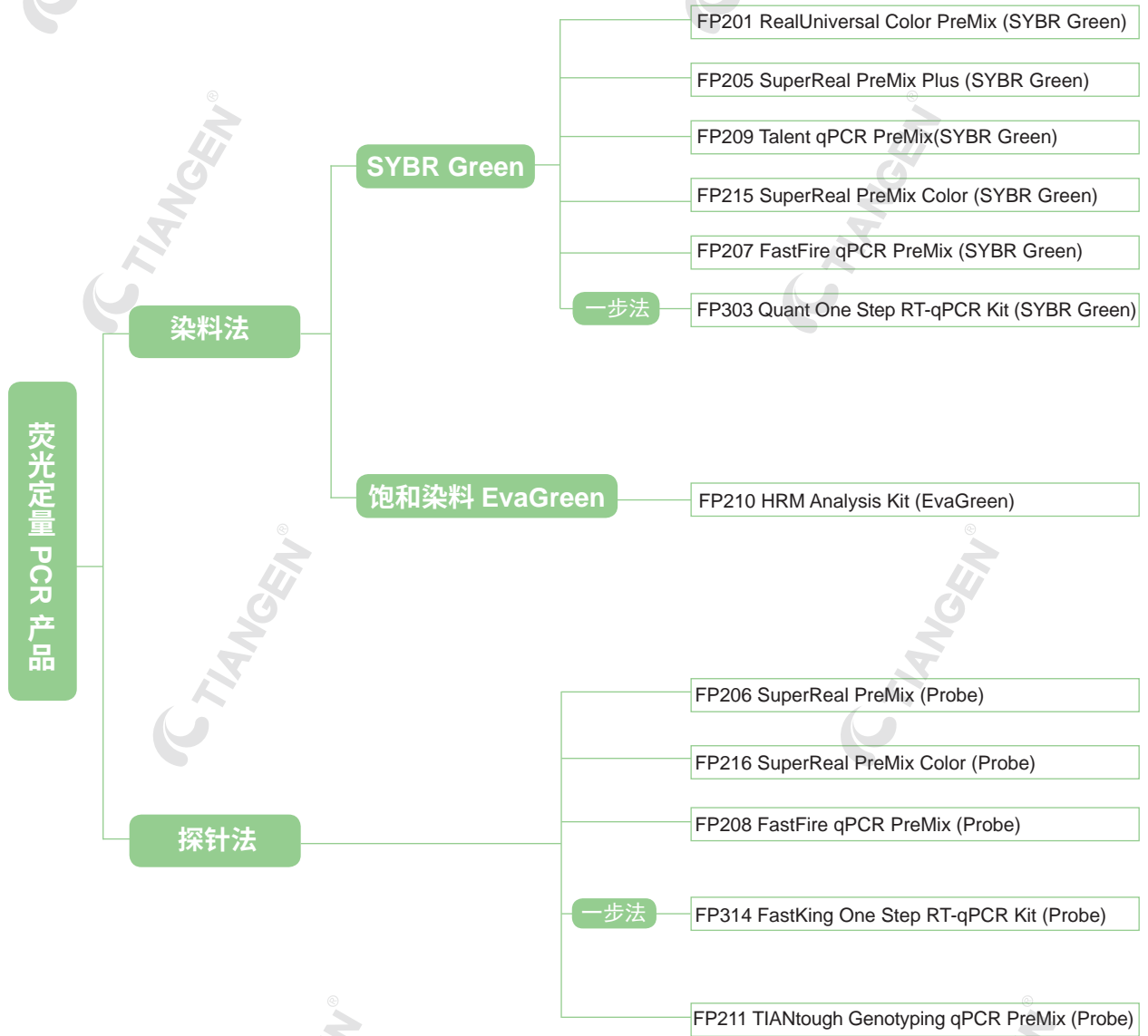


荧光定量 PCR 系列产品选择指南



II PCR、RT 及荧光定量

qPCR 系列产品选择指南

在荧光定量 PCR 领域, TIANGEN 创新地开发出了特异性强, 扩增效率高的“双核”荧光定量试剂——SuperReal 系列, 让您获得最佳的实验结果; 最快的荧光定量试剂——FastFire 系列, 提升您的工作效率, 节省宝贵的时间, 节省能源。此外, TIANGEN 还提供灵敏、高效的染料法和探针法 Genotyping 试剂, 供您采用 qPCR 方法进行基因分型、SNP 鉴定等研究。

SYBR Green 法系列产品

产品名称	目录号	组分	反应时间 (含熔解曲线)	特异性	Ct值	荧光 信号	稳定性	目录价 (20 μl× 500 rxn)	产品特点
SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)	FP205	预混Mix形式(含 SYBR Green), 单管Rox	100 min	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	¥1980	特异性高 稳定性强 更广泛的模板和 仪器适应性
Talent qPCR PreMix (SYBR Green)	FP209	预混Mix形式(含 SYBR Green), 单管Rox	70 min	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	¥1980	适合复杂模板 抗逆性强 扩增能力强 反应快速
FastFire qPCR PreMix (SYBR Green)	FP207	预混Mix形式(含 SYBR Green), 单管Rox	45 min	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★☆	¥1980	反应快速 荧光信号高 扩增能力强
SuperReal PreMix Color (SYBR Green)	FP215	预混Mix形式(含 SYBR Green), 单管Rox	100 min	★★★★★	★★★★★	★★★★☆	★★★★★	¥1980	特异性高 稳定性强 带有彩色指示剂 方便大量加样
RealMaster Mix (SYBR Green)	FP201	预混Mix形式(含 SYBR Green), 单管Rox	100 min	★★★★★	★★★★★	★★★★☆	★★★★☆	¥1480	性价比高 带有彩色指示剂 方便大量加样

探针法及基因分型系列产品

产品名称	目录号	特点	目录价 (20 μl×500 rxn)
SuperReal PreMix (Probe)	FP206	稳定性强, 扩增能力强, 可检测病毒、微生物等低丰度模板, 数据更准确	¥1980
FastFire qPCR PreMix (Probe)	FP208	快速、高效的探针法定量试剂, 是目前市面上最快速的探针法试剂之一	¥1980
SuperReal PreMix Color (Probe)	FP216	稳定性强, 扩增能力强, 灵敏度高, 数据准确, 带有彩色指示剂, 方便大量加样	¥1980
FastKing One Step RT-qPCR Kit(Probe)	FP314	一步法完成反转录和探针法荧光定量, 扩增能力强, 灵敏度高, 线性范围广	¥4980 (50 μl×200 rxn)
TIANtough Genotyping qPCR PreMix (Probe)	FP211	抗逆性强, 分析精准的探针法SNP分析试剂	¥2380
HRM Analysis Kit (EvaGreen)	FP210	灵敏度高, 样本重复性好, 基于饱和染料的高分辨率熔解曲线分析试剂	¥2480

荧光定量 PCR 技术的原理和应用

实时荧光定量 PCR 技术 (Real-Time PCR) 是通过 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测从而实现对起始模板定量及定性的分析。在实时荧光定量 PCR 反应中, 引入了一种荧光化学物质, 随着 PCR 反应的进行, PCR 反应产物不断累积, 荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环, 收集一次荧光强度信号, 这样我们就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化。

定量原理

荧光定量 PCR 技术涉及到三个基本概念:

基线 (Baseline)

是指在 PCR 扩增反应的最初数个循环里, 荧光信号变化不大, 接近一条直线, 这样的直线即是基线。

荧光阈值 (Threshold) 的设定

一般将 PCR 反应前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 荧光阈值是 PCR 3-15 个循环荧光信号标准差的 10 倍, 荧光阈值设定在 PCR 扩增的指数期。

CT 值

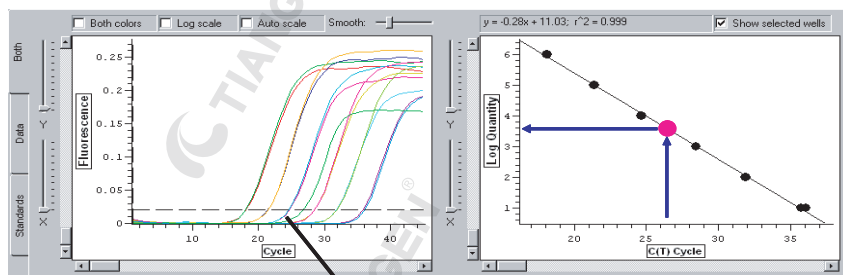
表示每个 PCR 反应管内荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。研究表明, 各模板的 CT 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, CT 值越小, 反之亦然。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线, 其中横坐标代表起始拷贝数的对数, 纵坐标代表 CT 值。因此, 只要获得未知样品的 CT 值, 即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

实时荧光定量 PCR 的特点

- 特异: 荧光定量 PCR 具有引物 (染料法) 和探针 (探针法) 的双重特异性, 故与传统的 PCR 相比, 特异性大为提高。
- 敏感: 荧光定量 PCR 的敏感度通常达 10^2 拷贝 / ml, 对数期分析, 线性范围很宽, 为 $0-10^{11}$ 拷贝 / ml。一般来讲临床标本中病原体的数目为 $0-10^{10}$ 拷贝, 在此范围内荧光定量 PCR 定量较为准确, 标本不需稀释。
- 重复: 荧光定量 PCR 结果相当稳定, 因为阈值设置在指数扩增期。在此阶段, 各反应组分浓度相对稳定, CT 与荧光信号的对数呈线性关系。与终点法相比 CT 值能更稳定, 更精确地反映起始模板的拷贝数。
- 安全: 无 PCR 后续操作步骤, 降低产物污染的风险性。

实时荧光定量 PCR 的应用范围

- 核酸的定量: 如 RNA、DNA 的定量。
- 核酸定性分析: 如 SNP 分析, 基因型分析, RNA 变异分析, 熔解曲线分析等。



实时荧光定量 PCR 定量原理

荧光材料

荧光定量 PCR 所使用的荧光化学材料可分为两大类：荧光染料和荧光探针。荧光染料以 SYBR Green I 为主要代表，是一种非特异性荧光化学材料；而荧光探针包括 Taqman、分子信标、荧光标记引物、杂交探针等几种，属于特异性荧光材料。目前使用比较多的是 SYBR Green I 荧光染料法和 Taqman 法。

■ 非特异性荧光染料 SYBR Green I 简介

SYBR Green I 是一种能够与双链 DNA 小沟结合的染料。没有与双链 DNA 结合时，其荧光信号很弱，当其与双链 DNA 结合后荧光信号大大增强并能够被仪器检测。利用 SYBR Green I 这种特点可以检测 PCR 扩增产物。SYBR Green I 的最大吸收波长约为 497 nm，发射波长最大约为 520 nm。

SYBR Green I 在核酸的实时检测方面有很多优点，它能够与体系中所有的双链 DNA 相结合，无需为不同的模板特殊定制，价格相对较低，是很多实验室开展荧光定量实验的首选。此外，由于一个 PCR 产物可以与多个 SYBR Green I 染料相结合，因此 SYBR Green I 的灵敏度很高。

