

製品コード 5760A/5761A
5770A/5771A

研究用

TAKARA

SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain
SYBR® Green II Nucleic Acid Gel Stain

説明書

SYBR Green I

SYBR Green Iはアガロースゲルやポリアクリルアミドゲルで核酸を高感度に検出可能な染色用試薬です。本製品は254 nmトランスイルミネーターを用いた場合で20 pg以下、300 nmの標準トランスイルミネーターを用いた場合でも60 pgのdouble-stranded DNA (dsDNA；二本鎖DNA)の検出が可能であり、エチジウムブロマイドで染色した時よりも25～100倍もの高い感度を示します。一本鎖DNA、RNAの検出も可能ですが、感度は高くありません。一本鎖DNAおよびRNA検出用としてはSYBR Green II(製品コード5770A/5771A)を用いることをお勧めします。本製品はアガロースゲル、ポリアクリルアミドゲルどちらでもすばやく浸透して、DNAとの結合により大きな蛍光強度の増強を示します。そのため短時間で染色でき、脱色操作も必要がないため実験時間の節約をはかることができます。

I. 内容

SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain 1 ml (製品コード 5760A)
SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain 50 μ l \times 10 (製品コード 5761A)

1 mlの試薬から10 Lの染色溶液を調製できます。10 Lの染色溶液で100枚以上のミニゲルの染色が可能です。

II. 物性および性能

DNA/SYBR Green I 複合体の蛍光量子収量 : \sim 0.8 (EtBrの場合： \sim 0.15)
最大励起波長 : 494 nm
(2番目のピークは284 nm、382 nm)
蛍光波長 : 521 nm を中心にもつ。

Ethidium Bromide との比較

	SYBR Green I	Ethidium Bromide
染色	30分	30分
脱染色	なし	30分
dsDNA 検出感度 (300 nm にて励起)	60 pg	0.5 \sim 2 ng
dsDNA 検出感度 (254 nm にて励起)	20 pg	0.2 \sim 1 ng
検出 Filter	SYBR Filter	Kodak Red

III. 保存

- ・ 製品状態 (10,000 \times , in DMSO)
遮光した状態で -20°C にて保存。
※ 1 ml 入りの製品は、一度融解した後は50 μ l ずつに小分けして凍結保存することをお勧めします。
- ・ Buffer で希釈して調製した染色溶液
遮光した状態で室温または 4°C にて polypropylene 製の容器に保存。(24時間は安定)
※ 染色溶液の安定性は高くありませんので、必要量を随時調製していただくことをお勧めします。

IV. 使用上の注意

- SYBR Green I は、核酸と結合する性質上、変異原性の可能性のあるものとして取り扱ってください。また、DMSO により組織中に色素が浸透する恐れもあります。使用に際しては、必ず手袋を着用してください。
(注) SYBR Green 溶液は活性炭に通して色素を吸着させてから捨ててください。
この際使用した活性炭は危険物として処理してください。
- 染色溶液は pH7.5 ~ 8.0 の Buffer で希釈して調製してください。その範囲外の pH の Buffer で調製した染色溶液は、不安定で染色効率が減少する傾向があります。
染色溶液は 24 時間以内に使用してください。1 回に 2、3 枚のゲルの染色が可能です。
- SYBR Green I はガラス表面あるいは polyethylene 製容器に吸着しますので、調製した染色溶液を使用する際は、必ず polypropylene 製容器を使用してください。容器は SYBR Green 染色専用として使用し、使用後は洗浄剤を使用せず蒸留水で洗ってください。
- 本製品で染色したゲルは、専用のフィルター [SYBR photographic filter (Life Technologies Code. S7569) など] を用いて写真撮影を行ってください。市販の黄色や緑色のフィルターでも写真撮影は可能ですが、若干感度が落ちます。また、Ethidium Bromide 用の赤色フィルターは使用できません。

