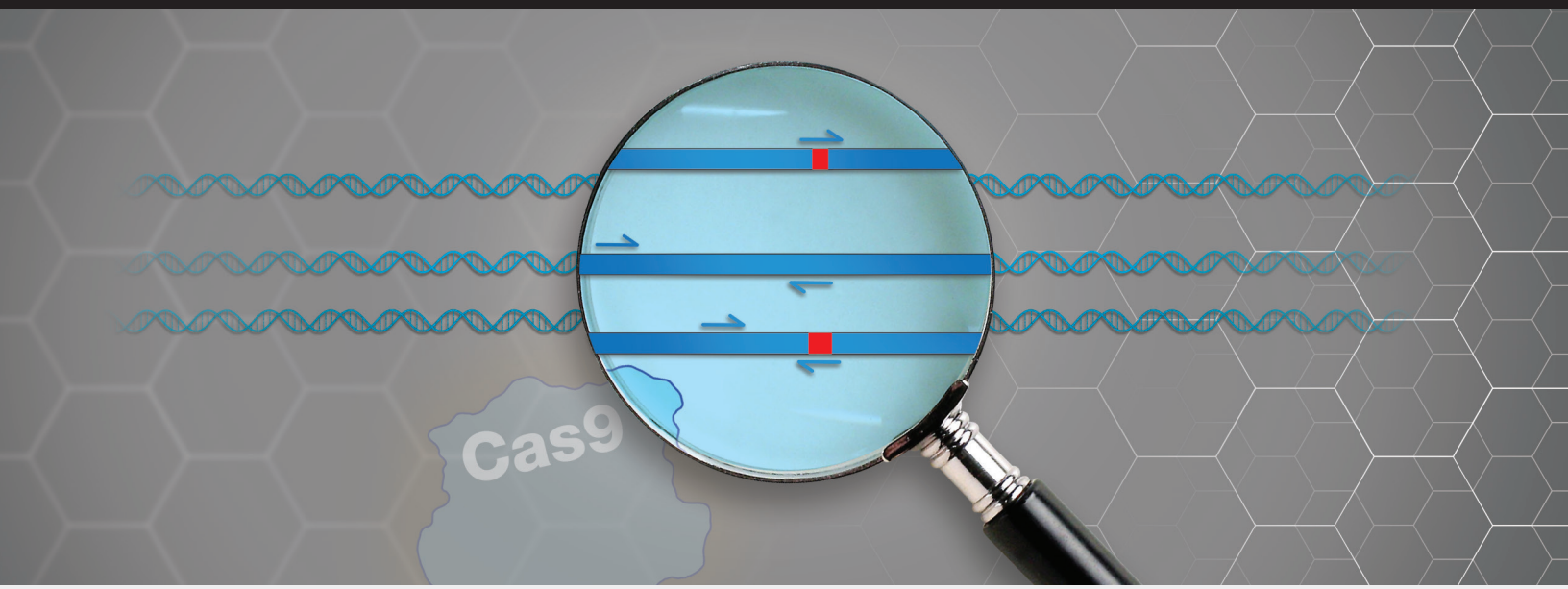
BIO-RAD Explorer



Out of the Blue Genotyping Extension

Katalog-Nr. 12012607EDU

Hinweise für Kursleiter

Hinweis: Die Vervielfältigung von Teilen dieses Dokuments ist nur für nicht-kommerzielle Lehrzwecke gestattet. Die kommerzielle Nutzung von urheberrechtlich geschützten Inhalten, einschließlich der Verwendung in entgeltlichen Lehrmaterialien, bedarf der ausdrücklichen Genehmigung von Bio-Rad™ Laboratories, Inc. Weitere Informationen erhalten Sie von **explorer@bio-rad.com**.

Dieses Produkt ist nicht für die Selbstanwendung bestimmt.

Wenn Sie technische Unterstützung benötigen, setzen Sie sich telefonisch mit der Niederlassung von Bio-Rad in Ihrer Nähe oder in den USA unter **1-800-4BIORAD** (1-800-424-6723) Option 2 in Verbindung.

BIO-RAD

Sehr geehrte Kursleitende,

die Erkenntnisse über das kürzlich neu entdeckte „CRISPR“-System machten deutlich, dass unser Verständnis der Immunität bei Bakterien unvollständig war. Nachdem das Gesamtbild – nämlich das einer adaptiven Immunantwort bei Bakterien – in den Fokus gerückt war, wurde der wissenschaftlichen Welt wieder einmal die Effizienz einer wissenschaftlichen Vorgehensweise vor Augen geführt. In der Bemühung um das Verständnis dieses winzigen Stücks Natur wurden in vielen Forschungslaboren weltweit sorgfältige Versuchsansätze entwickelt, Daten gegenseitig geprüft und unter Heranziehung verschiedener Evidenzquellen Hypothesen aufgestellt, die schließlich zu einem Durchbruch in der biowissenschaftlichen Forschung und Diagnostik führten. Dessen Auswirkungen werden unser Leben auf Jahrzehnte hinaus beeinflussen.

In diesem Erweiterungskurs werden die Kursteilnehmenden mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) molekulare Beweise für die CRISPR-Geneditierung in Bakterien gewinnen und ihre mithilfe des Out of the Blue CRISPR Kits erzielten vorherigen Ergebnisse ausführlicher beschreiben. Die nähere Charakterisierung von Ergebnissen ist nicht nur ein wichtiger Schritt im Rahmen eines realen wissenschaftlichen Arbeitsablaufs, sondern bietet den Kursteilnehmenden auch die Möglichkeit, praktische Erfahrungen in der wissenschaftlichen Vorgehensweise zu sammeln, d. h. der Gewinnung und Anwendung von Evidenzdaten aus mehreren Quellen. So wie Forscher mit jedem neuen Experiment Aufschluss über die Komplexität von CRISPR erhalten, werden auch Ihre Kursteilnehmenden durch die Kontinuität der wissenschaftlichen Vorgehensweise mehr über ihre bisherigen Ergebnisse erfahren.

Die in diesem Kit vorgesehenen Anwendungen wurden in Zusammenarbeit mit Sherry Annee, ehemaliger Präsidentin der National Association of Biology Teachers und Biotechnologielehrerin an der Brebeuf Preparatory Academy in Indianapolis, IN, USA, und Thomas Tubon Jr., Professor und Direktor des Stem Cell Program am Madison Area Technical College in Madison, Wisconsin, WI entwickelt.

Es ist uns ein Anliegen, unser Lehrmaterial und unsere Produkte kontinuierlich zu verbessern, daher ist uns auch Ihr Beitrag sehr wichtig. Wir freuen uns über Ihre Geschichten, Kommentare und Vorschläge.

Teilen Sie die Erfolge Ihrer Kursteilnehmenden in den sozialen Medien unter @bioradeducation.

