

Gebrauchsanweisung



ROTI® Black N

Silberfärbungskit für DNA

DNA-Färbung in foliengestützten und freien PAA-Gelen für Gelvolumina bis 10 ml (40 ml)

I Technische Hinweise

I.1 Allgemeine Tipps zur Silberfärbung

Achten Sie bitte auf die Sauberkeit der verwendeten Glasplatten, Glasgefäße und Schalen.

Tragen Sie bitte Handschuhe.

Verwenden Sie bitte doppelt destilliertes, deionisiertes Wasser.

Halten Sie für reproduzierbare Ergebnisse die vorgeschlagenen Zeiten bitte möglichst genau ein.

Beachten Sie bitte, dass die Temperatur der verwendeten Lösungen bei ca. 20 °C liegt.

I.2 Inhalt für 10 (40) Silberfärbungen

- 10 x Silbernitrat (N770) in Reaktionsgefäßen mit der Bezeichnung: **A**

Gefahr H272-H290-H314-H410
P273-P280-P303+P361+P353-P305+P351+P338-P310

- 2 x (3 x) Formaldehyd (N771) in Reaktionsgefäßen mit der Bezeichnung: **B**

Gefahr H301+H311+H331-H314-H317-H335-H341-H350-H370
P260-P280-P303+P361+P353-P304+P340-P305+P351+P338-P308-P311

- 10 x Natriumthiosulfat (N772) in Reaktionsgefäßen mit der Bezeichnung: **C**

- 1 x Natriumcarbonat **D** (N774)

Achtung H319
P305+P351+P338-P337+P313

(Wir empfehlen zur Aufbewahrung das Autoklavieren der frisch angesetzten Lösung.)

- 2 x Stopplösung (N773) mit Bezeichnung: **E**

Achtung H373 P260

Die Einzelbestandteile dieses Kits können nicht separat nachgekauft werden.

I.3 Zusätzlich benötigte Chemikalien

Wasser doppelt destilliert, Best.Nr. 3478.1

Essigsäure 100 % p.a., Best.Nr. 3738.1

Glycerin 99,5 %, Best.Nr. 3783.1

Alkohol:

Bei freien Gelen:

Wahlweise Ethanol p.a., Best.Nr. 9065.1

Methanol p.a., Best.-Nr. 4627.1

oder als günstige Alternativen:

Ethanol vergällt, Best.Nr. K928.1

ROTISOL®, Best.-Nr. 7917.1

Bei foliengestützten Gelen:

Methanol p.a., Best.-Nr. 4627.1

II Arbeitsanleitung

Für Gelvolumina bis 10 ml, z.B. 10 cm x 10 cm x 1 mm, (40 ml, z.B. 20 cm x 20 cm x 1 mm)

Bitte beachten:

Führen Sie die Färbeschritte unter sanftem Schütteln durch. Für optimale Ergebnisse empfehlen wir unsere ROTILABO®-Färbekammern (Best.-Nr. H591.1). Das folgende Rezept ist sowohl für foliengestützte als auch für freie Gele geeignet. Die Fixierlösung in Schritt 1 beinhaltet 20 % Methanol für alle Gele. Bei freien Gelen bis zu 1 mm Stärke kann das Methanol durch 15 % Ethanol ersetzt werden.

II.1. Fixierung der DNA im Gel:

nach der Elektrophorese in 100 ml (200 ml)

Fixierlösung, Fixierzeit: ≥15 min.

Falls Sie über Nacht fixieren wollen, empfehlen wir die Lagerung ohne Schütteln bei 4 °C.

Fixierlösung:

Für alle Gele

20 ml (40 ml) Methanol

+ 5 ml (10 ml) Eisessig

auf 100 ml (200 ml)

mit H₂O_{dd} auffüllen.

alternative Fixierlösung:

Nur für freie Gele

15 ml (30 ml) EtOH

+ 5 ml (10 ml) Eisessig

auf 100 ml (200 ml)

mit H₂O_{dd} auffüllen.

