

THUNDERBIRD® Next
Probe qPCR Mix

(Code No. QPX-101, QPX-101T)

使用说明书

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

—目录—

[1] 前言 · · · · ·	1
[2] 产品组成 · · · · ·	3
[3] 其他必需品 · · · · ·	4
[4] 使用方法 · · · · ·	6
[5] 研究最佳反应条件的方法 · · · · ·	11
[6] 相关方案：从 RNA 样品中合成 cDNA · · · · ·	14
[7] 常见问题 · · · · ·	17
[8] 相关产品 · · · · ·	20

—注意—

本试剂盒中包含的所有试剂均为研究用试剂，切勿将其作为诊断或临床用试剂使用。在使用本试剂盒时，请严格遵守实验室一般注意事项，安全操作。

※本文件中提及的公司名称、产品名称和标识均为各公司的商号、商标或注册商标。

[1] 前言

THUNDERBIRD® Next Probe qPCR 混合液是一种 2× 浓度的预混合试剂，用于与各种检测系统（如序列特异性荧光标记探针，如 TaqMan® 探针和荧光标记引物，ROX（不含）、探针和引物除外）进行 Realtime PCR。除 ROX（可选）、探针和引物外，预混合成分可简化反应溶液的制备，最大程度地减少样品间荧光强度的差异，从而获得高度可重复性的结果。该产品在传统 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix（Code No. QPS-101）的基础上进行了进一步改进，从而优化了多重检测和粗样本检测。它还与快速 PCR 循环兼容。

◆本试剂盒的特点◆

- 1. 高特异性** 成分优化提高了 PCR 的特异性。非特异性反应的减少提高了检测低浓度目标的可靠性。
- 2. 对不同目标进行统一检测** 采用新型增强剂。最大限度地减少不同目标 PCR 效率的差异。
- 3. 检测范围广** 高效的特异性扩增允许在很宽的测量范围内进行分析。
- 4. 可同时检测多个目标** 通过使用不同检测波长的 TaqMan® 探针，可以同时检测多个目标基因。可在同一反应中检测对照基因和目标基因，从而实现快速、简单和高度准确的基因定量。
- 5. 提高抑制物耐受性** 它避免了因血液蛋白等 PCR 抑制剂而导致的灵敏度降低。
- 6. 快速 PCR 循环** 即使反应周期很短，高扩增效率也能实现高效扩增。
- 7. 快速热启动** 该系统采用抗 DNA 聚合酶抗体热启动系统。抗体在加热后会迅速失活，因此初始变性时间可以设置得很短。
- 8. 使用 dUTP** 该产品的成分中含有 dUTP；添加了 Uracil-N-Glycosylase (UNG)* 可防止因携带污染而产生假阳性。*本产品不含 UNG。可使用 Uracil-DNA Glycosylase (UNG)，耐热型（Code No.UNG-101），需单独购买。
- 9. 适配各种仪器** 它既适用于标准块式仪器，也适用于使用玻璃毛细管的高速循环仪。50× ROX 参比染料单独提供，因此也可用于使用被动参比的仪器（Applied Biosystems 仪器、Agilent Technologies 仪器等），并可根据各型号的特点选择最佳 ROX 浓度。

[2] 产品组成

本试剂盒包含以下试剂。

试剂名称	保存	QPX-101 (500 次/20 μ L 反应)	QPX-101T (100 次/20 μ L 反应)
THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix	-20°C (或在 2-8°C 条件下 3 个月内)	1.67mL×3 支	1mL×1 支
50× ROX reference dye	-20°C (或在 2~8°C 条件下) 避光保存	250 μ L	50 μ L

*QPX-101 X5 是一套五个 QPX-101。

THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix

2× 预混合溶液，含反应缓冲液、dATP、dCTP、dGTP、dUTP、Mg²⁺、DNA 聚合酶和抗 DNA 聚合酶抗体。加入模板 DNA (如 cDNA、基因组 DNA、病毒 DNA、质粒 DNA) 和引物/探针溶液，用无菌水调至 1× 浓度。不包括 ROX (被动参比染料)

运抵后，将产品冷冻在 -20°C 下保存。使用时，解冻后用 Vortex 等充分搅拌，使溶液完全均化后再使用。之后，溶液可在 2-8°C 下冷藏长达三个月。如果较长时间内不使用，可再次在 -20°C 条件下冷冻保存。反复冻融大约 10 次后，依然对产品质量没有影响。

50×ROX reference dye

在使用被动参比校正孔间荧光强度和分装误差的仪器 (如 Applied Biosystems 仪器) 上进行反应时添加。最佳添加量取决于仪器。有关主要仪器的添加量信息，请参见 [4] 使用方法。对于不使用被动参比进行校正的仪器，无需添加本产品。

