

产 品 说 明 书

产品名称: AugeGreen qPCR 染液 , 2000 × in DMSO

产品货号: S2032

产品规格: 50 µL

应用范围: 实时定量 PCR、高分辨率溶解曲线

产品参数

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

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

储存条件

-20°C 避光保存, 有效期见外包装。

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, 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。

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 ₂ O	to a final volume of 50 µL

AugeGreen 使用说明

实验目的

实时定量 PCR 检测 2000 × AugeGreen

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. 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	Up to 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		
熔解曲线 T _m 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

实验方案

1. 配制 2×AugeGreen Buffer

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

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