Wir empfehlen, die ethanolische Fixierung nur bei freien Gelen von maximal 1 mm Stärke anzuwenden.

II.2. Vorbereitungen:

- Zentrifugieren Sie ein Reaktionsgefäß mit der Beschriftung A kurz ab. Pipettieren Sie 1 ml H₂O_{dd} dazu. Lösen Sie das Silbernitrat unter Vortexen vollständig.
- Zentrifugieren Sie ein Reaktionsgefäß mit der Beschriftung C kurz ab. Pipettieren Sie dazu 300 µl H₂O_{dd} und lösen Sie das Natriumthiosulfat unter Vortexen vollständig.
- Lösen Sie bitte das Natriumcarbonat in 250 ml (500 ml) H₂O_{dd} unter Rühren auf.

- Geben Sie zum Inhalt einer Flasche mit der Bezeichnung Stopplösung 1 l H_2O_{dd} und lösen Sie unter Rühren. Bei Bedarf wird der Inhalt der zweiten Flasche aufgelöst.

II.3. Waschschrirte:

2 x 5 min in je 100 ml (200 ml) H_2O_{dd}

Setzen Sie bitte während der Waschschrirte die Imprägnierungslösung (siehe Punkt 4) an.

II.4. Silberimprägnierung:

30 min in 100 ml (200 ml) Imprägnierungslösung.

Imprägnierungslösung:

Pipettieren Sie den Inhalt des Reaktionsgefäßes A zu 100 ml (200 ml) H_2O_{dd} .

Pipettieren Sie dazu 100 μ l (200 μ l) Formaldehyd aus dem Reaktionsgefäß B, mischen Sie gut durch.

Setzen Sie bitte während der Imprägnierung die Entwicklungslösung (siehe Punkt 6) an.

II.5. Waschschrirte:

1 x 20 s in 150 ml (300 ml) H_2O_{dd}

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe
Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
info@carlroth.de • www.carlroth.de ip 07/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428.
Geschäftsführer: André Houdelet

II.6. Entwicklung:

Inkubieren Sie das Gel in der Entwicklungslösung, bis die DNA-Banden gefärbt sind.
Verwerfen Sie dann die Entwicklungslösung, und gehen Sie zügig zu Schritt 7.

Entwicklungslösung:

Mischen Sie diese Lösung bitte unter permanentem Rühren:

20 ml (40 ml) Natriumcarbonat-Lösung (D)
+ 60 ml (120 ml) H_2O_{dd} , gut durchmischen.
+ 100 μ l (200 μ l) aus dem Reaktionsgefäß C
+ 100 μ l (200 μ l) Formaldehyd aus Reaktionsgefäß B
auf 100 ml (200 ml) mit H_2O_{dd} auffüllen.

Den Rest des Natriumthiosulfats (C) können Sie verwerfen.

II.7. Stopp:

- 1 x 20 s in 100 ml (200 ml) Stopplösung N
- Inkubieren Sie das Gel für ≥ 10 min in 100 ml (200 ml) Stopplösung N

Stopplösung N:

100 ml (200 ml) Stopplösung (E)
+ 100 ml (200 ml) H_2O_{dd} , gut mischen

Über einen längeren Zeitraum lagern Sie das Gel am besten bei 4 °C.

II.8. Waschschrirte:

2 x 5 min in je 100 ml (200 ml) H_2O_{dd}

Setzen Sie bitte während den Waschschrirten die Trocknerlösung an (siehe Punkt 9).

II.9. Trocknung:

≥ 30 min in 100 ml (200 ml) Trocknerlösung.

Trocknerlösung:

10 ml (20 ml) Glycerin
+ 15 ml (30 ml) Ethanol
auf 100 ml (200 ml) mit H_2O_{dd} auffüllen.

Anschließend können Sie das Gel zwischen zwei Cellophanfolien trocknen. Wir empfehlen dazu unsere Geltrocknungsrahmen (Best.Nr. K420.1, K421.1).

