



# 荧光定量PCR完全攻略

## 1、什么是定量PCR？

以参照物为标准，对PCR终产物进行分析或对PCR过程进行监测，从而达到评估样本中靶基因的拷贝数，称为定量PCR。定量PCR的可行性定量一般是在PCR扩增的指数期进行的。

## 2、定量PCR定量的理论依据是什么？

特定的待扩增基因片段起始含量越大，则指数扩增过程越短，当扩增速率趋于稳定后，则无论原来样品中起始模板含量多少，最终扩增片段的含量通常是一样的。理想的扩增结果： $Y=X \times 2^n$  其中Y代表扩增产物量，X代表PCR反应体中的原始模板数 n为扩增次数；理论上PCR扩增效率为100%，PCR产物随着循环的进行成指数增长，但实际上：DNA的每一次复制都不完全，即每一次扩增中，模板不是呈2的倍增长；实际应为： $Y= X(1+E)^n$ ，其中E代表扩增效率： $E = \text{参与复制的模板} / \text{总模板}$ ，通常 $E \leq 1$ ，E在整个PCR扩增过程中不是固定不变的。通常X在1~105拷贝、循环次数 $n \leq 30$ 时，E相对稳定，原始模板以相对固定的指数形式增加，适合定量分析，这也就是所谓的指数期；随着循环次数n的增加（>30次），E值逐渐减少，Y呈非固定的指数形式增加，最后进入平台期。

## 3、荧光定量PCR定量的理论模式又是什么？

PCR是对原始待测模板核酸的一个扩增过程，任何干扰PCR指数扩增的因素都会影响扩增产物的量，使得PCR扩增终产物的数量与原始模板数量之间没有一个固定的比例关系，通过检测扩增终产物很难对原始模板进行准确定量。近年来研究人员通过大量的实践，研究了相对准确的定量PCR方法，即荧光定量PCR。

$$\text{PCR扩增通式：} \quad ① \quad T_n = T_0 (1+E)^n$$

$$② \quad T_n = T_{n-1} (1+E)^n \quad \text{注：} [0 < E < 1]$$

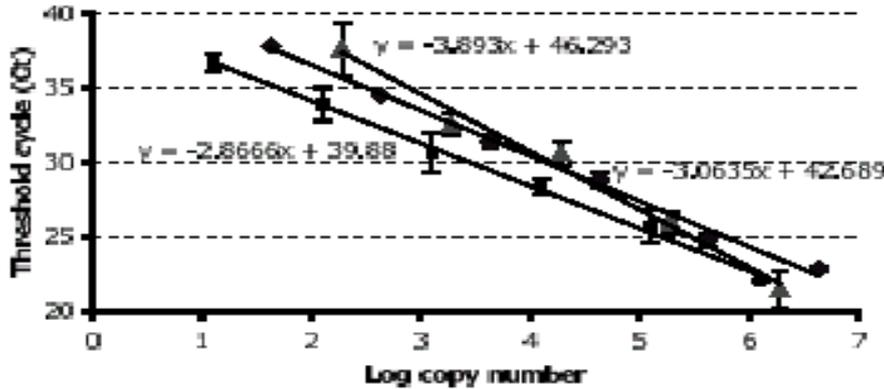
其中E表示扩增效率，n为循环数， $T_n$ 表示在n个周期后PCR产物的数量， $T_{n-1}$ 表示在n-1个周期后PCR产物的数量， $T_0$ 为原始模板数量。设定PCR到达指数扩增期时，产生一定的荧光(荧光依赖于某一循环扩增产物的总量，即特定的拷贝数K，为常数，大约在 $10^{10}$ 左右)高于背景为仪器所识别，此时的循环数为CP (crossing point)，也就是 $K = T_0 (1+E)^{CP}$ ，取对数即：

$$\lg K = \lg T_0 + CP * \lg(1+E)$$

$$CP = -1 / \lg(1+E) * \lg T_0 + \lg k / \lg(1+E)$$

由于对一特定的PCR而言，E与K均为常数，故上式为循环数(CP)对原始模板拷贝数的对

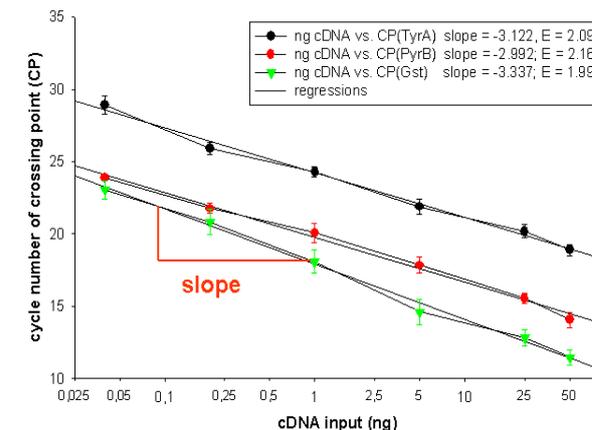
数 ( $\lg T_0$ ) 一次方程，其标准形式  $y=kx+b$ ，该直线的斜率为  $-1/\lg(1+E)$ ，在横坐标上的截距为  $\lg k/\lg(1+E)$ ，也是荧光定量PCR所谓的标准曲线。例如下图为单管实时荧光定量RT-PCR的标准曲线：



