

常见问题分析解决

1. 熔解曲线出现多峰

较为理想的熔解曲线是单峰曲线

非特异性扩增

引物设计不够优化：根据设计原则设计新的引物。可通过梯度 PCR 对引物退火温度进行优化；

出现引物二聚体

引物设计不合理而导致的引物二聚体在熔解曲线内峰值一般位于 75°C 左右，如该峰显著请按照以下方面进行优化：

A. 优化扩增条件，如提高退火温度，可利用梯度 PCR，摸索最佳的 T_m 值。通常两步循环(由 95°C 变性步骤直接进入 60°C 退火和延伸步骤) 有利于强效扩增，因此引物设计时设定的成功退火温度为 60°C。

B. 引物浓度太高，适当降低引物浓度。通常引物的 T_m 低于目的基因，熔解曲线上峰值在目的基因峰的左边。大多数情况下，每条引物的理想最终浓度为 200 nM，但如有需要，可将浓度降至 60 nM。

C. 可通过琼脂糖凝胶电泳确认引物二聚体。引物二聚体在凝胶的底部形成扩散条带，通常位于 100 bp 以下。在 PCR 过程中，二聚体的形成与模板的退火及延伸之间存在竞争作用。引物二聚体通常随模板的减少而增加。单独采用凝胶电泳分析进行验证的缺点在于，其灵敏度最低仅达到纳克级，因此可能无法得出结果。凝胶电泳分析的优势是当解离曲线(熔解曲线) 数据同时可用时，产物的大小有助于对结果进行综合解释；
cDNA 模板带有基因组污染：重新制备 cDNA 模板。

2. 扩增曲线形状异常，如“S”型曲线

- 反应体系引起的扩增曲线不光滑---扩增效率偏差（过高或过低）

A. 扩增效率过高

出现非特异扩增或引物二聚体：反应体系内模板浓度太高以及模板核酸质量较差（例如，如果采用硅胶柱纯化时，结合 DNA 或 RNA 的离液盐可抑制 Taq DNA 聚合酶。如果采用有机萃取法，则苯酚和乙醇残余物也具有相同的效应），可能导致出现抑制 PCR 反应的现象。在绝对定量时表现扩增效率大于 110%。

解决方案：

- 去除模板浓度最高的反应孔并重新分析标准曲线。如果效率重新回到 110% 以下，则分析良好；
- 对目的基因做标准曲线，一般用克隆的该基因的质粒做梯度稀释，或用 PCR 产物做梯度稀释，然后做定量扩增，通过曲线评估反应效率。绝对定量有效的扩增效率在 90%-110%；
- 重新纯化模板，去除模板中存在的潜在抑制物。切记应延长干燥时间，以去除乙醇沉淀过程中的乙醇，或采用另外的纯化柱加入洗涤液将离液盐从硅胶纯化物中去除。

B. 扩增效率过低

扩增效率过低主要表现在试剂浓度不适（主要是引物、镁和 Taq DNA 聚合酶，尤其是在多重实验中），引物对 Tm 之间的差异超过 5°C 以及热循环条件不适，试管中各种同源物质的竞争作用可造成反应效率低下。绝对定量表现：扩增效率 < 90%。

解决方案：

- 对上述因素逐一排除后进行调整优化实验体系。

C. 个别扩增曲线异常

如个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡，由于温度升高后气泡破裂，使仪器检测到的荧光值突然降低所致。进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

• 仪器设置不当引起的曲线异常

基线设置不当，如扩增曲线断裂或下滑：基线的终点值大于 Ct 值。减小基线终点 (Ct 值- 4)，重新分析数据；

- 基线范围和阈值设置不当。

基线范围和阈值都是人为设定的参数。二者一般由仪器自动默认为合适值。在对同一程序中的多种试剂盒或化学剂进行评估时，经常出现阈值设置不当造成不同组别数据的扩增曲线差异：软件自动选择的阈值更适合平台更高的曲线（下图中的蓝色曲线），这将导致此数据组中的红色曲线的 Ct 值出现偏差，因为其最佳阈值比此值更低。因此，需对每个数据组进行独立研究，这样才能根据具体情形选择最佳阈值；

- Rox 添加不当

表现为扩增曲线呈锯齿状且不连续，需校正参比染料。

3. Ct 值出现太晚

- 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计引物;
- 模板浓度太低：减少稀释度重复实验;
- 模板降解：重新制备模板，重复实验;
- PCR 产物太长：一般将 PCR 产物长度设计为 100 bp-150 bp 之内;
- 反应体系中存在 PCR 反应抑制剂：一般为加入模板时带入，模板质量不高，参照【问题 1.1】加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

4. 阴性对照也出现明显扩增

- 反应体系组分（如，水）被污染：实验过程中，更换新的 Mix 或者水重复实验;
- 标本间的交叉污染或产物污染：反应体系在超净工作台内配制，对实验室进行严格的区分，减少气溶胶污染；使用带滤芯的枪头;
- 引物二聚体的出现：一般在 35 循环以后阴性对照出现扩增属正常情况，可配合熔解曲线，PCR 产物的琼脂糖电泳结果进行分析。

5. 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- 加样误差：加大模板稀释倍数，提高加样体积;
- 标准品降解：重新制备标准品，重复实验;
- 模板浓度太高：增加模板稀释倍数。