V. 使用方法

電気泳動後の DNA の染色

- (1) アガロースあるいは未変性のポリアクリルアミドゲルで、TBE (89 mM Tris base、89 mM boric acid、1 mM EDTA、pH8.0) や TAE (40 mM Tris-acetate、1 mM EDTA、pH8.0) Buffer を用いて電気泳動を行う。色素の浸透を考えると、ゲル厚は 4 mm 以下が望ましい。
- (2) 本製品を開封する前にはチューブを室温で温め、スピンドウンによりチューブの底に液を回収する。
TE (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH8.0)、TBE あるいは TAE Buffer で SYBR Green I 試薬を 10,000 倍に希釈する。
- (3) 染色用容器にゲルを入れ、ゲルがしっかり浸漬するのに充分量の染色溶液を加える。アルミホイルで容器を覆うか、暗い場所に容器を置くなどして、染色中は完全に遮光する。
- (4) ゲルを室温でゆっくりと振とうする。染色時間は、ゲルの厚さやアガロース、ポリアクリルアミドゲルの濃度、フラグメントサイズにもよるが、10 ~ 30 分間ぐらいである。脱色は必要ない。染色溶液は暗所にて保存し (冷蔵庫にて保管するのが望ましい)、24 時間以内であれば 2 ~ 3 回くりかえして使用することができる。
- (5) 300 nm の UV トランスイルミネーター、あるいは更に高い感度を得るために、254 nm の UV トランスイルミネーターを用いて染色したゲルを照射する。
- (6) 専用のフィルターを用いてゲルの写真を撮影する。染色したゲルはバックグラウンドをほとんど持たないため、少量の DNA の検出の際、長時間フィルムを露光することができる。

VI. 参考文献

- 1) Schneeberger, C., *et al. PCR Methods & App.* (1995) **4**: 234-238.
- 2) Miyata, T. and Kokame, K. 日本血栓止血学会誌 (1995) 第6巻第4号別冊.
- 3) Sera, E. Miller, *et al. Biotechniques.* (1999) **27**: 34-36.

※ 7 ページの Q & A もご参照ください。

VII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- SYBR は Life Technologies Corporation. の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

SYBR Green II

SYBR Green IIはアガロースゲルやポリアクリルアミドゲルでRNAあるいは一本鎖DNAを高感度に検出可能な染色用試薬です。本製品は254 nm トランスイルミネーターを用いた場合で1 ng 以下、300 nm の標準トランスイルミネーターを用いた場合でも2 ng のRNAの検出が可能であり、エチジウムブロマイドで染色した時の2～3倍の感度を示します。また、洗浄、脱色操作を行う必要がないため、実験時間の節約をはかることができます。

特に、SSCP分析のように高い感度が要求される実験において、従来は放射性プローブを用いての分析が主流でしたが、非放射性的SSCP分析も開発されてきており、本試薬を用いることでより高い感度の検出が可能です。

なお、アガロース/ホルムアルデヒドゲルやポリアクリルアミド/尿素ゲルなど変性ゲルを用いた場合はSYBR Green IIの感度もいくぶん減少しますが(254 nmで20 ng、300 nmで40 ngのRNAを検出可能)、エチジウムブロマイドより優れた感度を示します。

I. 内容

SYBR Green II Nucleic Acid Gel Stain	1 ml (製品コード 5770A)
SYBR Green II Nucleic Acid Gel Stain	50 μ l \times 10 (製品コード 5771A)

1 ml の試薬から10 L の染色溶液を調製できます。10 L の染色溶液で100枚以上のミニゲルの染色が可能です。

II. 物性および性能

RNA/SYBR Green II 複合体の蛍光量子収量	: \sim 0.54 (EtBr の場合: \sim 0.07) \sim 0.36 (dsDNA との場合)
最大励起波長	: 497 nm (2 番目のピークは 254 nm)
蛍光波長	: 520 nm を中心にもつ。

Ethidium Bromide との比較

	SYBR Green II	Ethidium Bromide
染色	30 分	30 分
脱染色	なし	30 分
検出感度 (300 nm にて励起)	Denaturing gel 40 \sim 80 ng Non-denaturing gel 2 \sim 4 ng	100 \sim 200 ng 5 \sim 10 ng
検出感度 (254 nm にて励起)	Denaturing gel 20 \sim 40 ng Non-denaturing gel 1 \sim 2 ng	
検出 Filter	SYBR Filter	Kodak Red

