



Real-time qPCR 手册---

手把手教你从菜鸟到高手

目录

前言	3
一、 Real-time qPCR 发展史.....	3
二、 Real-time qPCR 概述.....	3
三、 Real-time qPCR 实验设计.....	8
四、 Real-time qPCR 操作过程.....	9
五、 Real-time qPCR 数据分析.....	16
六、 Real-time qPCR 常见问题分析.....	19

Real-time qPCR 手册---手把手教你从菜鸟到高手

前言

由于 Real-time qPCR 的众多优点，现在已经是生命科学领域的一项常规技术。越来越多的研究文章中涉及 RT-PCR 的实验，也基本上被 real-time qPCR 所代替。由于 real-time aPCR 输出的数据不同于常规的 PCR 电泳检测，很多没有做过 real-time qPCR 的研究者常常感到高深莫测，不知从何入手；甚至一些做过次实验的研究者也会对数据处理分析感到迷惑，不知所措。本文就从 real-time qPCR 的发展史说起，包括 real-time qPCR 的原理，实验设计，实际操作（以 ABI StepOne 仪器，和北京百泰克生物技术有限公司的试剂为例），数据分析，常见问题解答五个方面，手把手教你从各个方面了解 real-time qPCR，彻底的从菜鸟到高手！

一、Real-time qPCR 发展史

Real-time qPCR 就是在 PCR 扩增过程中，通过荧光信号，对 PCR 进程进行实时检测。由于在 PCR 扩增的指数时期，模板的 Ct 值和该模板的起始拷贝数存在线性关系，所以成为定量的依据。由于常规的 PCR 的缺点，real-time qPCR 由于其操作简便，灵敏度高，重复性好等优点发展非常迅速。设在已经涉及到生命科学研究的各个领域，比如基因的差异表达分析，SNP 检测，等位基因的检测，药物开发，临床诊断，转基因研究等。

在 Real-time qPCR 技术的发展过程中，定量 PCR 仪的发展起了至关重要的作用。1995 年，美国 PE 公司（已经并入 Invitrogen 公司）成功研制了 Taqman® 技术，1996 年推出了首台荧光定量 PCR 检测系统，通过检测每个循环的荧光强度，通过 Ct 值进行数据分析。从而荧光定量 PCR 获得广泛应用。现在的定量 PCR 仪有 ABI 7000、7300、7500、7700、7900HT、StepOnePlus™、StepOne™、PRISM® StepOne™ 系列；BIO-RAD 的 CFX96、iCycler iQ5®、MyiQ®、MJ Research Chromo4™ Opticon 系列；Stratagene Mx™ 系列；Roche LightCycler® 系列；Eppendorf Masericycler®；Corbett Rotor-Gene™；Cepheid SmartCycler® 和 BIOER 的 LineGene 系列（考虑到其是日资子公司，还是不并入国内企业吧！）。

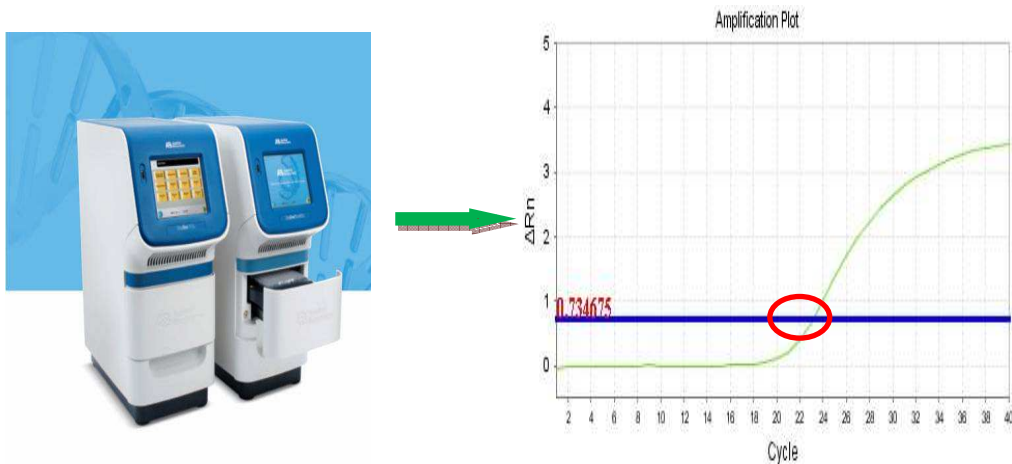
随国内生命科学的快速发展，科研水平不断提高，发高水平文章已不再是新鲜事。与此同时，国内公司经过长期不懈的努力，也有自主研发的 real-time PCR 仪器生产比如西安天隆科技公司的 TL 系列仪器。

二、Real-time qPCR 概述

1. Real-time qPCR 原理

实时 PCR 就是在 PCR 扩增过程中，通过荧光信号，对 PCR 进程进行实时

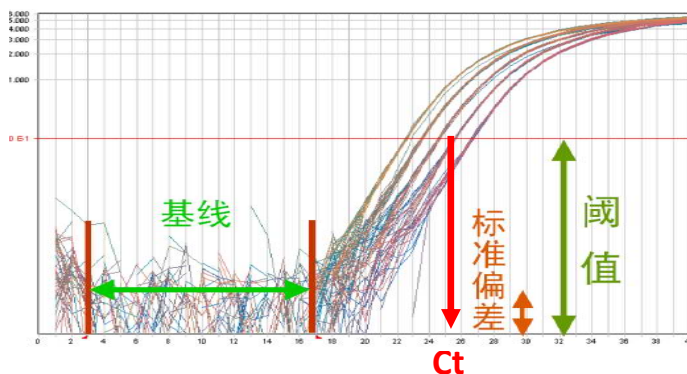
检测。一般来讲，定量 PCR 仪包括：实时荧光定量 PCR 仪主要由样品载台、基因扩增热循环组件、微量荧光检测光学系统、微电路控制系统、计算机及应用软件组成。其中基因扩增热循环组件工作原理与传统基因扩增仪大致相同，不同厂家不同型号的产品分别采用空气加热、压缩机制冷、半导体加热制冷等工作方式。独特是这个微量荧光检测系统。有由荧光激发光学部件、微量荧光检测部件、光路、控制系统组成。常用的荧光激发方式有两种：卤钨灯和 LED；荧光检测元件常用两种方式：光电倍增管和冷光 CCD 摄像机，光单色元件有滤光片和光栅。在实时 PCR 扩增过程中，荧光信号被收集，转化为成为扩增和熔解曲线。具体数据就是基线，荧光阈值和 Ct 值。



(From Invitrogen)

