



高效率 One-step qRT-PCR Kit

THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit

试用品

(Code No. QRZ-101, QRZ-101S)

使用说明书

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

[1] 简介	1
[2] 产品内容	2
[3] 除产品以外需要准备的物品	3
[4] 使用方法	4
1. 引物及 TaqMan® Probe 的设计方法与性能确认	4
2. 反应液的制备	5
3. 循环条件设定	6
[5] 各仪器循环条件设定例	7
1. Applied Biosystems® StepOnePlus™	7
2. LightCycler® 96	8
3. CFX96 Touch™ Deep Well	9
[6] 最适反应条件讨论方法	10
1. 条件讨论的顺序	10
2. 延伸(退火)温度·时间的讨论方法	11
3. 引物·TaqMan® Probe 浓度的探讨方法	12
[7] 实验例	13
实验例 1:纯化 RNA 的检测	13
实验例 2: 多数目的片段的的同时检测	14
[8] Trouble shooting	16
1. PCR 效率低、检测灵敏度低、检测结果散乱	16
2. 定量值的误差	17
3. 阴性样品中见到信号	17
[9] 相关产品	18

注意

本试剂盒中含有的试剂均为研究用途。请勿作为诊断·临床试剂使用。使用本试剂盒时，请严格遵守实验室的相关注意事项，安全规范操作。

[1] 简介

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit 是以高效逆转录酶 ReverTra Ace®为逆转录酶与以 Tth DNA Polymerase 作为 PCR 酶的双酶体系进行一步法荧光定量 PCR 的试剂盒。主要是能够将 TaqMan®分析法用于荧光定量 PCR。因为逆转录反应与 PCR 在同一反应体系中连续进行，试剂的分装操作一次完成，适用于高通量化。另外，也降低了样品间交叉污染的风险。

本产品由两种酶与优化的 buffer 组合而成，对微量的 RNA 也能够迅速进行定量。利于 RNA 病毒及表达量少的 mRNA 的定量。另外，不易受目的基因序列的影响，可高灵敏度地检测出各种类型的 RNA。

◆本产品的特点◆

1. 迅速·高灵敏度

通过使用 Probe 的 One-step qRT-PCR，可迅速且高灵敏度地对微量 RNA 进行定量。利于 RNA 病毒及表达量少的 mRNA 的定量。

2. 序列偏差的降低

不易受目的基因序列的影响，可高灵敏度地检测出各种各样的 RNA。

3. 混杂物抗性的提高

可避免因血红素等的 PCR 抑制剂导致的灵敏度下降。

4. 使用 dUTP

本产品的 2xReaction Buffer 中含有 dUTP。通过添加 Uracil-N-Glycosylase(UNG)*，能够防止因 Carryover 污染而导致的假阳性发生。

* 本产品中不含有 UNG。

5. 可同时检测多个目的基因

通过使用不同检测波长的 TaqMan® probe，可以同时检测多个目的基因。可在同一反应内检测对照基因和目的基因，可迅速简便地进行高准确率的基因定量。

6. 高速热启动

使用了抗 DNA 聚合酶的抗体，采用热启动体系。使用抗体的热启动方法，显示出对非特异性反应的强烈抑制效果，另外，通过加热，抗体可快速失活，酶也迅速再次活化，**可将高温对酶的伤害抑制到最低。**

7. 可用于各种各样的仪器

本产品可用于一般的模块型仪器，毛细管型等各种荧光定量 PCR 装置。也可用于带有 Fast Mode 的仪器。另外，因另外附带 50xROX Reference dye，对于需要 passive reference 的仪器(Applied Biosystems®制造的仪器等)，可根据各仪器适合的 ROX 浓度进行使用。

[2] 产品内容

本产品中含有以下组分。

产品名及内容	保存	QRZ-101S (50 μ l 反应 x20 次)	QRZ-101 (50 μ l 反应 x100 次)
2x Reaction Buffer	-20 $^{\circ}$ C	500 μ l x1 支	1.25ml x2 支
DNA Polymerase	-20 $^{\circ}$ C	25 μ l x1 支	125 μ l x1 支
RT Enzyme Mix	-20 $^{\circ}$ C	25 μ l x1 支	125 μ l x1 支
50x ROX Reference dye	-20 $^{\circ}$ C 避光 保存	20 μ l x1 支	100 μ l x1 支
RNase free water	-20 $^{\circ}$ C	500 μ l x1 支	1.25ml x2 支

2x Reaction Buffer

- 反应 buffer 是含有 dATP、dCTP、dGTP、dUTP 等的 2x 浓度的反应溶液。
 - 请添加模板 RNA、引物、附带的 DNA Polymerase、RT Enzyme Mix、50x ROX Reference dye，配制成 1x 浓度使用。*
 - 融解后充分混合，请混合均匀后使用。
- * 请每次混合后使用。混合后的状态不能保存。

DNA Polymerase

- 是 PCR 反应必需的 PCR 酶和热启动抗体的混合液。使用 Tth DNA polymerase 作为 PCR 酶。

RT Enzyme Mix

- RT 反应必需的逆转录酶。使用了高效逆转录酶 ReverTra Ace[®]。
- RT Enzyme Mix 中，除了含有逆转录酶外，还含有 RNase Inhibitor，能够抑制 RNase 的活性。

50x ROX Reference dye

- Applied Biosystems[®]生产的仪器、Agilent technologies 公司生产的仪器等，为校正孔间荧光强度及分装误差，需要使用 passive reference。
- 在用这些仪器进行反应时请添加 50x ROX Reference dye。
- 最适添加量因仪器类型不同而异，不需要校正的仪器则没必要添加。

