

Gelfärbung von Nukleinsäuren

Gel-Färbelösungen

Nukleinsäure-Färbereagenzien für Agarose- und Acrylamidgele, für Labor und Praktikum. Wir bieten Ihnen hochwertige Farbstoffe mit großer Sensitivität (Silberfärbungen), Standardfarbstoffe (Ethidiumbromid) in benutzerfreundlichen Tropfflaschen und nicht-toxische Fluoreszenzfarbstoffe. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Wirkungs- und Anwendungsweise und ihre Sensitivität.

Übersicht: Färbung von Nukleinsäuren in Gelen

Farbstoff	Best.-Nr.	Sensitivität	Beschreibung
Ethidiumbromid-Lösungen	2218 (1 %) HP46 (0,5 %) HP47 (0,025 %)	0,5 - 5 ng/Gel-Bande	<ul style="list-style-type: none"> Schnelle Standard-Fluoreszenzfärbung von Nukleinsäuren Anregung: 254-360 nm Geeignet für <i>In-Gel</i> und <i>Post-Run</i>-Färbung
ROTI®Black N	N769	<0,01 ng/Gelbande	<ul style="list-style-type: none"> Silberfärbung von DNA-Polyacrylamidgelen, Sichtbar unter weißem Licht. Geeignet für <i>Post-Run</i> Färbung
ROTI®Black NSeq	P081	<0,01 ng/Gelbande	<ul style="list-style-type: none"> Silberfärbung von DNA-Sequenziergelen Sichtbar unter weißem Licht. Geeignet für <i>Post-Run</i>-Färbung
ROTI®GelStain	3865	<0,3 ng/Gelbande	<ul style="list-style-type: none"> Sensitive Fluoreszenzfärbung von DNA & RNA in Agarose- oder PAA-Gelen. Anregung: 302 nm und 490 nm. Ungiftig, nicht krebserregend. Geeignet für <i>In-Gel</i>-Färbung
ROTI®GelStain Red Eco	223C	>0,1 ng/Gelbande	<ul style="list-style-type: none"> Sensitive Fluoreszenzfärbung von DNA & RNA in Agarose- oder PAA-Gelen. Anregung: 300 nm und 500 nm Nicht toxisch, nicht krebserregend Geeignet für <i>In-Gel</i> und <i>Post-Run</i> Färbung
ROTI®Methylene blue staining concentrate	0648	10 ng/Gelbande	<ul style="list-style-type: none"> Reversible, nicht-toxische Blaufärbung der DNA Sichtbar unter weißem Licht Geeignet für <i>Post-Run</i> Färbung
SYBR®Green	1CN2 1CN5* 1CN6* 1CN7* *Mix with Loading Dye	0,01 ng/Gelbande	<ul style="list-style-type: none"> Sehr empfindliche Fluoreszenzfärbung von DNA in Agarose- oder PAA-Gelen. Anregung: 254 nm und 495 nm. Geeignet für <i>In-Sample</i>-Färbung

Technische Info

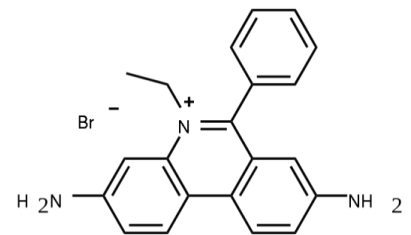
Ethidiumbromid

Anwendung

- Geeignet für In-Gel-Färbung, Post-Run-Färbung und In-Sample-Färbung von allen Agarose- und PAA-Gelen.
- Sensitivität: 0,5 - 5 ng/Gelbande

Mechanismus

- Interkalation* zwischen Basenpaaren von Nukleinsäuren
- Sehr starke Bindung an dsDNA
- Fluoreszenzfärbung, erfordert UV-Anregung
- **Anregungsmaxima** (gebundene DNA) 330 nm und 500 nm (Anregung bei 260-350 nm möglich). **Emissionsmaximum:** 605 nm



Gefährdung

Gefährlich bis toxisch, Karzinogenität kann nicht völlig ausgeschlossen werden.

