

Gelelektrophorese Eine Einführung, Demonstrationskit für Lehrer

[BAD_1086411.pdf]



Hintergrundinformationen

Die Gelelektrophorese ist eine grundlegende biotechnologische Technik, bei der Makromoleküle nach Größe und Ladung getrennt werden. Sie wird häufig verwendet, um Proben von DNA, RNA oder Proteinen zu analysieren und zu manipulieren. In diesem Experiment wird die Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt, um gefärbte Farbstoffmoleküle unterschiedlicher Größe und Ladung zu trennen und zu charakterisieren.

Bei der Gelelektrophorese werden die zu trennenden Proben auf ein poröses Gelmedium aus einem Material wie Agarose aufgetragen. Agarose ist eine gereinigte Form von Agar, einer gallertartigen Substanz, die aus Rotalgen gewonnen wird. Agarosegele werden hergestellt, indem man zunächst pulverisierte Agarose in den flüssigen Puffer gibt und die Mischung so lange kocht, bis sich die Agarose auflöst. Diese geschmolzene Agarose wird dann auf etwa 55-60°C abgekühlt, in eine Gelform gegossen, die als Gießschale bezeichnet wird, und erstarrt. Vor der Erstarrung wird ein Kamm in die Gießschale gelegt, um eine Reihe von Vertiefungen zu schaffen, in die Proben geladen werden, sobald der Kamm aus dem erstarrten Gel entfernt wird.

Die Gießschale und das erstarrte Gel werden dann in eine Elektrophoresekammer mit Drahtelektroden an beiden Enden gelegt. Das Gel ist mit einem ionenhaltigen Puffer, wie z.B. Trisborate-EDTA (TBE), bedeckt, der den pH-Wert des Systems regelt und Elektrizität leitet. Anschließend wird der Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernt und die Proben werden mit einer Pipette in die

entstandenen Vertiefungen gefüllt. Proben für die Gelelektrophorese werden mit einer kleinen Menge Saccharose oder Glycerin gemischt, um ihre Dichte zu erhöhen. Dadurch sinken die Proben beim Beladen auf den Boden der Taschen.

Nachdem alle Proben in die Vertiefungen geladen wurden, wird die Kammer an eine Stromversorgung angeschlossen und ein elektrischer Strom (normalerweise 50-150 V) an das Gel angelegt. Die Kammer ist mit einer positiven Elektrode (Anode) an einem Ende und einer negativen Elektrode (Kathode) am anderen Ende ausgestattet. Elektrophorese im wahrsten Sinne des Wortes bedeutet "mit Elektrizität zu transportieren"; sobald das elektrische Feld aufgebaut ist, wandern geladene Moleküle in den Proben durch die Poren des Gels in Richtung ihrer Anziehungspole. Moleküle mit einer negativen Nettoladung wandern in Richtung der positiven Elektrode und Moleküle mit einer positiven Nettoladung in Richtung der negativen Elektrode. Die Gesamtladung eines Moleküls beeinflusst die Geschwindigkeit, mit der es sich durch das Gel bewegt. Hochgeladene Moleküle wandern schneller durch das Gel als schwach geladene Moleküle.

Die Mobilität eines Moleküls während der Gelelektrophorese hängt auch von seiner molekularen Größe und Form ab. Die kleinen Poren der Gelmatrix wirken wie ein Sieb, das für ein hohes Auflösungsvermögen sorgt. Kleine Moleküle manövrieren leichter durch die Poren als größere Moleküle und bewegen sich daher relativ schnell. Große Moleküle stoßen auf mehr Widerstand, wenn sie sich durch die winzigen Poren bewegen und sich daher langsamer fortbewegen.

Größe und Nettoladung sind Faktoren, die zusammen bestimmen, wie schnell die Moleküle durch das Gel wandern und damit ihre Wanderdistanz. Kleine Größe und starke Ladung erhöhen die Migrationsrate eines Moleküls durch das Gel. Große Größe und schwache Ladung verringern die Migrationsrate. (Anmerkung: In der Elektrophorese der DNA, da alle Proben die gleiche Ladung haben, basiert ihre Migrationsrate ausschließlich auf der Größe).

