



# Größenbestimmung von DNA-Fragmenten und von Proteinen durch Gel-Elektrophorese

Georg Wille, Sabrina Oesteritz, Hans-Werner Müller, Stand: 19.10.2021

## 1 Motivation

Die Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld durch eine kondensierte Phase bezeichnet man als Elektrophorese. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von verschiedenen Eigenschaften ab, z.B. von der Größe, Masse und Ladung der Teilchen und der Viskosität des Mediums. Diese Effekte kann man sich zu Nutze machen, um die verschiedenen Komponenten eines Stoffgemischs voneinander zu trennen.

Wegen der guten Trenneigenschaften und der vergleichsweise einfachen Durchführung gehören elektrophoretische Verfahren zum Standardrepertoire in einem biochemischen und biophysikalischen Labor. Sie dienen der Bestimmung von Molekulargewichten, der Reinheitskontrolle von präparierten Proteinen, der DNA-Analyse bei molekularbiologischen Arbeiten, der DNA-Sequenzierung z.B. bei Genomprojekten oder, gekoppelt mit massenspektrometrischen Verfahren, zur Identifikation aller Proteine in einer Zelle ("Proteomics").

Im Praktikumsversuch sollen Sie durch zwei elektrophoretische Verfahren die Größen verschiedener Makromoleküle bestimmen: zum einen die der häufigsten Proteine in Hühnereiweiß, Milch und Blut, und zum anderen die Größe der DNA-Fragmente, die beim Verdau der DNA des Bakteriophagen Lambda mit zwei Restriktionsendonukleasen entstehen.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Elektrophorese

Auf geladene Teilchen in einem Medium wirken zwei Kräfte, wenn ein elektrisches Feld angelegt wird: die Coulombkraft und die durch die Stöße mit den Teilchen des Mediums hervorgerufene Reibungskraft. Da die Reibungskraft proportional zur Teilchengeschwindigkeit relativ zum Medium ist, die Coulombkraft (im homogenen) elektrischen Feld aber konstant bleibt, bewegen sich die Teilchen nach kurzer Beschleunigungsphase mit konstanter Geschwindigkeit. Coulombkraft und Reibungskraft sind dann gleich groß:

$$\begin{aligned} F_{el} &= q \cdot E & q & \text{Molekülladung, } E \text{ Feldstärke} \\ F_r &= f_c \cdot v & f_c & \text{Reibungskoeffizient, } v \text{ Geschwindigkeit} \\ \Rightarrow v &= \frac{q \cdot E}{f_c} = u \cdot E & u & \text{Mobilität} \end{aligned}$$

Man findet für nichtkugelförmige Teilchen der Masse  $M$ , z.B. Proteine oder DNA, den empirischen Zusammenhang  $u \approx q/M^{2/3}$ , der nichts anderes besagt als dass große Moleküle bei gleicher Ladung langsamer als kleine wandern werden. Wird ein Stoffgemisch der Elektrophorese unterworfen, trennt es sich also gemäß der Mobilität der einzelnen Bestandteile auf.

Für Teilchen, deren Ladung vom pH-Wert der Lösung abhängt, ist die mittlere Molekülladung entscheidend, da De- und Reprotonierung sehr viel schneller ablaufen als die Trennung im Medium. Man könnte also niemals elek-

trisch neutrale Essigsäuremoleküle und einfach negativ geladene Acetat-Ionen voneinander trennen, auch wenn bei einem pH-Wert von 4,76 beide Spezies in gleichen Mengen vorkommen. Sie wandeln sich viel zu schnell ständig ineinander um. Stattdessen wandern alle Moleküle zusammen mit einer mittleren Geschwindigkeit.

Ein zusätzlicher Effekt tritt auf, wenn das Medium keine homogene Flüssigkeit ist, sondern ein Gel aus langkettigen Makromolekülen. Die im Gel entstehenden Poren unterschiedlicher Größe bewirken einen weiteren Trenneffekt: sehr kleine Moleküle kommen ungehindert voran, mittlere werden unterschiedlich stark zurückgehalten, und sehr große Moleküle bewegen sich im Extremfall gar nicht mehr, weil sie nicht durch das Netzwerk passen.

