

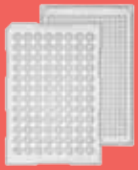
applied
biosystems



实时荧光定量 PCR 手册



单管 Assay



96 或 384 孔板



384 孔 TaqMan® Array Card



OpenArray® 芯片

上图显示的为实时荧光定量 PCR 常用的产品形式。

实时荧光定量 PCR 基础知识

1

实验设计

2

反应板制备

3

数据分析

4

疑难解析

5

数字 PCR

6

实时荧光定量 PCR 基础知识

1



1.1	简介	2
1.2	实时荧光定量 PCR 概述	3
1.3	实时荧光定量PCR 组分概述	4
1.4	实时荧光定量 PCR 分析	6
1.5	实时荧光定量 PCR 荧光检测系统	10
1.6	熔解曲线分析	14
1.7	参比荧光染料	15
1.8	污染预防	16
1.9	多重实时荧光定量 PCR	16
1.10	内部质控品和参考基因	18
1.11	实时荧光定量 PCR 仪校准	19

1.1 简介

聚合酶链式反应 (PCR) 是分子生物学领域功能最强大的技术之一。采用 PCR 技术, 利用序列特异性寡核苷酸、热稳定性 DNA 聚合酶和热循环, 可将 DNA 或 cDNA 模板内的特异性序列拷贝或“扩增”数千至数百万倍。在传统 (终点) PCR 中, 扩增序列的检测和定量是在反应结束, 即最后一次 PCR 循环完成后进行的, 且需要 PCR 后分析, 如凝胶电泳和图像分析。在实时荧光定量 PCR (qPCR) 中, 每次循环均检测 PCR 产物。通过监测指数扩增期的反应, 用户可以确定靶点的起始量, 且精度极高。

在理论上, PCR 可呈指数型扩增 DNA, 使每个扩增循环中的靶分子数倍增。在 PCR 问世之初, 科学家推断, 通过与已知标准品进行比较, 利用循环数和 PCR 终产物的量可以计算出遗传物质的起始量。为达到可靠定量的要求, 实时荧光定量 PCR 技术得以问世。如今终点 PCR 主要用于扩增特定的 DNA, 用于测序、克隆及其它分子生物学技术。

在实时荧光定量 PCR 中, 每次循环结束后通过荧光染料检测 DNA 的量, 荧光染料产生的荧光信号与生成的 PCR 产物分子 (扩增片段) 数直接成正比。利用反应指数期采集的数据, 生成有关扩增靶点起始量的定量信息。实时荧光定量 PCR 使用的荧光报告基团包括双链 DNA (dsDNA) 结合染料或在扩增过程中掺入 PCR 产物的、与 PCR 引物或探针结合的染料分子。

利用具有热循环功能及荧光染料筛查能力的仪器, 检测反应过程中荧光的变化。实时荧光定量 PCR 仪通过绘制荧光与循环数曲线, 生成扩增曲线, 表示在整个 PCR 反应过程中积聚的产物 (图 1)。

实时荧光定量 PCR 的优点包括:

- 能够实时监控 PCR 反应的进程
- 能够精确测定每个循环的扩增片段数量, 从而对样本中的起始材料量进行准确定量
- 具有更大的检测动态范围
- 在单管中实现扩增和检测, 无需 PCR 后处理

在过去的数年中, 实时荧光定量 PCR 已成为 DNA 或 RNA 检测和定量的主要工具。采用上述技术, 您可以实现精确的检测, 其准确度低至 2 倍范围, 起始材料的动态范围达 6 至 8 个数量级。

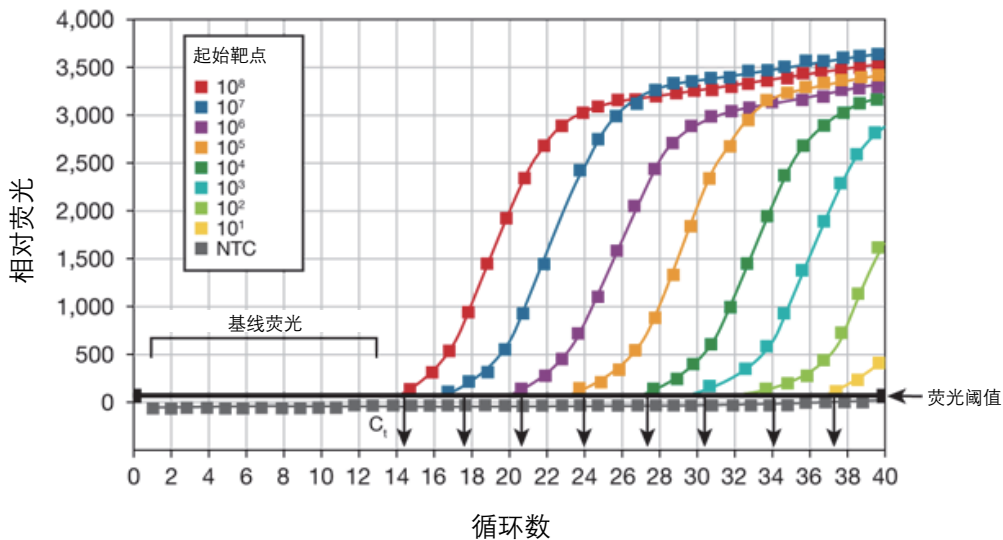


图 1. 相对荧光与循环数。通过绘制每个样本的荧光信号与循环数曲线, 生成扩增曲线; 因此, 扩增曲线表示在实时荧光定量 PCR 实验过程中积聚的产物。用于创建本图曲线的样本是连续梯度稀释的 DNA 靶序列。

1.2 实时荧光定量 PCR 概述

本部分将概括实时荧光定量 PCR 的步骤。实时荧光定量 PCR 是在标准 PCR 技术基础上演变而成，常用于定量样本中的 DNA 或 RNA。利用序列特异性引物，可测定特定的 DNA 或 RNA 序列的拷贝数。通过检测 PCR 循环的每个阶段中扩增产物的量，实现定量。如果样本中存在高丰度的特定序列 (DNA 或 RNA)，则在早期循环中即可观察到扩增；如果序列较少，则在晚期循环中方可观察到扩增。利用荧光探针或荧光 DNA 结合染料，采用实时荧光定量 PCR 仪检测荧光并完成 PCR 反应所需的热循环，实现扩增产物的定量。

实时荧光定量 PCR 的步骤

实时荧光定量 PCR 反应的每个循环包括三个主要步骤。一般运行 40 个循环。

1. **变性**：利用高温孵育将双链 DNA“溶解”为单链，并松开单链 DNA 的二级结构。一般采用 DNA 聚合酶可耐受的最高温度 (通常为 95°C)。如果模板 GC 含量较高，则延长变性时间。
2. **退火**：在退火过程中，互补序列有机会发生杂交，因此，应根据计算所得的引物熔解温度 (T_m)，使用适当的温度 (通常较引物的 T_m 低 5°C)。
3. **延伸**：在 70-72°C 之间，DNA 聚合酶的活性最佳，引物延伸速度达每秒 100 个碱基。当实时荧光定量 PCR 中的扩增片段较小时，通常将该步骤与退火步骤合并，温度为 60°C。

两步法 qRT-PCR

两步法定量逆转录 PCR (qRT-PCR) 的第一步是采用逆转录酶 (RT) 将总 RNA 或 poly(A) RNA 逆转录为 cDNA。采用随机引物、oligo(dT) 或基因特异性引物 (GSP) 完成第一链 cDNA 合成反应。为在实时荧光定量 PCR 应用中平均表示所有靶点并避免 oligo(dT) 引物的 3' 偏差，许多研究人员采用了随机引物或 oligo(dT) 和随机引物的混合物。

cDNA 合成采用的温度取决于所选的 RT 酶。逆转录完成后，将约 10% 的 cDNA 转移至单独的管中，完成实时荧光定量 PCR 反应。

一步法 qRT-PCR

一步法 qRT-PCR 可在同一管内完成第一链 cDNA 合成反应和实时荧光定量 PCR 反应，简化了反应设置，并降低了污染的可能性。需要使用基因特异性引物 (GSP)。这是由于在一步法操作中使用 oligo(dT) 或随机引物将生成非特异性产物，降低了目的产物的量。

1.3 实时荧光定量 PCR 组分概述

本部分将概括实时荧光定量 PCR 实验的主要反应组分和参数。在本手册后面的部分，将更详细地介绍一些特殊的组分，如报告基因染料、参比荧光染料和尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (UDG)。

DNA 聚合酶

PCR 的性能通常与热稳定性 DNA 聚合酶有关，因此酶的选择是反应成功的关键。影响 PCR 特异性的一个主要因素是 *Taq* DNA 聚合酶在低温下具有残留活性。在反应的设置中，引物可与 DNA 非特异性地退火结合，使得聚合酶合成非特异性产物。通过采用“热启动”酶，可最大程度地减少因引物错配形成非特异性产物的问题。采用热启动酶确保了在反应设置过程和初始 DNA 变性步骤中，DNA 聚合酶无活性。

逆转录酶

逆转录酶 (RT) 同 DNA 聚合酶一样，亦是 qRT-PCR 成功的关键。选择一种不仅能够提供高全长 cDNA 产量且在高温下具有良好活性的 RT 至关重要。高温性能对于具有二级结构的 RNA 的变性同样极为重要。在一步法 qRT-PCR 中，可在较高温度下维持活性的 RT 使您能够使用具有高熔解温度 (T_m) 的 GSP，提高了特异性，降低了背景。

dNTP

最好从同一供应商那里购买 dNTP 和热稳定性 DNA 聚合酶，因为在实验中使用不同供应商的试剂，常常会出现阈值循环 (C_t) 灵敏度下降的情况。

镁离子浓度

在实时荧光定量 PCR 中，氯化镁或硫酸镁的终浓度一般为 3 mM。这是大多数靶点的最佳工作浓度；但镁离子的最佳浓度范围为 3 至 6 mM。

良好的实验技术

不要低估良好的实验技术的重要性。反应的每个阶段 (从模板制备到 PCR 后分析) 最好使用专门的设备和解决方案。使用防气溶胶吸头和螺帽管有助于减少交叉污染问题。要获得严格的重复数据 (理论上为三次重复)，需制备包含除样本外的所有反应组分的预混液。使用预混液可减少加样步骤，从而降低孔间污染及其它加样误差的几率。

模板

每次实时荧光定量 PCR 反应需使用 10 至 1,000 拷贝的模板核酸。这相当于大约 100 pg 至 1 μg 的基因组 DNA 或利用 1 pg 至 100 ng 总 RNA 生成的 cDNA。多余的模板也可能提高污染物含量，大大降低 PCR 效率。PCR 引物的特异性针对 cDNA 而非基因组 DNA，处理 RNA 模板以降低其包含基因组 DNA 污染的几率十分重要。一种方案是采用 DNA 酶 I 处理模板。

纯的完整 RNA 是高质量全长 cDNA 合成的基础，也是实现准确的 mRNA 定量的关键。RNA 应避免 RNA 酶污染，且应维持无菌状态。总 RNA 一般适用于 qRT-PCR；通常无需 mRNA 提取，但提取 mRNA 可提高特定 cDNA 的产量。

实时荧光定量 PCR 引物设计

良好的引物设计是实时荧光定量 PCR 的最重要参数之一。这正是众多研究人员选择购买 TaqMan® Assay 产品的原因——这些引物和探针采用了成熟可靠的算法设计，获得了全世界科学家的信赖，适用于实时荧光定量 PCR。如果您选择设计您自己的实时荧光定量 PCR 引物，切记扩增片段的长度应约为 50–150 bp，因为较长的产物无法实现高效扩增。

一般而言，引物的长度应为 18–24 个寡核苷酸。这是针对实际的退火温度的。引物应根据标准 PCR 指南设计。它们对于目的基因序列应是特异性的，且无内部二级结构。引物应不含共聚物延伸段序列 (如 poly (dG)) 或重复基序，因其可引起不必要的杂交。

引物对应应具有相当的熔解温度 (在 1°C 以内)，且 GC 含量约为 50%。高 GC 含量的引物可形成稳定的不良杂合体。相反，高 AT 含量会降低匹配良好的杂合体的 T_m 值。如果可能，引物的 3' 端应具有高 GC 含量 (GC 夹)，以提升延伸端的退火效率。分析引物对序列，避免引物之间的互补和杂交 (引物二聚体)。

在 qRT-PCR 中，设计内含子两侧可与外显子退火结合的引物 (或覆盖 mRNA 相邻两个外显子交界处)，利用溶解曲线分析区分 cDNA 和潜在污染基因组 DNA 的扩增。要确认引物的特异性，可在公共数据库上进行 BLAST 搜索，以确保您的引物只识别目的靶点。

想获得最佳结果，需要在 50 至 500 nM 浓度间进行引物滴定。引物终浓度为 200 nM 时能有效地进行大多数的实验。

引物设计软件

引物设计软件程序 (如 OligoPerfect™ 设计工具和 Primer Express® 软件) 及序列分析软件 (如 Vector NTI® 软件) 可自动评估目的序列，并根据上述标准设计序列引物。

使用引物设计软件至少可以确保引物针对目的序列的特异性，且不会形成内部二级结构，并能避免每条引物的 3' 端自身或与其它引物之间形成互补杂交。如前所述，在使用 DNA 结合染料进行扩增片段检测时，良好的引物设计尤为关键。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

本部分定义了实时荧光定量 PCR 分析中常用的术语。

基线

实时荧光定量 PCR 反应的基线是指在 PCR 的最初几个循环中 (一般为第 3 至 15 个循环) 的信号水平, 此阶段的荧光信号变化极小。低水平的基线信号相当于反应的背景或“噪声” (图 2)。每个实时荧光定量 PCR 反应的基线应通过用户分析或扩增曲线自动分析, 根据经验确定。应仔细设置基线, 以准确确定阈值循环 (C_t) (定义如下)。基线确定应考虑足够的循环数, 消除扩增早期的背景, 但应排除扩增信号开始超过背景的循环。当比较不同的实时荧光定量 PCR 反应或实验时, 应采用同样的方法确定基线 (图 2)。

阈值

实时荧光定量 PCR 反应的阈值信号水平较计算出的基线信号水平有显著增加 (图 2)。设置阈值可将相关扩增信号从背景中区分出来。实时荧光定量 PCR 仪软件通常将阈值自动设置为基线荧光值标准差的 10 倍。但阈值可设置在 PCR 指数期的任意点。

C_t (阈值循环)

阈值循环 (C_t) 是反应的荧光信号与阈值交叉的循环数。 C_t 值可用于计算起始 DNA 拷贝数, 因为 C_t 值与起始靶点量呈反比。例如, 比较含有不同靶点量的样本的实时荧光定量 PCR 结果时, 如果第一个样本扩增前起始的靶基因拷贝数是后一个样本的两倍, 较之第二个样本, 第一个样本可提早一个循环生成 C_t (图 3)。前提是上述两个反应的 PCR 的工作效率均为 100% (即每个循环后产物量均实现倍增)。

模板量越低, 出现明显扩增的循环数越高。模板按 10 倍稀释, 则 C_t 值递减 3.3 个循环。

标准曲线

利用连续稀释的已知样本建立标准曲线, 确定实验样本的目的模板起始量, 或者评估反应效率 (图 4)。以已知的连续稀释浓度的对数为横坐标 (x 轴), 该浓度对应的 C_t 值为纵坐标 (y 轴), 绘制曲线。从该标准曲线中可以推导出反应性能及各种反应参数 (包括斜率、y 截距和相关系数) 相关的信息。标准曲线中所选的浓度应涵盖实验样本的预期靶点浓度范围。

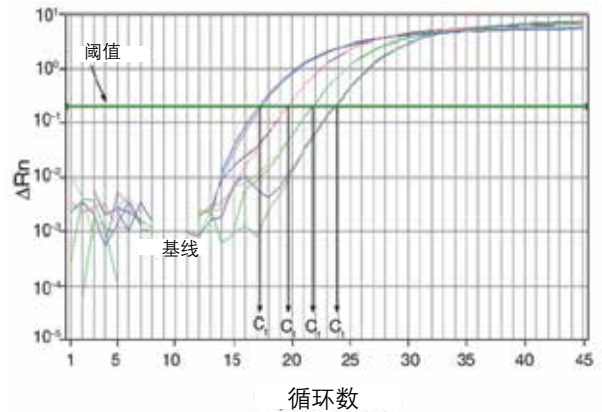


图 2. 实时荧光定量 PCR 反应的基线和阈值。

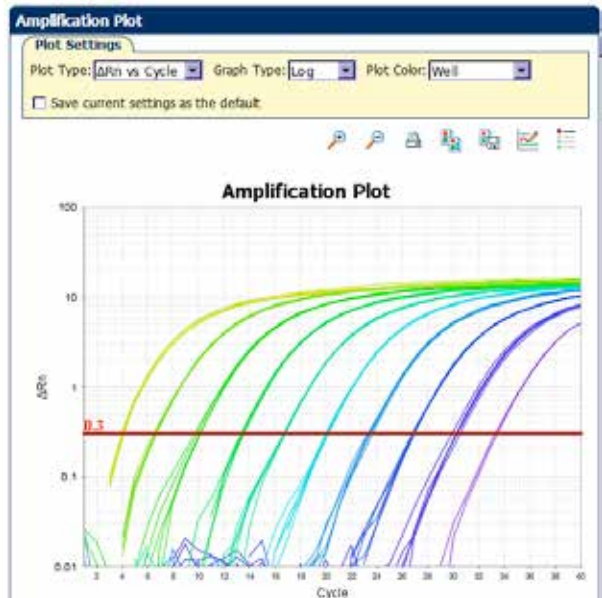


图 3. 10 倍连续稀释的扩增曲线。

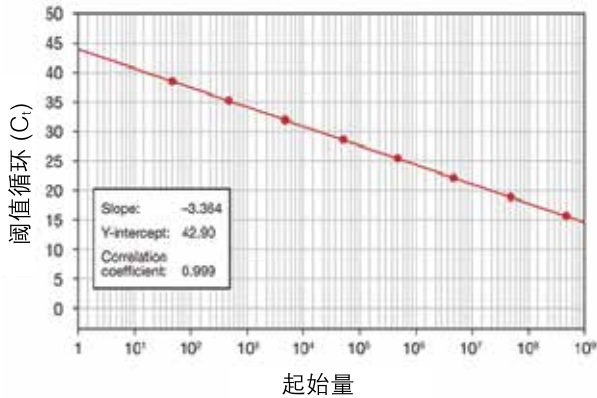


图 4. 实时荧光定量 PCR 数据的标准曲线示例。标准曲线的 y 轴表示阈值循环 (C_t)，x 轴表示起始 RNA 或 DNA 靶点量。斜率、y-截距和相关系数值可用于提供反应性能相关的信息。

相关系数(R²)

相关系数可用于表示数据与标准曲线之间的契合度。R² 值反映了标准曲线的线性度。在理论上，R² = 1，但 0.999 一般为最大值。

Y-截距

y-截距表示反应的理论最低检测限，或者 x 轴上的最低拷贝数的靶分子产生明显扩增时的预期 C_t 值。尽管 PCR 在理论上能够检测单拷贝靶点，但在实时荧光定量 PCR 应用中能可靠定量的最低靶点量通常为 2-10 拷贝。这限制了 y-截距值直接反映灵敏度的作用。但 y-截距值可用于比较不同的扩增系统和靶点。

指数期

在指数期的早期，而不是指数期的晚期或反应达到平台时进行实时荧光定量 PCR 反应定量十分重要。在指数期的开始，所有试剂仍有剩余，DNA 聚合酶仍然高效，扩增产物的量较少，不会竞争引物的退火性能。所有这些均可提高数据的准确度。

斜率

扩增反应的对数线性期的斜率可用于检测反应效率。要获得准确且可重复的结果，反应效率应尽可能接近 100%，相当于斜率为 -3.32 (参见下文效率，了解更多详情)。

效率

100% 的 PCR 效率对应的斜率为 -3.32，可根据下列等式确定：

$$\text{效率} = 10^{[-1/\text{斜率}] - 1}$$

理论上，PCR 反应的效率 (E) 应为 100%，表示在指数扩增阶段每次热循环后的模板倍增。实际效率可提供反应相关的重要信息。诸如扩增片段的长度、二级结构和 GC 含量等实验因素会影响效率。影响效率的其它条件有反应本身的动态范围、使用的试剂浓度未达到最佳以及酶的质量，这些因素均会导致效率低于 90%。一种或多种试剂中存在的 PCR 抑制剂可使其效率超过 110%。良好的反应效率应在 90% 至 110% 之间，其对应的斜率为 -3.58 至 -3.10。

动态范围

在此范围内，起始材料的浓度增加，扩增产物也相应增加。理论上，质粒 DNA 的实时荧光定量 PCR 的动态范围应为 7-8 个数量级，cDNA 或基因组 DNA 至少为 3-4 log 范围。

绝对定量

绝对定量是指在实时荧光定量 PCR 实验中，对已知量的样本进行连续稀释后扩增，生成标准曲线。然后通过与此曲线比较，定量未知样本。

相对定量

相对定量是指在实时荧光定量 PCR 实验中，将一个样本 (已处理) 中的目的基因表达与另一个样本 (未处理) 中相同基因的表达相比较。结果以处理样本的表达量相对于未处理样本表达量的倍数变化 (增加或减少) 表示。此类型的定量采用标准品基因 (如 β -actin) 作为实验差异对照品。

实时荧光定量 PCR 基础知识

熔解曲线 (解离曲线)

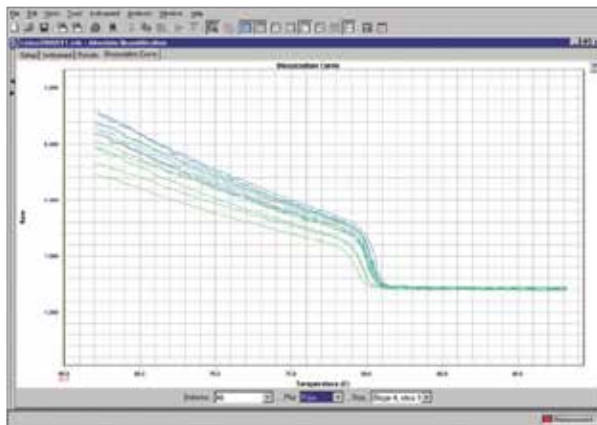
熔解曲线图示了随着反应温度的升高，当结合染料分子的双链 DNA (dsDNA) 解离或“熔解”成单链 DNA (ssDNA) 时，观察到的荧光强度的变化。例如，当加热结合有 SYBR® Green I 染料的双链 DNA 时，其达到熔点 (T_m) 后，由于 DNA 链的解离和染料的释放，检测的荧光强度会出现突然下降。绘制荧光强度与温度图 (图 5A)，及 $-\Delta F/\Delta T$ (荧光变化/温度变化) 与温度图，清晰显示熔解曲线动态范围 (图 5B)。

扩增后熔解曲线分析是一种简单、直接地检查实时荧光定量 PCR 反应中引物二聚体结构的方法，可确保反应的特异性。由于核酸的熔解温度受长度、GC 含量以及是否存在碱基错配等因素影响，不同的 PCR 产物通常可根据其熔解特性区分。通过熔解曲线分析鉴定反应产物 (如引物二聚体与扩增片段) 省去了耗时的凝胶电泳步骤。

图 6 所示的典型的实时荧光定量 PCR 数据组显示了上文提及的多个术语。图 6A 显示了典型的实时荧光定量 PCR 扩增曲线。在早期 PCR 反应循环中，荧光信号变化极小。随着反应的进行，每个循环的荧光水平开始增加。将反应阈值设置在基线之上、曲线的指数期部分。该阈值可用于指定每个扩增反应的阈值循环或 C_t 值。利用一系列含有已知量靶点的反应的 C_t 值生成标准曲线。将未知样本的 C_t 值与此标准曲线相比较进行定量，或者在相对定量时采用标准曲线检验效率。 C_t 值与起始模板量呈反比：反应中的起始模板量越高，反应的 C_t 值越低。

图 6B 显示了利用扩增曲线的 C_t 值生成的标准曲线。标准曲线提供了扩增效率、重复一致性及反应的理论检测限等信息

A.



B.

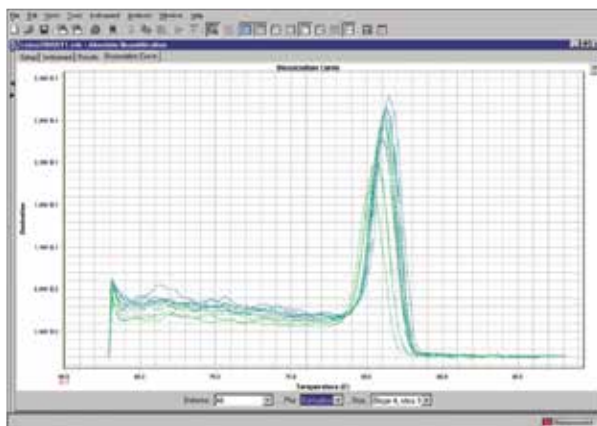


图 5. 熔解曲线 (A) 和 $-\Delta F/\Delta T$ 与温度 (B)。

A.



