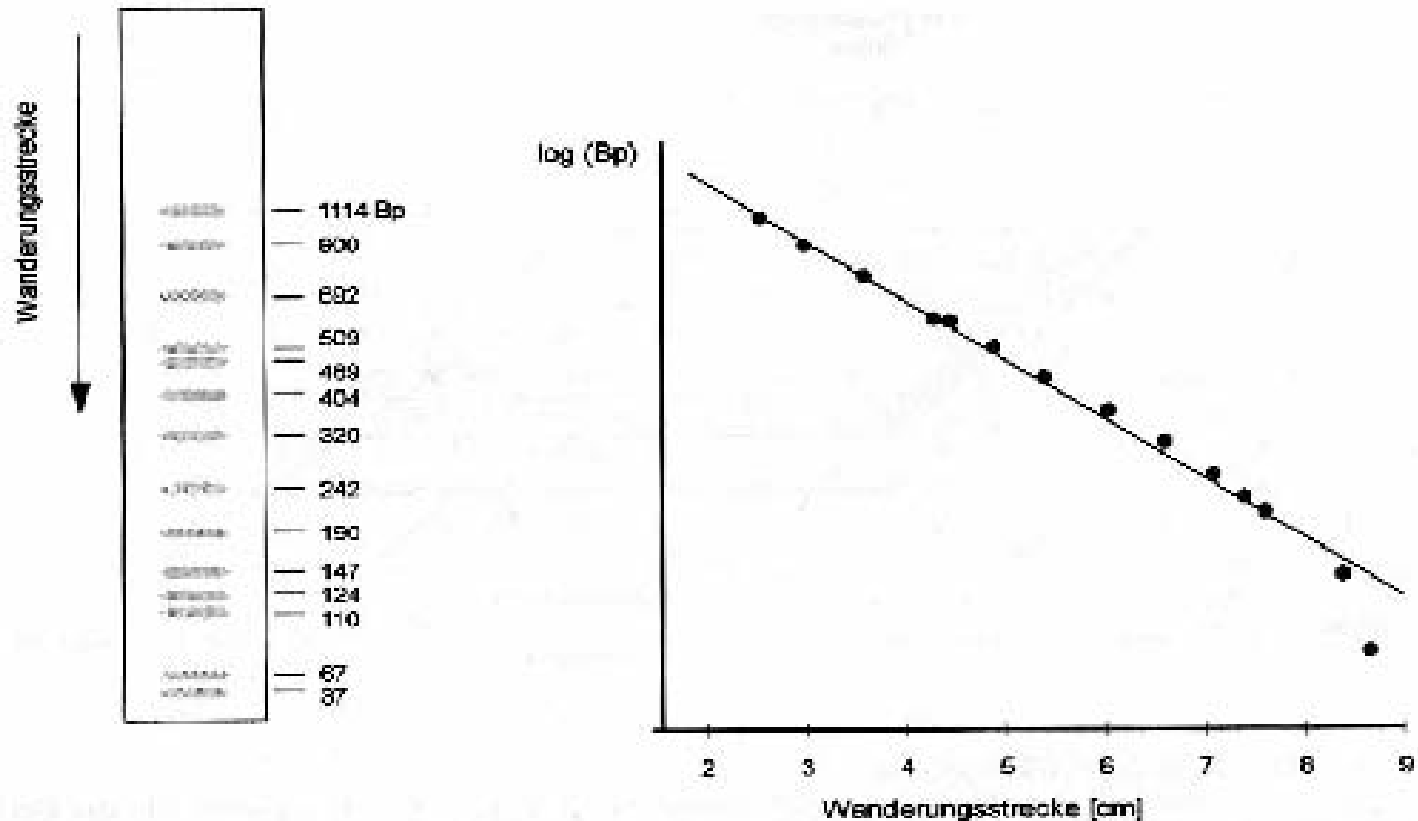
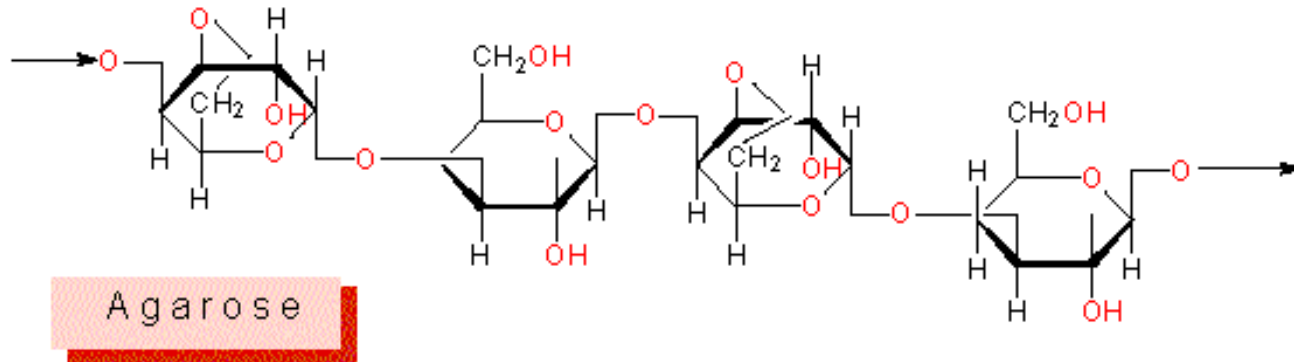