Bio-Rad Explorer Team
Bio-Rad Laboratories
6000 James Watson Drive, Hercules, CA 94547
explorer@bio-rad.com

Inhaltsverzeichnis

Bevor Sie beginnen
Aufbewahrung des Kits 1
Sicherheitshinweise 1
Bestandteile des Kits 2
Bestellinformationen 3
Überblick über die Anwendung des Kits 4
Zeitplanung 5
Eingliederung in den Lehrplan 6

Vorbereitung der Kursleitenden
Hinweise zur Vorbereitung 7
Hintergrundinformationen für Kursleitende 9

Hinweise für Kursleiter
Extraktion von DNA aus einer Bakterienkolonie und PCR 10

Anhang: Fast Gel-Protokoll und Anleitung zur Vorbereitung der Elektrophorese 12

Ressourcen 16

Aufbewahrung des Kits

Gehen Sie nach Erhalt des Out of the Blue Genotyping Extension Kits folgenderweise vor:

1. Lesen Sie die Angaben auf den Produktetiketten zur Aufbewahrung und zu den Chargennummern.

2. Lagern Sie die **Out of the Blue Genotyping Extension Reagent Refill Pack** (Nachfüllpackung für Reagenzien zur Genotypisierungserweiterung) in der Gefriertruhe (-20 °C).

3. Lagern Sie die **InstaGene Matrix** und **UView 6x Loading Dye and Stain** (Ladefarbstoff und Färbemittel, sofern Sie diese erworben haben) bei 4 °C.

4. Lagern Sie die Kit-Box und Kunststoffmaterialien bei Raumtemperatur.

5. Besuchen Sie **bio-rad.com/outoftheblue**, um die Hinweise für Kursleitende und Kursteilnehmende herunterzuladen.

Technische Unterstützung erhalten Sie von support@bio-rad.com oder unter 1-800-4BIORAD, Option 2.

Sicherheitshinweise

Es wird dringend empfohlen, Schutzbrille und Handschuhe zu tragen. Die Kursteilnehmenden sollten sich vor und nach dieser Übung die Hände mit Seife waschen. Wenn eine Lösung in die Augen von Kursteilnehmenden gelangt, 15 Minuten lang mit Wasser ausspülen. Es sollten Laborkittel oder andere Schutzkleidung getragen werden, um Flecken auf der Kleidung zu vermeiden.

Das LB-Agarmedium, mit dem die Kursteilnehmenden bei der näheren Charakterisierung ihrer Genotypisierungsergebnisse arbeiten werden, enthält sowohl Kanamycin als auch Spectinomycin. Das sind Antibiotika, die allergische Reaktionen oder Reizungen hervorrufen können. Personen mit einer Allergie gegen diese oder ähnliche Antibiotika sollten vor der Handhabung von Materialien und Reagenzien des Kits ihre Ärztin/ihren Arzt konsultieren. Legen Sie nach Abschluss der Arbeitsschritte im Labor alle Bakterienplatten und alle Materialien, die mit Bakterien in Kontakt gekommen sind, für mindestens 20 Minuten in eine 10%ige Bleichmittellösung, um sie zu dekontaminieren. Bezüglich der Entsorgung sind außerdem die vor Ort geltenden Vorschriften zu befolgen.

Der Bakterienstamm *E. coli* HB101-pBRKan, der in diesem Kurs verwendet wird, ist nicht pathogen und wurde genetisch so verändert, dass er ein angereichertes Medium zum Wachsen benötigt. Es sollten jedoch mikrobiologische Standardpraktiken angewendet werden.

Bei der Arbeit mit heißem geschmolzenem Agar ist besondere Vorsicht geboten. Es werden hitzebeständige Handschuhe und andere übliche persönliche Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille und Laborkittel, empfohlen.

Zusammensetzung des Kits

Jedes Kit enthält Material für 8 Arbeitsplätze für Kursteilnehmende.

Inhalt	**Menge/ Stückzahl**
InstaGene Matrix	20 ml
2x PCR Master Mix	1.200 µl
Out of the Blue Primer Mix, 50x	20 µl
Out of the Blue PCR Positive Control DNA (DNA als Positivkontrolle)	150 µl
PCR MW Leiter	200 µl
Orange G Ladefarbstoff, 5x	1 ml
Konisches 1,5-ml-Röhrchen, O-Ring-Schraubdeckel, steril	50
Mikroröhrchen mit Deckel, 1,5 ml	60
PCR-Röhrchen, 0,2 ml	100
Empfehlungen für Kursleitende zur Beantwortung von Fragen	1
Small Fast Blast DNA Elektrophorese-Kit	
Fast Blast DNA Stain (Färbemittel), 500x	100 ml
Zertifizierte Agarose für die Molekularbiologie	25 g
TAE-Elektrophoresepuffer, 50x	100 ml
Small UView DNA Elektrophorese-Kit	
UView 6x Loading Dye and Stain (Ladefarbstoff und Färbemittel)	1 ml
Zertifizierte Agarose für die Molekularbiologie	25 g
TAE-Elektrophoresepuffer, 50x	100 ml

Zusätzlich erforderliches Material (nicht in diesem Kit enthalten)	**Menge/ Stückzahl**
Thermocycler mit mindestens 56 Vertiefungen (Wells)	1
Volumenverstellbare Mikropipette (100–1.000 µl) und Spitzen	8
Volumenverstellbare Mikropipette (20–200 µl) und Spitzen	1
Volumenverstellbare Mikropipette (2–20 µl) und Spitzen	8
Kammer für die horizontale Gelelektrophorese mit Rahmen zum Gießen des Gels und Kamm	4–8
Netzteil	1–8
Auf 56 °C eingestelltes Trockenbad oder Wasserbad mit Schwimmständern für Röhrchen	1–2
Auf 95 °C eingestelltes Trockenbad oder Wasserbad mit Schwimmständern für Röhrchen	1–2
Mikrozentrifuge ≥ 2.000 x g	4–8
UV-Leuchtkasten (bei Verwendung von UView 6x Loading Dye and Stain)	1
Gelfärbewanne (bei Verwendung von Fast Blast DNA Stain)	4–8
Röhrchenständer	8
Mikrowellengerät	1
Destilliertes Wasser	750 ml
Messzylinder, 1 l, 200 ml und 50 ml zum Vorbereiten der Puffer	je 1
Becherglas oder Kunststoffkanister > 2,5 l zum Vorbereiten der Puffer	1
Becherglas, 500 ml, zum Vorbereiten von Fast Blast DNA Stain (sofern verwendet)	1
Erlenmeyer-Kolben, ≥ 500 ml, zum Vorbereiten der Agarose	1
Permanentmarker	8

Empfohlene Materialien (nicht in diesem Kit enthalten)	**Menge**
Vortexer	4–8
Zentrifugenadapter für PCR-Röhrchen	1–8
Ständer für PCR-Röhrchen	8