B.

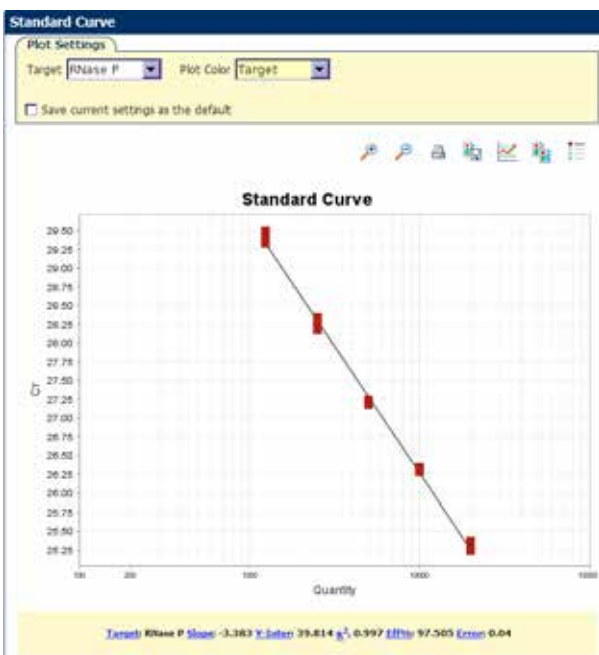


图 6. 1.25×10^3 至 2×10^6 个拷贝的 RNA 酶 P 扩增。在 ViiA™ 7 实时荧光定量 PCR 系统的标准热循环条件下, 采用 FAM™ 染料标记的 TaqMan® Assay 及 TaqMan® Universal Master Mix II 对 2 倍连续稀释的人 RNA 酶 P DNA 进行实时荧光定量 PCR 反应。(A) 扩增曲线。(B) 标准曲线显示了模板拷贝数与阈值 (C_t)。

1.5 实时荧光定量 PCR 荧光检测系统

实时荧光定量 PCR 化学原理

实时荧光定量 PCR 试剂的种类很多，但最常用的是 5' 核酸酶 Assay，例如 TaqMan[®] Assay 和基于 SYBR[®] Green 染料的 Assay (图 7)。

5' 核酸酶 Assay 以 Taq DNA 聚合酶的 5' 核酸酶活性命名 (图 8)。

5' 核酸酶结构域能够在 DNA 合成结束后，降解与模板结合的 DNA。5' 核酸酶 Assay 的第二个关键元件是一种称为 FRET 的现象：荧光共振能量转移 (fluorescent resonance energy transfer, FRET)。在 FRET 中，邻位的另一种染料——通常被称为淬灭剂——可大大降低荧光染料的发射信号。

可通过两种荧光染料对 FRET 进行图示说明：绿色和红色 (图 9)。绿色荧光染料的发射光能量较红色荧光染料更高，这是由于绿光的波长比红光短。如果红色染料邻近绿色染料，则激发绿色染料将导致绿光的发射能量被转移至红色染料上。换言之，能量从高处转移至低处。继而绿色染料的信号将被抑制或“淬灭”。但如果两种染料相距较远，则不会出现 FRET 现象，绿色染料能发射出全部信号。

用于靶点检测或定量的 5' 核酸酶 Assay 通常包括两个 PCR 引物和一个 TaqMan[®] 探针 (图 10)。

在 PCR 开始之前，TaqMan[®] 探针完整且具有一定的灵活性。探针完整时，报告基团和淬灭剂之间具有天然的亲和力，可促进 FRET 的发生 (图 11)。在 PCR 开始之前，报告基团信号被淬灭。

在 PCR 过程中，引物和探针与靶点退火结合。DNA 聚合酶延伸探针上游的引物。如果探针与正确的靶序列结合，则聚合酶的 5' 核酸酶活性会切断探针，释放出含有报告基团染料的片段。剪切完成后，报告基团和淬灭剂不再相互吸引；释放的报告基团分子将不再被淬灭。

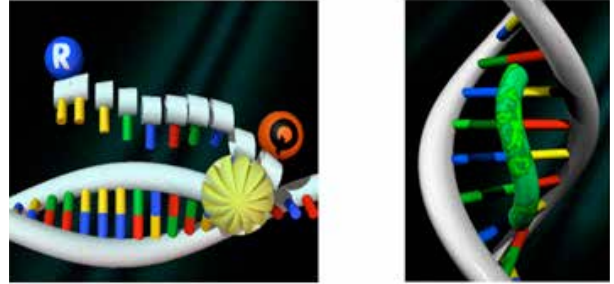


图 7. 5' 核酸酶 Assay。

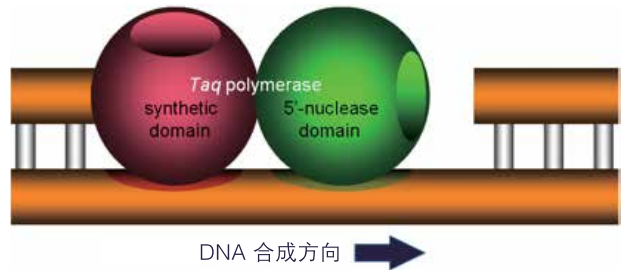


图 8. Taq DNA 聚合酶图示。每个不同颜色的球表示一个蛋白质结构域。

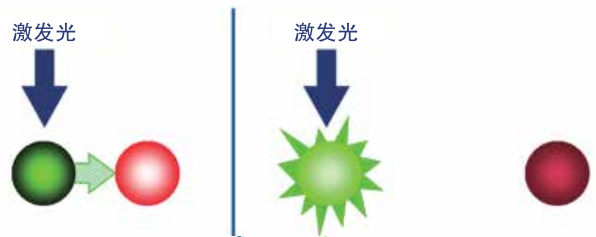


图 9. FRET 现象举例。(A) 当绿色荧光染料与红色荧光染料靠近时可出现 FRET。(B) 当两种荧光染料相距较远时，不会出现 FRET。

5' 核酸酶 Assay 特异性

Assay 特异性是指 Assay 结果中包括靶点信号且排除非靶点信号的程度。特异性可以说是任何一个 Assay 中最重要方面。影响 5' 核酸酶 Assay 特异性的最重要因素是同源物。同源物是与靶点序列相似的基因，但不是 Assay 的靶点。同源物在种属内部及相关种属之间极为常见。

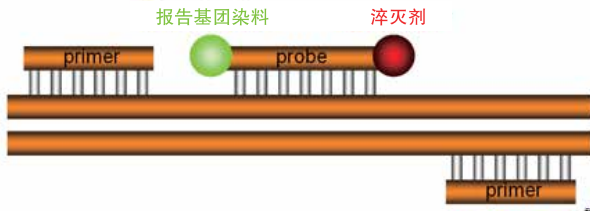


图 10. TaqMan® 探针。TaqMan® 探针具有基因特异性序列，可与两个 PCR 引物之间的靶点结合。TaqMan® 探针的 5' 端带有“报告基团”，该荧光染料将报告靶点的扩增。探针的 3' 端为淬灭剂，它可以淬灭完整探针中报告基团发出的荧光。淬灭剂还将阻断探针的 3' 端，这样即无法在热稳定性 DNA 聚合酶作用下延伸。



图 11. TaqMan® 探针图示。R 为报告基团染料，Q 为淬灭剂分子，橙色的线条表示核苷酸。

5' 核酸酶 Assay 提供了两种特异性工具：引物和探针。靶点与同源物之间的错配发生在引物的 3' 最末端的碱基对引物的特异性影响最大，而远离 3' 末端的错配对特异性影响较小。而发生在 TaqMan® MGB 探针 (较 TaqMan® TAMRA™ 探针短) 大部分位置上的错配对特异性的影响极大——TaqMan® MGB 探针是比引物更有效的实现特异性工具。

例如，引物结合位点上的一个或两个碱基的随机错配将极有可能使 DNA 聚合酶高效延伸与同源物结合的引物。DNA 聚合酶作用下的一个或两个碱基的延伸将稳定与同源物结合的引物，因此其结合的稳定性同引物与完全互补的目的靶点的结合相当。此时，DNA 聚合酶将继续合成，生成同源物的拷贝。

在 TaqMan® 探针 3' 端的淬灭剂的作用下，DNA 聚合酶无法稳定 5' 端的错配。TaqMan® MGB 探针结合位点上的错配将降低探针结合的紧密度，这样探针不会被剪切，而是整个探针被置换。整个探针回到其淬灭结构，当 PCR 循环结束采集数据时，信号由靶点而非同源物产生，即便同源物亦扩增，也不会产生信号。

除同源物外，PCR 还可扩增非特异性产物，这是引物与样本 DNA 的随机位点结合或者引物自身结合 (称为“引物二聚体”) 产生的。由于非特异性产物与靶点无关，因此它们无 TaqMan® 探针结合位点，在实时荧光定量 PCR 数据中不可见。

TaqMan® 探针类型

TaqMan® 探针可分为两种类型：MGB 和非 MGB。第一款 TaqMan® 探针属于“非 MGB”。它们采用 TAMRA™ 染料作为淬灭剂。在实时荧光定量 PCR 发展的早期，大量测试显示，TaqMan® 探针所需的退火温度远高于 PCR 引物的温度，因而无法完成剪切。因此，TaqMan® 探针的长度要大于引物。这种长探针上出现一个碱基错配对探针结合的影响相对较小，可完成剪切。但对于很多遗传复杂性较高的应用领域，如真核基因表达和单核苷酸多态 (Single nucleotide polymorphisms, SNP)，则需要更高的特异性。

TaqMan® MGB 探针是在 TaqMan® 探针技术基础上进一步改良而成的。TaqMan® MGB 探针的 3' 端带有小沟结合物 (MGB) 分子。探针与靶点结合后，DNA 内形成较短的小沟，使 MGB 分子结合，提高了熔解温度；从而增强了探针的结合。TaqMan® MGB 探针的长度可以大大短于 PCR 引物。由于 MGB 基团的存在，这些探针可以较 TaqMan® 探针更短，同时能够达到较高的熔解温度。与引物相比，TaqMan® MGB 探针能在更高的温度下，与靶点更特异地结合。TaqMan® MGB 探针更短，一个碱基的错配对其结合的影响更大。由于 TaqMan® MGB 探针具有更高的特异性，因此其被推荐用于大多数遗传复杂性高的应用领域。

TaqMan® 探针信号产生

无论您选择 MGB 还是非 MGB 探针，其信号图谱均相同。在早期 PCR 循环中，只能检测到较低的淬灭报告基团信号。在实时荧光定量 PCR 软件中，这些早期数据被自动消减为零，称为“基线”。如果样本含有靶点，则最后将生成足够量的剪切探针，使扩增信号高于基线。扩增信号变得可见的时间点与初始靶点量呈反比。

SYBR® Green 染料

SYBR® Green I 染料是一种荧光 DNA 结合染料，可与双链 DNA 的小沟结合。激发与 DNA 结合的 SYBR® Green 染料可产生较未结合染料更强的荧光信号。基于 SYBR® Green 染料的 Assay 一般包括两个 PCR 引物。在理想状态下，SYBR® Green Assay 的扩增图谱与基于 TaqMan® 探针的 Assay 类似。在早期 PCR 循环中，可观察到水平基线。如果样本中存在靶点，则在某个时间点将生成足够的 PCR 产物，使扩增信号变得可见。

SYBR® Green Assay 的特异性

Assay 特异性测试对所有 Assay 都十分重要，尤其是那些容易遇到特异性问题的 Assay。SYBR® Green Assay 不具有 TaqMan® 探针的特异性，因此更容易出现特异性问题。SYBR® Green 染料将与扩增产物、靶点或非靶点结合，所有这些信号经过汇总后可生成一条扩增曲线。SYBR® Green 扩增曲线的形状无法用于特异性评估。不论扩增的是靶点、非靶点还是混合物，曲线外观几乎相同。SYBR® Green Assay 产生的扩增不应被理解为大部分信号源自靶点。

不同样本之间的非靶点扩增有所差别，每个 SYBR® Green 反应都应完成至少一种类型的特异性评估。最常用的评估是解离分析。

SYBR® Green 染料解离

SYBR® Green 解离是采用 SYBR® Green 完成 PCR 反应后，PCR 产物逐渐熔解。解离是一种极佳的特异性评估方法，它无需额外的实验成本，在 PCR 反应容器内即可进行。但解离延长了热循环实验方案，需要额外的分析时间，同时具有一定的主观性，且分辨率有限。

SYBR® Green 解离的概念是，如果靶点是一个确定的基因序列，则应具有一个特定的熔解温度 (T_m)，可用于帮助样本中的靶点鉴别。一些非靶点产物的 T_m 值与靶点相差较大，从而实现了非靶点扩增的检测。

在最后的 PCR 循环完成后，增加解离实验方案。完成熔解过程后，实时荧光定量 PCR 软件将绘制数据的一阶导数的负值，使熔解曲线变为单峰。

靶点峰的准确鉴别取决于纯靶点的扩增。很多样本 (如 RNA 和基因组 DNA) 具有较高的遗传复杂度，有利于非靶点的扩增，同时抑制了靶点扩增，在某些情况下甚至改变了熔解峰的形状。研究人员采用纯的靶点作为起始材料，能够在扩增后将 T_m 峰和形状与特定的靶点相关联。应只观察到单峰。假定靶点峰应窄而对称，无不规则形状，如肩、驼峰或分割。这些不规则的形状说明生成了 T_m 值相当的多个产物，使人对反应的特异性产生怀疑。出现不规则解离的孔应从进一步分析中省去。

SYBR® Green 解离的分辨率较低，且无法区分 T_m 值相当的靶点和非靶点，如同源物。因此窄而对称的单峰不应确定为靶点或者某种产物，需额外的支持信息。

应评估每个可以观察到扩增的孔的解离数据。如果样本中包含的峰无法对应纯的靶点峰，则结论是反应中未检测到靶点。如果样本中包含的峰似乎与 T_m 值及纯靶点峰的形状匹配，则反应中可能有靶点扩增。利用单独的解离曲线无法获得确定的结果，但当其与其它信息相结合 (如阴性靶点样本、序列或凝胶)，则可提高特异性的可信度。

实时荧光定量 PCR 仪

实时荧光定量 PCR 仪有许多不同的模式。每种模式必须有一个用于激发荧光染料的激发光源，及用于检测荧光发射值的检测器。此外，每种模式还必须有一台 PCR 仪。热循环模块可以是固定的 (如 StepOnePlus® 系统)，也可以是用户可更换的 (如 ViiA™ 7 系统、QuantStudio™ 6 和 7 Flex 系统、QuantStudio™ 12K Flex 系统)。有多种模块可供选择，能够容纳各种 PCR 反应容器：48 孔板、96 孔板、384 孔板、384 微孔 Card、3072 通孔反应板等。所有的实时荧光定量 PCR 仪均附带软件，用于数据采集和分析。

染料区分

大多数实时荧光定量 PCR 反应含有多种染料，包括一个或多个报告基团染料，有时包括淬灭剂染料，以及极为常用的参比荧光染料。同一个孔内的多个染料可以单独检测，亦可通过优化的激发光和发射光滤光片组合或者一种称为多组分算法的过程检测。

多组分算法是一种检测反应中每种染料的染料强度的数学方法。多组分算法具有诸多优点，它可轻松校正染料指示错误，无需硬件调整即可将光学性能恢复至出厂标准，并提供了疑难排除信息来源。

1.6 熔解曲线分析

熔解曲线分析和检测系统

熔解曲线分析只适用于扩增片段上保留荧光基团的实时荧光定量 PCR 检测技术。采用 SYBR® Green I 或 SYBR® GreenER™ 染料的扩增可进行熔解曲线分析。双重标记探针检测系统 (如 TaqMan® 探针) 不适用, 因为该系统可在 PCR 过程中剪切并释放荧光基团至溶液中, 产生不可逆的信号变化; 但该方法具有更高的特异性, 因此不会带来严重的影响。

SYBR® Green I 和 SYBR® GreenER™ 染料与 dsDNA 结合后, 荧光水平大幅增加。通过监测 dsDNA 的熔解将会观察到, 随着 DNA 变为单链且染料从 DNA 上解离, 荧光强度逐渐下降。

熔解曲线分析的重要性

实时荧光定量 PCR 分析的特异性取决于使用的引物及反应条件。但即便是设计极佳的引物亦可能形成引物二聚体或扩增出非特异性产物 (图 12)。当包含基因组 DNA 的 RNA 样本进行 qRT-PCR 时, 基因组 DNA 也有可能被扩增。可采用熔解曲线分析确认实时荧光定量 PCR 反应的特异性。当无法进行熔解曲线分析时, 必须更加注意不同反应之间观察到的 C_t 值差异是否有效, 且不是由于存在非特异性产物造成的。

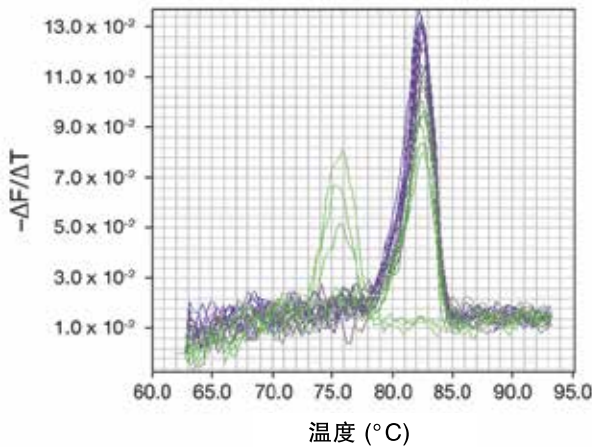


图 12. 熔解曲线分析可用于检测是否存在非特异性产物 (如引物二聚体), 如图所示, 熔解曲线中扩增产物峰的左侧有其它的峰。

熔解曲线分析和引物二聚体

当两个 PCR 引物 (同义引物或正义和反义引物) 相互结合, 而非与靶点结合时, 即形成引物二聚体。引物二聚体的熔解温度较扩增片段更低, 采用熔解曲线分析可鉴别是否存在引物二聚体。包含模板的样本中最好无引物二聚体存在, 因其会降低 PCR 效率并影响分析。无模板对照 (NTC) 中最易形成引物二聚体, 因其中包含大量的引物且无模板存在。NTC 中存在引物二聚体时, 用户应注意包含模板的反应中也可能有引物二聚体存在。如果 NTC 中存在引物二聚体, 则应重新设计引物。对 NTC 的熔解曲线分析, 可以将引物二聚体与由试剂组分中污染的核酸造成的假性扩增区分开来。

如何进行熔解曲线分析

要进行熔解曲线分析, 应对实时荧光定量 PCR 仪进行编程, 在热循环实验方案结束后显示熔解曲线。扩增完成后, 仪器将重新加热您的扩增产物, 为您提供完整的熔解曲线数据 (图 13)。大多数实时荧光定量 PCR 仪平台已将该特性整合至其分析软件包内。

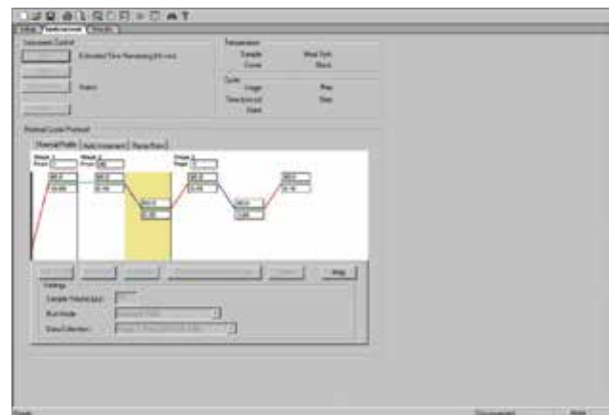


图 13. Applied Biosystems® 仪器上的熔解曲线热学特性设置示例 (快速加热至 94°C, 变性 DNA, 然后冷却至 60°C)。

1.7 参比荧光染料

在实时荧光定量 PCR 中，参比荧光染料常用于报告基因染料荧光信号的标准化，以及非 PCR 相关的荧光波动的校正。需要通过标准化校正反应浓度或体积变化引起的孔间波动，并校正仪器扫描差异。大多数实时荧光定量 PCR 仪采用 ROX™ 染料作为参比荧光染料，这是因为 ROX™ 染料不会对实时荧光定量 PCR 反应产生影响，且可将其荧光信号与其它报告基因或淬灭染料区分开来。其中的例外是 Bio-Rad iCycler iQ® 仪器系统，它采用荧光素作为参比荧光染料。

参比荧光染料

基于 ROX™ 染料的参比荧光染料可用于其兼容的仪器（如 Applied Biosystems® 仪器）上的实时荧光定量 PCR 中荧光报告基因信号的标准化。使用参比荧光染料可高效实现荧光报告基因信号的标准化，且无需修改仪器的默认分析参数。TaqMan® 实时荧光定量 PCR 预混液中含有参比荧光染料，可作为内部参照用于：

- 非 PCR 相关的荧光波动的标准化（例如由加样误差引起的）
- 机器“噪声”引起的荧光波动的标准化
- 仪器激发和检测差异补偿
- 为多重实时荧光定量 PCR 和 qRT-PCR 提供稳定的基线

荧光素参考染料

Bio-Rad iCycler® 仪器需要在每次运行之前采集“孔间差异因子”，补偿仪器或加样的不一致性。采用 SYBR® Green I 或 SYBR® GreenER™ 染料进行的实验，需利用其它荧光基团——荧光素——来计算孔间差异因子。

采用每孔含有荧光素染料的单独的反应板（外部孔间差异因子），或者将荧光素加入实时荧光定量 PCR 预混液中进行反应板内部校正（动力学孔间差异因子），采集孔间差异因子。当您每次采用 iCycler® 仪器开始运行前，必须选择方法。iCycler® iQ™5 和 MyiQ™ 系统可将外部孔间差异因子读数数据保存为单独的文件，供后续读数参考。

1.8 污染预防

与传统 PCR 一样，实时荧光定量 PCR 反应也受到核酸污染，从而导致假阳性结果。可能的污染源有：

- 样本间的交叉污染
- 实验室设备的污染
- 前次 PCR 扩增产物和引物残余污染。这是假阳性 PCR 结果的主要来源

尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (UDG)

尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (UDG) 可通过防止前次反应的 DNA 的扩增，减少或阻止 PCR 反应之间的 DNA 残余污染。在 PCR 反应中使用 UDG 可减少假阳性，从而提高实时荧光定量 PCR 反应的效率和数据的可靠性。

UDG 防止残余污染的原理

UDG 防止残余污染源于在实时荧光定量 PCR 预混液中采用 dUTP 替代 dTTP。然后再用 UDG 处理后续的实时荧光定量 PCR 反应预混液，降解污染的含有尿嘧啶的 PCR 产物，保留天然 (含有胸腺嘧啶) 的靶 DNA 模板。

采用标准 UDG，先在 50°C 下短暂孵育，然后进行 PCR 热循环，使酶能够剪切污染 DNA 中的尿嘧啶残基。去除尿嘧啶碱基可引起 DNA 断裂，防止其在 PCR 中用作模板。UDG 随后在 PCR 中升温至 95°C 灭活。我们还可提供热不稳定性酶，它在 50°C 下即可灭活，适用于一步法 qRT-PCR 反应预混液。

1.9 多重实时荧光定量 PCR

多重反应简介

PCR 多重反应是指在同一个反应中实现两个或更多基因序列的扩增和特异性检测。要获得成功，PCR 多重反应必须能够生成针对目的序列的足够的扩增产物。多重实时荧光定量 PCR 可同时产生定性和定量的结果。对于定量多重 PCR，所有的目的序列的扩增必须能产生足够的几何期即对数期的信号。对于定性结果，如果扩增产物足够，也可利用终点检测方法 (如凝胶电泳) 检测所有目的序列。

实时荧光定量 PCR 多重反应可用于生成定性或定量结果。要完成实时荧光定量 PCR 多重反应，所有目的序列都必须生成足够的几何相信号。

后缀“plex”可用于多个术语。单重 (Singleplex) 反应是一种旨在扩增单个基因序列的分析。双重 (Duplex) 反应是两个 PCR 反应的组合，旨在同时扩增两个基因序列。多重反应最常见的类型是双重反应，它是在同一孔内进行靶基因和对照或标准品基因序列分析；多于两重的更多重的反应也是可实现的。

一些商品化的实时荧光定量 PCR 试剂盒就是作为多重反应进行设计和验证的。例如，MicroSEQ® *E.Coli* 0157:H7 试剂盒采用了内部阳性对照和大肠杆菌靶点多重反应。在研究应用领域，通常由科学家来选择采用哪种多重反应分析，并负责多重反应的验证。在考虑是否建立多重反应分析时，权衡多重反应与所需的验证工作的利弊至关重要。