### 目前荧光定量 PCR 均采用外标定量

外标法定量PCR扩增效率的计算，由于标准曲线的斜率(Slope)为  $-1/\lg(1+E)$ ，可知  $E=10^{-1/\text{Slope}}-1$ ，如从标准曲线中知道  $\text{Slope}=-3.337$ ，则可推知扩增效率  $E=10^{1/3.337}-1=0.99$ ，也有作者将  $(1+E)$  直接视为扩增效率  $E$ ，则  $E=10^{-1/\text{Slope}}$ ，求得的  $E$  值均在 1—2 之间，有时也有大于 2 的结果，如下图所示。另外也可直接根据系列稀释外标在该次实时荧光PCR的结果来大略分析扩增效率的高低，例如系列 10 倍稀释外标在PCR扩增时有  $N_2=N_0E^{n_2}$ ， $N_3=(10*N_0)E^{n_3}$ ，在扩增到指数期时荧光值相同则代表此点的终末拷贝数相同，即  $N_2=N_3$ ， $E^{n_2-n_3}=10$ ，取对数得到  $\Delta \lg E=1$ ， $E=10^{1/\Delta n}$ ， $E=2$ ， $\Delta n=3.32$ ； $E=1.8$ ， $\Delta n=3.91$ 。反之亦然。如图所示。

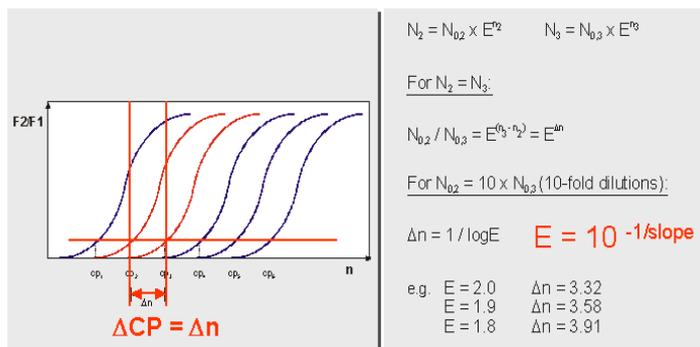
### Calculation of real-time PCR efficiency



Gene Quantifaction@wzw.tum.de © 2002

### Calculation of real-time PCR efficiency

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \Rightarrow E = 10^{-1/-3.337} \Rightarrow E = 10^{0.299} \Rightarrow E = 1.99$$



Roche Diagnostics, LC rel. Quantification software, March 2001

Rasmussen, R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds. Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications Springer Press, Heidelberg, page 21-34

#### 4、定量 PCR 可以分成哪几类？

根据反应体系是否设有参照物以及是否与标本在同一管中进行扩增，定量 PCR 可分为四种方法：

①**有限稀释法**，即倍比稀释法：通过稀释阳性样品直至靶基因不能再扩增为止，来设置已知浓度的参照品；根据阳性结果的最大稀释度及内参标或外参标的极限检出底线，计算出待检标本中原始模板的分子数；利用最大稀释度来进行标本核酸定量时的注意点 A、PCR 产物的最低可检测极限须有重复性；B、对每个稀释度必须作多次 PCR，一般先对模板 DNA 作 10 倍连续稀释后作 PCR，首先找到 PCR 结果呈阴性的接近稀释点，然后再对各稀释度作系列的 2 倍稀释，每个稀释点作 5 次 PCR；C、必须严格控制污染。优点：不需要特殊设备；缺点：扩增反应条件的标准化、严格注意污染，避免假阳性的产生。

②**使用外参照物的定量 PCR**，以已知浓度的目的基因为模板，按一定的倍比稀释，然后做出标准曲线图，未知的标本按这标准曲线找出对应的拷贝数。**荧光定量 PCR 通常使用该法做标准曲线。**

③**使用非竞争性内参照物的定量**：PCR 反应条件同样，在同一试管内，用两对引物，同步扩增来自同一 DNA 的一段靶序列和另一段内标序列。通过比较两种序列的扩增产量可对靶序列定量。方法：A、设计并合成 PCR 扩增靶基因及无关基因的引物，优化引物配比的条件。B、在指数增长期实现对靶基因及一系列已知含量无关基因的 PCR 扩增。C、PCR 产物琼脂糖凝胶电泳，EB 染色。D、电泳条带的紫外光下分析。E、二者荧光强度相等管的 DNA 含量亦相等。该方法只有当靶序列和内标序列以相同的量存在时，才能对两者相对定量；也