2. Real-time qPCR 的数学原理

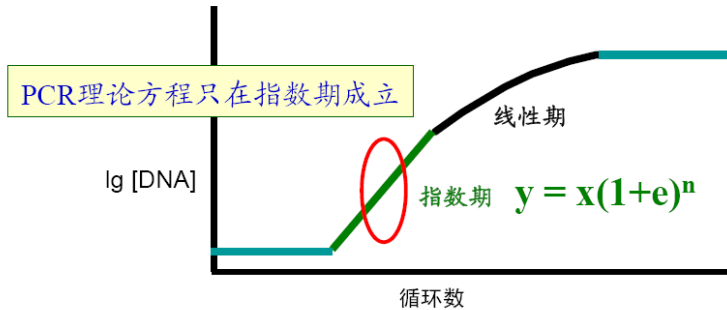
也就是说为什么 Ct 值跟初始模板的量成正比？首先来看一个 real-time qPCR 中的重要参数(具体的后面会讲到)Ct 值(Ct value)，阈值(threshold)，和基线(baseline)。一般来讲，第 3-15 个循环的荧光值就是基线，是由于测量的偶然误差引起的。阈值一般是基线的标准偏差的是 10 倍。在实际操作中也可以手动调节，位于指数期就可以。Ct 值就是荧光值达到阈值时候的 PCR 循环次数。所以是一个没有单位的参数。



那么为什么说 Ct 值跟初始模板的量成正比呢？我们来看 PCR 的扩增方程：

$$N = N_0 \times (1+e)^n$$

N: 产物分子数; N_0 : 起始分子数
e: 扩增效率; n: 循环次数



$$R_n = R_B + X_0 (1+e)^n R_s$$

第n次PCR循环时的荧光信号强度(R_n)等于背景信号强度(R_B)加上每个分子的荧光强度(即单位荧光强度, R_s)与分子数目的乘积。

设 $n=C_T$, 则:

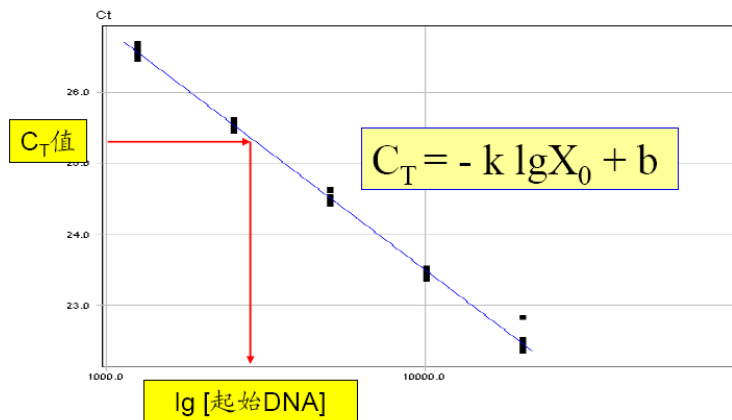
$$R_{CT} = R_B + X_0 (1+e)^{C_T} R_s$$

$$\lg(R_{CT} - R_B) = \lg X_0 + C_T \lg(1+e) + \lg R_s$$

$$C_T \lg(1+e) = -\lg X_0 + \lg(R_{CT} - R_B) - \lg R_s$$

$$C_T = -\frac{\log X_0}{\log(1+E_x)} + \frac{\log(R_T - R_B) - \log R_s}{\log(1+E_x)}$$

即 $C_T = -k \lg X_0 + b$ (线性方程)



从线性方程上看, 斜率 (slope) 为 $-1/\lg(1+E)$, 所以 $E=10^{-1/\text{slope}}-1$ 。如果从标准曲线上得到斜率 (-3.3), 就可以算出扩增效率 (0.99)。一般来讲 PCR 扩增效率在 90%-110%都是可以用于数据分析的。效率低于 100%, 是由于 PCR 反应中存在抑制因素; 而高于 100%可能一些污染、非特异性扩增或者

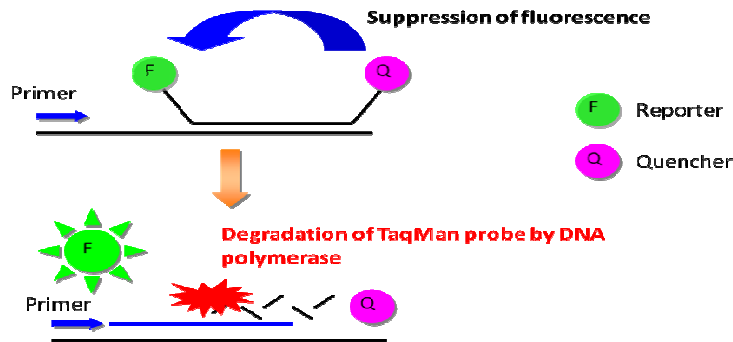
是引物二聚体造成。

3. Real-time qPCR 的种类

根据 real-time qPCR 的化学发光原理可以分为 2 大类：一类为探针类 包括 TaqMan[®] 探针和 分子信标，利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物的增加。；一类为非探针类，其中包括如 SYBR[®] Green I 或者特殊设计的引物(如 LUX[®] Primers) 通过荧光染料来只是产物的增加。

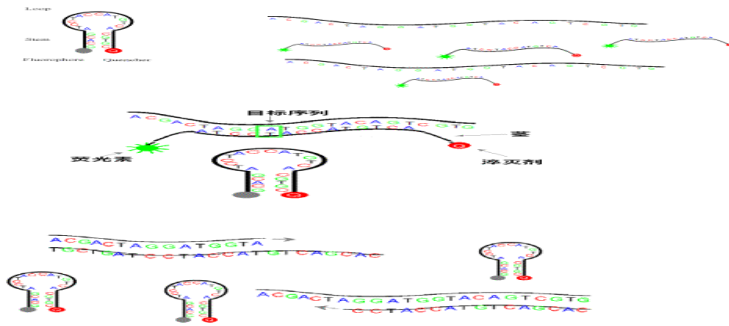
3.1 Taqman[®] 探针法

Taqman[®] 探针是最早用于定量的方法。就在 PCR 扩增时加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针，该探针为一寡核苷酸：5'端标记一个报告荧光基团，3'端标记一个淬灭荧光基团。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收，也就是 FRET 反应；PCR 扩增时，Taq 酶的 5' - 3' 外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团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，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。而新型 TaqMan-MGB 探针使该技术既可进行基因定量分析，又可分析基因突变 (SNP)，有望成为基因诊断和个体化用药分析的首选技术平台。



