



12-03

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix

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

使用说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

[1] 前言.....	1
[2] 本产品的组成.....	2
[3] 其他必需品.....	3
[4] 使用方法.....	5
[5] 相关 Protocol: RNA 样品的 cDNA 合成.....	13
[6] 常见问题.....	14
[7] 相关产品.....	17

【 注意 】

本产品为科研用试剂。**请勿作为诊断、临床试剂使用**。此外，对于本产品的有害性调查还不十分全面，因此，在使用时，请严格遵守实验室的一般注意事项，适当使用保护用品，安全操作。

【 保存 】

所有组分请均保存于**-20°C**条件下。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155, 5,677,152, 5,773,258, 5,407,800, 5,322,770, 5,310,652, 5,994,056, 6,171,785, and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim (such as apparatus or system claims in US Patent No. 6,814,934) and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

※LightCycler™是Idaho Technology Inc.和Roche Molecular Systems Inc.的商标。

※SYBR®是Molecular Probes Inc.的注册商标。

[1] 前言

THUNDERBIRD 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。由于该试剂将除ROX（另外添附）及引物的成分预先混合，在使反应液配制简便化的同时，还将样品间的荧光强度散乱控制在最小范围内，从而使得实验结果的可重复性大大提高。

通过改良原产品<SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (Code No.:QPK-201) 及 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- (Code No.:QPK-212)>的组分，提高了反应特异性和 PCR 效率。通过提高 PCR 效率，抑制非特异性反应、引物二聚体等的发生，可得到更广的可定量扩增区域（dynamic range）。

◆本产品特征◆

1. 高特异性 通过对组分的最优化，使得 PCR 的特异性更高。通过降低非特异性反应，使得对低拷贝目的片段的检测更加可信。
2. 对各种目的片段均可均一地检测 采用了新的增强剂，对各种目的片段 PCR 效率的波动可控制在最小范围内。
3. 更广的可定量扩增区域 由于产品的高效率、高特异性，可对更宽的测定范围进行分析。
4. 高适用性 THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix 除适用于普通及高速的模块型（Block Type）仪器外，还适用于使用玻璃毛细管（Glass Capillary Type）的高速循环仪。由于另外添附了 50× ROX Reference dye，对于使用 Passive Reference 的仪器（如 Applied Biosystems 公司制造的仪器、Agilent Technologies 公司制造的仪器），可根据各种仪器的特征把 ROX 调整到最适浓度。
5. 高速热启动 本产品采用了含抗 Taq 聚合酶抗体的热启动系统。由于通过升温能使抗体迅速失活，因此预变性的时间可以设定为很短。

<关于 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] 本产品的组成

本产品包含以下试剂。

品名及内容	保存	容量 (QPS-201)	容量 (QPS-201T)
THUNDERBIRD SYBR [®] qPCR Mix	-20°C (或2~8°C条件下3个月以内) 避光保存	5ml (1.67ml × 3)	1ml (1ml × 1)
50 × ROX reference dye	-20°C (或2~8°C) 避光保存	250 μl	50 μl

THUNDERBIRD SYBR[®] qPCR Mix

该组分是包含反应缓冲液、SYBR[®] Green I、dNTPs、Mg²⁺、rTaq DNA 聚合酶及抗 DNA 聚合酶抗体的 2 × 预混液。请添加模板 DNA (cDNA、genomic DNA、plasmid DNA 等) 和引物溶液，并用灭菌蒸馏水配制成 1 × 浓度后再使用。该溶液中不包含 ROX (Passive reference dye)。

收到产品后，请立即置于-20°C冷冻保存。初次使用时，先将其融解，然后轻轻地颠倒混合，使溶液完全均一后再使用。如果在短时期内要持续使用时，可在 2~8°C条件下冷藏保存，并在 **3 个月内使用完毕（最好在两周内使用完毕）**。融解后的产品短期内不用时，请装入原包装袋，再次于-20°C冷冻保存。经确认该产品反复冻融 10 次对品质没有影响。另外，为防止 SYBR[®] Green I 的荧光淬灭，**请务必避光保存**（请使用避光箱或产品内配有的铝箔袋）。

