

50X SYBR Green I for RT-PCR

Кат. ## PB025S, PB025M

Версия 3 от 10 марта 2022 г.

SYBR Green I – интеркалирующий краситель, специфичный к двухцепочечной ДНК. Раствор SYBR Green I оптимизирован для применения в ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Рекомендуется использовать как 50X раствор, при оптимизации условий ПЦР допускается двухкратное увеличение или двухкратное уменьшение (25X – 100X) концентрации красителя в реакционной смеси.

| Продукт | Кат. # | Состав | Кол-во реакций по 25 мкл |
|--------------------------------|--------|--|-----------------------------|
| 50X SYBR Green I for RT-PCR | PB025S | 50X SYBR Green I, 0.1 мл DMSO (100%), 1 мл | 200 |
| | PB025M | 50X SYBR Green I, 0.5 мл (5 x 0.1 мл) DMSO (100%), 1 мл | 1000 |

Хранение и транспортировка: -20 °C в темноте.

Число циклов замораживания/размораживания: не более 20.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

Совместимость с приборами

Спектральные свойства SYBR Green I: длина волны возбуждения – 497 нм, длина волны флуоресценции – 521 нм.

SYBR Green I совместим с любыми приборами для проведения амплификации в режиме реального времени. Детекция в каналах SYBR, FAM или Green.

www.evrogen.ru 1

Совместимость с компонентами ПЦР

SYBR Green I совместим с референсным красителем ROX, с любыми неокрашенными реакционными буферами, а также с полимеразами любого типа, вне зависимости от наличия 5' или 3' экзонуклеазной активности. SYBR Green I может использоваться в реакциях с добавлением dUTP и UDG (урацил-ДНК-гликозилазы).

При использовании рекомендуется применять полимеразы с «горячим стартом».

Принцип действия

SYBR Green I – интеркалирующий краситель, флуоресценция которого увеличивается на несколько порядков при встраивании в двухцепочечную ДНК. В ходе ПЦР при накоплении продукта амплификации сигнал флуоресценции возрастает, образуя кривую сигмоидной формы (см. рис. 1A).

Поскольку SYBR Green I связывается с любой двухцепочечной ДНК, увеличение флуоресценции в ПЦР может быть связано как с накоплением специфического продукта, так и неспецифического (димеры праймеров, неспецифический отжиг праймеров). Для получения корректных результатов после проведения ПЦР необходимо дополнительно проанализировать результат с помощью построения «кривой плавления» (Melt Peak, рис. 1Б).

Выбор концентрации интеркалирующего красителя

Раствор SYBR Green I можно использовать в широком диапазоне концентраций: от 25X до 100X. При повышении концентрации в реакции интенсивность флуоресценции возрастает, однако SYBR Green I может оказывать ингибирующее влияние на ПЦР, а также влиять на ее специфичность (см. рис. 1).

При понижении концентрации SYBR Green I уменьшается вероятность образования неспецифических продуктов. Результаты ПЦР получаются более воспроизводимыми.

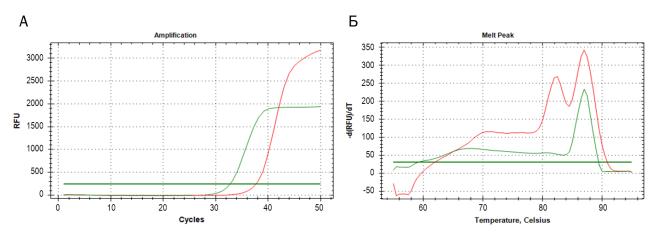


Рис. 1. Использование SYBR Green I в различных концентрациях. Красный цвет – 50X SYBR Green I использован как 25X, зеленый – как 50X. В данной реакции избыток SYBR Green I (25X) вызывает ингибирование и неспецифическую амплификацию. А – кривые амплификации; Б – кривые плавления.

Оптимизация ПЦР при использовании SYBR Green I

Для некоторых реакций может потребоваться дополнительная оптимизация условий. Оптимизацию следует проводить в тех случаях, когда при амплификации образуется не только специфический продукт (или специфический продукт не образуется вовсе).

ВНИМАНИЕ! ПРИ ОПТИМИЗАЦИИ ПЦР С SYBR GREEN І ВСЕГДА НЕОБХОДИМО СРАВНИВАТЬ РЕЗУЛЬТАТЫ ЦЕЛЕВОЙ РЕАКЦИИ И КОНТРОЛЬНОЙ РЕАКЦИИ БЕЗ МАТРИЦЫ (NTC).