RNase free water

- 是不含 RNase 的灭菌水。
- 请在制备反应液时使用。

[3] 除产品以外需要准备的物品

除本产品以外，请准备以下试剂及仪器。

1. 荧光定量 PCR 装置

本产品可用于一般的模块型、毛细管型等及各种荧光定量 PCR 装置。带有 Fast Mode 的装置也可以使用。使用时请按各装置的说明书进行操作。

2. 引物及 TaqMan® Probe

请根据目的基因的序列准备引物对及 TaqMan® Probe。因为 PCR 的反义引物可以作为逆转录的引物使用，所以无需准备随机引物及 Oligo dT 引物等。引物的纯度对反应特异性有很大影响。通常纯度比较低的引物质量的差别较大，容易发生非特异性扩增。如果可能请用 HPLC 纯化，至少也要 OPC 级别以上的纯度。另外，TaqMan® Probe 的纯度较低时，残留的未结合的荧光染料会对扩增时的检测有抑制作用。如果可能，请使用 HPLC 级别以上纯度的 TaqMan® Probe。

3. 模板 RNA

本产品中，作为模板的 RNA，可以使用 Total RNA、poly(A)⁺RNA(mRNA)、病毒 RNA 等各种 RNA。

(a) Total RNA

用 Acid-Guanidium-Phenol-Chloroform (AGPC) 等标准方法纯化的 Total RNA 中混有基因组 DNA。基因组 DNA 的混入，特别是在检测存在较多假基因的目的基因时，是发生假阳性信号的原因，有必要用 DNase 等去除基因组 DNA。

(b) poly(A)⁺RNA(mRNA)

poly(A)⁺RNA 是选择性分离只能与 oligo(dT) 杂交的有 polyA 末端的 mRNA。在纯化步骤能够浓缩 mRNA，对于想进行高灵敏检测 mRNA 时比较有用。但是，与 Total RNA 相比，易于受 RNase 影响导致降解，所以操作时请注意。

(c) 病毒 RNA

利用 AGPC 法及 spin column 法等标准方法，可使用从血浆，血清，无细胞体液等提纯的病毒 RNA。

4. Uracil-N-Glycosylase (UNG) [option]

请使用市售的热敏性(heat-labile)UNG。

[4] 使用方法

1. 引物及 TaqMan[®] Probe 的设计方法与性能确认

(1) 引物及 TaqMan[®] Probe 的设计方法

为取得高灵敏度的定量数据，引物及 TaqMan[®] probe 的设计是最重要的。下面，介绍设计时一般的注意事项。

(a) 引物

- 请以 18~25mer、GC 含量 40~60%、融解温度(Tm)*在 60~65℃的标准设计。
- 扩增长度按 70~200bp 的标准设定。因为超过 200bp，PCR 效率会下降，会造成检测灵敏度下降。
- 通过在跨内含子的外显子或其连接处设计引物，可避免基因组 DNA 产生的扩增。

(b) TaqMan[®] Probe

- 请以 20~30mer、GC 含量 40~60%、融解温度(Tm)*在 65~70℃的标准设计。
- 将 TaqMan[®] probe 在外显子连接处设计，可避免检测到基因组来源的扩增产物。

* 引物及 TaqMan[®] Probe 的 Tm 值的计算推荐用最接近碱基对法(Nearest Neighbor method)。本使用说明书里列出的引物·TaqMan[®] Probe 的 Tm 值是以 50mM 的 Na⁺ 浓度，50μM 的引物·TaqMan[®] probe 浓度计算的值。

本公司有以最接近碱基对法(Nearest Neighbor method)为基础开发的 Tm 计算程序。从本公司的生命科学事业部网页(<http://www.toyobo.co.jp/bio/>)的本产品的注意事项的链接上可以找到。

(2)引物及 TaqMan® Probe 的性能确认

引物及 TaqMan® Probe 的性能用以下方法可以确认。实验开始前，推荐做的事项包括：

(a)制备模板 RNA 的 3 个梯度以上的稀释系列。

（例如： 制备 Total RNA 量的稀释系列 0.2ng/μl、2ng/μl、20ng/μl ， 向 20μl 的反应体系中每个添加 5μl）

(b)用设计的引物 · TaqMan®Probe 进行反应，作标准曲线。

(c)确认 PCR 效率在 85~115%范围内、R² 的值为 R² ≥ 0.98 的水平。PCR 效率、

R² 值在此范围以外时，请参考「[6]最适反应条件的探讨方法」，进行延伸（退火）温度 · 时间的探讨及引物&TaqMan® Probe 浓度的探讨。通过这种探讨，仍然不能改善时请重新设计引物&TaqMan® Probe。

2. 反应液的制备

以下是以 50μl 及 20μl 反应时的制备为例进行说明。请结合所使用的荧光定量 PCR 仪器的特性，增减适宜的反应液量。

option

虽然同时检测多数的目的基因时也适用于同样的条件，但是事前，请先用单独的反应确认引物 · TaqMan® Probe 对的性能及所选择的报告染料适合于荧光定量 PCR 仪器。

试剂	20μl 反应	50μl 反应	最终浓度
RNase free water	Xμl	Xμl	
2xReaction Buffer	10μl	25μl	1x
DNA Polymerase	0.5μl	1.25μl	
RT Enzyme Mix	0.5μl	1.25μl	
Forward Primer	10pmol	25pmol	0.5μM*1
Reverse Primer	10pmol	25pmol	0.5μM*1
TaqMan® probe	4pmol	10pmol	0.2μM*2
50xROX Reference dye (Uracil-N-Glycosylase)	0.4 /0.04μl*3 0.4unit*4	1/0.1μl*3 1unit*4	1x/0.1x*3
RNA 溶液	Yμl*5	Yμl*5	
合计液量	20μl	50μl	