请在 -20°C 或 2-8°C 避光条件下保存。如果长期不用，可冷冻保存在 -20°C 下。

* 如果经常使用相同浓度的 ROX reference dye，可事先将 ROX reference dye 与 THUNDERBIRD®Next Probe qPCR Mix 混合并储存。混合后，轻轻倒置混合，并按照上述 THUNDERBIRD®Next Probe qPCR Mix 的储存条件进行储存 (为防止 ROX 荧光衰减，混合后请储存在避光容器中)。混合比例如下：ROX 浓度参见 [4] 使用方法。

使用 1 x 浓度的 ROX 时

qPCR 混合液：50 x ROX = 1.67mL : 66.8 μ L (QPX-101) 或 1mL : 40 μ L (QPX-101T)

使用 0.1x 浓度的 ROX 时

qPCR 混合液：50 x ROX = 1.67mL : 6.7 μ L (QPX-101) 或 1mL : 4 μ L (QPX-101T)

[3] 其他必需品

除了本试剂盒外，还需要准备以下仪器和试剂：

(1) Realtime PCR 装置

本产品可与各种类型的 Realtime PCR 仪器配合使用，包括常用机型、高速机型和玻璃毛细管式。使用本产品时，请遵循相应仪器的使用说明书。

(2) 引物

准备一组与目标基因序列相对应的引物。引物设计对于获得高灵敏的定量数据非常重要。设计引物时的一般注意事项如下。

- 引物长度应为 20-30 mer，GC含量应为40-60%。
- 扩增区的长度应设定在200 bp以下，如果可能，应设定在80-150 bp。如果太长，扩增效率可能会降低。
- 检测 cDNA 时，扩增区应尽可能跨内含子。这样可以防止基因组 DNA 源的扩增。
- 引物的溶解温度 (Tm) 应设定在60-65°C左右。不过，溶解温度只是一个粗略的参考值，因为计算方法不同，数值也可能不同。

引物的纯化纯度对反应特异性也有很大影响。一般来说，纯度低的引物，质量差异较大，更容易发生非特异性反应。在可能的情况下，应使用HPLC纯化的引物，或至少使用滤芯 (OPC) 纯化或更高纯度的引物。

(3) 荧光探针。

制备与目的基因序列相对应的荧光探针。探针序列的设计应遵循各种探针的设计指南。

如果探针未充分纯化，剩余未结合的荧光染料可能会抑制扩增检测。如有可能，请使用纯化等级高于 HPLC 纯化的探针。

(4) 模板 DNA

本产品可使用多种类型的 DNA 作为模板 DNA，包括 cDNA、基因组 DNA、质粒 DNA 和病毒 DNA。

(a) cDNA。

使用一般反转录反应试剂等合成的 cDNA 溶液可酌情用无菌水等稀释，无需纯化，直接加入 Realtime PCR 反应液中。

最大添加量为反应液体积的 10%。加入高浓度的试剂会明显改变 PCR 反应缓冲液的成分，导致定量降低。对于某些并非设计用于 Realtime PCR 的反转录反应试剂，其添加量可能低于

10%。

我们用于 Realtime PCR 的 cDNA 合成试剂盒 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 (Code No.FSQ-301) 的成分可减少 Realtime PCR 中的反应抑制，添加量最多可达反应体积的 20%。

(b) 基因组 DNA 和病毒 DNA

基因组 DNA 和病毒 DNA 也可用作模板。每 50 μL 反应的最大添加量应为 200 ng。

(c) 质粒 DNA。

质粒 DNA 也可用作模板。不过，如果使用环状 DNA，扩增效率可能会降低，也可能无法反映正确的拷贝数，因此请使用经内切酶切断后的直链 DNA。

当使用纯化的质粒 DNA 溶液作为模板时，目标序列的拷贝数相对于 DNA 的总含量会非常高，因此应减少反应溶液中的添加量。在这种情况下，溶液中的 DNA 浓度会变得极低，DNA 很容易因吸附在容器上而流失，从而导致 Realtime PCR 在低浓度范围内的线性度和重现性大大降低。在稀释过程中，可将不参与反应的核酸（如 yeast RNA 等）作为载体混入稀释液中，从而提高低浓度范围内的线性度。

质粒 DNA 的拷贝数可根据下列公式进行计算：

$$1\mu\text{g 质粒 DNA 拷贝数} = 9.1 \times 10^{11} / \text{质粒 DNA 的大小(kb)}$$

(5) Uracil-N-Glycosylase (UNG) [可选]。

可使用 Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile (Code No.UNG-101)，需单独购买。

[4] 使用方法

(1) 配制反应溶液

以下是使用 TaqMan® Probe 制备 50 μL 和 20 μL 反应溶液的示例。根据所用热循环仪的特性增减反应溶液的体积。

使用其他荧光探针时，请查阅经销商提供的信息。

选项	在同时检测多个目标物时，也可采用相同的条件，但在检测前应先检查引物、TaqMan® 探针组和所选报告染料的性能。		
试剂	20μL 反应	50μL 反应	终浓度