ROTI®Black N	N769.1	1 Kit
	N769.2	1 Kit

Instructions for use



ROTI® Black N

Silver Staining Kit for DNA

Staining of DNA in film supported and conventional PAA-gels with a maximum gel volume of 10 ml (40 ml)

I Technical information

I.1 General information about silver staining

Please use only clean glass plates, vessels and bowls.

Please wear gloves.

Use double distilled, deionised water.

For reproducible results, please carry out the procedure as indicated in the protocol.

Please ensure that the temperature of the required solutions is approximately 20 °C.

I.2 Kit components sufficient to stain 10 gels

- 10 x silver nitrate (N770) in test tubes, labelled: **A**
 Danger H272-H290-H314-H410
P273-P280-P303+P361+P353-P305+P351+P338-P310
- 2 x (3 x) formaldehyde (N771) in test tubes, labelled: **B**
 Danger H301+H311+H331-H314-H317-H335-H341-H350-H370
P260-P280-P303+P361+P353-P304+P340 - P305+P351+P338-P308-P311

- 10 x sodium thiosulphate (N772) in test tubes, labelled: **C**
- Sodium carbonate **D** (N774)
 Warning H319
P305+P351+P338-P337+P313

(For long-time storage we recommend autoclaving of the freshly prepared solution.)
- 2 x stop solution (N773), labelled: **E**
 Warning H373 P260

Contents of this Kit may not be bought separately.

I.3 Further chemicals required

- H₂O_{dd}, ref. 3478.1
- acetic acid 100 % p.a., ref. 3738.1
- glycerol 99,5 %, ref. 3783.1
- alcohol:
for conventional gels
ethanol p.a., ref. 9065.1
methanol p.a., ref. 4627.1
or as cheaper alternatives:
denatured ethanol, ref. K928.1
ROTISOL®, ref. 7917.1
for film supported gels
methanol p.a., ref. 4627.1

II Instructions for use

For a maximum gel volume of 10 ml, e.g. 10 cm x 10 cm x 1 mm (40 ml, e.g. 20 cm x 20 cm x 1 mm)

Attention:

Please carry out the various staining steps under gentle shaking. For best results, we recommend using our ROTILABO® staining chambers (ref. H591.1).

The following procedure is appropriate for both, film supported and conventional gels. The fixative in step 1 basically contains 20 % methanol (v/v) for all gels. If working with conventional gels of 1 mm thickness in maximum the methanol may be replaced by 15 % ethanol (v/v).

II.1. Fixation of DNA in the gel:

After electrophoresis in 100 ml fixative for ≥ 15 min.

In case fixation is done overnight, we recommend incubation at 4 °C without shaking.

<u>Fixative</u>	<u>Fixative (alternatively)</u>
For all gels 20 ml (40 ml) methanol + 5 ml (10 ml) Acetic acid	For conventional gels 15 ml (30 ml) EtOH + 5 ml (10 ml) Acetic acid
Adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H ₂ O _{dd}	Adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H ₂ O _{dd}

We recommend using ethanol only for conventional (non-film supported) gels of 1 mm thickness in maximum.

II.2. Preparation:

- Briefly centrifuge an „A-labelled“ reaction tube. Pipette 1 ml H₂O_{dd} to it. Vortex and dissolve the silver nitrate completely.

- Briefly centrifuge a „C-labelled“ reaction tube. Pipette 300 µl H₂O_{dd} to it. Vortex and dissolve the sodium thiosulphate completely.
- Please dissolve the D - sodium carbonate in 250 ml (500 ml) H₂O_{dd} by stirring.
- Add 1 l H₂O_{dd} to a „E - stop solution“ labelled bottle and dissolve the content by stirring. If necessary, carry out the same procedure for the second bottle.

II.3. Washing:

2 x 5 min in 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}

Please prepare the impregnation solution during the washing steps (see step 4).

II.4. Silver impregnation:

30 min in 100 ml (200 ml) impregnation solution

Impregnation solution:

Pipette the content of test tube A to a clean test tube with 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}. Add 100 µl (200 µl) formaldehyde from test tube B and mix thoroughly.

