

Konservierung von Tier-Gewebe für DNA-Analysen in GBOL – German Barcode of Life



Version vom 04.08.2012

Für das GBOL-Projekt, German Barcode of Life, sollen für alle Vielzeller-Arten, die in Deutschland vorkommen, insgesamt im Projekt bis zu 10 artgleiche Individuen von möglichst weit auseinander liegenden Fundpunkten gesammelt werden (diese können auch im Ausland liegen). Allgemeine Infos zum Projekt und mittelfristig auch die Information dazu, welche Arten schon gesammelt wurden, finden Sie auf dem GBOL-Portal:

<http://www.bolgermany.de/>

In dem vorliegenden Leitfaden sind die wesentlichen Faktoren für die Bereitstellung von geeigneten Tierproben für GBOL knapp dargestellt. Details können Sie mit dem für die entsprechende Tiergruppe zuständigen Koordinator klären. Diesen finden Sie unter:

<http://www.bolgermany.de/kontakt> oder <http://www.bolgermany.de/team/projekte>

Anforderungen für Tierproben in GBOL:

ALLGEMEINES

- Die Proben sollten **frisch gesammelt oder höchstens wenige Jahre alt** sein.
- Die Proben sollten im Idealfall aus dem **gesamten Organismus** bestehen (Ausnahmen, z.B. bei Material aus einem Museum, bitte mit dem/der zuständigen Koordinator/in der Tiergruppe in GBOL besprechen): wir brauchen einen Voucher, um die zukünftige Nachprüfbarkeit und aufbauende Forschung zu gewährleisten.
- Die Probe sollte das Geschlecht haben, das die relevanten diagnostischen Merkmale der Art trägt, z.B. bei Arthropoden meist die **Männchen**.
- Bitte identifizieren Sie die Proben so tief wie möglich, d.h. bis zur Art (ggf. Unterart).
- **Bitte in ein Röhrchen auch immer nur ein Tier geben** (auch mehrere Tiere einer Art sollen in jeweils einzelne Röhrchen). Wenn machbar, möglichst schon beim Sammeln einzeln 'einschnapsen', damit keine DNA übertragen wird (zum Einsatz von Tötungsgläsern, s.u.). Ausnahme: bei sehr kleinen Tieren unter 2mm können je 2-3 Tiere derselben Population in ein Röhrchen (s.u.).

Sammelröhrchen mit Ethanol werden von den meisten GBOL-Häusern **gestellt** (am ZFMK auch voretikettiert). Bitte geben Sie nicht genutzte Röhrchen wieder zurück.

- Zeitgleich mit den Proben brauchen wir die dazugehörigen **Daten** (Sammelinfos inkl. GPS-Koordinaten, Determination); bitte nutzen Sie hierfür unsere aktuelle **GBOL-Excel-Tabelle**, die Sie über das GBOL-Portal herunterladen können.
- Wir müssen davon ausgehen können, dass die Proben 'legal' gesammelt wurden (d.h. entsprechende Genehmigungen vorlagen, wo dies nötig war).

KONSERVIERUNG

Sofort nach dem Tod des Organismus beginnt der Abbau der DNA (der Erbsubstanz) in den Zellen. Damit die DNA nicht innerhalb kurzer Zeit zersetzt und die Probe für Barcoding-Analysen wertlos ist, muss man diesen Abbau stoppen. Hierzu sollten die Proben am besten möglichst früh in 96-prozentigen Ethanol gelangen und gekühlt werden. Ethanol entzieht dem Gewebe das für den Abbau der DNA nötige Wasser und inaktiviert die DNasen. Wasser / Feuchtigkeit ist die größte Gefahr für die Konservierung von DNA!

