

# Prüfung des Vorhandenseins des Bakteriums *Wolbachia Pipientis* in Bachflohkrebsen mittels PCR und Elektrophorese Gel

Cate Vogel

G4b

Maturitätsarbeit

Betreuung: Simon Tschärner

Eingereicht am 11.12.2023



**Kantonsschule  
Hottingen**



# Inhaltsverzeichnis

Vorwort .....	III
Themenfindung .....	III
Danksagung .....	III
1. Einleitung .....	1
1.1 Fragestellung .....	1
1.2 Wolbachia.....	1
1.2.1 Manipulation und Überlebensstrategien .....	1
1.2.2 Nutzung von Wolbachia als indirektes Insektizid .....	3
1.2.3 Klassifizierungen von Wolbachia .....	3
1.3 Gammarus fossarum.....	4
1.4 Das Verfahren.....	5
2. Erklärung der Methoden und Komponenten .....	5
2.1 Sezierung und DNA-Extraktion .....	5
2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	6
2.3 Gel Elektrophorese .....	8
3. Mein Verfahren und meine Materialien .....	11
3.1 Bachflohkrebse sammeln und bestimmen .....	11
3.2 Sezieren .....	12
3.3 Extraktion der DNA-Probe.....	12
3.4 PCR .....	15
2.5 Gel Elektrophorese .....	17
4. Resultate .....	21
4.1 Erster Versuch .....	21
4.2 Lösungsansätze.....	21
4.2.1 Mehr DNA.....	21

4.2.2 Q Solution .....	21
4.2.3 Andere Primer .....	21
4.3 Zweiter Versuch: .....	22
Fazit.....	24
Literaturverzeichnis.....	26
Abbildungsverzeichnis .....	29
Arbeitsjournal.....	30
Anhang .....	32
Erklärung.....	41

## **Vorwort**

### **Themenfindung**

Ich begann im Sommer 2022 mir Gedanken über das Thema meiner Maturitätsarbeit zu machen und fing darauffolgend auch an, mir zu jedem Fach, das mich interessiert, mehrere Ideen auszudenken und diese mit den jeweiligen Fachlehrpersonen zu besprechen. Nach einem Gespräch mit Herrn Tschärner über mögliche Arbeiten, war zwar das Thema noch nicht klar, aber ich wusste, dass ich etwas im biologischen Bereich machen wollte. Nachdem viele Ideen entweder wegen deren Schwierigkeit oder Komplexität verworfen wurden, erwähnte Herr Tschärner das Projekt: «The Wolbachia Project: Discover the Microbes Within!», zu welchem er eine Weiterbildung hatte. Er meinte, dass das doch ein spannendes Thema sein könnte und schickte mir ein Dossier, in dem ich mich in das Thema einlesen konnte. Schnell war für mich klar, dass mich das Thema interessiert und es eine Maturitätsarbeit wäre, durch die ich sehr viel lernen würde, aber auch nie das Interesse verlieren würde. Vor allem überzeugte mich das Arbeiten im Labor mit DNA und das Verstehen von PCR, welches ein Begriff war, den ich von den PCR-Tests in Corona-Zeiten kannte, aber nie genau wusste, was es war und wie es funktionierte. Da ich kein Vorwissen zu Arthropoden (Gliederfüssler) hatte und kein Beispiel kannte, welches es in der Schweiz gab und für mich leicht zugänglich war, schlug mir Herr Tschärner den Bachflohkrebs vor. Herr Tschärner wusste, dass er leicht zu fangen ist und es in der Nähe der Schule einen idealen Ort zum Fangen gibt. Somit hatte ich mein Thema gefunden.

### **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich gerne einen grossen Dank an Herrn Simon Tschärner aussprechen, der mich während der ganzen Arbeit stark unterstützte und auch viele Mittage und Abende mit mir in der Schule blieb und das Experiment begleitete.

Ein weiterer Dank geht an Frau Susanne Uehlinger, die die Laborantin der Biofachschaft an der KSH ist und mir beim Bestellen der Materialien half, mir beim Zusammenstellen des PCR-Rezeptes und der Umschreibung eine grosse Hilfe war und mich auch laufend motivierte.

Zudem geht ein Dankeschön an Frau Sarah Bordenstein und der Pennsylvania University, die mir Negativ- und Positivkontrollen und Primer gratis aus den USA zuschickten.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern danken, die mir die ganze Arbeit finanzierten und als es wegen der hohen Materialkosten unklar war, ob ich die Maturitätsarbeit weiter

durchziehen könnte, mich weiter ermutigten. Ihnen war es wichtiger, dass ich eine Maturitätsarbeit schreiben konnte, die mich interessiert und aus der ich auch etwas lernen konnte. Das ist nicht selbstverständlich.

# **1. Einleitung**

## **1.1 Fragestellung**

Ich setzte mir am Anfang dieser Arbeit vier Ziele, die ich erreichen wollte:

1. Das Bakterium *Wolbachia Pipientis* besser kennenlernen.
2. Die Frage «Kann sich das Bakterium *Wolbachia Pipientis* in Bachflohkrebsen, aus einem Zürcher Bach, einnisten?» beantworten.
3. Die Methoden, um diese Frage zu beantworten, verstehen.
4. Selbstständig ein wissenschaftliches Experiment durchführen und bei Misserfolg Lösungsansätze erarbeiten.

## **1.2 Wolbachia**

*Wolbachia* ist ein gramnegatives Bakterium, das sich in einem Grossteil von Arthropoden und Filariennematoden einnisten und diese infizieren kann. Es kann sich mittels vertikaler oder horizontaler Übertragung innerhalb der gleichen Art oder zwischen anderen Arten verbreiten. Zusätzlich fördert es seine Ausbreitung sowohl durch Manipulation der Reproduktion des Wirts, als auch Verbesserung der Fitness des Wirts. (Porter & Sullivan, 2023; Bordenstein S.R. et al., 2010)

### **1.2.1 Manipulation und Überlebensstrategien**

*Wolbachia* hat viele und komplexe Einflüsse auf ihren Wirt. Diese Symbiose kann fakultativ oder obligatorisch sein. Eine Symbiose gilt als fakultativ, wenn sich die Symbiosepartner wieder voneinander trennen und selbstständig weiterleben können. Eine Symbiose gilt als obligatorisch, wenn die Bakterien für die Fortpflanzung und das Überleben des Wirts notwendig sind und der Wirt durch das Entfernen des Bakteriums fortpflanzungsunfähig oder überlebensunfähig wird. Meist leben sie in den Geschlechtsorganen ihrer Wirte, wo sie deren Fortpflanzung und deren Entwicklung manipulieren und zu ihrem Vorteil nutzen können. (Prevot, 2015; Frei, 2010)

Das erreichen sie mittels verschiedener Strategien, die ich nachfolgend weiter erläutere:

#### Verweiblichung:

Während der Verweiblichung verwandelt sich der genetisch männliche Organismus eines Embryos in einen weiblichen. Der Organismus behält genetisch das männliche Geschlecht, die Geschlechtschromosomen bleiben die eines Männleins, jedoch können sie sich wie Weibchen fortpflanzen und Nachkommen produzieren. Androgenhormone sind zuständig für die Entwicklung der männlichen Geschlechtsmerkmale. Diese werden von Wolbachia gehemmt, wodurch die Keimdrüsen weibliche Merkmale entwickeln. Da Wolbachia nur von den Weibchen an ihre Nachfahren weitergegeben wird, fördert dies ihre Verbreitung. (Prevot, 2015; Habibi, 2016; Frei, 2010)

#### Parthenogenese:

Parthenogenese, auch Jungfernzeugung genannt, bezeichnet die unisexuelle Fortpflanzung, bei der Nachkommen aus unbefruchteten Eiern entstehen. Die Parthenogenese kann aufgrund der Anzahl an Chromosomen in zwei verschiedenen Arten unterteilt werden: einmal in haploide und einmal in diploide Parthenogenese. Diploide Eier haben 46 Chromosomen, wie die Körperzellen bei uns Menschen. Bei ihnen findet die Meiose nicht statt. Da sie schon die nötige Anzahl an Chromosomen haben, entstehen aus ihnen neue Organismen. Da keine Befruchtung stattfindet, kann kein Y-Chromosom geliefert werden und die Nachkommen werden immer weiblich sein. Das ist die diploide Parthenogenese. Wenn die vom Weibchen produzierten Eier eine Teilung durchmachen, werden aus den 46 Chromosomen 23, welche eigentlich von einem männlichen Gameten befruchtet werden sollten. Dies ist jedoch nicht immer möglich und in so einem Zustand entwickeln sich die Gameten zu haploiden Männchen, welche sich dann bisexuell fortpflanzen müssen. Dies ist die haploide Parthenogenese. Wolbachia kann verursachen, dass infizierte Männchen sich entweder nur mit infizierten Weibchen paaren können oder nur Männchen zeugen können. All dies verhindert die Entstehung von nicht infizierten Weibchen. Das Ziel hier ist, dass nur noch infizierte Weibchen oder Männchen produziert werden, da wenn infizierte Weibchen sich fortpflanzen, ihre Nachkommen automatisch auch infiziert sind. So sichert Wolbachia ihre Weitergabe von den Eltern an die nächste Generation. Wichtig zu erwähnen ist auch, dass infizierte Weibchen doppelt so viele Nachkommen produzieren können, wie nicht infizierte Weibchen. (Kunz, 2023; Prevot, 2015; Habibi, 2016)

Male Killing:

Wolbachia kann bewirken, dass die männlichen Embryos vor der Entwicklung sterben, was als Male Killing bezeichnet wird. Das heisst, es entstehen nur Weibchen, welche dank der Weitergabe der Mutter infiziert sind. (Kunz, 2023; Pevot, 2015; Habibi, 2016)

Zytoplasmatische Inkompatibilität:

Bei der Zytoplasmatischen Inkompatibilität modifiziert Wolbachia in einem infizierten Männchen sein Spermium so, dass es keine nichtinfizierten oder anders infizierten Eizellen befruchten kann. Das ist auch der Grund, warum infizierte Weibchen mehr Nachkommen produzieren können, als nicht-infizierte Weibchen produzieren können. Sie haben eine höhere daher Anzahl möglicher Paarungspartner. (Kunz, 2023; Pevot, 2015; Habibi, 2016)

(Für eine Übersicht der 4 Strategien und ihrer Auswirkungen, siehe Anhang 1)

### **1.2.2 Nutzung von Wolbachia als indirektes Insektizid**

Bei manchen Mückenarten, zum Beispiel bei Gelbfiebermücken (*Aedes aegypti*), führt Wolbachia zu Fortpflanzungsunfähigkeit. So könnte man viele männliche, infizierte Gelbfiebermücken in die Welt lassen, welche sich dann mit nicht-infizierten Weibchen paaren würden. Es würde dann jedoch kein Nachwuchs entstehen, da dieser nicht überlebensfähig wäre. Diese Mücken erleben nur eine Reproduktionsperiode, weswegen die Population der Mücken dramatisch abnehmen würde, da viel weniger Nachkommen entstehen würden. Da diese Mücken Überträger für verschieden humanpathogene Arbo-Viren sind, wie beispielsweise den Dengue Virus, für welchen es noch keine Medikamente gibt, oder den Malaria-Erreger Plasmodium, wäre dies eine Lösung, um Krankheiten zu verhindern. (Management Science for Health, 2022)

### **1.2.3 Klassifizierungen von Wolbachia**

Das Bakterium Wolbachia gehört zur Abteilung Proteobacteria. Proteobacteria gilt als die grösste und physiologisch vielfältigste Bacteriagruppe. Alle ihre Vertreter sind gramnegativ, da ihre Zellwände insbesondere aus ein- und wenigschichtigem Murein und Lipopolysacchariden bestehen. Ausserdem sind viele stickstofffixierende Bakterien und Krankheitserreger dieser Abteilung zugeteilt. Sie werden durch verwandte RNA-Sequenzen definiert. Die Proteobacteria können in fünf Klassen eingeteilt werden, welche als Präfix die griechischen