多重反应的优点

多重反应的三个优点：更高的通量 (每块反应板可分析更多样本)、更低的样本用量和试剂用量——取决于实验中的靶点数。例如，如果定量实验中只包括一个靶点分析，在同一反应中加入标准品分析，如内参，进行双重反应靶点分析将提高 2 倍的通量，同时每个样本减少一半的样本用量和试剂用量。但如果定量实验包括两个靶点分析，可将两个靶点反应与一个标准品反应组合成三重反应。在这种情况下，样本用量和试剂用量将进一步降低。

如果同时进行靶点和标准品多重反应，则多重反应还具有另一个优点——使加样精度错误最小化。同一孔的靶点和标准品数据来源于一次加样，因此任何加样精度错误对靶点和标准品结果具有同等影响。为获得精度优势，必须采用同一孔的标准品数据对靶点数据进行标准化，然后计算技术重复的精度。比较利用单重反应方式分析的数据（未经过基于孔的标准化）与利用多重反应方式完成的分析，证明多重反应的精度优势较大，具体取决于单重反应的错误。例如，对于单重反应精度错误极少的样本，多重反应的精度优势也微乎其微。

对于需要更高精度的定量实验，多重反应的精度优势显得尤为重要。例如，在拷贝数变异实验中，区分 1 拷贝基因与 2 拷贝基因是 2 倍差异，需要良好的精度。但区分 2 拷贝基因与 3 拷贝基因仅为 1.5 的差异，这需要更高的精度。对于此类型的实验，推荐采用多重反应方法，其有助于达到该实验所需的精度。

多重反应仪器

多重反应分析通常需要在同一孔内加入多种染料。实时荧光定量 PCR 仪必须能够准确地检测同一孔内的不同染料信号。这些测量必须保持针对各染料的特异性，即便当一种染料信号明显高于其它信号时。

多重反应试剂推荐

实时荧光定量 PCR 多重反应的最佳荧光试剂是那些可以指定不同染料来检测多重反应中的各个基因序列的试剂。绝大多数多重分析采用了多种染料、高特异性的试剂，如基于 TaqMan® 探针的 Assay。

对于 RNA 多重反应分析，我们一般推荐两步法 RT-PCR，而非一步法 RT-PCR。一步法 RT-PCR 要求逆转录和 PCR 的引物浓度相同，降低了多重反应引物浓度的灵活性。而在两步法 RT-PCR 中，可对 PCR 引物浓度进行多重反应优化，且不会影响逆转录。

多重反应的染料选择

假定采用的是多染料实时荧光定量 PCR 荧光试剂，则多重反应中各种基因序列的检测将需要不同的报告基因染料。同一孔内的报告基因染料必须被实时荧光定量 PCR

仪充分激发并准确检测。仪器生产商应能够提供推荐染料。请注意，Applied Biosystems® 实时荧光定量 PCR 预混液中包含一种红色的参比荧光染料。仅带有蓝色激发光的仪器可充分激发基于 ROX™ 染料的参比荧光染料，但蓝色激发光一般不足以激发用作报告基团的红色染料。

无需根据靶基因或基因产物的类型指定报告基因染料，但遵循染料的指定模式可简化多重分析的构建。例如，FAM™ 染料是 TaqMan® 探针中最常用的报告基因染料。我们遵循其模式指定 FAM™ 染料作为靶点分析的报告基因染料，并指定 VIC® 染料作为标准品分析的报告基因染料。采用此模式，可通过将不同的 FAM™ 染料标记的靶点分析与相同的标准品分析 VIC® 染料进行配对，构建多个双链分析。进行三重分析时，可将第三种染料 ABY® 或 JUN® 染料与 FAM™ 染料和 VIC® 染料相结合。请注意，如使用 ABY® 染料，则在同一孔内不应有 TAMRA™ 染料存在，如果使用 JUN® 染料，MUSTANG PURPLE® 应该作为参考标准取代 ROX™ 染料。

多重反应 PCR 饱和

多重反应 PCR 饱和是当丰度更高的基因扩增使热稳定性 DNA 聚合酶饱和时，多重分析中可能出现的不良现象，它抑制了较低丰度基因的扩增。饱和的补救措施是减少丰度更高的靶点的 PCR 引物的浓度，称为“引物限制”。引物限制的浓度应足够实现几何扩增，但需在 PCR 产物聚集到遏制较低丰度靶点扩增之前使引物耗竭。

计划多重分析时，研究人员应根据 PCR 反应中各基因和基因产物的 DNA 或 cDNA 绝对丰度，识别多重反应中哪种基因或哪些基因有可能引起饱和。为此我们列出了三种最常见的双链情景。

双重反应情景 1

在这个最常见的情景中，所有样本中丰度更高的基因或基因产物均相同。仅丰度更高的靶点分析需要引物限制。例如，标准品可能是 18S 核糖体 RNA，其占真核细胞总 RNA 的 20%。每个样本中 18S rRNA cDNA 的丰度高于任意 mRNA cDNA。因此仅 18S 分析需要引物限制。

双重反应情景 2

在本情景中，两个基因在所有样本中的丰度几乎相同。一般而言，两种基因的 C_t 差异为 3 或者更高，假定阈值相同，则认为两个基因的丰度不同。基因组 DNA 应用领域 (如拷贝数差异) 最可能出现此情景。情景 2 无需引物限制，因为两种基因几乎同时经历几何扩增期。

双重反应情景 3

在本情景中，基因或基因产物的丰度明显高于其它。此时，两种分析均应为引物限制。

多重反应引物相互作用

影响多重分析性能的另一个潜在威胁是不同分析的引物间不必要的相互作用。引物相互作用的风险会随反应中分析数目的增加而提高，因为随着多重反应分析数的增加，出现的引物对的数目会随之大幅增加。例如，在包含 4 个 PCR 引物的双重反应分析中，可能有 6 种不同的 PCR 引物对，在包含 6 个 PCR 引物的三重分析中，则可能有 15 种不同的 PCR 引物对。在单重反应中，每个分析可能都运行得很好，但在多重反应中，引物的相互作用可形成竞争产物，抑制扩增的进行。当多重反应分析具有同源性时，引物相互作用的几率会提高。如果基于单重反应与多重反应的 C_t 值存在明显差异的观察得出存在引物的相互作用的现象，则补救措施是对之前的多重反应的实验采用不同的 Assay 进行。

1.10 内部质控品和参考基因

实时荧光定量 PCR 已成为一种可选的基因表达分析方法。要利用实时荧光定量 PCR 获得所选基因的准确且可重复的表达图谱分析，使用可靠的内部对照基因产品对不同实验的表达水平进行标准化至关重要——通常采用看家基因的表达产物。被选为内部标准品 (或内源性对照) 的靶点的表达水平应与实验基因产物大致相当。使用内源性对照作为主动参考，可在 mRNA 靶点定量时对每个反应中加入的总 RNA 量差异进行标准化。无论选择哪个基因作为内源性对照，都必须在各种实验条件下对其进行测试，以确保对照基因在所有条件下均能稳定表达。

采用看家基因进行相对基因表达分析

当所选的看家基因的表达水平保持恒定时，可达到最佳的相对基因表达比较效果。BioTechniques 29:332 (2000) 和 J Mol Endocrinol 25:169 (2000) 上的几篇文章论述了看家参考基因的选择。理论上，所选的看家基因的表达水平应经过各种靶细胞或组织类型验证，以确认其在实验过程中保持恒定。例如，在增殖细胞中 GAPDH 会出现表达上调，18S 核糖体 RNA (rRNA) 无法代表全部细胞 mRNA 群。

1.11 实时荧光定量 PCR 仪校准

准确的校准是实时荧光定量 PCR 仪达到最佳性能的关键。它可长时间保护数据的完整性和一致性。实时荧光定量 PCR 仪应定期校准，在第一次使用新染料之前，亦须遵循生产商的说明进行校准。

激发/发射光差异校正

实时荧光定量 PCR 仪的光学元件可分为两大类：激发光源 (如卤素灯或 LED) 和发射光检测器 (如 CCD 或光电二极管)。尽管生产商可在模块的各孔内实现极佳的激发光强度和发射光灵敏度一致性，但仍始终有些差异存在。这种差异会随仪器年限和使用的增加而增加。反应板内未校正的激发/发射光差异可引起 C_t 值改变。但如果反应中存在参比荧光染料，则上述差异对报告基因和参比荧光信号的影响程度相同，因此报告基因的参比荧光标准化可校正其差异。

一般光学波动

在传统的塑料 PCR 反应板和管内，液体试剂处于孔底，空气在液体的上方，孔上采用了塑料密封。该配置可出现多种与温度有关的现象。

在循环过程中，温度可达到 95°C。在这么高的温度下，水可挥发至孔内的气体空间内。该水蒸气或水流将在冷的管壁上冷凝，形成水滴后滴入底部的试剂中。整个过程称为“回流”，在 PCR 过程中连续进行。

其次，在高温下，液体试剂内溶解的气体的溶解性下降，产生小气泡。

第三，水流的压力将给塑料密封施加作用力，使 PCR 过程中密封形状出现轻微改变。

上述所有温度相关的现象都在激发和发射光的光径上，可引起荧光信号波动。这些波动的程度各异，具体取决于多个因素，如试剂中溶解的空气量及反应板的密封程度。一般波动通常不会使报告基因信号产生明显的失真，但它们可影响重复样本的精度。如有波动存在，参比荧光染料与报告基因的光径相同，报告基因的参比荧光信号标准化可校正上述波动。

精度提升

参比荧光染料标准化的校正作用将提升实时荧光定量 PCR 数据的精度。提升度各不相同，取决于各种因素，如试剂和反应板的制备方法。

异常光学波动

异常光学波动是所有运行反应中不普遍存在的热学相关的异常，可使报告基因信号产生明显失真。异常光学波动的示例之一是反应板密封配置的重要变化，被称为“光学扭曲”。当反应孔密封不当时可出现光学扭曲，随后，在 PCR 过程中，加热的盖子的热量和压力可使密封合适。另一个示例是 PCR 过程中大气泡的破裂。

扩增曲线中的变形可能引起基线问题，甚至可影响 C_t 值。参比荧光染料标准化提供了极佳的光学扭曲校正，可完全消除校正后的标准曲线中的异常。标准化不能完全校正大气泡破裂，但有助于使数据失真最小化。

实验设计

2



2.1	引言	22
2.2	实时荧光定量 PCR Assay 类型	22
2.3	扩增片段和引物设计的考虑因素	23
2.4	核酸纯化和定量	26
2.5	逆转录的考虑因素	28
2.6	对照品	30
2.7	标准化方法	30
2.8	采用标准曲线评估效率、灵敏度和可重复性	32

2.1 引言

成功的实时荧光定量 PCR Assay 设计和开发是获取准确数据的基础。前期规划将有助于管理在此过程中出现的实验差异。

在着手实验设计前，应清晰地了解 Assay 的目标，尤其是需要回答哪些生物学问题。例如，旨在确定特定疾病状态下某个基因的相对表达水平的实验与旨在确定该疾病状态下病毒拷贝数的实验具有很大的差异。在确定实验目标后，识别适当的实时荧光定量 PCR 对照和进行实验优化

的可能性。本部分将介绍实时荧光定量 PCR Assay 设计和执行的各个阶段。我们将从下面几个方面鉴别差异的来源、其在数据准确性方面的作用以及优化指导原则：

- 靶向扩增片段和引物设计
- 核酸纯化
- 逆转录
- 质控品和标准化
- 效率、灵敏度和可重复性标准曲线评估

2.2 实时荧光定量 PCR Assay 类型

基因表达谱分析是实时荧光定量 PCR 的常见应用之一，其通过评估转录本的相对丰度，确定不同样本的基因表达图谱。RNA 质量、逆转录效率、实时荧光定量 PCR 效率、定量方法及标准品基因的选择在基因表达实验中发挥了尤为重要的作用。

病毒滴度测定 Assay 的设计较为复杂。研究人员通常想要定量样本中的病毒拷贝数。一般采用已知基因组等效物或从已滴定的病毒对照品中采集的核酸生成标准曲线，通过与标准曲线进行比较实现滴度测定。实验成功与否取决于生成标准曲线所用的材料的准确度。根据靶点的性质——RNA 或 DNA 病毒——逆转录和实时荧光定量 PCR 的效率亦具有重要的作用。病毒是否为功能性病毒或该研究是否对总病毒颗粒进行分析，都将影响到 Assay 设计。

在拷贝数变异分析中，基因组进行重复或缺失分析。Assay 设计，特别是标准曲线的生成将取决于要求相对还是绝对定量。Assay 设计主要关注区分单拷贝差异需要的实时荧光定量 PCR 效率和准确度。

最后，**等位基因分型 Assay** 可以检测低至单核苷酸水平的差异。与上述方法不同，它需要检测终点荧光，确定 SNP 基因型。引物和探针设计是确保等位基因特异的交叉反应性低发生率的关键。

2.3 扩增片段和引物设计的考虑因素

靶向扩增片段大小、GC 含量、位置和特异性

反应效率对实时荧光定量 PCR 数据的准确度极为重要，本指南将在后面的部分对此进行更详细的介绍。在理想状态下，每个循环后，PCR 反应中的每个靶点拷贝将被复制，全长靶分子数目倍增：这对应 100% 扩增效率。随着热循环过程的进行，效率的差异将被放大。因此，100% 效率的任何偏差均可导致潜在的错误数据。

使效率偏差最小化的一种方法是扩增相对较短的靶点。在特定的循环中扩增 100 bp 的区域相比扩增 1,200 bp 的靶点，更有可能实现完整合成。因此，实时荧光定量 PCR 靶点的长度一般为 60-200 bp。此外，较短的扩增片段受靶点-模板完整性差异的影响更小。如果核酸样本出现轻微降解，而靶序列较长，则上游和下游引物在同样的 DNA 片段中寻找其互补序列的难度将更大。

扩增片段的 GC 含量和二级结构是引起数据不准确的一个因素。如果二级结构阻碍了 DNA 聚合酶的路径，则每次循环更有可能出现不完美的靶点扩增。理论上，设计的引物应与中等 (50%) GC 含量且无明显 GC 延伸段的区域退火结合并扩增。对于 cDNA 扩增，最好使扩增片段位于转录本的 3' 端附近。如果 RNA 二级结构阻止了某些转录本的全长 cDNA 合成，则这些扩增片段受影响的可能性更小 (图 14)。

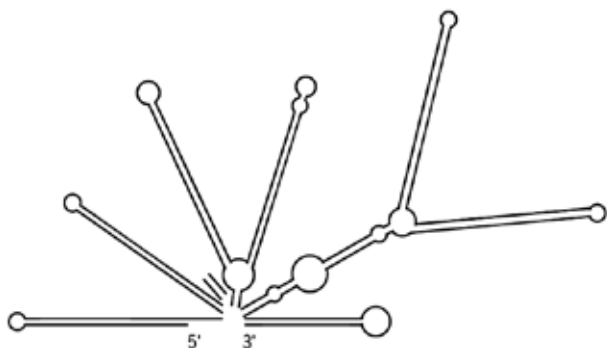


图 14. 具有高度二级结构的 RNA 分子。

靶点特异性是影响数据准确度的另一个重要因素。设计实时荧光定量 PCR 引物时，应检查引物以确保其结合位点是基因组中独一无二的。这降低了引物扩增样本基因组中的其它类似序列的几率。引物设计软件程序自动去除位于起始基因组和掩蔽同源区域的靶序列，避免了这些位点的引物设计。

基因组 DNA、假基因和等位基因变异体

在检测基因表达水平时，需要关注 RNA 样本中的基因组 DNA 残留。gDNA 可与目的靶点转录本共扩增，从而产生无效数据。通过设置不含有逆转录酶的对照反应 (RT 质控品) 检测基因组 DNA 污染；如果 RT 质控品的 C_t 值高于稀释度最高的靶点生成的 C_t 值，则表示无 gDNA 信号生成。但由于 gDNA 可竞争反应组分 (如 dNTP 和引物)，因此会影响反应的效率。

实时荧光定量 PCR 中避免 gDNA 干扰的最佳方法是利用 gDNA 中存在而 mRNA 中不存在的内含子，进行周到的引物 (或引物/探针) 设计。设计 TaqMan® Gene Expression Assay 时应尽可能使 TaqMan® 探针覆盖相邻两个外显子交界处。设计用于基于 SYBR® Green 染料检测的引物组时，应使引物与相邻外显子序列退火结合，或者使其中一个引物覆盖相邻两个外显子交界处。当上游和下游 PCR 引物与同一个外显子退火结合时，则它们既可以扩增 DNA 靶点，也可以扩增 RNA 靶点。相反，当引物与相邻外显子序列退火结合时，大多数情况下仅可以扩增 cDNA，这是由于 gDNA 扩增片段包括内含子序列，从而导致扩增片段过长，无法在实时荧光定量 PCR 条件下实现高效扩增。

假基因或沉默基因是设计引物时也需要考虑的转录本变异体。它们是现有基因的衍生物，由于启动子或基因本身的突变和/或重排导致了功能丧失。引物设计软件程序可进行 BLAST 搜索，避免出现假基因及其 mRNA 产物。

等位基因变异体是一个基因的两种或多种独特的形式，它们具有相同的染色体位点。源自上述变异体的转录本相差一个或多个突变。设计引物时应考虑等位基因变异体，具

实验设计

体取决于研究的是一个还是多个变异体。此外，变异体之间的 GC 含量差异可改变扩增效率，并在熔解曲线上生成单独的峰，易被错误地诊断为脱靶扩增。设计引物时还应考虑可变剪接的变异体。

引物和探针的特异性、二聚体形成和自折叠

引物二聚体形成的最常见原因是正向和反向引物的相互作用，但也可能是由于正向引物与正向引物或反向引物与反向引物之间的退火或者单个引物自身的折叠引起的。在更复杂的反应（如多重实时荧光定量 PCR）中，引物二聚体更值得关注。如果以交错排列的方式形成二聚体（通常是这种情况），则可出现一定的延伸，形成大小接近目的扩增片段的产物，且丰度随着循环的进行而增高。一般而言，PCR 反应的起始靶点量越少，形成引物二聚体的可能性越大。上述潜在问题的积极方面在于，引物二聚体之间的相互作用弱于目的引物与模板之间的相互作用，此外，有很多方法可以最大程度地减少或消除此现象。

引物二聚体的主要问题在于它们可引起假阳性结果，特别是使用 DNA 结合染料（如 SYBR[®] Green I 染料）的反应。另一个问题是它会导致与反应组分的竞争作用，使反应效率超出 90-110% 的理想范围。最后一个主要问题也与效率有关，是反应的动态范围可能缩小，从而影响反应的灵敏度。即便信号并非来自引物二聚体本身（如 TaqMan[®] Assay），反应的效率和动态范围仍将受到影响。

有几款免费的软件程序可分析您的实时荧光定量 PCR 引物设计，并确定它们是否容易形成二聚体或自折叠。AutoDimer 程序（由美国国家标准与技术研究院的 P.M. Vallone 编制）是一款可同时分析各种引物的生物信息学工具（图 15）。这尤其适用于多重反应领域。但虽然引物序列的生物信息学分析会大大降低二聚体形成的风险，但仍需要通过实验对二聚体形成进行监测。

传统的引物二聚体筛查方法是凝胶电泳，二聚体会在凝胶的底部形成扩散的模糊条带（图 16）。凝胶验证的问题之一是它的灵敏度不高，因此可能无法得出结果。但凝胶分析

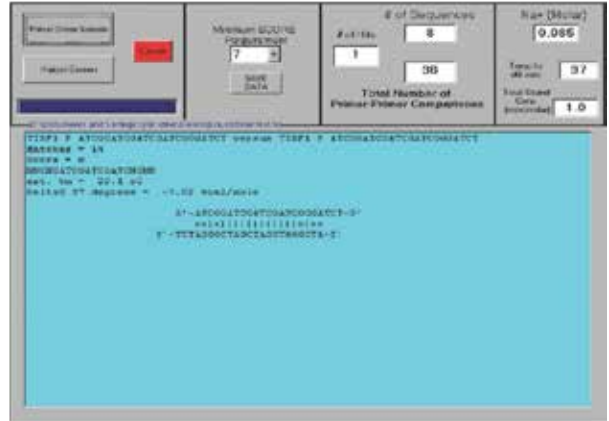


图 15. AutoDimer 软件屏幕截图。该软件可用于分析引物序列并报告引物内可能的二级结构区域（可导致引物自折叠）或可使引物相互退火结合的延伸段序列。

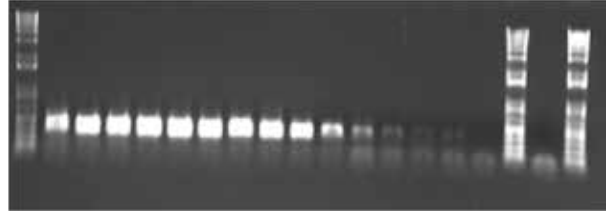


图 16. 通过琼脂糖凝胶分析研究引物二聚体的形成。在热循环反应前，将核酸样本连续梯度稀释后加入 PCR 混合物中，然后从每种混合物中取相同体积上样，进行琼脂糖凝胶电泳。引物二聚体在凝胶的底部形成扩散条带。

适用于验证从熔解/解离曲线获取的数据，这是检测引物二聚体的最佳方法。

采用 DNA 结合染料进行检测的实时荧光定量 PCR 运行结束后，应生成熔解或解离曲线。简言之，仪器从低温状态开始升温，低温下 DNA 呈双链且荧光强度较高，达到高

温时，DNA 开始变性，荧光强度开始下降。在 PCR 过程中生成的各产物的 T_m 值处将观察到荧光出现明显下降。比较无模板对照 (NTC) 的熔解曲线峰与靶点峰，确定反应中是否存在引物二聚体。

理论上，包含模板的每个反应应观察到一个单峰，而 NTC 中应无荧光峰存在。在较低熔解温度下出现的比目的扩增片段更小、更宽的峰，且同时出现在 NTC 反应中的，通常是二聚体。同样，产物凝胶电泳常用于验证熔解峰对应的产物的大小。

有些情况下，引物二聚体存在并不会影响实时荧光定量 PCR 分析的总体准确度。一个常见的现象是引物二聚体存在于无模板对照中，但在包含模板 DNA 的反应中没有。这并不奇怪，因为在模板不存在时，引物更有可能相互作用。当有模板存在时，不利于引物二聚体形成。只要在 NTC 中观察到的峰未出现在模板解离曲线上，引物二聚体就没有问题。

引物二聚体是一大类非特异性 PCR 产物中的一部分，包括当引物与不理想位点不完美匹配后退火结合形成的扩增片段。非特异性产物扩增值值得关注是因为它们可发出荧光，人为地改变反应的 C_t 值。它们可以通过竞争反应组分影响反应效率，降低动态范围和数据准确度。在绝对定量分析中，需要报告精确的拷贝数，因此非特异性产物更值得关注。

标准凝胶电泳通常是实时荧光定量 PCR 特异性分析的第一步。它可以鉴别与您的靶点扩增片段大小不同的产物，但其条带会掩盖大小相似的扩增片段，且灵敏度有限。鉴

于熔解曲线分析的准确度和灵敏度，它是确认凝胶电泳引物特异性评估的最值得信赖的方法。

尽管非特异性扩增应始终尽量避免，但在某些情况下，这些二级产物的存在并不会引起严重的问题。例如，如果以 GC 含量不同的异构体或多个等位基因为靶点，则预计会出现多个产物。

引物设计的考虑因素

设计实时荧光定量 PCR 引物时有下列推荐：Primer Express[®]，OligoPerfect[™] Designer 和 Vector NTI[®] 软件。请注意，引物设计软件程序，如我们的在线 OligoPerfect[™] 设计程序和 Vector NTI[®] 软件序列分析软件，可与我们的在线订购系统无缝连接，因此您无需复制粘贴序列。这些程序可自动设计针对特定基因或靶序列的引物，其算法采用了下列指导原则，此外还可以进行已知序列同源物的全基因组 BLAST 搜索。

- 设计引物的长度一般为 18–28 个核苷酸
- 避免重复核苷酸延伸段
- 目标为 50% GC 含量，有助于防止错配稳定化
- 选择 T_m 值匹配的引物 (在 5°C 范围内)
- 避免一个分析中采用的所有引物之间以及各引物内部出现序列互补

2.4 核酸纯化和定量

实时荧光定量 PCR 核酸纯化方法

在进行核酸纯化之前，必须考虑原材料（细胞或组织）及可能的技术限制。DNA 和 RNA 提取技术在易用性、是否需要有机溶剂及因残余 DNA（在 RNA 提取中）、蛋白质和有机溶剂导致的核酸纯度方面差异较大。

