

# THUNDERBIRD<sup>®</sup> Next SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix

(Code No. QPX-201, QPX-201T)

使用说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Biotech support Department  
OSAKA JAPAN

## - 目录 -

[1] 前言.....	- 1 -
[2] 产品组分.....	- 2 -
[3] 其他必需品.....	- 2 -
[4] 使用方法.....	- 4 -
[5] 相关 Protocol: cDNA 合成.....	- 8 -
[6] 常见问题.....	- 10 -
[7] 相关产品.....	- 12 -

## - 注意事项 -

本产品为科研用试剂。请勿作为诊断、临床试剂使用。在使用时, 请严格遵守实验室的一般注意事项, 安全操作。

※ LightCycler®是 Idaho Technology Inc.及 Roche Diagnostic Systems 公司的商标。

※ SYBR®是 Thermo Fisher Scientific 公司的注册商标。

## [1] 前言

THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix 是为使用 SYBR® Green I 检测体系的 Realtime PCR 而开发的 2× 浓度的预混液。本试剂除引物以外的组分都已预先混合，包括通用规格的 passive reference dye，可将样品间荧光强度的误差控制在最小范围，提高了实验结果的重复性。此外，还含有蓝色视觉辅助染料，方便操作。

本产品通过改良原产品「THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201)」的组分，提高了反应特异性和检测灵敏度。通过提高 PCR 效率、抑制非特异性反应(引物二聚体等的产生)，可得到更广范围的定量区域(动态范围)。另外，还可进行高速 PCR 循环。

### ◆本产品的特征◆

- 1. 高特异性** 通过优化组分以降低非特异性反应，从而提高了低拷贝样本检测时的准确度。
- 2. 可均一地检测各种目的片段** 使用了新的反应增强剂。将因目的片段不同而导致的 PCR 效率的误差抑制到了最低、可定量长至 500bp 的片段。
- 3. 更广的可定量扩增区域** 通过高效且特异的扩增，可在较广的测定范围进行分析。
- 4. 适用于各种仪器** 除了一般的模块型仪器外，还可用于玻璃毛细管型高速循环仪。另外，本产品的组分中含有 passive reference dye，所以需要 passive reference 的仪器 (如：Applied Biosystems 公司的仪器、Agilent Technologies 公司的仪器等) 无需再添加 ROX。
- 5. 可进行高速 PCR 循环** 由于扩增效率高、快速循环条件下也可高效扩增。
- 6. 高速热启动** 采用抗体法热启动的方式，通过加热使抗体迅速失活并释放 DNA 聚合酶活性，所以可设置较短的预变性时间。
- 7. 可使用 UNG** 本产品组分中含有 dUTP。通过添加 Uracil-N-Glycosylase(UNG)\*, 可防止 carryover 污染导致的假阳性。  
\* 本产品中不含有 UNG。请使用另外销售的 Uracil-DNA Glycosylase(UNG), Heat-labile(Code No. UNG-101)。
- 8. 含有蓝色染料** 本产品组分中含有蓝色染料。分装之后的孔呈蓝色，可以减少分装差错。  
\* 蓝色染料对 qPCR 反应及荧光信号无影响。

### <SYBR® Green I 检测体系>

SYBR®Green I 检测体系通过SYBR®Green I 染料与DNA的扩增产物结合，并以结合后染料的荧光强度的增强作为指标，进行检测。

虽然该方法和普通的 PCR 反应一样简便，但由于会出现引物二聚体、目的条带以外的扩增产物等，因此有必要在扩增后对融解曲线进行分析确认。

## [2] 产品组分

本产品包括以下试剂。

组成	保存	QPX-201 (500 次份/20 $\mu$ L 反应)	QPX-201T (100 次份/20 $\mu$ L 反应)
THUNDERBIRD <sup>®</sup> Next SYBR <sup>®</sup> qPCR Mix	-20 $^{\circ}$ C (或 2~8 $^{\circ}$ C 下保存 3 个月以内) <b>避光保存</b>	5mL (1.67mL $\times$ 3 支)	1mL (1mL $\times$ 1 支)

