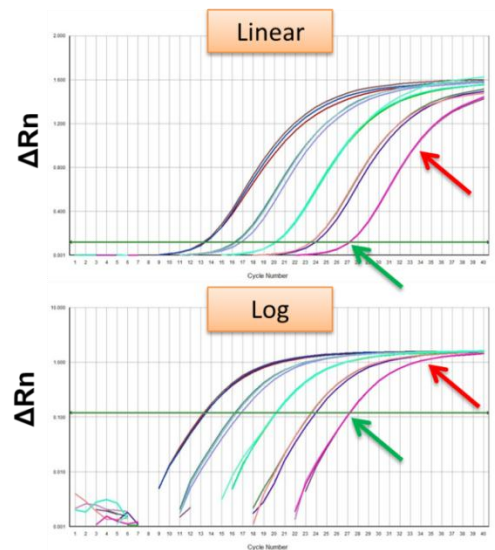


# qPCR 常见问题及解决方法

GoTaq® qPCR Master Mix (A6001、A6002)或两步法 RT-qPCR (A6010)一步法 RT-qPCR System (A6020)的常见问题

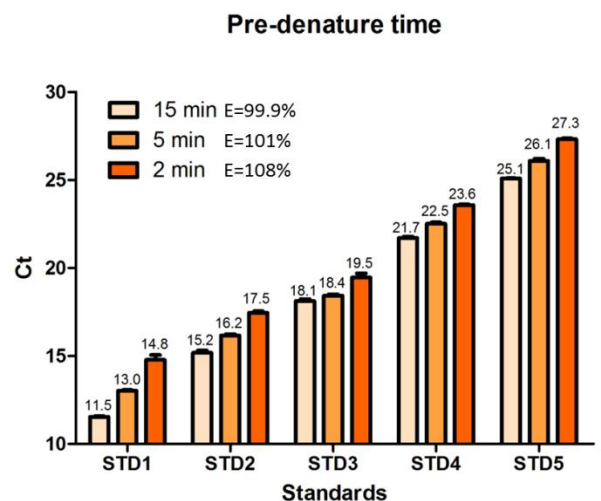
## 1. 扩增曲线没有平台期？答：

- 1) 如右图所示，在扩增曲线的线性（Linear）显示方式下，如果 Ct 值出现较晚（红色箭头指示的曲线），会看不到明显的平台期。但 Real Time PCR 计算 Ct 值是通过阈值（绿色水平线）与扩增曲线指数期的交叉点进行的（绿色箭头所示）。所以没有平台期不妨碍 Ct 值的计算。
- 2) 把扩增曲线以对数（Log）显示会使平台期更便于观察。同时扩增曲线的对数图（Log 显示）是更标准的显示方法。扩增曲线的指数期经过对数变换后会变成直线，更方便分析结果（绿色箭头所示）。
- 3) 如果研究者一定要在线性图下看到比较明显的平台期，可增加循环数至 45-50。平台期会比较明显。
- 4) 任何一个 PCR 反应，随着反应的进行，由于酶活力的降低，dNTPs、引物的消耗，产物的累积，一定会到达平台期。GoTaq 扩增系统由于酶活力持久，信号强、曲线升的更高，平台期的到来可能会稍晚。



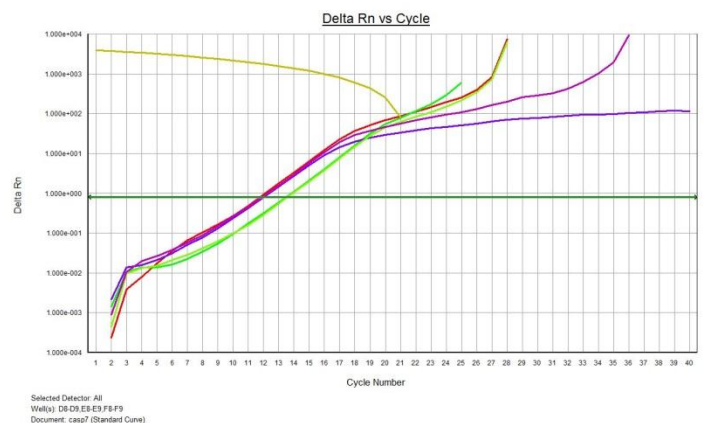
## 2. 检测灵敏度不如 TAKARA/TOYOBO？答：

- 1) GoTaq qPCR Master Mix 热启动所需的最短时间是 2min，而 TAKARA 和 TOYOBO 由于 Taq 酶不耐热，热启动时间最长只能做到 2min。
- 2) GoTaq qPCR Master Mix 的热启动酶由于耐热性好，热启动的时间可以设置的更长。延长热启动时间至 10min 左右对 GoTaq qPCR Master Mix 更合适。
- 3) 同时，延长热启动时间使模板的预变性时间增加，更加有利于解除模板本身的二级结构，提高检测的灵敏度。
- 4) 模板更彻底变性会使扩增效率更加接近 100%。