Out of the Blue Genotyping Extension

Small Fast Blast DNA Elektrophorese-Kit

Small UView DNA Elektrophorese-Kit

Bestellinformationen

Katalog-Nr.	Beschreibung
Kits und Nachfüllpackungen	
12012607EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension**
12012708EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension Refill Pack**
17006070EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension plus Small Fast Blast Elektrophorese-Kit**
17006284EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension plus Small UView Elektrophorese-Kit**
12012608EDU	**Out of the Blue CRISPR Kit**
12012620EDU	**Out of the Blue CRISPR Kit Refill Pack**
17006081EDU	**Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension Kits**
17006286EDU	**Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits plus Small Fast Blast DNA Electrophorese Pack**
17006285EDU	**Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits plus Small UView DNA Electrophorese Pack**
Verbrauchsmaterial	
7326030EDU	**InstaGene Matrix**, 20 ml
1660450EDU	**Small Fast Blast Electrophoresis Reagent Pack**, enthält 25 g Agarosepulver, 100 ml 500x Fast Blast DNA Stain (Färbemittel), 100 ml 50x TAE-Elektrophoresepuffer
1660462EDU	**Small UView Electrophoresis Reagent Pack**, enthält 25 g Agarosepulver, 1 ml UView 6x Loading Dye and Stain (Ladefarbstoff und Färbemittel), 100 ml 50x TAE-Elektrophoresepuffer
1613015EDU	**1% TAE Mini ReadyAgarose Precast Gel**, 7,1 x 10 cm, 8-Well
Geräte und Laborzubehör	
1660506EDU	**Professional Adjustable-Volume Micropipet**, 2–20 µl
1660507EDU	**Professional Adjustable-Volume Micropipet**, 20–200 µl
1660508EDU	**Professional Adjustable-Volume Micropipet**, 100–1.000 µl
1861096EDU	**T100 Thermal Cycler**
1664000EDU	**Mini-Sub™ Cell GT Cell**
1645050EDU	**PowerPac Basic Power Supply**
1660562EDU	**Digital Dry Bath**, 120 V
1660504EDU	**Temperature-Controlled Water Bath**, 120 V
12011919EDU	**Mini Centrifuge**, 100–240 V
1660531EDU	**UView Mini Transilluminator**
1660610EDU	**BR-2000 Vortexer**, 120 V
1660477EDU	**Gel Staining Trays**, 4er Packung
1660481EDU	**Green Racks**, je 5 St.
TRC0501EDU	**96-Place PCR Tube Racks and Covers**, je 5 St., mehrfarbig
2240110EDU	**1,5 ml Conical Tubes**, O-Ring-Schraubdeckel, steril, 500
TWI0201EDU	**0,2 ml PCR Tubes with Domed Caps**, durchsichtig, 1.000

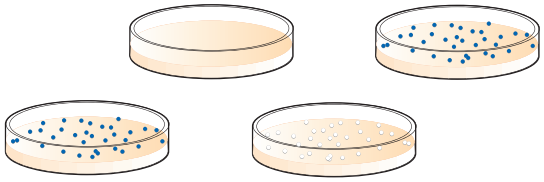
Eine vollständige Liste von 220–240 V-Geräten finden Sie auf **explorer.bio-rad.com**.

Überblick über die Anwendung des Kits

Teil 1

Erläuterung der Ergebnisse aus dem Laborkurs *lacZ* CRISPR Geneditierung

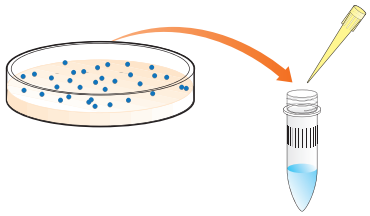
Die Kursteilnehmenden sehen sich ihre Laborergebnisse zur bakteriellen *lacZ* CRISPR Geneditierung an und überlegen sich zwei Ansätze zur Erklärung der Ergebnisse. Danach überlegen sie, welche zusätzlichen Informationen ihnen helfen könnten, eine der beiden Erklärungen auszuschließen.



Teil 2

Extraktion von DNA aus einer Bakterien-kolonie und PCR

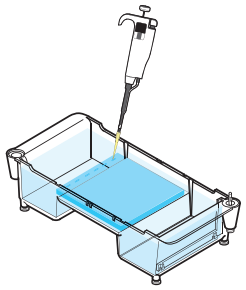
Die Kursteilnehmenden extrahieren genomische DNA aus Bakterienkolonien und bereiten Multiplex-PCR-Proben vor, um auf molekularer Ebene Beweise dafür zu finden, dass das *lacZ*-Gen in den ausgewählten Bakterienkolonien modifiziert wurde bzw. nicht modifiziert wurde.



Teil 3

Gelelektrophorese und Visualisierung

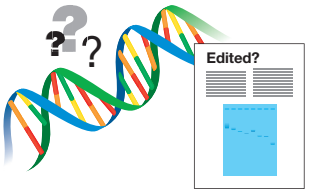
Die Kursteilnehmenden analysieren ihre PCR-Proben mittels Agarosegelelektrophorese und machen sie entweder mit Fast Blast DNA Färbemittel oder fluoreszierender DNA-Färbung sichtbar.



Teil 4

Datenanalyse und -auswertung

Die Kursteilnehmenden analysieren die Elektrophoreseergebnisse, um den Genotyp der Ausgangsbakterien zu bestimmen, und stellen ihre Beweisdaten zu Hypothesen über die Geneditierung zusammen.



Zeitplanung

Beginnen Sie den Erweiterungskurs Out of the Blue Genotyping Extension zur Genotypisierung innerhalb von zwei Wochen nach Abschluss von Kurs 2: Laborkurs für bakterielle *lacZ* CRISPR-Geneditierung mit dem Out of the Blue CRISPR Kit, aber vor Abschluss der Capstone-Aktivität. Der Erweiterungskurs zur Genotypisierung ist so aufgebaut, dass er zwei bis drei Unterrichtseinheiten mit einer Dauer von mindestens 90 Minuten umfasst (siehe Tabelle 1). Tabelle 2 enthält einen alternativen Zeitplan mit Unterrichtseinheiten mit einer Dauer von ca. 50 Minuten.

Tabelle 1: Empfohlener Zeitplan mit Unterrichtseinheiten mit einer Dauer von mindestens 90 Minuten ein- oder zweimal pro Woche. Der Zeitplan umfasst sowohl die Kurse für das CRISPR-Kit als auch für die Genotypisierungserweiterung.

	Unterrichtseinheit 1	Unterrichtseinheit 2	Unterrichtseinheit 3
Praktische Arbeit	Beginnen Sie mit Teil 1. Erläuterung der Ergebnisse aus dem Laborkurs *lacZ* CRISPR-Geneditierung (hierfür sind die Ergebnisse der Kursteilnehmenden aus dem Laborkurs für bakterielle *lacZ* CRISPR-Geneditierung erforderlich) Beginnen Sie mit Teil 2. Extraktion von DNA aus einer Bakterienkolonie und PCR Besprechung der als Vorbereitung auf die Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	Teil 2. Extraktion von DNA aus einer Bakterienkolonie und PCR (hierfür sind die Platten der Kursteilnehmenden mit den Bakterienkolonien aus dem Laborkurs für bakterielle *lacZ* CRISPR-Geneditierung erforderlich) Beginnen Sie mit Teil 3. Gelelektrophorese und Visualisierung Besprechung der als Vorbereitung auf die Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	Teil 3. Gelelektrophorese und Visualisierung Beginnen Sie mit Teil 4. Datenanalyse und -auswertung
Außerhalb des Unterrichts durchzuführen	Beenden Sie Teil 2. Besprechung der als Vorbereitung auf die Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	Beendigung der PCR und Kühllagerung der Proben Setzen Sie Teil 3 fort. Besprechung der als Vorbereitung auf die Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	Bereitstellung der über Nacht gefärbten Agarosegele zur Analyse Beenden Sie Teil 4.