Buchstaben von Alpha bis Epsilon haben. Wolbachia Pipientis gehören zu den Alpha Proteobacteria. Diese Klasse wurde auf der Grundlage der 16s-Ribonukleinsäure (16s-rRNA) aufgestellt. Genau genommen gehört Wolbachia zur Ordnung der Rickettsiales. Die meisten Organismen dieser Ordnung sind Stoffwechselfasiten. Noch genauer gehört Wolbachia zur Familie der Anaplasmataceae. Die drei meistverbreiteten Stämme Wolbachias sind: Wolbachia pipientis, Wolbachia melophagi und Wolbachia persice. Ich testete auf Wolbachia pipientis. (Biologie-Seite, o.J.a; Biologie-Seite, o.J.b)

### 1.3 Bachflohkrebs: Gammarus fossarum

Es ist wichtig bei der Untersuchung sicher zu sein welches Tier man genau untersucht, da es zum Beispiel in diesem Fall mehrere verschiedene Bachflohkrebse gibt und nur weil eine Art infiziert werden kann,

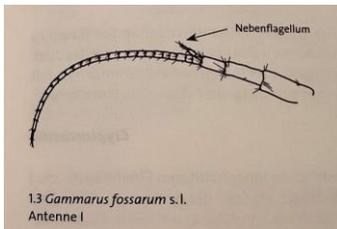


Abbildung 3: Das Nebenflagellum der ersten Antenne bei Gammarus fossarum (Altermatt et al. 2019, S. 53)



Abbildung 4: Echte Aufnahme der Nebenflagellums (Eigene Aufnahme)

heisst das nicht das alle infiziert werden können. Um die Art genau bestimmen zu können,

untersuchten wir die gefangenen Bachflohkrebse unter dem Binokular und folgten dem Gattungsschlüssel des Buches Amphipoda ((Flohkrebse) der Schweiz) der Serie Fauna Helvetica 32.

Als erstes war die erste Antenne zu betrachten (siehe Abb. 3). Ganz klar war ein Nebenflagellum zu erkennen (Siehe Abb. 4), was hiess, dass es entweder zur Gattung Gammaridae oder Bogi-diellida gehörte. Da die Antenne etwa so gross war wie 1/3 der Körperlänge konnten wir ausmachen, dass es zu den Gammardien gehört. Mit Fokus auf den Ort, an dem wir sie gefangen haben und

Abgleichung mit den Verbreitungen der verschiedenen Arten, können wir es auf zwei mögliche Arten beschränken: Gammarus fossarum und Gammarus pulex. Um die zwei Arten zu unterscheiden, schaut man sich den dritten Uropoden an (siehe Abb. 5). Da der Endopodit des Uropoden III etwa die Hälfte der Länge des Exopoditen war, war nun klar, dass es sich um ein Tierchen der Gattung Gammarus fossarum handelt.

(Altermatt et al., 2019, S.52 ff)

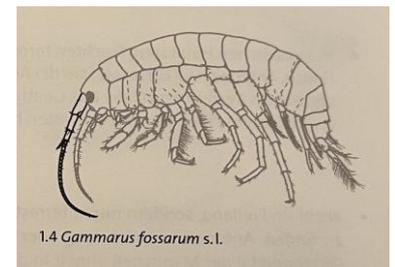


Abbildung 2: Zeichnung eines Gammarus fossarum (Altermatt et al. 2019, S. 53)

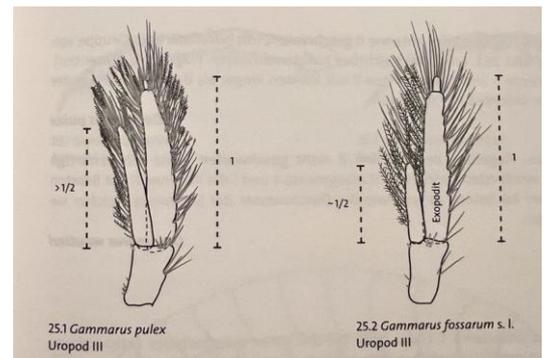


Abbildung 5: Uropoden III von Gammarus pulex und fossarum (Altermatt et al. 2019, S.101)

## 1.4 Das Verfahren

Da es sich bei *Wolbachia Pipientis* um ein intrazelluläres Bakterium handelt und es sein eigenes Genom in die DNA des Organismus einschleust, extrahieren wir die DNA des Bakteriums mit, wenn wir die DNA des Wirts extrahieren. Man kann also testen, ob ein Organismus von *Wolbachia Pipientis* infiziert ist, indem man die DNA extrahiert, sie durch PCR vervielfacht und die DNA-Probe mittels Gelelektrophorese auf das Bakterium überprüft.

## 2. Erklärung der Methoden und Komponenten

### 2.1 Sezierung und DNA-Extraktion

Bei der Sezierung wird zwischen kleinen, grossen und robusten Arthropoden unterschieden. Wenn die Grösse der Probe vergleichbar mit der Grösse einer Fruchtfliege oder einer Mücke ist, also ca. 2 mm, ist es nicht nötig, den Arthropoden zu sezieren und es kann eine Ganzkörperextraktion durchgeführt werden. Bei grossen Arthropoden, also Proben welche grösser als 2mm sind, wird der Bauch der Arthropode abgeschnitten. Ist der Bauch grösser als 2 mm, soll ein Skalpell verwendet werden, um einen Teil des Abdomens auszuschneiden. Es soll ein Teil des Abdomens sein, da sich *Wolbachia Pipientis* in den Fortpflanzungsorganen einnistet und der Abdomen am ehesten Fortpflanzungsgewebe enthält. Zu robusten Arthropoden gehören die Gliederfüsser, die ein besonders zähes Exoskelett aufweisen, wie beispielsweise eine Zecke. In diesem Fall schneidet man den Bauch vorsichtig auf und legt so die inneren Organe frei und extrahiert von dort Gewebe. Falls die zu sezierenden Tierchen in Alkohol konserviert wurden, muss man sie vorher dem Sezieren gründlich waschen, damit kein Alkohol mehr an den Tierchen ist. Danach werden sie noch abgetrocknet. (Kunz, 2023; PennState University, 2023, S.11)

Darauf folgt die Reinigung des Gewebes. Diese kann man in fünf Schritte aufteilen:

1.Zell-Lyse: Nach der Sezierung folgt das Herstellen eines Lysats. Dazu wird die Probe in einer Zell-Lyselösung eingeweicht. Dadurch wird die Probe Proteasen, beispielsweise Nukleasen, ausgesetzt, welche Proteine schneiden und damit die Zell- und Kernmembranen öffnen. Diese Zell-Lyselösung besteht aus mehreren Puffern und sollte die folgenden Komponenten beinhalten:

- EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure): Eine Säure, welche die Zellmembran destabilisiert, indem es die Nukleasenaktivität hemmt.

- SDS (Natriumlaurylsulfat): Ein Sulfat, welches die Membranen zerlegt und Proteine denaturiert (Funktioniert als den nötigen "Detergent")

- NaCl: Natriumchlorid entfernt Proteine aus der DNA, damit Proteine und SDS in gelöster Form bleiben und keine Co-Präzipitation mit der DNA passieren kann. Co-Präzipitation ist, wenn ein gelöster Stoff in einer Lösung, durch Ausfällung auf einen Träger, sich mit diesem zusammenbindet und so nicht gelöst bleibt.

-Tris: Hilft bei der Destabilisierung der Membran, indem es den pH-Wert der Lysepuffer stabilisiert.

2. Mittels Zentrifugation werden die Zelltrümmer und andere unlösliche Materialien von der löslichen DNA getrennt.

3. Um die DNA weiter zu reinigen werden zwei Waschpuffer verwendet. Allgemein gilt, dass der erste entweder aus Isopropanol oder aus einer Lösung auf Ethanolbasis, die eine geringe Konzentration an chaotropen Salzen enthält, besteht. Dieser Waschpuffer entfernt restliche Proteine und Pigmente. Im zweiten Schritt wird ein Waschpuffer mit Ethanol verwendet. Mit diesem werden die noch übrigen Salze entfernt. Dieser Schritt ist entscheidend für die Erhöhung der DNA-Ausbeute und -Reinheit.

4. Im letzten Schritt folgt die Elution der DNA. Dazu gibt man einen Elutionspuffer in die Zentrifugenröhrchen, inkubiert diese und zentrifugiert dann noch. Währenddessen wurde der Elutionspuffer durch die Matrix gezogen und mit ihr die DNA.

(Spiegato, 2022; PennState University, o.J., S.2ff; PennState University, 2023, S.12; Promega, o.J.; Qiagen, 2023)

## **2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Die DNA wird nun mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfacht, da die meisten DNA-Analysen eine grosse Menge an DNA erfordern. Die Polymerase-Kettenreaktion kopiert die DNA einer Probe und macht somit aus einem DNA-Strang zwei. Dieses Vorgehen wiederholt sich einige Male, also werden zwei zu vier, vier zu acht, acht zu 16 und so weiter, bis wir genug haben. Die DNA-Probe wird zuerst mit einem Gemisch aus Substanzen, welche ich auf der nächsten Seite noch genauer beschreiben werde, vermischt und dann in einen Thermocycler gelegt. Im Thermocycler durchläuft die Probe mehrere Zyklen. Ein PCR-Zyklus kann in drei Hauptschritte unterteilt werden:

1. Im ersten Schritt wird die Probe auf ca. 94 Grad Celsius erhitzt. Bei dieser Temperatur findet die Denaturierung des Doppelstrangs der DNA statt und es entstehen zwei einzelne, komplementäre DNA-Stränge.
2. Auf die Denaturierung folgt die Annealing Phase. Während dieser Phase wird die Temperatur, in unserem Fall auf 49 Grad Celsius, gesenkt, wo sich dann die Primer für die jeweilige DNA an den Einzelstrang anlagern. Die genaue Temperatur variiert und ist abhängig von der genauen Länge und Sequenz der Primer und liegt generell ca. 1-2 Grad Celsius unter der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer.
3. Der dritte und letzte Schritt ist die Elongation (Extension). Dabei wird die Temperatur wieder erhöht, hier auf 72 Grad Celsius, so dass das Enzym Taq Polymerase Nukleotide an den Matrizenstrang komplementär anfügen kann. Dies beginnt bei den Primern. Die Ergänzung endet beim ersten Stopcodon.

(PennState University, 2021, S. 5; Frei, 2010)

Im Falle eines infizierten Tierchens wird nicht nur die DNA des Wirts, sondern auch die des Bakteriums vervielfacht. Da es verschiedene DNAs gibt, werden genau zwei spezifische Gene gezielt vervielfacht. Das CO1-Gen (Cytochrom c Oxidase 1), welches ein Bestandteil des Mitochondriums ist, wird für die Antrophoden verwendet. Eine einzige tierische Zelle kann hunderte bis tausende Mitochondrien enthalten. Jedes Mitochondrium kodiert wiederum mehrere Kopien mitochondrialer DNA (mtDNA). Deshalb ist das genaue CO1-Gen ein idealer Kandidat für die PCR-Amplifikation. Für das Wolbachia Pipientis spezifische Gen wird 16s-rRNA-Gen verwendet. Wie CO1 beinhaltet es eine kennzeichnende DNA-Sequenz, die einen allgemeinen Nachweis durch PCR ermöglicht. Das heisst, wenn das Wolbachia in dem Arthropoden vorkommt, wird das Wolbachia 16s rRNA-Gen amplifiziert. Diese gezielte PCR-Amplifikation funktioniert mittels Primer. Primer sind kleine, generell ca. 20 Nukleotid lange, DNA-Abschnitte, die so entworfen sind, dass sie nur ein bestimmtes Gen oder einen bestimmten Abschnitt des DNA-Stranges binden und verstärken. Sie sind nötig, da sich die DNA-Polymerase nur an ein bestehendes Nukleotid anhängen kann. DNA-Polymerase ist das Enzym, das Nukleotide an die einzelsträngige DNA anhängt. Zur Vorbereitung für die PCR bereitet man ein Gemisch vor, bevor man die DNA hinzugibt und diese DNA in einen Thermocycler gibt. Dieses Gemisch besteht aus den folgenden Substanzen:

(PennState University, 2021, S.3; Frei, 2010)

- Primer: vorwärts und rückwärts Primern, in diesem Fall insgesamt vier da wir zwei verschiedene Gene vervielfachen wollen,
- Puffer: einen Puffer, welcher die pH-Wert-Konditionen beibehält und durch Beinhaltung von Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ) die Primer-Bindung fördert,
- dNTP (Desoxyribose-Nukleotidtriphosphat) mix: dNTPs sind künstliche Nukleotide, die während der PCR gebraucht werden, um neue DNA-Stränge zu synthetisieren.
- HotStarTaq DNA Polymerase: HotStar Taq DNA Polymerase ist eine modifizierte Form einer DNA-Polymerase, die aus dem gramnegativem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde und in *E. coli* (*Escherichia coli*) kloniert wurde. *E. coli* sind Bakterien, die in menschlichen aber auch tierischen Därmen vorkommen. Dort ist ihre Aufgabe, uns vor dem Befall durch andere Bakterien zu schützen und die Funktionen des Magen-Darm-Systems zu sichern. Die Taq DNA-Polymerase bildet Phosphodiester-Bindungen und verbindet so den wachsenden DNA-Strang und das dNTP. Danach katalysiert sie die Reaktion. Das geschieht durch Entfernen des Gamma- und Beta-Phosphats aus dem Triphosphat des dNTPs.