Diese sogenannte Gelelektrophorese ist in der Bioanalytik weit verbreitet: sie ist weniger anfällig gegen Diffusion und Konvektion, die zur Bandenverbreiterung und damit zur Verminderung der Trennschärfe führen, und nach beendeter Trennung können mit dem Gel und den darin enthaltenen Proben weitere Arbeitsschritte durchgeführt werden, z.B. Färbungen, Enzym-Aktivitätstests oder die Extraktion der isolierten Komponenten aus dem Gel, etwa für eine anschließende massenspektrometrische Analyse.

Im Versuch sollen Sie *die* zwei Standardmethoden aus der Laborpraxis durchführen: die Trennung von DNA-Fragmenten im Agarose-Gel, und die Trennung von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel.

## 2.2 DNA-Elektrophorese im Agarose-Gel

### 2.2.1 Prinzip

DNA ist ein Polyanion, dessen negative Ladung zur Größe des Moleküls proportional ist. In pH-neutraler oder basischer Lösung trägt der Phosphatrest jedes Nucleotids eine negative Ladung bei. Durch das konstante Ladung-Masse-Verhältnis hängt die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Stücks nur von der Größe des Moleküls ab, d.h. vom Reibungskoeffizienten und insbesondere von den Wechselwirkungen mit dem Medium.

Das Medium ist in diesem Fall ein Gel aus dem Polysaccharid Agarose, das aus Rotalgen gewonnen wird. Die Größenverteilung der Poren hängt von der Konzentration der Agarose ab und bestimmt, wie schnell DNA-Stücke unterschiedlicher Größe durch das Gel wandern können.

In der Praxis wird die DNA-Elektrophorese als Horizontalelektrophorese durchgeführt. Als Puffer sowohl für die Bereitung des Gels als auch für die Elektrodenkammern wird häufig sog. TBE-Puffer verwendet (12 g/l Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (= "Tris"), 6 g/l Borsäure, 10 mM Ethylendiamintetraacetat (=EDTA)) verwendet. Die Proben werden am Rand des Gels in beim Gießen des Gels vorgeformte Taschen aufgetragen. In der Elektrophoresekammer befindet sich diese Kante des Gels auf der Kathodenseite. Wenn das elektrische Feld angelegt wird, wandern die DNA-Fragmente durch das Gel zur Anode, und zwar kleine Fragmente schneller als große Fragmente. Den Proben wird beim Auftrag auf das Gel ein Farbstoff (meist Bromphenolblau) beigemischt, der ebenfalls negativ geladen ist und durch seine niedrige Molekülmasse schneller wandert als die kleinsten DNA-Stücke. Wenn dieser Farbstoff das andere Ende des Gels erreicht hat, ist die elektrophoretische Trennung abgeschlossen. Das Gel kann jetzt mit DNA-spezifischen Farbstoffen (z.B. Ethidiumbromid) gefärbt werden, dadurch werden die Banden der DNA-Fragmente unterschiedlicher Größen sichtbar. Alternativ kann auch schon bei der Elektrophorese ein Farbstoff (z.B. Nilblau) zugesetzt werden, der die DNA noch während des Laufes sichtbar macht. Bei Verwendung von Nilblau können noch 40 ng DNA pro Bande sichtbar gemacht werden, mit Ethidiumbromid 4 ng, und mit speziellen Cyanin-Farbstoffen, z.B. SYBR Green® genügen sogar schon 100 pg.

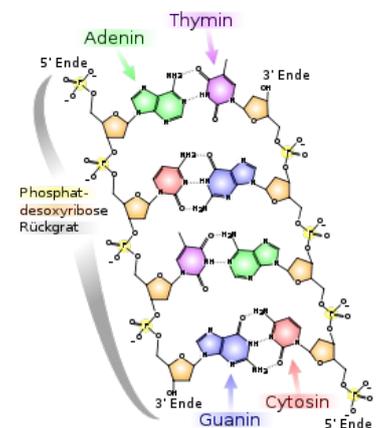


Abbildung 1: Struktur der DNA

Anstelle der nachträglichen Färbung des Gels kann schon der flüssigen Agarose Ethidiumbromid zugesetzt werden, das vermeidet die nachträglichen Färbeschritte. Man muss dann allerdings den Elektrophorese-Lauf schon beenden, wenn die Bromphenolblau-Bande die Gelmitte erreicht hat: Ethidiumbromid ist positiv geladen und läuft daher den DNA-Fragmenten entgegen, sodass die untere Hälfte des Gels dann ungefärbt ist.

