

# 实时荧光定量 PCR 实验解决方案

- 操作手册 -



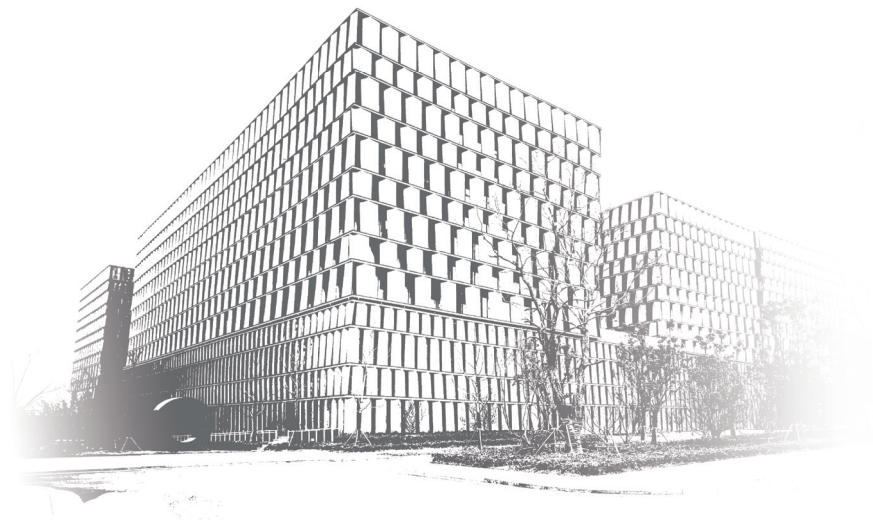
南京诺唯赞生物科技股份有限公司  
Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.

[www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)



南京诺唯赞生物科技股份有限公司 (Vazyme Biotech Co.,Ltd) 致力于酶和抗体的研发和生产，产品涵盖体外诊断、高通量测序和生命科学研究等领域。公司坐落于六朝古都南京，背靠风景秀丽的栖霞山，依托国家级南京经济技术开发区的区域辐射力，以先进的研发能力和领先的技术力量，书写全新的民族生物科技格局。

## Inno**V**ation in Enzyme Technology



# 目录

## 实时荧光定量 PCR 实验解决方案（操作手册）

### ● 实时荧光定量 PCR 总述

|                    |   |
|--------------------|---|
| 第一章：实时荧光定量 PCR 总述  | 7 |
| 一、实时荧光定量 PCR 的概念   | 7 |
| 二、实时荧光定量 PCR 的原理   | 7 |
| 三、实时荧光定量 PCR 方法的选择 | 9 |
| 四、实时荧光定量 PCR 的优势   | 9 |

### ● 实时荧光定量 PCR 操作流程及注意事项

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 第二章：实时荧光定量 PCR 操作流程及注意事项 | 11 |
| 一、RNA 模板的制备              | 11 |
| 二、逆转录反应                  | 15 |
| 三、实时荧光定量 PCR             | 17 |
| 四、FAQ                    | 19 |

### ● 实时荧光定量 PCR 应用及结果分析

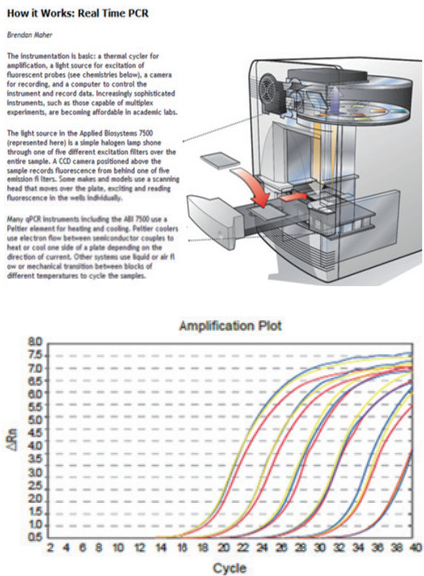
|                      |    |
|----------------------|----|
| 第三章：实时荧光定量 PCR 的应用   | 25 |
| 一、相对定量               | 25 |
| 二、绝对定量               | 26 |
| 第四章：实时荧光定量 PCR 的结果分析 | 27 |
| 一、实时荧光定量 PCR 常用名词    | 27 |
| 二、结果有效性判断            | 28 |

第一章：实时荧光定量 PCR 总述

Vazyme

一、实时荧光定量 PCR 的概念

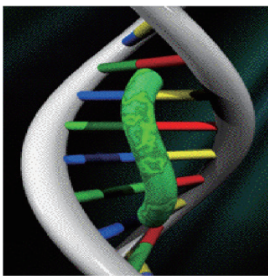
实时荧光定量 PCR 即 Real-time PCR，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过 C<sub>T</sub> 值和标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。



二、实时荧光定量 PCR 的原理

A 化学原理

变产物 DNA 分子为荧光信号，通过测定荧光值即可反映产物 DNA 分子量。



SYBR® Green



TaqMan® Probe

备忘录

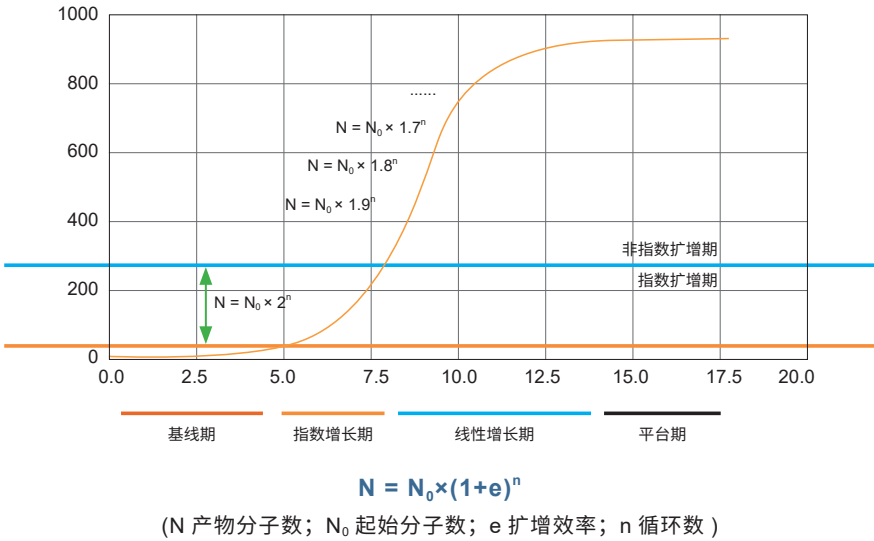
Blank lines for notes.