- *1 用 0.5 μ M 的浓度不能得到良好结果时，请参考「[6]最适反应条件的探讨方法」。同时检测多数目的基因时，也请用相同的浓度进行。
- *2 用 0.2 μ M 的浓度不能得到良好结果时，请参考「[6]最适反应条件的探讨方法」。同时检测多数目的基因时，也请用相同的浓度进行。
- *3 Applied Biosystems[®]制造的仪器及 Agilent Technologies 公司制造的仪器等，为校正孔间的荧光强度及分装误差，要使用 passive reference。用这些仪器进行反应时，请添加 ROX Reference dye。最适添加量因仪器种类不同而不同。主要仪器的添加量如表 1 所示。另外，不需要校正的仪器则没必要添加。
- *4 用 Uracil-N-Glycosylase(UNG)处理时，请使用热敏性(heat-labile)UNG。可根据各公司的推荐条件，调整酶量。
- *5 过量添加会造成反应效率下降，有时会得不到充分的直线型扩增效率。
Total RNA 请以 25ng/ μ l 以下的标准添加到反应液中。

表 1: 主要仪器的最适 ROX Reference dye 浓度

仪器	最终浓度（添加量）
Applied Biosystems [®] 7000、7300、7700、7900HT、StepOne [™] 、StepOnePlus [™] 等	1 \times (1/50 量)
Applied Biosystems [®] 7500、7500Fast、Agilent Technologies 公司制造的仪器（Opticon）等	0.1 \times (1/500 量)
Roche 公司制造的仪器、Bio-Rad 公司制造的仪器、Qiagen 公司制造的仪器等	不添加

3. 循环条件设定

推荐以下的条件。请将 Data Collection 设定在延伸（退火）这一步。PCR 效率较低的时候，请参考「[6]最适反应条件的探讨方法」。多数的目的基因同时检测时，推荐用以下条件进行。

Step	温度	时间	升降速度	
(UNG 反应)	(20~25 $^{\circ}$ C*1)	(10 分*1)	(最大)	
逆转录反应	50 $^{\circ}$ C	10 分	最大	
预变性	95 $^{\circ}$ C	1 分	最大	
PCR	变性	95 $^{\circ}$ C	15 秒	最大
(40~45cycles)*2	伸长(退火)	60 $^{\circ}$ C	45 秒	最大

*1 进行 UNG 处理时，进行逆转录反应之前，请设定 UNG 反应的步骤。上述表中表示的是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 循环数请设定为 40，扩增不充分时请提高到 45 个循环。

[5] 各仪器循环条件设定例

1. Applied Biosystems® StepOnePlus™

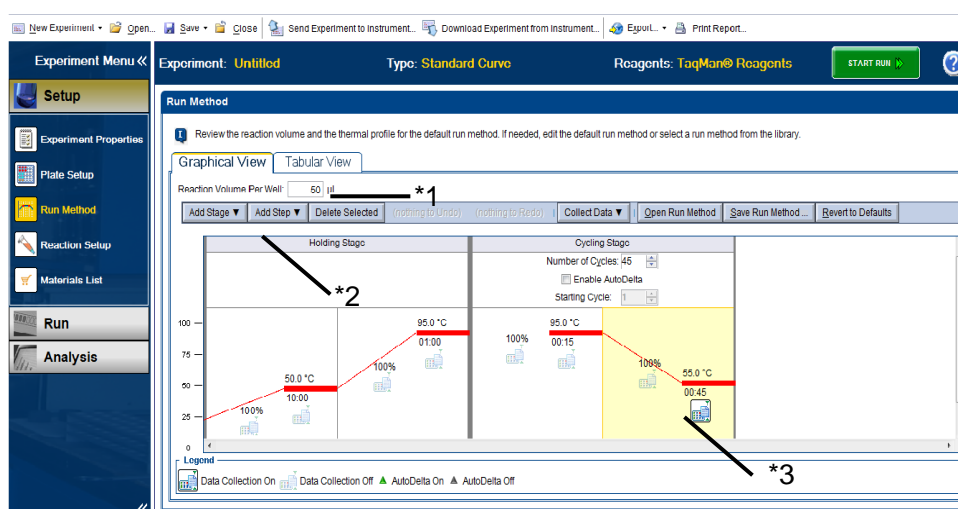
这里介绍一下 Applied Biosystems® 公司的仪器（Applied Biosystems® StepOnePlus™ 等）循环条件设定的例子。详细情况请参考各自的使用说明书。（通常模块型、software version 2.3）

或者，Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System（通常模块型、software version 2.0.6）等也可以按类似的设定方法进行，请参考。

- (1) 启动软件。
- (2) 从 Design Wizard、Advanced Setup、QuickStart 中选择一种。
- (3) 选择下表的类型，reagents 选择 TaqMan® Reagents。

Design Wizard 的时候	Method & Materials
Advanced Setup 的时候	Setup → Experiment Properties
QuickStart 的时候	Experiment Properties

- (4) 选择 Run Methods，在 Reaction Volume Per Well 栏中输入反应液的体积。
- (5) 选择 Add Step，加一步逆转录反应：50℃ 10 分钟。
- (6) 选择 Holding Stage，设定为 95℃ 1 分钟。
- (7) 选择 Cycling Stage，设定为 95℃ 15 秒，60℃ 45 秒，40 个循环。
- (8) 放置板或管，开始程序。

