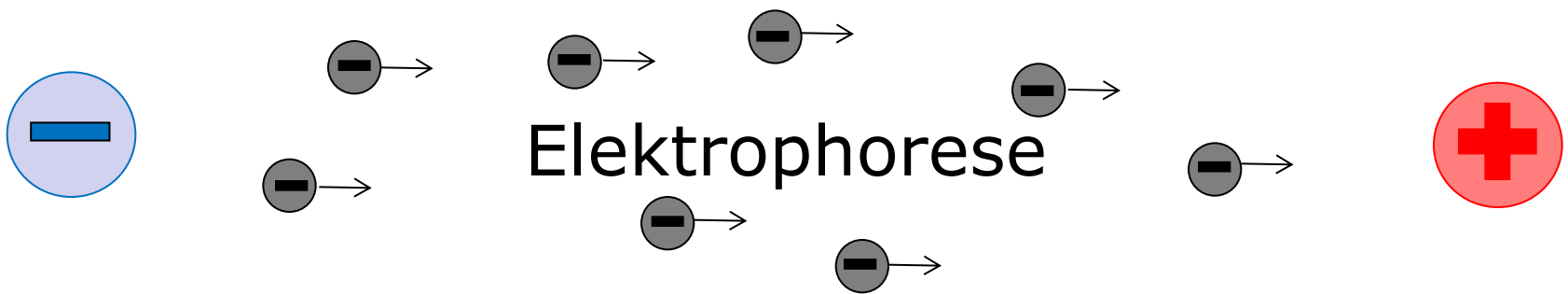


Gelelektrophorese

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



= Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld

Wanderungsgeschwindigkeit

proportional zu: Feldstärke und Ionenladung

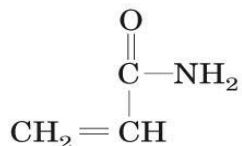
umgekehrt proportional zu: Teilchenradius und Viskosität

proportional zu: Porengröße des Mediums

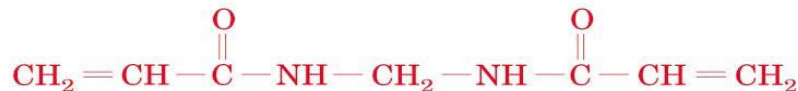
Für Auftrennung von Nukleinsäuren oder Proteinen
Verwendung der Gelelektrophorese

Trägermatrix: Agarose oder Polyacrylamid

Polyacrylamidgele



+

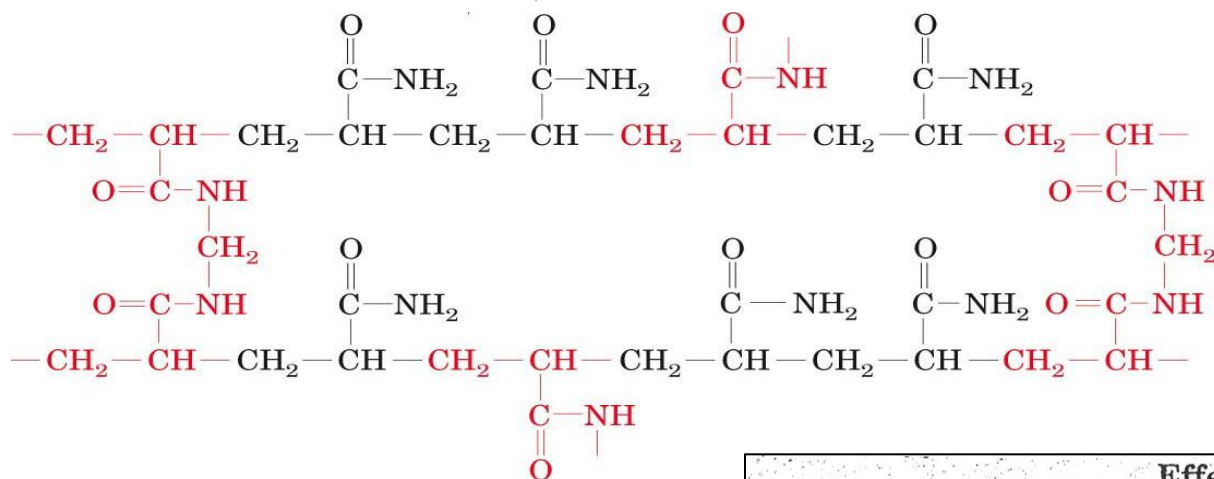


Acrylamid

Methylenbisacrylamid

Radikalstarter Ammonium-
peroxodisulfat (APS)