是对处于扩增指数期的 PCR 产物定量。

**④使用竞争性内参照物的定量 PCR:** 同样的反应条件，同一个试管，用同一对引物，同步扩增靶序列和内参照序列。靶基因的量可通过与产生相同产物的竞争物的量相比较而得到。其基本条件是靶序列和竞争性序列均用相同的引物以相同的效率扩增，两序列的初始化比值在整个反应过程中保持不变。目的 DNA 内参照 DNA 变性（同一对引物）PCR 竞争性模板的设置：通过改变克隆的靶基因的序列来设计竞争性模板插入新的限制性酶切位点或使原来的酶切位点缺失通过基因重组技术插入一个与特异性蛋白结合的 DNA 片段，或者使靶序列发生定点诱变人工合成竞争性模板 竞争性模板设计目的：使其与靶基因的 PCR 扩增产物相区别（通过酶切、杂交、显色等手段实现）。

**根据 PCR 扩增过程中是否加入某种标记物、标记物的种类以及最后检测的信号的不同可分为四种类型：**

- ①直接定量检测法，
- ②同位素标记定量检测法，
- ③酶标记定量检测法
- ④荧光定量 PCR 技术**

**荧光定量 PCR 主要原理：**荧光共振能量转移，外来光源激发供体荧光染料发出荧光，当其发射波长与受体荧光染料的吸收波长部分重叠，且两者距离很近(约 10~100 埃)时，受体荧光染料吸收供体荧光传递的能量而激发出另一波长的荧光，同时将供体荧光淬灭。

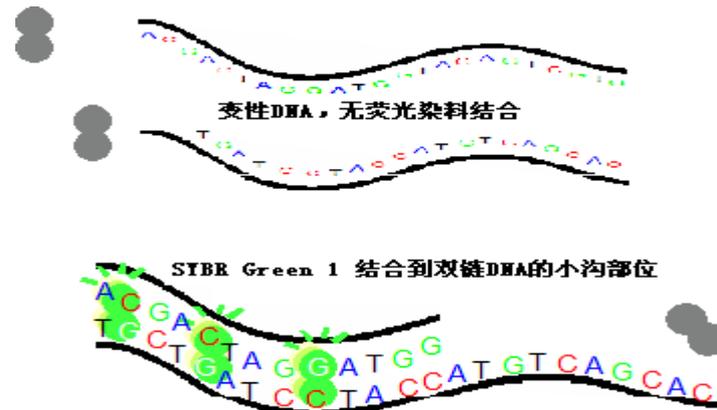
**依据 PCR 过程的监测检测模式又可分为如下几种**

(1) Sybr Green I 检测模式

SYBR Green I 是一种能与双链 DNA 结合发光的荧光染料。其与双链 DNA 结合后，荧光大大增强。因此，SYBR Green I 的荧光信号强度与双链 DNA 的数量相关，可以根据荧光信号检测出 PCR 体系存在的双链 DNA 数量。SYBR Green I 的最大吸收波长约为 497nm，发射波长最大约为 520nm。PCR 扩增程序一般为 94℃~55℃~72℃三步法，40 个循环。

SYBR Green I 的缺点：由于 SYBR Green I 没有特异性，不能识别特定的双链，只要是双链就会结合发光，对 PCR 反应中的非特异性扩增或引物二聚体也会产生荧光，通常本底较高，所以在临床上使用可能会有假阳性发生。

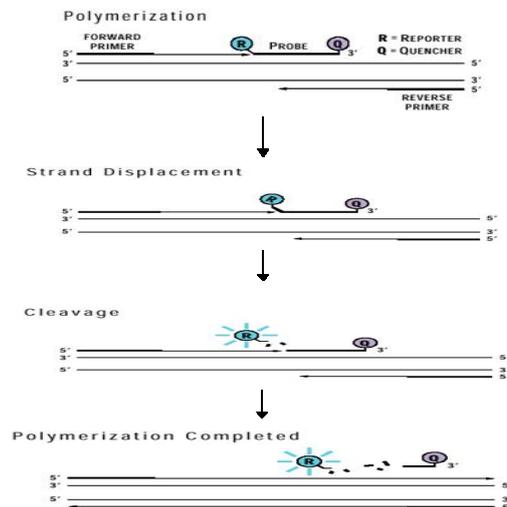
SYBR Green I 的优点：SYBR Green I 的优点是因为其缺点产生，由于它能所有的双链 DNA 相结合，所以对不同模板不需特别定制不同的特异性探针，通用性较好，并且价格相对较低。这对科研是很有利的，因此国内外在科研中使用比较普遍。



SYBR GREEN I 工作原理

## (2) 水解探针模式 (Taqman)

TaqMan 探针是一种寡核苷酸探针，荧光基团连接在探针的 5' 末端，而淬灭剂则在 3' 末端。当探针与靶序列配对时，荧光基团发射的荧光因与 3' 端的淬灭剂接近而被淬灭。在进行延伸反应时，聚合酶的 5' 外切酶活性将探针切断，使得荧光基团与淬灭剂分离，发射荧光。一分子的产物生成就伴随着一分子的荧光信号的产生。随着扩增循环数的增加，释放出来的荧光基团不断积累。因此 Taqman 探针检测的是积累荧光。PCR 扩增程序通常是：94℃～60℃ 40 个循环。常用的荧光基团是 FAM，TET，VIC，HEX。

