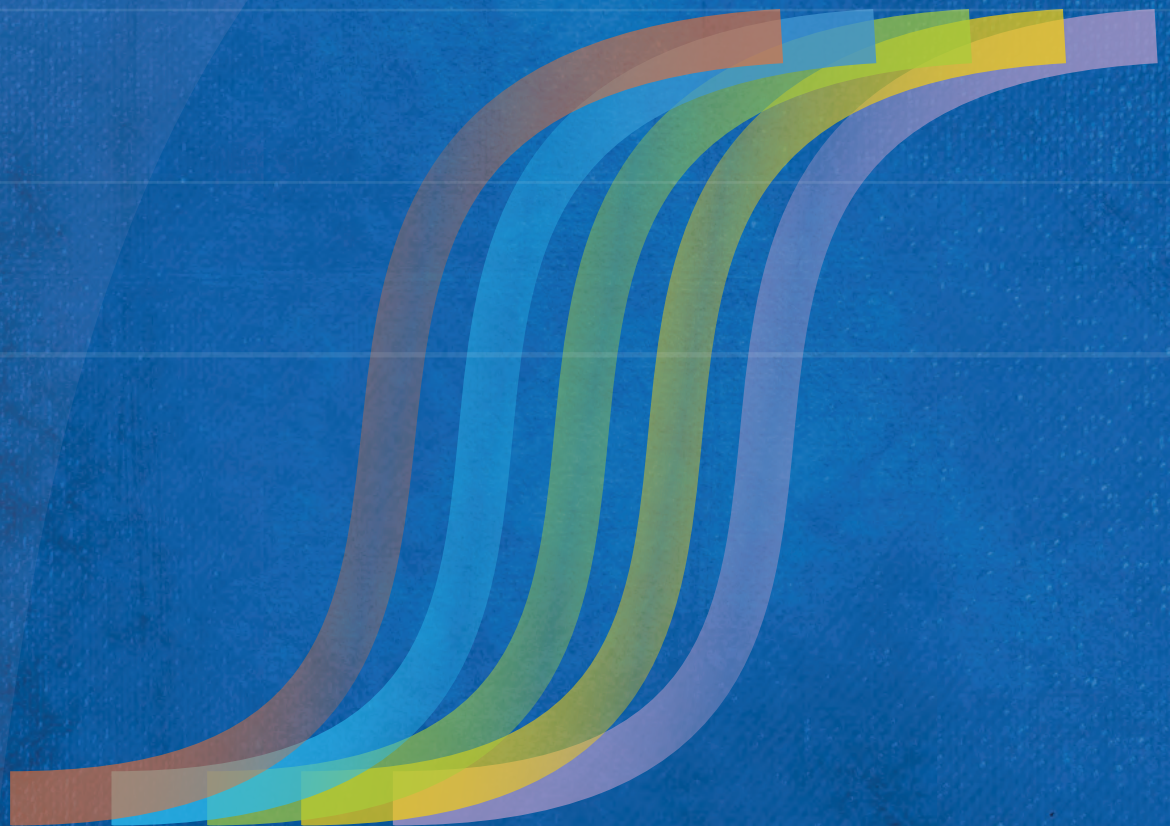


Innovation for Real Time PCR

1. Real Time PCR基础知识
2. MIQE guidelines
3. Real Time PCR troubleshooting

that's
GOOD
science!®



Clontech TAKARA cellartis

完善的Real Time PCR解决方案!

Step 1 高效的DNA、RNA提取

RNA提取

去除基因组DNA的total RNA提取

TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit

高收量的total RNA提取

RNAiso Plus

DNA提取

高品质基因组DNA提取

TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit

组织破碎用TaKaRa BioMasher Standard

Step 2 高效的cDNA合成

仅用于定量PCR的cDNA合成

去除基因组DNA的cDNA合成

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)

15分钟即可完成cDNA合成

PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)

RT引物可选择的cDNA合成

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)

全长cDNA合成

适用于初次实验者

PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit

40分钟即可完成
定量反应

Thermal Cycler Dice™
Real Time System III



Step 3 提供丰富选择的Real Time PCR试剂

TB Green™ Premix

高特异性, 扩增范围广

TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)

快速qPCR

TB Green™ Fast qPCR Mix

适用于高GC含量的目标基因

TB Green™ Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time)

有效抑制引物二聚体

TB Green™ Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time)

Dual-labeled Probe

有效抑制PCR阻碍物

Probe qPCR Mix

引物探针设计合成验证一条龙服务



与Takara一起
进入qPCR!

SUCCESS!

目 录

完善的Real Time PCR解决方案

封二

一、Real Time PCR基础知识

P3-P15

- | | |
|-----------------------|-----|
| 1. Real Time PCR的原理 | P4 |
| 2. Real Time PCR的检测方法 | P5 |
| 3. Real Time PCR的实验方法 | P7 |
| 4. Real Time PCR的解析方法 | P11 |

二、MIQE guidelines

P16-P18

- | | |
|----------------------|-----|
| 1. MIQE guidelines介绍 | P17 |
| 2. MIQE checklist | P17 |

三、Real Time PCR troubleshooting

P19-P23

Real Time PCR相关制品附录

P24-封底

前言

Real Time PCR，即实时监测PCR扩增产物并进行解析的方法，至今已经成为基因表达解析的必要手段。Real Time PCR秉承及发展了普通PCR的快速、高灵敏度检出等全部优点，同时克服了普通PCR不能准确定量、容易污染等的不足，可以说Real Time PCR使PCR技术发生了质的飞跃，扩展了PCR技术的应用范畴，是一种具有划时代意义的技术。

Real Time PCR技术最早报告在1992年，是由日本人Higuchi提出的。当时他的想法就是想实时观察PCR反应的全过程，最终达到检测样品中的DNA量的目的。他使用了EB（溴乙锭）作为荧光标记染料，利用了PCR反应中的数学函数关系，再结合加入标准品的方法，达到了对检测样品进行准确定量的目的。

1995年美国PE公司成功研制了TaqMan技术，1996年又推出了首台Real Time PCR检测系统，使Real Time PCR技术真正得以应用和推广。近年，Real Time PCR技术不断完善，取得了突飞猛进的发展。由于其具有操作简单、快速方便、灵敏度高、重复性好、污染率低等优点，被广泛应用于医学检测、药物疗效考核、基因表达研究、转基因研究、基因检测、病原体检测、动植物检测、食品检测等各种领域。

本手册向您介绍

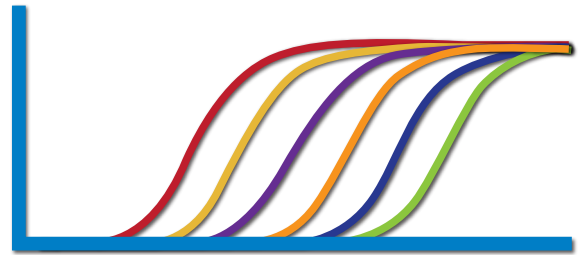
- 一、Real Time PCR基础知识；
- 二、MIQE guidelines；
- 三、Real Time PCR troubleshooting。

更多资讯请登录Takara官网查询。



一、Real Time PCR基础知识

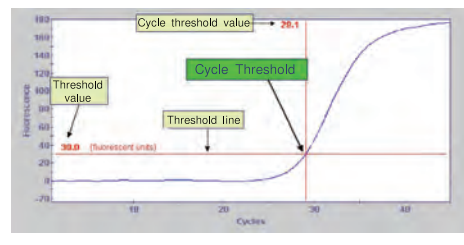
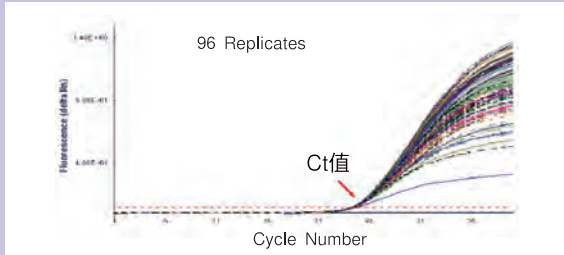
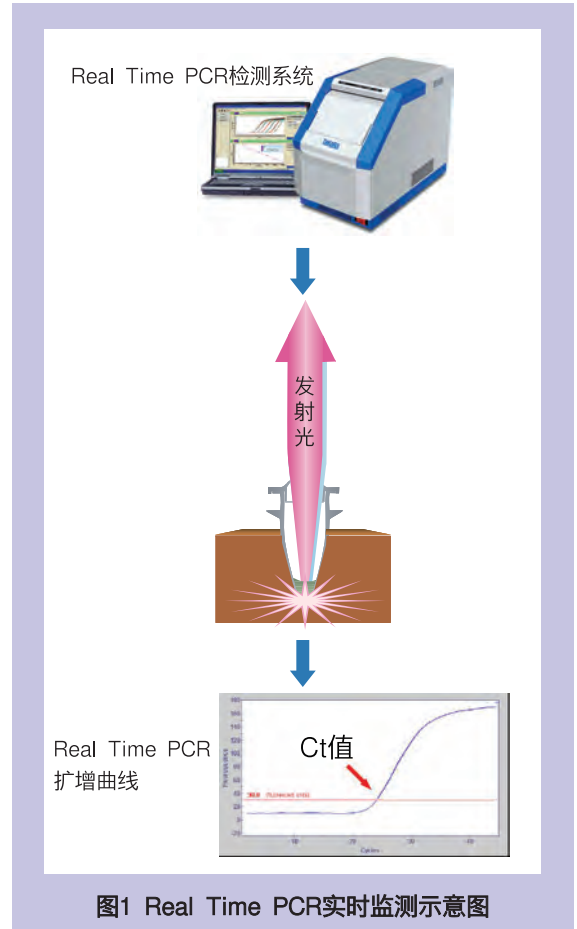
1. Real Time PCR的原理
2. Real Time PCR的检测方法
3. Real Time PCR的实验方法
4. Real Time PCR的解析方法



1. Real Time PCR的原理

Real Time PCR，即实时监测PCR扩增产物并进行解析的方法。如图1所示，它是在PCR反应体系中加入荧光物质，并通过Real Time PCR检测系统对PCR反应进程中的荧光信号强度进行实时监测，最终对实验数据进行分析处理的方法。