Durch Vergleich der Probenbanden mit den Banden bekannter Größe aus einem definierten DNA-Marker können dann die Größen der DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

### 2.2.2 Der Phage Lambda

Als Probe dient im Praktikum die DNA des Bakteriophagen Lambda ( $\lambda$ ). Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien befallen. Sie bestehen wie alle Viren aus einem Molekül Nucleinsäure mit definierter Sequenz, die in eine Hül-

le aus Proteinen und z.T. Lipiden verpackt sind. Beim Phagen Lambda besteht diese Nukleinsäure aus einem einzigen Stück doppelsträngiger DNA mit 48502 Basenpaaren („48,5 kb“). Dadurch ist sie gut geeignet für den Versuch.

### 2.2.3 Restriktionsendonucleasen

Im Versuch sollen aus der  $\lambda$ -DNA zunächst kleinere Fragmente mit definierter Größe hergestellt werden. Das geschieht durch die Anwendung von Restriktionsendonucleasen. **Endonucleasen** sind Enzyme, die DNA in der Mitte eines Stranges zerschneiden können, im Gegensatz zu Exonucleasen, die einen DNA-Strang vom Ende her verkürzen. Diese Schnitte im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA entstehen jedoch nicht beliebig, sondern nur an Stellen mit genau definierter DNA-Sequenz (**Restriktionsendonucleasen**), die für jedes Enzym spezifisch ist. Diese Sequenzen sind oft sechs Basenpaare lang, es gibt aber zahlreiche Ausnahmen. Durch die Sequenzspezifität sind Restriktionsendonucleasen (kurz: „Restriktionsenzyme“) zu sehr wichtigen Werkzeugen der Molekularbiologie geworden. Die Anwendung von Restriktionsenzymen auf eine DNA-Probe wird kurz als „Restriktionsverdau“ bezeichnet.

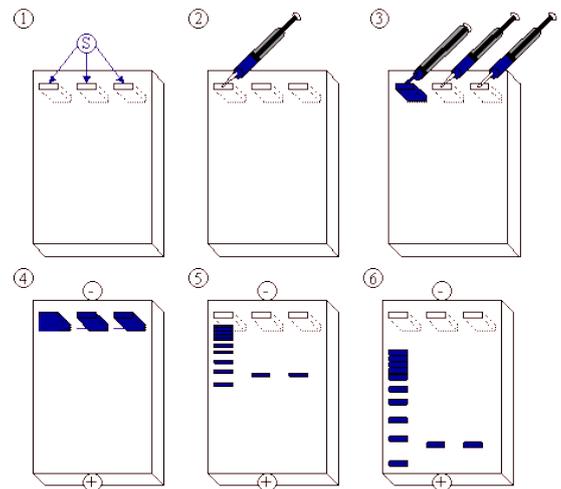


Abbildung 2: Schema der Agarose-Gelelektrophorese, in der linken Spur befindet sich ein Markergemisch mit bekannten Fragmentgrößen

Im Versuch werden die beiden Enzyme *EcoRI* und *HindIII* verwendet. Die Namen leiten sich von den Bakterienarten ab, aus denen sie isoliert wurden: *Escherichia coli* und *Haemophilus influenzae*.

*EcoRI* schneidet innerhalb der Erkennungssequenz 5'-G<sup>^</sup>AATTC-3' an der mit <sup>^</sup> markierten Stelle. Da diese Sequenz ein Palindrom ist, schneidet das Enzym gleichzeitig in *beiden* Strängen der doppelsträngigen DNA um vier Basenpaare versetzt. Diese Erkennungssequenz tritt im 48502 Basenpaare umfassenden Genom des Phagen Lambda insgesamt fünf Mal auf, und zwar an den Positionen 21226, 26104, 31747, 39168 und 44972.

*HindIII* schneidet in der ebenfalls palindromen Erkennungssequenz 5'-A<sup>^</sup>AGCTT-3'. Diese kommt in der Lambda-DNA sieben Mal vor, und zwar an den Positionen 23130, 25157, 27479, 36895, 37459, 37584 und 44141.

Beide Enzyme können einzeln oder gemeinsam auf eine DNA-Probe angewendet werden. Die entstandenen Fragmente werden dann im Agarosegel nach der Größe aufgetrennt.