Agarosegel - Elektrophorese (AGE)

- Genetischer Fingerprint in der Forensic
- Spezifischer Nachweis von Bakterien – und Viren-DNA
- Vaterschaftstest



Agarose



- langkettiges Polysaccharid aus glycosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6- Anhydrogalactose
- stellt die Hauptkomponente des Agars dar
- wird aus den Rotalgen gewonnen (Gattungen Gelidium und Gracillaria)
- Gewinnung durch Entfernung von Agaropektins
- Ausbildung von Doppelhelices, die sich in Gruppen zu relativ dicken Fäden zusammenlagern → Struktur verleiht Gelen hohe Stabilität bei großen Porendurchmessern

Agarosegel

- Bezeichnung für ein Gel, das in der Agarose - Gelelektrophorese zur Trennung von Substanzen, z. B. von Nukleinsäuren oder Proteinen eingesetzt wird
- wird durch Aufkochen von Agarose in einem Puffer hergestellt
- Die Konzentration der Agarose im Puffer richtet sich nach der Größe der mit der Gelelektrophorese aufzutrennenden Teilchen (wobei für kleinere Partikel eine bessere Trennung (räumliche Auflösung) mit einem höherprozentig angesetzten Agarosegel erzielt werden kann, für größere mit einem niederprozentigen Gel)
- Beim Abkühlen geliert die Masse und kann zuvor in eine Form, z.B. in ein Trägertablett für die Elektrophorese, gegossen werden
- bei Bedarf können Markierungsstoffe zum Sichtbarmachen der zu trennenden Substanzen zugemischt werden
- **Vorteile:**
 - Ungiftigkeit
 - einfache Herstellung
 - Herstellung von Gelen nachindividuellen Anforderungen
- **Nachteile:**
 - hoher Zeitbedarf von mehreren Stunden
 - Gele nie ganz klar
 - bei hoch empfindlichen Nachweistechiken kann es zu starken Hintergrundfärbungen kommen

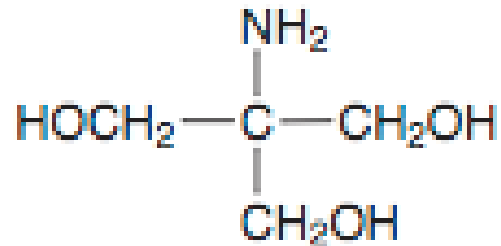
Grundprinzip der AGE

- Fäden aus Agarosepolymeren werden zu Gel vernetzt → Porenbildung
- je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren im Gel
- beim Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Anode
- „Siebeffekt“: kleinere DNA-Moleküle können sich schneller durch die Poren des Gels bewegen
→ **Auftrennung nach Größe**
- Wanderungsgeschwindigkeit von linearen DNA Molekülen ist umgekehrt proportional dem \log_{10} der Anzahl der Basenpaare (bzw. dem Molekulargewicht)