描述PCR动态进程的曲线即扩增曲线。PCR的扩增曲线实际上并不是一条标准的指数曲线，而是S形曲线（见图1）。这是因为随着PCR循环数的增加，DNA聚合酶的失活、dNTP和引物的枯竭、反应副产物焦磷酸对合成反应的阻害等原因，致使PCR并非一直呈指数扩增，而最终将进入平台期。由于影响PCR扩增的因素错综复杂，因此每次PCR扩增时进入平台期的时机及信号高低变化很大，很难准确控制。图2是同一样品重复进行96次Real Time PCR扩增时的实时监测结果，从这张图上我们可以看出，尽管平台期的变化很大，但在扩增曲线的指数增长区的某一区域，重复性非常好，这对PCR的定量分析非常重要。如果在扩增曲线的指数增长区适当位置设定荧光检出界限值，即阈值（Threshold），就会得到阈值与扩增曲线的交点Ct值，Ct值是指达到阈值时的循环圈数（Threshold Cycle）（见图3）。经数学理论证明，Ct值与起始模板数的对数值成反比线性关系。



在定量分析上，Real Time PCR与以往普通PCR的终点定量法的本质区别，在于可以实时监控PCR扩增产物，并且在指数扩增期进行准确定量。以下对定量原理进行简单说明（见图4所示）。

PCR每进行1个循环，DNA呈2倍的指数关系增长，不久达到平台期。起始DNA量越多扩增产物量便越早达到检出值，也就是扩增曲线越早起峰。我们将已知浓度的标准品梯度稀释进行Real Time PCR，就会按照起始DNA量由多到少的顺序等间隔得到一系列扩增曲线。再由Ct值与起始模板数的对数值之间存在的线性关系，就可以制作成下图所示的标准曲线。未知浓度的样品与标准品相同，也可以得到Ct值，并将Ct值代入标准曲线，就可以求出未知浓度样品的起始模板量，这就是Real Time PCR的定量原理。

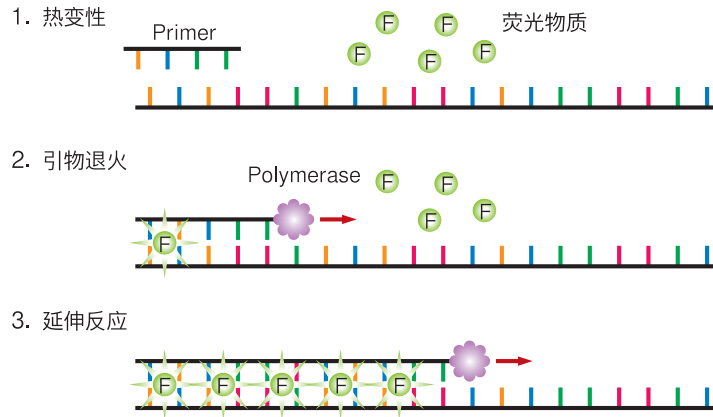


2. Real Time PCR的检测方法

Real Time PCR是通过检测反应体系中的荧光强度来检测PCR扩增产物的，其荧光检出方法可分为荧光嵌合法和荧光探针法两大类。

2.1 荧光嵌合法(TB Green™)的原理

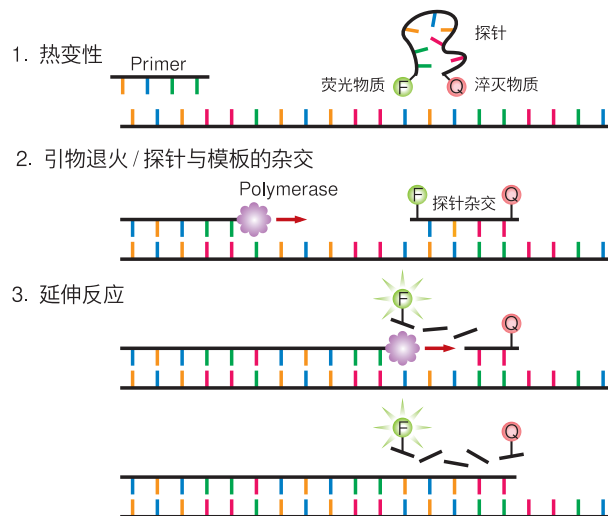
TB Green™（嵌合法）能与双链DNA非特异性结合，结合后发出荧光，通过检测反应体系中加入的TB Green™荧光强度，不但可以检测反应体系中的DNA扩增量，同时还能测定到扩增产物的DNA融解温度。



2.2 荧光探针法的原理

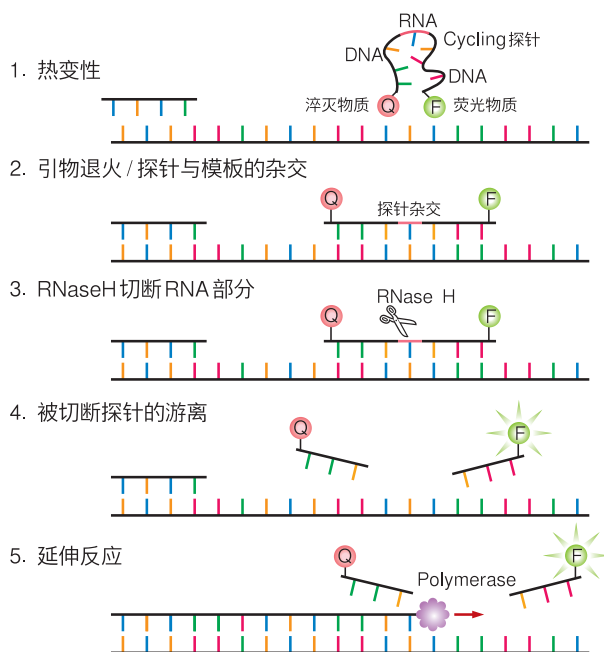
荧光探针法是使用5'端带有荧光基团（如：FAM等），3'端带有淬灭基团（如：TAMRA等）的探针进行荧光检测的方法。当探针完整时，5'端的荧光基团发射的荧光被3'端淬灭基团淬灭，不能发出荧光。而当探针被分解后，5'端的荧光物质便会游离出来，发出荧光。

当PCR反应液中加入荧光探针后，在PCR反应的退火过程中，荧光探针便会和模板杂交。进一步在PCR反应的延伸过程中，DNA聚合酶的5'→3' Exonuclease活性可以分解与模板杂交的荧光探针，游离的荧光物质便会发出荧光。通过检测反应体系中的荧光强度，可以达到检测PCR产物扩增量的目的。



2.3 Cycling探针法的原理

Cycling Probe法是由DNA/RNA嵌合探针与RNase H组合使用的高灵敏度检出法，能够高效率地检出扩增过程中及扩增结束时的目的基因片段。Cycling Probe内部含有RNA碱基，一端标记荧光基团，另一端标记淬灭基团，当探针处于完整状态时，荧光基团发射的荧光被淬灭基团所淬灭，但当探针与扩增产物中的互补序列杂交后，RNase H在RNA碱基处将探针切断，淬灭作用解除，荧光物质发出荧光。通过测定荧光强度，能够实时监控扩增产物量。如果探针的RNA碱基部分与模板不匹配，RNase H就不能在RNA碱基处将探针切断，所以该检出方法是一种即使一碱基不同也能识别的高特异性检出方法，特别适合于SNP解析。



2.4 荧光检测方法的选择

必须根据具体的实验用途进行选择。如果用于区别同源性高的序列以及进行SNP分型解析等多重PCR检测，荧光探针法无可替代，而进行除此之外的Real Time PCR实验，我们推荐使用简单易行、成本低的荧光嵌合法。可以参考如下信息：

	嵌合荧光法	荧光探针法
优点	简单易行，成本较低，无需合成特异性探针。	特异性强，能进行多重PCR。
缺点	对扩增的特异性要求高；不能进行多重PCR。	需要设计特异性探针，成本较高；有时探针设计困难。

3. Real Time PCR的实验方法

3.1 Two Step RT-PCR和One Step RT-PCR的选择

Real Time RT-PCR反应可选择Two Step RT-PCR反应或One Step RT-PCR反应（见图5），Two Step RT-PCR反应是将反转录反应和Real Time PCR反应分两步进行。进行Two Step RT-PCR反应时，可选择Random Primer、Oligo dT Primer或基因的特异性引物进行反转录反应，然后再将一部分反转录反应液（cDNA）作为模板添加到Real Time PCR反应液中。使用反转录引物时可以根据实验目的选择最合适的反转录引物，如果选择Random Primer或Oligo dT Primer，合成的cDNA可用于复数种类基因的检测，cDNA溶液可以稳定地长期保存，供以后解析使用。

One Step RT-PCR的反转录反应和PCR反应在同一反应管内连续进行，操作简单，污染几率低。另外，由于反转录反应引物使用的是基因的特异性PCR下游引物，因此，能够对特定基因进行高感度检出。

以前，Two Step RT-PCR的反应性能占有优势，但近些年来由于对试剂盒的不断改良，One Step RT-PCR也能够实现良好的反应性能。究竟采用何种方法，可根据实验目的自由选择。例如，基因表达解析等目的基因数多时，适合使用通用引物的Two Step RT-PCR方法；样品数多时，Two Step RT-PCR的操作显得过于烦杂，而One Step RT-PCR就很方便。另外，One Step RT-PCR因使用基因特异性反转录引物，Total RNA的添加量即使很多，也能够高效率反应，所以，有利于低表达基因的检出。

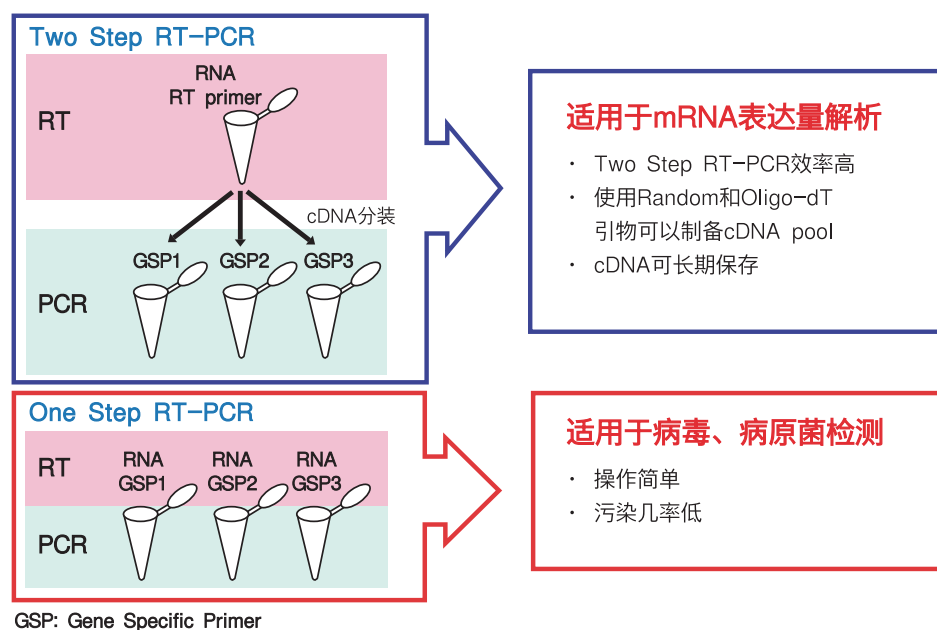


图5 Two step RT-PCR反应和One step RT-PCR反应图例

3.2 反转录Primer的选择

进行Two Step RT-PCR反应时的反转录Primer，可使用Random Primer、Oligo dT Primer或Gene Specific Primer三种引物，它们与RNA模板互补结合的位置关系如图6所示，我们必须根据实验目的区分使用。

