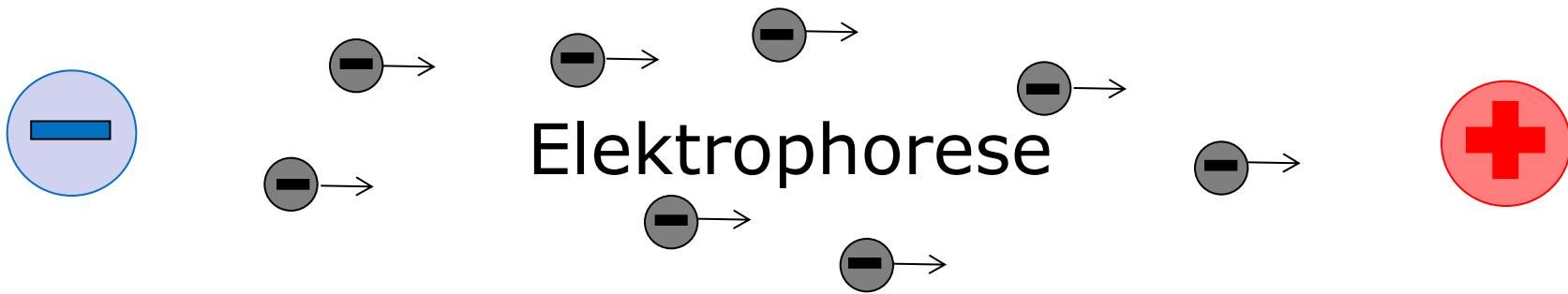


Gelelektrophorese

FI-Praktikum WS 2012/2013
„Molekulargenetik der Eukaryoten“



= Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld

Wanderungsgeschwindigkeit

proportional zu: Feldstärke und Ionenladung

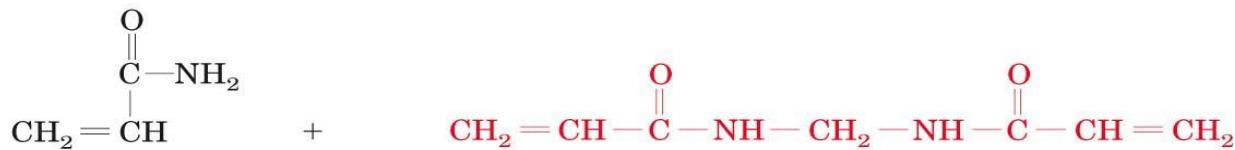
umgekehrt Teilchenradius und Viskosität

proportional zu: bzw. Porengröße des Mediums

Für Auftrennung von Nukleinsäuren oder Proteinen
Verwendung der **Gelelektrophorese**

Trägermatrix: Agarose oder Polyacrylamid

Polyacrylamidgele

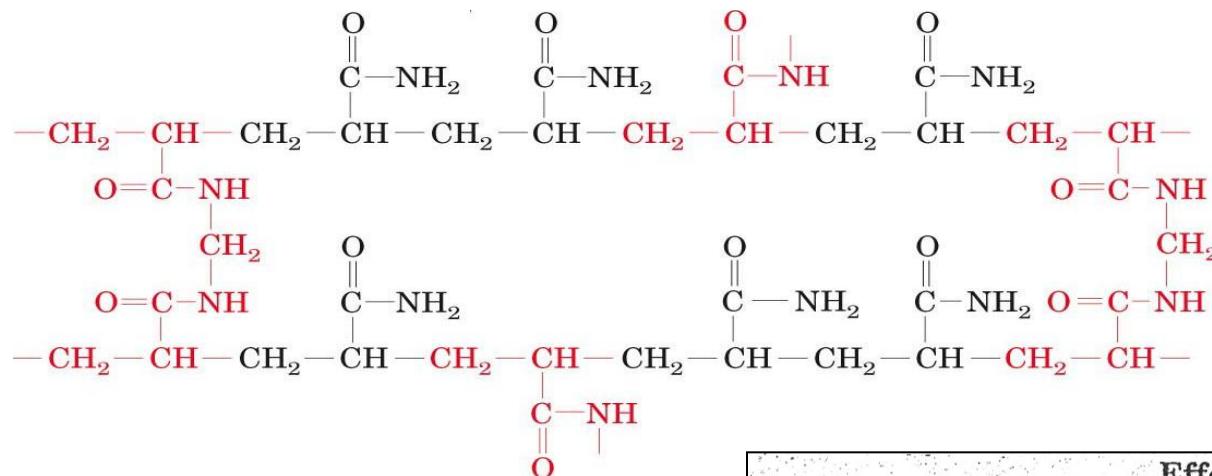


Acrylamid

Radikalstarter Ammonium-peroxodisulfat (APS)

