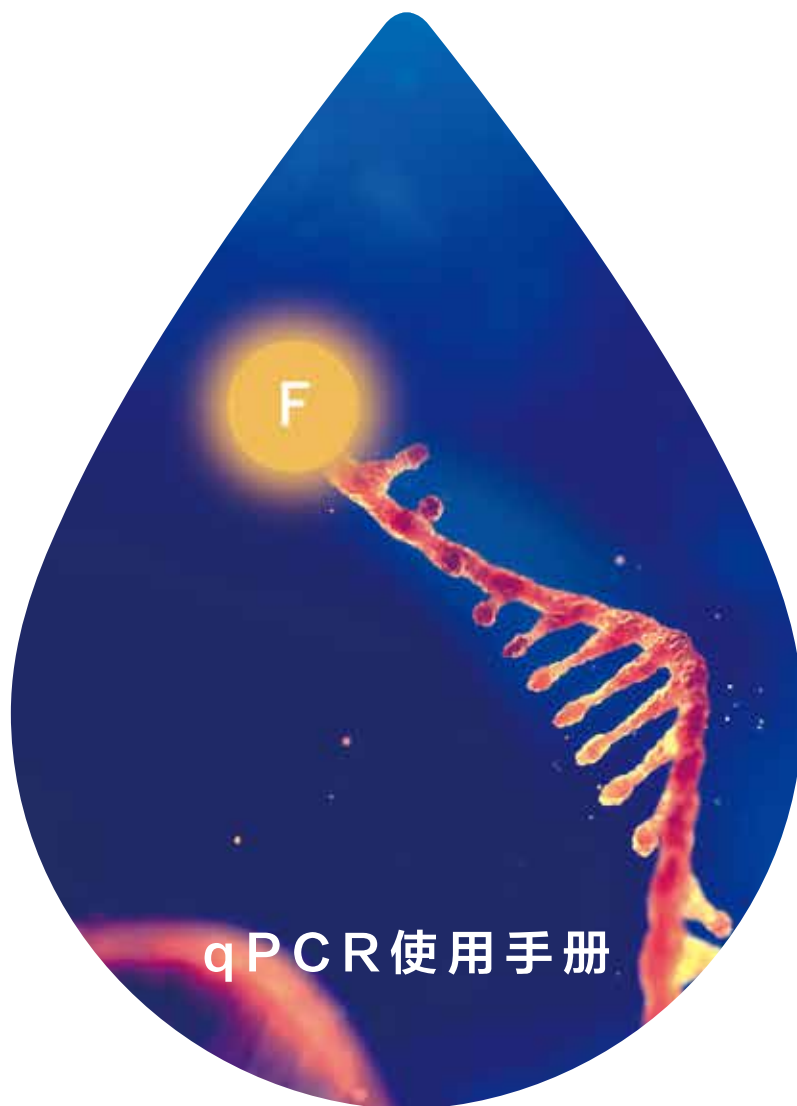


# qPCR探针和引物合成服务

分子诊断应用中qPCR技术的解决方案



- ✓ 外源污染率极低：杜绝NTC干扰峰
- ✓ 荧光标记稳定：保证阳性扩增信号
- ✓ 稳定性极佳：保证实验和分子诊断产品的稳定性



## “探”知未来 “引”领时代

实时荧光定量PCR（qPCR）技术作为分子诊断的主要技术之一，凭借其操作简便，灵敏度高的优势，在病毒检测、基因分型、肿瘤相关基因表达检测等方面应用广泛。未来，qPCR技术在精准医疗领域中预防早筛、伴随诊断和复发监控等方面发展前景广阔。

金斯瑞生物科技（01548.HK）是全球领先的生命科学研究服务及产品供应商，提供引物、基因、多肽、抗体、蛋白等生物试剂定制服务，服务全球160多个国家和地区的30多万客户。金斯瑞期待以领先的技术和专业的服务，助力您的qPCR项目高效推进，在分子诊断的时代遥遥领先，大显身手。

# qPCR探针和引物合成服务

——分子诊断应用中qPCR技术的解决方案

**您还在为探针外源污染和荧光信号不稳定干扰qPCR实验结果而困扰吗？**

**您还在为探针质量不稳定造成的数据波动和实验重复性欠佳而烦恼吗？**

依托17年领先的分子生物学技术平台，金斯瑞以更严苛的标准为您提供：

**外源污染极低、荧光信号稳定和批次间一致性极佳的qPCR探针和引物。**

权威的化学合成科学家严格管理生产流程，

资深的生物应用科学家精准把控下游应用，

高品质的探针和引物必将成为您实验成功稳定的金钥匙。

助力您的qPCR项目更快速顺畅的推进，是金斯瑞为之全力以赴的使命与责任。

# 目录

## 1. 实时荧光定量PCR (qPCR) 技术与应用

——快速掌握qPCR技术要点

qPCR技术原理 .....	2
qPCR实验流程与关键因素 .....	3
qPCR技术的应用与优势 .....	4

## 2. 金斯瑞qPCR探针和引物合成服务

——分子诊断应用的金钥匙

qPCR探针和引物合成服务详情 .....	6
金斯瑞qPCR探针和引物的优势 .....	7

## 3. qPCR探针应用的关键因素

——经典案例、经验分享

qPCR探针应用关键因素分析 .....	10
qPCR探针应用关键因素总结 .....	13

## 4. qPCR实验技巧与注意事项 .....

16



# 实时荧光定量PCR (qPCR) 技术与应用

# qPCR技术原理

qPCR (实时荧光定量PCR) 技术通过检测荧光强度的变化, 定性或定量的检测目标序列, 是基础生物学研究、临床检验和分子诊断的主流技术之一, 操作简便, 灵敏度高, 广泛应用于传染病、肿瘤、遗传病的分子诊断和精准医疗等领域。



