

Kurz ein bisschen Theorie...

Elektrophorese

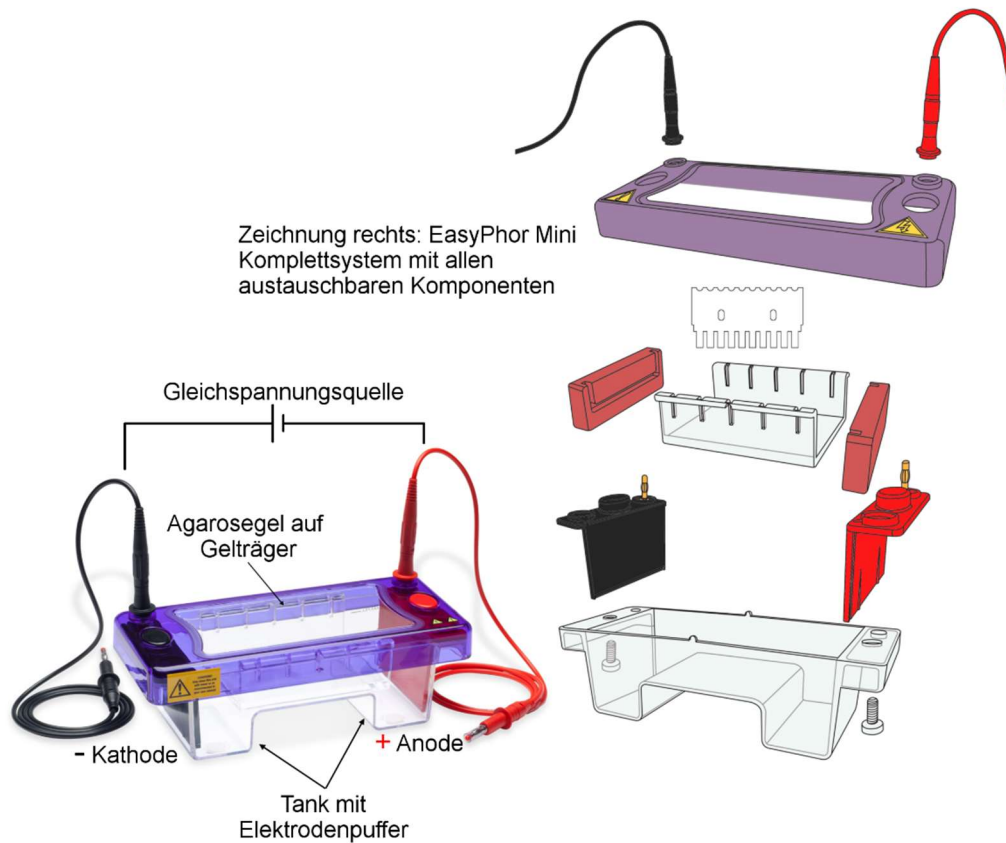
- Biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von positiv und negativ geladenen Molekülen im elektrischen Feld ausgenutzt wird.

Allgemeines

- Im elektrischen Feld wandern bewegliche, elektrisch geladene Teilchen zum entgegengesetzt geladenen Pol.
- Positiv geladene Teilchen (Kationen) wandern zum Minus-Pol (Kathode), negativ geladene Teilchen (Anionen) wandern zum Plus-Pol (Anode).
Aber verschiedene Teilchen wandern verschieden schnell.
- Und es sind besonders zwei Eigenschaften eines Teilchens, die seine Wanderungsgeschwindigkeit bestimmen:

Je kleiner das Teilchen, desto schneller ist die Wanderung.

Je größer die Ladung, desto schneller ist die Wanderung.



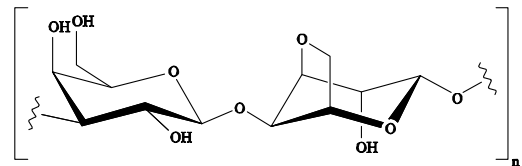
Agarose Grundwissen I



Agarose ist ein Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose, die glykosidisch miteinander verbunden sind. Es stellt die Hauptkomponente des Agars dar und wird vor allem aus den Rotalgengattungen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen. Agarose ist ein starker Gelbildner und für die Gelierfähigkeit des Agars verantwortlich (1 g Agarose immobilisiert 100 g Wasser).

