

## Gelelektrophorese: DNA-Marker und GenFinger

Ziel der Versuche ist es, das Pipettieren einzuüben, das Prinzip der Gelelektrophorese zu verstehen und den Täter aus dem Tatszenario zu überführen. Dafür wird ein **ungiftiges Agarosegel** mit **zwei Taschenspuren** gegossen, befüllt (siehe Abb. 1) und die Gelelektrophorese gestartet.

Abb.1: **Probenauftrag zur Gelelektrophorese**

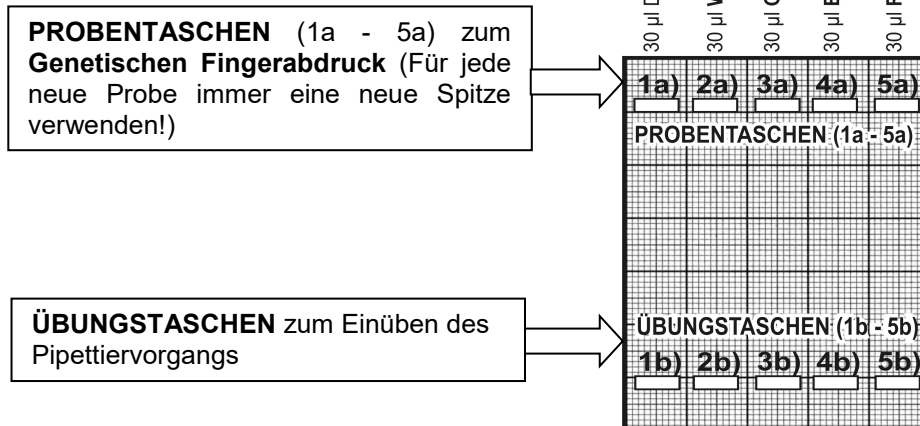
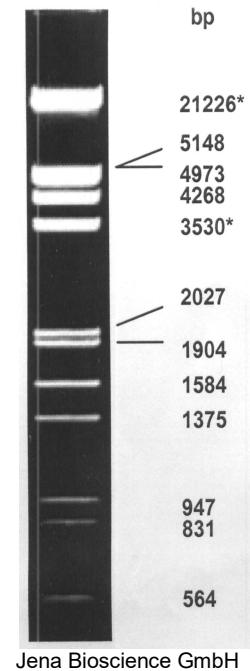


Abb. 2: **Bandenkarte des DNA-Markers**



**Ladepufferlösung (Taschen 1b - 5b):** Jedes Gruppenmitglied sollte zum **Einüben des Pipettiervorgangs** eine der Taschen 1b - 5b mit **Ladepufferlösung** befüllen. Bei der **Ladepufferlösung** handelt es um einen **Farbstoff**, der aufgrund seiner negativen Ladung im Gel wandert. Bei DNA-haltigen Proben (1a - 5a) bindet der Ladepuffer an die DNA und **beschwert** diese. So bleibt die Probe in der Tasche und diffundiert nicht heraus. Durch die Färbung zeigt der Ladepuffer, wie viel Probe bereits in die Taschen pipettiert wurde. Ladepuffer wandern je nach Molekülgröße (Farbe) unterschiedlich schnell durch das Gel. So kann abgeschätzt werden, wie lange eine Gelelektrophorese dauern muss, um eine Auftrennung der DNA-Fragmente zu erreichen und ab wann Gefahr besteht, dass diese aus dem Gel herauslaufen.

**DNA-Marker (Tasche 1a):** Der DNA-Marker enthält linearisierte (gerade) DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, deren Basenpaarlängen (bp) bekannt sind. Die einzelnen Fragmente liegen in einer hohen Kopienzahl vor, so dass die Bildung klarer DNA-Banden garantiert ist. Nach der Gelelektrophorese müssen die **Gele** mit **Azur (B) gefärbt** werden, damit die **Banden** sichtbar werden. In der **Abb. 2** ist eine **Bandenkarte** des GenIE-DNA-Markers abgebildet. Die mit \*markierten Fragmente können sich miteinander verbinden, so dass z.B. die 3530 bp Bande wegfällt.

**Proben Tatszenario (Taschen 2a - 5a):** Bei den Proben handelt es sich um die mittels PCR amplifizierte Proben des D18S51 Bereichs vom **Täter (weiß)**, dem **Sohn (gelb)**, dem **Vater (blau)** und der **Mutter (rot)**.

