

Molecular Biology

TECHNICAL MANUAL

Real-time qPCR Technical Manual
手把手教你从菜鸟到高手的学习手册

www.aokemedical.com

技术引领医学转化 专业创造行业口碑

目录

前言	3
RT-PCR发展史	3
RT-PCR概述	3
RT-PCR实验设计	8
RT-PCR操作流程	9
RT-PCR数据分析	16
RT-PCR问题分析	19

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 qPCR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，和北京吉康医学科技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！

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。

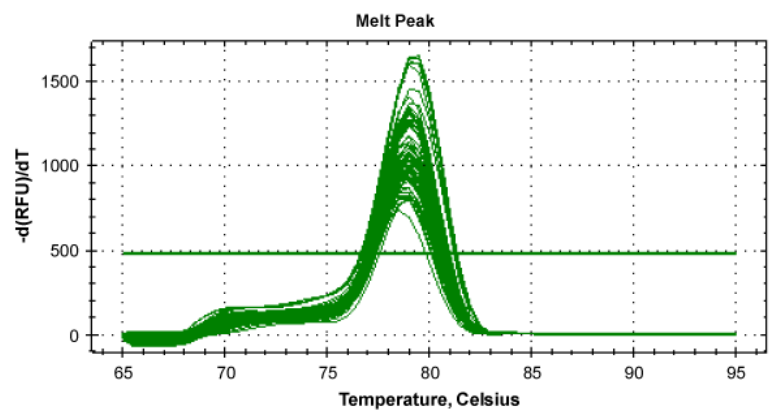
在Real-time qPCR技术的发展过程中，定量PCR仪的发展起了至关重要的作用。1995年，美国PE公司（已经并入Invitrogen公司）成功研制了Taqman®技术，1996年推出了首台荧光定量PCR检测系统，通过检测每个循环的荧光强度，通过Ct值进行数据分析。从而荧光定量PCR获得广泛应用。现在的定量PCR仪有ABI 7000、7300、7500、7700、7900HT、StepOnePlus™、StepOne™、PRISM® StepOne™系列；BIO-RAD的CFX96、iCycler iQ5®、MyiQ®、MJ Research Chromo4™ Opticon系列；Stratagene 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。与其同时，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。

Real-time qPCR概述

1. Real-time qPCR原理

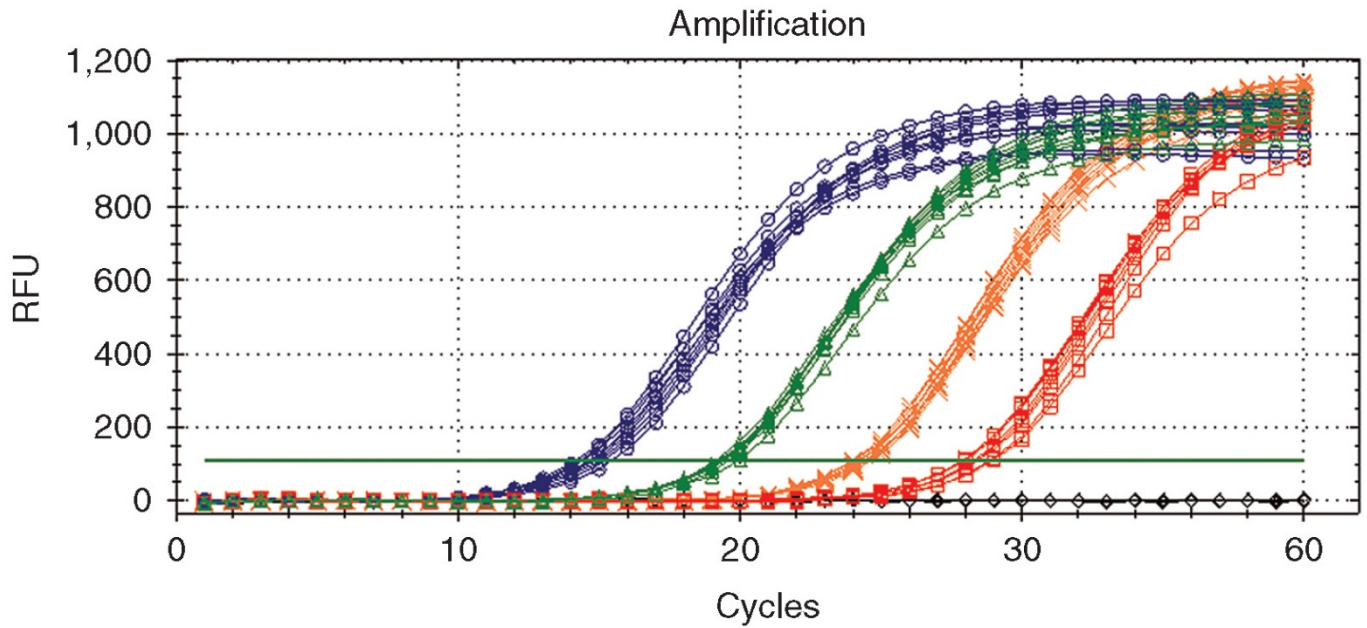
实时PCR就是在PCR扩增过程中，通过荧光信号，对PCR进程进行实时检测。一般来讲，定量PCR仪包括：