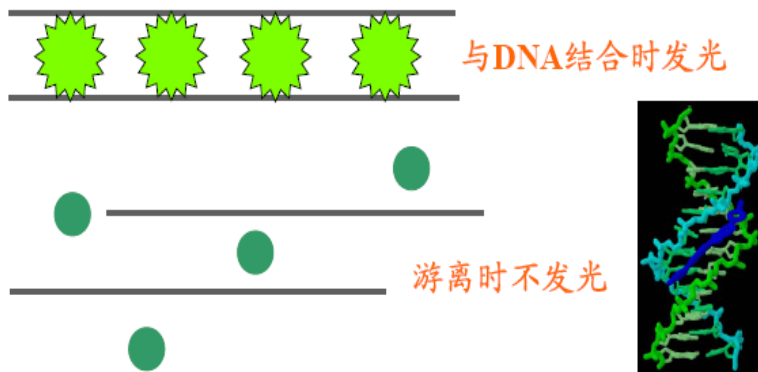
3.2 分子信标法

分子信标：一种在靶 DNA 不存在时形成茎环结构的双标记寡核苷酸探针。在此发夹结构中，位于分子一端的荧光基团与分子另一端的淬灭基团紧紧靠近。分子信标的茎环结构中，环一般为 15-30 个核苷酸长，并与目标序列互补；茎一般 5-7 个核苷酸长，并相互配对形成茎的结构。荧光基团连接在茎臂的一端，而淬灭剂则连接于另一端。分子信标必须非常仔细的设计，以致于在复性温度下，模板不存在时形成茎环结构，模板存在时则与模板配对。与模板配对后，分子信标的构象改变使得荧光基团与淬灭剂分开。当荧光基团被激发时，它发出自身波长的光子。



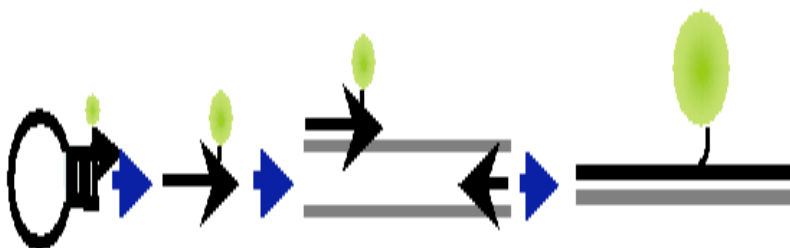
3.3 SYBR[®] Green 法

SYBR[®] Green I 是一种结合于小沟中的双链 DNA 结合染料, 与双链 DNA 结合后, 其荧光大大增强。这一性质使其用于扩增产物的检测非常理想。SYBR[®] GreenI 的最大吸收波长约为 497nm , 发射波长最大约为 520nm。在 PCR 反应体系中, 加入过量 SYBR[®] Green 荧光染料, SYBR[®] Green 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后, 发射荧光信号, 而不掺入链中的 SYBR[®] Green 染料分子不会发射任何荧光信号, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。



3.4 LUX[®] primers 法

LUX[®] (light upon extention) 引物是利用荧光标记的引物实现定量的一项新技术。目标特异的引物对中的一个引物 3'端用荧光报告基团标记。在没有单链模板的情况下, 该引物自身配对, 形成发夹结构, 使荧光淬灭。在有目标片断的时候, 引物与模板配对, 发夹结构打开, 产生特异的荧光信号。



4. Real-time qPCR 和常规 PCR 的区别

- 实时检测（在对数扩增时期）而不是终点检测
- 敏感性高
- 需要样品少
- 特异性高
- 精确定量

三、Real-time qPCR 实验设计

实验设计其实比实验本身更重要！好的实验设计可以事半功倍，节省时间！尤其做生物实验，一定要查询尽可能完全的相关资料，整理好思路，设计好实验路线。当然实验过程中出现各种各样的变化，但有足够多的背景知识，就可以分析原因，才有可能创新。对于一个 real-time qPCR 而言，首先就是实验材料的处理和准备；然后引物设计，这步至关重要，好的引物是实验本身成功的 50%；进行实验和数据分析（这一部分单独说明）。

1. 实验材料的处理和准备

以最基本的基因表达差异分析为例。实验材料分为对照组（CON）和处理组（TRT）。组内要有生物重复，可以数据分析此处理是否有统计意义。在材料收集过程中，尽量避免 RNA 的降解（尤其对于绝对定量的样品）。一般传统的收集材料的方法是样品采集立刻液氮速冻，然后迅速转移到超低温冰箱保存，但这种方法携带不方便，由于对于异地取材。现在新技术的发展，也有一些非液氮类的样品储存液，比如百泰克的 RNAfixer（Cat. No.RP1301 <http://www.bioteke.com/chn/showproduct.asp?id=232>）。

2. 引物设计

一般 real-time PCR 引物的设计遵循下面一些原则：

- 扩增产物长度在 80-150bp。
- 引物应用核酸系列保守区内设计并具有特异性。
- 产物不能形成二级结构。
- 产物长度一般在 15~30 碱基之间。
- G+C 含量在 40%~60%之间。
- 碱基要随机分布。
- 引物自身不能有连续 4 个碱基的互补。
- 引物之间不能有连续 4 个碱基的互补。
- 引物 5'端可以修饰。
- 引物 3'端不可修饰。
- 引物 3'端要避开密码子的第 3 位。

Taqman[®] 探针的设计稍有不同，一般有公司设计合成。遵循下面一下原则：

- 尽量靠在上游引物;
- 长度 30 - 45bp, T_m 比引物高至少 5℃;
- 5'端不要是 G, G 会有淬灭作用, 影响定量

四、Real-time qPCR 操作过程 (本操作过程以 ABI StepOne 定量 PCR 仪和北京百泰克生物技术有限公司的试剂为例)

1. RNA 提取和反转录

在抽提RNA过程中任一环节的不正确操作都可能导致RNA酶的污染。由于RNA酶的活性很难完全抑制, 预防其污染是十分必要的。在实际的操作中应遵循下面一些原则:

1. 全程佩戴一次性手套。皮肤经常带有细菌和霉菌, 可能污染RNA的抽提并成为RNA酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。
2. 使用灭菌的, 一次性的塑料器皿和自动吸管抽提RNA, 避免使用公共仪器所导致的RNA酶交叉污染。例如, 使用RNA探针的实验室可能用RNA酶A或T1来降低滤纸上的背景, 因而某些非一次性的物品 (如自动吸管) 可能富含RNA酶。
3. 在提取裂解液中, RNA是隔离在RNA酶污染之外的。而对样品的后续操作会要求用无RNA酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在150℃的烘箱中烘烤4小时。塑料器皿可以在0.5 M NaOH中浸泡10分钟, 用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。

当然, 这些也不是绝对的要求。如果是操作熟练。完全可以用初次开封的离心管和枪头, 新过滤的超纯水, 进行RNA的提取。百泰克是以开发和生产RNA试剂盒为特长的公司, 有多种RNA提取试剂盒

(<http://www.bioteke.com/chn/productlist.asp?classid=387>)。BOX1 是从组织细胞中提取RNA的操作步骤。如果是进行一步法 real-time qPCR(以总RNA或mRNA为模板), 就直接按照说明书在 MasterMix 里加入RNA和引物就可以放在仪器上进行反应。如果是两步法 (以cDNA为模板)。反转录一般取 1μg 或者 2μg 的总RNA, 20μl 或者 50μl 的反应体系, 按说明书操作即可。BOX2 是百泰克的 Super RT Kit(Cat.No.PR 6601<http://www.bioteke.com/chn/showproduct.asp?id=261>) 的反转录步骤。

