



诚信为本  
服务至上

---

# 荧光定量原理及实验设计、上机操作培训

福州都拜特生物技术有限公司

主讲人：逯平杰

时 间：2020年11月10日

产品咨询：18860119780

技术咨询：18159089690





荧光定量PCR技术是个啥？



荧光定量PCR技术能做啥？



荧光定量PCR实验怎么做？



荧光定量PCR结果怎么看？





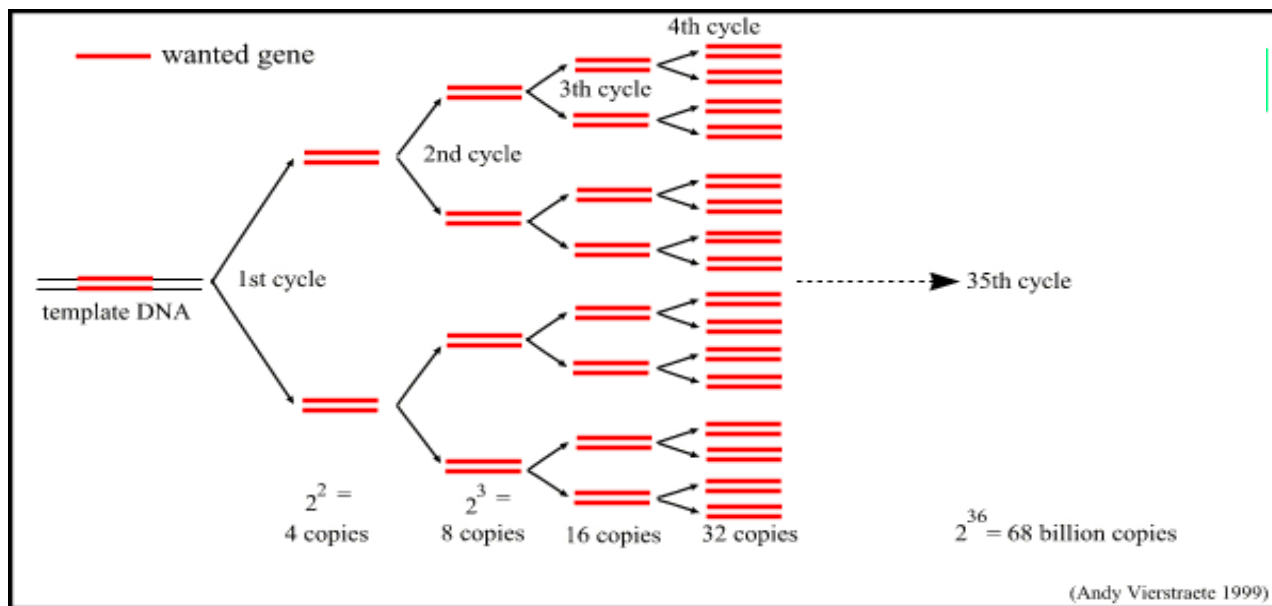
## 荧光定量PCR技术是个啥？

- ✓ 荧光定量PCR化学原理和基本概念
- ✓ 荧光定量PCR数学原理和基本概念
- ✓ 荧光定量PCR仪器工作原理



## PCR原理

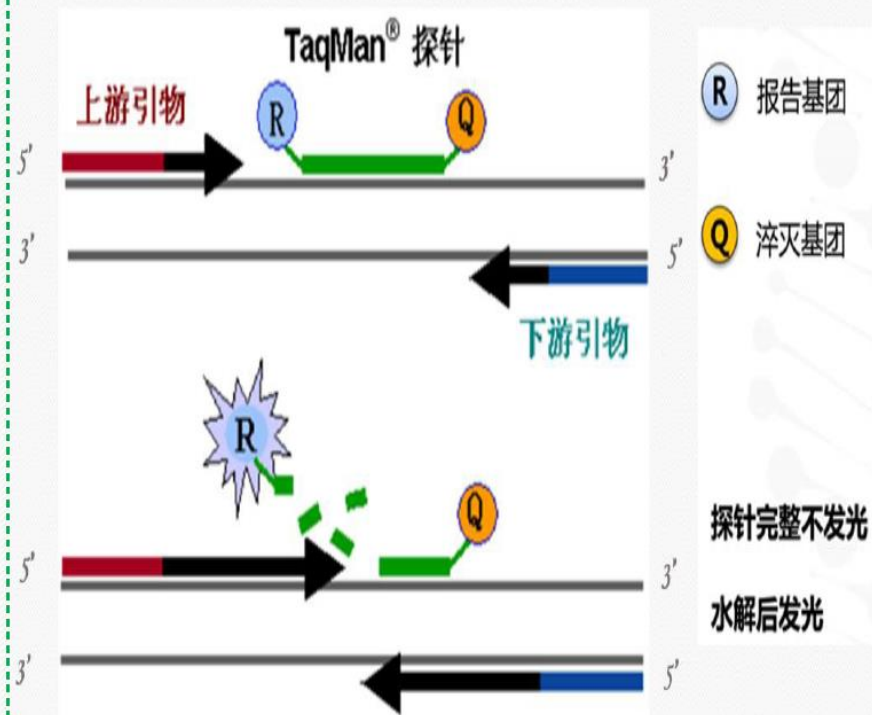
PCR: Polymerase Chain Reaction——聚合酶链式反应



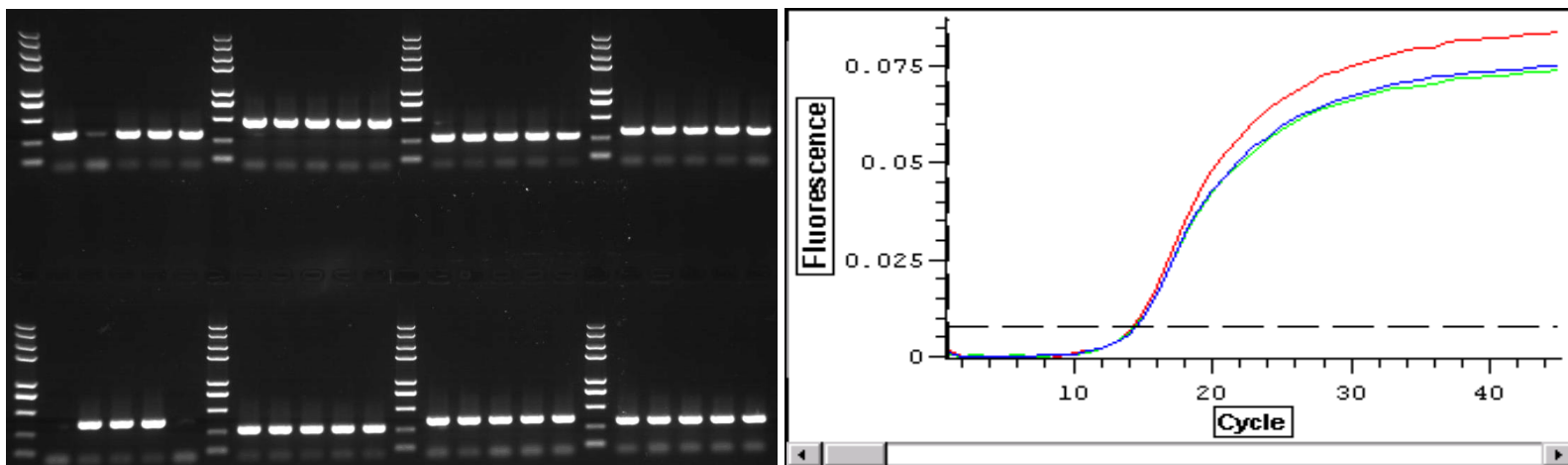
## SYBR Green 染料法

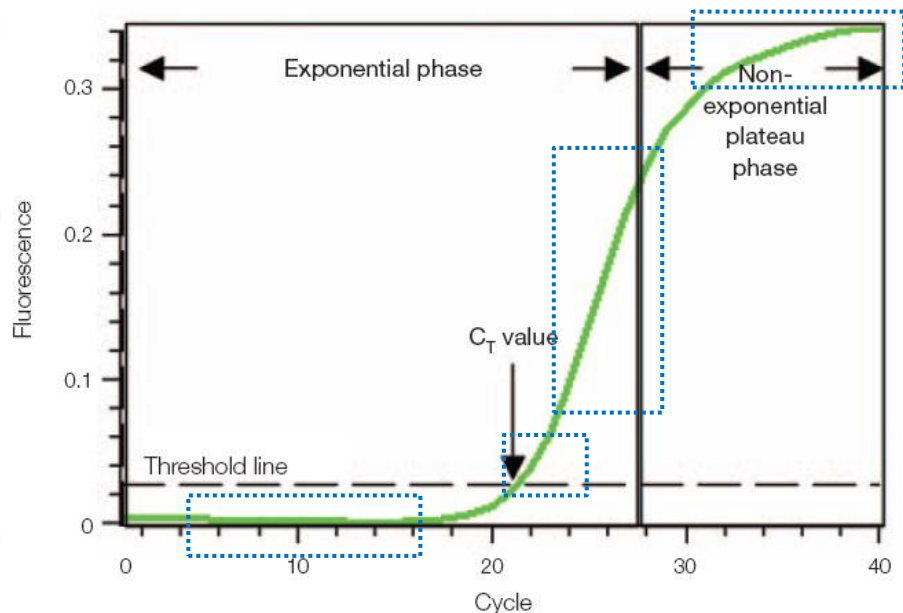
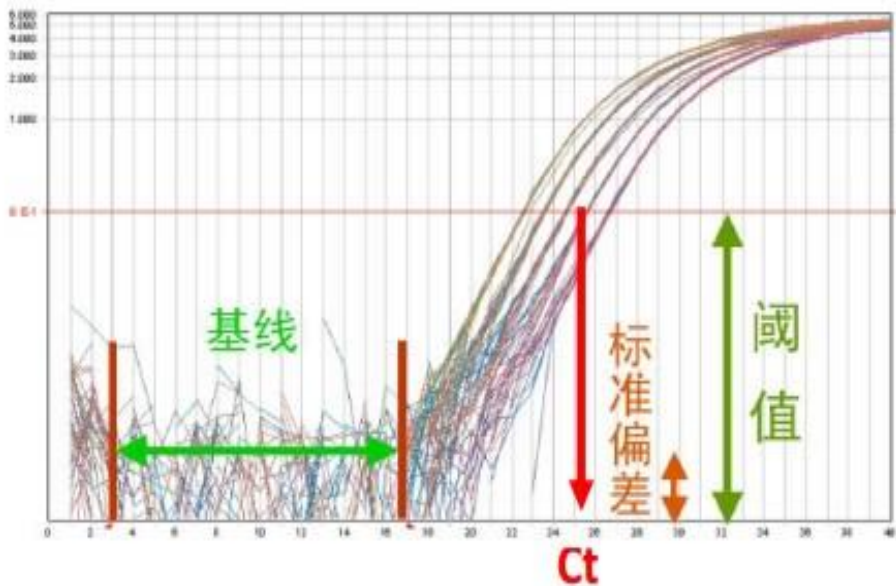


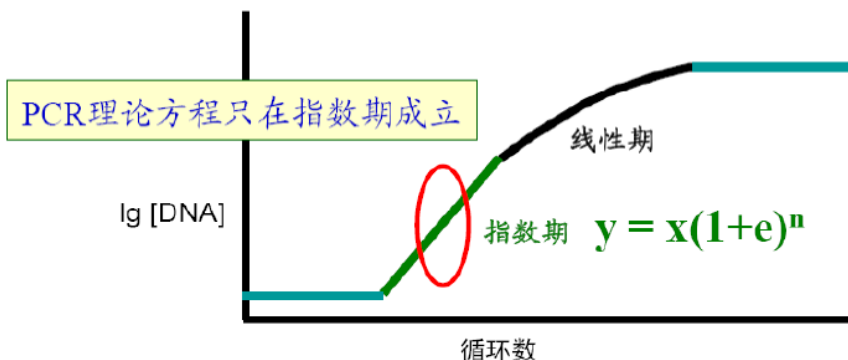
## Taq Man 探针法



- ◆ 常规PCR：借助电泳对扩增反应的终产物进行半定量及定性分析
- ◆ 实时荧光定量PCR技术：利用荧光信号的变化实时检测PCR扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化，最终对起始模板进行精确的定量分析







$$R_n = R_B + X_0 (1 + e)^n R_s$$

第n次PCR循环时的荧光信号强度( $R_n$ )等于背景信号强度( $R_B$ )加上每个分子的荧光强度(即单位荧光强度,  $R_s$ )与分子数目的乘积。

设 $n=C_T$ , 则:

