

特点:

1. Tiosbio® GelRed®是新型无毒核酸染料, GelRed®独特的油性和大分子量特点使其不能穿透细胞膜进入细胞内, 艾姆斯氏实验表明其诱变性远远小于EB。

2. 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。

3. 稳定性高: 适用于微波或其它加热方法制备的琼脂糖凝胶; 室温下的酸、碱缓冲液极其稳定, 耐光性强。

4. 耐光性强: 实验室的日常光线照射6个月仍可保证性能稳定。

5. 信噪比好: 样品荧光信号强, 背景信号低, 荧光亮度是EB的10倍以上, 肉眼可观测到亮度明显比EB强。

6. 操作简单: 与EB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。

7. 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。

8. 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。

包装量及储存条件:

500μL/支。

2~8℃避光保存 12 月。

操作步骤:

一. 胶染法(推荐方法): 用法类似 EB, 制胶时加入 GelRed®核酸染料。染料非常灵敏, 每 100mL 琼脂糖溶液中加入 10μL GelRed®原液即可。按常规方法电泳。

1. 制胶(以 1%的琼脂糖为例): 将 0.5g 琼脂糖加于 50mL 1×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 40~50℃左右时, 加入 5μL 的 GelRed®凝胶电泳染料, 混匀。

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。放置时尽量量保持平稳, 切勿晃动。待胶体凝固后, 缓慢垂直向上拔起点样梳子, 切勿用力过猛。

3. 泡胶: 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。将 DNA 样本(1μL 溴酚蓝与 2μL DNA 标本混合)加入点样孔内, 从负极移向正极恒压电泳(电压恒定在 100~120 V 之间, 一般是 5V/cm)。电泳至适宜位置后关闭电源(约 30~40min)取出凝胶。在 312nm 激发的 UV 凝胶成像系统中观察电泳结果。

4. 用量: 每支染料大约可以做 100~200 块 50mL 的胶。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。

5. 电泳条件优化建议:

①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/弥散的现象, 而大分子的 GelRed®是在 DNA 外面通过静电吸引, 而非共价结合的方式 DNA 进行结合。因而容易出现条带迁移, 特别是大片段 DNA 更易发生条带迁移现象!

②GelRed®灵敏性很高, 建议减少 DNA 的上样量, 8 泳道小胶孔推荐的已知浓度样品的上样量为 50~200ng/泳道。若样品浓度未知, 建议使用常用上样量的 1/3 或 1/5。

③新配置的电泳液及 TBE 电泳缓冲液的染色效果最佳。

④电泳时电压不宜过高, 一般 TBE 缓冲液不要超过 120V, TAE 缓冲液不要超过 100V。

⑤染料无需低温冷藏, 请于室温下储存, 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。

6. 漂亮的琼脂糖电泳图与多种因素有关, 使用 GelRed®作为染料的时候, 需要对以 EB 染色剂电泳体系进行优化。

①尝试将 marker 浓度和样品浓度稀释一倍, 特别是含大片段多的 marker! 目前国产的 marker 多基于 EB 染料开发的酶切的混合片段, 对于 GelRed®染料来说 marker 浓度是偏高的; 另外, 酶切的混合片段的杂带 EB 染料可能显示不出, 但高灵敏性的 GelRed®会显示出来。少数情况下, 某些酶切后的质粒 DNA 样品会出现拖尾和分辨率降低的现象, 可使用后染法改善。

②GelRed®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。

③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。

④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。

⑤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。

⑥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！

⑦聚丙烯酰胺凝胶不能使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，染料不易深入，显色效果没有琼脂糖凝胶好。

特别提醒：观测如使用紫外成像仪，请选择 GelRed[®]；使用激光成像仪或可见光下观测，请选择 GelGreen[®]。

二. 泡染法

1.按照常规方法进行电泳。

用纯水将 10000×GelRed[®]核酸染料稀释约 3300 倍，制成 3×的染色液。(例如将 15μL10000×GelRed[®]加入到 50mL ddH₂O)。

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，随丙烯酰胺含量增加染色时间顺延，3.5%~10%聚丙烯酰胺凝胶，染色时间通常介于 30min 到 1h。染色溶液可重复使用 2~3 次。