本部分将重点讨论 RNA 提取，但其中大部分指导原则亦适用于 DNA 提取。

一步法有机试剂萃取是一种极为有效的从各种细胞和组织类型中纯化 RNA 的方法。许多实验方案采用酚和异硫氰酸胍混合物破坏细胞，溶解细胞组分，同时保护核酸不被 RNA 酶降解，维持核酸的完整性。异硫氰酸胍是一种高离液盐，可防止 RNA 被内源性的 RNA 酶降解 [Biochemistry 18:5294 (1979)]。一般随后加入氯仿，通过离心将混合物分为水相和有机相。在异硫氰酸胍存在的情况下，RNA 只保留在水相中，而 DNA 和蛋白质存在于有机相和相界面中。然后采用异丙醇沉淀，从水相中提取出 RNA。

此过程相对较快，可以获得高水平的 RNA，但需要使用有毒的化学试剂，且 DNA 残留量较采用其它技术更高。残留的胍、酚或乙醇还会大大降低 cDNA 合成的效率。

大多数基于硅胶磁珠或过滤器的方法是在存在异硫氰酸胍的溶液中裂解样本并匀浆化。匀浆化后，在样本中加入乙醇，RNA 与硅胶磁珠或过滤器结合，通过冲洗有效去除杂质，Proc Natl Acad Sci USA 76:615 (1979)。用水洗脱纯化的总 RNA。

与有机萃取法相比，该方法更省时，且无需使用酚。RNA 产量不高，但纯度（蛋白质、多糖、DNA 和纯化试剂）更好。仍会出现因冲洗不充分导致的胍和乙醇残留，且同样会对 cDNA 合成的效率产生负面影响。

最后，将有机裂解与硅胶柱相结合的方法可提供良好的样本裂解，以及硅胶结合法所具有的简便、速度和纯度优势。

评估 RNA 的品质

在评估 RNA 品质和数量时，应注意几个关键点。确保 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 和 2.0 之间。比值低于 1.8 表示存在蛋白质污染，会降低反应效率。 A_{260}/A_{280} 比值有助于评估包含苯环的组分的残留，如离液盐异硫氰酸胍和酚，它们会抑制酶反应。在变性凝胶或诸如 Agilent Bioanalyzer 等仪器上评估 RNA 的完整性 (图 17)。

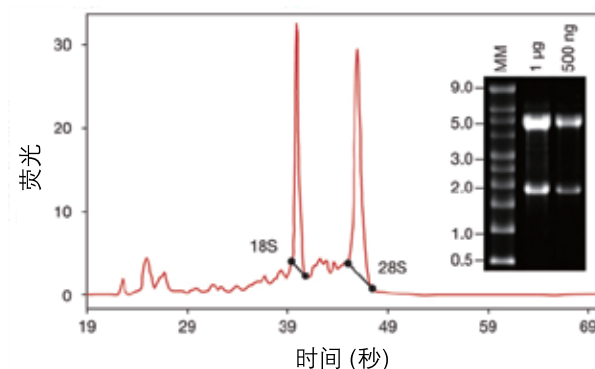


图 17. Agilent Bioanalyzer 示踪和凝胶成像显示 RNA 的完整性。完整的哺乳动物总 RNA 显示了两个条带或峰，分别代表 18S 和 28S rRNA。一般而言，28S rRNA 的亮度 [或 Bioanalyzer 示踪中峰的面积] 是 18S rRNA 的两倍。

Agilent Bioanalyzer® 系统只需一步即可测定 RNA 品质，并分配 RIN (RNA 完整值) 值。利用全部示踪 (包括降解产物) 计算 RIN 值，其效果优于仅评估 rRNA 峰。

研究人员随后可以比较不同组织类型 RNA 的 RIN 值，评估质量标准化和一致性维护。

定量准确度

在 RNA 定量领域，荧光染料（如 RiboGreen® 和 PicoGreen® 染料）具有更高的灵敏度、准确度和高通量性能，效果优于紫外吸光度测量法。紫外吸光度测量无法区分核酸和游离核苷酸。事实上，游离核苷酸在 260 nm 的吸光度高于核酸。紫外吸光度测量同样无法区分同一样本中的 RNA 和 DNA。此外，纯化核酸样本中常见的污染物会影响紫外吸光度读数。最后，大多数紫外吸收光酶标仪在测量过程中需要消耗大量的样本。可供选择的荧光染料种类很多，我们可以找出能克服上述所有限制的试剂：能够区分核酸和游离核苷酸的染料，能够区分同一样本中的 RNA 和 DNA 的染料，以及对常见样本污染物不敏感的染料。Qubit® 定量平台利用 Quant-iT™ 荧光技术，采用先进的荧光基团，一旦与 DNA、RNA 或蛋白质结合即可发出荧光。该特异性意味着您可以获得比紫外吸光读数更准确的结果，因为 Quant-iT™ 分析试剂盒只报告靶分子的浓度（而非污染物）。一般而言，采用荧光染料的定量方法极为灵敏且只需少量样本。

表达研究中的基因组 DNA 残留

我们在前面介绍了引物设计是避免实时荧光定量 RT-PCR 反应中的 DNA 扩增的第一步。在 RNA 提取阶段采用 DNA 酶处理样本，可从源头控制 DNA。除传统的 DNA 酶 I 外，Life Technologies 还可提供超高活性的 TURBO™ DNA 酶，其催化活性优于野生型 DNA 酶 I。它甚至可以去除少量的 DNA，避免其影响 RT-PCR。DNA 酶处理可以在溶液或分离柱内完成，具体取决于分离方法。柱上 DNA 酶处理常用于硅胶基质萃取，与溶液内处理不同，它在 EDTA 存在的条件下无需热灭活，因为盐本身可以去除酶。其缺点在于柱上反应需要更多的酶。溶液内 DNA 酶反应通常需要在 65°C 下对 DNA 酶进行热灭活。反应所需的游离镁在此温度下可引起镁依赖的 RNA 水解。DNA-free™ 和 TURBO DNA-free™ 试剂盒采用了新型 DNA 酶灭活试剂，有助于避免上述问题。灭活试剂不仅可以去除反应中的 DNA 酶，还可以结合并去除反应缓冲液中的二价阳离子。这还减少了将二价阳离子引入 RT-PCR 反应的问题，二价阳离子会影响反应的效率。

2.5 逆转录的考虑因素

逆转录酶

qRT-PCR 中使用的大多数逆转录酶来源于禽成髓细胞瘤病毒 (AMV) 或莫洛尼鼠白血病病毒 (M-MLV)。天然 AMV 逆转录酶的热稳定性一般优于 M-MLV, 但产量较低。但是, 对这些天然的酶进行适当的处理, 可生成适用于 qRT-PCR 的变异体。理想的逆转录酶具有下列特性:

- **热稳定性**——如前所述, 二级结构对反应灵敏度的影响较大。天然 RT 在理想工作温度为 42°C 至 50°C, 而热稳定性 RT 在该温度范围的上限 (或者更高) 方可发挥作用, 实现 GC 富集区域的逆转录
- **降低的 RNA 酶 H 活性**——常见的天然逆转录酶中存在 RNA 酶 H 结构域, 它在体内可剪切 RNA-DNA 杂交双链的 RNA 链, 供复制的下一阶段使用。在 qRT-PCR 应用领域, RNA 酶 H 活性可大幅降低全长 cDNA 的产量和比例, 从而降低了反应的灵敏度。现推出的几种 RT (尤其是 SuperScript® II 和 III) 具有较低的 RNA 酶 H 活性。

一步法和两步法 qRT-PCR

可从便捷性、灵敏度和 Assay 设计几个方面选择一步法和两步法 qRT-PCR。必须根据各个实验评估各种技术的优点和缺点。

在一步法反应中, 逆转录过程中同时存在逆转录酶和热稳定性 DNA 聚合酶, RT 在高温 DNA 聚合酶活化阶段被灭活 (所谓的热启动)。正常情况下, 适合 RT 的缓冲液不适用于 DNA 聚合酶。因此, 一步法缓冲液是一种折中的溶液, 为两种酶提供了可以接受但并非最佳的功能。虽然其功能性稍差, 但采用这种单管操作, 在 PCR 阶段可以对生成的所有 cDNA 进行扩增。

一步法 qRT-PCR 的优点包括:

- **防止污染**——闭管系统可防止在 RT 和 PCR 阶段引入污染物
- **便捷**——移液步骤减少, 最大程度缩短操作时间
- **高通量样本筛选**——理由如上
- **灵敏度**——由于生成的所有第一链 cDNA 均被用于实时荧光定量 PCR 扩增, 因此一步法反应的灵敏度高于一部法反应

一步法 qRT-PCR 的缺点包括:

- **形成引物二聚体的风险更高**——一步法反应中存在的正向和反向基因特异性引物, 极易在 42–50°C 逆转录条件下形成二聚体。对于采用 DNA 结合染料进行检测的反应, 这个问题尤为严重
- **cDNA 不适用于其它实时荧光定量 PCR 反应**——一步法反应采用了 RT 步骤的所有 cDNA, 因此如果反应失败, 则样本丢失

在两步法 qRT-PCR 中, 逆转录的缓冲液已针对逆转录酶进行优化。逆转录完成后, 约 10% 的 cDNA 被转移至各个实时荧光定量 PCR 反应中, 且采用了最佳的缓冲液。

两步法 qRT-PCR 的优点包括:

- **cDNA 可以保存并用于其它实时荧光定量 PCR 反应**——两步法 qRT-PCR 生成了足量的 cDNA, 可用于多个实时荧光定量 PCR 反应, 适用于珍贵或有限的样本
- **灵敏度**——由于两步法反应的 RT 和实时荧光定量 PCR 反应分别采用了优化的缓冲液, 因此其灵敏度优于一部法
- **多靶点**——根据使用的 RT 引物, 您可以从单个 RNA 样本中筛查多个靶点

两步法 qRT-PCR 的缺点包括:

- **RT 酶和缓冲液可抑制实时荧光定量 PCR**——由于 RT 及相关的缓冲液如果稀释不当, 可抑制 DNA 聚合酶, 因此一般仅 10% 的 cDNA 合成反应被用于实时荧光定量 PCR。特定的抑制水平取决于 RT、靶点的相对丰度和扩增反应的可靠性。
- **便捷性较差**——两步法反应需要更多操作, 不适用于高通量应用
- **污染风险**——由于每步使用单独的试管, 因此增加了污染的风险

RNA 引物设计策略

逆转录是 qRT-PCR 反应中最可变的的部分。第一链合成反应可使用基因型、oligo(dT) 或随机引物 (图 18), 引物选择对于 RT 效率和一致性的影响较大, 进而影响数据的准确度。

随机引物可用于生成大量的 cDNA, 因此可提供最高的实时荧光定量 PCR 灵敏度。它们还适用于非多聚腺苷酸化 RNA, 如细菌 RNA。由于它们可与整个靶分子退火结合, 因此降解的转录本和二级结构不会引起与基因特异性引物和 oligo(dT) 引物同样严重的问题。

尽管产量提高是随机引物的一个优点, 但数据显示它会高估拷贝数。采用随机和 oligo(dT) 引物的结合物可结合它们在 RT 反应中的优点, 提高数据质量。随机引物仅适用于两步法 qRT-PCR 反应。

Oligo(dT) 引物具有 mRNA 特异性, 且当其用于引物反应时, 可对同一 cDNA 库的许多不同靶点进行分析, 因此是两步法反应的理想选择。但是, 由于它们始终从转录本的 3' 端开始逆转录, 复杂的二级结构可导致不完整 cDNA 的生成。片段化 RNA 的 oligo(dT) 引发, 如从福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样本中分离的 RNA 也有问题。不过, 只要实时荧光定量 PCR 引物的设计靠近靶点的 3' 端, 在此位点下游提前终止将不会引起严重的问题。

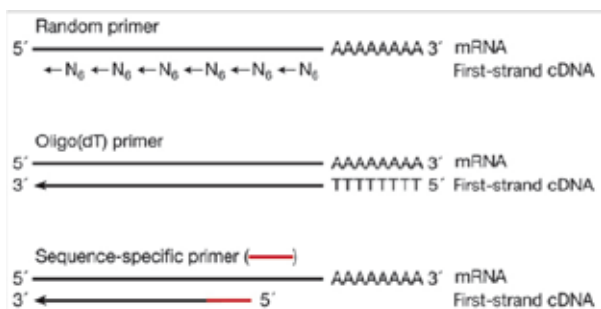


图 18. 常用的 RNA 引发策略图示。

有多种类型的 oligo(dT) 可供选择。Oligo(dT) 20 是 20-mer 胸苷的均匀混合物, oligo(dT) 12-18 是 12-mer 至 18-mer 胸苷的混合物。锚定 oligo(dT) 引物在 3' UTR/poly(A) 交界处退火结合, 可避免 poly(A) 滑移。最佳 oligo(dT) 的选择在一定程度上取决于反应温度。热稳定性更高的 RT 采用较长引物的反应效果更佳, 与较短的引物相比, 它们在高温下可维持更紧密的退火结合。如果 18S rRNA 用于标准化, 则不推荐 oligo(dT) 引物。

序列特异性引物可提供最高的特异性, 是最稳定的 RT 引物方案。但它们不具备 oligo(dT) 和随机引物的灵活性, 仅能生成 1 个 cDNA 拷贝的靶基因产物。正因如此, 基因特异性引物一般不是稀有或珍贵样本研究的最佳选择。一步法 qRT-PCR 反应均采用基因特异性引物进行第一链合成, 其它引物方案适用于两步法反应。

每种引物类型理论上都具有独特的优点和缺点。此外, 单个靶点对不同引物的反应各异。理论上, 应在初始 Assay 验证阶段对各种引物选项进行评估, 以确定哪种引物可提供最佳的灵敏度和准确度。

影响逆转录效率的因素

qRT-PCR 反应的 RT 阶段的稳定性低于 PCR 阶段。这是与起始样本有关的多种因素造成的, 一般未经过热稳定性 DNA 聚合酶测试。这些因素包括:

RNA 完整性差异: 特定 RNA 样本的降解程度直接影响了转换为 cDNA 后定量的 mRNA 靶点的百分比。根据使用的第一链引物的不同, 降解阻止了 RT 形成可与全长靶点扩增片段反应的 cDNA。RT 效率越低, PCR 分析的灵敏度越低。未经过标准化的效率差异可导致不准确的结论。

实验设计

GC 含量、RNA 样本复杂性和采用的 RT 酶：如果 RT 对样本之间不可避免的差异的敏感度较低，则 RNA 表达水平比较更准确。例如，数据显示所有背景核酸与 RT 引物不相容，可使反应效率产生高达 10 倍的差异。最好使用能在此背景下实现稳定的 cDNA 合成的 RT。

有机溶剂和离液盐残留：乙醇和胍是 RNA 捕获所必需的，但会抑制酶反应。RNA 样本间上述污染物的含量差异可影响样本的比较。因此，使用上述副产物含量相对较低的 RNA 提取方法至关重要。我们还建议在实时荧光定量 PCR 反应中使用验证的标准品基因。

2.6 对照品

实时荧光定量 PCR 反应的对照品可证明从实验样本中获取的信号可表示目的扩增片段，从而验证了反应的特异性。所有实验应包括无模板对照 (NTC)，qRT-PCR 反应还应包括无逆转录酶 (no-RT 对照)。

NTC 对照品应包含除 DNA 或 cDNA 样本外的所有反应组分。这些孔内检测到的扩增是由于引物二聚体或 PCR 反

应产物的污染。这种污染类型可使测得的表达水平高于实际值。

No-RT 反应应包含除逆转录酶外的所有反应组分。如果在 no-RT 对照品反应中可观察到扩增产物，则表示 DNA 而非 cDNA 被扩增。这也可以人为夸大实验样本的表达水平。

2.7 标准化方法

在本指南的开头，我们指出消除实验不一致性对于实时荧光定量 PCR 实验设计极为重要。偏离实验计划会限制研究人员比较数据的能力，如果在分析时未考虑此偏离，则可导致错误的结论。实验差异的来源包括起始样本的性质和数量、RNA 提取过程、逆转录以及实时荧光定量 PCR 扩增。标准化是中和上述差异效应的重要过程。在实时荧光定量 PCR 的每个阶段都有单独的标准化策略，但其中一些策略更为有效。这包括：

样本量标准化：利用相同量的样本（如组织或细胞）进行 RNA 或 DNA 提取可使差异最小化，但这只是近似值，且无法解决 RNA 提取中的偏差。

RNA 或 DNA 量标准化：必须对 RNA 或 DNA 样本进行精确的定量和质量评估，但只采用该方法进行标准化仍存在不足，因为其无法控制逆转录和实时荧光定量 PCR 的效

率差异。例如，污染物水平的微小差异会影响 RT 反应并降低扩增效率。在 PCR 过程中样本的差异会被扩增，可能出现与样本的生物状况无关的巨大倍数变化。移液也容易出现操作差异，且无法利用纯化后 RNA 分析的标准化来补偿。

参考基因标准化：使用标准品基因（又称为参考基因或内源性对照）是解决实时荧光定量 PCR 中几乎所有来源的差异最彻底的方法。但采用此方法时，所有样本中的该基因必须表达一致。有效的标准品基因可对照 RNA 的质量和数量，以及逆转录和实时荧光定量 PCR 扩增效率的差异。如果两个不同的样本中逆转录或者 DNA 聚合酶扩增靶点的效率不同，则标准品转录本将反映出该差异。可使用内源性参考基因，如看家基因或外源性核酸靶点。

内源性对照

实时荧光定量 PCR 中的常见内源性标准品包括：

- β -actin (*ACTB*)：细胞骨架基因
- 18S 核糖体 RNA (rRNA)：核糖体亚单位
- 亲环素 A (*PPIA*)：丝氨酸苏氨酸磷酸酶抑制剂
- 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (*GAPDH*)：糖酵解途径
- β -2-微球蛋白 (*B2M*)：主要组织相容性复合体
- β -葡萄糖苷酸酶 (*GUSB*)：溶酶体内的外切糖苷酶
- 次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 (*HPRT1*)：嘌呤补救合成途径
- TATA 框结合蛋白 (*TBP*)：RNA 转录

由于每个实时荧光定量 PCR 实验各不相同，仔细周详的计划应包括选择标准品。标准品的选择不是根据实验室中其他人的使用情况，而是应选择最符合特定靶点的定量策略的标准品。

质量标准品的第一个要求是其丰度与您的靶基因产物相当。这对于多重反应尤为重要，因为如果在达到靶点 C_t 之前先达到标准品反应平台，标准品将阻碍靶点扩增，导致靶点 C_t 升高，从而影响反应的进行。标准品反应还可采用引物限制条件，模拟较低的表达水平。大多数 TaqMan® 内源性对照 Assay 可提供引物限制配方。

标准品靶点的实时荧光定量 PCR 分析的扩增效率应与实验靶点分析相当；可采用标准曲线进行评估。尽管在比较不同效率的反应时可采用校正因子，但当反应效率相当时，准确度更高。

最后也是最重要的一点，无论样本的治疗或疾病状态如何，标准品的表达应保持稳定。这必须通过实验测定，如图 19 所示。

应进行多次重复确保准确度，但无疑亲环素 (*PPIA*)、*TBP* 和 *HPRT1* 并不适用于这些治疗组，因其经过治疗后可能出现表达下调。即便是最常用的参考基因，在特定的条件下其表达水平亦有可能改变，因此应始终对其进行验证：

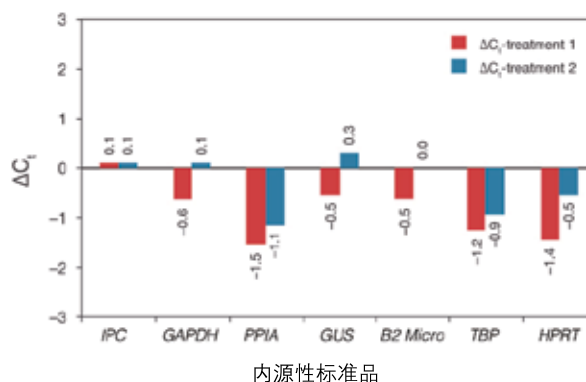


图 19. 常用内源性对照的基因表达水平及标准化的重要性。在本例中，分析两个治疗组和一个正常组的常用参考基因表达水平，一同扩增的还有内部阳性对照 (IPC)。IPC 提供了正常反应间差异的标准。条形代表各治疗组与正常样本相比，标准品的上调和下调，正常样本的 ΔC_t 为 0。其目标是找到一种模拟 IPC 变化的标准品。

- *GAPDH* 是一种常用的标准品，其在多数情况下表达稳定。但是，*GAPDH* 在某些癌症细胞、采用抑癌基因处理的细胞、缺氧状态及锰或胰岛素处理的样本中表达上调。
- β -actin 是另一种常用的看家基因，其在大多数细胞类型中适中表达。但其在乳腺上皮细胞、囊胚细胞、猪组织和牛心肌等中的表达稳定性尚有疑问。
- 18S rRNA 占细胞总 RNA 的 85-90%，且其在大鼠肝脏、人皮肤成纤维细胞及人和小鼠恶性细胞组织中表达稳定。但其丰度水平不适用于中等和低表达的靶点。寻找适当的 RNA 浓度，使 18S rRNA 提供足够宽的基线，且在 40 个循环内生成目的靶点 C_t ，这通常较为困难。此外，多重反应必须限制 18S 引物的浓度，以防标准品将所有反应组分隔，使 PCR 条件不利于目的靶点的扩增。

实验设计

其它方法不取决于单个参考基因的准确度，而是多个验证标准品的几何平均数。使用多个一致的标准品可更好地缓冲单个基因的 C_t 波动，从而提高分析和样本类型的灵活性。

外源性标准品

外源性标准品并不常用，但如果无法找到针对特定样本组的高度一致的内源性标准品，则外源性标准品是一种可行的选择。外源性参考基因是合成或体外转录的 RNA，其序列在实验样本中并不存在。鉴于其外源性，它不会在不同状态或治疗的细胞中出现正常的生物学波动。当使用外源性标准品时，其加入实验流程越早，则可以对照的步骤越多。例如，如果将外源性转录本加入细胞裂解缓冲液中，则它可用作细胞裂解、RNA 纯化及后续 RT 和 PCR 反应的标准品。

例如，外源性标准品有植物特异性的体外转录 RNA，如光合作用基因。由于哺乳动物没有同样的内源性转录本，因此可将它插入哺乳动物样本内。

采用外源性标准品的缺点有：

- 它不是内源性的。在工作流程的早期插入外源性标准品 (例如加入细胞裂解缓冲液中)，可使其用途最大化。
- 当引入标准品时，准确度会受到加样差异的影响。
- 长期储存和多次冻融可影响转录稳定性。因此，应定期进行拷贝数评估，确保其不会随时间变化而改变。

2

2.8 采用标准曲线评估效率、灵敏度和可重复性

实验设计的最后一个阶段是验证前述参数可实现高效、灵敏且可重复的实验。

反应效率

如前所述，实时荧光定量 PCR 反应的整体效率取决于 RT 反应和 PCR 扩增反应的效率。

RT 的效率取决于转换为 cDNA 的靶 RNA 百分比。低转换率可影响灵敏度，但样本间转换百分比差异的影响更大。

PCR 扩增效率是实时荧光定量 PCR 反应中最稳定的因素。但是，该扩增可指数放大 RT 效率的轻微差异，可能会导致错误数据的出现。100% 效率代表每个循环中的模板均实现了完美倍增，但可接受的分析验证范围为 90-110%。该效率范围对应的标准曲线斜率为 -3.6 至 -3.1。图 20 的图表显示了仅由反应效率差异导致的测量偏差。

验证所有待比较的靶点 (如参考基因和目的基因) 的反应效率，优化其效率使之尽可能一致，并在数据分析过程中采用效率校正可减少上述效应。这些测量将在后面的数据分析部分进一步讨论。

反应效率的最佳评估方法是生成标准曲线。通过构建连续稀释的样本核酸，并进行实时荧光定量 PCR，生成标准曲线。然后以起始核酸量为 X 轴，以 C_t 为 Y 轴，绘制结果曲线。用于生成标准曲线的样本 (尽可能接近) 应与将用于实验的样本匹配 (即相同的总 RNA 或 DNA 样本)。标准曲线分析的稀释范围或动态范围应涵盖实验样本预期的浓度范围。曲线的斜率可用于测定反应效率，大多数科学家认为反应效率应在 90% 至 110% 之间。

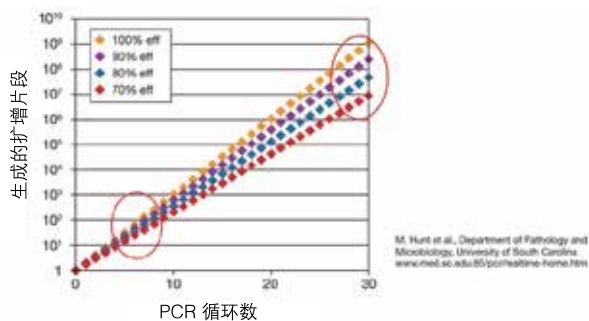


图 20. 不同的扩增效率引起的偏差效应。四种不同的实时荧光定量 PCR 反应的效率在 70% 至 100% 之间。其差异在早期循环并不明显。但在 30 个循环之后，效率为 70% 的反应与效率为 100% 的反应之间报告的拷贝数差异达 100 倍。反应的循环数越多，分析要求的灵敏度越高，效率差异就显得越重要。