第一章：实时荧光定量 PCR 总述

备忘录

➔ B 数学原理

通过循环数 “n”(C<sub>T</sub> 值 ) 来计算起始 DNA 量。

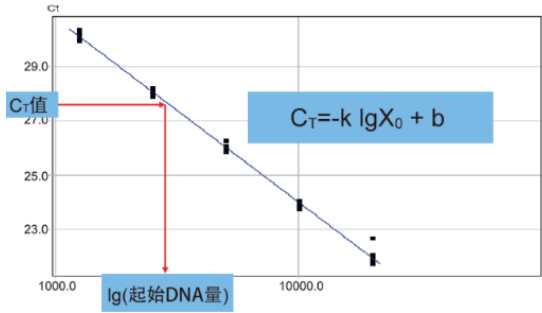


数学原理与化学原理结合：

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

第 n 次 PCR 循环时的荧光信号强度 (R<sub>n</sub>) 等于背景信号强度 (R<sub>B</sub>) 加上每个分子的荧光强度 (即单位荧光强度, R<sub>s</sub>) 与分子数目的乘积。

设  $n = C_T$ , 则:  $R_{C_T} = R_B + X_0(1+e)^{C_T} R_s$   
 $\lg(R_{C_T} - R_B) = \lg X_0 + C_T \lg(1+e) + \lg R_s$   
 $C_T \lg(1+e) = -\lg X_0 + \lg(R_{C_T} - R_B) - \lg R_s$   
$$C_T = \frac{-\lg X_0}{\lg(1+e)} + \frac{\lg(R_{C_T} - R_B) - \lg R_s}{\lg(1+e)}$$
  
即  $C_T = -K \lg X_0 + b$  (线性方程)



第一章：实时荧光定量 PCR 总述

备忘录

◆ 三、实时荧光定量 PCR 方法的选择

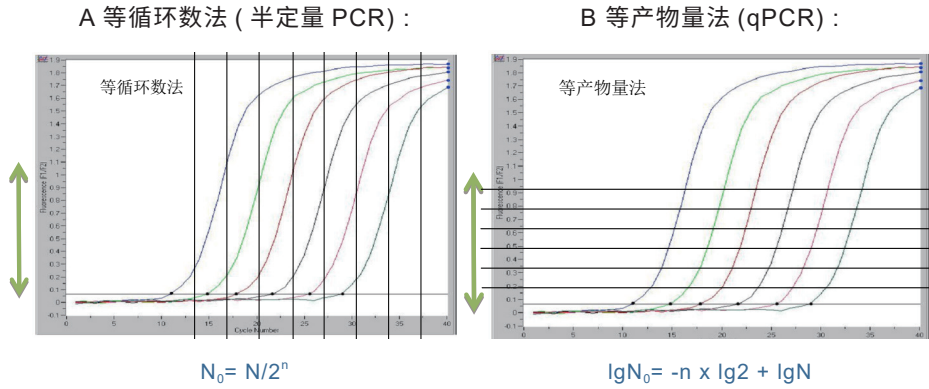
➔ SYBR® Green VS TaqMan® Probe

|    | SYBR® Green | TaqMan® Probe |
|----|-------------|---------------|
| 优点 | 价格便宜        | 特异性高          |
|    | 适用性广        | 支持多重荧光定量      |
|    | 操作方便        |               |
| 缺点 | 引物要求高       | 价格贵           |
|    | 特异性稍差       | 只适合特定目标       |
|    | 不能进行多重定量    |               |

SYBR® Green 染料法：表达量比较高时推荐使用；  
TaqMan® 探针法：表达量比较低时推荐使用。

◆ 四、实时荧光定量 PCR 的优势

➔ 比较不同样品间某基因的“量”的方法：



实时荧光定量 PCR 的优点：

- (1) 能够实时监测 PCR 反应的进程；
- (2) 具有更大的检测范围，能够对样本中的起始量进行准确定量；
- (3) 在单管中同时实现扩增和检测，无需 PCR 后处理。

# 实时荧光定量 PCR 操作流程及注意事项

## 第二章：实时荧光定量 PCR 操作流程及注意事项

- 一、RNA 模板的制备
- 二、逆转录反应
- 三、实时荧光定量 PCR
- 四、FAQ

## 第二章：实时荧光定量 PCR 操作流程及注意事项

Vazyme

### ◆ 一、RNA 模板的制备

常见的 RNA 提取的方法：传统的酚氯仿抽提法和柱式抽提法。

#### ➔ 操作流程概要

#### 酚氯仿抽提法

以 Vazyme 产品 Vezol Reagent (Vazyme #R411) 为例

##### ● 自备材料

氯仿，异丙醇，75% 乙醇 (DEPC 水配制 )，DEPC 水

##### ● 组分

| 组分            | R411   |
|---------------|--------|
| Vezol Reagent | 100 ml |

##### ● 样本制备

1 ml Vezol Reagent 能够充分裂解的最大样本量如下：

|           |                                        |
|-----------|----------------------------------------|
| 贴壁细胞      | 10 cm <sup>2</sup> 培养面积                |
| 悬浮细胞      | 5 x 10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup> 个 |
| 动物 / 植物组织 | 50-100 mg                              |

