

Ce1Red核酸染料（10000× 水溶液）

Ce1Red核酸染料特点

1. 安全无毒：独特油性大分子使其不能穿透细胞膜进入细胞内，艾姆斯氏实验表明，该染料的诱变性远远小于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。
4. 耐光性强：实验室的日常光线照射下稳定6个月。
5. 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。
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。

产品包装： Ce1Red10000x Nucleic Acid Dye 500uL/支

储存条件： 2-8℃避光干燥可保存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Ce1Red核酸染料（染料灵敏，每100mL 琼脂糖溶液中加入3~5 μL Ce1Red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
- （2）试剂：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 pH8.3 定容 1000ml]；用 ddH₂O 稀释 10 倍配制 1X TBE 电泳缓冲液；溴酚蓝指示剂，1%的西班牙琼脂糖凝胶，Ce1Red 核酸染料
- （3）仪器：电泳仪（100v），移液器（0.5~10u1），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 40~50℃左右时加入 1~2u1 的 Ce1Red 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。放置时尽量保持平稳，切勿晃动。
- （3）置胶：待约 20 分钟左右胶体凝固后，缓慢垂直向上拔起点样梳子，切勿用力过猛。

- (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（1 μ l 溴酚蓝与 2 μ l 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 100~120v 之间，一般是 5V/cm）。
- (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 312nm 激发的 UV 凝胶成像系统观察结果。。
- (9) *注：此方法染色染料用量相对较少。500 μ L 染料大约可以做 200~500 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。

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GelRed与DNA是通过静电吸引结合的，在DNA外面就容易出现条带迁移，特别是大片段DNA！
 - ✓ 鉴于 GelRed 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 50-200 ng/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。
 - ✓ 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。
 - ✓ 电泳时电压不宜过高，一般 TBE 不要超过 120V，TAE 不要超过 100V。
 - ✓ 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 $^{\circ}$ C，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。GelRed 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；减少 GelRed 在凝胶中的总量，比如用 0.5X 的浓度来代替 1X 的浓度。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。
 - ✓ 更换电泳缓冲液。新配置的电泳液效果好！ TBE 缓冲液比 TAE 缓冲液的效果更好。
 - ✓ 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 GelRed 是偏高的；另外，EB 显示不出来酶切的混合片段的杂带，GelRed 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，GelRed 电泳电压要低一些（一般是 5V/cm 但是不绝对），跑胶的时间长一些。
 - ✓ GelRed 染料和样品混合后，点样到琼脂糖凝胶中，有时效果非常好，有时效果不好。
 - ✓ 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。CelRed 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H₂O将CelRed10,000× 储液稀释约3,300倍到纯水中，制成3× 染色液。（例如将15 μL CelRed10,000× 储液加入到50mL ddH₂O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 312nm 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× CelRed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×凝胶裁样缓冲液混合，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 CelRed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CelRed；如果使用激光成像仪或在可见光下观测，请选择CelGreen。