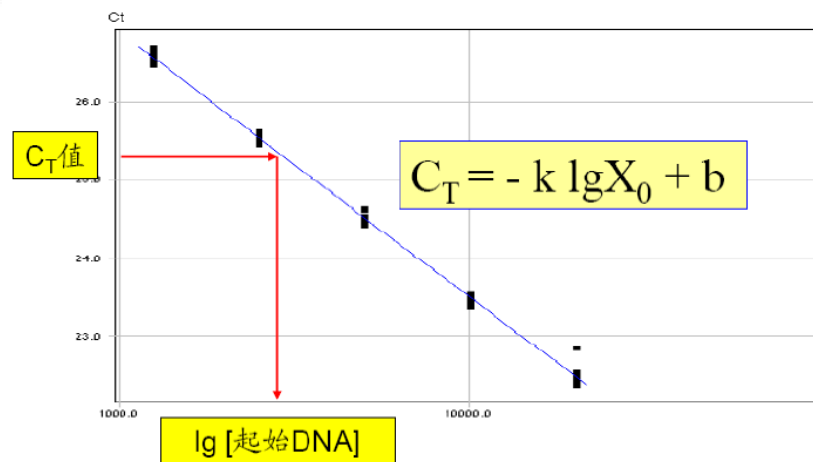
$$R_{C_T} = R_B + X_0 (1 + e)^{C_T} R_s$$

$$\lg (R_{C_T} - R_B) = \lg X_0 + C_T \lg (1 + e) + \lg R_s$$

$$C_T \lg (1 + e) = -\lg X_0 + \lg (R_{C_T} - R_B) - \lg R_s$$

$$C_T = -\frac{\log X_0}{\log(1 + E_X)} + \frac{\log(R_T - R_B) - \log R_s}{\log(1 + E_X)}$$

即  $C_T = -k \lg X_0 + b$  (线性方程)

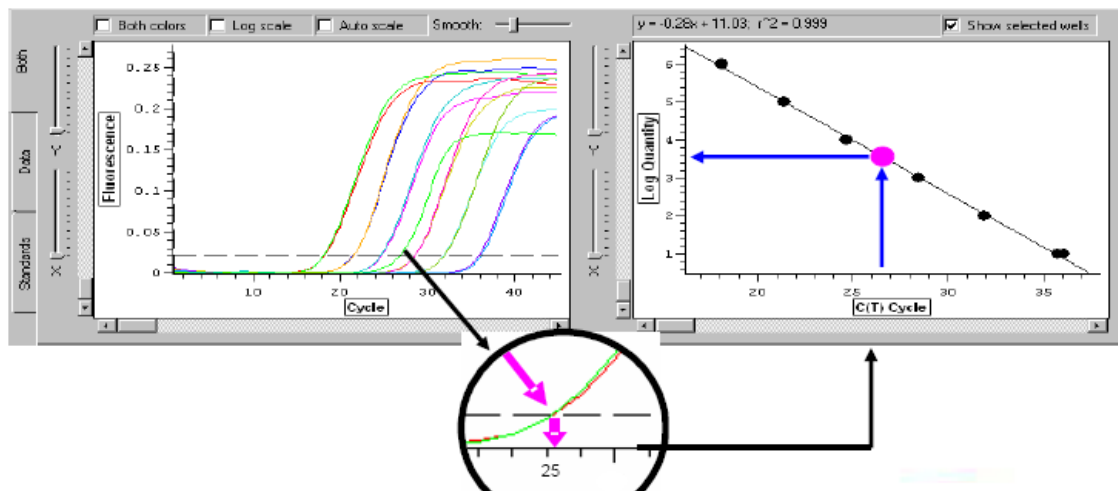




## 绝对定量——

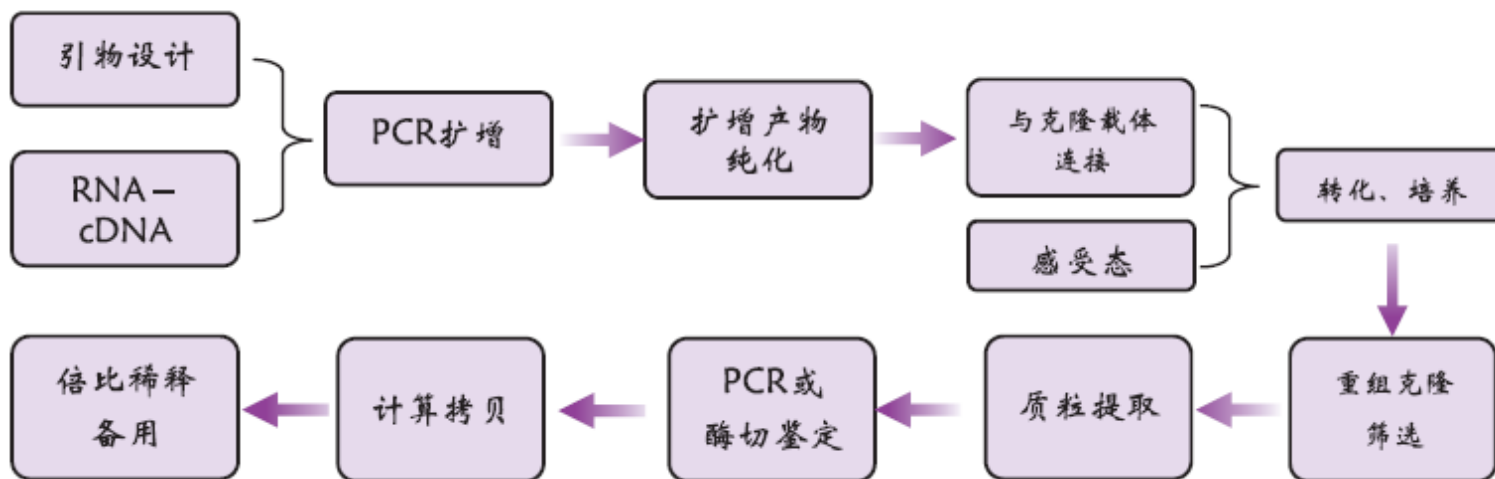
找出一个给定样本的本质属性（拷贝数、具体数量等）

- Log（起始浓度）与循环数呈线性关系，通过已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,即得到该扩增反应存在的线性关系
- 根据样品Ct值，就可以计算出样品中所含的模板量



## 绝对定量——

找出一个给定样本的本质属性（拷贝数、具体数量等）



标准质粒的建立流程



## 绝对定量——

找出一个给定样本的本质属性（拷贝数、具体数量等）

### 质粒标准品稀释方法与拷贝数计算

#### 倍比梯度稀释方法：

1v原液(标准品i) +9v稀释缓冲液，得标准品ii

1v标准品ii+9v稀释缓冲液，得标准品iii

1v标准品iii +9v稀释缓冲液，得标准品iv

1v标准品iv +9v稀释缓冲液，得标准品v

#### 拷贝数的计算：

待测样本浓度（ng/ul）=OD<sub>260</sub>×40×稀释倍数

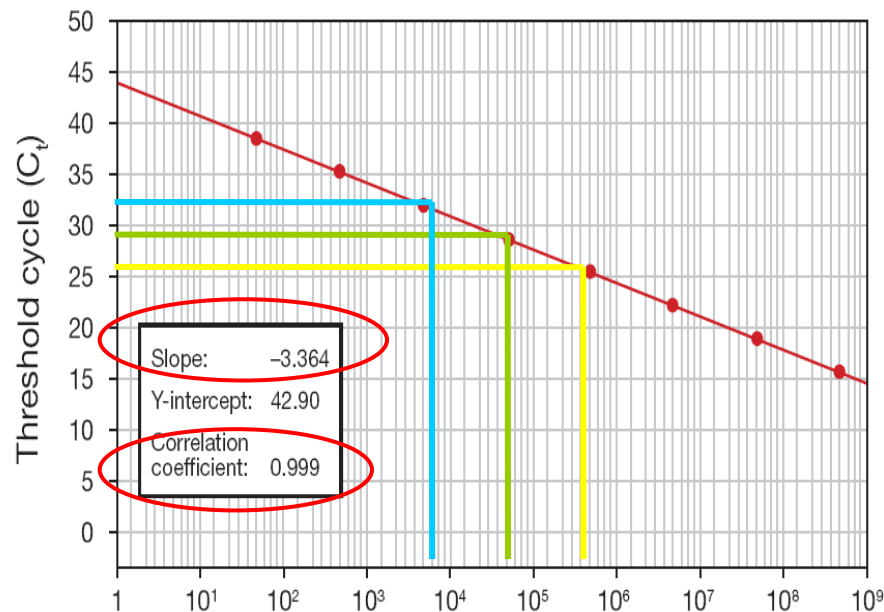
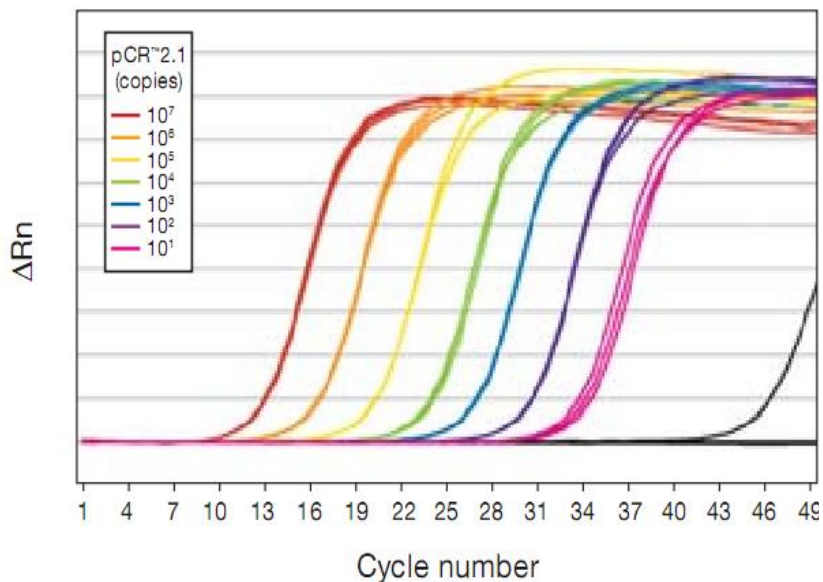
样本分子量=碱基数×324

待测样本拷贝数（copies/ul）=待测样本浓度/样本分子量×6×10<sup>14</sup>



## 绝对定量——

找出一个给定样本的本质属性（拷贝数、具体数量等）



## 相对定量——

比较多个样本间某一特定性质属性（基因表达差异等）

所谓相对定量，即我们不用得到绝对的拷贝数，而只需要计算表达的差异即可，我们得到的结果只是某基因表达水平升高了或者降低了多少倍。

进行相对基因表达分析普遍采用操作简便的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法，条件是目标基因和参照基因扩增效率都接近100%且相互间效率偏差在5%以内。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法之前，必须验证目标基因和参照基因的扩增效率。



## 相对定量——

比较多个样本间某一特定性质属性（基因表达差异等）

- 理想的PCR反应： $X_n = X_0 \times 2^n$
- 非理想的PCR反应： $X_n = X_0(1 + Ex)^n$
- A样本相对B样本的某基因表达差异：