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。



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。



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

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

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

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

即: $C_T = -k \lg X_0 + b$ (线性方程)

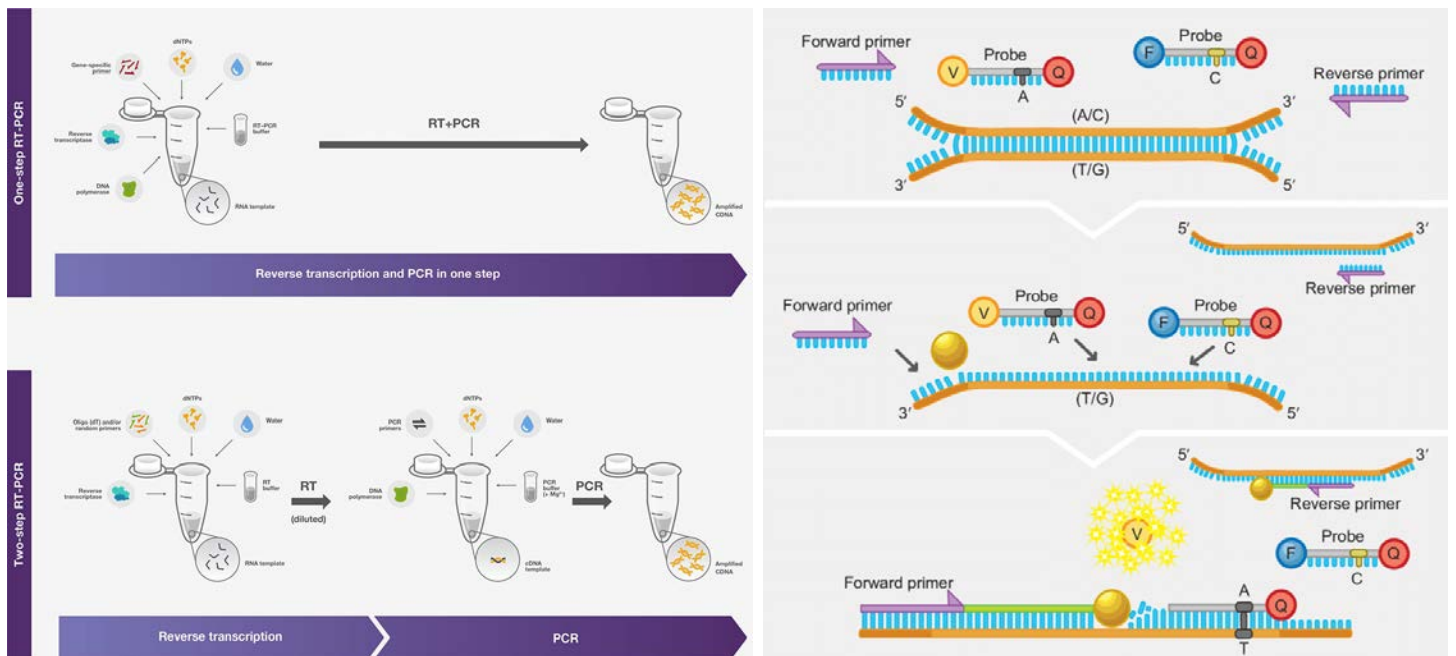
从线性方程上看, 斜率 (slope) 为 $-1/\lg(1+E)$, 所以 $E=10^{-1/\text{slope}}-1$ 。如果从标准曲线上得到斜率 (-3.3), 就可以算出扩增效率 (0.99)。一般来讲PCR扩增效率在90%-110%都是可以用于数据分析的。效率低于100%, 是由于PCR反应中存在抑制因素; 而高于100%可能一些污染、非特异性扩增或者是引物二聚体造成。