### Hinweise zur Versuchsdurchführung

- Jede 3er Versuchsgruppe benötigt: 1x Frischkäsebox, 5x neue 9V Batterien, 1x Lineal, 1x Schere und 1x Permanent-Marker (schwarz), Boden der Frischkäseboxen schwärzen (Permanent Marker).
- Die **Versuchsanleitung** (und das Bildmaterial FGenFinger 3 & 4) sollten Sie vor dem Versuchstag durchgearbeitet haben. Arbeitsblätter als Download und kurze **Filme** unter [www.genie-konzept.de](http://www.genie-konzept.de).
- **GELDICKE:** Nicht zu dicke Gele gießen, da die Färb- und Entfärbzeit zu lange dauert. (Optimale Geldicke: Zacken des Kamms ragen **4 mm** in die flüssige Agaroselösung hinein.)
- **Pipettieren der DNA-Proben:** Pipettieren Sie nicht zu langsam und vermeiden Sie Erschütterungen des Gels, da ansonsten die Proben aus den Taschen diffundieren. Ziehen Sie nur so viel Probenmenge in die Pipettenspitze auf, dass die Pipette nicht mit der Probe in Kontakt kommt.
- **Geltaschen nicht durchstechen** und für **jede neue Probe eine neue Pipettenspitze** verwenden!
- Da immer die **komplette Probe** (ca. 30 µl) in die Geltaschen (1a - 5a) eingesetzt werden soll und die Pipettenspitze max. 20 µl aufnimmt, muss zum Befüllen einer Tasche meist 2mal pipettiert werden.



Versuchsanleitung **GELELEKTROPHORESE** (FGenFinger 3 & 4)**MATERIAL**  **WICHTIG:** Pro Gruppe wird 1 Gel gegossen!

|   |                                 |   |   |                          |
|---|---------------------------------|---|---|--------------------------|
| Schüler-<br>material                    | 1) 1 Frischkäsebox (Gelkammern) | <input type="checkbox"/>                              | 15) 1 Objektträger (50 x 70 oder 80 mm) | <input type="checkbox"/> |
|   | 2) 5 Batterien (jeweils 9 Volt) | <input type="checkbox"/>                              | 16) 4 Hefthalterklemmen                 | <input type="checkbox"/> |
|   | 3) Permanent Marker (schwarz)   | <input type="checkbox"/>                              | 17) 2 Karbonfasergewebe (je 6 x 3 cm)   | <input type="checkbox"/> |
|   | 4) Schere                       | <input type="checkbox"/>                              | 18) 2 Kabel mit Krokodilklemmen         | <input type="checkbox"/> |
|   | 5) Lineal                       | <input type="checkbox"/>                              | 19) Schutzhandschuhe                    | <input type="checkbox"/> |
| 6) Paketbandrolle (Breite 5cm)          | <input type="checkbox"/>        | Aqua dest. und Mikrowelle/n                           | <input type="checkbox"/>                |                          |
| 7) Erlenmeyerkolben (200ml) Duran Glas  | <input type="checkbox"/>        | <b>Gel - Übungstaschen unten: 1b - 5b</b>             |   |                          |
| 8) TAE-Pufferlösung                     | <input type="checkbox"/>        | 20) Ladepufferlösung - reicht für 3 Taschen           | <input type="checkbox"/>                |                          |
| 9) Agarose-Pulver (1g)                  | <input type="checkbox"/>        | <b>Gel - Probestaschen oben: 1a - 5a</b>              |   |                          |
| 10) Azur (B) - Lösung (0,04%) ca. 100ml | <input type="checkbox"/>        | 21) DNA-Marker  | <input type="checkbox"/>                |                          |
| 11) 2 aufgeschnittene Schlauchstücke    | <input type="checkbox"/>        | 22) <b>Weiß:</b> amplifizierte DNA-Probe <b>Täter</b> | <input type="checkbox"/>                |                          |
| 12) 6-8 Pipettenspitzen                 | <input type="checkbox"/>        | 23) <b>Gelb:</b> amplifizierte DNA-Probe <b>Sohn</b>  | <input type="checkbox"/>                |                          |
| 13) Pipette                             | <input type="checkbox"/>        | 24) <b>Blau:</b> amplifizierte DNA-Probe <b>Vater</b> | <input type="checkbox"/>                |                          |
| 14) 2 Gelkämme                          | <input type="checkbox"/>        | 25) <b>Rot:</b> amplifizierte DNA-Probe <b>Mutter</b> | <input type="checkbox"/>                |                          |

