

Durchführung einer Gel-Elektrophorese mit einem DNA-Gemisch

(Fotos vom 6. März 2013 – Molekularbiologisches Praktikum 12 G-Kurs Biologie Herr Korne - am KOMM Homburg/Saar unter Anleitung von Frau Dr. Amoroso)

Mit einer Elektrophorese lassen sich Stoffgemische trennen, z.B. Bruchstücke von DNA oder Proteine.

Grundlegendes Prinzip der Trennung ist die gerichtete und unterschiedlich schnelle Wanderung der Makromoleküle zwischen den Elektroden eines elektrischen Gleichspannungsfelds aufgrund ihrer eigenen elektrischen Ladung (und Größe). Nachdem die Gleichspannung angelegt ist, wandern die negativ geladenen Moleküle zur positiv geladenen Elektrode („Plus-Pol“) und umgekehrt. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Gesamtladung, der Größe und der Gestalt der Teilchen. Verwendet man Agar-Gel (Polysaccharid Agarose) als Träger für die Elektrophorese, spricht man von einer Gel-Elektrophorese. Die getrennten Makromoleküle („Fraktionen“) werden auf dem „götterspeiseähnlichen“ Gel durch eine Markierung (z.B. DNA-Markierung durch Ethidiumbromid unter UV-Licht) sichtbar.¹

