



## AIE Blood Dye Master Mix (No Rox)

### 【产品清单】

产品名称	产品编号	规格	储存	保质期
AIE Blood Dye Master Mix (No Rox)	AIEBlmix-11000	1mL	-20°C 避光	18个月
AIE Blood Dye Master Mix (No Rox)	AIEBlmix-15000	5 × 1mL	-20°C 避光	18个月

### 【产品简介】

AIE Blood Dye Master Mix是一款可针对全血样本进行直接qPCR扩增反应，无需进行DNA纯化或者样本预处理的试剂盒。适用于含EDTA、肝素、柠檬酸钠等常规的抗凝血，新鲜血、4°C储藏血、冷冻血液以及FTA卡上的干血渍均可完成扩增反应，对全血样本中的杂质具有高度耐受性（最高加入全血样品为10%）。核心组分是采用自主研发的抗体进行封闭、定向改造的可用于血液直扩的热启动DNA聚合酶，以及具有极强抗干扰能力的饱和染料。该酶封闭了Taq DNA聚合酶5'→3'聚合酶活性，使得在体系配置和升温阶段的非特异扩增被抑制，在预变性温度下加热30 sec封闭抗体即可完全失活，从而释放出DNA聚合酶活性，搭配添加了扩增增强因子的最适buffer，可以保证PCR体系具有较高的扩增效率、特异性和灵敏度。对血液中的PCR抑制物具有极强的耐受性，较高的灵敏度和特异性。

本试剂盒为一种2×浓度的预混试剂，操作简单并减少了污染的可能性，可实现高通量检测。2×预混试剂包括PCR反应所需要的DNA聚合酶、dNTP、Mg<sup>2+</sup>、缓冲液，增强剂和饱和染料等成分，只需向反应体系加入引物和模板即可进行PCR反应，其结果可通过荧光曲线进行观察而无需进行后续电泳检测。

### 【运输和保存条件】

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

### 【适用范围】

不同类型的全血样本直接 PCR 反应

### 【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. 推荐血液模板使用量为反应总体积的 10%，即 50 μL 反应体系中加入 5 μL 全血作为模板，注意避免吸取血液凝块。
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。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

## 【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. PCR反应体系 (仅供参考)

组分	体积	终浓度
2 × AIE Blood Dye Master Mix	10 μL	1 ×
Forward Primer(10 μM)	0.5 μL	0.25 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μL	0.25 μM
血液模板	1 μL	-
ddH <sub>2</sub> O	To 20 μL	-

1. **引物浓度**: 0.2-0.4 μM可以得到较好结果。反应性能较差时，可在0.1-0.5 μM范围内调整引物浓度；
2. **模板用量**: 建议按1-10 %总体积量取用模板，20 μl体系建议采用1μl血液作为模板；
3. **反应体系**: 推荐使用 20 μL、40 μL，以保证目的基因扩增的有效性和重复性；

### 2. PCR反应程序 (仅供参考)

Stage 1	预变性	Rep: 1	95 °C	5 min
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95 °C	30 sec
			60 °C	25 sec
			72 °C	1 min

1. 退火温度为通用 T<sub>m</sub> 值或低于引物 T<sub>m</sub> 值 1-2°C。如果扩增产物特异性较差，可以建立退火温度梯度以寻找最佳退火条件；
2. 延伸时间 10 sec/kb 可扩增 8 kb 以下大部分目的片段，3-5 sec/kb 即可扩增大部分 2 kb 以下片段。若扩增效率较低，可适当延长时间至 20-30 sec/kb，不应超过 60 sec/kb。

## 【常见问题与解决方案】

◇ 无扩增产物或产量少

- ① 检查引物设计，确认引物浓度和纯度或重新设计引物；
- ② 重复实验，确认体系、程序无误；
- ③ 增加循环数或优化退火温度；
- ④ 尝试不同的血液用量；

◇ 产物呈现高分子量弥散条带

- ① 提高退火温度或设置退火梯度；
- ② 延伸时间不应过长或减少循环数；

- ③ 尝试不同的血液用量;
- ④ 降低引物浓度;
- ◇ 产物呈现低分子量弥散条带
- ① 提高退火温度或设置退火梯度;
- ② 降低引物浓度或减少循环数;
- ③ 尝试不同的血液用量;