



诚信为本
服务至上

荧光定量PCR实验原理及实验设计、上机操作培训

福州都拜特生物技术有限公司

2023年05月10日

产品咨询：18860119780

技术咨询：18159089690



- ✓ 掌握实验技术原理
- ✓ 开发实验设计思路
- ✓ 规范实验技术操作
- ✓ 提升疑难问题分析能力
- ✓ 协助完成实验





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？





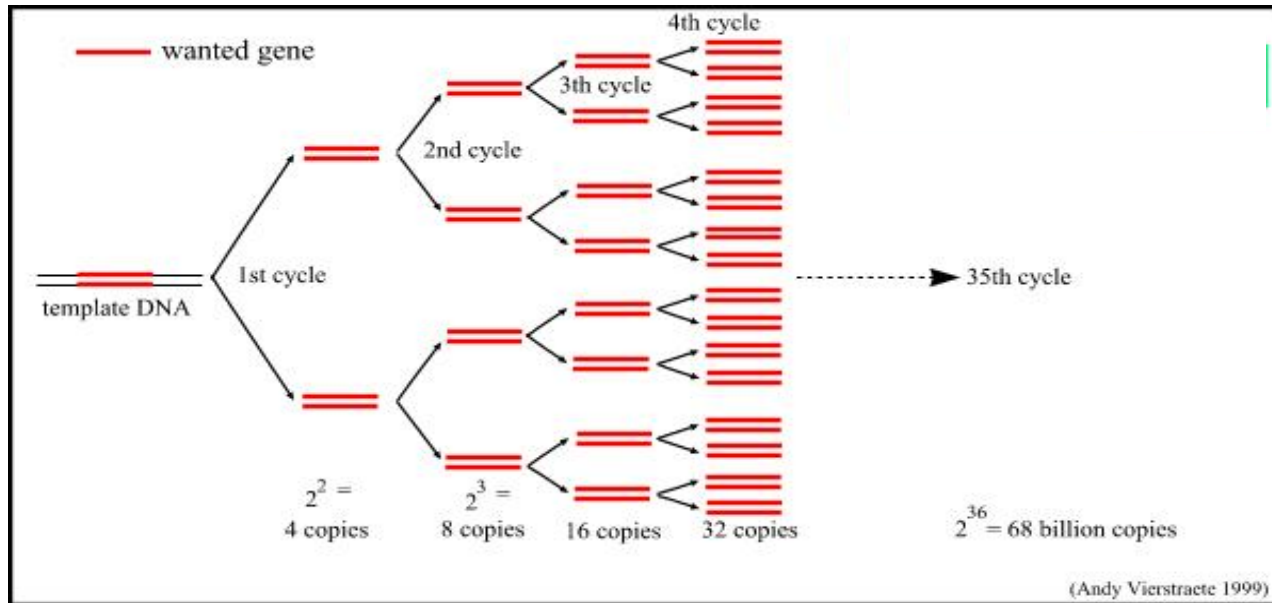
- ✓ 荧光定量PCR化学原理和基本概念
- ✓ 荧光定量PCR数学原理和基本概念
- ✓ 荧光定量PCR仪器工作原理





荧光定量PCR化学原理和基本概念

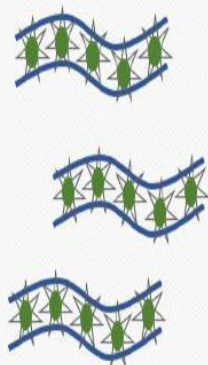
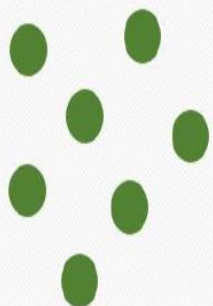
PCR: Polymerase Chain Reaction——聚合酶链式反应



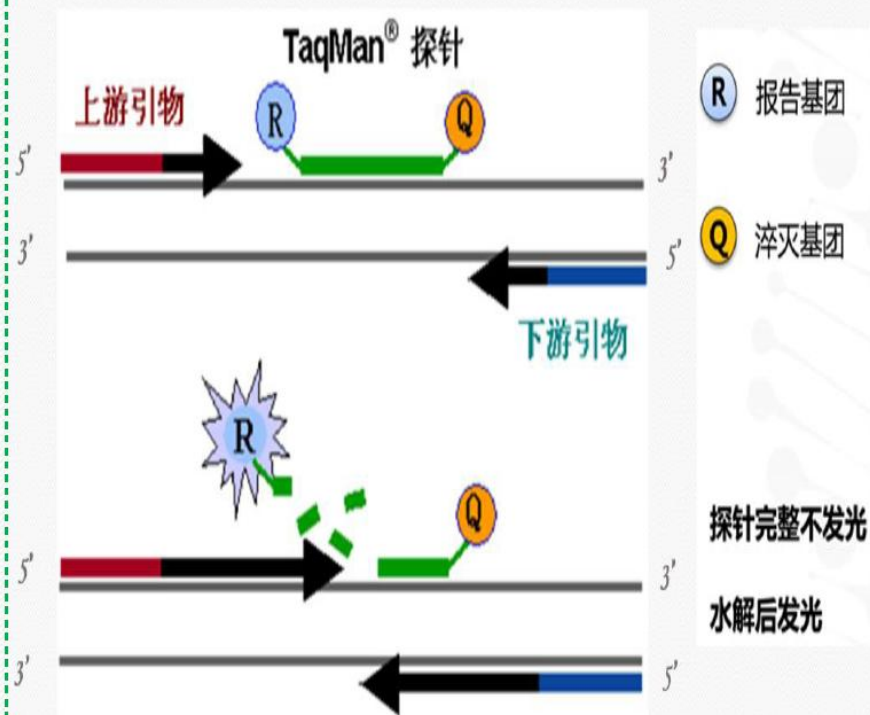


荧光定量PCR化学原理和基本概念

SYBR Green 染料法



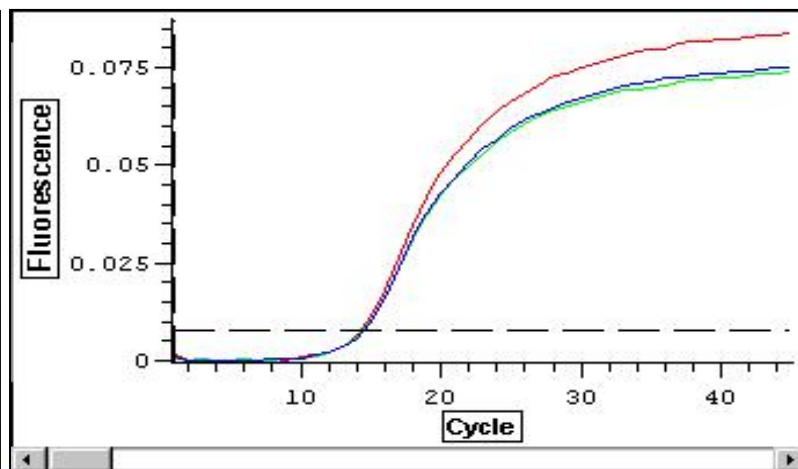
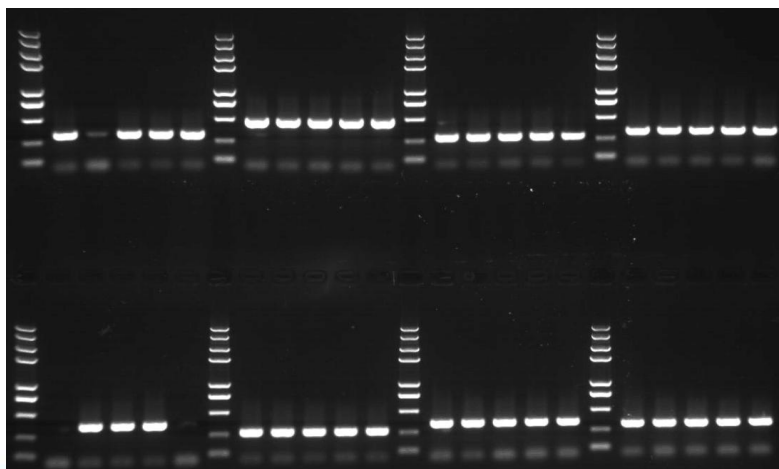
Taq Man 探针法





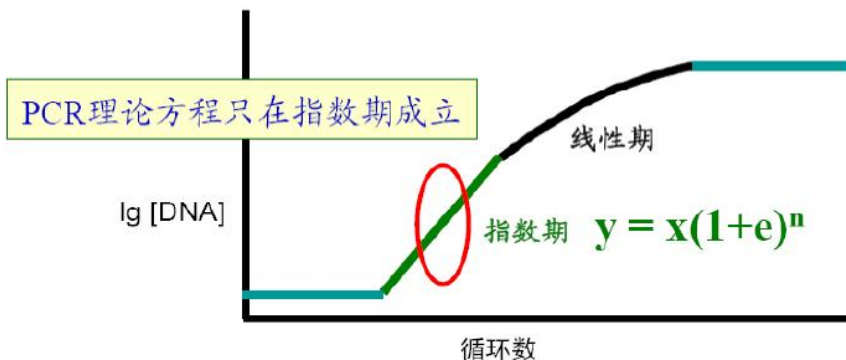
荧光定量PCR化学原理和基本概念

- ◆ 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





荧光定量PCR数学原理和基本概念



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

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:

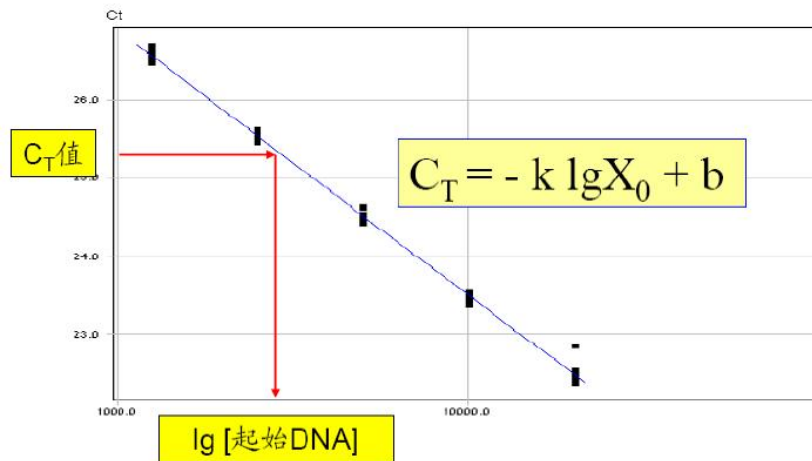
$$R_{C_T} = R_B + X_0 (1 + e)^{C_T} R_s$$