Tabelle 2: Alternativer Zeitplan mit täglichen Unterrichtseinheiten mit einer Dauer von ca. 50 Minuten.

	Unterrichtseinheit 1	Unterrichtseinheit 2	Unterrichtseinheit 3	Unterrichtseinheit 4	Unterrichtseinheit 5
Praktische Arbeit	Beginnen Sie mit Teil 1. Erläuterung der Ergebnisse aus dem Laborkurs *lacZ* CRISPR Geneditierung (hierfür sind die Ergebnisse der Kursteilnehmenden aus dem Laborkurs für bakterielle *lacZ* CRISPR-Geneditierung erforderlich)	Beginnen Sie mit Teil 2. Extraktion von DNA aus einer Bakterienkolonie und PCR (hierfür sind die Platten der Kursteilnehmenden mit den Bakterienkolonien aus dem Laborkurs für bakterielle *lacZ* CRISPR-Geneditierung erforderlich) Nach Extraktion der DNA durch die Kursteilnehmenden stoppen	Beenden Sie Teil 2. PCR	Teil 3. Gelelektrophorese und Visualisierung	Bereitstellung der über Nacht gefärbten Agarosegele zur Analyse Teil 4. Datenanalyse und -auswertung
Außerhalb des Unterrichts durchzuführen	(Optional) Beenden Sie Teil 1. Teil 2. Extraktion von DNA aus einer Bakterienkolonie und PCR Besprechung der als Vorbereitung auf die Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen		Durchführung der PCR und Kühllagerung der Proben Beginnen Sie mit Teil 3. Gelelektrophorese und Visualisierung Besprechung der als Vorbereitung auf die Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	(Optional) Beginnen Sie mit Teil 4. Datenanalyse und -auswertung	Beenden Sie Teil 4.

Eingliederung in den Lehrplan

Erforderliche theoretische und praktische Vorkenntnisse

- Grundlagen des Aufbaus und der Funktion der DNA, einschließlich der Nukleotid-Basenpaarungsregeln
- Grundlegende Funktion von Cas9 und single guide RNA (sgRNA) bei der gezielten DNA-Spaltung
- Grundlegende Funktion und Prozess der homologiegesteuerten DNA-Reparatur, einschließlich der Rolle der Donor-Matrizen-DNA
- Zentrales Dogma (DNA > RNA > Protein > Merkmal)
- Expression des lacZ-Gens und Erkennung der β-Galactosidase mittels Blau-Weiß-Screening
- Wichtigste Schritte und Zweck der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- Benutzung einer Mikropipette
- Durchführung einer Agarosegelektrophorese und Interpretierung der Gelergebnisse

Konzepte, Themenbereiche und Kenntnisse

- **Genetik** – Die Kursteilnehmenden werden mittels PCR-Amplifikation feststellen, ob Bakterien Wildtyp- oder editierte *lacZ*-Gene haben. Mithilfe der Genotypisierungsergebnisse können die Kursteilnehmenden bestätigen, dass in bestimmten Bakterienproben eine CRISPR-vermittelte Geneditierung stattgefunden hat

- **Gentechnik** – Die Kursteilnehmenden transformieren Bakterien und führen eine CRISPR-Geneditierung durch (zwei wichtige Verfahren in der Gentechnik). Das zugrunde liegende Ziel der Gentechnik ist die Veränderung von Genomen, um einem bestimmten Phänotyp hervorzurufen

- **Multiplex-PCR** – Die Kursteilnehmenden verwenden mehrere Primersätze in einer einzigen PCR-Probe, was eine praktische Methode zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer DNA-Zielsequenzen darstellt

- **Zentrales Dogma** – Die Kursteilnehmenden blockieren die Funktion des *lacZ*-Gens, das die β-Galactosidase (β-Gal, ein Enzym, das den Milchzucker Laktose hydrolysiert), codiert. Die Kursteilnehmenden editieren das *lacZ*-Gen und stellen eine sichtbare Veränderung des Phänotyps fest

- **Argumentation in der Wissenschaft** – Die Kursteilnehmenden stellen Argumente über die Geneditierung zusammen, die sich auf die Beweisdaten stützen, die sie selbst anhand der Kits Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension erhalten hatten

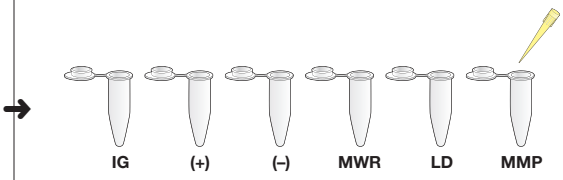
Hinweise zur Vorbereitung

Lösungen vorbereiten und verteilen

Bereiten Sie die Reagenzien (bis auf PCR-Mastermix und Primer) bis zu vier Wochen vor Stattfinden des Kurses vor und lagern Sie sie gekühlt bei 4 °C. Der PCR-Mastermix mit der Primer-Lösung sollte *frühestens 30 Minuten vor der Vorbereitung der PCR-Proben durch die Kursteilnehmenden zubereitet werden.*

1. Bereiten Sie die Lösungen vor und verteilen Sie sie in beschriftete Röhrchen (siehe Tabelle unten).

   Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination beschriften Sie die Röhrchen und pipettieren Sie die Lösungen nacheinander. Achten Sie darauf, für jede Lösung eine neue Pipettenspitze zu verwenden.



Typ und Anzahl der Röhrchen für 8 Laborarbeitsplätze	Röhrchenetikett	Röhrcheninhalte und Anweisungen zur Vorbereitung
Für die DNA-Extraktion und PCR		
8 Mikroröhrchen mit Deckel, 1,5 ml	**IG**	1,3 ml InstaGene Matrix **Vorbereitung:** Resuspendieren Sie das Harz vor dem Verteilen durch Schütteln, manuelles Rühren oder Rühren auf einer Rührplatte mit dem in der Flasche enthaltenen Magnetrührstab.
8 Mikroröhrchen mit Deckel, 1,5 ml	**+**	15 µl Out of the Blue PCR Positivkontrolle DNA
8 Mikroröhrchen mit Deckel, 1,5 ml	**–**	15 µl destilliertes Wasser
8 Mikroröhrchen mit Deckel, 1,5 ml	**MMP**	80 µl Master Mix und Primer-Lösung **Vorbereitung:** Geben Sie unmittelbar vor der PCR 735 µl 2x PCR Master Mix und 15 µl Out of the Blue Primer Mix in ein separates 1,5 ml-Mikroröhrchen, pipettieren Sie zum Mischen auf und ab und verteilen Sie die Mischung dann in die Röhrchen.
Für die Elektrophorese		
8 Mikroröhrchen mit Deckel, 1,5 ml	**LD**	40 µl Ladefarbstoff
8 Mikroröhrchen mit Deckel, 1,5 ml	**MWR**	15 µl Molekulargewichtsstandard mit Ladefarbstoff **Vorbereitung:** Geben Sie vor dem Verteilen 50 µl Ladefarbstoff direkt in das Röhrchen mit dem PCR-Molekulargewichtsstandard und pipettieren Sie zum Mischen auf und ab.