$$X_{0(A)} : X_{0(B)}$$

$$\equiv X_{n(A)} / 2^{n(A)} : X_{n(B)} / 2^{n(B)}$$

$$\equiv 2^{-(n(A) - n(B))}$$

$$\equiv 2^{-\Delta T}$$

$n$ ：扩增反应的循环次数

$X_n$ ：第 $n$ 次循环后的产物量

$X_0$ ：初始模板量

$Ex$ ：扩增效率

$n_{(A)}$ ：A样本扩增反应的循环次数

$n_{(B)}$ ：B样本扩增反应的循环次数

$X_{0(A)}$ ：A样本初始模板量

$X_{0(B)}$ ：B样本初始模板量

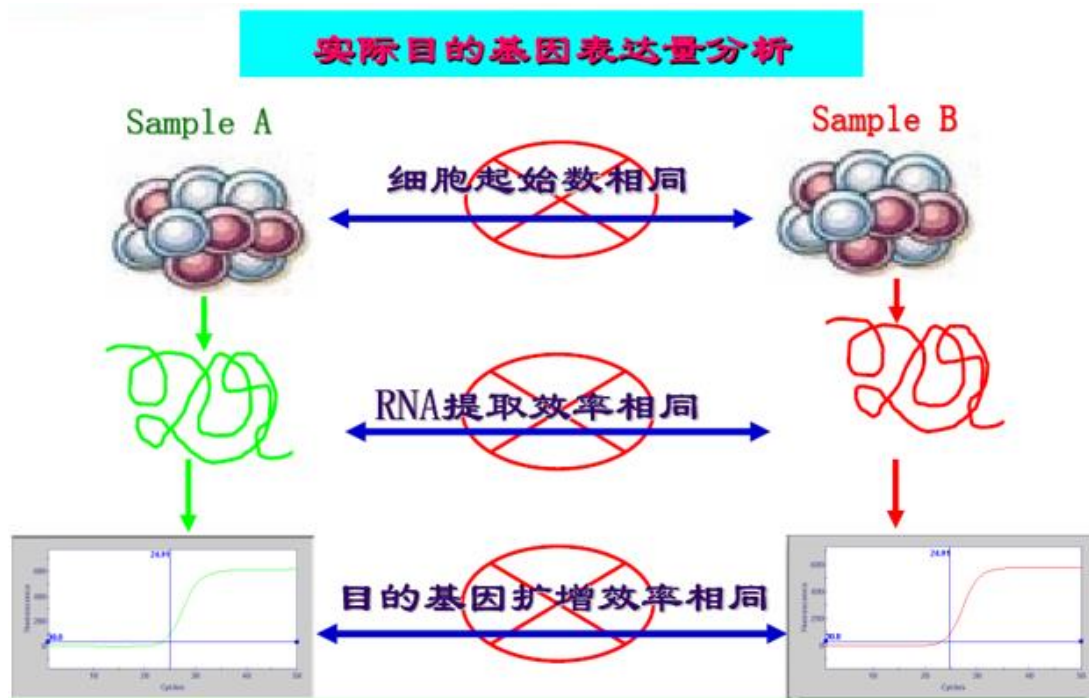
$X_{n(A)}$ ：第 $n$ 次循环后A样本的产物量

$X_{n(B)}$ ：第 $n$ 次循环后A样本的产物量



## 相对定量——

比较多个样本间某一特定性质属性（基因表达差异等）



## 相对定量——

比较多个样本间某一特定性质属性（基因表达差异等）

2<sup>-ΔΔCt</sup>

Template	Assay	Ct (dRn)
对照细胞	GAPDH	18.20
病毒刺激细胞	GAPDH	18.22
对照细胞	ISG54	26.84
病毒刺激细胞	ISG54	23.64

$$\Delta Ct(\text{实验组}) = Ct(\text{实验组, 目的基因}) - Ct(\text{实验组, 内参基因})$$

$$\Delta Ct(\text{对照组}) = Ct(\text{对照组, 目的基因}) - Ct(\text{对照组, 内参基因})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(-3.22)} = 9.32$$

病毒刺激细胞后，细胞中的ISG54抗病毒基因表达上调了9.32倍。





## 相对定量——

比较多个样本间某一特定性质属性（基因表达差异等）

迄今适用于所有类型的细胞 / 组织所通用的内参基因可能不存在。正确选择内参基因，很大程度上依赖于所研究的细胞或组织，研究者应寻找适合各自实验系统的特异性稳定表达的内参基因。

因此，适当内参基因的选择，需要在每种类型的细胞、每种类型的肿瘤和每种实验条件下进行。



## 相对定量——

比较多个样本间某一特定性质属性（基因表达差异等）

- 内参基因的稳定性评价：

- A. 候选内参基因的数目要大于5个

- B. 样本数大于10个

- C. 常用的软件有：

- geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>)

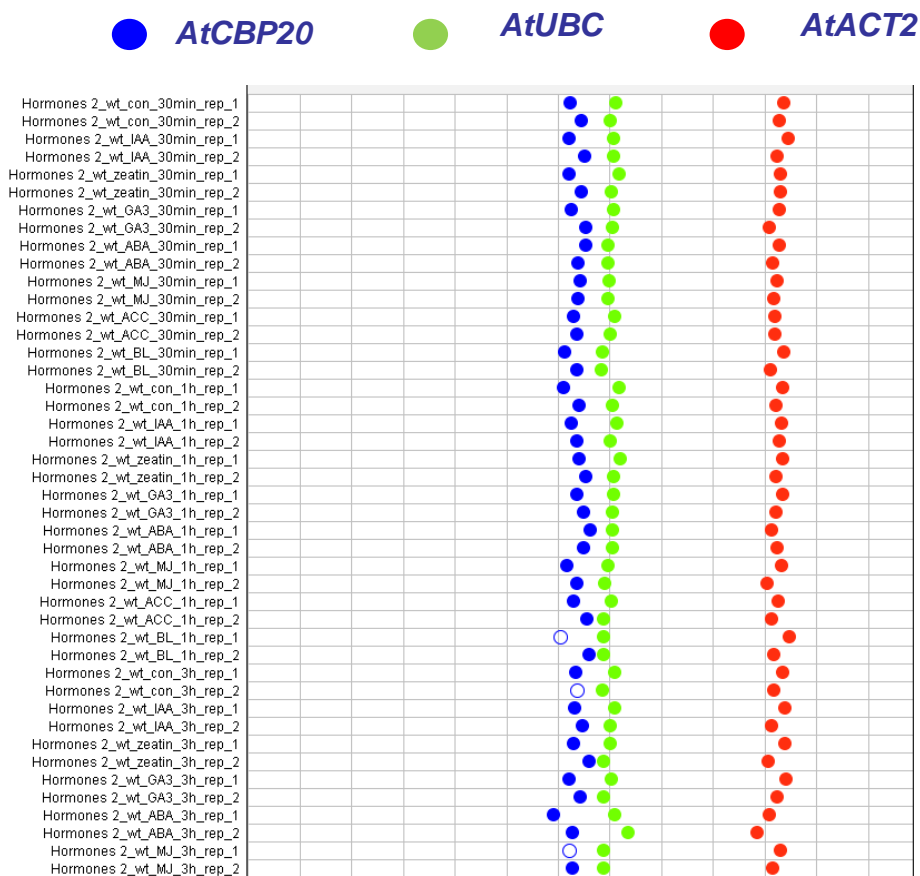
- NormFinder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>)

- BestKeeper

- qBase

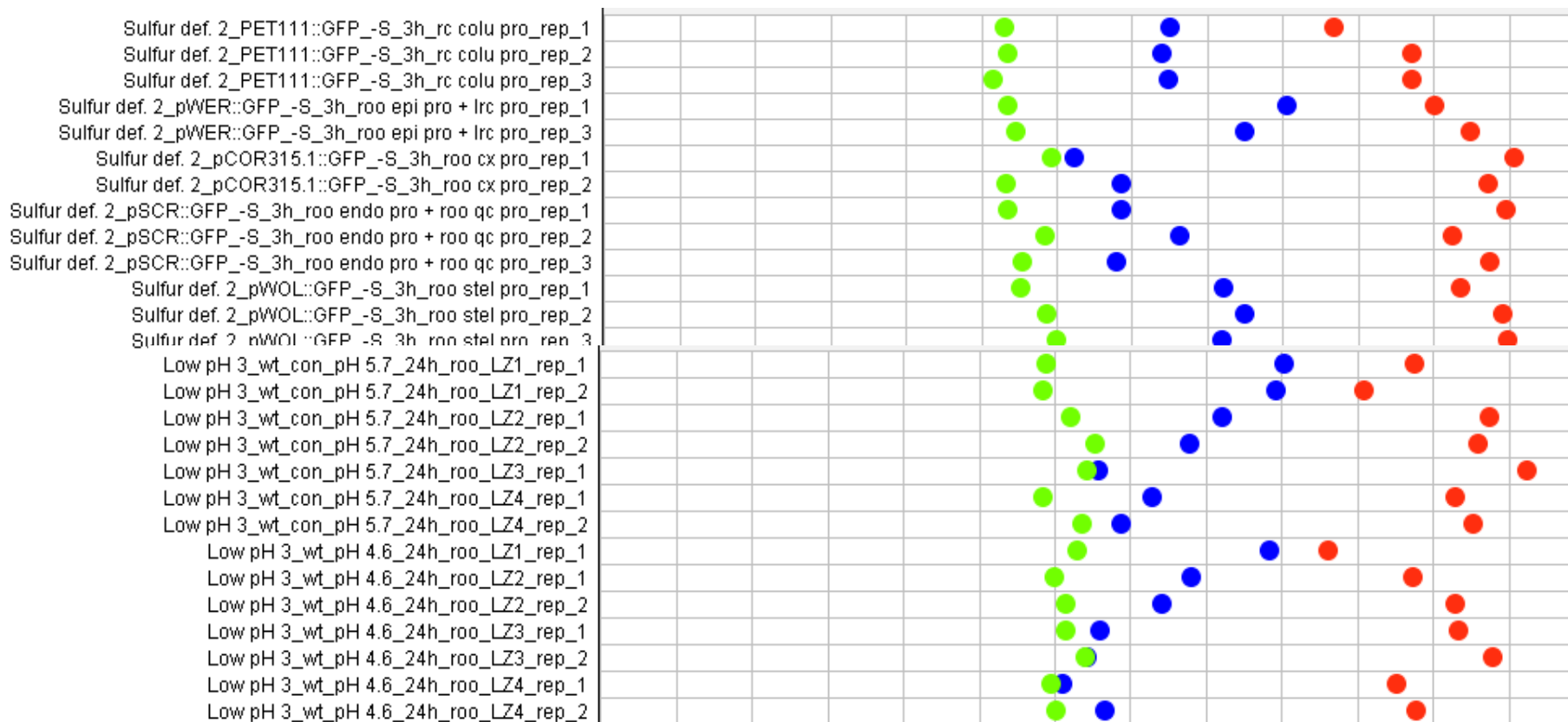


## 三个内参基因在多数实验条件下表达稳定

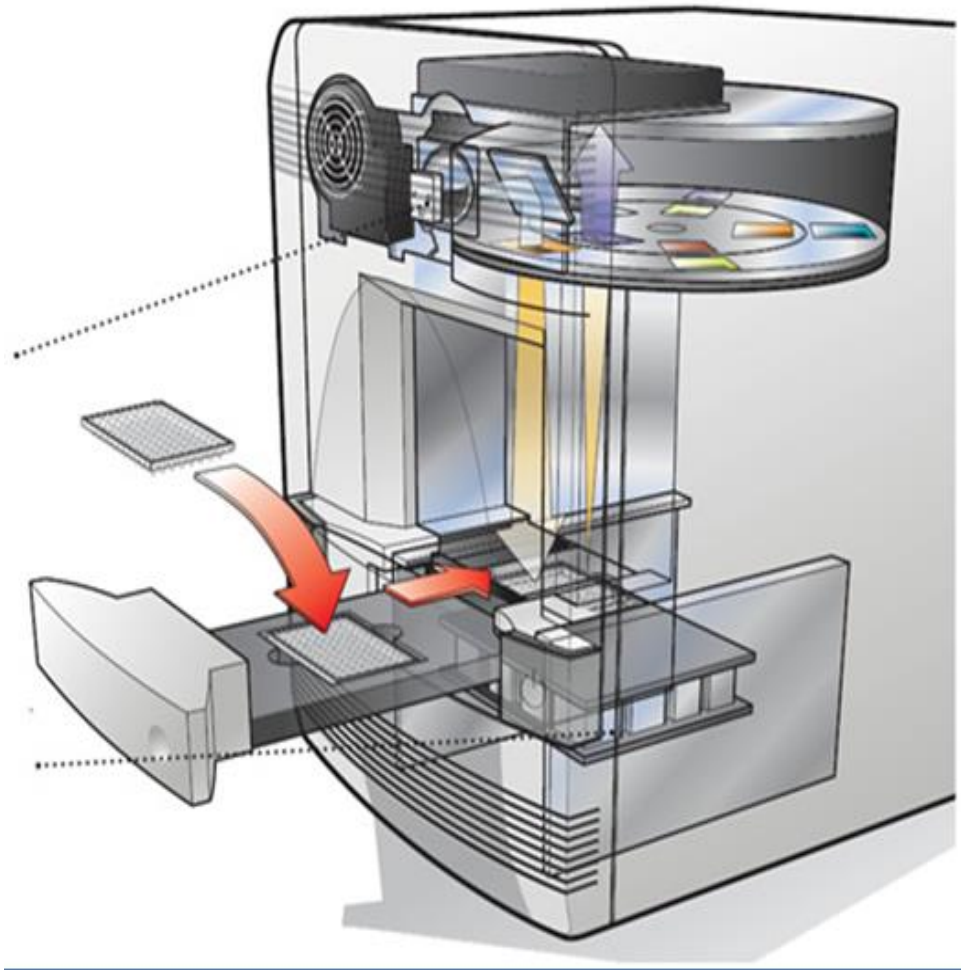


## 三个内参基因在多数实验条件下表达不稳定

● *AtCBP20*      ● *AtUBC*      ● *AtACT2*



- 激发光发射源
- 接收装置
- PCR反应模块





## 荧光定量PCR技术能做啥？

运用荧光定量PCR技术，我们可以对DNA、RNA样品进行定量及定性分析。定量分析包括绝对定量分析和相对定量分析。前者可以得到某个样本中基因的拷贝数和浓度；后者可以对不同方式处理的样本中基因表达水平进行比较。目前实时荧光定量PCR技术已经被广泛应用于基础科学研究、临床诊断、疾病研究及药物研发等领域。其中最最主要的应用集中在以下几个层次：