2. Mix 配制

一般来讲, 进行 real-time qPCR MasterMix 都是 2×的浓缩液, 只需要加入模板和引物就可以。由于 real-time qPCR 灵敏度高, 所以每个样品至少要做 3 个平行孔, 以防在后面的数据分析中, 由于 C_t 相差较多或者 SD 太大, 无法进行统计分析。通常来讲, 反应体系的引物终浓度为 100-400mM; 模板如果是总RNA一般是 10ng-500, 如果cDNA, 通常情况下是 1μl 或者 1μl 的 10 倍稀释液, 要根据目的基因的表达丰度进行调整。当然这些都是经验值, 在操作过程中, 还需要

根据所用 MasterMix, 模板和引物的不同就行优化, 达到一个最佳反应体系。在反应体系配置过程中, 有下面几点需要注意:

1. MasterMix 不要反复冻融, 如果经常使用, 最好溶解后放在 4 度。
2. 更多的配制 Mix 进行, 减少加样误差。最好能在冰上操作。
3. 每管或每孔都要换新枪头! 不要连续用同一个枪头加样!
4. 所有成分加完后, 离心去除气泡。
5. 每个样品至少 3 个平行孔。

BOX 1: 从组织中提取总 RNA

1. 用玻璃或强力匀浆器搅匀组织样品, 保存于液氮内样品需要用研钵磨碎, 每50~100mg组织加1ml的裂解液RL后匀浆。组织样品容积不能超过RL容积的10%。
2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀, 在 15 -30°C 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。
3. **可选步骤:** 4°C 的条件下 12, 000rpm 离心 10 分钟, 小心取上清转入一个新的 RNase- free 的离心管中。
当样品富含蛋白质、脂肪、多糖或是细胞外物质例如肌肉。脂肪组织或植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在 2~8°C 的条件下以 12,000rpm 离心 10 分钟, 移除匀浆中不溶解的物质, 余下的沉淀中包含有细胞外膜、多糖、以及高分子量 DNA, 而上层的超浮游物含有 RNA。
4. 每 1mlRL 加 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖, 剧烈振荡 15 秒并将其在室温下孵育 3 分钟。
5. 于 4°C 12, 000rpm 离心 10 分钟, 样品会分成三层: 下层有机相, 中间层和上层无色的水相, RNA 存在于水相中。水相层的容量大约为所加 RL 体积的 60%, 把水相转移到新管中, 进行下一步操作。
6. 加入1倍体积70%乙醇(**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 颠倒混匀(此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱RA中(吸附柱套在收集管内)。
7. 10, 000rpm 离心45秒, 弃掉废液, 将吸附柱重新套回收集管。
8. 加500μl 去蛋白液RE, 12, 000rpm 离心45秒, 弃掉废液。
9. 加入700μl漂洗液RW(**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000 rpm 离心60秒, 弃掉废液。
10. 加入500μl漂洗液RW, 12,000 rpm 离心60秒, 弃掉废液。
11. 将吸附柱RA放回空收集管中, 12,000 rpm离心2分钟, 尽量除去漂洗液, **以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。**
12. 取出吸附柱RA, 放入一个RNase free离心管中, 根据预期RNA产量在吸附膜的中间部位加 50-80μl RNase-free water(事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好), 室温放置2分钟, 12,000 rpm 离心1分钟。如果需要较多RNA, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心1分钟, 或者另外再加30μl RNase free water, 离心1分钟, 合并两次洗脱液。

洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 RNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积最好不少于 30μl, 体积过小降低 RNA 洗脱效率, 减少 RNA 产量。

BOX2: cDNA第一链合成

1. 按以下组分配制反转录反应液

Total RNA or Poly(A) RNA	0.2-2 μ g
Oligo (dT) (50 μ M)	1 μ l
dNTP Mixture (10mM each)	1 μ l
RNase-free dH ₂ O	Up to 14 μ l

2. 在PCR仪上进行以下反应: 65°C, 5min, 然后置于冰上急冷。

3. 在上述PCR管中加入以下反转录反应液:

上述变性、退火后反应液	14 μ l
5 $\times$ First-strand Buffer	4 μ l
M-MLV Reverse Transcriptase (200U/ μ l)	1 μ l
RNase Inhibitor (40U/ μ l)	1 μ l
Total	20 μ l

4. 在PCR仪上按以下条件进行反转录反应:

30°C 10min

42°C 30-60min

6. cDNA 立刻进行实验或者 4 度 (-20 度) 保存。

BOX3: 两步法 real-time qPCR 体系配制

组成成分	20 μ l 体系	25 μ l 体系	50 μ l 体系	终浓度
2 $\times$ Premixture	10 μ l	12.5 μ l	25 μ l	1 $\times$
上游 Primer				100-400nm
下游 Primer				100-400nm
模板				pg-ng
灭菌蒸馏水				
Total	至 20 μ l	至 25 μ l	至 50 μ l	

扩增程序

循环数	Step	温度	时间	检测	说明
1	1	95°C	2 min	off	起始模板变性
35-45	1	95°C	15 sec	off	模板变性
	2	60-68°C	20-60 sec	on	退火/延伸

溶解程序

循环数	Step	温度	时间	检测
1	End	55-65°C	10-20sec	On
	End	95°C	10-20sec	Off

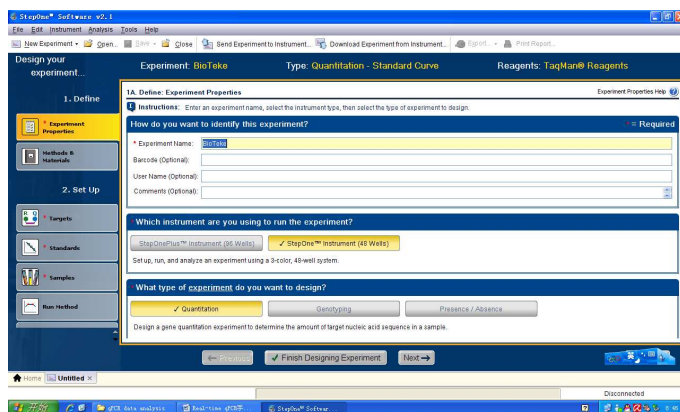
说到反应体系的配制，不得不说到参比或者校正染料（reference dye, passive dye）。常用的是 **ROXTM**（现在已经是 ABI 的注册商标了！）或者其他染料，只要不影响检测 PCR 产物的荧光值就可以。参比染料的作用是标准化荧光定量反应中的非 PCR 震荡，校正加样误差或者是孔与孔之间的误差，提供一个稳定的基线。现在很多公司已经把 **ROXTM** 配制在 MasterMix 或者 Premixture 里。如果反应曲线良好或已经优化好反应体系，也可以不加 **ROXTM** 染料校正。比如 Bio-RAD 的系列仪器就不需要。百泰克 real-time qPCR 系列产品（<http://www.bioteke.com/chn/productlist.asp?classid=396>）是通用试剂，可以应用于各种荧光定量 PCR 仪，体系配制和反应程序如 BOX3。