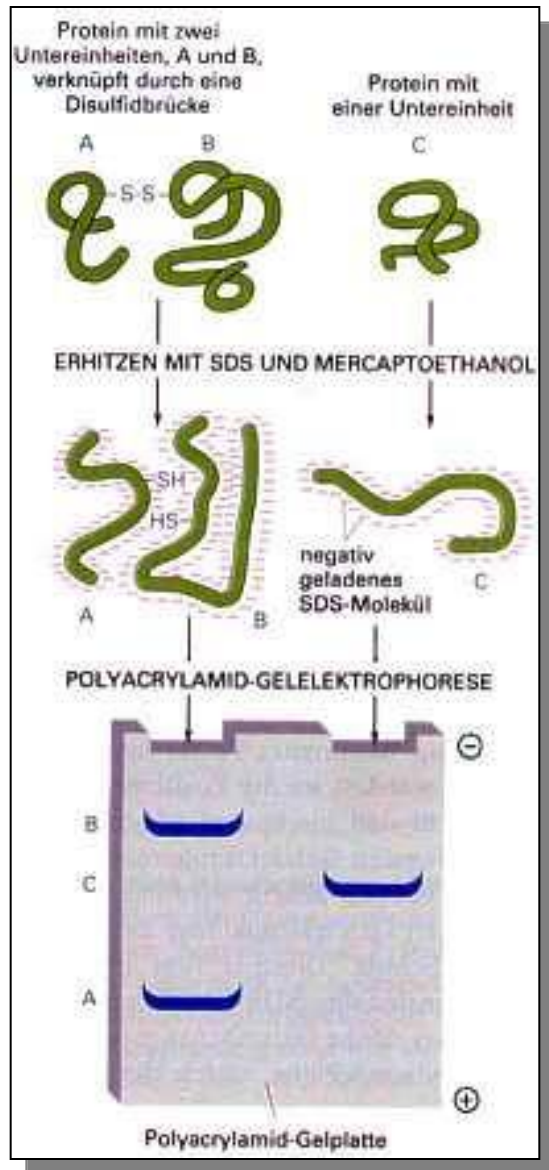
Polymerisierungskatalysator
Tetramethylethyldiamin (TEMED)



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:

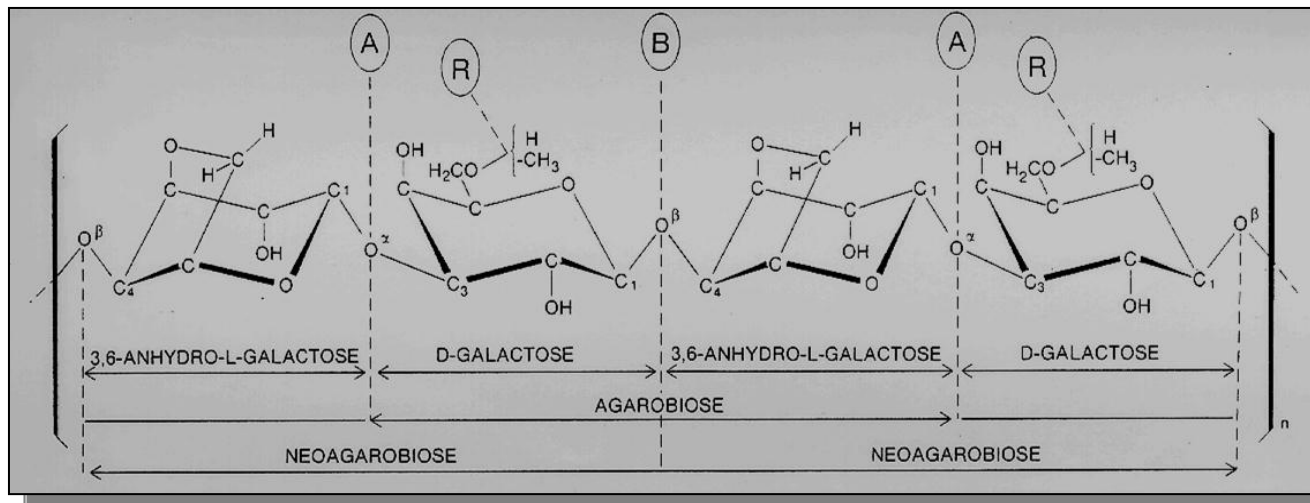
- SDS bindet stöchiometrisch an Protein
- 4°- und 3°-Struktur wird aufgelöst
- Protein erhält negativen Nettoladung