灭菌水	X μ L	X μ L	
THUNDERBIRD®	10 μ L	25 μ L	1×
Next Probe qPCR Mix			
Forward Primer	6pmol	15pmol	0.3 μ M*1
Reverse Primer	6pmol	15pmol	0.3 μ M*1
TaqMan® probe	4pmol	10pmol	0.2 μ M*2
50×ROX Reference dye	0.4 /0.04 μ L*3	1/0.1 μ L*3	1×/0.1×*3
(Uracil-N-Glycosylase)	0.4unit*4	1unit*4	
DNA 溶液	Y μ L	Y μ L	
合计溶液	20 μ L	50 μ L	

*1 同时检测多个目标物时，使用相同的浓度。

*2 如果在 0.2 μ M 浓度下无法获得良好结果，请参阅"[6] 如何考虑最佳反应条件"。同时检测多个目标物时，请使用相同的浓度。

*3 在 Applied Biosystems 和 Agilent Technologies 等仪器中，被动参比用于孔与孔之间的荧光强度和点样误差校正。在这些仪器上进行反应时，请使用 ROX Reference Dye。最佳添加量请参考表 1。不进行校正的仪器则无需添加。

*4 在进行 Uracil-N-Glycosylase 处理时，请使用热敏性 (Heat-labile) UNG。

可使用 Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile (UNG-101)*需单独购买。

表 1: 常见仪器的最佳 ROX Reference Dye 浓度

仪器	最终浓度 (添加量)
Applied Biosystems®7000 、 7300 、 7700 、 7900HT、 StepOne™、 StepOnePlus™ 等	1×(1/50 量)
Applied Biosystems®7500 、 7500Fast 、 QuantStudio™、 Agilent Technologies 仪器等	0.1×(1/500 量)
Roche 仪器、 Bio-Rad 仪器、 Qiagen 仪器等。	不要

(2) PCR 循环条件设置

建议使用以下条件 (1) 快速循环, (2) 普通循环; Data Collection 应设置为延伸 (退火) 步骤; 如果 PCR 效率较低, 请参阅"[6] 如何考虑最佳反应条件"。同时检测多个目标时, 还应使用以下推荐条件。

① 高速循环

步骤		温度	时间	升降速度
(UNG 反应)		(20 ~ 25°C* ¹)	(10 分* ¹)	(最大)
初期变性		95°C	20 秒	最大
PCR	变性	95°C	5 秒	最大
(40 ~ 45cycles)* ²	延伸 (退火)	60°C	10 秒	最大

② 常规循环

步骤		温度	时间	升降速度
(UNG 反应)		(20 ~ 25°C* ¹)	(10 分* ¹)	(最大)
初期变性		95°C	20 秒	最大
PCR	变性	95°C	5 秒	最大
(40 ~ 45cycles)* ²	延伸 (退火)	60°C	30 秒	最大

*1 用于 UNG 处理 (可选: 本产品不含 UNG。Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile (Code No. UNG-101), 需单独购买)。在初始变性之前, 设置 UNG 反应步骤。上表为常规温度条件和反应时间, 请根据各公司的试剂建议条件进行调整。

*2 循环次数建议为 40 个循环, 如果扩增不充分, 可增至 45 个循环。

(2)-1.Applied Biosystems® StepOnePlus™ 循环条件设置示例

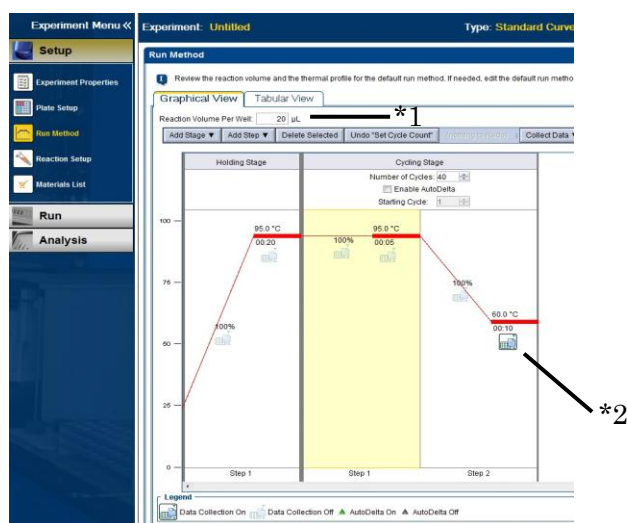
以下是 Applied Biosystems 仪器（如 Applied Biosystems® StepOnePlus™）的循环条件设置示例。详情请参阅相应的使用说明书。（常规型号，软件版本 2.3）

Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR 系统（常规型号，软件版本 2.0.6）、QuantStudio® Real-Time PCR System 等也有类似的设置方法。请参考。