▲ 过多的样本量可能会导致样本裂解不充分，并使产物纯度降低

▲ 对于贴壁牢固的细胞可用细胞刮勺剥离细胞

##### ◇ 贴壁细胞

- 1、弃培养液，PBS 洗涤一次。
- 2、每 10 cm<sup>2</sup> 培养面积的细胞加入 1-3 ml Vezol Reagent，使之充分覆盖到细胞表面，然后用移液器将细胞吹打下来。
- 3、将裂解液转移至 1.5 ml 离心管中，用移液器反复吹打直至无明显颗粒样存在。冰上静置 5 min。

##### ◇ 悬浮细胞

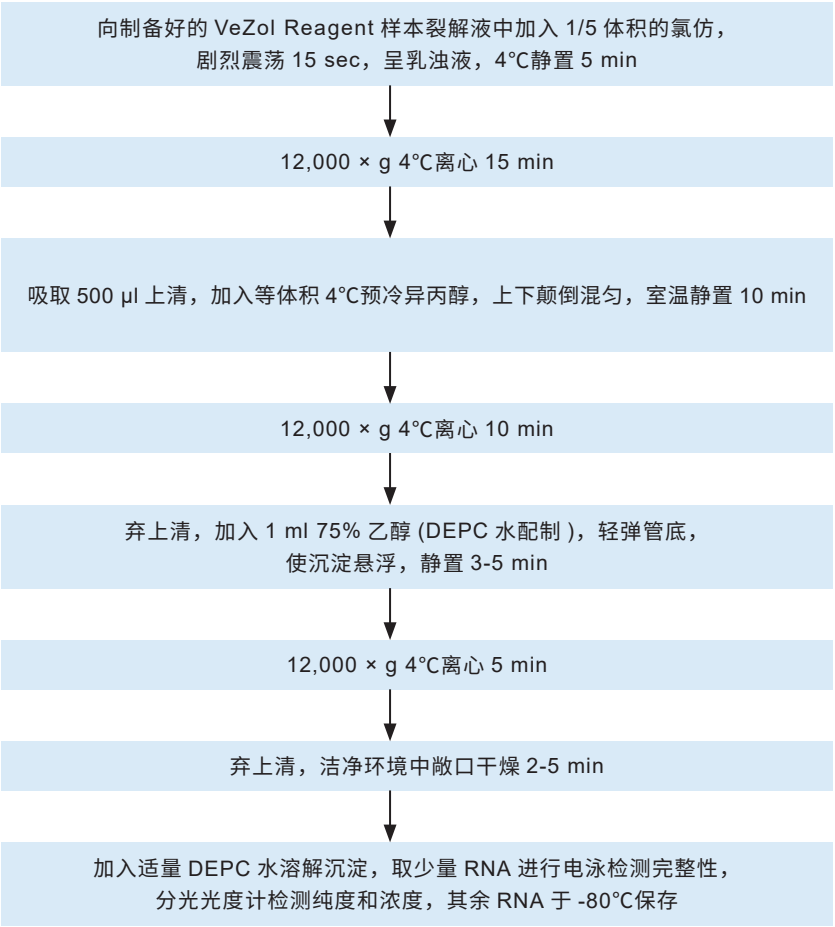
- 1、离心收集细胞，PBS 洗涤一次。
- 2、每 5 x 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> 个细胞加入 1 ml Vezol Reagent。
- 3、用移液器反复吹打至充分裂解。室温静置 5 min。

◇动物 / 植物组织

- 液氮研磨：
- 1、将液氮研磨的粉末立即转移至离心管中，每 50 - 100 mg 组织中加入 1 ml VeZol Reagent，涡旋振荡直至无明显团块，室温静置 5 min。
  - 2、将裂解液转移至离心管中，12,000 × g 4℃离心 5 min，吸取上清。

- 匀浆处理：
- 1、取新鲜组织，每 50 - 100 mg 组织中加入 1 ml VeZol Reagent，用玻璃匀浆器、电动匀浆器等进行匀浆，直至无明显组织块，室温静置 5 min。
  - 2、将裂解液转移至离心管中，12,000 × g 4℃离心 5 min，吸取上清。

● 提取流程



▲ 研磨不彻底会影响 RNA 的得率和质量

▲ 加入氯仿后，需在振荡仪剧烈震荡 15 sec，混匀是否均匀直接决定后续分层效果

▲ 此步必须低温离心，否则产物会有少量基因组污染

▲ 此时溶液分为三层，RNA 存在于上层水相，如用 1 ml RNA isolater 提取，上层水相约为 600 µl。建议吸取上层水相 400-500 µl，以防吸到中间层导致产物被基因组污染

▲ 此步通常可见管底有白色沉淀

▲ 为减少乙醇残留，应尽可能的将上清液弃干净。建议弃去大部分上清后，短暂离心将所有液体甩至管底，再用移液器将剩余液体吸掉。

▲ 沉淀不可过分干燥，否则会导致 RNA 难以溶解

柱式抽提法

以 Vazyme 产品 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2(Vazyme #RC112) 为例

● 自备材料

无水乙醇、50% 乙醇、1.5 ml RNase-free 离心管、RNase-free 枪头等。

● 组分

| 组分                                                                | RC112-01<br>(50 rxns) |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Buffer RL                                                         | 35 ml                 |
| Buffer RW1                                                        | 45 ml                 |
| Buffer RW2                                                        | 20 ml                 |
| RNase-free ddH2O                                                  | 10 ml                 |
| FastPure gDNA-Filter Columns III (each in a 2 ml Collection Tube) | 50 个                  |
| FastPure RNA Columns III (each in a 2 ml Collection Tube)         | 50 个                  |
| RNase-free Collection Tubes 1.5 ml                                | 50 个                  |

Buffer RL：提供动物组织和细胞裂解所需的环境；

Buffer RW1：去除蛋白质、DNA 等杂质；

Buffer RW2：去除盐离子残留；

RNase-free ddH2O：洗脱总 RNA；

FastPure gDNA-Filter Columns III：吸附 DNA，去除裂解杂质；

FastPure RNA Columns III：特异性吸附 RNA；

Collection Tubes 2 ml：收集滤液；

RNase-free Collection Tubes 1.5 ml：收集 RNA。

● 样本制备

◇动物组织

匀浆处理：

取新鲜组织，每 10 - 20 mg 加入 500 µl Buffer RL( 肝组织用 350 µl Buffer RL)，用玻璃匀浆器或者电动匀浆器进行匀浆，直至无明显组织块即可。

