

## SafeGreen 核酸染料 (10000× 水溶液)

### SafeGreen 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，药明康德严格的Ames-test实验表明，该染料的没有EB致癌诱变性。
2. 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SafeGreen完全克服这一点。
3. 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。
4. 染色均匀：整个凝胶负极端和正极端的亮度一样。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SafeGreen完全克服这一点。
5. 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。
6. 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。适用于微波或其它加热方法制备琼脂糖凝胶。
7. 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。
8. 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。
9. 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。
10. 适用范围广：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。
11. 完美兼容：SafeGreen兼容所有的紫外凝胶透射仪；SafeGreen兼容所有的蓝光仪和可见光仪器。Safe与EB有相近的光谱特性，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，使用和EB相同紫外凝胶透射仪，在300nm紫外光附近可得到最佳激发。

**产品包装：** SafeGreen® 10000x Nucleic Acid Dye 500uL/支；

**储存条件：** 室温或4℃避光可保存24个月。

### 操作步骤：

#### 一. 胶染法（预染法，用法EB完全相同）

制胶时加入SafeGreen 核酸染料（染料灵敏，每100mL 琼脂糖溶液中加入10 μL SafeGreen 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（国产的 DNA marker 浓度太高，至少稀释 2~3 倍后使用）
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) 溴酚蓝指示剂，1%的西班牙琼脂糖凝胶，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 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 SafeGreen 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 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SafeGreen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 SafeGreen 的高灵敏性, 建议减少 DNA 的上样量。DNA 样品最佳上样量为~100ng/泳道(常规 8 泳道小胶孔)。
- 2) 部分国产的DNA marker浓度太高, 稀释一倍后使用! 目前国产的部分marker是基于EB染料开发的酶切的混合片段, 请使用后染法。
- 3) 更换电泳缓冲液, 新配置的电泳液效果好! 用 TBE 缓冲液代替 TAE 效果更好!
- 4) 电泳时电压不宜过高, 一般不要超过130V。与EB相比, SafeGreen电泳电压要低一些, 跑胶的时间长一些。
- 5) 染料在室温或 4℃下避光储存即可; 若有沉淀, 将染料加热至 40~50℃并充分振荡溶解, 不影响使用。
- 6) 由于SafeGreen具有良好的热稳定性, 可以在热的琼脂糖溶液中直接添加后充分振荡混匀。SafeGreen也可以加到琼脂糖粉末和电泳缓冲液中, 然后用微波炉加热以制备琼脂糖凝胶。
- 7) 个别客户用3X染料和样品混合后, 点样到琼脂糖凝胶中, 不推荐这种点样方式!
- 8) 如果总是看到条带弥散或分离不理想, 建议使用电泳后泡染法染胶。

**\*此胶染法(预染法)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(后染法)。**

#### 二. 泡染法(后染法)

**注意:** 泡染出现的条带弯曲和拖带的现象与样品的质量和凝胶的浓度有关, 并不是染料的问题! 泡染比预染适当提高琼脂糖凝胶浓度约0.2%-0.3%。

- (1) 按照以上常规方法进行电泳。 **用于胶回收等高浓度DNA样品强烈推荐泡染法!**
- (2) 将SafeGreen® 10,000×储液稀释约10000倍到0.1M NaCl溶液中制成3×染色液。(例如将15 μL SafeGreen® 10,000×原装液加入到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1%的凝胶, 染色时间约30min。
- (4) 用 302nm 激发的紫外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。3× SafeGreen®染色液室温避光保存, 可重复使用3次左右。

#### 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1X SafeGreen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:** PAGE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SafeGreen; 如果使用激光成像仪或在可见光下观测, 请选择SafeGreen。