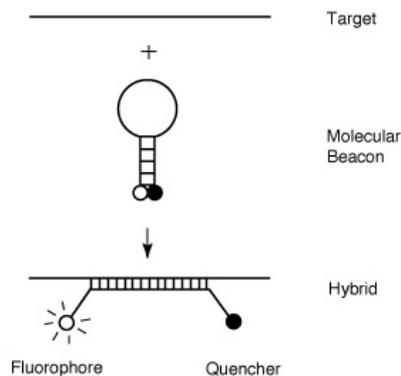


Taqman 探针工作原理

## (3) 杂交探针模式 (Beacon、FRET)

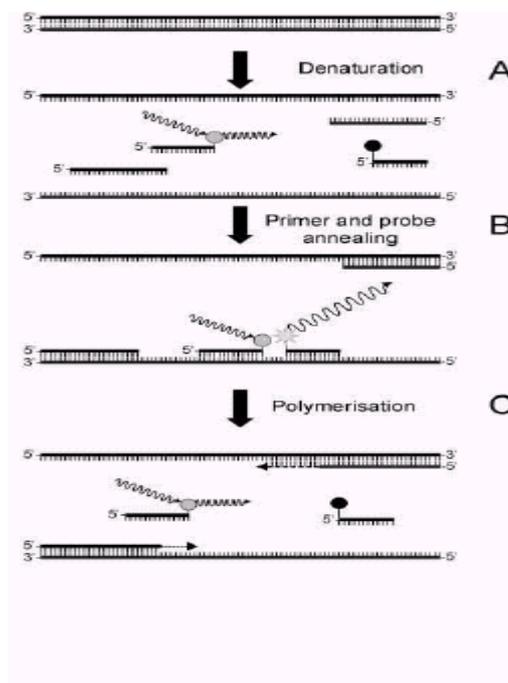
分子信标是一种呈发夹结构的茎环双标记寡核苷酸探针，两端的核酸序列互补配对，因此标记在一端的荧光基团与标记在另一端的淬灭基团紧紧靠近。荧光基团被激发后产生的光子被

淬灭剂淬灭，由荧光基团产生的能量以红外而不是可见光形式释放出来。分子信标的茎环结构中，环一般为 15-30 个核苷酸长，并与目标序列互补；茎一般 5-7 个核苷酸长，并相互配对形成茎的结构。荧光基团标记在探针的一端，而淬灭剂则标记在另一端。在复性温度下，因为模板不存在时形成茎环结构，当加热变性会互补配对的茎环双链解开，如果有模板存在环序列将与模板配对。与模板配对后，分子信标将成链状而非发夹状，使得荧光基团与淬灭剂分开。当荧光基团被激发时，因淬灭作用被解除，发出激发光子。由于是酶切作用的存在，分子信标也是积累荧光。常用的荧光基团：FAM，Texas Red。PCR 扩增程序通常是：94~55~72 °C 三步法，40 个循环。



分子信标工作原理

**FRET 探针又称双杂交探针**，FRET 探针由两条相邻探针组成，在一条探针的 5' 端标记 FAM 荧光基团，另一探针的 3' 端标记 Red 640 荧光基团。当复性时，探针结合在模板上，FAM 基团和 Red640 基团相邻，激发 FAM 产生的荧光，作为 Red640 基团的激发光被吸收，使 Red640 发出波长为 640 的荧光。当变性时，探针游离，两基团距离远，不能产生 640 波长的荧光。由于 FRET 探针是靠近发光，所以检测信号是实时信号，非累积信号。常用的荧光基团是：LC-Red640，LC-Red705。