Benötigte Mittel für eine Gelelektrophorese

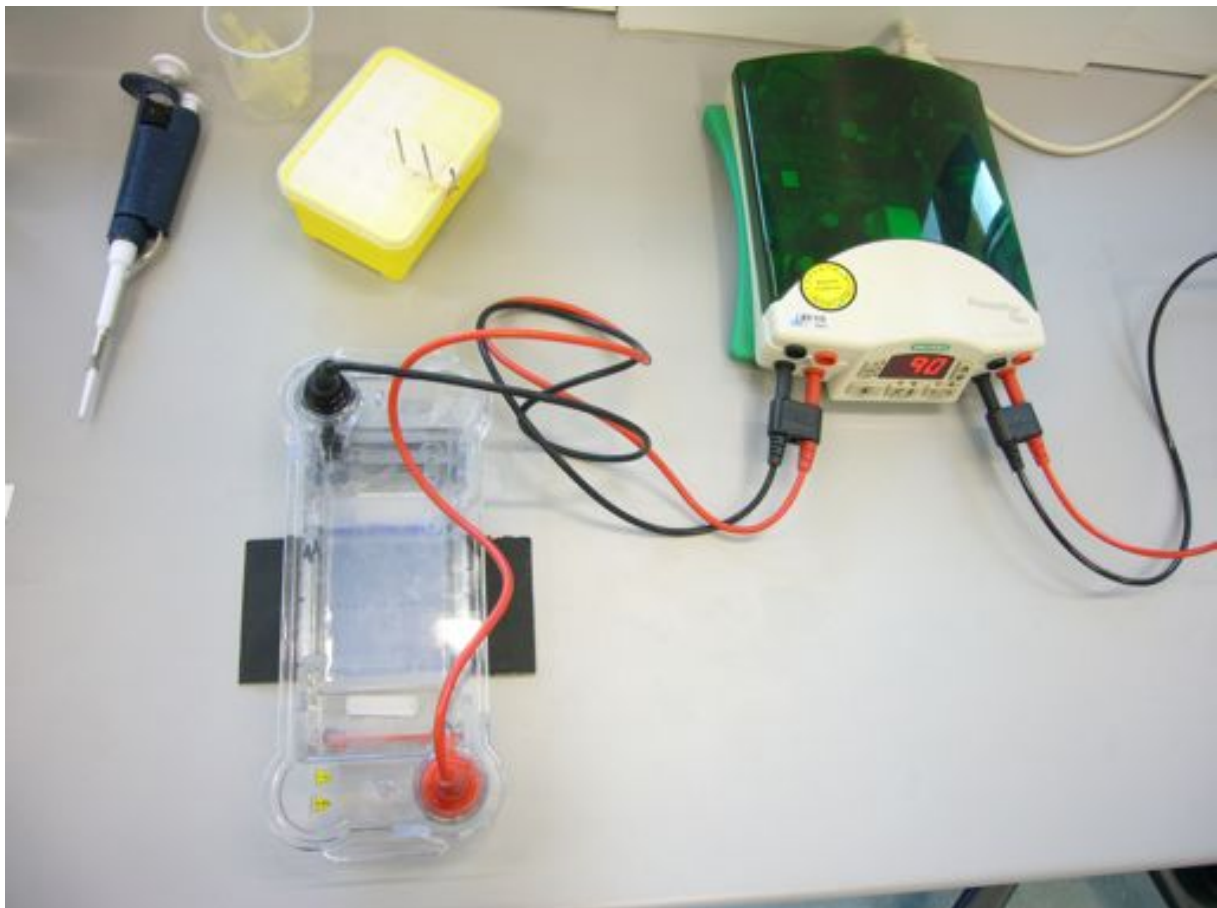


Abbildung 1: Vorne links steht die Elektrophoresekammer. Ein schwarzes Stück Papier lässt das Gel deutlicher hervortreten. Der für die Gleichspannung benötigte Transformator (grün) ist oben rechts im Bild zu sehen. Eine Mikropipette und die dazugehörigen austauschbaren Pipettenspitzen liegen links.

¹ Nach: Biologie Heute SII. Schroedel. Braunschweig. 2004, S. 17.

Erstellen des Gels und Anlegen der Spannung

Das Agarose-Gel wird nach einem zur Größe der DNA-Bruchstücke passenden Rezept aus dem Vielfachzucker Agarose gegossen (ca. 0,5 cm dick), wobei durch den Einsatz von einem kammartigen Gebilde in der Gießschale Taschen darin eingelassen werden.

Für die Elektrophorese wird ein Gemisch aus DNA-Bruchstücken verwendet, die vorher mit Hilfe einer PCR (Polymerasekettenreaktion) vervielfältigt wurden und in großer Zahl vorliegen.

Das Gel wird in die Elektrophorese-Kammer gelegt. Die ausgelassenen Taschen werden dann mit Hilfe einer Mikropipette mit den entsprechenden DNA-Proben befüllt. Aus Sicherheitsgründen können die Elektroden erst mit der Kammer verbunden werden, wenn sie mit dem durchsichtigen Kunststoffdeckel geschlossen ist. Immerhin werden Spannungen bis 220 Volt angelegt.