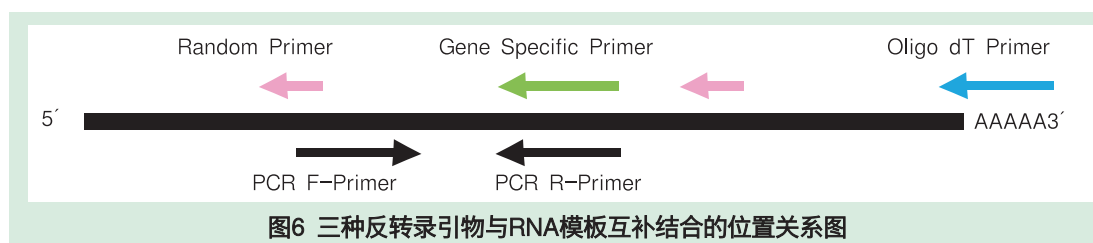


图6 三种反转录引物与RNA模板互补结合的位置关系图

Random Primer:

通常基因表达解析，Random Primer最适合。Random Primer能够在mRNA全长范围内进行高效率反转录，所以不管目的片段在mRNA的任何位置都能很好地进行表达解析。

Oligo dT Primer:

想从Poly (A) 尾开始反转录反应时，使用Oligo dT Primer。但是如果目的片段距离Poly (A) 尾过远，反转录效率将会降低。所以，Oligo dT Primer最好与在距离Poly (A) 尾1.5 kb以内的PCR引物组合使用。但从Poly (A) 尾至目的片段扩增位置之间存在强二级结构或mRNA有分解可能的时候，使用Oligo dT Primer要特别注意。

Gene Specific Primer:

进行One Step RT-PCR反应时的反转录引物只能使用基因特异性下游引物，而不能使用Random Primer和Oligo dT Primer。对于基因表达解析这样的复数基因检测，不适合使用Gene Specific Primer。

利用Real Time RT-PCR进行基因表达解析时，将Random Primer和Oligo dT Primer混合使用效果更佳，不仅可以在mRNA全长范围内高效率反转录，还可以将受mRNA二级结构及mRNA分解的影响控制在最小限度。

RR037和预混型RR036使用Oligo dT Primer和Random 6 mers，合成的cDNA偏差很小。不论距离polyA近或远的基因，都可高效进行Real Time PCR检测。

3.2.1 Total RNA中有基因组DNA混入时如何处理？

提取的Total RNA中常常混有基因组DNA，而基因组DNA可以直接作为PCR模板进行扩增，造成解析结果不准确。为了避免这种情况发生，我们必须采取如下两种措施：① 引物设计时避免基因组DNA扩增；② 使用DNase I 处理除去基因组DNA。

① 引物设计时避免基因组DNA扩增

我们可以利用基因组DNA具有外显子和内含子的结构，在引物设计上下工夫，使PCR反应时不能扩增基因组DNA（原理见图7）。此时我们首先应确认目的基因的基因组结构，选择跨越较长的内含子。然后，在这个内含子两侧的外显子上分别设计上游、下游引物。Real Time PCR反应时通常扩增的目的DNA片段长度都比较短，设置的条件也是适合短片段DNA的扩增，超过500 bp就很难扩增了。所以，当内含子足够长时，基因组DNA来源的扩增就不能发生；当内含子较短时，可将其中一条引物设计在exon junction上，这样，基因组DNA来源的扩增也不能发生。但是，此种方法不适合具有单个外显子的基因、或者不具有内含子的生物种以及基因组情报没被解析的生物种等，此时必须采取②的方法解决。

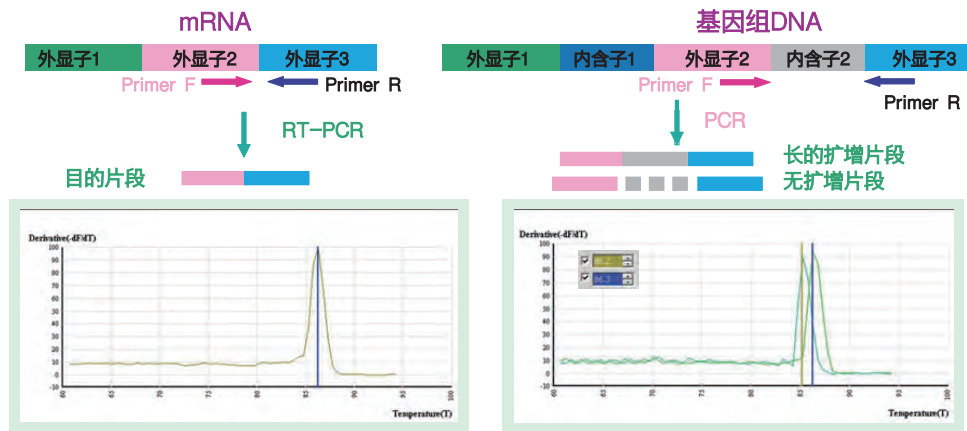


图7 避免基因组DNA扩增的原理图

②使用DNase I 处理除去基因组DNA

使用常规方法提取Total RNA后，再使用DNase I 分解混入的基因组DNA，最后进行苯酚/氯仿抽提、乙醇沉淀等纯化Total RNA。或者使用能去除基因组DNA的反转录试剂进行反转录反应。RR047 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 是可以除去基因组DNA进行Real Time RT-PCR反应的专用反转录试剂。

- 使用RR047试剂盒中自带的gDNA Eraser即可高效去除残留的基因组DNA。
- 仅需42°C、2分钟即可去除基因组DNA！反转录反应需15分钟！

3.3 Real Time PCR反应

3.3.1 采用荧光嵌合法的Real Time PCR反应

① 引物设计

引物设计的优劣，是影响实验结果的最重要因素。有些引物反应性能差，可以通过反应条件优化得到改善，但大多数情况改善效果并不是很明显，所以，预先设计反应性能良好的引物尤为重要。

引物设计的关键点有如下三点：

- 必须与目的DNA序列稳定地退火：T_m值和GC含量在适当范围。
- 引物利用效率高：引物内部和上、下游引物之间无互补序列。
- 特异性高：DNA模板上不存在与引物的错配部位。

除此之外，引物的长度、扩增片段长度以及前面叙述的基因组结构等参数都要加以考虑，表1总结了引物设计原则，

★号表示重要程度，★号越多，表示该参数越重要，设计时要优先考虑。

表1 引物设计原则

扩增片段大小	★★	80–150 bp (尽量限制在300 bp以内)
Primer长度	★★	17–25 base
GC含量	★	40–60% (最好45–55%)
T _m 值	★★★★	两条引物的T _m 值尽量接近，应用专用软件计算T _m 值
序列	★	· 整体上碱基不能过偏
		· 局部避免GC rich或AT rich (特别是3'端)
		· 避免T/C连续, A/G连续
3'末端序列	★★	· 3'末端避免GC含量过高
		· 3'末端碱基最好为G或C
		· 3'末端碱基尽量避免为T
互补性	★★★★	· 引物内部或两条引物之间避免3 base以上的互补序列
		· 引物3'末端避免2 base以上的互补序列
特异性	★★★★	使用BLAST检索，确认引物特异性
引物设计位置	★★	尽量在Exon junction上设计引物，限制基因组DNA扩增

考虑以上各参数设计引物，必须使用引物设计专用软件。如果想省去自己设计引物的繁杂操作，可以有效利用[Takara引物设计合成验证一条龙服务](#)。详情请登录Takara官网查询。

② Real Time PCR试剂选择

Real Time PCR试剂的选择，也是实验成功的关键点，详情请参见附录部分介绍。

③ 引物的反应性确认

新设计合成的引物，首先必须进行反应性确认。为了确认PCR扩增效率和检测灵敏度，建议使用按6个浓度梯度稀释的模板，同时，要设置No Template Control (NTC) 反应，确认是否产生引物二聚体。模板使用梯度稀释的cDNA溶液即可，每个反应加入相当于Total RNA 1 pg、10 pg、100 pg、1 ng、10 ng、100 ng的cDNA。反应结束后，对如下4项进行确认。

● PCR扩增效率

从标准曲线的斜率计算出扩增效率。扩增效率指标：0.8 < E < 1.2，越接近于1越理想。

● 检测灵敏度

确认定量可能范围，即确认可以进行良好扩增的PCR循环数。采用荧光嵌合法检测时，以开始出现引物二聚体等非特异性扩增作为定量界限，以后的循环就不能进行准确定量。如果至35 Cycles无非特异性扩增时，说明定量可能范围宽；而在30 Cycles之前就有非特异性扩增产生时，定量可能范围变窄，必须进行条件优化或重新设计引物。

· No Template Control

与上述的「检测灵敏度」相同，如果在30 Cycles之前有引物二聚体产生，定量可能范围变窄，必须进行条件优化或重新设计引物。

· 基因组来源的扩增

通过融解曲线分析，确认是否进行了基因组来源的DNA模板扩增。如果有基因组来源的扩增，必须对Total RNA进行DNase I处理，或者使用能去除基因组DNA的反转录试剂以除去Total RNA中混入的基因组DNA。

④ PCR条件优化顺序

如果引物的反应性确认实验显示，PCR扩增效率低或有引物二聚体等非特异性扩增时，需要对PCR条件进行优化，其优化顺序可以按图8的顺序进行。如果条件优化后结果仍无改善，必须重新设计引物。