(Li Linguas, 2021; Qiagen, 2010, S.7; Gentside, 2018; PennState University, 2021a, S.6; Reindl, 2021)

## 2.3 Gel Elektrophorese

Zur Untersuchung der PCR-Produkte wurde eine Gel Elektrophorese genutzt. Eine Elektrophorese wird als das Wandern geladener Teilchen in einem elektrischen Feld definiert. Während dieser Wanderung werden ionische (negativ oder positiv geladene) Substanzen nach Ladung und Grösse getrennt. Im ersten Schritt wird ein Agarose Gel hergestellt. Dazu verdünnt man erstmals mittels destilliertem Wasser einen konzentrierten TAE-Puffer von 50x zu einem 1x Puffer in einem Erlenmeyerkolben. Zu diesem fügt man dann das angegebene Gewicht an Agarose Pulver. Der TAE-Puffer (Tris-acetat-EDTA) ermöglicht den Nukleinsäuren die Wanderung durch die Agarosematrix. Zusätzlich hält der Puffer den pH-Wert konstant und die Ionenkonzentration aufrecht. Um das Agarose Pulver aufzulösen, erwärmt man das Gemisch in der Mikrowelle, bis sich das ganze Pulver aufgelöst hat und man gar nichts mehr im Wasser sieht. Nun muss das Gemisch bis auf 60 Grad Celsius abkühlen. Die Temperatur misst man mit einem Thermostat. Die Festigung passiert durch das Quervernetzen von Polymersträngen. Sobald es abgekühlt hat, giesst man es in die Giessform, die zur

Elektrophoresekammer dazugehört und wartet, bis es erhärtet ist. Dies dauert ca. 20 Minuten. (Edvotek, 2015, S.13; TeachersCollegesj, 2019)

Während man wartet, bereitet man die DNA-Proben vor, denn diese müssen noch eingefärbt werden, damit man sie während der Elektrophorese beobachten kann und sehen kann, ob sie in die richtige Richtung laufen. Dies macht man mit einem DNA-Gel-Ladefarbstoff, welchen man einfach zu den DNA-Proben in die PCR-Tuben füllt und es dann mit leichtem Dagegen-Klopfen vermischt. Sobald das Gel fest ist,

kann man die Seitenwände und den Kamm (siehe Abb. 6) sorgfältig entfernen und die Giessform samt Gel in die Elektrophoresewanne setzen. Hier ist es wichtig, dass man die Taschen (siehe Abb. 7), in welche später die DNA-Proben gefüllt werden, beim negativen Pol hat. Es entsteht ein elektrisches Feld, da an einem Ende des Gels eine negative Elektrode (Kathode) und am anderen Ende eine positive Elektrode



Abbildung 6: Kamm für das Agarose Gel (eigene Aufnahme)



Abbildung 7: Durch Kamm entstandenen Taschen im Agarose Gel (eigene Aufnahme)

(Anode) entsteht und diese durch Wasser geleitet werden. Da DNA wegen der Phosphate negativ ist und Wolbachia ein gramnegatives Bakterium ist, werden sie von der negativen Elektrode zur positiven wandern. Da die Wolbachia-DNA und die Arthropoden-DNA jedoch andere Längen haben, werden sie unterschiedlich weit wandern und dies kann man dann im Gel betrachten. Das Agarose Gel fungiert als eine Art Sieb, da das Gel kleine Poren gebildet hat, durch die die DNA-Proben hindurch gehen müssen. Kleine DNA-Moleküle bewegen sich leichter und schneller durch die Poren als längere. (PennState University, 2021b, S.3; Edvotek, 2015, S.13; ETH; o.J., S.117f; Kalberer, o.J.)

Nachdem man die Giessform sorgfältig in die Wanne gelegt hat, erstellt man eine Pufferlösung mit Puffer und destilliertem Wasser, welche die Wanne bis zur markierten Stelle füllen sollte. Das Gel sollte komplett bedeckt sein. Nun pipettiert man die DNA-Probe in die, durch den Kamm entstandenen Taschen. Hierbei ist es wichtig, einen Marker mitlaufen zu lassen, mit welcher man später die Grösse der Fragmente ermitteln kann. Danach wird sorgfältig der Deckel der Wanne darüber geschoben, welcher auch die Elektroden mit dem Powersupply verbindet. Dies liefert den Strom für das elektrische Feld. Nun stellt man noch den Powersupply an und die Elektrophorese läuft. Die Laufzeit ist abhängig von der Voltmenge. (PennState University, 2021b, S.9; Edvotek, 2015, S.14)

Nach der Elektrophorese wird das Gel gefärbt, um die Wanderungen der zwei DNAs sichtbar zu machen. Dazu wird meistens Ethidiumbromid verwendet oder, in meinem Fall, Fast Blast DNA Stain, welches eine non-toxische und kostengünstigere Alternative ist. Fast Blast DNA Stain gehört zu den Thiazinfarbstoffen und beinhaltet positiv geladene Moleküle. Diese werden von den negativen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle angezogen und färben diese blau. Das Gel kann entweder schnell oder über Nacht eingefärbt werden. Beim schnell Einfärben wird eine Konzentration von 100x benutzt und braucht nur 2-3 Minuten. Danach muss das Gel so oft gewaschen werden, bis die Färbung klar ist. Beim über Nacht Färben, wird eine Konzentration von 1x verwendet und dies dauert mindestens 8 Stunden. Jedoch ist danach kein Waschen nötig. Nach dem Einfärben sollte man die DNA-Banden klar erkennen können und hat somit das Experiment beendet. (Bio-Rad, o.J., S.1ff)

### 3. Mein Verfahren und meine Materialien

Bei jedem Schritt wurden Nitril Einweghandschuhe getragen.

Bei jedem Pipettierschritt wurde eine neue Pipettenspitze pro Probe verwendet.

#### 3.1 Bachflohkrebse sammeln und bestimmen

Bachflohkrebse gehören zu den häufigsten Bewohnern von kleinen und mittelgrossen Fliessgewässern in Mitteleuropa. Herr Tschärner kannte einen kleinen Bach, ca. zehn Minuten von der Kantonsschule Hottingen entfernt, beim Wolfbachtobelweg (47.3711132, 8.5607998) (siehe Abb. 8). Um dort die Bachflohkrebse zu sammeln, stiegen wir in den Bach und suchten eine geeignete Stelle. Wir füllten einen kleinen Kanister mit Wasser, in den wir später die gefangenen Lebewesen hineinschütteten. Dann hält man einen kleinen Kescher an die gefundene Stelle im Wasser und wühlt in der Erde mit der Hand, so dass die Tierchen ins Wasser herauskommen und man sie dann mittels Kescher heraussieben kann. Es war ideal, dass es einen grossen Stein gab, welchen ich bewegen und die Erde darunter aufwühlen konnte, da Bachflohkrebse es lieber kühl haben und sich unter dem Stein wohl fühlten. Wir entnahmen dem Kanister mit den verschiedenen, gefangenen Tierchen die Bachflohkrebse mittels eines kleinen Siebes und sammelten sie in einem Weckglas. Das wiederholten wir, bis wir genug hatten. Am nächsten Tag füllten wir ein neues Glas mit Brennsprit und versetzten die Bachflohkrebse dort hinein, um sie zu konservieren, da wir sie erst über einen Monat später sezieren würden. Wir behielten sie im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung.



Abbildung 8: Der Fluss beim Wolfbachtobelweg (Eigene Aufnahme)

Die Materialien, die dazu benutzt worden sind:

- Gummistiefel
- Kescher
- Kanister
- Weckglass
- Kleines Sieb
- Brennsprit

### 3.2 Sezieren

Vor dem Sezieren mussten wir die Bachflohkrebse aus dem Brennsprit herausholen und dann sehr gut mit destilliertem Wasser abspritzen, danach mit einem Papierhandtuch trocknen, auf eine Petrischale geben und in ein Binokular einsetzen. Das Binokular muss jeweils auf die sezierende Person angepasst werden. Da Bachflohkrebse grösser sind als 2 mm und einen Panzer haben, versuchten wir den Panzer zu entfernen und nur Gewebe aus dem Abdomen zu holen. Dies stellte sich als schwierig dar, da die Bachflohkrebse doch sehr klein sind. Ein weiterer Faktor war, dass es im Vergleich zum Panzer sehr wenig Abdomengewebe hatte. Ich brauchte einige Anläufe, bis ich mit dem Binokular gut arbeiten konnte und eine gute Technik hatte. Am besten funktionierte es, wenn man zuerst die Beine abtrennte, dann den Kopf und dann versuchte, entweder den Panzer abzuziehen oder ihn längs aufzuspalten und mit der Pinzette im Inneren so viel Gewebe wie möglich herauszukratzen. Das gewonnene Gewebe wurde dann in Mikrozentrifugen-Röhrchen platziert, welche alle beschriftet wurden. Zusätzlich platzierten wir auch negative und positive Sicherheitsproben (siehe Abb. 9 & 10), welche wir gratis von «The Wolbachia Project: Discover the microbes within» zugeschickt bekommen haben (siehe Anhang 2), in Röhrchen und beschrifteten diese. Die Kontrollproben waren kleine Arthropoden, also war keine Sezierung nötig.



Abbildung 9 & 10: Positiv (links) und negativ (rechts) Kontrolle (Eigene Aufnahme)

Die Materialien die dazu benutzt worden sind:

- Pinzette
- Skalpell
- Nadel
- Binokulares Mikroskop der Carl Zeiss GmbH
- Petrischalen für das Binokular
- Mikrozentrifugen-Röhrchen: 1,5 ml
- Negativ Kontrolle ((-) Drosophila)
- Positiv Kontrolle ((+) Drosophila)
- Spritzflasche mit destilliertem Wasser

### 3.3 Extraktion der DNA-Probe

Für die DNA-Extraktion wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (50) von Qiagen verwendet (Cat. No. / ID: 69504). Ich folgte dem «DNeasy® Blood & Tissue Handbook» Protokoll.

Dieses Kit beinhaltet DNeasy mini spin Columns (siehe Abb. 11) mit auswechselbaren Sammelröhrchen (2 ml), 5 Puffer (ATL, AL, AW1, AW2, AE) und Proteinase K.