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

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

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

即 $C_T = -k \lg X_0 + b$ (线性方程)





荧光定量PCR数学原理和基本概念

——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）

绝对定量常用于精确计算初始模板中目的基因的浓度，比如测定血液样品中病毒颗粒数（DNA或RNA），细胞中基因的拷贝数等，得到的数据是单个样本的定量描述，不依赖于其他样本。

理想情况下，Ct值与模板起始拷贝数的对数存在线性关系，这种关系表现在图上就是标准曲线。绝对定量的检测即根据标准曲线对未知样品进行的定量。



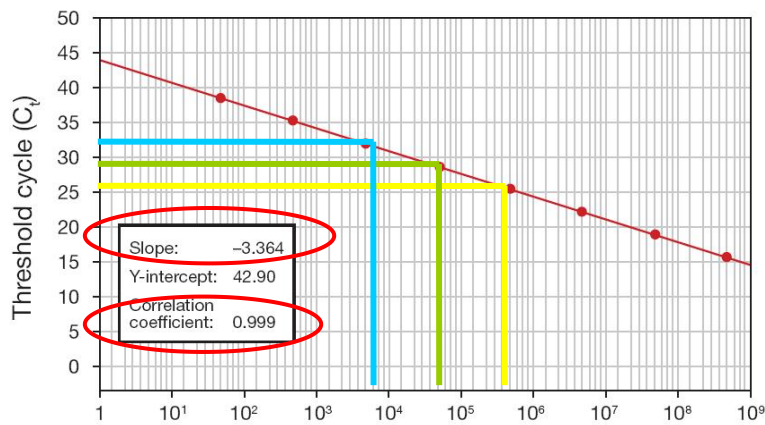
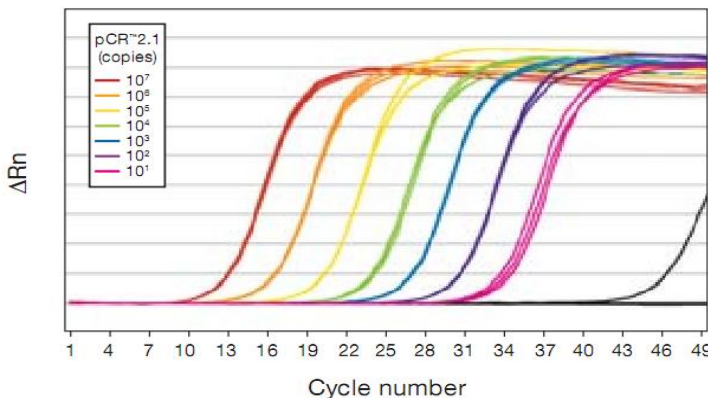


荧光定量PCR数学原理和基本概念

——绝对定量实验设计

Step1: 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。

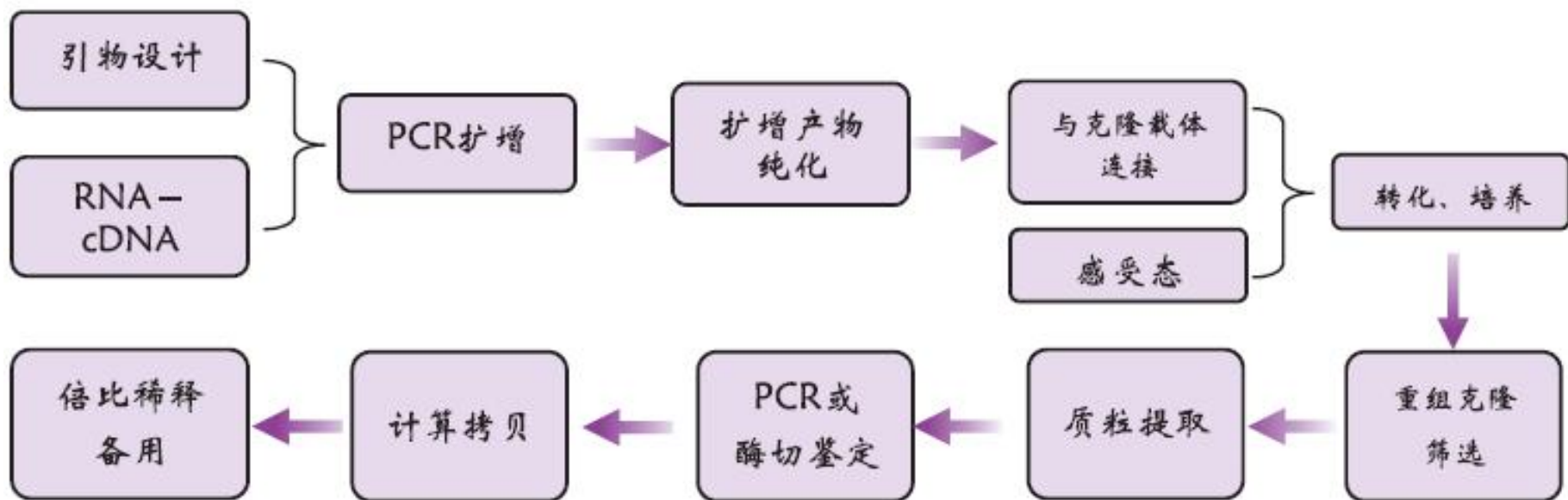
Step2: 根据样品Ct值，就可以计算出样品中所含的模板量。





荧光定量PCR数学原理和基本概念

——绝对定量标准质粒的建立流程





荧光定量PCR数学原理和基本概念

——绝对定量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) = $OD_{260} \times 40 \times$ 稀释倍数

样本分子量=碱基数 $\times 324$

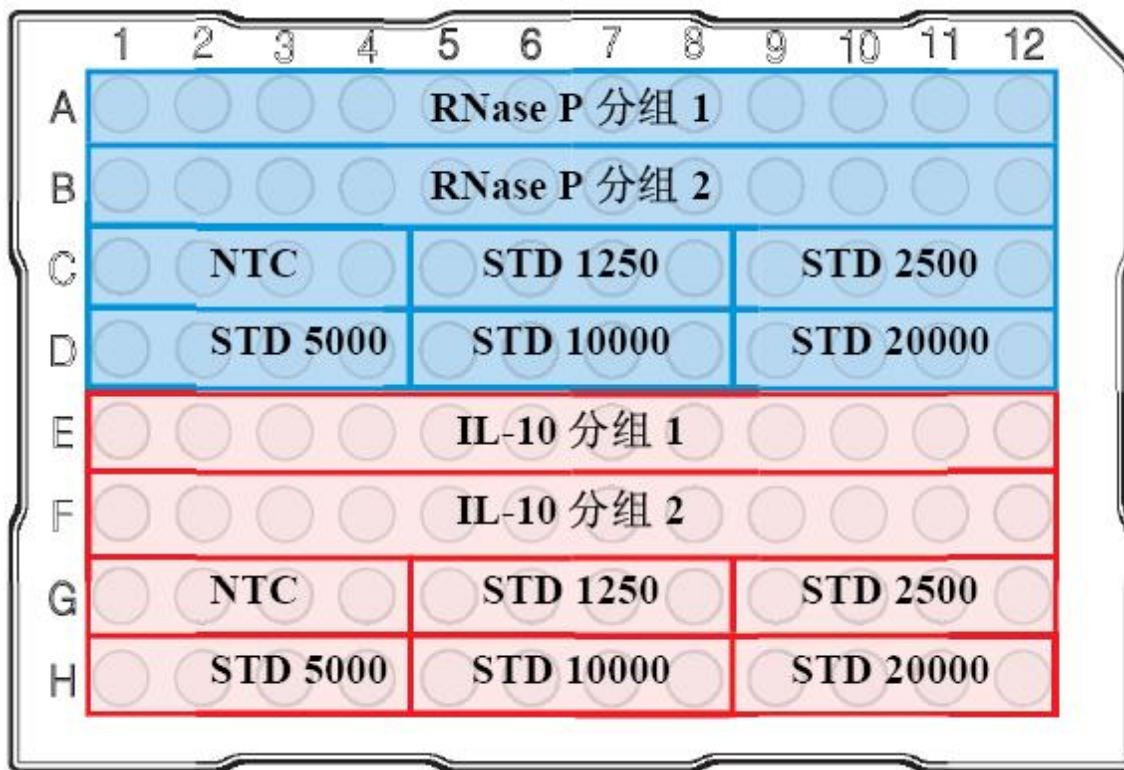
待测样本拷贝数 (copies/ul) = 待测样本浓度/样本分子量 $\times 6 \times 10^{14}$





荧光定量PCR数学原理和基本概念

——绝对定量布板





荧光定量PCR数学原理和基本概念

——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。





荧光定量PCR数学原理和基本概念

——相对定量基因表达差异公式

- ◆ 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

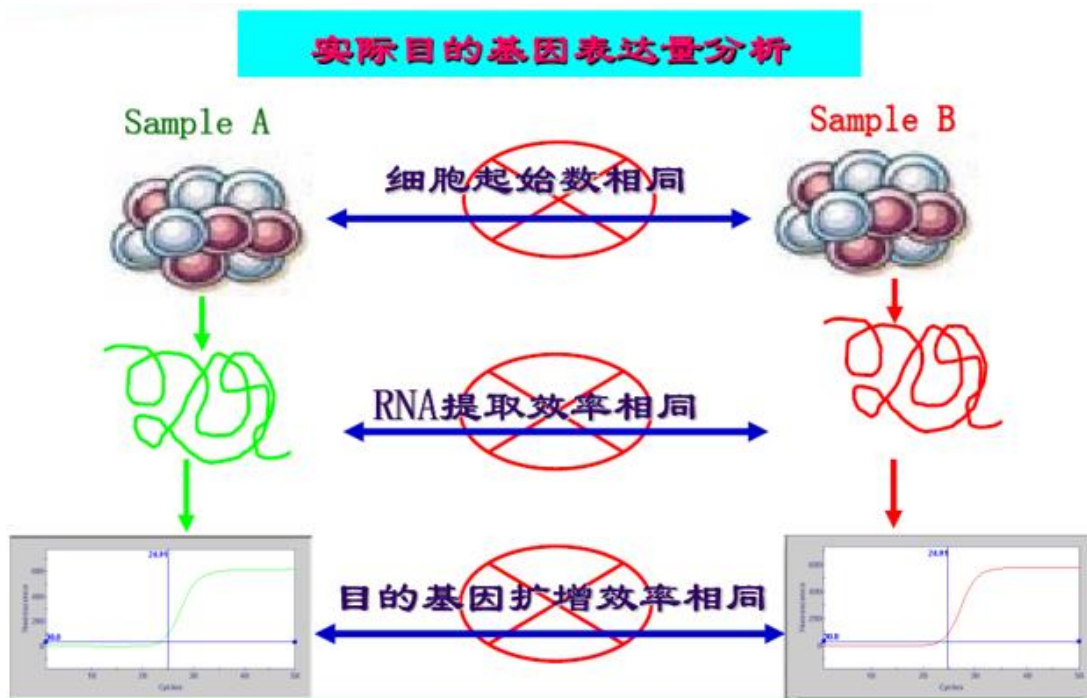
$X_{n(B)}$: 第 n 次循环后A样本的产物量





荧光定量PCR数学原理和基本概念

——相对定量归一化处理





荧光定量PCR数学原理和基本概念

——相对定量(Relative Quantification, RQ)值

$2^{-\Delta\Delta Ct}$

Template	Assay	Ct (dRn)
对照组	内参基因	18.20
实验组	内参基因	18.22
对照组	目的基因	26.84
实验组	目的基因	23.64

