Gebrauchsanweisung

ROTI®Black NSeq

Silberfärbungskit für DNA in Sequenziergelen

I Technische Hinweise

I.1 Allgemeine Tipps zur Silberfärbung

Die Silberfärbung wird mit dem auf die Glasplatte polymerisierten Gel durchgeführt.
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 Silberfärbungen

- 10 x Silbernitrat (P082) in Reaktionsgefäßen mit der Bezeichnung: **A**

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

- 10 x Formaldehyd (P083) 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 (P084) in Reaktionsgefäßen mit der Bezeichnung: **C**

- 2 x Natriumcarbonat: **D** (P085)

  Achtung H319
  P305+P351+P338-P337+P313
  (Wir empfehlen zur Aufbewahrung das Autoklavieren der frisch angesetzten Lösung.)

- 2 x Stopplösung (P086), Bezeichnung: **E**

  Achtung H373 P260

Die Einzelbestandteile dieses Kits können nicht separat nachgekauft werden.

I.3 Zusätzlich zum Kit benötigte Chemikalien

Wasser doppelt destilliert, Best.-Nr. 3478.1
Essigsäure 100% p.a. (Eisessig), Best.-Nr. 3738.1

II Arbeitsanleitung

Für Gelvolumina bis 48 ml (z.B. 30 cm x 40 cm x 0,4 mm)

Führen Sie die Arbeitsschritte unter sanftem Schütteln durch. Die Silberfärbung wird mit dem auf die Glasplatte polymerisierten Gel durchgeführt.

II.1 Fixierung der DNA im Gel:

nach der Elektrophorese in 500 ml Fixierlösung, Fixierzeit: 1-3 h.

Fixierlösung (500 ml)
50 ml Eisessig
+ 450 ml H_2O_{dd}

II.2 Vorbereitungen:

- Zentrifugieren Sie ein Reaktionsgefäß mit der Beschriftung **A** kurz ab. Pipettieren Sie 1 ml H_2O_{dd} dazu. Lösen Sie das Silbernitrat unter Vortexen vollständig.
- Zentrifugieren Sie ein Reaktionsgefäß mit der Beschriftung **C** kurz ab. Pipettieren Sie dazu 1 ml H_2O_{dd} und lösen Sie das Natriumthiosulfat unter Vortexen vollständig.
- Geben Sie zum Inhalt einer Flasche mit der Bezeichnung **D** - Natriumcarbonat 1000 ml H_2O_{dd} und lösen Sie den Inhalt unter Rühren. Bei Bedarf wird der Inhalt der zweiten Flasche aufgelöst.
- Geben Sie zum Inhalt einer Flasche mit der Bezeichnung **E** - Stopplösung 1000 ml H_2O_{dd} und lösen Sie den Inhalt unter Rühren und Erwärmen. Bei Bedarf wird der Inhalt der zweiten Flasche aufgelöst.

II.3 Waschschritte:

2 x 5 min in je 500 ml H_2O_{dd}

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

II.4. Silberimprägnierung:

30 min in 500 ml Imprägnierungslösung.

Imprägnierungslösung:
Pipettieren Sie den Inhalt eines Reaktionsgefäßes **A** zu 500 ml H_2O_{dd}. Pipettieren Sie dazu 500 µl Formaldehyd aus einem Reaktionsgefäß **B**, mischen Sie gut durch.

Setzen Sie bitte während der Imprägnierung die Entwicklungslösung (siehe Punkt 6) und die Stopplösung NSeq (siehe Punkt 7) an.

II.5. Waschschritt:

1 x 20 s in 500 ml H_2O_{dd}

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 (500 ml):
Mischen Sie diese Lösung bitte unter permanentem Rühren.
200 ml Natriumcarbonat-Lösung **D**
+ 300 ml H_2O_{dd}.
+ 100 µl aus dem Reaktionsgefäß **C***
+ 500 µl CH_2O aus dem Reaktionsgefäß **B**
* Bei Auftreten von Gelbfärbung können Sie das Volumen auf 200 µl erhöhen. Den Rest der Natriumthiosulfat-Lösung (Reaktionsgefäß **C**) können Sie verwerfen.

II.7. Stopp:

1x 20 s in 500 ml Stopplösung NSeq spülen. Inkubieren Sie das Gel für ≥15 min in 500 ml Stopplösung NSeq

Stopplösung NSeq (1000 ml):
200 ml Stopplösung (E)
+ 800 ml H_2O_{dd}, gut durchmischen.