**1. Herstellung Gelgießkammer** (FGenFinger 3 & 4 und Film auf [www.genie-konzept.de](http://www.genie-konzept.de))

|   |   |
|---|---|
| 1 | Zum Bau der Gelgießkammer werden <b>5 Streifen</b> Paketband mit je ca. <b>10 cm Länge</b> benötigt.  |
| 2 | Den Objektträger auf eine glatte und ebene Unterfläche (Tisch / Prospekthülle) legen. ( <b>Abb. 2</b> )   |
| 3 | Den <b>ersten Streifen</b> des Paketbands auf die lange Seite des Objektträgers kleben, so dass dieser über der Mitte des Objektträgers liegt und an der oberen langen Seite sowie links und rechts an den kurzen Seiten mindestens noch 2 cm über den Objektträger hinausragt ( <b>Abb. 3</b> ). |
| 4 | Den <b>zweiten Streifen</b> des Paketbands unten auf die lange Seite des Objektträgers kleben, so dass dieser über der Mitte des Objektträgers liegt (Überlappung) und an der langen Seite sowie an den kurzen Seiten mindestens noch 2 cm über den Objektträger hinausragt ( <b>Abb. 4</b> ).    |
| 5 | Die <b>Schritte 3 und 4</b> mit den Paketbandstreifen 3 und 4 <b>wiederholen</b> ( <b>Abb. 5</b> ) und zum Abschluss den 5ten Paketbandstreifen über die <b>Mitte</b> kleben ( <b>Abb. 6 &amp; 7</b> ).   |
| 6 | Das Paketband mit dem Objektträger von der Unterlage lösen und <b>umdrehen</b> . Mit der Schere das Paketband im Abstand von ca. <b>1,5 cm</b> um den Objektträger herum <b>abschneiden</b> . ( <b>Abb. 8</b> )   |
| 7 | Das Paketband nun mit der Klebefläche hochklappen und an den <b>Ecken fest zusammendrücken</b> ( <b>Abb. 9-11</b> ). Die <b>Gelgießkammer ist fertig</b> .  |

**2. Gel gießen** (FGenFinger 3 & 4 und Film auf [www.genie-konzept.de](http://www.genie-konzept.de))

|   |   |
|---|---|
| 1 | An beiden Seiten der <b>Gelkämme je einen Hefthalter</b> befestigen. Die <b>Kämme</b> so in der Gelgießkammer positionieren, dass dieser <b>gerade</b> und in einem <b>Abstand</b> von ca. <b>1 cm</b> von der oberen (Probestaschen) bzw. unteren (Übungstaschen) kurzen Seite in der Kammer stehen (die Kammzacken befinden sich ca. 1-2 mm über dem Objektträger). ( <b>Abb. 12 &amp; 13</b> ). <b>Wichtig</b> ist ein gerader Taschenverlauf.   |
| 2 | Pro Gruppe werden ca. 50 ml eines <b>1%igen Agarosegels</b> benötigt. 1g Agarosepulver in 100 ml 1fach <u>Pufferlösung</u> (TAE) geben (reicht für zwei Agarose-Gele). Bitte einen <b>Erlenmeyerkolben</b> (Duran Glas) mit mind. 200 ml Volumen benutzen. ( <b>Abb. 14 &amp; 15</b> )  |
| 3 | Die Gellösung im <b>Erlenmeyerkolben</b> in der <b>Mikrowelle</b> aufkochen (ca. 2 Min bei 700 Watt), bis alle Schlieren in der Lösung verschwunden sind (= klare Lösung). ( <b>Abb. 16 &amp; 17</b> )<br><b>Vorsicht: Siedeverzug!</b> Zum Herausnehmen <b>Schutzbrille, Handschuhe</b> und <b>Schlauchstücke</b> tragen. Das <b>Agarosegel 3 Min auf etwa 60° C abkühlen lassen</b> .   |
| 4 | Das ca. 60° C warme <u>Agarosegel</u> vorsichtig, aber möglichst in einem Guss in die Gelgießkammer gießen, so dass die <b>Kammspitzen 3-4 mm</b> in das <b>Gel eintauchen</b> . ( <b>Abb. 18 &amp; 19</b> ). Sollte etwas Agarose auslaufen, ist das kein größeres Problem, da Agarose ungiftig ist. Ist die <u>Agaroselösung</u> bereits zu weit <u>abgekühlt</u> (zähflüssig), kann die Lösung erneut erhitzt werden.  |
| 5 | Das <b>Gel 15-20 min.</b> ohne Erschütterung <b>erstarren lassen</b> (Gel wird trübe / milchig). ( <b>Abb. 20</b> )   |
| 6 | Nach dem Aushärten des Gels (Fingerprobe) die <b>Kämme vorsichtig und langsam aus dem Gel ziehen</b> . Die <b>Geltaschen</b> werden sichtbar ( <b>Abb. 21</b> ).  |