Bereiten Sie die Agarosegele, TAE-Puffer und Färbemittel
*(nur bei Verwendung des Fast Gel-Protokolls) vor**

2. Bereiten Sie acht 1%ige Agarosegele mit jeweils 8 Probenvertiefungen vor. Es ist wichtig, zum Herstellen dieser Gele 1x TAE (nicht 0,25X TAE) zu verwenden. Im Anhang finden Sie Anweisungen zum Gießen der Gele.

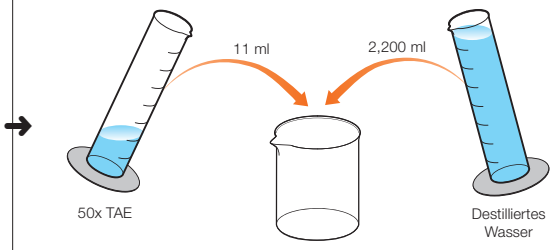
3. Bereiten Sie 2,2 l des 0,25x TAE-Elektrophoresepuffers vor, indem Sie 11 ml von 50x TAE in 2.200 ml destilliertes Wasser geben (zur Verwendung im Fast DNA-Gel-Protokoll).*

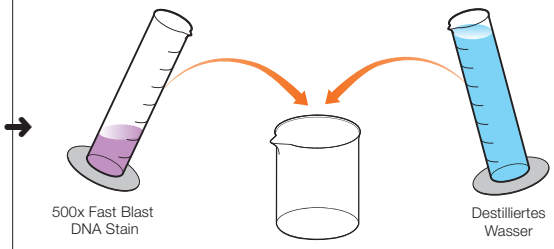
   Hinweis: Das korrekte Volumen an destilliertem Wasser wäre 2.189 ml, aber der Unterschied hat keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

4. Gegebenenfalls 100x Fast Blast DNA Stain zum Färben der Agarosegele vorbereiten. Anweisungen hierzu finden Sie im Anhang.

   Hinweis: Bei Verwendung von UView 6x Ladefarbstoff und Färbemittel zur Visualisierung wird Fast Blast DNA Färbemittel nicht benötigt.

* Wurde entwickelt, um die Vorteile des Bio-Rad Fast Gel-Protokolls mit 0,25x TAE-Laufpuffer und höheren Spannungen zu nutzen. Einzelheiten und alternative Elektrophoreseoptionen mit Anweisungen zur Vorbereitung finden Sie im Anhang.





Hintergrundinformationen für Kursleitende

Mehrere Methoden zum Nachweis von Geneditierung

Nach einem Protokoll zur Geneditierung ist es wichtig, nicht nur zu überprüfen, ob eine Editierung an der richtigen Stelle vorgenommen wurde, sondern auch, ob die Editierung so vonstatten ging, wie es beabsichtigt war. Ein Beispiel für die Folgen einer unvollständigen Überprüfung einer Geneditierung finden Sie im Abschnitt Ressourcen (siehe Regalado 2019). Es gibt eine Reihe verschiedener Techniken, um den Genotyp des untersuchten Organismus zu bestimmen oder eine Geneditierung zu bestätigen. Die Wahl der Technik hängt von der Anzahl der Gene, den Arten der zu untersuchenden Unterschiede in den Allelen sowie den Kosten und der Zeit der Analyse ab. Einige allelische Variationen können beispielsweise zu Veränderungen in Restriktionsfragmentmustern führen (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen, RFLPs), während andere nur durch Sequenzierung nachgewiesen werden können. Im Falle der Editierung des *lacZ*-Gens (Insertion) in Kurs 2, Laborkurs für bakterielle *lacZ* CRISPR-Geneditierung mit dem Out of the Blue CRISPR Kit, lässt sich die Editierung mittels PCR nachweisen, einem gängigen Schritt in einem molekularbiologischen Arbeitsablauf. Das Zusammentragen dieser Art von molekularen Beweisdaten bedeutet für die Kursteilnehmenden nicht nur, praktische Forschungserfahrungen zu sammeln, sondern unterstreicht auch einen entscheidenden Grundsatz der wissenschaftlichen Praxis – das Sammeln und Verwenden von Evidenzdaten aus mehreren Quellen, um eine Hypothese zu untermauern und alternative Erklärungen auszuschließen. In den Ressourcen finden Sie zugehörige Artikel und Tools.

Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR ist die gleichzeitige Amplifikation mehrerer Amplikons in einer einzigen Vertiefung unter Verwendung eines jeweils spezifischen Primerpaars. Anstatt mehrere Einzelreaktionen durchzuführen, finden alle Reaktionen in einer einzigen Probe statt. Nach einer schnellen DNA-Extraktion aus jeder Kolonie führen die Kursteilnehmenden eine Multiplex-PCR durch, um das Vorhandensein/Nichtvorhandensein der CRISPR-modifizierten Insertion nachzuweisen: Ein Primerpaar erzeugt in Gegenwart des *lacZ*-Wildtypgens ein Amplikon mit ca. 1.100 bp, während ein anderes Primerpaar in Gegenwart des editierten *lacZ*-Gens ein Amplikon mit ca. 650 bp erzeugt (Einzelheiten zur Primer-Zielsequenz sind in den Hinweisen für Kursteilnehmende erläutert). In vielen Multiplex-Experimenten überlappen sich die DNA-Zielsequenzen nicht. Hier sind die Primer jedoch absichtlich so gestaltet, dass sie sich an der Editierungsstelle überlappen, sodass entweder der „editierte“ oder der „nicht-editierte“ Primersatz ein Amplikon erzeugt und eine Genotypbestimmung ermöglicht. Als interne Kontrolle erzeugt ein drittes Primerpaar nur dann ein Amplikon mit ca. 350 bp, wenn chromosomale DNA erfolgreich extrahiert und amplifiziert wurde.

Obwohl die Multiplex-PCR praktische Vorteile bietet und dabei helfen kann, wertvolles Probenmaterial zu sparen, erfordert ein Multiplex-PCR-Experiment einen sorgfältigen Aufbau, damit alle Zielsequenzen mit denselben Zyklusparametern (in einer einzigen Probe) erfolgreich amplifiziert werden können. Wichtige Gesichtspunkte:

- **Amplikon-Größe** – Wenn eine Analyse durch Gelelektrophorese geplant ist, muss jedes Amplikon eine andere Größe haben, damit eine ausreichende Trennung stattfinden kann. Gleichzeitig dürfen die Unterschiede nicht zu groß sein, da kürzere Amplikons bevorzugt amplifiziert werden.
- **Primerpaare** – Alle müssen eine ähnliche Schmelztemperatur aufweisen (um unter Verwendung der gleichen Zyklusparameter gleich gut zu funktionieren), sollten keine Dimere miteinander bilden und müssen für ihre Zielsequenzen spezifisch sein.