- (1) 启动软件。
- (2) 选择 Design Wizard、Advanced Setup 或 QuickStart。
- (3) 选择下表中的选项卡，并选择【Reagents】下的【TaqMan® Reagents】。

Design Wizard 情况下	Method & Materials
Advanced Setup 情况下	Setup → Experiment Properties
QuickStart 情况下	Experiment Properties

- (4) 选择 Run Methods 并在 Reaction Volume Per Well（每孔反应体积）中输入反应液体积。
- (5) 选择 Holding Stage，改为 95°C 20 秒。
- (6) 选择 Cycling Stage，改为 95°C 5 秒、60°C 10 秒和 40 个循环。
- (7) 放置平板或试管并启动程序。



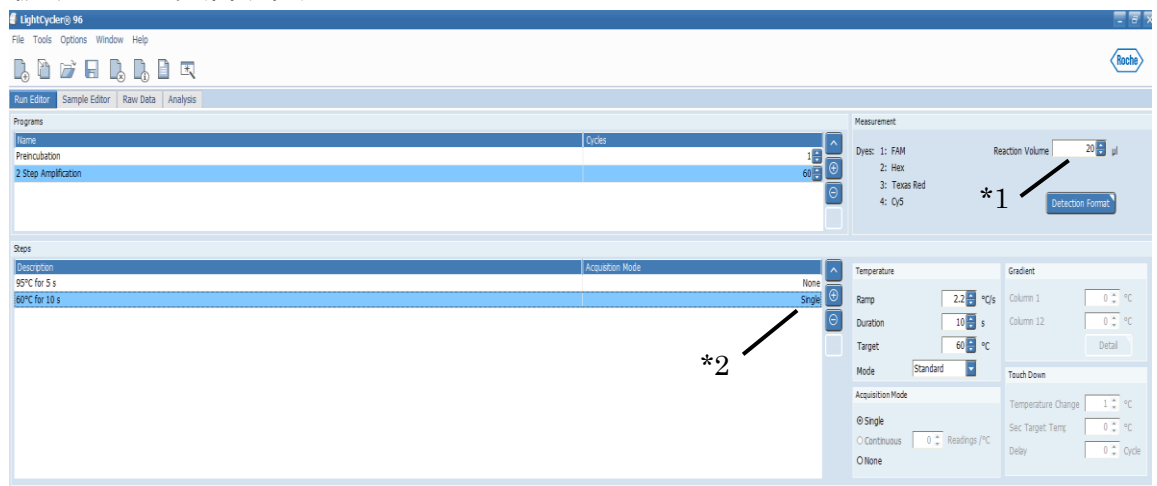
*1 请务必在 Reaction Volume (µl) 字段中输入正确的反应体积。

*2 设置延伸（退火）反应期间的数据采集点。由于仪器或控制软件的规格问题，可能无法将时间设置为 25 秒或更短，因此请查看说明书并相应设置时间（例如，QuantStudio® 5 的 96 孔默认设置为 25 秒或更长，Applied Biosystems® 7000/7300 为 31 秒或更长，Applied Biosystems® 7000/7300 为 75 秒或更长）。

(2)-2.LightCycler®96 循环条件设置示例

以下是 Roche LightCycler®96 循环条件设置示例。详情请参阅相应的使用说明书。(软件版本 1.1)

- (1) 启动软件并选择 Create New Experiment.
- (2) 在 Reaction Volume 中输入反应液体积。
- (3) 打开 Run Editor 选项卡, 在 Predefined Programs 中选择 Preincubation 和 2 Step Amplification。选择 "+"号可添加 Preincubation。
- (4) 选择 Preincubation 并更改为 Target 95°C 和 Duration 20 秒。
- (5) 选择 2 Step Amplification 并更改为 Target 95°C, Duration 5 秒, Target 60°C, Duration 10 秒。
- (6) 放置平板或试管后, 启动程序。