SYBR Green I 的缺点在于它能够和所有的双链 DNA 相结合，因此由引物二聚体、单链二级结构及非特异性扩增产物引起的荧光信号会影响定量的精确性。可以通过对扩增产物的熔解曲线分析来判断荧光信号的真实性。

■ 特异性荧光探针或者荧光引物

定量 PCR 所涉及的荧光探针和荧光引物的检测都与 FRET 原理相关。荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理的主要的含义是：一对合适的荧光物质可以构成一个能量供体 (donor) 和能量受体 (acceptor) 对，其中供体的发射光谱与受体的吸收光谱重叠，当它们在空间上相互接近到一定距离 (1-10 nm) 时，激发供体而产生的荧光能量正好被附近的受体吸收，使得供体发射的荧光强度衰减，受体荧光分子的荧光强度增强。能量传递的效率和供体的发射光谱与受体的吸收光谱的重叠程度、供体与受体的跃迁偶极的相对取向、供体与受体之间的距离等有关。

不同机型的荧光定量 PCR 仪中使用的染料化合物汇总

荧光定量系统	内参染料	染料 1	染料 2	染料 3	染料 4
ABI PRISM 7700	ROX	FAM	HEX, JOE, VIC	—	—
ABI PRISM 7000 /7900HT	ROX	FAM	HEX, JOE, VIC	Bodipy TMR,NED	—
ABI 7300	ROX	FAM	HEX, JOE, VIC	Bodipy TMR,NED	—
ABI 7500	ROX	FAM	HEX, JOE, VIC	Bodipy TMR, NED	Alexa Fluor 647, Cy5
iCycler iQ and iQ5	Not required	FAM	HEX, JOE TET, VIC	Texas Red, ROX	Cy5
LightCycler 2.0	Not required	FAM	HEX, JOE, VIC	Texas Red, ROX	Alexa Fluor 660, Bodipy 630/650, Pulsar 650
Mx3000P ^m Mx3005P ^m	Not required	FAM	HEX, JOE, VIC	Texas Red, ROX	Cy5
Rotor-Gene ^m 3000	Not required	FAM	HEX, JOE, VIC	Texas Red,ROX	Cy5

染料 1 适合拷贝数极少的模板，染料 2 适合拷贝数中等的模板，染料 3-4 适合拷贝数丰富的模板

引物设计原则

- 序列选取应在基因的保守区段。避免引物自身或与引物之间形成 4 个或 4 个以上连续配对，避免引物自身形成环状发夹结构。典型的引物为 18 到 24 个核苷酸，引物需要足够长，保证序列独特性，并降低序列存在于非目的序列位点的可能性。
- 引物之间的 Tm 值相差避免超过 2°C。引物的 3' 端避免使用碱基 A，避免出现 3 个或 3 个以上连续相同的碱基。为避免基因组的扩增，引物设计最好能跨两个外显子。

Taqman 探针设计原则

- 探针位置尽可能地靠近上游引物。探针长度应在 15-45 bp (最好是 20-30 bp)，以保证结合特异性。Tm 值在 65-70°C，通常比引物 Tm 值高 5-10°C (至少要 5°C)，GC 含量在 40%-70% 之间。探针的 5' 端避免使用 G，因为 5' G 会有淬灭作用，而且即使是被切割下来还会存在淬灭作用。

与标准曲线相关的参数

实时荧光定量 PCR 实验中绝对定量及相对定量实验均需要标准样品，生成标准曲线的样品可以是质粒、基因组、cDNA、PCR 产物或化学合成的 DNA 片段。

标准样品分子量的确定：DNA 样品 OD₂₆₀ 值为 1 时其浓度为 50 μg/ml，质粒样品浓度的计算如下：

质粒样品浓度 (μg/μl) = OD₂₆₀ 值 × 核酸稀释倍数 × 50/1000。

判断扩增曲线是否良好的指标

- 曲线拐点清楚，特别是低浓度样本指数期明显，扩增曲线整体平行性好，基线平而无上扬现象。
- 曲线指数期斜率与扩增效率成正比，斜率越大扩增效率越高。
- 标准的基线平直或略微下降，无明显的上扬趋势。
- 各管的扩增曲线平行性好，表明各反应管的扩增效率相近。

TIANGEN Real Time PCR 产品适用的荧光定量 PCR 仪器

- ABI PRISM 7000/7700/7900HT/7300/7500/7500Fast/Step One/Step One Plus/Via7/Quant Studio 系列 (Thermo)
- LightCycler 480/LightCycler 1.5/2.0 (Roche)
- DNA Engine Option/DNA Engine Option2/Chromo4 RealTime System, iCycler IQ/MyiQ/iQ5 Real Time PCR Cyclers /CFX 96 (Bio-Rad)
- Mx3000P/Mx3005P (Stratagene)
- Rotor Gene 3000/6000 (Qiagen)
- Smart Cycler System (Cepheid)
- Line-Gene (Bioer)
- 其它各种荧光定量 PCR 仪器

RealUniversal 彩色荧光定量预混试剂 (SYBR Green)

RealUniversal Color PreMix (SYBR Green)

——简便直观的染料法荧光定量彩色试剂

目录号	包装	价格
FP201-01	20 μ l \times 125 次	420 元
FP201-02	20 μ l \times 500 次	1480 元
FP201-03	20 μ l \times 5000 次	12800 元

产品包装

试剂盒组成	125 次 (20 μ l 体系)	500 次 (20 μ l 体系)	5000 次 (20 μ l 体系)
2 \times RealUniversal PreMix (SYBR Green, blue)	1.25 ml	4 \times 1.25 ml	10 \times 4 \times 1.25 ml
50 \times ROX Reference Dye	250 μ l	1 ml	10 \times 1 ml
40 \times Dilution Buffer (Yellow)	1.25 ml	1.25 ml	10 \times 1.25 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 \times 1 ml	5 \times 1 ml	10 \times 5 \times 1 ml

产品特点

- 高效：化学修饰的 HotStar Taq DNA 聚合酶配合精心优化 buffer 体系，大大提高扩增效率
- 简便：Mix 中预先混有 PCR 组分及最适浓度的 SYBR Green I，直接加入模板、引物和水即可直接进行反应。
- 直观：Mix 中额外添加了蓝色指示剂。试剂盒中还提供了黄色的样本稀释液，利于大量样品的稀释和加样，减少误操作概率。

下游应用

适用于在各类荧光定量仪器上采用 SYBR Green 法进行表达分析及核酸检测等类型实验，尤其适合样本数量多、加样繁琐的高通量实验。

产品简介

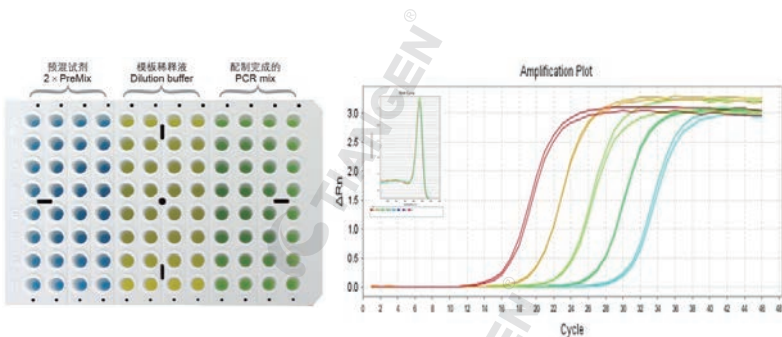
本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。2 \times RealUniversal PreMix 中预先混有 Real Time PCR 反应所需的酶、dNTP 等所有组分以及最适浓度的 SYBR Green I，并且额外添加了蓝色指示剂。试剂盒中还提供了黄色的样本稀释液，利于大量样品的稀释和加样，减少误操作概率。

本产品采用了高效的化学修饰的 HotStar Taq DNA 聚合酶，配合精心优化 buffer 体系，具有高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点，对于不同来源、不同丰度的目的基因都具有良好的适应性和准确的定量结果。

保存条件

-20 $^{\circ}$ C 保存

实验例



模板量 (ng)	FP201	A 公司	B 公司
100	16.79	17.28	18.04
10	20	20.58	21.53
1	23.59	24.31	25.26
0.1	27.19	27.74	29.26
0.01	31.23	31.33	32.67
扩增效率	89%	92%	86%
R ²	0.9984	0.9997	0.9994

左：彩色示例

中：取人源样本 RNA，模板量分别为 100、10、1、0.1、0.01 ng，经反转录 (TIANGEN KR116) 之后，分别用 FP201 定量 HSc 基因，展示扩增曲线和熔解曲线。结果显示，FP201 具有特异性强、灵敏度高和宽广可信范围的特点。

右：取人源样本 RNA，模板量分别为 100、10、1、0.1、0.01 ng，经反转录 (TIANGEN KR116) 之后，分别用 FP201、国外 A 公司和 B 公司的定量试剂定量 HS1 基因，展示 Ct 值、扩增效率和标准曲线的相关系数。结果显示，FP201 对于不同浓度都具有良好的扩增效果，与进口产品质量相当。

SuperReal 荧光定量预混试剂增强版 (SYBR Green)

SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)

——稳定性和特异性突出的双核家族明星产品

目录号	包装	价格
FP205-01	20 μl × 125 次	580 元
FP205-02	20 μl × 500 次	1980 元
FP205-03	20 μl × 5000 次	16800 元

产品包装

试剂组成	125 次 (20 μl 体系)	500 次 (20 μl 体系)	5000 次 (20 μl 体系)
2× SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)	1.25 ml	4 × 1.25 ml	10 × 4 × 1.25 ml
50× ROX Reference Dye	250 μl	1 ml	10 × 1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 × 1 ml	5 × 1 ml	10 × 5 × 1 ml

产品特点

- 特异性强: Buffer 中具有独特的 K⁺ 和 NH₄⁺ 的平衡体系与独创的 H-Bond 因子, 反应系统再度升级, 具有更高的扩增特异性。
- 灵敏度高: 可定量检测低丰度的转录本表达水平。
- 重复性好: 实验结果稳定, 具有很好的重复性。
- 简便快捷: 为预混 Mix, 只需加入模板、引物、ddH₂O 便可进行 Real-Time PCR 反应。
- ROX 校正: 单独包装的 ROX 染料, 使用更灵活, 结果更准确。
- 适用广泛: 经实验验证, 广泛地适用于在 ABI、Stratagene、Roche、Bio-Rad 和 Eppendorf 等各种荧光定量 PCR 仪上采用 SYBR Green 法进行基因表达分析和核酸检测等实验。