**WICHTIG:** Die RESTE der Agarosegellösung **NIE**MALS in den Ausguss kippen (Verstopfungsgefahr!). Ist keine Zeit mehr vorhanden, kann das Gel - siehe Punkt 5 - haltbar gemacht werden!

### 3. Beladen des Gels und Start der Gelelektrophorese

|    |   |                                     |
|----|---|-------------------------------------|
| 1  | Mit dem Permanent-Marker (schwarz) die Bodenfläche der Frischkäsebox komplett einfärben und kurz trocknen lassen ( <b>Abb. 23</b> ).  | <p>Abb 1:<br/>Probenauftrag Gel</p> |
| 2  | Die <b>Elektroden</b> (2 Karbon-Gewebestücke ca. 6 x 3 cm) an den kurzen Rändern in die Gelkammer einsetzen und mit je einer Krokodilklemme an der Frischkäsebox fixieren. ( <b>Abb. 24</b> ).  |                                     |
| 3  | Die fünf 9 Volt-Batterien in Reihe schalten, aber <b>noch nicht anschließen</b> . ( <b>Abb. 25</b> )  |                                     |
| 4  | Die Paketbandumhüllung vom Objektträger und dem Gel entfernen ( <b>Abb. 27</b> ) und den Objektträger mit dem Gel in die <b>Elektrophoresekammer</b> (Frischkäsebox) setzen. Die Geltaschen sollten sich über dem schwarz gefärbten Bodenbereich befinden. ( <b>Abb. 28</b> )   |                                     |
| 5  | <b>TAE-Pufferlösung</b> in die Elektrophoresekammer füllen. Das Gel muss komplett mit Puffer überschichtet werden und alle Luftblasen sollten aus den Geltaschen entfernt sein. ( <b>Abb. 29</b> )  |                                     |
| 6  | <b>Proben vor dem Pipettieren auftauen</b> (in den Händen) und <b>runterschnippen</b> , da sich Probenreste im Deckel absetzen. Zuerst die Übungstaschen, dann die Probetaschen befüllen. Jedes Gruppenmitglied sollte mal pipettieren. ( <b>Abb. 30 - 32</b> ). Die <b>gesamte Probenmenge (1a - 5a)</b> in die entsprechende Geltaschen pipettieren. <b>Vorsicht:</b> Beim Pipettieren nicht mit der Pipettenspitze durch die Geltaschen stechen, da sonst die Probe durch das Loch entweicht. <b>Keine Luft(-blasen)</b> in die Pipettenspitze aufnehmen, dies führt zu Pipettierproblemen (daher Probe erneut aufnehmen). |                                     |
| 7. | <b>Nach der Befüllung der Probetaschen die Gelelektrophorese sofort starten</b> . Die <b>Krokodilklemmen</b> mit den <b>Batterien</b> (5 x 9V) verbinden ( <b>Abb. 33</b> ). <b>Wichtig:</b> Den <b>negativen Pol</b> mit der Elektrode verbinden, die <b>direkt an den PROBEtaschen</b> liegt. Die <b>Aufgaben des Beobachtungsbogens (GenFinger 14)</b> bearbeiten.   |                                     |
| 8. | Elektrophorese bei <b>maximal 45 V</b> (5 x 9V) <b>30-40 Minuten</b> laufen lassen. Danach die Batterien abtrennen ( <b>Abb. 35</b> ).  |                                     |

