Окрашивание нуклеиновых кислот в гелях красителем dsGold®

dsGold (также известен как Oxazole Gold) является асимметричным цианиновым красителем, используемым для окрашивания дцДНК, оцДНК и РНК в электрофоретических гелях.

dsGold демонстрирует более чем 1000-кратное увеличение флуоресценции при связывании с нуклеиновыми кислотами и имеет самый высокий квантовый выход (0,6–0,7) по сравнению с другими красителями, такими как бромистый этидий (EtBr), dsGreen и ssGreen. Комплексы красителя с нуклеиновыми кислотами имеют два максимума возбуждения флуоресценции — при 300 нм и 495 нм, и один максимум излучения при 546 нм. Таким образом, гели, окрашенные с помощью dsGold, могут быть визуализированы с использованием как ультрафиолетовых, так и синих транслиминаторов с соответствующими светофильтрами.

Чувствительность dsGold позволяет обнаруживать всего 25 пг ДНК в денатурирующих гелях с мочевиной, глиоксалом и формальдегидом. Краситель способен быстро проникать в толстые и высокопроцентные агарозные гели. Из-за низкой флуоресценции несвязанного красителя, гели с формальдегидом не требуют процедуры удаления красителя. Присутствие dsGold в окрашенных гелях в стандартных рабочих концентрациях не мешает Т4 ДНК-лигазе, Taq-полимеразе, эндонуклеазам рестрикции или нозерн- или Саузерн-блоттингу. Краситель можно легко удалить из нуклеиновых кислот путем осаждения этанолом, оставляя чистые матрицы доступными для последующих манипуляций или анализа.

Обращение и утилизация

Перед открытием каждую пробирку следует нагреть до комнатной температуры, а затем кратковременно центрифугировать в микроцентрифуге, чтобы раствор dsGold стек на дно пробирки.

В настоящее время нет данных о мутагенности или токсичности dsGold. Поскольку этот реагент связывается с нуклеиновыми кислотами, его следует рассматривать как потенциальный мутаген и обращаться с ним с соответствующей осторожностью. Работа со стоковым раствором в ДМСО требует особого внимания, так как ДМСО может усиливать всасывание органических молекул в ткани. Мы рекомендуем надевать двойные перчатки при работе с стоковым раствором. Как и все красители нуклеиновых кислот, растворы dsGold следует утилизировать в соответствии с местными рекомендациями.

Lumiprobe Corporation
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Окрашивание нуклеиновых кислот

Данный протокол описывает процедуры окрашивания нуклеиновых кислот инкубированием геля в растворе красителя dsGold. Не рекомендуется добавлять краситель в гель перед электрофорезом, поскольку dsGold приводит к сильному замедлению электрофоретической подвижности нуклеиновых кислот в геле.

1. Отберите в пластиковую емкость необходимый объем 1× TAE, TE или TBE. Для прокраски агарозного геля объемом 20 мл достаточно будет 35–50 мл раствора красителя.
2. Добавьте к буферу концентрат красителя в соотношении 1:10 000. Тщательно перемешайте.

   Важно! Окрашивание красителем dsGold чувствительно к pH. Для достижения наилучших результатов pH окрашивающего раствора должен быть в пределах от 7,5 до 8,0 (предпочтительно pH 8,0) при температуре, используемой для окрашивания.
3. Проведите электрофорез образца(ов) в агарозном или полиакриламидном геле. Предварительная промывка гелей, в том числе, содержащих мочевину, формальдегид или глиоксаль, не требуется.
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 °C и постоянном перемешивании на орбитальном шейкере при 50–80 об/мин. Время инкубации зависит от толщины геля и процентного содержания агарозы или полиакриламида.
8. Окрашивающий раствор можно хранить в темноте и использовать повторно 3–4 раза, однако для достижения наилучших результатов следует использовать свежий раствор красителя.

Просмотр и фотографирование гелей

dsGold максимально возбуждается при 495 нм, пик эмиссии комплекса dsGold/дцДНК находится при 546 нм.

Просмотр или документирования геля осуществляется, используя зеленый/желтый фильтр. Оптимальное время экспозиции или другие настройки прибора определяется эмпирическим путем.

Для визуализации гелей, окрашенных dsGold, можно использовать трансиллюминаторы с синим светом или УФ-ртутные лампы 254 и 300 нм. Окрашенные гели также можно визуализировать и анализировать с помощью лазерных сканеров.

Lumiprobe Corporation
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe
Life science solutions

Удаление красителя dsGold из нуклеиновых кислот

Краситель dsGold можно эффективно удалить из нуклеиновых кислот, просто осадив ДНК или РНК этанолом. Более 97% красителя удаляется за один этап осаждения. Более 99% красителя удаляется, если в качестве соли в процедуре осаждения используется ацетат аммония.

1. Добавьте к образцу нуклеиновой кислоты одну из следующих солей до указанной конечной концентрации: 200 мМ NaCl, 300 мМ ацетата натрия (pH 5,2) или 2 М ацетата аммония. Осторожно перемешайте.
2. Добавьте к образцу два объема холодного абсолютного этанола и хорошо перемешайте. Инкубируйте при 0 °C (на льду) в течение 30 минут.
3. Осадите нуклеиновые кислоты центрифугированием в течение не менее 15 минут при 10 000–12 000 × *g*.
4. Удалите супернатант и промойте осадок 70% этанолом.
5. Повторите центрифугирование для осаждения нуклеиновых кислот.
6. Дайте осадку высохнуть на воздухе и ресуспендируйте при необходимости.

Lumiprobe Corporation
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com