

The background features a large, semi-transparent globe of the Earth in the center, surrounded by several glowing blue spheres of varying sizes, some in sharp focus and others blurred, creating a bokeh effect. The overall color palette is dominated by deep blues and teals.

ThermoFisher
S C I E N T I F I C

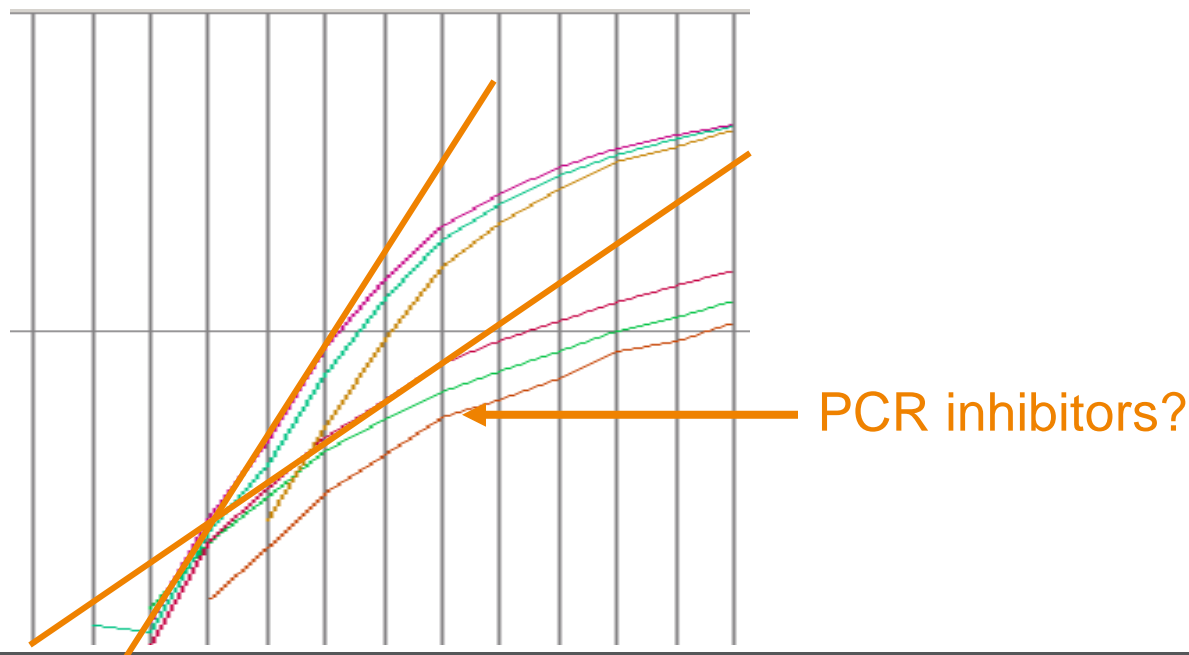
定量PCR数据常见问题分析

The world leader in serving science

常见问题一：抑制物（Inhibition）

扩增曲线斜率不一致提示存在抑制物

- 在指数增长期，扩增曲线的斜率应当有良好的一致性，即所有的曲线都应该是平行的。
- 如果扩增曲线的斜率不一致，就提示可能样本的质量不好。