Abbildung 11: DNeasy Mini Spin Column mit Sammelröhrchen



Abbildung 12: Vortex-Genie 2 (Eigene Aufnahme)

1. Als erstes wurde den DNA-Proben (Negativ-, Positivkontrolle und Bachflohkrebsgewebe) je 180  $\mu$ l ATL-Puffer hinzugefügt. Dieser beinhaltet SDS und EDTA. Dazu wurde je 20  $\mu$ l Proteinase K hinzugefügt und mittels Vortexer vermischt. Dazu wurde der Vortex-Genie 2 (Model G560) der Firma Scientific Industries benutzt (siehe Abb. 12). Danach wird die Probe bei 56°C für ca. 2 Stunden inkubiert. Währenddessen wurden die Proben immer wieder gevortext. Falls ein Thermomixer oder ein Schüttelwasserbad vorhanden ist, ist dies zu empfehlen. Dazu wurde der Inkubator der Firma Labnet International, Inc. verwendet namens AccuBlock Digital Dry Bath des Models D1100 (siehe Abb. 13). Nun muss man 1-3 Stunden warten oder wie in unserem Fall, die Probe über Nacht einwirken lassen.



Abbildung 13: Inkubator (Eigene Aufnahme)

2. Nach der Ruhezeit vortext man das Gemisch für ca. 15 s bevor man je 400  $\mu$ l AL Puffer-Ethanol Gemisch, welches man vormischen konnte (50% Ethanol, 50% AL Puffer) (AL Puffer beinhaltet Guanidiniumhydrochlorid und Apfelsäure), hinzupipettiert.

3. Nun pipettiert man das Gemisch aus 2. in die DNeasy mini spin columns mit Sammelröhrchen. Diese werden nun zentrifugiert, bei 8'000 rpm ( $\geq 6000 \times g$ ) für 1 Minute. Da wir eine ungerade Anzahl Proben hatten und in der Zentrifuge das Gewicht ausgeglichen sein sollte wurde ein leeres Röhrchen mitzentrifugiert. Es wurde die Mini Spin Zentrifuge (Cat. No. 5452) der Firma Eppendorf verwendet (siehe Abb. 14).



Abbildung 14: Mini Zentrifuge (Eigene Aufnahme)

4. Nach dem Zentrifugieren wird das Sammelröhrchen ausgewechselt und je 500  $\mu$ l AW1 Puffer (erster Waschpuffer) hinzu pipettiert. Da der AW1 und AW2 Puffer als Konzentrat geliefert wurden, muss man sie vor Benutzung noch mit Ethanol verdünnen. Wieder werden die Röhrchen bei 8'000 rpm ( $\geq 6000 \times g$ ) für eine Minute zentrifugiert.

5. Nach der Zentrifugation wird das Sammelröhrchen wieder gewechselt und dessen Durchfluss entsorgt. Nun werden je 200  $\mu$ l AW2 Puffer (zweiter Waschpuffer) hinzu

pipettiert und bei 14'000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Die Mini Spin Zentrifuge konnte jedoch maximal bei 13'400 rpm ( $\geq 20'000 \times g$ ) zentrifugieren. Also erhöhten wir die Zeit zu 3 Minuten und 10 Sekunden. Dabei wird die Säulenmembrane getrocknet. Es ist wichtig, dass man das Röhrchen vorsichtig der Zentrifuge entnimmt und das Sammelröhrchen vorsichtig wechselt, sodass die Membrane nicht in Kontakt mit der Flüssigkeit kommt. Beim Zentrifugieren wurde alles restliche Ethanol der Membrane entzogen, weil Ethanol die Reaktion stören könnte. Falls die Membrane doch aus Versehen in Kontakt mit der Flüssigkeit kommt, sollte man das Röhrchen nochmals zentrifugieren.

6. Die Säule wurde nun in ein neues Sammelröhrchen (2 ml) gestellt und je 100  $\mu\text{l}$  AE Puffer (Elutionspuffer) hinzu pipettiert. Die Probe wurde nun für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 8'000 rpm ( $\geq 6000 \times g$ ) für eine Minute zentrifugiert um zu eluieren. Diesen Schritt habe ich zwei Mal wiederholt, ohne das Röhrchen zu wechseln, um auf das benötigte Volumen von 200  $\mu\text{l}$  zu kommen. Dies kann man auch in einem Schritt machen und einmal 200  $\mu\text{l}$  AE Puffer statt zweimal 100  $\mu\text{l}$  hinzu pipettieren.

Die benutzten Materialien im Überblick:

- DNeasy Blood & Tissue Kit (50) von Qiagen (Cat. No./ID: 69504):
  - DNeasy Mini Spin Columns
  - Sammelröhrchen (2ml)
  - ATL Puffer
  - AL Puffer
  - AW1 Puffer
  - AW2 Puffer
  - AE Puffer
  - Proteinase K
- Vortex-Genie 2 (Model G560) der Firma Scientific Industries
- Mini Spin Zentrifuge (Cat. No. 5452) der Firma Eppendorf
- 3 Variable Mikropipetten Easy 40 + der Firma Labbox (0.5-1.0  $\mu\text{l}$ ; 20-200  $\mu\text{l}$ ; 100-1000  $\mu\text{l}$ ) mit auswechselbaren Pipettenspitzen
- AccuBlock Digitl Dry Bath (D1100) Labnet International, Inc.
- Ethanol 70%

### 3.4 PCR

Für die PCR wurde das HotStarTaq DNA Polymerase (250 U) Kit (Cat. No. / ID: 203203) von Qiagen benutzt. Das beinhaltet, HotStarTaq DNA Polymerase, PCR Puffer, Q-Solution und MgCl<sub>2</sub> (25 Mm). Dazu wurde noch den dNTP Mix, PCR Grade (200 µl) (Cat. No./ ID: 201900) der Firma Qiagen benutzt (siehe Anhang 3). Ich folgte dem Protokoll: «PCR Using HotStarTaq DNA Polymerase» beim ersten Versuch und beim zweiten Versuch folgte ich zusätzlich dem «PCR Using HotStarTaq DNA Polymerase and Q-Solution» Protokoll. (Achtung die gegebenen µl Angaben sind für 1 Probe. Also müssen die Angaben auf die Anzahl Proben + 1 hochgerechnet werden. Die «extra» Probe gleicht den Teil der beim Pipettieren verloren geht aus.) Als erstes mischten wir 10 µl PCR Puffer, welcher schon MgCl<sub>2</sub> enthält, 2 µl dNTP Mix, je 1 µl der 4 Primer und 0.5 µl HotStarTaq zusammen und vortexten dies.

Die Primer wurden bei Microsynth bestellt (siehe Anhang 4):

- Wspec-F (Oligo ID: 5009466) (16s-Gen forwards (Wolbachia))  
Nukleotidsequenz: 5'-CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG-3'
- Wspec-R (Oligo ID: 5009467) (16s-Gen rückwärts (Wolbachia))  
Nukleotidsequenz: 5'-AGC TTC TTC GAG TGA AAC CAA TTC-3'
- LCO1490 (Oligo ID: 5009468) (CO1-Gen forwards)  
Nukleotidsequenz: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'
- HCO2198 (Oligo ID: 5009469) (CO1-Gen rückwärts)  
Nukleotidsequenz: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'

(Zusätzlich wurden von The Wolbachia Project: discover the microbes within! noch gratis die essenziell gleichen Primer geschickt)

(Bevor man die Primer benutzen konnte, musste man sie resuspendieren. Da sie gefroren gelagert werden, musste man sie zuerst auftauen und dann vortexen. Dann musste man jeden einzeln mit der vom Hersteller angegebenen Menge an destilliertem Wasser zu 100 µM verdünnen. Die genauen Angaben pro Primer können im Anhang nachgelesen werden. Danach wurden sie für 5 Minuten bei 65°C inkubiert.)

1. Danach wurde 82.5 µl destilliertes Wasser hinzugefügt damit man später mit der DNA ein Endvolumen von 100 µl hat. Dies wurde wieder gevortext und dann wurde das Gemisch auf die Anzahl PCR-Röhrchen verteilt. Danach wurde jedem PCR-Röhrchen noch 3.5 µl DNA hinzugefügt und jedes Röhrchen wurde beschriftet.

Zusätzlich wird noch eine Probe ohne DNA vervielfacht, um sicher zu gehen, dass der Mix nicht verseucht worden ist.

Zweiter Versuch: Beim zweiten Versuch benutzte ich zwei verschiedene Primer, da ich sichergehen wollte, dass der Primer nicht das Problem ist. Die Primer von Microsynth mischte ich einmal ohne und einmal mit Q Solution. Da die Primer verschiedenen Konzentrationen hatten mussten wir verschiedenen Volumen benutzen. Auch verringert wird das Endvolumen von 100 µl auf 20 µl damit nicht so viel Material verschwendet wird. (Die genauen Rezepte können im Anhang 5 nachgeschaut werden)

2. Danach wurden die Röhren in die PCR-Maschine gelegt und das PCR-Programm wurde gestartet. Für die PCR benutzte ich die PCR-Maschine der Firma Peqlab (peqSTAR Thermal Cycler 96x Universal Gradient) (siehe Abb. 15).

Wir liessen dann das folgende PCR-Programm laufen (so wurde es auch von der Maschine angezeigt):

1. Heat Lid to 110.0°C
2. Close Cycler Lid
3. 94.0°C for 15' 0''
4. Start Loop, 38x
5. 94,0°C for 45''
6. 49,0°C for 45''
7. 72,0°C for 1' 0''
8. Close Loop
9. 72,0°C for 10' 0''
10. Deactivate Lid Heating

Das ganze Programm dauerte ca. 2.5 Stunden.

Benutzte Materialien im Überblick:

- HotStraTaq DNA Polymerase (250 U) Kit (Cat. No. / ID: 203203) von Qiagen
  - HotStarTaq DNA Polymerase
  - PCR Puffer
  - Q-Solution (beim ersten Versuch nicht benutzt)
  - MgCl<sub>2</sub> (25 Mm) (nicht benutzt)
- dNTP Mix, PCR Grade (200 µl) (Cat. No. / ID: 201900) der Firma Qiagen



Abbildung 15: PCR Maschine  
(Eigene Aufnahme)

- Primer von Microsynth
  - Wspec-F
  - Wspec-R
  - LCO1490
  - HCO2198
- Die gleichen Primer auch von the Wolbachia Project: discover the microbes within
- Vortex-Genie 2 (Model G560) der Firma Scientific Industries
- Destilliertes Wasser
- AccuBlock Digitl Dry Bath (D1100) Labnet International, Inc.
- peqSTAR Thermal Cycler (Modell: 96x Universal Graient) der Firma Peqlab
- 3 Variable Mikropipetten Easy 40 + der Firma Labbox (0.5–1.0 µl; 20–200 µl; 100–1000 µl) mit auswechselbaren Pipettenspitzen
- PCR-Röhrchen
- Destilliertes Wasser

## 2.5 Gel Elektrophorese

1. Zur Herstellung des Gels wurden 1.0 ml TAE Puffer (50x) mit 49.0 ml destilliertem Wasser in einem Erlenmeyerkolben verdünnt, sodass ein 1x Gemisch entsteht. Danach wurden 0.75g Agarose Pulver hinzugefügt. Um sicher zu gehen, dass das Gel nicht zu heiss wird, erwärmt man es zuerst eine Minute in der Mikrowelle auf hoher Temperatur. Danach nimmt man den Erlenmeyerkolben mit Handschuhen hinaus und schwenkt ihn leicht, um die Vermischung zu unterstützen. Dann stellt man ihn wieder in die Mikrowelle und wiederholt diesen Prozess mit 15 Sekunden Intervallen. Bevor man das Gel giessen kann, muss es erst auf 60°C abkühlen. Dies überprüft man mittels Thermometer.
2. Sobald das Agarosegemisch 60°C erreicht hat, giesst man es in die Giessform. Hier ist es wichtig, die Seitenwände und den Kamm nicht zu vergessen, da sonst das Gel herausfliessen würde oder keine Taschen durch die Kammer entstehen würden, in die man später die DNA-Probe pipettieren kann. Das noch flüssige Gel lässt man nun härten. Dies sollte ca. 20 Minuten dauern. Ich liess es über 3 Stunden härten, da ich das Gel während der Mittagspause goss und erst am Abend weitermachen konnte.

