1 und Tabelle 1: Holzinger F, Frick C, Wink, M (1992): Molecular basis for the insensitivity of the monarch (*Danaus plexippus*) to cardiac glycosides. FEBS 314, No3, 477–480 [URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1334851/]

### Lösungsvorschlag Teil A

1. Bedeutung der Natrium-Kalium-Ionenpumpe:
Leckstrom an Neuronen und anderen Zelltypen, Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten von Natriumionen und Kaliumionen durch dieses Transmembranprotein; ATP-verbrauchender Transportmechanismus; Ionengradient für Erregungsleitung essentiell, Natriumionengradient auch für sekundär aktiven Transport vieler Stoffe bedeutend
Abbildung 1:
Die Natrium-Kalium-Ionenpumpe von Bärenspinner und Tabakschwärmer wird durch Konzentrationen von 10–5 mol/l Ouabain fast vollständig gehemmt und bei 10–3 mol/l Ouabain inaktiviert. Die Aktivität der Natrium-Kalium-Ionenpumpe des Monarchfalters liegt auch bei Konzentrationen von 10–5 mol/l bis 10–3 mol/l Ouabain nahezu bei 100 %.
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Natrium-Kalium-Ionenpumpe des Monarchfalters durch Ouabain in ihrer Aktivität nicht beeinträchtigt wird.
2. Aminosäuresequenzen (Sequenzausschnitt der Ouabain-Bindestelle)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Art | 111 |  |  |  |  |  |  |  | 119 |  |  | 122 |
| *D. plexippus* | Gln | Ala | Ser | Thr | Val | Glu | Glu | Pro | Ser | Asp | Asp | His |
| *M. sexta* | Gln | Ala | Ser | Thr | Val | Glu | Glu | Pro | Ser | Asp | Asp | Asn |
| *C. transiens* | Gln | Ala | Ser | Thr | Val | Glu | Glu | Pro | Ala | Asp | Asp | Asn |

1. Hypothese:
An der ersten Position des Tripletts 122 kommt es durch eine Substitution von A zu C bei der Proteinbiosynthese zum Einbau von Histidin anstelle von Asparagin in die Aminosäuresequenz der Natrium-Kalium-Ionenpumpe beim Monarchfalter. Da eine andere Aminosäure durch das mutierte Triplett codiert wird, handelt es sich um eine Missense-Mutation. Dies kann die Raumstruktur der Ouabain-Bindestelle so verändern, dass Ouabain nicht mehr bindet und daher die Aktivität der katalytischen Untereinheit der Natrium-Kalium-Ionenpumpe des Monarchfalters nicht beeinträchtigen kann. Auch andere Herzglykoside wie etwa aus den *Asclepias*-Arten können daher nicht mehr an diesen Bereich binden. Diese Unempfindlichkeit ermöglicht dem Monarchfalter die Speicherung von Herzglykosiden, die über die Nahrung aus den *Asclepia*-Arten aufgenommen und gespeichert werden.

Funktionale Erklärung: Durch den Austausch von Asparagin gegen Histidin an Position 122 wird die Raumstruktur der Herzglykosid-Bindestelle der Natrium-Kalium-Ionenpumpe so verändert, dass keine Bindung des Wirkstoffs mehr erfolgen kann.

Kausale Erklärung: Die Raumstruktur eines Proteins ist von seiner Aminosäuresequenz abhängig, weil die biochemischen Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten die Ausbildung einer bestimmten Raumstruktur induzieren.

### Materialien zur Erarbeitung Teil B (LK)

### Möglicher Einstieg

Das Genom des Monarchfalters ist groß. Wie kann ein Teilbereich der DNA gezielt analysiert werden?

### Mögliche Problemfrage

Mit welchen Verfahren kann DNA gezielt vervielfacht werden?

Aspekte

* Reaktivierung von Vorwissen zur Replikation, zum Genaufbau bei Eukaryoten und zur Prozessierung (evtl. Hilfekarten anbieten)
* Methode der PCR etwa mithilfe des Lehrbuchs oder von Animationen erarbeiten
* Anwendung auf konkretes Beispiel bei Monarchfalter, Tabakschwärmer und Bärenspinner zur Vertiefung (unterschiedliche Primer wegen Substitutionen an Primer-Bindestelle)
* Ggf. Erweiterung möglich (Introninsertion in genomischer DNA an Position 42, verschiedene Intron-Längen liegen vor)
* Ggf. Methode der Gelelektrophorese erarbeiten und auf die PCR-Produkte anwenden lassen

### Materialien zur Erarbeitung Teil B (LK)

Aufgaben

1. Geben Sie die DNA-Sequenzen der Primerpaare für alle drei Insektenarten auf Basis von Abbildung 1 an und erklären Sie die Bedeutung der Primerpaare für die PCR.
2. Beschreiben Sie kurz den Prozess der RNA-Prozessierung bei Eukaryoten.
3. Berechnen Sie die Größe der zu erwartenden PCR-Produkte unter Berücksichtigung der Introns für die drei Insektenarten
4. Planen Sie Negativkontrollen zur Verifizierung der PCR-Ergebnisse.
5. Skizzieren Sie ein zu erwartendes Gelbild der PCR-Produkte unter Angabe eines Größenmarkers.

