

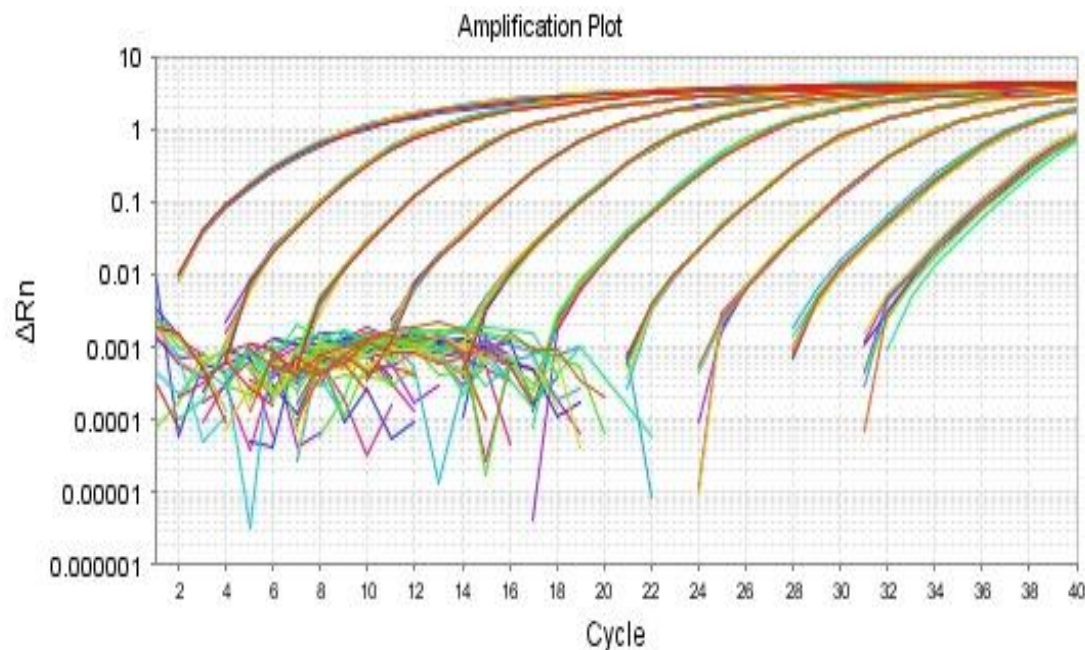
Module 2: 定量PCR实验设计和流程

定量PCR的实验设计

- 准确定量样品的三个基本要求
- 定量PCR的实验要素
- 定量PCR的实验中的误差校正

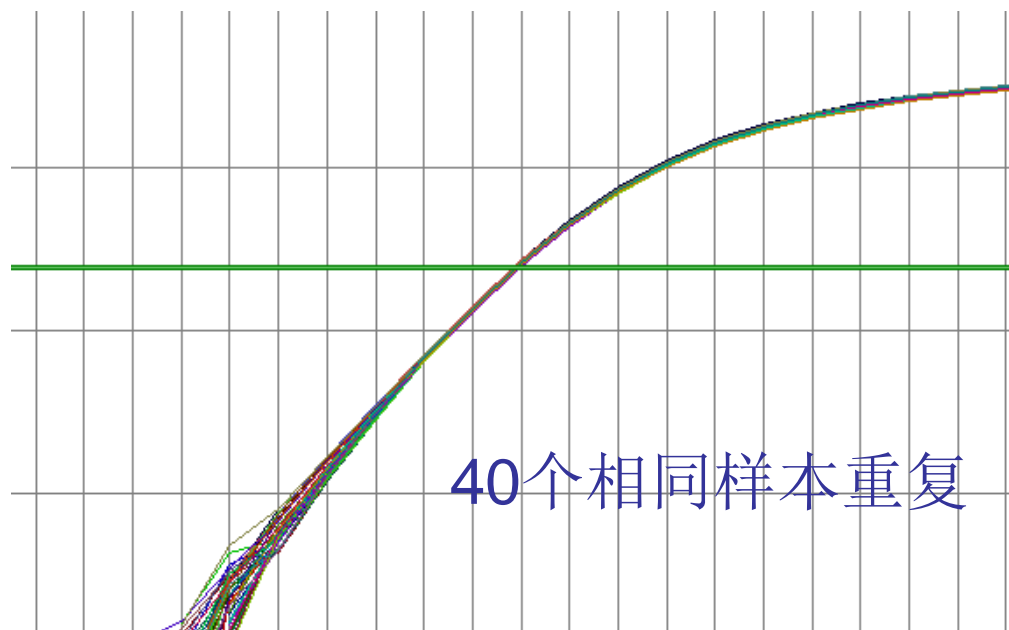
准确定量样品的三个基本要求

- 重复性好
- 准确度高
- 动力学范围宽