- ✓ 临床、食品级环境应用
- ✓ 分子生物学应用
- ✓ 遗传学、SNP分析及深入应用



## 1、临床、食品及环境应用

临床方面的应用主要包括病原微生物检测、病原体检测、基因病诊断、传染病检测和病变检测等。此外在食品检测、环境检测和 RNAi 基因失活率的检测等方面也有广泛应用。在这些领域内，定量 PCR 比传统 PCR 具有更高的灵敏度，而且耗时少，且可以从活的或死的病原菌中检测到定量核酸，从而体现了定量 PCR 灵敏度高，特异性强，无污染和准确性等特点。



## 2、分子生物学应用

在分子生物学上定量 PCR 的应用相当广泛，包括基因转录检测（同一基因在不同组织的表达差异，例如比较经过不同处理样本之间特定基因的表达差异，如药物处理、物理处理、化学处理等），特定基因在不同时期的表达差异等，利用定量 PCR 测定产物并进行融解曲线分析的方法对已知 cDNA 芯片的差显技术的结果进行确认。





### 3、遗传学，SNP 分析及深入应用

用不同的荧光报告基团标记的探针分别与野生型和突变基因杂交。杂交探针的效率和其后的切除与杂交有关。如果一种染料的信号明显高于另一种则说明它是纯合子，如果两种荧光信号都增加则表明是一个杂合子。

甲基化分析：GC 岛内胞嘧啶的甲基化形成 5' - 甲基化胞嘧啶被认为和许多人类疾病特别是癌症有关，可以利用 Methylight 对其进行分析，此技术基于 Taqman 探针法，在扩增前处理 DNA，使得未甲基化的胞嘧啶变为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不受影响，然后用特异性的引物和探针来区分甲基化和非甲基化的 DNA。

SNP 分析：SNPs 即单核苷酸多态性，人类最常见的可遗传变异占据所有已知多态性的 90% 以上，SNP 分析从根本上来说是确定一对染色体的每种基因的两个拷贝，哪种突变在两个拷贝中存在，因此利用定量 PCR 可以快速灵敏的检测 SNP 结果。

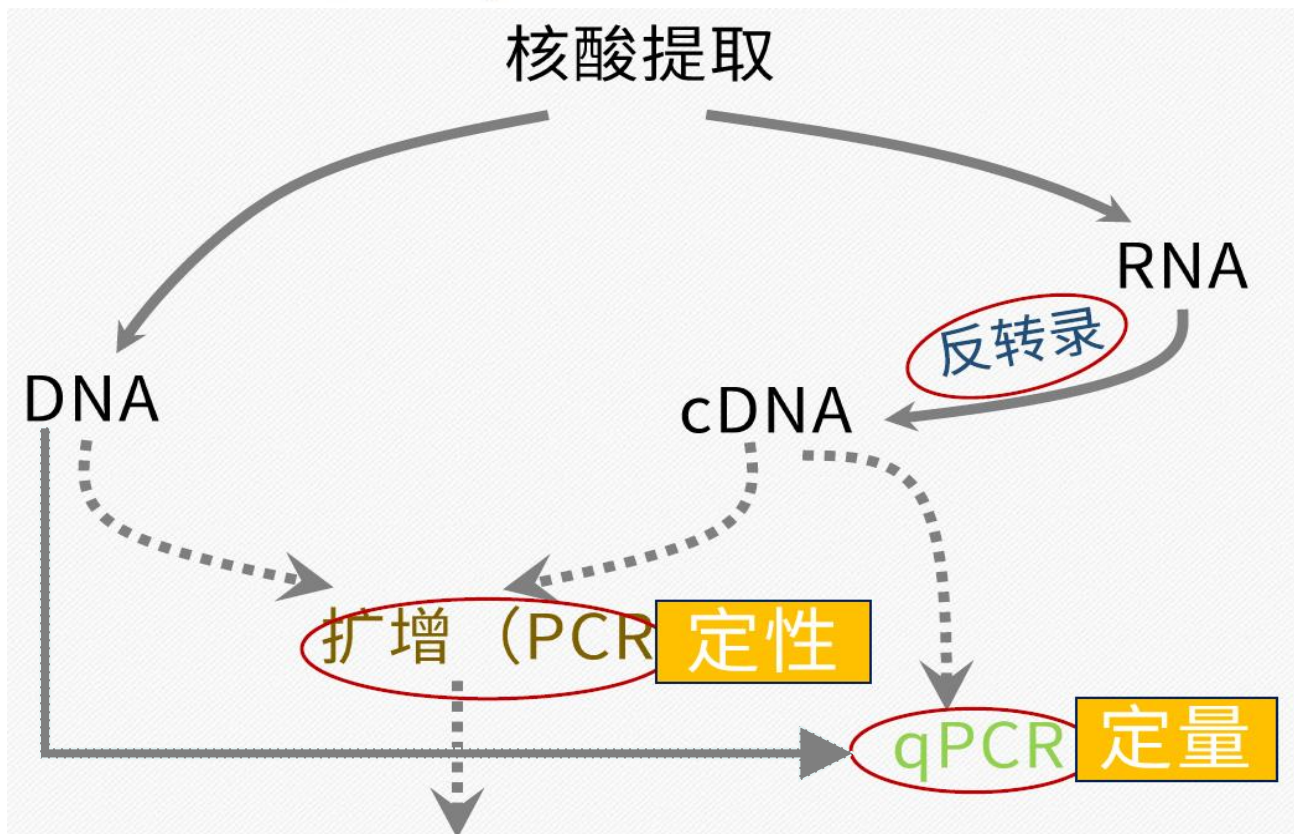




## 荧光定量PCR实验怎么做？

- ✓ 核酸模板制备
- ✓ RT实验策略
- ✓ qPCR实验设计
- ✓ qPCR实验参考方案



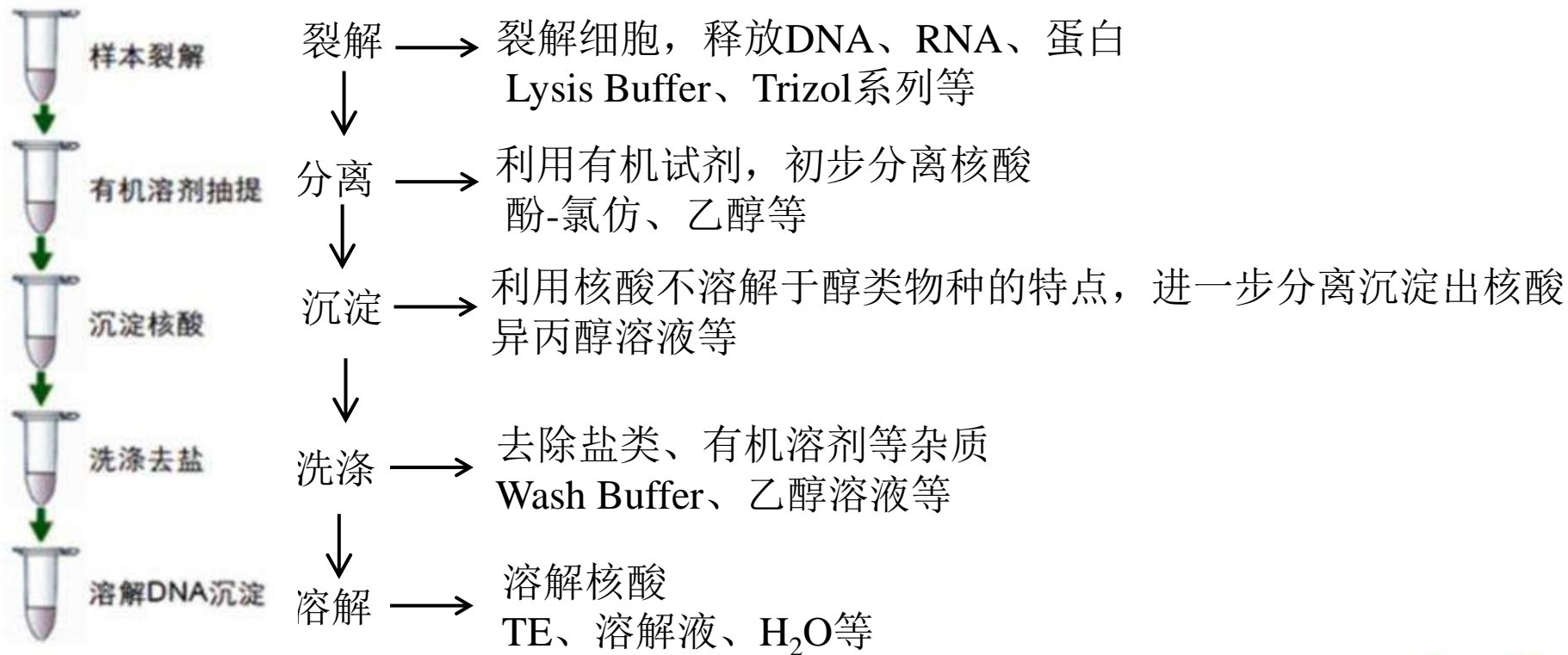


荧光定量PCR实验关联图

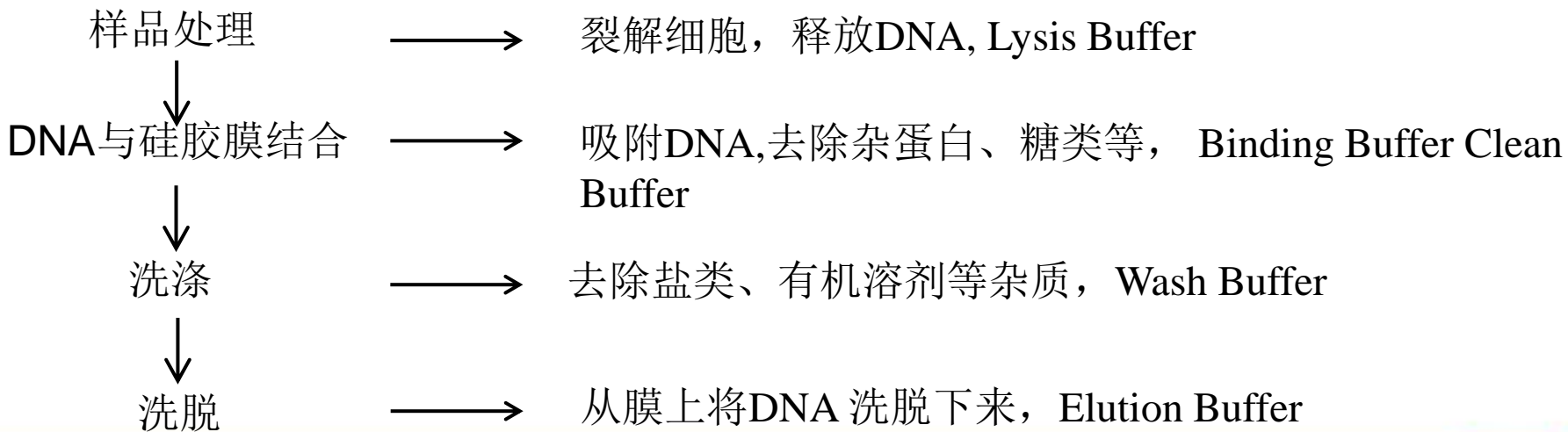
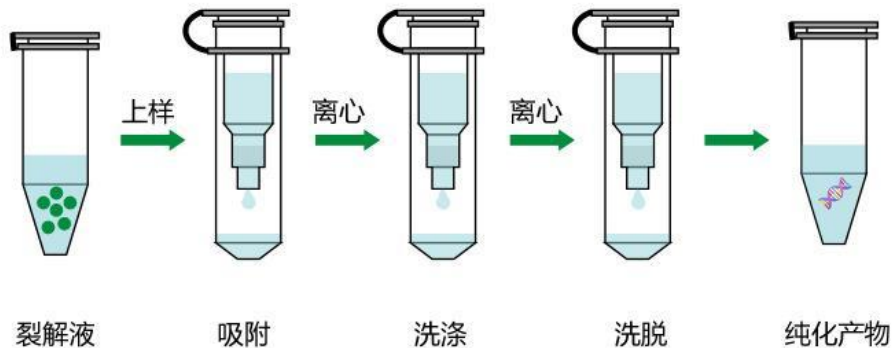