50 × ROX reference dye

以 Applied Biosystems 公司制造的仪器为代表，为校正各孔间的荧光强度及分注误差，在使用 Passive Reference 的仪器进行反应时，请添加 ROX。最适添加量根据仪器不同而不同。几种主要的仪器的添加量请参考[4]使用方法。不用 Passive Reference 进行校正的仪器无需添加 ROX。

请在-20°C或 2~8°C条件下避光保存。长时间不用时，请于-20°C冷冻避光保存。

※ROX reference dye 固定使用同一浓度时，也可将 50 × ROX reference dye 预先与 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 混合后保存。混合后请轻轻地颠倒混匀，然后按上述 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 的保存条件保存。混合比例如下。ROX 的浓度请参考[4]使用方法。

1 × ROX 浓度

qPCR Mix: 50 × ROX = 1.67ml: 66.8 μl (QPS-201) 或 1ml: 40 μl (QPS-201T)

0.1 × ROX 浓度

qPCR Mix: 50 × ROX = 1.67ml: 6.7 μl (QPS-201) 或 1ml: 4 μl (QPS-201T)

[3] 其他必需品

除本产品外，还需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。

Applied Biosystems	ABI PRISM 7000	●
	Applied Biosystems 7700	●
	Applied Biosystems 7300	●
	Applied Biosystems 7500	●
	Applied Biosystems 7500 Fast	●
	Applied Biosystems 7900HT	●
	Applied Biosystems Step One™	○
	Applied Biosystems Step One Plus™	○
Roche Diagnostics	LightCycler 1. x	●
	LightCycler 2.0	●
	LightCycler 480	●
Bio-Rad/MJ	iCycler iQ	●
Agilent Technologies	Mx3000P	●
	Mx3005P	●
	Mx4000	○
Takara	Thermal Cycler Dice	●
BioFlus	Line Gene	●

●：可以使用（使用过）

○：使用可能（未使用过）

(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 200bp，如可能请尽量设定在 80~150bp。过长的片段容易导致扩增效率低下，而且容易导致非特异性反应，影响定量的准确性。
- 引物设计应尽量横跨内含子，以防止基因组 DNA 的扩增而引起假阳性。
- 请尽量选择融解温度（melting temperature:T_m）为 60~65℃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℃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、纯度较低的引物荧光强度散乱，容易产生非特异性产物。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

用本产品，cDNA、genomic DNA、plasmid DNA、virus DNA 等都可作为模板使用。

(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。另外如果使用的某种市售的 cDNA 合成试剂盒不是专门针对荧光定量 PCR 而设计的，那么添加的 cDNA 体积应小于总反应体系的 10%。

※ 本公司的 Realtime PCR 用逆转录试剂盒 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，使带入到 Realtime PCR 反应体系的逆转录反应液的影响降到最小，即使在 PCR 反应体系中添加最多至 20% 的液量，也能表现出良好的反应曲线。

(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 μ l 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将其线性化后再使用。

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 μ g plasmid DNA 的拷贝数 = 9.1×10^{11} / plasmid DNA 的大小 (kb)

[4] 使用方法

(1) 反应液的配制

以下为50 μ l及20 μ 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 μ l反应体系	20 μ l反应体系	终浓度
灭菌蒸馏水	X μ l	X μ l	
THUNDERBIRD SYBR [®] qPCR Mix	25 μ l	10 μ l	1 X
Forward Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 μ M ^{*1}
Reverse Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 μ M ^{*1}
50X ROX reference dye	1 / 0.1 μ l	0.4 / 0.04 μ l	1x / 0.1x ^{*2}
DNA溶液	Y μ l	Y μ l	
合计液量	50 μl	20 μl	

*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 μ M作为设定范围的参考。

*²50X ROX reference dye，是对于使用Passive Reference的仪器（如Applied Biosystems公司制造的仪器等），为校正各孔间的荧光强度及分注误差而使用。最适添加量根据仪器不同而不同。不用Passive Reference进行校正的仪器无需添加。