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

Agarose

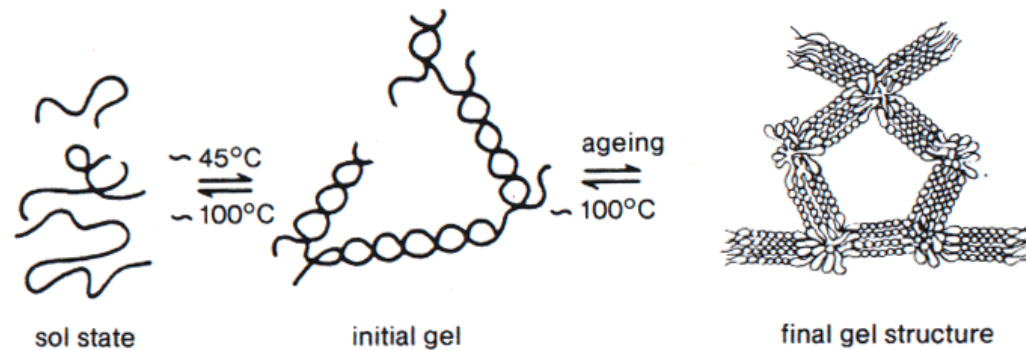


- Gewonnen aus Seegras
- Entdeckt in Japan
- Erster Einsatz in der Biologie: 1882 R. Koch für Mikrobiologie
→ seit 1971 Elektrophorese
- Dimer aus D-Galactose und 3,6-anhydro-L-Galactose



Herstellung und Eigenschaften eines Agarose-Gels

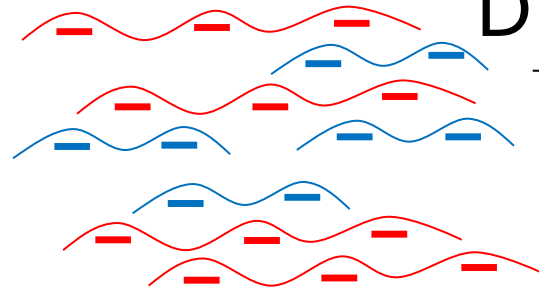
Festes Pulver in Puffer aufkochen, geliert beim Abkühlen ab etwa 45 °C