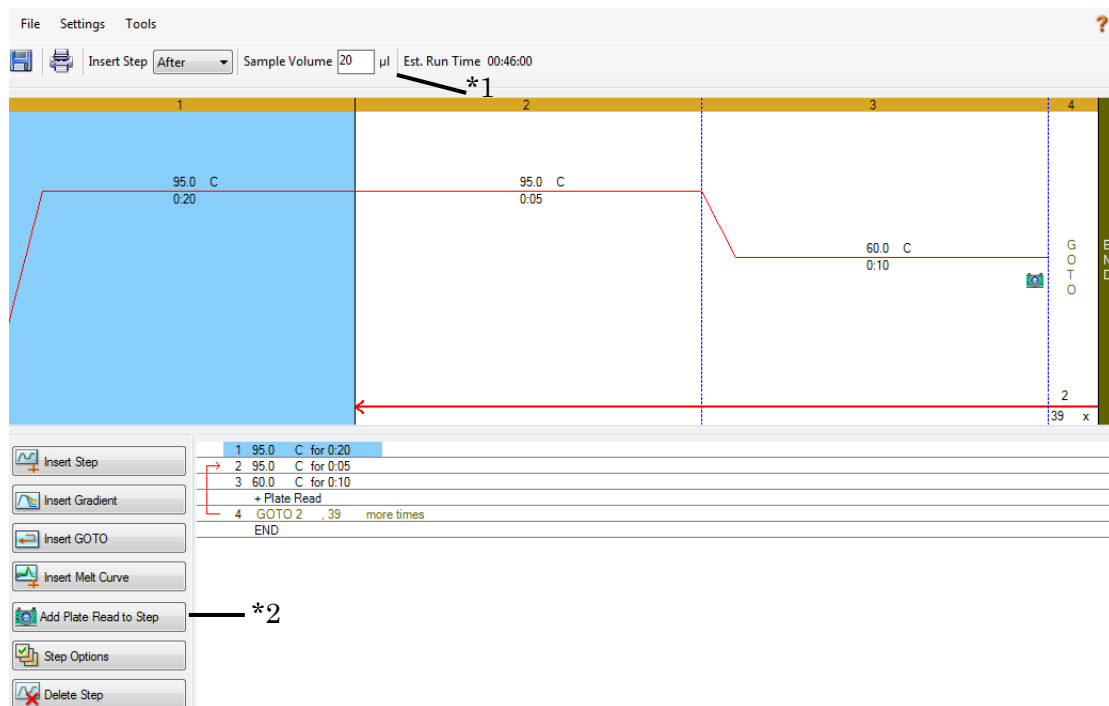
*1 务必在 Reaction Volume (µl)中输入正确的反应体积。

*2 设置延伸（退火）反应期间的数据采集点。

(2)-3. CFX96 Touch™ Deep Well 中设置循环条件示例

以下是 Bio-Rad CFX96 Touch™ Deep Well 中使用的循环条件设置示例。有关详细信息，请参阅相应的使用说明书。（软件版本 3.1）

- (1) 启动软件并选择 User-defined（用户定义）。
- (2) 选择 Create New... 并在 Sample Volume 中输入反应液体积。
- (3) 将每个过程改为 95°C 20 秒、95°C 5 秒、60°C 10 秒和 40 个循环。
- (4) 放置平板或试管并启动程序。



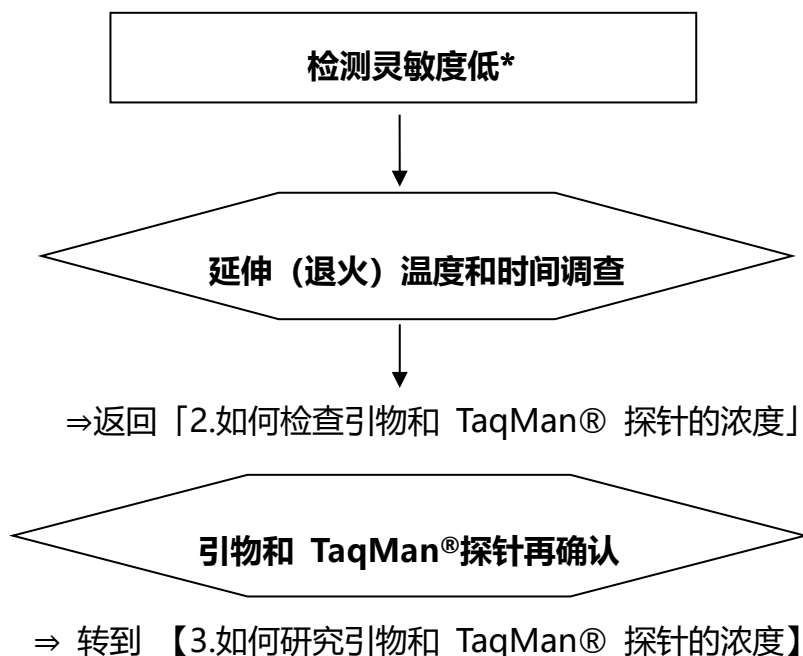
*1 务必在 Sample Volume (µL) 中输入正确的反应体积。

*2 设置延伸（退火）反应期间的数据采集点。

[5] 如何检查最佳反应条件

1. 条件探讨流程

如果在"[4] 使用方法 (2) PCR 循环条件设置 "中描述的初始反应条件下无法获得目标灵敏度, 则必须探讨最佳反应条件。 请按以下步骤探讨反应条件。



* 检测灵敏度低的原因可能是 PCR 效率低或 TaqMan®探针的检测有问题。

由于这些可能是引物或 TaqMan®探针的设计造成的, 因此首先检查引物和 TaqMan®探针的设计是否有问题。

然后按照"[5] 如何检查最佳反应条件- 2. 如何检查引物和 TaqMan®探针的浓度", 然后按照"[5] 如何检查最佳反应条件- 3. 如何研究引物和 TaqMan® 探针的浓度"