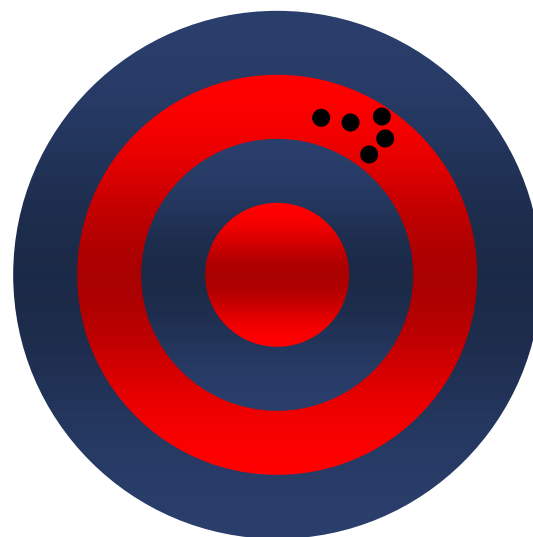
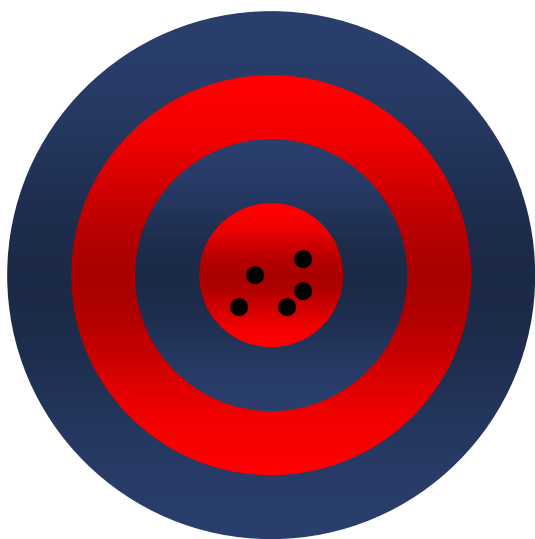
1. 重复性: 曲线一致性

重复性好



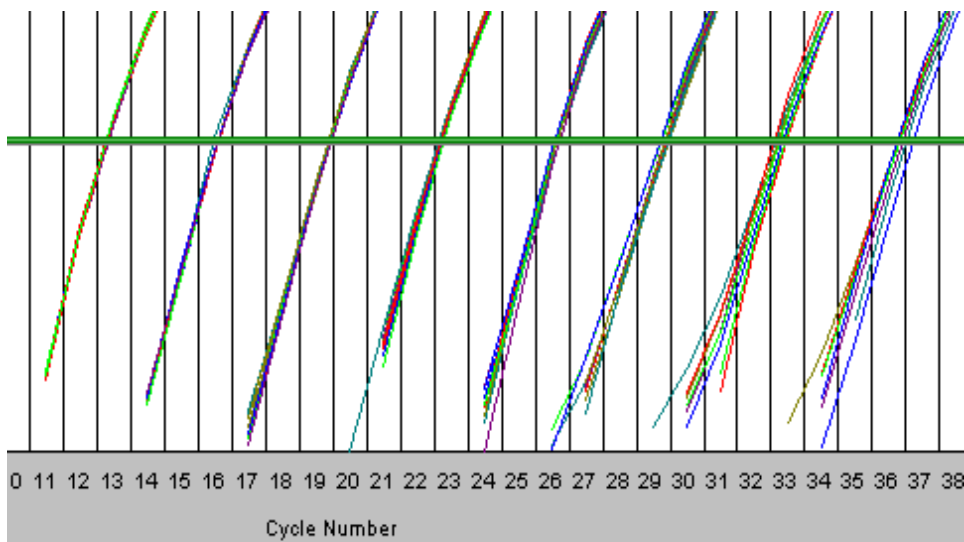
2. 准确度

与正确检测数据的接近程度



3.动力学范围

能得到高质量数据的线性范围
(范围越大越好)