## 2.3 SDS-PAGE mit Proteinen

### 2.3.1 Prinzip

Die Abkürzung SDS-PAGE steht für **S**odium **D**odecylsulfate **P**olyacrylamide **G**el **E**lectrophoresis, d.h. für die Elektrophorese in einem Gel aus Polyacrylamid in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat.

Das Gel aus Polyacrylamid hat hier die gleiche Funktion wie die Agarose bei der DNA-Elektrophorese: es bildet eine poröse Matrix, die verschieden große Proteine unterschiedlich stark bremst. Das Gel wird durch radikalische Polymerisation von Acrylamid erhalten. Eine Beimischung von N,N-Methylenbisacrylamid sorgt für die Quervernetzung der ansonsten linearen Polyacrylamidketten. Die Konzentration und das Mischungsverhältnis der beiden Komponenten bestimmt die Größe der Poren im fertigen Gel.

Während DNA-Moleküle grundsätzlich negativ geladen sind, und zwar proportional zu ihrer Größe, ist das bei Proteinen nicht der Fall. Die Nettoladung eines Proteins bei einem gegebenen pH-Wert hängt von seiner Aminosäurezusammensetzung ab. Dadurch ist eine einfache Größenbestimmung wie im Fall der DNA eigentlich unmöglich, da gleich große Proteine unterschiedlich schnell wandern können, z.T. sogar in entgegengesetzte Richtungen. Tatsächlich gibt es elektrophoretische Verfahren, die native Proteine nach ihrer Ladung trennen, aber sie sind nicht für die Größenbestimmung geeignet.

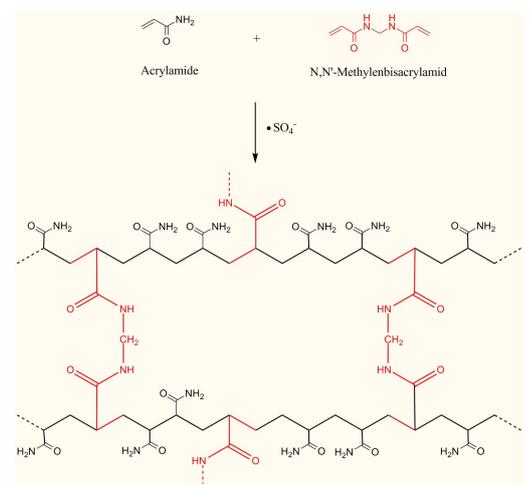


Abbildung 3: Polymerisation von Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid

Um letztere zu ermöglichen, wendet man einen Trick an: die Proteine werden in Gegenwart eines des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat durch Erwärmen denaturiert. Die Polypeptidkette entfaltet sich, und SDS bindet nun unspezifisch an die entfaltete Kette. Dabei ist das Mengenverhältnis von SDS-Molekülen zu Protein überraschenderweise für fast alle Proteine das gleiche: es binden durchschnittlich 0,5 Moleküle SDS pro Aminosäure, das entspricht ca. 1,4 g SDS pro 1 g Protein. Da jedes einzelne SDS-Molekül eine negative Ladung trägt, wird die eigene Ladung des Proteins weitgehend maskiert. Das Protein hat nun ähnlich wie die DNA eine hauptsächlich von der Kettenlänge, d.h. von der Molekülgröße abhängende negative Gesamtladung und wandert in der Elektrophorese zur Kathode.

Oft werden noch Disulfid-Brücken, die mehrere Proteinmoleküle miteinander vernetzen und so größere Proteine „vortäuschen“ können, durch Zugabe von Mercaptoethanol oder Dithioerythritol (DTE) reduziert.

SDS-PAGE wird in einem Vertikalgel zwischen zwei Glasplatten durchgeführt. Oft besteht das Gel aus zwei getrennten Zonen: oben aus einem „Sammelgel“ mit niedriger Acrylamidkonzentration, darunter aus einem „Trenngel“ mit höherer Acrylamidkonzentration. Im Sammelgel wird das Proteingemisch in beim Gießen entstandene Probenaschen aufgetragen und während der Elektrophorese durch einen speziellen Effekt (s.u.) auf einen wenige Mikrometer breiten Streifen konzentriert. Es erfolgt hier noch keine Größenseparation, weil die Poren des Sammelgels sehr weit sind. Die sehr schmale Zone mit den konzentrierten Proben wandert dann in das Trenngel, wo sie eine gute Trennung auch von Proteinen ermöglicht, die sich in ihrer Größe nur wenig unterscheiden. Auch hier wird der Probe wieder ein Farbstoff (Bromphenolblau) beige-mischt, der aufgrund seiner geringen Größe am schnellsten läuft. Wenn die blaue Zone das untere Gel-Ende erreicht, ist die Elektrophorese abgeschlossen. Die Glasplatten werden entfernt und die Proteinbanden im Gel durch Behandlung mit einem Proteinfarbstoff, meist Coomassieblau G250, sichtbar gemacht. Durch Vergleich mit den Banden bekannter Größe in einem ebenfalls aufgetragenen Marker-Proteingemisch kann die Größe unbekannter Proteine abgeschätzt werden.