Puffergemische

1. TRIS – Borat – EDTA Puffer (TBE)
2. TRIS – Acetat – EDTA Puffer (TAE)

TRIS



- Kurzbezeichnung für **Tris(hydroxymethyl)-aminomethan**
- Bei einem pKa 8,3 bei 20 °C besitzt TRIS eine gute Pufferkapazität zwischen pH 7,2 - 9,0
- Unter der Bezeichnung Trometamol wird die Substanz in der pharmazeutischen Praxis als Wirkstoff gegen Acidosen angewandt.

Aufgabe in der Agarosegelelektrophorese:
Pufferung des pH Wertes

Borat / Acetat

(Borat = Salz der Borsäure)

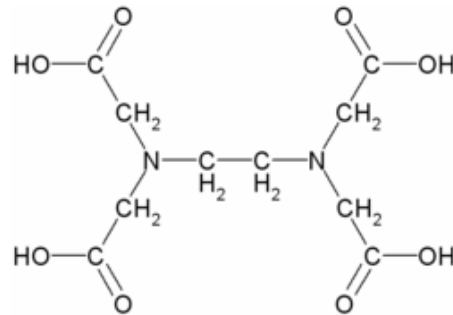
Häufig verwendete Borate:

- Boracit (Magnesium-chlor-borat, wasserfrei)
 - Borax (Natriumtetraborat)
 - Pandermit (Calciumborat)
 - Colemanit (Calciumborat)
 - Sassolin
- Ulexit (Calcium-natrium-borat)

Funktion in der Agarosegel - Elektrophorese:

Liefert die passende Ionenkonzentration
des Puffers

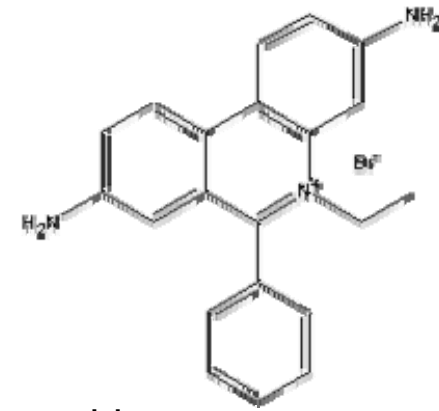
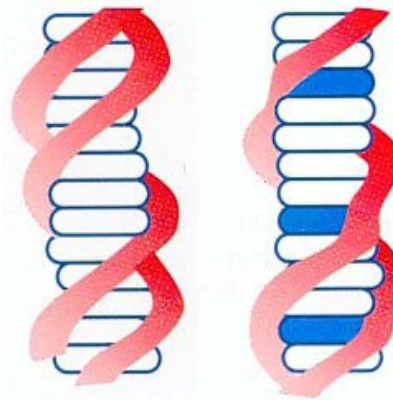
EDTA



- EDTA ist einer der am häufigsten verwendete Komplexbilder
- 6-Zahniger Ligand
- EDTA wird zur Behandlung von Metallvergiftungen eingesetzt. Eine umstrittene Therapie ist die *Chelation Therapy*, bei welcher EDTA injiziert wird, um den Körper zu "reinigen".
- Funktion bei der Agarosegel – Elektrophorese:
Chelatkomplexbildung mit Kationen (Mg^{2+})
→ die meisten Nucleasen benötigen für ihre Aktivität zweiwertige Kationen

Ethidiumbromid

→ Nitril – Handschuhe!!!