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。

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

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。

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80-150 bp。
- 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'端要避免密码子的第3位。尽量靠在上游引物。
- 长度30 - 45 bp, T_m 比引物高至少 5 °C。
- 5'端不要是G, G会有淬灭作用, 影响定量。

Real-time qPCR 操作过程

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 °C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。GENECOME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。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1 μg 或者2 μg 的总RNA, 20 μl 或者50 μl 的反应体系, 按说明书操作即可。BOX2是GENECOME的Super RT Kit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Ct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100-400 nM；模板如果是总RNA一般是100-500 ng，如果cDNA，通常情况下是1 μl或者1 μl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50~100 mg组织加1 ml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, 000 rpm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12,000 rpm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 1 ml RL加0.2 ml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, 000 rpm 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, 000 rpm 离心45秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
8. 加500 μl去蛋白液RE，12, 000 rpm离心45秒，弃掉废液。
9. 加入700 μl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500 μl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50-80 μl 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30 μl 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30 μl，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 μg
Oligo (dT) (50 μM)	1 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
RNase-free ddH ₂ O	Up to 14 μl

2. 在PCR仪上进行以下反应: 65 °C, 5 min, 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 μl

5×First-strand Buffer	4 μl
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ μl)	1 μl
RNase Inhibitor (40 U/ μl)	1 μl
Total	Up to 20 μl

4. 在PCR仪上按以下条件进行反转录反应:

30 °C	10 min
42 °C	30-60 min

6. cDNA 立刻进行实验或者4度 (-20度) 保存。

BOX3: 两步法Real-time qPCR体系配置

组成成分	20 μ l体系	20 μ l体系	20 μ l体系	终浓度
2xPremixture	10 μ l	12.5 μ l	25 μ l	1x
上游Primer				100-400 nmol
下游Primer				100-400 nmol
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 $^{\circ}$ C	2 min	off	起始模板变性
35-45	1	95 $^{\circ}$ C	15 sec	off	模板变性
	2	60-68 $^{\circ}$ C	20-60 sec	on	退火延伸

溶解程序

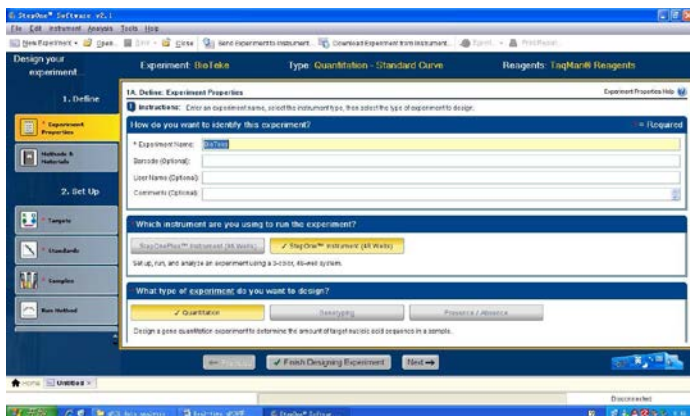
循环数	Step	温度	时间	检测
1	End	55-65 $^{\circ}$ C	10-20 sec	On
	End	95 $^{\circ}$ C	10-20 sec	Off