Sicherheit

Positiv im Ames-Test* potenziell erbgutverändernd

Färbung

- Zugabe zum Ladepuffer /Nukleinsäure „In-Sample“ [ca. 2 µg/ml]
- Zugabe zum Gel „In-Gel“ (Flüssigagarose) [ca. 0,2 µg/ml]
- Färbung nach der Elektrophorese „Post-Run“ [ca. 2 µg/ml, 10 Min, optional: Entfärbung für 15 Min.]
- Färbung prinzipiell reversibel, aber schwer zu entfernen



Bitte beachten Sie

- Bei Anwendung während des Gellaufs: Nukleinsäuren, die mit Ethidiumbromid versetzt wurden, zeigen ein leicht verändertes Laufverhalten im Vergleich zu freien Nukleinsäuren
- Lineare dsDNA wird intensiver gefärbt als ssDNA, RNA oder zyklische dsDNA
- Eine Quantifizierung der DNA im Gel ist möglich, wenn die verglichene DNA eine identische Sekundär- und Tertiärstruktur aufweist. z. B.: Vergleich nur von zyklischer DNA mit ebenso zyklischer DNA

*Informationen über den Zusammenhang zwischen DNA-Interkalation und Mutagenität oder die Untersuchung der Mutagenität finden Sie auf S. 8.

Technische Info

ROTI®Black N and ROTI®Black NSeq

Anwendungen

- Geeignet für die Post-Gel-Färbung von PAA-Gelen (ROTI®Black N) und Sequenziergelen (ROTI®Black NSeq)
- Geeignet für die Färbung von dsDNA, ssDNA und RNA.
- Sensitivität: <0,01 ng/Gelbande

Mechanismus

- Positiv geladene Silberionen binden sich an negativ geladene DNA
- Die Zugabe von Formaldehyd reduziert die Silberlösung zu metallischem Silber
→ unter weißem Licht als schwarz sichtbar

Gefährdung

Enthält gefährliche und giftige Reagenzien (Formaldehyd), mit Vorsicht behandeln

Sicherheit

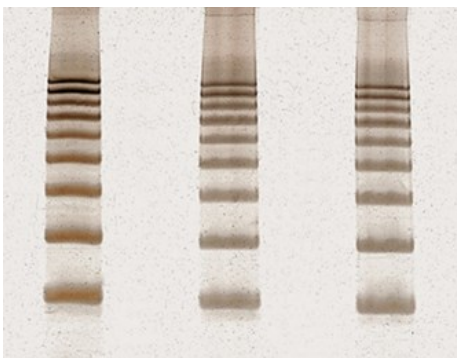
Sichere Alternative zur radioaktiven Visualisierung

Färbung

- Ultra-empfindliche Färbung von Nukleinsäuren
- Post-Run-Färbung von PAA-Gelen
- Färbung ist nicht reversibel

Bitte beachten Sie

- Bitte halten Sie die genauen Zeiten für reproduzierbare Ergebnisse ein
- Empfindlicher als organische Färbungen
- Färbung ist für mehrere Wochen stabil
- DNA-Quantifizierung im Gel ist möglich

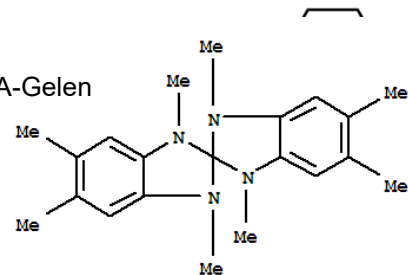


Technische Info

ROTI®GelStain

Anwendungen

- Geeignet für die In-Gel-Färbung von allen Agarosegelen und PAA-Gelen
- Geeignet für die Färbung von dsDNA, ssDNA und RNA.
- Empfindlichkeit: 0,1 - 0,3 ng/Gelbände



Mechanismus

- ROTI®GelStain ist ein interkalierender Nukleinsäure-Farbstoff*.
- Fluoreszenzfärbung, erfordert UV-Anregung oder blaues Licht zur Visualisierung
- Anregungsmaximum (DNA gebunden): 302nm und 490nm. Emissionsmaximum (gebundene DNA): 520nm

Gefährdung

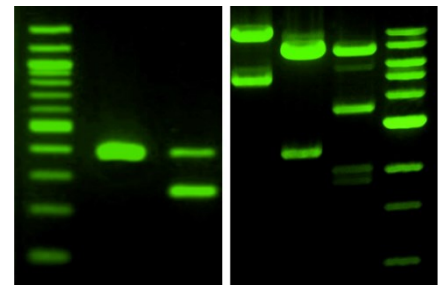
Keine bekannt.

