



AIE-qPCR Dye Mix (No Rox)

【产品清单】

产品名称	产品编号	规格	储存	保质期
AIE-qPCR Dye Mix (No Rox)	AIEmix-21000	1mL	-20°C避光	18个月
AIE-qPCR Dye Mix (No Rox)	AIEmix-25000	5 × 1mL	-20°C避光	18个月

【产品简介】

AIE-qPCR Dye Mix是基于AIE-MiRed饱和染料的2 × 预混液，用于实时荧光定量和DNA熔解曲线分析。核心组分Taq DNA聚合酶是嗜热性细菌*Thermus aquaticus*来源的热稳定重组型Taq DNA聚合酶，分子量为94 KD。扩增片段的长度可达10 kb（简单模板）。延伸速度为1min/kb（70~75°C，简单模板可达10s/kb）。该酶具有5'→3'聚合酶活性，无3'→5'外切酶活性。扩增产物具有3'-dA，可直接用于TA克隆。使用时，仅需在扩增体系中加入模板和引物即可进行实时荧光定量PCR，大大简化操作流程，降低污染几率。

本产品还适用于qPCR快速反应程序、10 μL小体积反应，不影响特异性和高灵敏度的情况下可实现快速、准确地对目的基因进行检测和定量。可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因定量准确、重复性好、可信度高。

【适用机型】

Bio-Rad: CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4;

Eppendorf: Mastercycler ep realplex, realplex 2 s;

Qiagen: Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000;

Roche Applied Science: LightCycler 480, LightCycler 2.0; Lightcycler 96;

Thermo Scientific: PikoReal Cycler; Cepheid: SmartCycler; Illumina: Eco qPCR.

【运输和保存条件】

-20°C保存，冰袋运输，Mix 解冻后可于2 ~ 8°C避光条件下稳定存放6个月。

【应用范围】

本试剂用于DNA样本的扩增定量，可以扩增大多数物种来源的DNA，样本类型可以是基因组DNA、cDNA、质粒DNA、λDNA等。

【注意事项】

1. 本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及其他非合理用途。
2. 使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。加样过程中吹打要轻，如果操作不慎 Mix 起泡，需再次离心方可使用。
3. 由于本品检测灵敏度极高，易被空气中气溶胶污染。因此反应体系配制时请于超净工作台内进行，配制过程中请使用灭菌枪头、反应管，条件容许的实验室推荐使用专用的移液枪和带滤芯的枪头。
4. 本品尽量避免反复冻融，以免造成酶活下降。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。

【实验流程】

以下举例为常规qPCR反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

1. qPCR反应体系 (仅供参考)

组分	体积	终浓度
2 × AIE-qPCR Dye Mix	10 μL	1 ×
Forward Primer (10 μM)	0.4 μL	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μL	0.2 μM
Template DNA/cDNA	X μL	-
ddH ₂ O	To 20 μL	-

【注】：使用前务必充分混匀，避免剧烈震荡产生过多气泡。

1. **引物浓度**：一般来说，反应体系中引物终浓度为0.2 μM即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度0.1 - 1.0 μM范围内调整引物浓度。
2. **模板浓度**：通常DNA模板的量以10-100 ng基因组DNA或1-10 ng cDNA为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。如模板类型为未稀释cDNA原液，使用体积不应超过qPCR反应总体积的1/10。
3. **体系配置**：请于超净工作台内配制，并使用无核酸酶残留的枪头、反应管；推荐使用带滤芯的枪头。避免交叉污染 和气溶胶污染。

2. qPCR反应程序 (仅供参考)

标准程序

Stage 1	预变性	Rep: 1	95 °C	3 min
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95 °C	10 sec
			60 °C	30 sec
Stage 3	熔解曲线	使用仪器默认熔解曲线采集程序		

快速程序

Stage 1	预变性	Rep: 1	95 °C	30 sec
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95 °C	3 sec
			60 °C	10 sec
Stage 3	熔解曲线	使用仪器默认熔解曲线采集程序		

【注】：可根据实验需要进行两步法和三步法的调整。

- 预变性时间**：根据不同模板和引物的具体情况可适当缩短至 30 sec。如果模板的GC含量较高，可将预变性时间延长至5min。
- 退火温度和时间**：请根据引物和目的基因的长度进行调整。
- 荧光信号采集**：请根据您使用的Real-time PCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用ABI 7700和7900HT时至少30 sec；使用ABI 7000和7300时至少 31 sec；使用ABI 7500时至少34 sec；使用ABI StepOnePlus时至少10 sec。

【结果分析】

定量实验至少需要三个生物学重复。反应结束后需要确认扩增曲线及熔解曲线。

1) **扩增曲线**：标准扩增曲线为 S 型。

Ct 值落在 20-30 之间时，定量分析最准确；

Ct 值小于 10 时，需要将稀释模板后，重新进行实验；

Ct 值介于 30-35 之间时，需要提高模板浓度，或者增大反应体系的体积，以提高扩增效率，保证结果分析的准确性；

Ct 值大于 35 时，检测结果无法定量分析基因的表达量，但可用于定性分析。

2) **熔解曲线**：

熔解曲线单峰，表明反应特异性好可以进行定量结果分析；若熔解曲线出现双峰或者多峰，则不能进行定量分析。

熔解曲线出现双峰，需要通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳判断非目标峰是引物二聚体还是非特异性扩增。

如果是引物二聚体，建议降低引物浓度，或者重新设计扩增效率高的引物。

如果是非特异性扩增，请提高退火温度，或者重新设计更高特异性的引物。

【引物设计指南】

- 推荐引物长度 25 bp 左右。扩增产物长度 150 bp 为佳，可以在 100 bp-300 bp 内选择。
- 正向引物和反向引物的 T_m 值相差不宜超过 2°C。引物 T_m 值 60°C-65°C 为佳。
- 引物碱基分布要均匀，避免出现连续的 4 个相同碱基，GC 含量控制在 50% 左右。3' 端最后一个碱基最好为 G 或 C。
- 引物内部或者正反两条引物间最好避免出现有 3 个碱基以上的互补序列。
- 引物特异性需要用 NCBI BLAST 程序进行核对。避免引物 3' 端有 2 个碱基以上的非特异性互补。

6. 设计完成的引物需要进行扩增效率的检测，只有具备相同扩增效率的引物才可用于定量比较分析。