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

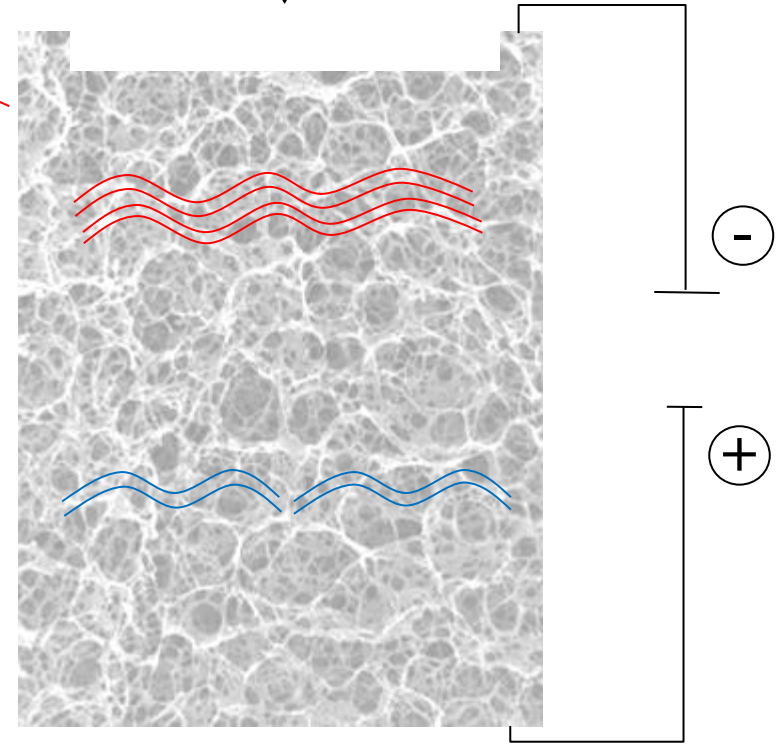
DNA-Gelelektrophorese



Hauptladungsträger sind die Phosphatgruppen des Zucker-Rückgrades

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

Auftrennung der DNA im elektrischen Feld



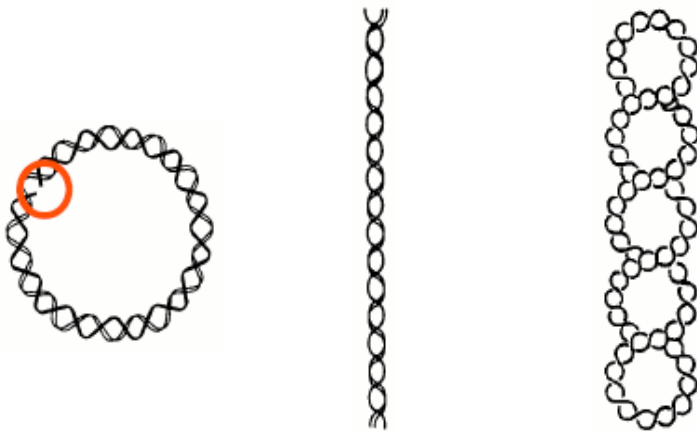
DNA-Fragmente bestimmter Größe laufen in Gelen unterschiedlicher Konzentration auch unterschiedlich schnell

