



# GelGreen 核酸染料 (10000×水溶液)

## 产品信息:

组成	EL110-01	EL110-02
GelGreen 核酸染料(10000×)	500μl	500μl×5

**储存条件:** 室温可保存 24 个月。

## 产品特点:

- 带形清晰整齐: 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。
- 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。
- 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GelGreen完全克服这一点。
- 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。
- 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GelGreen完全克服这一点。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。

## 操作步骤:

### 一. 胶染法(推荐方法, 用法类似EB)

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

#### 1. 实验室材料和试剂:

- 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)
- 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。
- 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。
- 溴酚蓝指示剂, 1%的博迈德琼脂糖凝胶
- 仪器: 电泳仪 (130v), 移液器(0.5~10ul), 凝胶成像仪

#### 2. 实验步骤:

- 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 GelGreen 凝胶电泳染料, 摇匀。
- 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。
- 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GelGreen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 GelGreen 的高灵敏性，建议减少 DNA 的上样量，推荐已知浓度样品的上样量为 50~200ng/泳道(8 泳道小胶孔)。对于未知浓度的样品，尝试 1/3 或 1/5 的常用上样量。国产的 DNA marker 浓度太高，至少稀释一倍后使用！
2. 更换电泳缓冲液，新配置的电泳液效果好！推荐用 1×TBE 缓冲液代替 TAE，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。
4. 染料无需低温冷藏，室温下储存即可，以避免沉淀，若发现沉淀，请将染料加热至 45~50℃，2min，搅拌溶解，不影响使用效果。

要得到漂亮胶图与多种因素有关，需要在EB的基础上优化电泳条件，请尝试：marker浓度和样品浓度稀释一倍；降低琼脂糖浓度；选用更长的凝胶；降低电压延长凝胶时间以保证边缘清晰；改进上样技巧或选择泡染法染色。GelGreen染料由于染料分子偏大，会对marker的大片段迁移有一定影响，偶尔会造成拖带，微笑条带等情况。减少DNA上样量。污染和微笑条带往往是过量的DNA样本造成的。推荐的泳道和已知浓度的样品的上样量为50-200ng/泳道。对于未知浓度的样品，尝试1/2或1/3的常用上样量；配制百分比浓度小的琼脂糖凝胶。高分子量的DNA在低百分比的琼脂糖凝胶分离效果比较好。

染料过于灵敏，建议marker浓度稀释一倍，特别是含大片段多的marker！目前国产的marker是基于EB染料开发的酶切的混合片段，浓度对于GelGreen是偏高的；另外，EB显示不出来酶切的混合片段的杂带，GelGreen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。

染料过于灵敏，建议未知浓度的样品的稀释一倍后上样，特别是含大片段多的样品。

与EB相比，GelGreen电泳电压要低一些，跑胶的时间长一些。

GelGreen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GelGreen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GelGreen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。GelGreen兼容所有常用的电泳缓冲溶液。

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。
- (2) 用H<sub>2</sub>O将GelGreen 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 GelGreen 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× GelGreen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3× GelGreen的1×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（BM）Gelred；如果使用激光成像仪或在可见光下观测，请选择 GelGreen。

BM190724