FRET 工作原理

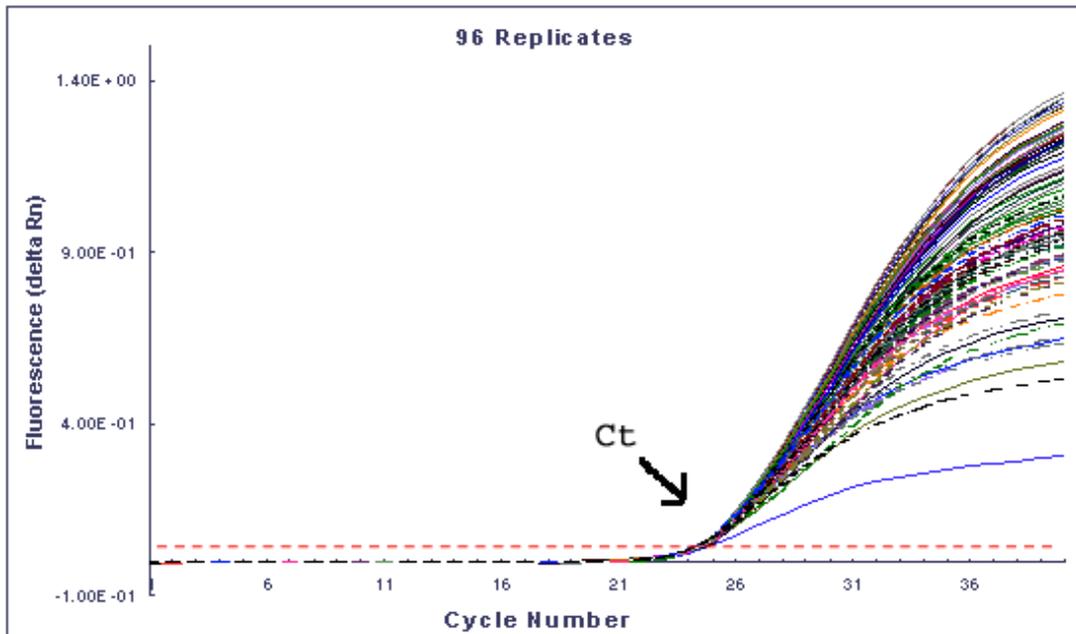
能用于实时荧光 PCR 定量的方法很多，各有优缺点，应根据实验的需要和当前的实验条件选择适合自己的方法。

	SYBR GREEN	FRET 探针	Taqman	分子信标
性质	可逆荧光		积累荧光	
熔点分析	能		不能	
特异性	引物（非特异性扩增或引物二聚体有影响）	引物+2 探针	引物+探针	引物+探针
探针	不需要	需要	需要	需要
通用性	通用	专用	专用	专用

5、为什么要用荧光定量 PCR 技术进行定量？它与传统的定量 PCR 有什么不同？

如前所述的，传统的定量 PCR 有很多，主要是倍比稀释法、内参照法、竞争法、PCR-ELISA 法，但这些定量 PCR 技术的难点主要在于：（1）如何确定 PCR 正处于线性扩增范围内（只有在此范围内 PCR 产物信号才与初始模板的拷贝数成比例）。（2）一旦线性扩增范围确定

以后，如何找到一个合适的方法检测结果。为了保证线性，研究者要扩增一系列梯度稀释的 cDNA 或者对每个基因的扩增循环数作适当的调整；有的研究者加一个竞争性模板，有的做限制性的稀释梯度分析，或者加一个 PCR 模拟 (mimic) 反应，即用相似的引物与目标产物共扩增，而扩增产物的检测通常在跑胶以后通过染料、放射活性或者探针进行检测。(3) 大多数是终点检测，即 PCR 到达平台期后进行检测，而 PCR 经过对数期扩增到达平台期时，检测重现性极差。同一个模板在 96 孔 PCR 仪上做 96 次重复实验，所得结果有很大差异(如下图所示)，因此无法直接从终点产物量推算出起始模板量；虽然加入内标后，可部分消除终产物定量所造成的不准确性。但即使如此，传统的定量方法也都只能算作半定量、粗略定量的方法，所以传统定量 PCR 的缺点是：劳动强度大、定量不准确、重复性差。



而荧光定量PCR有如下显著的优点：

- 1、特异性好，使用特异性探针定量分子进行识别，具有很高的准确性。同时，靶序列由引物和探针双重控制，特异性好、假阳性低。
- 2、灵敏度高，荧光PCR检测技术是综合了PCR技术、荧光标记技术、激光技术、数码显象技术为一体的技术，因此它的检测灵敏度很高。
- 3、线性关系好、线性范围宽，由于荧光信号的产生和每次扩增产物成一一对应的关系，通过荧光信号的检测可以直接对产物进行定量；定量范围可在  $0-10^{10}$  拷贝/毫升。
- 4、操作简单、安全、自动化程度高、防污染。扩增和检测可以在同一管内检测，不需要开盖，不易污染；同时扩增和检测一步完成，不需要后期处理，不再需要担心放射性污染。

5、速度快、高通量，可在 2—3 小时完成 96 个样品的定量分析。

## 6、荧光定量 PCR 为什么使用外标定量，而不是内标定量？

### A、内标对实时荧光定量 PCR 的影响

若在待测样品中加入已知起始拷贝数的内标，则 PCR 反应变为双重 PCR，双重 PCR 反应中存在两种模板之间的干扰和竞争，尤其当两种模板的起始拷贝数相差比较大时，这种竞争会表现得更为显著。但由于待测样品的起始拷贝数是未知的，所以无法加入合适数量的已知模板作为内标。也正是这个原因，传统定量方法虽然加入内标，但仍然只是一种半定量的方法。

