

## Info-Box

**Die Gel-Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zur Trennung genutzt wird. Zur Trennung von Nukleinsäuren (DNA, RNA) besteht die Gelmatrix meist aus Agarose, einem langkettigen Zucker, der aus der Zellwand von Rotalgen gewonnen wird.**

## Die Gelmatrix

Agarosepulver wird mit einem entsprechenden Puffer aufgeköcht und die klare Flüssigkeit in einen Gießrahmen gegossen. Bevor das Gel abkühlt und damit aushärtet, wird ein Kamm hineingesteckt, dessen einzelne Zacken nach dem späteren Entfernen jeweils eine Tasche für das Probenmaterial bieten (siehe Abb. 1 und Abb. 2). Die Matrix stellt dann ein dreidimensionales Netz mit einer definierten Porengröße dar. Vor dem Auftragen wird der Probe zum Beschweren und farblichen Markieren ein Ladepuffer zugesetzt.

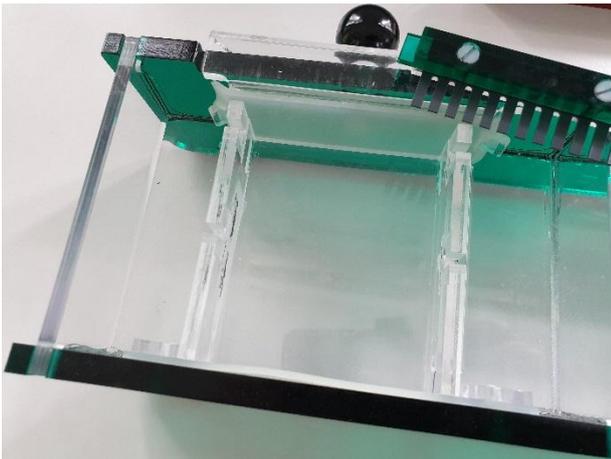


Abb. 1: Gießrahmen mit Gelkamm

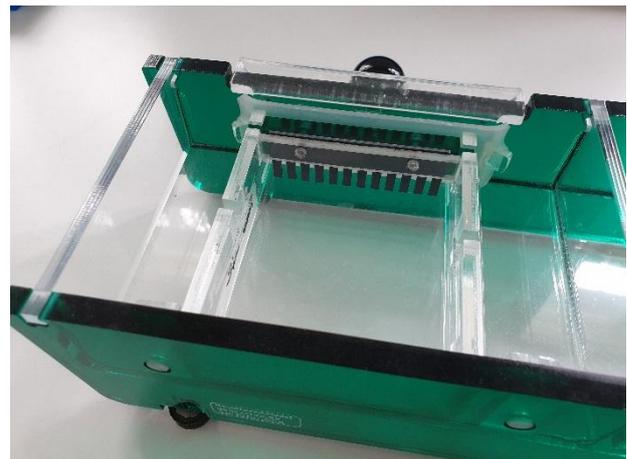


Abb. 2: Nach dem Gießen des Agarosegemisches in den Gießrahmen wird der Kamm hineingesteckt.

**Frage 1:** Je nachdem wie groß die zu trennenden DNA-Fragmente sind, muss die Gel-Matrix entsprechend hergestellt werden. Je kleiner die Gelporen sind, desto schwieriger ist es für große Moleküle, das Gel zu durchdringen. Wie kann man eine relativ kleine Porengröße im Agarose-Gel erreichen?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## Die Gel-Elektrophorese

Das Gel wird in eine mit einer gepufferten Salzlösung gefüllte Gel-Kammer gelegt. Die zu untersuchende Probe mit DNA-Material wird nach dem Entfernen des Kammes mit Hilfe einer Pipette in die Taschen gefüllt. Als „molekulares Lineal“ muss in eine der Taschen immer ein Molekulargewichtsstandard pipettiert werden. Darunter versteht man eine Mischung verschieden großer DNA-Fragmente mit bekannter Größe. Eine Spannungsquelle wird angeschlossen. Die Moleküle beginnen, im elektrischen Feld zu wandern. Dabei ist die Trennung der unterschiedlich großen Fragmente umso besser, je höher die angelegte Spannung und je länger die Laufzeit ist. Um zu verhindern, dass die Proben aus dem Gel in den Puffer laufen und damit für die Analyse verloren sind, muss die Elektrophorese rechtzeitig beendet werden.