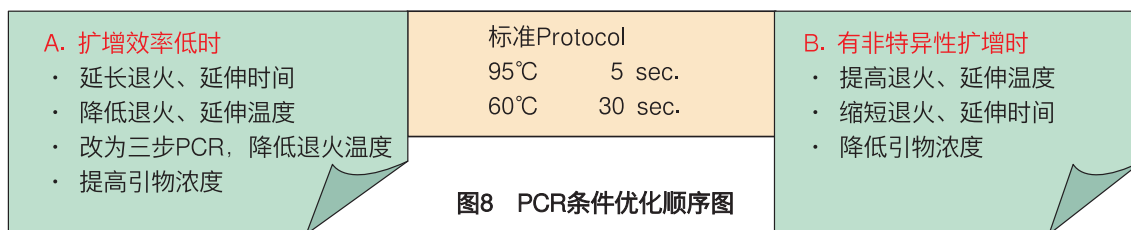


图8 PCR条件优化顺序图

3.3.2 采用荧光探针检测法的Real Time PCR反应

① 引物·探针设计

采用荧光探针检测法要同时考虑引物和探针的质量。通常首先要寻找合适的探针位置，再进行引物的设计，然后再将引物和探针之间进行比对分析，应该说设计上比采用荧光嵌合法更加困难和烦琐。表2总结了探针设计原则，★号表示重要程度，★号越多，表示该参数越重要，设计时要优先考虑。

表2 探针设计原则

Probe 长度	★★	20–24 base
Tm 值	★★★★	探针的Tm值比引物高8–10°C
序 列	★	<ul style="list-style-type: none"> · 目的序列GC含量相对较高的区域设计 · 整体上碱基不能过偏 · 局部避免GC rich或AT rich（特别是3'端）；避免T/C连续，A/G连续
5' 末端序列	★	探针5'末端的第一个碱基不能是G
互补性	★★★★	· Probe内部或Probe与两条引物之间避免3 base以上的互补序列
特异性	★★★★	BLAST检索确认Probe特异性

引物·探针设计也必须使用专用软件。如果想省去自己设计引物的繁杂操作，可以有效利用Takara引物探针设计合成验证一条龙服务。详情请登录Takara官网查询。

② Real Time PCR试剂的选择

探针法Real Time PCR试剂请参考附录部分。

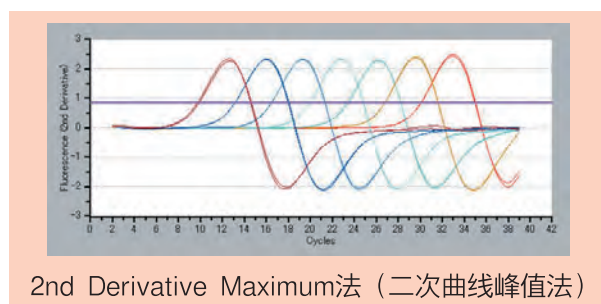
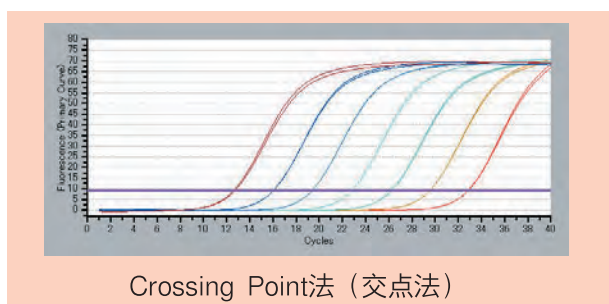
③ 引物·探针的反应性确认

新设计合成的引物·探针必须进行反应性确认，其确认顺序与采用荧光嵌合法基本相同。实验开始前，应使用TB Green™代替探针先对引物反应性进行确认。虽然探针检测法不能检出非特异性扩增产物，但容易产生非特异性扩增的引物（扩增效率和检出灵敏度低）最好也不要使用。

4. Real Time PCR的解析方法

4.1 Ct值的计算方法

Ct值的计算方法有两种。一种是交点法（Crossing Point法），是通过阈值和扩增曲线的交点计算Ct值的方法。另一种是二次求导法（2nd Derivative Maximum法），是通过扩增曲线二次求导后取其最大的点计算Ct值的方法。交点法因为是在指数扩增区域的任意位置设定阈值而进行解析，其Ct值会随着阈值的设定位置不同而发生变化，所以容易产生较大的实验间的误差。二次求导法因为是以扩增速度的变化率最大点计算Ct值，不会随阈值的设定不同而变化，所以重现性高。另外，还能排除仪器检出误差的影响，是一种高准确度的计算方法。但是，并不是所有厂家的定量PCR仪都具有通过二次求导法计算Ct值的功能，仅限于部分厂家的仪器。例如，Takara公司的Thermal Cycler Dice Real Time System、Cepheid公司的Smart Cycler、Roche公司的LightCycler等。

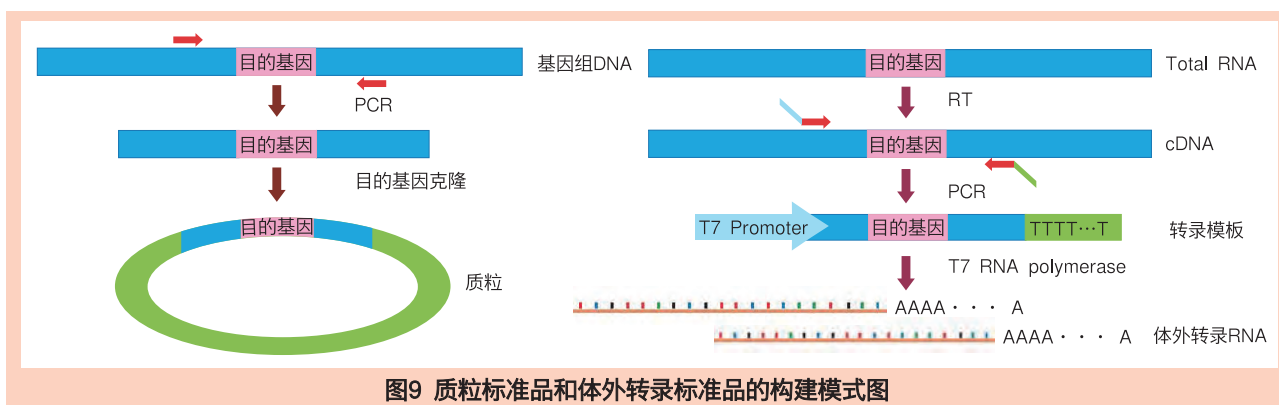


4.2 标准曲线分析

4.2.1 制作标准曲线使用的标准品种类

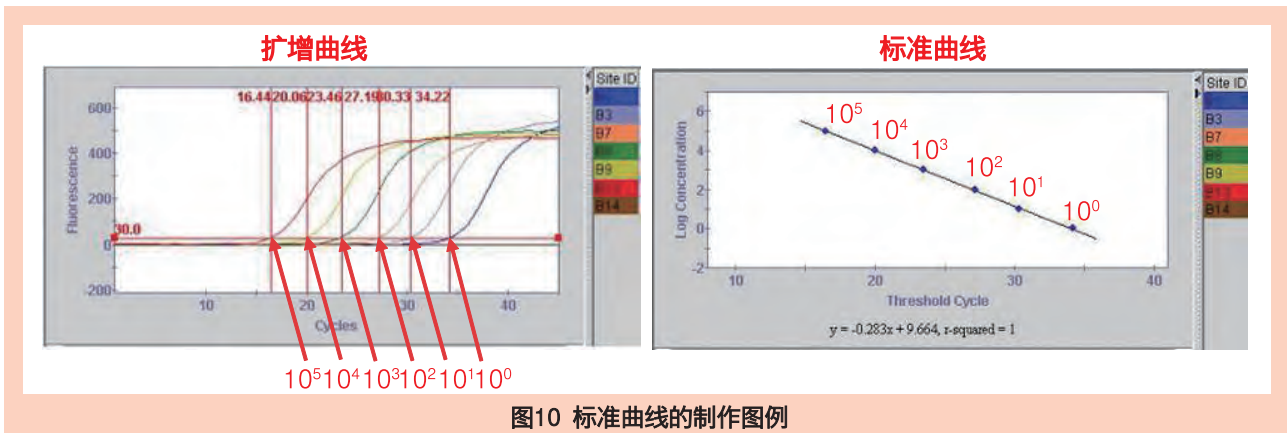
制作标准曲线首先要选择标准品。为了保持与实际检测样品间的扩增效率的一致性，作为标准品应尽量选择与实际检测样品结构近似的样品。例如，以基因组DNA为起始材料时就要选择基因组DNA作为标准品，进行mRNA表达解析时最好选择表达目的基因的Total RNA（或以Total RNA为模板合成的cDNA）作为标准品。但是，当这样的标准品材料获得较为困难或目的基因的丰度较低时，对于DNA起始的材料必须构建质粒，对于RNA起始的材料必须构建体外转录RNA。

同时，所构建的质粒或体外转录RNA，不仅具有目的序列，还要在目的序列的两侧各多加一段序列，使其更加接近实际检测样品的结构，以保持与实际检测样品间的扩增效率的一致性（如图9所示）。



4.2.2 标准曲线制作方法

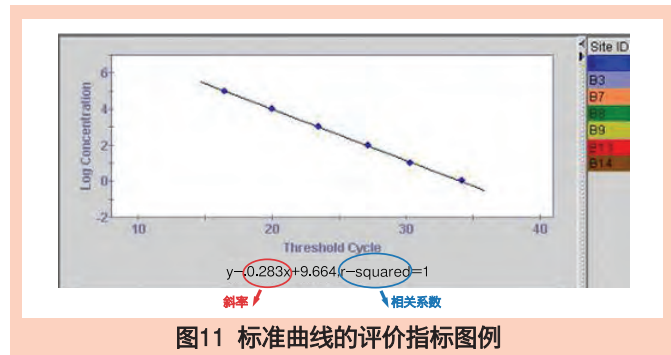
如图10所示，制作标准曲线首先必须准备5~6个梯度稀释的标准品，然后将这些标准品作为模板进行Real Time PCR反应，得到各自的Ct值，通过Ct值与起始模板浓度的对数值之间存在的线性关系，就能够制作出标准曲线。标准曲线的制作不需要人工操作，由仪器自动完成。



4.2.3 理想的标准曲线

评价标准曲线的优劣有两个指标，相关系数 (r^2) 和斜率 (slope)。如图11所示，相关系数反映标准曲线的直线性，理想值应大于0.98，越接近于1说明直线性越好，定量越准确。斜率反映PCR扩增效率 (E)，PCR理想的扩增效率应在 $0.8 < E < 1.2$ 范围，如果PCR扩增效率低时必须重新设计引物；如果PCR扩增效率比理论值高时，说明反应体系中有可能存在对反转录反应或PCR反应的阻害物质，需要改进提取方法。