预防性诊断



伴随诊断与预后监测

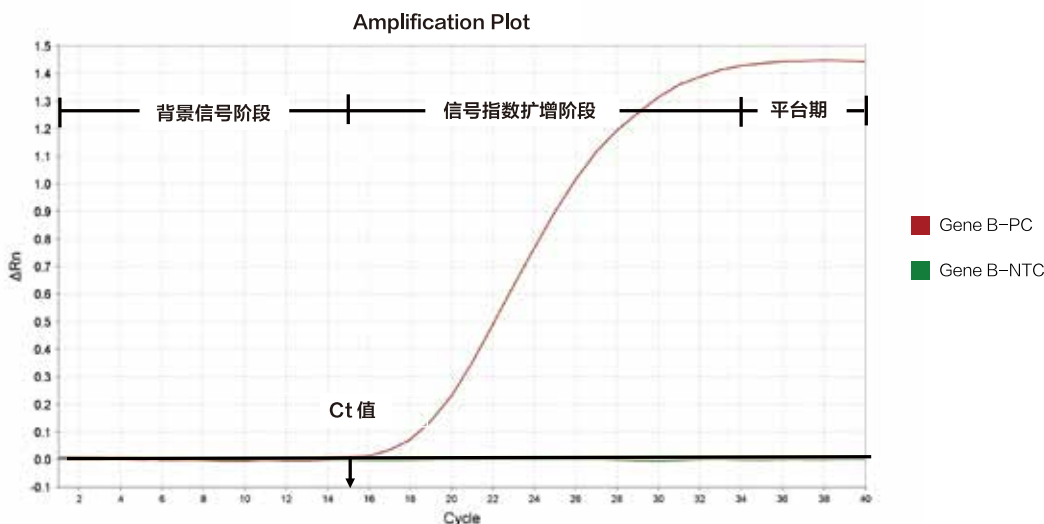


精准医疗方案

qPCR技术有SYBR Green和TaqMan探针两个平台, 其中TaqMan探针可以与目标序列特异性结合, 适用于分子诊断方面的应用。

**qPCR检测原理:** qPCR探针 (TaqMan探针) 5'末端携带FAM、TET、VIC等荧光基团, 3'端携带TAMRA、BHQ、MGB等淬灭基团。qPCR探针与目标序列可以特异性结合, 探针完整时, 报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收; PCR扩增时, Taq酶的5'-3'外切酶活性将探针上的报告荧光基团切下, 并和淬灭荧光基团分离, 荧光监测系统即可接收到荧光信号。

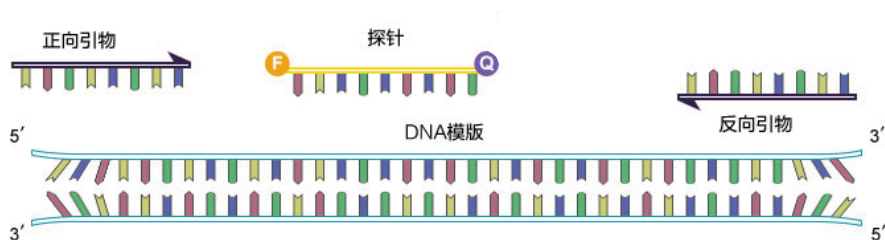
**qPCR检测方法:** Ct值是每个反应荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数, 荧光信号指数扩增阶段, Ct值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, Ct值越小。可根据待测样品与阳性对照的Ct值是否相符, 来进行定性, 也可根据内参法对样品的起始拷贝数进行相对定量。



# qPCR实验流程

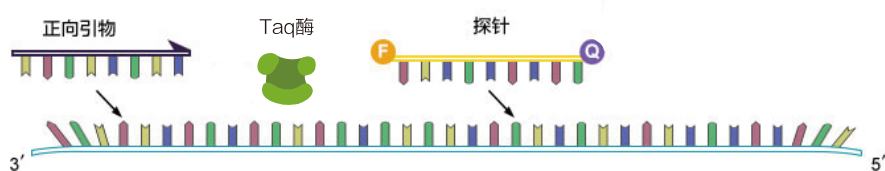
## 第一步：反应体系准备

准备DNA模板（样品）、正/反向引物、TaqMan探针；



## 第二步：模板的变性及退火

模板变性后变成单链，正/反向引物结合在单链模板上，探针也会特异性的结合在单链模板上，此时，探针完整，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收，不会产生荧光值；