2. 如何检查引物和 TaqMan®探针的浓度

如果引物退火不充分, 可通过降低延伸 (退火) 温度和延长延伸 (退火) 时间来提高 PCR 效率。 TaqMan®探针退火不充分也会导致检测灵敏度降低, 可采取上述相同措施加以改善。

如果降低延伸 (退火) 温度仍不能改善情况, 则可能发生了引物二聚体等非特异性扩增, 导致 PCR 效率降低。 在这种情况下, 提高延伸 (退火) 温度可提高 PCR 效率。

初期反应条件

步骤		温度	时间
初期变性		95°C	20 秒
PCR	变性	95°C	5 秒
(40cycles)* ¹	延伸 (退火)	60°C	10-30 秒



降低延伸 (退火) 温度*²

步骤		温度	时间
初期变性		95°C	20 秒
PCR	变性	95°C	5 秒
(40cycles)* ¹	延伸 (退火)	55°C ~	10-30 秒

如果有改良的趋势

无改良情况

延长延伸 (退火) 时间

步骤		温度	时间
初期变性		95°C	20 秒
PCR	变性	95°C	5 秒
(40cycles)* ¹	延伸 (退火)	55°C ~	~ 1 分

提高延伸 (退火) 温度*²

步骤		温度	时间
初期变性		95°C	20 秒
PCR	变性	95°C	5 秒
(40cycles)* ¹	延伸 (退火)	~ 65°C	10-30 秒

*1 请先尝试 40 个循环，如果扩增不充分，可增加到 45 个循环。

*2 使用 Applied Biosystems® StepOnePlus™ 的 VeriFlex™ 功能或 Bio-Rad 仪器的温度梯度功能，可同时确认多个延伸 (退火) 温度、这样可以更方便地进行研究。

3. 如何研究引物和 TaqMan® 探针的浓度

如果按照【2. 如何检查引物和 TaqMan®探针】的方法，PCR 效率及检测灵敏度依然没有改善的情况下，请确认引物·TaqMan®探针浓度。按照以下(1)和(2)的顺序进行确认。

(1) 提高引物浓度/增加 TaqMan®探针浓度。

如果引物退火不充分，可通过增加引物浓度来提高 PCR 效率。同样，如果 TaqMan®探针退火不充分，增加 TaqMan®探针的浓度也可提高检测灵敏度。

首先，将 TaqMan®探针浓度固定在 0.2 μM ，然后将引物浓度提高到 0.3 至 0.5 μM 。如果不能改善情况，则将 TaqMan®探针浓度提高到 0.2-0.4 μM 。

(2) 降低引物浓度。

如果出现引物二聚体等非特异性扩增，可通过降低引物浓度来提高 PCR 效率。

在这种情况下，将 TaqMan®探针浓度固定在 0.2 μM ，引物浓度降低到 0.2-0.3 μM 。

请注意，如果将 TaqMan®探针浓度降至 0.2 μM 以下，可能无法确保一定的荧光强度，检测灵敏度也会降低。

[6] 相关方案：从 RNA 样品合成 cDNA。

该试剂可用于使用各种反转录试剂合成的 cDNA 模板。使用专为 Realtime PCR 设计的反转录试剂可体验更高的反应灵敏度。

我们的 ReverTraAce® qPCR RT Kit (Code No.FSQ-101)、ReverTraAce® qPCR RT Master Mix (Code No.FSQ-201)、ReverTraAce® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No.FSQ-301) 是专为 Realtime PCR 而设计的高效 cDNA 合成试剂盒。

与本产品配套使用，可获得更优异的结果。本节将介绍使用 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix 或 ReverTraAce® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 进行 Realtime PCR 的 cDNA 合成方法（详情请参见试剂盒随附的使用说明书）。

●ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix(Code No. FSQ-201)

(1) RNA 变性（可选）。

将用作模板的 RNA 溶液分装实验所需用量体积，在 65°C 温育 5 分钟，然后置于冰上尽快冷却。

对于容易形成高阶结构的 RNA，该处理可提高反转录效率，因此建议首次进行实验时便探讨确认该条件。（进行此处理时，请务必加入 5×RT Master Mix 之前进行）。

(2) 制备反应液

在冰上按以下步骤制备反应液。

Nuclease-free Water	X μL
5×RT Master Mix	2 μL
RNA	约 1pg ~ 1μg
<hr/>	
Total volume	10 μL

(3) 反转录反应

轻轻搅拌反应液使其均匀，然后在以下温度下孵育。

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，具有优异的高温反应活性。通过添加这种工艺可提高反转录效率。

反应完成后，储存于 4°C 或 -20°C。进行 Realtime PCR 时、作为模板直接或稀释后加入反应溶液中。

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

(1) 混合 4×DN Master Mix 和 gDNA Remover (仅用于初次使用)