Allgemeines

- Rotalge → AgarAgar → Agaropektion und Agarose → Reinigung nach Kettenlänge und Sulfatgehalt → eventuell Methylierung
- Kettenlänge ca. 400 Agarobioseunits (~ 120 kDa)
- Ketten sind gewunden und bilden maschendrahtartige, makroporöse Matrix
- Porengröße variiert zwischen 100 – 300 nm



Agarose Grundwissen II

- **Agarose hat verschiedene Schmelz- und Geliertemperaturen**
 - Der Methylierungsgrad bestimmt die Geliertemperatur (es gibt natürliche und synthetische Methylierung)
- **Agarose ist nicht toxisch und einfach zu präparieren**
- **Geladene Gruppen der Agarose (Pyruvat-, Sulfatgruppen) bestimmen den EEO Wert**
 - Elektroendosmose ist die Bewegung einer Flüssigkeit parallel zu einer Oberfläche durch ein elektrisches Feld. Der Effekt tritt unter anderem bei der Elektrophorese auf und wird dann elektroosmotischer Fluss genannt.
 - Die negativen Sulfationen sind an die Gelmatrix gebunden. Die entsprechenden Kationen (Na^+ , K^+) sind frei beweglich. Legt man eine Spannung an, wandern beide gegeneinander und es gibt einen unerwünschten Bremseffekt bei der DNA Elektrophorese.
 - D.h. hoher EEO → DNA wandert langsamer, Banden können unscharf werden. Das kann aber wiederum für Proteintrennung nützlich sein, da Proteine unterschiedlich geladen sein können.
- **Agarose hat unterschiedliche Gelstärken**
 - Wird angegeben in Gramm pro Quadratcentimeter
 - Ist abhängig von der Konzentration und der Art der Agarose (durch Modifikation der Extraktionsprozedur lassen sich Agarosefraktionen isolieren, die schon bei geringerer Prozentigkeit eine höhere Festigkeit haben) → speziell für PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese) wichtig
 - *Biozym LE: 1200 g/cm² bei 1%igem Gel (hohe Gelstärke, sehr praktisch fürs Blotting)*
 - *Biozym Plaque GP: 200 g/cm² bei 1%igem Gel (wie „Wackelpudding“, positiv für Zellkulturapplikationen, In-Gel Techniken oder für das Recovery von DNA nach der Auftrennung)*



Und wie finde ich jetzt die richtige Agarose für meine Anwendung?

1) Fragmentgröße und gewünschte **Auflösung**

- Was will ich auftrennen? Kleine Fragmente? Große Fragmente?



2) Schmelztemperatur

- Will ich nach der Elektrophorese DNA-Banden ausschneiden und die DNA weiterverwenden?

3) Gelstärke

- Will ich nach der Elektrophorese noch **blotten**? Muss mein Gel leicht handhabbar und robust sein?



Agarose	Trennbereich (Basenpaare)	Endkonzentration Agarose in %	
		1x TAE Puffer	1x TBE Puffer
Biozym Phor	150 – 800	2,00	1,80
	100 – 600	3,00	2,00
	50 – 250	4,00	3,00
	20 – 130	5,00	4,00
	< 80	–	5,00
Biozym Sieve 3:1	500 – 1.000	3,00	2,00
	100 – 500	4,00	3,00
	10 – 100	6,00	5,00
Biozym Sieve GeneticPure 	500 – 1.000	2,50	2,00
	150 – 700	3,00	2,50
	100 – 450	3,50	3,00
	70 – 300	4,00	3,50
	10 – 100	4,50	4,00
	8 – 50	5,00	4,50
Biozym LE und Biozym LE GeneticPure	1.000 – 23.000	0,60	0,50
	800 – 10.000	0,80	0,70
	400 – 8.000	1,00	0,85
	300 – 7.000	1,20	1,00
	200 – 4.000	1,50	1,25
	100 – 3.000	2,00	1,75
Biozym Plaque und Biozym Plaque GeneticPure 	500 – 25.000	0,75	0,70
	300 – 20.000	1,00	0,85
	200 – 12.000	1,25	1,00
	150 – 6.000	1,50	1,25
	100 – 3.000	1,75	1,50
	50 – 2.000	2,00	1,75
Biozym Gold	5.000 – 50.000	0,30	TBE Puffer nicht für die Auftrennung von DNA > 12.000 bp empfehlenswert
	1.000 – 20.000	0,50	
	800 – 10.000	0,80	
	400 – 8.000	1,00	