Der zusätzliche Aufwand wird jedoch dadurch wettgemacht, dass mehr als eine Zielsequenz in einer einzigen Probe analysiert werden kann und eine höhere Genauigkeit bei der vergleichenden Analyse und Quantifizierung in Forschung, Forensik und Diagnostik erzielt wird.

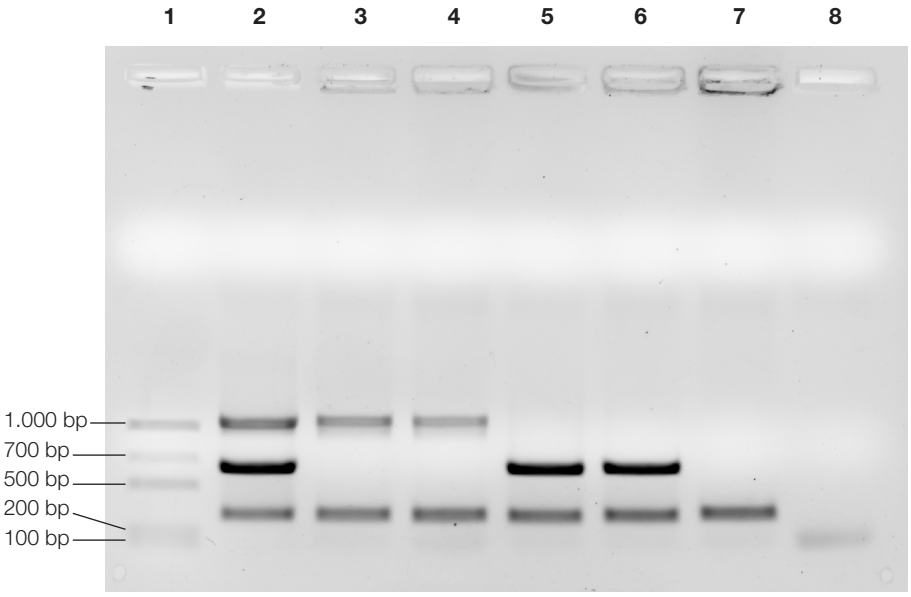
Extraktion von DNA aus einer Bakterienkolonie und PCR

Ziel: Die Kursteilnehmenden sammeln DNA-Beweisdaten und kombinieren sie mit ihren bisherigen Beweisdaten, um ihre Hypothesen über die CRISPR-vermittelte Geneditierung zu untermauern.

	Tipps und Hinweise für den Unterricht
Teil 1. Ergebnisse aus dem Laborkurs *lacZ* CRISPR Geneditierung	• Es gibt viele alternative Erklärungen für die Ergebnisse der vorab durchgeführten Bakterientransformation im Labor. So kann beispielsweise die Farbe der Kolonien durch die Einführung eines DNA-bindenden Proteins, Protein-Protein-Wechselwirkungen, die die Aktivität derβ-Galactosidase verringern, oder sogar durch einen Aufhebungseffekt zwischen den in die Bakterien eingeführten Elementen beeinflusst werden. Viele alternative Erklärungen sind in Anbetracht der Kenntnisse über die bakterielle Zellbiologie sehr unwahrscheinlich. Sie können jedoch mit zusätzlichen Beweisdaten ausgeschlossen werden • Die Kursteilnehmenden aufzufordern, sich experimentelle Beispiele zu überlegen, mit denen eine von zwei alternativen Erklärungen ausgeschlossen werden könnte, gibt den Kursteilnehmenden die Möglichkeit zu üben, wie die Beweislage für eine Hypothese formuliert wird • Option: Wenn die Kursteilnehmenden mehr Hilfestellung benötigen, geben Sie ihnen eine alternative Erklärung, die sie bei der Beantwortung der Fragen verwenden können. Zum Beispiel: Der Cas9-sgRNA-Komplex unterdrückt die Expression wichtiger Gene, einschließlich *lacZ,* was zum Zelltod führt; die HDR-Maschinerie mit Donor-DNA-Matrize behindert die Funktion des Cas9-sgRNA-Komplexes • Option: Bitten Sie die Kursteilnehmenden, sich ein Experiment zu überlegen, das die erforderlichen Informationen liefert, um eine ihrer alternativen Erklärungen auszuschließen
Teil 2. Extraktion von DNA aus einer Bakterienkolonie und PCR	• Das DNA-Extraktionsprotokoll umfasst die erforderlichen Erhitzungs- und Zentrifugationsschritte. Damit diese Schritte innerhalb einer 50-minütigen Unterrichtseinheit durchgeführt werden können, werden eventuell mehrere Trocken-/Wasserbäder und Zentrifugen benötigt. Es ist unbedingt vorab zu planen, welche Zeit benötigt wird, damit alle Proben der Kursteilnehmenden analysiert werden können. • Wenn eine Gruppe von Kursteilnehmenden eine Bakterienkolonie auf Platte B gefunden hat, empfiehlt es sich, Probe D3 durch die Kolonie von B zu ersetzen. Bakterienwachstum auf Platte B ist unerwartet und bietet eine Gelegenheit für eine authentische Klärung im Unterricht • Die Kursteilnehmenden sagen möglicherweise die Entstehung eines Amplikons mit ca. 1.750 bp vorher, das von den reversen Wildtyp- und vorwärts editierten Primern produziert wird. Dies ist eine reelle Möglichkeit. Die Elongation des 1.750-bp-Amplikons dauert jedoch länger und wird durch das Design des PCR-Programms unterdrückt • Der Überstand der InstaGene Matrix ist technisch gesehen eine bessere Negativkontrolle als Wasser. Das Dekantieren des Überstands macht die verbleibende InstaGene Matrix jedoch unbrauchbar. Stattdessen wird Wasser verwendet, um Abfall zu vermeiden • Die als Positivkontrolle verwendete DNA-Matrize enthält alle drei PCR-Zielsequenzen, und in der Reaktion entstehen Amplikons mit ca. 1.100 bp, ca. 650 bp und ca. 350 bp • Beurteilungsmöglichkeit des Wissensstands: Anhand der Art der PCR-Vorhersagen kann der Wissensstand der Kursteilnehmenden überprüft werden. Zum Beispiel könnten Kursteilnehmende fälschlicherweise annehmen, dass Primersätze separat zu Proben hinzugefügt werden oder dass sowohl das 1.100- als auch das 650-bp-Amplikon in einer einzigen Probe hergestellt würden. Es ist zwar möglich, dass beide Amplikons aus einer Kolonie mit einer gemischten Population erzeugt werden, aber wenn eine Kolonie wie beabsichtigt aus einer einzigen transformierten Zelle wächst, sollte nur ein Amplikon vorhanden sein
Teil 3. Gelelektrophorese und Visualisierung	• Die Laboraktivität der Agarosegelelektrophorese ist für das Fast Gel-Protokoll von Bio-Rad mit einer Dauer von 10 Minuten ausgelegt. Für dieses Protokoll wird ein Netzteil benötigt, dass für die Abgabe von 300 V geeignet ist, zum Beispiel Bio-Rad PowerPac Basic Power Supply. Weitere Informationen finden Sie im Anhang

Extraktion von DNA aus einer Bakterienkolonie und PCR (Fortsetzung)

	Tipps und Hinweise für den Unterricht
Teil 4. Datenanalyse und -auswertung	• Beispiel für ein Kursteilnehmergel:



Spur	**Probe**	***lacZ*-Genstatus**
1	Molekulargewichtsstandard	n. z.
2	DNA als Positivkontrolle (+)	n. z.
3	PCR-Probe (S)	Wildtyp
4	PCR-Probe (C)	Wildtyp
5	PCR-Probe (D1)	Editiert
6	PCR-Probe (D2)	Editiert
7	PCR-Probe (B/D3)	???
8	Negativkontrolle (–)	n. z.