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

Konformation der DNA beeinflusst Wanderungsgeschwindigkeit

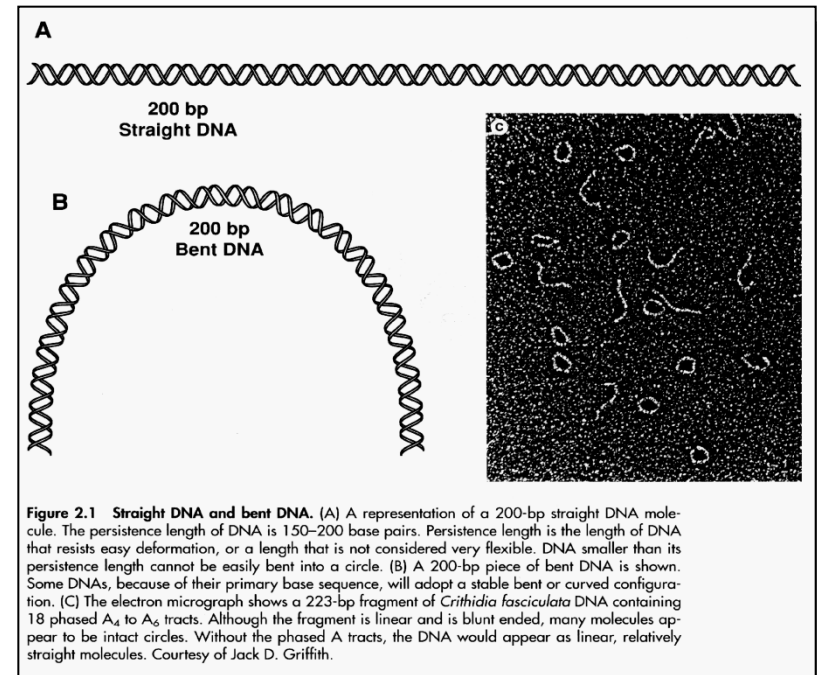
Plasmid-DNA

Open circle → Linear → Supercoiled



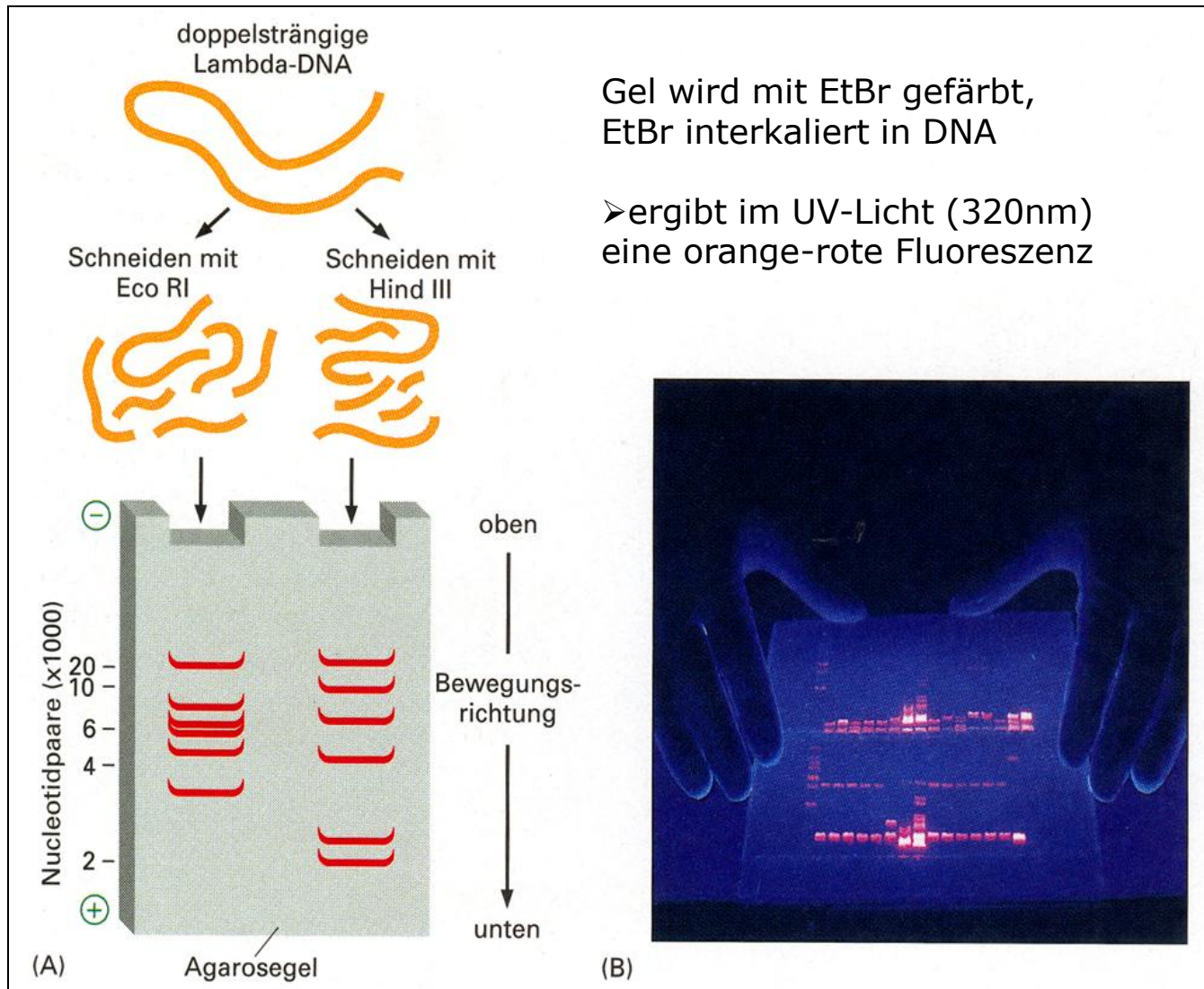
„curved DNA“