Ausgehend von genomischer DNA des Monarchfalters *(Danaus plexippus)* konnte mithilfe der PCR gezielt ein Bereich aus dem Gen für die katalytische Untereinheit der Natrium-Kalium-Ionenpumpe vervielfältigt werden. Dieser Bereich wurde anschließend sequenziert. Mit dem gleichen Verfahren konnten auch die entsprechenden DNA-Bereiche von Tabakschwärmer (*Manduca sexta*) und Bärenspinner (*Creatonotus transiens*) analysiert werden. Die ermittelten Sequenzen sind in Abbildung 1 dargestellt. Die eingesetzten Primerpaare sind mit Primer A und Primer B gekennzeichnet, wobei die Primer-Sequenzen sich bei den drei untersuchten Insektenarten unterscheiden.

|  |
| --- |
| **A Nukleotidsequenzen** |
|  | Primer A |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5ʹ... | 1 |  | 11 |  | 21 |  | 31 |  | 41 |  | 51 |  |
| *D. plexippus* | C | T | G | T | G | G | A | T | T | G | G | A | G | A | G | A | T | T | C | T | A | T | G | C | T | T | T | A | T | T | G | C | C | T | A | T | G | G | T | A | T | T | C | A | G | G | C | G | A | G | T | A | C | T | G | T | T | G | A | A |
| *M. sexta* | C | T | G | T | G | G | A | T | C | G | G | T | G | C | G | A | T | T | C | T | T | T | G | C | T | T | T | A | T | T | G | C | A | T | A | T | G | G | A | A | T | C | C | A | G | G | C | G | A | G | T | A | C | C | G | T | A | G | A | A |
| *C. transiens* | C | T | G | T | G | G | A | T | T | G | G | A | G | A | G | A | T | T | C | T | A | T | G | C | T | T | T | A | T | T | G | C | C | T | A | T | G | G | A | A | T | T | C | A | G | G | C | T | A | G | T | A | C | C | G | T | A | G | A | G |
|  | 61 |  |  |  |  |  |  |  |  | 71 |  |  |  |  |  |  |  |  | 81 |  |  |  |  |  |  |  |  | 91 |  |  |  |  |  |  |  |  | 101 |  |  |  |  |  |  |  | 111 |  |  |  |  |  |  |  |
| *D. plexippus* | G | A | A | C | C | C | T | C | G | G | A | C | G | A | C | C | A | C | T | T | G | T | A | T | C | T | C | G | G | A | A | T | C | G | T | A | T | T | G | G | C | G | G | C | T | G | T | C | G | T | T | A | T | C | G | T | G | A | C | T |
| *M. sexta* | G | A | A | C | C | C | T | C | C | G | A | T | G | A | T | A | A | C | T | T | G | T | A | C | C | T | T | G | G | C | A | T | T | G | T | A | T | T | G | G | C | G | G | C | T | G | T | C | G | T | G | A | T | C | G | T | T | A | C | G |
| *C. transiens* | G | A | A | C | C | A | G | C | G | G | A | T | G | A | C | A | A | T | C | T | T | T | A | C | C | T | C | G | G | C | A | T | C | G | T | A | T | T | G | G | C | A | G | C | T | G | T | C | G | T | G | A | T | C | G | T | T | A | C | G |
|  | 121 |  |  |  |  |  |  |  | 131 |  |  |  |  |  |  |  | 141 |  |  |  |  |  |  |  | 151 |  |  |  |  |  |  |  | 161 |  |  |  |  |  |  |  | 171 |  |  | ...3ʹ |
| *D. plexippus* | G | G | A | A | T | A | T | T | C | T | C | T | T | A | C | T | A | C | C | A | A | G | A | A | A | G | G | A | A | G | T | C | T | T | C | C | A | A | G | A | T | C | A | T | G | G | A | A | T | C | C | T | T | C | A | A | A | A | A | C |
| *M. sexta* | G | G | T | A | T | A | T | T | C | T | C | A | T | A | C | T | A | C | C | A | C | G | A | A | A | G | G | A | A | G | T | C | A | T | C | T | A | A | G | A | T | C | A | T | G | G | A | A | T | C | G | T | T | C | A | A | A | A | A | C |
| *C. transiens* | G | G | T | A | T | C | T | T | C | T | C | A | T | A | C | T | A | T | C | A | G | G | A | A | A | G | G | A | A | G | T | C | A | T | C | G | A | A | G | A | T | C | A | T | G | G | A | A | T | C | G | T | T | C | A | A | A | A | A | C |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | Primer B |

