

qPCR 解决方案

1. qPCR 原理

利用实时荧光信号的变化监测整个 PCR 进程，对未知模板进行定量分析的方法，主要分为染料法荧光定量检测和探针法荧光定量检测。其特点有操作简单、快速方便、灵敏度高、重复性好、污染率低等，不仅应用于基因表达解析，还被广泛应用于 SNP 分型解析、病毒和病原菌的检测、物种鉴定、转基因食品的定量分析等诸多领域。

基线期：PCR 反应早期，循环数较少，产物累积较少，产生的荧光的水平不能与荧光本底背景明显区分。

平台期：PCR 反应过程中产生的 DNA 拷贝数是以指数方式增加的，随着反应循环数的增加，最终 PCR 反应不再以指数方式生成模板，从而进入平台期。

Ct 值 (Cycle threshold)：表示每个 PCR 反应管内荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。Ct 值与起始模板数的对数值之间存在线性关系，因此，通过已知浓度样品的 Ct 值和未知浓度样品的 Ct 值，可以计算出未知样品的起始模板量。

熔解曲线 (Melt curve)：检测是荧光强度与温度的变化，可以用来确定不同的反应产物，包括非特异性产物。

决定系数 (r Squared)：反映标准曲线的直线性，越接近于 1 说明直线性越好，定量越准确。

斜率 (Slope)：反映 PCR 扩增效率，-0.25~-0.33 (根据不同装置数值不同)。

扩增效率 (Efficiency)：理想情况下扩增效率应在 $0.8 < E < 1.2$ 。

2. 染料法荧光定量和探针法荧光定量的比较

	染料法荧光定量	探针法荧光定量
优势	对 DNA 无选择性，简单易行，成本低廉，无需设计特异性探针	特异性强于染料法荧光定量检测，能进行多重荧光定量检测
劣势	对扩增的特异性要求较高；无法满足多重荧光定量 PCR 检测；容易与非特异性双链 DNA 结合，产生假阳性	针对不同基因需设计合成特异性探针；不易找到本底低的探针；成本较高
用途	DNA 及 RNA 定量；基因表达验证	DNA 及 RNA 定量；SNP 分型，病原体 and 病毒检测，多重荧光定量 PCR 检测

3. 绝对定量与相对定量

绝对定量：使用已知拷贝数的绝对标准品，制作标准曲线，对未知样品的绝对量（拷贝数）进行测定的方法；通常应用于在病毒、细菌、衣原体、支原体及转基因食品的检测中应用广泛。

作为标准品应尽量选择与实际检测样品结构近似的样品，以基因组 DNA 为起始材料时需选择基因组 DNA 作为标准品；进行 mRNA 表达解析时需选择表达目的基因的总 RNA 或逆转获得的 cDNA 作为标准品，但在绝对定量推荐使用 RNA 梯度稀释后进行逆转录和 qPCR 的标准曲线制作。

相对定量：是分别测定目的基因和参比基因（内参基因）的量，再求出对于参比基因的目的基因的相对量，进行样品间相对量的比较。主要用于检测细胞 mRNA 表达量的变化；比较不同组织的 mRNA 表达差异；验证基因芯片、基因过表达或 siRNA 干扰的实验结果。

4. 荧光定量引物设计原则

引物	原则
扩增片段大小	80-150 bp（尽量限制在 300 bp 以内）
引物长度	17-25 nt
GC 含量	GC 含量理想的是 40-60%，最好为 45-55%
二级结构	引物中避免出现任何反向重复序列
Tm 值	两条引物的 Tm 值尽量接近，可选用软件计算
序列	整体上碱基不能过偏，局部避免高 GC rich 或高 AT（特别是 3' 端）
3' 末端序列	避免 GC 含量过高，3' 末端碱基最好为 G 或 C，尽量避免 3' 末端碱基为 T
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
qPCR 引物	尽量在 Exon junction 或长内含子侧翼上设计引物，避免基因组 DNA 扩增
引物纯化	需经脱盐处理

探针设计	原则
探针 Probe 长度	长度在 20-24nt
Tm 值	探针的 Tm 要求比引物的 Tm 高约 10°C（8-10°C），通常在 65-70°C
序列	应避免连续的单碱基重复序列，尤其是 G；探针 5' 端不应含太多 G，避免淬灭荧光；探针不与任一引物互补
GC 含量	理想情况下 30%-80%，在目的序列 GC 含量相对较高的区域设计，整体上碱基不能过偏，局部避免高 GC rich 或高 AT（特别是 3' 端）

特异性	BLAST 检索确认 Probe 特异性
-----	----------------------

5. TaqMan 探针常用荧光-淬灭对

探针法通常是使用 5'端带有荧光物质（如：FAM 等），3'端带有淬灭物质（如：TAMRA、BHQ 等）的探针进行荧光检测的方法。

5'端报告染料	3'端报告染料
HEX	TAMRA、BHQ-1 或 BHQ-2
TET	TAMRA 或 BHQ-1
6-FAM	TAMRA 或 BHQ-1
JOE	BHQ-1
Cy3	BHQ-2
Cy5	BHQ-2
ROX	BHQ-2
TAMRA	BHQ-2
Texas Red	BHQ-2

6. 如何选择 Two Step RT-PCR 和 One Step RT-PCR?

