

# Agarose-Gelelektrophorese

## 1. nachzulesende Theorie:

Grundlagen Elektrophorese, verschiedene elektrophoretische Verfahren, Prinzip der Gelelektrophorese, Versuchsaufbau, verwendete Chemikalien und Reagenzien, Plasmide & Restriktionsenzyme

## 2. Aufgabe:

- Aufnehmen einer Kalibriergerade mittels DNA-Marker bekannter Größen
- Größenbestimmung einer DNA-Probe

## 3. Chemikalien:

- 1X TBE Puffer
- Ethidiumbromid-Färbelösung: 100 µg Ethidiumbromid in 300 ml 1X TBE Puffer
- Loading Dye
- DNA-Marker: Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder
- DNA-Probe: λ-DNA-HindIII-digest

## 4. Durchführung:

- Herstellen eines 0,6 % - 1, 2 % Agarose Gels: Wiegen Sie 0,6 bis 1,2 g Agarose in einen 300 ml Weithals-Erlenmeyerkolben ein, und füllen sie mit 1X TBE Puffer zur 100 ml Marke auf
- Stülpen Sie ein Becherglas umgekehrt auf die Öffnung des Erlenmeyerkolbens
- Erhitzen Sie in der Mikrowelle für 2 Minuten bei 800 W
- Fassen Sie den Erlenmeyerkolben VORSICHTIG durch eine dicke Schicht Papier an, und schwenken sie zweimal langsam um
- Erhitzen Sie nochmals in der Mikrowelle für 1 Minute bei 800 W
- Montieren Sie den Gelschlitten im Gießstand, so dass die Öffnungen verschlossen sind
- Giessen Sie vorsichtig die Agarosegellösung hinein, entfernen Sie evtl. Luftblasen
- Setzen Sie einen Kamm an der äußeren Aussparung ein
- Lassen Sie das Ganze mindestens 30 Minuten abkühlen
- Bereiten Sie währenddessen den DNA-Größenstandard und die Probe vor
  - DNA-Marker: 1 µl + 1 µl Loading Dye + 4 µl steriles Wasser
  - Probe: 2 µl + 13 µl TE-Puffer + 3 µl Loading Dye
- Wenn das Gel erkaltet ist, entfernen Sie den Gelschlitten aus dem Gießstand und platzieren Sie ihn in der Elektrophoresekammer (auf richtige Orientierung achten!)
- Entfernen Sie den Kamm und füllen Sie die Elektrophoresekammer mit 1X TBE Puffer, so dass das Gel mit 1-2 mm Puffer bedeckt ist.
- Laden Sie die Proben auf das Gel, und schließen Sie die Kammer mit dem Deckel
- Verbinden Sie die Kabel der Elektrophoresekammer mit dem Transformator. Achten Sie dabei auf die Farben der Anschlüsse und Kabel
- Drehen Sie den Regler für Ampere ganz nach rechts, den linken Schalter auf Volt (unten) und den Messbereichsschalter (rechts) auf 400V (unten).
- Regeln Sie die Spannung auf 100 bis 150 V und lassen Sie das Gel laufen, bis das dunklere Blau (Bromphenolblau) noch etwa 3-4 cm vom Rand entfernt ist.

- Schalten Sie den Strom aus, entfernen Sie den Deckel und überführen Sie das Gel in die Ethidiumbromid-Färbelösung

**!!!ACHTUNG: Ethidiumbromid ist giftig und möglicherweise karzinogen. Handschuhe tragen und Gel nur mit Pinzette anfassen. Danach sofort die Handschuhe ausziehen und getrennt entsorgen!!!**

- Lassen Sie das Gel in der Färbelösung 30 min schütteln
- Überführen Sie das Gel in dest. Wasser und lassen Sie es einige Minuten schütteln
- Machen Sie eine Aufnahme unter UV Licht.

## **5. Auswertung:**

Messen Sie die Entfernungen der einzelnen DNA-Banden zur Depottasche aus.

Erstellen Sie eine Kalibriergerade, indem Sie den Logarithmus der Größe der DNA-Fragmente des DNA-Markers gegen die durchwanderten Strecke auftragen. Tragen sie die Messwerte der Proben mit Fehlerbalken in den Grafiken ein und bestimmen Sie die Größen der enthaltenen DNA-Fragmente.

Vergleichen sie die ermittelten Größen der DNA-Fragmente mit den tatsächlichen.

Diskutieren Sie KURZ, für welche Fragmente im verwendeten Gel eine Größenbestimmung möglich ist.