## 3. 荧光信号升高太高，超出检测范围？答：

- 1) ABI 仪器，除 7500 和 7500FAST 之外其他的型号，如 7300、7900、StepOne、StepOne Plus 需要高浓度校正荧光染料，应加入  $100 \times CXR$  至  $1 \times$ 。
- 2) 而对于 ABI 7500/7500FAST 和 Roche、Bio-Rad、Stratagene 等其他品牌的仪器，GoTaq qPCR Master Mix 试剂已经预混低浓度的校正荧光染料，不需要再加 CXR。

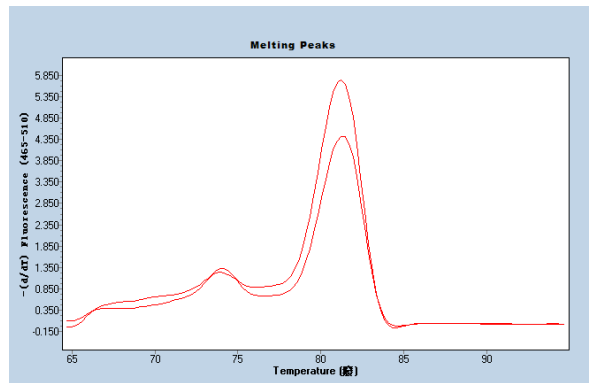


# qPCR 常见问题及解决方法

GoTaq® qPCR Master Mix (A6001、A6002)或两步法 RT-qPCR (A6010)一步法 RT-qPCR System (A6020)的常见问题

## 4. 熔解曲线有杂峰？答：

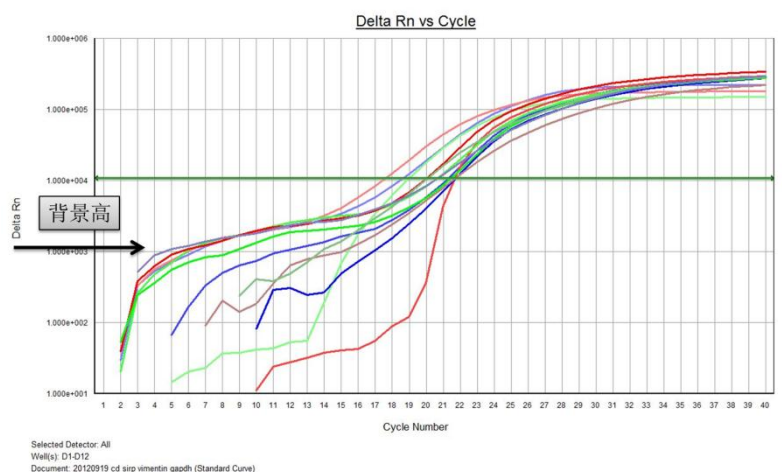
- 1) 熔解曲线的杂峰可能是引物二聚体或其他非特异性扩增，说明引物质量不是特别好。如果优化条件后杂峰消失，则引物仍旧能用于定量实验。如优化后杂峰无法去除，则可能需要重新设计引物。
- 2) GoTaq qPCR Master Mix 比一般的荧光定量 PCR 试剂更灵敏，有可能检测到其他试剂检测不到的杂峰。而一般的以 SYBR Green I 为染料的荧光定量 PCR 试剂，由于 SYBR Green I 的荧光信号较低，杂峰较低时无法发现，只有把产物跑胶后发现非特异性条带、或做扩增效率的实验发现扩增效率>110%才能确认。



- 3) 进行 Real Time PCR 实验时，使用较低的引物浓度会减少引物二聚体的出现。建议初次实验时采用 0.2  $\mu\text{M}$  的终浓度（假设单个引物储存液的浓度是 10  $\mu\text{M}$ ，则每 20  $\mu\text{l}$  反应体系需加入 0.4  $\mu\text{l}$  引物）进行，如果出现引物二聚体，可将引物浓度进一步降低至终浓度 0.1  $\mu\text{M}$ 。