## 第三步：聚合反应和信号收集

模板进行PCR扩增，Taq酶的5'-3'外切酶活性将探针上的报告荧光基团切下，并和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号。



## qPCR实验关键因素

**外源污染率：**外源污染可能造成NTC起峰，对样品荧光强度造成干扰，导致Ct值出现偏差，影响检测结果的准确性。

**荧光标记稳定性：**修饰效率低或不稳定，极有可能因为荧光基团脱落造成荧光值偏低甚至未检测到荧光值，同时，也极有可能因为淬灭基团脱落造成荧光信号基线偏高，两种情况都会影响Ct值和检测结果的准确性。

## qPCR的应用



### 分子生物学研究

**核酸分析：**对病原微生物、病毒、转基因动植物基因拷贝数、RNAi基因失活率等进行检测。

**基因表达差异分析：**比较经过不同药物处理等，不同样本间特定基因的表达差异。

**SNP检测：**检测单核苷酸多态性，研究个体对不同疾病的易感性或者对特定药物的不同反应。

**甲基化检测：**甲基化与许多疾病有关，利用Methylight等技术，使未甲基化的胞嘧啶变成尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不受影响，采用qPCR实验区分甲基化和非甲基化DNA。



### 分子诊断与 精准医疗研究

**产前诊断：**产前无创监测各类遗传性疾病，从孕妇的外周血中分离胎儿DNA，用qPCR检测其相关基因。

**病原体检测：**对人类免疫缺陷病毒、肝炎病毒、流感病毒等病原体进行更快捷灵敏的检测。

**药物疗效考核：**利用qPCR检测基因表达量或病毒载量等信息，从而制定不同的治疗方案或考核治疗效果。

**肿瘤基因检测：**部分肿瘤相关基因的突变和表达增加在早期就出现，可利用qPCR检测这些基因的突变与表达量。

## qPCR的优势



灵敏度高



重复性好



操作简便



成本较低





## 金斯瑞 qPCR 探针和引物合成服务

# qPCR探针和引物合成服务

依托17年领先的分子生物学平台，金斯瑞推出qPCR探针和引物，以专业的质控和严格的标准，针对性的解决qPCR技术应用中由于引物质量不合格造成的干扰，是qPCR技术应用于分子生物学检测、分子诊断等领域的绝佳选择。

## 金斯瑞qPCR探针和引物订购详情

分类	纯化方式	碱基范围	周期与价格	发货内容
TaqMan探针	HPLC+	6-39 nt	欢迎咨询	<ul style="list-style-type: none"><li>• 单管或96孔板</li><li>• 干粉或溶液</li><li>• COA文件</li></ul>
正反义链引物				

**HPLC+纯化:** 十万级洁净车间生产，每条探针和引物均采用独立的特殊纯化体系，有效将外源污染控制到最低，避免NTC起峰干扰实验。

**ISO13485认证:** 金斯瑞提供ISO13485认证的qPCR探针和引物合成服务，供有试剂盒临床申报等需求的客户选择。

## 金斯瑞的服务优势



### 定制化服务与质控标准

金斯瑞提供多种qPCR探针与引物服务，包括不同的交付要求与质控标准，精准匹配您的个性化需求。



### 资深化学和生物科学家

资深的化学合成与生物应用科学家，严格监控qPCR探针和引物合成的流程，深入研究您的下游应用，任何可能干扰实验的影响因素都会在合成过程中被有效控制。



### 专业技术支持和项目管理

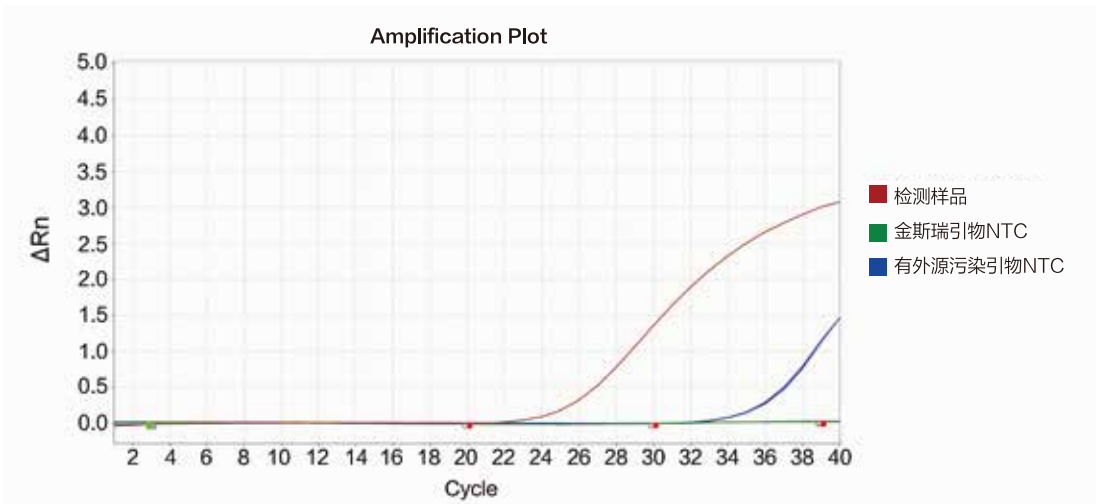
专业的技术支持和项目经理，高效管理与推进您的项目，助您在分子诊断高速发展的时代赢得先机。