In diesem Experiment werden fünf bekannte Farbstoffproben und drei unbekannte Farbstoffmischungen einer Agarosegel-Elektrophorese unterzogen. Ein Teil der Farbstoffe wird von der negativen Elektrode angezogen, ein anderer Teil von der positiven Elektrode, abhängig von ihrer Gesamtladung. Jeder der bekannten Farbstoffe weist einen einzigartigen Gelmigrationsabstand auf, der sich auf seine Molekülgröße und Nettoladung bezieht. Die Studenten identifizieren die Komponenten der unbekanntes Farbstoffmischungen, indem sie die Migrationsabstände und die Migrationsrichtung der unbekanntes Farbstoffe mit denen der bekannten Farbstoffproben vergleichen.

Hinweis: Die Elektrophorese von Farbstoffen ist eine einfache und nützliche Einführung in die Gelelektrophorese. Obwohl es sich in gewisser Weise von den meisten Elektrophoresen unterscheidet, die Ihre Schüler später durchführen werden, sind die Unterschiede ebenso lehrreich wie die Ähnlichkeiten. So veranschaulichen die Farbstoffkomponenten den Trennvorgang deutlich, während DNA- und Proteingele gefärbt werden müssen, um die Trennbänder zu zeigen. Wenn man sieht, wie bestimmte Farbstoffmoleküle sich im Gel bewegen, ist es später leicht, die Verwendung und Wirkung des Ladefarbstoffs in DNA-Trennungen zu verstehen.

Material:

Benötigt und im Lieferumfang enthalten:

- 1 Flasche mit 0,8% Schmelz-Agarose, 60 mL (hergestellt mit 0,48 g Agarose in 60 mL 1fach TBE)
- 1 Flasche 20x TBE Puffer, 20 mL (genug, um 400 mL 1x TBE Lösung herzustellen)
- Bromphenolblau, 30 mL
- Methylorange, 30 mL
- Ponceau G, 30 mL
- Xylol, 30 mL
- Pyronin Y, 30 mL
- Unbekannt #1, 30 mL
- Unbekannt #2, 30 mL
- Unbekannt #3, 30 mL
- 8 Nadelspitzenpipetten
- 1 Lineal
- 1 Kunststoffschale

Benötigt, aber nicht im Lieferumfang enthalten:

- Gel-Elektrophoresekammer
- Stromversorgung (mind. 50-V-Fähigkeit)
- Rolle Abdeckband
- Gestell für Mikrozentrifugenröhrchen
- 400-mL-Behälter (oder größer)
- kochendes Wasserbad oder Mikrowellenofen
- Destilliertes Wasser (380 mL)
- 55-60°C Wasserbad (optional)

Vorbereitungszeit

- TBE Puffer vorbereiten / 5 min
- Farbstoffreagenzien vorbereiten / 5 min
- 0,8%ige Agaroselösung herstellen / 10-25 min

Zeitbedarf Experiment:

- Gießen von Agarosegel(en) / 20 min
- Gelaufladung / 10-15 min
- Elektrophorese / 25 min
- Prüfung und Diskussion / 15 min

Das Gel kann gegossen und in der Elektrophoresekammer unter 1x TBE-Puffer bis zu 2 Tage aufbewahrt werden.

Sicherheitshinweise

Wenn Sie das 8-Stationen-Klassenzimmer-Kit verwenden, erinnern Sie die Schüler daran, stets die Sicherheitsregeln zu beachten. Achten Sie beim Anschluss der Elektrophorese-kammer an das Stromnetz auf eine sorgfältige Überwachung. Die Spannungsversorgung sollte erst eingeschaltet werden, wenn der Deckel der Kammer fest sitzt und die elektrischen Leitungen ordnungsgemäß in die Eingänge eingeführt sind. Die Stromversorgung sollte ausgeschaltet werden, bevor der Deckel entfernt und die Leitungen abgeklemmt werden.

Vorbereitungen

1× TBE-Puffer vorbereiten

Tris-borate-EDTA (TBE) ist eine stabile Pufferlösung und kann daher auch mehrere Tage im Voraus hergestellt und in einem Ballon oder einem anderen Behälter gelagert werden.