6. 反应结束无扩增曲线出现

- 扩增效率问题：电泳检测 qPCR 反应产物，观察是否有目的条带的出现。如果没有，则需要逐一排查引物、模板以及反应条件问题;
- 确认引物是否降解：长时间未用的引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除引物降解的可能性;
- 模板浓度太低或目标基因表达丰度过低：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。
另外通常基因表达检测所需的 cDNA 量为 1 到 100ng。但是如果样本中目的基因的丰富很低，可能就需要

更多的样本量。检测一个样本量的范围，或者更理想的情况下加入阳性对照反应确认反应本身正常。如果对期望的表达水平不是很确定，可重新查询文献或 NCBI Unigene 数据库中 EST 表达数据来预估在不同组织中的表达水平；

- 模板降解：重新制备模板，重复实验；

- 逆转录问题：

与低表达量相关，如果目的基因在样本中的丰度很低，需要增加实验的灵敏度。确认一下 qPCR 反应中没有加入过量的 cDNA (最大加样水平为 20% v/v)，因为过量的 cDNA 样本会引入抑制剂降低反应效率。也可以检查一下逆转录酶和引物。随机引物通常比基于 oligo(dT) 的方法产生更多的 cDNA。另外，有些逆转录酶经过热稳定性改造，也会提高 cDNA 产量。检查反应中的各组分，通过优化各组分提高扩增效率；

- 确认是否是程序设置不当：

如是否设置了信号采集步骤：两部法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在 72°C 延伸阶段；

- 确认了上述因素后排查是否反应循环数不够：一般设置循环数为 40，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度；

- 实验设计问题

如果没有见到任何扩增，还可能是引物/探针的设计并未针对正确的靶点。检查序列数据库如 NCBI 搜寻目的基因的不同变异型。有可能实验设计只是针对了其中一种变异体，但是在所研究的样本里并无表达。同时还要检查引物/探针靶向的目的基因的区域，是在编码区还是内含子？靶向 5' UTR 区域是不会检查到感染到细胞里的外源基因表达的（因为 5' UTR 区域是不会包含在表达载体质粒上的）。类似的情况，如果实验设计是靶向内含子序列的，也是不会从 cDNA 样本中得到扩增的；

- 产品储存是否得到：

该产品 -20°C 保存可以长期保持活性，推荐 -20°C 保存。4°C 保存将会导致产品活性下降。因反复冻融也可能导致产品活性下降，因此当每次用量较小时，推荐小体积分装后 -20°C 保存。

7. 实验重复性差

- 加样体积失准：使用性能较好的移液枪，扩大反应体积，将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中；

- 定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器;
- 模板浓度太低：模板浓度越稀，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积;
- qPCR mix 没有完全混匀。请使用前充分混匀，
重复性好的扩增曲线：重复性较理想的扩增曲线 $STD < 0.2$ 。

8. 绝对定量中通过以下参数对 qPCR 结果加以判定---线性关系、扩增效率确认

- 相关系数 (R^2) : > 0.98 , 越接近 1 , 结果可信度越高。 $R > 0.99$ 或 $R^2 > 0.98$;
- 标准曲线斜率 : -3— -3.5 , 100%扩增效率对应的斜率是-3.32 ;
- PCR 扩增效率 (E) : 90%-110% , 越接近 1 , 越理想。其对应的斜率为 -3.58 至-3.10。效率 = $10^{(-1/\text{斜率})-1}$;
- 检测灵敏度确认 : 35Cycles 内可得到好的定量结果 , 如果采用 SYBR 检测方法 , 30cycles 内无非特异性产物扩增 ;
- NO template control (NTC) 确认 : 35cycles 内无引物二聚体产生 ;
- 重复性: $STD < 0.2$ 。

绝对定量和相对定量的差别 ?

- 绝对定量目的是测定目的基因在样本中的分子数目 , 即通常所说的拷贝数:
相对定量的目的是测定目的基因在两个或多个样本中的含量的相对比例 , 而不需要知道它们在每个样本中的拷贝数;
- 绝对定量实验必须使用已知拷贝数的绝对标准品 , 必须做标准曲线:
相对定量可以做标准曲线 , 也可以不做标准曲线;
相对定量实验有两种方法 : 标准曲线法和 Ct 值比较法。如果使用标准曲线法 , 可以使用绝对标准品 , 也可以使用相对标准品 , 而且相对标准品在实验操作上更为简便易行。相对标准品是只知道样品中 DNA 或 RNA 的稀释比例而不需要知道其分子数目的标准品 , 典型的做法是将一个已知 pg 数的样品做一系列梯度稀释。

德泰生物产品推荐

分子诊断用酶

货号	产品名称	组成	规格
DTE02	高保真PCR预混液	酶;dNTP;buffer(Mg ²⁺)	1mL
			10mL
DTE03	热启动Taq酶	酶	250U
			1000U

标签抗体

货号	产品名称	浓度	规格
DTH01	HIS标签抗体	0.5mg/mL;1mg/mL	100μg
			500μg
			1mg
			5mg
			10mg
DTF01	Flag标签抗体	0.5mg/mL;1mg/mL	100μg
			500μg
			1mg
			5mg
			10mg
DTG01	GST标签抗体	0.5mg/mL;1mg/mL	100μg
			500μg
			1mg
			5mg
			10mg
DTM01	MYC标签抗体	0.5mg/mL;1mg/mL	100μg
			500μg
			1mg
			5mg
			10mg