### B、荧光定量 PCR 无需内标定量

实时荧光定量 PCR 技术有效地解决了传统定量只能终点检测的局限，实现了每一轮循环均检测一次荧光信号的强度，并记录在电脑软件之中，通过对每个样品 Ct 值的计算，根据标准曲线获得定量结果。实时荧光定量 PCR 无需内标是建立在两个基础之上的：

#### (1) Ct 值的高度重现性

PCR 循环在到达 Ct 值所在的循环数时，刚刚进入真正的指数扩增期（对数期），此时微小误差尚未放大，因此 Ct 值的重现性极好，即同一模板不同时间扩增或同一时间不同管内扩增，得到的 Ct 值是恒定的。

#### (2) Ct 值与起始模板的线性关系

由于 Ct 值与起始模板的对数存在线性关系，可利用标准曲线对未知样品进行定量测定，因此，实时荧光定量 PCR 是一种采用外标准曲线定量的方法。

美国 Texas 大学的科研人员进行了外标法定量和内标法定量的方法学比较，得出的结论是：内标法作为定量或半定量的手段是不可靠的，而外标准曲线的定量方法是一种准确的、值得信赖的科学方法。

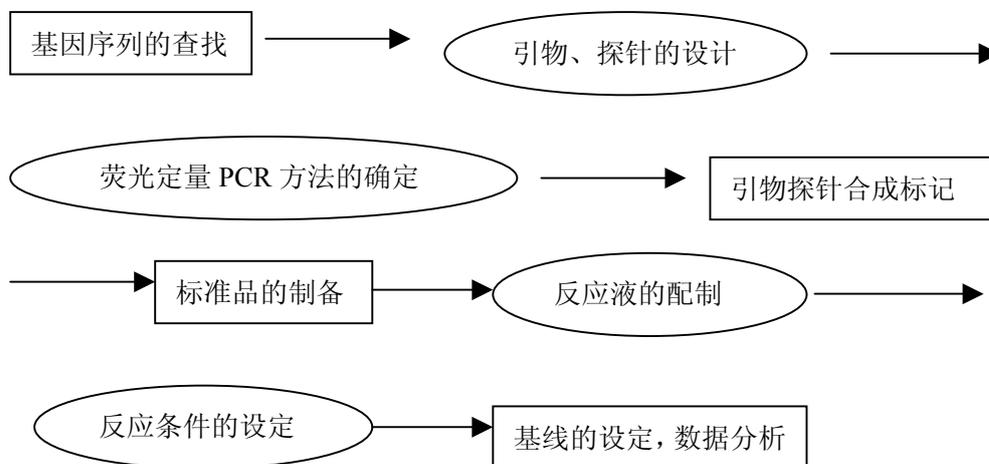
## 7、为什么要用定量 PCR 而不是定性 PCR？

在实验生物学及临床医学的一些场合，由单纯 PCR 所提供的阳性或阴性结果还远远不够，在阐述许多问题的本质时，基因及其表达的定量起着至关重要的作用。定量 PCR 常用来研究发病机制、估计病毒的负荷量、监测临床治疗进展或用于诊断遗传缺陷等。通过对靶基因量的检测，将其与疾病的临床表现、临床分型以及各种标志酶的值联系起来，为疾病的诊断和药物疗效监测提供科学的依据。与非定量 PCR 分析方法不同，定量 PCR 分析的操作程序有助于评估污染的情况，即测出污染的程度，即使负对照产生了正的信号，只要这些信号比实验样品的低得多，依据这样的结果，至少可以推测出实验中所得出的信号是真实的。

在一定程度上消除了单纯 PCR 过于敏感、假阳性率高的缺点。

## 8、如何设计荧光定量 PCR 实验方案？

下面是一些简要的操作流程，希望能起抛砖引玉的作用，当然具体问题要具体分析：



1)、大量阅读相关的背景资料后，根据自己所要研究的基因名称，在genebank中找到相应的基因序列。（www.ncbi.nlm.nih.gov）

2)、用引物设计软件Primer5.0、Oligo6.0 或beacon designs3.0 进行引物探针的设计；（该软件可在www.shinegene.org.cn下载）

### 引物设计通常遵守如下原则：

- A、引物与模板的序列要紧密互补。
- B、引物与引物之间避免形成稳定的二聚体或发夹结构。
- C、引物不能在模板的非目的位点引发DNA 聚合反应(即错配)。
- D、引物长度通常在 20—25bp,Tm值在 55—65℃，GC含量在 40%—60%，产物大小在 100-250bp之间。
- E、引物的 3'端避免使用碱基A；引物 3'端避免出现 3 个以上连续相同的碱基。
- F、为避免基因组的扩增，引物设计最好能跨两个外显子。

### 探针设计通常遵守如下原则：

- A、探针位置尽可能地靠近上游引物。
- B、探针长度通常在 20—30bp，Tm值在 65—70℃，通常比引物高 5—10℃，GC含量在 40%—70%。
- C、探针的 5'端应避免使用碱基G。
- D、整条探针中，碱基C的含量要明显高于G的含量。