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.8. Waschschritt:

1 x 20 min in 500 ml H_2O_{dd}

II.9. Trocknung:

Lassen Sie das Gel einfach bei Raumtemperatur trocknen.

ROTI®Black NSeq	**P081.1**	**1 Kit**

ROTI®Black NSeq

Silver staining kit for DNA in sequencing gels

I Technical Information

I.1 General tips on silver staining

Silver staining is performed with the polymerised gel still sticking to one glass plate.
Please ensure that the glass plates, glass vessels and bowls used in the process are clean.
Please wear gloves.
Please use bidistilled, deionised water.
For reproducible results, please keep to the recommended times as closely as possible.
Please ensure that the solutions used have a temperature of app. 20 °C.

I.2 Kit components sufficient to stain 10 gels

- 10 x silver nitrate (P082) in reaction tubes labelled **A**
  Danger H272-H290-H314-H410
  P273-P280-P303+P361+P353-P305+P351+P338-P310
- 10 x formaldehyde (P083) in reaction 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 (P084) in reaction tubes labelled **C**
- 2 x Sodium carbonate **D** (P085)
  Warning H319
  P305+P351+P338-P337+P313

  (For long-time storage we recommend autoclaving of the freshly prepared solution.)
- 2 x Stop solution (P086) labelled **E**
  Warning H373 P260

Contents of this Kit may not be bought separately.

I.3 Additional chemicals required

Water, bidistilled, Art. No. 3478.1
Acetic acid 100 % p.a., Art. No. 3738.1

II Instructions for silver staining

For gel volumes up to 48 ml (e.g. 30 cm x 40 cm x 0.4 mm)

Please carry out individual working phases under gentle shaking. Silver staining is perfomed with the polymerised gel still sticking to one glass plate.

II.1 Fixation of the DNA in gel:

After electrophoresis in 500 ml fixative for 1–3 h.

Fixative (500 ml)
50 ml Acetic acid
+ 450 ml H_2O_{dd}

II.2 Preparation:

- Briefly centrifuge reaction tube **A**. Pipette 1 ml H_2O_{dd} into the tube. Completely dissolve the silver nitrate by vortexing.
- Briefly centrifuge reaction tube **C**. Pipette 1 ml H_2O_{dd} into the tube and completely dissolve the sodium thiosulphate by vortexing.
- Add 1000 ml H_2O_{dd} to bottle marked '**D** - sodium carbonate and dissolve the contents by stirring. If required, also dissolve the contents of the second bottle.
- Add 1000 ml H_2O_{dd} to bottle marked '**E** - stop solution, and dissolve the contents by stirring and heating. If required, also dissolve the contents of the second bottle.

II.3 Washing:

2 x 5 min in 500 ml each H_2O_{dd}

Prepare the impregnation solution (see Phase 4) during the washing steps.

II.4 Silver impregnation:

30 min in 500 ml impregnation solution.

Impregnation solution:
Pipette contents of reaction tube **A** to 500 ml H_2O_{dd}. Also add 500 µl formaldehyde by pipetting from reaction tube **B**. Mix thoroughly.

Prepare the developing solution (see Phase 6) and stop solution NSeq (see Phase 7) during impregnation.

II.5 Washing:

1 x 20 s in 500 ml H_2O_{dd}

II.6 Developing:

Incubate gel in the developing solution until DNA-bands have been stained. Remove developing solution and **quickly** move on to step 7.

Developing solution (500 ml):
Please mix this solution under constant stirring.
200ml sodium carbonate solution (**D**)
+ 300 ml H_2O_{dd}
+ 100 µl from reaction tube **C***
+ 500 µl CH_2O from reaction tube **B**

* Volume may be increased to 200 µl in the event of yellow staining.
The remaining sodium thiosulphate solution (reaction tube C) may be discarded.

II.7 Stop:

Rinse 1 x 20 s in 500 ml stop solution NSeq
Incubate gel for ≥15 min in 500 ml stop solution NSeq.

Stop solution NSeq (1000 ml):
Mix 200 ml stop solution (**E**)
+ 800 ml H_2O_{dd} well.

II.8 Washing:

1 x 20 min in 500 ml H_2O_{dd}

II.9 Drying:

Allow gel to dry at room temperature.

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.