产品简介

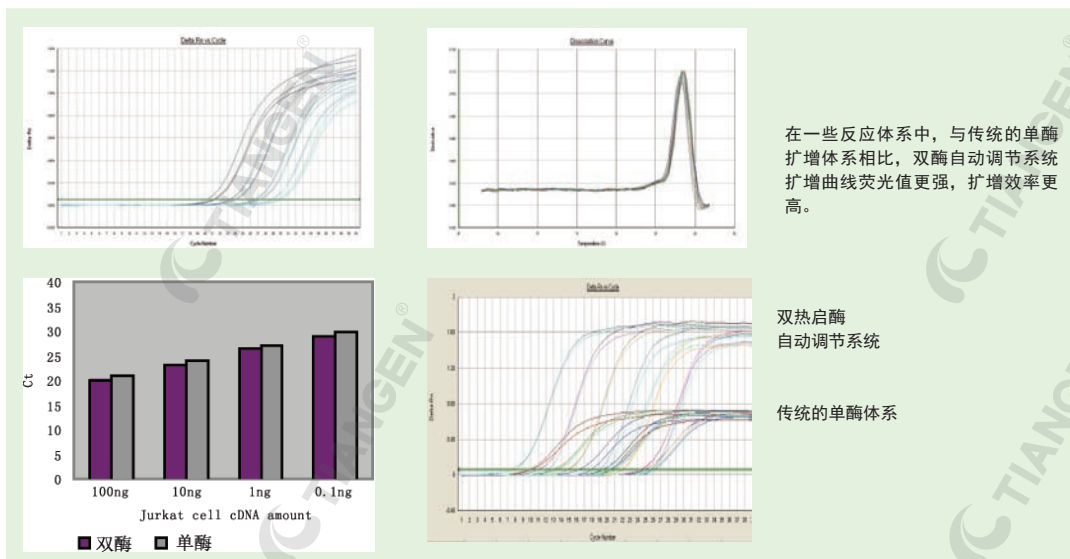
SuperReal PreMix Plus 是在 SuperReal PreMix 的基础上开发出来的 Real-Time PCR 专用试剂, 除了拥有 FP204 的使用简单方便, 独特双组分热启动 DNA 聚合酶, 添加独创 H-Bond 因子的 Buffer 体系和单独包装的 ROX 等优点外, 因对 Buffer 精心调整, 可更有效地减少引物二聚体和非特异性扩增的产生, 使其具有更高的扩增特异性和广泛模板适应性的特点。

保存条件

-20°C 避光保存

实验例

双酶系统保证稳定、高效扩增



独特缓冲体系打造超强特异性

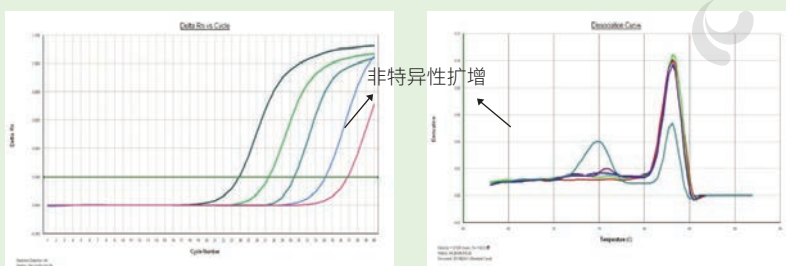
Buffer 中具有独特的 K^+ 和 NH_4^+ 的平衡体系与独创的 H-Bond 因子，反应系统再度升级，具有极高的扩增特异性。

仪器的广泛适用性

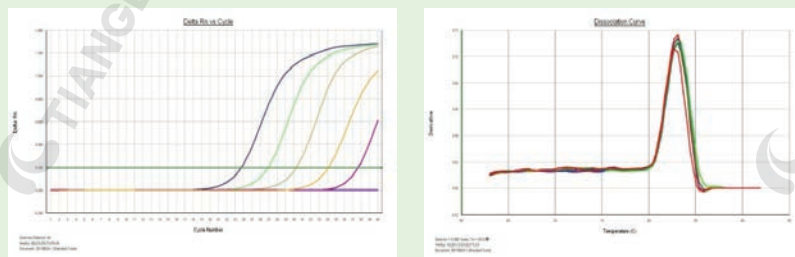
经实验验证，广泛地适用于在 ABI(PRISM 7000/7300/7700/7900HT/Step One/7500/7500 Fast), Stratagene(Mx3000P/Mx3005p/Mx4000), Roche、Bio-Rad 和 Eppendorf 等各种荧光定量 PCR 仪上采用 SYBR Green 法进行基因表达分析和核酸检测等实验。

H-bond 因子缓冲液体系与普通荧光定量缓冲液体系比较：

A 公司的缓冲液体系：



TIANGEN 公司的 H-bond 因子缓冲液体系：



在对于同一个较难扩增的模板体系实验中，SuperReal PreMix Plus 的 H-bond 因子缓冲液体系相对于普通缓冲液体系的反应特异性更强，重复性更好。

Talent 荧光定量检测试剂盒 (SYBR Green)

Talent qPCR PreMix (SYBR Green)

——完美应对杂质干扰，快速定量复杂片段

目录号	包装	价格
FP209-01	20 μl × 125 次	580 元
FP209-02	20 μl × 500 次	1980 元
FP209-03	20 μl × 5000 次	16800 元

产品包装

试剂盒组成	125 次 (20 μl 体系)	500 次 (20 μl 体系)	5000 次 (20 μl 体系)
2 × Talent qPCR PreMix (SYBR Green)	1.25 ml	4 × 1.25 ml	10 × 4 × 1.25 ml
50 × ROX Reference Dye	250 μl	1 ml	10 × 1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	5 × 1 ml	10 × 5 × 1 ml

产品特点

- 高灵敏的抗体修饰聚合酶，反应时间缩短一半
- H-Competitor 因子竞争氢键，特别应对高 GC 模板、复杂二级结构模板和长片段模板
- EP 组分稳定 PCR 体系，有效的保护酶活，抵御各种抑制剂的干扰
- 无色透明管代替棕色管，剩余量一目了然

下游应用

适用于在各类荧光定量仪器上采用 SYBR Green 法进行表达分析及核酸检测等类型实验，尤其适合高 GC、复杂二级结构、杂质残留量高及长片段模板定量时使用。

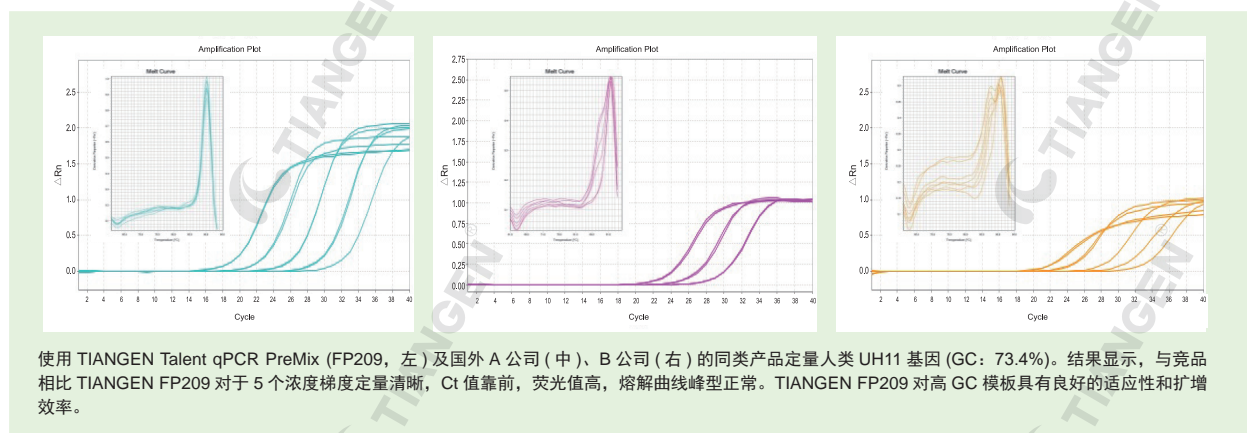
产品简介

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real-Time PCR 的专用试剂。2 × Talent qPCR PreMix 采用了抗体修饰的 Anti Taq DNA 聚合酶，配合独特的 qPCR Buffer 体系可确保本产品在所有的 Real-Time PCR 仪上进行高灵敏的快速 qPCR 反应，qPCR 反应时间可缩短 50%。此外，Buffer 中添加了 H-Competitor 因子和 EP 组分，使得本产品具有广泛的样本普适性，对具有复杂高级结构的模板、PCR 抑制剂残留较多的模板以及长片段扩增等具有非常好的适用性。同时本产品还具有高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围等特点，在不影响 PCR 效果的前提下更快获得结果，节约科研时间和能源。

保存条件

-20°C 保存

实验例



SuperReal 彩色荧光定量预混试剂 (SYBR Green)

SuperReal PreMix Color (SYBR Green)

——贴心又特异的染料法荧光定量彩色试剂

目录号	包装	价格
FP215-01	20 μl × 125 次	580 元
FP215-02	20 μl × 500 次	1980 元
FP215-03	20 μl × 5000 次	16800 元

产品包装

产品组成	125 次 (20 μl 体系)	500 次 (20 μl 体系)	5000 次 (20 μl 体系)
2 × SuperReal Color PreMix (SYBR Green)	1.25 ml	4 × 1.25 ml	10 × 4 × 1.25 ml
50 × ROX Reference Dye	250 μl	1 ml	10 × 1 ml
40 × Dilution Buffer (yellow)	1.25 ml	1.25 ml	10 × 1.25 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 × 1 ml	5 × 1 ml	10 × 5 × 1 ml

保存条件

-20 °C 避光保存

下游应用

适用于在各类荧光定量仪器上采用 SYBR Green 法进行表达分析及核酸检测等类型实验，尤其适合样本数量多、加样繁琐的高通量实验。

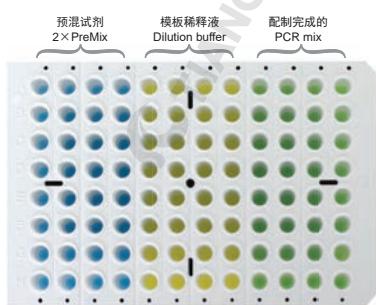
产品简介

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。产品中预先混有 Real Time PCR 反应所需最适浓度的 SYBR Green I，是一种 2 × 浓度的 PreMix。产品额外添加了指示剂，利于大量样品的加样，减少误操作概率。