Methylenbisacrylamid

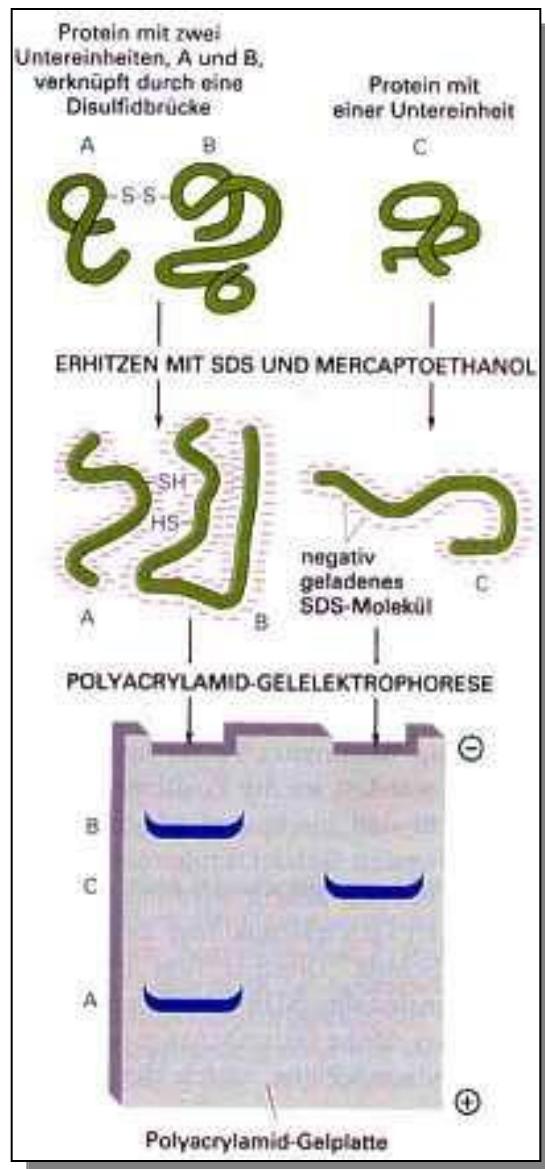
Polymerisierungskatalysator
Tetramethylethylendiamin (TEMED)



Bessere Auftrennung bei kleinen Molekülen wegen geringer Porengröße

Acrylamide (% [w/v]) ^a	Effective range of separation (bp)
3.5	1000–2000
5.0	80–500
8.0	60–400
12.0	40–200
15.0	25–150
20.0	6–100

Protein-Elektrophorese



Native Elektrophorese:

Ladung durch AS: Asp/Glu: -

Lys/Arg: +

His/Cys: - oder +

→ Ladung nicht proportional zur Masse

→ keine MW-Bestimmung möglich

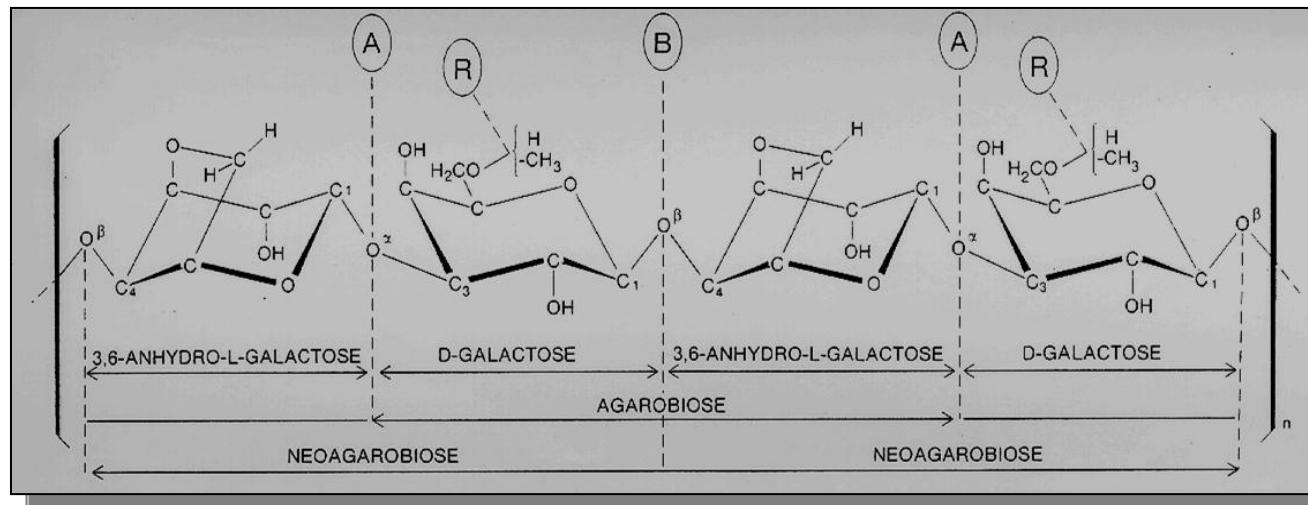
SDS-PAGE:

- SDS bindet stöchiometrisch an Protein
- 4°- und 3°-Struktur wird aufgelöst
- Protein erhält negativen Nettoladung

Negative Ladung des SDS ermöglicht Molekulargewichtsbestimmung, aber keine enzymatische Aktivität mehr

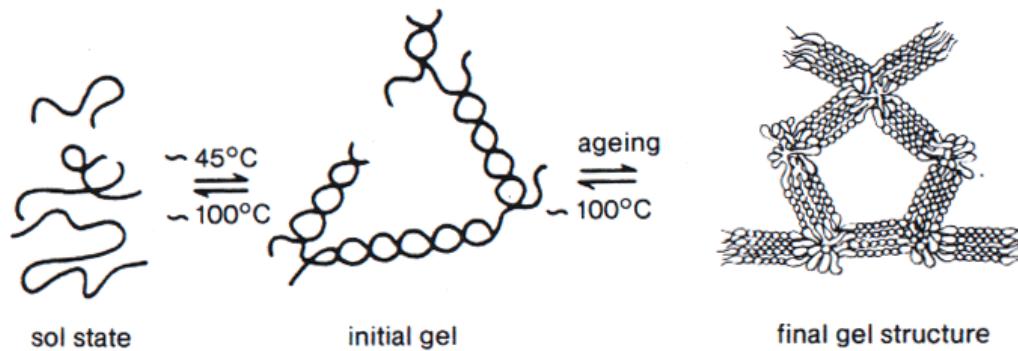
Agarose

- Gewonnen aus Seegras
- Entdeckt in Japan
- Erster Einsatz in der Biologie: 1882 R. Koch für Mikrobiologie
→ seit 1971 Elektrophorese
- Dimer aus D-Galactose und 3,6-anhydro-L-Galactose



Herstellung und Eigenschaften eines Agarose-Gels

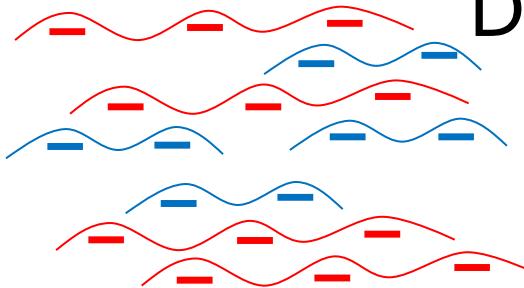
Festes Pulver in Puffer aufkochen, geliert beim Abkühlen ab etwa 45 °C



Porengröße und damit Trenneigenschaften hängen von der Agarosekonzentration ab

Amount of agarose in gel (% [w/v])	Efficient range of separation of linear DNA molecules (kb)
0.3	5–60
0.6	1–20
0.7	0.8–10
0.9	0.5–7
1.2	0.4–6
1.5	0.2–3
2.0	0.1–2