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。GENECOME Real-time qPCR系列产品是通用试剂，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80-150 bp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。

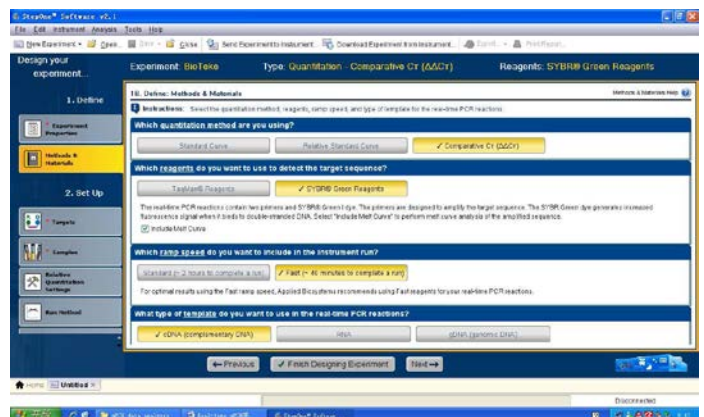
3. 仪器设置

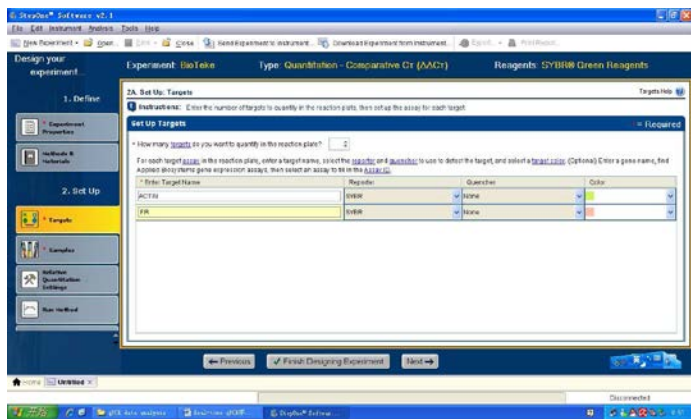
所有仪器的操作都基本一致，设置的时候包括反应板设置 (Plate setup) 和程序设置 (Program setup)。我们以ABI StepOne 为例，详细看一下反应设置：



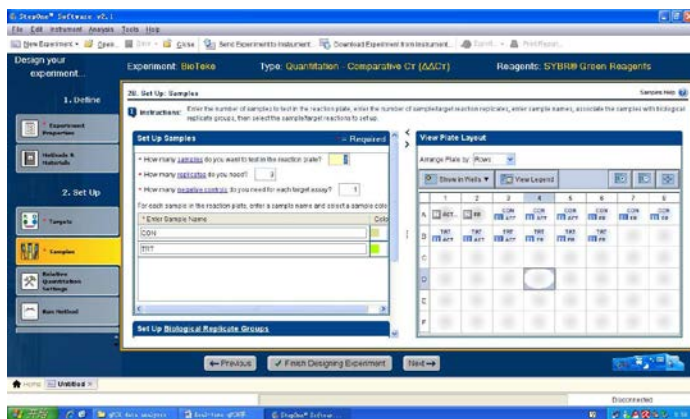
A. 首先是实验目的选择：定量还是其他。我们命名为“BioTeke”，进行“定量”实验。