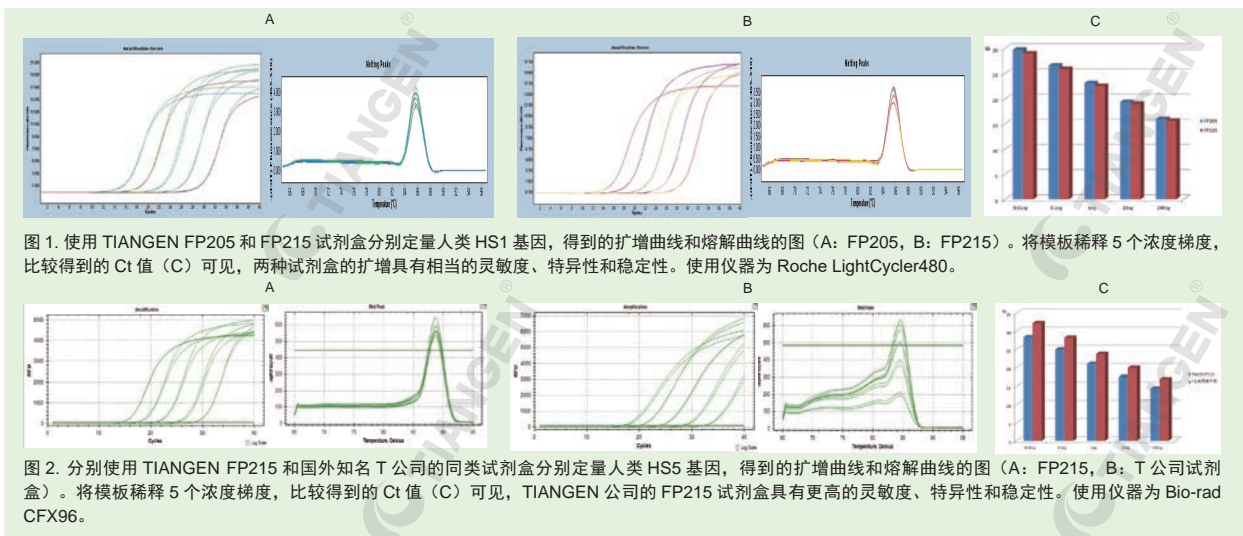
SuperReal Color PreMix 采用了独特的双组分热启动 DNA 聚合酶（化学修饰的 HotStar Taq DNA 聚合酶和抗体修饰的 Anti Taq DNA 聚合酶），配合精心优化 buffer 体系，具有高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点。本升级版试剂在经过成分调整后，扩增特异性上的优势更为突出。

产品特点

- 试剂中加入彩色指示剂，避免由于样品数量多而导致的加样错误或加样遗漏。
- 保持 SuperReal PreMix 一贯的特色，高荧光值，高灵敏度，高特异性。
- 经过严格检测，指示剂不会影响染料的荧光值和定量结果。
- 适用多种常见的荧光定量 PCR 仪 (Roche、Bio-rad、ABI 等)。



实验例



FastFire 快速荧光定量 PCR 预混试剂 (SYBR Green)

FastFire qPCR PreMix(SYBR Green)

——最快速的 SYBR Green 法荧光定量试剂

目录号	包装	价格
FP207-01	20 μl × 125 次	580 元
FP207-02	20 μl × 500 次	1980 元
FP207-03	20 μl × 5000 次	16800 元

产品包装

试剂盒组成	125 次 (20 μl 体系)	500 次 (20 μl 体系)	5000 次 (20 μl 体系)
2xFastFire qPCR PreMix (SYBR Green)	1.25 ml	4×1.25 ml	10×4×1.25 ml
50×ROX Reference Dye	250 μl	1 ml	10×1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2×1 ml	5×1 ml	10×5×1 ml

产品特点

- 最快速：FastFire 系列的 SYBR Green 法产品，采用了可快速激活的抗体修饰 Anti Taq DNA 聚合酶，配合独特的快速 Buffer 体系，可节省多达 60% 的反应时间，成为目前市面上最快速的 SYBR Green 试剂。
- 扩增能力强：扩增荧光信号强，结果更准确可信。
- 稳定性好：Buffer 中添加独特的 PCR 稳定剂和增强剂，使结果更稳定，重复性好，更准确可信。
- 仪器广泛适用：不仅适用于快速荧光定量 PCR 仪，也适用于普通荧光定量 PCR 仪。
- ROX 校正：单独包装的 ROX 染料，使用更灵活，结果更准确。

产品简介

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real-Time PCR 的专用试剂，可对目标 DNA 进行快速、特异性的定量检测。优化的预混液可缩短反应时间，适用于标准或快速 PCR 仪。

FastFire qPCR PreMix 采用了抗体修饰的 Anti Taq DNA 聚合酶，配合独特的快速 PCR Buffer 体系可确保在所有的 Real-Time PCR 仪上进行灵敏的 qPCR 反应，具有反应快速、PCR 反应时间缩短 60%，同时具有高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点，使你在不影响 PCR 效果的前提下更快获得结果，节约科研时间和能源。

保存条件

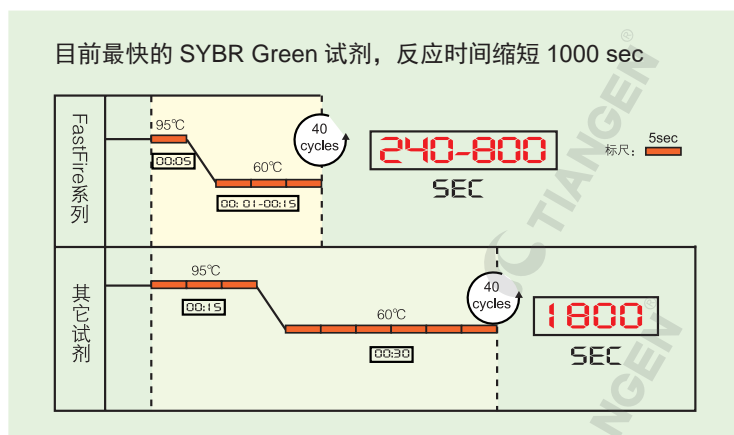
-20 °C 避光保存

实验例

最快速——提高实验效率，延长仪器使用寿命，节约能源

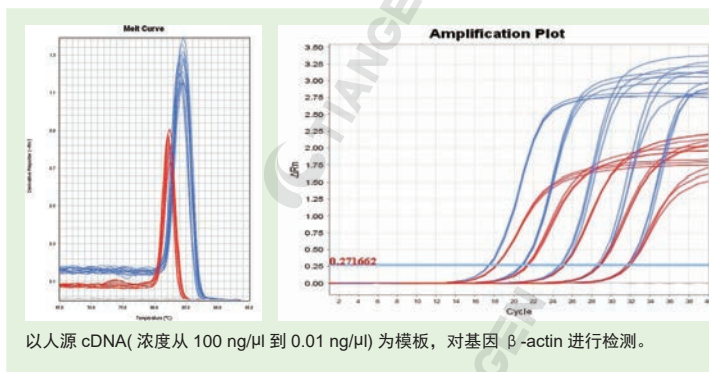
可快速激活的抗体修饰的 Anti Taq DNA 聚合酶，配合独特的快速 Buffer 体系，成为目前市面上最快速的 SYBR Green 试剂，提高实验效率。

目前最快的 SYBR Green 试剂，反应时间缩短 1000 sec



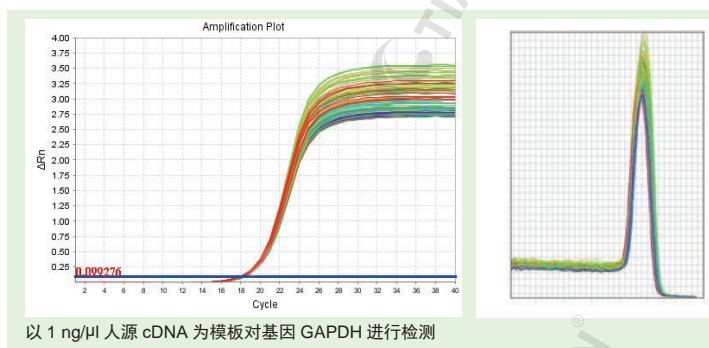
扩增能力强——扩增荧光信号更强

扩增荧光信号更强（扩增能力强），具有更标准的扩增曲线，灵敏度高，能准确定量检测低浓度模板的目的基因，而T公司产品的检测信号弱，CT值靠后，可能导致结果不准确。



稳定性更好——结果可重复性更强

96 孔平行重复实验表明, 本试剂稳定性更强, 结果重复性更好。



SuperReal 荧光定量预混试剂 (探针法)

SuperReal PreMix (Probe)

——性能稳定的双核探针法定量试剂

目录号	包装	价格
FP206-01	20 μl × 125 次	580 元
FP206-02	20 μl × 500 次	1980 元
FP206-03	20 μl × 5000 次	16800 元

产品包装

试剂盒组成	125 次 (20 μl 体系)	500 次 (20 μl 体系)	5000 次 (20 μl 体系)
2 × SuperRealPreMix (Probe)	1.25 ml	4 × 1.25 ml	10 × 4 × 1.25 ml
50 × ROX Reference Dye	250 μl	1 ml	10 × 1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 × 1 ml	5 × 1 ml	10 × 5 × 1 ml

注意事项

- PCR 反应的预变性条件必须设定为 95 °C 15 min，用以激活热启动酶。
- 如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。使用时请上下颠倒轻轻混匀，请不要使用振荡器进行混匀，尽量避免出现泡沫，并经瞬时离心后使用。
- 引物终浓度为 300 nM，探针终浓度为 200 nM 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。
- 需要进一步优化引物浓度的，可以在 50-900 nM 范围内调整；需要进一步优化探针浓度的，可以在 100-500 nM 范围内调整。
- 20 μl 反应体系中，基因组 DNA 或 cDNA 模板的使用量一般小于 100 ng，逆转录产物作为模板时，使用量应不超过 PCR 体系终体积的 20%。

保存条件

-20 °C 避光保存

产品简介

本产品采用了独特的双组分热启动 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增，通过在 PCR 反应液中加入荧光探针，然后检测反应进程中的荧光强度，达到检测 PCR 产物扩增量的目的。

1. 本产品中双热启动酶构成了独特的酶活自动调节系统。酶活自动调节系统是由化学修饰的 HotStar Taq DNA 聚合酶和抗体修饰的 Anti Taq DNA 聚合酶组成，使 SuperReal PreMix 在整个 PCR 反应过程始终保持最佳的 DNA 聚合酶活力，配合精心优化 Buffer 体系，从而具有定量准确，扩增效率高，重复性好和宽广的可信范围的特点。
2. 本产品经过优化特别有利于 Taq 酶发挥其 5' -3' 外切酶活性，使荧光信号的释放达到最佳的效果。此外，SuperReal PreMix(Probe) 也充分降解了探针荧光淬灭基团的信号释放，经过上述优化，用相同量的模板将得到更强的信号。

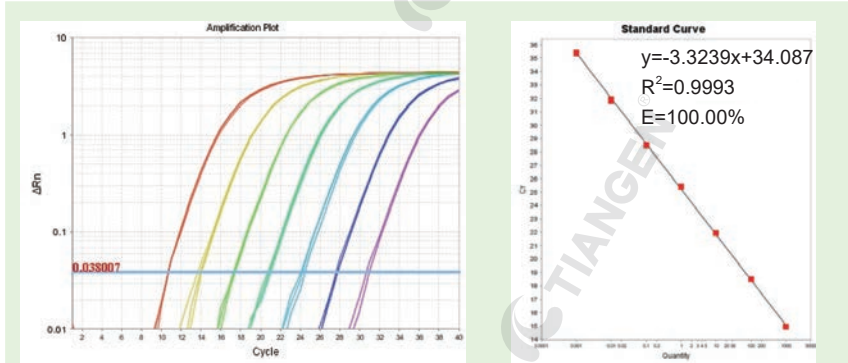
产品特点

- 双核优势：双酶热启动系统，稳定性强，数据更准确。
- 线性检测范围宽：可至少达 10⁷ 的线性检测范围。
- 灵敏度高：可检测病毒，微生物等低丰度模板。
- 扩增能力强：荧光信号更强。