通常来讲，real-time qPCR 的反应程序不需要想常规的 PCR 那样，要变性、退火、延伸 3 步。由于其产物长度在 80-150bp 之间，所以只需要变性和退火就可以了。SYBR[®] Green 等染料法，最好在 PCR 扩增程序结束后，加一个溶解程序，来形成溶解曲线，判断 PCR 产物的特异性扩增。而溶解程序，仪器都有默认设置，或稍有不同，但都是一个在产物进行溶解时候，进行荧光信号的收集。

3. 仪器设置

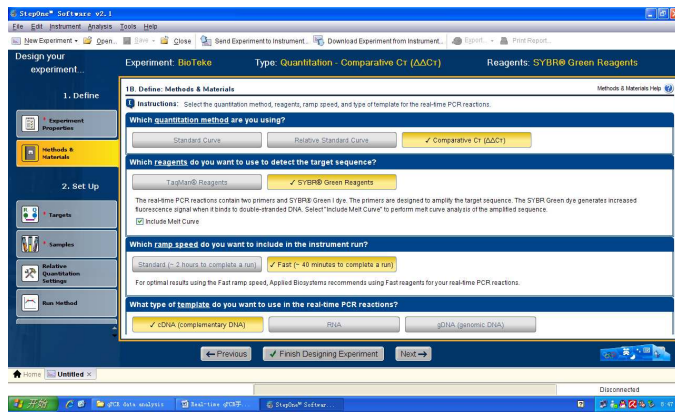
所有仪器的操作都基本一致。设置的时候包括反应板设置（plate setup）和程序设置（program setup）。我们以 ABI StepOne 为例，详细看一下反应设置：

A. 首先是实验目的选择：定量还是其他。我们命名为“BioTeke”，进行“定量”实验。

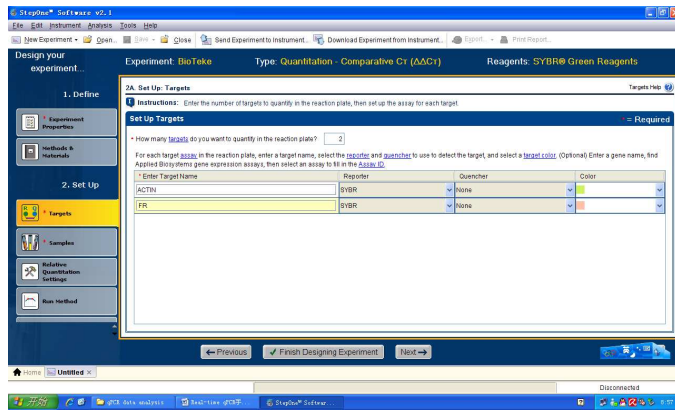


B. 实验方法的选择：我们选用的比较 Ct 的 SYBR Green 方法，Fast 程序，以 cDNA 为模板进行。

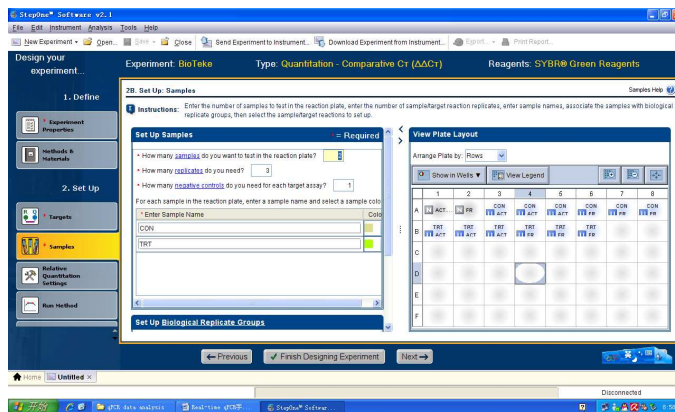
Real-time qPCR 手册---手把手教你从菜鸟到高手



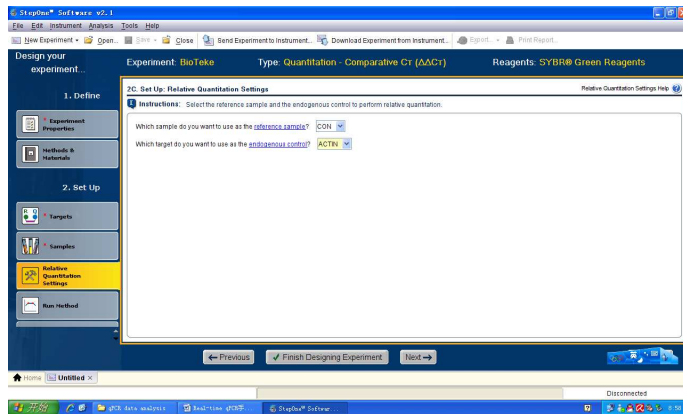
C. 目的基因的设置：有几个目的基因和目的基因的名称。



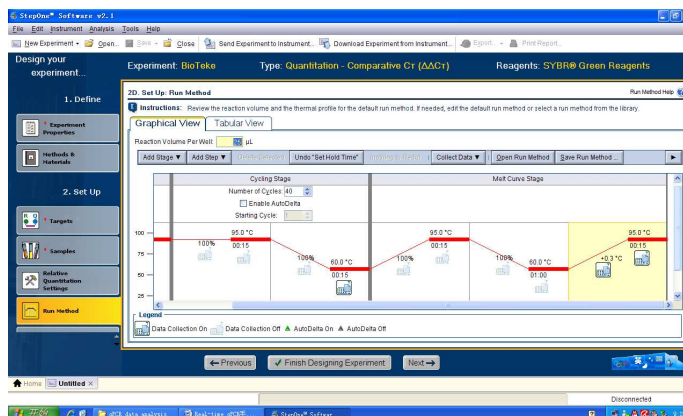
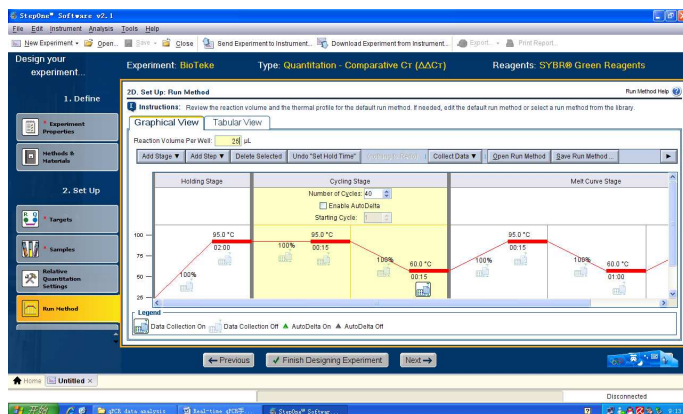
D. 样品的设置：包括哪个是实验组，哪个是对照组。以及负对照的设置和生物重复的设置。



