
Лабораторный протокол: qPCR с dsGreen или SYBR Green I

Флуоресцентный интеркалирующий краситель dsGreen является аналогом SYBR® Green I. Оба красителя обладают очень высокой чувствительностью к наличию двухцепочечной ДНК и используются для неспецифической детекции амплификации ДНК в ПЦР "в реальном времени" (количественной ПЦР).

1. Если dsGreen хранился при температуре ниже 20°C необходимо заранее его разморозить и хранить при комнатной температуре в темноте. Для быстрого оттаивания краситель можно инкубировать при температурах до 50 °C.
2. Рассчитайте объемы реагентов, необходимых для постановки реакции согласно протоколу производителя реагентов для ПЦР. Помните, что краситель dsGreen (100x в стоковой концентрации) должен быть разведен в смеси для ПЦР до 1x концентрации.
3. Приготовьте 1x смесь для ПЦР без образцов ДНК согласно протоколу производителя реагентов для ПЦР, добавьте необходимое количество dsGreen. Если Вы используете Taq-полимеразу без горячего старта, держите смесь для ПЦР на льду.
4. Поместите необходимое количество смеси для ПЦР в пробирки для ПЦР, добавьте образцы ДНК.
5. Проведите полимеразную цепную реакцию согласно инструкции к Вашему амплификатору.

Замечания:

При проведении ПЦР-анализа всегда используйте положительный и отрицательный контроли. Программа амплификации для количественной ПЦР не отличается от программы для стандартной ПЦР для конкретных праймеров/матрицы. Для детекции используйте каналы для красителей FAM или SYBR (для Rotor-Gene - зеленый канал). Для того, чтобы иметь возможность отличать специфический продукт амплификации от димеров праймеров добавьте в программу амплификации этап со съемкой кривой плавления ампликона.