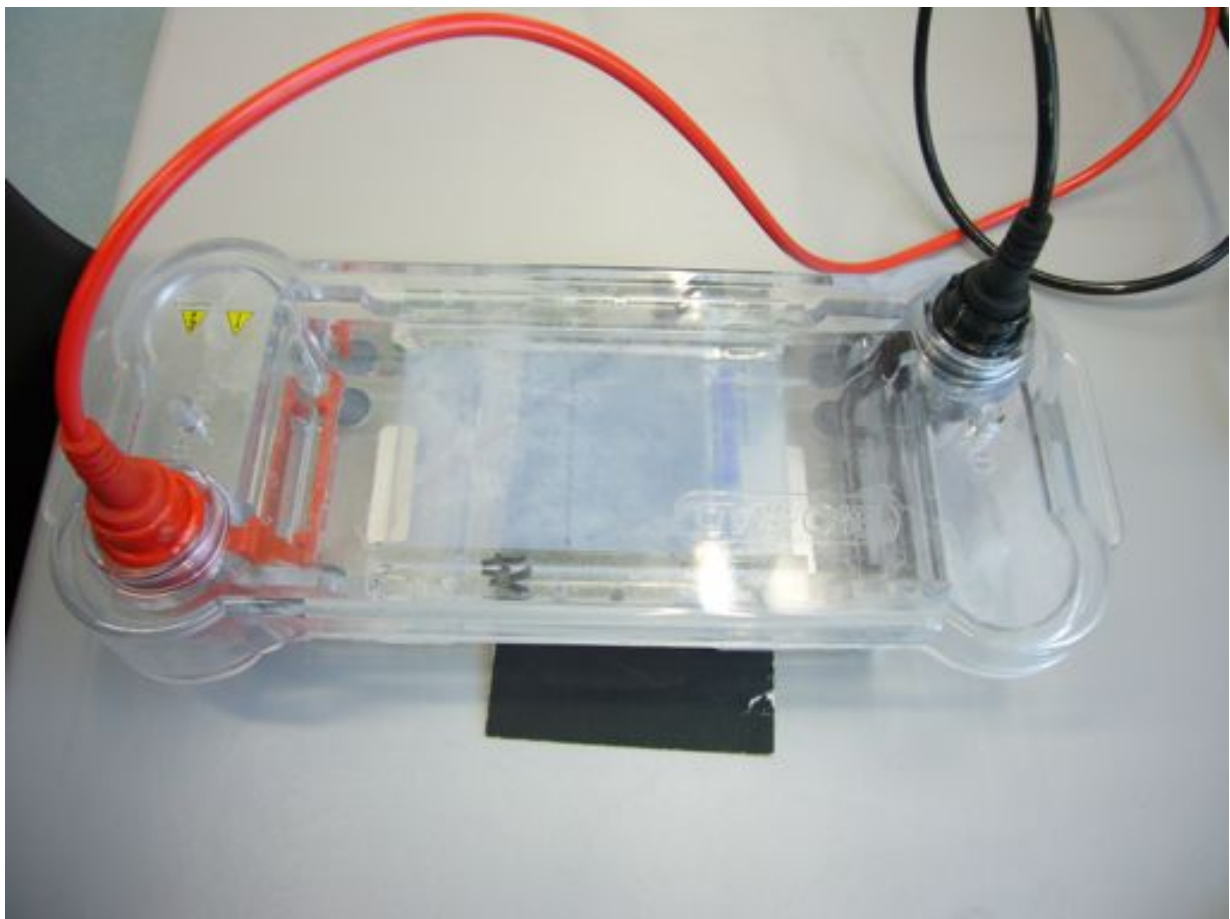


Abbildung 2: Gel-Elektrophoresekammer: links (rot) ist der Plus-Pol, rechts (schwarz) ist der Minus-Pol. Die Taschen für eine Gelelektrophorese mit DNA liegen sinnvollerweise auf der rechten Seite, da sich Nukleinsäuren aufgrund ihrer Ladung im Gleichspannungsfeld zum Plus-Pol hin bewegen.

Im Gleichspannungsfeld bewegen sich DNA-Bruchstücke in Richtung des Plus-Pols, da Nukleinsäuren aufgrund ihrer Phosphatreste im gelösten Zustand eine negative Ladung besitzen.

Abschluss der Gel-Elektrophorese

Nach etwa 30 - 45 Minuten ist die Auftrennung der DNA-Bruchstücke durch die Gel-Elektrophorese abgeschlossen.

Die Bruchstücke sind nun der Größe nach getrennt: kleinere Stücke sind aufgrund ihrer geringen Größe leichter und schneller durch das Gel gewandert als größere Stücke. Die Banden sind jedoch ohne Färbung noch nicht auf dem Gel zu erkennen.