Bereiten Sie die Lösung wie folgt vor:

Um die 1×-Konzentration von TBE vorzubereiten, geben Sie 20 mL (die gesamte Flasche) von 20× TBE-Puffer auf 380 mL destilliertes Wasser in einem 400-mL-Behälter (oder größer).

Spülen Sie alle Rückstände aus der 20× TBE Pufferflasche mit einem Teil der frischen

1× TBE-Lösung. Rühren Sie, bis die Lösung komplett gemischt ist und beschriften Sie den Behälter "1× TBE".

Zentrifugieren Sie die Farbstoffproben (~30 Sek.) in einer Mikrozentrifuge ab um die komplette Lösung am Boden des Reaktionsgefäßes zu haben. Wahlweise klopfen Sie die Unterseite jedes Rohres scharf auf die Tischplatte, bis sich alle Flüssigkeit im Boden des Rohres angesammelt hat.

Bereiten Sie die 0,8%ige Agaroselösung mindestens 30 Minuten vor dem Gießen der Gele vor.

Achtung: Beim Umgang mit der Agarose sind Ofenhandschuhe oder hitzebeständige Handschuhe zu verwenden.

Schmelzen Sie die Agarose, indem Sie die Flasche auf eine der folgenden Weisen erhitzen:

1. Lösen Sie den Verschluss der Flasche mit 0,8% Agarose. Erhitzen Sie die Flasche im Mikrowellenherd in 1-Minuten-Intervallen, bis die Agarose vollständig geschmolzen ist. Um zu verhindern, dass die Agarose überkocht, die Flasche zwischen jeder Minute des Erhitzens verwirbeln. Achten Sie auf die Flasche. Wenn die Agarose zu stark zu kochen beginnt, entfernen Sie sie vorsichtig von der Wärmequelle, bis sich die Flüssigkeit absetzt.

2. Lösen Sie den Verschluss der Flasche mit 0,8% Agarose. Erwärmen Sie die Flasche in einem kochendes Wasserbad, bis die Agarose vollständig geschmolzen ist (~6-12 Minuten).

Der Wasserstand sollte knapp über dem Niveau der Agarose in der Flasche liegen. Um zu verhindern, dass die Agarose überkocht, die Flasche alle paar Minuten verwirbeln. Achten Sie auf die Flasche.

Wenn die Agarose anfängt, zu heftig kochen, vorsichtig aus der Wärmequelle nehmen, bis die Flüssigkeit sich absetzt

Die 0,8%ige Agaroselösung wird klar, wenn die Agarose schmilzt. Drehen und beobachten Sie den Flaschenboden, um sicherzustellen, dass keine feste Agarose zurückbleibt. Lassen Sie die Flasche abkühlen, bis sie schmerzfrei in einer bloßen Hand gehalten werden kann. Es sollte sich noch warm anfühlen und bei 55-60°C liegen. An dieser Stelle können Sie die Agarose sofort verwenden oder bei dieser Temperatur in einem 55-60°C-Wasserbad halten.

Vorbereiten der Gelkammer:

Diese Anleitung ist für die Verwendung mit der Carolina™ Gel-Elektrophoresekammer (21-3668) bestimmt. Wenn Sie dieses Gerät nicht besitzen, passen Sie diese Anleitung an Ihr spezielles Gerät an.

Gießen des/der Agarosegel(s)