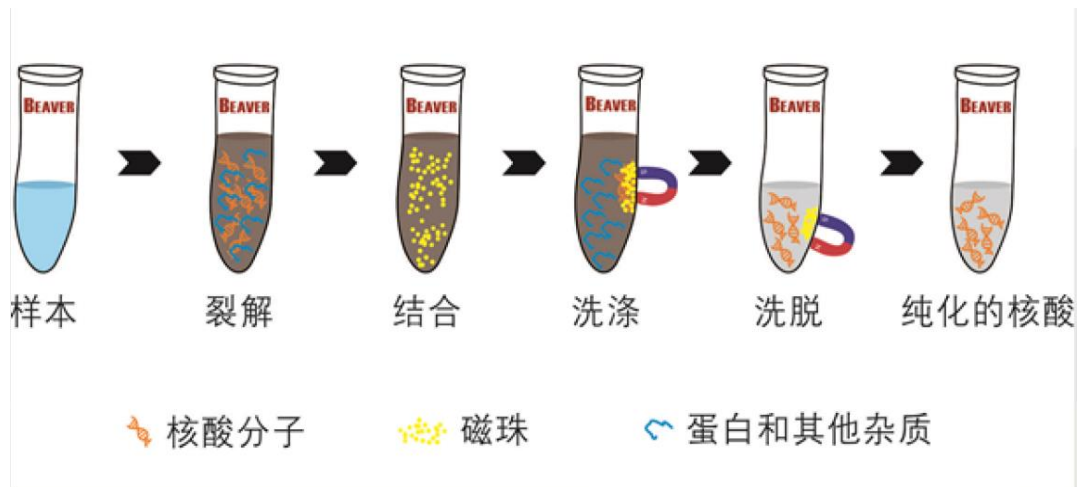
## 抽提法



## 离心柱法



## 磁珠法



- 1、裂解：破坏细胞结构，使DNA充分游离出来；
- 2、结合：加入磁珠结合液，使DNA与磁珠结合；
- 3、洗涤：利用洗涤液去除残留杂质；
- 4、洗脱：分离DNA与磁珠，得到高质量的DNA溶液。



## 核酸提取方法特点

### 传统提取法

特点：  
需要准备大量试剂；  
操作繁琐，时间长；  
毒性大。

### 固相抽提法

特点：  
简单、方便、省时省力、高效率；  
提取结果稳定；  
纯度符合下游实验。

### 自动化抽提系统

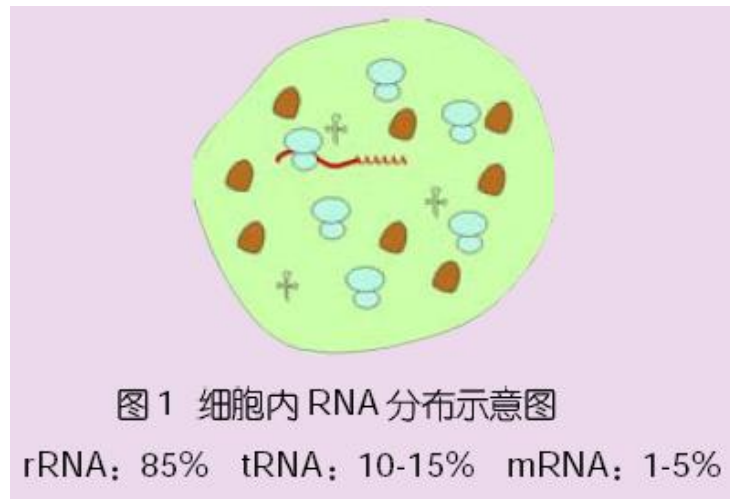
特点：  
降低了人力成本和工作者的隐患；  
提高了结果可重复性和质量。  
避免样品交叉污染。





## RNA提取原理及注意事项

细胞中的RNA可以分为信使RNA(mRNA)、转运RNA(tRNA)和核糖体RNA(rRNA)三大类(见图1),且各种RNA的含量也不相同,其中rRNA占细胞中RNA含量的80-85%,构成了核糖体骨架;tRNA含量约为10-15%,是氨基酸运输的载体;mRNA含量占1-5%,是携带氨基酸编译的密码子。不同组织总RNA提取的实质就是将细胞裂解,释放出RNA,并通过不同方式去除蛋白、DNA等杂质,最终获得高纯RNA产物的过程。



## RNA提取——注意事项

- 根本原则：防止RNA降解，确保RNase free!
- 避免外源RNase：操作细节
- 避免内源RNase：材料处理与保存



## RNA提取——操作细节

### 避免外源RNase污染

- 仪器：RNase free耗材、高温或DEPC处理器皿
- 试剂：RNA实验专用、DEPC处理
- 人员：戴口罩、手套
- 环境：RNase free工作区

### 避免内源RNase污染

- 操作快速!
- 液氮研磨/液氮速冻
- RNA保存试剂



## RNA品质检验

- 紫外分光光度计检验RNA纯度及浓度
- 凝胶电泳检验RNA完整性



## 紫外分光光度计检验——RNA纯度及浓度

无法检验RNA是否降解

通过  $OD_{260/280}$  来检测 RNA 纯度， $OD_{260/230}$  作为参考值。

$OD_{260/280}$  在 1.9-2.1 之间，可以认为 RNA 的纯度较好；

$OD_{260/280}$  值小于 1.8，则表明蛋白杂质较多；

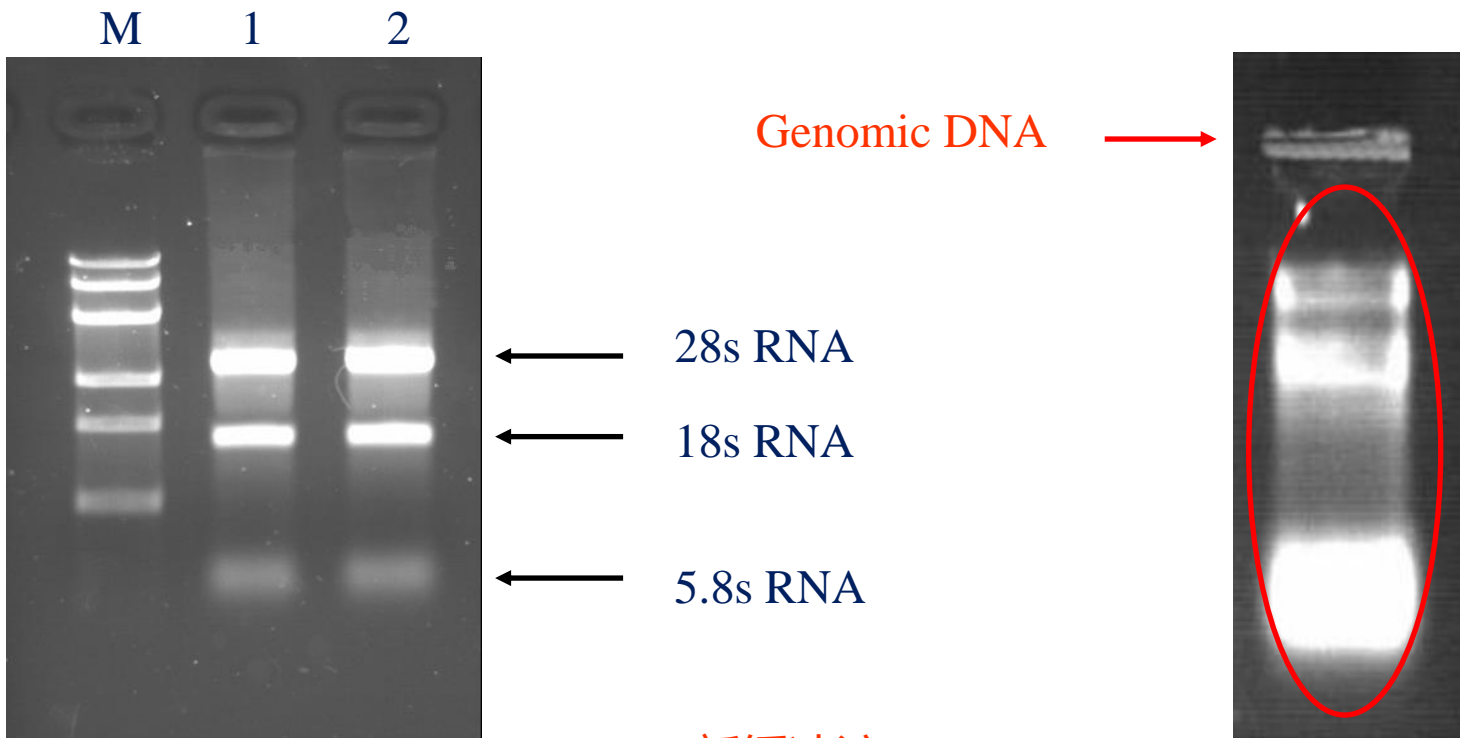
$OD_{260/280}$  值大于 2.2，则表明 RNA 已经降解；

$OD_{260/230}$  值小于 2.0，则表明裂解液中有异硫氰酸胍和  $\beta$ -巯基乙醇的残留。

注意：如果用 TE 溶解或洗脱 RNA，会使  $OD_{260/280}$  值偏大。



## 凝胶电泳检验——RNA完整性



Lane M: *Trans8K* DNA Marker

Lane 1、2: Human Total RNA

新缓冲液  
高电压/短时间  
add RNase Inhibitor



## 几种检验方法比较

	凝胶电泳法	紫外分光光度计	ARLC&2100B
判断RNA是否完整	可以	不可以	可以
准确定量	不可以	可以	可以
检验基因组DNA	可以	不可以	可以
检验蛋白，盐类，酚等杂质	不可以	可以	不可以
受溶剂影响	不敏感	敏感	敏感



## 基因组DNA残留

- RNA提取时，最值得注意的污染物
- 对PCR、qPCR等后续实验可能有影响，尤其影响qPCR定量结果
- 提取RNA时，应尽量**去除**
- 后续实验时，应设**对照**检验，或设计实验**去除**其影响
- 选择使用**适当的试剂**，RT过程中去除基因组DNA残留





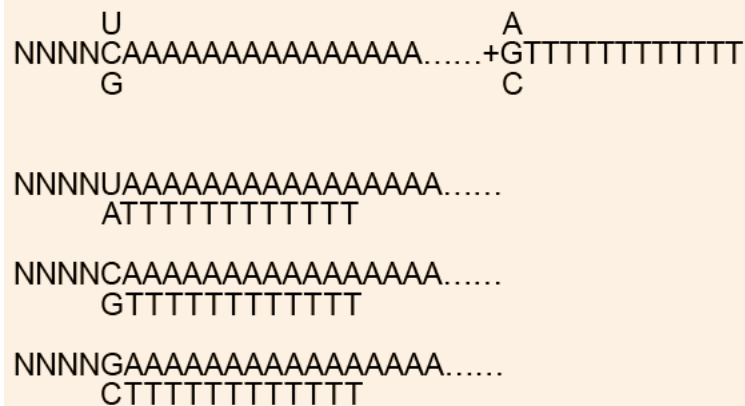
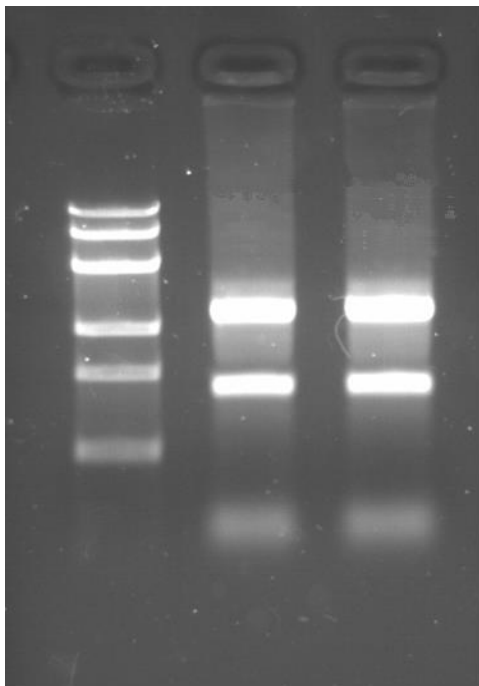
## 去除基因组DNA残留