有些Real Time PCR装置，能够通过标准曲线得到的斜率自动换算出PCR扩增效率。有些Real Time PCR装置，没有给出PCR扩增效率，我们也可以通过标准曲线得到的斜率按公式自己计算出PCR扩增效率。不同Real Time PCR装置X轴和Y轴代表的含义不同，公式也分两种。



标准曲线X轴表示起始模板浓度(log10)，Y轴表示Ct值时：
 $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$
标准曲线X轴表示Ct值，Y轴表示起始模板浓度(log10)时：
 $E = 10^{-\text{slope}} - 1$

4.3 融解曲线分析

4.3.1 融解曲线分析方法

采用TB Green荧光嵌合法检测时，可以通过融解曲线分析，确认PCR反应的特异性。如图12所示，融解曲线分析是在PCR反应结束后，将PCR反应液的温度渐渐升高，实时监测TB Green的荧光信号强度变化进行的。起初由于PCR扩增产物呈双链，具有较高的荧光信号强度，随着温度的渐渐升高，DNA双链渐渐打开，嵌入DNA双链中的TB Green数量减少，荧光信号强度就渐渐降低，当双链DNA解链一半时，荧光信号强度急剧下降，此时的温度即融解温度 (T_m 值)， T_m 值与PCR扩增产物的序列有关，对于某一PCR扩增产物，其值是固定的。左图为融解曲线的一次曲线，右图为融解曲线的负一次微分曲线，通常使用融解曲线的负一次微分曲线进行融解曲线分析的较多。

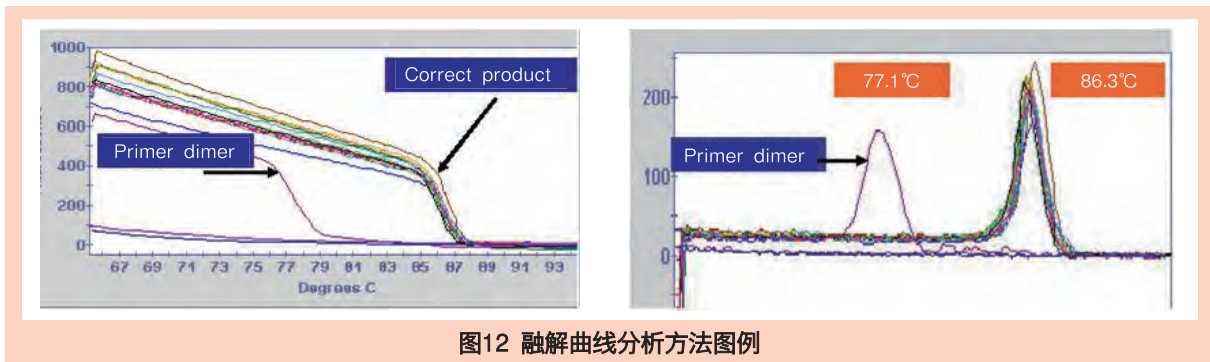


图12 融解曲线分析方法图例

4.3.2 理想的融解曲线

理想的融解曲线应该是只有单一峰型的曲线（如图13的左侧图所示），如果出现两个以上的峰型，说明有引物二聚体等非特异性扩增产生（如图13的中间及右侧图所示），需要对条件进行优化或重新设计引物（也有特例情况，我们会在troubleshooting的部分介绍）。

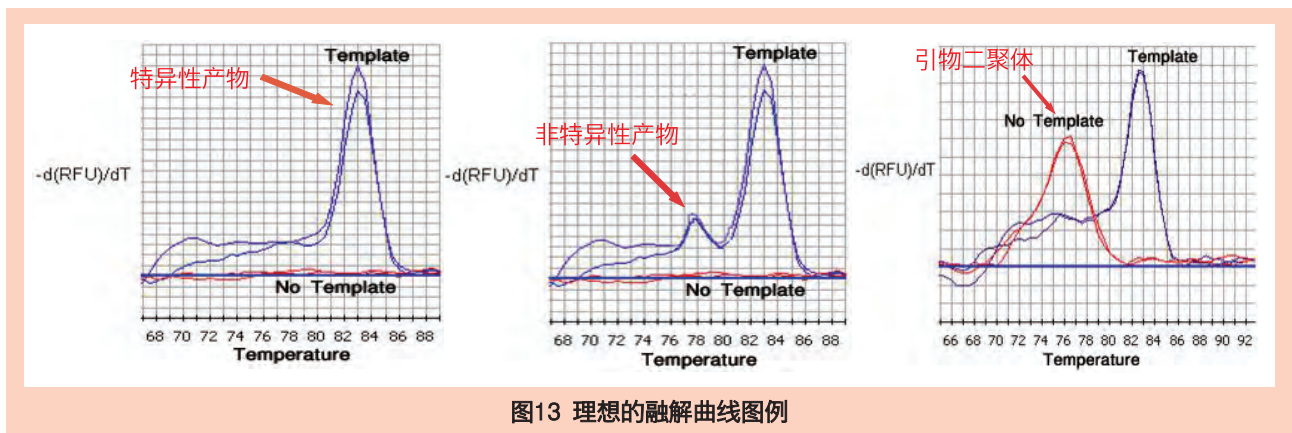


图13 理想的融解曲线图例

4.4 绝对定量和相对定量解析方法

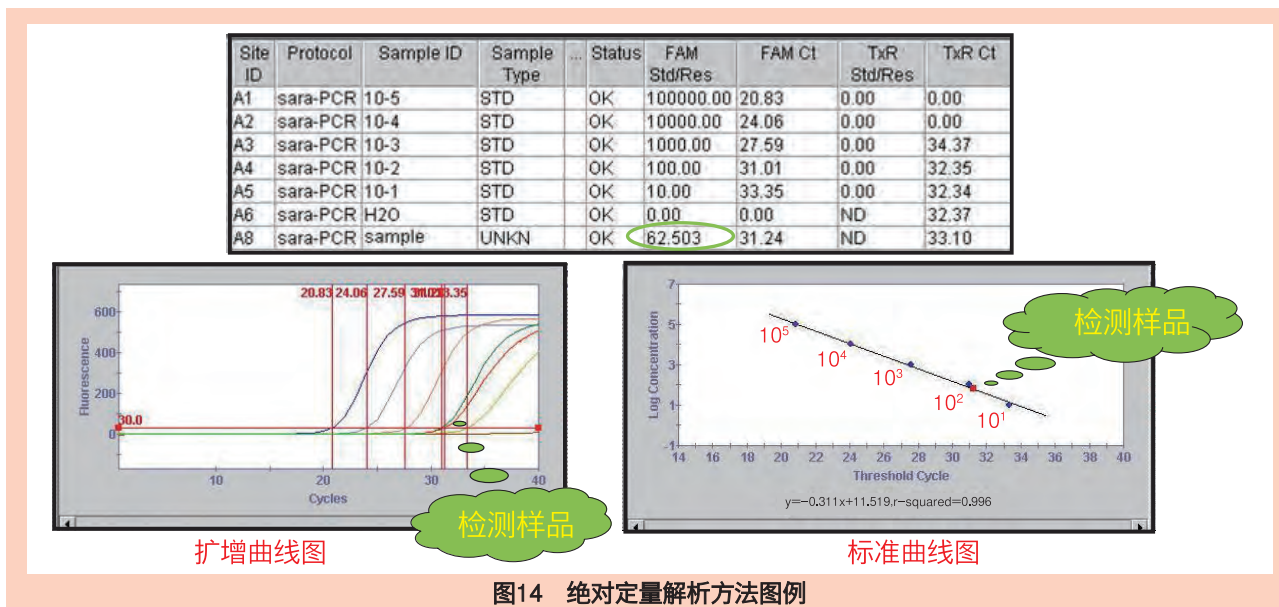
4.4.1 绝对定量和相对定量的区别

定量方法可以区分为绝对定量和相对定量两大类。绝对定量是对未知样品的绝对量（拷贝数）进行测定的方法；而相对定量，并不是测定基因的绝对量，而是分别测定目的基因和参比基因的量，再求出对于参比基因的目的基因的相对量，最后再进行样品间相对量的比较。

我们不能简单地说绝对定量准确还是相对定量准确，而只能说它们的应用领域不同。绝对定量应用于病毒病原菌定量检测、转基因拷贝数分析、GMO定量分析等领域；相对定量主要应用于mRNA表达量解析，如果此时采用绝对定量的方法，就不能得到准确的解析结果。

4.4.2 绝对定量解析方法

绝对定量解析方法相对简单。绝对定量是使用已知浓度的标准品制作标准曲线，对未知浓度的样品进行绝对量（拷贝数）测定的方法。所以，绝对量（拷贝数）已知并含有未知样品序列的标准品是必要的。关于使用标准品制作标准曲线的方法，我们在4.2部分已经详细地进行了介绍，这里不再赘述。如图14所示，未知浓度的样品只要与标准品同时进行反应，将扩增曲线得到的Ct值代入标准曲线，就可以得到未知样品的绝对量（拷贝数）。



4.4.3 相对定量解析方法

A. 相对定量的必要性

相对定量解析方法相对复杂，一般用于基因表达解析。首先应分别测定目的基因和参比基因的量，再求出对于参比基因的目的基因的相对量，最后再进行样品间相对量的比较。

不同的样品，即使反应时使用相同量的Total RNA，但因细胞来源不同，RNA的总表达量并非一致。因此仅仅将反应时RNA量统一，起始的细胞数也不一定相同。而进行表达量比较时，不是RNA量相同，而是相同细胞数的RNA才是最重要的。实际上要将样品材料（组织、细胞、菌体等）统一到相同细胞数提取，是非常困难的。同时还不能保证RNA提取效率完全相同、PCR扩增效率完全相同等。基于以上原因，利用Real Time RT-PCR方法进行基因表达解析，有必要选择House Keeping Gene（管家基因）作为参比基因来对所有样品进行归一化处理（RNA量校正），然后再对不同样品之间的目的基因表达量进行比较。目前，相对定量解析大多采用标准曲线的定量方法，但也有不采取制作标准曲线的定量方法（如 $\Delta\Delta Ct$ 方法等）。

B. 相对定量的校正方法

以前，GAPDH， β -actin基因常被作为管家基因使用，但近几年也常有这些基因因样品经药物等处理后表达量发生变化的报道。目前，很多研究者认为一种管家基因有可能校正不充分，同时使用两个或两个以上的复数管家基因进行校正更值得信赖。当然这种校正方法也是非常耗费精力的，通常要选择若干个管家基因同时进行表达量分析，从中选择表达量变化幅度小的管家基因来使用。选择最适校正基因的软件有很多，请下载利用（geNorm、BestKeeper等）。