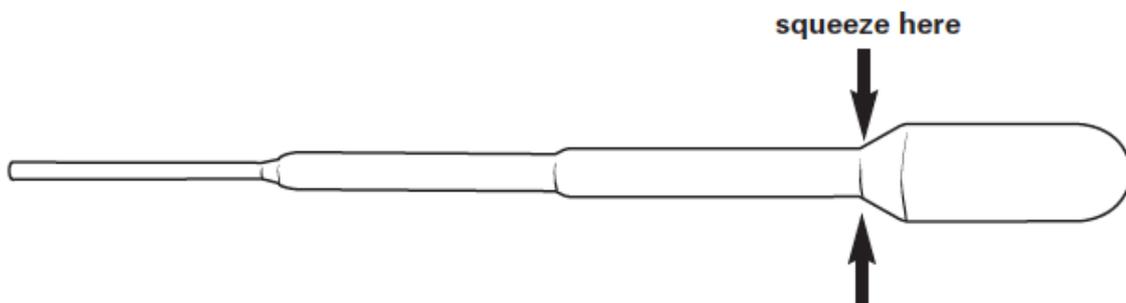
1. Versiegeln Sie die offenen Enden der Gelgießschale mit Abdeckband, so dass keine Nähte oder Lücken entstehen. Kamm in den mittleren Rillensatz über den roten Streifen in der Gießschale einführen. Dadurch entsteht eine Reihe von Vertiefungen in der Mitte des Gels, sobald sich das Gel gebildet hat.
2. Füllen Sie die Gießschale vorsichtig bis zu einer Tiefe von ca. 7 mm mit der vorbereiteten 0,8%igen Agaroselösung; das flüssige Gel sollte etwa die Hälfte der Höhe der Kammzähne abdecken.
3. Während die Agarose noch flüssig ist, bewegen Sie große Blasen und Ablagerungen mit dem Kamm an den Rand der Gießschale. Bringen Sie den Kamm wieder in seine Position in der mittleren Reihe von Nuten in der Gießschale.
4. Lassen Sie das Gel ungestört erstarren. Achten Sie darauf, dass Sie die Gießschale während dieser Zeit nicht bewegt wird. Sobald die Agarose ausgehärtet ist, erscheint das Gel trübe. Das Gel verfestigt sich in 10-15 Minuten.
5. Wenn die Agarose erstarrt ist, entfernen Sie das Abdeckband an den Enden der Gießschale, um das Gel zu entsiegeln. Legen Sie die Gießschale und das Gel in die Elektrophoresekammer mit dem roten Streifen zum positiven (roten) Ende und dem schwarzen Streifen zum negativen (schwarzen) Ende.
6. Füllen Sie die Elektrophoresekammer mit 1x TBE (tris-borate-EDTA) Puffer, dass nur die Oberfläche des Gels bedeckt ist.
7. Entfernen Sie langsam und vorsichtig den Kamm aus dem Gel, ohne die Vertiefungen zu zerreißen. Stellen Sie sicher, dass die vom Kamm zurückgelassenen Probengefäße vollständig in den Puffer 1x TBE eingetaucht sind. Wenn "Grübchen" um die Vertiefungen herum erscheinen, fügen Sie langsam weitere 1x TBE Puffer hinzu, bis sie verschwinden.

8. Das Gel ist nun bereit für die Beladung mit Farbstoffproben. Wenn Sie das Gel zu einem anderen Zeitpunkt aufladen, decken Sie den Elektrophoresetank mit dem Deckel ab, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern.

Beladen des Gels:

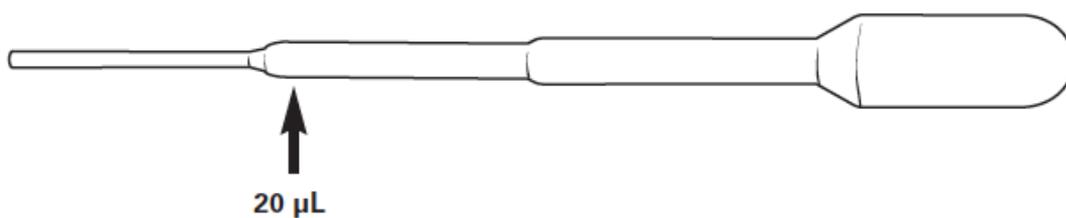
Farbstoffproben werden mit Hilfe von Plastikpipetten in das Gel eingefüllt. Für eine bessere Kontrolle während des Pipettierens drücken Sie die Pipette an der Stelle, an der der Schaft auf den Kolben trifft, wie in der Abbildung unten gezeigt.

hier drücken



In jede Vertiefung des Gels wird eine sehr kleine Menge Farbstoff (20 µL) eingefüllt. Das Volumen von 20 µl ist etwas größer als die Nadelspitze der Kunststoffpipette.