### **THUNDERBIRD<sup>®</sup> Next SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix**

是含有反应buffer、SYBR<sup>®</sup> Green I、dATP、dCTP、dGTP、dUTP、Mg<sup>2+</sup>、passive reference dye、DNA聚合酶及DNA聚合酶抗体等的2 $\times$ 预混溶液。请添加模板DNA（cDNA、genomic DNA、plasmid DNA等）及引物溶液，用灭菌水配制成1 $\times$ 浓度进行使用。

※ 产品到货后，请放于-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。使用时，请融解后用 Vortex Mixer 充分混合，溶液完全均一后再使用。融解后，3 个月以内使用完时，可在 2~8 $^{\circ}$ C 冷藏保存。长期不使用时，请放于-20 $^{\circ}$ C 重新冷冻保存。已确认可反复冻融 10 次不影响品质。另外，为防止 SYBR<sup>®</sup> Green I 的荧光衰减，使用及保存过程请尽量保持避光。

## [3] 其他必需品

除本产品外，请准备以下试剂和仪器。

### (1) Realtime PCR 仪

本产品适用于普通及高速的模块型（Block Type）、玻璃毛细管型（Glass Capillary Type）等各种 Realtime PCR 仪。请使用者根据各仪器说明书，结合实际情况进行适当调整。

### (2) 引物

请根据目的基因的序列设计引物。为得到高灵敏度定量性的数据，引物的设计非常重要。以下列举了设计引物时需注意的一般事项。

- 引物长度请设定为20~30mer、GC含量为40~60%。
- 扩增片段应小于500bp，如可能请尽量设定在80~200bp。过长的片段容易导致扩增效率低下。
- 检测cDNA时，引物设计应尽量横跨内含子。这样可以防止基因组DNA扩增而引起假阳性。
- 请尽量选择融解温度（melting temperature: T<sub>m</sub>）为60~65 $^{\circ}$ C范围内的引物。融解温度值根据计算方法不同而有所差异，但请以60~65 $^{\circ}$ C为基准进行考虑。

此外，引物的纯化纯度对反应特异性有很大的影响。经过一般纯化、纯度较低的引物品质差别较大，容易产生非特异性反应。请尽可能使用HPLC级别纯化，至少要用经Cartridge(OPC)级别以上纯化的引物。

### (3) 模板 DNA

本产品可使用 cDNA、genomic DNA、plasmid DNA、virus DNA 等各种类型的模板。

#### a) cDNA

将普通逆转录反应试剂合成的cDNA，无需纯化，用灭菌水等稀释后可直接添加到Realtime PCR反应液中。

添加量不应超过总反应体系的 10%。过量的添加会大大改变 PCR 反应缓冲液的组成，导致定量性低下。另外,如果使用的不是专门针对荧光定量 PCR 的逆转录试剂，那么添加的 cDNA 体积应小于总反应体系的 10%。

※ 本公司的Realtime PCR用cDNA试剂盒ReverTra Ace qPCR RT Kit (Code No.FSQ-101)、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Code No.FSQ-201)、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (去基因组DNA) (Code No.FSQ-301)，通过改良组分，使对Realtime PCR反应的抑制降低了，可在PCR反应体系中添加最多至20%的液量。

#### b) genomic DNA、virus DNA

genomic DNA、virus DNA 也可作为模板使用。由于 SYBR® Green I 拥有和双链 DNA 分子结合发光的特性，在以大量的双链 DNA 为模板的情况下，SYBR® Green I 与模板 DNA 自身相结合，会造成基线上飘。因此，在以 genomic DNA 为模板时，为避免在高浓度区域出现线性差的情况，请注意添加量（每 50 μl 反应体系以 200ng 为上限）。

#### c) plasmid DNA

plasmid DNA 也可作为模板使用。但如果直接使用环状 Plasmid DNA，容易导致扩增效率低下，从而不能真实地反应拷贝数。因此请用限制性内切酶切为线性化后再使用。

此外，当用纯化过的plasmid DNA溶液作为模板使用时，相对全基因组DNA而言，目的片段的拷贝数会变得极高，因此添加到反应液中的量要适当减少。此时，溶液中的DNA浓度会变得很低，DNA容易被容器吸附，进行Realtime PCR时，会造成低浓度区域的线性和重现性低下。如果在稀释时，将与反应无关的核酸（yeast RNA等）作为掺入物与稀释液混合，可改善低浓度区域的线性。

plasmid DNA 的拷贝数，可用以下简易的公式计算。

每 1 μg plasmid DNA 的拷贝数 =  $9.1 \times 10^{11}$  / plasmid DNA 的大小 (kb)

