

AugeGreen™, 20×in water (荧光定量 PCR 级染料)

产品货号

S2007

产品规格

1mL

储存条件

-20°C避光保存, 有效期见外包装

应用范围

实时定量 PCR、高分辨率溶解曲线

产品参数

$\lambda_{abs}/\lambda_{em} = 500/530 \text{ nm}$ (结合 DNA)

$\lambda_{abs} = 471 \text{ nm}$ (未结合 DNA)

产品介绍

AugeGreen 是一种用于实时定量 PCR (qPCR) 的 DNA 结合染料。该染料的诸多优点使它远胜于 SYBR Green I。除了有相似的光谱特性, AugeGreen 有三个主要特点使它区别于 SYBR Green I。

首先, AugeGreen 对 PCR 的抑制性远小于 SYBR Green I。因此, 使用 AugeGreen 进行的 qPCR 实验可以使用快速 PCR 步骤。同时, AugeGreen 在实验中可以使用较高的浓度, 从而获得远强于 SYBR Green I 扩增信号。较高浓度的 AugeGreen 也消除了“染料重分布”的缺陷, 使 AugeGreen 既可用于多重 PCR, 也可用于高分辨率 (高清晰) 溶解曲线分析 (HRM)。该分析正被越来越多的用于 PCR 后的基因分型和同源双链分析。由于 SYBR Green I 对 PCR 的抑制性, 从而要求其使用浓度必须很低, 因此 SYBR Green I 无法解决由低浓度造成的染料重分布问题, 既不能用于多重 PCR 也不能用于 HRM。同时, 染料重分布问题也可能影响常规溶解曲线的可靠性, 因为低熔点的 DNA 链可能由于这种原因而无法检测到。

第二, AugeGreen 的稳定性极强。在正常的储存、操作和 PCR 过程中不会被破坏。在缓冲溶液中的染料可以安全的储存在室温或冰箱里, 也可以反复冻融。与之相反, SYBR Green I 不稳定而且降解后对 PCR 抑制性更强。

第三, AugeGreen 降低了细胞膜透性, 因而比 SYBR Green I 更加安全。独立实验室的测试结果显示, AugeGreen 既没有诱变性也没有细胞毒性。相反, 虽然 SYBR Green I 本身诱变性很弱, 但它在细胞中可能抑制了正常 DNA 的修复机制, 使其有诱变增强作用。考虑到 PCR 的广泛使用, 其安全性应该足够重视。

AugeGreen 染料特性

1. 光谱特性

AugeGreen in TE Excitation/Emission

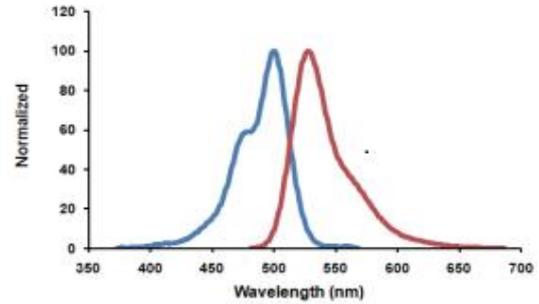


图1. 在TE缓冲液中, 结合到双链DNA中AugeGreen染料的激发光谱 (蓝色) 和发射光谱 (红色)

2. SYBR Green I 与 AugeGreen 荧光染料的稳定性比较

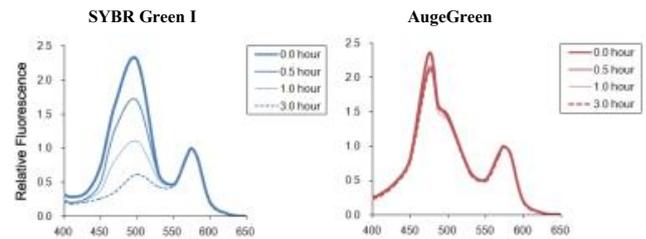


图2. AugeGreen、SYBR Green I 的吸收光谱 1.2 μM , pH9 的 Tris 缓冲液中, 99°C 孵育 3 h 后, 两种荧光染料溶液的相对荧光强度, ROX 作参照物

3. 染料的稳定性

Ames 实验显示, AugeGreen 染料没有细胞毒性和致突变性, 该染料不具细胞膜渗透性 (图 3), 这是其低细胞毒性的一个关键因素。相反地, 众所周知, SYBR Green I 荧光染料具有很强的致突变性, 可能原因是其抑制了细胞内 DNA 修复机制 (Ohta, etel. Mutat. Res.492, 91(2001)), 而 SYBR Green I 较强的细胞毒性是由其较高的细胞膜渗透性所导致的 (图 3)。