- Spur 7 stellt ein seltenes Ergebnis dar, das erhalten wird, wenn Bakterien den durch Cas9 verursachten Doppelstrangbruch reparieren, ohne die Donor-DNA-Matrize zu verwenden, und tritt bei Verwendung von Kolonien auf Platte B oder D auf. Obwohl das *lacZ*-Gen in diesen Fällen editiert ist, fehlt die Sequenz, an die der Primersatz für das editierte *lacZ* binden könnte und die durch die Donor-DNA-Matrize eingeführt wird. Die genaue Ursache dieser seltenen Ereignisse ist nicht genau bekannt. Bei den meisten Kursteilnehmenden wird Spur 7 genauso aussehen wie Spur 5 und Spur 6
- Achten Sie darauf, dass die Kursteilnehmenden Beweisdaten sowohl aus der Multiplex-PCR als auch aus bakteriellen Transformationsexperimenten einbeziehen, wenn sie ihre Hypothesen aufstellen
- Möglichkeit zur Beurteilung des Wissensstandes: Zeigen Sie den Kursteilnehmenden das Beispielgel und lassen Sie sie Erklärungen für das Ergebnis in Spur 7 UND weitere Experimente vorschlagen, die helfen könnten, die Ursache zu ermitteln. Beispielsweise könnte eine Sequenzierung detaillierte Informationen über den Status des *lacZ*-Gens liefern

Anhang

Fast Gel-Protokoll und Anleitung zur Vorbereitung der Elektrophorese

In den Ressourcen finden Sie Links zu Videos mit Anleitungen zum Gießen, Laden und Laufenlassen von Agarosegelen.

Fast Gel-Protokoll

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Visualisierung von DNA-Banden auf einem Agarosegel mit veränderten Bedingungen und alternativen Reagenzien zu beschleunigen. Diese Optionen sowie die dafür erforderlichen Materialien und Protokolle sind nachstehend aufgeführt.

1. 1 % Agarosegele mit 1x TAE-Puffer gießen.
2. 0,25x TAE-Elektrophoresepuffer vorbereiten.
3. Proben laden, das Gel mit den in Tabelle 1 genannten Parametern laufen lassen und die DNA mit einer der Färbeoptionen unten sichtbar machen.

Tabelle 1. Elektrophorese-Optionen.

Elektrophorese-Puffer und -Spannung	Dauer der Elektrophorese
0,25x TAE bei 300 V*	10 min
0,25x TAE bei 200 V	20 min
1x TAE bei 100 V	30 min

* Erfordert ein Netzteil mit einer Spannung von 300 V, z. B. das PowerPac Basic Power Supply (Katalog-Nr. 1645050EDU).

UView 6x Loading Dye and Stain: DNA-Proben unter Verwendung von 6x UView Loading Dye and Stain für die Elektrophorese vorbereiten.
Nach der Gelelektrophorese sofort mit einem UV-Leuchtkasten oder einer UV-Handlampe im Dunkeln sichtbar machen.

Fast Blast DNA Stain: DNA-Proben vor der Elektrophorese mit 5x Orange G Loading Dye vorbereiten. Nach der Elektrophorese die DNA mit dem Färbemittel Fast Blast DNA Stain färben und am nächsten Tag visualisieren.

Agarosegele vorbereiten

Entweder acht 7 x 7 cm Gele mit einem Kamm mit 8 Vertiefungen für acht Arbeitsplätze oder vier 7 x 10 cm Gele mit jeweils zwei Kämmen mit 8 Vertiefungen gießen, die von zwei Arbeitsplätzen gemeinsam verwendet werden. Tabelle 2 enthält Mengenangaben für verschiedene Optionen.

Tabelle 2. Volumen und Mengen der Reagenzien für Agarosegele.

Anzahl der Gele	1	4	8	16
1 % TAE-Agarosegel (7 x 7 cm) – für einen Arbeitsplatz				
Gereinigtes Wasser, ml	39	156	312	624
50x TAE, ml	0,8	3,2	6,4	12,8
Agarose, g	0,4	1,6	3,2	6,4
Gesamtvolumen an geschmolzener Agarose, ml	40	160	320	640
1 % TAE-Agarosegel (7 x 10 cm) – für zwei Arbeitsplätze				
Gereinigtes Wasser, ml	49	196	392	784
50x TAE, ml	1,0	4,0	8,0	16,0
Agarose, g	0,5	2,0	4,0	8,0
Gesamtvolumen an geschmolzener Agarose, ml	50	200	400	800

Agarose schmelzen

1. Die erforderliche Menge Agarosepulver und dann die Flüssigkeiten in einen geeigneten Behälter geben (nicht mehr als 50 % des Behältervolumens). Zum Mischen schwenken.

   Hinweis: Bei Verwendung eines Erlenmeyer-Kolbens ein kleines 25 ml-Becherglas über die Öffnung stülpen, um die Verdunstung zu minimieren. Bei Verwendung einer Flasche den Deckel lose aufsetzen, damit Luft und Dampf entweichen können.

2. Die Agarose-Lösung in die Mikrowelle stellen. Für 3 Minuten in der Mikrowelle erhitzen. In 30-Sekunden-Schritten weiter erhitzen, bis die Lösung siedet und sich die gesamte Agarose aufgelöst hat.

   Vorsicht: Bei der Vorbereitung von Agarosegelen immer hitzebeständige Schutzhandschuhe, Schutzbrille und einen Laborkittel tragen. Heiße geschmolzene Agarose kann schwere Verbrennungen verursachen.

3. Die Agarose vor dem Gießen der Gele auf etwa 60 °C abkühlen lassen.

Agarosegele gießen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Agarosegele zu gießen. In diesem Abschnitt ist die Methode mit Klebeband beschrieben. Informationen zu alternativen Methoden finden Sie in der Gebrauchsanleitung Ihres horizontalen Elektrophoresesystems.

1. Die Enden einer Gelwanne fest mit Standard-Laborklebeband (kein normales Klebeband) verschließen.

2. Den Kamm in die dafür vorgesehene Vertiefung in der Gelwanne einsetzen. Wenn ein Gel mit zwei Reihen von Vertiefungen gegossen werden soll, wird ein Kamm an einem Ende der Wanne und ein zweiter Kamm in der Mitte der Gelwanne eingesetzt.

3. Sobald die geschmolzene Agarose auf mindestens 60 °C abgekühlt ist, so viel Agarose eingießen, bis die Zähne des Gelkamms bedeckt sind, oder bis zu einer Tiefe von 0,5–0,75 cm.