3. Während das Gel erhärtet, gibt man zu den DNA-Proben je 4  $\mu\text{l}$  Loading Dye, ein Färbemittel, um die DNA beim Pipettieren und beim Wandern im Gel zu sehen. Sobald das Gel erhärtet ist, löst man die Seitenwände, entnimmt vorsichtig den Kamm und setzt die Giessform samt Gel in die Elektrophoresewanne. Hier ist es wichtig, darauf zu achten, dass die Taschen bei der Kathode sind, da sie sonst nicht in die richtige Richtung laufen. Dazu wurde das PerfectBlue™ Gelsystem Mini M (Bestell-Nr. 40-0911) der Firma Peqlab benutzt. Um die Elektrophoresekammer zu füllen, wird 490ml destilliertem Wasser mit 10ml TAE Puffer vermischt, welches dann in die Wanne geleert wird. Nun wird von jeder DNA-Probe 16  $\mu\text{l}$  in die Taschen des Gels pipettiert. (Kleiner Tipp: Sobald die Pipette den zweiten Stopp erreicht hat, nicht wie sonst durchdrücken. Das kann die Probe wieder aus der Tasche hinausdrücken und dann sieht man es im Gel hinterher nicht deutlich.) Zusätzlich wird auch noch ein Marker zur Sicherheit in eine Tasche pipettiert. Im letzten Schritt schiebt man den Deckel der Wanne ein und verbindet so die Wanne mit dem Powersupply, welcher schon in eine Steckdose ein gesteckt sein sollte. Nun wird der Powersupply noch angeschaltet und die Elektrophorese läuft. Diese lief mit 150 Volt für 55 Minuten (bei 550 Volt sollte sie mindestens 45 Minuten und maximal 1 Stunde laufen.) Man sieht, ob sie auch wirklich läuft, wenn sich kleine Luftblasen bilden und an den Seiten der Wanne zu sehen sind. Nach einer Weile sieht man auch, wie sich das Färbemittel schon bewegt hat. (siehe Abb. 16) Und so kann man auch sichergehen, dass sie wirklich läuft und auch in die richtige Richtung.

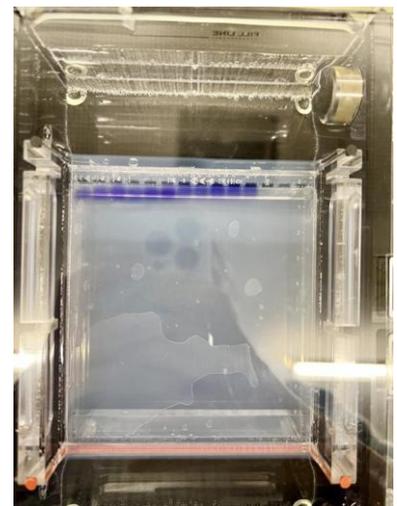


Abbildung 16: Laufende Gelelektrophorese; die DNA-Proben haben sich schon leicht bewegt (Eigene Aufnahme)

4. Nun muss das Gel gefärbt werden. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder das Färben über Nacht oder das schnelle Färben. Bei beiden Methoden wurde Fast Blast™ DNA Stain (500x) (Catalog # 166-0420EDU) verwendet. Bei meinem ersten Versuch folgte ich dem Über-Nacht-Protokoll: dazu wurden 1 ml Fast Blast mit 499 ml Hahnenwasser gemischt und in ein Gefäss gegeben. Zuerst entnimmt man die Giessform der Wanne und lässt das Gel dann sanft aus der Giessform in die Hand gleiten und von der Hand in das gefüllte Gefäss. Das Gel

sollte komplett bedeckt sein. Nun wird das Gel für mindestens 8 Stunden eingelegt. Während dieser 8 Stunden sollte es immer wieder bewegt werden.

Bei meinem zweiten Versuch folgte ich dem schnelleren Protokoll: dazu wurden 100 ml Fast Blast™ mit 400 ml Hahnenwasser gemischt und wieder in ein Gefäss gefüllt, zu welchem später das Gel hinzugefügt wird. Nun lässt man das Gel nur 2-3 Minuten in der Lösung. (Bei meinem zweiten Versuch hatte ich 2 Gels, bei welchen ich das erste 3 Minuten und das zweite 2 Minuten in der Lösung lies). Danach wird das Gel für 10 Sekunden in ein neues Gefäss mit warmem Wasser gelegt und leicht bewegt. Nach 10 Sekunden wird es wieder in ein neues Gefäss mit warmem Wasser getan und nun lässt man es 5 Minuten im warmen Wasser. Dies wiederholt man, bis man die Resultate gut ablesen kann. Ich musste die 5 Minuten insgesamt etwa 10-mal wiederholen. Insgesamt nutzte ich 3 Gefässe, welche ich zwischen den Wechseln immer ausspülte und neu auffüllte.

Benutzte Materialien im Überblick:

- TAE Puffer
- Agarose Pulver
- Destilliertes Wasser
- Mikrowelle
- Erlenmeyerkolben
- Dicke Handschuhe
- Thermometer
- Powersupply
- 3 Variable Mikropipetten Easy 40 + der Firma Labbox (0.5-1.0 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl) mit auswechselbaren Pipettenspitzen
- PerfectBlue™ Gelsystem Mini M (Bestell-Nr. 40-0911) der Firma Peqlab
  - MultiCast Gelgiessstand
  - Giessschiene
  - Gelträger
  - Ersatzdichtung (Seitenwände)
  - Kamm (1.0 mm 14 Zähne haltet 16 µl)
- Fast Blast™ DNA Stain (500x) (Catalog # 166-0420EDU) der Firm Bio-Rad
- Loading Dye von Edvotek
- 3 Gefässe

- Elektrophorese Puffer von Edvotek
- Agarose Pulver von Edvotek

## 4. Resultate

**4.1 Erster Versuch:** Nach dem ersten Versuch konnte man auf dem ersten Gel gar nichts erkennen. Selbst den Marker konnte man nicht gut sehen (siehe Abb. 17). Deshalb entschied ich mich, das Experiment nochmals neu durchzuführen. Obwohl es recht klar war, dass entweder das Agarosegel oder das Färbungsmittel das Problem waren, entschied ich mich, bei verschiedenen Schritten etwas zu ändern. Da ich nur noch 3 Wochen bis zum Abgabetermin hatte, entschied ich mich, verschiedene Lösungsansätze miteinander anzuwenden.



Abbildung 17: erste Gelelektrophorese; Marker nicht zu sehen (Eigene Aufnahme)

### 4.2 Lösungsansätze

**4.2.1 Mehr DNA:** Ich dachte mir, dass ich vielleicht nicht genug DNA extrahiert hatte und wollte dies bei meinem zweiten Versuch vermeiden. Deshalb benutzte ich bei den positiv und negativ Kontrollen zwei Arthropoden je und versuchte bei den Bachflohkrebsen so viel Abdomengewebe wie möglich zu sezieren. Ausserdem entschied ich mich, bei den einen Proben den Bauch nicht zu sezieren und den ganzen Bauchraum samt Panzer zu benutzen.

**Resultat:** Beides ergab Resultate. Also war das pingelige Sezieren nicht nötig.

**4.2.2 Q Solution:** Da uns Q Solution schon mitgeliefert wurde und es in den meisten Fällen, Primern helfen konnte, mischte ich sie beim einten PCR Mix mit den verwendeten Primern vom ersten Versuch mit ein. Es wurden insgesamt 3 Proben mit Q-Solution getestet: Eine Negativ-, eine Positiv- und eine Bachflohkrebsprobe.

**Resultat:** Die Primer von Microsynth ohne Q Solution konnte ich im Gel nicht ablesen, diejenigen mit Q Solution wiederum schon, also half es in diesem Fall den Primern.

**4.2.3 Andere Primer:** Ich dachte mir, vielleicht ging auch etwas bei der Primer-Resuspension falsch und wollte für diesen Fall noch andere Primer verwenden. Dies war möglich, da wir von Anfang an zwei Primer zur Wahl hatten und ich keine neuen bestellen musste.

**Resultate:** Beim zweiten Versuch konnte man nur bei den Primern von the Wolbachia Project etwas sehen und nicht bei den Primern von Microsynth (ohne Q Solution). Also waren die Microsynth Primer ohne Q Solution einfach zu schwach.

**4.3 Zweiter Versuch:** Beim zweiten Versuch war ein Problem, dass der Fast Blast einfach nicht klar färbte. Dies konnte man auch bei dem Marker erkennen, welcher auch nicht gut eingefärbt war. Das zweite Problem war, dass der DNA-Farbstoff und die Arthropoden-DNA gleich weit im Gel wanderten, was eine verschwommene Markierung ergab. Die Bakterien-DNA wanderte wiederum weiter und diesen konnte man wenigstens erkennen, aber auch nicht scharf.

Hier die Ergebnisse des zweiten Versuches:

Erstes Gel (siehe Abb. 18):

1	Marker	
2	<b>Microsynth Primer mit Q Solution ohne DNA</b>	-
3	Microsynth Primer ohne DNA	-
4	<b>Microsynth Primer mit Q Solution mit Positivkontrolle (1Arthropode)</b>	+
5	<b>Microsynth Primer mit Q Solution mit Negativkontrolle(1Arthropode)</b>	-
6	Microsynth Primer mit Positivkontrolle (1Arthropode)	-
7	Microsynth Primer Bachflohkrebsprobe (mit Panzer)	-
8	Microsynth Primer Bachflohkrebsprobe (ohne Panzer)	-
9	<b>Microsynth Primer mit Q Solution Bachflohkrebsprobe (ohne Panzer)</b>	+
10	Microsynth Primer mit Negativkontrolle (1Arthropode)	-
11	<u>Wolbachia Project Primer mit Positivkontrolle (1 Arthropode)</u>	+



Abbildung 18: Zweites Gel;  
mit Resultaten  
(Eigene Aufnahme)

Zweites Gel (siehe Abb. 19):

1	Marker	
2	Microsynth Primer mit Positivkontrolle (2 Arthropoden)	-
3	Microsynth Primer mit Negativkontrolle (2 Arthropoden)	-
4	<u>Wolbachia Project Primer ohne DNA</u>	-
5	<u>Wolbachia Project Primer mit Positivkontrolle (2 Arthropoden)</u>	+
6	<u>Wolbachia Project Primer Bachflohkrebs (mit Panzer)</u>	+
7	<u>Wolbachia Project Primer Bachflohkrebs (ohne Panzer)</u>	+
8	<u>Wolbachia Project Primer Negativkontrolle (1 Arthropode)</u>	-
9	<u>Wolbachia Project Primer Bachflohkrebs (ohne Panzer)</u>	+
10	<u>Wolbachia Project Primer Negativkontrolle (2 Arthropoden)</u>	-

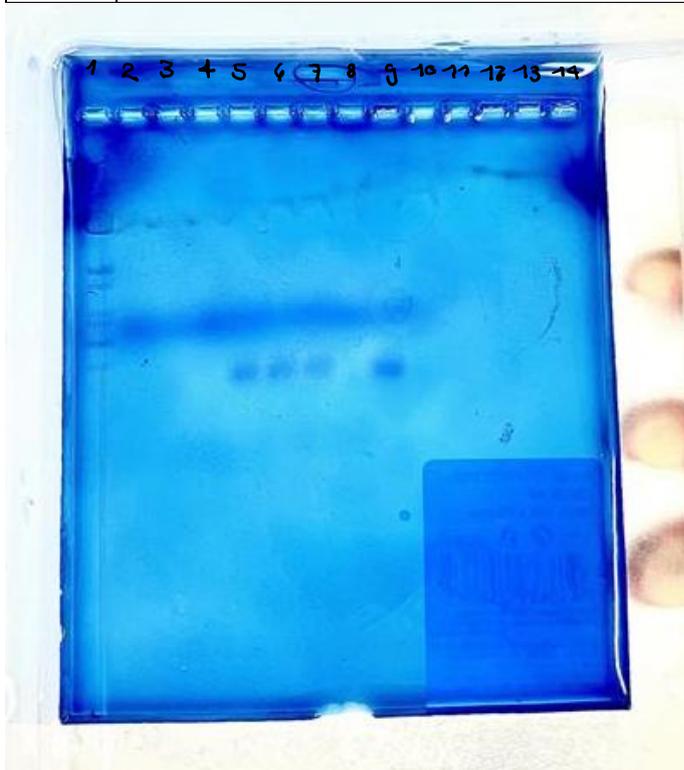


Abbildung 19: Drittes Gel; mit Resultaten (Eigene Aufnahme)

## Fazit

Im Verlauf dieser Arbeit habe ich alle in der Einleitung erwähnten Ziele erreicht:

Ich weiss nun über ein Bakterium, über das ich vor etwa einem Jahr noch nichts wusste, mehr als über jedes andere Tier. Ich kann deren Überlebensstrategien und wie diese zum menschlichen Wohl genutzt werden können, nachvollziehen und anderen erklären.

