

Färbung von Nukleinsäuren in Gelen mit dem Farbstoff dsGold®

dsGold (auch bekannt als Oxazol-Gold) ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der zur Färbung von dsDNA, ssDNA und RNA in elektrophoretischen Gelen verwendet wird.

dsGold zeigt eine über 1000-fache Verstärkung der Fluoreszenz bei Bindung an Nukleinsäuren und besitzt mit 0,6 0,7 die höchste Quantenausbeute im Vergleich zu anderen Farbstoffen wie Ethidiumbromid (EtBr), dsGreen oder ssGreen. Die Farbstoff-Nukleinsäure-Komplexe weisen zwei Fluoreszenz-Anregungsmaxima bei 300 nm und 495 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 546 nm auf. Dadurch können dsGold-gefärbte Gele sowohl mit UV- als auch mit Blaulicht-Transilluminatoren unter Verwendung geeigneter Filter visualisiert werden.

Die hohe Sensitivität von dsGold ermöglicht den Nachweis von lediglich 25 pg DNA in denaturierenden Gelen mit Harnstoff, Glyoxal und Formaldehyd. Der Farbstoff diffundiert rasch auch in dicke und hochprozentige Agarosegele. Aufgrund der geringen Eigenfluoreszenz des ungebundenen Farbstoffs ist bei formaldehydhaltigen Gelen keine Entfärbung erforderlich.

Die Anwesenheit von dsGold in üblichen Arbeitskonzentrationen beeinträchtigt weder die Aktivität von T4-DNA-Ligase, Taq-Polymerase noch von Restriktionsendonukleasen, noch interferiert es mit Northern- oder Southern-Blot. Der Farbstoff kann durch Ethanol-fällung leicht von Nukleinsäuren entfernt werden, sodass reine Matrizen für nachfolgende Anwendungen oder Analysen zur Verfügung stehen.

Handhabung und Entsorgung

Vor dem Öffnen sollten die Gefäße auf Raumtemperatur erwärmt und kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert werden, damit sich die Lösung am Boden des Gefäßes sammelt.

Zur Mutagenität oder Toxizität von dsGold liegen bisher keine Daten vor. Da dieses Reagenz jedoch an Nukleinsäuren bindet, sollte es als potenziell mutagen betrachtet und entsprechend vorsichtig gehandhabt werden.

Der Umgang mit der Stammlösung in DMSO erfordert besondere Vorsicht, da DMSO die Aufnahme organischer Moleküle in Gewebe verstärken kann. Es wird empfohlen, beim Arbeiten mit der Stammlösung doppelte Handschuhe zu tragen.

Wie bei allen Nukleinsäure-Farbstoffen müssen Lösungen von dsGold gemäß den lokalen Entsorgungsvorschriften entsorgt werden.

Protokoll zur Färbung von Nukleinsäuren

Dieses Protokoll beschreibt die Färbung von Nukleinsäuren durch Inkubation des Gels in einer dsGold-Lösung. Eine Zugabe des Farbstoffs zum Gel vor der Elektrophorese wird nicht empfohlen, da dsGold die elektrophoretische Mobilität der Nukleinsäuren stark verlangsamt.

1. Geben Sie das benötigte Volumen $1 \times$ TAE-, TE- oder TBE-Puffer in ein Kunststoffgefäß hinzu. Für ein Agarosegel mit einem Volumen von 20 ml sind 35–50 ml Färbelösung ausreichend.
2. Geben Sie das Farbstoffkonzentrat zum Puffer im Verhältnis 1:10.000 hinzu und mischen Sie gründlich.

Wichtig: Die Färbung mit dsGold ist pH-abhängig. Für optimale Ergebnisse sollte die Färbelösung bei der jeweiligen Färbetemperatur einen pH-Wert zwischen 7,5 und 8,0 (bevorzugt 8,0) aufweisen.

3. Führen Sie die Elektrophorese der Probe(n) in Agarose- oder Polyacrylamidgelen durch. Ein Vorwaschen von Gelen, auch bei Harnstoff-, Formaldehyd- oder Glyoxal-Gelen, ist nicht erforderlich.

4. Legen Sie das Gel in eine Kunststoffschale (z. B. Deckel einer Pipettenspitzenbox oder handelsübliches Kunststoffgefäß).

Wichtig: Verwenden Sie kein Glasgefäß, da der Farbstoff an den Gefäßwänden adsorbieren kann, was zu einer unzureichenden Färbung des Gels führt.

5. Fügen Sie ausreichend Färbelösung hinzu, um das Gel vollständig zu bedecken.

6. Decken Sie das Gel und die Färbelösung mit Aluminiumfolie ab oder stellen Sie sie lichtgeschützt.

7. Inkubieren Sie das Gel mindestens 20 Minuten bei 37 °C unter konstantem Schütteln auf einem Orbital-Schüttler bei 50-80 U/min in der Farbstofflösung. Die Inkubationszeit hängt von der Geldicke und dem Agarose- oder Polyacrylamid-Gehalt ab.

8. Die Färbelösung kann lichtgeschützt 3- bis 4-mal wiederverwendet werden, jedoch ergeben frische Lösungen die besten Ergebnisse.

Visualisierung und Dokumentation von Gelen

dsGold wird optimal bei 495 nm angeregt, das Emissionsmaximum des dsGold/dsDNA-Komplexes liegt bei 546 nm.

Die Visualisierung erfolgt mit einem grün/gelben Filter. Die optimale Belichtungszeit oder andere Geräteeinstellungen werden experimentell bestimmt.

Für die Visualisierung von mit dsGold gefärbten Gelen können Blaulicht-Transilluminatoren oder UV-Quecksilberlampen (254 nm und 300 nm) verwendet werden. Gefärbte Gele können auch mit Laser-Scannern visualisiert und analysiert werden.

Entfernung des Farbstoffs dsGold aus Nukleinsäuren

dsGold lässt sich durch Ethanol-fällung effizient aus Nukleinsäuren entfernen. Mehr als 97 % des Farbstoffs werden in einem einzigen Fällungsschritt entfernt. Die Verwendung von Ammoniumacetat als Fällungssalz entfernt über 99 % des Farbstoffs.

1. Geben Sie zu der Nukleinsäureprobe eines der folgenden Salze bis zur angegebenen Endkonzentration zu: 200 mM NaCl, 300 mM Natriumacetat (pH 5,2), 2 M Ammoniumacetat. Mischen Sie die Probe vorsichtig.

2. Fügen Sie 2 Volumen eiskalten absoluten Ethanol hinzu, mischen Sie gut und inkubieren Sie die Probe 30 Minuten bei 0 °C (auf Eis).

3. Fällern Sie die Nukleinsäuren durch Zentrifugation für mindestens 15 Minuten bei 10.000–12.000 × g aus.

4. Entfernen Sie den Überstand und waschen Sie das Pellet mit 70 % Ethanol.

5. Wiederholen Sie die Zentrifugation, um die Nukleinsäuren vollständig auszufällen.

6. Lassen Sie das Pellet an der Luft trocknen und resuspendieren Sie es bei Bedarf.