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

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

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

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

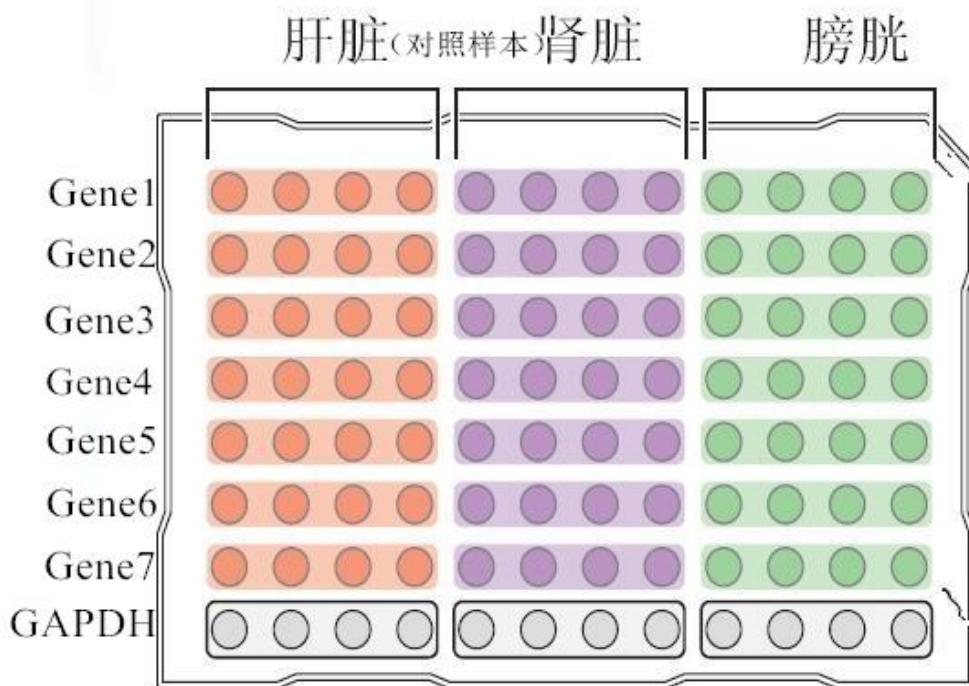
实验组目的基因表达量上调了9.32倍。





荧光定量PCR数学原理和基本概念

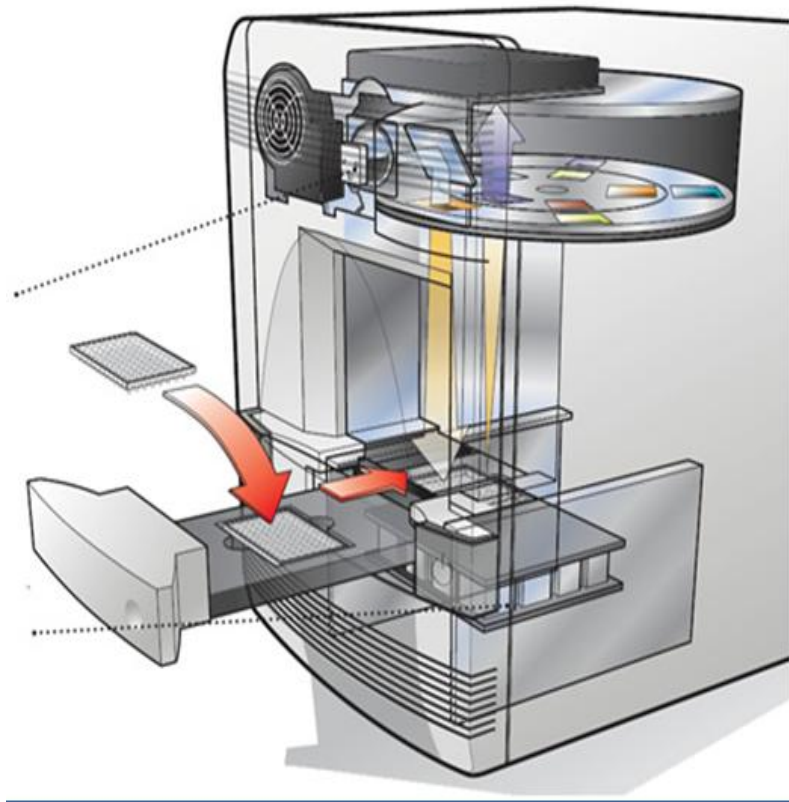
——相对定量布板





荧光定量PCR仪器工作原理

- 激发光发射源
- 接收装置
- PCR反应模块





诚信为本
服务至上



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。

产品咨询：18860119780

技术咨询：18159089690





MIQE qPCR国际标准

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

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

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。





qPCR国家标准

ICS 07.080
CCS A 40



中华人民共和国国家标准

GB/T 42077—2022/ISO 20395:2019

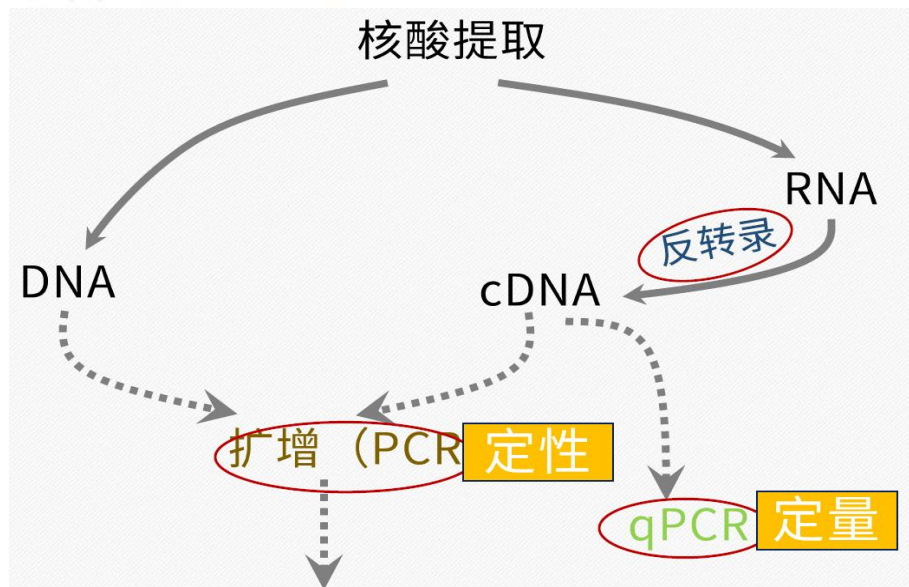
生物技术 核酸靶序列定量方法的性能
评价要求 qPCR 法和 dPCR 法

Biotechnology—Requirements for evaluating the performance of quantification
methods for nucleic acid target sequences—qPCR and dPCR

产品咨询：18860119780

技术咨询：18159089690





荧光定量PCR实验关联图

定量PCR引物

RNA/DNA
抽提

RNA
反转录

PCR
预实验

定量
PCR

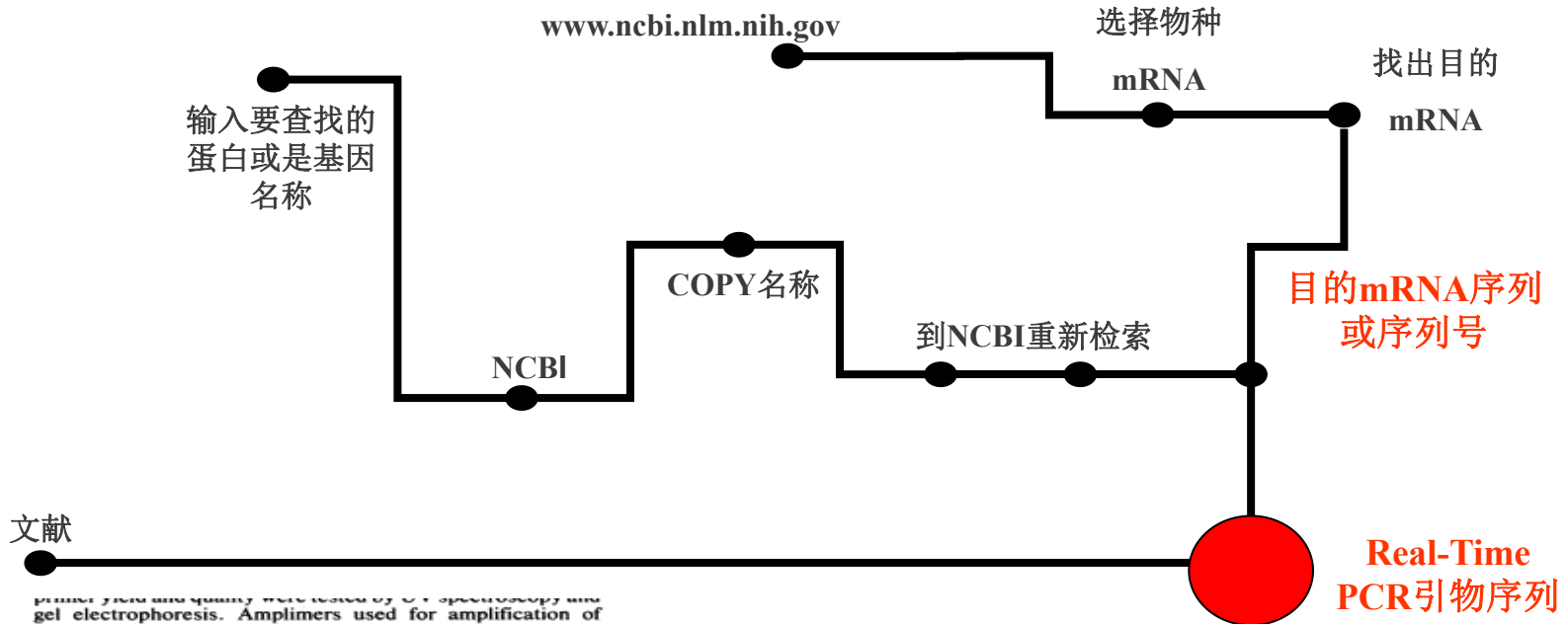
数据分析

荧光定量PCR操作流程





荧光定量PCR引物设计



primer yield and quality were tested by 5' T-spectroscopy and gel electrophoresis. Amplimers used for amplification of β_2 -microglobulin (β_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 GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA (residues 2733-2752) (8), which yield a 167-bp product. Each primer was added at 37.5 pmol per reaction. For quantitation, 2 μ Ci (1 Ci = 37 GBq) of [α - 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.





