



Tipps für GelRed®- Anwendungen (Gele: 1,5% Agarose) von Genaxxon

1. Verdünnung der GelRed®-Stammlösung, wenn GelRed® direkt in das PCR-Produkt gegeben wird (In-Slot-Applikation):

Genaxxon empfiehlt die In-Slot-Applikation einer 20-fach GelRed®-Probenmischung.

Verdünnung der GelRed®-Stammlösung:

3µL GelRed® (10 000X) werden mit 97µL 6X Loading Buffer verdünnt (Enthält das PCR-Produkt bereits einen Loading buffer, kann alternativ H₂O verwendet werden.). Dies ergibt eine **300X GelRed®-Lösung**.

8µL der 300X GelRed® Lösung werden in 112µL 6X Loading Buffer gegeben. Dies ergibt die 20X GelRed®-Arbeitslösung.

Von der Arbeitslösung werden 1µL bis 2µL auf 4µL Probe (PCR-Ansatz) gegeben (entspricht einem 5X Loading Buffer) und direkt in den Slot des Agarosegels appliziert.

Zur gleichmäßigen Befüllung der Geltaschen kann auch mehr 6X Loading Buffer beigemischt werden, so dass eine gleichmäßige Befüllung der Taschen gewährleistet ist. Die tatsächliche Menge richtet sich nach individuellem Erfahrungswert des Anwenders und sollte individuell angepasst werden.

Herstellung 300X GelRed®-Lösung:

3 µL GelRed® (10 000X) in 97µL 6X Loading Buffer

Herstellung 20X GelRed®-Lösung:

8 µL GelRed® 300X

112 µL 6X Loading Buffer

als 5X-Puffer zu verwenden (4µL Probe + 1 µL Loading Buffer with GelRed®)

2. GelRed® im Gel (Precast):

In 100 mL TBE-/ TAE-Gel werden 10µL GelRed® empfohlen, es ist möglich, bis auf 3,5µL GelRed® / 100mL Gel zu reduzieren.

Es muss getestet werden, ob die Intensität der DNA-Banden den Bedürfnissen des Anwenders genügt.

3. Poststaining:

3X Färbelösung in Wasser mit 0.1M NaCl (erhöht die Sensitivität):

15µL GelRed® 10 000X Stock Solution und 5 mL NaCl auf 45 mL Wasser;

Gel ca. 30 Min. im Färbebad lassen, normale UV- Illustrierung

Färbebad NICHT in TAE-/ TBE- Puffer machen!

4. GelRed® für Southern Blot:

Es ist möglich, den Transfer von DNA auf eine Membran mit einem GelRed® - gefärbten Agarosegel zu erkennen. Dabei kommt es zu keinerlei Störungen nachfolgender Schritte.

Protokoll: Färbung des Gels in GelRed® -Färbebad. Wir empfehlen, NaCl zum Färbebad hinzuzufügen.

3X Färbebad in Wasser mit 0.1M NaCl:

15µL GelRed® stock solution und 5 mL NaCl auf 45mL Wasser; Gel ca. 30 Min. im Färbebad lassen.

Blotten nach normalem Elektroblothing-Protokoll. Kontrolle der Blothingmembran unter UV-Licht.

Weiterführende Schritte wie üblich. Kein Entfärben notwendig.