III. 保存

- 製品状態 (10,000 \times , in DMSO)
遮光した状態で -20°C にて保存。
※ 1 ml 入りの製品は、一度融解した後は50 μ l ずつに小分けして凍結保存することをお勧めします。
- Buffer で希釈して調製した染色溶液
遮光した状態で室温または 4°C にて polypropylene 製の容器に保存。
(4°C では数週間、室温では3 \sim 4日は安定)

IV. 使用上の注意

- SYBR Green II は、核酸と結合する性質上、変異原性の可能性のあるものとして取り扱いしてください。また、DMSO により組織中に色素が浸透する恐れもあります。使用に際しては、必ず手袋を着用してください。
(注) SYBR Green 溶液は活性炭に通して色素を吸着させてから捨ててください。
この際使用した活性炭は危険物として処理してください。
- 染色溶液は、pH7.5～8.0 の Buffer で希釈して調製してください。その範囲外の pH の Buffer で調製した染色溶液は、不安定で染色効率が減少する傾向があります。
染色溶液は一回に 2、3 枚のゲルの染色が可能です。
- SYBR Green II はガラス表面あるいは polyethylene 製容器に吸着しますので、調製した染色溶液を使用する際は、必ず polypropylene 製容器を使用してください。容器は SYBR Green 染色専用として使用し、使用後は洗浄剤を使用せず蒸留水で洗ってください。
- 本製品で染色したゲルは、専用のフィルター [SYBR photographic filter (Life Technologies Code. S7569) など] を用いて写真撮影を行ってください。市販の黄色や緑色のフィルターでも写真撮影は可能ですが、若干感度が落ちます。また、Ethidium Bromide 用の赤色フィルターは使用できません。

V. 使用方法

電気泳動後の RNA の染色

- (1) 一般的な方法により、未変性ゲルや変性ゲル（ポリアクリルアミド／尿素ゲルやアガロース／ホルムアルデヒドゲル）を用いて電気泳動を行う。色素の浸透を考えると、ゲル厚は 4 mm 以下が望ましい。
- (2) 本製品を開封する前にはチューブを室温で温め、スピンドウンによりチューブの底に液を回収する。未変性ゲルやポリアクリルアミド／尿素ゲルを用いる場合には TBE (89 mM Tris-base、89 mM boric acid、1 mM EDTA、pH8.0) Buffer で SYBR Green II 試薬を 10,000 倍に希釈する。アガロース／ホルムアルデヒドゲルを用いる場合には TBE Buffer で SYBR Green II 試薬を 5,000 倍に希釈する。
- (3) 染色用容器にゲルをいれ、ゲルがしっかり浸漬するのに充分量の染色溶液を加える。アルミホイルで容器を覆うか、暗い場所に容器を置くなどして、染色中は完全に遮光する。染色前にゲルから尿素やホルムアルデヒドを洗い出す必要はない。
- (4) ゲルを室温でゆっくりと振とうする。染色時間は、ゲルの厚さや濃度、フラグメントサイズにもよるが、アガロースゲルで 20～40 分間、ポリアクリルアミドゲルで、10～40 分間ぐらいである。脱色は必要ない。染色溶液は暗所にて保存する（冷蔵庫にて保管するのが望ましい）。
- (5) 300 nm の UV トランスイルミネーター、あるいは更に高い感度を得るために、254 nm の UV トランスイルミネーターを用いて染色したゲルを照射する。
- (6) 専用のフィルターを用いてゲルを写真撮影する。染色したゲルはバックグラウンドをほとんど持たないため、少量の RNA の検出の際、長時間フィルムを露光することができる。

VI. 参考文献

- 1) Schneeberger, C., *et al. PCR Methods & App.* (1995) **4**: 234-238.
- 2) Miyata, T. and Kokame, K. 日本血栓止血学会誌 (1995) 第 6 巻 第 4 号 別冊.