表1：几种主要仪器的最适ROX reference dye浓度

仪器	终浓度（添加量）
Applied Biosystems 7000、7300、7700、7900HT、 Step One [™] 、Step One Plus [™] 等	1 X（1/50量）
Applied Biosystems 7500、7500Fast、 Agilent Technologies公司仪器（Option）等	0.1 X（1/500量）
Roche公司仪器、Bio-Rad公司仪器、BioFlux Line Gene等	不添加

※本公司原产品<SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix(Code No.:QPK-201)及SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix -Plus-(Code No.:QPK-212)>内所含的ROX相当于上述的1 X浓度。

(2) PCR 循环条件的设定

以下为使用根据推荐条件设计的引物时的标准 PCR 温度条件。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（2）-3.想改善反应效率时的 3 步法 PCR（第 12 页）。

步骤	温度	时间	升降速度
预变性	95°C	20~60秒 ^{*1}	最大
PCR (40 cycles)	变性	1~15秒 ^{*2}	最大
	延伸	60°C ^{*3} 30~60秒 ^{*4}	最大

(Data Collection请设定在延伸步骤)

融解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Analysis) ^{*5}

^{*1} 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（按表 2）设定足够的预变性时间。不知道最适时间时，请设定为 60 秒（预变性时间的延长对反应效率几乎没有任何影响）。

表2：几种主要仪器的预变性时间基准

仪器	预变性时间
Applied Biosystems公司的高速PCR仪 (Applied Biosystems 7500Fast等)	20秒
Capillary的高速PCR仪 (Roche LightCycler TM 1.x、2.0)	30秒
普通的Block Type PCR仪 (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(普通Block)、Step One TM 、Step One Plus TM 、Agilent Technologies公司仪器、BioFlux Line Gene等)	60秒

*²PCR 循环中的变性时间根据各仪器的特性按表 3 设定时间。请注意, 变性时间不充分是 PCR 效率低下的原因。不知道最适时间时, 请设定为 15 秒 (变性时间的延长对反应效率几乎没有影响)。

表3: 几种主要仪器的最适PCR循环中的变性时间基准

仪器	PCR循环中的变性时间
Applied Biosystems公司的高速PCR仪 (Applied Biosystems 7500Fast等)	3秒
Capillary的高速PCR仪 (Roche LightCycler™ 1.x、2.0)	5秒
普通的Block type PCR仪 (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(普通Block)、Step One™、Step One Plus™、Agilent Technologies公司仪器、BioFlux Line Gene等)	15秒

*³ 无法得到充分的扩增效率时, 适当降低温度; 发生非特异性反应时, 提高温度。由此可改善反应结果。请以 56°C~64°C的范围作为设定参考。

*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 (45-60 秒)。另外, 部分仪器由于硬件或控制用的软件原因, 无法设定为 30 秒, 此时请根据仪器的使用说明书, 设定最适的可设定时间 (如 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。