Sicherheit

- Weniger Mutationen als Ethidiumbromid im Ames-Test*
- Negativ im Mausmark-Chromophilus-Erythrozyten-Mikronukleustest und im Mausspermatocyten-Chromosomenaberrationstest*

Färbung

- Die Färbung ist reversibel, aber schwer zu entfernen
- Setzt grüne Fluoreszenz frei, wenn es an dsDNA, ssDNA oder RNA gebunden ist
- Zugabe zum Flüssigel [5µl/100ml] und zum Laufpuffer [5µl/100ml]
- Eine Zugabe zum Ladebuffer/Probe wird nicht empfohlen
- Eine Färbung nach dem Lauf wird nicht empfohlen.



Bitte beachten Sie

- Für nachfolgende Klonierungsanwendungen empfehlen wir ROTI®GelStain Red Eco (223C), da ROTI®GelStain Ligationsreaktionen stören kann
- Nebeneffekte der In-Gel-Färbung: Nukleinsäure, die mit ROTI®GelStain beladen wurde, zeigt ein leicht verändertes Laufverhalten im Vergleich zu freier Nukleinsäure.
- Die Färbung ist abhängig von der Sekundär- und Tertiärstruktur der Nukleinsäuren. Aufgrund des Basenstapel-Interkalationsmechanismus werden längere Fragmente von linearer dsDNA effizienter angefärbt als kurze Fragmente (unter 500 bp), ssDNA, kurze RNA oder zyklische dsDNA.
- Eine Quantifizierung der DNA im Gel ist möglich, sofern beide verglichenen DNA-Proben die gleiche Sekundär- und Tertiärstruktur aufweisen. Zyklische DNA sollte zum Beispiel nur durch Vergleich mit einem mit einem zyklischen DNA-Standard quantifiziert werden.

* Informationen über den Zusammenhang zwischen DNA-Interkalation und Mutagenität oder die Untersuchung der Mutagenität finden Sie auf S. 8.

Technische Info

ROTI®GelStain Red Eco

Anwendungen

- Geeignet für In-Gel- und Post-Run-Färbung aller Agarose- und PAA-Gele.
- Geeignet für die Färbung von dsDNA, ssDNA, RNA und kurzer DNA
- Sensitivität: >0,1 ng/Gelbande

Mechanismus

- ROTI®GelStain Red Eco ist ein interkalierender Nukleinsäure-Farbstoff*.
- Fluoreszenzfärbung, erfordert UV- oder Blaulichtanregung zur Visualisierung
- Auch unter blauem LED-Licht sichtbar
- Anregungsmaximum (DNA gebunden): 300 nm (UV-Licht) und 500 nm (blaues Licht). Emissionsmaximum (gebundene DNA): 600 nm

Gefährdung

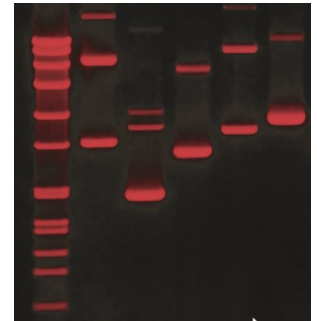
Keine bekannt

Sicherheit

- Weniger Mutationen als Ethidiumbromid im Ames-Test*

Färbung

- Die Färbung ist im Prinzip reversibel, aber schwer zu entfernen
- Emittiert orangefarbene Fluoreszenz, wenn es an dsDNA, ssDNA oder RNA gebunden ist
- Für In-Gel-Färbung: Zugabe zum flüssigen Gel [10µl / 100ml]
- Für Post-Run-Färbung: Zugabe zum Elektrophoresepuffer [30µl / 100µl]
- Eine Zugabe zum Ladepuffer/Probe wird nicht empfohlen.