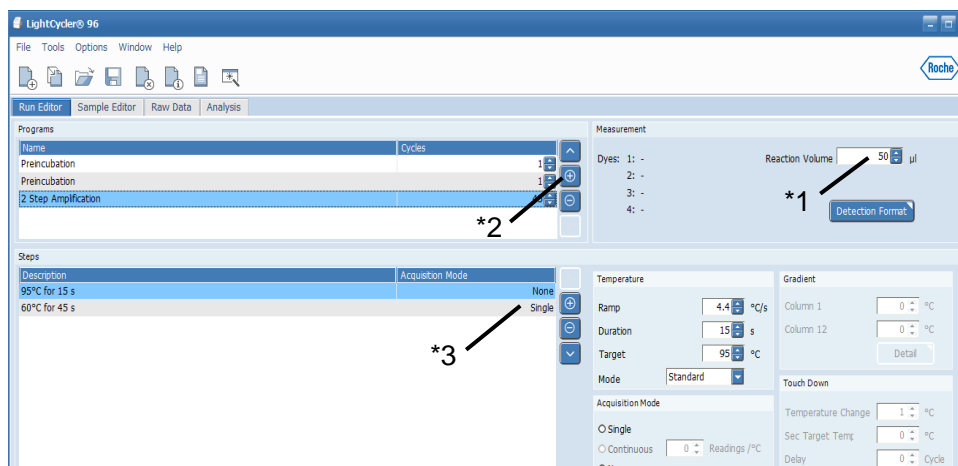


- *1 Reaction Volume(µl) 栏内，请务必输入正确的反应液的体积。
- *2 初次设定时，设为预变性与 PCR(两步法)的循环。选择 Add Step，追加一步逆转录反应。
- *3 退火反应时，请设定数据收集点。

2. LightCycler® 96

以下是 Roche 公司生产的 LightCycler® 96 循环条件设定的例子。详细情况请参考各自的使用说明书。(software version 1.1)

- (1) 启动软件，选择 Create New Experiment。
- (2) 在 Reaction Volume 栏内输入反应液的体积。
- (3) 打开 Run Editor 的类型，在 Predefined Programs 中依次选择 Preincubation、Preincubation、2 Step Amplification。Preincubation 中可以通过选择「+」标记来追加。
- (4) 选择第一个 Preincubation，设定为 Target 50°C、Duration 600 秒。
- (5) 选择第二个 Preincubation，设定为 Target 95°C、Duration 60 秒。
- (6) 选择 2 Step Amplification，设定为 Target 95°C、Duration 15 秒、Target 60°C、Duration 45 秒。
- (7) 放置板或管，开始程序。

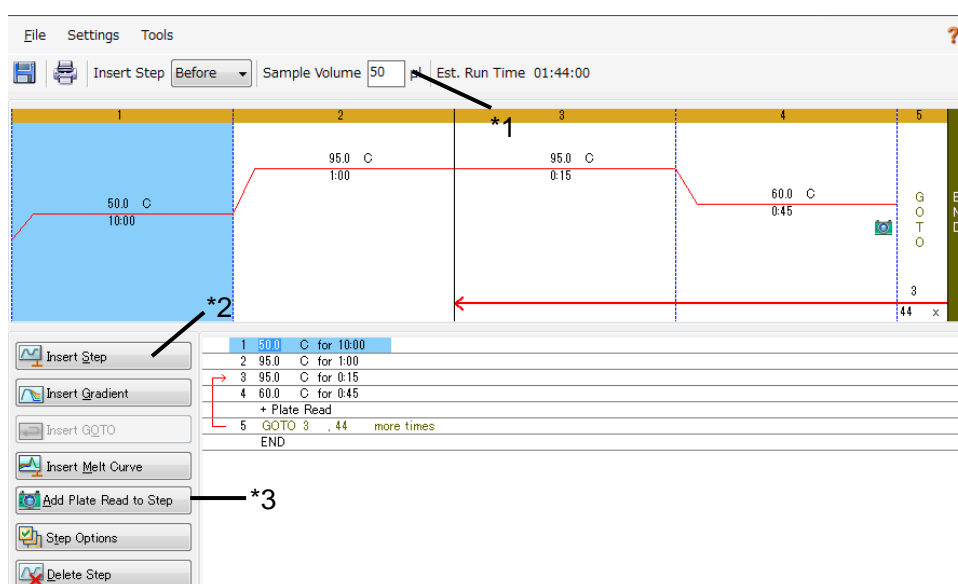


- *1 Reaction Volume(µl) 栏内，请务必输入正确的反应液的体积。
- *2 初次设定时，设为预变性与 PCR(两步法)的循环。选择「+」，追加一步逆转录反应。
- *3 退火反应时，请设定数据收集点。

3. CFX96 Touch™ Deep Well

使用 Bio-Rad 公司生产的 CFX96 Touch™ Deep Well 时循环条件设定例子。详细情况请参考各自的使用说明书。(software version3.1)

- (1)启动软件，选择 User-defined。
- (2)选择 Create New...，在 Sample Volume 栏内输入反应液的体积。
- (3)选择 Insert Step，追加逆转录反应：50℃ 10分钟。
- (4)设定各步骤为 95℃ 1分钟、95℃ 15秒、60℃ 45秒、40个循环。
- (5) 放置板或管，开始程序。