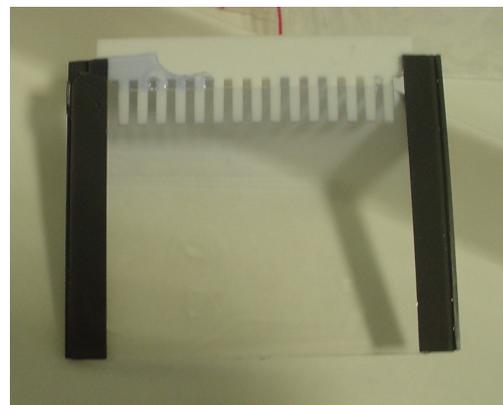


Abbildung 4: Polyacrylamidgel zwischen zwei Glasplatten mit Probenkamm. Das Sammelgel im oberen Drittel ist schwach blau eingefärbt.

### 2.3.2 Funktion des Sammelgels

Während das Trenngel die Proteine je nach Größe unterschiedlich stark ausbremsen und so separieren soll, besteht die Funktion des Sammelgels in der Konzentrierung der Probe in einen möglichst schmalen Streifen zu Beginn der Trennung. Wäre die Probenzone beim Start der Größentrennung relativ breit, so wären auch die Banden einzelner Proteine *nach* der Größentrennung breit und würden sich daher stärker überlappen. Durch die Konzentrierung des Probengemisches in einen sehr schmalen Streifen kann die Auflösung der Methode daher wesentlich erhöht werden.

Der konzentrierende Effekt des Sammelgels kommt durch die Verwendung verschiedener Ionen und pH-Werte in den einzelnen Teilen des Aufbaus (Trenngel, Sammelgel, Elektrodenkammern) auf folgende Weise zustande.

Das Pufferion in allen Teilen des Aufbaus ist Tris (Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan), eine Verbindung, die entweder elektrisch neutral oder positiv geladen ist. Das Gegenion ist im gesamten Gel Chlorid, in den Elektrodenkammern aber Glycin. Glycin ist bei pH 6,8 nur schwach negativ geladen, bei pH 8,3 und pH 8,6 sehr viel stärker. Der chloridhaltige Puffer für das Sammelgel wird auch zum Auflösen der Probe verwendet.

Wenn die Spannung angelegt wird (ca. 200 V), wandern Glycin-Anionen aus der oberen (Kathoden-) Pufferkammer in Richtung Sammelgel. Beim dortigen pH 6,8 verlieren sie ihre Ladung zum größten Teil und werden dadurch verlangsamt. Gleichzeitig wandern im Sammelgel die hochbeweglichen Chloridionen schnell in Richtung Anode. Zwischen der Chloridionen-Front und der Glycinfront entsteht so einen ionenverarmte Zone mit relativ niedriger Leitfähigkeit. Der resultierende hohe elektrische Widerstand führt dazu, dass fast die gesamte angelegte Spannung in einem nur wenige Mikrometer breiten Streifen abfällt, der sich nun von oben nach unten durch die Probenzone und das Sammelgel bewegt. In diesem starken elektrischen Feld werden die Proteine in der Probe, deren Beweglichkeit zwischen der von Chloridionen