定量PCR的实验要素

- 目的基因
- 标准曲线
- 监控系统
- 监控污染

目的基因：样品

模板质量：纯度和浓度

- 分光光度计检测：

- DNA纯度： $OD_{260}/OD_{280}=1.8$
- RNA纯度： $OD_{260}/OD_{280}=2.0$

- Qubit[®] 荧光定量：

- 分别定量DNA、RNA及蛋白质
- 准确性、灵敏度和简便性
- Qubit[®] Assay (dsDNA, ssDNA, RNA, protein)



标准曲线:标准品

- 目的：生成标准曲线，建立Ct值与浓度之间的线性关系
- 要求：
 - 绝对定量实验：标准品浓度已知
 - 相对定量实验：标准品与待测样品的PCR效率一致，且接近100%
 - 试剂质量一致：模板纯度、引物和探针的T_m值、酶活性、缓冲液成分
 - 反应条件一致：循环参数相同

标准曲线:如何制备标准曲线

- Don't:

- 制备3个点的2倍标准曲线

- Do:

- 推荐制备至少5个点的10倍标准曲线 (4 logs)

标准曲线:标准品梯度稀释方法

- 10倍连续梯度稀释方法:

1v原液(标准品i) +9v稀释缓冲液, 得标准品ii

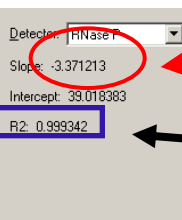
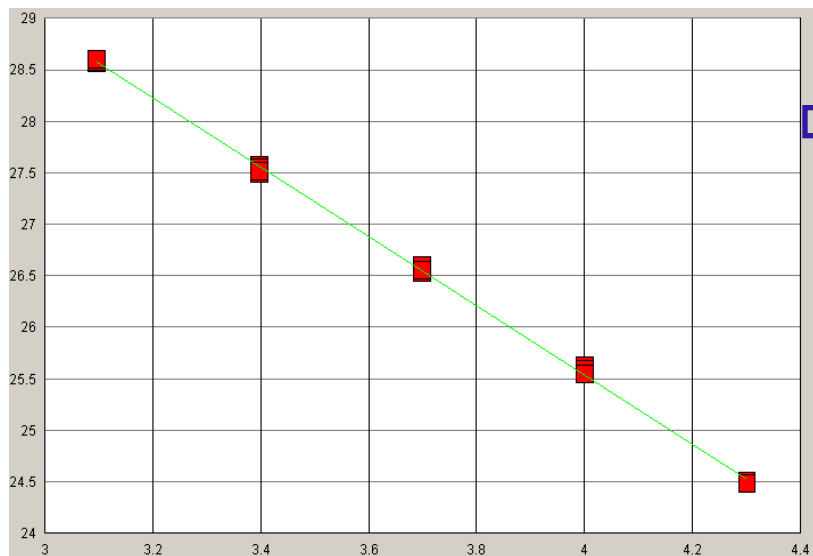
1v标准品ii+9v稀释缓冲液, 得标准品iii