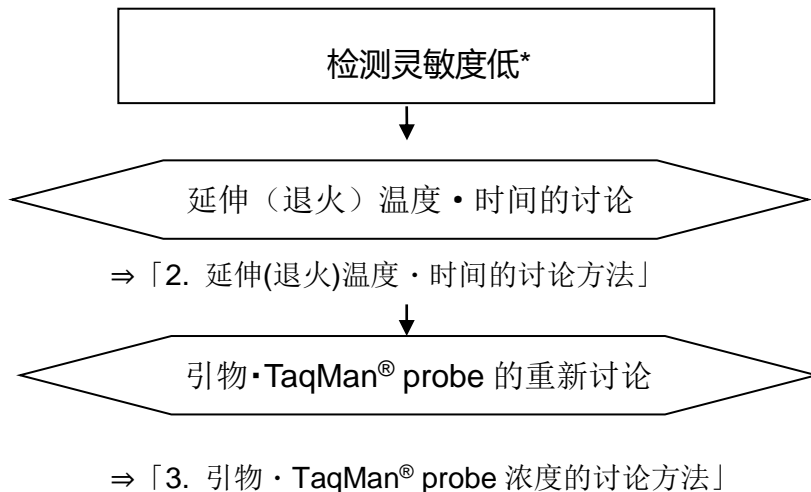


- *1 Sample Volume(μl) 栏内，请务必输入正确的反应液的体积。
- *2 初次设定时，设为预变性与 PCR(两步法)的循环。选择 Insert Step，追加逆转录反应。
- *3 退火反应时，请设定数据收集点。

[6] 最适反应条件讨论方法

1. 条件讨论的顺序

按照「[4]使用方法 3. 循环条件设定」中记载的预反应条件，没有达到目标灵敏度时，有必要讨论一下最适反应条件。反应条件按以下顺序讨论。



- * 检测灵敏度低的原因，可以考虑是 PCR 效率低下或者 TaqMan® Probe 的检测有问题。这些原因，有可能是引物或 TaqMan® Probe 设计的问题，所以，首先请确认「[4]使用方法 1. 引物及 TaqMan® Probe 设计方法和性能的确证」，之后再进行「[6]最适反应条件的讨论方法 2. 延伸(退火)温度・时间的讨论方法」以及「[6] 最适反应条件的讨论方法 3. 引物・TaqMan® Probe 浓度的讨论方法」。

2. 延伸(退火)温度·时间的讨论方法

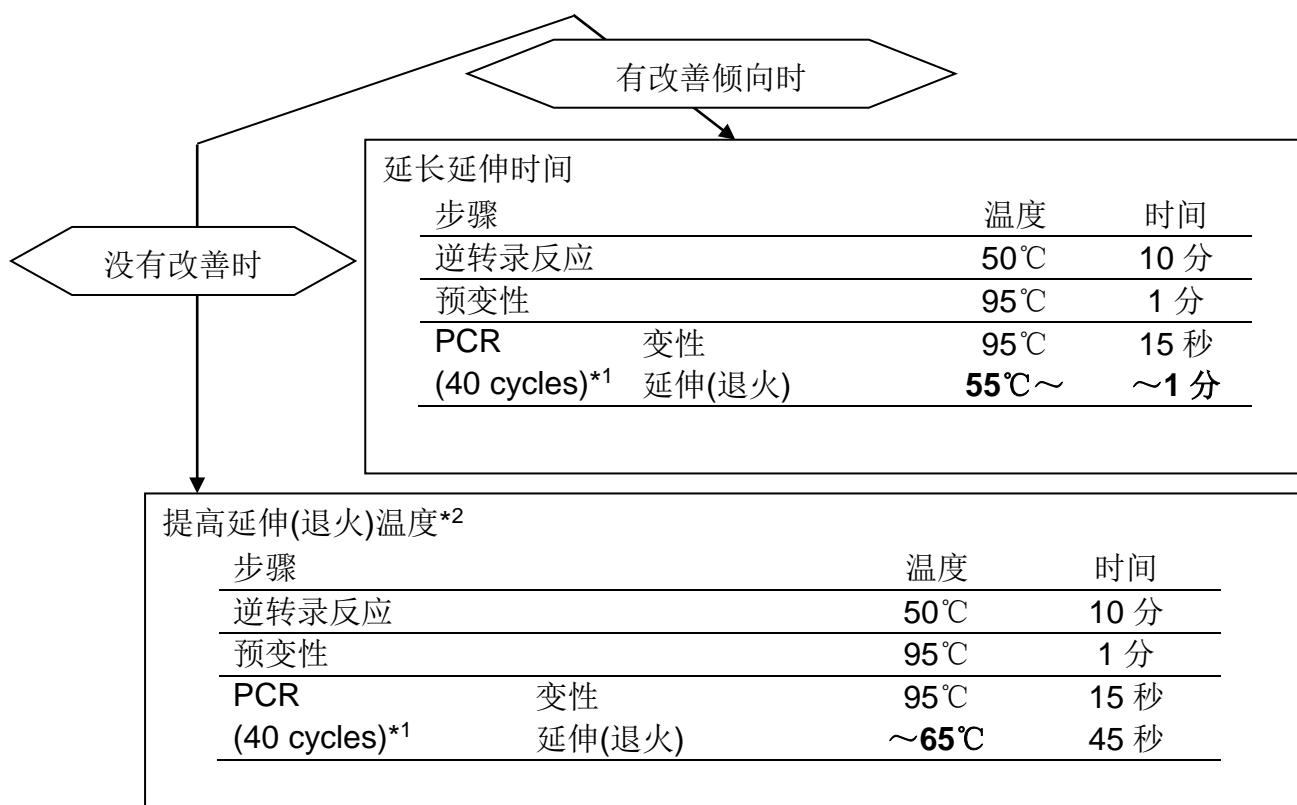
引物不能充分退火时,降低延伸(退火)温度可以改善 PCR 效率。另外, TaqMan[®] Probe 的退火不充分时,会引起检测灵敏度下降,可参考与上述方法进行改善。

