

GelGreen Plus 核酸染料

KM302 500ul

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KM301
GelGreen Plus 核酸染料	4°C	500ul

本试剂盒在 4°C 储存 12 个月不影响使用效果。

【操作步骤】

一、胶染法（前染法）（用法同 EB）

1. 按常规操作，制备琼脂糖凝胶，加入浓缩的 10000X GelGreen，使其在凝胶中的终浓度为 1X Gelred（比如，制备 100ml 凝胶，加入染料 10 μ l，可根据实际情况调整用量），轻轻摇匀，倒胶。
2. 因为非常灵敏，电泳过程中 DNA marke 上样量只需 1-5ul，可根据实际情况确定 DNAmarker 上样量。
3. 按常规方法电泳，用 302nm 激发的 UV 凝胶成像系统观察结果。

注意事项：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！

注意事项：

4. 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。
5. 更换电泳缓冲液，新配置的电泳液效果好，推荐用 1 \times TBE 缓冲液代替 TAE，因为含硼酸盐的试剂导电性能更好。
6. 电泳时电压不宜过高，一般不要超过 130V。
7. 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°C，2min，搅拌溶解，

不影响使用效果。

8. 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可以保证边缘清晰，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，偶尔会造成拖带情况。减少 DNA 上样量。污染和微量条带往往是过量的 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。
9. 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。
10. 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。
11. 与 EB 相比，GelGreen 电泳电压要低一些，跑胶的时间长一些。
12. 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。
13. 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液。
14. 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 H₂O 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。