实验例

宽广的线性检测范围

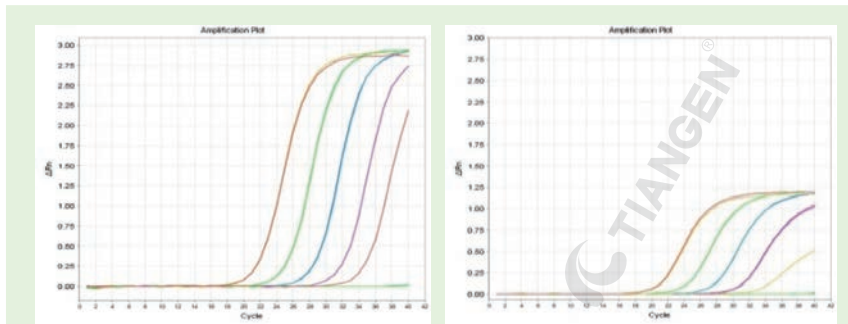
具有很宽的线性检测范围，对 lamda DNA 可检测低至 1 fg/μl 的模板，扩增效率高，重复性好，线性关系优异。



以 lamda DNA 为模板 10 倍梯度稀释 7 个梯度 (浓度从 1 ng/μl 到 1 fg/μl) 进行 PCR 检测

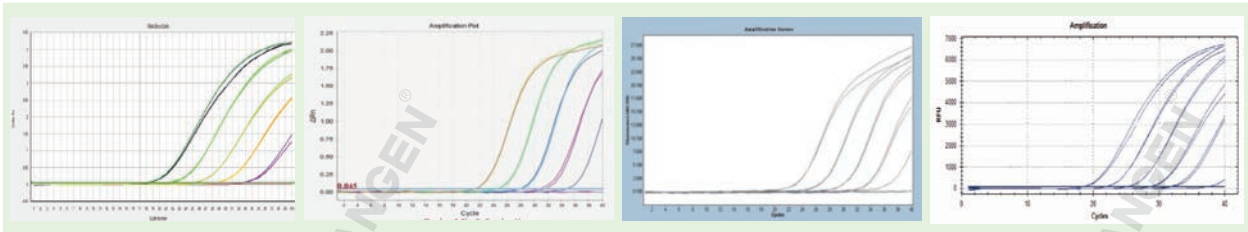
扩增能力强，扩增曲线更标准，灵敏度更高

扩增荧光信号强(扩增能力强)，具有更标准的扩增曲线，灵敏度高，能准确定量检测低浓度模板，而 T 公司产品的检测信号弱，导致灵敏度低，可能导致低浓度模板时检测不到，产生假阴性结果。



以大豆 gDNA(100-0.01ng/μl) 为模板，与 T 公司产品对比，对 Lectin 基因进行检测。

仪器的广泛适应性



经实验验证，广泛地适用于在 ABI、Stratagene、Roche、Bio-Rad 和 Eppendorf 等各种荧光定量 PCR 仪上采用 Probe 法进行基因表达分析和核酸检测等实验。

SuperReal 彩色荧光定量预混试剂 (探针法)

SuperReal PreMix Color (Probe)

——稳定高效的探针法荧光定量彩色试剂

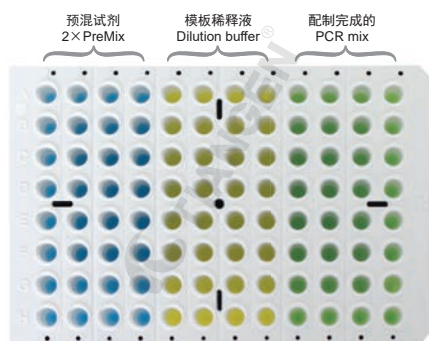
目录号	包装	价格
FP216-01	20 μl × 125 次	580 元
FP216-02	20 μl × 500 次	1980 元

产品包装

产品组成	125 次 (20 μl 体系)	500 次 (20 μl 体系)
2× SuperReal Color PreMix (Probe)	1.25 ml	4 × 1.25 ml
50× ROX Reference Dye	250 μl	1 ml
40× Dilution Buffer (yellow)	1.25 ml	1.25 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 × 1 ml	5 × 1 ml

保存条件

-20 °C 避光保存



产品简介

本产品是采用探针法进行 Real-Time PCR 的专用试剂，为 2× 浓度的 PreMix 形式，反应液配制十分简单方便。产品额外添加了指示剂，利于大量样品的加样，减少误操作概率。SuperReal Color PreMix 采用了独特的双组分热启动 DNA 聚合酶（化学修饰的 HotStar Taq DNA 聚合酶和抗体修饰的 Anti Taq DNA 聚合酶），配合精心优化 buffer 体系，具有定量准确，扩增效率高，重复性好和宽广的可信范围的特点。

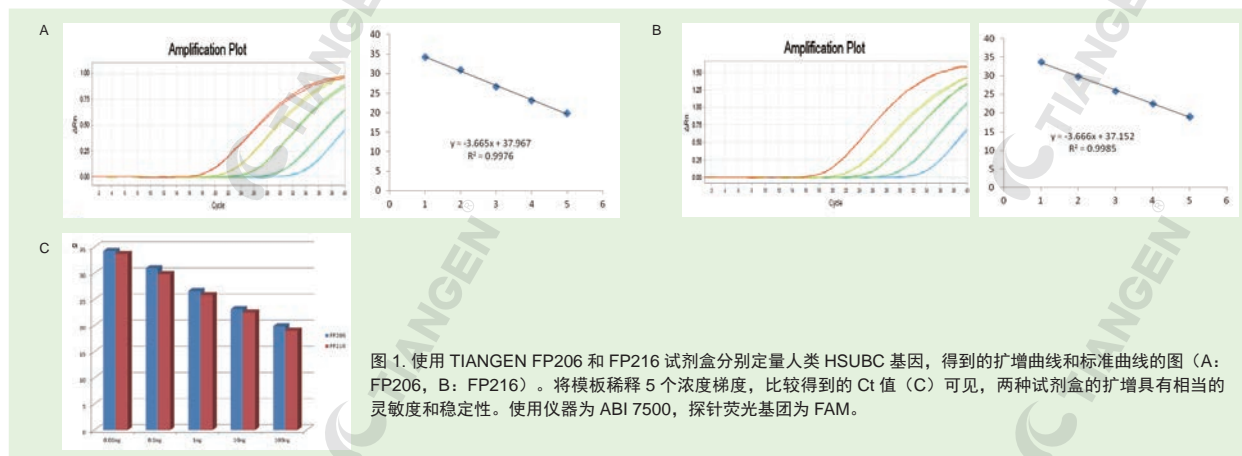
产品特点

- 试剂中加入彩色指示剂，避免由于样品数量多而导致的加样错误或加样遗漏。
- 保持 SuperReal PreMix 一贯的特色，高荧光值，高灵敏度，高特异性。
- 适用多种常见荧光探针 (FAM, HEX, NED 等)，指示剂不会影响探针的荧光值。
- 适用多种常见的荧光定量 PCR 仪 (Roche、Bio-rad、ABI 等)。

下游应用

适用于在各类荧光定量仪器上采用探针法进行表达分析及核酸检测等类型实验，尤其适合样本数量多、加样繁琐的高通量实验。

实验例



FastFire 快速定量 PCR 试剂 (探针法)

FastFire qPCR PreMix (Probe)

——最快速的探针法荧光定量试剂

目录号	包装	价格
FP208-01	20 μl × 125 次	580 元
FP208-02	20 μl × 500 次	1980 元

产品包装

试剂盒组成	125 次 (20 μl 体系)	500 次 (20 μl 体系)
2 × FastFire qPCR PreMix (Probe)	1.25 ml	4 × 1.25 ml
50 × ROX Reference Dye	250 μl	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 × 1 ml	5 × 1 ml

产品特点

- 最快速: FastFire 系列的探针法产品, 采用了可快速激活的抗体修饰 Anti Taq DNA 聚合酶, 配合独特的快速 Buffer 体系, 可节省多达 60% 的反应时间, 成为目前市面上最快速的 Probe 试剂。
- 扩增能力强: 扩增荧光信号强, 结果更准确可信。
- 稳定性好: Buffer 中添加独特的 PCR 稳定剂和增强剂, 使结果更稳定, 重复性好, 更准确可信。
- 仪器广泛适用: 不仅适用于快速荧光定量 PCR 仪, 也适用于普通荧光定量 PCR 仪。
- ROX 校正: 单独包装的 ROX 染料, 使用更灵活, 结果更准确。

产品简介

本产品是利用序列特异性探针, 对 DNA 进行快速、灵敏的 Real-Time PCR 定量检测的专用试剂。优化的预混液可使反应时间缩短 60% 以上, 适用于标准或快速 PCR 仪。FastFire qPCR PreMix 采用了抗体修饰的 Anti Taq DNA 聚合酶, 配合独特的快速 PCR Buffer 体系可确保在所有的 Real-Time PCR 仪上进行灵敏的 qPCR 反应, 具有反应快速、PCR 反应时间缩短 60%, 同时具有高扩增效率, 高扩增特异性和宽广的可信范围的特点, 使你更快获得高准确性结果, 并节约科研时间和能源。

保存条件

-20°C 避光保存

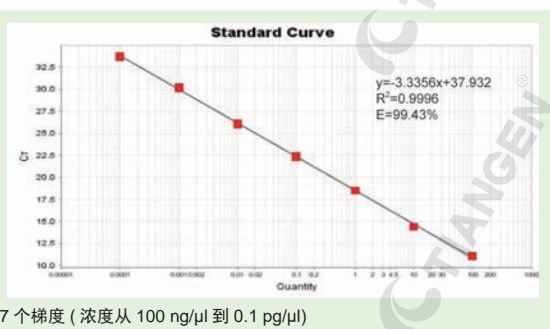
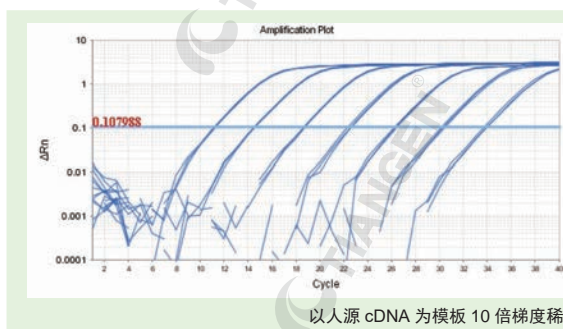
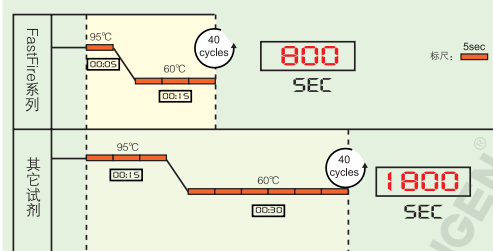
实验例