E. 对照组和内参基因的设置：这个是为后面的定量做准备的。

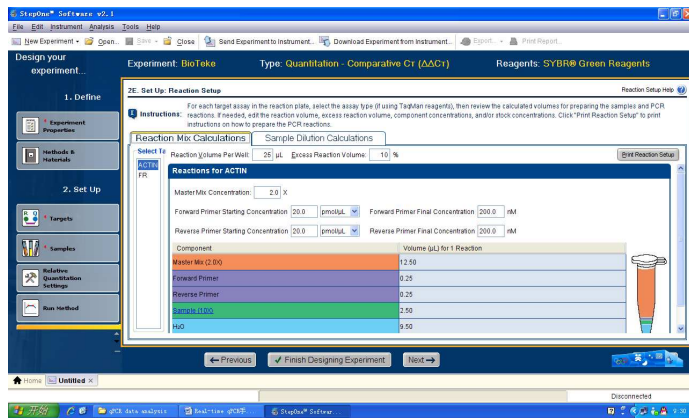


F. 反应程序的设置：PCR 反应程序的设置要根据不同公司的 MasterMix。比如 BioTeke 的 95℃ 2 分钟就可以激活 DNA 聚合酶（ABI 的需要 10 分钟）。循环反应是 95℃15 秒，60℃15 秒的 40 个循环。溶解曲线程序采用仪器默认设置就可以。或者是仪器说明书上建议的程序。

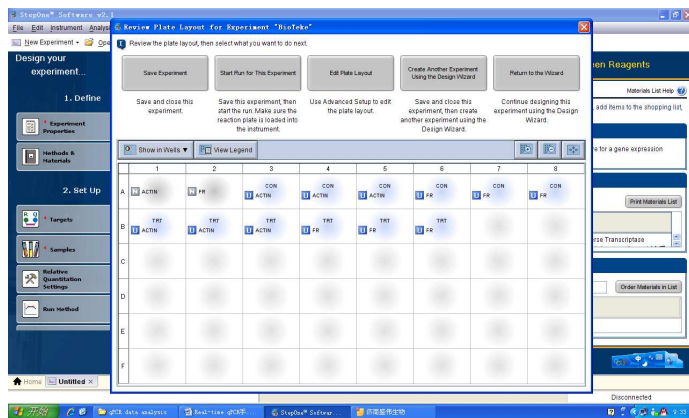


G. 反应体系的设置：

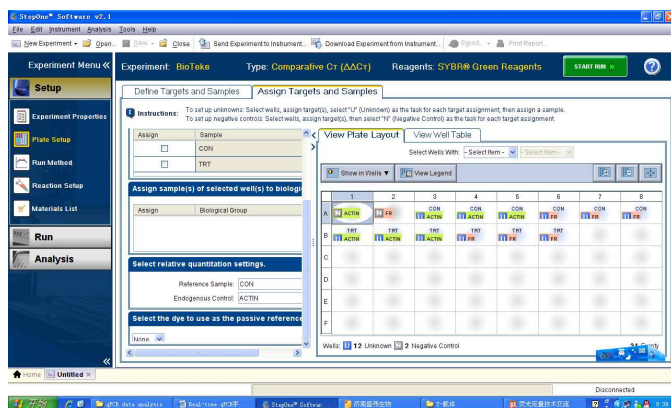
Real-time qPCR 手册---手把手教你从菜鸟到高手



A-G 这五个步骤简单设置好，可以保存，修改反应程序或者立刻进行反应。



需要注意一点 ABI 仪器的需要加 ROX 参比染料的，默认的是 ROX。有些公司是把 ROX 或者其他染料配制在 MasterMix 里面；也有的是单独分开。要根据不同公司的 MasterMix 进行这一个步骤的选择。BioTeke 的 MasterMix 里没有参比染料，所以选择“none”。



设置好之后，就可以把配置好的 PCR 管放进仪器，点击 RUN！

五、Real-time qPCR 数据分析

1. Real-time qPCR 常见参数

➤ 基线 (baseline)

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

➤ 阈值 (threshold)

自动设置是 3-15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍

手动设置：置于指数扩增期，刚好可以清楚地看到荧光信号明显增强。

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。

➤ Ct 值 :与起始浓度的对数成线性关系。

分析定量时候一般取 Ct:15-35。太大或者太小都会导致定量的不准确。

➤ Rn (Normalized reporter) 是荧光报告基团的荧光发射强度与参比染料的荧光发射强度的比值。

➤ ΔRn : ΔRn 是 Rn 扣除基线后得到的标准化结果 ($\Delta Rn = Rn - \text{基线}$)。

2. 影响 Ct 值的关键因素

➤ 模板浓度

模板浓度是决定 Ct 的最主要因素。控制在一个合适范围内，使 Ct 在 15-35 之间。

➤ 反应液成分的影响

任何分子的荧光发射都受环境因素影响----比如溶液的 pH 值和盐浓度。

➤ PCR 反应的效率

PCR 反应的效率也会影响 CT 值。在 PCR 扩增效率低的条件下进行连续梯度稀释扩增，与 PCR 扩增效率高的条件下相比，可能会产生斜率不同的标准曲线。PCR 效率取决于实验、反应混合液性能和样品质量。一般说来，反应效率在 90-110%之间都是可以接受的。

3. 如何评估实时定量 PCR 反应的效果

➤ PCR 扩增效率: 为了正确地评估 PCR 扩增效率，至少需要做 3 次平行重复，至少做 5 个数量级倍数(5 logs)连续梯度稀释模板浓度。

➤ R^2 值: 另一个评估 PCR 效率的关键参数是相关系数 R^2 ，它是说明两个数值之间相关程度的统计学术语。如果 R^2 等于 1，那么你可以用 Y 值 (Ct) 来准确预测 X 值 (量)。如果 R^2 等于 0，你就不能通过 Y 值来预测 X 值。 R^2 值大于 0.99 时，两个数值之间相关的可信度很好。

- **精确度**：标准偏差（standard deviation，偏差的平方根）是最常用的精确度计量方法。如果许多数据点都靠近平均值，那么标准偏差就小；如果许多数据点都远离平均值，则标准偏差就大。实际上，足够多重复次数产生的数据组会形成大致的正态分布。这经常可通过经典的中心极限理论来证明，独立同分布随机变量在无限多时趋向于正态分布。如果 PCR 反应效率是 100%，那么 2 倍稀释点之间的平均 Ct 间隔应该恰为 1 个 Ct 值。要以 99.7% 的几率分辨 2 倍稀释浓度，标准偏差就必须小于等于 0.167。标准偏差越大，分辨 2 倍稀释的能力就越低。为了能够在 95% 以上的情况下分辨出 2 倍稀释，标准偏差必须小于等于 0.250。
- **灵敏度**：无论 CT 绝对值是多少，任何能够有效扩增和检测起始模板拷贝数为 1 的系统都达到了灵敏度的极限。PCR 效率是决定反应灵敏度的关键因素。在检测极低拷贝数时的另一个重要的考虑因素是，低拷贝时的模板数量不能按普通情况来预期。相反，它会遵循泊松分布，即进行大量的平行重复，平均应该含有一个拷贝的起始模板，实际上约 37% 不含有拷贝，仅有约 37% 含有 1 个拷贝，约 18% 实际上含有两个拷贝。因此，为了更可靠地检测低拷贝，必须做大量的平行重复实验来提供统计显著性，并克服泊松分布的限制。