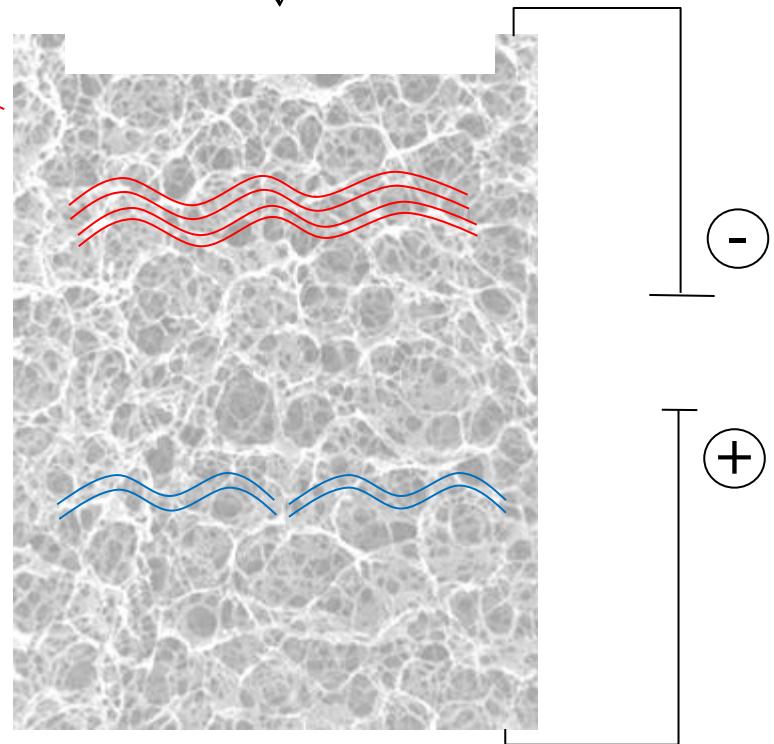
DNA-Gelelektrophorese



Hauptladungsträger sind die Phosphatgruppen des Zucker-Rückgrades

- Ladung proportional zu Masse
- Laufstrecke umgekehrt proportional zu Logarithmus von MW

Auf trennung der DNA im elektrischen Feld



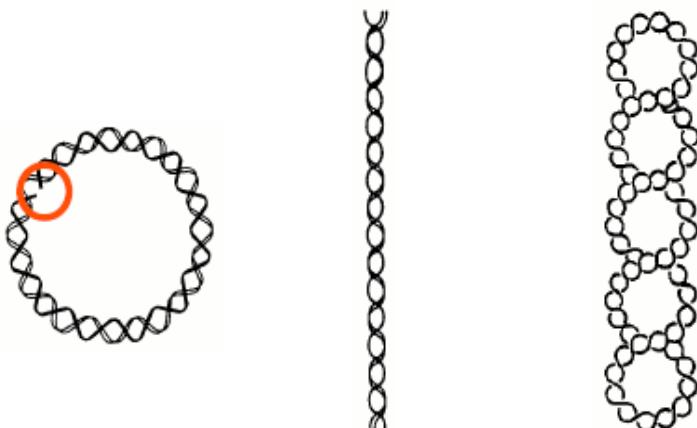
DNA-Fragmente bestimmter Größe laufen in Gelen unterschiedlicher Konzentration auch unterschiedlich schnell

Höhere Feldstärke steigert Laufgeschwindigkeit, opt. 5 V pro cm Elektrodenabstand