欢迎咨询qPCR探针和引物，邮件发送至[oligo@genscript.com.cn](mailto:oligo@genscript.com.cn)或拨打电话400-025-8686转5812或5815，专业技术支持为您服务。

# 金斯瑞qPCR探针和引物的优势

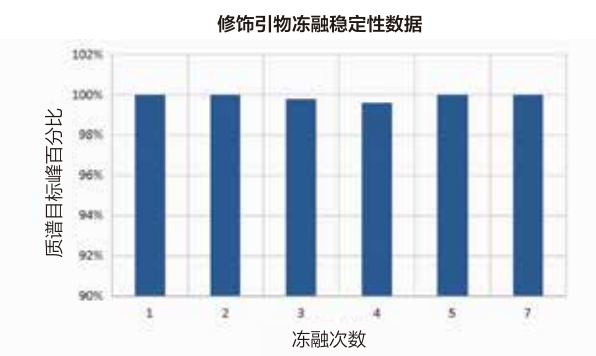
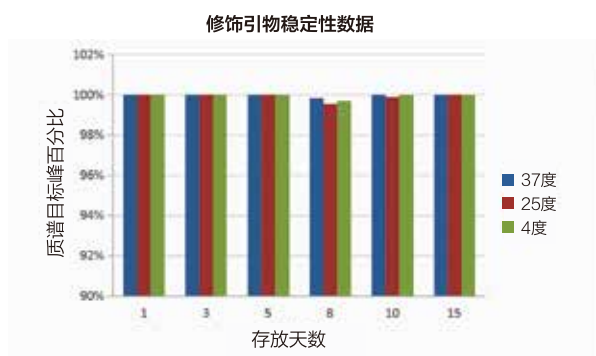
## 外源污染极低：杜绝假阳性信号干扰！

qPCR探针和引物均于十万级洁净间生产，严格控制外源污染，无NTC干扰峰，避免定性和定量结果出现偏差。



## 修饰稳定：保证稳定的阳性扩增信号！

qPCR探针是修饰引物，金斯瑞采用独家的优化修饰方案，确保qPCR探针稳定性更好，受温度、存放时间、冻融次数影响极小，正常保存和操作的情况下，不会因为修饰脱落造成荧光值出现偏差。