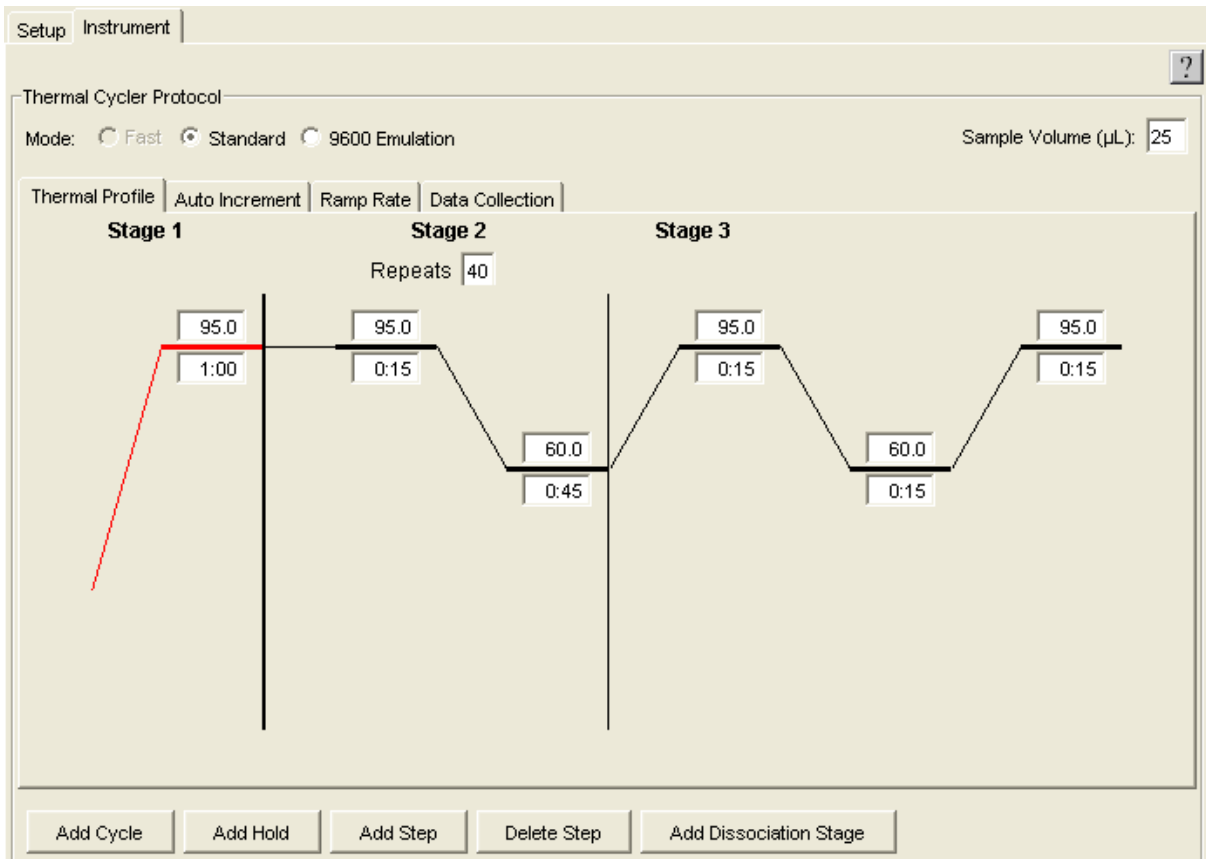
(2)-1 Applied Biosystems 7900HT 的循环条件设定例 (普通 Block Type、软件版本 2.2.2)

