

## Färbung von RNA in Gelen mit ssGreen®

**ssGreen®** ist einer der empfindlichsten Farbstoffe für die posteletrophoretische Färbung von RNA und einzelsträngiger DNA (ssDNA) in Agarose- oder Polyacrylamidgelen. Die Fluoreszenzquantenausbeute des **ssGreen®/RNA-Komplexes** ist mehr als siebenmal höher als bei Ethidiumbromid/RNA. Obwohl ssGreen® nicht spezifisch für RNA konzipiert ist, zeigt der Farbstoff bei der Bindung an RNA eine etwa 1,5-mal höhere Quantenausbeute als an doppelsträngiger DNA. Dies macht ihn unter allen Nukleinsäurefarbstoffen einzigartig.

Die Färbung mit ssGreen® ist mit denaturierenden Gelen kompatibel. In Agarose-Formaldehyd- und Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen ist die Empfindlichkeit von ssGreen® zwar leicht reduziert, übertrifft jedoch weiterhin diejenige von Ethidiumbromid. Außerdem beeinträchtigt die Färbung von Agarose-/Formaldehyd-Gelen mit ssGreen® den Transfer von RNA auf Filtermembranen oder die anschließende Hybridisierung beim Northern Blot nicht, vorausgesetzt, die Vorhybridisierungs- und Hybridisierungspuffer enthalten 0,1–0,3 % SDS.

Die Färbung von Gelen mit ssGreen® erfordert zudem weniger Schritte als die Färbung mit Ethidiumbromid. Da die Fluoreszenz des ssGreen/RNA-Komplexes weder durch Formaldehyd noch durch Harnstoff gelöscht wird, ist es nicht nötig, diese Denaturierungsmittel vor dem Färben aus den Gelen auszuwaschen. Darüber hinaus weist ssGreen eine sehr geringe Eigenfluoreszenz auf, sodass das Gel betrachtet und fotografiert werden kann, ohne zuvor ungebundenen Farbstoff zu entfernen.

## Umgang und Entsorgung

Vor dem Öffnen sollte jedes Röhrchen auf Raumtemperatur gebracht und dann kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert werden, damit die ssGreen-Lösung zum Boden des Röhrchens fließt.

Derzeit gibt es keine Daten zur Mutagenität oder Toxizität von ssGreen®. Da dieses Reagenz jedoch an Nukleinsäuren bindet, sollte es als potenzielles Mutagen angesehen und entsprechend vorsichtig behandelt werden. Beim Arbeiten mit der Stammlösung in DMSO ist besondere Vorsicht geboten, da DMSO die Aufnahme organischer Moleküle in Gewebe erhöhen kann. Wir empfehlen, beim Umgang mit der Stammlösung Doppelhandschuhe zu tragen. Wie alle Nukleinsäurefarbstoffe müssen Lösungen von ssGreen gemäß den jeweils geltenden Vorschriften entsorgt werden.

## Färbung von RNA

1. Führen Sie die Elektrophorese in nicht denaturierenden oder in denaturierenden Polyacrylamid-/Harnstoff- bzw. Agarose-Formaldehyd-Gelen entsprechend den Standardmethoden durch.
2. Verdünnen Sie die ssGreen-Stammlösung. Für ein 20 ml großes Agarosegel reichen in der Regel 35–50 ml Färbelösung aus.
  - Für nicht denaturierende Gele und denaturierende Polyacrylamid-/Harnstoff-Gele: 1:10 000 in 1× TBE
  - Für denaturierende Agarose-/Formaldehyd-Gele: 1:5 000 in 1× TBE

Mischen Sie die Lösung gründlich.

*Wichtig:* Die Färbung mit ssGreen® ist pH-empfindlich. Für optimale Ergebnisse sollte der pH-Wert der Färbelösung

- zwischen 7,5 und 8,0 liegen (idealerweise bei pH 8,0) und zwar bei der Temperatur, die für die Färbung vorgesehen ist.
- Legen Sie das Gel in eine Kunststoffwanne (z.B. den Deckel einer Spitzenbox oder einen geeigneten Haushaltsbehälter).  
*Wichtig:* Verwenden Sie keine Glasbehälter, da der Farbstoff an Glas adsorbiert werden kann, was zu einer unzureichenden Färbung führt.
  - Geben Sie so viel Färbelösung hinzu, dass das Gel vollständig bedeckt wird.
  - Decken Sie das Gel und die Färbelösung mit Alufolie ab oder stellen Sie sie an einen dunklen Ort, um sie vor Licht zu schützen.
  - Schwenken Sie die Wanne mit dem Gel vorsichtig bei Raumtemperatur. Die optimale Färbezeit liegt in der Regel zwischen 20–40 Minuten für Agarosegele und 10–40 Minuten für Polyacrylamidgele. Die Färbedauer kann je nach Dicke des Gels sowie nach der Agarose- bzw. Polyacrylamidkonzentration variieren.
  - Die Färbelösung kann bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt und drei- bis viermal wiederverwendet werden.

## Färbung von DNA

ssGreen® ist nicht ausschließlich für RNA geeignet und kann auch für die DNA-Färbung in Gelen eingesetzt werden. Verwenden Sie hierfür unser [Protokoll zur DNA-Färbung mit dsGreen®](#) und übertragen Sie es auf ssGreen.

Beachten Sie, dass das direkte Zugeben von ssGreen® im Verhältnis 1:10 000 zur geschmolzenen Agarose die Mobilität der Fragmente verändert. Für eine optimale Auftrennung im Gel muss daher die Elektrophoresezeit etwa um das 1,5- bis 2-Fache verlängert werden.

## Betrachtung und Fotodokumentation von Gelen

ssGreen® wird optimal bei 483 nm angeregt und besitzt zudem ein sekundäres Anregungsmaximum bei etwa 254 nm (nicht dargestellt). Das Emissionsmaximum des ssGreen®/RNA-Komplexes liegt bei 518 nm.

Für die Betrachtung oder Dokumentation des Gels empfiehlt sich ein grün/gelber Filter. Zur Visualisierung ssGreen®-gefärbter Gele können Blaulicht-Transilluminatoren oder Niederdruck-Quecksilberlampen (254 nm) eingesetzt werden. Auch Hochdruck-Quecksilberlampen (365 nm) sind möglich, jedoch mit etwas geringerer Anregungseffizienz.

Die gefärbten Gele weisen nur eine sehr geringe Hintergrundfluoreszenz auf, wodurch selbst geringe RNA-Mengen bei längeren Belichtungszeiten (bis zu 2 Minuten) detektiert werden können.