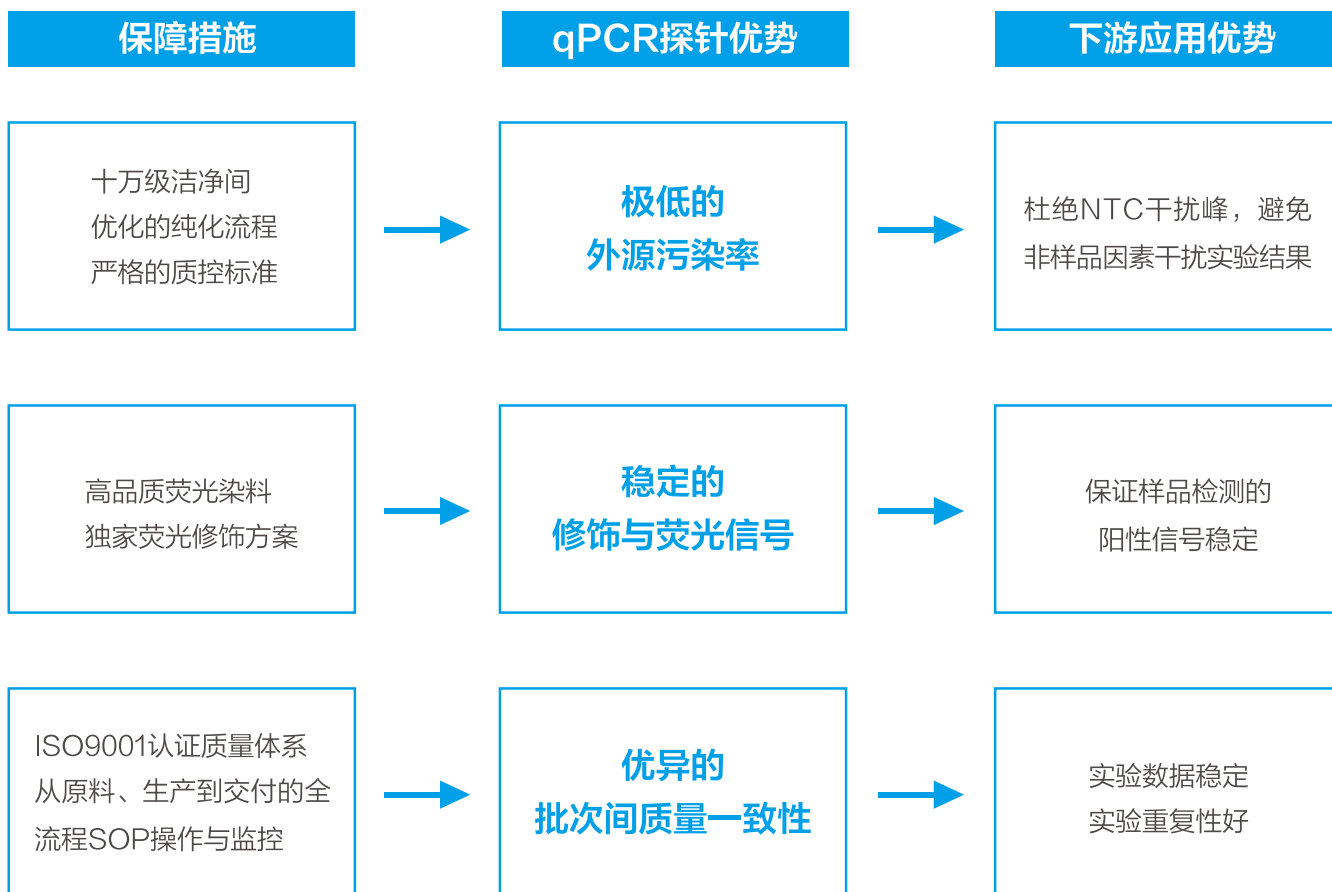


## 批次间一致性好：保证实验的重复性！

探针的纯度、荧光强度、精准定量等参数批次间差异极小，更稳定，保证了实验的可重复性，更保证了诊断试剂盒产品批次间的一致性。

## 金斯瑞qPCR探针和引物遥遥领先的质量是来源于哪些保障措施？

金斯瑞qPCR探针和引物稳定的质量来源于领先的研发水平、规范的生产流程和严苛的质控标准，更有生物应用科学家深度解析可能干扰qPCR实验的影响因素，并在生产过程中严格控制这些因素。金斯瑞质量稳定的qPCR探针和引物也正是您实验成功率和一致性的坚实基础。



欢迎咨询qPCR探针和引物，邮件发送至[oligo@genscript.com.cn](mailto:oligo@genscript.com.cn)或拨打电话400-025-8686转5812或5815，专业技术支持为您服务。



# qPCR探针应用的关键因素

# qPCR探针应用的关键因素解析

金斯瑞深知常规引物的标准不足以满足qPCR实验对qPCR探针质量的严格要求，哪些质量控制标准是影响qPCR实验成败的关键？拥有专业化学合成与生物应用科学家的金斯瑞研发团队为您逐一解析。

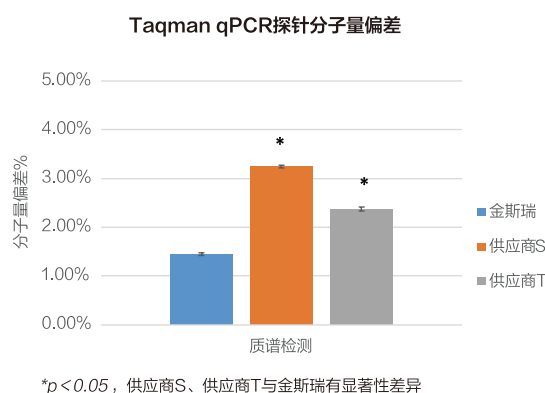
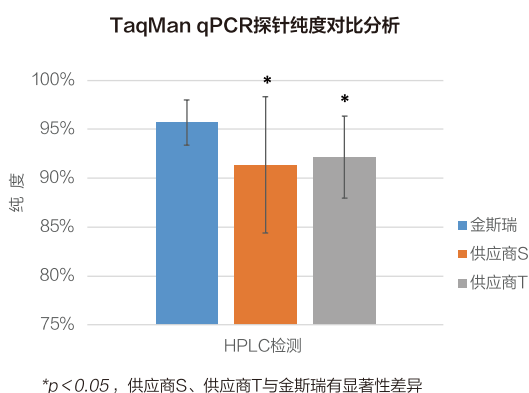
## 关键因素一：纯度与碱基错误率

qPCR探针的纯度是全长序列的探针占全部探针的百分比，纯度较低代表探针中存在较多有缺失的序列（即N-X的比例较高），实验过程中，这部分有缺失的探针可能导致扩增效率下降，造成Ct值偏大，影响检测结果。

qPCR探针的碱基错误率将影响SNP分型检测，由于SNP分型检测会针对野生型和突变型分别设计合成一个探针，放在同一个实验体系中，这两个探针仅会有极少碱基的区别，用于特异性的区分野生型和突变型，因此，探针的碱基错误率将显著影响SNP检测中探针的特异性。

## 实验对比方法：

通过HPLC检测纯度，通过质谱检测分子量，比较金斯瑞、供应商S和供应商T的qPCR探针的纯度和分子量偏差，各检测并统计10组以上探针样品的平均值与标准差。



## 实验结果表明：

金斯瑞qPCR探针的纯度显著高于供应商S和供应商T，多组探针间纯度差异较小，表明批次间一致性好。供应商S和供应商T的多组qPCR探针纯度的标准差 (Error Bar) 较大，表明引物批次间的纯度差异较大，批次间一致性较差。