降低延伸(退火)温度仍然无法得到改善时,有可能是产生了引物二聚体等非特异性扩增,导致 PCR 效率下降。这时可以通过提高延伸(退火)温度来改善 PCR 效率。

预反应条件			
步骤		温度	时间
逆转录反应		50℃	10 分
预变性		95℃	1 分
PCR	变性	95℃	15 秒
(40 cycles)* ¹	延伸(退火)	60℃	45 秒



降低延伸(退火)温度* ²			
步骤		温度	时间
逆转录反应		50℃	10 分
预变性		95℃	1 分
PCR	变性	95℃	15 秒
(40cycles)* ¹	延伸(退火)	55℃~	45 秒



*1 循环数先用 40 个，扩增不充分时请将循环数提高至 45 个。

*2 讨论延伸(退火)温度时，通过使用 Applied Biosystems® StepOnePlus™ 的 VeriFlex™ 性能或 Bio-Rad 公司的仪器的温度梯度功能等，可以一次用多个延伸(退火)温度进行摸索，就能够更简便地进行探讨。

3. 引物 · TaqMan® Probe 浓度的探讨方法

「2. 延伸(退火)温度 · 时间的讨论方法」的方法中 PCR 效率或检测灵敏度不能改善时，请对引物 · TaqMan® Probe 的浓度进行探讨。请按(1)、(2)的顺序进行讨论。

(1) 提高引物浓度 / 提高 TaqMan® Probe 的浓度

引物退火不充分时，通过提高引物浓度，可以改善 PCR 效率。另外，TaqMan® Probe 的退火不充分时，通过提高 TaqMan® Probe 的浓度，可以改善检测灵敏度。

首先请将 TaqMan® probe 的浓度固定在 0.2 μ M，引物浓度提高到 0.5~0.8 μ M 的标准。这样仍然得不到改善时，请将 TaqMan® probe 浓度提高到 0.2~0.4 μ M 的标准。

(2) 降低引物浓度

引物二聚体等非特异扩增产生时，通过降低引物浓度，可以改善 PCR 效率。这时，请将 TaqMan® probe 浓度固定在 0.2 μ M，引物浓度降低到 0.2~0.5 μ M 的标准。

如果 TaqMan® probe 的浓度降至 0.2 μ M 以下，就不能保证足够的荧光强度，有时会导致检测灵敏度下降，所以请注意。

[7] 实验例

实验例 1:纯化 RNA 的检测

<方法>

使用 THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit, 进行 RS 病毒 A 型的检测。样品是使用 QIAamp Virus RNA Kit 从咽喉粘液中提取的 RNA(6.5×10^4 copies), 然后按 10 倍稀释 6 个浓度梯度。

1. 循环条件：

步骤		温度	时间
逆转录反应		50°C	10 分
预变性		95°C	1 分
PCR (45 cycles)	变性	95°C	15 秒
	延伸(退火)	60°C	45 秒

2. 使用仪器：Applied Biosystems® StepOnePlus™

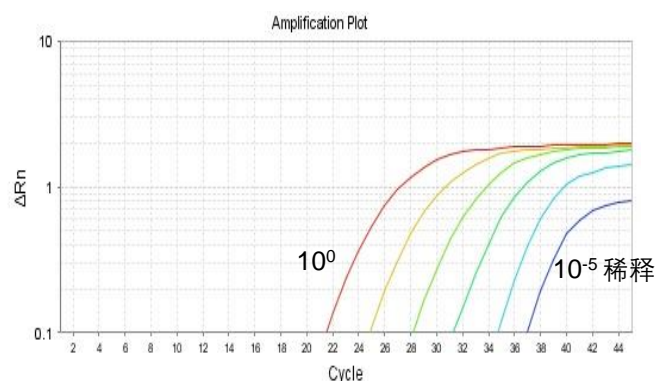
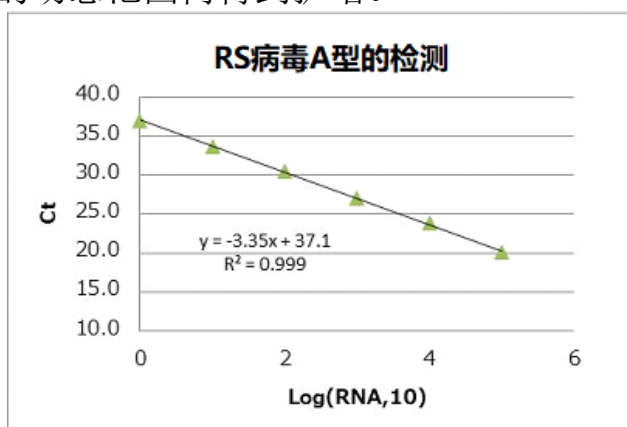
3. 检测的 RNA：RS 病毒 A 型

4. 引物·TaqMan® Probe

RS 病毒 A 型	序列	链长	GC 含量	Tm 值
Forward Primer	GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA	26mer	38.5%	65.4°C
Reverse Primer	TGCTCCGTTGGATGGTGTATT	21mer	47.6%	66.3°C
TaqMan® probe	[FAM]ACACTCAACAAAGATCAACTTC TGTCATCCAGC[TAMRA]	33mer	42.4%	73.9°C

<结果>

使用从临床检测样本提取的病毒 RNA, 可以确认能得到良好的 PCR 效率且在更广泛的动态范围内得到扩增。



实验例 2: 多数目的片段的的同时检测

<方法>

将 HeLa S3 细胞以每孔 4×10^5 cells 的浓度铺于 6 孔板中，添加 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 后培养 20 小时，提取 Total RNA。以得到的 Total RNA 为模板，使用 THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit，检测 IL-1 β 、TNF- α 、GAPDH 基因。TaqMan[®] Probe 用 3 种荧光染料标记，分别将 3 种基因单独检测和同时进行多重检测。将 HeLa S3 RNA 作 10 倍稀释（6 个梯度），20 μ l 反应体系中，添加 1pg~100ng。