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。

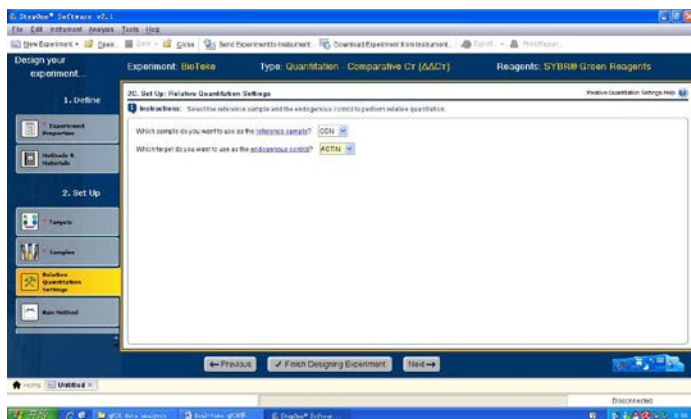




C. 目的基因的设置：有几个目的基因和目的基因的名称。

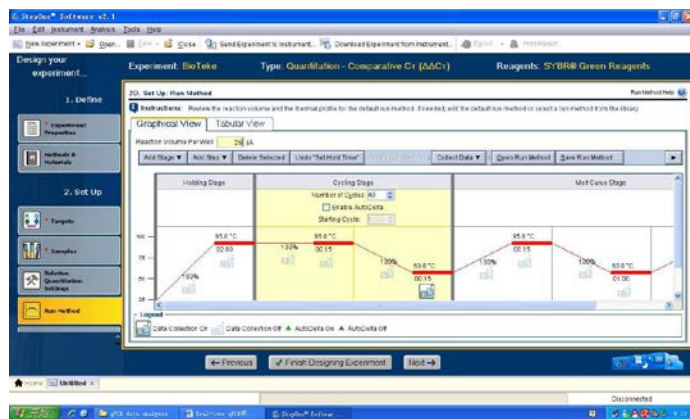


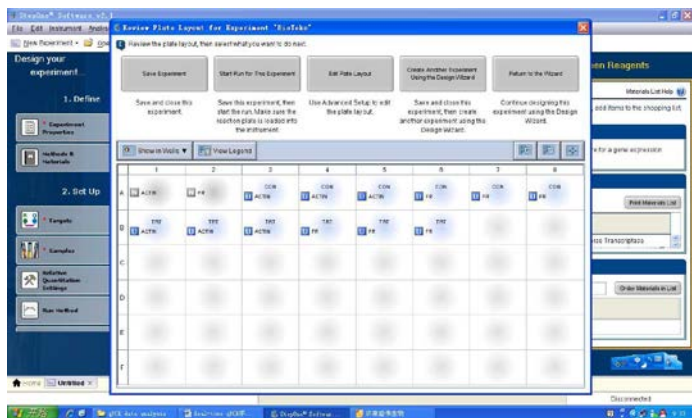
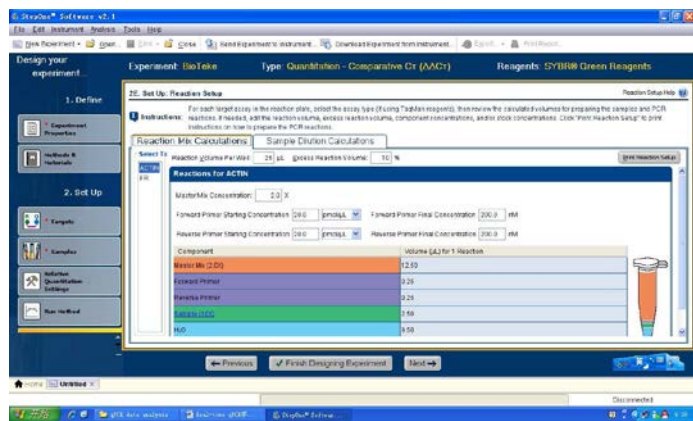
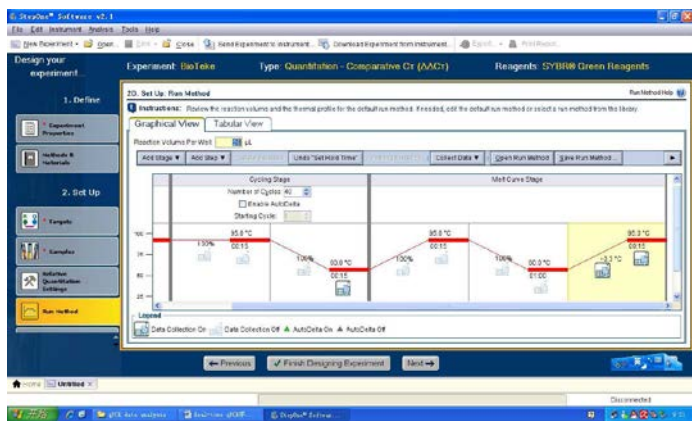
D. 样品的设置：包括哪个是实验组，哪个是对照组。以及负对照的设置和生物重复的设置。