荧光定量PCR引物设计原则

- ★扩增片段大小：80-250 bp(尽量限制在300 bp以内)
- ★Primer长度：17-25 base
- ★GC含量：40-60%(最好45-55%)
- ★★★★Tm值：两条引物的Tm值尽量接近，应用专用软件计算Tm值
- ★序列：整体上碱基不能过偏，个别部分避免GC rich或AT rich(特别是3'端)，避免T/C连续，A/G连续
- ★3'末端序列：
 - 3'末端避免GC rich或AT rich
 - 3'末端碱基最好为G或C
 - 3'末端碱基尽量避免为T





荧光定量PCR引物设计原则

★★★互补性：

引物内部或两条引物之间避免3 base以上的互补序列

引物3'末端避免2 base以上的互补序列

★★★特异性：

使用BLAST检索，确认引物特异性

★★★RT-PCR用引物：

尽量在Exon junction上设计引物，限制基因组DNA扩增

注：★表示重要程度，★越多表示越重要，设计时要优先考虑





RNA/DNA提取纯化



Step1、裂解：破坏细胞结构，使核酸、蛋白等充分游离出来；

Step2、结合（萃取）：分离核酸，去除杂蛋白、糖类等；

Step3、洗涤：利用洗涤液去除去除盐类、有机溶剂等残留杂质；

Step4、洗脱：溶解核酸，得到高质量的DNA/RNA样本。





RNA/DNA提取纯化

Q: 做荧光定量PCR，什么情况下用RNA？什么情况下用DNA？

荧光定量PCR是一种技术平台，既可以检测mRNA的表达变化，也可以检测基因组DNA的变化。实验目的不同，所用模板不同。

比如：对某基因的mRNA表达水平定量，需要提RNA。因为mRNA直接可以编码蛋白质，蛋白质是机体生命活动执行者。基因组DNA没有定量的意义；并且基因组DNA含有很多内含子是不参与编码蛋白质的。

如果要检测基因突变或者研究某个蛋白结合基因组DNA的情况，就可以提取基因组DNA再做荧光定量。





RNA/DNA提取纯化——RNA提取操作细节

避免外源RNase污染

- 耗材：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/DNA提取纯化——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





RNA/DNA提取纯化——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；

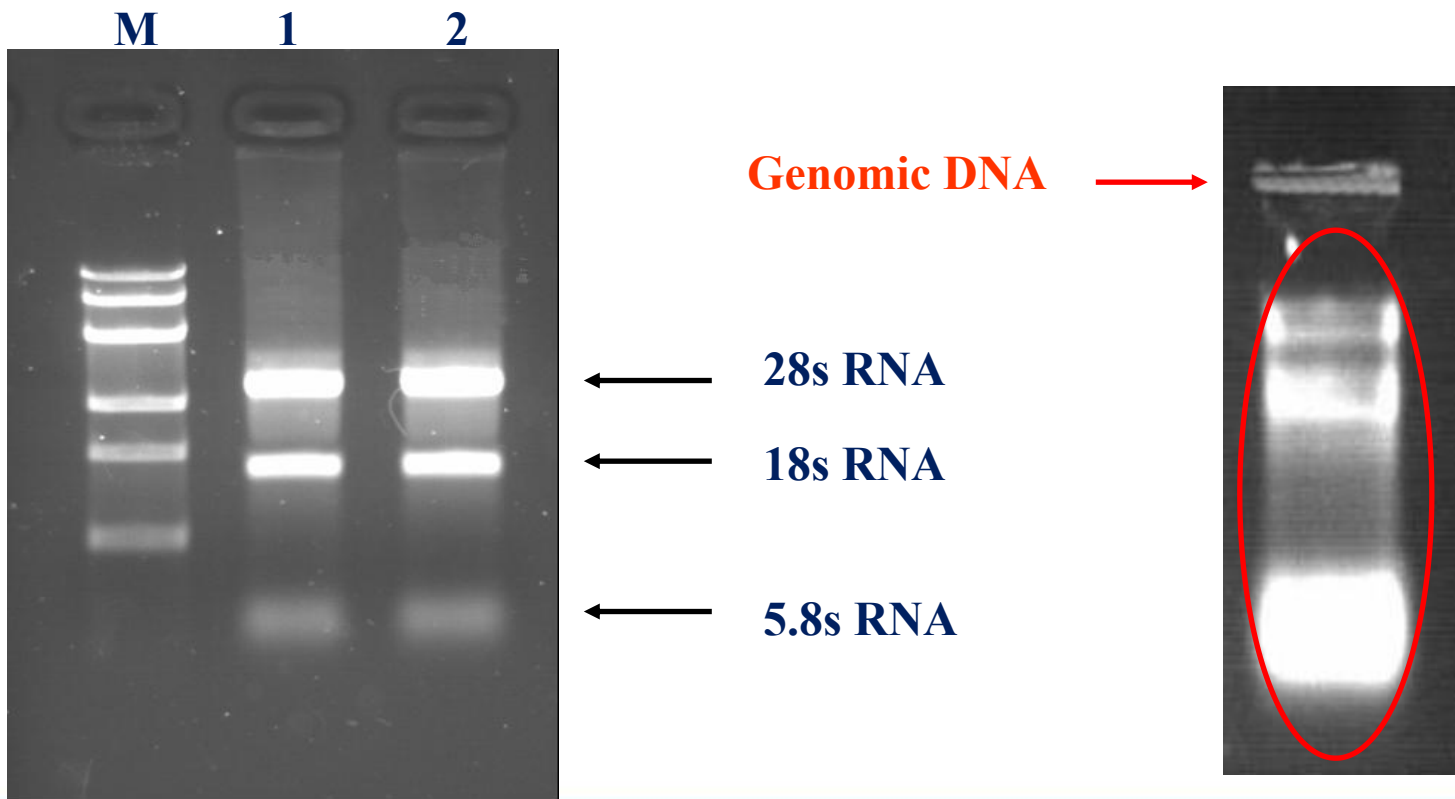
$OD_{260/230}$ 值小于 2.0，则表明裂解液中有异硫氰酸胍和 β -巯基乙醇的残留。

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





RNA/DNA提取纯化——凝胶电泳检验RNA完整性





RNA/DNA提取纯化——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

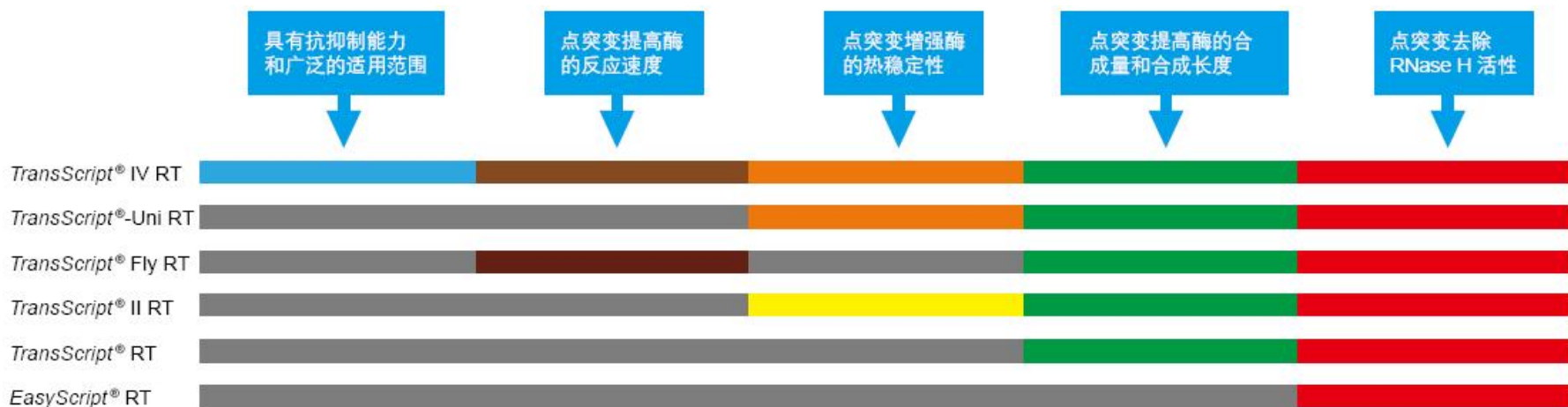




反转录理论知识及实验策略

Q: 做荧光定量PCR，提取RNA后，为什么要进行逆转录实验？

逆转录（Reverse Transcription, RT）实验是一种以 RNA 为样本，在逆转录酶的作用下，RNA链被逆转录成为互补 DNA（cDNA）的过程。由于DNA聚合酶不能以RNA为模板合成cDNA，所以不能对RNA核酸进行直接PCR。



Trans反转录酶系列改造原理





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）





确定定量方法——相对定量实例

实验目的：

比较病毒刺激细胞后，细胞抗病毒基因ISG54的表达情况差异。

样品：病毒刺激细胞，对照细胞

试剂：

TransZol Up

*TransScript*TM First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Removal)

*PerfectStart*TM Green qPCR SuperMix





确定对照样品及内参基因

确定对照样本 (Calibrator)