Please prepare the developing solution during silver impregnation (see step 6).

II.5. Washing step:

1 x 20 s in 150 ml (300 ml) H₂O_{dd}

II.6. Developing:

Incubate the gel in developing solution until the bands containing DNA are stained. Discard the developing solution and quickly move on to step 7.

Developing solution:

Mix the solution under constant stirring.
 20 ml (40 ml) sodium carbonate solution **D**
 + 60 ml (120 ml) H₂O_{dd}, mix thoroughly
 + 100 µl (200 µl) from test tube **C**
 + 100 µl (200 µl) formaldehyde from test tube **B**
 Adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H₂O_{dd}.

Discard the rest of the sodium thiosulphate (C) solution.

II.7. Stop:

Wash 1 x 20 s in 100 ml (200 ml) stop solution N
 Then incubate the gel ≥ 10 min in 100 ml (200 ml) stop solution N

For a longer storage, store at 4 °C.

Stop solution N:

100 ml (200 ml) Stop solution (E)
 + 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}, mix thoroughly

II.8. Washing step:

2 x 5 min in je 100 ml (200 ml) H₂O_{dd}

Please prepare the drying solution during washing step 2 (see step 9)

II.9. Drying:

≥30 min in 100 ml (200 ml) drying solution

The gel can then be dried between two sheets of cellophane film. We recommend using our drying frame (ref. K420.1, K421.1).

Drying solution:

10 ml (20 ml) glycerol
 + 15 ml (30 ml) EtOH

Adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H₂O_{dd}.

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
 P.O. Box 100121 • 76231 Karlsruhe
 Phone: +49 (0) 721/ 5606-0
 Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
 info@carlroth.com • www.carlroth.com ip 07/2021

The company is a limited partnership with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRA 100055. Roth Chemie GmbH, with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRB 100428, is the personally liable partner. Managing Director: André Houdelet. Sales tax identification number: DE 143621073.

ROTI®Black NSeq	N769.1	1 Kit
	N769.2	1 Kit

KURZÜBERSICHT

**ROTI®Black N - für die Silberfärbung von DNA
in freien und foliengestützten PAA-Gelen
N769.1/2**



Für Gelvolumina bis 10 ml, z.B. 10 cm x 10 cm x 1 mm (40 ml, z.B. 20 cm x 20 cm x 1 mm).

Ausführliche Anleitung siehe II der Gebrauchsanweisung.

1. Fixierung	15 min in 100 ml (200 ml) Fixierlösung <u>Fixierlösung für alle Gele:</u> 20 ml (40 ml) Methanol + 5 ml (10 ml) Eisessig auf 100 ml (200 ml) mit H ₂ O _{dd} auffüllen <u>alternative Fixierlösung nur für freie Gele:</u> 15 ml (30 ml) Ethanol + 5 ml (10 ml) Eisessig auf 100 ml (200 ml) mit H ₂ O _{dd} auffüllen	15 min
2. Vorbereitung (während 1.)	I. 1 ml H ₂ O _{dd} zu Reaktionsgefäß A, vortexen II. 300 µl H ₂ O _{dd} zu Reaktionsgefäß C, vortexen III. 500 ml H ₂ O _{dd} in die Flasche „D - Natriumcarbonat“, rühren IV. 1 l H ₂ O _{dd} in die Flasche „E - Stopplösung“, rühren	-
3. Waschschritte während 3.	2 x 5 min mit je 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} <u>Imprägnierungslösung ansetzen:</u> Inhalt des Reaktionsgefäßes A in 100 ml (200 ml) verdünnen + 100 µl (200 µl) Formaldehyd aus Reaktionsgefäß B, mischen	10 min
4. Silber- imprägnierung während 4.	30 min in 100 ml (200 ml) Imprägnierungslösung <u>Entwicklungslösung ansetzen:</u> 20 ml (40 ml) Natriumcarbonat-Lösung (D) + 60 ml (120 ml) H ₂ O _{dd} , gut durchmischen + 100 µl (200 µl) aus dem Reaktionsgefäß C + 100 µl (200 µl) Formaldehyd aus dem Reaktionsgefäß B auf 100 ml (200 ml) mit H ₂ O _{dd} auffüllen <u>Stopplösung N ansetzen:</u> 100 ml (200 ml) Stopplösung (E) + 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} , gut durchmischen	30 min
5. Waschschritt	1 x 20 s in 150 ml (300 ml) H ₂ O _{dd}	20 s
6. Entwicklung	Inkubation in Entwicklungslösung bis die DNA-Banden gefärbt sind.	ca. 2-5 min
7. Stoppen	1 x 20 s in 100 ml (200 ml) Stopplösung N spülen, dann ≥ 10 min in 100 ml (200 ml) Stopplösung N inkubieren	20 s 10 min
8. Waschschritte während 8.	1 x 20 min in 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} <u>Trocknungslösung ansetzen:</u> 10 ml (20 ml) Glycerin + 15 ml (30 ml) Ethanol auf 100 ml (200 ml) mit H ₂ O _{dd} auffüllen	20 min
9. Trocknung	≥ 30 min in 100 ml (200 ml) Trocknerlösung. Anschließend können Sie das Gel zwischen zwei Cellophanfolien trocknen.	≥ 30 min