4. Das Gel bei Raumtemperatur für 10–20 Min. fest werden lassen.

5. Den Kamm bzw. die Kämme und die Klebefolie vorsichtig entfernen.

6. Die Gele in einem verschließbaren Kunststoffbeutel bis zu 1 Tag bei Raumtemperatur oder bis zu 1 Woche im Kühlschrank lagern.

TAE-Puffer vorbereiten

Üblicherweise wird 1x TAE-Puffer sowohl zum Gießen des Gels als auch als Laufpuffer verwendet. Die Elektrophorese kann stark verkürzt werden, indem die Gele stattdessen mit 0,25x TAE-Puffer bei 200 oder 300 V laufen gelassen werden. Jedoch erfolgt auch bei Verwendung dieses schnelleren Protokolls das Gießen der Gele weiterhin mit 1x TAE-Puffer. Siehe Tabelle 3.

1. Destilliertes Wasser mit dem in Tabelle 10 angegebenen Volumen von 50x TAE-Puffer kombinieren und gut mischen.

   Hinweis: Wenn Sie 0,25x TAE-Puffer nacheinander in verschiedenen Unterrichtseinheiten verwenden, stellen Sie sicher, dass der Puffer vor der Verwendung höchstens Raumtemperatur hat. Wenn der Puffer bereits vorab zu warm ist, kann er sich so stark erwärmen, dass er das Agarosegel während eines Hochspannungslaufs zum Schmelzen bringt.

Tabelle 3. Volumen und Mengen der Reagenzien für den Elektrophoresepuffer.

Anzahl der Elektrophoresekammern	1	4	8	16
0,25 % TAE-Puffer				
Gereinigtes Wasser, ml	274	1.094	2.189	4.378
50x TAE, ml	1,4	5,6	11	22
Gesamtvolumen an 0,25 % TAE-Puffer, ml	275	1.100	2.200	4.400

DNA visualisieren

UView 6x Loading Dye and Stain

Bei Verwendung von UView 6x Loading Dye and Stain ist keine zusätzliche Vorbereitung erforderlich.

1. Bei der Vorbereitung von DNA-Proben Orange G Loading Dye durch UView 6x Loading Dye and Stain ersetzen.

2. Direkt nach der Elektrophorese die Gele vorsichtig auf einen UV-Leuchtkasten legen, die UV-Abschirmung anbringen und das UV-Licht zur Visualisierung einschalten.

Fast Blast DNA Stain-Färbemittel

1. 100x Fast Blast DNA Stain nach den Mengenangaben in Tabelle 4 vorbereiten.

2. Pro Gel ~50 ml 100x Färbemittel in eine Gelfärbewanne geben und 2–3 Min. vorsichtig schwenken.

3. Nach 2 Min. das Färbemittel abgießen und für den nächsten Gebrauch aufbewahren.* Bei einer längeren Färbedauer wird die Hintergrundfärbung deutlich intensiver.

4. Das Gel 30 s bis 1 Min., oder so lange, bis die Oberflächenfärbung vollständig entfernt ist, mit Leitungswasser spülen. Das Gel vollständig mit viel Leitungswasser bedecken und zum Entfärben vorsichtig über Nacht schwenken lassen. Die DNA wird nach einigen Stunden als dunkelblaue Banden vor einem hellblauen Hintergrund sichtbar, wobei sich der Kontrast über Nacht allmählich verstärkt.

   Hinweis: Die Verwendung von 100x Fast Blast DNA Stain verhindert, dass die kleinen DNA-Fragmente während der Färbung über Nacht in das Gel diffundieren. Aufgrund seiner niedrigeren Konzentration verhindert 1x Fast Blast DNA Stain die Diffusion von DNA Fragmenten jedoch nicht und sollte daher nicht zum Färben über Nacht verwendet werden.

   * 100x Fast Blast DNA Stain kann mindestens sechsmal wiederverwendet werden.

Tabelle 4. Vorbereitung von 100x Fast Blast DNA Stain.

Anzahl der zu färbenden 7 x 10 cm Gele	1	4	8	16
500x Fast Blast DNA Stain, ml	10	40	100	200
Destilliertes Wasser, ml	40	160	400	800
Gesamtvolumen an 100x Fast Blast DNA Stain, ml	50	200	500	1000

Ressourcen

Beladen eines Agarosegels und Durchführung einer Agarosegelelektrophorese: https://www.youtube.com/watch?v=uAttNVEEEwY. Stand: 6. Februar 2020.

Gießen eines Agarosegels: https://www.youtube.com/watch?v=qbUMRDrNnu8. Stand: 5. März 2020.

Interaktive Animation der Polymerase-Ketten-Reaktion:
https://www.bio-rad.com/webroot/web/movies/lse/global/english/what-is-polymerase-chain-reaction/tutorial.html.
Stand: 6. Februar 2020.

Carroll D (2017). Genome editing: past, present, and future. Yale J Biol Med 90, 653–659.

Edwards MC und Gibbs RA (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. Genome Res 3, S65–S75.

Markoulatos P, et al. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. J Clin Lab Anal 16, 47–51.

Regalado A. (2019) Gene-edited cattle have a major screwup in their DNA. MIT Technology Review,
https://www.technologyreview.com/s/614235/recombinetics-gene-edited-hornless-cattle-major-dna-screwup/.
Stand: 24. Februar 2020.

Rechtliche Hinweise

BIO-RAD und MINI-SUB sind in bestimmten Ländern Marken der Bio-Rad Laboratories, Inc..
Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.
© 2022 Bio-Rad Laboratories, Inc.
Dieses Produkt ist nicht für die Selbstanwendung bestimmt.

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Website *bio-rad.com* ***USA*** *1 800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *00 800 00 24 67 23* ***Belgium*** *00 800 00 24 67 23* ***Brazil*** *4003 0399*
Canada *1 905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *00 800 00 24 67 23* ***Denmark*** *00 800 00 24 67 23* ***Finland*** *00 800 00 24 67 23*
France *00 800 00 24 67 23* ***Germany*** *00 800 00 24 67 23* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *00 800 00 24 67 23* ***India*** *91 124 4029300* ***Israel*** *0 3 9636050*
Italy *00 800 00 24 67 23* ***Japan*** *81 3 6361 7000* ***Korea*** *82 2 3473 4460* ***Luxembourg*** *00 800 00 24 67 23* ***Mexico*** *52 555 488 7670*
The Netherlands *00 800 00 24 67 23* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *00 800 00 24 67 23* ***Poland*** *00 800 00 24 67 23* ***Portugal*** *00 800 00 24 67 23*
Russian Federation *00 800 00 24 67 23* ***Singapore*** *65 6415 3188* ***South Africa*** *00 800 00 24 67 23* ***Spain*** *00 800 00 24 67 23* ***Sweden*** *00 800 00 24 67 23*
Switzerland *00 800 00 24 67 23* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 651 8311* ***United Arab Emirates*** *36 1 459 6150* ***United Kingdom*** *00 800 00 24 67 23*

10000122387 Ver C DE *22-0527 0822 Sig 0122*