

## Gelred 核酸染料 10000X

产品包装： gelred 核酸染料 500uL/支； 储存条件： 4°C或者室温避光可保存 24 个月。

### 操作步骤：

#### 一 . 胶染法（推荐方法，用法类似 EB）

制胶时加入核酸染料(染料灵敏, 每 100mL 琼脂糖溶液中加入10 $\mu$ L Gelred 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 (尽管国产的 DNA marker 浓度较高, 可正常使用, 一般 5 $\mu$ L。)

(2) 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 ddH<sub>2</sub>O 稀释 50 倍配制 1X TAE 电泳缓冲液。

(3) 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 ddH<sub>2</sub>O 稀释 10 倍配制 1X TBE 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 TAE 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°C左右 加入 5ul 的 Gelred 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 5ul 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。

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, 尽管我们大分子的 GelRed 与 DNA 是通过静电吸引非共价结合的, 我们也完全克服了国外同类产品对大分子量 DNA 条弥散的问题!

1.尽管多数国产的 DNA marker 浓度较高, 经测试我们的 Gelred 仍然适用, 不需要像国外

同类产品稀释 Marker 一倍后使用!

2. 更换电泳缓冲液, 新配置的电泳液效果好! TBE 缓冲液比 TAE 效果好, 因为含硼酸盐的试剂导电性能更好。

3. 电泳时电压不宜过高, 一般不要超过 130V。

对 DNA 的迁移率和条带分离效果 Gelred 与 EB 相比, 完全一样! 但是 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), 这个方法可以区分染料是否是 EB 配置的。

Gelred 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。

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, 而不需要等待溶液冷却。摇晃, 振荡或者翻转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, 然后用微波炉或其他常用方式加热以制备琼脂糖凝胶。Gelred 兼容所有常用的电泳缓冲液。

如果总是看到条带弥散或分离不理想, 为了避免染料可能对 DNA 迁移的干扰, 建议使用电泳后染胶。使用泡染法染色以确认问题是否与染料有关。如果染色后问题依旧存在, 则说明问题与染料无关!

**\*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 H<sub>2</sub>O 将 Gelred® 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 Gelred® 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× Gelred 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 Gelred 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。