- 选择适当的提取方法，选择高品质提取试剂
- DNase I (RNase free!) 处理
- 选择基因组DNA去除和RT同时进行的试剂

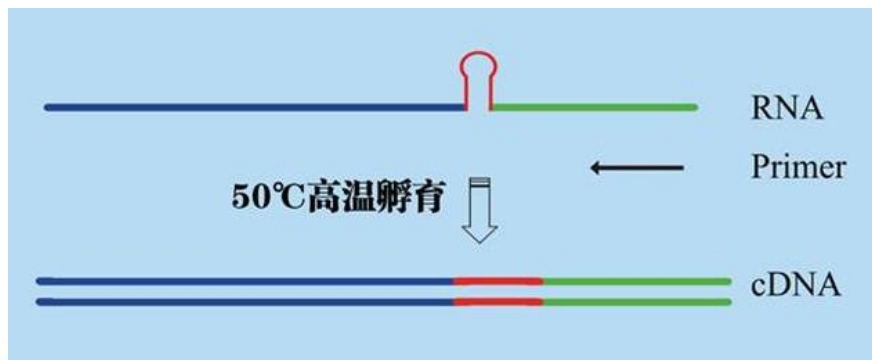


- 高品质RNA
- 位点锚定引物
- 热稳定RT酶（无RNase H活性）
- DNA去除与RT同时进行
- 优化反应体系，减少加样步骤及反应时间





- 结合位点锚定，特异性高。
- 跨越Poly(A)<sup>+</sup>结构。
- cDNA 合成完整，成功率高。

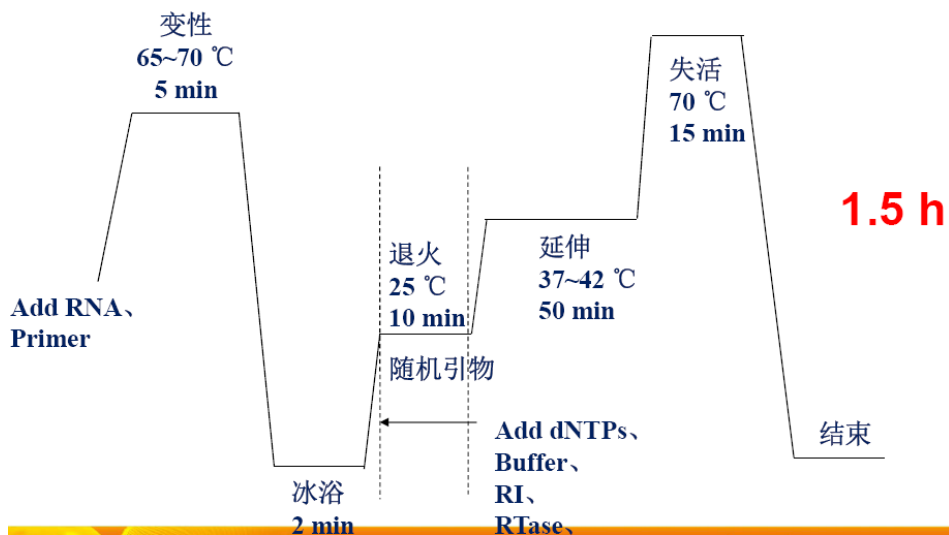




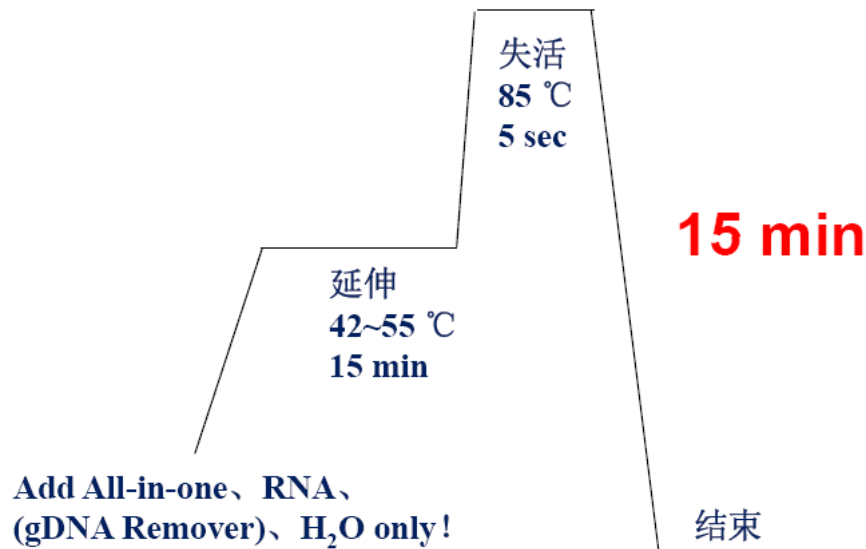
- 🔬 合成第一链cDNA的同时去除RNA模板中残留的基因组DNA。
- 🔬 15分钟反转录 (for qPCR), 30分钟反转录 (for PCR)。
- 🔬 SuperMix型, 操作方便。



## 常规反转录条件



## All-in-One for qPCR



## MIQE qPCR国际标准

### The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

Stephen A. Bustin,<sup>1\*</sup> Vladimir Benes,<sup>2</sup> Jeremy A. Garson,<sup>3,4</sup> Jan Hellemans,<sup>5</sup> Jim Huggett,<sup>6</sup>  
Mikael Kubista,<sup>7,8</sup> Reinhold Mueller,<sup>9</sup> Tania Nolan,<sup>10</sup> Michael W. Pfaffl,<sup>11</sup> Gregory L. Shipley,<sup>12</sup>  
Jo Vandesompele,<sup>5</sup> and Carl T. Wittwer<sup>13,14</sup>

1. 提出发表文章时所要求的**最低限度**的必要**信息标准**。
2. 对qPCR的术语；概念；研究与临床应用；样本的采集、处理和制备；核酸的质量控制；反转录；qPCR过程；数据分析等方面的操作标准和规范都做了详尽的阐述。



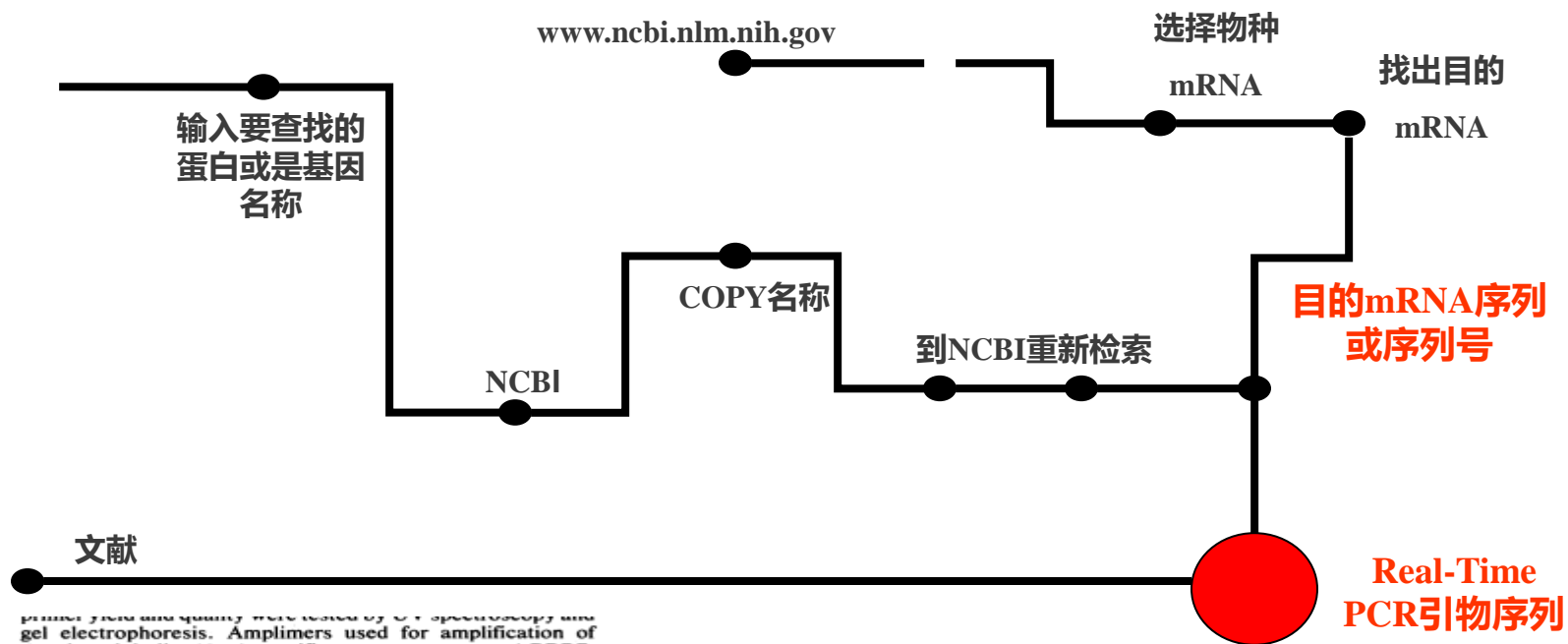
## 热启动DNA聚合酶

——四种常见的热启动技术

- 1、Chemical Modification of DNA Polymerase（化学修饰）
- 2、Recombinant Modification of DNA Polymerase（重组修饰）
- 3、DNA Polymerase Inhibition by Nucleic Acid Additives（核酸添加剂抑制物）
- 4、Taq DNA Antibodies（抗体封闭）



## qPCR引物设计



primer yield and quality were tested by 5' RZ-PCR and gel electrophoresis. Amplimers used for amplification of  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2m$ )-specific sequences were ACCCC-CACTGAAAAAGATGA (residues 1544–1563; sense strand) and ATCTTCAAACCTCCATGATG (residues 2253–2262 and 3508–3517; antisense strand) (23); PCR using these amplimers yields a 120-base-pair (bp) product. *MDR1*-specific sequences were amplified by using the sense-strand primer CCCATCATTGCAATAGCAGG (residues 2596–2615) and the antisense-strand primer GTTCAAACCTCTGCTCCTGA (residues 2733–2752) (8), which yield a 167-bp product. Each primer was added at 37.5 pmol per reaction. For quantitation, 2  $\mu$ Ci (1 Ci = 37 GBq) of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP was added to each reaction mixture, performed in triplicate. PCR was carried out in a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer/Cetus); this apparatus provided a constant yield of PCR.





## RNA提取用试剂及耗材

博日科技	SimplyP 总RNA提取试剂盒(无DNA残留型)
TransGen	RNase-free Water
Axygen	10 $\mu$ L盒装无菌吸头 (无RNA酶)
Axygen	200 $\mu$ L盒装无菌吸头 (无RNA酶)
Axygen	1000 $\mu$ L盒装无菌吸头 (无RNA酶)
Axygen	1.5ml EP管 (无RNA酶)
Axygen	0.2ml PCR管 (无RNA酶)

## RNA电泳用试剂及耗材

TransGen	2 $\times$ RNA Loading Buffer
TransGen	GelStain (替代EB的无毒高敏核酸染料)
TransGen	Agrose (琼脂糖)
TransGen	Trans2K Plus DNA Marker
Solarbio	TBE(5 $\times$ )电泳缓冲液

## 反转录用试剂及耗材

TransGen	TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(One-Step gDNA Removal)
TransGen	2 $\times$ FineTaq PCR SuperMix (+dye)
TransGen	Trans DNA Marker I
Axygen	0.2ml PCR管 (无RNA酶)

## 荧光定量PCR (qPCR) 需要试剂耗材

TransGen	PerfectStart Green qPCR SuperMix
Axygen	0.2ml透明薄壁八联管, 无盖
Axygen	0.2ml透明PCR八联管平盖(荧光定量专用)





## 荧光定量PCR结果怎么看？

- ✓ 荧光定量PCR标准数据参考范围
- ✓ 荧光定量PCR实验结果分析
- ✓ 荧光定量PCR常见问题分析



数据名称	参考范围
Tm	>80℃
CT	18 ~ 30 cycles
R <sup>2</sup>	>0.95
Slope	(-3.58) ~ (-3.10)
Efficiency	90% ~ 110%
NTC	CT(NTC) = 0 CT(NTC) - CT(样品) ≥ 5
NRC	CT(NTC) = 0 CT(NTC) - CT(样品) ≥ 5





诚信为本  
服务至上

# 荧光定量PCR实验结果分析

## 判断数据有效性

产品咨询：18860119780

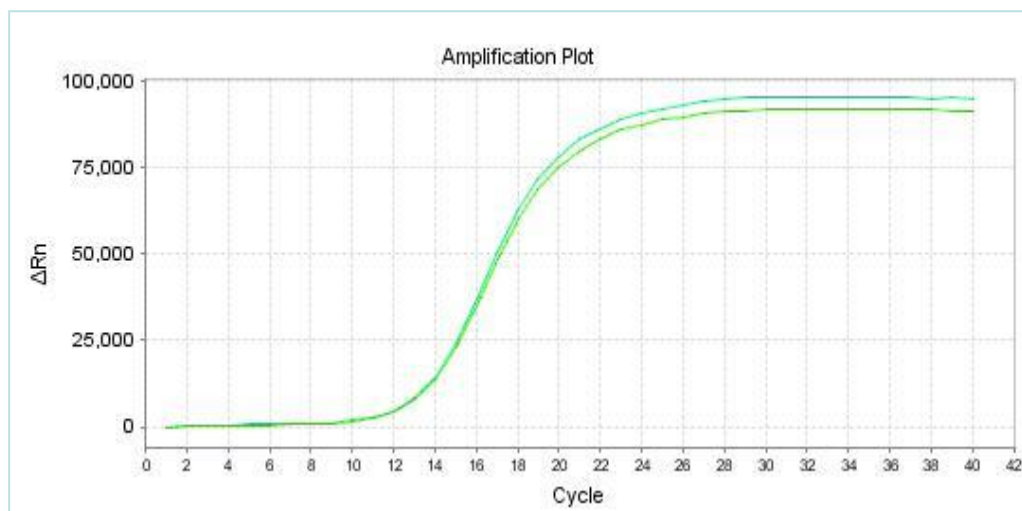
技术咨询：18159089690



- 用扩增曲线检验qPCR体系
- 用溶解曲线检验qPCR体系
- 用标准曲线检验qPCR体系
- 用No-Template Control( NTC)检验qPCR体系 (引物)
- 用No RT Control检验qPCR体系 (模板)