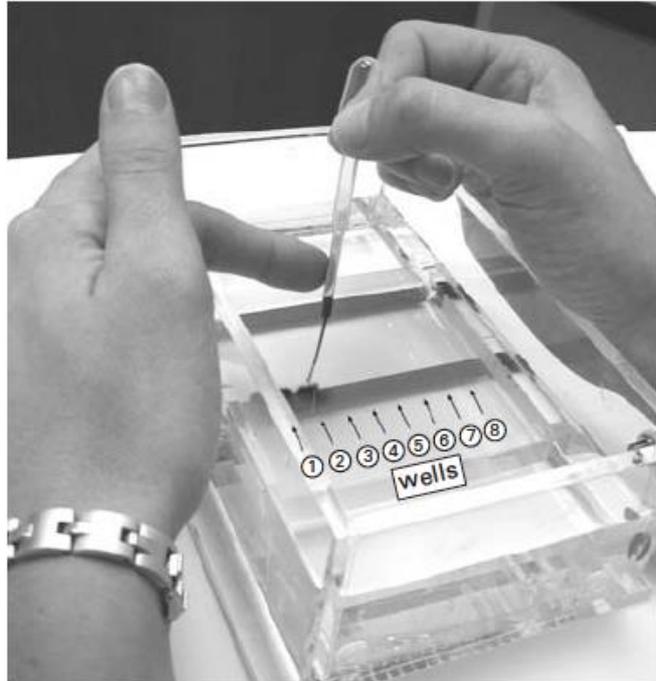
Siehe Abbildung unten.



9. Laden Sie Farbstoffproben in die Vertiefungen (auch Lanes genannt) von links nach rechts in der unten angegebenen Reihenfolge. Um die erste Probe (Bromphenolblau) in die Vertiefung zu laden, ziehen Sie 20 L Farbstoff in eine Plastikpipette

Halten Sie die Pipette mit Ihrer dominanten Hand. Legen Sie den Ellenbogen Ihres dominanten Arms auf die Labortischbank, um Ihre Hand zu stabilisieren. Die Luft aus der Pipette entfernen, so dass sich der Farbstoff an der Spitze befindet. Führen Sie die Pipette mit Ihrer nicht-dominanten Hand durch die Oberfläche. Die Pipettenspitze nicht in die Vertiefung drücken, sondern direkt über die Vertiefung legen. Den Farbstoff langsam in die Vertiefung ausstoßen (siehe Abbildung 1 unten).

Der Farbstoff sinkt auf den Grund der Vertiefung, weil er mit Saccharose vermischt wurde, um seine Dichte zu erhöhen.



Wiederholen Sie diesen Vorgang für jede Farbstoffprobe und fahren Sie von links nach rechts in der unten angegebenen Reihenfolge fort. Verwenden Sie für jede Farbstoffprobe eine saubere Kunststoffpipette. Vergewissern Sie sich, dass das Etikett auf jeder Färberöhre vor dem Beladen überprüft wurde, um sicherzustellen, dass es mit der vorgesehenen Reihenfolge übereinstimmt.

Reihenfolge:

Spur 1 Bromphenol blau

Spur 2 Methylorange

Spur 3 Ponceau G

Spur 4 xylencyanol

Spur 5 Pyronin Y

Spur 6 unbekannt #1

Spur 7 unbekannt #2

Spur 8 unbekannt #3

Gelelektrophorese

10. Wenn alle Farbstoffproben geladen sind, legen Sie den Deckel auf die Elektrophorese-kammer. Richten Sie den Deckel so aus, dass das positive Ende der Kammer mit dem roten (positiven) Kabel und das negative Ende der Kammer mit dem schwarzen (negativen) Kabel verbunden ist. Schließen Sie dann die elektrischen Kabel an die Stromversorgung an, mit dem Pluskabel im Plus-Eingang (rot bis rot) und dem Minuskabel im Minus-Eingang (schwarz bis schwarz). Wenn Sie ein mehrkanaliges Netzteil verwenden, stellen Sie sicher, dass beide elektrischen Leitungen an den gleichen Kanal angeschlossen sind.
11. Schalten Sie das Netzteil ein und stellen Sie es auf die gewünschte Spannung ein. Beobachten Sie, wie die Farbstoffe langsam in das Gel eindringen und sich mit der Zeit trennen. Achten Sie darauf, dass kein Farbstoff aus dem Gel austritt. Führen Sie das Gel so lange, bis das Band in Bahn 3 0,5 cm vom Ende des Gels entfernt ist.
12. Sobald die gewünschte Trennung der Farbstoffe erreicht ist, schalten Sie die Stromzufuhr aus, trennen Sie die Leitungen von den Eingängen und entfernen Sie die Oberseite der Elektrophoresekammer.
13. Nehmen Sie vorsichtig die Gießschale ab und schieben Sie das Gel in die die Kunststoffschale. Die Gelresultate sollten dem Bild ähneln.