### (4) Uracil-N-Glycosylase (UNG) [可选]

可使用另外销售的 Uracil-DNA Glycosylase(UNG),Heat-labile(Code No.UNG-101)。

## [4] 使用方法

### (1) 反应液的配制

以下为 50  $\mu$ l 及 20  $\mu$ l 反应体系时的配制例。请根据实际使用的 PCR 仪的特征适当增减反应液量。

试剂	50 $\mu$ L 反应体系	20 $\mu$ L 反应体系	终浓度
灭菌水	X $\mu$ L	X $\mu$ L	
THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix	25 $\mu$ L	10 $\mu$ L	
Forward Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 $\mu$ M*1
Reverse Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 $\mu$ M*1
DNA 溶液	Y $\mu$ L	Y $\mu$ L	
<b>总体积</b>	<b>50 <math>\mu</math>L</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>	

\*1. 扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度。由此可改善反应结果。引物的浓度，请以终浓度 0.2~0.6  $\mu$ M 作为设定范围的参考。

### (2) PCR 循环条件的设定

以下为使用根据推荐条件(参考p.2 (2))设计的引物时的标准PCR循环条件 (①高速循环、②普通循环)。该2步法PCR条件适用于绝大多数目的片段。

此外，本试剂在大多数情况下可直接使用其他公司试剂的反应条件。

在无法得到充分反应效率的情况下，或使用  $T_m$  值低于一般值 (60°C以下) 的引物时，用 3 步法可得到更好的结果。详见 d)想改善反应效率时的 3 步法 PCR (第 7 页)。

#### ① 快速循环

步骤	温度	时间	升降速度
(UNG 反应)	(20~25°C*1)	(10 分*1)	(最大)
预变性	95°C	30 秒*2	最大
PCR 变性	95°C	5 秒*3	最大
(40 cycles) 延伸	60°C*4	10 秒*5	最大

(Data Collection 请设定在延伸步骤)

#### 融解曲线分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)\*6

#### ② 普通条件

步骤	温度	时间	升降速度
(UNG 反应)	(20~25°C*1)	(10 分*1)	(最大)
预变性	95°C	30 秒*2	最大
PCR 变性	95°C	5 秒*3	最大
(40 cycles) 延伸	60°C*4	30 秒*5	最大

(Data Collection 请设定在延伸步骤)

#### 融解曲线分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)\*6

- \*1: 进行 UNG 处理时(可选; 本产品中不含有 UNG, 可使用另外销售的 Uracil-DNA Glycosylase(UNG), Heat-labile(Code No. UNG-101)), 请将 UNG 反应步骤设定在预变性之前。上表列出了一般的温度条件及反应时间, 请根据各公司的推荐条件进行调整。
- \*2: 本产品由于采用了高速热启动系统, 可在极短的预变性时间内(20~60 秒)实现酶的再活化。但为了使模板 DNA 完全变性, 须根据各仪器的特性设定足够的预变性时间。不知道最适时间时, 请设定为 30 秒(预变性时间的延长对反应效率几乎没有任何影响)。
- \*3: PCR 循环中的变性时间根据各仪器的特性设定为 1~5 秒。请注意, 变性时间不充分时可能导致 PCR 效率下降。初次实验请设定为 5 秒(变性时间的延长对反应效率几乎没有任何影响)。
- \*4: 扩增效率较低时, 可适当降低退火温度; 发生非特异性反应时, 可适当提高退火温度。可能会对反应结果有改善。请以 56°C~64°C 的范围作为设定参考。
- \*5: 一般情况下, 目的片段在 300bp 以下时, 延伸时间 10 秒即可进行充分的反应。但一部分仪器为测定稳定的荧光, 延伸时间需大于 10 秒。扩增曲线散乱, 或各孔间的差异较大时, 请设定较长的延伸时间(30-60 秒)。另外, 部分仪器由于硬件或配套软件的限制, 无法设定为 25 秒以上, 此时请根据仪器的使用说明书, 设定最适的可设定时间(如 QuantStudio 5 的 96 孔板为 25 秒以下、Applied Biosystems 7000/7300 为 31 秒以上, 7500 为 35 秒以上)。
- \*6: 融解曲线分析请根据各仪器的标准设定。详细请见各仪器的使用说明书。