多个样本比较情况下，其中之一作为对照样本，其它所有样本中目的基因的表达都相对于对照上调或下调。

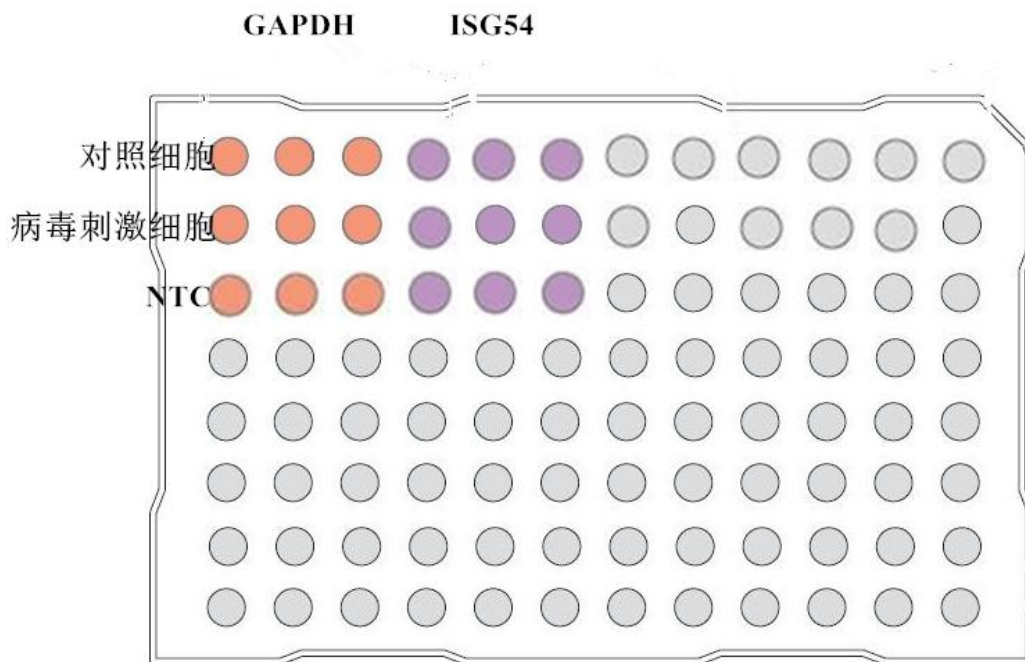
确定内参基因 (GAPDH或 β -actin)

在所有样本中恒定表达的已知基因，该内参基因可以是一个或多个。内参基因一般是稳定表达的，但在个别物种中可能并非稳定表达，此时需选择多个内参引物。





布板



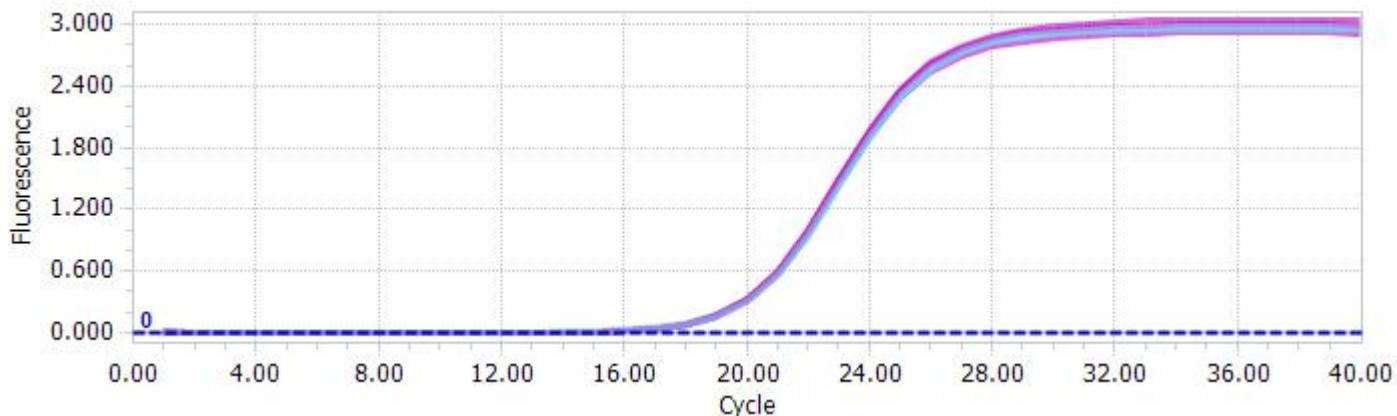
在同一反应板上运行多种样本类型，每种样本类型的内对照包含在同一反应板上



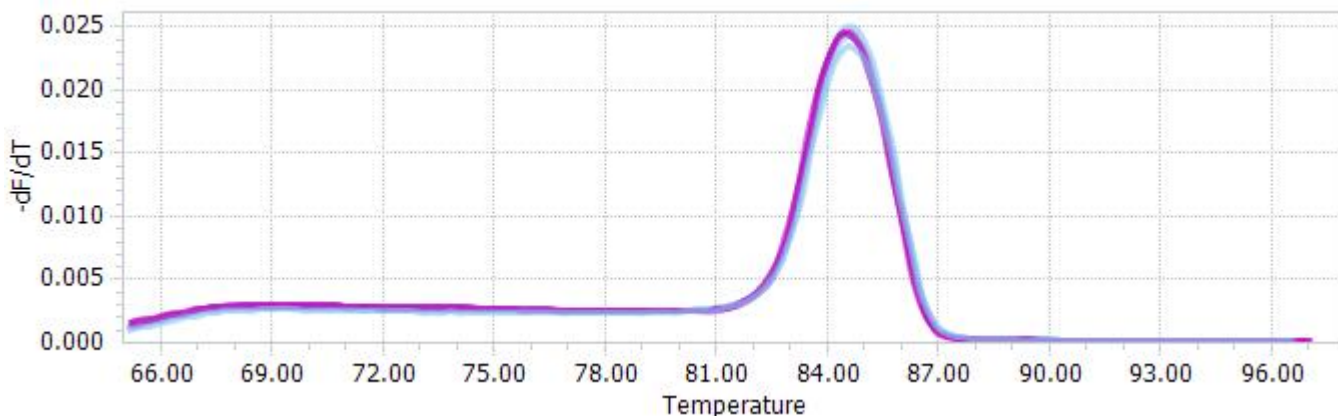


实验结果

扩增曲线



溶解曲线



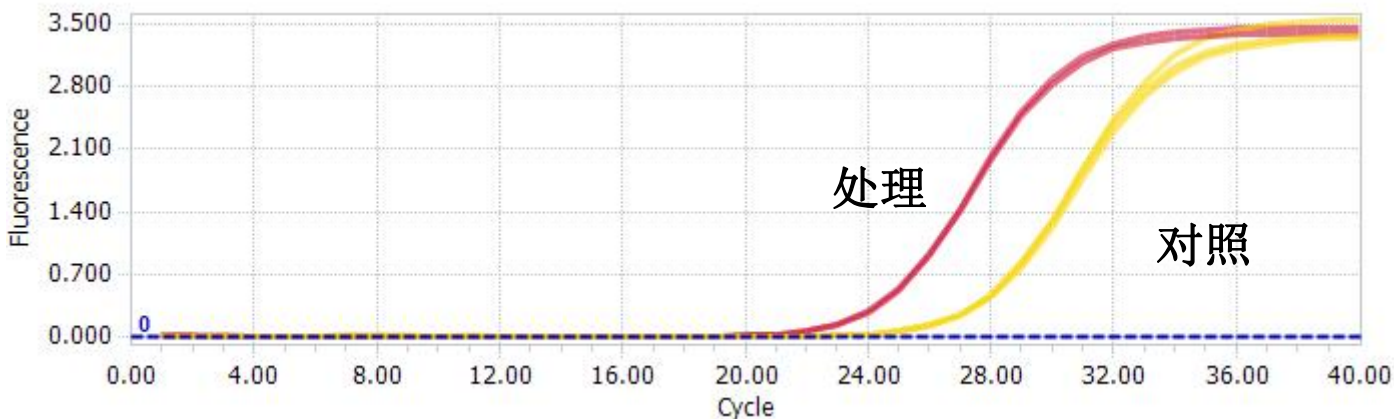
GAPDH内参基因



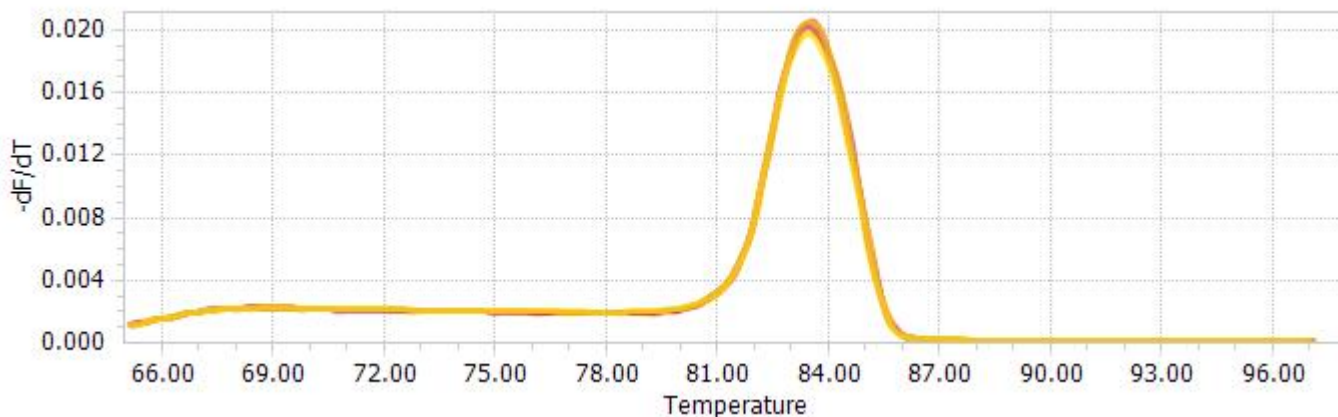


实验结果

扩增曲线



溶解曲线



ISG54目的基因





数据分析

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

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

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

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

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

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

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。





RNA提取用试剂及耗材

TransGen	TransZol Up Plus RNA Kit
TransGen	RNase-free Water
Axygen	10 μ L盒装无菌吸头（无RNA酶）
Axygen	200 μ L盒装无菌吸头（无RNA酶）
Axygen	1000 μ 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 EasyTaq 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





- ✓ 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





荧光定量PCR标准数据参考范围

数据名称	参考范围
Tm	>80℃
CT	18 ~ 30 cycles
R ²	>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