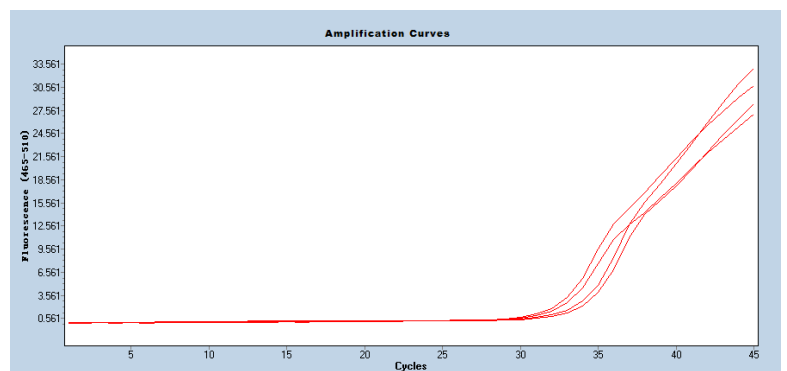
## 5. 荧光信号的背景很高？答：

- 1) 如右图所示，当提取的 RNA 样品纯度不高时会出现。出现这种情况，提示 RNA 样品中有可能污染了基因组 DNA。
- 2) 染料法 qPCR 的发光原理是染料特异性与双链 DNA 结合，两者结合后染料受激发才能产生光信号。如果 RNA 模板中污染有双链的基因组 DNA，会造成背景较高。
- 3) 发生这种情况时，可先将 RNA 样品用 DNA 酶消化以去除污染的基因组 DNA，再进行反转录和定量 PCR，结果会有改善。



## 6. 曲线不规则？答：

- 1) 引物浓度太高，与 GoTaq qPCR Master Mix 试剂不匹配造成的。
- 2) 降低反应体系中引物的用量，引物终浓度降至 0.2-0.1  $\mu\text{M}$  会有改善。必要时引物浓度可在 0.3  $\mu\text{M}$ -0.05  $\mu\text{M}$  范围内进行调整，寻找合适的引物浓度。
- 3) 而且，在进行 Real Time PCR 实验时，使用较低浓度的引物还会减少引物二聚体及其他杂峰的出现。



注：对于首次使用 GoTaq® qPCR Master Mix 的实验者，建议参考“A6001 试用指导”进行实验。

# qPCR 常见问题及解决方法

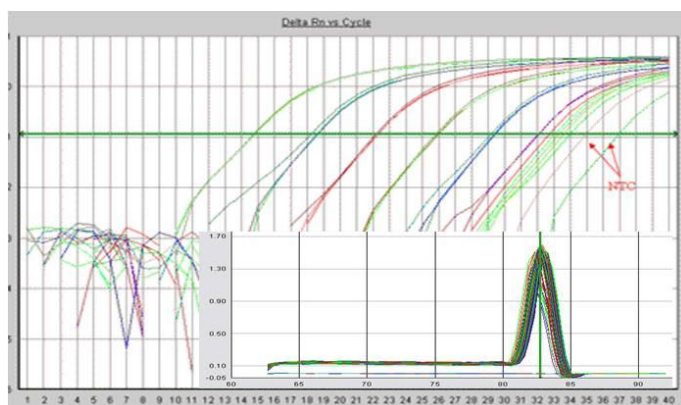
GoTaq® qPCR Master Mix (A6001、A6002)或两步法 RT-qPCR (A6010)一步法 RT-qPCR System (A6020)的常见问题

## 其他 Real Time PCR 常见问题及解答:

### 1. 阴性对照有扩增?

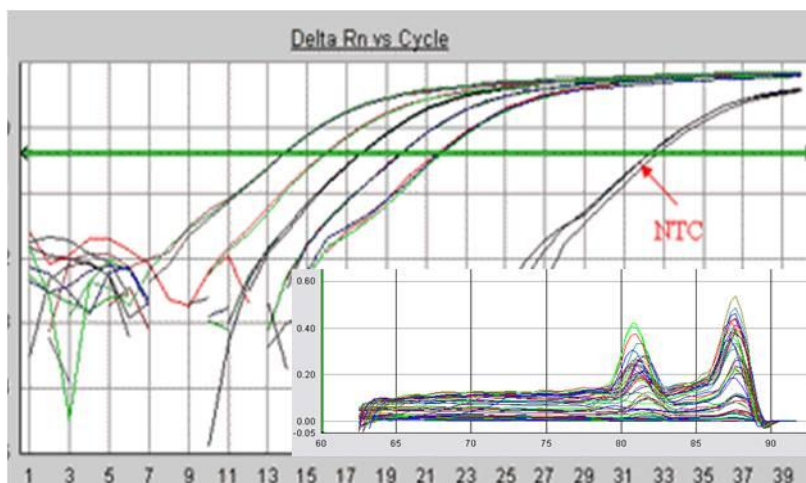
可分为两种情况:

第一种情况



表现	原因	解决方法
阴性对照有扩增，但多个阴性对照的 $C_T$ 值大小不等，熔解曲线呈单峰	反应体系被污染	模板交叉污染 使用带滤芯的枪头
		PCR 产物气溶胶污染 1. 反应体系中加入 UNG 酶/dUTP(增加成本) 2. 将 PCR 反应体系的准备与产物跑胶分开在不同的房间进行
		反应体系的其他组分被污染 换用新的组分

第二种情况



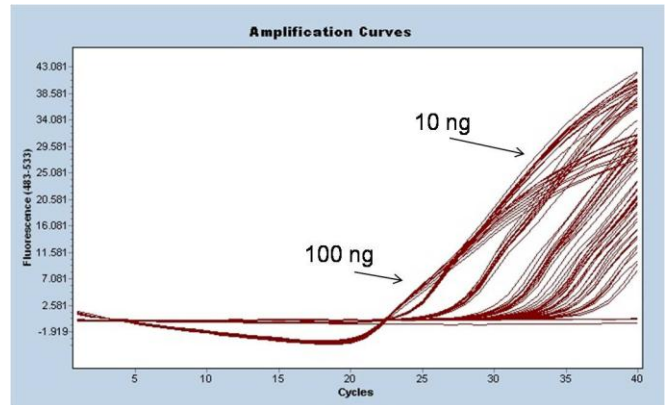
表现	原因	解决方法
阴性对照有扩增，多个阴性对照的 $C_T$ 值类似，熔解曲线有多个峰	有引物二聚体	1. 降低引物浓度至 $0.1\mu\text{M}$ 2. 将 PCR 扩增程序由两步法改成三步法 3. 重新设计引物

# qPCR 常见问题及解决方法

GoTaq® qPCR Master Mix (A6001、A6002)或两步法 RT-qPCR (A6010)一步法 RT-qPCR System (A6020)的常见问题

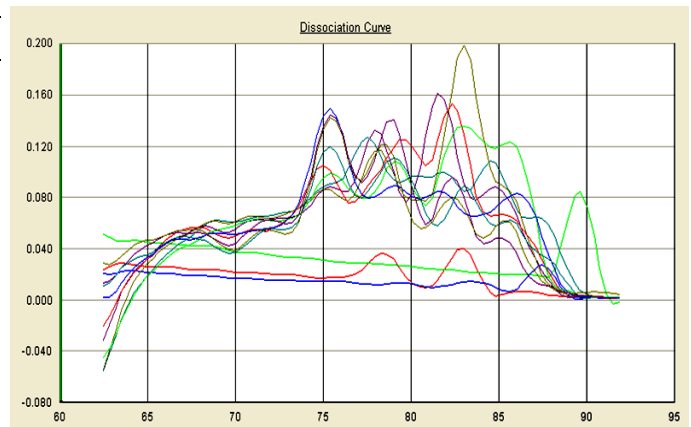
## 2. 高浓度模板反而 C<sub>T</sub> 值更大甚至检测不到?

表现	原因	解决方法
高浓度模板反而 C <sub>T</sub> 值更低甚至检测不到	模板含量太高、信号出现早, 与仪器基线设置不匹配	1. 修改数据分析时的基线设置, 使基线的循环数小于样品的 C <sub>T</sub> 值 2. 稀释模板