评价荧光 PCR 结果的标准

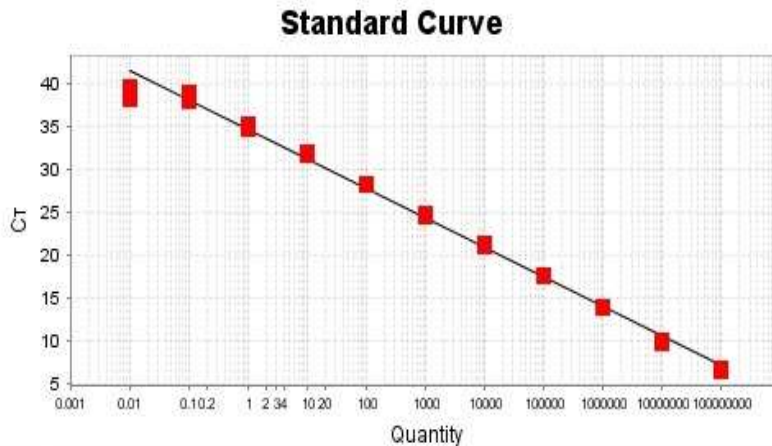
因素	建议	指标
效率	5 个数量级梯度稀释	Slope ~ -3.3
		R ² > 0.99
精密度	至少 3 个重复	标准差 < 0.25 (0.5 或者 1 个 Ct 之内)
灵敏度	增加低浓度样本的重复数	统计分析

除了这些因素，还必须评估和验证合适的实验对照（如无模板对照，无反转录酶对照等）以及模板质量。

3. Real-time qPCR 定量方法

可以分为绝对定量和相对定量。绝对定量是用一系列已知浓度的标准品制作标准曲线，在相同的条件下目的基因测得的荧光信号量同标准曲线进行比较，从而得到目的基因的量。该标准品可以是纯化的质粒 DNA，体外转录的 RNA，或者是体外合成的 ssDNA。相对定量可以分为比较 Ct 法和其他一些相对方法。比较 Ct 指的是通过与内参基因 Ct 值之间的相差来计算基因表达差异，也称之为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

3.1 绝对定量



$Y = -3.432X + 34.638$; $R^2 = 0.995$, $E = 95\%$, 所以可以进行数据分析。

如果未知样品的 $C_t = 25$,

代入方程: $25 = -3.432X + 34.638$,

所以: $X = 2.8$

Copies = $10^{2.8}$

3.2 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 定量

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ sample A} \\ - (C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ sample B}]$$

The mean C_T of the *HOXD10* gene in treated and untreated samples was 24.6 and 27.5, respectively. The mean C_T of the 18S rRNA in the treated and untreated samples was 9.9 and 9.8, respectively. What is the fold change in expression of the *HOXD10* gene due to treatment?

$$\begin{aligned} \text{Fold change due to treatment} &= 2^{-\Delta\Delta C_T} \\ &= 2^{-[(24.6 - 9.9) - (27.5 - 9.8)]} \\ &= 8 \end{aligned}$$

3.3 其他定量方法

Table 1. Characteristics of Relative Quantitation Methods

Methods (Reference)	Amplification Efficiency Correction	Amplification Efficiency Calculation	Amplification Efficiency Assumptions	Automated Excel-Based Program
Standard Curve (31)	no	standard curve	no experimental sample variation	no
Comparative C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (21)	yes	standard curve	reference = target	no
Pfaffl et al. (26)	yes	standard curve	sample = control	REST ^a
Q-Gene (23)	yes	standard curve	sample = control	Q-Gene ^b
Gentile et al. (7)	yes	raw data	researcher defines log-linear phase	no
Liu and Saint (22)	yes	raw data	reference and target genes can have different efficiencies	no
DART-PCR (30)	yes	raw data	statistically defined log-linear phase	DART-PCR ^c

^a C_t , cycle threshold, DART-PCR, data analysis for real-time PCR; REST, relative expression software tool.
^bwww.gene-quantification.info
^cwww.BioTechniques.com
^dnar.oupjournals.org/cgi/content/full/31/14/e73/DC1

Marisa L. Wong and Juan F. Medrano: BioTechniques July 2005

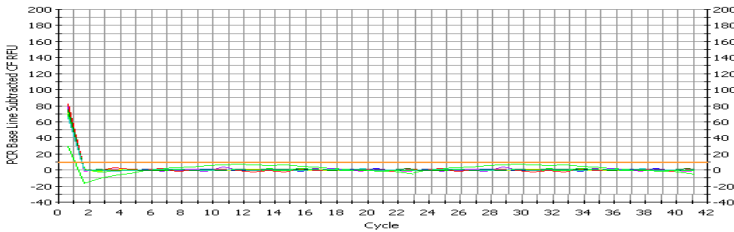
	待测基因 (Ct 值)	参照基因 (Ct 值)	待测基因扩增效率 (E)	参照基因扩增效率 (E)
干预前	A	B	C	D
干预后	E	F	C	D

根据实验要求我们可以选择相应的方法，如下表：

数据处理方法	参考条件	计算方法
ΔC_t 法	扩增效率为 100%，仅需目标基因即可	表达水平 = $2^{-\Delta C_t} = 2^{-(E-A)}$
$2^{-\Delta\Delta C_t}$	目的基因和参照基因扩增效率都接近 100%，且相对偏差不得超过 5%，需要目标基因和参照基因。	表达水平 = $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[(E-F)-(A-B)]}$
参照基因的 ΔC_t	同 $2^{-\Delta\Delta C_t}$	表达水平 = $2^{(F-B)-(E-A)}$
Pfaffl 法	目标基因和参照基因扩增效率不同，但目标基因间的扩增效率相同，需目标基因和参照基因，以及扩增效率。	表达水平 = $C^{(A-E)}/D^{(F-B)}$

