****

**荧光定量PCR实验常见问题解析**

****

**荧光定量PCR实验常见问题解析**

**1、荧光定量PCR实验中无Ct值出现**

(1)反应的循环数不够：一般要在35个循环以上，但是过多的循环次数可增加背景值。
(2)检测荧光信号的步骤有误：SYB-Rgreen法（SG法）采用的是72℃延伸时采集荧光信号，Taman法则是在退火结束或延伸结束时进行信号采集。
(3)引物或探针降解: 可通过PAGE电泳检测其完整性，若是电泳条带呈弥散状，可考虑重新合成引物或探针。
(4)模板量不足: 对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。
(5)模板降解: 避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。
(6)序列或者引物有误：检测样品中不含有待检测基因。

**2、Ct值出现过晚（Ct>38）**

(1)扩增效率低: 优化反应条件；设计更好的引物或探针；改用三步法进行反应等。
(2)模版降解或模版浓度太高。
(3)试剂灵敏度不好：更换更高灵敏度、抗干扰的试剂。
(4)检测基因结构复杂：高GC、复杂二级结构和长片段模版，都会影响PCR扩增。
(5)扩增产物太长: 一般采用80-150bp的产物长度。

**3、扩增效率低**

（1）引物或探针不佳: 重新设计更好的引物和探针。
（2）反应试剂中部分成分特别是荧光染料降解。
（3）反应条件不够优化：可调整退火温度或改为三步扩增法。
（4）反应体系中有PCR反应抑制物：一般是加入模板时所引入，应先把模板适度稀释，再加入反应体系中，减少抑制物的影响。

**4、溶解曲线不止一个主峰**

(1)引物设计不够优化：应避免引物二聚体和非特异性扩增出现。
(2)同源性比较高：被检测基因在待检测样品有同源性较高的序列。
(3)模板有基因组的污染：RNA提取过程中避免基因组DNA的引入，或通过引物设计避免非特异扩增。

**5、标准曲线线性关系不佳**

（1）加样/稀释误差: 使得标准品不呈梯度。
（2）标准品出现降解: 应避免标准品反复冻融，或重新制备并稀释标准品。
（3）引物或探针不佳: 重新设计更好的引物和探针。
（4）模板中存在抑制物，或模板浓度过高

**6、负对照有信号**

(1)引物设计不够优化：应避免引物二聚体和发夹结构的出现。
(2）模板有基因组的污染：RNA提取过程中避免基因组DNA的引入，或通过引物设计避免非特异扩增。
（3）实验器材污染：移液器、水、枪头或者荧光定量PCR孔内有荧光污染。

**7、如何提高实验反应的灵敏度与特异性？**

(1)确定模板RNA完整性，无DNA污染。
(2)RNA模板中不应含有扩增反应的抑制剂。
(3)为了防止模板降解，在反应体系中加入RNase抑制剂RNasin。
(4)使用适量的模板RNA，模板量太多会降低特异性，太少会导致扩增不出条带或条带太弱。
(5)若模板中有二级结构，可通过提高逆转录反应温度来提高扩增效果。
(6)设计引物时，避免在引物3’端含有互补序列，避免形成内部发卡结构。

**8、避免RNA降解的方法有哪些？**

(1)在用来验证完整性之前先在变性胶上分析RNA。
(2)运用良好无污染的技术分离RNA
(3)将组织提取后立刻提取RNA，并将提取好的RNA反转录为cDNA进行低温保存。