1v标准品iii +9v稀释缓冲液, 得标准品iv

1v 标准品iv +9v稀释缓冲液, 得标准品v

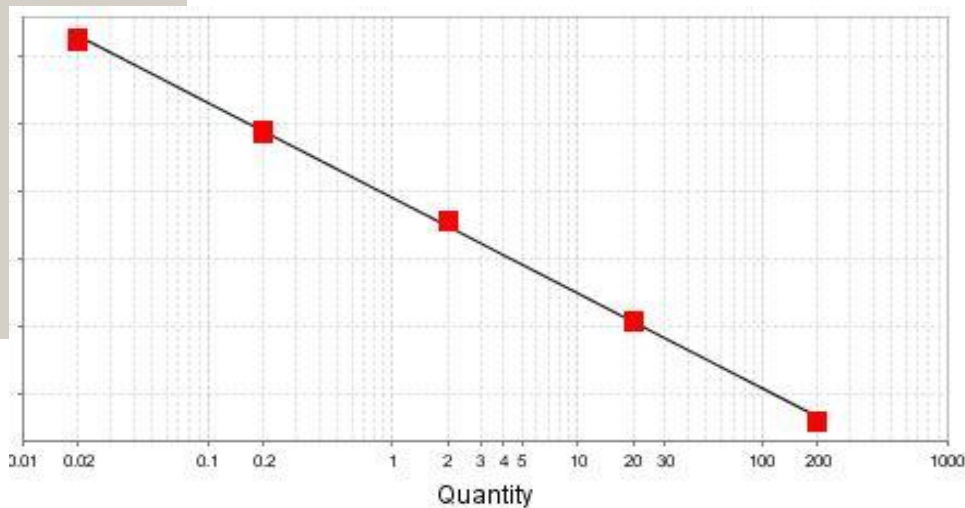
不可由标准品i分别加不同体积的稀释缓冲液直接得到标准品ii、iii、iv、v

标准曲线: PCR扩增效率的确定



$$E = 10^{(-1/\text{斜率}) - 1}$$

$$R^2 \geq 0.99$$



Target: GAPDH Slope: -3.506 Y-Inter: 27.226 R²: 0.999 Eff%: 92.853

$$R^2 \geq 0.99$$

$$E = 92.85\%$$

监控系统:阳性对照

- 100%能扩增出荧光信号的对照组
- 正常实验中可当做阳性对照的反应孔
 - 标准品
 - 内参(管家基因)

监控污染:阴性对照

- 类型

- 无模板对照（No Template Control, NTC）
- 无反转录酶对照（No RT Control）
-



通过扩增图谱、熔解曲线、电泳、测序等手段对阴性对照结果进行分析，以确认反应体系中是否存在污染

定量PCR的实验要素 小结

- 目标基因

样品：模板质量

- 标准曲线

标准品：生成标准曲线，建立Ct值与浓度之间的线性关系

- 监控系统

阳性对照：标准品，内参(管家基因)

- 监控污染

阴性对照：无模板对照，无反转录酶对照

定量PCR的实验中的误差校正

- 校准生物学误差
- 校准物理误差
- 降低随机误差

校准生物学误差:内参(管家基因)

- 内参基因(Endogenous Control)

用于校准实验过程中样品本身对定量结果的影响

- 原因：核酸提取时通常以重量，体积或细胞数为单位取样，提取过程中存在得率差异和操作误差，造成等量样品不一定获得等量提取物
- 目的：将定量结果校准为以基因组（或单个细胞）为单位，不同样品之间才具有可比性
- 校准方法： $[目的基因]/[内参]=均一化的目的基因表达量$

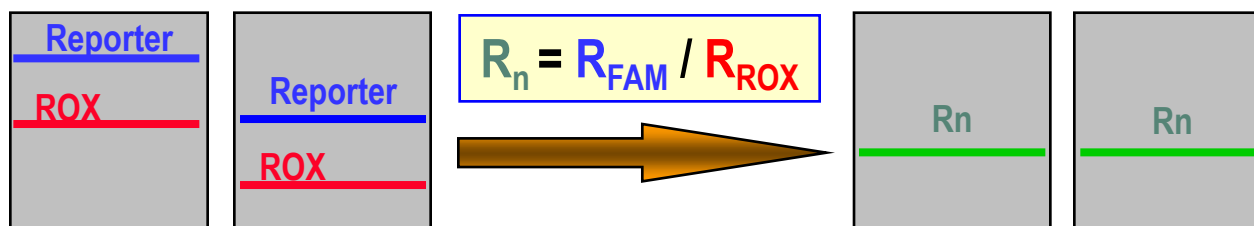
内参的选择

- 在所有待测样品中，内参的表达量应当恒定不变
- 常用内参基因，如18S rRNA、GAPDH等
- Human/Mouse/Rat Endogenous Control