液氮研磨：将液氮研磨好的粉末立即转移到 Buffer RL 中，按每 10 - 20 mg 加入 500 µl Buffer RL( 肝组织用 350 µl Buffer RL)，涡旋震荡直至无明显粉末团即可。

▲ 冰上进行匀浆，防止局部温度瞬时升高导致 RNA 降解。

▲ 匀浆完或者液氮研磨后的样本，若不立即提取，可置于 -85 ~ -65℃保存。



2. 配制逆转录反应体系

在第 1 步的反应管中直接加入 4 × HiScript IV qRT SuperMix

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| 4 × HiScript IV qRT SuperMix | 5 μl  |
| 第 1 步的反应液                    | 15 μl |

用移液器轻轻吹打混匀。

▲ 4 × HiScript IV qRT SuperMix 含有高浓度的甘油，在使用前请短暂离心，并用移液枪轻轻吸打充分混匀后，准确吸取

No RT Control 反应（可选）

No RT Control 是指不加逆转录酶的逆转录阴性对照反应，用于检验 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留。在 RNase-free 离心管中配制如下混合液

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| 4 × No RT Control Mix | 5 μl  |
| 第 1 步的反应液             | 15 μl |

用移液器轻轻吹打混匀。

▲ 4 × No RT Control Mix 含有高浓度的甘油，在使用前请短暂离心，并用移液枪轻轻吸打充分混匀后，准确吸取

3. 进行逆转录反应

|      |        |
|------|--------|
| 37°C | 15 min |
| 85°C | 5 sec  |

▲ 如果模板具有复杂二级结构或高 GC 区域，可将反应温度提高至 50°C，有助于提高产量  
▲ 产物可立即用于 qPCR 反应，或在 -20°C 保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后于 -80°C 保存。cDNA 应避免反复冻融  
▲ cDNA 产物仅适用于 qPCR 反应，不适用于克隆等下游实验为长片段 PCR 扩增。如有需要，可使用 HiScript IV 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) (Vazyme #R412) 进行操作

→ 相关产品

| 用途分类                    | 产品名称                                                    | 规格         | 货号    |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|------------|-------|
| RT-qPCR 专用预混液（可去除基因组）   | HiScript IV RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)          | 100 rxn    | R423  |
| 通用型逆转录试剂盒（可去除基因组）       | HiScript IV 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) | 50/100 rxn | R412  |
| 基因组清除与逆转录一步完成的第三代逆转录预混液 | HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR    | 100 rxn    | R333  |
| 茎环法 miRNA 专用逆转录试剂盒      | miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by stem-loop)      | 50/100 rxn | MR101 |
| 加尾法 miRNA 专用逆转录试剂盒      | miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by tailing A)      | 20/50 rxn  | MR201 |

◆ 三、实时荧光定量 PCR

→ 操作流程概要

基于 SYBR 染料法的 qPCR 反应体系

以 Vazyme 产品 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme #Q712) 为例

● 组分

| 组分                                         | Q712-02                    | Q712-03                      |
|--------------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
|                                            | (500 rxn / 20 μl reaction) | (2,500 rxn / 20 μl reaction) |
| 2 × Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix | 4 × 1.25 ml                | 5 × Q712-02                  |

● 自备材料

ddH<sub>2</sub>O、1.5 ml 离心管、qPCR 管  
冰或移动冰盒

● 操作流程（以 ABI QuantStudio 3 为测试机型）

1. 体系配置

在 qPCR 管中配制如下混合液

|                                            |            |
|--------------------------------------------|------------|
| 2 × Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix | 10.0 μl    |
| Primer1 (10 μM)                            | 0.4 μl     |
| Primer2 (10 μM)                            | 0.4 μl     |
| Template DNA/cDNA                          | x μl       |
| ddH <sub>2</sub> O                         | To 20.0 μl |

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

▲ 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 μM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度 0.1-1.0 μM 范围内调整引物浓度  
▲ qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性  
▲ 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10

2. 反应程序

|         |      |          |                      |                            |
|---------|------|----------|----------------------|----------------------------|
| Stage 1 | 预变性  | Reps: 1  | 95°C                 | 30 sec                     |
| Stage 2 | 循环反应 | Reps: 40 | 95°C<br>60°C         | 10 sec<br>30 sec           |
| Stage 3 | 融解曲线 | Reps: 1  | 95°C<br>60°C<br>95°C | 15 sec<br>60 sec<br>15 sec |

▲ 该预变性条件适合绝大多数扩增反应，如模板结构复杂，可将预变性时间延长至 3 min 以提高预变性效果  
▲ 仪器类型不同，融解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认融解曲线采集程序即可

基于 Taqman 探针法的 qPCR 反应体系

以 Vazyme 产品 AceQ® Universal U<sup>+</sup> Probe Master Mix V2 (Vazyme #Q513) 为例

组分

| 组分                                                    | Q513-02<br>(500 rxn / 20 µl reaction) | Q513-03<br>(2,500 rxn / 20 µl reaction) |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| 2 × AceQ Universal U <sup>+</sup> Probe Master Mix V2 | 4 × 1.25 ml                           | 5 × Q513-02                             |

自备材料

ddH<sub>2</sub>O、1.5 ml 离心管、qPCR 管  
冰或移动冰盒

操作流程（以 ABI StepOnePlus™ 为测试机型）

1. 体系配置

在 qPCR 管中配制如下混合液

|                                                       |            |
|-------------------------------------------------------|------------|
| 2 × AceQ Universal U <sup>+</sup> Probe Master Mix V2 | 10.0 µl    |
| Primer1 (10 µM)                                       | 0.4 µl     |
| Primer2 (10 µM)                                       | 0.4 µl     |
| TaqMan Probe (10 µM)                                  | 0.2 µl     |
| Template DNA/cDNA                                     | x µl       |
| ddH <sub>2</sub> O                                    | To 20.0 µl |