Für Schritt 1-9 benötigen Sie ca. 110 min.

SUMMARY

**ROTI®Black N – for silver staining of DNA
in conventional and film supported PAA gels
N769.1/2**



For gel volumes up to 10 ml, e.g. 10 cm x 10 cm x 1 mm (40 ml, e.g. 20 cm x 20 cm x 1 mm).

See II for detailed instructions.

1. Fixation	15 min in 100 ml (200 ml) Fixative <u>Fixative for all gels:</u> 20 ml (40 ml) Methanol + 5 ml (10 ml) Eisessig adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H ₂ O _{dd} <u>Alternative Fixative for conventional gels only:</u> 15 ml (30 ml) Ethanol + 5 ml (10 ml) Acetic acid adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H ₂ O _{dd}	15 min
2. Preparation (during 1.)	I. 1 ml H ₂ O _{dd} to tube A, vortex II. 300 µl H ₂ O _{dd} to tube C, vortex III. 500 ml H ₂ O _{dd} to bottle D - sodium carbonate, mix IV. 1 l H ₂ O _{dd} to bottle E - stop solution, mix	-
3. Washing during 3.	2 x 5 min with 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} each <u>Prepare Impregnation solution:</u> Dilute contents of tube A in 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} Add 100 µl (200 µl) formaldehyde from tube B, mix	10 min
4. Silver impregnation during 4.	30 min in 100 ml (200 ml) impregnation solution <u>Prepare Developing solution:</u> 20 ml (40 ml) sodium carbonate solution (D) + 60 ml (120 ml) H ₂ O _{dd} , mix thoroughly + 100 µl (200 µl) from tube C + 100 µl (200 µl) formaldehyde from tube B adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H ₂ O _{dd} <u>Prepare Stop solution N:</u> 100 ml (200 ml) stop solution (E) + 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} , mix thoroughly	30 min
5. Washing	1 x 20 s in 150 ml (300 ml) H ₂ O _{dd} .	20 s
6. Developing	Inkubation in developing solution until DNA-bands are visible.	ca. 2-5 min
7. Stop	Rinse 1 x 20 s in 100 ml (200 ml) stop solution N, then incubate ≥ 10 min in 100 ml (200 ml) stop solution N	20 s 10 min
8. Washing during 8.	1 x 20 min in 100 ml (200 ml) H ₂ O _{dd} <u>Prepare Drying solution:</u> 10 ml (20 ml) glycerol + 15 ml (30 ml) ethanol adjust the volume to 100 ml (200 ml) with H ₂ O _{dd}	20 min
9. Drying	≥ 30 min in 100 ml (200 ml) drying solution. The gel can then be dried between two sheets of cellophane film.	≥ 30 min

Approximately 110 minutes are required for steps 1 – 9.