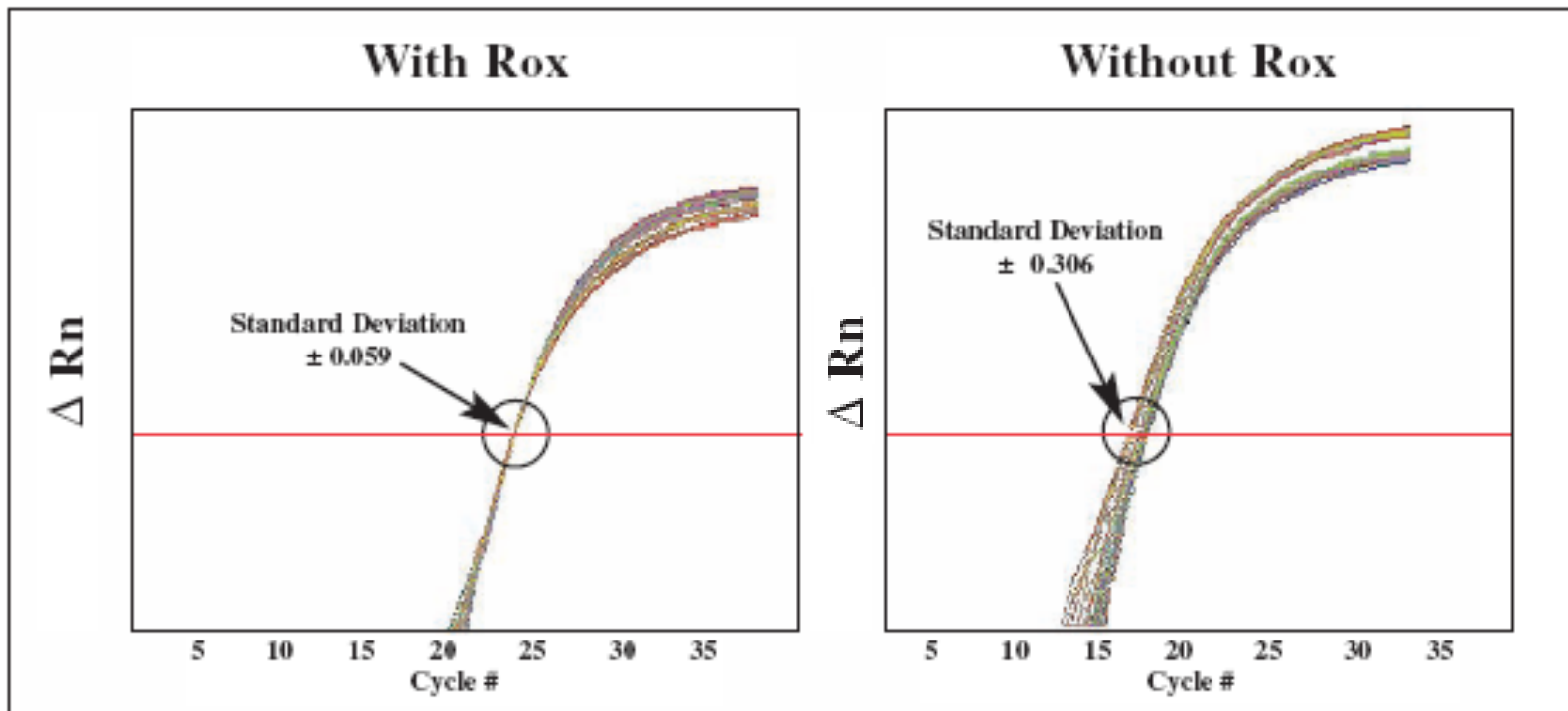
Product Name	Part Number
TaqMan® Array Human Endogenous Control Panel	4367563
TaqMan® Array Mouse Endogenous Control Panel	4378702
TaqMan® Array Rat Endogenous Control Panel	4378704

校准物理误差:参比荧光 (ROX)

- Master Mix中ROX浓度固定
- ROX不参与PCR扩增，信号强度只与Master Mix用量有关
- ROX的功能：校准物理误差
 - 耗材质量、管盖厚度、透光性能
 - 反应体系监控：蒸发、操作