将 8.8 μL (50 分之 1 的量) 的 gDNA Remover 加入试管中 4×DN Master Mix 的总体积 (440 μL) 中，倒置混匀。含 gDNA Remover 的 4×DN Master Mix 可在 -20°C 下稳定保存至少 3 个月。

·如果 gDNA Remover 不能在短时间内用完，可根据需要混合更小体积。

(例如：4×DN Master Mix 220 μL + gDNA Remover 4.4 μL)

(2) RNA 变性 (可选)

将作为模板的 RNA 溶液按所需量进行分装，在 65°C 温育 5 分钟，然后放置于冰上进行快速冷却。

·该处理可提高易形成高阶结构的 RNA 的反转录效率，因此建议首次进行实验时便摸索确认该条件。(进行此处理时，请务必在加入 4×DN Master Mix 之前进行)。

(3) 基因组 DNA 去除反应 (DNase 反应)

在冰上配制反应溶液，步骤如下

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

轻轻搅拌使反应溶液混匀后，在 37°C 孵育 5 分钟。

*如有必要，可适当扩大反应体积。

(4) 逆转录反应

在冰上继续配制反应溶液，步骤如下。

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

轻轻搅拌反应溶液混匀后，并在以下温度下孵育

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，具有优异的高温反应活性。 通过添加这种工艺可提高反转录效率。

反应完成后，储存于 4°C 或-20°C。 进行 Realtime PCR 时、作为模板直接或稀释后加入反应溶液中。

[7] 常见问题

现象	原因	对策
线性度会受到高浓度样品反应的干扰。	样本溶液中的杂质对反应的抑制。	<p>如果样本纯度低，PCR 可能会受到杂质的抑制。</p> <p>此外，如果使用的 cDNA 是用非 Realtime PCR 专用的反转录试剂合成的，则可能会受到反转录溶液中所含物质的抑制。</p> <p>建议降低样本浓度或纯化样本。</p> <p>此外，在反转录反应中应使用专为 Realtime PCR 设计的试剂。</p>
低浓度样品反应中线性紊乱或扩增曲线荧光强度低	目标 DNA 的拷贝太少	<p>如果反应溶液中只含有几至几十个目标 DNA 拷贝，那么拷贝数的偏差可能会增大，线性度也可能会受到干扰。</p> <p>可尝试提高样本浓度。</p>
	DNA 吸附在反应管上	<p>如果所用样本中的 DNA 含量较低，或样本稀释后放置时间较长，实际模板体积可能会因 DNA 吸附在反应管中而减少。</p> <p>可提高样本浓度后。如果样本需要稀释后再进行反应，应在反应步骤开始前进行稀释。</p>
	与引物二聚体发生竞争	<p>一般来说，在使用荧光探针进行检测时，不会检测到来自目标以外的扩增产物的信号，但如果目标序列的扩增和引物二聚体的扩增同时发生，两者的竞争可能会削弱目标序列的扩增反应。</p> <p>推荐重新检查反应条件，避免发生非特异性反应。如果情况没有改善，可考虑更换引物序列。</p>

<p>稀释样本的扩增曲线存在间隔不齐或形状不均的情况</p>	<p>与非特异性反应的竞争</p>	<p>一般来说，在使用荧光探针进行检测时，不会检测到来自非目标扩增产物的信号，但如果引物序列的特异性不够，目标序列的扩增反应可能会因同时发生非目标扩增反应而被竞争削弱。</p> <p>推荐重新检查反应条件，避免发生非特异性反应。如果情况没有改善，可考虑更换引物序列。</p>
--------------------------------	-------------------	---

现象	原因	对策
PCR 效率低于 90%。 (slope < -3.6)	反应条件不合适	根据目标序列的不同，在标准反应条件下可能无法获得足够的 PCR 效率。 可确认【 [4] 使用方法- (2) PCR 循环条件设置】重新检查 PCR 反应条件。
	引物降解	由于引物降解，PCR 效率可能会大大降低。 推荐从未曾稀释的溶液中重新稀释引物或重新合成引物。
	在计算 PCR 效率时，将偏离直线的 Ct 值包括在内	如果在 PCR 效率计算中使用了偏离直线的 Ct 值，计算值的误差就会增大。 将偏离直线的 Ct 值从计算中去除，然后重新计算。
PCR 效率大于 110%。 (slope > -3.1)	在计算 PCR 效率时，将偏离直线的 Ct 值包括在内	如果在 PCR 效率计算中使用了偏离直线的 Ct 值，计算值的误差就会增大。 将偏离直线的 Ct 值从计算中去除，然后重新计算。
可重复性不佳	样本纯度低	样品纯度低可能会抑制 PCR 的进行并降低重现性。降低样品浓度并进行反应或纯化样品。
	样品稀释后放置时间过长。	稀薄的 DNA 溶液可能会因吸附在容器上而降低有效浓度。 推荐用未稀释的溶液重新稀释。 稀释的标准样本在稀释后不应保存，而应在每次反应时用未稀释的溶液制备。
	使用纯化的质粒 DNA 或 PCR 扩增产物作为模板	当使用纯化的质粒 DNA 溶液或 PCR 扩增产物作为模板时，目标序列的拷贝数相对于 DNA 的总含量极高，因此添加到反应溶液中的量必须很低。 在这种情况下，溶液中的 DNA 浓度会变得极低，这就很容易造成 DNA 因吸附在容器上等原因而损失，从而导致线性度和重现性显著下降，尤其是在低浓度范围内。 推荐稀释时，将不参与反应的核酸（如酵母 RNA）混入稀释液中，可提高低浓度范围内的线性度。