C. 相对定量的解析顺序

我们用一个实验例，来对相对定量的解析顺序进行说明。

该实验是对三个RNA样品A、B、C之间的“目的基因X”的mRNA表达量进行比较。我们选择了“管家基因H”进行RNA量的校正。

① 原始定量结果

如表3及图15所示，分别使用目的基因X和管家基因H的6个浓度梯度稀释的标准品，制作两条标准曲线。样品A、B、C与标准品同时进行反应，得到的目的基因的Ct值代入目的基因的标准曲线，得到的管家基因的Ct值代入管家基因的标准曲线，就可以换算出各自的起始模板量（见表3 定量结果*1）。

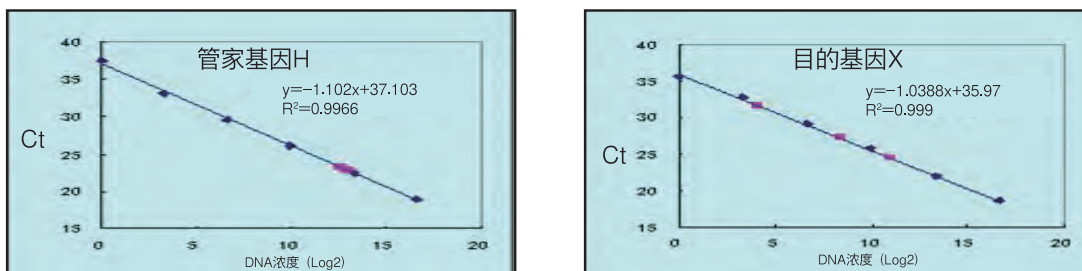


图15 目的基因X和管家基因H的原始定量结果

表3 目的基因X和管家基因H的原始定量结果

	目的基因X			管家基因H		
	已知量	Ct	定量结果 ^{※1}	已知量	Ct	定量结果 ^{※1}
标准品1	1	35.66		1	37.46	—
标准品2	10	32.77		10	33.06	—
标准品3	100	29.20		100	29.69	—
标准品4	1000	25.75		1000	26.10	—
标准品5	10000	22.06		10000	22.51	—
标准品6	100000	18.62		100000	18.88	—
Sample A	—	27.22	343.3	—	23.17	6391.5
Sample B	—	31.70	17.3	—	22.70	8589.7
Sample C	—	24.62	1946.1	—	22.93	7432.9

② 计算校正值

正如前面所述，利用Real Time RT-PCR方法进行基因表达解析，必要选择House Keeping Gene作为参比基因来对所有样品进行归一化处理（RNA量校正），再对不同样品之间的目的基因表达量进行比较。校正方法如表4所示，用目的基因X的定量结果除以管家基因H的定量结果即可得到校正值（见表4 校正值^{※2}）。

表4 校正值和相对量的计算方法

检测样品	管家基因H		目的基因X	
	定量结果 ^{※1}	定量结果 ^{※1}	校正值 ^{※2}	相对量 ^{※3}
RNA样品A	6391.5	343.3	0.0537	1.000
RNA样品B	8589.7	17.3	0.0020	0.037
RNA样品C	7432.9	1946.1	0.2618	4.874

③ 计算相对量

相对量的计算方法如表4所示，为了使样品之间的表达量更容易地进行比较，通常将对照样品的表达量作为“1”，计算出相对量，再进行样品间相对量的比较（见表4 相对量^{※3}）。

④ 图表制作

为了更直观地表示各个样品的相对表达量差异，最后可以将计算得到的相对量用图表的形式表示（如图16所示）。

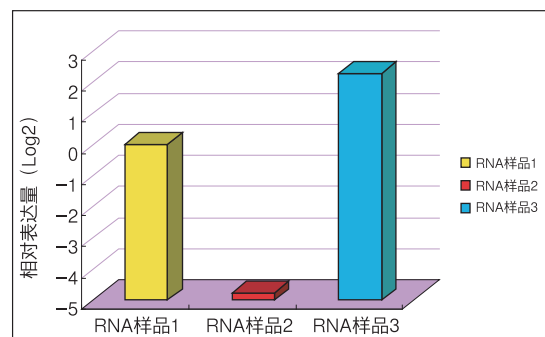
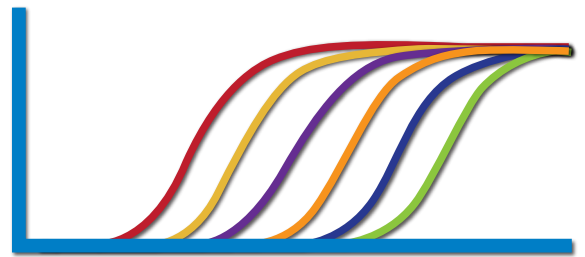


图16 相对定量解析结果



二、MIQE guidelines

1. MIQE guidelines介绍
2. MIQE checklist



1. MIQE guidelines介绍

虽然Real Time PCR (qPCR) 技术在短短数十年间迅速普及，但是对于如何最好地执行和解释定量实时PCR (qPCR) 实验缺乏共识。加上许多出版资料上缺乏足够的实验细节，这也妨碍了读者对实验细节的了解，更影响了该实验的重复性。

因此，MIQE (The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) 应运而生。该准则的目标是保证结果的可靠性，以确保科学文献的完整性，促进实验室之间数据的一致性，并增加实验透明度。

MIQE guidelines提供了对qPCR实验评价的基本信息准则，其中包括一份清单 (checklist)，以配合科研人员首次向出版商提交手稿。通过对所提供的所有相关实验条件和结果的分析，评审员可以评估所使用的数据的有效性。因此充分说明所含试剂、序列和分析方法是必要的，从而使其他研究人员可以重现结果。

The latest MIQE version is at <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.112797>

2. MIQE checklist

Checklist表格详见P18，可复制使用。

表格特别说明如下：

Table 1. MIQE checklist for authors, reviewers and editors. All essential information (E) must be submitted with the manuscript. Desirable information (D) should be submitted if available. If using primers obtained from RTPrimerDB, information on qPCR target, oligonucleotides, protocols and validation is available from that source.

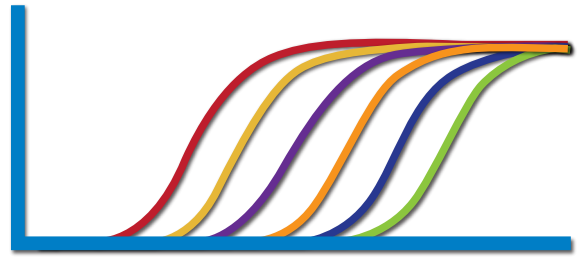
*: Assessing the absence of DNA using a no RT assay is essential when first extracting RNA. Once the sample has been validated as RDNA-free, inclusion of a no-RT control is desirable, but no longer essential.

** : Disclosure of the probe sequence is highly desirable and strongly encouraged. However, since not all commercial pre-designed assay vendors provide this information, it cannot be an essential requirement. Use of such assays is advised against.

ITEM TO CHECK	IMPORTANCE	CHECKLIST
EXPERIMENTAL DESIGN		
Definition of experimental and control groups	E	
Number within each group	E	
Assay carried out by core lab or investigator's lab?	D	
Acknowledgement of authors' contributions	D	
SAMPLE		
Description	E	
Volume/mass of sample processed	D	
Microdissection or macrodissection	E	
Processing procedure	E	
If frozen – how and how quickly?	E	
If fixed – with what, how quickly?	E	
Sample storage conditions and duration (especially for FFPE samples)	E	
NUCLEIC ACID EXTRACTION		
Procedure and/or instrumentation	E	
Name of kit and details of any modifications	E	
Source of additional reagents used	D	
Details of DNase or RNase treatment	E	
Contamination assessment (DNA or RNA)	E	
Nucleic acid quantification	E	
Instrument and method	E	
Purity (A260/A280)	D	
Yield	D	
RNA integrity method/instrument	E	
RIN/RQI or Cq of 3' and 5' transcripts	E	
Electrophoresis traces	D	
Inhibition testing (Cq dilutions, spike or other) E	E	
REVERSE TRANSCRIPTION		
Complete reaction conditions	E	
Amount of RNA and reaction volume	E	
Priming oligonucleotide (if using GSP) and concentration	E	
Reverse transcriptase and concentration	E	
Temperature and time	E	
Manufacturer of reagents and catalogue numbers	D	
Cqs with and without RT	D*	
Storage conditions of cDNA	D	
qPCR TARGET INFORMATION		
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E	
Sequence accession number	E	
Location of amplicon	D	
Amplicon length	E	
<i>In silico</i> specificity screen (BLAST, etc)	E	
Pseudogenes, retropseudogenes or other homologs? Sequence alignment	D	
Secondary structure analysis of amplicon	D	
Location of each primer by exon or intron (if applicable)	E	
What splice variants are targeted?	E	
qPCR OLIGONUCLEOTIDES		
Primer sequences	E	
RTPPrimerDB Identification Number	D	
Probe sequences	D**	
Location and identity of any modifications	E	
Manufacturer of oligonucleotides	D	
Purification method	D	
qPCR PROTOCOL		
Complete reaction conditions	E	
Reaction volume and amount of cDNA/DNA	E	
Primer, (probe), Mg++ and dNTP concentrations	E	
Polymerase identity and concentration	E	
Buffer/kit identity and manufacturer	E	
Exact chemical constitution of the buffer	D	
Additives (SYBR Green I, DMSO, etc.)	E	
Manufacturer of plates/tubes and catalog number	D	
Complete thermocycling parameters	E	
Reaction setup (manual/robotic)	D	
Manufacturer of qPCR instrument	E	
qPCR VALIDATION		
Evidence of optimisation (from gradients)	D	
Specificity (gel, sequence, melt, or digest)	E	
For SYBR Green I, Cq of the NTC	E	
Standard curves with slope and y-intercept	E	
PCR efficiency calculated from slope	E	
Confidence interval for PCR efficiency or standard error	D	
r2 of standard curve	E	
Linear dynamic range	E	
Cq variation at lower limit	E	
Confidence intervals throughout range	D	
Evidence for limit of detection	E	
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E	
DATA ANALYSIS		
qPCR analysis program (source, version)	E	
Cq method determination	E	
Outlier identification and disposition	E	
Results of NTCs	E	
Justification of number and choice of reference genes	E	
Description of normalisation method	E	
Number and concordance of biological replicates	D	
Number and stage (RT or qPCR) of technical replicates	E	
Repeatability (intra-assay variation)	E	
Reproducibility (inter-assay variation, %CV)	D	
Power analysis	D	
Statistical methods for result significance	E	
Software (source, version)	E	
Cq or raw data submission using RDML	D	