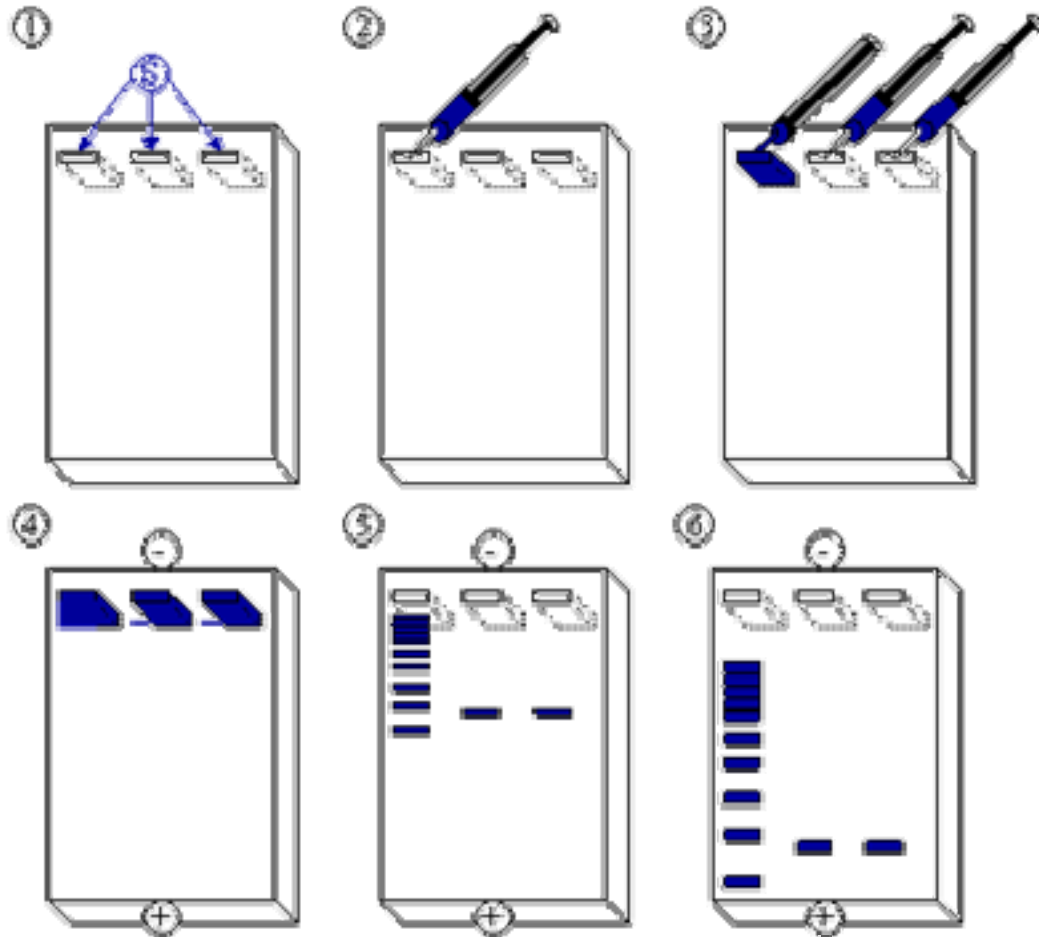


- **Ethidiumbromid** (5-Ethyl-3,8-diamino-6-phenyl-phenanthridiniumbromid, Abkürzung **EtBr**) auch **Ethidium** oder **Homidiumbromid** genannt ist eine **sehr giftige und erbgutverändernde organische Substanz**.
- Ethidiumbromid wird in der Molekularbiologie zum **Anfärben von Nukleinsäuren** bei der Gelelektrophorese verwendet.
- Bestandteil des Agarosegels oder Färbung nach Elektrophorese
- (Charge-Transfer-Prozesse → Ausbildung einer rot-orange Fluoreszenz (Emission ~ 590nm) bei Anregung durch UV-Licht(260-360nm))
- Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren dabei zwischen die Basen der DNA bzw. RNA (bis zu 3 Moleküle je 10 Basen), wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen.
- Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA / RNA-Konzentration, sowie zur Länge der Nukleinsäure.