最快速——提高实验效率, 延长仪器使用寿命, 节约能源
可快速激活的抗体修饰 Anti Taq DNA 聚合酶, 配合独特的 Buffer 体系是目前市面上最快速的 Probe 试剂。

更宽广的线性检测范围

具有很宽的线性检测范围, 可检测低至 0.1 pg/μl 的模板, 扩增效率高, 重复性好, 线性关系优异。

目前最快的 Probe 试剂, 反应时间缩短 1000 sec



以人源 cDNA 为模板 10 倍梯度稀释 7 个梯度 (浓度从 100 ng/μl 到 0.1 pg/μl)

HRM 分析试剂盒 (EvaGreen)

HRM Analysis Kit (EvaGreen)

— 高分辨率熔解曲线分析的专业试剂

目录号	包装	价格
FP210-01	20 μl × 125 次	720 元
FP210-02	20 μl × 500 次	2480 元

产品包装

试剂盒组成	125 次 (20 μl 体系)	500 次 (20 μl 体系)
2xHRM Analysis PreMix (EvaGreen)	1.25 ml	4 × 1.25 ml
50×ROX Reference Dye	250 μl	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 × 1 ml	5 × 1 ml

产品特点

- 高分辨率：采用 EvaGreen 饱和染料，在饱和状态下具很高的熔解曲线分辨率，可以区分单个碱基的变异。
- 高特异性：采用抗体修饰的热启动 DNA 聚合酶，降低非特异性扩增，提高特异性。
- 高稳定性：精心优化 Buffer 体系，增加了熔解曲线的稳定性，提高结果可信度。
- ROX 校正：单独包装的 ROX 染料，使用更灵活，结果更准确。

保存条件

-20℃ 避光保存

产品简介

本产品结合了饱和染料 EvaGreen 和抗体酶的优点，是一款适用于高分辨率熔解曲线 (High Resolution Melting, HRM) 分析的专业试剂盒。本品是一种 2 × PreMix, PCR 反应液配制十分简单方便；具有分辨率高和模板高度适应性等特点。

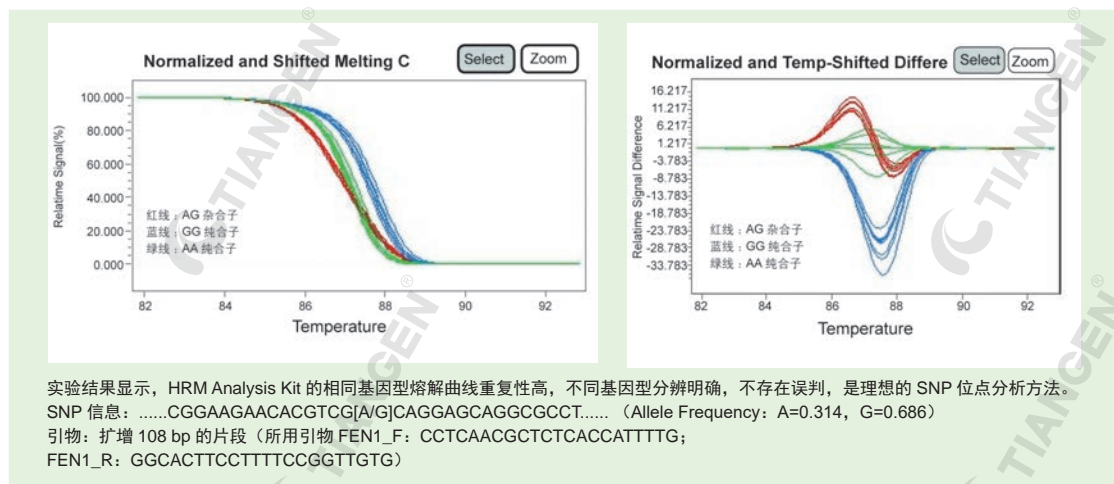
与 SYBR Green 不同，EvaGreen 在高浓度情况下不会抑制 PCR 反应；可以使双链 PCR 产物的结合量达到饱和状态，所以称为“饱和染料”。不会产生 SYBR Green 的“染料重排”现象，能够很好的区分扩增产物之间单个碱基的差异。本产品可用于已知 SNP 分析，未知 SNP 筛选，以及未知突变基因扫描和甲基化 PCR 分析等研究。

下游应用

- 已知 SNP 分型。
- 未知 SNP 筛选。
- 未知突变基因扫描。
- 甲基化 PCR 分析。

实验例

使用 DP348 提取 100 μl 人类血液样本，上样量 50 ng，根据 NCBI SNP 数据库，选取 FEN1 基因的已知 SNP (rs174538) 使用 Roche LightCycle480 检测，结果如下：



实验例

根据 NCBI SNP 数据库，选取已知的 SNP 进行检测，检测的 SNP 信息如下：

RefSNP number: rs174538

Gene Name: FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1)

序列: CGCTCCGCCACCGGAAGAACACGTCG[A/G]CAG-GAGCAGGCGCCTAGCACAACCG

Allele Frequency: A=0.314, G=0.686

根据该 SNP 位点两侧序列信息，设计引物：FEN1_F: CCT-CAACGCTCTCACCATTTTG；

FEN1_R: GGCACCTTCCTTTTCCGGTTGTG；扩增 PCR 产物长度为 108 bp。配置反应体系，在 Roche LightCycle480 仪器上运行，检测 24 个个体，结果如下：

仪器要求

HRM 对仪器的要求较高，ABI 7500 Fast，ABI 7900HT，Roche LightCycler 480，Qiagen Roter-Gene 等配合专用软件可进行 HRM 实验。

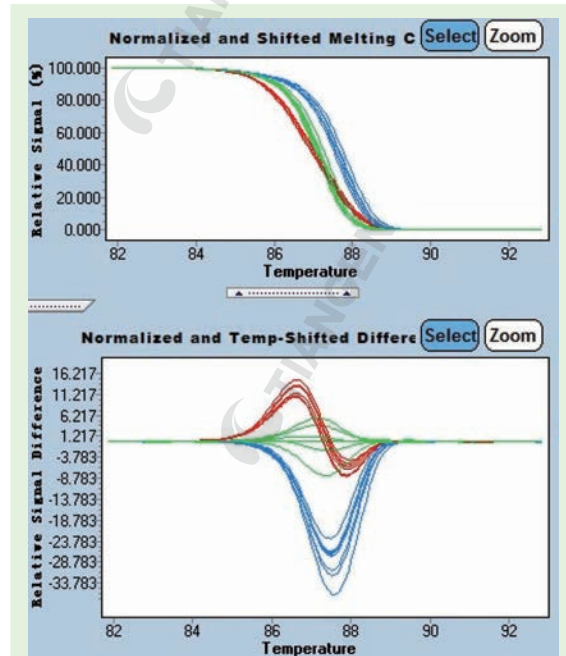


图 1. 对已知 SNP 进行检测，NCBI Assay ID 为 ss869699；PCR 产物长度为 108 bp；24 个检测样本。Roche LightCycler 480 仪器运行，收集熔解曲线信号参数：Ramp Rate 0.05；Acquisitions 12；Gene scanning 方法分析。结果中可以看出，HRM Analysis Kit 的不同基因型分辨明确，相同基因型熔解曲线重复性高，不存在误判。

TIANexact 基因分型 PCR 试剂 (探针法)

TIANexact Genotyping qPCR PreMix(Probe)

—SNP 位点精准分型的探针法试剂

目录号	包装	价格
FP211-01	20 μl × 125 次	700 元
FP211-02	20 μl × 500 次	2380 元

产品包装

试剂盒组成	125 次 (20 μl 体系)	500 次 (20 μl 体系)
2 × TIANexact Genotyping PreMix (Probe)	1.25 ml	4 × 1.25 ml
50 × ROX Reference Dye	250 μl	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 × 1 ml	5 × 1 ml

产品特点

- 高特异性：特异的抗体修饰热启动 Taq DNA 聚合酶，降低非特异性扩增，提高特异性。
- 防弹式基因分型：独特 Buffer 体系能高效屏蔽 PCR 抑制剂对 SNP 分型的影响。
- 准确率高：强劲的 SNP 分型荧光信号，使结果更易判定。
- 适用范围广：适用于植物，动物等样本，也适用于一些环境样本的粗提液检测。
- 蓝色指示剂：预混液中含有蓝色指示染料，避免添加错误。
- ROX 校正：单独包装的 ROX 染料，使用更灵活，结果更准确。

产品简介

本产品是一款专门应用于探针法 SNP 检测的即用型 2 × 浓度的热启动 PCR 预混试剂。该预混试剂含有特异的抗体修饰 Taq DNA 聚合酶，能有效检测极低丰度的 DNA 模板。精心配制的独特 PCR 缓冲液能有效消除众多对 PCR 的抑制及对荧光信号淬灭的影响，对 SNP 鉴定有很好的特异性和扩增效率，特别是对粗提样本，其表现出高度的抗逆性。适用于植物，动物，以及一些环境样本的粗提液。Buffer 中预混有蓝色指示染料，该染料对 PCR 反应以及探针荧光没有任何影响；使操作更加方便，避免大量样本小体系（10 μl 体系）操作过程中容易产生的加样错误。

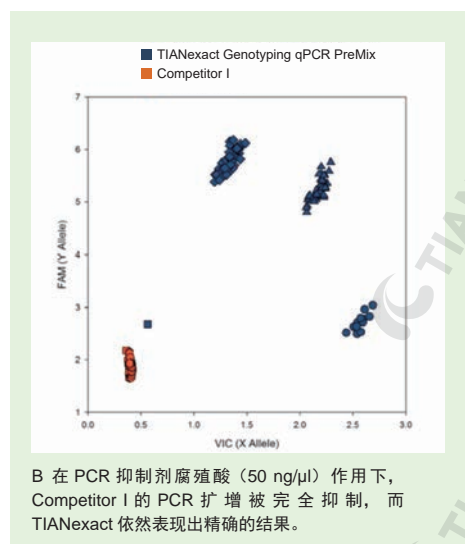
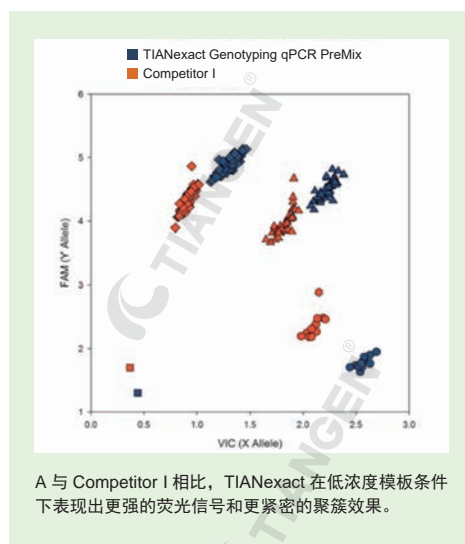
下游应用

