# AugeGreen™, 2000× in DMSO
# (荧光定量 PCR 级染料)

**产品货号：** S2032
**产品规格：** 50 μL
**储存条件**：-20℃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：**
λabs/λem = 500/530 nm(结合 DNA)
λabs = 471 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）熔解曲线分析（HRM）。该分析正被越来越多的用于 PCR 后的基因分型和异源双链分析。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熔解曲线的可靠性，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，AugeGree 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

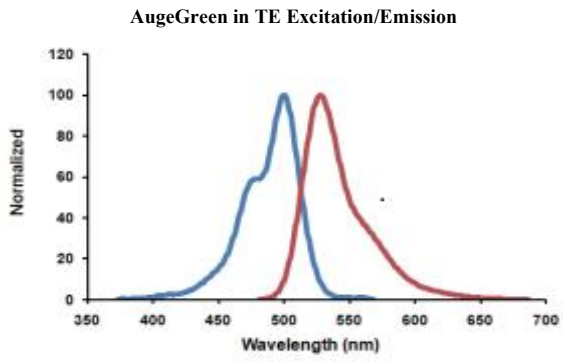


图 1. 在 TE 缓冲液中，结合到双链 DNA 中 AugeGreen 染料的激发光谱（蓝色）和发射光谱（红色）。

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

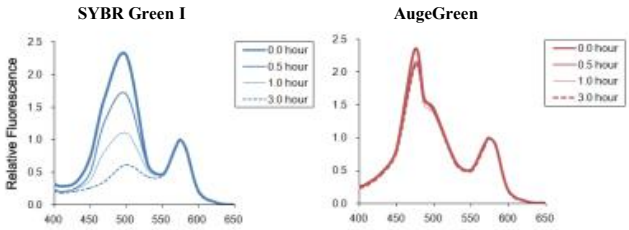


图 2. AugeGreen、SYBR Green I 的吸收光谱 1.2 μM, pH9 的 Tris 缓冲液中，99℃孵育 3 h 后，两种荧光染料溶液的相对荧光强度，ROX 作参照物

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）。

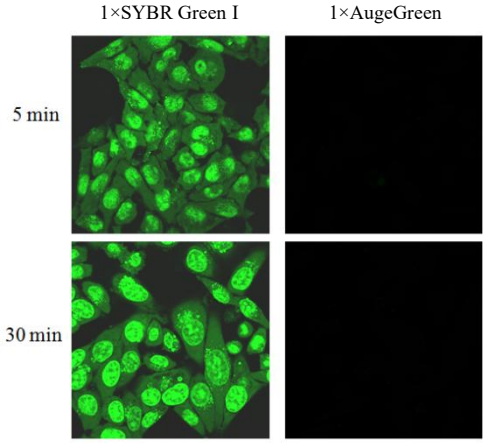


图 3. 37℃条件下，用 SYBR Green I 或 AugeGreen（1.2 μM）孵育 HeLa 细胞，分别在 5 min 或 30 min 后拍照，观察荧光强度。SYBR Green I 迅速渗透进入细胞，然而 AugeGreen 几乎不具有细胞膜渗透性。

## 使用方法

1. 如下建立实验体系：（仅供参考）

2000 × AugeGreen 储液先用去离子水稀释 100 倍，制备成 20 × AugeGreen 的工作液。

| 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 |
| $dH_2O$ | 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

本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

**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. 熔解曲线分析仪器：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 和熔解曲线的分析。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。

**AugeGreenTM 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 $(NH4)_2SO_4$ | 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 |
| $H_2O$ | / | 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 |
| $H_2O$ | 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℃ | 2 min |
| Step 2 | 95℃ | 5 sec |
| Step 3 | 60℃ | 30 sec |
| Step 2~3，重复 45 个循环 | | |
| 熔解曲线 Tm 值 57℃~99℃ | | |

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。

本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。