三、Real Time PCR troubleshooting



Q1 一步法RT-qPCR与两步法RT-qPCR的使用区别？

A1 基因表达解析等绝大部分RT-PCR，非常适合选择Two Step RT-PCR，而RNA病毒检测等以基因检测为目的RT-PCR，应优先考虑防止污染，所以建议选择One Step RT-qPCR。详见3.1部分。

Q2 RT-qPCR进行基因表达解析时，经常会用到管家基因，如何选择管家基因？

A2 以前，GAPDH， β -actin基因常被作为管家基因使用，但近几年也常有这些基因因样品经药物等处理后表达量发生变化的报道。目前，很多研究者认为一种管家基因有可能校正不充分，同时使用两个或两个以上的复数管家基因进行校正更值得信赖。当然这种校正方法也是非常耗费精力的，通常要选择若干个管家基因同时进行表达量分析，从中选择表达量变化幅度小的管家基因来使用，选择最适校正基因的软件有很多，请下载利用（geNorm、BestKeeper等）。

【参考文献】

Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Vandesompele J, et al., (2002) *Genome Biol.*; 3 (7) : RESEARCH0034.1-11

Q3 绝对定量与相对定量有哪些差别？

A3 绝对定量与相对定量有如下差别：

1. 绝对定量：是对未知样品的绝对量（拷贝数）进行测定的方法；通常应用于病毒、细菌、衣原体、支原体的定量检测及转基因食品的检测。
2. 相对定量：是分别测定目的基因和参比基因的量，再求出对于参比基因的目的基因的相对量，最后再进行样品间相对量的比较。主要用于检测细胞mRNA表达量的变化；比较不同组织的mRNA表达差异；验证基因芯片、siRNA干扰的实验结果。

Q4 如何选择制作标准曲线的标准品？

A4 为了保持与实际检测样品间的扩增效率的一致性，作为标准品应尽量选择与实际检测样品结构近似的样品。例如以基因组DNA为起始材料时就要选择基因组DNA作为标准品，进行mRNA表达解析时最好选择表达目的基因的Total RNA(或以Total RNA为模板合成的cDNA)作为标准品。即使扩增碱基序列相同，但整体模板不同，也有可能导致PCR扩增效率不同（比如基因组DNA和质粒DNA等）。

Q5 制作标准曲线的标准品，使用RNA和cDNA哪个更好？

A5 Real Time PCR制作标准曲线有2种方法（1）从RNA开始稀释进行反转录和Real Time PCR的标准曲线制作；（2）反转录反应后得到的cDNA开始稀释进行Real Time PCR的标准曲线制作。根据实验目的不同，选择合适的方法。

【绝对定量】

RNA绝对定量要考虑到反转录效率，应选择上述方法（1）的标准品。此时，不推荐使用cDNA稀释品作为标准品。

【相对定量】

相对定量通常使用管家基因等来测定，可以校正反转录效率的误差，推荐选择上述方法（2）的标准品。如果使用RNA制作标准曲线，除了PCR扩增效率以外，还要考虑RNA的反转录效率。如果按此与实际情况不符的PCR扩增效率计算，可能会导致计算结果有偏差。

Q6 荧光定量实验的成功因素有哪些？

A6 荧光定量实验的成功因素如下：

1. 优良试剂的选择。

Real Time PCR试剂的选择是否合适，也是实验成功的关键点，所以在有必要对试剂的选择要点加以说明。

a. 标准曲线的质量直接影响定量的准确性。建议使用标准品专用稀释Buffer稀释标准品。

b. 根据采用的荧光检测方法进行试剂选择。选择探针法专用试剂或嵌合法专用试剂。

c. Real Time RT-PCR要根据实验目的进行试剂选择。mRNA表达量分析选择Two Step RT-PCR试剂，病毒病原菌检测选择One Step RT-PCR试剂。

d. Real Time PCR 反应通常样品数量较多，操作步骤过多易产生错误。最好选择PCR反应Buffer、DNA聚合酶、dNTP等试剂已经预混在一起的2×Premix Type试剂，操作更加简单方便。同时，使用的试剂最好不需要进行Mg²⁺浓度的优化等实验。

e. Real Time PCR反应对反应特异性要求高。最好选择应用Hot Start DNA聚合酶的试剂。但有一点需要强调，Hot Start DNA聚合酶有两种类型，即化学修饰型和抗体结合型。使用这两种Hot Start DNA聚合酶的PCR反应条件不同，使用化学修饰型Hot Start DNA聚合酶，需要在PCR条件的最初步骤设置10~15分钟的热变性程序，以恢复DNA聚合酶的活性；而抗体结合型Hot Start DNA聚合酶，不需要长时间的热变性步骤，通常的PCR条件即可恢复DNA聚合酶的活性，最适合快速PCR反应。

f. 所选试剂要与使用的Real Time PCR检测系统相匹配。最好选择对各种机型装置都显示良好反应性能的试剂。

2. 引物和探针的设计。

详见3.3.1和3.3.2部分介绍。

3. 反应条件的优化

依据所使用的产品说明书进行反应条件的优化。

4. 实验操作

必须分区操作。通常分为：反应液调制区；模板添加/样品制备区；PCR反应区。

Q7 进行Real Time PCR实验时，需要做哪些确认工作？

A7 进行Real Time PCR首先要确认的工作如下：

1. 引物和探针的序列是否有错误？组合是否正确？

2. Total RNA是否有分解的可能？

3. 各种试剂是否忘记加入？

4. PCR条件和荧光检出步骤是否设定正确？

如果有成功反应经历的模板（Positive Control），设置Positive Control反应，很容易进行以上项目的确认。

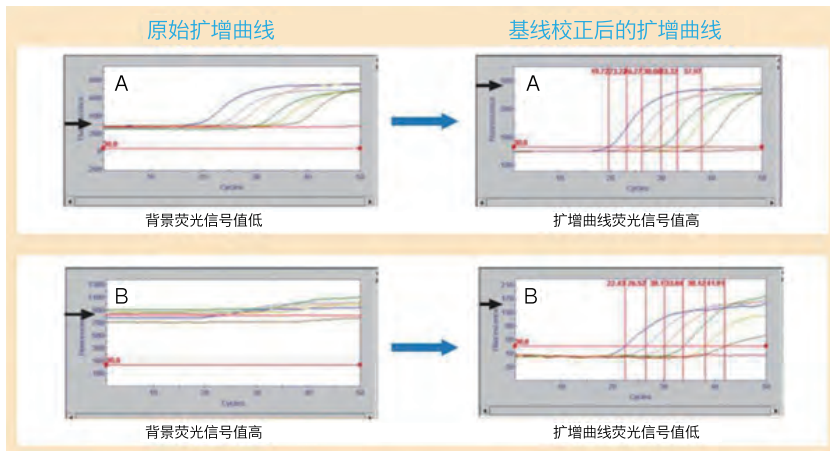
Total RNA一定要通过电泳和OD分析确认其质量。

Q8 如何确认模板中是否含有有害物质？

A8 有时Total RNA或cDNA中含有对反转录反应和PCR反应的有害物质（如RNA提取时使用的有机溶剂等）。为了确认这样的有害物质的有无，使用较高浓度的模板按3~4个梯度稀释，并使用其进行Real Time RT-PCR反应或Real Time PCR反应。如果无有害物质存在，得到的Ct值会依存模板浓度的变化而变化；如果有有害物质存在，就会发现高浓度的模板有反应性能下降的现象。

Q9 扩增曲线的荧光信号值低的原因是什么？

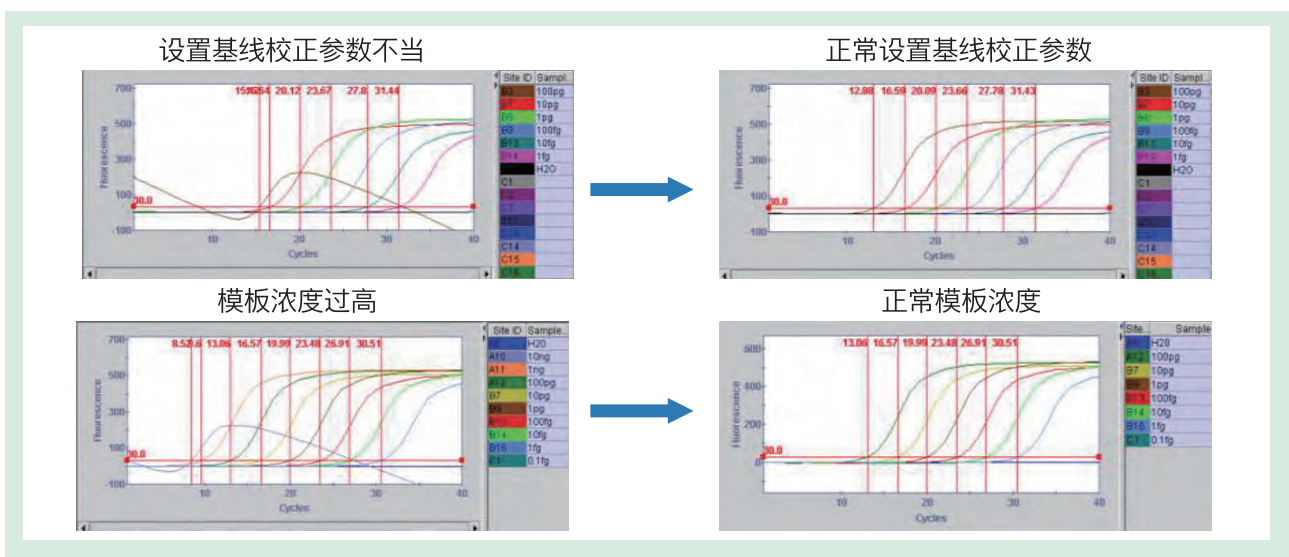
A9 扩增曲线存在问题时，首先应确认基线校正或ROX校正前的原始曲线，扩增曲线的荧光信号值低多数是由于背景荧光信号值过高造成的。如下图所示，A的原始扩增曲线背景荧光信号值约为280，其基线校正后的扩增曲线显示较高的荧光信号值（约500）；而B的原始扩增曲线背景荧光信号值可达800，其基线校正后的扩增曲线荧光信号值较低（约150）。使用嵌合荧光法进行检测时，背景荧光信号偏高大多数是由于模板量过高，染料嵌入到初始模板DNA中发出荧光造成的。使用荧光探针法进行检测时，背景荧光信号偏高大多是由于设计的探针质量差使淬灭基团的淬灭作用不充分、报告基团和淬灭基团的搭配不合理、探针的荧光标记效率低等原因造成的。