1. 循环条件：

步骤	温度	时间
逆转录反应	50 $^{\circ}$ C	10 分
预变性	95 $^{\circ}$ C	1 分
PCR (45cycles)	变性 95 $^{\circ}$ C 延伸(退火) 60 $^{\circ}$ C	15 秒 45 秒

2. 使用仪器： LightCycler[®] 96

3. 检测的 RNA： HeLa S3 RNA

4. 引物 · TaqMan[®] Probe

IL-1 β	序列	链长	GC 含量	Tm 值
Forward Primer	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA	21mer	47.6%	63.7 $^{\circ}$ C
Reverse Primer	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT	21mer	52.4%	64.3 $^{\circ}$ C
TaqMan [®] probe	[FAM]CTCTGCCCTCTGGATGGCGG [TAMRA]	20mer	70%	73.5 $^{\circ}$ C

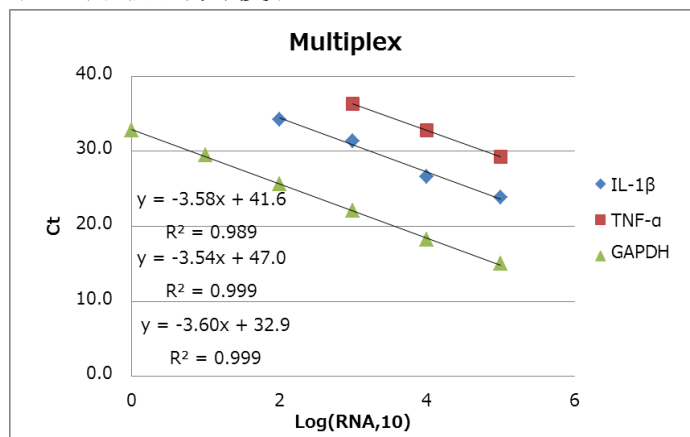
TNF- α	序列	链长	GC 含量	Tm 值
Forward Primer	CCCAGGGACCTCTCTCTAATC	21mer	57.1%	62.8 $^{\circ}$ C
Reverse Primer	ATGGGCTACAGGCTTGTCCT	21mer	52.4%	64.8 $^{\circ}$ C
TaqMan [®] probe	[Cy5]TGGCCCCAGGCAGTCAGATC ATC[BHQ2]	23mer	60.9%	75.3 $^{\circ}$ C

GAPDH: Human GAPD(GAPDH) Endogenous Control (VIC[R]/MGB probe, primer limited)

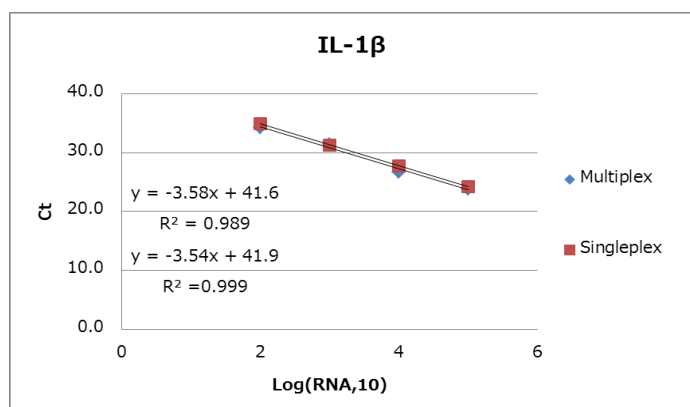
(生产商: Applied Biosystems 产品编号: 4326317E)

<结果>

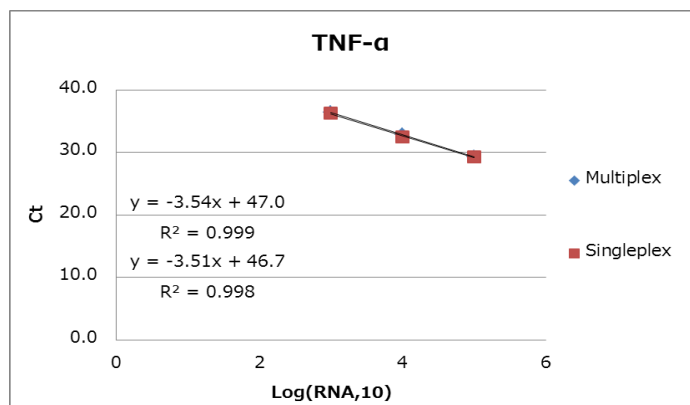
分别用各基因单独(Singleplex)及 3 通道多得检测进行比较,可以检测到相同的灵敏度、PCR 效率、 R^2 值几乎没有差别。本产品可以同时检测 3 种基因,有利于表达分析的简便化。



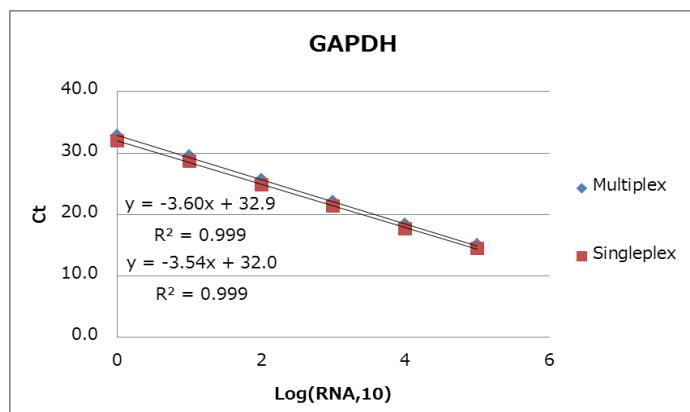
	PCR 效率	R^2 值
IL-1 β	90.2%	0.989
TNF- α	91.8%	0.999
GAPDH	89.6%	0.999