下例为本试剂在 Applied Biosystems 7900HT 上使用时的循环条件。

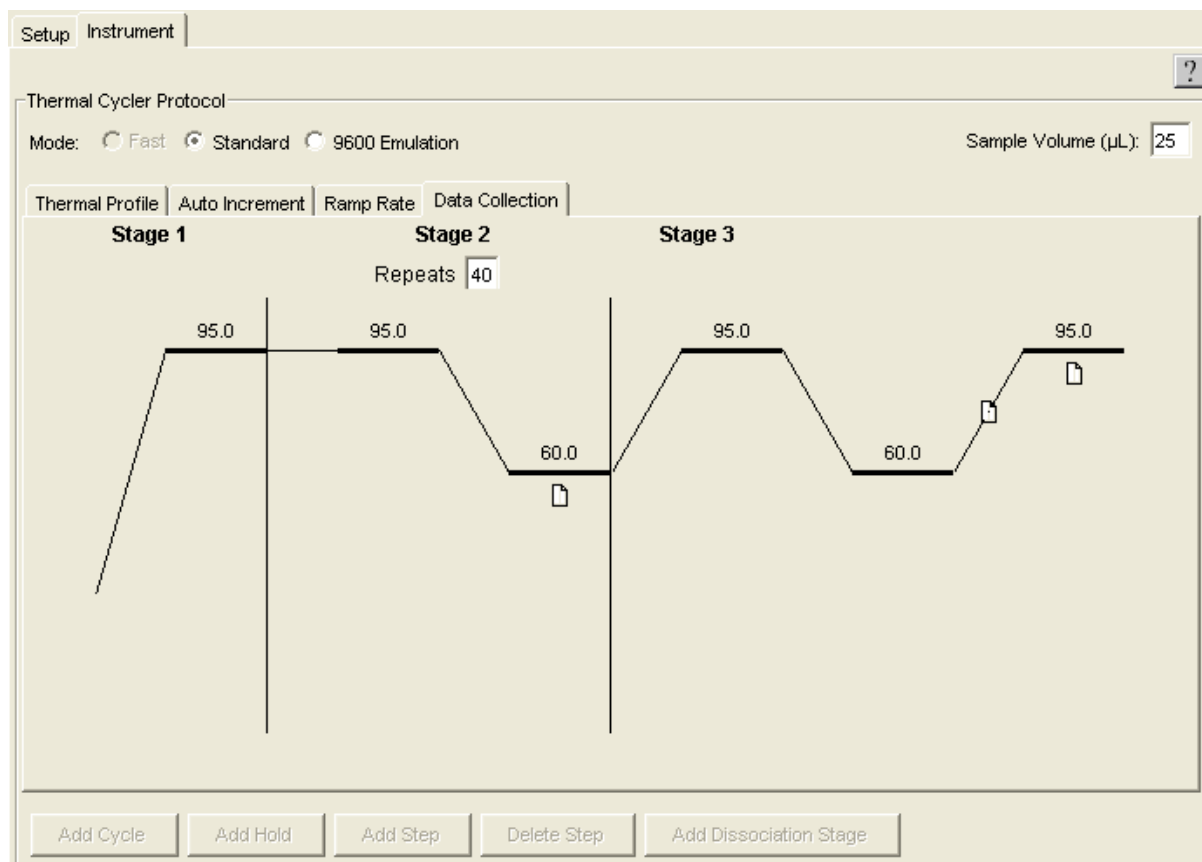
1. 启动软件，开启 Instrument 标签中的 Thermal Profile，如图设定温度条件。要进行融解曲线分析时，请按 Add Dissociation Stage，可自动追加融解曲线分析步骤。