- Die Proben sollten **möglichst früh in 96% Ethanol** (96% Ethylalkohol) gelangen, am besten direkt in 96% Ethanol sammeln (d.h. bei kleinen Tieren darin abtöten), wenn die Determination dann noch möglich ist (Verhärtung in hochprozentigem Alkohol).
 - **Niedrigprozentigeren Alkohol meiden!** Das Wasser in diesem führt zu DNA-Abbau; höherprozentigerer Ethanol enthält Spuren von Trocknungsmitteln: 96% sind das Optimum. Auch andere Alkohole sind suboptimal.
 - Wenn irgend möglich bitte **nur unvergällten Alkohol verwenden** (die unterschiedlichen Vergällungsmittel greifen teilweise stark die DNA an).
 - **Wichtig: das Volumen-Verhältnis von Probe : Ethanol sollte 1:10 nicht überschreiten** (hoher Ethanol-'Überschuss' nötig); andernfalls muss der Alkohol ausgetauscht werden (am Abend oder nächsten Tag und je nach Probengröße noch öfter), da er durch das Wasser in der Probe verdünnt wird. 'Austausch-Alkohol' wird gerne zur Abholung (Versand unzulässig) gestellt, sonst verkaufen auch Apotheken unvergällten 95% Ethanol in kleinen Mengen.
 - die Probe darf **nie in Kontakt mit Formalin** (= Formol) gekommen sein! Auch **Essigsäure** in flüssiger Form ist bitte zu **meiden**.
 - alternative Konservierungsflüssigkeiten (z.B. DMSO-NaCl, Propylenglykol) sind meistens suboptimal für die DNA – deren Einsatz bitte mit dem zuständigen Koordinator absprechen.
 - Lepidopteren sollten getrocknet werden.
- Die Proben sollten trocken und **kühl gelagert** worden sein.
 - **Für kurze Zeit** nicht einfrieren, sondern **im Kühlschrank** halten.
 - **Für längere Zeit**, ab ca. 3 Wochen, möglichst **einfrieren und nicht mehr auftauen** bis zur Übergabe; wiederholtes **Auftauen-Einfrieren schadet** der DNA.

Tips für Sammeln von GBOL-Proben:

PROBENGROSSE

- **Bei sehr kleinen Tieren**, kleiner als ca. 2mm, wäre es sehr hilfreich, wenn **zwei bis drei artgleiche Individuen vom exakt selben Fundort** und vom selben Sammeldatum pro Röhrchen eingereicht würden.
- **Sehr große Tiere**, die nicht passen oder die die Röhrchen fast komplett ausfüllen, bitte wie für morphologische Untersuchung sammeln und sofort **Unterproben, z.B. bei Arthropoden Beine** (2-3 von einer Körperseite) oder Muskel, wie oben beschrieben, in Alkoholröhrchen konservieren (Wirbeltier-Unterproben: s.u.). Dabei ist dringend zu beachten, dass das morphologische Belegexemplar die **selbe Identifizierungsnummer** wie die Gewebe-Unterprobe bekommt (es bietet sich die GBOL-ID an, sofern vor-zugewiesen). Diese Form des Sammelns ist für die Morphologie immer schonender und kann gerne auch für kleinere Proben angewendet werden, allerdings ist sie auch aufwendiger und fordert große Sorgfalt, um Zuordnungsfehler zu vermeiden. Bitte lassen Sie uns wissen, falls Sie routinemäßig so sammeln möchten, damit wir Ihnen die dazu am besten passenden Röhrchen zukommen lassen können.
- **Bei mittelgroßen Tieren** ist es immer sinnvoll, ein **Bein abzutrennen** (Arthropoden), oder den Hinterleib zu **punktieren**, um die schnelle Durchdringung des Gewebes mit Alkohol zu gewährleisten. Das abgebrochene oder abgeschnittene Bein bitte ebenfalls im Röhrchen lassen (da ja immer nur 1 Tier pro Gefäß enthalten ist, kein Problem der Zuordnung).
Wenn die Tiere ca. die Größe einer Hummel überschreiten, ist es hilfreich, ihnen 1x Alkohol aus dem Röhrchen mit einer Spritze direkt in den Hinterleib zu injizieren (z.B. am Abend nach dem Sammeln). Spritzen können manche der GBOL-Häuser mitschicken. Bitte nach Gebrauch im selben Röhrchen 5x leer durchspülen und trockenwischen.