3)、为确保引物探针的特异性，最好将设计好的序列在blast中核实一次，如果发现有非特异性互补区，建议重新设计引物探针。(www.ncbi.nlm.nih/blast)

4)、根据仪器特点和个人的喜好，选择标记的荧光素种类。如：FAM、Texas red、LC-Red640，LC-Red705 等，同时确定荧光定量PCR的方法，选择Taqman或beacon等，可参考前面所述。

5)、选择高品质的引物探针合成商，如闪晶生物等。

6)、外标准品的制备：一种是化学合成目的基因，它的优点是纯度高、定量准确，缺点是受化学合成工艺的限制，只能合成 120bp以下的长度；一种是将PCR扩增产物直接梯度稀释，它的优点是方便、简单，缺点是不准确、不稳定；另一种是将PCR产物克隆到载体上，然后抽出质粒，经过测量浓度和拷贝数的换算，可准确定量，它的优点是稳定、准确。如果是转基因食品，则要求转基因食品与非转基因食品按一定的比例混合做成标准品。稀释液可以是TE或者是闪晶生物提供的DNA保存液。拷贝数 = (质量 ÷ 分子量) × 6.0 × 10<sup>23</sup>。通常外标由 4 个点到 5 个点组成，模板的浓度分别为 10<sup>7</sup>/ml、10<sup>6</sup>/ml、10<sup>5</sup>/ml、10<sup>4</sup>/ml、10<sup>3</sup>/ml。

7)、合成好的引物探针，最好用双蒸水稀释成 25pmol/ul的浓度，然后放 -20℃ 保存，还应该注意避光保存探针。如果是配成 25pmol/ul的浓度，那么所加水的量是 (ul)：

$$(\text{OD数} \times 33) \div \text{分子量} \times 40000$$

8)、PCR反应液的配制

1×PCR buffer、0.3-0.5pmol/ul的引物、0.1—0.3pmol/ul的探针、2.5-4.0mM的Mg<sup>2+</sup>、1-2U的Taq酶、0.2—0.4mM的dNTPs、0.2-1U的UNG酶、0.3-0.6mMdUTP、通常取 2-5ul的模板、反应总体积通常为 20—50ul (以上所有的浓度都是指终浓度)

9)、PCR扩增程序的设定

在lightcycler上通常是：先 50℃2 分钟 → 93℃3 分钟，然后 93℃5 秒 → 60℃20 秒，循环 40 次，在 60℃时，设定荧光检测点。

在其它荧光仪器上，通常是：先 50℃2 分钟 → 93℃5 分钟，然后 93℃20 秒 → 60℃30 秒，循环 40 次，在 60℃时，设定荧光检测点。

10)、为确保实验数据的有效性，每次实验都设阴性对照和 4 个标准品，每个样品都平行做 2 个复孔。

11)、基线或阈值的设定

通常是以 10—15 个循环的荧光值作为阈值，也可以以阴性对照荧光值的最高点作为基线。

## 9、荧光定量 PCR 常见的几个问题

1)、文献上找到的引物和探针序列能否直接使用？

通常国外的文献可信度比较高，可直接使用；但为了保险起见，最好用blast对引物探针的序列进行必要的验证；或者再进一步用primer软件对引物探针的二级结构和退火温度进行分析，这样更有利于您对整个实验的把握。

#### 2)、在实验之前要进行哪些准备工作？

首先要不加探针做常规的 PCR 实验，验证引物是否工作、模板是否降解、模板纯度是否合适，同时确定实验的最佳反应体系和反应条件。

#### 3)、标本的采集和处理应该注意什么问题？

根据实验要求和目的，有针对性采集病灶部位的标本；采集好的标本，最好根据每次实验用量，用冻存管分成几小份，放在-80℃保存，以免反复冻融；标本通常分成 3 类，如细胞组织、分泌物、血清全血；如果是血清，不能有融血现象的发生，否则会影响PCR的扩增；如果是全血，最好不用EDTA作为抗凝剂，选用柠檬酸作为抗凝剂，否则会影响PCR的扩增；如果是组织，最好用蛋白酶K消化；如果是提RNA的标本，更应该防止反复冻融和保持标本的新鲜。

#### 4)、在做荧光定量实验时要注意些什么呢？

A、在操作中，应使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性移液器吸头（带滤嘴自卸式），并不能用手直接触摸毛细管、离心管底部。

B、在试剂准备和标本处理时应使用超净工作台(负压式)或防污染罩，以防止对环境的污染。

C、操作台、移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应经常用 10%次氯酸或 75%乙醇擦拭消毒。每次实验前后用 10%次氯酸和 70%乙醇擦拭移液器、操作台。

D、实验中涉及的有害有毒的标本及试剂应妥善放置，专人保管；废弃物应置专门容器中，妥善处理。

E、荧光探针应避光保存，加入反应液中后，应尽快配制好反应体系进行扩增。

F、配制反应体系时，应注意移液器的使用方法，所有的液体都要缓慢加至管底，不要加至管壁，所有液体的混匀要用振荡器进行，不能用移液器吹打，反应体系配制完毕后低速离心数秒，避免产生气泡。