Bitte beachten Sie

- Nebeneffekte der In-Gel-Färbung: Nukleinsäure, die mit ROTI®GelStain Red Eco beladen wurde, zeigt ein leicht verändertes Laufverhalten im Vergleich zu freier Nukleinsäure.
- Für Klonierungsanwendungen: UV-Belastung so gering wie möglich halten, vorzugsweise nur mit blauem Licht arbeiten.
- Eine Quantifizierung der DNA im Gel ist möglich. Solange die DNA-Leiter, die als Referenz für die Quantifizierung verwendet wird, und die zu quantifizierenden DNA-Proben auf demselben Gel mit demselben Färbemittel gefärbt werden, können die Leiterbanden bekannter Menge als Referenz für die ungefähre Quantifizierung der DNA-Banden im Gel verwendet werden.

* Informationen über den Zusammenhang zwischen DNA-Interkalation und Mutagenität oder die Untersuchung der Mutagenität finden Sie auf S. 8.

Technische Info

Methylenblau-Färbekonzentrat

Anwendung

- Geeignet für das Post-Staining von dünnen Agarose- (1,5 % Agarose) und PAA-Gelen.
- Geeignet für die reversible Färbung von Southern- und Northern Blots
- Geeignet für die Färbung von dsDNA, ssDNA und RNA.
- Sensitivität: 10 ng/Gelbande

Mechanismus

- Positiv geladene Ammoniumgruppe von Methylenblau bindet an negativ geladene DNA
- Die ionische Bindung an die Phosphorsäure der Nucleinsäuren führt zu einer schwachen Bindung
- Blaue Färbung, sichtbar im weißen Licht

Gefährdung

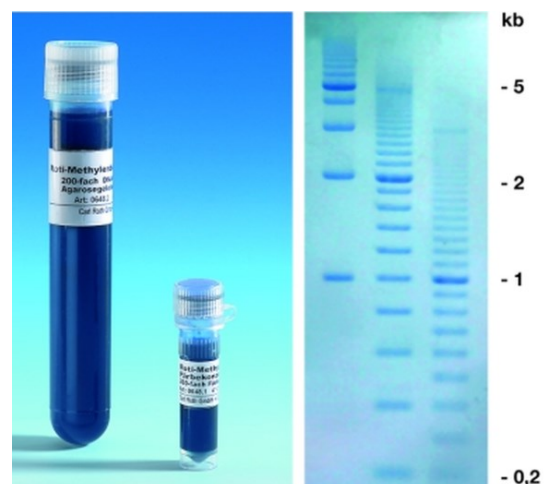
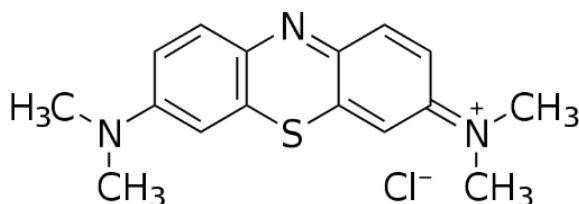
Keine bekannt

Färbung

- Post-Run-Staining für 10 - 30 min [250 µl / 50 ml Wasser]
- Entfärbung für 15 min. bis über Nacht erforderlich
- Reversible Färbung, leicht zu entfernen

Bitte beachten Sie

- Das Methylenblau-Färbekonzentrat enthält ein Lösungsmittel, wodurch die DNA nach Zugabe in den Ladebuffer ausgefällt wird.
- dsDNA/RNA wird intensiver gefärbt als ssDNA/RNA





Guter Rat ist Roth.