金斯瑞qPCR探针的实际分子量与理论值的差距最小，表明序列准确性最好，显著优于供应商S和供应商T。

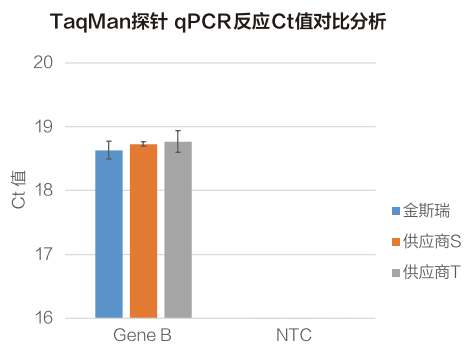
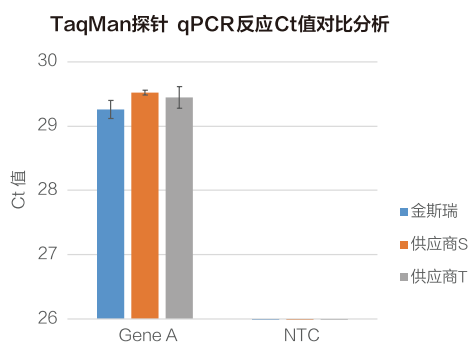
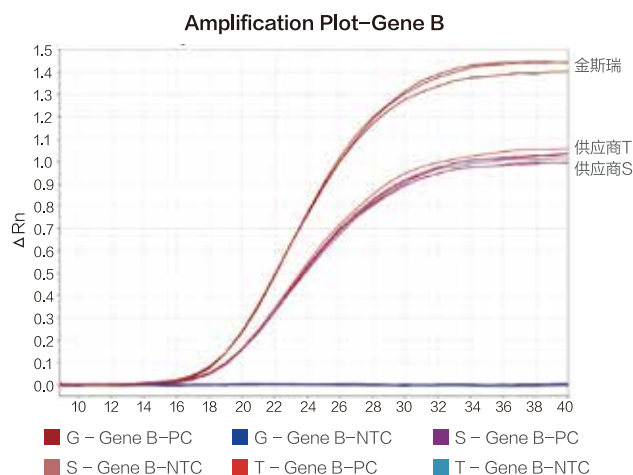
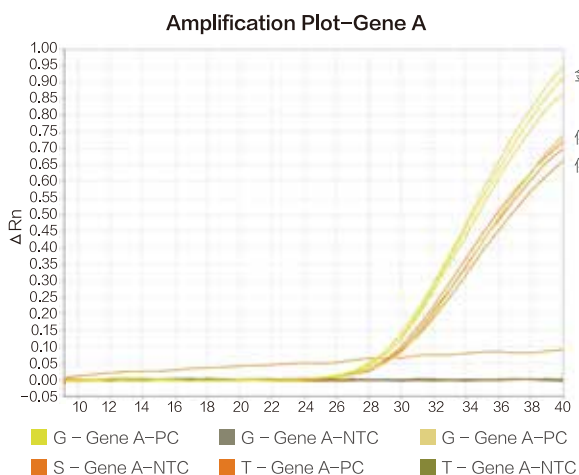
## 关键因素二：荧光强度与Ct值

Ct值是qPCR探针检测的重要参数，可根据待测样品与阳性对照的Ct值是否相符进行定性。Ct值的范围为15-35，特异性相似的情况下，应优选Ct值小，即扩增效率高的探针进行实验。

