

AugeGreen™ qPCR 染液, 20× in water

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

染料特性:

1. 光谱特性

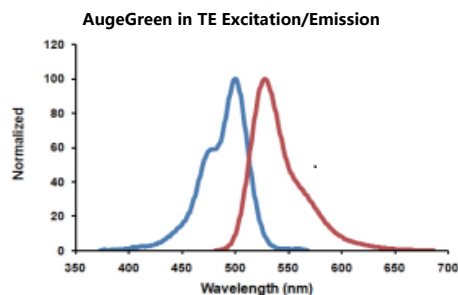


图1. 在TE缓冲液中，结合到双链DNA中AugeGreen染料的激发光谱（蓝色）和发射光谱（红色）

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

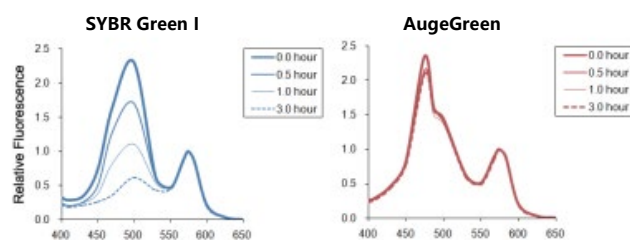


图2. AugeGreen、SYBR Green I 的吸收光谱 1.2 μ M, pH9 的 Tris 缓冲液中，99°C 孵育 3 h 后，两种荧光染料溶液的相对荧光强度，ROX 作参照物

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, et al. 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）。

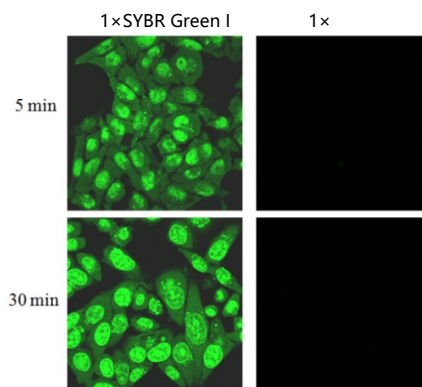


图3. 37°C条件下，用 SYBR Green I 或 AugeGreen (1.2 μ M) 孵育 HeLa 细胞，分别在 5 min 或 30 min 后拍照，观察荧光强度。SYBR Green I 迅速渗透进入细胞，然而 AugeGreen 几乎不具有细胞膜渗透性。

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，需要在反应体系中额外加入 BSA (终浓度~0.5 mg/mL)；

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。

应用范围

实时定量 PCR、高分辨率溶解曲线、核酸染料

产品货号

S2007S/S2007L

储运条件

-20°C 避光保存，有效期见外包装；冰袋运输。

产品特点

安全性高：低透膜、无诱变报道

定量准确：无 GC/AT 偏好

背景低：ssDNA 亲和力低，溶解曲线背景干净

批间差小：公司自研产品，批间差稳定；

使用方便：提供多种浓度的 AugeGreen 染料，选择灵活方便。

产品组分

产品货号	产品名称	规格
S2007S	AugeGreen™ qPCR 染液,	1mL
S2007L	20× in water	5mL

产品参数

外观：橙黄色液体

波长： λ_{abs} = 471 nm (未结合 DNA)

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。

4. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。

5. 由于本产品是水溶液形式（无防腐剂），为避开封使用后可出现微生物生长，建议初次使用时将原液分装成小管，保存于-20℃，短期可以 4℃保存

6. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。

7. 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用方法（荧光定量 PCR 仅供参考）

1. 主要试剂

(1) Primer (hβ-actin) :

forward 5' -CACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'

reverse 5' -CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

(2) HS Taq DNA Polymerase: Thermo (EP0612)

(3) Glycerol: Sigma (V900090-500 mL)

(4) BSA: Sigma (A7030)

(5) 10 mM dNTPs: Takara (4019)

2. 实验步骤

(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% Tween 20	0.03%	1.5
1 mg/mL BSA	22 mg/mL	2.2
dH ₂ O	/	44.3
Total volume	/	100

注：1) 请根据不同的仪器类型，不加入或加入合适浓度的参比染料 ROX。

2) 该体系需根据所使用的 Taq 酶的不同进行适当优化。

(2) 配制 q-PCR 反应体系

包括实验组，阴性对照，阳性对照，共三组，同时进行检测，分别进行三次平行实验。

体系	20 μL/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
dH ₂ O	定容至 20 μL

注：1) 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%。

2) 引物终浓度一般控制在 0.1-0.5 μM 范围内。

(3) 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℃		

注：在 qPCR 仪器设置程序时，在退火或延伸步骤中选择 SYBR Green 或 FAM 通道。

(4) 保存数据，判断样本质量

1) 检测样品与标准品之间的 Ct 值差；

2) 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。

(5) 可选：如需对 PCR 产物进行凝胶电泳分析，无需额外凝胶染色。只需将 DNA loading buffer 加入 PCR 产物溶液中，混匀后直接上样电泳。凝胶可以通过紫外凝胶成像仪，或含有 488nm 激发的凝胶扫描仪及蓝色 LED 成像仪进行成像。

同系列产品

产品货号	产品名称
S2007	AugeGreen™ qPCR染料, 20× in water
S2032	AugeGreen™ qPCR染料, 2000× in DMSO
S2016	Biolife Green I, 20× in DMSO (荧光定量PCR级染料)
S2017	Biolife Green I, 20× in water (荧光定量PCR级染料)
S2018	Biolife Green I, 10,000× in DMSO (荧光定量PCR级染料)

相关联产品

产品货号	产品名称
R5009	5-ROX (羧酸)
R5040	6-ROX (羧酸)
R2012	ROX参比染料 (25 μM in TE缓冲液)
R2021	6-ROX glycine (6-ROX甘氨酸), 25μM
R5152	5-ROX glycine (5-ROX 甘氨酸)
S2016	Biolife Green I, 20×in DMSO (荧光定量PCR级染料)
S2018	Biolife Green I, 10,000×in DMSO (荧光定量PCR级染料)
S2017	Biolife Green I, 20×in water (荧光定量PCR级染料)
S2007	AugeGreen™, 20×in water (荧光定量PCR级染料)
S2032	AugeGreen™, 2000×in DMSO (荧光定量PCR级染料)