1. Оптимизация состава реакционной смеси

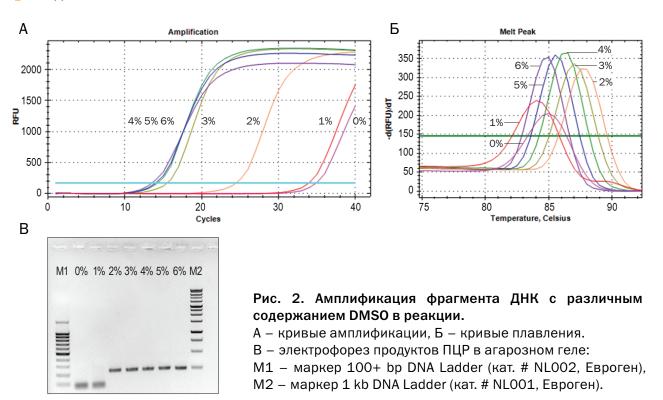
Выбор полимеразы. Использование полимеразы с «горячим стартом» снижает уровень неспецифической амплификации.

Подбор структур праймеров, не образующих димеры. Для анализа структуры праймеров можно воспользоваться любой онлайн-программой.

Добавление DMSO. Если при добавлении SYBR Green I амплификация целевого продукта ухудшается, добавьте в реакционную смесь DMSO до 5% (100% DMSO входит в состав набора).

Рекомендуется проверить несколько вариантов с разной концентрацией (см. рис. 2).

ВНИМАНИЕ! СЛЕДУЕТ УЧИТЫВАТЬ, ЧТО ГОТОВЫЕ РЕАКЦИОННЫЕ СМЕСИ ДЛЯ ПЦР МОГУТ СОДЕРЖАТЬ DMSO В СВОЕМ СОСТАВЕ.



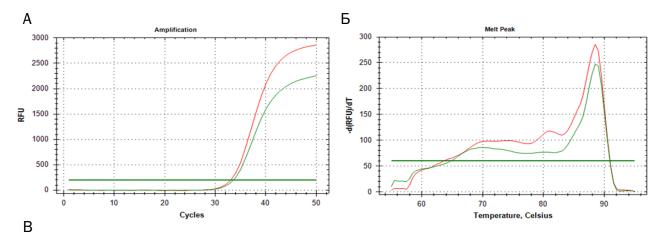
При увеличении в реакционной смеси концентрации DMSO начиная с 2% DMSO образуется специфический продукт. 4% DMSO – оптимальная концентрация для данной системы. При дальнейшем увеличении концентрации DMSO существенного смещения порогового значения (Ct) не наблюдается (рис. 2A).

Концентрация DMSO влияет на параметры кривых плавления. При увеличении содержания DMSO в реакции пики кривых плавления одного и того же ПЦР-продукта смещаются в область более низкой температуры (рис. 2Б).

2. Оптимизация условий ПЦР

Подбор оптимальной температуры отжига праймеров увеличивает эффективность и специфичность амплификации (см. рис. 3). Наилучшим образом его можно выполнить, используя градиент температур в амплификаторе. При повышении температуры отжига праймера общий выход ПЦР может снизиться за счет уменьшения неспецифической амплификации.

Анализ кривой плавления и электрофорез продукта ПЦР на агарозном геле (см. рис. 3) показывают, что при температуре отжига +58.5°C (красный цвет, дорожка 2) образуется в том числе и неспецифический продукт. При температуре +61.5°C (зеленый цвет, дорожка 1) образуется преимущественно специфический продукт.



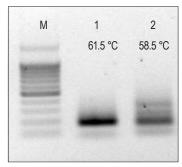


Рис. 3. Амплификация фрагмента геномной ДНК (180 п.о.) с разной температурой отжига праймера.

А – кривые амплификации; Б – кривые плавления;

В – продукт амплификации на агарозном геле:

M – маркер 100+ bp DNA Ladder (кат. # NL002, Евроген);

дорожка 1 - 61.5°C; дорожка 2 - 58.5°C.

Только для научно-исследовательских целей.

3A0 Евроген Москва 117997 ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15 Тел.: +7 (495) 784-7084 order@evrogen.ru www.evrogen.ru