Bitte daran denken, wenn die 'Biomasse' mehr als 1/10 des Röhrchens ausmacht, den Alkohol zu tauschen (s.o.). Wenn man hierbei zu nachlässig vorgeht, wird dies die DNA zerstören und im Labor muss dann sehr kostenintensiv festgestellt werden, dass die Probe für GBOL nicht taugt...

WEITERE TIPS

- Wenn wegen der Determinierung nicht direkt in Alkohol gesammelt werden kann, ist die Verwendung eines **Tötungsglases** für wenige Stunden eine Option, bitte aber Tötungsmittel immer nur **gasförmig wirken lassen** (z.B. ein Tropfen auf Papiertuch oder Watte im Glas) und hier gilt besonders: aus der Sonne/Hitze nehmen!
- generell **Sonneneinstrahlung** oder aufgeheiztes Fahrzeug möglichst **meiden**.
- Bitte entfernen sie, wenn möglich, sichtbare Fremdorganismen von der Oberfläche (z.B. Milben, Pflanzenteile) vor dem 'Einschnapsen'.
- Sterilisieren von schneidenden/spitzen Instrumenten (Spritzen, Mikroscheren, Rasierklingen o.ä. – bitte Vorsicht bei der Handhabung) sollte mindestens durch Spülen in 96% Alkohol und Abwischen mit jeweils unbenutztem Papier-Tuch erfolgen (besser: Abflämmen).
- Auch **Fallenmaterial** kann u.U. für GBOL geeignet sein; bitte kontaktieren Sie den für Ihre Tiergruppe zuständigen Koordinator mit allen Fallen-Details (Dauer bis zur Leerung, Sonnenaussetzung, Fangflüssigkeit – auch hier wäre eigentlich Ethanol am besten, notfalls Propylenglykol oder das giftigere Ethylenglykol).
- Im Labor wird in Platten von 95 Proben gearbeitet. Wenn Sie uns größere Zahlen an Proben zukommen lassen, **denken Sie bitte in 95er-Schritten**, (z.B. geben Sie uns 95 statt 100). Danke, das macht uns die Arbeit viel leichter! Wenn Sie Boxen im 95er-Format befüllen, ist es eine gute Idee, **artgleiche Proben** oder Schwesterarten **räumlich zu trennen** (nicht in die angrenzende Position, sondern einige Positionen weiter zu stecken), um eventuelle Laborfehler gleich zu sehen.
- Sammeln Sie bitte nachhaltig, wenn die natürlichen Ressourcen knapp sind.
- Insbesondere für tot gefundene Vertebraten bietet sich zum eigenen Schutz das Tragen von Labor-Handschuhen an. Letztere können wir Ihnen schicken (Größe S,M, oder L).
- Wer GBOL-Alkohol trinkt, wird zu Stein (früher oder später)!

Versand

- Legen Sie der Sendung bitte ein **Übersichtsblatt** bei, um welche Proben es sich handelt; dieses können Sie sich für den Ausdruck ausgeben lassen, wenn Sie Ihre Probendaten auf dem GBOL-Portal eingeben/hochladen: www.bolgermany.de
- Nutzen Sie den kostenlosen **Rücksendescchein**, falls Ihr GBOL-Partner diesen beilegt.
- Versand von Alkoholproben ist reguliert und v.a. von öffentlichen Einrichtungen wird erwartet, dass sie die aufwendigen Vorschriften diesbezüglich befolgen, wenn sie selbst Material verschicken (aus diesem Grund füllen nicht alle GBOL-Häuser den Alkohol bereits im Vorfeld in die Röhrchen). Beim Ethanolversand ist zu beachten:
 - Pro Paket darf maximal 1 Liter Alkohol verschickt werden.
 - Flüssigkeit muss in fest verschlossenen Röhrchen von < 30ml sein.
 - Eigentlich müssen die Röhrchen dann doppelt eingeschweißt und mit saugfähigem Material verpackt werden.In Ihrem Fall könnten Sie das Verpackungsmaterial aufbewahren und wieder abdichten, wenn Sie es zurückschicken. Dies liegt in Ihrem Ermessen.