ROX校准增加数据精度



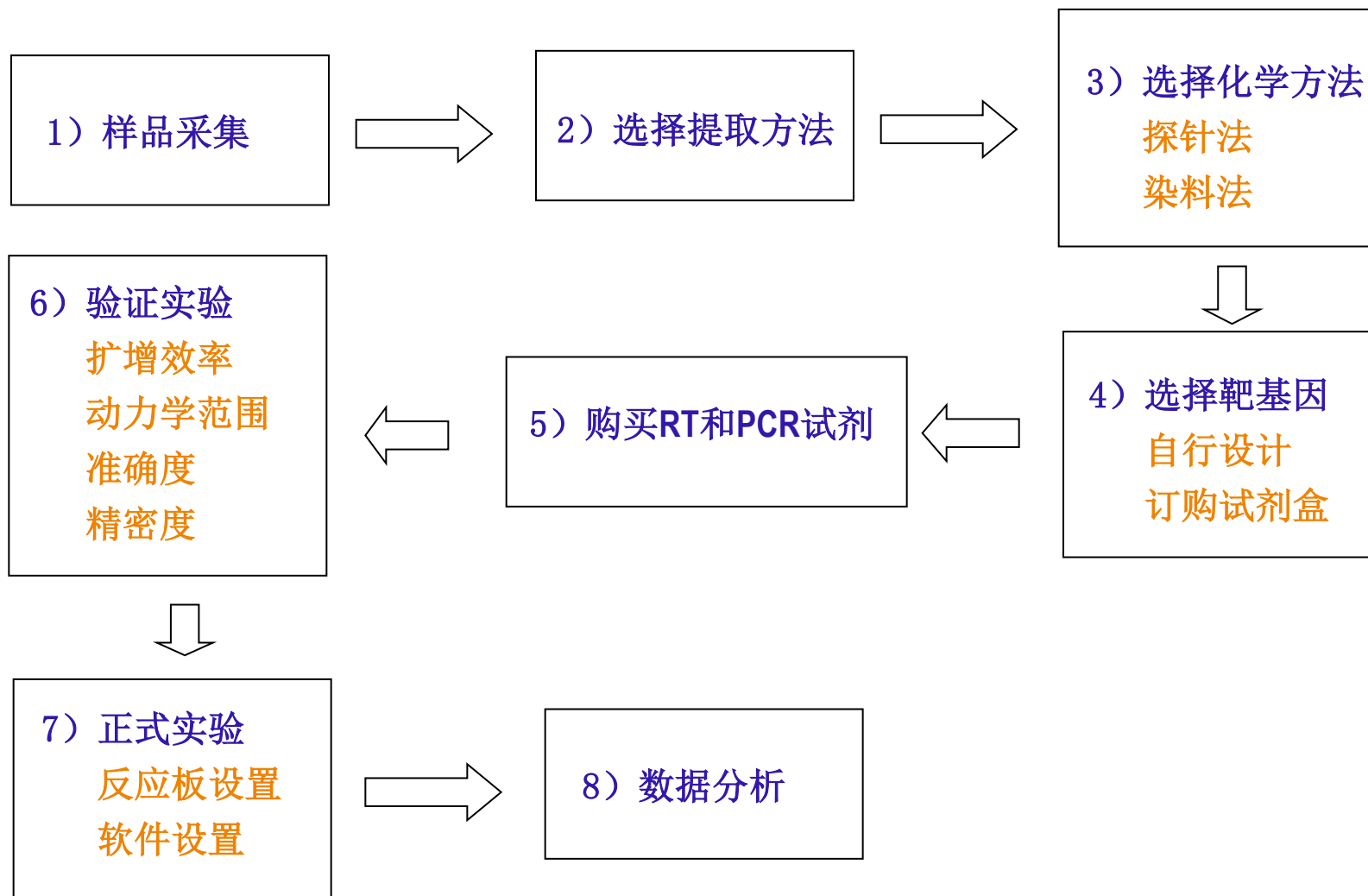
降低随机误差: 重复实验

- 生物学重复: 样品三次重复
- 技术重复: 每个样品做3-4个复孔

定量PCR的实验中的误差校正 小结

- 生物学方面的误差：内参校正
细胞数量的差异、抽提效率、纯化损失、反转录效率等
- 物理方面的误差：ROX校正
耗材质量（如管盖厚度、透光性能不一致）所导致的光学误差；反应体系监控（蒸发）。
- 随机误差：统计校正
重复实验，取平均值

定量PCR的实验流程



日常实验中的注意事项

- 实验室分区：样品处理区、定量PCR反应制备区、扩增区
- 标准品的稀释最好使用独立的一套移液器
- 移液器使用带滤芯的枪头
- 先加阴性对照，后加样品，再由低浓度到高浓度加标准品，最后加阳性对照
- 反应后的PCR管应当直接废弃，切不可在实验区域内开启
- PCR管/ 8联管/板上不可用记号笔标记
- PCR管/ 8联管/板使用光学平盖或光学膜，不要裸手触摸盖或膜表面
- PCR管或8联管要对称放置

Questions?