

Окрашивание ДНК в гелях красителем dsSafe®

Краситель dsSafe® — флуоресцентный краситель для прокраски нуклеиновых кислот в агарозных и полиакриламидных гелях. Данный краситель является лучшей безопасной альтернативой бромистому этидию (EtBr): dsSafe не токсичен, не обладает мутагенной и канцерогенной активностью, он не требует специальных условий хранения и утилизации.

Полосы ДНК, окрашенные красителем dsSafe, можно обнаруживать с помощью стандартного УФ-трансиллюминатора, трансиллюминатора видимого света или лазерного сканера. Краситель также подходит для окрашивания РНК в гелях.

В комплексе с ДНК спектр красителя dsSafe имеет два пика возбуждения: в ультрафиолетовом (280 нм) и в голубом диапазоне (502 нм), и максимум эмиссии в зеленом диапазоне ~530 нм.

Можно использовать два варианта протокола окрашивания нуклеиновых кислот в геле: путем инкубирования геля в растворе красителя или добавления красителя в гель перед электрофорезом.

Окрашивание инкубированием геля в растворе красителя

Это классический метод окрашивания ДНК в агарозных и полиакриламидных гелях (ПААГ).

1. Проведите электрофорез образца(ов) в агарозном или полиакриламидном геле.
2. Отберите в пластиковую емкость необходимый объем 1× TAE или 1× TBE. Для прокраски агарозного геля объемом 20 мл достаточно будет 35–50 мл раствора красителя.
3. Добавьте к буферу концентрат красителя в соотношении 1:10 000. Тщательно перемешайте.
4. Поместите гель в пластиковый лоток (крышку от коробки с наконечниками или контейнер для хранения бытовых продуктов).

Важно! Не используйте стеклянный контейнер, так как краситель может адсорбироваться на стенках контейнера, что приведет к недостаточному окрашиванию геля.

5. Добавьте достаточное количество раствора красителя, чтобы целиком покрыть гель.
6. Накройте гель и окрашивающий раствор алюминиевой фольгой или поместите их в темное место, чтобы защитить от света.
7. Инкубируйте гель в растворе красителя не менее 20 мин при 37 °С и постоянном перемешивании на орбитальном шейкере при 50–80 об/мин.

Добавление красителя в гель

Этот метод подходит только для агарозных гелей, но не для ПААГ.

Важно! Данный метод окрашивания может иногда приводить к деформации полос ДНК или их диффузии в геле. В этом случае используйте метод инкубирования геля в растворе красителя.

1. Разведите концентрированный краситель в соотношении 1:10 000 в буфере для агарозного геля (например, 1× TBE или 1× TAE). Добавьте к раствору красителя порошок агарозы. Например, если требуется 20 мл расплавленной агарозы, добавьте 2 мкл 10 000× концентрата красителя dsSafe в 20 мл 1× буфера, хорошо перемешайте раствор и добавьте к нему агарозу.

2. Нагрейте до кипения агарозу в буфере с красителем и дождитесь ее полного растворения. Для нагрева можно использовать микроволновую печь или другое нагревательное устройство.

(Опционально) В качестве альтернативы, можно добавить краситель непосредственно к расплавленной агарозе в соотношении 1:10 000 (1 мкл концентрата красителя на каждые 10 мл буфера).

3. Залейте получившуюся смесь в форму для геля и дождитесь затвердевания.

Важно! Как и при предварительном окрашивании гелей бромистым этидием, подвижность фрагментов нуклеиновых кислот в геле может быть несколько ниже по сравнению с их подвижностью в геле без окрашивания.

4. Проведите электрофорез образцов. Возможно наблюдение за мигрирующими полосами ДНК в режиме реального времени под ртутной лампой низкого давления с длиной волны 254 нм.

Просмотр и фотографирование геля

Для просмотра окрашенных гелей можно использовать стандартный трансиллюминатор с длиной волны 300 нм, эпипри трансиллюминатор с длиной волны 254 нм или трансиллюминатор с синим светом.

ДНК, окрашенную красителем dsSafe, можно также визуализировать и анализировать с помощью систем визуализации, оснащенных источником возбуждения в УФ-диапазоне или в диапазоне 470–530 нм.

Важно! Если полосы из геля, окрашенного красителем dsSafe, будут вырезаны и использованы в реакции лигирования, рекомендуется освещение с помощью источника синего, но не ультрафиолетового света. В некоторых случаях источники ультрафиолетового света в сочетании с окрашиванием dsSafe могут приводить к снижению эффективности клонирования.