Konformation der DNA beeinflusst Wanderungsgeschwindigkeit

Plasmid-DNA

Open circle → Linear → Supercoiled



„curved DNA“

Änderung des Propellertwists
führt zu DNA-Krümmung

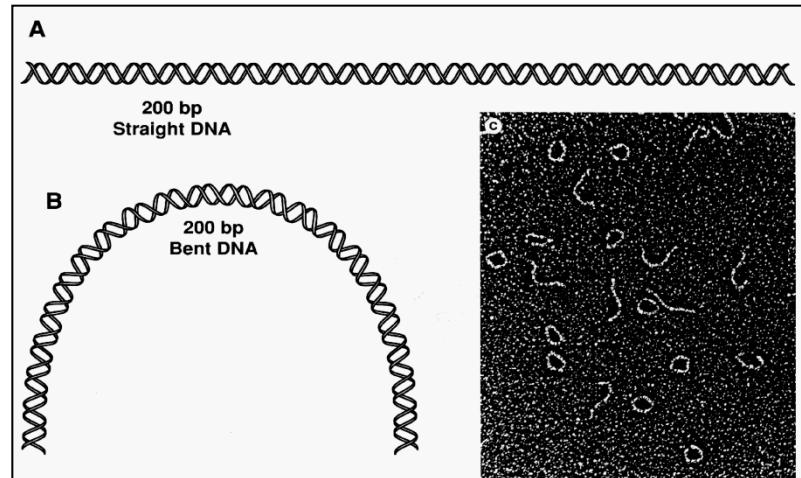
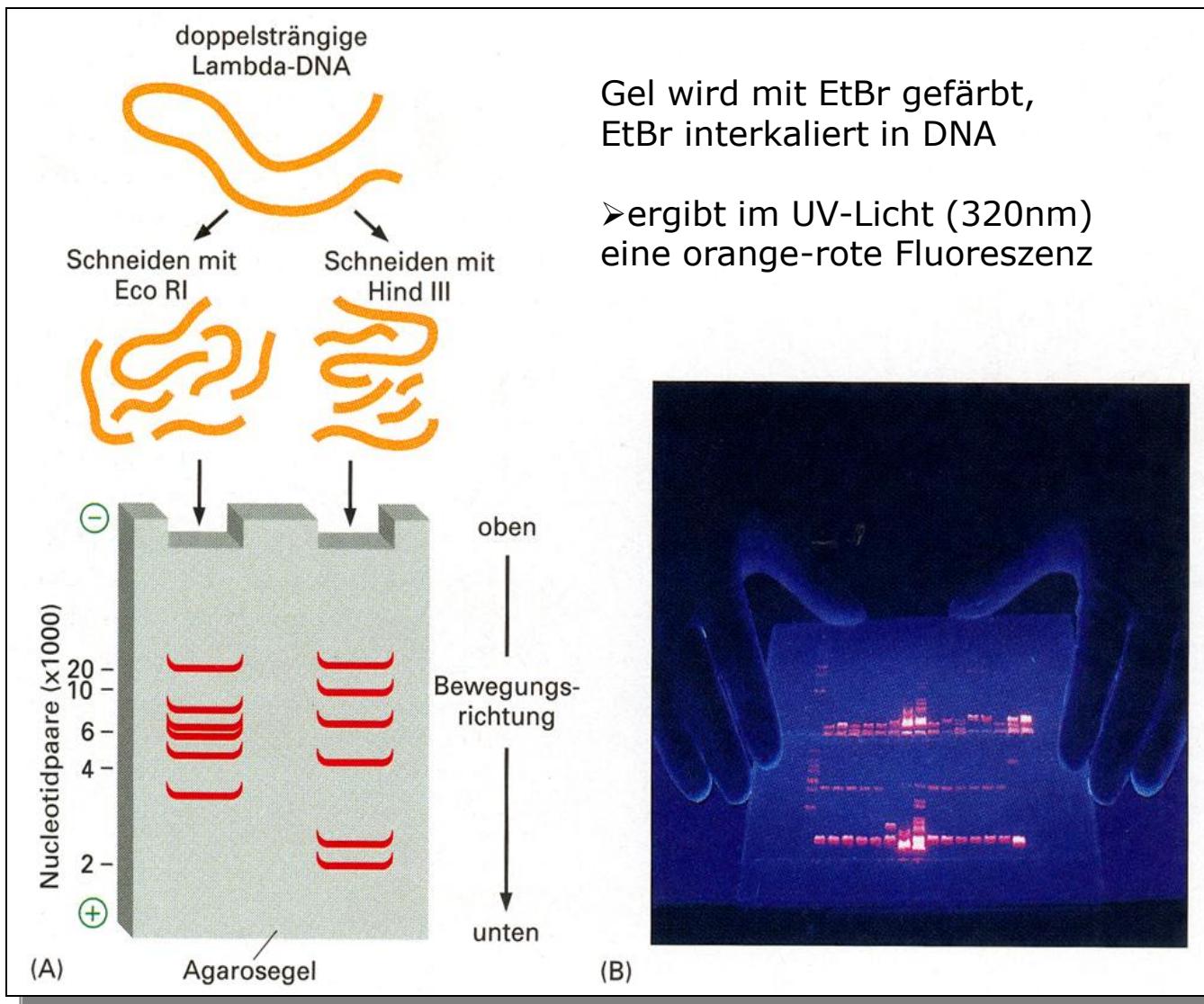


