

SafeRed®/DuGreen® 核酸染料 (10000× 水溶液)

SafeRed®/DuGreen®核酸染料特点:

1. 带形清晰整齐: 第三代SafeRed®和DuGreen®完全克服了原装国外相同染料分不开大片段 DNA 的缺点, 所有电泳条带清晰整齐美观。
2. 安全无毒: 独特油性大分子使其不能穿透细胞膜进入细胞, Ames-test实验表明, 该染料的没有EB类似的诱变性。
3. 迁移率好: EB小分子很快跑出胶外, 所以EB容易导致小DNA片段看不清, 我们的大分子SafeRed完全克服这一点。
4. 定量准确: 适用于核酸分子大小的确定和定量, EB对小DNA片段定量不准确。
5. 染色均匀: 电泳时染色均匀, 靠近负极凝胶和靠近正极端的亮度一样。EB会导致胶的整体背景稍微高些, 经常出现阴阳背景(胶的背景一部分亮一部分暗); EB长时间、长距离的电泳, EB信号强度会相应下降。我们的大分子SafeRed完全克服这一点。
6. 灵敏度高: 适用于各种大小片段的电泳染色, 对核酸迁移的影响小于SYBR Green I。
7. 稳定性高: 耐热, 可加在缓冲液里, 100℃溶解凝胶, 防止染色剂没充分混匀。适用于使用微波或其它加热方法制备琼脂糖凝胶; 室温下在酸或碱缓冲液中极其稳定。
8. 耐光性强: 实验室的日常光线照射环境下可以常温放置 24个月。
9. 信噪比好: 样品荧光信号强, 背景信号低, 荧光亮度是EB的十倍以上, 肉眼可观测到亮度明显比EB强, EB会导致胶的整体背景稍微高些, 经常出现阴阳背景。
10. 操作简单: 与EB用法完全一样, 在预制胶和电泳过程中染料不降解; 而电泳后染色过程也只需 30 分钟且无需脱色或冲洗, 即可直接用紫外凝胶透射仪观察。
11. 适用范围广: 可选择电泳前染色(胶染法)或电泳后染色(泡染法); 适用于琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳; 可用于 dsDNA、ssDNA 或 RNA 染色。
12. 完美兼容: 与EB有相同的光谱特性, 无需改变滤光片及观察装置: 标准的 EB 滤光片或 SYBR 滤光片都适用, 使用与观察EB相同的普通紫外凝胶透射仪观察即可, 在 300nm 紫外光附近可得到最佳激发。

产品包装: SafeRed® 10000x Nucleic Acid Dye 500uL/支; SafeGreen® 10000x Nucleic Acid Dye 500uL/支

储存条件: 室温避光可保存24个月。

操作步骤:

一. 胶染法(推荐方法, 用法类似EB)

制胶时加入SafeRed 核酸染料(染料灵敏, 每100mL 琼脂糖溶液中加入 10μL SafeRed 原装液即可)。按常规方法电泳。

1. 实验室材料和试剂:

- (1) 实验样品: 质粒DNA, DNA marker (国产的DNA marker浓度太高, 至少稀释2~3倍后使用)
- (2) TBE缓冲液配置: 10X TBE电泳缓冲液[Tris 107.8146g (890mM), 硼酸55.0287g(890mM), EDTA 5.845g(20mM),加NaOH约4g调节pH=8.3; 定容1000mL]; 用ddH₂O稀释10倍配制1X TBE电泳缓冲液。
- (3) TAE缓冲液配置: 50X TAE电泳缓冲液[Tris 242g (2M),EDTA 37.2g(100mM),加醋酸约57ml调节pH=8.5; 定容1000mL]; 用ddH₂O稀释50倍配制1X TAE电泳缓冲液。
- (4) 溴酚蓝指示剂, 1%的西班牙琼脂糖凝胶
- (5) 仪器: 电泳仪 (130v), 移液器(0.5~10ul), 凝胶成像仪

2. 实验步骤:

- (1) 制胶: 将0.5g琼脂糖溶于50mL 1X TBE电泳缓冲液中, 加热至琼脂糖完全融化。将融好的琼脂糖溶液室温放置 50℃左右加入5ul的SafeRed凝胶电泳染料, 摇匀。
- (2) 倒胶: 将制好的琼脂糖凝胶缓慢倒于制胶托盘内, 避免产生气泡。将点样梳子垂直置于电泳胶膜的一端, 距离托盘底部约1mm。放置时尽量保持平稳, 切勿晃动。
- (3) 置胶: 待约30分钟左右胶体充分凝固后, 缓慢垂直向上拔起点样梳子, 切勿用力过猛。(夏季适当延长凝胶时间)
- (4) 将琼脂糖凝胶放入电泳槽内, 加入电泳缓冲液, 使电泳缓冲液液面高于凝胶面约 1~2mm。
- (5) 将混合溴酚蓝指示剂的 DNA样本 (1ul溴酚蓝与2ul DNA标本混合) 加入到点样孔内。
- (6) 盖上电泳槽盖, 开启电源, 使DNA从负极移向正极恒压电泳(电压恒定在120~130v之间, 一般可选择130V)。
- (7) 当DNA条带距离点样孔约 1~2cm后关闭电源, (约30~40分钟)取出凝胶。
- (8) 用 302nm 激发的 UV 凝胶成像系统观察结果。