Q10 出现扩增曲线朝右下方下落现象的原因是什么？

A10 出现这种现象一般有两种可能，如下图所示。

1. 由于基线校正不恰当。确认设置的基线校正范围的参数，按仪器说明书要求重新设定再进行解析。
2. 使用的模板量过多，扩增曲线过早起峰，使基线校正不能正常进行。当扩增曲线在10 Cycles以内起峰时，要将模板稀释100~1000倍后使用。



Q11 PCR扩增效率低的原因有哪些？

A11 由标准曲线的斜率计算得到的PCR扩增效率低时，可以考虑以下几点原因。

1. PCR反应性能差。引物、试剂、PCR条件的再摸索。
2. PCR阻害物质的混入。模板提取方法的再摸索。
3. 标准品稀释不准确。使用专用标准品稀释Buffer。

稀释的低浓度标准品常常有易分解不稳定的现象产生，所以使用的稀释液中最好加入与实验材料不同生物种的tRNA和rRNA以起保护作用。但偶尔也有因加入的tRNA和rRNA的序列与目的基因序列具有同源性而产生的干扰现象。如果使用不含tRNA和rRNA的标准品稀释专用试剂EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160)，将不会有这方面的顾虑。

Q12 PCR扩增效率过高的原因是什么？

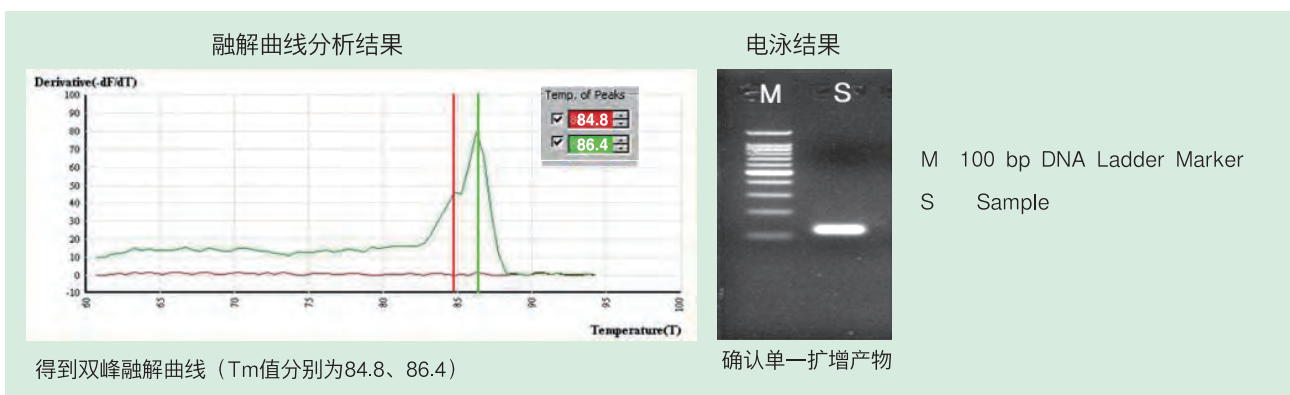
A12 PCR扩增效率比理论值偏高，大多是由于反应体系中含有PCR阻害物质，需要改进模板提取方法。另外，使用嵌合荧光法检测时，有时非特异性扩增也会导致PCR扩增效率高，要通过融解曲线分析加以确认。

Q13 融解曲线分析有复数峰产生的原因有哪些？

A13 首先怀疑发生了目的片段以外的扩增。

1. 引物二聚体等非特异性扩增。优化PCR条件或再设计引物。
2. 存在目的基因的Variant。获取Variant信息，再设计引物。
3. Genomic DNA来源的扩增。DNase I处理或考虑基因组结构、引物再设计。

但也有偶尔例外的情况。那是由于目的序列内部GC含量等的不均一造成同一扩增产物解离稍有偏差，致使虽然为特异性扩增，但融解曲线分析却出现非单一峰型的情况，但此时电泳确认结果却为单一条带（如下图所示）。因此，对初次使用引物的扩增产物有必要进行电泳确认，其目的有两个：①单一峰型时可以确认扩增片段大小，判断是否为目的产物；②非单一峰型时也有必要对扩增产物进行确认，如果电泳结果显示为单一条带，并与目的片段大小吻合，可以判断为进行了特异性扩增。



【Real Time PCR相关制品附录】

产品名称	Code No.	包装量
■ 制备RNA/DNA		
TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit	9767	50 次
RNAiso Plus	9108Q	25 ml
	9108	100 ml
	9109	200 ml
RNAiso Blood	9112Q	25 ml
	9112	100 ml
	9113	200 ml
RNAiso for Small RNA	9753Q	25 ml
	9753A	100 ml
CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (Real Time)	3732	200 次
CellAmp™ Whole Transcriptome Amplification Kit (Real Time) Ver.2	3734	100 次
TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0	9765	50 次
TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit	9769S	10 次
	9769	50 次
TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0	9766	50 次
DNAiso Reagent	9770Q	25 ml
	9770A	100 ml
TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit	9768S	10 次
	9768	50 次
TaKaRa MiniBEST Whole Blood Genomic DNA Extraction Kit	9781S	10 次
	9781	50 次
TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0	9763	50 次
TaKaRa MiniBEST FFPE DNA Extraction Kit	9782	50 次
TaKaRa BioMasher Standard (Sterile)	9791A	50 次
■ 反转录反应		
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)	RR037Q	20 次
	RR037A	200 次
	RR037B (A × 4)	800 次
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)	RR036Q	20 次
	RR036A	200 次
	RR036B (A × 4)	800 次
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)	RR047Q	10 次
	RR047A	100 次
	RR047B (A × 4)	400 次
■ TB Green™ (嵌合法)检测 1 step Real Time RT-PCR用		
One Step TB Green™ PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	RR096A	100 次
	RR096B (A × 5)	500 次
One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	RR066A	100 次
	RR066B (A × 5)	500 次
One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)	RR086A	100 次
	RR086B (A × 5)	500 次

产品名称	Code No.	包装量
■ TB Green™(嵌合法)检出Real Time PCR试剂		
TB Green™ <i>Premix Ex Taq</i> ™ II (Tli RNaseH Plus)	RR820Q	40 次
	RR820A	200 次
	RR820B (A × 2)	400 次
TB Green™ <i>Premix Ex Taq</i> ™ II (Tli RNaseH Plus), Bulk	RR820L	200 次
	RR820W (L × 5)	1,000 次
TB Green™ <i>Premix Ex Taq</i> ™ II (Tli RNaseH Plus), ROX plus	RR82LR	200 次
	RR82WR (LR × 5)	1,000 次
TB Green™ <i>Premix Ex Taq</i> ™ (Tli RNaseH Plus)	RR420Q	40 次
	RR420A	200 次
	RR420B (A × 2)	400 次
TB Green™ <i>Premix Ex Taq</i> ™ (Tli RNaseH Plus), Bulk	RR420L	200 次
	RR420W (L × 5)	1,000 次
TB Green™ <i>Premix Ex Taq</i> ™ (Tli RNaseH Plus), ROX plus	RR42LR	200 次
	RR42WR (LR × 5)	1,000 次
TB Green™ <i>Premix DimerEraser</i> ™ (Perfect Real Time)	RR091Q	40 次
	RR091A	200 次
	RR091B (A × 2)	400 次
TB Green™ <i>Premix Ex Taq</i> ™ GC (Perfect Real Time)	RR071Q	40 次
	RR071A	200 次
	RR071B (A × 2)	400 次
MightyAmp™ for Real Time (TB Green™ Plus)	R075A	200 次
	R075B (A × 2)	400 次
TB Green™ Fast qPCR Mix	RR430S	40 次
	RR430A	200 次
	RR430B (A × 2)	400 次
■ 探针法检测Real Time PCR相关		
<i>Premix Ex Taq</i> ™ (Probe qPCR)	RR390Q	40 次
	RR390A	200 次
	RR390B (A × 2)	400 次
<i>Premix Ex Taq</i> ™ (Probe qPCR), Bulk	RR390L	200 次
	RR390W (L × 5)	1,000 次
<i>Premix Ex Taq</i> ™ (Probe qPCR), ROX plus	RR39LR	200 次
	RR39WR (LR × 5)	1,000 次
One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	RR064A	100 次
	RR064B (A × 5)	500 次
Probe qPCR Mix	RR391S	40 次
	RR391A	200 次
	RR391B (A × 2)	400 次

产品名称	Code No.	包装量
■ 直接对培养细胞RT-qPCR试剂		
CellAmp™ Direct TB Green™ RT-qPCR Kit	3735S	1 Kit
	3735A	1 Kit
CellAmp™ Direct Probe RT-qPCR Kit	3736S	1 Kit
	3736A	1 Kit
■ Cycling 探针法检测 Real Time PCR 相关		
CycleavePCR® Starter Kit	CY505S	80 次
CycleavePCR® Reaction Mix	CY505A	400 次
	CY505B (A × 3)	1,200 次
CycleavePCR® Core Kit	CY501	50 次
■ MicroRNA 定量试剂		
Mir-X™ miRNA qRT-PCR TB Green™ Kit	638314	200 次
	638316	600 次
Mir-X™ miRNA First Strand Synthesis Kit	638313	20 次
	638315	60 次
■ Real Time PCR 仪		
Thermal Cycler Dice™ Real Time System III	TP950	一台
Thermal Cycler Dice™ Real Time System III with PC	TP970	一台
Thermal Cycler Dice™ Real Time System III with PC MRQ	TP980	一台
Thermal Cycler Dice™ Real Time System Lite	TP700	一台
Thermal Cycler Dice™ Real Time System Lite MRQ	TP760	一台
相对定量解析软件「Multiplate RQ」	TP840	—

- 本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经许可，严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可及注册商标信息请在网站上确认：<http://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页上记载的产品是2018年7月1日的信息，最新信息请参见公司官网。



Clontech **TAKARA** cellartis

销售商：

宝日医生物技术（北京）有限公司
Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.

地址：北京市昌平区科学园路22号（中关村生命科学园内）
电话：010-80720985, 80720986

制造商：

宝生物工程（大连）有限公司
Takara Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

地址：辽宁省大连市经济技术开发区东北二街19号
电话：0411-87621671

技术咨询热线：4006518761, 4006518769