	PCR 效率	R^2 值
Multiplex	90.2%	0.989
Singleplex	91.6%	0.999



	PCR 效率	R^2 值
Multiplex	91.8%	0.999
Singleplex	92.9%	0.999



	PCR 效率	R^2 值
Multiplex	89.6%	0.999
Singleplex	91.6%	0.999

[8] Trouble shooting

1. PCR 效率低、检测灵敏度低、检测结果散乱

(1)仪器的设定不合理

原因	对策
检测仪器的设定等与荧光染料不符合	根据用于标记的荧光染料的种类不同，有必要改变检测仪器的设定。正确设定后再重新分析。
data collection 的设定不合适	各种分析法不同，data collection 的推荐设定位置也不同。确认设定，正确之后再进行分析。
样品位置的设定错误	请确认输入的样品编号与放入仪器的样品的位置相一致、先设定正确的样品位置，再进行分析或实验。
其他的装置的故障・不良状态	请根据各装置的使用说明书进行检查。

(2)RNA 样品不好

原因	对策
RNA 发生降解	由于 RNase 的作用，有可能引起模板 RNA 的降解。请重新修正 RNA 的抽提过程、使用 RNA 操作专用的移液器等器材、重新进行 RNA 的制备。

(3)循环条件设定及引物・TaqMan® Probe 浓度不合适

原因	对策
延伸(退火)温度・时间不合适	请参考「[6]最适反应条件的探讨方法」，优化延伸(退火)温度及时间。
引物・TaqMan® Probe 浓度不合适	通过调整延伸(退火)温度・时间不能改善时，请调整引物・TaqMan® Probe 的浓度。 请参考「[6] 最适反应条件的探讨方法」，优化引物・TaqMan® probe 的浓度。
引物・TaqMan® Probe 的设计有问题	重新调整循环条件的设定及引物・TaqMan® Probe 的浓度，也不能改善时，可能是引物・TaqMan® Probe 设计的问题。请优化引物・TaqMan® Probe。

(4)ROX 浓度的不合适

原因	对策
50xROX Reference dye 的浓度不合适	50xROX Reference dye 的最适添加量因仪器种类不同而异。另外，不需要校正的仪器则无需添加。请确认 50xROX Reference dye 合适的浓度。

2. 定量值的误差

(1) 仪器设定的不合适

原因	对策
装置的故障・不良状态	装置的不良状态会引起在温度管理及检测时产生误差。请根据各装置的使用说明书进行检查。

(2) RNA 样品不好

原因	对策
样品纯度低	样品中的杂质可能是产生误差的原因。请使用纯度高的样品。另外，样品中的基因组 DNA 的残留，会导致检测到基因 DNA 来源的扩增产物。这种情况下，请参考「[4]使用方法 1. 引物及 TaqMan® probe 的设计方法与性能的确证」，重新设计引物及 TaqMan® probe。此外，请将样品用 DNase I 处理，除去基因组 DNA。
样品的吸附	有可能 RNA 样品被微量管吸附。请使用低吸附管，重新制备 RNA。
模板 RNA 的拷贝数过少或过多	请制备模板 RNA 的 3 个梯度以上的稀释系列，制作标准曲线，在标准曲线的直线区域进行定量。

(3) 循环条件设定及引物・TaqMan® probe 浓度的不合适

原因	对策
延伸(退火)温度・时间不合适	请按「[8]Trouble Shooting 1. PCR 效率低、检测灵敏度低、检测结果散乱(3) 循环条件设定及引物・TaqMan® Probe 浓度不合适」同样的操作进行实验。
引物・TaqMan® Probe 浓度不合适	
引物・TaqMan® Probe 的设计有问题	

(4) 反应液量不合适

原因	对策
试剂分装的误差	尽管多数的荧光定量 PCR 装置能够检测出比推荐的反应范围更少的反应液量，但有可能引起检测灵敏度及正确性降低。请提高反应范围，用推荐的反应液体积重新进行实验。

3. 阴性样品中见到信号

原因	对策
阳性样品或 PCR 产物的污染	首先，请更换阴性样品。更换后仍然发生这种情况时，请更换使用的灭菌水，引物及试剂等，再进行实验。
TaqMan® probe 的设计有问题	TaqMan® probe 有可能发生非特异性的结合。通过重新设计 TaqMan® probe，有时可以得到改善。

[9] 相关产品

通过简单地相关性分析的 One-Step Realtime PCR 用试剂

产品名称	内容	Code No.
One-step Realtime PCR 用 MasterMix (SYBR [®] Green 分析用) <i>RNA-direct</i> [™] SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix	0.5ml×5 支	QRT-201

RNA 制备相关试剂

产品名称	内容	Code No.
使用磁珠法的简便病毒 RNA 纯化试剂盒 MagExtractor[™] -Viral RNA-	100 次用	NPK-401F
使用磁珠法的简便病毒 Total RNA 纯化试剂盒 MagExtractor[™] -RNA-	100 次用	NPK-201F
使磁珠法纯化更易于操作的专用磁力架 Magical Trapper	1 个	MGS-101

[销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 楼 AL

邮编：200122

订购 • 技术相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

[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