Obwohl die Ergebnisse nicht sehr klar zu lesen waren, konnte ich meine Frage beantworten. Nach meinen Ergebnissen waren alle getesteten Bachflohkrebse, die mit einem funktionierenden PCR Mix bearbeitet wurden, infiziert. Demnach können Bachflohkrebse von *Wolbachia Pipientis* infiziert werden, oder zumindest die von dem Bach, den ich getestet habe. Hier ist es mir wichtig anzumerken, dass diese Ergebnisse nicht zu überbewerten sind und mit ihnen sorgfältig umgegangen werden sollte. Um definitive und vertrauensvolle Ergebnisse zu haben, hätte ich den Versuch einige Mal durchführen müssen. Dies war mir wegen des begrenzten Zeitrahmens der Maturitätsarbeit nicht möglich. Es kann auch sein, dass mir bei dem Versuch ein Fehler unterlaufen ist und ich ein False-Positive erhalten habe. Es ist mir wichtig, die Unzuverlässigkeit der Resultate zu unterstreichen.

Ich kann nun erklären wie eine DNA-Extraktion, eine PCR oder eine Gel-Elektrophorese durchgeführt wird und wozu welcher Schritt notwendig ist. Besonders die PCR zu verstehen, finde ich heutzutage gut. Vor drei Jahren brach der Corona-Virus aus und darauf folgte der PCR-Test. Dies ist ein Begriff, den ich im Alltag gehört und verwendet habe, aber nie wusste, was eigentlich dahintersteckt. Nun weiss ich, was hinter dem Begriff PCR steckt und wie ein PCR-Test funktioniert.

Während meiner Schulzeit an der Kantonsschule Hottingen führte ich schon einige Experiment im Biopraktikum oder im Chemiepraktikum durch. Doch noch nie musste ich nach einem Misserfolg meine Schritte zurückverfolgen und erarbeiten, wo der Fehler liegen könnte. Dies fand ich ein wichtiger Teil des Experiments. Von Anfang an war klar, dass der Versuch sehr wahrscheinlich nicht beim ersten Mal funktionieren würde. Als er dann misslang, kam das Reflektieren des Versuches und somit auch das Verstehen. Ich persönlich lernte vom Erarbeiten des Lösungsansatzes mehr als vom ersten Versuch, da ich beim ersten Versuch eigentlich nur einer Anleitung gefolgt bin. Dann aber musste ich die Schritte analysieren und nachvollziehen, um allfällige Fehlerquellen ausfindig zu machen.

Wenn ich nun auf meine Arbeit zurückblicke, habe ich einige Punkte, welche ich bei einem neuen Anlauf anders machen würde. Erstens würde ich die Materialien früher bestellen. Da

viele Materialien aus Amerika importiert werden mussten, brauchte die Lieferung einige Zeit. Diese Zeit hätte ich besonders am Ende gut gebrauchen können, da ich dann ein anderes DNA-Färbemittel hätte organisieren können, um klarere Ergebnisse zu erhalten. Auch hätte ich die Arbeit einfacher auf Englisch schreiben können. Ich bin in einer Immersionsklasse und rede somit täglich eigentlich gleich viel Englisch wie Deutsch. Ich entschied mich, die Arbeit auf Deutsch zu schreiben, da mein ganzes biologisches Vorwissen Deutsch war und ich dachte, es wäre schwieriger alle Fachbegriffe im Englischen zu verstehen. Sobald ich aber mit der Recherche angefangen hatte, wurde schnell klar, dass die meisten Quellen auf Englisch waren. Somit lernte ich eigentlich die ganzen Fachbegriffe automatisch, weil ich sowieso ca. 75% der Dokumente nur auf Englisch fand.

Mögliche Weiterarbeit: Hätte ich mehr Zeit gehabt hätte ich den Versuch nochmals mit einem neuen DNA-Färbemittel durchgeführt, um klare Ergebnisse zu erhalten. Ein mögliches alternatives DNA-Färbemittel wäre Ethidium.

Ausserdem wäre es spannend, zusätzlich noch Bachflohkrebsen aus anderen Zürcher Gewässern zu untersuchen oder auch aus Gewässern der ganze Schweiz.

Es würde mich auch interessieren, verschiedene Arten von Bachflohkrebsen zu untersuchen anstatt nur eine Art. Auch interessant wäre es, verschiedene Arthropoden aus einzelnen Gewässern zu vergleichen.

Spannend wäre auch, die Bachflohkrebsen vor dem Versuch in Männchen und Weibchen einzuteilen und die Infektionsquote bei den verschiedenen Geschlechtern zu vergleichen.

## Literaturverzeichnis

Altermann, F., Alther, R., Fišer, C. & Švara, V. (2019). Amphipoda (Auflage: 900 ex.)  
Neuchâtel: CSCF & SEG

Biologie-Seite. (o. J.). Anaplasmatataceae Abgerufen von  
<https://www.biologie-seite.de/Biologie/Anaplasmatataceae>

Biologie-Seite. (o.J.). Wolbachia Abgerufen von  
<https://www.biologie-seite.de/Biologie/Wolbachia>

Bio-Rad. (o.J.). Fast Blast™ DNA Stain (500x) 100 ml Instruction Manual Catalog  
#166-0420EDU Abgerufen von  
[https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin\\_4110153A.pdf](https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin_4110153A.pdf)

Bordenstein S.R. et al. (8. Oktober 2010) The American Biology Teacher, Vol. 72,  
No. 8, pages 478–483. doi: 10.1525/abt.2010.72.8.3

Edvotek. (2015). VNTR Human DNA Typing Using PCR Abgerufen von  
<https://www.edvotek.com/334.150515.pdf>

ETH Z. (o.J.) Teil chromatographische und elektrophoretische Trenntechniken, Kapitel 5  
Abgerufen von  
[https://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Trennmethoden/Analytische-Chemie\\_Skript\\_5\\_Elektrophorese.pdf](https://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Trennmethoden/Analytische-Chemie_Skript_5_Elektrophorese.pdf)

Frei, M. (Oktober 2010). Wolbachia-Befall bei Hymenopteren: Eine erste Datenerfassung  
aus der Schweiz. (Maturitätsarbeit, Biologie)

Gentside. (8. Juni 2018). Escherichia coli (E. coli): Definition, Arten, Symptome,  
Übertragung, Behandlung von Kolibakterien. Abgerufen von  
[https://www.gentside.de/leben/gesundheit/escherichia-coli-e-coli-definition-arten-symptome-ubertragung-behandlung-von-kolibakterien\\_art7761.html](https://www.gentside.de/leben/gesundheit/escherichia-coli-e-coli-definition-arten-symptome-ubertragung-behandlung-von-kolibakterien_art7761.html)

Habibi, A. et al. (11. April 2016) Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences  
4(2):156-168. doi:10.18006/2016.4(2).156.168

Kalberer, M. (o.J.). Analytische Chemie für Biologie, Pharmazie und  
Bewegungswissenschaften und Sport: Teil Chromatographische und Elektrophoreti-  
sche Trennverfahren. Abgerufen von  
<https://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Schrott/Kapitel-2-Grundlagen.pdf>

Kunz, B. (8. März 2023). BK03 The Wolbachia Project: Discover the Microbes Within!  
Kantiwil Abgerufen von  
[file:///C:/Users/catev/Downloads/BK02\\_Wolbachia\\_Projekt\\_Dossier%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/catev/Downloads/BK02_Wolbachia_Projekt_Dossier%20(1).pdf)

Li Linguase. (24 August 2021) Die Funktion von dNTPs in der PCR-Reaktion.  
Abgerufen von <https://lilinguas.com/de/die-funktion-von-dntps-in-der-pcr-reaktion/#:~:text=Die%20dNTPs%20sind%20die%20Bestandteile%20von%20PCR%2C%20RT-PCR%2C,der%20DNA%20oder%20zur%20Amplifikation%20der%20DNA%20beitragen.>

Management Sciences for Health. (24. August (2022). Wolbachia: Eine neuartige Methode zur Kontrolle von Mücken, um die Ausbreitung von Dengue zu zähmen - Management Sciences for Health. Abgerufen von <https://msh.org/de/story/wolbachia-a-novel-method-for-controlling-mosquitoes-to-tame-the-spread-of-dengue/>

PennState University. (o.J.) DNA Extraction Lab-CIBT  
Version Abgerufen von  
<https://bpb-us-e1.wpmucdn.com/blogs.cornell.edu/dist/3/1009/files/2015/05/Wolbachia-Lab-2-CIBT.pdf>

PennState University. (Oktober 2021a). Lab 3: PCR: Duplex Reaction. Abgerufen von  
[https://www.biorad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin\\_4110153A.pdf](https://www.biorad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin_4110153A.pdf)

PennState University. (Juni 2021b). Lab 4 Electrophoresis: Standard Abgerufen von  
[https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin\\_4110153A.pdf](https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin_4110153A.pdf)

Porter, J. & Sullivan, W. (2023). The cellular lives of Wolbachia. Nature Reviews Microbiology, 21(11), 750–766. Abgerufen von  
<https://doi.org/10.1038/s41579-023-00918-x>

Prevot, Karine, (29. Januar 2015). Wolbachia Abgerufen von  
<https://embryo.asu.edu/pages/wolbachia#:~:text=Feminization%2C%20a%20process%20by%20which%20genetically%20male%20organisms,in%20Poitiers%2C%20France%2C%20studied%20this%20phenomenon%20in%20crustaceans.>

Promega. (o.J.). DNA Purification Abgerufen von

<https://ch.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/#references-2ae16bef-0d6b-4ccc-a925-42fe16a15467>

Qiagen. (Juni 2023) DNeasy® Blood & Tissue Handbook HB-2061-004 Abgerufen von  
[file:///C:/Users/catev/Downloads/HB-2061-004\\_HB\\_DNY\\_Blood\\_Tissue\\_0623\\_WW%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/catev/Downloads/HB-2061-004_HB_DNY_Blood_Tissue_0623_WW%20(1).pdf)

Qiagen. (Oktober 2010). HotStarTaq® PCR Handbook 1064914 Abgerufen von  
[file:///C:/Users/catev/Downloads/EN-HotStarTaq-PCR-Handbook%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/catev/Downloads/EN-HotStarTaq-PCR-Handbook%20(3).pdf)

Reindl. (27. April 2021). PCR-Test. Abgerufen von  
<https://www.netdokter.ch/krankheiten/covid-19/pcr-test/>

Spiegato. (6. Januar 2022) Was ist Kopräzipitation? Abgerufen von  
<https://spiegato.com/de/was-ist-kopraezipitation>

TeachersCollegesJ. (4. Juli 2019). What is the purpose of TBE buffer in gel electrophoresis?  
Abgerufen von  
<https://teacherscollegesj.org/what-is-the-purpose-of-tbe-buffer-in-gel-electrophoresis/>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Titelbild: zwei Bachflohkrebse auf Petrischale (Eigene Aufnahme)

Abbildung 2: Zeichnung eines Gammarus fossarum (Altermatt et al. 2019, S. 53)

Abbildung 3: Das Nebenflagellum der ersten Antenne bei Gammarus fossarum (Altermatt et al. 2019, S. 53)