荧光定量PCR实验结果分析——判断数据有效性

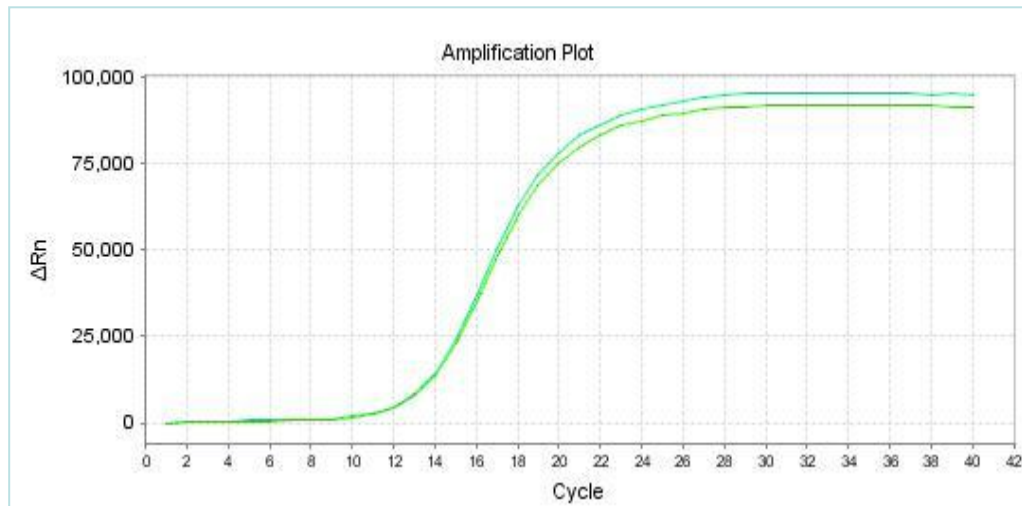
- 用扩增曲线检验qPCR体系
- 用溶解曲线检验qPCR体系
- 用标准曲线检验qPCR体系
- 用No-Template Control(NTC)检验qPCR体系（引物）
- 用No RT Control检验qPCR体系（模板）





荧光定量PCR实验结果分析——用扩增曲线检验qPCR体系

- 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

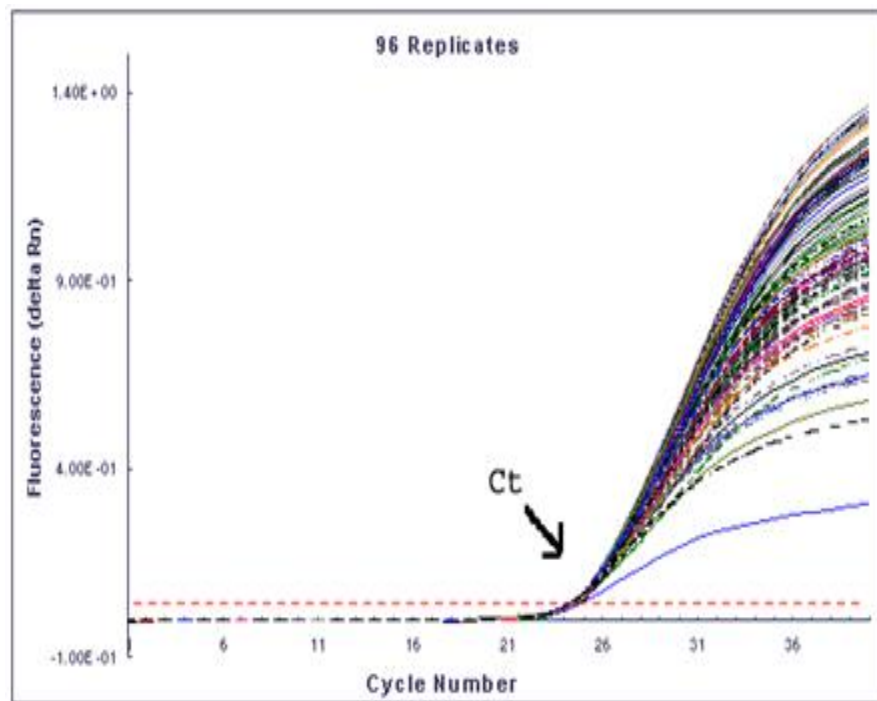
CT值是判断实验成功与否的重要参考





荧光定量PCR实验结果分析——用扩增曲线检验qPCR体系

- 临床检验
 小于33
- 科学研究
 小于38
- 内参基因
 小于20，样品间差距不超过1
- 复孔
 不超过0.5

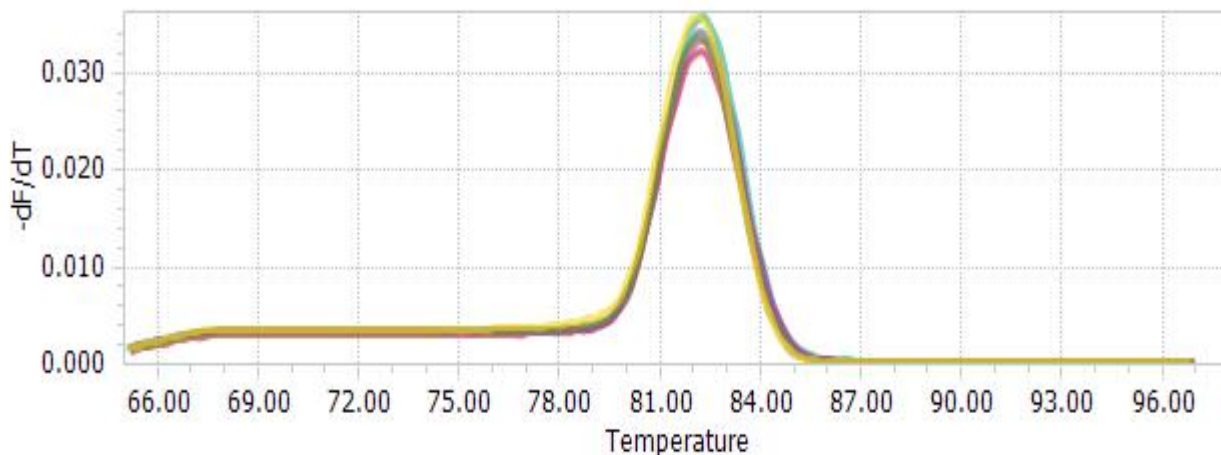


CT值是判断实验成功与否的重要参考





荧光定量PCR实验结果分析——用溶解曲线检验qPCR体系



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

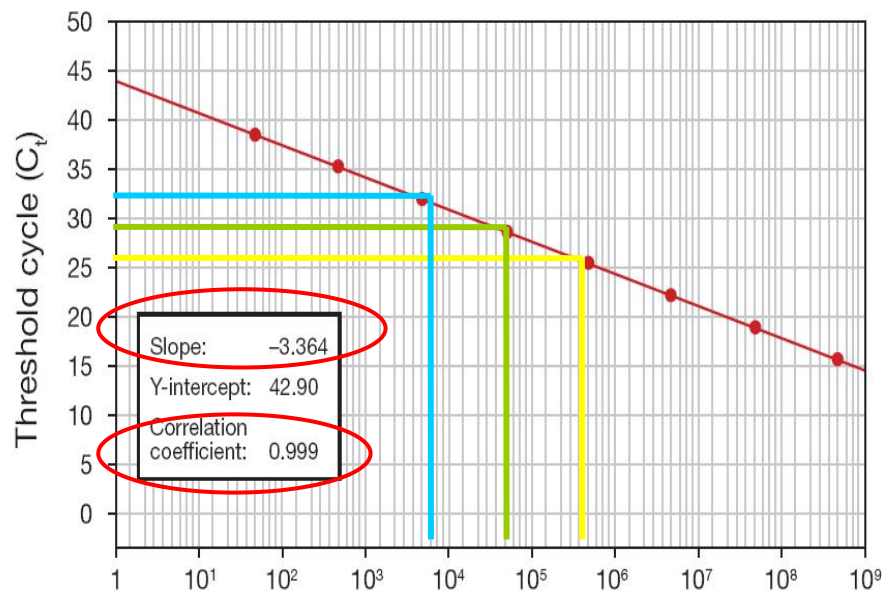
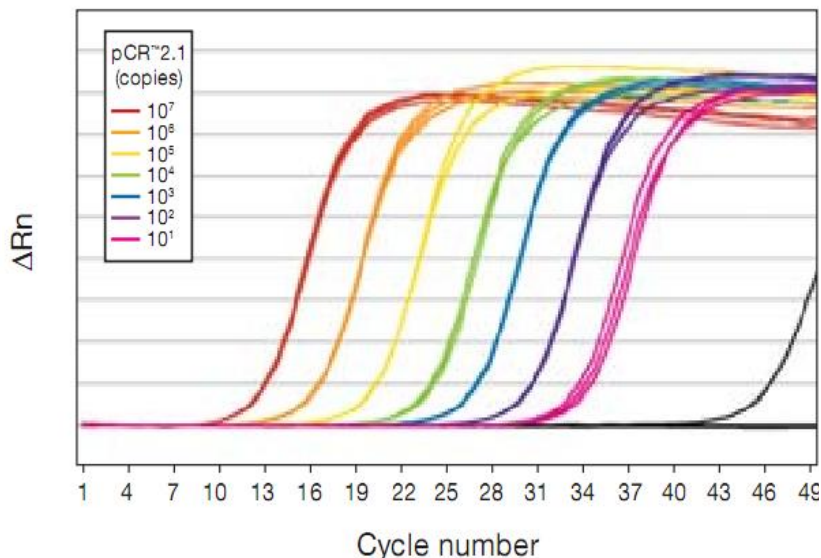