Abb. 3: Gießrahmen mit ausgehärtetem Gel. Einer der beiden Käbme steckt noch im Gel.



Die obere Reihe bietet 10 Taschen für die zu analysierenden Proben.

Die Taschen der unteren Reihe sind kleiner, hier können 12 Proben geladen werden.

Abb. 4: Die Käbme wurden entfernt, die Taschen zum Einfüllen der Proben sind sichtbar.



Abb. 5: Das Gel liegt in der Elektrophorese-Kammer. Vier Taschen des Gels sind schon beladen.

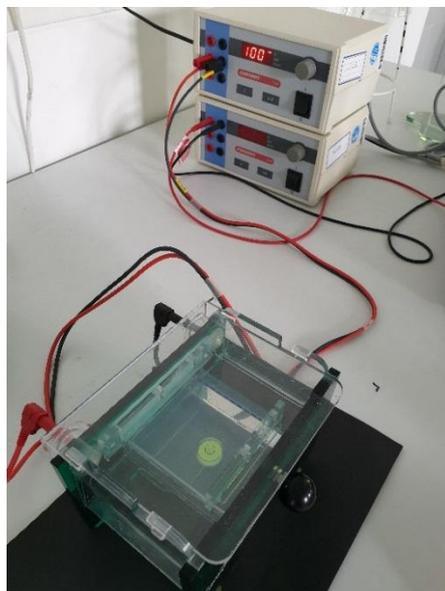


Abb. 6: Die Spannungsquelle ist angeschlossen.

Hinweis: Fotos im LoLa-Labor erstellt (Mai 2020)

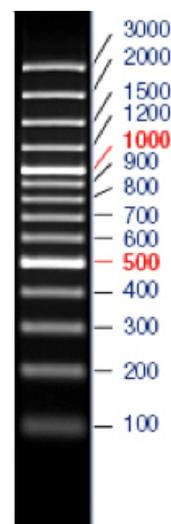
**Frage 2:** Die DNA-Moleküle beginnen nach Anschluss der Spannung im elektrischen Feld durch das Gel zu wandern. Zu welchem Pol wandern sie? Begründen Sie!

.....

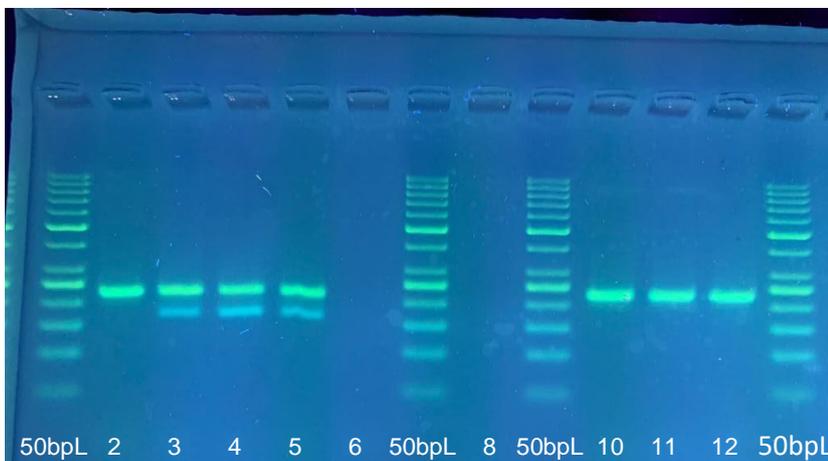
.....