- 黑色素
- 多糖类
- 血红蛋白
- 尿素
- 其他
- 乙醇
- 蛋白酶K
- 胍盐
- 苯酚

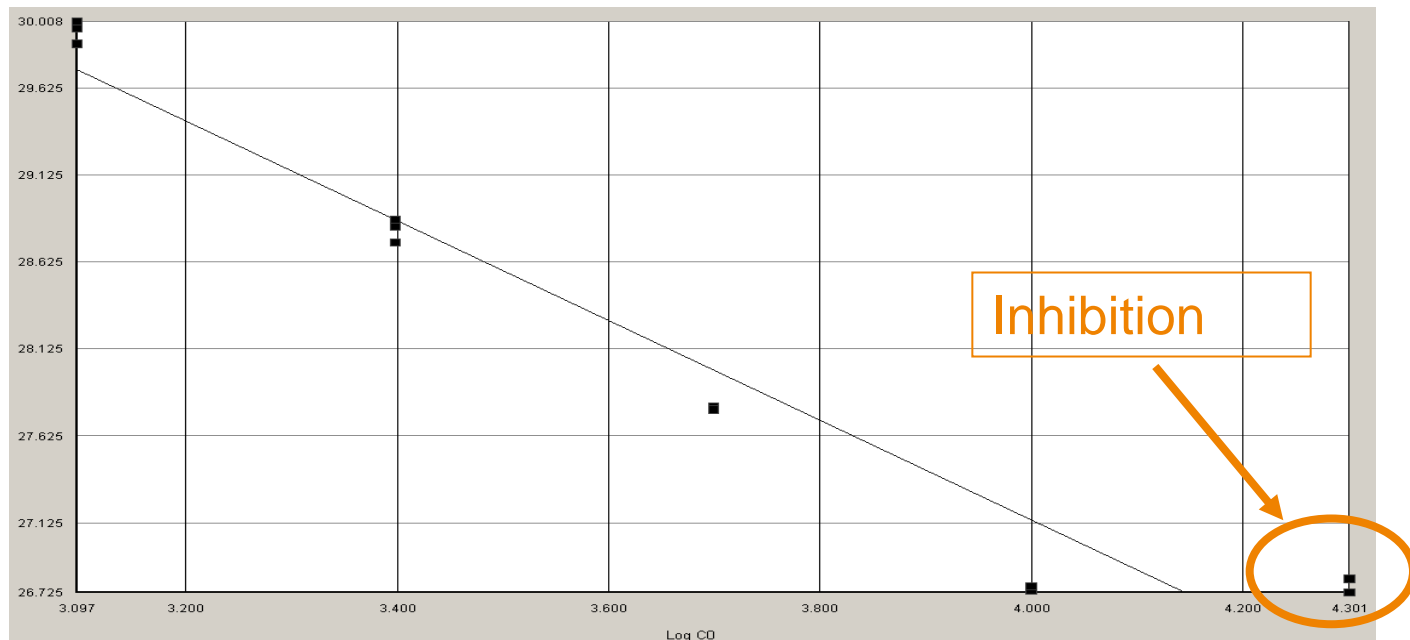
- 用分光光度计测量样品260/280比值。
 - DNA纯度: $OD_{260}/OD_{280}=1.8$
 - RNA纯度: $OD_{260}/OD_{280}=2.0$
- 将样品梯度稀释, 制作标准曲线

标准曲线检查DNA样本质量

- 以一个高浓度的样本(cDNA or gDNA)作为起始样本
- 对样本进行梯度稀释
- 每个稀释度重复三次进行绝对定量实验
- 检查标准曲线的线性

抑制物的存在导致PCR过程受到抑制

- 正常标准曲线所有的点都应该落在同一条线上



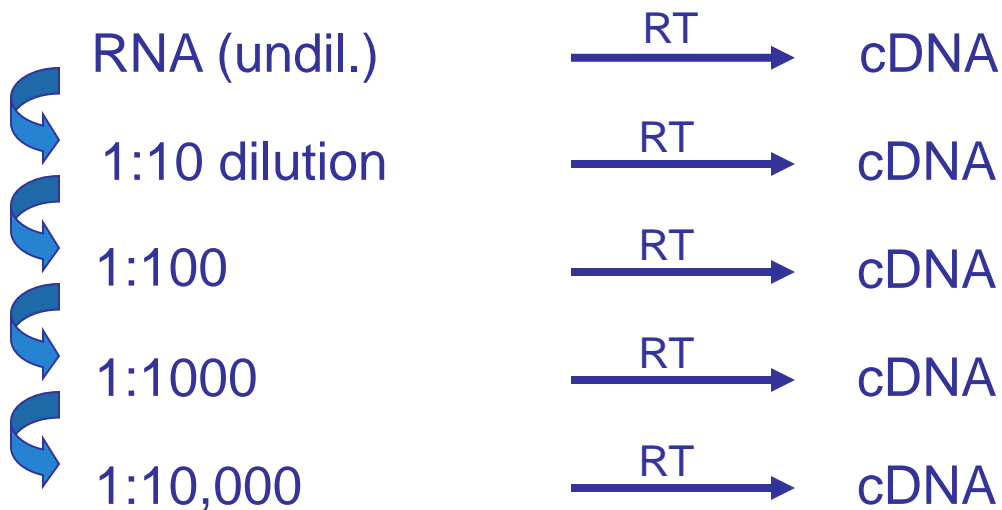
- 抑制物的影响可以通过稀释样品消除

抑制物同时会抑制逆转录反应

- 以RNA为起始模板, 也会受到抑制物的影响。
- 逆转录很容易受到抑制物的影响, 使得cDNA的产量下降.
- 检测不同浓度RNA进行RT的效率是检测是否存在抑制物的好方法。

