

Agarose Gel Elektrophorese zur Analyse der *Wolbachia* PCR

Wie sind die Erwartungen für das fertige Gel unter der Bedingung, dass alles optimal funktioniert hat und Ihr Insekt A positiv und Ihr Insekt B negativ für eine *Wolbachia* Infektion ist.

Durchführung:

1. Herstellung des Agarose Gels

Material: Gelkammern, 5x TBE (Tris-Borate-EDTA) Puffer, Agarose Pulver, 100ml Messzylinder, 250ml Messzylinder, 250ml Erlenmeyerkolben, 500ml Erlenmeyerkolben, RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Inc.), H₂O

- Bereiten Sie die Agarose Gel Kammer mit dem Kamm mit den schmalen Zähnen korrekt vor. Zwei Gruppen machen zusammen ein Gel (2 Marker und 12 Proben auf ein Gel)
- TBE Puffer: eine Person stellt für die ganze Halbkasse 500ml 1xTBE Puffer her: 8.51g 5xTBE Pulver in 500ml H₂O
- Stellen Sie ein 2% Gel her, indem Sie 2g Agarose in einem 250ml Erlenmeyerkolben mit 100ml TBE Puffer mischen.
- Erhitzen Sie sorgfältig in der Mikrowelle, wobei Sie immer wieder nach einem kurzen Intervall das Erhitzen unterbrechen und den Erlenmeyer schütteln.
- Wenn die Agarose geschmolzen ist, geben Sie 5µl RedSafe™ (20'000x) zu (macht DNA unter UV Licht sichtbar und ist nicht cancerogen)
- Giessen Sie das Gel vorsichtig, so dass sich keine Luftblasen bilden.
- Lassen Sie das Gel abkühlen und sich verfestigen. Das Gel kann nun entweder unmittelbar verwendet werden oder mit Frischhaltefolie umwickelt im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

2. Laden des Gels

- Geben Sie TBE Puffer zum Gel, bis das Gel vollständig bedeckt ist. Entfernen Sie etwaige Luftblasen aus den Slots.
- Pipettieren Sie 6 mal 2µl 6xLoading Buffer auf ein Stück Parafilm (Wir müssen weniger Eppendorf Tubes verbrauchen) und geben Sie jeweils 10µl Ihrer PCR Produkte zu den Loading Buffer Tropfen. Mischen Sie durch sorgfältiges auf und ab Pipettieren.
- Pipettieren Sie in das erste Slot 2µl Marker (1 kb DNA Ladder, BioLabs)
- Pipettieren Sie die jeweils 12µl der 6 Proben in die jeweiligen Slots
- Notieren Sie genau, was Sie wo auf dem Gel geladen haben.
- Eine zweite Gruppe muss auf das gleiche Gel laden.
- Decken Sie das Gel mit dem Deckel zu, verbinden Sie die Gelkammer mit dem Power Supply und lassen Sie das Gel bei 120V laufen. **Achtung:** Sind die Pole richtig orientiert, so dass das Gel in die korrekte Richtung läuft?
- Sobald der blaue Farbstoff das Ende des Gels erreicht hat, können Sie das Gel durch Ausschalten des Power Supply anhalten.
- Betrachten Sie das Gel unter UV Licht (**Achtung:** UV Licht schädigt Ihre Augen! Nie direkt ins UV Licht sehen, nur durch UV-Schutz-Abdeckung) Machen Sie ein möglichst gutes Foto auf dem alle Banden sichtbar sind mit der Digitalkamera. Falls dies nicht möglich ist, zeichnen Sie das Gel mit allen Banden ab. Achten Sie darauf dies möglichst genau durchzuführen, um interpretierbare Daten zu erhalten.
- Interpretieren Sie Ihr Resultat schriftlich. Vergleichen Sie mit der aufgestellten Hypothese.