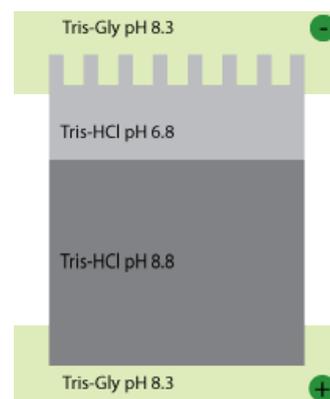


Abbildung 5: Diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel. Von oben nach unten: Kathodenpuffer, Sammelgel, Trenngel, Anodenpuffer. (Quelle: bitesizebio.com)

und dem fast neutralisierten Glycin liegt, beschleunigt und mitgeführt. Der gesamte Probeninhalt konzentriert sich letztendlich in diesem wenige Mikrometer breiten Streifen zwischen Glycin- und Chloridfront, der Richtung Trenngel wandert. Dort bei pH 8,6 angekommen, wird das Glycin wieder stärker negativ geladen; es überholt die Proteine wegen seiner geringen Größe und wandert nun zusammen mit dem Chlorid in Richtung Anode. Die Proteine treffen gleichzeitig auf das engmaschige Trenngel, werden von diesem nun größenabhängig unterschiedlich stark zurückgehalten und damit voneinander separiert.

### 2.3.1 Die Proben: Milch, Ei, Blut

Für die SDS-PAGE sollen im Versuch unterschiedliche biologische Proben verwendet werden: Kuhmilch (*Bos taurus*), Hühnereiweiß (*Gallus gallus*) und Schweineblut (*Sus scrofa*). Diese Proben bestehen aus den folgenden Hauptbestandteilen, die auf dem Gel zu erkennen sein sollten:

- Kuhmilch besteht zu ca. 3% aus Proteinen
  - Davon sind 80% die **Caseine**, das sind die Proteine, die beim Ansäuern der Milch "dick" werden. Von diesen gibt es vier Typen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und Massenanteil:  $\alpha_{s1}$  (23 kD, 40%),  $\alpha_{s2}$  (25 kD, 10%),  $\beta$  (24 kD, 37%), und  $\kappa$  (19 kD, 13%)
  - Der Rest sind die sog. Molkeproteine, hauptsächlich zusammengesetzt aus  $\alpha$ -Lactalbumin (18 kD, 19%),  $\beta$ -Lactoglobulin (14 kD, 51%), Serumalbumin (60 kD, 6%) und Immunglobulinen (54 kD + 106 kD, 11%)
- Hühnereiweiß besteht zu ca. 10% aus Proteinen, hauptsächlich aus Ovalbumin (45 kD, 65%), Conalbumin/Ovotransferrin (77 kD, 14%), Ovomucoïd (22 kD, 10%) und Globulinen (9%)
- Blut enthält ebenfalls viele Proteine
  - *Blutzellen*: das mit Abstand häufigste Protein in den Blutzellen ist das Hämoglobin der Erythrozyten (ca. 160 g pro Liter Blut), das aus zwei verschiedenen Typen von Untereinheiten besteht (Hb $\alpha$  15 kD und Hb $\beta$  16,2 kD)
  - *Plasma*: im nichtzellulären Teil des Blutes sind ebenfalls ca. 70 g/l Proteine enthalten. Den größten Anteil macht Serumalbumin (67 kD, 60%) aus. Die restlichen 40% sind die sog. Globuline, eine heterogene Gruppe von Proteinen mit unterschiedlichen Größen und Funktionen (z.B. Eisentransport, Immunabwehr). Wenn bei der Plasmapräparation Erythrozyten kaputt gehen („hämolisieren“), findet man auch im Plasma Hämoglobin (erkennbar an der roten Färbung).

## 3 Quellen und Literatur

F. Lottspeich, J. W. Engels. Bioanalytik 2. Aufl.. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006. ISBN-13: 978-3-8274-1520-2

A. T. Andrews. Electrophoresis 2nd ed.. Clarendon Press, Oxford 1985. ISBN-10: 0-19-854632-7

Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* **227**, 680-685. [PMID 5432063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5432063/) [doi:10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0)

[http://classes.ansci.illinois.edu/ansc438/Milkcompsynth/milkcomp\\_protein.html](http://classes.ansci.illinois.edu/ansc438/Milkcompsynth/milkcomp_protein.html)

Dairy Chemistry and Physics: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html>

R. H. Forsythe, J. F. Forster (1950) Egg white proteins. Electrophoretic study on whole egg white. *J Biol Chem* **184**, 377-384. <http://www.jbc.org/content/184/1/377.full.pdf>

Wikipedia: <http://de.wikipedia.org/>

BitesizeBio: <http://bitesizebio.com/2008/09/18/how-sds-page-works/>

## 4 Vorbereitung auf den Versuch

1. Berechnen Sie aus den gegebenen Schnittstellen für die beiden Restriktionsenzyme *EcoRI* und *HindIII* in der Lambda-DNA, wie groß die entstehenden DNA-Fragmente sind, und zwar bei einem Verdau
  - a) nur mit *EcoRI*