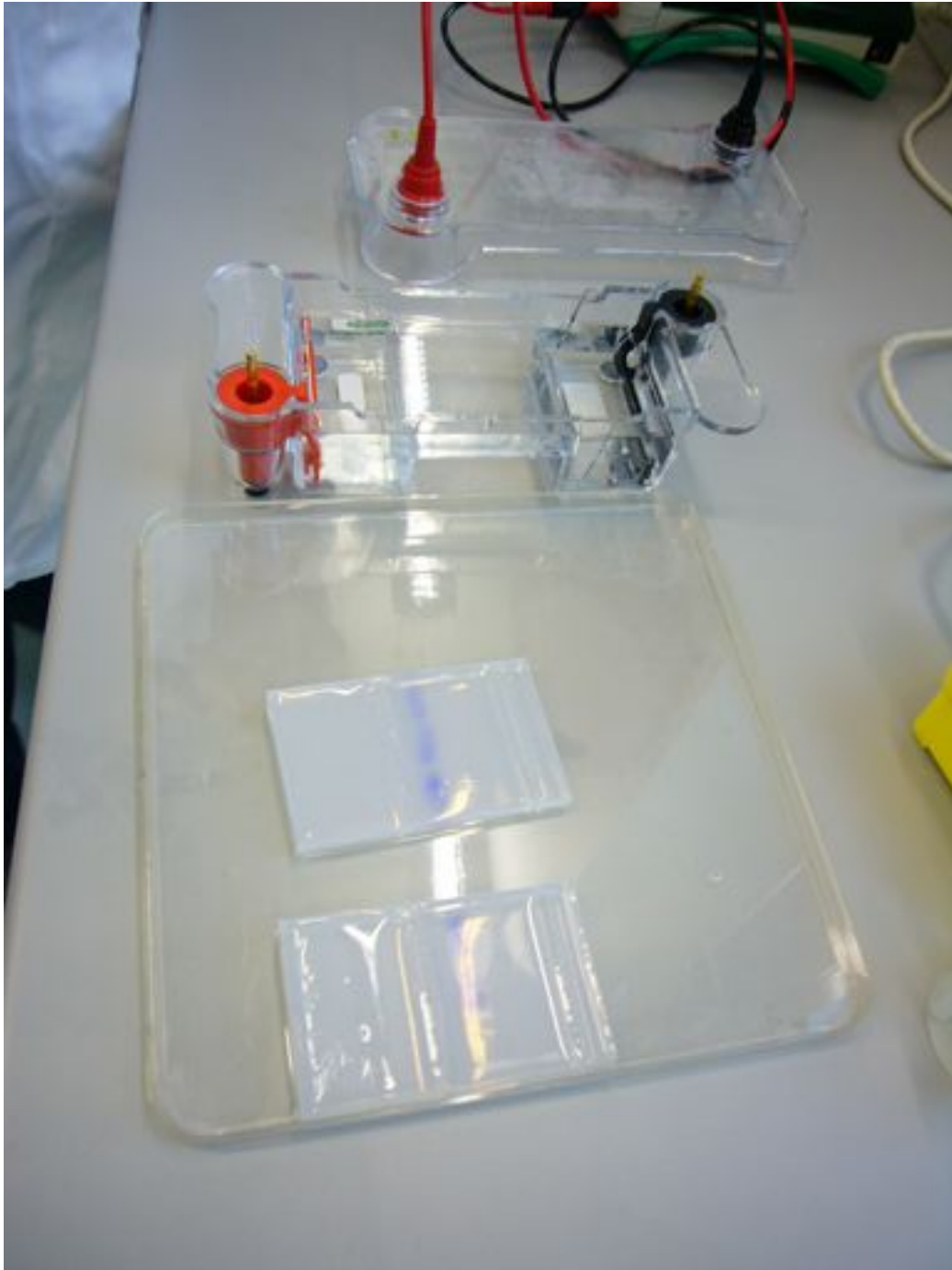


Abbildung 3: Im Hintergrund sieht man eine der geöffneten Elektrophoresekammern. Im Vordergrund liegen zwei Gele ausgebreitet auf einem Plastiktablett.



Abbildung 4: Zwei Agarosegele nach der Elektrophorese auf einem Plastiktablett. Man sieht auf jedem Gel die beiden Reihen der eingelassenen Taschen, in welche die zu untersuchenden DNA-Proben hineingegeben wurden.

Färbung der DNA-Bruchstücke

Da die DNA selbst farblos ist, muss man sie zur Auswertung der Gel-Elektrophorese markieren. Dies wird im Labor (nicht von den Schülern) durch die Färbung mit dem Farbstoff Ethidiumbromid durchgeführt, der sich an die Nukleinsäuren bindet und unter Einwirkung von UV-Licht violett fluoresziert.