Abbildung 4: Echtaufnahme der Nebenflagellums (Eigene Abbildung)

Abbildung 5: Uropoden III von Gammarus pulex und fossarum (Altermatt et al. 2019, S.101)

Abbildung 6: Kamm für das Agarose Gel (eigene Aufnahme)

Abbildung 7: Durch Kamm entstandenen Taschen im Agarose Gel (eigene Aufnahme)

Abbildung 8: Der Fluss beim Wolfbachtobelweg (eigene Aufnahme)

Abbildung 9 & 10: Positiv (links) und negativ (rechts) Kontrolle (Eigene Aufnahme)

Abbildung 11: DNeasy Mini Spin Column mit Sammelröhrchen (Eigene Aufnahme)

Abbildung 12: Vortex-Genie 2 (Eigene Aufnahme)

Abbildung 13: Inkubator (Eigene Aufnahme)

Abbildung 14: Mini Zentrifuge (Eigene Aufnahme)

Abbildung 15: PCR Maschine (Eigene Aufnahme)

Abbildung 16: Laufende Gelelektrophorese; die DNA-Proben haben sich schon leicht bewegt (Eigene Aufnahme)

Abbildung 17: erste Gelelektrophorese; Marker nicht zu sehen (Eigene Aufnahme)

Abbildung 18: Zweites Gel; mit Resultaten (Eigene Aufnahme)

Abbildung 19: Drittes Gel; mit Resultaten (Eigene Aufnahme)

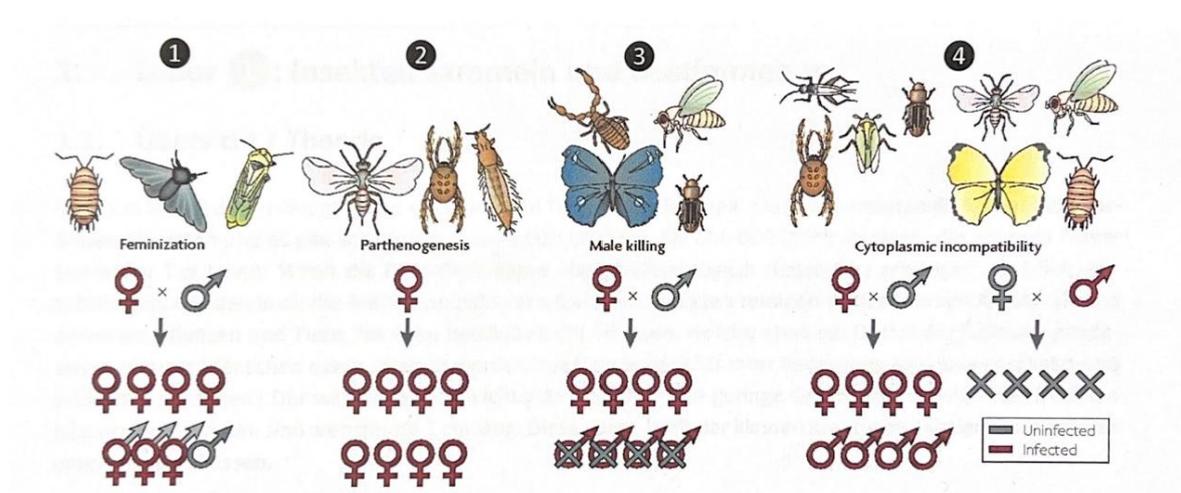
## Arbeitsjournal

Datum	Was ich gemacht habe:
11.04.2023	Erhalten des Wolbachia Project Dossiers und Einlesung in das Thema
16.05.2023	Besprechung und Festlegung des Themas mit Herrn Tscharner
01.06.2023	Besprechung und Unterschreibung des Maturavertrags
24.06.2023	Bestellung des Kompasses von Severin Brunold
01.07.2023	Lesen des Kompasses
08.07.2023	Durchlesen und Verstehen des Wolbachia Project Dossiers
12.07.2023	Besprechung des Kompasses und des Zeitplanes mit Herr Tscharner
21.09.2023	Anmeldung beim Wolbachia Project durch Herrn Tscharner
26.09.2023	Fangen der Bachflohkrebse
27.09.2023	Konservierung der Bachflohkrebse in Ethanol
27.09.2023	Festlegung der Materialien und Bestellung
01.07.2023	Lieferung der Materialien von Qiagen und Besprechung mit Herrn Tscharner über die genauen Zeiten für das Experiment
24.10.2023	Besprechung mit Herrn Tscharner über die Bestellung und den Zeitplan
25.10.2023	Verfassen der ungefähren Einleitung
28.10.2023	Niederschreiben der Einleitung
07.11.2023	Sezierung der Bachflohkrebse und erste Schritte der DNA-Extraktion (ATL-Puffer und Proteinase)
08.11.2023	Restliche Schritte der DNA-Extraktion
09.11.2023	Besprechung der Primer und der folgenden Schritte
10.11.2023	Resuspendierung der Primer
11.11.2023	Recherche zu der Erklärung der Methoden
12.11.2023	Verfassung der Erklärung der Methoden
14.11.2023	Herstellung des PRC Mix und Durchführung der PCR
15.11.2023	Herstellung des Agarose Gel
15.11.2023	Durchführung der Elektrophorese und Einfärbung des Gels
17.11.2023	Betrachtung und Auswertung des Gels
18.11.2023	Erste Version des Hauptteils
20.11.2023	Besprechung mit Frau Uehlinger über den zweiten Versuch

28.11.2023	Sezierung der Bachflohkrebse und erste Schritte der DNA-Extraktion (ATL-Puffer und Proteinase)
28.11.2023	Restliche Schritte der DNA-Extraktion
29.11.2023	Herstellung der drei verschiedenen PCR Mixe, Herstellung der PCR-Proben und PCR
29.11.2023	Durchführung beider Elektrophoresen und einfärben und waschen der beiden Gels
01.12.2023	Recherche zum Rest des Hauptteils
02.12.2023	Überarbeitung der Einleitung und verfassen der Hälfte des Hauptteils
03.12.2023	Verfassen der zweiten Hälfte des Hauptteils
04.12.2023	Verfassung des ganzen Restes des Textes
06.12.2023	Artenbestimmung mit Herrn Tscharner
06.12.2023	Niederschreiben von «1.3 Gammarus fossarum»
06.12.2023	Überarbeitung des Textes
07.12.2023	Kontrolle des Quellenverzeichnis
07.12.2023	Zweite Überarbeitung
07.12.2023	Einfügen Bilder, Erstellung Titel Blatt, Erstellung Abbildungsverzeichnis, Erstellung Anhang
08.12.2023	Drucken und Binden der Arbeit
11.12.2023	Abgabe der Arbeit

## Anhang

### Anhang 1: Übersicht und Darstellung der Überlebensstrategien von Wolbachia und deren Auswirkungen (Quelle: Siehe Kunz, B. im Literaturverzeichnis)



Anhang 2: Lieferungsbeleg der Materialien von PennState University



**PennState**

Sarah Bordenstein  
 Director, The Wolfenbarger Project  
 Associate Research Professor  
 Departments of Biology & Entomology

**Pro Forma Invoice**

Page 1 of 1

This invoice must be completed in English.

<b>EXPORTER:</b> Tax ID#: _____ Contact Name: Sarah Bordenstein Telephone No.: (814) 865-1152 E-Mail: srb6253@psu.edu Company Name/Address: Penn State University W-237 Millennium Sci Complex Pollock Road  University Park PA 16802 Country/Territory: UNITED STATES OF AMERICA Parties to Transaction: <input type="checkbox"/> Related <input checked="" type="checkbox"/> Non-Related					Ship Date: 24 Oct, 2023 Air Waybill No. / Tracking No.: 773848378670 Invoice No.: _____ Purchase Order No.: _____  Payment Terms: _____ Bill of Lading: _____  Purpose of Shipment: GIFT				
<b>CONSIGNEE:</b> Tax ID#: _____ Contact Name: Simon Tscharner Telephone No.: 0041786613812 E-Mail: simon.tscharner@ksh.ch Company Name/Address: Kantonsschule Hottingen Minervastrasse 14  ZURICH 8032 Country/Territory: SWITZERLAND					<b>SOLD TO / IMPORTER (if different from Consignee):</b> <input checked="" type="checkbox"/> Same as CONSIGNEE:  Tax ID#: _____ Company Name/Address: _____  Country/Territory: SWITZERLAND				
If there is a designated broker for this shipment, please provide contact information.									
Name of Broker			Tel. No.			Contact Name			
Duties and Taxes Payable by <input type="checkbox"/> Exporter <input checked="" type="checkbox"/> Consignee <input type="checkbox"/> Other If Other, please specify									
No. of Packages	No. of Units	Net Weight (LBS / KGS)	Unit of Measure	Description of Goods	Harmonized Tariff Number	Country/ Terr. of MFR	Unit Value	Total Value	
	2.00	0.20	PCS	DNA extracted from fruit flies	293499	US	1.000000	2.00	
	8.00	0.80	PCS	PCR primers	293499	US	1.000000	8.00	
	4.00	0.40	PCS	Dead fruit flies, preserved in less than 1 ml ethanol	051199	US	1.000000	4.00	
	1.00	0.60	PCS	Notebook	482010	US	1.000000	1.00	
<b>Total Pkgs</b>	<b>Total Units</b>	<b>Total Net Weight</b>	<b>(Indicate LBS/KGS)</b>	<b>Total Gross Weight</b>	<b>(Indicate LBS/KGS)</b>	<b>Terms of Sale:</b>	<b>Subtotal:</b>	15.00	
1	15.00	2.00	LB	2.00	LB		<b>Insurance:</b>	0.00	
<b>Special Instructions:</b>							<b>Freight:</b>	0.00	
<b>Declaration Statement(s):</b>							<b>Packing:</b>	0.00	
These items are controlled by the U.S. Government and authorized for export only to the country of ultimate destination for use by the ultimate consignee or end user(s) herein identified. They may not be resold, transferred, or otherwise disposed of, to any other country or to any person other than the authorized ultimate consignee or end-user(s), either in their original form or after being incorporated into other items, without first obtaining approval from the U.S. government or as otherwise authorized by U.S. law and regulations.							<b>Handling:</b>	0.00	
I declare that all the information contained in this invoice to be true and correct.							<b>Other:</b>	0.00	
<b>Originator or Name of Company Representative if the invoice is being completed on behalf of a company or individual:</b>							<b>Invoice Total:</b>	15.00	
Sarah Bordenstein							<b>Currency Code:</b>	USD	
<b>Signature / Title / Date:</b> <i>Sarah Bordenstein</i>							24 Oct, 2023		

REV. 08-23-22

Anhang 3: Lieferungsbeleg der Materialien von Qiagen:

Seite 1 of 2



Kantonsschule Hottingen  
Minervastrasse 14  
8032 Zürich  
Schweiz

1

Versandanschrift  
Kantonsschule Hottingen  
Simon Tscharner  
Minervastrasse 14  
8032 Zürich  
Schweiz

Proformarechnung	
Rechnungsnummer	93502979
Datum	27.09.2023
Bestellnummer	WEB 27092023 03:54
Datum	27.09.2023
Auftragsnummer	144151813
Datum	18.10.2023
Kundennummer	1606118
Ihre Umsatzsteuernummer	CHE-244.274.271
Unsere Steuernummer	CHE-107.647.166

Pos.	Details zur Position					
1	Art.-Nr.	69504	DNeasy Blood & Tissue Kit (50)			
	Menge:	1 ST				
	Preise:	Typ		Preis		Betrag
		DNeasy Blood & Tissue Kit (50)		284.00 CHF ST		284.00
2	Art.-Nr.	203203	HotStarTaq DNA Polymerase (250 U)			
	Menge:	1 ST				
	Preise:	Typ		Preis		Betrag
		HotStarTaq DNA Polymerase (250 U)		263.00 CHF ST		263.00
3	Art.-Nr.	201900	dNTP Mix, PCR Grade, 10mM, 1x200µl			
	Menge:	1 ST				
	Preise:	Typ		Preis		Betrag
		dNTP Mix, PCR Grade, 10mM, 1x200µl		87.60 CHF ST		87.60
Summe Positionen:						634.60
Trockeneiszuschlag						22.00
Mehrwertsteuer 7.70 %						656.60
50.56						
<b>Endbetrag:</b>						<b>707.16</b>

Unsere Allgemeinen Verkaufsbedingungen finden Sie auf [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Auf Anfrage senden wir Ihnen alternativ gerne eine Kopie zu.