2. 反应程序

|         |      |          |      |        |
|---------|------|----------|------|--------|
| Stage 1 | 污染消化 | Reps: 1  | 37°C | 2 min  |
| Stage 2 | 预变性  | Reps: 1  | 95°C | 5 min  |
| Stage   | 循环反应 | Reps: 45 | 95°C | 10 sec |
|         |      |          | 60°C | 30 sec |

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- ▲ 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 µM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度 0.1-1.0 µM 范围内调整引物浓度
- ▲ 探针终浓度可以在 50-250 nM 之间调整，不能使用 ROX 标记的探针
- ▲ qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性
- ▲ 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10

▲ AceTaq DNA Polymerase 需要热激活处理以恢复酶活，请至少设置 PCR 反应预变性条件为 95°C 5 min。如果模板的 GC 含量较高，可将预变性时间延长至 10 min

▲ 延伸时间请根据您使用的 Real-time PCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用 ABI 7700 和 7900HT 时至少 30 sec；使用 ABI 7000 和 7300 时至少 31 sec；使用 ABI 7500 时至少 34 sec；使用 ABI StepOnePlus™ 时至少 10 sec

相关产品

| 用途分类                        | 产品名称                                              | 规格            | 货号    |
|-----------------------------|---------------------------------------------------|---------------|-------|
| 染料法蓝色通用型抗体法修饰定量专用预混液        | ChamQ Blue Universal SYBR qPCR Master Mix         | 500/2,500 rxn | Q312  |
| 染料法模板示踪型抗体法修饰定量专用预混液        | ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix                  | 500/2,500 rxn | Q411  |
| 染料法通用型化学法修饰定量专用预混液          | AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix               | 500/2,500 xn  | Q511  |
| 染料法通用型抗体法修饰定量专用预混液          | ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix              | 500/2,500 rxn | Q711  |
| 稳定检测低表达体系的染料法通用型 qPCR 专用预混液 | Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix            | 500/2,500 rxn | Q712  |
| 染料法通用型茎环法 miRNA 荧光定量专用预混液   | miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix              | 125/500 rxn   | MQ101 |
| 探针法通用型防污染体系定量专用预混液          | AceQ Universal U <sup>+</sup> Probe Master Mix V2 | 500/2,500 rxn | Q513  |
| 探针法通用型防污染体系 SNP 分型专用预混液     | ChamQ Geno-SNP Probe Master Mix                   | 500/2,500 rxn | Q811  |

四、FAQ

总 RNA 提取 - 酚氯仿抽提法

RNA 降解

- (a) 组织样本保存不当。RNA 提取时需选择新鲜组织或细胞样本，若为冻存样本，尽量避免反复冻融。样品离开活体或原来的生长环境后，样品中的内源 RNase 开始降解 RNA，降解速度与内源 RNase 的含量及温度有关。  
也可将新鲜组织充分浸泡在 RNA Keeper Tissue Stabilizer (Vazyme #R501) 中，组织可于室温存放一周，4°C 存放一个月或 -20°C /-80°C 长期保存。
- (b) 投入样本较多，导致裂解不充分。
- (c) RNA 保存时间过久，发生降解。对提取的 RNA 进行纯度和完整度检测，分管于 -80°C 长期保存或于 -20°C 短期保存，尽快使用，避免反复冻融。

提取的 RNA 有基因组污染

向裂解液中加入氯仿后，需要在低温下 (2°C -8°C ) 高速离心。

离心后，RNA 被抽提到上层的水相中，中、下层为有机相，含有氯仿。DNA 即存在于中层。氯仿在常温下会与水以一定的比例互溶，因此，常温离心会导致上层水相中也有少量基因组 DNA 污染。另外，吸取上层液体时，应非常小心，避免吸到中间层和下层。

加入异丙醇离心后未看到沉淀

RNA 含量可能较低。建议加入异丙醇后于 4°C 或 -20°C 放置 10-30 min 后再次离心。若依然看不到沉淀，弃上清时，采用吸取而非倾倒的方法，以免沉淀丢失。

总 RNA 提取 - 柱式抽提法

gDNA-Filter Columns 堵塞问题

- (a) 样品用量太多  
本试剂盒适用于提取 10-20 mg 动物组织或者 2-5×10<sup>6</sup> 个细胞，超量的组织会降低产量以及纯度，操作时应减少样本使用量。
- (b) 样品富含肌纤维  
肌肉、心脏以及皮肤等富含肌纤维，肌纤维的分子量大，会引起柱子堵塞，样本处理时采用液氮研磨方式会降低堵柱现象。
- (c) 组织研磨或者匀浆不充分  
研磨或者匀浆不充分时，碎片有可能导致柱堵塞，将裂解后的液体先进行 13,000 × g 离心 5 min，取上清再加入 gDNA-Filter Columns。

Vazyme

第二章：实时荧光定量 PCR 操作流程及注意事项

- 提取不到 RNA 或者 RNA 产量低

(a)

样本保存不当或者样本保存时间过久

样本保存不当或者保存时间过长都有可能导致 RNA 的降解，采集新鲜样本或经过液氮速冻后保存于 -70℃或液氮中的样本。

(b)

匀浆或者液氮研磨不充分

匀浆或者液氮研磨不充分，裂解不充分，导致 RNA 的释放不充分。

(c)

洗脱不充分

RNase-free ddH<sub>2</sub>O 滴加到纯化柱膜中央。纯化柱的洗脱体积为 50-200 μl，若洗脱效果不理想，可加入提前于 65℃预热的 RNase-free ddH<sub>2</sub>O，延长室温放置时间，离心后进行第二次洗脱。
- RNA 降解

纯化后的 RNA 降解与样本质量、是否被 RNase 污染、操作方式等因素有关：

(a)

样本因为没有及时保存，导致 RNA 降解

组织样本或者细胞在收集后若不及时进行后续实验，液氮速冻后于 -70℃保存。

(b)