Änderung des Propellertwists führt zu DNA-Krümmung

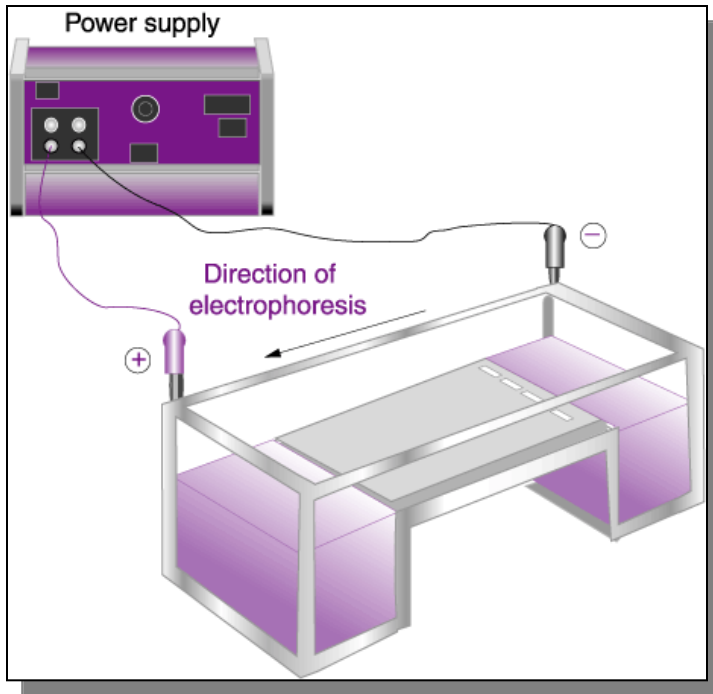


„curved“ DNA läuft langsamer als Lineare

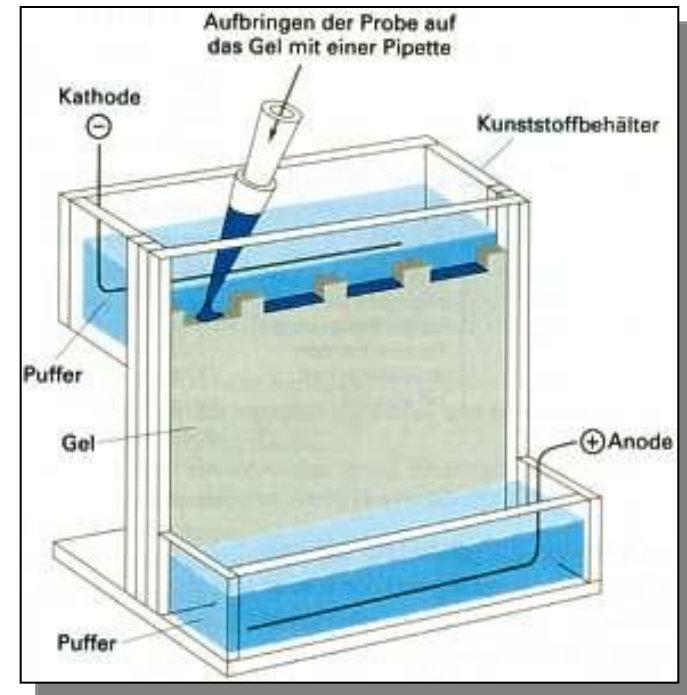
DNA-Restriktionsfragmente können durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach sortiert werden