|  |
| --- |
| **B Intronsequenzen** |
| *D. plexippus* | C | T | G | G | T | A | A | G | T | T | G | T | A | G | G | C | T | C | T | T | A | A | T | A | A | C | T | T | A | A | G | T | C | A | T | C | T | A | T | T | A | T | T | T | A | T | T | T | T | T | G | T | G | A | G | A | T | G | T | T |
|  | G | A | A | T | A | T | A | T | T | A | C | A | A | C | A | A | C | A | T | T | A | T | G | A | A | A | C | T | C |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| *M. sexta* | C | A | G | G | T | A | A | G | T | T | A | A | T | A | A | G | C | A | T | G | T | C | A | A | T | T | A | C | A | T | A | T | A | G | C | G | T | T | A | T | C | A | A | C | G | A | A | A | A | A | A | T | A | T | A | A | T | T | T | C |
|  | G | G | A | A | T | A | A | A | A | T | A | A | T | C | C | T | C | A | C | A | T | A | A | G | A | C | A | G | C | C | T | A | C | C | A | C | G | A | T | G | G | A | C | T | C | C | T | T | T | G | G | G | T | G | A | A | T | A | T | T |
|  | C | C | C | A | T | A | T | C | A | A | A | T | A | A | A | A | T | T | C | T | T | T | T | A | C | T | T | A | A | T | T | T | A | T | A | C | C | A | T | C | A | T | C | A | C | T | T | A | A | C | A | A | A | C | G | A | A | A | A | A |
|  | C | A | T | C | A | A | T | G | A | A | T | T | G | G | C | T | G | G | C | T | G | G | T | C | T | G | A | T | C | A | T | C | A | G | T | A | T | A | A | A | C | T | G | A | A | G | T | T | T | T | T | G | T | C | T | T | C |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| *C. transiens* | C | A | G | G | T | A | A | G | T | A | A | C | G | C | A | A | C | A | A | A | T | A | C | A | A | T | A | T | A | C | T | C | A | A | T | A | G | C | A | A | G | T | A | T | A | C | G | A | C | T | T | A | T | A | A | T | T | A | A | T |
|  | A | T | G | G | C | A | A | A | T | A | C | T | C | C | T | C |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Abbildung 1: Vergleich von Nukleotidsequenzen. **A** Ausschnitt der codierenden DNA-Bereiche von *D. plexippus*, *M. sexta* und *C. transiens*. Der Pfeil zeigt die Insertionsstelle des arteigenen Introns im Genausschnitt. **B** Die arteigenen Intronsequenzen sind im unteren Bereich aus Gründen der Übersichtlichkeit separat dargestellt.

Abbildung 1: Holzinger F, Frick C, Wink, M (1992): Molecular basis for the insensitivity of the monarch (*Danaus plexippus*) to cardiac glycosides. FEBS 314, No3, 477–480

### Lösungsvorschlag Teil B (LK)

1. Primerpaare
Hier ist ein Hinweis zur Ausrichtung des Primerpaares sinnvoll: Primer A entspricht der angegeben Sequenz, Primer C muss in der komplementären Sequenz angegeben werden. Konvention ist bei Sequenzangaben, dass sie immer von 5‘ nach 3‘ erfolgen. Für die Lerngruppe ist es vermutlich einfacher, wenn Primer C von 3‘ nach 5‘ angegeben wird.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Art | Primer A | Primer B |
| *D. plexippus* | 5‘ CTGTGGATTGGAGAGATTC 3‘ | 5‘ GTTTTTGAAGGATTCCATGA 3‘ |
| *M. sexta* | 5‘ CTGTGGATCGGTGCGATTC 3‘ | 5‘ GTTTTTGAACGATTCCATGA 3‘ |
| *C. transiens* | 5‘ CTGTGGATTGGAGAGATTC 3‘ | 5‘ GTTTTTGAACGATTCCATGA 3‘ |

1. Transkription führt zu prä-mRNA, Spleißen der Exons und Entfernen der Introns, Capping und Poly-Adenylierung
2. *D. plexippus*: 180bp + 89bp = 269bp;
*M. sexta*: 180bp + 297bp = 477bp;
*C. transiens*: 180bp + 76bp = 256bp
3. Negativkontrollen müssen Ansätze sein, bei denen genau eine essentielle Komponente des vollständiges Ansatzes fehlt:
vollständiger Ansatz – genomische DNA des jeweiligen Insekts, Puffer, Wasser, Primerpaar, Desoxy-Nukleotide, Taq-Polymerase;
also
- Ansatz ohne Taq-Polymerase
- Ansatz ohne Primerpaar
- Ansatz ohne Matrizen-DNA
- Ansatz ohne Nukleotide
4. Skizze des zu erwartenden Gelbilds