- b) nur mit *HindIII*
  - c) bei gleichzeitiger Anwendung beider Enzyme!
2. Wieviele *EcoRI*-Schnittstellen erwarten Sie durchschnittlich in einer zufälligen DNA-Sequenz von 48502 Basenpaaren Länge?
  3. Wo finden Sie SDS im Haushalt?
  4. Wie sieht die Struktur von Mercaptoethanol und Dithioerythritol aus? Warum können diese Substanzen Disulfidbrücken in Proteinen aufbrechen?
  5. Welche Protonierungsgleichgewichte kann Glycin eingehen?
  6. Welche Funktion hat das Serumalbumin im Blut?
  7. Woran können Sie erkennen, dass der Probenpuffer für die SDS-PAGE SDS, Mercaptoethanol und Bromphenolblau enthält?

## 5 Versuchsdurchführung

Da einige Schritte im Versuch (Restriktionsverdau, Elektrophoreseläufe, Gelfärbungen) eine längere Zeit in Anspruch nehmen, führen Sie die DNA- und die Proteinelektrophorese parallel durch. Der Ablauf ist wie folgt:

1. Ansetzen des Restriktionsverdaus der Lambda-DNA. Der Verdau dauert ca. 1 Stunde.
2. Vorbereitung der Proben für die Proteintrennung mittels SDS-PAGE, Auftragen auf das bereits vorbereitete Gel, Start der Elektrophorese. Diese dauert ca. 1,5 Stunden.
3. Gießen des Agarosegels, Auftragen der fertig verdauten DNA-Proben auf das Agarosegel, Start der Elektrophorese. Diese dauert ebenfalls ca. 1,5 Stunden.
4. Beenden der SDS-PAGE, Färben des Gels (30 min)
5. Beenden der Agarose-Gelelektrophorese, evtl. Färben des Gels
6. Fotografieren bzw. Scannen beider Gele.

Richten Sie sich bei der Durchführung der einzelnen Schritte nach den detaillierten Arbeitsanleitungen im Anhang bzw. den Anweisungen des Versuchsbetreuers.

## 6 Auswertung

Das Protokoll ist keine theoretische Abhandlung über die Elektrophorese. Folgendes sollte enthalten sein:

- Antworten auf die Fragen unter Punkt 4
- eine kurze Beschreibung der durchgeführten Schritte mit besonderem Augenmerk auf Abweichungen von dieser Vorschrift und mit den konkreten Angaben für Schritte, die in der Anleitung nur ungefähr genannt sind (Verdau-Zeiten, Elektrophoresedauer etc.)
- die Versuchsergebnisse, d.h. die Gelbilder
- die folgenden Einzelheiten:

### 6.1 Agarose-Gelelektrophorese

- Vergleichen Sie die Größe aller unbekanntes DNA-Fragmente mit den jeweiligen Markerbanden. Stimmen Sie überein?
- Stimmen die von Ihnen theoretisch vorhergesagten Banden mit den beobachteten überein?
- Woran kann es liegen, dass Sie im Gel weniger Banden sehen als erwartet? Woran kann es liegen, wenn Sie Banden an anderen Positionen finden als erwartet?
- Schätzen Sie ab, für welchen Größenbereich der Fragmente die durchgeführte DNA-Elektrophorese brauchbar ist. Was können Sie verändern, um noch kleinere oder noch größere Fragmente zu trennen?

## 6.2 SDS-PAGE

- Schätzen Sie die Größe der Proteine in den einzelnen Proben durch Vergleich mit den Markerbanden ab!
- Versuchen Sie, die Banden den bekannten Bestandteilen der Proben zuzuordnen!
- Für welchen Proteingrößenbereich ist die durchgeführte SDS-PAGE sinnvoll?
- Was können Sie tun, um diesen Bereich zu verändern?
- Welche Fehlerquellen könnte es bei der Größenbestimmung anhand einer Gelbande geben?

**Einen detaillierten Anhang für die Versuchsdurchführung mit konkreten Volumina, Inkubationszeiten, Marker-Referenzen, Pufferzusammensetzungen, Pipettiervorschrift etc. erhalten Sie am Versuchstag vom Betreuer.**