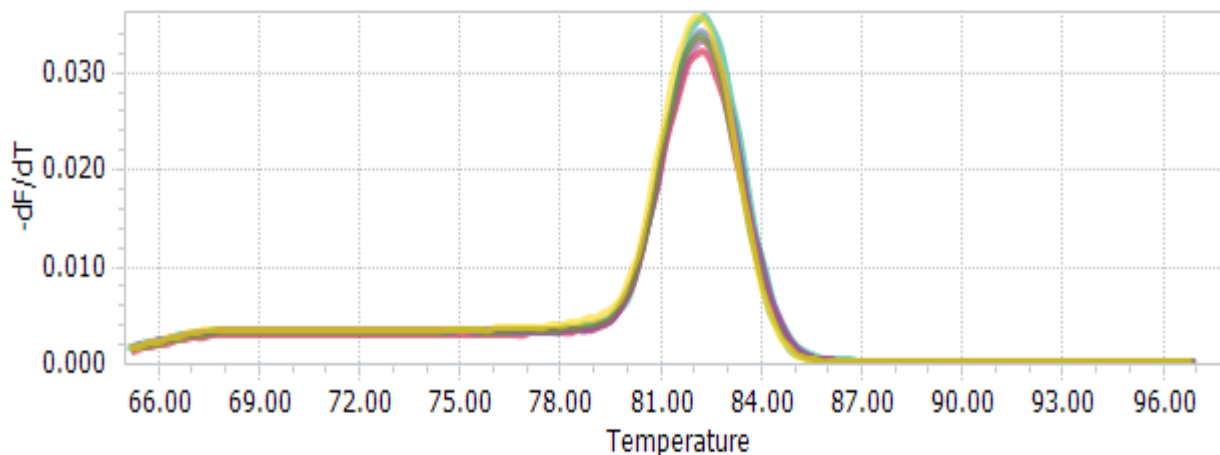
- 平滑
- 起始无扩增
- 起峰时间正常
- NTC和NRC无扩增  
或扩增起峰较晚



## 扩增曲线

**CT值是判断实验成功与否的重要参考**





## 溶解曲线

- 呈现单峰
- 峰的宽度较小
- NTC和NRC均无较高的峰出现



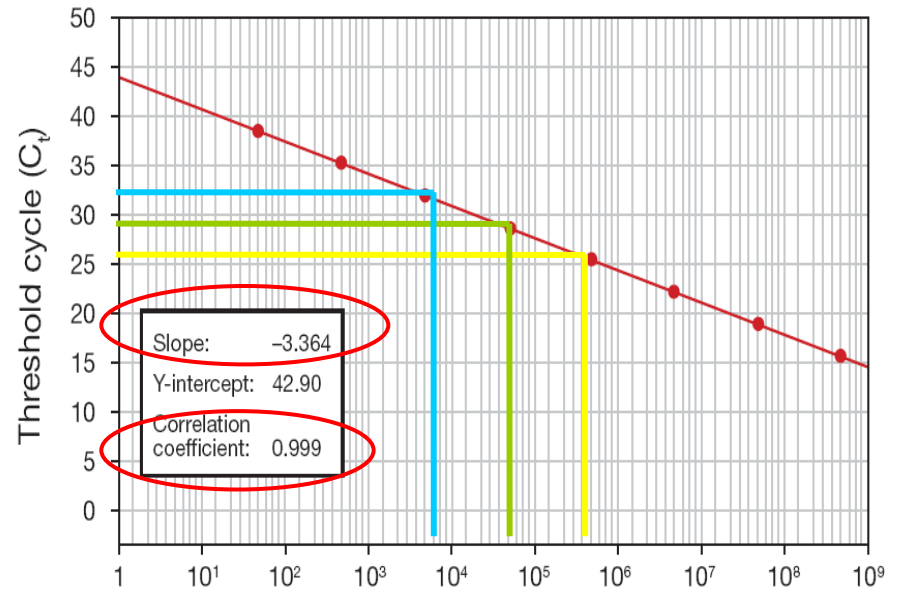
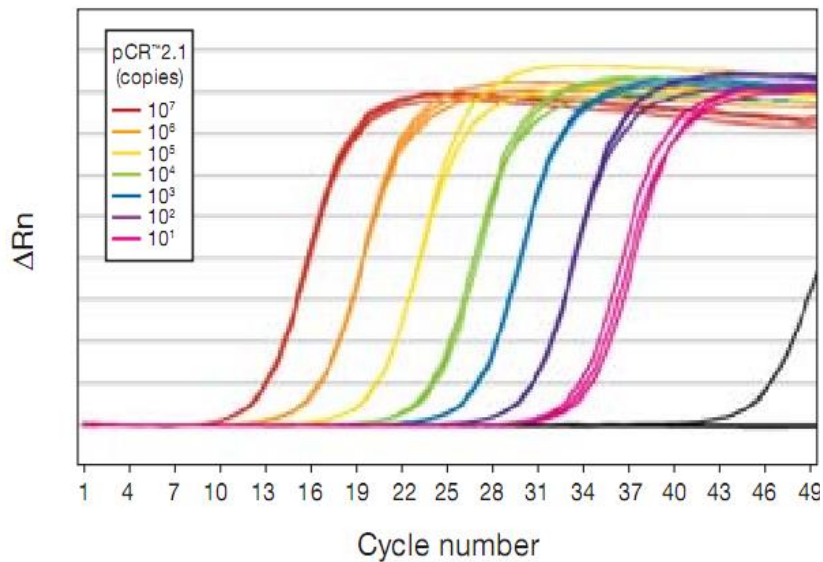
# 荧光定量PCR实验结果分析

$$r^2=0.999 \quad \text{Slope}=-3.364$$

$$E=10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

$$r^2: 0.95 \sim 1 \quad \text{Slope: } -3.58 \sim -3.10$$

$$E: 90\% \sim 110\%$$



扩增效率





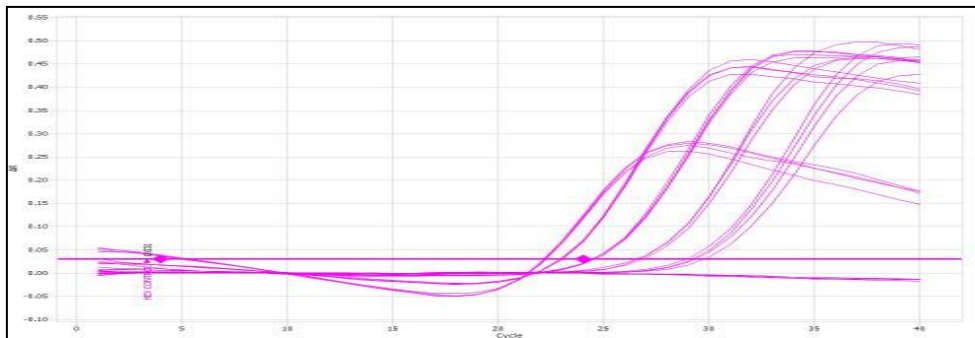
现象	原因	解决方案
1. Ct值出现过晚 ( > 38)	a. 扩增效率低, 反应条件不够优化	1. 重新设计引物或探针; 2. 更换灵敏度更高的试剂; 3. 改用三步法反应, 降低退火温度
	b. 反应成分降解或模板量偏低	1. 设置阳性对照; 2. 检查RNA质量; 3. 提高反转录效率; 4. 采用一步法qRT-PCR
	c. PCR产物太长	重新设计引物, 扩增长度建议100-200 bp

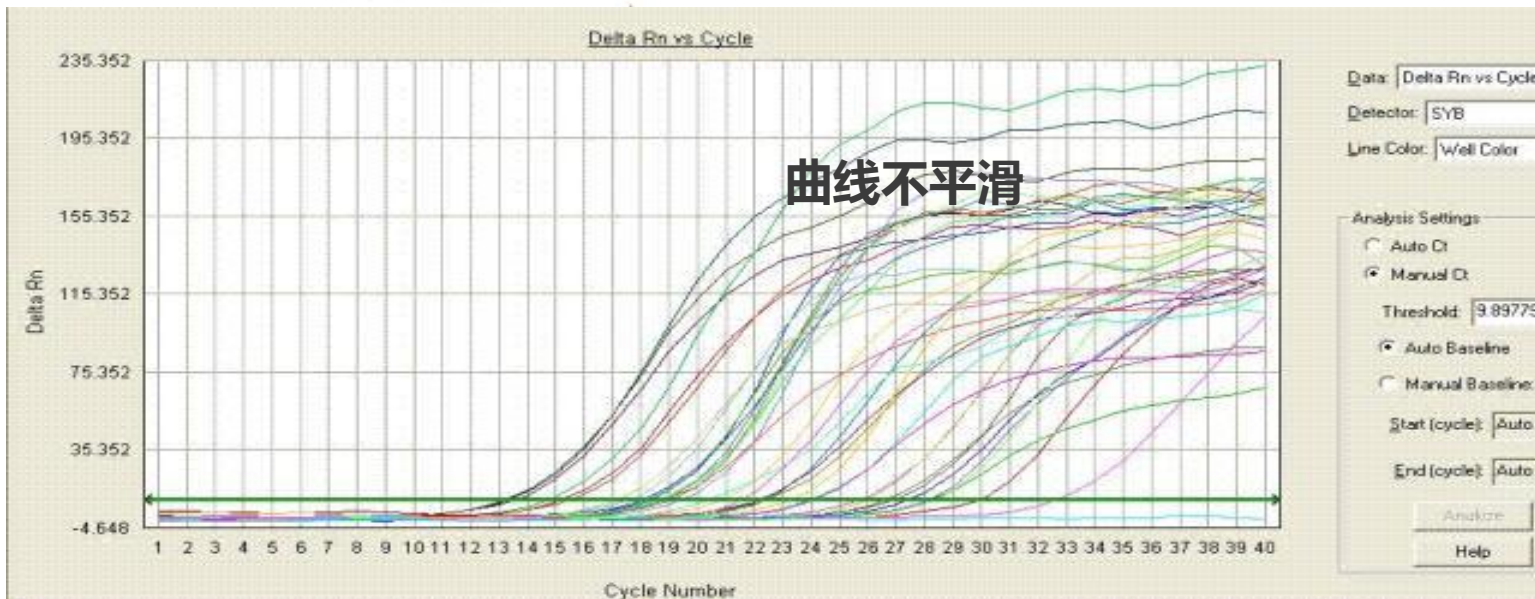


现象	原因	解决方案
2. 无Ct值 或无信号	a. 循环数偏少	建议扩增循环数35以上，可以根据具体情况增加循环数至45
	b. 信号采集设置有误	三步法建议在72°C延伸采集，确定设置了采集信号指令
	c. 引物或探针失效	1. 设置阳性对照；2. 探针退火温度偏低，凝胶电泳检测是否存在扩增产物
	d. 模板不足或降解	1. 检测RNA质量；2. 提高反转录效率；3. 避免cDNA反复冻融；4. 使用探针法