### 4. Färben und Entfärben der DNA ☞ **WICHTIG: Handschuhe tragen!!!**



|    |  |
|----|--|
| 1. | Die Krokodilklemmen und die Elektroden entfernen. Die Pufferlösung abgießen ( <b>Abb. 36</b> ). <b>Wichtig:</b> Elektroden trocknen und Pufferlösung sammeln – beides ist wiederverwertbar!  |
| 2. | ☞ <b>Wichtig: Schutzhandschuhe tragen (Abb. 37)</b> . ca. 50 ml der 0,04%igen <b>Azur (B) Färbelösung</b> in die Frischkäsebox mit dem Gel gießen, so dass das Gel komplett überschichtet ist.   |
| 3. | Nach ca. <b>30min. Färbelösung abgießen (Abb. 38)</b> . <b>Wichtig:</b> Färbelösung ist wiederverwertbar!  |
| 4. | Das Gel in <b>wenig</b> (ca. 10 ml) und <b>lauwarmen Leitungswasser</b> für 10-15 Min. entfärben ( <b>Abb. 39</b> ). Zu heißes Wasser löst das Gel auf bzw. löst die DNA aus dem Gel. <b>Entfärbungen NICHT über Nacht</b> vornehmen. Bei <b>Zeitproblemen</b> Gel nach dem Färben im lauwarmen Wasser <b>kurz abspülen</b> und mit <b>ganz wenig Wasser</b> (ca. 1-2 ml) in einer <b>Plastiktüte</b> (oder Frischkäsebox) im <b>Kühlschrank lagern</b> . Die Entfärbung kann später nachgeholt werden. Zu lange Entfärbezeiten (in zu viel Wasser) lösen den Azur Farbstoff von der DNA oder sogar die DNA aus dem Gel. |

**AUFGABE:** Bestimmen Sie die Laufstrecken der Banden und zeichnen Sie diese auf dem **BEOBACHTUNGSBOGEN (Gen Finger 14 - AUFGABE 2.3)** ein.

### 5. Haltbarmachung des gegossenen Gels (ungefärbte oder gefärbte Gele ☞ **Abb. 22**)

|   |   |
|---|---|
| 1 | In einen Gefrierbeutel ca. 5 ml Aqua dest. einfüllen (Austrocknungsschutz für die Gele).  |
| 2 | Das Gel mit dem Objektträger (evt. auch mit der Gelgießkammer) in den Gefrierbeutel legen. Den oberen Rand des Gefrierbeutels umschlagen (Verdunstungsschutz) und in den <b>Kühlschrank</b> legen. Das Gel kann so für ca. <b>4 bis 6 Wochen</b> gelagert werden. |

## Beobachtungsbogen: Gelelektrophorese

**1. Bedingungen der Gelelektrophorese:** Gelkonzentration: \_\_\_\_\_ %, 1x TAE-Puffer

|  |  |
|--|--|
| <b>Versuchsbeginn: Datum, Uhrzeit</b><br>(Wann wurde die Spannungsquelle angeschlossen?) | <b>Versuchsende: Datum, Uhrzeit:</b><br>(Wann wurde die Spannungsquelle abgetrennt?) |
| <b>Angelegte Spannung</b> (in Volt):   | <b>Färbung</b> (Zeitdauer in Min. und Farbstoff)                                     |
| <b>Besonderheiten:</b>   |  |

### 2. Bestimmung der Bandenlaufstrecken:

#### Aufgabe 2.1)

**Versuchsbeginn:** Beschriften Sie die Spuren der Probetaschen des Gels mit den eingefüllten Proben und Mengen (Abb.1).

#### Aufgabe 2.2)

**Während der Gelelektrophorese:** Notieren und erklären Sie, was Sie während der Gelelektrophorese (im Gel und an den Elektroden) beobachten können (siehe FGenFinger 4, Abb. 34). ☞ Tipp: Der TAE-Puffer ist eine wässrige Lösung.

#### Aufgabe 2.3)

**Versuchsende:** Zeichnen Sie für jede Spur der Probetaschen des Gels die Banden (auch deren Färbung und Dicke) auf dem Millimeterpapierstück (Abb.1) ein.

#### Aufgabe 2.4)

Vergleichen Sie die Farbintensität der Banden des DNA-Markers, die näher an den Taschen liegen, mit denen, die weiter von den Taschen entfernt sind (Eigene Ergebnisse und GenFinger 12, Abb. 2).

Beobachtung:

Deutung:

Abb. 1: Gel-Millimeterpapiererausschnitt