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。

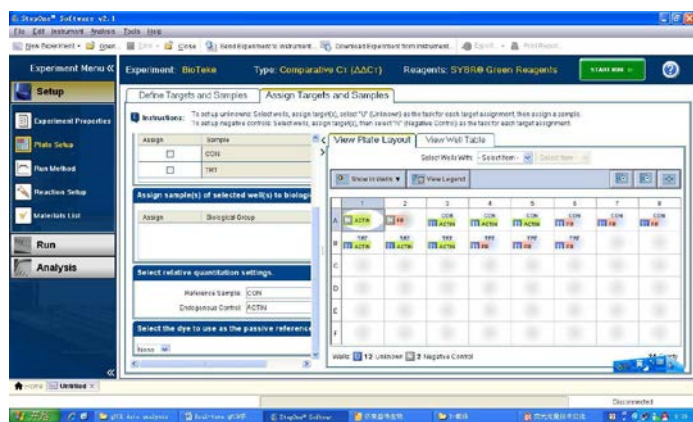
F. 反应程序的设置：PCR反应程序的设置要根据不同公司的MasterMix。比如GENECOME的95 °C 2分钟就可以激活DNA聚合酶（ABI的需要10分钟）。循环反应是95 °C 15秒，60 °C 15 秒的40个循环。溶解曲线程序采用仪器默认设置就可以。或者是仪器说明书上建议的程序。





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。GENECOME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！

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。

- **R2值**: 另一个评估PCR效率的关键参数是相关系数R2, 它是说明两个数值之间相关程度的统计学术语。如果R2 等于1, 那么你可以用Y值 (Ct) 来准确预测X值 (量)。如果R2等于0, 你就不能通过Y值来预测X值。R2 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