### a) Applied Biosystems StepOnePlus™ 的循环条件设定例

下例为本试剂在 Applied Biosystems (Applied Biosystems StepOnePlus™ 等) 上使用时的循环条件。详细请见各仪器的使用说明书。(普通 Block Type、软件版本 2.3)

另外, Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System、QuantStudio™ Real-Time PCR System 等也是类似的设定方法。

1. 启动软件, 选择 Design Wizard、Advanced Setup、QuickStart 中的其中一个进行设定。
2. 选择下表中的标签键, reagents 选择 SYBR® Green Reagents。

Design Wizard 时	Methods & Materials
Advance Setup 时	Setup → Experiment Properties
QuickStart 时	Experiment Properties

3. 选择 Run Methods, 按以下进行温度条件设定。

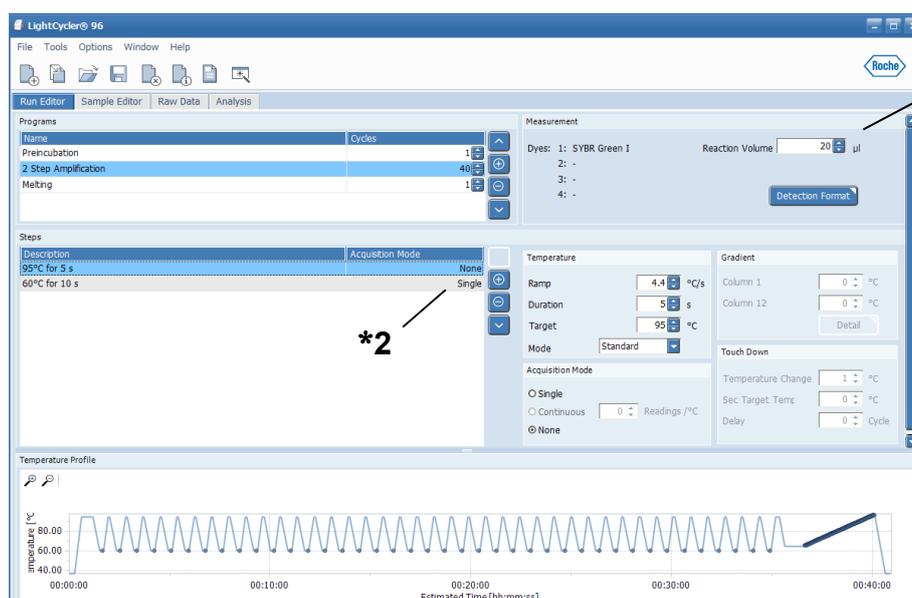


- \*1. Sample Volume (μL)一栏中, 请务必输入正确的反应液体积。
  - \*2. 请将数据收集设置在延伸反应这一步。仪器或控制软件的规格上, 有些不能设定为 25 秒以下, 请先确认操作说明书, 再设定适当的时间(例如: QuantStudio 5 的 96 孔板可设定为 25 秒以上, Applied Biosystems 7000/7300 为 31 秒以上、7500 为 35 秒以上)。
  - \*3. 请再加上融解曲线分析用循环。
4. 将反应板或管放入仪器, 启动反应程序。

## b) LightCycler®96 的循环条件设定例

下例为 Roche 公司的 LightCycler®96 的循环条件设定例。详细信息请参考操作说明书。(软件版本 1.1)

1. 启动软件, 选择 Create New Experiment。
2. 在 Reaction Volume 内输入反应液体积。
3. 打开 Run Editor 键, 在 Predefined Programs 中按依次选择 Preincubation、2 Step Amplification、Melting。
4. 选择 Preincubation, 将 Target 更改为 95°C、Duration 30 秒。
5. 选择 2 Step Amplification, 将 Target 更改为 95°C、Duration 5 秒、Target 60°C、Duration 10 秒。