反应条件不合适	<p>如果反应条件偏离最佳值，可能会降低反应的重现性。</p> <p>可确认【[4] 使用方法-（2）PCR 循环条件设置】重新检查 PCR 反应条件。</p>
引物和探针的质量差异	<p>即使是序列完全相同的引物和探针，在不同的合成过程中也可能出现质量差异。</p> <p>推荐在合成新的引物或探针时，应与之前使用过的引物或探针进行对比实验，检查是否存在质量差异。</p>

现象	原因	对策
在 no-template control (NTC) 下可看到扩增。	污染	如果重新测试时仍出现问题，则可能是试剂或无菌水受到污染，应重新更换试剂或无菌水。
	荧光测量设置不正确 (如进行多重 PCR 时)。	在使用多个荧光探针的多重 PCR 中，如果荧光测量设置不正确，可能会错误地检测到不同染料之间串扰产生的信号。 重新检查反应系统中所有荧光染料的仪器设置。
扩增曲线中的荧光信号较弱或扩增曲线形状参差不齐	过量添加 50 x ROX reference dye	在使用被动参比的仪器中，如果加入过量的 50×ROX 参比染料，则在进行荧光体积校正时，荧光值的估计值可能会降低。 [4] 使用说明 (1) 根据反应溶液的配制，检查 50×ROX REFERENCE DYE 的添加量。
	荧光测量设置不正确	荧光染料设置不正确会导致检测不正确，请参阅仪器操作说明并重新检查设置。
	荧光探针纯度低	如果荧光探针的纯度不够，合成过程中残留的未结合荧光团可能会导致基线升高，从而使扩增产物的荧光值估计值降低。
	荧光淬灭剂的荧光强度高	如果使用 TAMRA 等荧光淬灭剂，淬灭剂发出的荧光可能会增加基线，导致对扩增产物荧光值的估计值降低。 非荧光淬灭探针可以改善这种情况。
	探头老化	探针溶液的储存问题可能会导致探针降解和基线上升。 此外，某些荧光染料会被 EDTA 降解。 请检查探针合成商推荐的储存条件。
	荧光测量时间短	对于某些仪器，如果 PCR 延长时间太短，可能无法完全完成荧光测量。 如果扩增曲线明显震颤，设置较长的延长时间 (45-60 秒) 可能会改善这种情况。
	反应液量少。	如果用小于仪器标准条件的液体体积进行反应，荧光读数的误差会增加。 用更大体积的液体进行反应。

[8] 相关产品

用于 SYBR® Green I 检测系统的 Real-time PCR 试剂。

品名	内容	Code No.
用于 SYBR® Green I 检测系统的 Real-time PCR 试剂。 THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix	1mL×1 本 (100 次份 /20 µL 反应)	QPX-201T
	1.67mL x 3 本 (500 次份 /20 µL 反应)	QPX-201

cDNA 合成试剂盒

品名	内容	Code No.
用于 Realtime PCR 的 cDNA 合成试剂盒 ReverTra Ace® qPCR RT Kit	200 次份	FSQ-101
用于 Realtime PCR 的 cDNA 合成试剂盒 预混型 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	200 次份	FSQ-201
用于 Realtime PCR 的 cDNA 合成试剂盒 预混型 (包含基因组 DNA 去除组分) ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	200 次份	FSQ-301

1 步法 Realtime PCR 相关试剂

品名	内容	Code No.
适用于各种荧光探针和引物检测系统 用于 1 步 Realtime PCR 的试剂 RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	0.5mL×5 本 (250 次份 /20 µL 反应)	QRT-101
用于 SYBR® Green I 检测系统 用于 1 步 Realtime PCR 的试剂 RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	0.5mL×5 本 (250 次份 /20 µL 反应)	QRT-201
高效率 1-step qRT-PCR Kit THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit	250 次份 /20 µL 反应	QRZ-101

用于预防 Carryover 污染造成假阳性相关试剂

品名	内容	Code No.
热敏性(Heat-labile) UNG Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile	200 U	UNG-101



<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