qPCR实验通过检测荧光信号对目标序列进行检测，因此一般情况下，荧光信号强度也是重要的实验参数之一。

### 实验对比方法：

针对Gene A和Gene B，在相同实验条件下，通过qPCR 扩增曲线图，比较金斯瑞、供应商S和供应商T的qPCR探针的荧光强度与Ct值。



### 实验结果表明：

金斯瑞的qPCR探针荧光强度显著高于供应商S和供应商T，供应商S和供应商T的荧光强度相当。

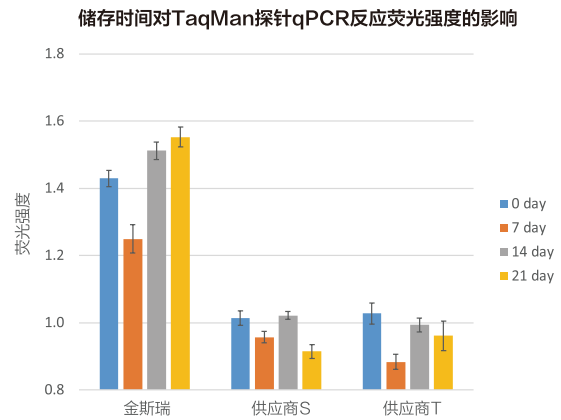
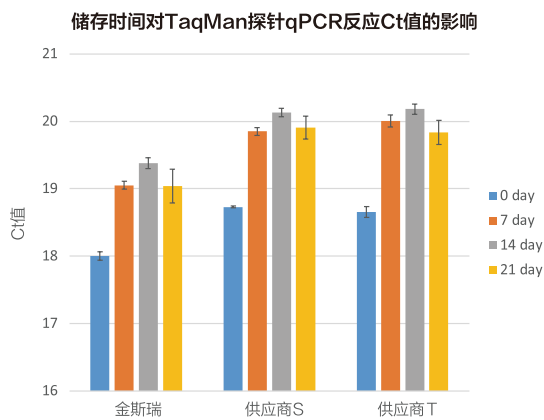
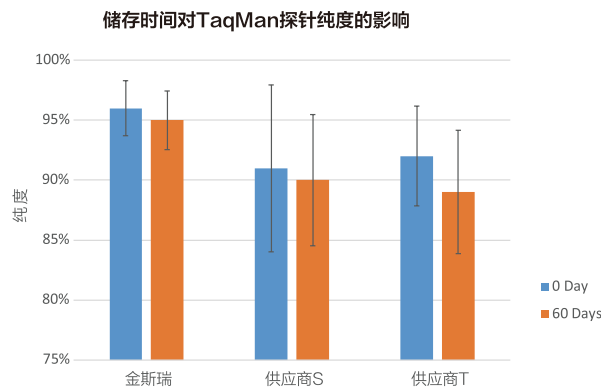
金斯瑞qPCR探针的Ct值位于正常范围内，且Ct值小于供应商S和供应商T，表明扩增效率高于供应商S和供应商T。

## 关键因素三：稳定性

qPCR探针的稳定性决定了实验的稳定性，尤其针对分子诊断应用的产品，作为核心原料的探针的稳定性，直接决定了分子诊断试剂盒的稳定性。

### 实验对比方法：

在相同储存Buffer和储存浓度的条件下，将金斯瑞、供应商S和供应商T的qPCR探针在4℃放置2个月后，利用HPLC检测qPCR探针的纯度，同时检测了荧光强度和Ct值。



### 实验结果表明：

4℃存储2个月后，金斯瑞的qPCR探针纯度变化较小，供应商S和供应商T纯度显著下降，样品组间差异较大。

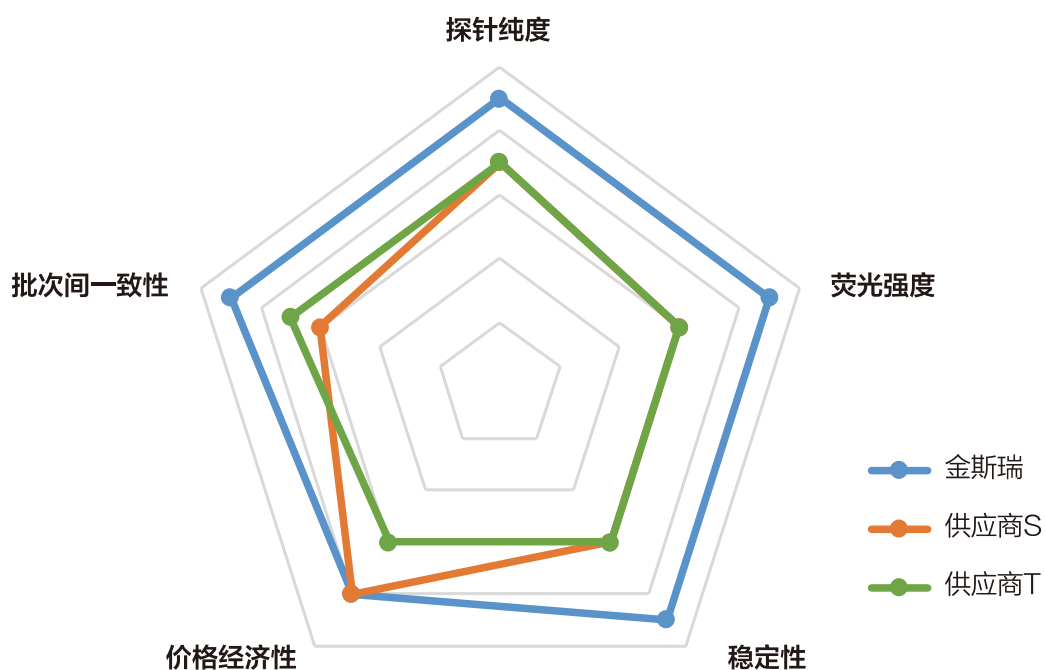
金斯瑞qPCR探针的荧光强度和Ct值受储存时间的影响较小，表明扩增效率变化较小。供应商S和供应商T的qPCR探针Ct值受储存时间影响较大，出现显著升高，表明扩增效率变低。

综上，金斯瑞的qPCR探针受储存时间影响较小，更为稳定，是qPCR实验和分子诊断试剂盒原料的首选。



## qPCR探针应用的关键因素总结

结合qPCR实验应用中探针纯度、荧光强度和稳定性等几个关键因素，市面上几家供应商的质量比较如下：



## 金斯瑞qPCR探针和引物的资质



ISO9001认证



十万级洁净间



ISO13485认证 (可选)