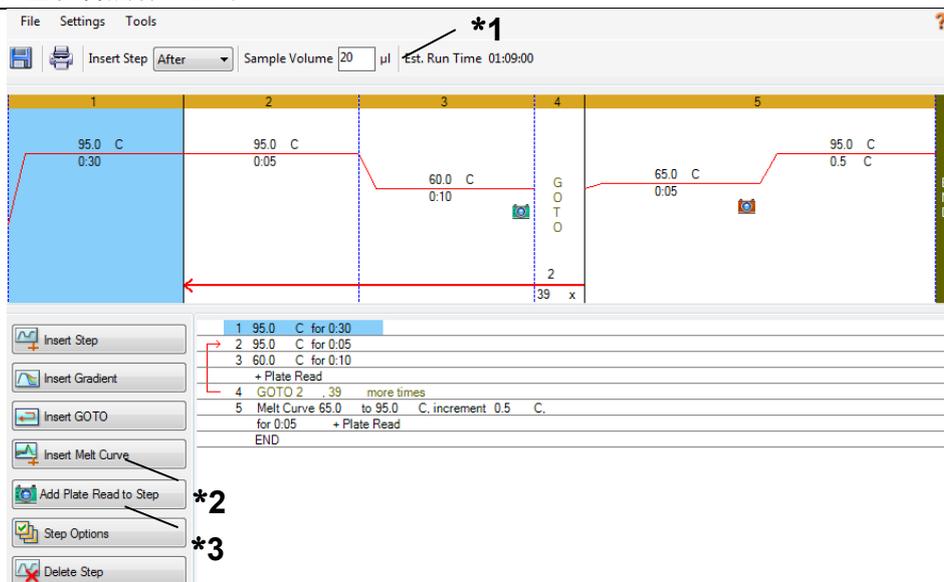
- \*1. Reaction Volume(μl) 一栏中, 请务必输入正确的反应液体积。
- \*2. 请将数据收集点设置在延伸反应这一步。

6. 将反应板或管放入仪器, 启动反应程序。

## c) CFX96 Touch™ Deep Well 的循环条件设定例

下面为使用 Bio-Rad 公司的 CFX96 Touch™ Deep Well 时的循环条件设定例。详细信息请参考操作说明书。(软件版本 3.1)

1. 启动软件, 选择 User-defined。
2. 选择 Create New, 在 Sample Volume 内输入反应液体积。
3. 将各步骤分别更改为 95°C 30 秒、95°C 5 秒、60°C 10 秒, 共 40 个循环。



- \*1. Sample Volume (μL) 一栏中，请务必输入正确的反应液体积。
- \*2. 选择 Insert Melt Curve，请再加上融解曲线分析用循环。
- \*3. 在延伸反应循环中选择 Add Plate Read to Step，请设定数据收集点。

4. 将反应板或管放入仪器，启动反应程序。

#### d) 想提高反应效率时的 3 步法 PCR

用第 7 页中所述的 2 步法无法得到期望的结果时，用下述的 3 步法可得到改善。特别是想改善以下几种情况的结果时。

- 引物的T<sub>m</sub>值低于一般值（60℃以下）时。
- 目的片段较长（500bp以上）时。
- 其他 PCR 效率低下的情况。

步骤	温度	时间	升降速度
预变性	95℃	20~60 秒 <sup>*1</sup>	最大
PCR 变性	95℃	1~5 秒 <sup>*1</sup>	最大
(40 cycles) 退火	55~65℃ <sup>*2</sup>	5~30 秒 <sup>*3</sup>	最大
延伸	72℃ <sup>*4</sup>	10~60 秒 <sup>*4</sup>	

(Data Collection 请设定在延伸步骤)