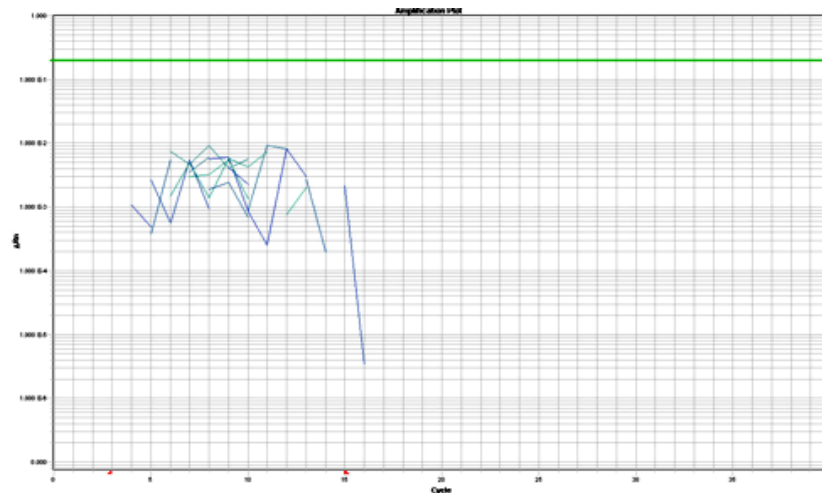


## 3. 熔解曲线有 2 个或 2 个以上的峰?

表现	原因	解决方法
熔解曲线有 2 个或 2 个以上的峰	反应特异性差, 有引物二聚体或其他非特异性扩增	1. 降低引物浓度至 0.1μM 2. 进行梯度 PCR, 寻找合适的退火温度, 将 PCR 扩增程序由两步法改成三步法 3. 重新设计引物



## 4. ΔRn 不超过 1, 在低水平徘徊

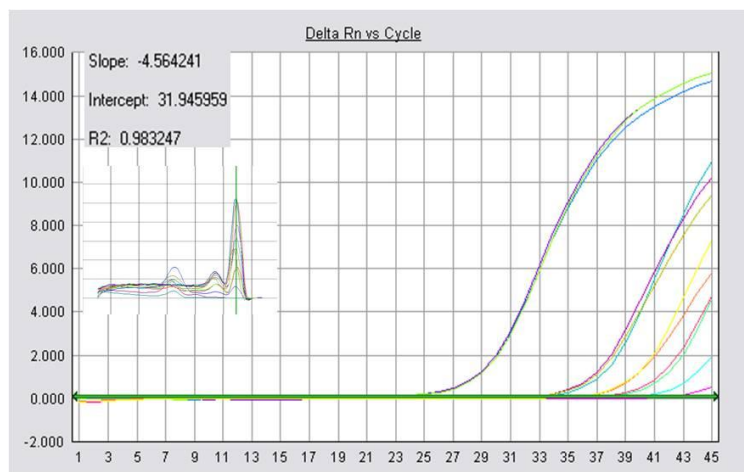


表现	原因	解决方法
ΔRn 不超过 1, 在低水平徘徊	无扩增 样品中模板含量太高, C <sub>T</sub> 值出现太早, 与仪器设置不匹配	组分加错、无模板的阴性结果、引物问题等等 1. 修改数据分析时的基线设置, 使基线的循环数小于样品的 C <sub>T</sub> 值 2. 稀释模板

# qPCR 常见问题及解决方法

GoTaq® qPCR Master Mix (A6001、A6002)或两步法 RT-qPCR (A6010)一步法 RT-qPCR System (A6020)的常见问题

## 5. 扩增效率低于 90%



表现	原因	解决方法
标准曲线斜率绝对值大于 4, 扩增效率低于 90%	模板中存在 PCR 反应抑制因子, 反应被抑制	将模板进行稀释或重新提取 RNA 或将 cDNA 纯化
	难扩增模板	PCR 扩增阶段采用三步法、延长延伸时间、调整镁离子浓度等
	引物问题	换用其他引物进行 PCR 反应, 如其他引物无此问题, 则说明是引物问题。改变扩增条件可能有改善。如无改善, 则需重新设计引物
	模板稀释错误	重新稀释模板

## 6. 扩增效率高于 110%

表现	原因	解决方法
标准曲线斜率绝对值小于 3, 扩增效率高于 110%	非特异性扩增	降低引物浓度、改变退火温度、重新设计引物
	引物二聚体	降低引物浓度、重新设计引物
	模板稀释错误	重新稀释模板

## 7. 标准曲线 R<sup>2</sup> 小于 0.98

表现	原因	解决方法
标准曲线 R <sup>2</sup> 小于 0.98	标准曲线的个别点结果有误	检查 C <sub>T</sub> 最大的点和最小的点是否超出检测范围, 只有在线性范围内定量才是准确的
	模板稀释错误	重新稀释模板