Agarosen und passende „Recovery“-Techniken	Agarosen					Auswahlhilfe Agarose Blotting
	Biozym LE GeneticPure	Biozym Plaque GeneticPure	Biozym Sieve GeneticPure	Biozym Phor	Biozym Plaque	
In-Gel Reaktionen		●	●			Southern <1 kb
β-Agarase		●	●		●	Southern >1 kb
Phenol/Chloroform		●	●		●	Northern <1 kb
Aufreinigungssäulen	●	●	●	●	●	Northern >1 kb
Elektroelution	●	●	●	●	●	
Freeze/Squeeze	●	●	●	●	●	

● Agarose vom Low Melting Typ

Herstellung eines Agarosegels – welchen Puffer soll ich wählen?

TAE Puffer – Für anschließende Isolierung der DNA

- Für Auftrennung großer (> 12 kb) DNA Moleküle
- Geringe Ionenstärke
- Geringe Pufferkapazität - relativ schnelle, starke Hitzeentwicklung bei der Elektrophorese

TBE Puffer – Für Auftrennung kleiner (< 1 kb) DNA Moleküle

- Schärfere Banden bei kleinen (< 1 kb) DNA Molekülen
- Geringere Mobilität der DNA
- Hohe Ionenstärke
- Hohe Pufferkapazität - relativ geringe Hitzeentwicklung bei der Elektrophorese

Den Puffer, den man für die Herstellung der Agarose gewählt hat, auch als Laufpuffer wählen

Herstellung eines Agarosegels in der Mikrowelle

1. Wählen Sie einen Erlenmeyerkolben, der das 2-4 Fache des Volumens der gewünschten Lösung aufnehmen kann.
2. 1X oder 0,5X Elektrophoresepuffer bei Raumtemperatur und einen Rührfisch in das Gefäß geben.
3. Streuen Sie langsam das Agarosepulver unter schnellem Rühren ein, um Verklumpungen zu vermeiden.
4. Entfernen Sie den Rührfisch, falls er nicht mit Teflon® beschichtet ist.
5. Wiegen Sie das Gefäß mit der Agaroselösung vor dem Erhitzen.
6. Decken Sie das Gefäß mit Plastikfolie ab und stechen Sie zur Belüftung ein kleines Loch in die Folie.
7. Erhitzen Sie das Gefäß in der Mikrowelle mit hoher Leistung, bis Blasen entstehen.
8. Nehmen Sie das Gefäß aus der Mikrowelle.
Achtung: Mikrowellenlösungen können sich beim Rühren überhitzen und schäumen!
9. Schwenken Sie das Gefäß vorsichtig, um abgesetzte Pulver- und Gelstücke zu resuspendieren und erhitzen Sie es bei hoher Leistung erneut, bis die Lösung siedet. Am Siedepunkt halten, bis sich alle Partikel aufgelöst haben (ca. 1 Minute).
10. Nehmen Sie das Gefäß aus der Mikrowelle und schwenken Sie es vorsichtig, um die Agaroselösung gründlich zu mischen.
11. Nach dem Auflösen ausreichend **heißes** destilliertes Wasser hinzufügen, um das Anfangsgewicht zu erhalten, und erneut gründlich mischen.
12. Kühlen Sie die Lösung vor dem Gießen auf 50 °C bis 60 °C ab und gießen dann das **Gel** (in der Regel mit einer **Stärke von ca. 5 mm**).

Für die richtige Spannung sorgen:

- ✓ Auftrennung von Fragmenten < 1 kb bei ca. 5 V/cm* in TBE Puffer (TAE Puffer für Rückgewinnung der Probe)
- ✓ Auftrennung von Fragmenten von 1 kb-12 kb bei ca. 4-10 V/cm* in TBE oder TAE Puffer (TAE Puffer für Rückgewinnung der Probe)
- ✓ Auftrennung von Fragmenten von > 12 kb bei ca. 1-2 V/cm* in TAE Puffer

* "V/cm": cm =Abstand der Elektroden.