#### 融解曲线分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)<sup>\*5</sup>

- \*1: 预变性及 PCR 循环中的变性条件说明请参照第 7 页指导。
- \*2: 退火温度请设定在「引物 T<sub>m</sub>~引物 T<sub>m</sub>-5℃」的范围内。非特异性反应较多的情况下，稍微提高反应温度可改善结果。
- \*3: 退火时间请按高速 PCR 仪 5 秒，普通 PCR 仪 15 秒的标准设定。非特异性反应较多，或反应效率较差的情况，请以 30 秒为上限适当延长。
- \*4: 一般情况下，目的片段在 300bp 以下时，延伸时间 30 秒即可进行充分的反应。但一部分仪器为测定稳定的荧光，延伸时间需大于 30 秒。扩增曲线散乱，或各孔间的差异较大时，请设定较长的延伸时间（30-60 秒）。另外，部分仪器由于硬件或控制用的软件的原因，无法设定为 25 秒以下，此时请根据仪器的使用说明书，设定最适的可设定时间（例如：QuantStudio 5 的 96 孔板可设定为 25 秒以上，Applied Biosystems 7000/7300 为 31 秒以上，7500 为 35 秒以上）。
- \*5: 融解曲线分析请根据各仪器的标准设定。详细请见各仪器的使用说明书。

## [5] 相关 Protocol: cDNA 合成

本试剂可以用各种逆转录反应合成的 cDNA 为模板，但如果用 Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒，则可进行更高灵敏度的反应。

本公司的 ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit(Code No.FSQ-101)、ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix(Code No.FSQ-201)、ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code No. FSQ-301)是专为 Realtime PCR 设计开发的高效率 cDNA 合成试剂盒。与本产品组合使用，可以得到可靠性更高的结果。

这是使用 ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix 或 ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 合成 Realtime PCR 用 cDNA 的方法。(详细请参照该试剂盒所附的说明书)。

### ● ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix (Code No. FSQ-201)

#### (1) RNA 的变性 (可选)

取作为模板使用的 RNA (按使用量), 65°C、5 分钟温育后在冰上急速冷却。

- 如果进行了该步骤, 则可提高容易形成高级结构的 RNA 的逆转录效率, 所以在初次实验时建议进行条件讨论。进行该步骤时, 注意不要添加 5x RT Buffer。

#### (2) 反应液的配制

在冰上配制以下反应液。

Nuclease-free Water	X $\mu$ L
5 $\times$ RT Master Mix	2 $\mu$ L
RNA	1 pg~1 $\mu$ g
<hr/>	
Total volume	10 $\mu$ L

#### (3) 逆转录反应

轻轻搅拌反应液, 混合均匀后, 进行以下温度的温育反应。

37°C,	15 分	(逆转录反应)
50°C,	5 分	(可选) **
98°C,	5 分	(酶失活反应)
4°C,	hold	

\*\* ReverTra Ace<sup>®</sup>经过改良, 提高了耐高温反应性。通过本步骤, 可能会提高逆转录效率。

反应结束后, 4°C或-20°C保存。进行 Realtime PCR 反应时, 作为模板直接或稀释后添加到反应液中。

● **ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301)**

(1) 4x DN Master Mix 与 gDNA Remover 的混合（初次使用时）

可在整管 4x DN Master Mix（440μl）中添加 8.8μl（1/50 量）的 gDNA Remover，颠倒混匀后再使用。添加 gDNA Remover 的 4x DN Master Mix 在-20°C 条件下可至少保持 3 个月的稳定。

- 短时间内无法使用完毕时，请少量混合后使用（如：4x DN Master Mix 220μl + gDNA Remover 4.4μl）。

(2) RNA 的变性（可选）

取作为模板使用的 RNA（按使用量），65°C、5 分钟温育后在冰上急速冷却。

- 如果进行了该步骤，则可提高容易形成高级结构的 RNA 的逆转录效率，所以在初次实验时建议进行条件讨论。（进行该步骤时，请务必在添加 4x DN Master Mix 之前进行）。

(3) 基因组 DNA 去除反应（DNase 反应）

在冰上配制以下反应液。

4×DN Master Mix (已添加 gDNA Remover)	2 μL
RNA template	0.5pg~0.5μg
Nuclease-free Water	X μL
<hr/>	
Total volume	8 μL