Horizontale vs. Vertikale Gelelektrophorese

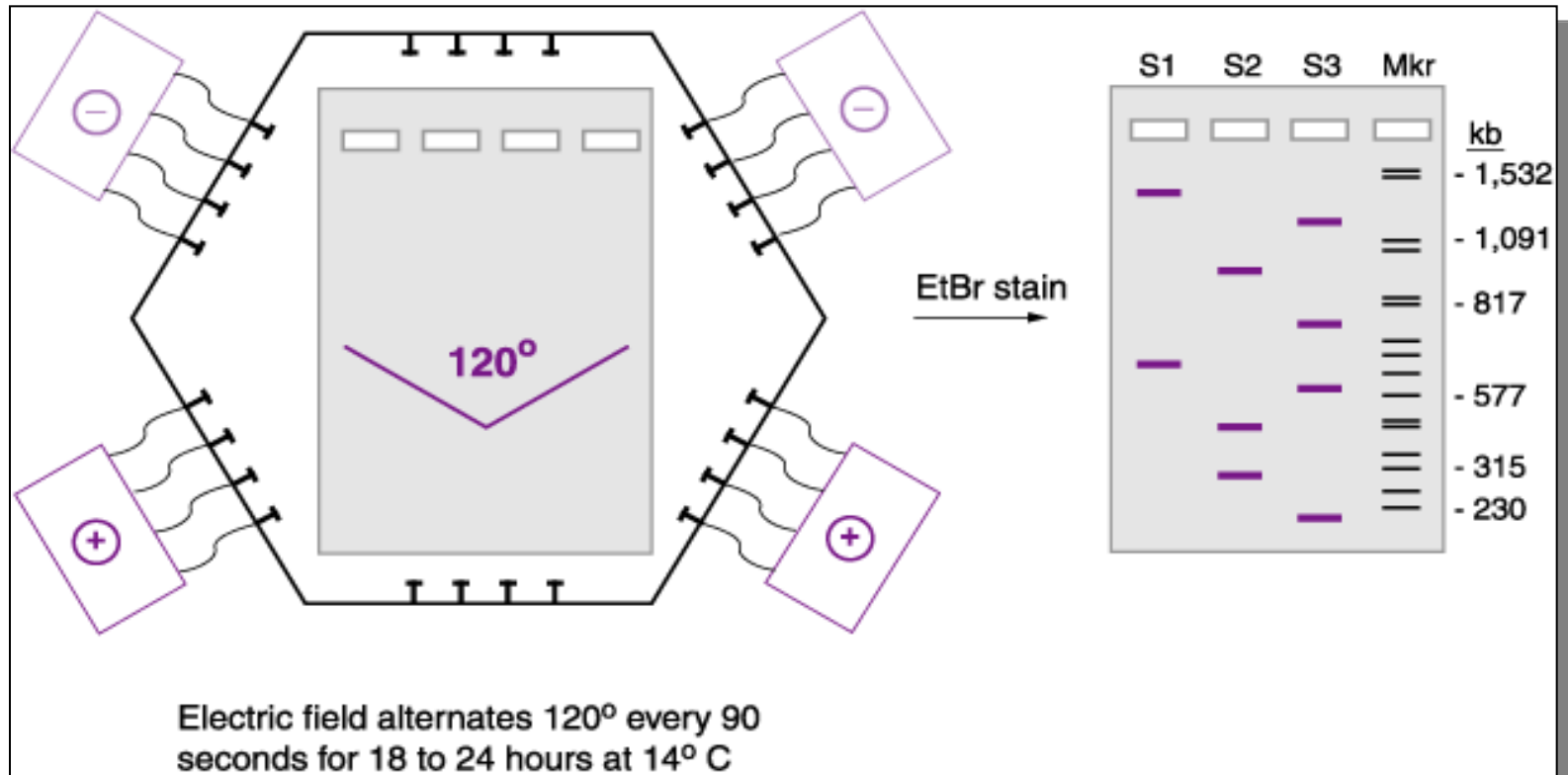


- einfachste Herstellung
- höherer Agaroseverbrauch
- ungünstige Temperaturverteilung > unscharfe Trennung im unteren MW-Bereich

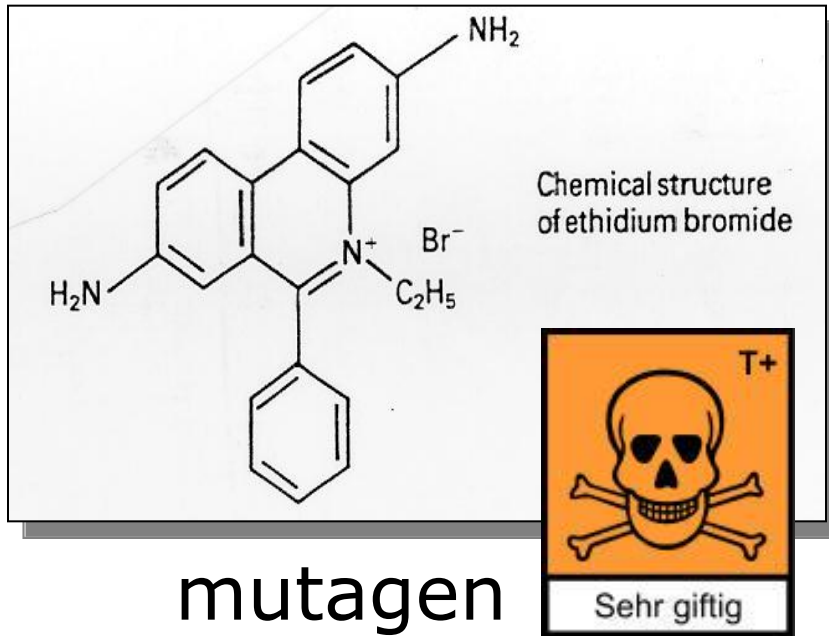


- Auftragsvolumen flexibler
- Auftrennung im unteren MW-Bereich schärfer
- schwieriger herzustellen