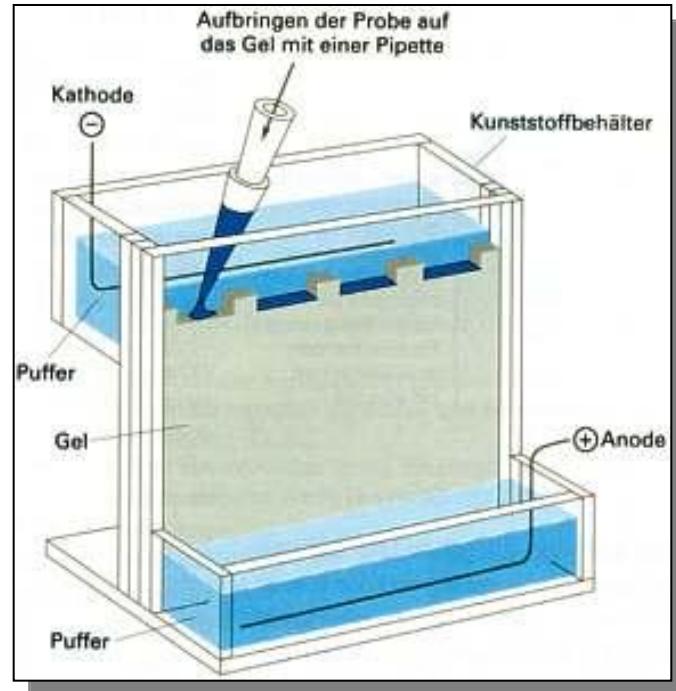
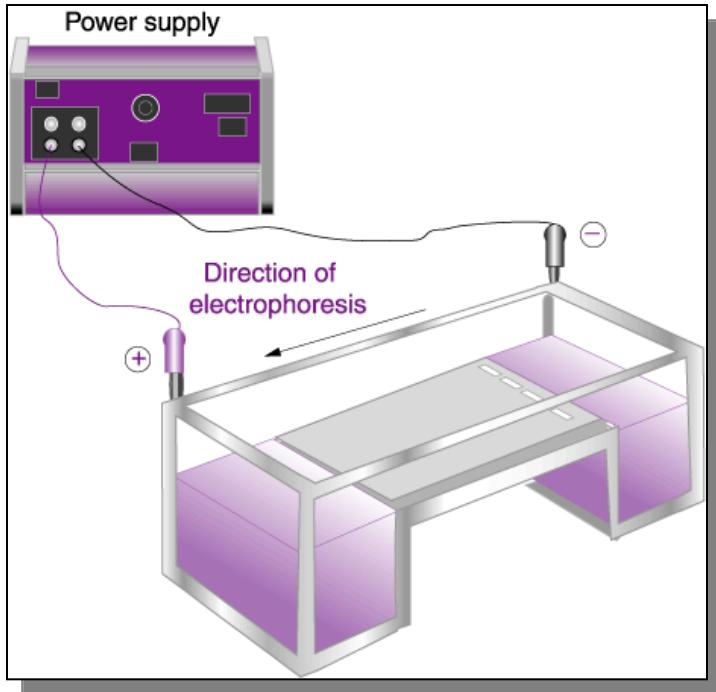
Figure 2.1 Straight DNA and bent DNA. (A) A representation of a 200-bp straight DNA molecule. The persistence length of DNA is 150–200 base pairs. Persistence length is the length of DNA that resists easy deformation, or a length that is not considered very flexible. DNA smaller than its persistence length cannot be easily bent into a circle. (B) A 200-bp piece of bent DNA is shown. Some DNAs, because of their primary base sequence, will adopt a stable bent or curved configuration. (C) The electron micrograph shows a 223-bp fragment of *Critthidia fasciculata* DNA containing 18 phased A₄ to A₆ tracts. Although the fragment is linear and is blunt ended, many molecules appear to be intact circles. Without the phased A tracts, the DNA would appear as linear, relatively straight molecules. Courtesy of Jack D. Griffith.

„curved“ DNA läuft langsamer als Lineare

DNA-Restriktionsfragmente können durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach sortiert werden