轻轻搅拌反应液，混合均匀后，37°C 温育 5 分钟。

- 必要时，可适当扩大反应体系。

(4) 逆转录反应

继续在冰上进行以下反应液的配制。

(3)的反应液	8 μL
5×RT Master Mix II	2 μL
<hr/>	
Total volume	10 μL

轻轻搅拌反应液，混合均匀后，按以下温度进行温育。

37°C,	15 分	(逆转录反应)
50°C,	5 分	(可选) **
98°C,	5 分	(酶失活反应)
4°C,	hold	

\*\* ReverTra Ace®经过改良，提高了耐高温反应性。通过本步骤，可能会提高逆转录效率。

反应结束后 4°C或-20°C保存。进行 Realtime PCR 反应时，作为模板稀释或直接添加到反应液中。

## [6] 常见问题

问题	原因	对策
用高浓度样品进行反应时线性混乱	由于 SYBR® Green I 与样品 DNA 的结合造成基线上飘	SYBR® Green I 与全部双链 DNA 相结合，由于具有发荧光的特性，当样品中含高浓度的双链 DNA 时，会造成基线上飘，从而无法计算出正确的 Ct 值。请适当降低样品浓度再进行反应。
	样品溶液中的杂质抑制了反应	当样品纯度较低时，其所含的杂质会抑制 PCR 反应。此外，使用非 Realtime PCR 专用逆转录试剂盒合成的 cDNA 时，逆转录反应液中所含的物质也会抑制 PCR 反应。请降低样品浓度，或将样品纯化后再进行反应。建议使用 Realtime PCR 用 cDNA 合成逆转录试剂盒。
用低浓度样品进行反应时线性混乱	目的 DNA 的拷贝数过少	反应液中的目的 DNA 只有几个到几十个拷贝时，拷贝数散乱的概率变大，容易形成线性混乱。此时请适当提高样品浓度再进行反应。
	DNA 被反应离心管所吸附	使用样品的 DNA 量较少或样品稀释后被长时间存放的情况下，会使得 DNA 被反应离心管吸附，从而造成实际参与反应的模板量减少。请提高样品浓度再进行反应。另外，如果要对样品进行稀释，请稀释后立即进行反应。
	同时产生引物二聚体	对目的 DNA 进行扩增时，同时发生引物二聚体的扩增，从而无法检测出目的片段的扩增曲线。进行融解曲线分析，出现几个峰顶时，请再次优化反应条件，防止引物二聚体的再次发生。
稀释系列样品的扩增曲线的间隔不均一	与非特异性反应的竞争	引物特异性不好时，会产生目的片段以外的扩增，从而无法检测出目的片段的扩增曲线。进行融解曲线分析，出现几个峰顶时，请再次优化反应条件，防止引物二聚体的再次发生。仍无法得到改善时，请尝试重新设计引物。
PCR 效率低于 80% (slope < -3.95)	反应条件不合适	根据目的片段的不同，有可能出现在标准的反应条件下 PCR 效率不高的情况。请根据[4]使用方法·(2) PCR 循环条件的设定，重新探讨 PCR 反应条件。
	引物的 Tm 值低于一般情况(60°C以下)	使用 Tm 值较低的引物时，会出现在标准的循环条件下无法充分退火的情况。此时可适当降低延伸温度(参考 p.5、*4)、或尝试使用三步法 PCR(参考 p.7)。
	引物质量不好	当引物质量不好时，会导致 PCR 效率大幅下降。可从引物原液重新稀释，或重新合成引物。
	计算 PCR 效率时，包含了偏离直线的 Ct 值	如果计算 PCR 效率时，包含了偏离线性的 Ct 值，会增大计算值的误差。应将偏离直线的 Ct 值排除后再计算。