GelRed[®]染色液可以大量制备，在室温下避光保存直至用完。

三. GelRed[®]/GelGreen[®]常见问题：

Q: GelRed[®]/GelGreen[®]与核酸的结合机制是什么？

A: GelRed[®]/GelGreen[®]通过静电及电荷相互作用与核酸结合。

Q: GelRed[®]/GelGreen[®]检测下限多少？

A: GelRed[®]/GelGreen[®]是超敏感的染料，可检测含量低至 0.1ng 的 DNA。仪器灵敏度和曝光设置均影响检测极限。

Q: GelRed[®]/GelGreen[®]的使用量是多少？

A: 10000×储备液用于 1×甚至 0.5×预制凝胶使用量 1:10000~1:20000(例如: 5μL 用于 50~100mL 凝胶), 或 1:3333 比例用于电泳后染色(15μL 用于 50 mL 溶液)。

Q: GelRed[®]/GelGreen[®]需要在黑暗中使用吗？

A: GelRed[®]和 GelGreen[®]长期储存需避光，但可在室内光线下使用。

Q: 哪些仪器可用于 GelRed[®]和 GelGreen[®]的检测？

A: 标准 (302 或 312nm) 紫外透射成像仪可用于检测 GelRed[®]。254 nm 的紫外透射仪、可见光激发的凝胶成像仪 (如 Dark Reader) 或 488nm 凝胶激光扫描仪均可检测 GelGreen[®]。

Q: GelRed[®]和 GelGreen[®]适用于什么样的发射滤光片？

A: GelRed[®]适用于溴化乙锭滤片; GelGreen[®]适用于 SYBR Green 或黄色滤片。另外, GelRed[®]或 GelGreen[®]均适用于长通道黄色滤片。

Q: marker 电泳为何有时分辨率会不高？

A: GelRed[®]比 EB 分子大，在预制胶中对 DNA 的迁移有一定影响。建议采用后染法以保证 DNA 迁移的真实水平。

Q: 如何提高预制凝胶的条带分离效果？

A: ①减少 DNA 上样量。过量的 DNA 样本容易造成污染和微笑条带。推荐已知浓度样品的上样量为 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。

②减少 GelRed[®]在凝胶中的总量，GelRed[®]再稀释一倍后使用比如用 0.5×的浓度来代替 1×的浓度。

③降低琼脂糖凝胶的百分比浓度。高分子量 DNA 在低百分比的琼脂糖凝胶分离效果更好。

④更换电泳缓冲液。含磷酸盐的 TBE 缓冲液导电性比 TAE 缓冲液更好。

⑤为了避免染料可能对 DNA 迁移的干扰，建议使用电泳后染胶。

⑥电泳时电压不宜过高，一般 TBE 缓冲液电压不要超过 120V，TAE 不要超过 100 V。

Q: GelRed[®]/GelGreen[®]迁移的方向？

A: 相对 EB, GelRed[®]和 GelGreen[®]不容易通过凝胶迁移。电泳缓冲液中不需要添加额外的染料，凝胶染色更均匀。

Q: 为何有时会出现污染或微笑的 DNA 条带或错误的 DNA 迁移条带？

A: GelRed[®]和 GelGreen[®]在预制凝胶电泳中会影响 DNA 的迁移,尤其国产的某些限制性酶切 marker 或 DNA 样本,

可能会在 GelRed® 预制凝胶中发生异常迁移。

Q: GelRed® 荧光弱, 性能降低, 或后染法琼脂糖凝胶中仍有染料是什么原因?

A: 溶解的染料可能沉淀了。将 GelRed® 45~50℃ 加热 2min, 搅拌至染料溶解。另外应室温储存染料, 以免沉淀。

Q: 后染法需要去除染料的步骤吗?

A: 不需要, 但高背景的凝胶可通过适当脱色降低背景。

Q: GelRed® 和 GelGreen® 可用于单链 DNA 或 RNA 的染色吗?

A: 可以, GelRed® 对单链核酸染效果比 GelGreen® 敏感 5 倍左右。

Q: GelRed®/GelGreen® 凝胶可以预制、储存吗?

A: 完整的 GelRed®/GelGreen® 预制琼脂糖凝胶可在 4℃ 避光贮存。

Q: GelRed®/GelGreen® 的预制胶可以重复使用吗?

A: 不可以, 连续电泳会降低染色强度。

Q: 预制的 GelRed®/GelGreen® 凝胶可以重新融化再制备吗?