样本反复冻融

组织样本保存时，分小块保存，避免因反复冻融导致样本降解。

(c)

电泳原因

RNA 降解现象部分因电泳过程引起，电泳前将电泳槽用 3%双氧水浸泡 20 min，之后用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 进行冲洗，电泳缓冲液用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 配置。

(d)

确保提取过程中使用的枪头和离心管均为 RNase-free。
- 下游实验结果不理想

(a)

洗脱后 RNA 中有盐离子残留

纯化柱需要进行两次 Buffer RW2 洗涤，如果两次洗涤后仍存在盐离子残留，则在加入 Buffer RW2 后，室温放置 5 min 再进行离心操作，以最大程度上去除盐离子污染。

(b)

洗脱后 RNA 有乙醇残留

确认 Buffer RW2 洗涤后，按操作说明所需的离心转速进行空管离心操作；如仍有乙醇残留，可在空管离心后室温放置 5 min，最大程度上去除残留乙醇。

第二章：实时荧光定量 PCR 操作流程及注意事项

Vazyme

- 提取的 RNA 有基因组 DNA 污染

不同种类组织细胞 DNA、RNA 含量相差较大，样本上样量请勿超过 20 mg 组织和 5×10<sup>6</sup> 细胞。如肝脏、脾脏和肾脏 DNA 含量丰富，上样量请勿超过 10 mg，否则会导致基因组残留过多。gDNA-Filter Columns 能够有效去除体系中大部分 DNA，如果下游实验对痕量 DNA 敏感，可根据具体情况选择使用以下方案：

(a)

使用试剂盒提供的 DNase I 工作液进行膜上消化清除残留 DNA，具体过程请参照实验操作流程模块。

(b)

逆转录时选择含有基因组去除模块的逆转录试剂，推荐使用 HiScript<sup>®</sup> IV RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (Vazyme #R423)。

(c)

设计引物时选用跨内含子的引物，从而避免基因组 DNA 模板参与扩增反应。
- 逆转录反应
- 逆转录试剂盒中带有 gDNA wiper Mix，可以去除残留在 RNA 中的基因组。但如果不进行基因组去除，会影响接下来的逆转录吗？

不去除基因组并不会影响逆转录实验的进行，但如果基因组残留严重而未进行去除，会影响下游荧光定量实验的准确性。

●

延长逆转录时间，是否可以提高逆转录效率？

对于一般体系，延长逆转录时间对逆转录效率并没有显著提升；对于一些 GC 含量较高或含高级结构的模板，延长逆转录时间可提升逆转录效率。
- 20
- www.vazyme.com
- 21
- www.vazyme.com

● 荧光定量 PCR

● ROX 选择表

| Vazyme qPCR仪器与参比染料对照卡   |                                                                                          |                                                                                  |                                                                                                               |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                         | ROX Reference Dye 1<br>(High ROX)<br>Q141/Q341/Q441                                      | ROX ReferenceDye 2<br>(Low ROX)<br>Q131/Q331/Q431                                | Without ROX<br>Q121/Q321/Q421                                                                                 |
| ABI/<br>Thermo/<br>life | 5700,7000,7300,<br>7700,<br>7900,7900HT,<br>7900HT Fast,<br>Step One™,<br>Step One Plus™ | 7500,<br>7500 Fast,<br>ViiA™ 7,<br>QuantStudio 3 / 5 / 6<br>Flex/7 Flex/12k Flex | PikoReal™ Cyclor                                                                                              |
| Stratagene              |                                                                                          | MX4000™,<br>MX3005P™,<br>MX3000P™,                                               |                                                                                                               |
| Bio-Rad                 |                                                                                          |                                                                                  | CFX96™,<br>CFX384™,<br>iCycler iQ™,<br>iQ™ 5,<br>MyiQ™, MiniOpticon™,<br>Opticon®,<br>Opticon 2,<br>Chromo 4™ |
| Eppendorf               |                                                                                          |                                                                                  | Mastercycler™ ep realplex,<br>realplex 2s                                                                     |
| Illumina                |                                                                                          |                                                                                  | Eco QPCR                                                                                                      |
| Cepheid                 |                                                                                          |                                                                                  | SmartCycler®                                                                                                  |
| Qiagen /<br>Corbett     |                                                                                          |                                                                                  | Rotor-Gene® Q,<br>Rotor-Gene® 3000,<br>Rotor-Gene® 6000                                                       |
| Roche                   |                                                                                          |                                                                                  | Applied Science LightCycler® 480,<br>LightCycler® 2.0<br>LightCycler® 96                                      |
| TaKaRa                  |                                                                                          |                                                                                  | Thermal Cycler Dice™ Real Time<br>System TP700,TP800,TP850,TP900,<br>TP950                                    |
| Analytikjena            |                                                                                          |                                                                                  | qTower2.0,<br>qTower2.2                                                                                       |
| 杭州博日                    |                                                                                          |                                                                                  | LineGene 9600,<br>LineGene K Plus                                                                             |

www.vazyme.com    Add: 南京市国家级经济技术开发区红枫科技产业园D2栋    Tel:400-600-9335

Sales:sales@vazyme.com    Support:support@vazyme.com    Service:service@vazyme.com

● 绝对定量标准曲线线性关系不佳

- (a) 加样误差  
加大模板稀释倍数，提高加样体积。
- (b) 标准品降解  
重新制备标准品，重复实验。
- (c) 模板浓度过高  
增加模板稀释倍数。

● 在定量时，如何判断 cDNA 投入量

首次得到的 cDNA 需要进行多个梯度稀释，将不同梯度稀释的 cDNA 进行 qPCR 定量，选取 C<sub>T</sub> 值落在 18-28，或者 15-33 范围内的扩增曲线对应的 cDNA 稀释梯度作为后续该基因的参考稀释度。(C<sub>T</sub> 值在 18-28，或者 15-33 区间范围被认为是准确的)。