问题	原因	对策
PCR 效率高于 110% (slope > -3.1)	计算 PCR 效率时, 包含了偏离线性的 Ct 值	如果计算 PCR 效率时, 包含了偏离线性的 Ct 值, 会增大计算值的误差。应将偏离直线的 Ct 值排除后再计算。
重现性差	样品纯度不好	不纯的样品会抑制 PCR 反应, 从而导致实验的重现性差。可降低样品的浓度或对样品进行纯化后再反应。
	使用了稀释后长时间放置的样品	浓度较低的 DNA 溶液长时间存放时, 由于被反应容器吸附, 实际浓度会更低。请从原液重新稀释后再进行反应。另外, 通过梯度稀释的标准样品应避免稀释后再保存, 最好每次使用时直接从原液稀释。
	使用了质粒 DNA 或 PCR 扩增产物作为模板	使用质粒 DNA 或 PCR 扩增产物作为模板时, 由于目的片段相对全部 DNA 量的拷贝数非常高, 应减少添加到反应液的液量。此时, 溶液中 DNA 浓度非常低, DNA 很容易被容器吸附而减少。这会造成低浓度区域的线性及重现性变差。在稀释时, 可以在稀释液中混合一些与反应无关的核酸(Yeast RNA 等), 可改善低浓度区域的线性。
	引物质量不好	即便是同一序列的引物, 在合成时也会发生质量上的差异。可在新合成时, 与原来使用的引物做一下比较实验, 以确认质量差异。
no-template control (NTC) 可见扩增	发生了引物二聚体	融解曲线分析时, NTC 在目的片段的低温侧出现峰值, 疑似有引物二聚体产生。引物二聚体根据引物序列或引物质量的不同发生的程度也有所差异。首先根据[4] 使用方法·(2) PCR 循环条件的设定再次探讨 PCR 的反应条件, 如果仍无法改善, 则可进行引物的再设计或再合成。合成时, 纯化级别请选择 HPLC 以上。
	发生交叉污染	进行融解曲线分析时, NTC 的峰顶和目的片段大致在同一位置时, 可能是反应体系交叉污染所引起的。如果再次尝试仍然如此, 则可能是由试剂或灭菌水的交叉污染所引起的, 此时请换新的试剂。
扩增曲线的荧光信号很弱, 或扩增曲线呈锯齿状	荧光测定时间太短	一部分仪器, PCR 的延伸时间过短时, 荧光测定不能充分完成。扩增曲线的锯齿状较明显时, 将延伸时间设定得稍长些(30~60 秒)可得到改善。
	反应液量太少	以少于仪器的标准条件的液量进行反应时, 荧光测定值的误差会增大, 此时应增加液量。
融解曲线分析时可看到几个峰顶	发生了非特异性反应	引物的特异性不好的情况下, 会同时发生非特异性扩增, 无法只检测出纯粹的目的片段的扩增曲线。此时应重新探讨反应条件, 以避免非特异性反应的产生。仍无法得到改善时, 请重新设计引物。
	发生了引物二聚体	目的 DNA 的扩增与引物二聚体的扩增同时发生时。此时应重新探讨反应条件以避免引物二聚体的发生。仍无法得到改善时, 可重新设计引物或提高合成引物的纯度级别。

## [7] 相关产品

### Probe 检测体系用 Realtime PCR 试剂

产品名称	容量	Code No.
Probe 检测体系用 Realtime PCR 试剂 <b>THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix</b>	1mL × 1 支 (100 次份 /20 μL 反应)	QPX-101T
	1.67mL × 3 支 (500 次份 /20 μL 反应)	QPX-101

### cDNA 合成试剂盒

产品名称	容量	Code No.
Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒 <b>ReverTra Ace® qPCR RT Kit</b>	200 次份	FSQ-101
Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂 预混型 <b>ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix</b>	200 次份	FSQ-201
Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂 预混型 (带基因组 DNA 去除试剂) <b>ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover</b>	200 次份	FSQ-301

### 1-step Realtime PCR 相关试剂

产品名称	容量	Code No.
Probe 检测体系用 1-step Realtime PCR 试剂 <b>RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix</b>	0.5mL × 5 支 (250 次份 /20 μL 反应)	QRT-101
SYBR® Green I 检测体系用 1-step Realtime PCR 试剂 <b>RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix</b>	0.5mL × 5 支 (250 次份 /20 μL 反应)	QRT-201
高效率 1-step qRT-PCR Kit <b>THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit</b>	250 次份 /20 μL 反应	QRZ-101

### carryover 污染应对 · 防止假阳性试剂

产品名称	内容	Code No.
热敏性(Heat-labile) UNG <b>Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile</b>	200 U	UNG-101



Ideas & Chemistry

<销售商>

东洋纺（上海）生物科技有限公司

邮编：200122

邮箱：tech@bio-toyobo.cn

网址：<http://www.bio-toyobo.cn>

联系电话：021-58794900

公司地址：上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 楼 AL 单元

<生产商>

东洋纺株式会社敦贺生物工厂

地址：日本国福井县敦贺市东洋町 10 番 24 号