*注: 此方法染色染料用量相对较少。染料加入胶中可直接使用微波炉加热, 制好的胶溶液可以在室温下保存直至用完。

优化电泳条件参考事项：

因为EB是插入DNA内部变成一个整体分子，所以不容易出现迁移/弥散的问题，而大分子的SafeRed与DNA是通过静电吸引非共价结合的，在DNA外面就容易出现条带迁移，特别是大片段DNA！

- 1) 鉴于SafeRed的高灵敏性，建议减少DNA的上样量。样品最佳上样量为~100ng/泳道(8泳道小胶孔)。
- 2) 部分国产的DNA marker浓度太高，至少稀释一倍后使用！染料过于灵敏，特别是大片段marker！目前国产的marker是基于EB染料开发的酶切的混合片段，EB显示不出来酶切的混合片段的杂带，SafeRed的高灵敏性会显示出来。少数情况下质粒经某些酶切后的DNA样品会出现拖尾和分辨率降低，请使用后染法。
- 3) 更换电泳缓冲液，新配置的电泳液效果好！建议用1×TBE缓冲液代替TAE，因为含硼酸盐的试剂导电性能更好。
- 4) 电泳时电压不宜过高，一般不要超过130V。与EB相比，SafeRed电泳电压要低一些，跑胶的时间长一些。
- 5) 染料无需低温冷藏，室温下避光储存即可，以避免沉淀；若有沉淀，将染料加热至40~50℃并充分振荡溶解，不影响使用。
- 6) 个别客户用染料和样品混合后，点样到琼脂糖凝胶中，不推荐这种点样法。
- 7) 由于GelRed具有良好的热稳定性，可以在热的琼脂糖溶液中直接添加，然后充分振荡以保证染料充分混匀。也可以选择将GelRed储液加到琼脂糖粉末和电泳缓冲液中，然后用微波炉加热以制备琼脂糖凝胶。
- 8) 如果总是看到条带弥散或分离不理想，建议使用电泳后染胶。

***此方法不适合预制聚丙烯酰胺凝胶，对于聚丙烯酰胺凝胶请使用泡染法。**

二. 泡染法

- (1) 按照常规方法进行电泳。**用于胶回收等高浓度DNA样品强烈推荐泡染法！**
- (2) 用H₂O将SafeRed® 10,000× 储液稀释约3,300倍到0.1M NaCl溶液中，制成3× 染色液。（例如将15μL SafeRed® 10,000× 储液加入到50mL 0.1M NaCl溶液中）。
- (3) 将凝胶小心地放入合适的容器中，如聚丙烯容器中。缓慢加入足量的3× 染色液浸没凝胶。室温振荡染色30min左右，最佳染色时间根据凝胶厚度以及琼脂糖浓度不同而略有不同。对于含3.5~10%丙烯酰胺的凝胶，染色时间通常介于30min到1h，并随丙烯酰胺含量增加而延长。
- (4) 用302nm 激发的UV凝胶成像系统观察结果。

***注意事项：用泡染法染色时，染料用量较多。单次使用的染色液可重复使用3次左右；3× SafeRed®染色液可以大量制备，在室温下避光保存直至用完。**

三. 核酸电泳的PAGE步骤：

- 1) 将TBE制备的凝胶放入电泳槽中，用夹子夹住边缘。
- 2) 用配置凝胶溶液同一批次的5×TBE灌满缓冲液槽。用注射器排除凝胶底部的气泡。
- 3) 用注射器吸取1×TBE冲洗加样孔。将DNA样品和适量的6×凝胶上样缓冲液混合，用微量移液管加入加样孔。
- 4) 将电极与电源相连（正极接下槽），打开电源一般90V；1~8V/cm。进行电泳9h。
- 5) 电泳至标准参照染料迁移至所需位置（一般是电泳到二甲苯完全迁出，溴酚蓝距底边2~3cm停止）。关闭电源，拔掉插头，弃去电泳槽中的电泳液。
- 6) 将凝胶取下来放入，染色皿中，加3X SafeRed的1X缓冲液中的振荡染色30-60分，放置在紫外检测即可。

***注意事项：与琼脂糖凝胶不同，不能用预染或点染的方法；只能用泡染的方法显色，由于聚丙烯酰胺比较致密，染料不容易深入，显色效果没有琼脂糖凝胶好。**

特别提醒：如果用的是紫外成像仪，请选择SafeRed；如果使用激光成像仪或在可见光下观测，请选择DuGreen。