※Sample Volume(μ l)栏请务必输入正确的反应液量。

※延伸时间如缩短到 45 秒以下，受仪器本身特性的影响，扩增曲线会呈锯齿状。



- 选中 **Data Collection** 标签，点击如下图所示的三个小图标对应的位置，以激活相应阶段的数据采集功能。

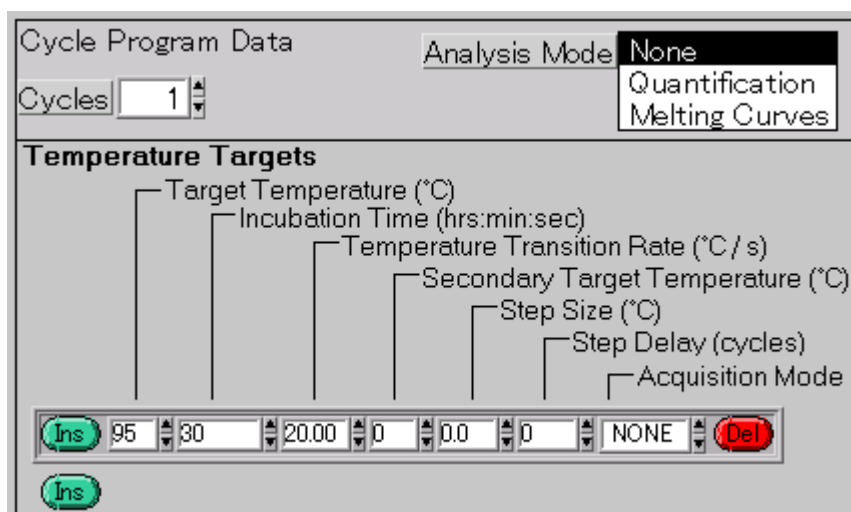


- 在正确的位置放置 PCR 板，就可以开始 PCR 反应了。

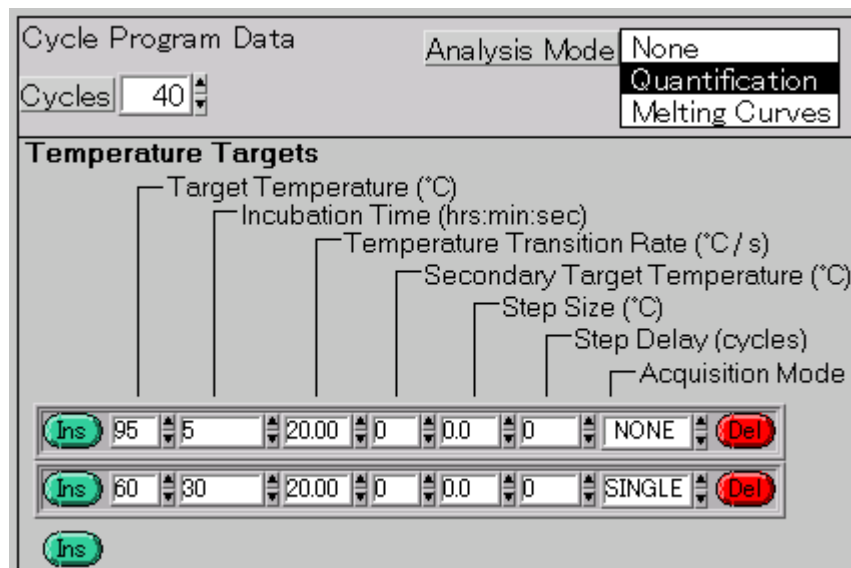
(2)-2 Roche LightCycler1.1 的循环条件设定例 (软件版本 3.5)

下例为本试剂在 Roche LightCycler1.1 上使用时的循环条件。

1. 启动软件，在各阶段输入温度条件。在预变性步骤，**Analysis Mode** 选择 **None**，温度及时间按下图输入。



2. 在接下去的 PCR 步骤，**Analysis Mode** 选择 **Quantification**，温度及时间按下图输入。延伸反应（60°C）的 **Acquisition Mode** 设定为 **SINGLE**。



3. (进行融解曲线分析时) 在融解曲线步骤, Analysis Mode 选择 Melting Curves, 温度及时间按下图输入。在最后一步 95°C 的位置, Temperature Transition Rate 设为 0.20, Acquisition Mode 设为 CONT。

Target Temperature (°C)	Incubation Time (hrs:min:sec)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Secondary Target Temperature (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	15	20.00	0	0.0	0	NONE
65	15	20.00	0	0.0	0	NONE
95	0	0.20	0	0.0	0	CONT

4. 由于反应结束后需在 chamber 内冷却, 应追加冷却步骤。Analysis Mode 选择 None, 温度及时间按下图输入。

Target Temperature (°C)	Incubation Time (hrs:min:sec)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Secondary Target Temperature (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
40	30	20.00	0	0.0	0	NONE

5. 将样品放入 Carousel, 开始反应。

(2)-3.想改善反应效率时的 3 步法 PCR。

用第 6 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_m 值低于一般值（ 60°C 以下）时。
- 目的片段较长（300bp 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°C	20~60秒 ^{*1}	最大
PCR (40 cycles)	变性	95°C	1~15秒 ^{*1}
	退火	55~65秒 ^{*2}	5~30秒 ^{*3}
	延伸	72°C	30~60秒 ^{*4}

(Data Collection请设定在延伸步骤)

融解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Analysis) ^{*5}

^{*1} 预变性及 PCR 循环中的变性条件说明请参照第 6、7 页（表 2、3）。

^{*2} 退火温度请设定在「引物 T_m ~引物 $T_m-5^{\circ}\text{C}$ 」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（45-60 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 30 秒，此时请根据仪器的使用说明书，设定最适的可设定时间（如 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: RNA 样品的 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 qPCR RT Kit (Code: FSQ-101)是专为Realtime PCR设计开发的高效率cDNA合成试剂盒。本节简略叙述使用ReverTra Ace qPCR RT Kit合成Realtime PCR用cDNA的方法（详细请参照该试剂盒所附的说明书）。