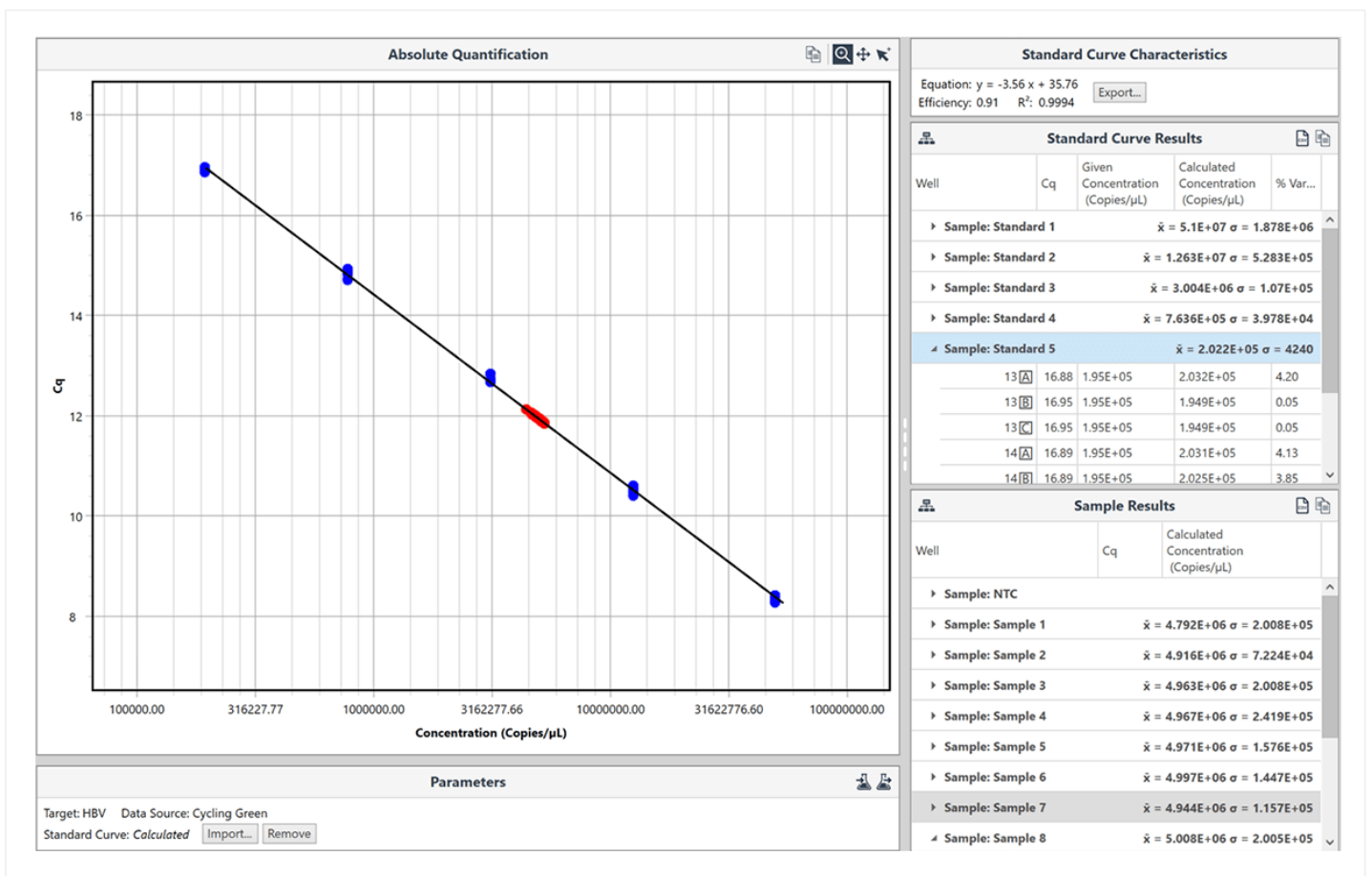
因素	建议	指标
效率	5个数量级梯度稀释	Slope \approx -3.3
		R2 > 0.99
精密度	至少3个重复	标准差 < 0.25(0.5或者1个Ct之内)
灵敏度	增加低浓度样本的重复数	统计分析

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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

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 $Ct = 25$,

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?

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
Gentle 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

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

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 °C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值出现过早 (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 - 150 bp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的入，或通过引物设计避免非特异扩增。

6. 扩增效率低

➤ 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

参考资料

1. GENECOME、Qiagen、ABI荧光定量PCR技术讲座和生物通、丁香园、螺旋网相关资料。

2. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method Thomas D Schmittgen and Kenneth J Livak 2008, Nature Protocols: Vol3:1101-1108

3. Real-time PCR for mRNA Quantitation Marisa L. Wong and Juan F. Medrano 2005, BioTechniques, Vol39:1-11,km90p kj