专注引物合成17年，金斯瑞具备领先的研发、先进的技术和顶尖的设备，同时严格执行原料质检、仪器监控、规范生产和质检的全流程SOP操作。软硬件实力、专业经验和管理制度，确保了优越稳定的探针和引物的质量，也是支持您的分子诊断项目快速推进的可靠保障。

## qPCR探针和引物的应用范围



基础生物学检测



基因/病原体诊断



诊断试剂盒原料

欢迎咨询qPCR探针和引物，邮件发送至[oligo@genscript.com.cn](mailto:oligo@genscript.com.cn)或拨打电话400-025-8686转5812或5815，专业技术支持为您服务。



# qPCR实验技巧与注意事项

# qPCR实验技巧与注意事项

## qPCR实验流程

检测基因的表达量，提取RNA反转录的cDNA产物作为样品：



## 1. qPCR探针和引物的设计技巧：

- ① **检测片段的选择：**选择检测组内的保守（突变少，可避免假阴性）、组间特异的序列（可避免假阳性），作为探针的设计位置；
- ② **设计探针：**长度15–25nt、GC含量30–80%、T<sub>m</sub>值为68–70℃、5'端尽量避免是G，G会有淬灭作用，避免多个连续相同碱基，尤其是连续的G，不利于与模板的结合，探针特异性结合模板的位置尽量靠在5'端引物；
- ③ **设计正/反义引物：**引物要与模板的5'端严格配对，避免在引物3'端含有互补序列形成内部发卡结构，正/反义引物T<sub>m</sub>至少比探针低5℃，保证探针在退火过程中结合到模板上，扩增片段不宜太长，一般在80–150bp。

## 2. 样品收集与处理:

① **防止降解:** 样品采集后立刻液氮速冻或转移到-80℃冰箱保存, 可使用非液氮类的样品储存液, 逆转录需要在冰上操作, 防止RNA降解, cDNA模板避免反复冻融造成降解;

② **避免污染:** 全程佩戴一次性的橡胶手套、口罩, 使用灭菌的、一次性的耗材或玻璃器皿处理样品, 每管或每孔都要换新枪头, 通过 DNase 对提取的 RNA 进行去除基因组 DNA;

### ③ 总RNA纯度和完整性检测:

核酸蛋白检测仪上测定OD260 /OD280比值:

OD260 /OD280 < 1.9 说明有蛋白污染

OD260 /OD280 = 1.9 ~ 2.1 说明RNA纯度高

OD260 /OD280 > 2.1 说明有部分降解

跑胶检测: 总RNA的5s rRNA, 18s rRNA和28s rRNA三条条带完整, 28S的亮度是18S的两倍, 证明总RNA抽提比较完整, 没有降解;

④ **模板处理:** 每个样品至少3个平行孔, 设置阴性对照, 防止水和mix被污染。反应体系中加入RNase抑制剂Rnasin防止降解, 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;

⑤ **Mix配置:** 最好在冰上配置, 不要反复冻融, 经常使用可溶解后放在4℃, 所有成分加完后, 离心去除气泡。

### 3. 参数的设置:

- ① **基线**: 通常是3-15个循环的荧光信号, 同一次反应中针对不同的基因需单独设置基线;
- ② **荧光阈值**: 荧光扩增曲线上人为设定的一个值, 可以设定在荧光信号指数扩增阶段任意位置上, 一般默认设置是3-15个循环的荧光信号的标准偏差的10倍, 手动设置可置于指数扩增期。同一次反应中针对不同的基因可单独设置阈值, 但对于同一个基因扩增一定要用同一个阈值;
- ③ **Ct值**: 荧光信号指数扩增阶段, Ct值与模板起始浓度的对数成线性关系, 起始拷贝数越多, Ct值越小, 检测时一般取Ct值为15-35, 太大或太小会导致检测结果不准;

若设计的多对引物熔解曲线均显示特异性良好, 则优先选择Ct值小、扩增效率高的引物进行正式实验。Ct值偏大, 可以将模板浓缩以提高其浓度, 如抽干之后用少量水去溶解。探针和引物应该是过量的, 否则 Ct 值会变大。

### 4. 优化qPCR检测的效果:

- ① 为了正确评估Ct值, 至少需要做3次平行重复;
- ② 标准曲线至少做5个数量级倍数 (10倍) 连续梯度稀释的模板浓度, 确保待测样品荧光值落在标准曲线荧光值范围内;
- ③  $R^2$ 是评价标准曲线中Ct值与模板起始浓度的对数线性关系的关键参数, 它是说明两个数值之间相关程度,  $R^2$ 值大于0.99 时, 两个数值之间相关的可信度较好。





— 金斯瑞美国总部  
美国·新泽西



— 金斯瑞中国总部  
中国·南京



— 金斯瑞生产基地  
中国·镇江

金斯瑞始终以客户的需求为己任，致力于  
让先进技术真正走进千千万万的实验室。

更多详情，欢迎访问  
[www.genscript.com.cn](http://www.genscript.com.cn)

☎ 400-025-8686-5812/5815

✉ [oligo@genscript.com.cn](mailto:oligo@genscript.com.cn)



更多服务详细，优惠活动，  
欢迎关注“金斯瑞试剂服务”