荧光定量PCR实验结果分析——用标准曲线检验qPCR体系

$r^2=0.999$ Slope= -3.364
 $E=10^{(-1/\text{slope})} - 1$

$r^2: 0.95 \sim 1$ Slope: -3.58 ~ -3.10
 $E: 90\% \sim 110\%$

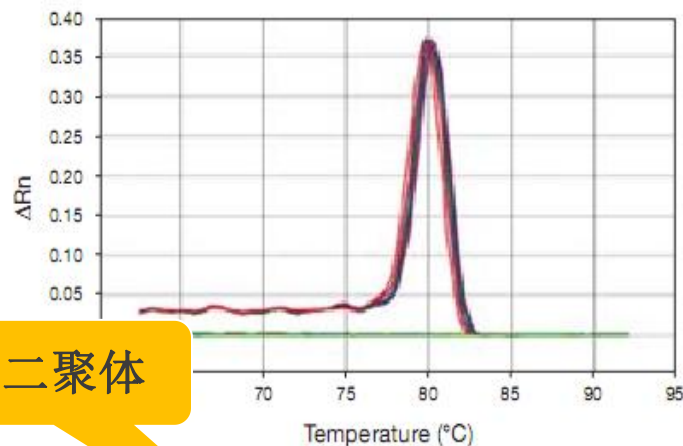
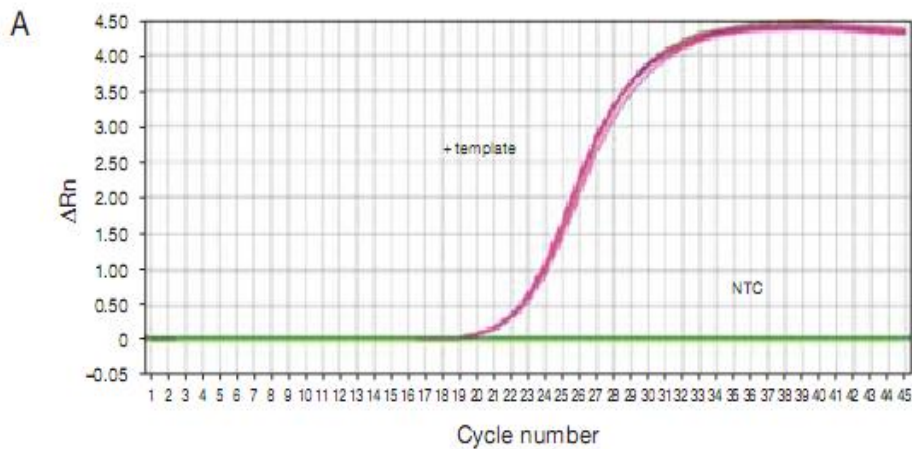


标准曲线

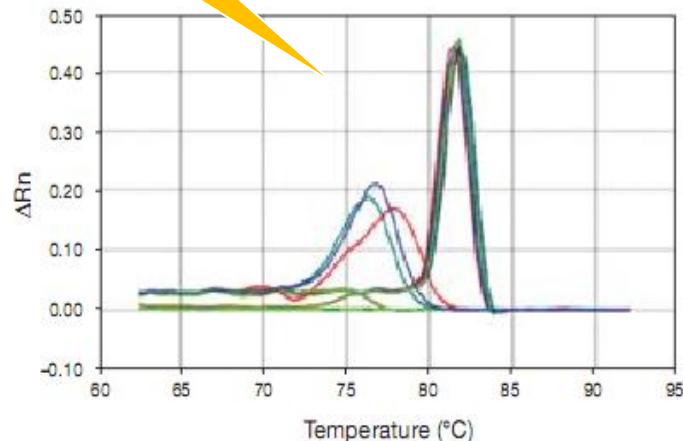
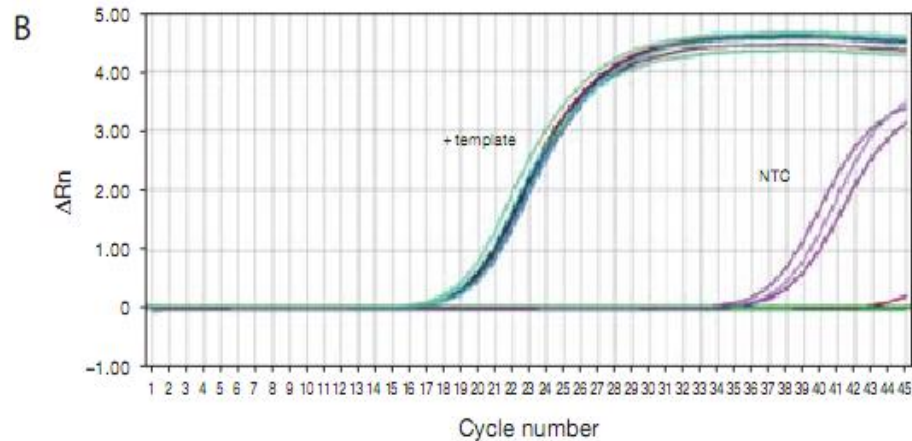




荧光定量PCR实验结果分析——用NTC检验qPCR体系



引物二聚体





荧光定量PCR实验结果分析——用NTC检验qPCR体系

Stevens AJ等发现“许多商品化PCR试剂容易在PCR过程形成二聚体”的问题,并建立必然形成二聚体的引物的NTC(无模板阴性对照)扩增来验证试剂特异性的方法。

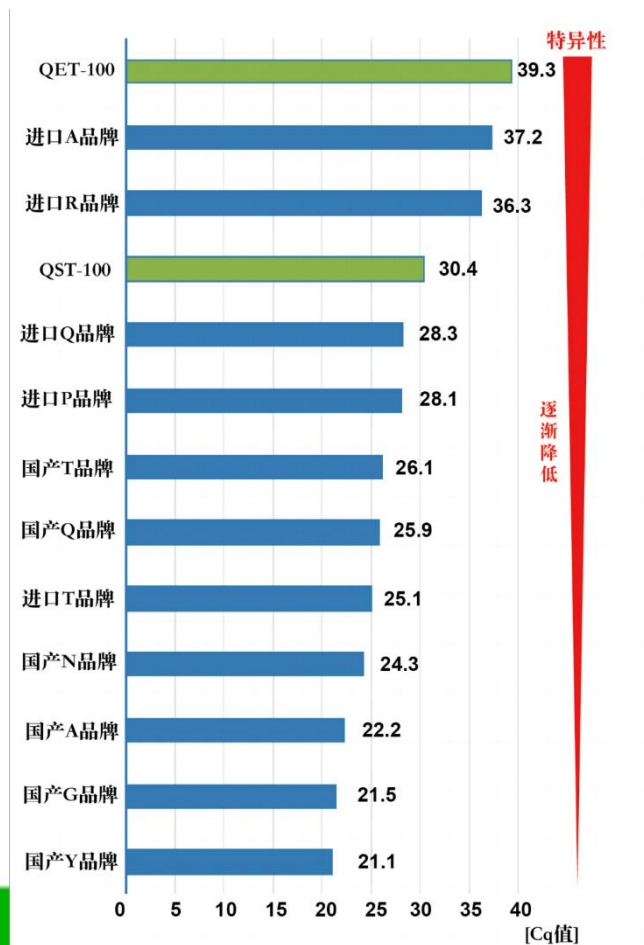


图1. 不同品牌染料法qPCR试剂特异性对比





荧光定量PCR实验结果分析——用NTC检验qPCR体系

NTC

- NTC—反应是否存在污染
- NTC—引物是否特异，是否会形成引物二聚体

NTC的最佳状况

- NTC的CT值为零，扩增曲线与基线重合

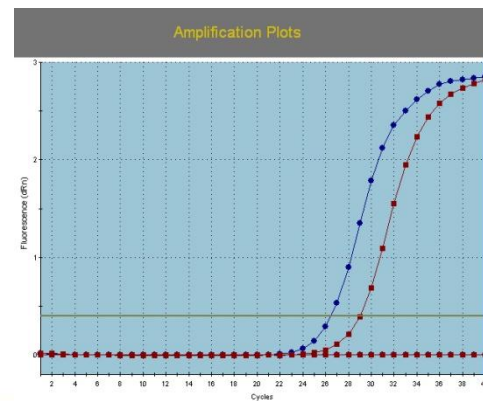
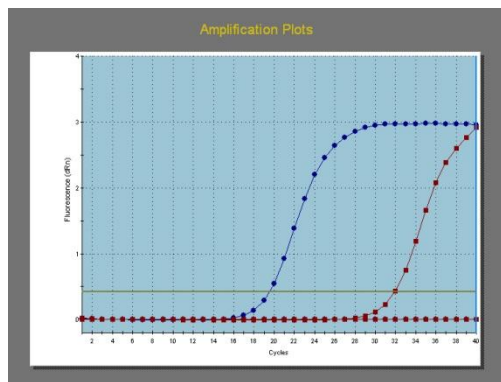
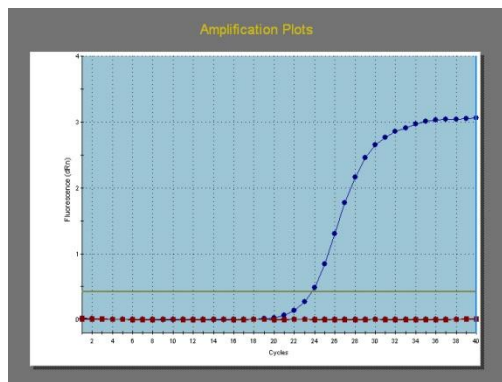
NTC的CT值与全管反应物的CT值相差5以上或10以上





荧光定量PCR实验结果分析——用No RT Control检验qPCR体系

- RT反应中的阴性对照，即不加入RT酶的反应
- 目的：检测RNA中是否有基因组DNA的残留
- 将No RT Control产物与正常cDNA同时进行qPCR
- 观察其结果，判断正常cDNA的扩增结果是否可信、该RNA是否可用





荧光定量PCR常见问题分析

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





荧光定量PCR常见问题分析

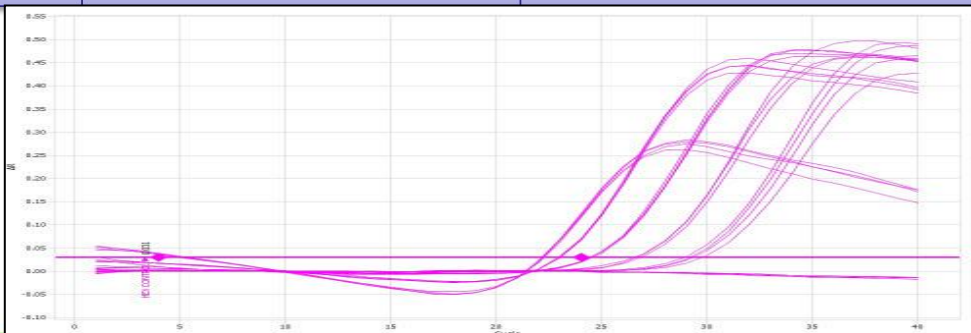
现象	原因	解决方案
2. 无Ct值 或无信号	a. 循环数偏少	建议扩增循环数35以上，可以根据具体情况增加循环数至45
	b. 信号采集设置有误	三步法建议在72°C延伸采集，确定设置了采集信号指令
	c. 引物或探针失效	1. 设置阳性对照；2. 探针退火温度偏低，凝胶电泳检测是否存在扩增产物
	d. 模板不足或降解	1. 检测RNA质量；2. 提高反转录效率；3. 避免cDNA反复冻融；4. 使用探针法