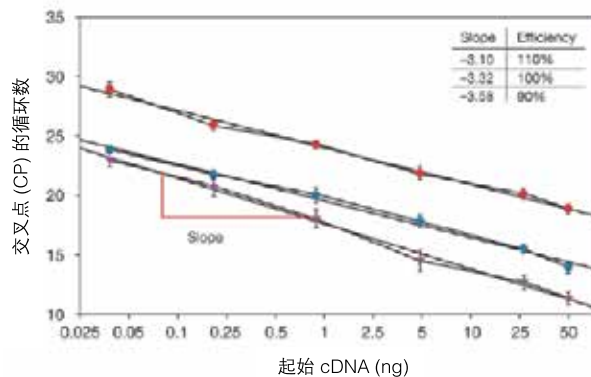


图 21. 利用标准曲线评估实时荧光定量 PCR 反应的示例。

在图 21 中，生成了三种不同靶点的标准曲线。红色和蓝色曲线平行表示它们的效率相当，因此可在任意稀释度实现准确比较。此类型的比较示例是将标准品基因与靶基因进行比较，调整样本间的非生物学差异。但紫色曲线在较低浓度下的效率也较低，因此无法在低浓度下实现准确比较。

除评估实验状态并为相对定量提供效率值外，标准曲线还可用于确定特定的反应问题是由于抑制还是缺少优化造成的。在手册的疑难解析部分将对此问题进行更详细的讨论。

灵敏度和可重复性

效率在 90–110% 的理想窗口内的标准曲线确定了实时荧光定量 PCR 反应可测量的起始模板量范围。某种程度上可通过靶点 C_t 在扩增曲线上出现的时间测定灵敏度。但是，分析灵敏度的实际测量方法是特定少量的模板是否适用于标准曲线并维持理想的扩增效率。符合要求的稀释度最高的样本决定了反应灵敏度。

标准曲线还包括 R^2 值，用于测量重复样本的可重复性。重复标准曲线以评估一致性，从而保持样本的数据准确度。

反应板制备

3



3.1	混合	36
3.2	反应板装载	36
3.3	反应板密封	36
3.4	反应板插入	37

反应板制备

3.1 混合

最好在短暂混合、离心所有实时荧光定量 PCR 反应组分后配制反应。轻轻晃动含酶的预混液，短暂 (1-2 秒) 涡旋其它组分 (如 PCR 引物对或 TaqMan® Assay)，解冻核酸样本。由于实时荧光定量 PCR 预混液的密度高于其它实时荧光定量 PCR 反应组分，因此充分混匀反应混合物至关重要，否则将影响反应精度。

将试管轻轻上下颠倒几次，或者稍微涡旋 1-2 秒是高效的混匀方法。但应避免过度涡旋，因其可形成气泡，影响荧光检测，并降低酶的活性，从而降低扩增效率。应始终进行短暂离心，收集容器底部的内容物，并去除溶液的气泡。

3.2 反应板装载

根据实验的性质确定试剂加入反应板或管的次序。例如，如果您分析 20 种不同 RNA 样本中的 5 个基因的表达，则最好先将 Assay 混合物分至反应板或管内，然后加入样本。另一方面，如果您只分析 5 种不同 RNA 样本中的 20 个基因的表达，则更简单的做法是先分配 RNA 样本，然

后加入 Assay 预混液。无论加入试剂的次序如何，都应对移液进行规划，以免样本和 Assay 之间的交叉污染。由于核酸具有亲水性且可迅速溶于 Assay 预混液，因此无需充分混匀反应组分。

3.3 反应板密封

塑料 PCR 反应板可采用光学盖或光学覆膜密封，它们是一侧有粘性的薄塑料纸。白色衬垫可保护其粘性。覆膜的末端为带有穿孔的矩形凸起。使用这些凸起操作覆膜，避免与其接触。撕下白色衬垫，将覆膜置于反应板上方，边缘向内折起。覆膜附带一个正方形的塑料安装工具。用它弄平覆膜，特别是反应板上方的 4 个边缘。还可在撕下白色条带时利用安装工具的边缘按住覆膜的各端，防止拉起覆膜。检查反应板的上方，确认覆膜与反应板接触良好，特别是 4 个边缘。

密封好反应板后，拿起检查底部，看是否存在异常，如意外的空孔、液滴粘在孔壁上以及孔底存在气泡。请注意空孔或体积异常的孔。短暂离心反应板，解决粘附的液体和底部气泡问题。

应标记反应板裙边，或者提供条形码。切勿写在反应板表面、孔的上方，这会影响荧光激发和读数。也不要写在反应板底部，因为墨水会附在实时荧光定量 PCR 仪的模块上。模块被彩色或荧光物质严重污染会影响实时荧光定量 PCR 数据。

3.4 反应板插入

反应板准备好后，需遵循生产商的说明将其装载至实时荧光定量PCR仪中。含有DNA或cDNA模板和AmpliTaq Gold®试剂的反应板在室温下极其稳定。它们可在正常的实验室光线条件下室温储存。避免装载的反应板受到阳光直射；这会对混合物中的荧光染料造成影响。如果您需要将反应板运送至室外，可用铝箔包裹反应板，以免阳光直射。

对于带有可更换的热循环模块的仪器，应确保安装与反应板类型相匹配的模块。请注意96孔标准模块和96孔快

速模块不一样。标准96孔反应板和标准管的容量为0.2 mL，而快速96孔反应板和快速反应管的容量仅为0.1 mL。即便未使用快速模式，快速塑料产品也必须采用快速模块。

装载过程因仪器型号而异。一些仪器带有抽屉式系统：拉出抽屉，将反应板置于模块或固定装置上，然后推回抽屉。在某些仪器中，反应板位于仪器臂上，由计算机控制。

数据分析



4.1	引言	40
4.2	绝对定量	40
4.3	相对定量	42
4.4	高分辨率熔解曲线 (HRM) 分析	44
4.5	多重实时荧光定量 PCR 分析	46

4.1 引言

如实验设计的开始部分所述，定量方法的选择取决于实验的目标。

- 绝对定量可测定靶点的实际拷贝数，但也是最费力、最复杂的定量形式。此方法要求周密的计划和高度准确的标准曲线。绝对定量常用于确定病毒滴度。

- 相对定量也需要仔细规划，但生成的数据是相对丰度，而非确切的拷贝数。这是适用于基因表达研究的方法，可提供两种主要的定量方案： $\Delta\Delta C_t$ 和标准曲线定量。

4.2 绝对定量

绝对定量是适合需要测定靶点实际拷贝数的研究人员采用的实时荧光定量 PCR 分析方法。要进行绝对定量，需对已知浓度的目标模板溶液进行几次连续稀释，采用实时荧光定量 PCR 扩增，利用获得的数据生成标准曲线，标准曲线以各靶点浓度及相应的 C_t 值绘制。然后将未知样本的 C_t 值与此标准曲线进行比较，确定其拷贝数。

- 用于生成标准曲线的模板及定量该模板采用的方法是实验的基础。连续稀释时的加样准确度极为重要。还应记住实时荧光定量 PCR 的灵敏度会放大微小的人为误差。
- 目标模板和连续稀释的实际样本的 RT 和 PCR 效率相当至关重要。

标准曲线生成——概述

采用绝对标准曲线，目的靶点的拷贝数必须已知。这表示在生成曲线前，应准确定量模板。图 22 重点显示了标准曲线设置。目的靶点样本被准确测定为含有 2×10^{11} 个拷贝。将样本连续八次稀释 10 倍至 2×10^3 个拷贝，对每个稀释样本进行实时荧光定量 PCR，重复至少三次。生成的标准曲线与每个特定的 C_t 的拷贝数相关。然后通过与该标准曲线进行比较，推算出未知样本的拷贝数。定量的准确度与标准曲线的质量直接相关。

在绝对定量时，应考虑：

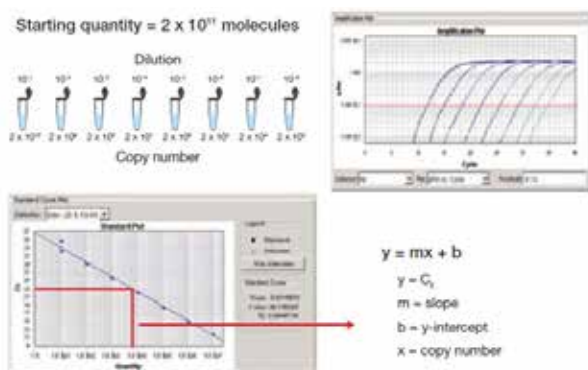


图 22. 绝对定量标准曲线设置流程。

标准曲线生成——模板选择

如前所述，生成绝对标准曲线采用的模板将决定数据的准确度。尽管您可能需要均匀的纯模板进行初始拷贝数测定和标准曲线生成，但最好使用与实验样本尽可能类似的目标模板。由于诸如核酸提取和逆转录等步骤可影响反应的动态范围，所以应采用与实验样本尽可能相同的处理步骤。下列类型的模板可用作绝对定量标准品：

- DNA 标准品：**目的靶点的 PCR 扩增片段或含有目的靶点的质粒克隆。

优点：易于生成、定量，可在适当的储存条件下维持稳定性。

缺点：无法进行 qRT-PCR 的逆转录步骤，大大影响了反应效率。

- RNA 标准品：**目的靶点的体外转录 RNA (图 23)。

优点：结合了 RT 效率，最大程度地模拟了目的靶点。

缺点：需要耗费时间生成该标准品，因其不稳定，难以保持长期准确度。

RNA 和 DNA 标准品的均质性意味着它们通常具有较实验样本更高的效率。因此可将背景 RNA (如酵母 tRNA) 插入标准模板中，形成更具异质性的环境，有助于平衡反应效率。背景 RNA 可抑制 cDNA 合成率达 10 倍。

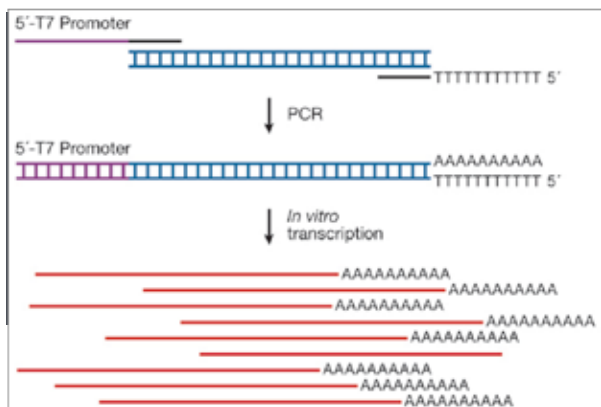


图 23. 体外转录实验方案示意图。利用实时荧光定量 PCR 生成的 PCR 产物可利用包含 5' T7 启动子的序列和包含 3' poly(T) 的逆转录引物重新扩增。体外转录反应生成多聚腺苷酸化正义 mRNA。纯化后可将其准确定量并稀释，用于生成标准曲线。

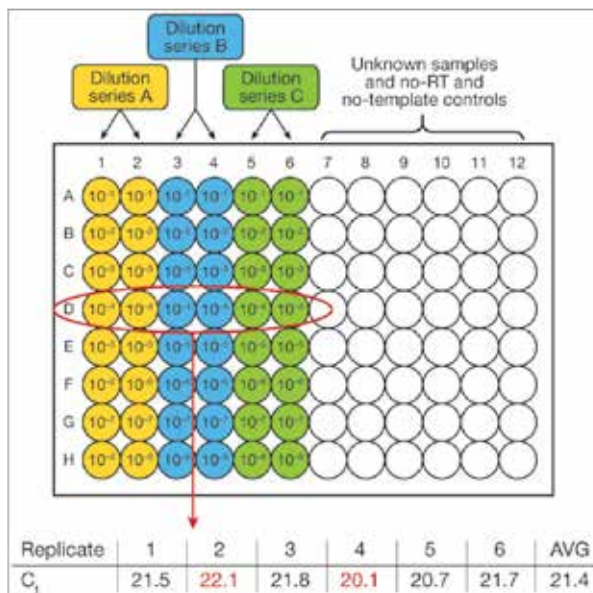


图 24. 用于标准曲线生成的反应板设置。计算平均阈值循环 (C_t) 值时，应除去重复反应中的最高值和最低值。

标准曲线应用——cRNA

为说明应如何遵循绝对定量标准曲线的建议，本部分将逐步介绍此定量方法中 cRNA 标准曲线的构建。

T7 RNA 聚合酶可利用质粒或 PCR 产物，用于生成均质的目的转录本。

由于其检测限较广且准确性更佳，因此建议采用互补 RNA (cRNA) 荧光检测，而不是紫外吸光度测量。另一种精确的定量方法是数字 PCR。

测定拷贝数后，以 cRNA 比 tRNA 1:100 的比例加入不相关的酵母 tRNA，模拟生物样本的正常背景。然后将该标准品稀释至少 5 至 6 个数量级，用于实时荧光定量 PCR 中的 C_t 测定。

加样不准确对绝对定量数据影响较大。适当的预防措施可尽量减小这种影响。如图 24 反应板设置所示，制备三个单独的 cRNA 稀释梯度，每个梯度的每个稀释样本重复扩增两次。

必须记住，稀释梯度应涵盖实验样本可能出现的所有模板量。例如，如果未知检测样本可能只含有 10 个拷贝，则标准曲线中的最低点不应包含 100 个模板拷贝。

每个稀释度获取六个 C_t 值。除去最高和最低 C_t 值，计算剩余四个 C_t 值的平均值。如果我们关注此样本中的 10-4 稀释度 (图 24)，我们可以观察到特定样本的 C_t 值在 2 个循环中是如何变化的。通过指定稀释度 (对应特定拷贝数) 为 21.4——平均 C_t 值，可使上述差异最小化。

4.3 相对定量

相对定量尽管仍存在技术挑战，但不像绝对定量那样严峻。该技术适用于大多数基因表达研究，可分析校准（正常）样本和一个或多个实验样本中目的基因表达水平的上调或下调。采用该技术无需精确测定拷贝数，而是关注与校准样本相比的倍数变化。

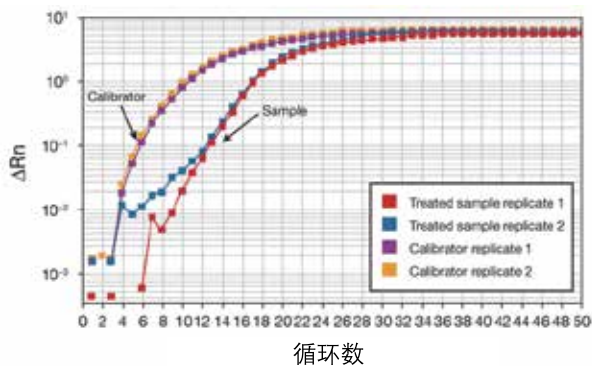
我们在此列出了相对定量的常用方法，以及各自是如何控制差异的。

相对定量算法—— ΔC_t

这是最基本的相对定量形式。获取检测和校准样本的目的基因表达的 C_t 值，两者之间的差异为 ΔC_t 。倍数差异为 2 的 ΔC_t 次幂。

$$\text{倍数差异} = 2^{\Delta C_t}$$

该方法不控制样本数量、样本质量或反应效率的差异，还存在不足 (图 25)。



$$\begin{aligned} \text{倍数差异} &= 2^{\Delta C_t} \\ 2^{12-6} &= \text{样本低64倍} \end{aligned}$$

图 25. 处理样本和校准品中的表达相对定量。处理样本和校准品重复运行两次；校准品 C_t 为 6，处理样本为 12。根据 ΔC_t 方法，计算得出的处理样本中靶基因的相对表达水平较校准品低 64 倍。但由于未使用标准品，该结果的实验差异效应未知，因此结论可靠性较低。

相对定量算法—— $\Delta\Delta C_t$

$\Delta\Delta C_t$ 方法是一种非常普遍的技术，它比较了包括校准品（如未处理或野生型样本）和标准品（如看家基因表达）在内的实验样本的结果。采用该方法，可根据检测样本和校准样本中的标准品（正常）基因的 C_t 调整同样两个样本中的目的基因 (GOI) 的 C_t 。其得出的 $\Delta\Delta C_t$ 值可用于测定表达的倍数差异。

$$\text{倍数差异} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta C_{t \text{ 样本}} - \Delta C_{t \text{ 校准品}} = \Delta\Delta C_t$$

$$C_{t \text{ GOI}}^s - C_{t \text{ 正常}}^s = \Delta C_{t \text{ 样本}}$$

$$C_{t \text{ GOI}}^c - C_{t \text{ 正常}}^c = \Delta C_{t \text{ 校准品}}$$

$\Delta\Delta C_t$ 方法要求标准品和靶基因的效率相同。无疑明显的问题是：可接受的偏差范围是多大？确定该范围的方法是采用同样的样本生成标准品基因和目的靶基因的标准曲线 (图 26)。可获得每个稀释度的标准品和靶基因的平均 ΔC_t 。数值本身并不重要；重要的是各个稀释度的值的一致性。

对于一些研究人员而言，这些小的效率偏差仍可导致数据不准确。采用目的基因和标准品校正可使扩增效率差异最小化。

相对定量算法——标准曲线法

相对定量的标准曲线法采用检测和校准样本的靶基因之间的 C_t 差异，利用参考基因 C_t 进行标准化，调整扩增效率的微小差异。采用此方法需要利用标准曲线确定标准品和目的基因的扩增效率，但无需采用前面的技术的前提。该技术要求所有分析样本中的标准品基因必须相同。

在图 27 中，

$$\text{倍数差异} = (E_{\text{靶点}})^{\Delta C_t \text{ 靶点}} / (E_{\text{标准品}})^{\Delta C_t \text{ 标准品}}$$

$$E = \text{标准曲线 E 的效率} = 10^{[-1/\text{斜率}]}$$

$$\Delta C_{t \text{ 靶点}} = C_{t \text{ GOI}}^c - C_{t \text{ GOI}}^s$$

$$\Delta C_{t \text{ 标准品}} = C_{t \text{ 正常}}^c - C_{t \text{ 正常}}^s$$

倍数差异方程摘自 M.W. Pfaffl 的 *A-Z of Quantitative PCR* 一书。

要获得最准确的效率值，应仔细选择标准曲线中的校准样本。该校准样本应经过同样的纯化步骤，运行同样的反应，且复杂度与实验样本相当。因此，最佳校准样本是含有目的靶点的异质性样本——例如，从待研究的细胞系或组织中提取的总 RNA。值得注意的是，校准样本和实验样本之间的任何差异均可导致效率校正不准确，从而使基因表达的倍数变化计算变得不准确。由于无需检测拷贝数，因此可随意稀释。

该技术采用了与 $\Delta\Delta C_t$ 方法相同的扩增曲线设置，结合标准曲线中的效率值（在同一块反应上运行）调整标准品和目的基因 (GOI) C_t 值。利用上述两个斜率计算效率（图 27）。

简而言之，选择定量策略的第一步是确定绝对定量或相对定量哪种能最好地解决问题。如果您需要知道样本中有多少靶分子，则需要利用已知量的目标模板生成精确的标准曲线。在大多数情况下，相对定量是首选的方法。 ΔC_t 方法未采用标准品，而 $\Delta\Delta C_t$ 方法则利用一个或多个参考基因，对实时荧光定量 PCR 的处理差异进行标准化。利用标准品可计算倍数变化（需要或不需要调整反应效率）。

Input amount RNA (ng)	Normalizer gene Avg C_t	Target gene Avg C_t	ΔC_t Normalizer - target
10	20.3	18.2	2.1
5	21.4	19.4	2
1	22.8	20.6	2.2
0.5	23.8	21.3	2.5
0.1	24.8	22.5	2.3
0.01	25.9	23.7	2.2
0.05	26.8	24.5	2.3

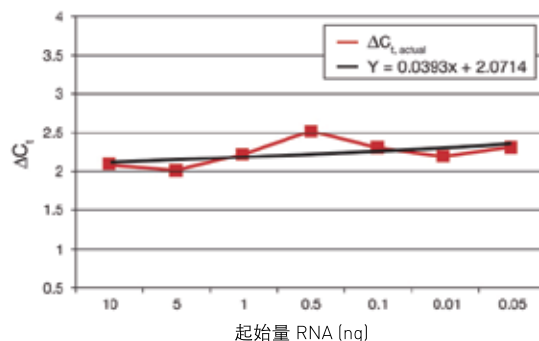


图 26. 相对效率曲线。 ΔC_t 范围为 2.0 至 2.5。以稀释度或起始 RNA 量作图，获取斜率。完美的直线（斜率 = 0）表示所有起始浓度的效率一致，采用 $\Delta\Delta C_t$ 方法时，斜率 < 0.1 一般被视为可接受的范围。

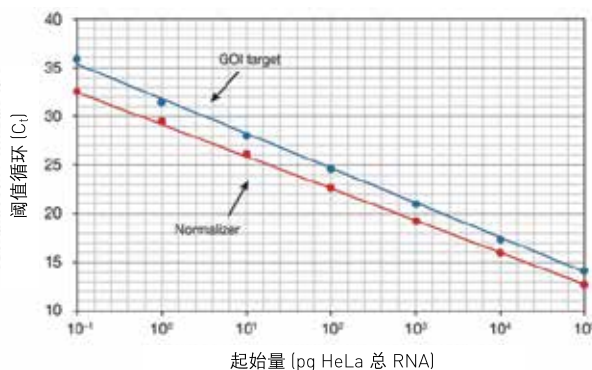


图 27. 利用标准曲线获取效率值，调整标准品和目的基因 C_t 值。HeLa RNA 连续稀释 6 个数量级，进行实时荧光定量 PCR，生成标准品和目的基因 (GOI) 标准曲线。



4.4 高分辨率熔解曲线 (HRM) 分析

高分辨率熔解曲线 (HRM) 分析是一种全新的均匀闭管 PCR 后分析方法, 适用于 SNP、新型突变和甲基化图谱的鉴别。HRM 分析是一种较传统熔解曲线分型更灵敏的方法, 它监测双链 DNA 解离为单链 DNA 的温度。此温度称为 T_m , 或产物的熔解温度。高分辨率熔解曲线分型需要具有高级光学和热学性能的实时荧光定量 PCR 仪和分析软件, 用于实现超快数据采集和高度准确的热学控制和一致性。QunatStudio™ 12K Flex、QunatStudio™ 6/7、ViiATM 7、7900HT Fast、7500 Fast、StepOnePlus® 和 StepOne® 实时荧光定量 PCR 系统、Rotor-Gene® 6000 系统 (Corbett Life Science) 及 LightCycle® 480 系统 (Roche Diagnostics) 是目前可用于 HRM 分析的商品化仪器。

在 HRM 分析中, 在包含高性能双链 DNA (dsDNA) 结合染料的混合物中采用 PCR 扩增约 80–250 bp 基因片段。MeltDoctor™ HRM Master Mix 采用了 MeltDoctor™ HRM 染料, 它是一种热稳定型的荧光 SYTO® 9 染料, 在双链 DNA 存在的情况下具有低背景荧光和高亮度。在 40 个循环之后, 扩增产物退火, 并发出大量荧光。当 HRM 分析开始后, 实时荧光定量 PCR 仪缓慢升温, 同时记录扩增片段的荧光数据。随着 PCR 产物开始变性 (或熔解), 荧光染料释放, 荧光强度慢慢下降, 直到温度接近 PCR 产物的 T_m 。在十分接近 T_m 时, 随着样本从双链解离为单链 DNA, 可观察到荧光强度显著下降 (图 28)。

HRM 分析应用领域

最广泛的 HRM 分析应用领域是基因筛查。基因筛查是搜索 PCR 扩增片段中是否存在未知变异, 它可在测序步骤之前进行或者作为替代测序方法。由于 PCR 产物突变可导致 DNA 熔解曲线的形状改变, 因此它可以利用 HRM 分析检测。杂交双链 DNA 样本扩增并熔解时, 其熔解曲线不同于纯合野生型或突变样本。

一些常见的 HRM 分析应用领域包括:

- 基因筛查 (突变研究)
- 突变分析
- 单核苷酸多态性 (SNP) 检测
- 杂合性研究
- 物种鉴定
- 甲基化分析

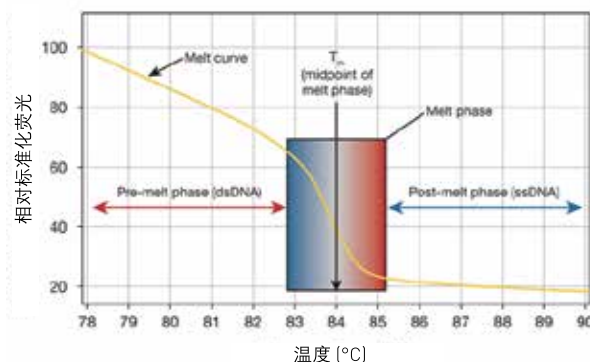


图 28. PCR 扩增片段的熔解曲线特性。特定的 DNA 序列具有特征性的熔解曲线。可通过 T_m 变化或熔解曲线形状的改变检测出突变。与传统的熔解曲线分析不同, HRM 可区分出单核苷酸差异的扩增片段。该技术为 dsDNA 结合染料开创了诸多新应用领域。

采用传统方法, 上述应用领域需要针对各个靶点的独特荧光探针, 代价高昂、设计耗时费力, 且不灵活。采用 dsDNA 结合染料的 HRM 提供了与基于探针的分析同样的性能, 且价格更低廉, 形式灵活。

尽管 HRM 的应用领域很多, 但单核苷酸水平的区分更具挑战性, 因其必须检测出微小的 T_m 改变。

HRM 分析试剂

除专业仪器和软件外, HRM 分析还需要能够区分单个核苷酸差异的扩增片段熔点的 dsDNA 结合染料。

已成功应用于 HRM 分析的染料包括:

- MeltDoctor™ HRM 染料 (Thermo Fisher Scientific)
- Molecular Probes® SYTO® 9 染料 (Life Technologies Thermo Fisher Scientific)
- LCGreen® 和 LCGreen® Plus+ 试剂 (Idaho Technology)
- EvaGreen® 染料 (Biotium Inc.)