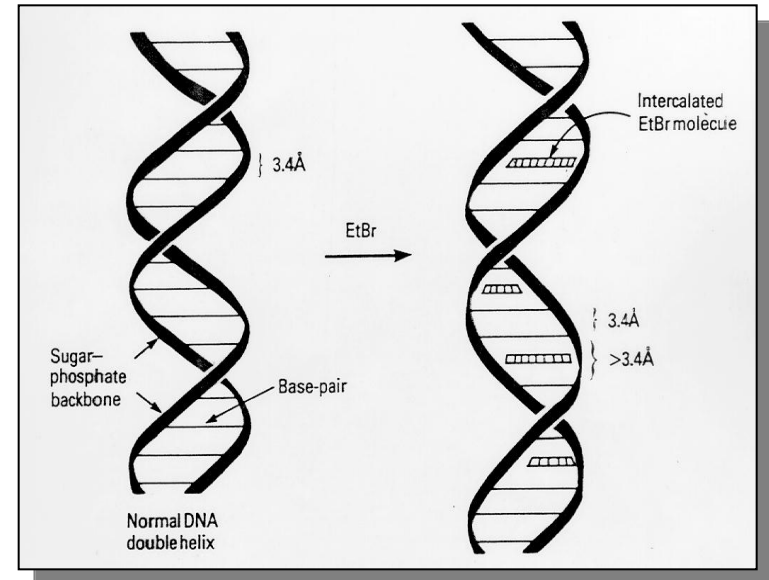
CHEF-PFGE: contour-clamped homogeneous electric field



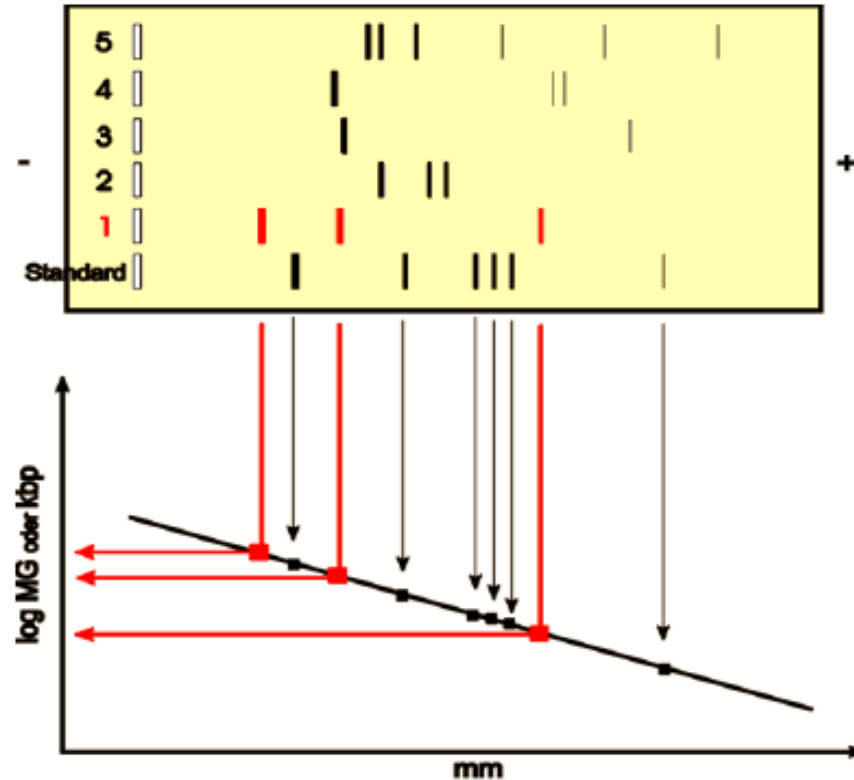
Ethidiumbromid



- bindet sequenzunspezifisch
- Färbelösung 5 ug/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



Fragmentgrößenbestimmung



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