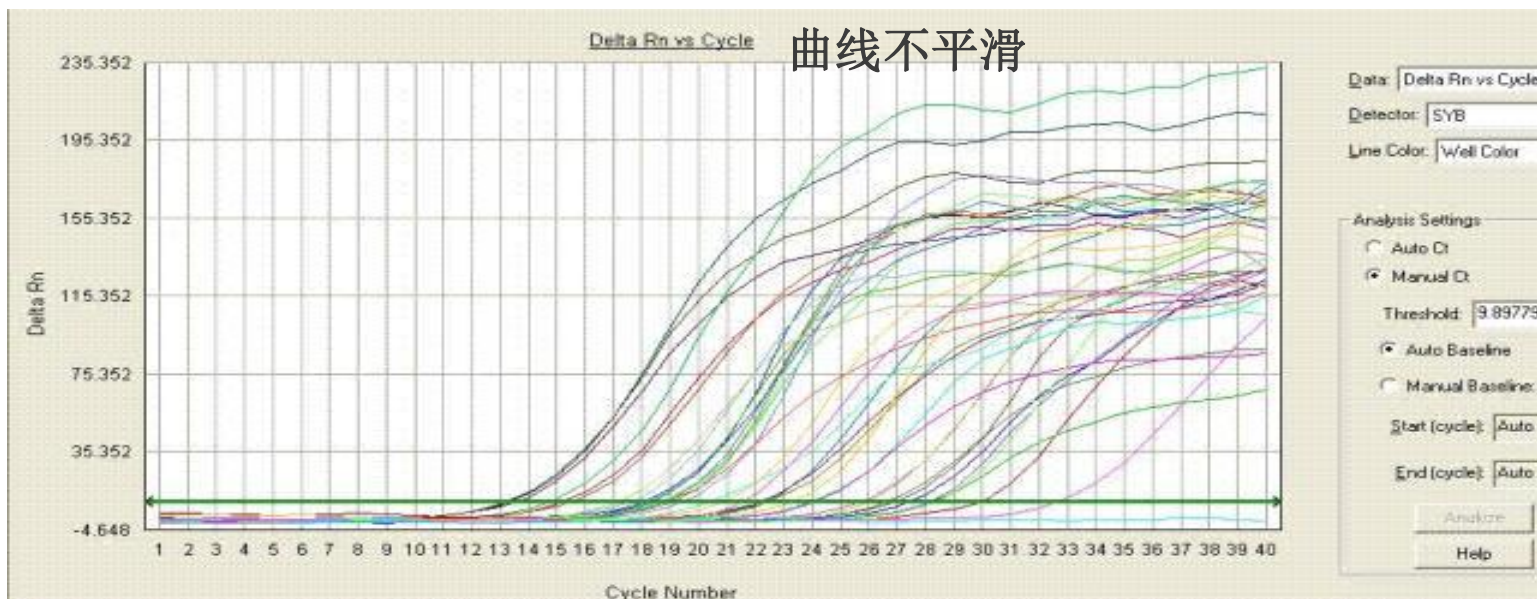
荧光定量PCR常见问题分析

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





荧光定量PCR常见问题分析

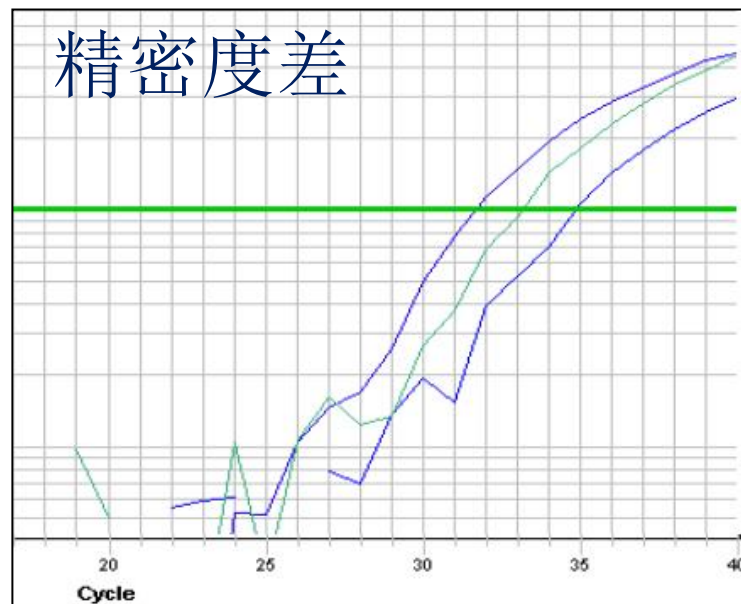
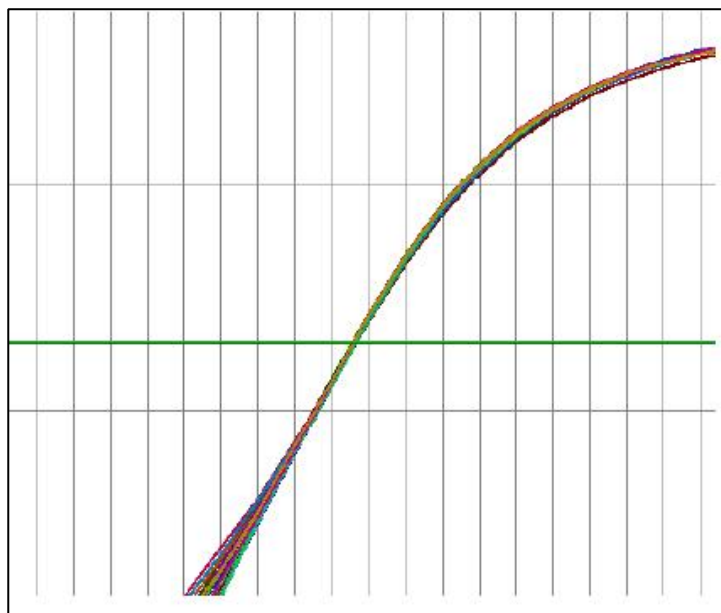


- 探针或荧光染料品质不好
- 仪器使用过度，荧光收集不稳定
- 仪器未经过校正（包括自动校正或ROX校正）
- 体系中抑制物较多，导致荧光不稳定





荧光定量PCR常见问题分析



- 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。





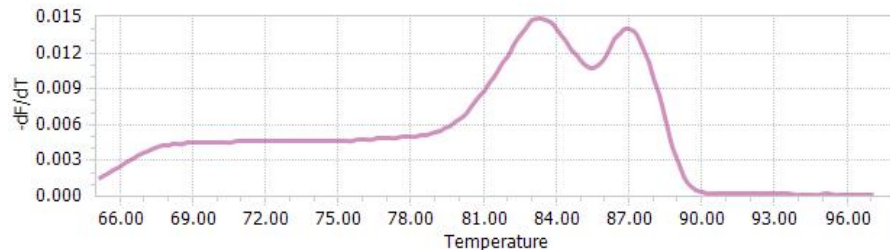
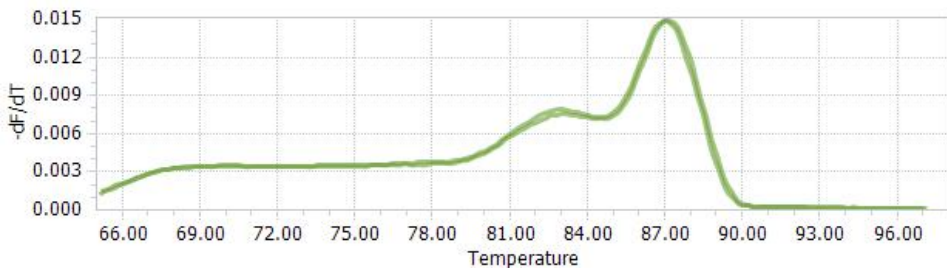
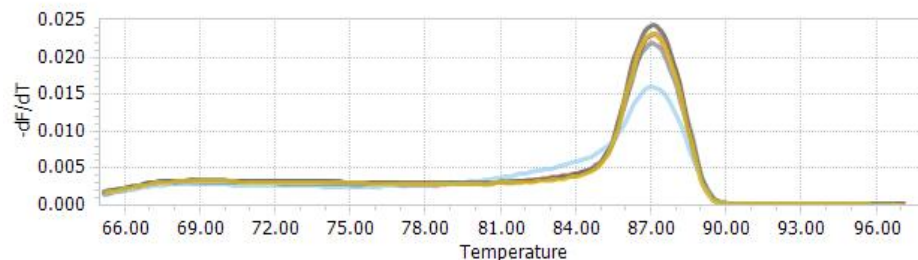
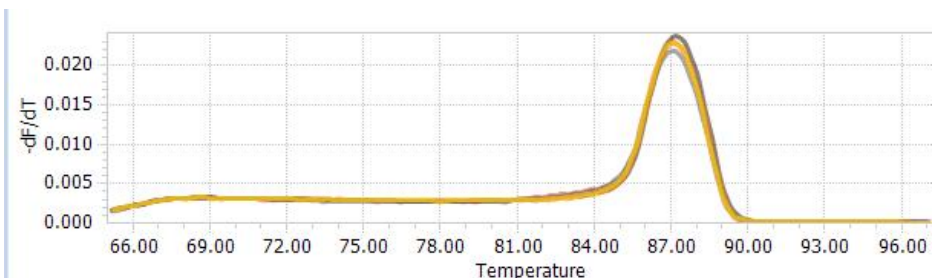
荧光定量PCR常见问题分析

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℃），无错配，Blast比对特异的引物；引物用量合适（0.2-0.4 μM）
	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





荧光定量PCR常见问题分析





荧光定量PCR常见问题分析

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℃冰箱，使用时将酶置于冰上





荧光定量PCR常见问题分析

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℃）； 2. 降低引物浓度（0.2-0.4 μM）
	c. PCR核心酶	选用封闭技术先进（全封闭）的试剂





荧光定量PCR常见问题分析

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





荧光定量PCR常见问题分析

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℃冰箱，使用时将酶置于冰上



感谢聆听！
请批评指正！