HRM 分析成功的关键

- 设置合适的升温速率。通常需要每一个 C_t 产生 10-20 个数据点用于 HRM 的分析。
- 保持较短的扩增片段，实现最高的灵敏度。与较大的扩增片段相比，100 bp 左右的扩增片段可简化单核苷酸熔解曲线的检测。
- 确保 PCR 扩增片段的特异性。错配产物和引物二聚体可使数据解释复杂化。引物浓度低于 200 nM， $MgCl_2$ 在 1.5 mM 至 3 mM 范围及使用热启动 DNA 聚合酶将有助于获得高特异性。采用标准的低分辨率熔解曲线评估错配。无模板对照 (NTC) 熔解曲线对特异性评估至关重要。
- 避免扩增包含除目的基因外的其它差异基因的区域。检查 PCR 产物的种属同源性、外显子/内含子边际、剪接位点及二级结构和折叠。
- 所有待分析的靶点均维持相似的荧光平台及相似的 PCR 产物量。待比较样本量的差异可影响熔解温度和混淆 HRM 分析。采用类似的起始样本量十分有用。
- 确保反应使用足够的模板。一般而言， C_t 应低于 30，以生成足够的材料，实现准确的熔解分析。
- 提供充分的熔解数据采集窗口。例如，窗口应在扩增片段熔解温度的上下 $10^\circ C$ 范围内 ($T_m \pm 10^\circ C$)。需要足够的熔解前和熔解后温度数据，实现准确的曲线标准化和高重复相关度。
- 对于一些仪器，我们还建议在扩增后加入 $50^\circ C$ 预维持步骤 (但在熔解之前)，以确保所有产物已重新关联，并有利于杂交双链形成。使用混合物 (如 MeltDoctor™ HRM Master Mix)，实现目的基因片段的灵敏且无偏差扩增。

4.5 多重实时荧光定量 PCR 分析

多重反应技术是在同一个实时荧光定量 PCR 反应中分析超过一个靶点。利用一种特定的染料、靶点特异性的荧光探针或引物对结合物区分每个靶点。多重反应常用于在同一反应中扩增标准品基因和目的基因。

理论上，某个反应中可扩增的靶点数仅受可被实时荧光定量 PCR 仪激发并检测的具有不同光谱的染料数限制。但仍有其它实验障碍存在：反应中的不同引物对和/或探针不得相互作用，这些引物和探针需分享 PCR 组分，如 dNTP 和热稳定 DNA 聚合酶。多重反应的优化时间较长，但具有几个显著的优点：

- 差异较小，一致性更高。在同一管内对标准品和目的基因进行多重反应，消除了这两个靶点在不同 (即便相邻) 孔内扩增可出现的孔间差异。
- 试剂用量更少，成本更低。多重反应只需较少的反应即可分析相同数目的靶点。
- 更高的通量。利用每次实时荧光定量 PCR 反应及每个样本可分析更多的靶点。

多重反应分析成功的关键

成功的多重反应必须考虑下列多个因素：

- 引物和探针设计
- 试剂优化 (包括引物浓度、靶点丰度、反应组分和荧光基因/淬灭剂组合)
- 多重反应分析验证

引物和探针设计

引物和探针设计无疑是多重反应分析中最重要的因素。随着反应复杂度的提高，引物和探针形成二聚体的可能性也随之升高，竞争反应组分将限制一个或多个靶点的扩增。下面是一些尤其重要的因素，可实现性能最大化并最大程度抑制竞争效应：

- 保持较短的扩增片段。引物设计的扩增区段在 60 bp 至 150 bp 范围内将提升反应效率。
- 设计引物的 T_m 值差别在 1°C 范围内。请记住，所有引物和探针将在同一个温度下退火。错配的 T_m 将导致效率偏差。
- 进行引物和探针设计 BLAST 搜索，确保其针对目的靶点的特异性。
- 使用引物设计软件确定引物或探针序列是否容易形成二聚体。一款免费的程序 AutoDimer (由美国国家标准与技术研究院的 P.M. Vallone 编制) 可分析特定的多重反应中的所有引物设计，了解其是否容易形成二聚体。另一款软件 Multiple Primer Analyzer 也可在 Thermo Scientific™ 网站上获得。

试剂优化

多重反应的关键问题是不同扩增靶点的试剂之间的竞争。确保高扩增效率需要降低引物用量，或者提高所有组分的浓度，或两者兼具。大多数的优化实验都是从测试不同引物浓度开始的。

引物浓度和靶点丰度

多重反应中各种扩增片段的数量各不相同，扩增效率同样如此。限制更易扩增或丰度更高的靶点的引物浓度可提供一个公平竞争的平台。例如，如果 β -actin (高拷贝标准品) 与低丰度靶点进行多重反应，则共享的反应组分可能在早期循环即已耗尽。降低 β -actin 的用量可限制其扩增效率，使较低丰度的靶点更易于扩增。一般而言，对于更高丰度的靶点，您应采用不使 C_t 延迟的最低引物浓度。

反应组分浓度

每个多重反应各不相同，但调整引物浓度的方法最有可能达到多重和单重反应 C_t 值的一致性。也可增加 Taq DNA 聚合酶、镁离子和 dNTP 的用量，并增强缓冲液的强度来提高所有靶点的灵敏度和扩增效率。

荧光基团/淬灭剂组合

多重反应中的报告荧光基团必须具有独特的光谱，使各荧光信号可在单个通道中分别检测。采用适当的染料，实时荧光定量 PCR 仪激发和发射光学元件能够过滤任何一点由错误的荧光基团发出的荧光(这种干扰又称为重迭噪声)。

同样的，随着多重反应中探针数量的增加，各个双标记荧光探针的淬灭剂选择也变得越来越重要。荧光淬灭剂(如 TAMRA™ 染料，FAM™ 染料的一种常见淬灭剂)可在不同的波长释放荧光基团的能量。在多重反应中，该染料的淬灭剂可在不同波长产生多个信号，增加了过滤及数据完整性的难度。而 Dark 淬灭剂，如 NFQ 或 QSY® 淬灭剂，以热量而不是荧光的方式释放能量，从而降低了整体荧光背景。根据您使用的仪器的检测能力，选择适当的多重反应染料组合。

验证多重反应分析

与单重实时荧光定量 PCR 分析一样，多重反应也应建立标准曲线，先评估多重反应中所有靶点的反应效率，然后运行分析。此验证过程包括两个主要阶段：

1. 验证各靶点的引物和/或探针，确定各自的效率。这是引物和探针设计的初始评估。
2. 优化多重反应分析的整体效率。

单独评估各个引物和探针组，确定设计和条件是否适用于此靶点。这是通过连续稀释的标准曲线完成的，同样试图达到近 100% 的效率。在各引物/探针组合经过功能验证后，继续进行多重反应优化。值得注意的是，当对靶点进行多重反应时，单重反应的引物/探针浓度条件并非最佳。构建多重反应检测板时，建议在条件允许的情况下每次添加一个靶点，而不是在第一次实验中整合所有靶点。

使用相同的标准曲线方法，结合所有引物和探针，针对各个稀释度进行多重反应。将各个靶点的效率与其相应的单重实时荧光定量 PCR 反应效率相比较。理论上，单重反应和多重反应的标准曲线变化极小。如果多重反应靶点的反应效率变化超过 5% 或者超出 90-110% 的理想范围，则需要优化多重反应分析的引物/探针浓度或其它组分。

多重反应的 C_t 值应与单重反应相当，使反应的灵敏度不受影响。

疑难解析



5.1 引言	50
5.2 常见问题	59

5.1 引言

实时荧光定量 PCR 分析的部分实施需要经过优化以确保所有反应参数均设置精确，从而获得准确的结果。在研究新基因或改变分析参数时，必须对分析进行验证，并调整所需的反应。该过程包括调整引物浓度、热循环温度和时间，然后通过标准曲线评估确定参数。

优化过程确实需要时间，但是所花的时间是值得的。这样得出的分析结果不仅具有最高的灵敏度和最大的动态范围，而且效率高（与高准确度相关），重复性好。这些因素使数据具有可靠性，并最终为研究界所接受。

解决实时荧光定量 PCR 反应过程中出现的问题似乎令人畏缩。但是，如果将适当的 Assay 设计考虑在内，实时荧光定量 PCR 的常见困难可归结为四个主要方面：

- 引物二聚体的形成
- 引物和探针的储存
- 实时荧光定量 PCR 的抑制和较低的反应效率
- 软件分析设置

引物二聚体的形成

当引物对之间的部分序列存在同源性时，可形成引物二聚体。如果在 PCR 反应过程中引物退火形成二聚体，则 Taq DNA 聚合酶可延伸二聚体，形成长于原始引物的产物，它可导致循环过程中更易出现退火错误。根据长度的不同，引物也可能出现自身折叠，由此与模板形成冲突。反应的复杂性（尤其在多重反应过程中）可使上述不良影响发生的几率增加。

引物二聚体的形成是您在实时荧光定量 PCR 设计和验证过程中最常见的问题之一，但在实时荧光定量 PCR 反应中解决该问题的途径很多。在讨论如何解决之前，最重要的是了解为何应减少二聚体的形成。

引物二聚体引发的问题

引物二聚体对反应的影响在很大程度上取决于反应中采用的化学物质。基于荧光探针的反应受引物二聚体的影响不是很大，这是由于在引物二聚体区域极少出现探针退火及断裂的现象。此时，引物的竞争作用是需要考虑的主要问题。另一方面，基于双链 DNA 结合染料（如 SYBR Green）的反应受引物二聚体的影响很大，这是因为染料的结合方式为非特异性的，由此可导致反应过程中监测到的荧光信号增强。这可相应改变 C_t 值，使结果出现偏差。

外部信号是影响反应效率的最重要因素，而反应孔内的竞争作用也会对其产生直接的影响。如前所述，较低的反应效率可使动态范围缩小，由此造成灵敏度下降。

最好在引物设计阶段就采取简单的预防措施，从一开始即避免二聚体的形成。有几款免费工具可协助完成上述过程。其中一种工具是 AutoDimer（由美国国家标准与技术研究院的 P.M. Vallone 编制），它可以从理论上对引物对的序列进行分析，并标记出那些易形成二聚体的序列。

尽管以生物信息学为基础的引物设计可以降低二聚体形成的可能性，但仍需要通过实验对其进行监测。

确定是否存在引物二聚体

凝胶电泳是显示引物二聚体的一种极佳的方法。如图 29 所示，引物二聚体在凝胶的底部形成扩散条带，通常位于 100 bp 以下。在 PCR 过程中，二聚体的形成与模板的退火及延伸之间存在竞争作用。引物二聚体通常随模板的减少而增加。

单独采用凝胶电泳分析进行验证的缺点在于，其灵敏度最低仅达到纳克级，因此可能无法得出结果。凝胶电泳分析的优势是当解离曲线（熔解曲线）数据同时可用时，产物的大小有助于对结果进行综合解释。

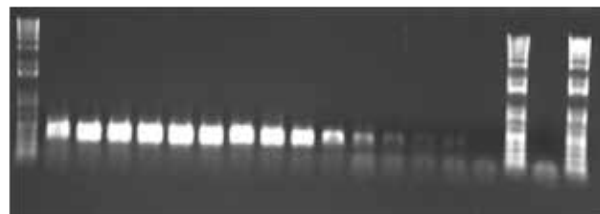


图 29. 琼脂糖电泳分析引物二聚体的形成。热循环反应之前，核酸样本经系列稀释并与 PCR 反应液混合，相同体积的反应混合液加入琼脂糖凝胶，引物二聚体为胶底部的扩散条带。

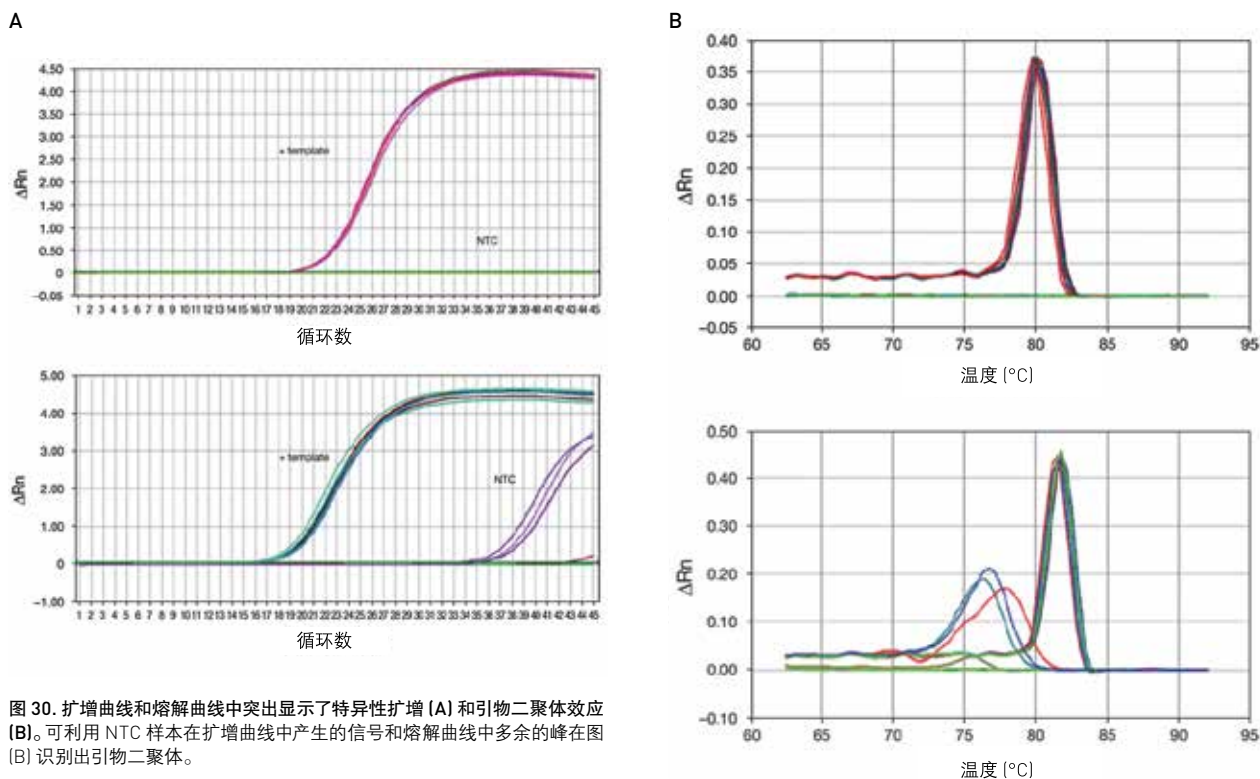


图 30. 扩增曲线和熔解曲线中突出显示了特异性扩增 (A) 和引物二聚体效应 (B)。可利用 NTC 样本在扩增曲线中产生的信号和熔解曲线中多余的峰在图 (B) 识别出引物二聚体。

解离曲线，又称熔解曲线，是利用双链 DNA 结合染料获得的标准反应热廓线。如果扩增具有极好的特异性，则实时荧光定量 PCR 板上每个反应孔的解离曲线将出现一个较窄的单峰。引物二聚体的荧光强度较低，呈较宽的“波形”，显示其在 70°C 左右熔解。出现此峰形和熔解温度主要是由于引物二聚体的长度较小且不确定。如数据分析部分所述，若对解离曲线中是否存在引物二聚体有任何疑问，可将观察的结果与 NTC 反应孔相比较。当模板不存在时，更易出现引物二聚体峰 (图 30)。

减少或去除引物二聚体

如果出现了引物二聚体，有许多方法可以减少或消除反应中的引物二聚体。

1. 首先是优化热循环条件，这主要是提高退火温度。大多数情况下，两步循环 (由 95°C 变性步骤直接进入 60°C 退火和延伸步骤) 有利于强效扩增，因此引物设计时设定的成功退火温度为 60°C。
2. 可降低引物浓度，甚至采用不同的正向引物和反向引物的比值也有一定的帮助。大多数情况下，每条引物的理想最终浓度为 200 nM，但如有需要，可将浓度降至 60 nM。

3. 镁的最佳浓度一般约为 3 mM。高于此浓度易形成引物二聚体。
4. 如果未对引物形成二聚体的倾向进行评估，则应补充评估并考虑重新设计 (如有需要)。通常情况下，最好使用热启动 DNA 聚合酶，并在冰上进行反应。
5. 在理论上，针对同一靶点应同时检测多个引物组。这实际上可以节省大量时间，因为如果这些引物中的一个能立即发挥作用，则可以减少花费在优化过程上的时间。

请记住，由于在引物对存在的情况下，RT 反应的温度更低，因此二聚体在一步法 qRT-PCR 反应中可能更值得关注。另外还须注意，有些情形下引物二聚体并不是一个值得担心的问题。例如，如果只是在 NTC 孔里出现，或者样本孔和 NTC 孔的 ΔC_t 值的差异是大于 10 (因为这表明来自引物二聚体的荧光信号可以忽略不计。)



疑难解析

引物和探针的储存

尽管引物和探针的储存经常被忽略，但在保证实时荧光定量 PCR 分析的长期成功和一致性方面具有重要作用。影响引物和探针的稳定性的主要因素是储存温度、储存时间、是否被长时间暴光、储存的引物和探针的浓度以及储存溶液的组分。

引物和探针储存不当引发的问题

引物和探针储存不当可导致降解及特异性丧失，进而对反应效率造成影响。在基于荧光标记的引物和探针的分析中，降解的探针可释放出游离染料，从而导致背景增加以及信噪比降低。由于其荧光强度较低，因此上述现象可使扩增曲线显得极为粗糙。附于引物和探针上的荧光染料也会逐渐发生光漂白作用，从而很难在实时荧光定量 PCR 仪中被检测出来。

确定引物或探针的完整性是否受到影响

确保引物和探针的稳定性的首要预防措施是对储存时间进行简单的监测。大多数情况下，引物和探针的稳定性可达一年（或者更长时间）。但储存条件不当时，可在 6 个月内观察到储存相关效应。

评估引物完整性的最佳方法是连续利用标准曲线。复制不准确及解离曲线中存在多个峰（尤其是以前未曾出现过的）是稳定性降低的常见指征。

至于荧光标记的探针和引物，在仪器的多组分视图中观察到超过正常水平的背景荧光即可视为探针降解。

如果荧光探针和引物未降解而染料本身出现降解，当有产物形成但无法在实时荧光定量 PCR 仪中检测出来时，可通过溴化乙锭染色的凝胶显色。

图 31 中的标准曲线突出显示了储存不当的引物产生的效应。图 31A 中的扩增曲线受到了降解引物的消极影响，而图 31B 中的曲线则是储存适当的引物的预期结果。熔解曲线插图可提供更多详情，显示其中存在多种非特异性产物。

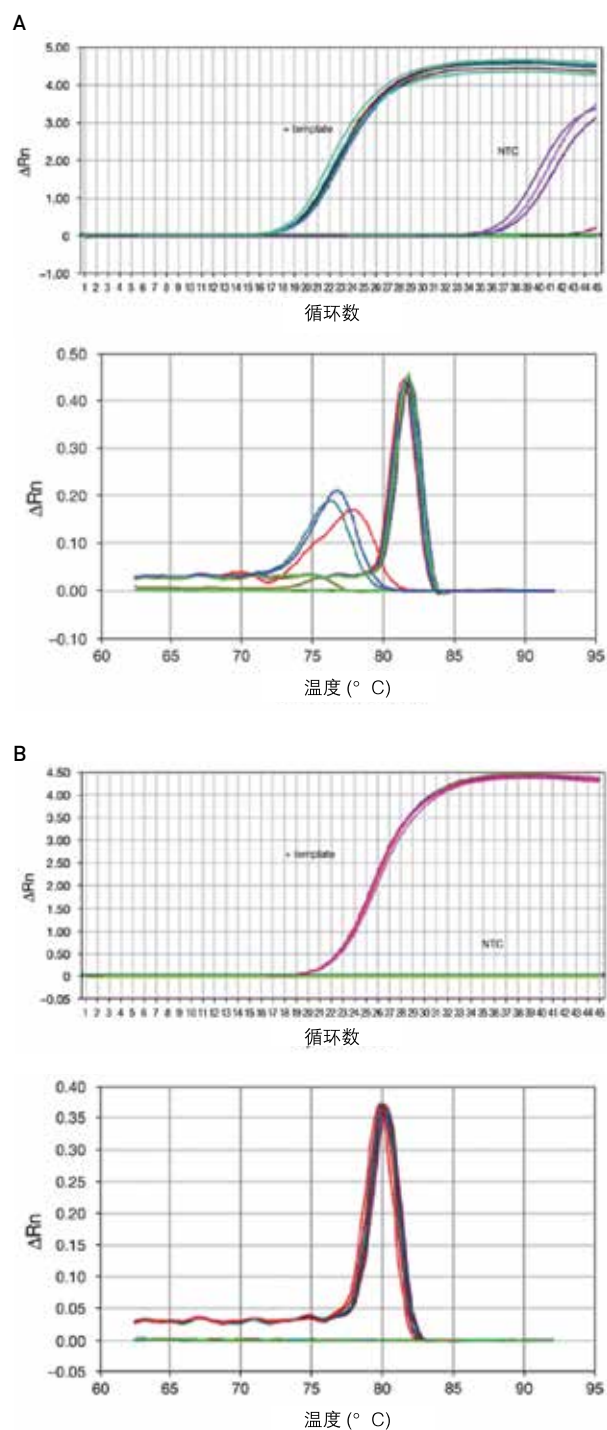


图 31. 扩增曲线分别显示了储存不当的引物（通过熔解曲线和背景荧光显示 [A]）与储存适当的引物（B）产生的效果。

长期保持引物和探针的稳定性

保持引物和探针的稳定性关键有四点。低压冻干的引物在储存时间和温度方面具有更好的灵活性。引物一旦重新溶解，即应置于 -20°C 保存，且若保存时间超过一年则应对其进行监测，看它是否出现功能下降。对于标记的引物和探针，则应采取避免标记物暴露（例如使用不透明管及置于暗处保存），以延长它们的使用寿命。

最后，引物浓度也可影响其稳定性。建议引物的储存浓度不低于 $10\ \mu\text{M}$ ；实际上，在大多数情况下， $100\ \mu\text{M}$ 的引物浓度操作更简单。引物和探针还应分装保存，以减少冻融次数，特别是标记的引物和探针。最后，TE 缓冲液可形成比水更为稳定的环境。此外，含有 $0.1\ \text{mM}$ EDTA 的 TE 缓冲液（标准 TE 中含有 $1\ \text{mM}$ EDTA）是一种理想的溶液，这是由于一些 PCR 反应对 EDTA 的灵敏度可能有一些残存。

NTC 扩增

如前所述，当引物二聚体形成时，如果使用与 DNA 双链结合的染料，在 NTC 反应中也可观察到荧光信号。也存在另一种情况，引物二聚体的扩增也会在 NTC 孔中被观察到。无论是基于探针还是双链 DNA 结合染料的反应，在存在污染物的情况下，也可看到晚期扩增。这可能是一种随机事件，并不是所有 NTC 都会出现扩增，通常是由不常见的加样错误引起。如果在每一个 NTC 反应里都出现扩增，很可能是其中一种或两种试剂被污染了。可采用以下步骤防止或去除污染。

1. 使用干净的工作台，用带核酸降解试剂的溶液擦拭工作台面。
2. 用带 dUTP 和 UDG 的反应预混液降解来自前序 PCR 反应的产物，防止前序 PCR 反应的污染。
3. 用新的反应管尽量通过置换不同来源的试剂，发现出现问题的试剂。