Technische Info

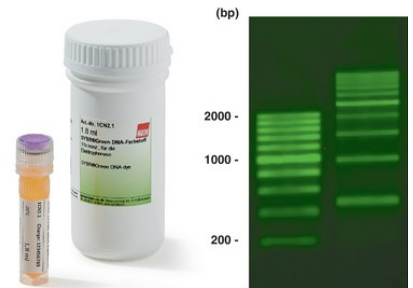
SYBR®Green

Anwendungen

- Geeignet für In-Sample-Färbung aller Agarose- und PAA-Gele
- Geeignet für die Färbung von dsDNA
- Sensitivität: 0,1 ng/Gelbande

Mechanismus

- Interkaliert in der kleinen Furche der dsDNA oder zwischen den Basenstapeln (geringere Menge)¹
- Fluoreszenzfärbung, erfordert UV- oder Blaulichtanregung zur Visualisierung
- Anregungsmaximum (gebundene DNA): 254 nm (UV-Licht) und 495 nm (blaues Licht. Emissionsmaximum (gebundene DNA): 521 nm



Gefährdung

Die SYBR®Green Färbelösung ist sehr niedrig konzentriert (<0,1 %) und daher nicht als mutagen eingestuft. Dennoch empfehlen wir einen vorsichtigen Umgang, da Karzinogenität und Mutagenität nicht vollständig ausgeschlossen werden können.

Sicherheit

- Weniger Mutationen als Ethidiumbromid im Ames-Test^{2*}
- Zytotoxischer als Ethidiumbromid²

Färbung

- Besonders mild, beeinträchtigt nicht die Integrität der DNA
- Emittiert grüne Fluoreszenz bei Bindung an die DNA
- Hohe DNA-Affinität → für ein starkes Signal ist nur eine geringe Menge an Farbstoff erforderlich
- Reversible Färbung, leicht zu entfernen
- Post-Run-Färbung und In-Gel-Färbung werden aufgrund der großen Menge an Farbstoff, die erforderlich wäre, nicht empfohlen.

Bitte beachten Sie

- Nebeneffekte der In-Sample-Färbung: Nukleinsäure, die mit SYBR®Green beladen wurde, zeigt ein leicht verändertes Laufverhalten im Vergleich zu freier Nukleinsäure. Tipp: Verwenden Sie vorgefärbte DNA-Leitern (1CN8.1 oder 1CN9.1) als Referenz.
- Für Klonierungsanwendungen: Halten Sie die UV-Exposition so gering wie möglich, arbeiten Sie vorzugsweise nur mit blauem Licht.
- DNA-Quantifizierung im Gel ist möglich. Solange der DNA-Marker, der als Referenz für die Quantifizierung verwendet wird, und die zu quantifizierenden DNA-Proben auf demselben Gel mit demselben Färbemittel ausgeführt und gefärbt werden, kann der Marker als Referenz für die ungefähre Quantifizierung der DNA-Banden im Gel verwendet werden

* Informationen über den Zusammenhang zwischen DNA-Interkalation und Mutagenität oder die Untersuchung der Mutagenität finden Sie auf S. 8.





Guter Rat ist Roth.

Technische Info

DNA Interkalation und Mutagenität

DNA Interkalation

Eine häufige Frage im Zusammenhang mit der Sicherheit von DNA-Farbstoffen ist, ob DNA-Farbstoffe tatsächlich in die DNA interkalieren oder ob sie nur an bestimmte DNA-Strukturen (wie die kleine Furche) binden. Der Grund für diese Frage ist, dass angenommen wird, dass interkalierende DNA-Farbstoffe ein höheres Potenzial haben, mutagen und damit karzinogen zu sein. In der Tat können Farbstoffe, die in die DNA interkalieren, die Replikationsmaschinerie stören und so zu Mutationen führen^{3,4}. Dies ist jedoch nicht das einzige Kriterium für die Mutagenität eines Farbstoffs. Selbst Farbstoffe wie Hoechst, die nur an der kleinen Furche der DNA binden, müssen vor der DNA-Replikation und Transkription entfernt werden, da sonst Mutationen auftreten können⁵.