QIAGEN bietet auch einen papierlosen Rechnungsversand im PDF-Format an. Wenn Sie Ihre Rechnungen gerne als PDF per Email erhalten möchten, kontaktieren Sie bitte Ihr lokales Customer Care Team.

Lieferbedingungen  
CPT Zürich

Zahlungsbedingungen  
Vorauszahlung

Versandbedingungen Paketdienst int.

QIAGEN AG  
Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon  
Switzerland  
Kundenservice Tel. : 0800897470  
Email: [Customercare-ch@qiagen.com](mailto:Customercare-ch@qiagen.com)  
[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)  
VAT no: CHE-107.647.166 MWST

UBS AG, Kontonummer:  
233-904858.01H, BC-N° 0233  
IBAN: CH80 0023 3233 9048 5801 H,  
BIC: UBSWCHZH40A

1079333

Anhang 4: Lieferungsbeleg und Informationen zu den Primern von Microsynth**Microsynth****Technical Datasheet**

Order Id 852579

Order Date 25.10.2023

**Wspec-F**

Type	DNA	Synthesis scale	Genomics	Molecular weight	6454.2 g/mol	Amount	11.85 OD
5' Modification	NONE	Purification	Desalted	Ext. coefficient	215.6 1/(mM·cm)		55.0 nmol
3' Modification	NONE	Length	21 nt	Tm (50 mM NaCl)	57.5 °C		355.0 µg
No internal modifications				Tm (NN-Method)	48.8 °C	Volume for 100 µM	550.0 µl
5'-CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG-3'							

Oligo Id 5009466

**Wspec-R**

Type	DNA	Synthesis scale	Genomics	Molecular weight	7311.8 g/mol	Amount	13.28 OD
5' Modification	NONE	Purification	Desalted	Ext. coefficient	234.0 1/(mM·cm)		56.8 nmol
3' Modification	NONE	Length	24 nt	Tm (50 mM NaCl)	62.0 °C		415.1 µg
No internal modifications				Tm (NN-Method)	55.3 °C	Volume for 100 µM	567.7 µl
5'-AGC TTC TTC GAG TGA AAC CAA TTC-3'							

Oligo Id 5009467

**LCO1490**

Type	DNA	Synthesis scale	Genomics	Molecular weight	7722.1 g/mol	Amount	15.08 OD
5' Modification	NONE	Purification	Desalted	Ext. coefficient	272.3 1/(mM·cm)		55.4 nmol
3' Modification	NONE	Length	25 nt	Tm (50 mM NaCl)	59.2 °C		427.7 µg
No internal modifications				Tm (NN-Method)	50.1 °C	Volume for 100 µM	553.8 µl
5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'							

Oligo Id 5009468

**HCO2198**

Type	DNA	Synthesis scale	Genomics	Molecular weight	7980.2 g/mol	Amount	14.16 OD
5' Modification	NONE	Purification	Desalted	Ext. coefficient	280.9 1/(mM·cm)		50.4 nmol
3' Modification	NONE	Length	26 nt	Tm (50 mM NaCl)	61.7 °C		402.3 µg
No internal modifications				Tm (NN-Method)	53.9 °C	Volume for 100 µM	504.1 µl
5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'							

Oligo Id 5009469

Anhang 5: Die benutzten PCR Rezepte

Erster Versuch:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x PCR Puffer (enthält bereits MgCl <sub>2</sub> )	10 µl	1x
dNTP mix 10 mM je	2 µl	200 mM je
Primer 1 (Wspec-F)	1-5 µl (benutzt: 1 µl)	0.1-0.5 µM (benutzt: 0.1 µM)
Primer 2 (Wspec-R)	1-5 µl (benutzt: 1 µl)	0.1-0.5 µM (benutzt: 0.1 µM)
Primer 3 (LCO1490)	1-5 µl (benutzt: 1 µl)	0.1-0.5 µM (benutzt: 0.1 µM)
Primer 4 (HCO2198)	1-5 µl (benutzt: 1 µl)	0.1-0.5 µM (benutzt: 0.1 µM)
HotStarTaq	0.5 µl	2.5 U
Destilliertes Wasser	Variable (Endvolumen = 100 µl)	
DNA	1-5 µl (benutzt 3.5)	
Endvolumen	100 µl	

Primer von the Wolbachia Project:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x PCR Puffer (enthält bereits MgCl <sub>2</sub> )	2 µl	1x
dNTP mix 10 mM je	0.4 µl	200 mM je
Primer 1 (Wspec-F)	0.4 µl	0.2 µM
Primer 2 (Wspec-R)	0.4 µl	0.2 µM
Primer 3 (LCO1490)	0.4 µl	0.2 µM
Primer 4 (HCO2198)	0.4 µl	0.2 µM
HotStarTaq	0.1 µl	2.5 U
Destilliertes Wasser	Variable (Endvolumen = 20 µl)	
DNA	3.5 µl	
Endvolumen	100 µl	

## Primer Microsynth ohne Q Solution:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x PCR Puffer (enthält bereits MgCl <sub>2</sub> )	2 µl	1x
dNTP mix 10 mM je	0.4 µl	200 mM je
Primer 1 (Wspec-F)	0.8 µl	0.2 µM
Primer 2 (Wspec-R)	0.8 µl	0.2 µM
Primer 3 (LCO1490)	0.8 µl	0.2 µM
Primer 4 (HCO2198)	0.8 µl	0.2 µM
HotStarTaq	0.1 µl	2.5 U
Destilliertes Wasser	Variable (Endvolumen = 20 µl)	
DNA	3.5 µl	
Endvolumen	20 µl	

Primer von Mricosynth mit Q-Solution (Q Solution verändert den Schmelzpunkt der DNA und kann zu besseren Ergebnissen führen):

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x PCR Puffer (enthält bereits MgCl <sub>2</sub> )	2 µl	1x
5x Q Solution	4 µl	
dNTP mix 10 mM je	0.4 µl	200 mM je
Primer 1 (Wspec-F)	0.8 µl	0.2 µM
Primer 2 (Wspec-R)	0.8 µl	0.2 µM
Primer 3 (LCO1490)	0.8 µl	0.2 µM
Primer 4 (HCO2198)	0.8 µl	0.2 µM
HotStarTaq	0.1 µl	2.5 U
Destilliertes Wasser	Variable (Endvolumen = 20 µl)	
DNA	3.5 µl	
Endvolumen	20 µl	

**Anhang 6: Von «The Wolbachia Project» vorgegeben Materialliste**



**Wolbachia Project Supply Calculator**

**Instructions:**

1. Define the number of student groups in pink box below.
2. Determine preferred incubator.
  - a) If using dry bath, delete rows 31-33
  - b) If using water bath, delete row 30.
3. Determine preferred electrophoresis system.
  - a) If using MiniOne (recommended), delete Column G and "Choice 2" under Electrophoresis Systems
  - a) If using a standard system, delete Column F and "Choice 1" under Electrophoresis Systems
4. The default for 'Shared Class Resources' is one per group. However, this can be manually adjusted based on classroom needs.

# Groups = 4 (assumes 2 students per group)

SHARED CLASS RESOURCES	General (per group)	Lab 1	Lab 2: Qiagen DNeasy	Lab 3	Lab 4: Mi- niOne	Lab 4: Standard	TOTAL
Computer with internet		✓					4
Colored pencils		✓					4
Dissecting microscope		✓	✓				4
Insect Field Guides (optional)		✓					4
Macro lens for phone (optional)		✓					4
Spray bottle of 70% ethanol or rubbing alcohol		✓	✓	✓	✓	✓	4
Vortex			✓	✓			4
Centrifuge			✓	✓	✓	✓	4
Thermal cycler				✓			4
Microwave					✓	✓	1

SELECT INCUBATOR (delete other rows)							
Choice 1: Dry bath *	Dry bath / heat block		✓				4
Choice 2: Water Bath	Water bath		✓				4
	Float rack		✓				4
	Metal tongs		✓				4
SELECT ELECTROPHORESIS SYSTEM (delete other rows)							

Choice 1: MiniOne *	MiniOne System				✓		4
Choice 2: Standard	Gel rig					✓	4
	Power supply					✓	4
	Electronic balance					✓	4
	Weigh boat					✓	4
	Spatula					✓	4
	Oven mitt					✓	4
	Trans-illuminator					✓	4

RESOURCES PER GROUP	General (per group)	Lab 1	Lab 2: Qiagen DNeasy	Lab 3	Lab 4: MiniOne	Lab 4: Standard	TOTAL NEEDED
Arthropods *	2	✓	✓				8
Small wash bottle	1	✓	✓	✓	✓	✓	4
Safety glasses	2	✓	✓			✓	8
Bent probe	1	✓	✓				4
Forceps/tweezers	1	✓	✓				4
Scalpel	1	✓	✓				4
Sharpie	1	✓	✓	✓			4
Colored lab tape	1	✓	✓	✓		✓	4
P20 pipette	1			✓	✓	✓	4
P20 box of pipette tips	1			✓	✓	✓	4
P200 pipette	1		✓				4
P200 box of pipette tips	1		✓				4
P1000 pipette	1		✓				4
P1000 box of pipette tips	1		✓				4
Box of Kimwipes	1	✓	✓				4
Waste cup for tips/tubes	1		✓	✓			4
Waste cup for liquids	1		✓				4
Tube rack, 1.5 ml	1	✓	✓	✓	✓	✓	4
PCR tube rack	1			✓	✓	✓	4
Gloves	20	✓	✓	✓	✓	✓	80
Arthropod collection containers		4					16
Petri dish		2	4				24
Transfer pipette or eye dropper		1					4
1.7 ml tubes, sterile		2	8	2			48
(+) insect control			1				4
(-) insect control			1				4
1.7 ml tubes for homogenization			4				16
Microtube pestles, sterile			4				16
Proteinase K, 120 ul aliquot			1				480 ul
Buffer ATL, 1.1 ml aliquot			1				4.4 ml
Buffer AL, 1.2 ml aliquot			1				4.8 ml

Buffer AW1, 1.5 ml aliquot			2				12	ml
Buffer AW2, 1.5 ml aliquot			2				12	ml
Buffer AE, 600 ul aliquot			1				2400	ul
Spin columns			4				16	
Collection tubes			4				16	
Ethanol (95-100%), 1.1 ml aliquot			1				4.4	ml
WspecF primer, 30 ul aliquot				1			120	ul
WspecR primer, 30 ul aliquot				1			120	ul
CO1_F primer, 30 ul aliquot				1			120	ul
CO1_R primer, 30 ul aliquot				1			120	ul
Taq master mix, 2X, 200 ul aliquot				1			800	ul
Nuclease-free water, 100 ul aliquot				1			400	ul
PCR tubes, 12 each				12			48	
GelGreen Gel cup					2		8	
MiniOne TBE conc.					2		56	ml
DI water					2		1200	ml
Gel casting tray & comb					1	1	8	
DNA ladder, aliquot					1	1	80	ul
Agarose, aliquot						1	8	g
Running buffer, 1X SB, variable						1	variable	
GelRed (or alternative), aliquot						1	80	ul
500 ml flask						1	4	
250 ml graduated cylinder					1		4	
100 ml graduated cylinder						1	4	

## **Erklärung**

„Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle wörtlichen und sinngemässen Übernahmen aus andern Werken habe ich als solche kenntlich gemacht. Ich nehme ausserdem zur Kenntnis, dass meine Arbeit zur Überprüfung der korrekten und vollständigen Angabe der Quellen mit Hilfe einer Software (Plagiaterkennungstool) geprüft wird.“

Datum

Unterschrift