4. 在条件允许的情况下，在不同的实验地点建立反应，尤其是当应用质粒作为对照时（质粒可以被很容易扩散并且难以去掉）。

实时荧光定量 PCR 的抑制和较低的反应效率

在这一点上，应将反应效率视为实时荧光定量 PCR 分析和优化的关键因素。利用标准曲线（通过对目标模板进行连续梯度稀释获得）获取效率值。该效率值可作为总反应的“健康”标志。低效率与高效率所造成的影响有所不同。改善上述两种情形的步骤则相差甚远。理想的反应效率为 100%，但反应效率在 90–110% 范围内都是可以接受的。

导致效率较高或较低的原因

效率高于 110% 说明反应过程中存在抑制作用。引起抑制作用的原因包括 RNA 或 DNA 质量较差，模板浓度过高及含有核酸纯化的残余物。例如，如果采用硅胶柱纯化时，结合 DNA 或 RNA 的离液盐可抑制 *Taq* DNA 聚合酶。如果采用有机萃取法，则苯酚和乙醇残余物也具有相同的效应。

反应效率较低比抑制作用更常见，它是指效率低于 90%。其原因包括试剂浓度不适（主要是引物、镁和 *Taq* DNA 聚合酶，尤其是在多重实验中）。造成反应效率较低的其它因素包括引物 T_m 之间的差异超过 5°C 以及热循环条件不适。如前所述，试管中各种源物质的竞争作用可造成反应效率低下。

不管靶序列的效率是高或低，使靶序列与标准品之间的效率匹配对于维持数据的准确性十分重要。例如，95% 的靶序列 A 效率与 96% 的靶序列 B 效率优于 99% 的靶序列 A 效率与 92% 的靶序列 B 效率。

疑难解析

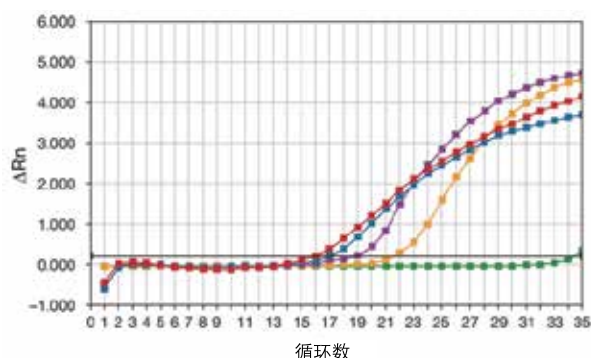


图 32. 连续梯度稀释模板, 评估反应效率。C_i 较小的稀释度呈扁平状且曲线形状异常。随着模板逐渐被稀释, 抑制作用消失, 曲线也呈现更明显的特征性指数期的形状。

效率偏差引发的问题

效率超出 90–110% 的范围可对结果造成人为影响, 易导致假结论, 这主要是由于作为对照的靶序列的效率不同。此外, 抑制作用和较低的效率可影响分析的灵敏度, 并导致动态范围减小及通用性降低 [图 32]。

确定是否存在效率偏差现象

如前所述, 确定某个特定的分析效率是否低下的最佳方法是稀释模板生成标准曲线 (模板稀释的范围应涵盖所有未知样本), 然后查看该范围内的效率。它应尽可能接近 100%。

解离曲线出现多个峰或凝胶显示多种产物意味着反应源物质之间存在竞争作用, 这必将对反应效率产生影响。

解决低效率或抑制作用

一旦确定反应被抑制或效率较低, 则可采取一些步骤将效率值重新调整到理想范围内。

1. 对于抑制作用, 可去除模板浓度最高的反应孔并重新分析标准曲线。如果效率重新回到 110% 以下, 则分析良好。请记住, 在实际分析过程中不可采用从标准曲线上去除的任何浓度。

2. 另一种解决方案是重新纯化模板。切记应延长干燥时间, 以去除乙醇沉淀过程中的乙醇, 或采用另外的柱上洗涤液将离液盐从硅胶纯化物中去除。
3. 通过分析优化可解决效率低下的问题。此过程有时相对简单, 但在某些情况下, 随着分析复杂度的提高, 优化过程可能十分耗时费力。
4. 扩增单个产物时, 将镁的浓度提升至 6 mM 可提高反应效率, 但当出现竞争作用时, 则应降低镁的浓度。
5. 在某些情况下 (主要是多重反应中), 必须采用引物和探针优化基质。此时, 需检测正向引物与反向引物的比值或浓度, 有时甚至还需检测探针比值, 以找出分析的理想浓度组合。最佳引物浓度介于 100 至 600 nM 之间, 而最佳探针浓度则在 100 nM 至 400 nM 之间。
6. 根据引物的 T_m 值, 确保热循环条件 (尤其是退火温度) 适当, 且引物设计时使之有相似的 T_m 值。

有时, 看似与反应相关的问题实际上可能是由软件引起的。验证和/或优化软件设置通常可使结果重新恢复至期望值。

软件分析设置

如前所述, 仪器分析有时会破坏一个成功的分析。对数据准确性影响最大的分析设置包括:

- 扩增曲线基线线性度
- 基线范围设置
- 阈值
- 参考染料

扩增曲线基线线性度是影响结果的参数之一。仪器软件通常能够在曲线的平滑部分自动设置基线。但当 C_t 值出现过早时 (例如使用 18S 作为标准品), 其设置的基线错误地包括了非平直区域。图 33 显示了同一曲线的不同基线设置。图 33A 显示的曲线的基线范围包括第 1 至第 14 个循环, 由于在第 10 个循环中即可检测出荧光, 因此基线设置范围过宽。其结果是造成曲线下降和 C_t 延迟。图 34 显示基线被重新设置在第 2 至第 8 个循环的线性范围内, 使曲线和 C_t 回到准确的位置上。

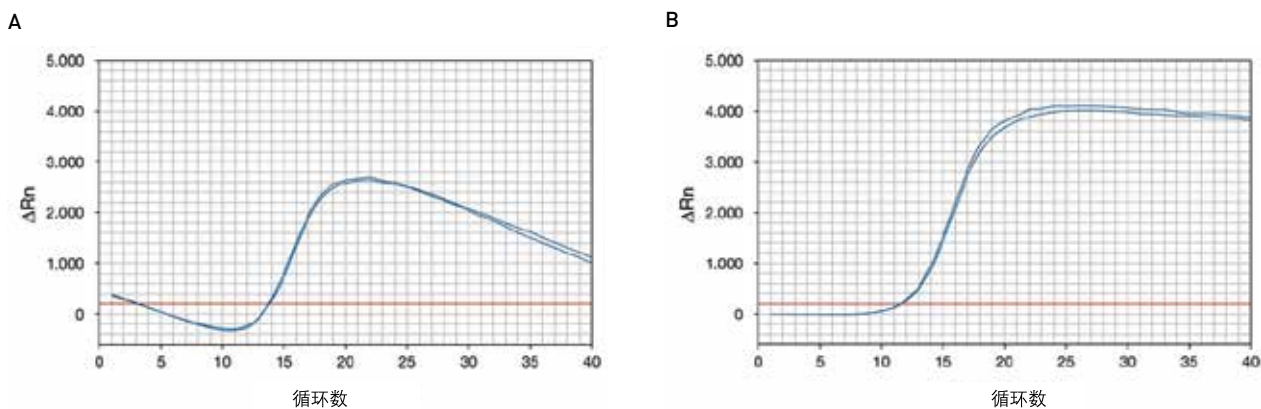


图 33. 扩增曲线显示了设置不当的基线 [A] 和设置正确的基线 [B]。

基线范围设置常被忽略，但它也可对反应效率产生影响。如图 35 所示，仪器默认设置通常在分析的可行范围内。但是，手动调整有时可进一步改善结果。

阈值 (超过背景值的荧光强度，用来确定 C_t) 是另一个由软件自动设置的参数，但也可手动调整 (图 36)。

在对同一程序中的多种试剂盒或化学试剂进行评估时，经常可出现上述情况。软件将自动选择阈值，此阈值更适合平台更高的曲线 (图 35 中的蓝色曲线)。这将导致此数据组中的红色曲线的 C_t 值出现偏差，因为其最佳阈值比此值更低。因此，需对每个数据组进行独立研究，这样才能根据具体情形选择最佳阈值。

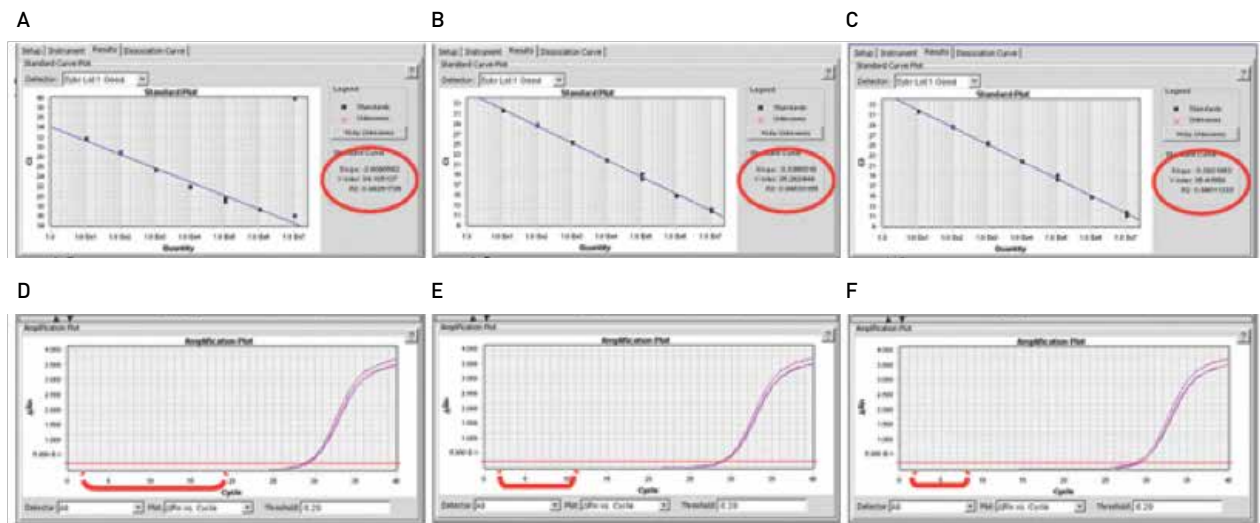


图 34. 比较不同的基线设置方法，达到可接受反应效率。(A 和 D) 这些曲线中基线的手动设置范围很宽，标准曲线的斜率较低——仅为 -2.81，其值不在 -3.58 至 -3.10 (对应于 90-110% 的效率) 的最佳范围之内。(C 和 F) 我们可以看到与图 A 和 D 相同的曲线，但其基线是由仪器自动选择的。现在的斜率在最佳窗口范围内，且分析也在动态范围内。(B 和 E) 这些曲线为手动调整获得的，在基线内另外加入了 4 至 5 个循环，其斜率得到进一步改进，效率更加接近于 100%。

5

疑难解析

同样，默认设置通常已十分适当，但也可将阈值手动拖至指数期中间，以获得更高的准确度(如有需要)。

可通过标准曲线动态范围验证确定分析中的可取模板浓度。还可去除标准曲线上的最高和/或最低浓度，以改善反应效率，但需确保不在实际分析过程中使用这些浓度(图 36)。

通常，可以将极高和极低的模板包括在检测极限范围内，因为如果效率受到影响，则可将终末数据点去除。

采用诸如 ROX 和荧光素等参考染料能够很好地避免因仪器和用户所造成的错误。这些错误十分常见，以至于这个“幕后”因素经常被人们遗忘，其对反应的负面影响也被忽略了。但是，了解仪器软件与染料本身之间的关系是十分重要的。

对于采用参考染料的仪器来说，其软件将惰性染料的荧光信号从靶序列发出的荧光中删除。因此，如果 ROX™ 的强度过高，可导致目标信号返回效果极差，扩增曲线呈锯齿状且不连续(图 37)。

表面上似乎是反应失败了，需要采取大量的优化措施，但从何处开始呢？如果关闭 ROX™ 通道并重新分析标准品和数据，则可发现数据实际上是好的(图 37B)；这是参考染料标准化的问题。

如前所述，在大多数情况下，默认的仪器软件设置效果尚好。但是，对这些设置进行验证可增加在数据准确性方面的可信度。确保软件选择的基线仅包括扩增曲线的平缓部分，并根据需要增加或减小基线范围。在对数曲线视图中查看扩增曲线，确认阈值设置在曲线的指数期的中间附近。调整 y 轴使其与荧光平台强度的比例适当，并记住可将极端值和整个稀释组从标准曲线中去除，以改善反应的效率和 R² 值(只要这些稀释度不会在评估“未知”样本时用到)。

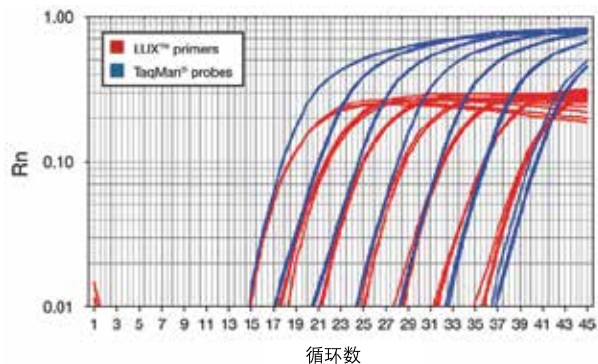


图 35. 对数曲线屏幕截图显示了两组曲线，它们的平台高度和指数期不同。扩增曲线中确定 C_t 的最准确部分位于对数曲线指数期的中间。最佳阈值设置有时因各组数据的不同而异。

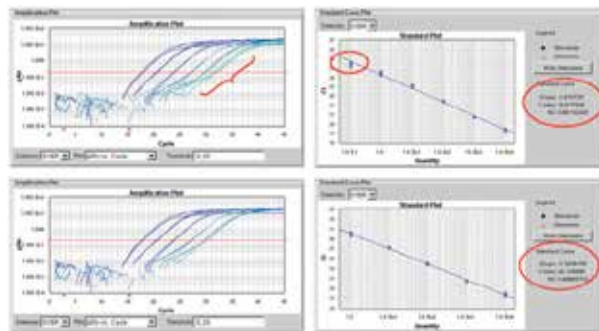


图 36. 通过排除异常数据改进标准曲线的斜率。连续稀释 5 个数量级后进行扩增。在此范围内的斜率仅为 -2.9，超出了理想效率窗口。下图显示的曲线已将最高稀释度从标准曲线中略去，并对其效率进行了重新分析。此时斜率变为 -3.1，已达到验证分析所需的效率。

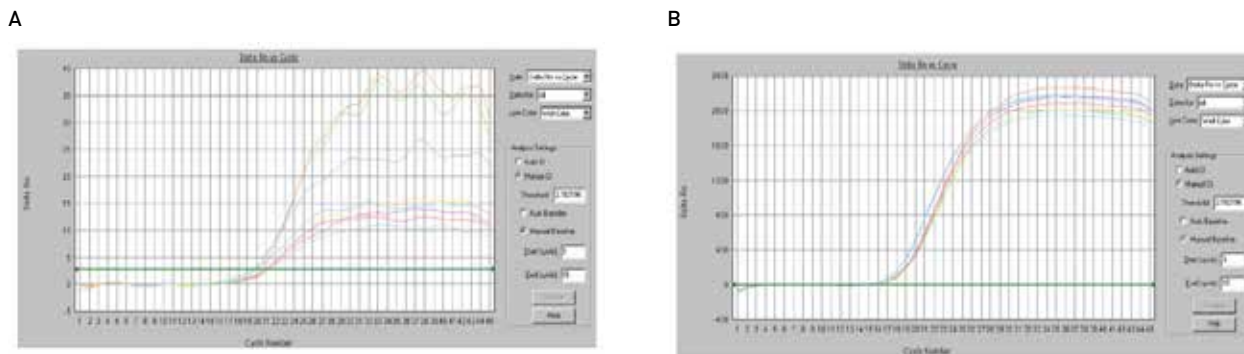


图 37. 校正参考染料。(A) 高浓度的参比荧光染料 (例如 ROX™) 可导致目标信号返回效果较差。(B) 一旦将 ROX™ 信号从分析中去除, 则目标信号重新回到预期范围内。

最后, 如需对不同的分析进行比较, 切记必需确保其基线和阈值设置相同。

疑难解析是验证和采用实时荧光定量 PCR 分析时必不可少的内容。但是, 通过对关键问题进行分类并加以理解, 该过程可变得相对容易。

- 确保引物二聚体不会产生信号或造成反应效率低下
- 采取必要的步骤维持引物和探针的稳定性
- 反应评估过程的最后一步是对标准曲线进行验证
- 了解效率低于 90% 时采用的处理方法与该值高于 110% 的处理方法不同
- 验证并调整仪器分析设置 (如有需要)

无扩增

最后一个可能会发生的问题就是完全没有扩增。一旦确认上述问题都有被一一确认, 那么其他可能带来无扩增的原因包括: 低表达, 反转录问题, 或实验设计问题。

低表达问题

通常基因表达检测所需的 cDNA 量为 1 到 100 ng。但是如果您的目的基因的丰量的样本中很低, 可能就需要更多的样本量。检测一个样本量的范围, 或者更理想的情况下加入阳性对照反应确认反应本身正常。如果您对期望的表达水平不是很确定, 可重新查询文献或 NCBI Unigene 数据库中 EST 表达数据来预估在不同组织中的表达水平。

逆转录的问题

与低表达量相关, 如果您感兴趣的基因在样本中的丰度很低, 您需要增加实验的灵敏度。确认一下您的 qPCR 反应中没有加入过量的 cDNA (最大加样水平为 20% v/v), 因为过量的 cDNA 样本会引入抑制剂降低反应效率。您也可以检查一下逆转录酶和引物。随机引物通常比基于 oligo(dT) 的方法产生更多的 cDNA。另外, 有些酶, 例如 Super-Script® III 逆转录酶经过热稳定性改造, 也会提高 cDNA 产量。检查您的反应中的各组分, 通过优化各组分提高扩增效率。

实验问题

如果没有见到任何扩增, 可能是引物/探针的设计并未针对正确的靶点。检查序列数据库如 NCBI 搜寻目的基因的不同变异型。有可能实验设计知识针对了其中一种变异体, 但是在所研究的样本里并无表达。同时还要检查引物/探针靶向的目的基因的区域, 是在编码区还是内含子? 靶向 5' UTR 区域是不会检查到转染到细胞里的外源基因表达的 (因为 5' UTR 区域是不会包含在表达载体质粒上的)。类似的情况, 如果实验设计是靶向内含子序列的, 也是不会从 cDNA 样本中得到扩增的。



5.2 常见问题

问:特定量的人类基因组 DNA 中有多少拷贝?

答:1 个基因拷贝 = 3×10^9 bp

$$1 \text{ bp} = 618 \text{ g/mol}$$

$$1 \text{ 个基因拷贝} = (3 \times 10^9 \text{ bp}) \times (618 \text{ g/mol/bp})$$

$$= 1.85 \times 10^{12} \text{ g/mol} = [1.85 \times 10^{12} \text{ g/mol}] \times (1 \text{ mole}/6.02 \times 10^{23} \text{ [阿伏伽德罗常数]})$$

$$= 3.08 \times 10^{-12} \text{ g}$$

每个体细胞中含有 6.16 pg 的 DNA (精子和卵细胞中含有 3.08 pg)。每 3.08 pg 的人类 DNA 中含有一个拷贝的非重复序列。因此, 100 ng 基因组 DNA 中含有: $(100,000 \text{ pg 的 DNA})/3.08 \text{ pg} = \sim 33,000$ 个拷贝; 1 ng 的 DNA 包含 330 个拷贝。

问:我为什么需要关注实时荧光定量 PCR 分析的效率?

答:如果您希望比较两个基因的表达水平 (例如在采用标准品基因的情况下), 您就需要对 PCR 的效率有所了解, 以确认您观察到的 C_t 值未受 PCR 试剂污染的影响, 或不是由于优化不当的分析引起的。

问:我发现当模板样本浓度增加时, 扩增曲线的效率反而降低了: 稀释样本形成的曲线斜率为 -3.4, R^2 值为 0.99; 浓缩样本的斜率则为 -2.5, R^2 值为 0.84。

答:您样本的某些成分可抑制 PCR 反应。稀释样本能获得更高效率的原因是其中的抑制剂 (盐或一些其它成分) 被稀释, 无法发挥抑制作用。下列参考文献可解释上述现象:

- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH et al.(2003) 实时定量聚合酶链式反应 (PCR) 数据的无分布型式假定分析. *Neurosci Lett* 339:62-66.
- Liu W and Saint DA (2002) 基于模拟聚合酶链式反应动力学的一种新的实时逆转录聚合酶链式反应分析定量方法. *Anal Biochem* 302:52-59.
- Bar T, Ståhlberg A, Muszta A et al.(2003) 实时荧光定量 PCR 中的动态异常检测 (KOD). *Nucleic Acids Res* 31:e105.

问:我能否比较效率不同的 PCR 反应之间的 C_t 值?

答:您不能将效率不同的 PCR 反应之间的 C_t 值进行比较, 因为 $\Delta\Delta C_t$ 计算方法的前提是 PCR 的效率相当。这正是为何在对未知样本进行定量前必须先优化您的系统的原因。可采用带有效率修正的相对定量标准曲线法。

问:什么是淬灭剂? 为什么要在实时荧光定量 PCR 中使用?

答:淬灭剂可通过与引物或探针结合, 淬灭与引物或探针同时相连的荧光基团发出的荧光。淬灭剂一般用于基于探针的分析中, 它可与荧光基团附着在同一个寡核苷酸上, 淬灭或改变荧光基团发出的荧光波长。这通常通过 FRET (荧光共振能量转移) 来实现。当荧光基团受到激发, 其能量传递至淬灭剂, 发出不同 (更高) 波长的光。常见的淬灭剂有 Dabcyl、TAMRA™ 染料及 Dark 或 Black Hole Quencher® 染料。

问:在什么情况下我应使用一步法而不是两步法 qRT-PCR?

答:两步法 qRT-PCR 多用于检测单个 RNA 样本的多重信息。它还可用来构架 cDNA 文库, 以供进一步分析。但是, 在处理大量样本时, 一步法 qRT-PCR 更方便, 且有助于减少残余污染, 这是由于在 cDNA 合成和扩增步骤之间无需打开管盖。一步法 qRT-PCR 是对整个 cDNA 样本进行扩增, 所以其灵敏度更高, 可检测出低至 0.1 pg 的总 RNA。

问:什么是 MGB-NFQ? 用它作为淬灭剂的好处是什么?