**Auswertung des Gels:**

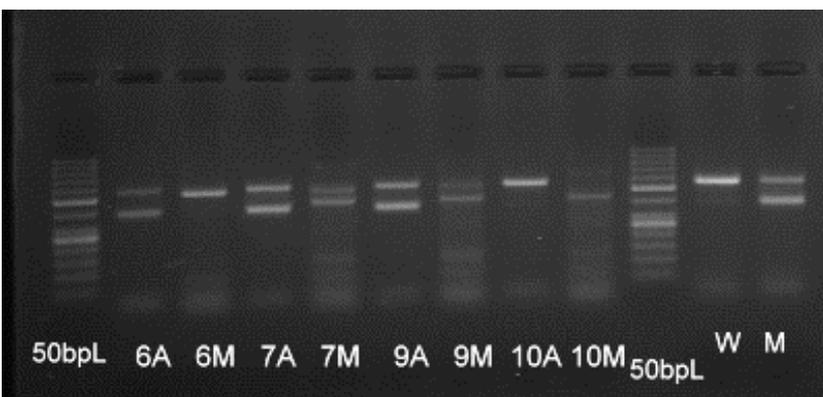
Die DNA-Fragmente wandern umso schneller, je kleiner die Moleküle sind. Nach dem Gellauf haben sich die kleinen Moleküle am weitesten vom Auftragungsort entfernt (die Laufstrecke korreliert negativ mit dem Logarithmus der Molekülgröße). DNA-Moleküle gleicher Größe sammeln sich auf einer Höhe in sogenannten Banden. Zur Identifizierung der Fragmentgrößen wird in einer parallelen Spur des Gels ein Molekulargewichtsstandard aufgetrennt. Beispielsweise wird eine 100bp-Leiter verwendet, d.h. die Fragmentgrößen (in Basenpaaren, bp) sind ganzzahlige Vielfache von 100 (Abb. 7). Die Anfärbung der DNA erfolgt mit einem unter UV-Licht fluoreszierenden Farbstoff, der sich in den DNA-Doppelstrang einlagert. Der Farbstoff wurde dem Gel bereits beim Gießen zugesetzt. Betrachtet man ein Gel unter UV-Licht, so fluoresziert der in der DNA eingelagerte Farbstoff je nach Produkt grün oder orange. Je mehr Farbstoffmoleküle sich eingelagert haben, umso stärker ist die Fluoreszenz (Beispiele siehe Abb. 8 und Abb. 9).



**Abb. 7:** GeneRuler™ 100bp Plus DNA Leiter der Fa. Thermo Fisher Scientific



**Abb. 8:** Fotografie eines Gels unter UV-Licht. In die Taschen 1, 7, 9 und 13 wurde jeweils eine 50bp-Leiter; in die Taschen 2 bis 5 sowie 10 bis 12 die zu analysierenden Proben pipettiert. Die Taschen 6 und 8 wurden mit Negativ-Kontrollen befüllt. Mittels PCR wurde ein Mikrosatellit auf dem Chromosom 1 der Hausmaus untersucht. Einige der untersuchten Tiere sind homozygot, andere heterozygot.



**Abb. 9:** In zwei Spuren wurde als Molekulargewichtsstandard eine 50bp-Leiter aufgetrennt. In den übrigen Spuren wurden PCR-Produkte aufgetrennt, die in einem LoLa-Kurs generiert wurden. Dabei wurde anonymisierte DNA freiwilliger Spender mit zwei Primerpaaren (A bzw. M) amplifiziert, die auch in der Kriminaltechnik verwendet werden. Es handelt sich bei diesem Experiment also um einen „abgespeckten“ genetischen Fingerabdruck.

Hinweis: Die Fotos stammen aus dem Lola Kursbetrieb.