(1)RNA的变性

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。

- 该步骤也可以省略。但如果进行了该步骤，则可提高容易形成高级结构的RNA的逆转录效率。
- 进行该步骤时，注意不要添加5x RT Buffer和逆转录酶等。否则会造成RNA的分解以及酶活性的低下。

(2)反应液的配制

反应液组成

Nuclease-free Water	X μ l
5x RT Buffer	2 μ l
RT Enzyme Mix	0.5 μ l
Primer Mix	0.5 μ l
RNA	0.5pg~1 μ g

Total volume 10 μ l

(3)逆转录反应

37°C•15分钟（逆转录反应）

↓

98°C•5分钟（酶失活反应）

↓

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。

- 此温度条件是最适合本试剂盒组成成分的条件，一旦改变此温度条件，除了影响酶的活性之外，对引物的退火效率、RNA的清除效率、以及逆转录反应后的酶灭活效率等也会产生很大的影响。摸索条件的时候，请一定要基于此温度条件来进行实验。

[6] 常见问题

问题	可能原因	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	目标DNA的拷贝数过少	反应液中的目标DNA的拷贝数只有几倍到几十倍时，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，从而造成实质性的模板量减少。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	对目标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，请再次摸索反应条件，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	引物的特异性不够充分的情况下，会同时发生目标以外的扩增，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，请再次摸索反应条件，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。

问题	可能原因	对策
PCR效率低于90% (slope < -3.6)	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无法得到充分的PCR效率的情况。 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T _m 值低于一般情况(60°C以下)	使用T _m 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.7、*3)、或尝试使用三步法PCR(参考p.12)。
	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,包含了偏离直线的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。
PCR效率高于110% (slope > -3.1)	计算PCR效率时,包含了偏离直线的Ct值	如果计算PCR效率时,包含了偏离直线的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。
	使用了纯化质粒DNA或PCR扩增产物作为模板	使用纯化质粒DNA溶液或PCR扩增产物作为模板时,由于相对全DNA量的目的片段的拷贝数非常高,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直线性及重现性差。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直线性。
	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。

问题	可能原因	对策
no-template control (NTC)可见扩增	发生了引物二聚体	融解曲线分析时，no-template control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而发生的程度有所差异。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，no-template control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，则可能是由试剂类或灭菌水的交叉污染所引起的，此时请换新的试剂或灭菌水。
扩增曲线的荧光信号很弱，或扩增曲线呈锯齿状	50X ROX reference dye添加量过剩	使用Passive Reference的仪器，50X ROX reference dye添加量过剩的情况下，荧光值修正后，SYBR [®] Green I的荧光值会较低。根据 [4] 使用方法 (1) 反应液的配制 确认50X ROX reference dye的添加量。
	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(45~60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	目标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纯化级别。

[7] 相关产品

各种荧光 Probe、荧光引物检测体系用 Realtime PCR 试剂

品名	容量	Code No.
各种荧光Probe、荧光引物检测体系用 Realtime PCR试剂 THUNDERBIRD Probe qPCR Mix	1ml x 1 1.67ml x 3	QPS-101T QPS-101
Realtime PCR用Master Mix (Probe Assay用) Realtime PCR Master Mix	1ml x5	QPK-101
Realtime PCR用Master Mix (SYBR® Green Assay用) SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	1ml x5	QPK-201
Realtime PCR用Master Mix (SYBR® Green Assay用) SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-	1ml x5	QPK-212

※THUNDERBIRD Probe qPCR Mix 中，50X ROX reference dye 另外单独添付。

cDNA 合成试剂

品名	容量	Code No.
Realtime PCR用cDNA合成试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Kit	200次份	FSQ-101
Master Mix Veasion ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	200次份	FSQ-201
去除基因组DNA试剂+Master Mix Veasion 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	容量	Code No.
各种荧光Probe、荧光引物检测体系用 1步法•Realtime PCR试剂 RNA-direct Realtime PCR Master Mix	0.5ml x 5	QRT-101
SYBR® Green I检测体系用 1步法•Realtime PCR试剂 RNA-direct SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	0.5ml x 5	QRT-201

※RNA-direct 系列中，50mM Mn(OAc)₂ 另外单独添付。

[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

代理商资料：