Q 1 : SYBR Green の変異原性は？

A 1 : AMES Test の結果から、エチジウムブロマイドと比較して変異原性は低いことが示唆されています。ただし、SYBR Green は核酸と結合する性質を持つこと、および DMSO 溶液になっているため色素が組織へ浸透する恐れがあることから、取り扱いに際しては必ず手袋を着用ください。

Q 2 : SYBR Green の廃棄方法は？

A 2 : SYBR Green 溶液は活性炭に通して、色素を吸着させてから捨ててください。この時に使用した活性炭は危険物として処理してください。(Molecular Cloning 2nd ed., A Laboratory Manual, E9)

Q 3 : 染色後の核酸から SYBR Green 色素を除去したいが方法は？

A 3 : エタノール沈殿することで核酸と結合した SYBR Green 色素を除去できます。イソプロパノール沈殿では色素の除去効率が悪くなります。ブタノール抽出、クロロホルム抽出、フェノール抽出では色素の除去はできません。

Q 4 : SYBR Green をあらかじめゲルに加えて染色することは可能ですか？

A 4 : SYBR Green をあらかじめ加えたゲルを用いた場合、電気泳動後に染色する方法に比べ、感度が低下し、シャープなバンドになりません。また DNA の移動度も異なるため、SYBR Green をあらかじめ加えたゲルを用いて染色する方法はお勧めしません。また、垂直型ゲルを使用するときは、SYBR Green をゲルに入れて染色した場合、色素がガラスやプラスチックに吸着してしまい、DNA が検出できませんので、必ず電気泳動後に染色を行ってください。

Q 5 : 始めにエチジウムブロマイドで染色した後に SYBR Green で染色することはできますか？

A 5 : SYBR Green の使用方法の「電気泳動後の染色方法」で検出することができます。ただし、SYBR Green だけで染色する場合より感度は低下します。

Q 6 : DNA を SYBR Green I で染色後、蛍光下で観察したらオレンジ色に見えた。これは大丈夫？

A 6 : 二本鎖の DNA を観察するときに、一本鎖になっている部分がオレンジ色に観察される場合があります。

Q 7 : SYBR Green で染色した DNA を制限酵素で切断するつもりだが、色素の除去は必要ですか？

A 7 : SYBR Green により DNA の切断が阻害されることはありませんので色素を除去する必要はありません。

Q 8 : SYBR Green で染色した DNA をサブクローニングに応用できますか？

A 8 : SYBR Green で染色した DNA はライゲーション反応や制限酵素による切断反応等の酵素反応を阻害しません。したがって、サブクローニングの時に色素を除去する必要はありません。なお、in Gel Ligation および in Gel Digestion も可能です。

Q 9 : SYBR Green で染色した DNA および RNA はハイブリダイゼーションに使用できますか？

A 9 : SYBR Green で染色した DNA および RNA はノーザンプロット法およびサザンプロット法にそのまま使用できます。その際、プレハイブリダイゼーション溶液とハイブリダイゼーション溶液中に 0.1 ~ 0.3% SDS を加えることをお勧めします。

Q 10 : 塩化セシウム密度勾配法による Plasmid の精製に応用できますか？

A 10 : 密度勾配に SYBR Green 色素が影響を与える可能性があるためお勧めできません。

Q 11 : GelBond Film や GelBond PAG Film は使用できるか？

A 11 : 使用できません。

Q 12：一本鎖 DNA を染色したい場合に使用する試薬はどちらですか？

A 12：SYBR Green I では感度が落ちますので、SYBR Green II をお勧めします。

Q 13：SYBR Green I でシーケンスゲルサイズのゲルを染色する方法は？

A 13：ポリアクリルアミドゲルはガラス板上で直接染色することができます。その場合、片方のガラス板を外し、ゲル全体に 10,000 倍希釈した SYBR Green 溶液を広げて、5～15 分染色してください。ガラス板全体を希釈液中に浸すと、色素がガラス板に吸着して感度が落ちますので避けてください。

VII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・SYBR は Life Technologies Corporation. の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社