**Frage 3:** Schauen Sie sich den Molekulargewichtsstandard auf den Abbildungen 8 und 9 an. Je zwei Banden der 50bpLeiter fluoreszieren zur besseren Orientierung bei der Gelauswertung besonders stark. Wie erreicht der Hersteller diese verstärkte Fluoreszenz der 250bp- und 400bp-Bande?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**Aufgabe:**

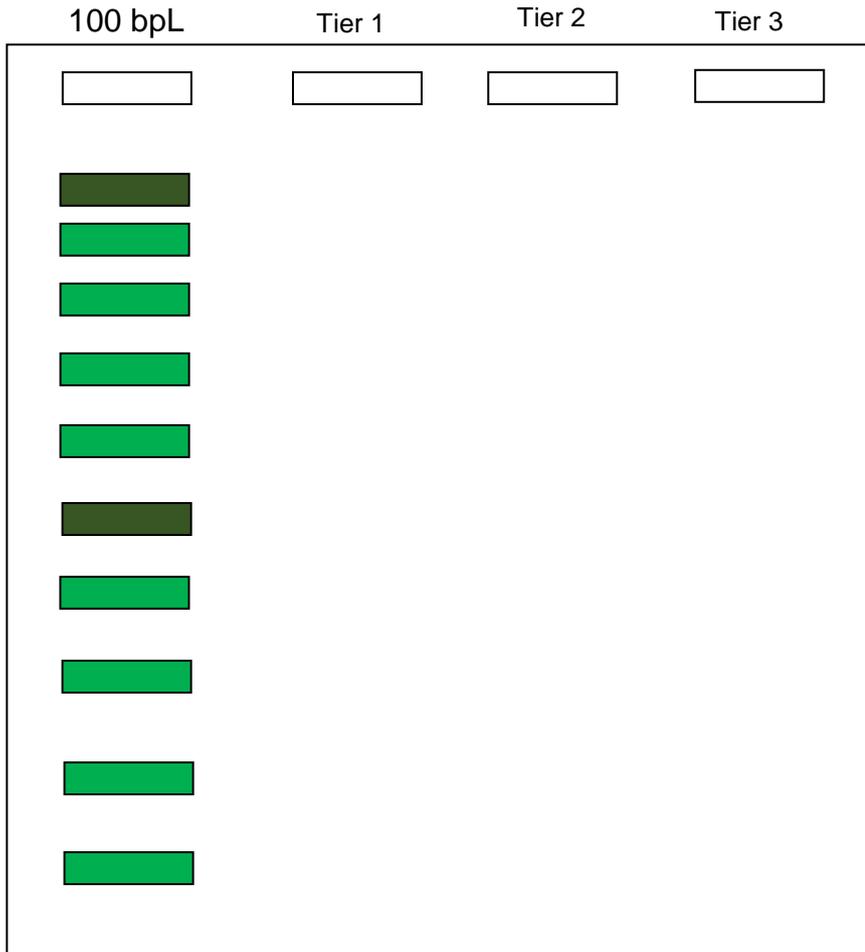
Als Molekulargewichtsstandard wurde in der nachfolgenden Gel-Skizze eine 100 bp Leiter dargestellt. Beschriften Sie zunächst die Banden des Molekulargewichtsstandards.

Aufgetrennte Proben: Aus dem Genom eines diploiden Organismus wurde eine DNA-Sequenz mittels PCR (Polymerase chain reaction) vervielfältigt (siehe auch LoLa Arbeitsmaterialien zur PCR). Es wurde ein DNA-Abschnitt untersucht, der in der Natur in unterschiedlichen Ausprägungen vorkommt (unterschiedliche Allele). Die PCR-Produkte dieser Allele können eine Größe von ungefähr 240 bp und 400 bp haben. Welche Allelkombinationen sind möglich, d.h. welche Ergebnisse sind zu erwarten? Vervollständigen Sie die folgende Skizze mit den verschiedenen Möglichkeiten!

Beachten Sie, dass bei diploiden Organismen jeweils zwei Allelvarianten möglich sind, der Organismus bezüglich eines genetischen Merkmals also heterozygot oder homozygot sein kann. Auf welcher Höhe zeichnen Sie die Banden ein? Begründen Sie!

Falls Sie unterschiedliche Fluoreszenz-Intensitäten erwarten, stellen Sie diese mit verschiedenen Farbtintensitäten dar und begründen Sie die Unterschiede.

# Schematisches Gel



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....