- 已知 SNP 分型。

保存条件

-20℃ 避光保存

实验例



Quant 一步法反转录荧光定量试剂盒 (SYBR Green)

Quant One Step RT-qPCR Kit(SYBR Green)

—使用 SYBR-Green 进行一步法 Real-Time RT-PCR 专用产品

目录号	包装	价格
FP303-01	50 μ l \times 50 次	1500 元

产品包装

试剂盒组成	50 次 (50 μ l 体系)
2 \times Quant One Step RT-qPCR Mix (SYBR)*	1.3 ml
HotMaster Taq Polymerase (2.5 U/ μ l)	130 μ l
Quant RTase (for one step)	30 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	2 \times 1 ml

* 内含 dNTP Mixture, Mg²⁺, SYBR Green I 和 ROX Reference Dye 等

保存条件

-20 $^{\circ}$ C 避光保存

产品特点

- 进行 Real Time One Step RT-PCR 反应，可以快速、准确地对 RNA 病毒等微量 RNA 进行分析。试剂盒中使用了改良后的 HotMaster Taq Polymerase，具有高扩增效率，高扩增灵敏度，高扩增特异性的特点。
- 2 \times Quant One Step SYBR RT PCR Master mix 中预先混有 SYBR Green 和 Rox Reference Dye 等，反应液配制十分简单方便。

产品简介

本试剂盒是采用 SYBR Green 嵌合荧光法进行 Real Time One Step RT-PCR 的专用产品。使用本制品进行 Real Time RT-PCR 反应可在同一反应管内连续进行，操作简单，并能有效防止污染。本反应体系由于可以对扩增产物进行实时检测，大大提高了检测灵敏度，并省略了 PCR 反应后的电泳步骤，非常适合于微量 RNA 的检测。

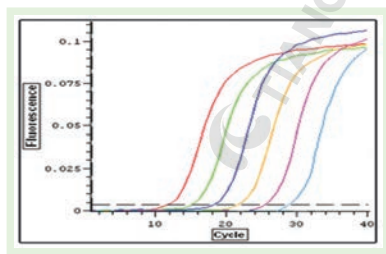
本试剂盒中使用了最适合于 Real Time RT-PCR 的反转录酶 Quant RTase 和 HotMaster Taq DNA Polymerase。Quant Reverse Transcriptase 是一种由工程菌进行重组表达的全新高效反转录酶，具有与 RNA 高亲和性的特点，能通读 GC 含量高、二级结构复杂的 RNA 模板。Quant RTase 是在 Quant Reverse Transcriptase 基础上进行修饰，使之更适合一步法 Real Time PCR。HotMaster Taq DNA Polymerase 利用抑制剂通过温度调节方式封闭 HotMaster Taq DNA Polymerase 的底物结合位点，温度低于 40 $^{\circ}$ C 时，形成非活性的酶-抑制剂复合物，当温度升高至引物特异性的退火温度时，结合平衡向模板-特异性引物复合物形成方向移动，因此最大限度的减少 PCR 扩增全程中的非特异性扩增产物产生，大大提高了荧光定量 PCR 反应的精确性。

本试剂盒可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

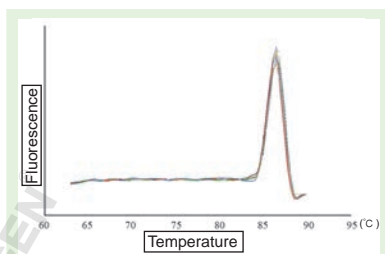
产品应用

该试剂盒适用于一步法 Real Time RT-PCR，可以准确简便地进行 mRNA 表达分析，适用于各种类型荧光定量 PCR 仪。

实验例



扩增曲线



融解曲线

实验材料: Human total RNA;
目的基因: β -actin 基因;
模板稀释: 按照 10 的倍数稀释模板为 0.001ng -100ng;
One Step qRT-PCR 试剂盒: Quant One Step qRT-PCR (SYBR Green) Kit (FP303)。

FastKing 一步法反转录 - 荧光定量试剂盒 (探针法)

FastKing One Step RT-qPCR Kit (Probe)

—更灵敏更高效的一步法反转录和探针法荧光定量试剂

目录号	包装	价格
FP314-01	50 μl × 50 次	1980 元
FP314-02	50 μl × 200 次	4980 元

产品包装

试剂盒组成	50 次 (50 μl 体系)	200 次 (50 μl 体系)
2 × FastKing One Step		
Probe RT-qPCR MasterMix	1.25 ml	4 × 1.25 ml
25 × FastKing Enzyme Mix	100 μl	400 μl
50 × ROX Reference Dye	250 μl	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 × 1 ml	5 × 1 ml

产品特点

- 纯净：反转录和荧光定量一步完成，避免交叉污染
- 灵敏：低至 1 ng 的模板也能被准确识别，特别适合低丰度模板
- 抗逆：无惧复杂模板，完美抵御杂质干扰，适合各种不同模板
- 简便：优化产品组成，提高实验效率

下游应用

本试剂盒适用于探针一步法 Real-Time RT-PCR，可以准确简单的进行 mRNA 的表达分析，尤其适合微量 RNA 的检测，适用于各类荧光定量 PCR 仪。

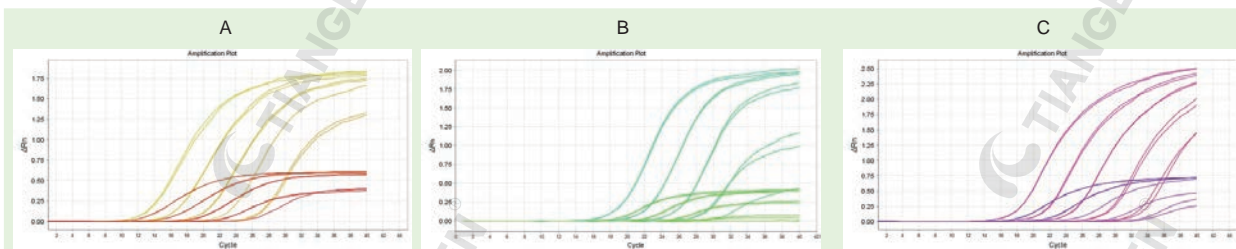
产品简介

本产品是采用探针法 (TaqMan®, Molecular Beacon 等) 进行一步法 RT-qPCR 的专用试剂。使用本制品进行 Real Time One Step RT-qPCR 反应可在同一反应管内连续进行，操作简单，避免了样品间交叉污染的同时也提高了检测的灵敏度。本试剂盒采用 TIANGEN 新型逆转录酶 (King RTase)、新型抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶及 RNase Inhibitor 的预混 Mix 形式，具有更强的 RNA 亲和性和热稳定性，以及更高的扩增效率和特异性。另外，本产品中的 2 × FastKing One Step Probe RT-qPCR MasterMix 是专门为上述两种关键酶而优化的新型反应体系，其中包含必要离子组分、dNTPs 以及 PCR 稳定剂和增强剂，可保证 King RTase 和新型热启动 Taq DNA 聚合酶在整个一步法反应过程中发挥最大功效。

保存条件

-20°C 保存

实验例



分别提取人类 293T 细胞，玉米叶片和肠道病毒的 total RNA，用 FP314 和竞品分别一步法反转录定量内参基因。结果显示，TIANGEN FP314 荧光值高，Ct 靠前，梯度清晰，重复性好，实验结果优于同类产品。

- A: 293T 细胞样本。橙色线：FP314，红色线：竞品。
 B: 玉米叶片样本。蓝色线：FP314，绿色线：竞品。
 C: 肠道病毒样本。粉色线：FP314，紫色线：竞品。

Q&A 荧光定量 PCR 常见问题及分析

Q 如何选择适合的程序

A-1 —— 大部分的双链 DNA 在 95°C 就开始解链了，在有些情况下在 90 至 94°C 都不能很好地变性 DNA。由于部分变性，参加反应的探针和引物相应的减少了，因此反应效率会下降。对于特定的热启动酶，应相应增加热激活的步骤。

A-2 —— 15 到 20 秒对于变性一般的扩增子是足够的，长一点的产物可能会需要 30 秒，但 60 秒的变性时间通常是不需要的。

A-3 —— 根据引物和探针的 T_m 值设计退火温度。三步法 SYBR Green 的退火时间大约 20 到 35 秒，延伸时间为 30 到 60 秒。双标记探针通常是两步法，退火和延伸合并为一步，时间大约是 45 到 60 秒，温度通常在 60°C。

A-4 —— 对于信号的采集，SYBR Green 应当在 72°C 延伸时采集，此时绝大部分的 DNA 是双链状态；对于两步法检测，信号采集应该在退火延伸的整合步骤；Taqman 法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。

Q 无信号出现

A-1 仪器与耗材不匹配或检测通道不正确。
—— 定期检修仪器，换用配套的耗材。

A-2 反应循环数不够。
—— 一般都要在 35 个循环以上，可根据实验情况增加循环（如增至 45 个循环），但高于 45 个循环会增加过多的背景信号。

A-3 引物或探针降解。
—— 可通过 PAGE 电泳检测其完整性。如果降解应重新合成。

A-4 引物或探针的设计不当。
—— 探针的 T_m 值应比引物 T_m 值高 5-10°C 左右，否则会造成探针未杂交上但产物已经开始延伸的情况。上下游引物 T_m 值差不应超过 4°C。避免引物或探针中出现二级结构。

A-5 模板量太少。
—— 对未知浓度的样品应使用相对较高的浓度进行预实验，根据预实验的结果再对起始模板量进行调整或稀释。模板加入量不应超过 500 ng DNA。