● miRNA 定量时，融解曲线不特异

- (a) 引物设计问题。
- (b) 基因表达量很低，易导致扩增曲线出现杂峰。

● 如何确定基因表达量高低

如果基因扩增 C<sub>T</sub> 值超过 30，使用 PCR 产物通过梯度稀释创建标准曲线，判断该引物扩增效率，若扩增效率满足 90-120%，则可以判断该基因扩增 C<sub>T</sub> 值偏大是由于基因表达量低所致。

● 阴性对照出现明显扩增

- (a) 反应体系污染  
更换新的 Mix、水、引物重复实验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。
- (b) 扩增为引物二聚体引起  
配合融解曲线进行分析。

● C<sub>T</sub> 值出现太晚

- (a) 扩增效率极低  
优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。
- (b) 模板浓度太低  
减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- (c) 模板降解  
重新制备模板，重复实验。
- (d) PCR 产物太长  
推荐 PCR 产物长度为 80 bp-150 bp。
- (e) 体系中存在 PCR 抑制剂  
重新制备模板，重复实验。

### 第三章：实时荧光定量 PCR 的应用

**Vazyme**

## ◆ 一、相对定量

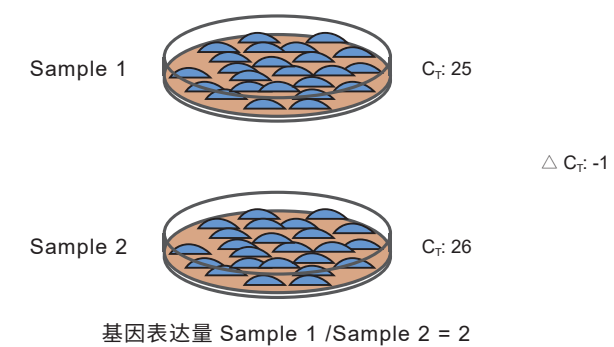
测定不同样品中基因表达量的相对值。

## → 内参基因的选择

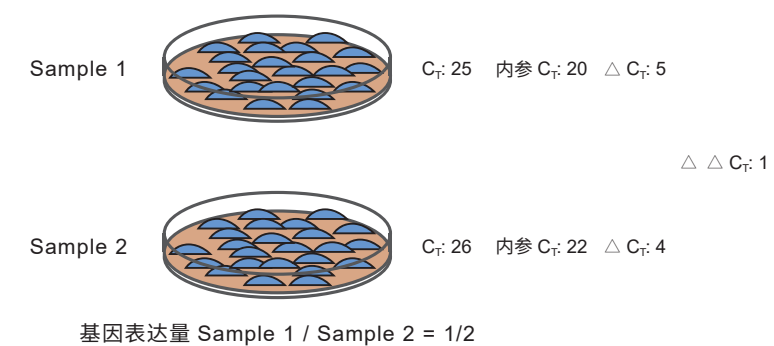
- (1) 始终选择表达充沛、均一的基因做为内参基因；
- (2) 不要盲目选择常用的内参基因；
- (3) 常用内参基因：*GAPDH*, *Actin*, *Tublin*。

**内参基因的选择至关重要，决定结果的有效性**

**例：**



加入内参基因后：



## 结果计算

公式— $2^{-\Delta\Delta C_T}$ :

处理组

对照组

$$F = 2 \cdot [(\text{处理组目的基因平均 } C_T \text{ 值} - \text{处理组内参基因平均 } C_T \text{ 值}) - (\text{对照组目的基因平均 } C_T \text{ 值} - \text{对照组内参基因平均 } C_T \text{ 值})]$$

①  $C_{T\text{目的(处理)}} - C_{T\text{内参(处理)}} = \Delta C_{T\text{处理}}$ ;  $C_{T\text{目的(对照)}} - C_{T\text{内参(对照)}} = \Delta C_{T\text{对照}}$

$$\textcircled{2} \Delta C_{T \text{ 处理}} - \Delta C_{T \text{ 对照}} = \Delta \Delta C_T$$

③ 倍数差异 =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$

## 备忘录

[illegible]

## 实时荧光定量 PCR 应用及结果分析

### 第三章：实时荧光定量 PCR 的应用

- 一、相对定量
- 二、绝对定量

## 第四章：实时荧光定量 PCR 的结果分析

- ## 一、实时荧光定量 PCR 常用名词

### 第三章：实时荧光定量 PCR 的应用

## ◆ 二、绝对定量

根据标准品，测定样品中基因表达量的绝对值(拷贝数)。

 **标准品：**具有明确拷贝数浓度的样品

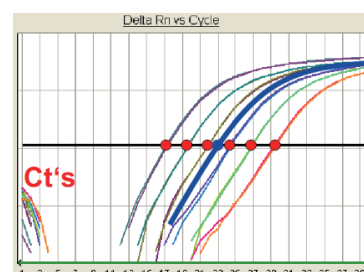
### A/ 克隆质粒

B/ PCR 产物

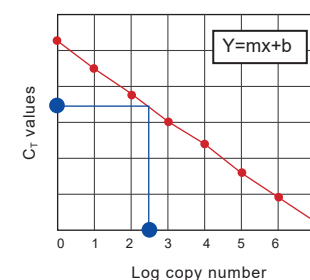
C/ cDNA ( 扩增效率测定等用途可以使用，绝对定量不能使用 )



### 标准品梯度稀释



### 标准品稀释梯度与待测样本上机测试



### 标准曲线绘制及待测样本拷贝数计算

## → 拷贝数计算

平均分子量 (MW) :

$$\text{dsDNA} = (\text{碱基数}) \times (660 \text{ 道尔顿} / \text{碱基})$$
$$\text{ssDNA} = (\text{碱基数}) \times (330 \text{ 道尔顿} / \text{碱基})$$
$$\text{ssRNA} = (\text{碱基数}) \times (340 \text{ 道尔顿} / \text{碱基})$$

拷贝数计算公式：

$$(6.02 \times 10^{23} \text{ 拷贝数 / 摩尔}) \times (\text{浓度 g/ml}) / (\text{MW g/mol}) = \text{copies/ml}$$