Analyse der Ergebnisse

14. In der nachstehenden Tabelle ist die Anzahl der Farbbänder in jeder Bahn und die Migrationsrichtung (positiv oder negativ) für jedes Band anzugeben. Bestimmen Sie die Migrationsdistanz jedes Farbstoffs in den bekannten und unbekannt Proben, indem Sie die Entfernung vom Zentrum der Geltasche zum Zentrum messen mit dem mitgelieferten Lineal. Wenn sich der Farbstoff in Richtung des positiven Pols bewegt hat, markieren Sie die Wanderstrecke als positive Zahl. Wenn sich der Farbstoff auf den negativen Pol zubewegt, markieren Sie die Wanderstrecke als negative Zahl.

Lane	Sample	Number of Bands	Direction of Migration (positive or negative)	Migration Distance (cm) <i>Actual distances may vary slightly.</i>
1	bromphenol blue	1	<i>positive</i>	<i>2.4 cm</i>
2	methyl orange	1	<i>positive</i>	<i>1.5 cm</i>
3	ponceau G	1	<i>positive</i>	<i>3.4 cm</i>
4	xylene cyanol	1	<i>positive</i>	<i>0.9 cm</i>
5	pyronin Y	1	<i>negative</i>	<i>-2.4 cm</i>
6	unknown #1	2	<i>positive</i>	<i>0.9 cm, 3.4 cm</i>
7	unknown #2	3	<i>positive</i>	<i>1.5 cm, 2.4 cm, 3.4 cm</i>
8	unknown #3	2	<i>negative and positive</i>	<i>0.8 cm, -2.4 cm</i>

Offene Fragen:

1. Basierend auf der Migrationsrichtung, der Migrationsreichweite und dem Aussehen Ihres Gels, welche Farbstoffkomponenten waren in den unbekannte Farbstoffmischungen?

unbekannt #1: Xyloicyanol und Ponceau G

unbekannt #2: Methylorange, Bromphenolblau und Ponceau G

unbekannt #3: Xyloicyanol und Pyronin Y

2. Welches Farbstoffmolekül wanderte am weitesten durch das Gel? Welches reiste die kürzeste Distanz durch das Gel? Welche Eigenschaften beeinflussen die Migration Entfernung?

Ponceau G wanderte am weitesten durch das Gel. Xyloicyanol migrierte die kürzeste Distanz durch das Gel. Die Größe eines Moleküls und der Grad der Molekülgröße molekulare Ladung beeinflusst die Wanderungsdistanz. Kleine oder hochgeladene Moleküle wandern weiter als große oder schwach geladene Moleküle.

3. Wie hoch waren die Ladungen der Farbstoffmoleküle, die in Richtung des positiven Elektrode und der Farbstoffmoleküle, die in Richtung des negative Elektrode? Woher weißt du das?

Farbstoffe, die in Richtung der positiven Elektrode wanderten, hatten eine Netto-Negativladung. Farbstoffe die in Richtung der negativen Elektrode wanderten, hatten eine positive Nettoladung. Diese Migrationsmuster auftrat, weil sich entgegengesetzte Ladungen anziehen.

4. Warum ist elektrischer Strom notwendig, um Moleküle durch Gel zu trennen?

Geladene Moleküle, die in einem Gel geladen sind, wandern durch ein elektrisches Anziehungskraft zu den entgegengesetzt geladenen Polen. Ohne den elektrischen Strom, Migration wäre nicht möglich.

5. Warum ist die poröse Matrix von Agarosegelen ein essentieller Bestandteil von Molekültrennung durch Gelelektrophorese?

Die Poren bieten einen Durchgang für die Proben, um sich durch das Gel zu bewegen. Die Matrix der winzigen Poren wirkt auch wie ein Sieb, das zur Molekültrennung beiträgt. Kleine Moleküle leichter durch die Poren des Gels zu manövrieren als größere Moleküle und somit schneller migrieren als die größeren, langsameren Moleküle.