Grundprinzip der AGE

- molekularbiologische Methode, um Desoxyribonukleinsäure (DNA) Fragmente mit Hilfe eines Agarose-Gels nach ihrer Größe zu trennen und die Stranglänge zu bestimmen
- Anwendung zur Auftrennung von DNA z.B. nach PCR (Polymerasekettenreaktion), Isolierung von DNA aus Zellen (z.B. Plasmide)
- Fäden aus Agarosepolymeren werden zu Gel vernetzt → Porenbildung
- je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren im Gel
- Siebeffekt“: kleinere DNA-Moleküle können sich schneller durch die Poren des Gels bewegen → **Auftrennung nach Größe**
- beim Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Anode
- elektrophoretische Methode:
Grundprinzip ist die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld
- Wanderungsgeschwindigkeit von linearen DNA Molekülen ist umgekehrt proportional dem \log_{10} der Anzahl der Basenpaare (bzw. dem Molekulargewicht)
- zur Analyse und Präparation von DNA-Fragmenten zwischen 0,1 und 50 kb Länge

Methode der AGE



Vorbereitung

- Herstellung einer 1% Agaroselösung in TBE / TAE; für kleine DNA-Fragmente bis zu 2%. Volumen 15-70 ml, je nach Größe des Gels.
- Agarosegellösung kochen, normalerweise im Mikrowellenherd.
- Die Lösung bei Raumtemperatur bis auf ca. 60 °C abkühlen lassen, dabei stetig rühren.
- 1 µl Ethidiumbromid pro 10 ml Gellösung dazugeben.
Vorsicht: Ethidiumbromid ist mutagen!
- Die Lösung rühren, bis sich das Ethidiumbromid gut verteilt hat, dann in die Gelkammer gießen.
- Den Kamm auf einer Seite des Gels hineinstecken, ca. 5-10 mm vom Rand entfernt.
- Wenn das Gel fest geworden ist, den Kamm entfernen. Die Aussparungen, die im Gel zurückbleiben, werden *Taschen* oder *Slots* genannt, diese sind vor Auftragen der Probe mit Puffer zu spülen.
- Das Gel in 0,5× TBE-Laufpuffer legen. Das Gel muss vollständig bedeckt sein. Die Slots müssen an der negativen Elektrode der Kammer zu liegen kommen.
- Den Probenpuffer mit Farbmaler zu den DNA-Proben hinzugeben. Die DNA-Leiter enthält für gewöhnlich schon Farbmaler.

Prozedur

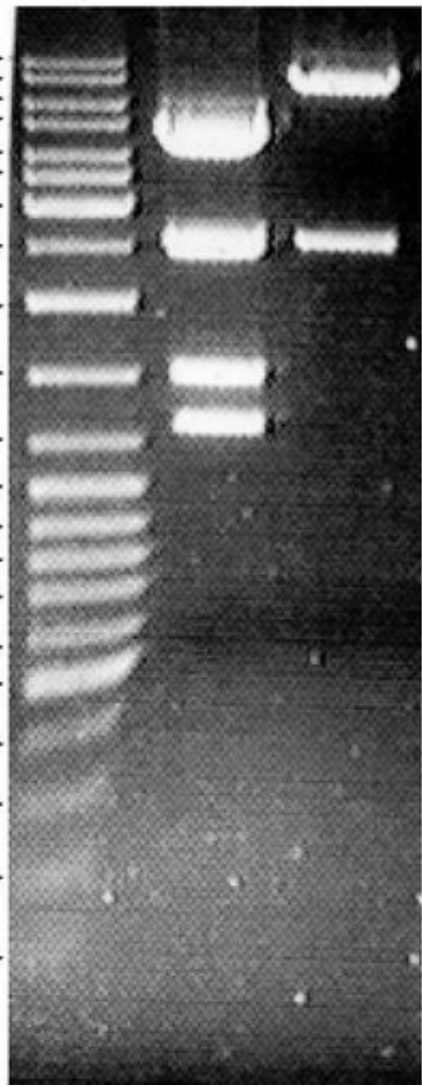
- DNA-Leiter und -Proben mit einer Pipette in jeweils einen Slot spritzen (je nach Größe der Taschen von 2 μl bis zu 100 μl)
- Elektrische Spannung anlegen, normalerweise 100 Volt bei einer Stromstärke im Milliamperebereich.
- Wenn die Stränge genügend aufgetrennt sind (anhand der Farbfront abschätzen), Elektrophorese beenden.
- Das Gel kann unter einer UV-Lampe betrachtet werden. Ethidiumbromid, das sich in die DNA eingelagert hat, fluoresziert im ultravioletten Licht.