Fotos

Gerne nehmen wir auch **digitale Farbfotographien** entgegen, insbesondere **des Habitats**, in dem das Tier gefunden wurde, ebenso **'Live-Bilder'** (gar bei Farbveränderung in Alkohol). Hierfür beachten Sie bitte:

- Die Kamera sollte auf **höchste Auflösung** eingestellt sein und ohne spezielle Farbkorrektur (keine "kräftigen Farben" o.ä.). Die Bilder sollten nicht verwackelt sein.
- Das Objekt sollte zentriert und ohne viel seitlichen Freiraum sein. Ausrichtung des Tiers nach links bei lateraler, nach oben bei dorsaler/ventraler Sicht.
- Wenn dies ohne Präparation möglich ist, sollten die **diagnostischen Charaktere** sichtbar sein. Eine Maßstab-Skala kann immer gerne hinzugefügt werden.
- Benennung der Bilder bitte anpassen an die Identifizierungsnummer der Probe, z.B. GBOL-400789 oder für mehrere: GBOL-400789-a plus GBOL-400789-b usw. Wenn Habitatbilder für mehr als eine Probe passen, bitte separat die Zuordnung auflisten.
- Eventuelle Erläuterungen/Kommentare bitte in der GBOL-Sammeltabelle im Feld "Bemerkungen zur Probe" vornehmen, und davorschreiben: *Foto*:
- Wenn Ihre Bilder in die Datenbank aufgenommen und online angezeigt werden, geschieht dies unter einer **Creative Commons (CC) BY-Lizenz** (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/de/>), d.h. Sie geben das Werk für die weitere Nutzung frei, es muss aber stets Ihr Name als Autor angezeigt werden (sollten Sie dies anders als Vorname und Nachname wünschen, bitte mitteilen).

Gewebeproben von Wirbeltieren

Da Wirbeltiere nicht 'am Stück' in kleinen Ethanolröhrchen präserviert werden können, müssen Unterproben genommen werden (s.o.).

- Wir ziehen **Muskelgewebe** immer anderen Proben vor. Stark schleimhaltige, verhärtete Gewebe und insbesondere Darm aber bitte auf jeden Fall vermeiden.
- Bitte konservieren Sie pro Röhrchen ein **Stück von max. 0,5cm³ in 96% Ethanol** (oder alternativ mehrere kleine).
Falls die Röhrchen nicht zeitnah eingereicht werden (gekühlt ca. 1 Woche), wechseln Sie bitte den Alkohol (z.B. am Folgetag).
- Leicht zu beprobende Gewebe:
 - Amphibien/Reptilien – Zehen, Schwanzspitzen (wo vorhanden)
 - Vögel – Zehen
 - Säuger (insbes. Kleinsäuger) – Stückchen eines Ohrs oder Schwanzspitze
 - Fische – Stück der Pectoralflosse (aber mit Kontaminationsgefahr verbunden) oder, destruktiver für die Probe, Auge
- **Blut** bitte nur im **Notfall** nehmen, in **EDTA** (nicht Alkohol) konserviert, möglichst sofort schicken oder für sehr wenige Tage im Kühlschrank (> 0°C) lagern.
- Auch nur notfalls: Federn (> 5) oder Haare (> 20; ausgerissen, nicht geschnitten), in hermetisch verschließbaren Tüten (z.B. Ziploc) trocken schicken, und mit der Probennummer auf einem Zettel in der jeweiligen Tüte (also direkt bei der Probe).