KURZÜBERSICHT

ROTI®Black NSeq - für die Silberfärbung von DNA in Sequenziergelen

P081.1

Für Gelvolumina bis 48 ml (z.B. 30 cm x 40 cm x 0,4 mm).
Ausführliche Anleitung siehe II der Gebrauchsanweisung.
Die Silberfärbung wird mit dem auf die Glasplatte polymerisierten Gel durchgeführt.

1. Fixierung	1h - 3h in 500 ml Fixierlösung Fixierlösung: 50 ml Eisessig + 450 ml H_2O_{dd}	≥60 min
2. Vorbereitung **(während 1.)**	I. 1 ml H_2O_{dd} zu Reaktionsgefäß A, vortexen II. 1 ml H_2O_{dd} zu Reaktionsgefäß C, vortexen III. 1 l H_2O_{dd} in die Flasche „D - Natriumcarbonat“, rühren IV. 1 l H_2O_{dd} in die Flasche „E - Stopplösung“, rühren	-
3. Waschschritte	2 x 5 min mit je 500 ml H_2O_{dd}	10 min
während 3.	Imprägnierungslösung ansetzen: Inhalt des Reaktionsgefäßes A in 500 ml H_2O_{dd} verdünnen + 500 µl Formaldehyd aus Reaktionsgefäß B, mischen	
4. Silber-imprägnierung	30 min in 500 ml Imprägnierungslösung	30 min
während 4.	Entwicklungslösung ansetzen: 200 ml Natriumcarbonat-Lösung (D) + 300 ml H_20_{dd}, gut durchmischen + 100 µl aus dem Reaktionsgefäß C + 500 µl Formaldehyd aus dem Reaktionsgefäß B Stopplösung NSeq ansetzen: 200 ml Stopplösung (E) + 800 ml H_20_{dd}, gut durchmischen	
5. Waschschritt	1 x 20 s in 500 ml H_2O_{dd}	20 s
6. Entwicklung	Inkubieren in Entwicklungslösung bis die DNA-Banden gefärbt sind.	ca. 2-5 min
7. Stoppen	1 x 20 s in 500 ml Stopplösung NSeq spülen, dann ≥ 15 min in 500 ml Stopplösung NSeq inkubieren	20 s 15 min
8. Waschschritte	1 x 20 min in 500 ml H_2O_{dd}	20 min
9. Trocknung	Lassen Sie das Gel einfach bei Raumtemperatur trocknen.	über Nacht

Für Schritt 1-8 benötigen Sie ca. 140 min.

SUMMARY

ROTI®Black NSeq – for silver staining of DNA in sequencing gels

P081.1

For gel volumes up to 48 ml (e.g. 30 cm x 40 cm x 0.4 mm).
See II for detailed instructions.
Silver staining is performed with the polymerised gel still sticking to one glass plate.

1. Fixation	1 h – 3 h in 500 ml Fixative: 50 ml Acetic acid (100%) + 450 ml H_2O_{dd}	≥60 min
2. Preparation **(during 1.)**	I. 1 ml H_2O_{dd} to tube A, vortex II. 1 ml H_2O_{dd} to tube C, vortex III. 1 l H_2O_{dd} to bottle D - sodium carbonate, mix IV. 1 l H_2O_{dd} to bottle E - stop solution, mix	-
3. Washing	2 x 5 min with 500 ml H_2O_{dd} each	10 min
during 3.	Prepare Impregnation solution: Dilute contents of tube A in 500 ml H_2O_{dd} Add 500 µl formaldehyde from tube B, mix thoroughly	
4. Silver impregnation	30 min in 500 ml impregnation solution	30 min
during 4.	Prepare Developing solution: 200 ml sodium carbonate solution (D) + 300 ml H_2O_{dd}, mix thoroughly + 100 µl from tube C + 500 µl formaldehyde from tube B Prepare Stop solution NSeq: 200 ml stop solution (E) + 800 ml H_2O_{dd}, mix thoroughly	
5. Washing	1 x 20 s in 500 ml H_2O_{dd}.	20 s
6. Developing	Incubation in developing solution until DNA-bands are stained.	ca. 2-5 min
7. Stop	Rinse 1 x 20 s in 500 ml stop solution NSeq, then incubate ≥15 min in 500 ml stop solution Nseq	20 s 15 min
8. Washing	1 x 20 min in 500 ml H_2O_{dd}	20 min
9. Drying	Allow the gel to dry at room temperature.	Over night

Approximately 140 minutes are required for steps 1 – 8.