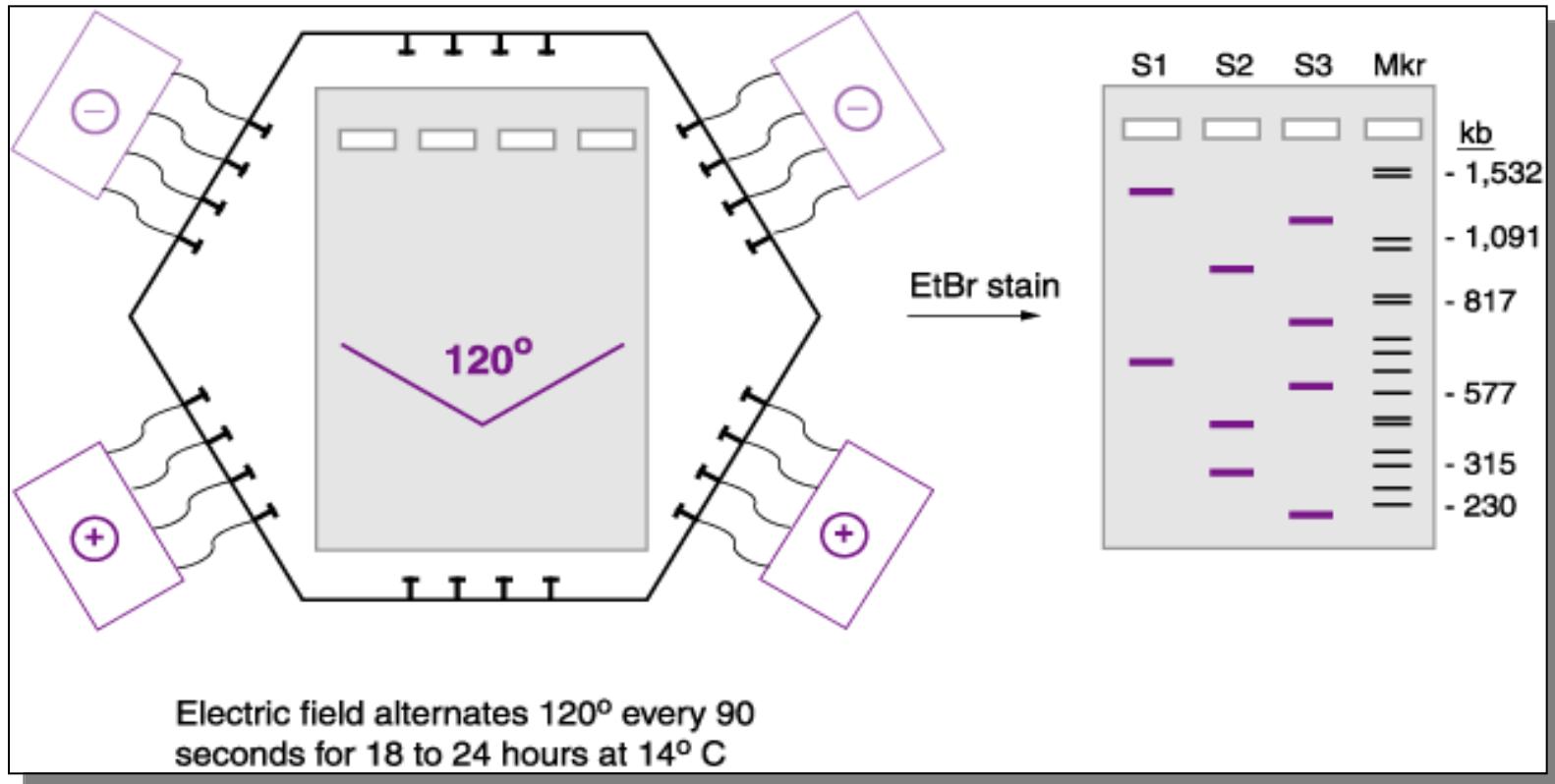
Horizontale vs. Vertikale Gelelektrophorese

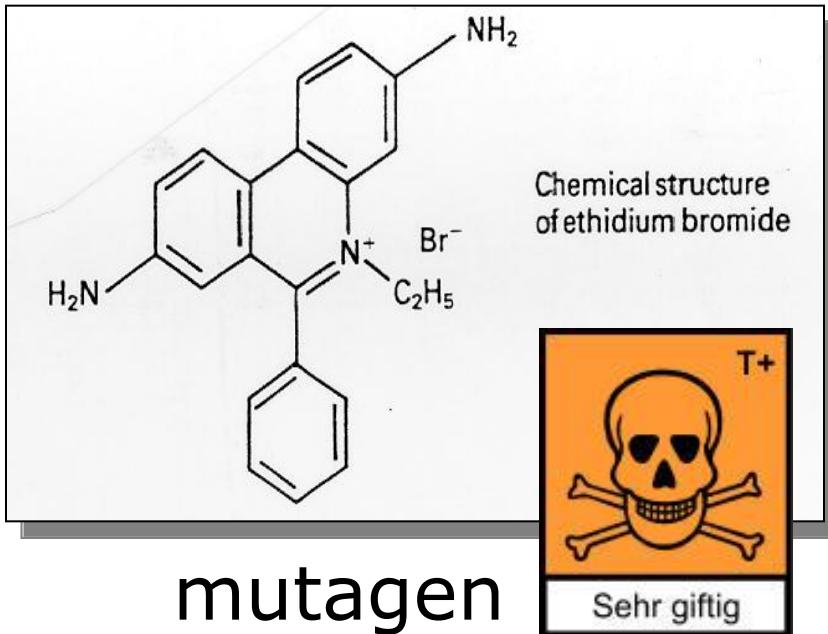


- einfachste Herstellung
- höherer Agaroseverbrauch
- ungünstige Temperaturverteilung > unscharfe Trennung im unteren MW-Bereich