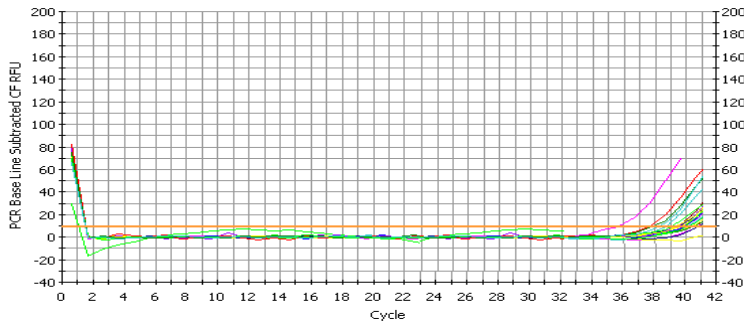
六、Real-Time qPCR 常见问题分析

1. 无 Ct 值出现



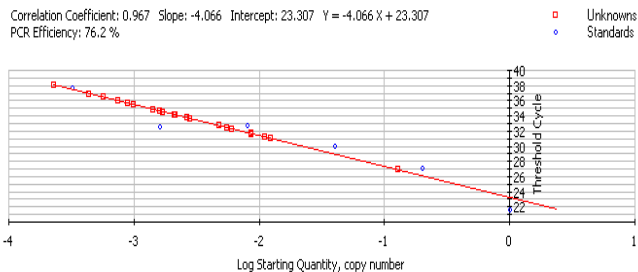
- 检测荧光信号的步骤有误：一般 SG 法采用 72℃ 延伸时采集，Taqman 法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。
- 引物或探针降解：可通过 PAGE 电泳检测其完整性。
- 模板量不足：对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。
- 模板降解：避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

2. Ct 值出现过晚 (Ct>38)



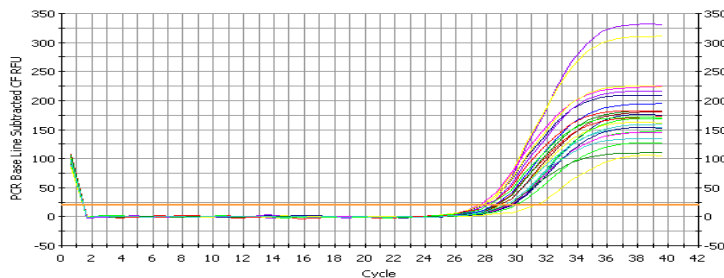
- 扩增效率低: 反应条件不够优化。设计更好的引物或探针; 改用三步法进行反应; 适当降低退火温度; 增加镁离子浓度等。
- PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。
- PCR 产物太长: 一般采用 80-150bp 的产物长度。

3. 标准曲线线性关系不佳



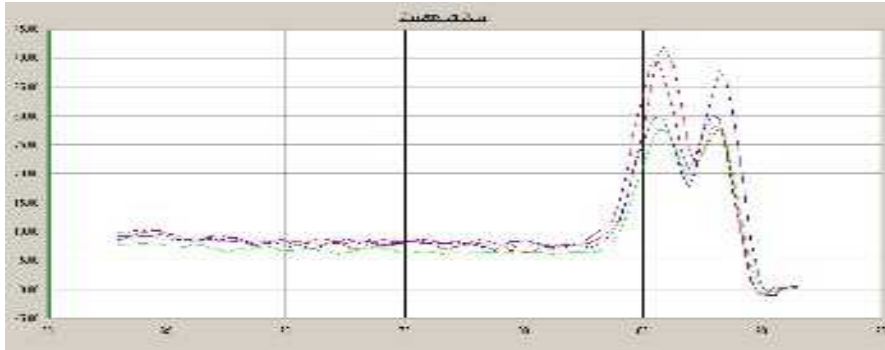
- 加样存在误差: 使得标准品不呈梯度。
- 标准品出现降解: 应避免标准品反复冻融, 或重新制备并稀释标准品。
- 引物或探针不佳: 重新设计更好的引物和探针
模板中存在抑制物, 或模板浓度过高

4. 负对照有信号



- 引物设计不够优化: 应避免引物二聚体和发夹结构的出现。
- 引物浓度不佳: 适当降低引物的浓度, 并注意上下游引物的浓度配比。
- 镁离子浓度过高: 适当降低镁离子浓度, 或选择更合适的 mix 试剂盒。
- 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。

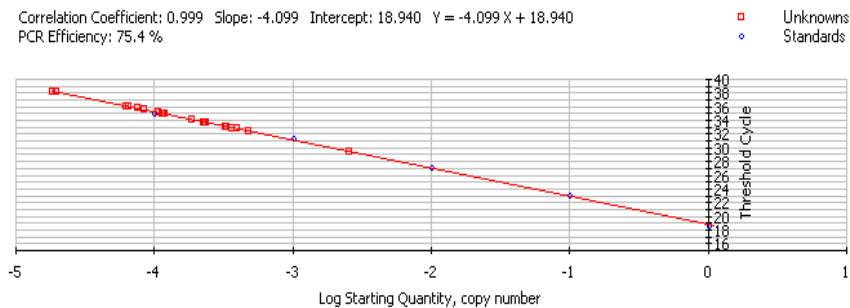
5. 溶解曲线不止一个主峰



- 引物设计不够优化：应避免引物二聚体和发夹结构的出现。
- 引物浓度不佳：适当降低引物的浓度，并注意上下游引物的浓度配比。
- 镁离子浓度过高：适当降低镁离子浓度，或选择更合适的 mix 试剂盒。
- 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。

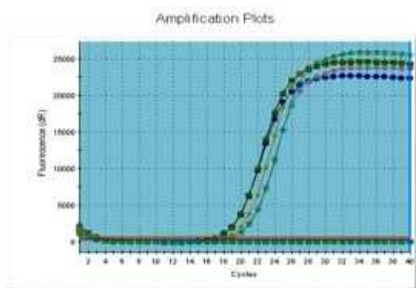
6. 扩增效率低

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -4.099 Intercept: 18.940 $Y = -4.099X + 18.940$
PCR Efficiency: 75.4 %



- 反应试剂中部分成分特别是荧光染料降解。
- 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。
- 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。

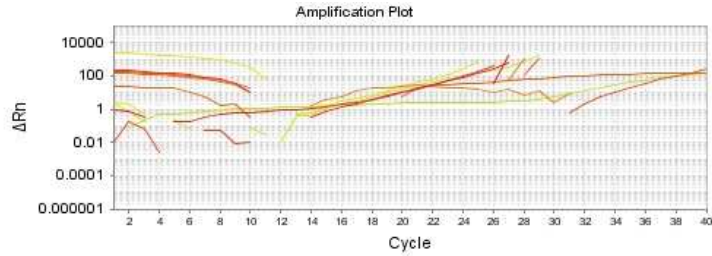
7. 同一试剂在不同仪器上产生不同的曲线，如何判断？



判断标准：扩增效率，灵敏度，特异性

如果扩增效率在 90%-110%，都是特异性扩增，都可以把数据用于分析。

8. 扩增曲线的异常？比如“S”型曲线？



- 参比染料设定不正确 (MasterMix 不加参比染料时，选 NONE)
- 模板的浓度太高或者降解
- 荧光染料的降解