答:MGB-NFQ 是 Minor Groove Binder-Non-Fluorescent Quencher 的缩写。MGB 结构部分提高探针的 T_m 值, 可以设计更短、特异性更高的探针。一般来讲, Taqman® MGB 探针在全配和错配探针之间的 T_m 值差异更大, 这样能够使等位基因的区分更加精确, 使实时荧光定量 PCR 反应更为敏感。

高级主题：数字 PCR



6.1	数字 PCR	62
6.2	数字 PCR 属性	64
6.3	数字 PCR 应用	65
6.3	开始数字 PCR 实验	68

6.1 数字 PCR

数字 PCR 与传统实时荧光定量 PCR 的比较

数字 PCR 采用了与传统实时荧光定量 PCR 相同的引物组、荧光标记物和酶试剂。TaqMan[®] Assay 适用于数字 PCR；但 SYBR[®] Green 染料亦具有兼容性。实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 的主要区别是在数字 PCR 中，样本被分到数千个单独的 PCR 反应中——形成有限稀释。表 1 列出了其他主要差异。与实时荧光定量 PCR 不同，数字 PCR 提供了一种高度精确且灵敏的方法，无需参考样本或标准曲线。这些关键属性受反应数和数字 PCR 反应的体积影响。QuantStudio[®] 3D 数字 PCR 系统利用基于芯片的技术，将一个标准的 PCR 反应混合物分成 20,000 个单独的 PCR 反应。这种直接的样本稀释过程可以使众多反应中的一部分反应含有目标分子，另一部分则不含有目标分子，分别代表阳性和阴性反应。在双槽式 PCR 仪上扩增后，利用阴性反应对样本中的目标分子数进行绝对计数，无需参照标准品或对照品 (图 38)。图 39 显示了数字 PCR 中采用的基本操作步骤。

数字 PCR 中的靶点定量

采用相对简单的统计学分析即可实现数字 PCR 定量。由于每个反应预计含有零、一个或数个分子，因此阳性信号与阴性信号的比例将呈现经典的 Poisson 分布。例如，如果您的病毒 DNA 样本和数字 PCR 试剂混合物中包含 20,000 个拷贝的病毒靶点，您将混合物分为 20,000 份，则理论上每个反应中包括约 1 个拷贝。当然，也许有很多反应中包括了零个、两个或超过两个拷贝——出现这些结果的可能性符合 Poisson 模型。

图 38 显示了 Poisson 分布模型。继续我们的示例，如果 20,000 个数字 PCR 反应中，20% 发出阴性信号，则可在 x 轴上寻找 20% 对应的靶点拷贝数，并根据图上的虚线识别每个反应对应的平均拷贝数。在本例中，结果为 1.59 个拷贝/反应。由于计算的方式为百分比，因此不论反应次数如何，结果均相同。但是区别在于，反应次数越多，置信区间越窄，统计数据的可靠性越高。

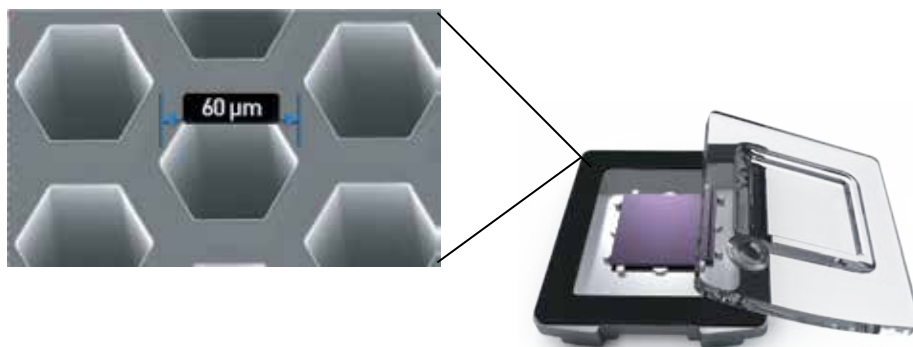


图 38. QuantStudio[®] 3D 数字 PCR 20K 芯片。每块芯片包括 48 个子阵 x 64 个通孔/子阵。反应板的亲水性和疏水性涂层可通过毛细管操作使试剂保留于通孔内。

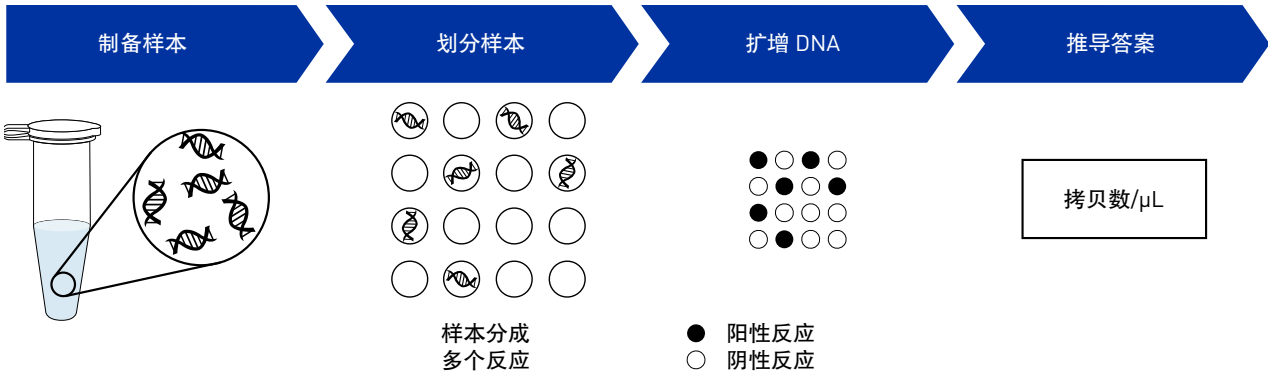


图 39. 数字 PCR 采用了常见的技术和简单的工作流程。

	传统 qPCR	数字 PCR
实验输出值	C_t , ΔC_t 或 $\Delta\Delta C_t$	拷贝数/ μL
定量	相对定量	绝对定量
影响结果的因素:	检测试剂 (如 TaqMan [®] Assay 或 SYBR [®] Green 染料)	结果不受这些因素影响
	使用的实时荧光定量 PCR 仪器	
	PCR 引物/探针的扩增效率	

表 1. 传统 qPCR 与数字 PCR 比较。

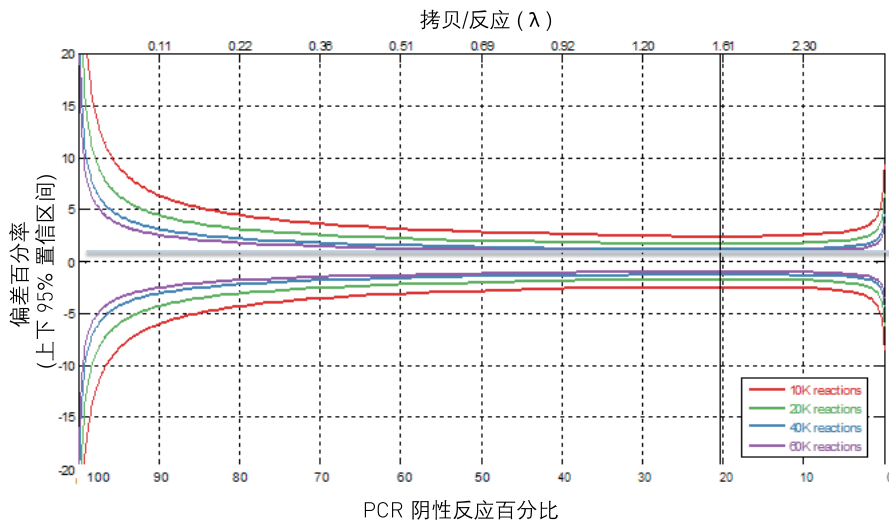


图 40. 采用 Poisson 方程计算数字 PCR 数据的靶点量。

6.2 数字 PCR 属性

低水平病原体的检测

数字 PCR 克服了实时荧光定量 PCR 的限制，可以提供更多属性，拓展了 TaqMan® Assay 的性能。这些属性包括三个主要类别——更高的精度、灵敏度和特异性，无需标准曲线即可实现绝对定量。

数字 PCR 如何达到更高的灵敏度、特异性和精度？

灵敏度受分析总体积影响。实际上它与实时荧光定量 PCR 的差异不大；但是，数字 PCR 的结果统计是通过靶点的大量重复完成的，使我们能够看到是否可以检测目标的靶点。想象下一个装满球的容器 [图 41]。从容器中取出的球数量越多，您捕获容器中目标球的几率越大。

特异性受分析和运行的重复数影响。数字 PCR 将样本分成单独的反应，拓展了目前的 TaqMan® 实时荧光定量 PCR Assay 的性能，提高了特异性。例如，一个样本含有 99 个野生型分子和 1 个突变型分子，相当于突变的比例为 100 分之 1，或 1%。在标准实时荧光定量 PCR 模式下使用 TaqMan® SNP Genotyping Assay，单一突变型分子便消失在野生型拷贝的海洋中 [图 42A]。首先将样本分成小份时，含有突变型分子的反应中存在竞争关系的野生型序列数量减少，有效地降低了背景噪声。如果份数足够，则反应孔中野生型信号不会盖过突变型信号。在图 42B 所示的范例中，将我们的样本分成二十个数字反应，则每份中的样本复杂度降至 5 分之 1 或 20%——理论上，相比起始样本提高了二十倍。

精度受运行的重复数影响。增加重复数可以提高结果的统计学意义，从而提高了您测定的数值代表样本中实际靶点数量的可信度。为获得最高的精度，阴性反应百分比应在 5% 至 80% 之间。

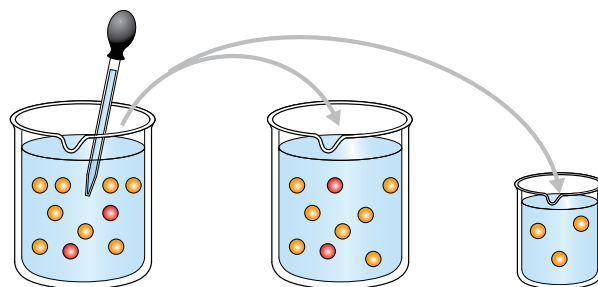


图 41. Poisson 原理假定从总样本中的取样体积适当。提高总样本的取样量能更准确地测定靶点数量。

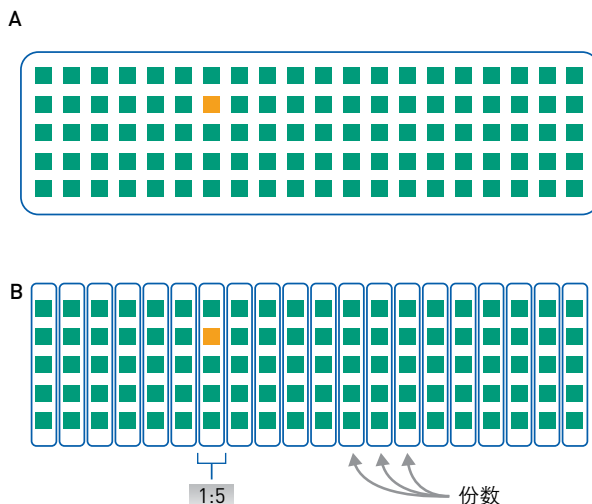


图 42. 数字 PCR 将样本分成单独的反应，拓展了目前的 TaqMan® 实时荧光定量 PCR Assay 的性能，提高了特异性。

6.3 数字 PCR 应用

精确的拷贝数变异检测

拷贝数变异 (CNV) 是指基因组 DNA 序列拷贝数与参照或标准序列不同的基因组修饰。基因组改变 (如插入、缺失、倒位或易位) 可以导致双等位基因或多等位基因 CNV。CNV 与疾病易感性或抗病能力相关, 因此它是一项十分重要的研究领域。目前存在许多 CNV 检测方法, 包括原位荧光杂交 (FISH)、比较基因组杂交 (CGH)、阵列比较基因组杂交 (aCGH)、实时荧光定量 PCR (qPCR) 和下一代测序 (NGS)。

尽管上述部分技术取得了一定的进展, 但在很多情况下, 测量的精度不足以确定靶点和参照序列比例极小的拷贝数

差异。数字 PCR 技术能够实现高度精确的测量, 检测并准确定量低百分比的拷贝数差异。

采用 QuantStudio® 3D 系统和靶向 17、6 或 8 号染色体长臂上的 *CCL3L1* 基因位点的标准 TaqMan® Copy Number Assay, 对从卡瑞尔人数据库中获取的 9 个基因组 DNA 样本进行分析。重复测量结果显示, 样本中每个基因组的拷贝数变异为 0 至 8 个拷贝 (图 43A)。由于检测的高精度, 可以清晰辨别出包含 7 个和 8 个拷贝的样本之间的明显差异, 说明数字 PCR 能够区分低于 1.2 倍的差异 (图 43B)。

A

样本	重复数	预期拷贝数	测得拷贝数 (平均值)	标准差	CV (%)
NA17245	6	0	0.08	0.06	N/A
NA17251	6	1	0.98	0.02	2.21
NA17258	6	2	1.96	0.05	2.47
NA17132	6	3	2.98	0.06	1.85
NA19194	8	4	4.00	0.05	1.22
NA18507	8	5	5.11	0.13	2.50
NA17110	8	6	5.91	0.12	2.07
NA17202	8	7	7.02	0.07	1.02
NA18854	8	8	7.95	0.20	2.55

B

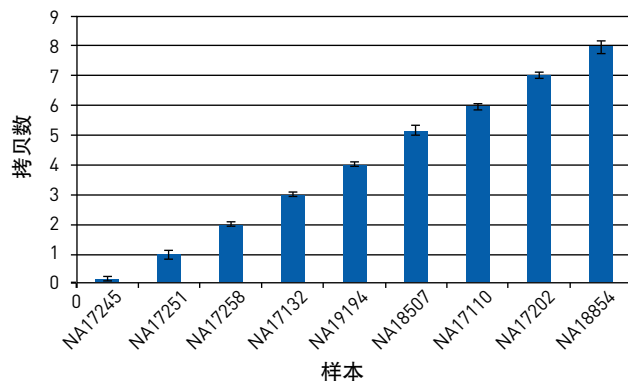


图 43. 17 号染色体上的 *CCL3L1* 基因位点拷贝数分析的精度。[A] 检测 9 个 DNA 样本的拷贝数。每组重复的 CV (第 6 列) 低于 2.6%, 证明每个重复组中的检测重复性很高。[B] 无重叠的误差线显示, 通过精确测量能够区分出包含 7 至 8 个拷贝 *CCL3L1* 的样本的统计学差异。

高级主题：数字 PCR

稀有等位基因检测

稀有等位基因检测在癌症研究等领域具有重要意义，因为重要调控基因（如原癌基因或肿瘤抑癌基因）中的突变累积是促进肿瘤发生的一个重要因素。极少量体细胞的上述突变即足以促进癌症发生或发展。

由于这些突变均为稀有突变，因此需要具有高信噪比和低假阳性与假阴性比例的分析。

常用的 SNP 基因分型技术，如毛细管电泳 (CE) 测序和实时荧光定量 PCR，用于检测突变率不低于 20% (或约五分之一的细胞) 的细胞时最高效。将实时荧光定量 PCR 试剂 (如 TaqMan® Assay) 与数字 PCR 方法相结合，研究人员现已能够检测低至 1%——甚至更低的突变细胞 (图 44)。

数字 PCR 先将样本分成众多单独的反应后再扩增，降低了含有突变型分子的反应中存在竞争关系的野生型序列的数量，有效地降低了背景噪声。如果份数足够，则反应孔中野生型信号不会盖过突变型信号。由于各数据点均为数字结果，因此可以计算各个等位基因、突变型和野生型的总计数及比例 (图 45)。

下一代测序文库的绝对定量

下一代测序 (NGS) 文库定量几乎无需样本处理，无需使用数字 PCR 生成标准曲线。利用该方法可以实现精确的文库定量，这是 Ion Torrent™ 和其他 NGS 工作流程的关键步骤，可以使下游测序产量最大化。为获得高精度，我们提供了一款 TaqMan® Assay，同时覆盖了各文库特异性的正向和反向接头。

该方法只定量同时包含上述两个接头序列的文库重组体。最后，使用数字 PCR 定量 NGS 文库可以确保定量准确，几乎无需重新运行或重复进行样本测序，降低了总测序成本。如需了解有关该应用的更多信息，请登录 lifetech-nologies.com/dpcrngs

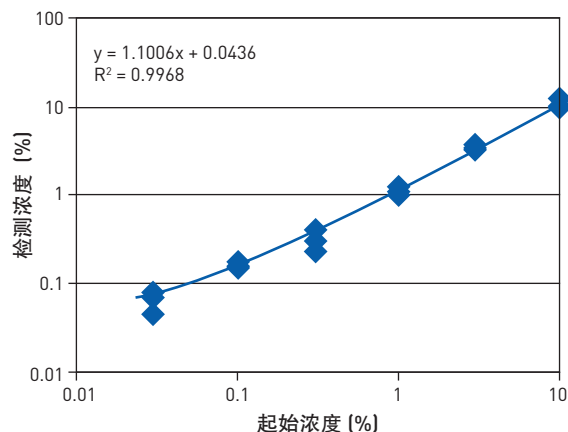


图 44. 采用添加-回收方法检测稀有等位基因。将不同数量的来源于三种不同的 *KRAS* 致癌等位基因的 DNA 加入恒量的正常 DNA 中。请注意，起始浓度和检测浓度具有极佳的相关性；线性斜率表示突变等位基因定量准确。

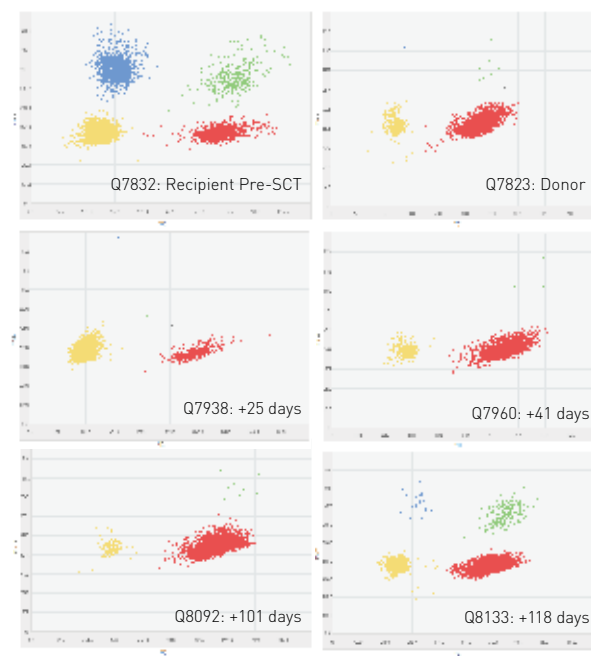


图 45. 骨髓移植样本中的等位基因嵌合。选择可以区分骨髓供体与受体的两个等位基因。在进行干细胞移植之前 (pre-SCT) 以及移植之后的指定时间采集样本。请注意，受体的等位基因在 101 天后开始重新显现，118 天变得十分明显，表示复发。

核酸标准品的绝对定量

准确的基因检测通常需要与参照样本和分析标准品进行比较。参照样本标准化在测量领域尤其重要。对于很多生物体或应用而言，通常没有合适的参照样本提供。采用传统实时荧光定量 PCR 生成参照标准品需要考虑如何对参照样本进行起始校准，其长期稳定性，以及是否有足够的参照材料完成未来的所有研究。此外，缺乏广泛采用的标准品也影响了不同实验室之间的比较。

数字 PCR 不依赖参照样本或分析标准品；它可用于绝对定量，检测目的核酸靶点的精确拷贝数 (图 46)。该技术尤其适用于参照样本和分析标准品校准。通过直接拷贝数测定，数字检测的分析标准品可使不同实验室对结果进行比较，确保基于相同的绝对基线进行检测。

低倍数基因表达变化

实时荧光定量 PCR 常用于检测差异基因表达；但该方法一般只能检测出两倍或者更大的差异。而一些研究则需要检测低于两倍的表达变化。此外，通常需要表达其相对于参照基因的差异基因表达，如管家基因 *actin*。

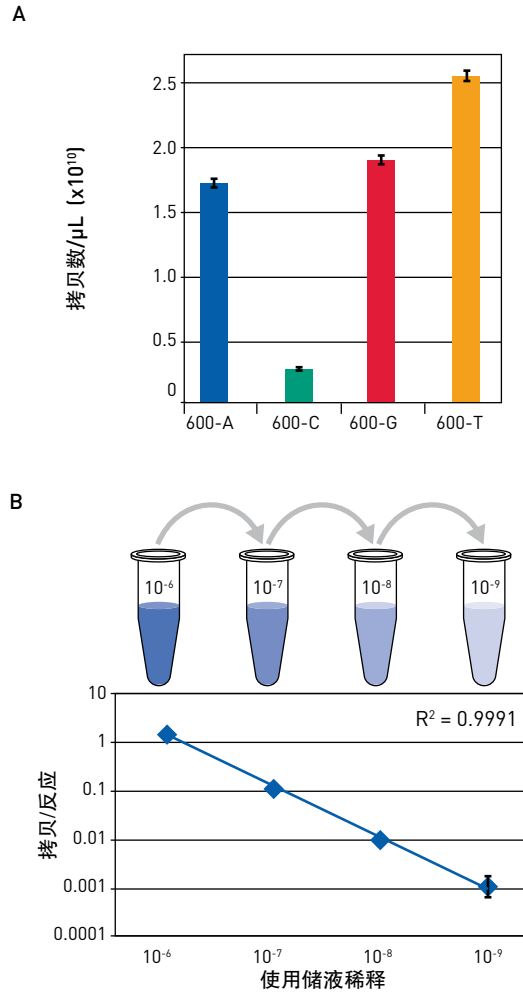


图 46. 数字 PCR 可以精确定量标准品，无需使用标准曲线。**[A]** 利用数字 PCR 检测四个标准品，重复两次，结果以绝对拷贝数/微升表示。较小的误差线证明各样本检测的精度极高。**[B]** 对于样本 600-T，进行 10 倍序列稀释，稀释度达 4 log。计算每个稀释度各反应的拷贝数，结果证明其具有极佳的相关度 (0.9991)，各稀释度提供了极高的精度。

高级主题：数字 PCR

数字 PCR 的测量精度高达 $\pm 10\%$ 甚至更高，能够分辨两倍或更低的差异变化 (图 47)。

此外，数字 PCR 能够对转录本进行绝对定量，无需参照基因。与实时荧光定量 PCR 一样，数字 PCR 需要将 RNA 转

变为 cDNA。鉴于转变效率对于实验灵敏度而言至关重要，因此我们提供了高性能 cDNA 逆转录试剂盒，可无缝整合至数字 PCR 基因表达工作流程。

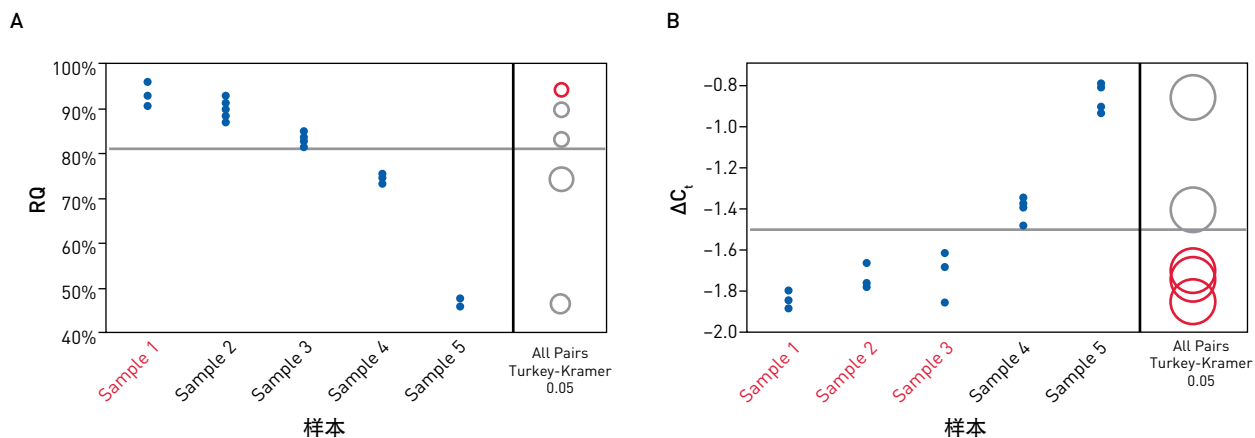


图 47. 数字 PCR (A) 和实时荧光定量 PCR (B) 的定量精度比较。样本 1 至 5 是不同比例的合成 miRNA hsa-miR-19b 和 hsa-miR-92 的混合物：样本 1，100%；样本 2，95%；样本 3，90%；样本 4，75%；样本 5，50%。逆转录后，利用 qPCR 和数字 PCR 在 QuantStudio® 3D 系统上检测 cDNA。报告各样本的 hsa-miR-19b 和 hsa-miR-92 qPCR 的 ΔC_t 。报告各样本的数字 PCR 相对定量结果 (百分位数)。在 QuantStudio® 3D 系统上进行数字 PCR 能够鉴别样本 1 和 2 之间 5% 的差异 (Tukey-Kramer HSD 检验，用无重叠的圆圈表示)，而实时荧光定量 PCR 甚至无法鉴别样本 1 和 3 之间 10% 的差异。采用 JMP 软件对实验重复样本进行 Tukey-Kramer HSD 检验。

6.4 开始数字 PCR 实验

要进行数字 PCR 实验，必须对样本进行稀释，使每个反应中包括一个或零个分子。首先使用分光光度计建立起始浓度，将 ng/ μ L 转换为拷贝/ μ L。然后使用该数值计算各样本靶向 20,000 拷贝/芯片所需的样本体积。如果您的样本的靶点拷贝数/基因组已知，稀释样本，上样至 QuantStudio® 3D 数字 PCR 20K 芯片，使各通孔反应中包含 0.6 至 1.6 拷贝的目标序列。例如，假定每个基因组中存在 3.3 pg/拷贝的特定基因，反应孔体积为 865 μ L，则将特定样本中的 gDNA (原始) 稀释至 600 拷贝/ μ L 或 1.98 ng/ μ L (最终反

应)，使每个反应孔中包括 0.6 拷贝。参照 QuantStudio® 3D 数字 PCR 系统产品手册，了解如何测定目标拷贝数/基因组。

设置数字 PCR 实验时，每种应用领域均有需要考虑的一组因素。请参照 QuantStudio® 3D 数字 PCR 系统实验设计指南，进一步了解应用特定的说明。您可以登录 lifetechnologies.com/quantstudio3d 或访问数字 PCR 论坛社区 lifetechnologies.com/dpcrcommunity 获取。



如需了解更多信息, 请登录 lifetechnologies.com/qpcr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2014 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. TaqMan® and AmpliTaq Gold® are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license. iCycler iQ, iQ, and MyiQ are trademarks or registered trademarks of Bio-Rad Laboratories, Inc. LightCycler is a registered trademark of Roche Diagnostics GmbH. Rotor-Gene is a registered trademark of Qiagen GmbH. LCGreen is a registered trademark of Biofire Defense, LLC. EvaGreen is a registered trademark of Biotium, Inc. Black Hole Quencher is a registered trademark of Biosearch Technologies, Inc. BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine. C0010759 1214

ThermoFisher
SCIENTIFIC