



Tipps für SafeGel red stain Anwendungen (Gele: 1,5% Agarose) von Genaxxon

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

Genaxxon empfiehlt die In-Slot-Applikation einer 20-fach SafeGel red stain-Probenmischung.

Verdünnung der SafeGel red stain -Stammlösung:

3µL SafeGel red stain (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 SafeGel red stain Lösung**.

8µL der 300X SafeGel red stain Lösung werden in 112µL 6X Loading Buffer gegeben.

Dies ergibt die **20X SafeGel red stain -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 Geldaschen 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 SafeGel red stain -Lösung:

3 µL SafeGel red stain (10 000X) in 97µL 6X Loading Buffer

Herstellung 20X SafeGel red stain -Lösung:

8 µL SafeGel red stain 300X

112 µL 6X Loading Buffer

als 5X-Puffer zu verwenden (4µL Probe + 1 µL Loading Buffer mit SafeGel red stain)

2. SafeGel red stain im Gel (Precast):

In 100 mL TBE-/ TAE-Gel werden 10µL SafeGel red stain empfohlen, es ist möglich, bis auf 3,5µL SafeGel red stain / 100mL Gel zu reduzieren. **ACHTUNG:** Vor Zugabe von SafeGel red stain die geschmolzene Agaroselösung auf ca. 55°C bis 60°C abkühlen lassen.

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 SafeGel red stain 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. SafeGel red stain für Southern Blot:

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

Protokoll: Färbung des Gels in SafeGel red stain-Färbebad. Wir empfehlen, NaCl zum Färbebad hinzuzufügen.

3X Färbebad in Wasser mit 0.1M NaCl:

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

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

Weiterführende Schritte wie üblich. Kein Entfärben notwendig.