G、配制反应体系过程中若需标记，请在试管架或离心机管架上标记，不要直接标记在离心管上。

#### 5)、为什么阳性对照一直没有扩增曲线？

首先确定没有少加漏加反应成分，确定反应条件是否合适，模板是否降解；但也可能是体系

有问题，如：镁离子浓度不对、酶浓度不对等；最大的可能是酶不工作或是探针不工作了；

6)、为什么阴性对照一直有扩增曲线出现？

最大的可能是有污染了；但也可能是体系有问题，如：镁离子浓度不对、酶浓度不对等。

7)、如果出现污染该怎么办？

以替换法确定污染从何而来，对症下药，值得注意的是，因荧光定量PCR的敏感度极高，从防止污染的角度出发，最好在体系中加入dUTP，一旦出现污染现象，可以用UNG酶消除；同时将实验室分成4个区，即试剂储存和准备区、标本制备区、扩增反应混合物配制、扩增和产物分析区。

18、酶或探针不工作怎么办？

在有充分证据的情况下，找供应商的责任，所以在买酶和探针时要找有质量保证和信用的供应商，譬如闪晶生物，以免不必要的麻烦。

19、客户需要提供什么？

一般只需要提供基因序列和样品就可以了。

# 荧光定量 PCR 技术服务

为了更好地服务广大科研人员，闪晶公司提供全套技术服务，详情可参考如下信息或者访问如下网页：

<http://www.shinegene.org.cn/service/serv001.html>

荧光定量 PCR 用 Taqman 方法对 DNA/RNA 进行 real time PCR 的定量测定或型的鉴定。

## 荧光定量PCR服务要求

1. 请您提供新鲜的且尽量多的材料（各种材料的 RNA 提取量请参照“总 RNA 的提取”），或直接提供纯化好的总 RNA（大于 5 ug/ 样品）；（各种材料的 DNA 提取量请参照“DNA 的提取”），或直接提供纯化好的 DNA（大于 5 ug/ 样品）。
2. 请通过 E-mail 提供已知的全长基因序列。
3. 请提供尽可能详细的背景资料：DNA/ RNA 来源、丰度等

## 荧光定量PCR操作程序

1. 根据基因序列设计特异性的引物和荧光探针。
2. 提 DNA/ RNA 。
3. Real Time PCR(荧光定量 PCR)，进行实验结果分析
4. 实验完成后，提供完整的实验报告（含软件分析结果）及引物等实验材料

## 荧光定量PCR收费标准

- 1、RNA提取：10—20 个样品的RNA提取是：150 元/个；20—30 个样品的RNA提取是：120 元/个；30 个以上样品的RNA提取是：100 元/个；每份材料最少应提供：100mg/样品
- 2、一个指标每个样品为 150 元；二个指标每个样品为 240 元；三指标每个样品为 300 元，三个指标以上每个样品为 80 元/反应。
- 3、引物合成为每个碱基 2.1 元，探针标记为 1200 元/条，如果是用sybr green I(染料)做，则免去探针的费用，染料赠送。
- 4、内参的GAPDH引物探针免费，标准曲线免费赠送。
- 5、不再收取任何的基础费或者开机费。

(如果样本或者指标数更多，再面议)，5000.00 元以内的服务费，一律 100%预付；乘车路线：火车站坐 1 号地铁到终点，然后换 5 号地铁到北桥站即可。

**E-mail:master@shinegene.org.cn or shinegene@vip.163.com 免费电话:8009881995**

时间：接到样品后 1 个月内完成！

提供样本：用干冰运输，样品重量在 100mg 左右；如果没有干冰，必需将组织用 Trizol 研粹或者收集好的细胞用 Trizol 保存或者将提好的 RNA 用保存在无水酒精中，然后用冰袋和泡沫箱包装运输；上海的用户可以上门取标本。

技术部免费设计引物探针，客户只需提供标本和 GeneBank 的 ID 号或者告诉我们指标的名称。

荧光定量 PCR 相关试剂

ZN00801	Trizol	300.00/50ml
		540.00/100ml
ZK00804	第一链 cDNA 合成试剂盒	800.00 / 50 次 (20ul 体系)
		1400.00 / 100 次 (20ul 体系)
ZK00714	荧光定量 PCR 试剂盒 (染料法)	800.00/100 次 (50ul 体系)
	荧光定量 PCR 试剂盒 (探针法)	800.00/100 次 (50ul 体系)
	TaqMan 探针标记	1200.00 / 条 (20D)
	MGB 探针标记	2800.00 / 条 (20D)
	Molecular Beacon(分子信标)	1500.00 / 条 (20D)
	引物合成	1.50/bp(20D)



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市吴河路 328 号 A 座 2 楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：021-54460832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.synthesisgene.com