## 第四章：实时荧光定量 PCR 的结果分析

## ◆ 一、实时荧光定量 PCR 常用名词

校正染料 (ROX)

校正加样误差或孔与孔之间的误差，提供一个稳定的基线，极大地改进定量的精确度，提高重复管之间的数据重现性。

**注意：不同的仪器对 ROX 的需求不同。**

 **基线**

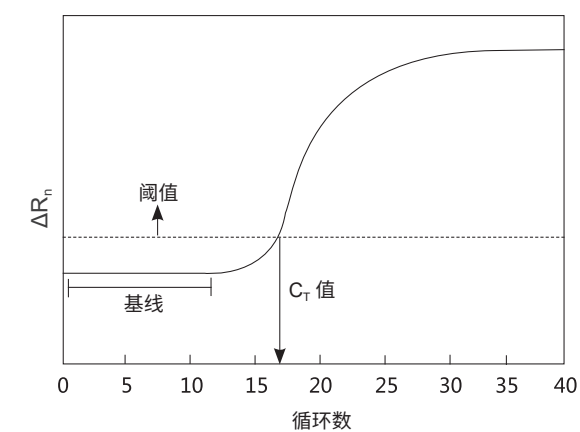
PCR 的最初几个循环, 在此基线上荧光信号几乎没有变化。

→ 閾値

可以相信的最低荧光值。

 C<sub>T</sub> 值

扩增曲线与阈值交点的横坐标。

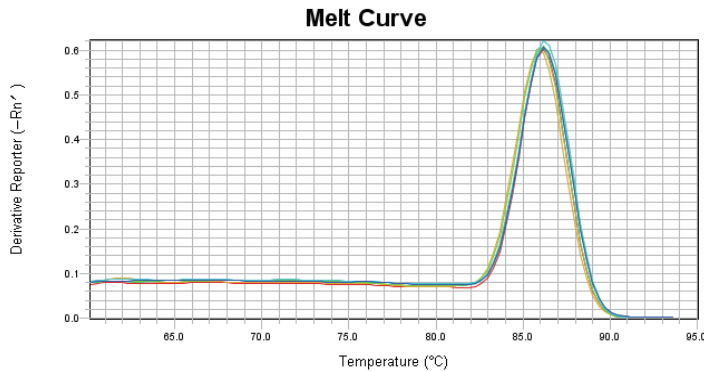


第四章：实时荧光定量 PCR 的结果分析

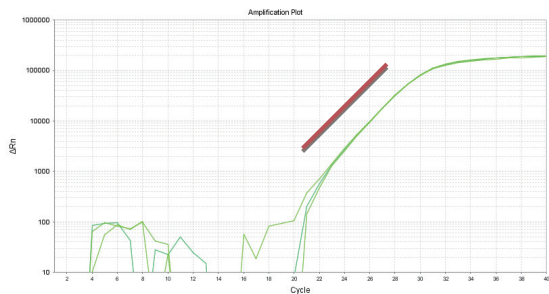
备忘录

二、结果有效性判断

➔ 融解曲线单峰（染料法）

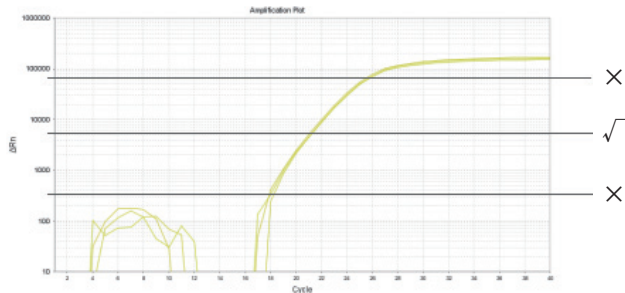


➔ 扩增曲线指数扩增区域，复孔间 C<sub>T</sub> 值 STD<0.2



➔ 阈值设置合理

阈值位于指数增长期：仪器会自动计算阈值，但并非所有情况下仪器计算结果都是合理的，必要时进行手动调整。



第四章：实时荧光定量 PCR 的结果分析

备忘录

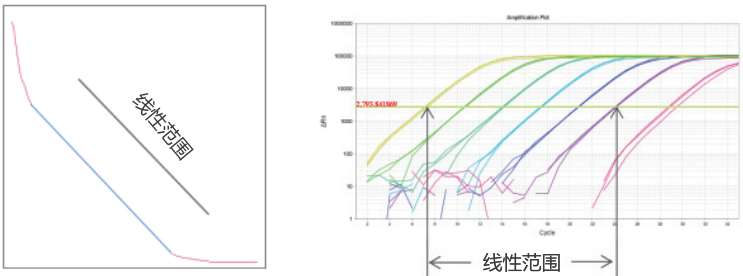
➔ NTC 确认无气溶胶污染或可以忽略

NTC = No Template Control (qPCR 反应，模板以水代替)；  
若  $\Delta C_T = NTC (C_T \text{ 值}) - \text{目的基因} (C_T \text{ 值}) \geq 3$  或  $\geq 5$ ，可认为体系中气溶胶污染不会影响到实验结果的准确性。

➔ NRT 确认无基因组残留或可以忽略

NRT=No RT Control (逆转录反应中，除逆转录酶组分，其余组分正常添加)；  
若  $\Delta C_T = NRT (C_T \text{ 值}) - \text{目的基因} (C_T \text{ 值}) \geq 3$  或  $\geq 5$ ，可认为体系中基因组残留不会影响到实验结果的准确性。

➔ 待测 C<sub>T</sub> 值于线性范围内



➔ 扩增效率符合近似计算标准

PCR 扩增效率 (e) 介于 90%-120% 之间

## Vazyme

## 备忘录

## Vazyme Online

了解更多产品和服务信息，请登录我们的网站 [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

### 南京诺唯赞生物科技股份有限公司

销售咨询: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)

电话: 400-600-9335

技术支持: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)

网址: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

技术服务: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)

地址: 江苏省南京经济技术开发区科创路红枫科技园 D2 栋