A-6 模板降解。
—— 应避免在样品制备中引入杂质，避免反复冻融的情况。

Q 信号出现过晚

A-1 扩增效率低，反应条件不够优化。
—— 参考 Q5。

A-2 PCR 模板上样量的不足或模板降解。
—— 提高模板量，保证模板完整性。

A-3 酶的活性低或缓冲液成分改变。
—— 应注意试剂的有效期和保存条件。

A-4 PCR 产物太长。
—— 一般采用 100-150bp 的产物长度。

Q 标准曲线的线性关系不佳

A-1 加样存在误差，稀释不准确，使得标准品不呈梯度。
—— 提高实验操作精度。

A-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。

A-3 引物或探针不佳。
—— 可重新设计更好的引物和探针。

A-4 模板中存在抑制物，或模板浓度过高。
—— 降低模板量或稀释模板。

Q 扩增效率低

A-1 引物或探针设计不合理
—— 应调整设计更好的引物或探针。

A-2 反应试剂中的部分成分、特别是荧光染料降解。
—— 检查试剂盒是否过期或保存不当。换用新的试剂盒。

A-3 反应条件不够优化。
—— 可适当降低退火温度或改为三步扩增法。

A-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。

A-5 镁离子浓度低。
—— 适当增加镁离子浓度。按 0.5 mM 的间距调整。

Q 实验重复性不好

A-1 加样不准确。
—— 提高实验操作精度。

A-2 样品在仪器上的温度条件有差异。
——应尽量避免在仪器最外一圈的孔内进行样本组的实验，并定时对仪器进行校正。

A-3 模板浓度低。
——样品初始浓度越低，杂质的影响越大，重复性越差。应减少样品的稀释倍数。

Q 阴性对照也出现明显的扩增

A-1 使用的试剂、酶或水被污染。
——换用新的试剂和水，清洁实验区。

A-2 引物二聚体的影响。
——在 35 个循环以后出现阴性扩增属正常情况，可配合熔解曲线进行分析。如引物二聚体 Ct 过于靠前，应重新设计引物。

A-3 反应过程中探针的降解。
——用 PAGE 电泳对探针进行检测。如果降解应重新合成。

Q 熔解曲线是单一峰，但 Tm 值偏低

A-1 ——目的片段为短片段，如 miRNA 等。这类产物的 Tm 值比一般产物低。

A-2 ——目的片段为长片段，则有可能是引物二聚体的峰，而没有特异性产物的峰。可用同样的模板和引物进行普通 PCR，之后进行琼脂糖电泳，根据电泳条带的大小判断是否有特异性条带产生，进而调整引物序列或引物浓度。

Q 熔解曲线是单一峰，但峰型差

A-1 ——峰比较宽，顶端不够尖，可能是溶液体系中离子配比的影响，也与产物的序列有关，GC 含量过高会导致熔解曲线变宽。一般认为当峰的跨度不超过 7°C 时，结果可信，不

影响最后的定量。但是，跨度过大的峰可能是两个大小相近的扩增产物叠加产生，应进行高浓度（3%-4%）的琼脂糖电泳，检测是否存在非特异性扩增。如果有，则此熔解曲线相当于非单一峰，结果不可信。调整方案参考 Q10。此外，应确认扩增序列内不会出现缺失突变的情况。

A-2 ——峰不对称，上峰和下峰的曲线坡度不同，最大的可能是存在长度不同的非特异性扩增，但是量比较小。用高浓度琼脂糖电泳检测，条带可能存在弥散。使用三步法扩增，调整退火温度，可以有效的改善这种情况。如果是上峰曲线比较平缓，则有可能是延伸不完全，形成一系列短的 PCR 产物。可以考虑在调整退火温度的同时增加延伸时间。

Q 熔解曲线不是单一峰

A-1 引物设计不够优化。
——与阴性对照的熔解曲线比对可判断是引物二聚体或是非特异性扩增的影响。相应的调整引物设计，避免引物二聚体、发夹结构或非特异性扩增的出现。

A-2 引物浓度不佳。
——适当降低引物的浓度（200-250 nM 为宜），并注意上下游引物的浓度配比。

A-3 镁离子浓度过高。
——适当降低镁离子浓度，或选择更合适的预混试剂盒。

A-3 模板有基因组的污染。
——RNA 提取过程中应避免基因组 DNA 的引入，通过设计跨内含子引物来避免基因组扩增的影响。

部分使用 TIANGEN PCR 产品发表的文献列表

题目	期刊	IF	使用产品	单位
Regulation of HIV-1 Gag-Pol Expression by Shiftless, an Inhibitor of Programmed -1 Ribosomal Frameshifting	Cell	36.216	SuperReal	中科院生物物理所
Harnessing a previously unidentified capability of bacterial allosteric transcription factors for sensing diverse small molecules in vitro	Science Advances	12.804	FastFire	中科院微生物所
Drosophila Dicer-2 has an RNA interference-independent function that modulates Toll immune signaling	Science Advances	12.804	SuperReal	武汉大学
A novel class of microRNA-recognition elements that function only within open reading frames	Nature Structural & Molecular Biology	12.109	RealUniversal	武汉大学
Suppression of SRCAP chromatin remodelling complex and restriction of lymphoid lineage commitment by Pcid2	Nature Communications	11.878	RNA 提取 / SuperReal	中科院生物物理所
Multiple truncated isoforms of MAVS prevent its spontaneous aggregation in antiviral innate immune signalling	Nature Communications	11.878	RNA 提取 / SuperReal	中科院 上海生化细胞所
Ube2D3 and Ube2N are essential for RIG-I-mediated MAVS aggregation in antiviral innate immunity	Nature Communications	11.878	RNA 提取 / SuperReal	中科院 上海生化细胞所
Sensing of cytosolic LPS through caspy2 pyrin domain mediates noncanonical inflammasome activation in zebrafish	Nature Communications	11.878	RNA 提取 / FastKing/SuperReal	华东理工大学
Inhibition of the mevalonate pathway enhances cancer cell oncolysis mediated by M1 virus	Nature Communications	11.878	SuperReal	中山大学医学院
Identifying and characterizing SCRaMbLEd synthetic yeast using ReSCuES	Nature Communications	11.878	FastQuant/ SuperReal	中科院深圳先进技术研究院
Dop1 enhances conspecific olfactory attraction by inhibiting miR-9a maturation in locusts	Nature Communications	11.878	miRNA/ RealUniversal	中科院动物所
DNA-PK inhibition synergizes with oncolytic virus M1 by inhibiting antiviral response and potentiating DNA damage	Nature Communications	11.878	SuperReal	中山大学医学院
A mapping framework of competition-cooperation QTLs that drive community dynamics	Nature Communications	11.878	SuperReal	北京林业大学
An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in Pseudomonas aeruginosa	Nature Communications	11.878	FastKing/ SuperReal	香港城市大学
Zika virus NS3 is a canonical RNA helicase stimulated by NS5 RNA polymerase	Nucleic Acids Research	11.147	One-Step qPCR	协和医学院基础所
H2A.Z.1 crosstalk with H3K56-acetylation controls gliogenesis through the transcription of folate receptor	Nucleic Acids Research	11.147	DNA 提取 / FastQuant/ SuperReal	中科院动物所
RNAe: an effective method for targeted protein translation enhancement by artificial non-coding RNA with SINEB2 repeat	Nucleic Acids Research	11.147	RNAprep/ FastQuant/ SuperReal	清华大学
Quantitative proteomics reveals that long non-coding RNA MALAT1 interacts with DBC1 to regulate p53 acetylation	Nucleic Acids Research	11.147	FastQuant/ SuperReal	天津医科大学
Brain-specific deletion of histone variant H2A.z results in cortical neurogenesis defects and neurodevelopmental disorder	Nucleic Acids Research	11.147	DNA 纯化 / SuperReal	中科院动物所
LncRNA Inc-RI regulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks by stabilizing RAD51 mRNA as a competitive endogenous RNA	Nucleic Acids Research	11.147	SuperReal	北京放射医学研究所

题目	期刊	IF	使用产品	单位
The RNA binding protein EWS is broadly involved in the regulation of pri-miRNA processing in mammalian cells	Nucleic Acids Research	11.147	SuperReal	武汉大学
Arabidopsis ECAP Is a New Adaptor Protein that Connects JAZ Repressors with the TPR2 Co-repressor to Suppress Jasmonate-Responsive Anthocyanin Accumulation	Molecular Plant	10.812	RNA 提取 / SuperReal	中国农业大学
A GmNINA-miR172c-NNC1 Regulatory Network Coordinates the Nodulation and Autoregulation of Nodulation Pathways in Soybean	Molecular Plant	10.812	RNA 提取 / FastKing/ SuperReal	华中农业大学
The Genome of Artemisia annua Provides Insight into the Evolution of Asteraceae Family and Artemisinin Biosynthesis	Molecular Plant	10.812	RNA 提取 / SuperReal	上海交通大学
Robust Transcriptional Activation in Plants Using Multiplexed CRISPR-Act2.0 and mTALE-Act Systems	Molecular Plant	10.812	SuperReal	成都电子科技大学
Paracrine and epigenetic control of CAF-induced metastasis: the role of HOTAIR stimulated by TGF-β1 secretion	Molecular Cancer	10.679	FastQuant/ SuperReal	天津医科大学
Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism	PNAS	9.661	FastQuant/ SuperReal	中科院动物所
Selective replication of oncolytic virus M1 results in a bystander killing effect that is potentiated by Smac mimetics	PNAS	9.661	SuperReal	中山大学
Identification and characterization of alphavirus M1 as a selective oncolytic virus targeting ZAP-defective human cancers	PNAS	9.661	SuperReal	中山大学
Heterochromatin protects retinal pigment epithelium cells from oxidative damage by silencing p53 target genes	PNAS	9.661	RNA 提取 / SuperReal	中山大学 中山眼科中心
Compression Generated by a 3D Supracellular Actomyosin Cortex Promotes Embryonic Stem Cell Colony Growth and Expression of Nanog and Oct4	Cell Systems	8.64	FastQuant/ SuperReal	清华大学
RNF20 controls astrocytic differentiation through epigenetic regulation of STAT3 in the developing brain	Cell Death and Differentiation	8.086	基因组提取 / RNAprep/FastQuant/ SuperReal	中科院动物所
A negative feedback loop of ICER and NF-κ B regulates TLR signaling in innate immune responses	Cell Death and Differentiation	8.086	FastQuant/ SuperReal	同济大学附属第十人民医院
Long noncoding RNA lncAIS downregulation in mesenchymal stem cells is implicated in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis	Cell Death and Differentiation	8.086	SuperReal	协和医院 / 生物物理所
DC-SIGN-LEF1/TCF1-miR-185 feedback loop promotes colorectal cancer invasion and metastasis	Cell Death and Differentiation	8.086	miRNA/SuperReal	大连医科大学第二附属医院
Circular RNA cESRP1 sensitises small cell lung cancer cells to chemotherapy by sponging miR-93-5p to inhibit TGF-β signalling	Cell Death and Differentiation	8.086	FastQuant/Talent	南方医科大学珠江医院
Tet3-Mediated DNA Demethylation Contributes to the Direct Conversion of Fibroblast to Functional Neuron	Cell Reports	7.815	基因组提取 / FastQuant/ SuperReal	中科院动物所
The Anti-Warburg Effect Elicited by the cAMP-PGC1α Pathway Drives Differentiation of Glioblastoma Cells into Astrocytes	Cell Reports	7.815	SuperReal	中山大学
Two B-Box Domain Proteins, BBX18 and BBX23, Interact with ELF3 and Regulate Thermomorphogenesis in Arabidopsis	Cell Reports	7.815	RNA 提取 / SuperReal Color	复旦大学
Zika Virus Infection in Hypothalamus Causes Hormone Deficiencies and Leads to Irreversible Growth Delay and Memory Impairment in Mice	Cell Reports	7.815	One-Step qPCR	首都医科大学