

实时荧光定量PCR

1.引物准备

1.1 引物终浓度为5 μM 为例，上下引物浓度为10 μM 的液体则等体积混合，若上下引物为粉末，则瞬时离心后稀释至50 μM ，上下引物各取10 μL 加入至80 μL DEPC水中



2.样本稀释

2.1 2 μL cDNA原液+38 μL DEPC水，稀释20倍



3.体系配制

3.1 取1.5 mL的Ep管，依次按照单孔体系加入DEPC水 2.6 μL ，Primer_{mix} 0.4 μL ，SYBR Green mix 5 μL



4.离心分配

4.1 将步骤3中的体系混匀，瞬时离心
4.2 将上述溶液以8 μL /管分到各离心管中



5.加样上机

5.1 加入2 μL cDNA，盖上离心管盖，混匀，瞬时离心后将其以10 μL /孔分配在八连排中，离心混匀
5.2 打开qPCR仪器，选择file→open→protocol→XXX，选择Plate→Quirk Plate 96 wells SYBR only，点击Start Run，选择保存文件夹即可

常见问题解析

1. 如何选择内参?

理想内参：①不存在假基因以避免基因组DNA的扩增；②高度或中度表达，排除太高或低表达；③稳定表达于不同类型的细胞和组织（如正常细胞和癌细胞），而且其表达量是近似的，无显著性差别；④表达水平与细胞周期以及细胞是否活化无关；⑤其稳定的表达水平与目标基因相似；⑥不受任何内源性或外源性因素的影响，如不受任何实验处理措施的影响。

2. 当内参的Ct值相差较大时怎么办?

当内参相差较大时，需要通过调整个别样本cDNA的稀释倍数，让所有样本的内参值尽可能相近。

3. 为什么结果中会有无Ct值?

无Ct值可能由①荧光信号采集步骤错误（如荧光染料法应在72°C延伸时采集，探针法在退火/延伸结束采集），此部分可以通过内参基因的表达量是否正常判断；②引物/探针降解或模板量不足导致，需通过PAGE电泳验证引物完整性并减少模板的稀释浓度。

4. 扩增效率低下怎么办?

扩增效率低下通常表现为Ct值偏高、标准曲线斜率异常或扩增曲线平台期提前，这直接影响了实验的灵敏度和准确性。扩增效率低下的影响因素包括引物、探针浓度不合适以及反应体系成分比例不当。例如，若引物或探针浓度过高或过低，则可能导致扩增效率下降，从而影响目标基因的检测灵敏度。此外，反应体系中Mg²⁺浓度不足或dNTPs比例失衡也会影响扩增效率。因此，可以通过优化反应体系成分比例并选择合适探针浓度，提高扩增效率，进而改善实验结果的可靠性。