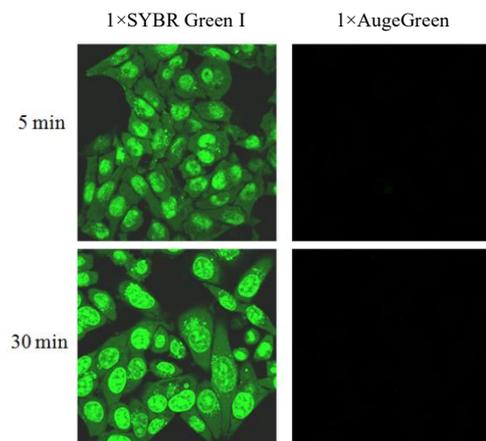


图3. 37°C条件下, 用 SYBR Green I 或 AugeGreen (1.2 μM) 孵育 HeLa 细胞, 分别在 5 min 或 30 min 后拍照, 观察荧光强度。SYBR Green I 迅速渗透进入细胞, 然而 AugeGreen 几乎不具有细胞膜渗透性。

使用方法

1. 如下建立实验体系：（仅供参考）

名称	体积
10×的无Mg ²⁺ 聚合酶缓冲液	5 μL
50 mM MgCl ₂	2.5 μL
2 mM dNTP	5 μL
20×AugeGreen工作液	2.5 μL
Taq DNA polymerase	1-5 units
F, R Primers	各0.1-0.5 μM
模板	适量
dH ₂ O	to a final volume of 50 μL

注：a. DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定合适的 DNA 模板添加量。cDNA 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。b. 引物终浓度一般控制在 0.1-0.5 μM 范围内。

2. 在 qPCR 仪器上进行实时荧光定量 PCR 并获得荧光在退火或延伸步骤中使用 SYBR Green 或 FAM 通道。

注意事项

1. qPCR 仪器：对于 iCycler 的用户，不需要在 PCR Mix 里面额外添加 FAM。由于 AugeGreen 有轻微的背景荧光，它可以作为充足且稳定的校准基线来使用。对于 Roche Light Cycler 的用户，如果使用玻璃毛细管进行反应，那么需要在反应体系中额外加入 BSA（终浓度 ~0.5 mg/mL）；如果使用透明的塑料毛细管，则不需要添加 BSA。

2. 溶解曲线分析仪器：Rotor-Gene 6000, ABI 7500 FAST, HR1™, 384-well LightScanner™, Roche LightCycler 480, Rotor-Gene 6000, ABI 7500 FAST 和 Roche LightCycler 480 等仪器都可以用于 qPCR 和溶解曲线的分析。具体参照仪器生产商的使用说明进行数据的采集和分析操作。

3. 扩增片段长度：推荐的 DNA 扩增长度为 50-200 bp，如果需要扩增更长的 DNA 片段，那么需要适当延长 PCR 的反应时间。

AugeGreen™ 使用说明（仅供参考）

实验目的

实时定量 PCR 检测 20×AugeGreen

主要试剂

1. Prime

hβ-actin: forward 5' -CACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' ;
reverse 5' -CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

2. HS Taq DNA Polymerase: Thermo(EP0612)

3. Glycerlo: Sigma(V900090-500 mL)

4. BSA: Sigma(A7030)

5. 10 mM dNTPs: Takara(4019)

实验方案

1. 配制 2×AugeGreen Buffer

组分	浓度	体积 (μL)
1 M Tris HCl pH8.5	50 mM	5
500 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM	4
50 mM MgCl ₂	7 mM	14
50% glycerol	2.5%	5
DMSO	10%	10

20×AugeGreen	2×	10
10 mM dNTPs	0.4 mM	4
2% Tween20	0.03%	1.5
1 mg/mL BSA	22 mg/mL	2.2
H ₂ O	/	44.3
Total volume	/	100

2. 配制 q-PCR 反应体系

成分	20 μL/体系/管反应
10 μM primers	1 μL
模板	适量
HS Taq DNA 酶 (5 U/μL)	0.2 μL
2×AugeGreen buffer	10 μL
H ₂ O	定容至 20 μL

注：a. DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定合适的 DNA 模板添加量。cDNA 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。b. 引物终浓度一般控制在 0.1-0.5 μM 范围内。

3. 实验分组：标准对照样品孔（阳性对照）、检测样品孔、空白对照孔（阴性对照）共三组，同时进行检测，分别进行三次平行实验。

4. 混匀离心、上机进行荧光定量 PCR（仪器为 Roche: LC96）。

PCR 程序

	温度	时间
Step 1	95°C	2 min
Step 2	95°C	5 sec
Step 3	60°C	30 sec
Step 2~3, 重复 45 个循环		
溶解曲线 Tm 值 57°C~99°C		

5. 保存数据，判断样本质量

A. 检测样品与标准品之间的 Ct 值差

B. 检测样品与标准品之间的荧光强度差

检测结果需达到：以上两组检测指标无显著性差异。