基因表达解析等绝大部分 RT-PCR，建议选择 Two Step RT-PCR。可选择随机引物、OligodT 或基因特异性引物进行逆转录反应，然后再将反转录反应液（cDNA）或稀释后作为模板进行 RT-qPCR。

RNA 病毒检测等 RT-PCR，建议选择 One Step RT-PCR，反转录反应引物只能使用基因的特异性 PCR 下游引物。其逆转录反应和 PCR 反应在同一反应体系内进行，操作简便，降低污染。但这一反应体系并非逆转录反应和 PCR 反应的最佳反应条件，因此，One Step RT-PCR 要比 Two Step RT-PCR 反应效率低。

7. 总 RNA 中混有基因组 DNA 时处理方法

- 引物设计在 Exon junction 或长内含子侧翼上，避免基因组 DNA 扩增。引物选择跨越较长的内含子，在这个内含子两侧的外显子上分别设计上、下游引物。
- 使用 DNase I 处理去除基因组 DNA 污染：使用常规方法提取 Total RNA 后，再使用 DNase I 处理。
- 可选用使用 ExonScript RT SuperMix with dsDNase 逆转录试剂盒，可以高效去除残留的基因组 DNA。去除基因组 DNA 和逆转录反应在同一管内完成。

8. 荧光定量实验成功的关键要素

- 总 RNA 需通过电泳和 OD 分析确认其质量，再逆转录获取 cDNA。建议实验室设置阳性对照与阴性对照。

- 引物和探针的设计：参见 4. 荧光定量引物设计原则
- 选择优良试剂：根据实验目的选择染料法荧光定量检测或探针法荧光定量检测；为了减少操作错误，建议选择 2×预混试剂；为了降低非特异性扩增，最好选择 Hot Start DNA 聚合酶的预混试剂，但需在 PCR 条件的最初步骤设置 10~15 分钟的热变性程序，以恢复 DNA 聚合酶的活性；选用试剂耗材需与荧光定量检测仪配套；选择质量较高的标准品制备标准曲线。
- 反应条件的优化：可根据使用的产品说明书进行反应条件的优化。
- 实验操作：必须分区操作，避免污染。

9. 扩增曲线的荧光信号值低的原因

扩增曲线存在问题，如扩增曲线的荧光信号值低，通常是由于背景荧光信号值过高造成的。染料法进行检测时，背景荧光信号偏高大多数是由于模板量过高；荧光探针法进行检测时，背景荧光信号偏高大多是因设计的探针质量差

- 确认基线或 ROX 校正前的原始曲线。
- 调整模板使用量。

10. 扩增曲线出现朝右下方下落的原因

- 使用的模板量过多，扩增曲线过早起峰，使基线校正不能正常进行。建议优化模板使用量。
- 基线校正不恰当，确认设置的基线校正范围的参数。

11. PCR 扩增效率低的原因

- PCR 阻害物质的混入，需重新优化获取模板的方法。
- 标准品稀释不准确，需使用专用标准品稀释液。
- PCR 反应条件不佳。引物、试剂、PCR 反应条件等优化。

12. 融解曲线出现复数峰的原因

可能是目的片段以外的扩增或引物二聚体的产生

- 存在目的基因的 Variants，需重新设计引物。
- 引物二聚体等非特异性扩增，优化 PCR 条件或重新设计引物。
- 基因组 DNA 的扩增，需用 DNase I 处理或考虑重新设计引物。

注：建议对初次使用引物的扩增产物进行电泳确认：单一峰型时可以确认扩增片段大小，判断是否为目的产物；非单一峰型时也有必要对扩增产物进行确认，如果电泳结果显示为单一条带，并与目的片段大小吻合，可以判断为进行了特异性扩增。

13. Ct 值的计算方法

- 交点法，通过荧光阈值和扩增曲线的交点获得 Ct 值。

- 二次求导法,通过扩增曲线二次求导后取其最大值获取 Ct 值,其不会随荧光阈值的设定不同而变化,重现性高。

14. RT-qPCR 预混试剂有絮状沉淀物的处理方法

白色絮状沉淀物的产生有时是由组分溶解不彻底导致。此时请用手稍微加热或室温短时间放置制品,然后进行上下颠倒或低速短暂涡旋混合,使组分充分溶解,但请不要用振荡器等剧烈搅拌混合。溶解后的试剂性能不受影响。

15. 使用 qPCR 试剂时, PCR 程序选择两步法还是三步法

普通 PCR 反应程序按三步法进行,而 qPCR 系列产品的大量实验数据表明,两步法 PCR 可以减少反应时间,增强反应特异性,提高扩增效率,得到较好的实验结果,推荐使用标准程序两步法 PCR。即退火/延伸温度为 60℃,可在 60~66℃ 范围进行优化。但需要注意避免退火/延伸设定温度高于 68℃,温度过高引物退火不完全,降低扩增效率。如果两步法 PCR 反应性能较差时,可使用三步法 PCR 程序进行优化。