DNA-Leiter

Probe 1 Probe 2

bp

10,000
8000
6000
5000
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1200
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100



Kathode

DNA-Wanderung

Anode

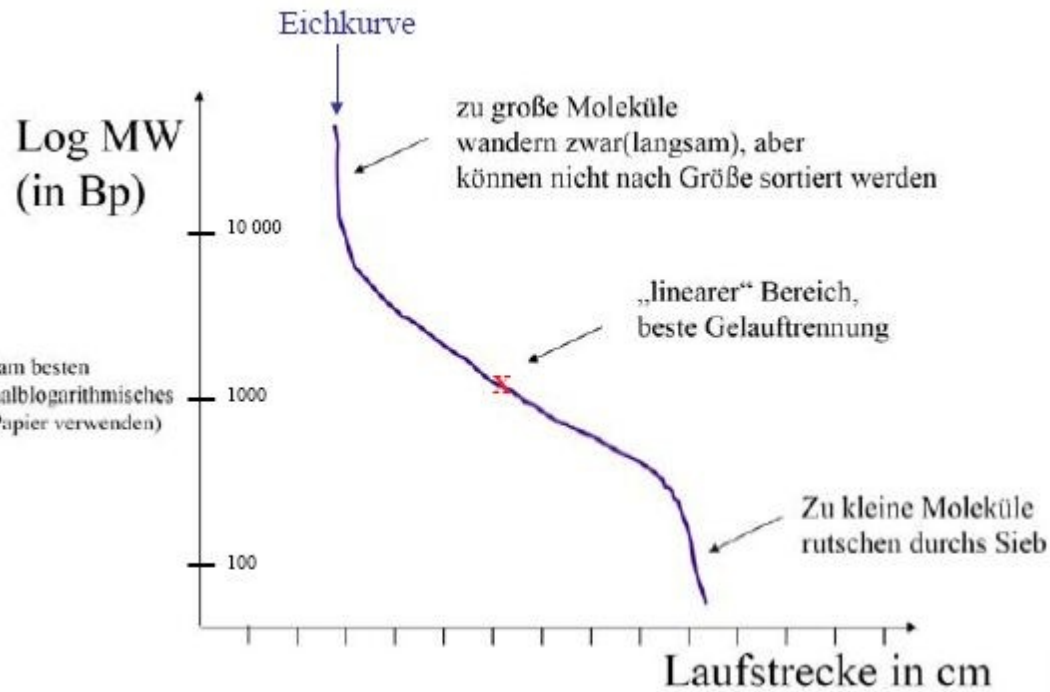


Basenpaare

— 23130
— 9416
— 6557
— 4361

— 2322
— 2027

— 564



mathematische Beziehung zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und molarer Masse

$$D = a - b (\log M)$$

D: Wanderungsstrecke

M: Molare Masse

a, b: von Elektrophoresebedingungen abhängige Konstanten

Vergleich mit Standard-DNA bekannter Fragmentlänge
Abschätzen der Größe oder Auftrag in Diagramm

- Vorteil: einfachere Methode
- Nachteil: weniger genau, meist jedoch ausreichend (Abweichungen 5%) im Vergleich zur mathematischen Bestimmung