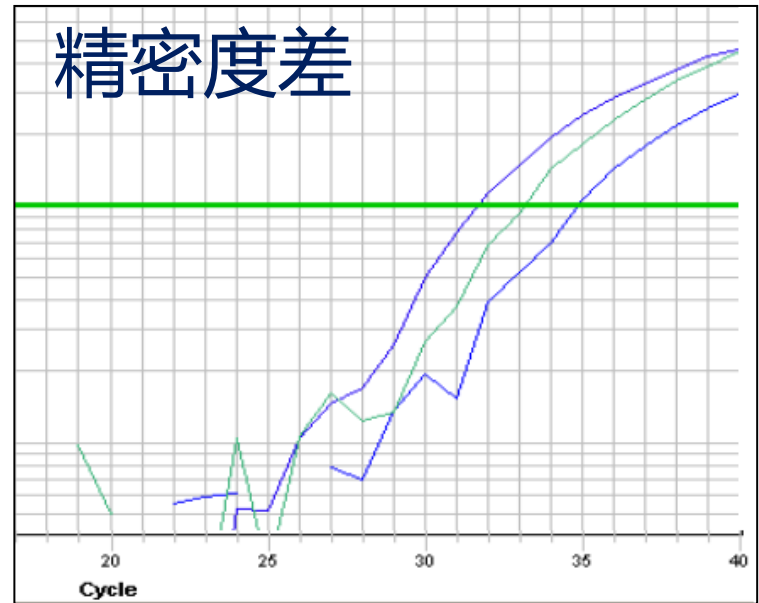
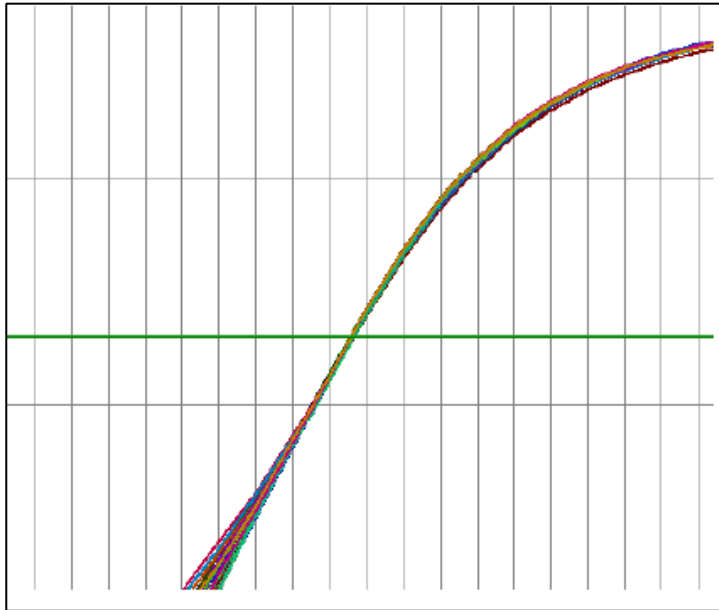
现象	原因	解决方案
3. 扩增曲线S型异常	a. ROX添加不当	根据机型选择合适的ROX
	b. 模板浓度过高	适当稀释模板，减少扩增抑制
	c. 基线设置不正确	基线期起始于3-10个循环，终止于指数扩增前





- 探针或荧光染料品质不好
- 仪器使用过度，荧光收集不稳定
- 仪器未经过校正（包括自动校正或ROX校正）
- 体系中抑制物较多，导致荧光不稳定



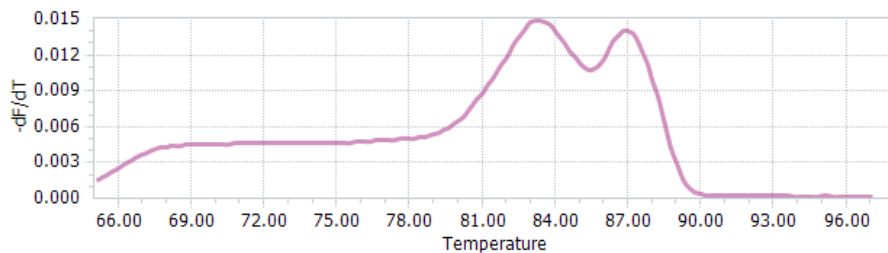
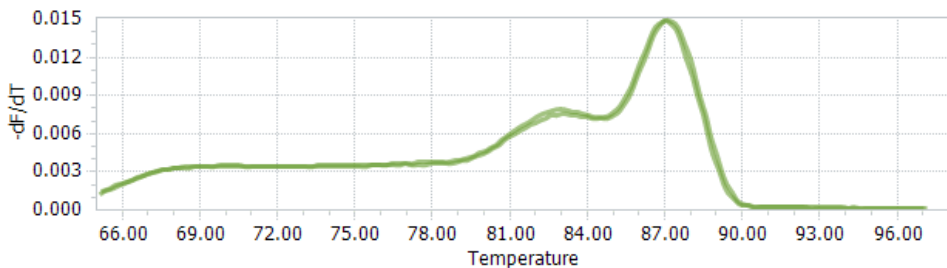
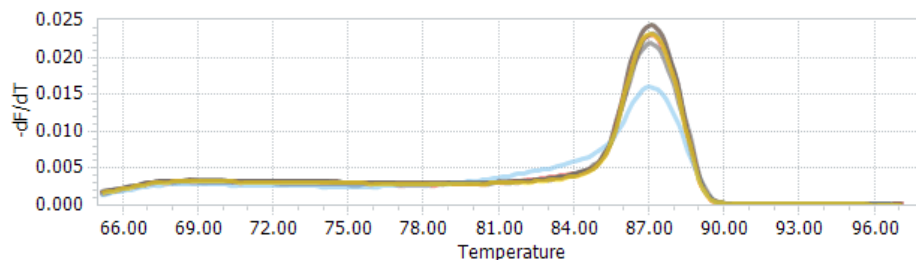
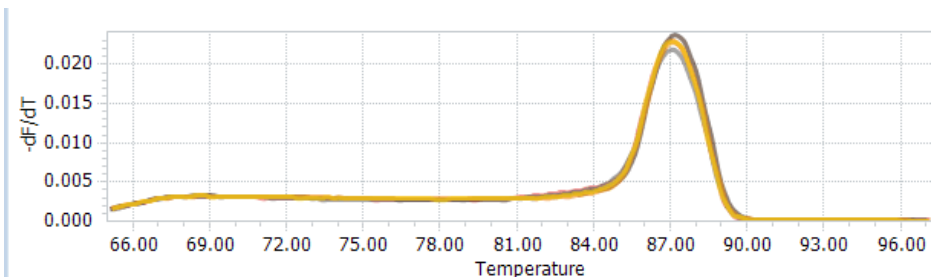


- 加样误差，体系配置错误，反应液没有混匀。
- 低拷贝基因或模板浓度过高或过低。
- 未引入校正系统。



现象	原因	解决方案
4. 溶解曲线不是单峰	a. 引物设计及用量	重新设计退火温度较高 (58-62°C), 无错配, Blast 比对特异的引物; 引物用量合适 (0.2-0.4 $\mu$ M)
	b. 模板有基因组污染	优化RNA提取方法; 选择合适的反转录试剂; 跨内含子设计引物
	c. 基因表达量低	增加反转录效率, 适当提高模板量; 选用一步法 qRT-PCR
	d. 扩增体系不佳	使用灵敏度高, 特异性强的试剂





现象	原因	解决方案
5. 标准曲线 线性关系不佳	a. 加样误差	1. 标准品加样体积大于2微升; 2. 引物预混后再分复孔; 3. 校正移液器, 尽量选择硅化枪头; 4. 使用文库稀释液稀释标准品
	b. 标准品降解	1. 避免反复冻融; 2. 电泳检测发现降解后重新制备稀释标准品
	c. 模板浓度高或有抑制物	改变稀释精度, 增加稀释梯度
	d. 引物或探针不佳	重新设计引物和探针
	e. PCR酶灵敏度不高及活力下降	1. 更换灵敏度更高, 线性关系更好的试剂; 2. 校正-20°C冰箱, 使用时将酶置于冰上





现象	原因	解决方案
6. NTC 有扩增	a. 水, 试剂或引物 污染	分装水和引物, 试剂优先于引物和模板加入到体系中
	b. 引物二聚体	1. 优化引物设计, 提高退火温度 (58-62°C) ; 2. 降低引物浓度 (0.2-0.4 $\mu$ M)
	c. PCR核心酶	选用封闭技术先进 (全封闭) 的试剂



现象	原因	解决方案
7. 扩增效率低	a. 反应条件不够优化	1. 降低退火温度, 使用三步法; 2. 使用扩增更线性的试剂
	b. PCR抑制物	1. 优化核酸纯化方法; 2. 适当稀释模板降低抑制物影响
	c. 引物设计	1. 引物避免3' 端错配; 2. 扩增片段长度在100-200 bp



现象	原因	解决方案
8. 标准曲线 线性关系不佳	a. 加样误差	1. 标准品加样体积大于2微升; 2. 引物预混后再分复孔; 3. 校正移液器, 尽量选择硅化枪头; 4. 使用文库稀释液稀释标准品
	b. 标准品降解	1. 避免反复冻融; 2. 电泳检测发现降解后重新制备稀释标准品
	c. 模板浓度高或有抑制物	改变稀释精度, 增加稀释梯度
	d. 引物或探针不佳	重新设计引物和探针
	e. PCR酶灵敏度不高及活力下降	1. 更换灵敏度更高, 线性关系更好的试剂; 2. 校正-20°C冰箱, 使用时将酶置于冰上





诚信为本  
服务至上

**感谢聆听!**



产品咨询：18860119780

技术咨询：18159089690





诚信为本  
服务至上

---

# 福州都拜特生物技术有限公司

产品咨询：18860119780

技术咨询：18159089690





诚信为本  
服务至上

# 关于都拜特

福州都拜特（Dobiotech）生物技术有限公司坐落于福建省福州市仓山区神峰科技园区，占地400多平方米，是一家致力于生命科学和医学科研及诊断领域的专业化**产品及技术服务型**企业。经过不断的发展，公司逐步形成了完善的经营管理团队和成熟的市场销售体系，成为了多个知名品牌的签约代理商。

2019年，公司经过多年精心准备筹划的**实验技术平台**正式运营，形成了以资深博士带队，全力打造以生物科研项目合作为核心的专业化技术团队。未来，公司将专注于为各大科研院所、医院、企业、科研事业单位等科研机构在生命科学及医学研究领域提供全面的技术支持及项目解决方案。

经营理念——诚信为本、服务至上，做有担当的服务商

服务宗旨——感恩于心，感恩于行

发展目标——打造全方位、高水平、好口碑的优质合作商

员工标准——真诚，有善心；自律，有担当；勤奋，有拼劲

产品咨询：18860119780

技术咨询：18159089690







产品咨询：18860119780

技术咨询：18159089690





## 主营仪器

- 分子生物学仪器：**组织研磨仪、核酸提取仪、基因扩增仪、移液器、分光光度计、凝胶成像系统、荧光及光学发光成像系统、电泳和印迹系统等
- 生物工程类设备：**摇床、培养箱、超净工作台、生物安全柜、液氮罐、分析天平、细胞破碎仪、低温恒温循环泵、高压灭菌锅、纯水器、冻干机
- 细胞生物学仪器：**细胞计数器、光学显微镜、活体成像系统、酶标仪

## 主营试剂



分子生物学产品  
细胞生物学产品



核酸纯化专家  
荧光PCR法核酸检测试剂盒  
自动化提取仪、基因扩增仪



蛋白纯化磁珠  
免疫磁珠、基础磁珠  
磁珠法核酸提取试剂盒等



KO验证抗体  
第四代重组兔单抗  
定制抗体、ELISA试剂盒



澳洲血清、乌拉圭血清  
国产血清、无血清细胞培养基  
ELISA试剂盒等



国际权威细胞



行业领先的外泌体研究工具

## 课题合作

合作热线：181-5908-9690 (张博士)

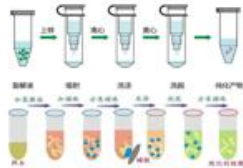
产品咨询：18860119780

技术咨询：18159089690

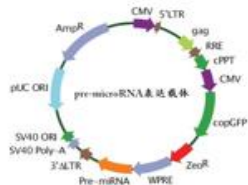




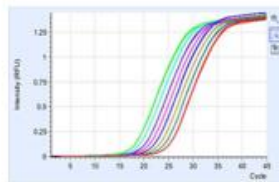
## 科研项目合作



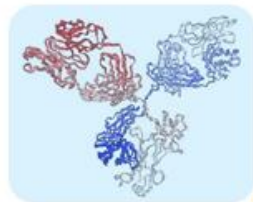
核酸提取



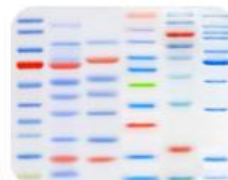
载体构建



荧光定量



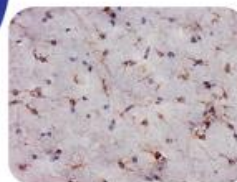
蛋白表达纯化



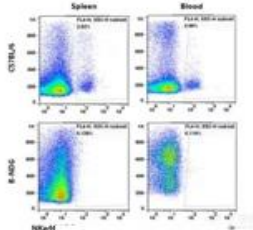
West Blot



ELISA



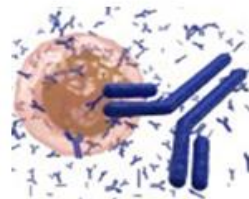
IHC



流式细胞术



生理生化检测



抗体定量



# 整体课题实验流程