- Auftragsvolumen flexibler
- Auftrennung im unteren MW-Bereich schärfer
- schwieriger herzustellen

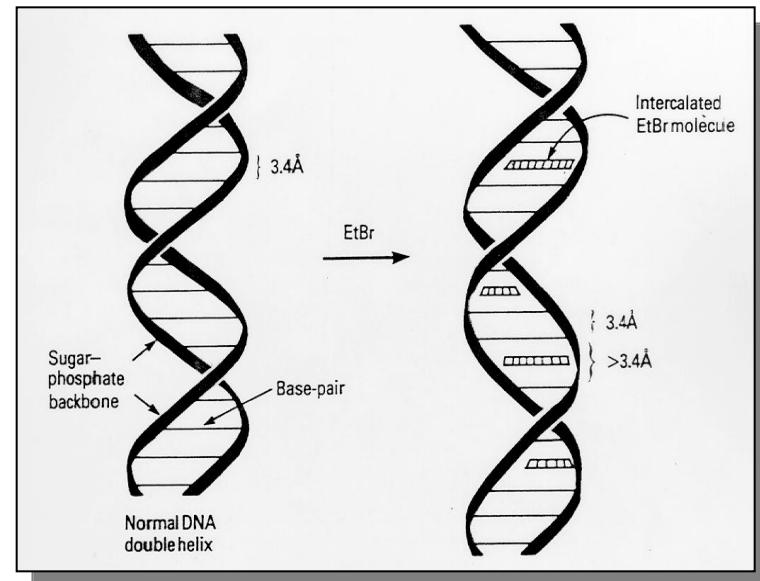
CHEF-PFGE: contour-clamped homogeneous electric field



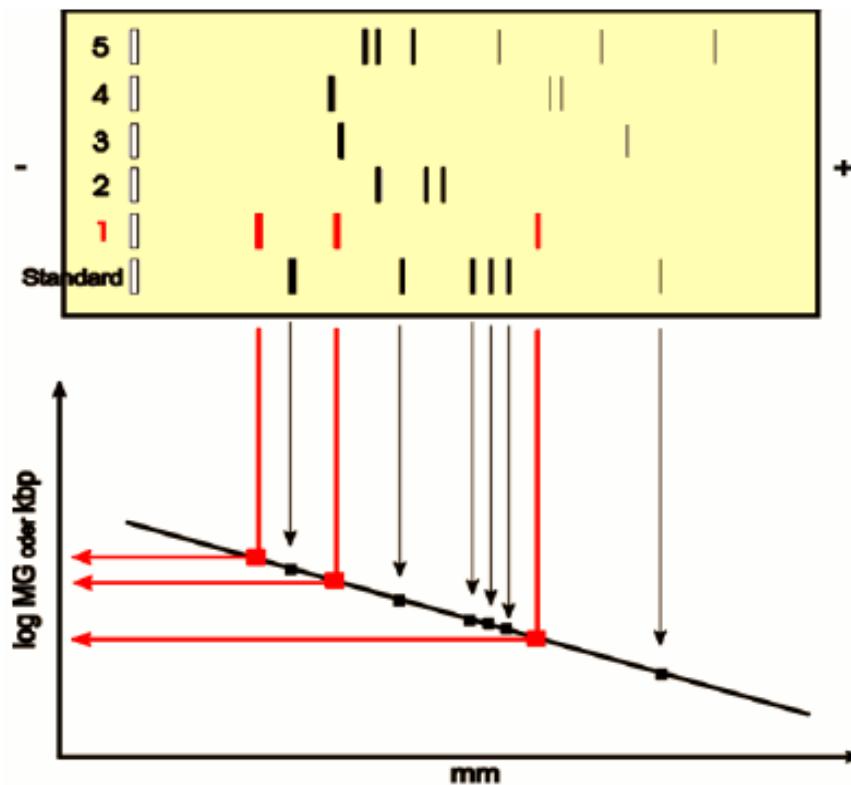


- bindet sequenzunspezifisch
- Färbelösung 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Nachweisgrenze: 10-50 ng für dsDNA
- leuchtet orange-rot bei UV- Belichtung
Anregung: 360nm
Emission: 590nm
- Nachweis von ss/ds DNA/RNA
- Einlagerung von EtBr proportional zur Masse des Moleküls

Ethidiumbromid



Fragmentgrößenbestimmung



- Auftragen des Logarithmus des Molekulargewichts gegen die Laufstrecke (Marker als Eichgerade)