Um die genotoxische Gefahr zu begrenzen, die sich aus der Wechselwirkung von DNA und Fluoreszenzfarbstoffen ergibt, gibt es zwei zusätzliche Bedingungen, die diese Gefahr einschränken: Die Membrandurchlässigkeit als physikalische Barriere und die Sensitivität des Farbstoffs, da bei einer höheren Sensitivität geringere Konzentrationen erforderlich sind und somit die Menge der DNA-Schäden reduziert wird.

Methoden zur Untersuchung der Mutagenität

Die Mutagenitätsrate bestimmter DNA-Färbemittel kann mit einigen gängigen Methoden getestet werden, darunter der Ames-Test oder der *In-vivo*-Mikronukleus-Assay im Knochenmark der Maus^{6,7}.

Beim Ames-Test werden auxotrophe *Salmonella typhimurium*-Bakterienstämme, die eine Mutation in einem Gen tragen, das an der Histidin-Synthese beteiligt ist, auf einem histidinfreien Medium kultiviert, das verschiedene Konzentrationen des potenziellen Mutagens enthält. Die Stämme können auf dem Medium nur wachsen, wenn sie eine Rückmutation im Gen für die Histidinsynthese erhalten, da dies ihre Prototrophie wiederherstellt. Wenn in diesem Medium eine erhöhte Anzahl von Zellen wächst, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Substanz das Potenzial hat, mutagen zu sein⁶.

Da die Substanzen jedoch auf ihr mutagenes Potenzial bei Säugetieren getestet werden müssen, da dies zur Entstehung von Krebs führen könnte, ist der Ames-Test allein nicht ausreichend, da Eukaryoten einen völlig anderen Stoffwechsel haben als Prokaryoten. Wenn eukaryontische Zellen einer Substanz ausgesetzt werden, die zwar durch den Ames-Test als nicht mutagen eingestuft wird, können durch den Stoffwechsel neue Produkte entstehen, die dann sehr wohl eine mutagene Wirkung auf das Erbgut haben. Aus diesem Grund müssen die potenziellen Mutagene auch in eukaryotischen Systemen getestet werden, zum Beispiel mit dem *in vivo* Mikronukleustest. Bei diesem zytogenetischen Test werden Tiere oder Zellkulturen mit genotoxischen Verbindungen behandelt. Anschließend werden die polychromatischen Erythrozyten untersucht, da während ihrer Entwicklung vom Knochenmark zu polychromatischen Erythrozyten der Zellkern verdrängt wird. Bei DNA-Schäden können Mikrokerne gebildet werden, die dann im ansonsten kernlosen Zytoplasma verbleiben und mikroskopisch nachgewiesen werden können. Wird eine Zunahme von mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten beobachtet, ist dies ein Hinweis auf eine induzierte Chromosomenschädigung⁷.

Fallen diese Mutagenitätstests negativ aus, ist das Mutagenitätspotenzial deutlich geringer. Um jedoch mögliche Mutationen vollständig auszuschließen und die Entstehung von Krebs zu verhindern, ist es ratsam, beim Umgang mit DNA-Farbstoffen Handschuhe zu tragen, insbesondere dann, wenn Sie diese häufig verwenden

lha 07/2023





Guter Rat ist Roth.

Technische Info

Quellen

- ¹**Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F.** Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* **2004** Jul 12;32(12):e103
- ²**Singer VL, Lawlor TE, Yue S.** Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test) *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **439** (1), pp. 37-47 (1999)
- ³**Biebricher A, Heller I, Roijmans R. et al.** The impact of DNA intercalators on DNA and DNA-processing enzymes elucidated through force-dependent binding kinetics. *Nat Commun* **6**, 7304 (2015)
- ⁴**Hurley, L.** DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2**, 188–200 (2002).
- ⁵**Durand RE, Olive PL.** Cytotoxicity, Mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33342. *J Histochem Cytochem.* **30**(2):111-6 (1982)
- ⁶**Ames BN, Mccann J, Yamasaki E.** Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res.* (**6**) 347-64 (1975)
- ⁷**Hayashi, M.** The micronucleus test—most widely used *in vivo* genotoxicity test—. *Genes and Environ* **38**, 18 (2016).