A: 是的, 预制胶溶化后最好再添加一些染料, 保证重新制备凝胶的信号强度。

Q: GelRed®/GelGreen® 电泳后染色可重复使用吗?

A: 可以。如果敏感度降低, 则建议更换新鲜的染料溶液。

Q: GelRed® 及 GelGreen® 与克隆、连接、测序的下游扩增子兼容吗?

A: 兼容。由于 GelRed®/GelGreen® 与 DNA 结合比 EB 更紧密, 需要去除样品 DNA 中的染料, 以确保后续操作。

Q: GelRed®/GelGreen® 安全性如何?

A: GelRed®/GelGreen® 经过埃姆斯 AMS 及相关测试, 已经被证明是可替代 EB 和 SYBR, 更安全的染料。但使用这些试剂也要遵循实验室安全条例, 以免污染 DNA 等样品。

Q: GelRed® 和 GelGreen® 用后应该如何处置?

A: GelRed® 和 GelGreen® 通过 TUV 认证测试, 及中国农科院的斑马鱼测试, 可以直接倒入下水道。但不同国家和地区的规定可能存在差异, 请联系当地的安全监管部门获取相关信息。

Q: GelRed® 可用于脉冲凝胶电泳和凝胶迁移电泳分析吗?

A: 可用于 EMSA 和 PFGE 凝胶的电泳后染色。

Q: GelRed®/GelGreen® 染色的胶可用于 Southern 或 Northern 杂交吗? 对转膜或杂交过程有干扰吗?

A: 建议使用后染法。

Q: GelRed® 可以用于检测 RNA 的甲醛变性胶吗?

A: 可以。

Q: GelRed® 可用聚丙烯酰胺、DGGE、EMSA 实验或 PFGE (脉冲场) 凝胶吗?

A: 可以, 需使用后染法。

Q: GelRed® 可用于彗星试验 (单细胞凝胶电泳测定技术, 一种单链或双链 DNA 突变和破损的遗传测定法) 吗?

A: 可以。

Q: GelRed® 可用于碱性凝胶电泳缓冲液 (30mM NaOH, 1mMEDTA) 吗? 可用于氯化铯梯度纯化 DNA 的染色吗?

A: 可以。正丁醇萃取前, 加 SDS 至终浓度 0.1%, 可去除纯化的 DNA 中的 GelRed®。

Q: GelRed® 和 GelGreen® 在 DMSO 和水中两种溶剂中的溶解性及效果是否存在差异?

A: 两种溶剂的效果相似。

名称	GelRed®	GelGreen®	Sybr Green I	EB	Goldview
灵敏度	高	高	高	低	低
稳定性	高	高	低	高	高
对 DNA 迁移影响	条带不弯曲	条带不弯曲 DNA 不迁移	染料浓度高时, 条带易发生弯曲迁移	条带不弯曲 DNA 不迁移	条带不弯曲 DNA 不迁移
安全性	安全无毒。独特的油性大分子量; 不易挥发; 不易吸入; 不能穿透细胞膜进入活体细胞, 无诱变性, 无致癌性	安全无毒。独特的油性大分子量; 不易挥发; 不易吸入; 不能穿透细胞膜进入活体细胞, 无诱变性, 无致癌性	花菁染料, 能透过细胞膜进入活体细胞内, 但容易生物降解, 不会在体内残留, 安全无毒。	分子量小, 易挥发升华, 易吸入人体, 不易生物降解, 在体内长期残留。易引起有机体突变, 强诱变剂和高致癌物。	主要成分为吖啶橙, 高毒, 致癌, 高诱变性。易挥发升华, 易吸入人体, 能穿透细胞膜进入活体细胞内, 不易生物降解, 体内长期残留。
适用性	与 EB 光谱特性一致, 无需改变滤光片及观察装置。普通紫外凝胶透射仪可用, 300nm 紫外光附近可得到最佳激发。	254nm 紫外凝胶透射仪或可见光凝胶透射仪观察。	>100bp 产物电泳染色, 254nm 激发的紫外凝胶透射仪或可见光凝胶透射仪观察。	>100bp 产物电泳染色, 背景荧光信号高; 普通紫外凝胶透射仪观察。	>100bp 产物电泳染色, 背景荧光信号高; 254nm 激发的紫外凝胶透射仪或可见光凝胶透射仪观察。