Die bei der Elektrophorese entstandenen Banden aus DNA („Fraktionen“) sind unter der UV-Lampe als rosa Balken zu erkennen. Mit einem besonderen Fotoapparat kann schnell und unkompliziert ein Foto der Banden gemacht werden, das man leichter auswerten kann.

Mit Hilfe des Musters lässt sich die am Anfang des Praktikums gesetzte Fragestellung zu den DNA-Proben klären.



Abbildung 5: Ein Foto der beiden Gelplatten auf der UV-Lampe: Man sieht deutlich die rosa Banden mit den durch Ethidiumbromid gefärbten DNA-Bruchstücken. Bei jedem Gel wurde nur die obere Taschenreihe benutzt.

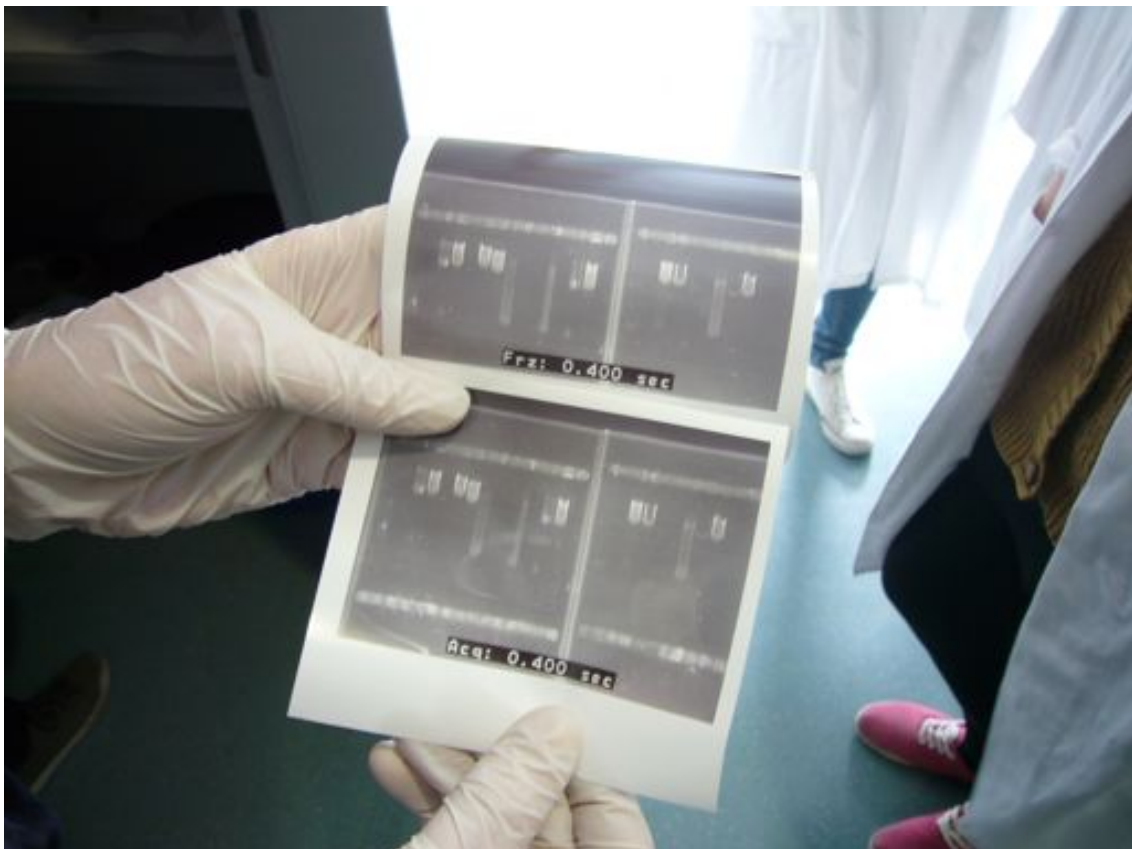


Abbildung 6: Die Fotografie der beiden Gelplatten lässt sich praktischer auswerten.