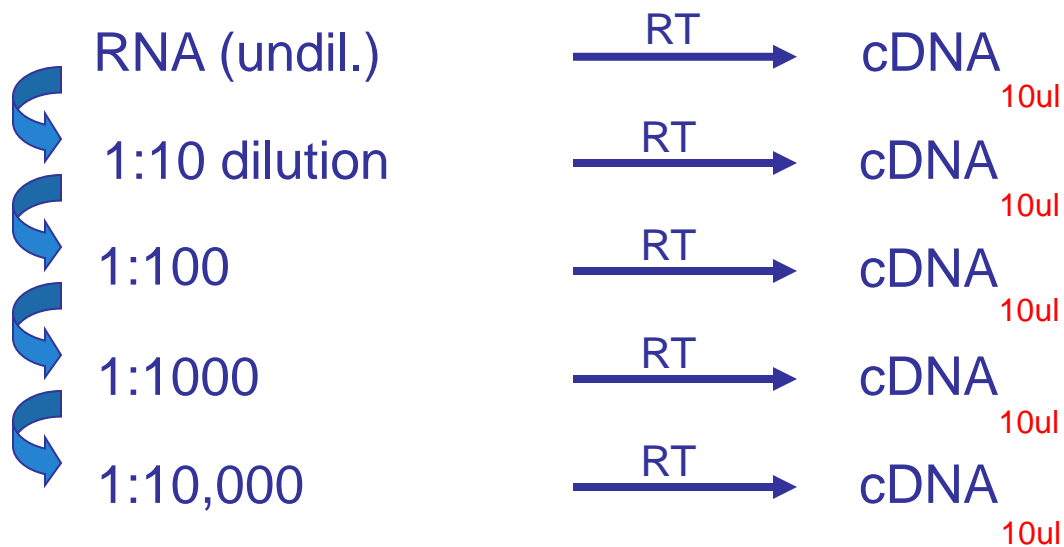
制作RNA标准曲线

如何制作RNA标准曲线？



用同样的方法提取的一组未知 RNA，选择一个高浓度的RNA作为起始模板。

如何制作RNA标准曲线？

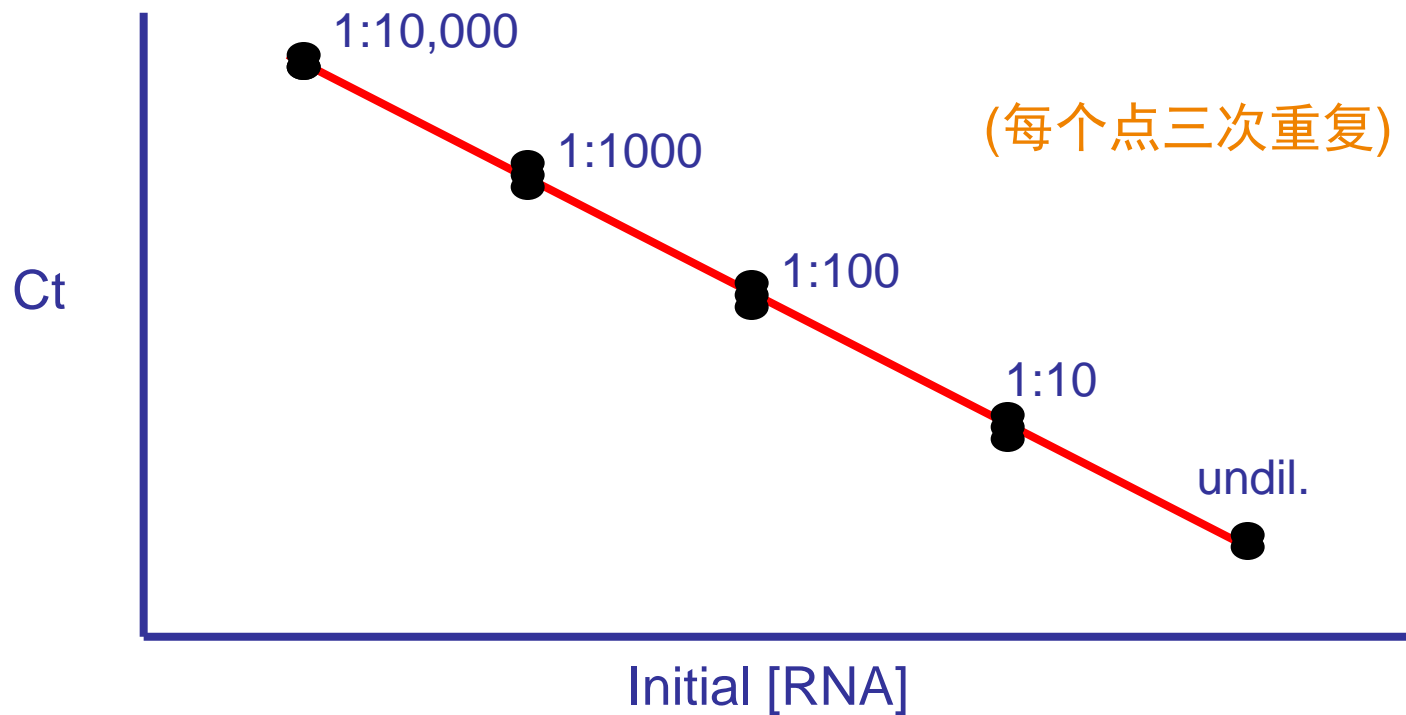


将每个梯度的RNA都逆转录为cDNA；注意每个逆转录反应的体积应该一致。

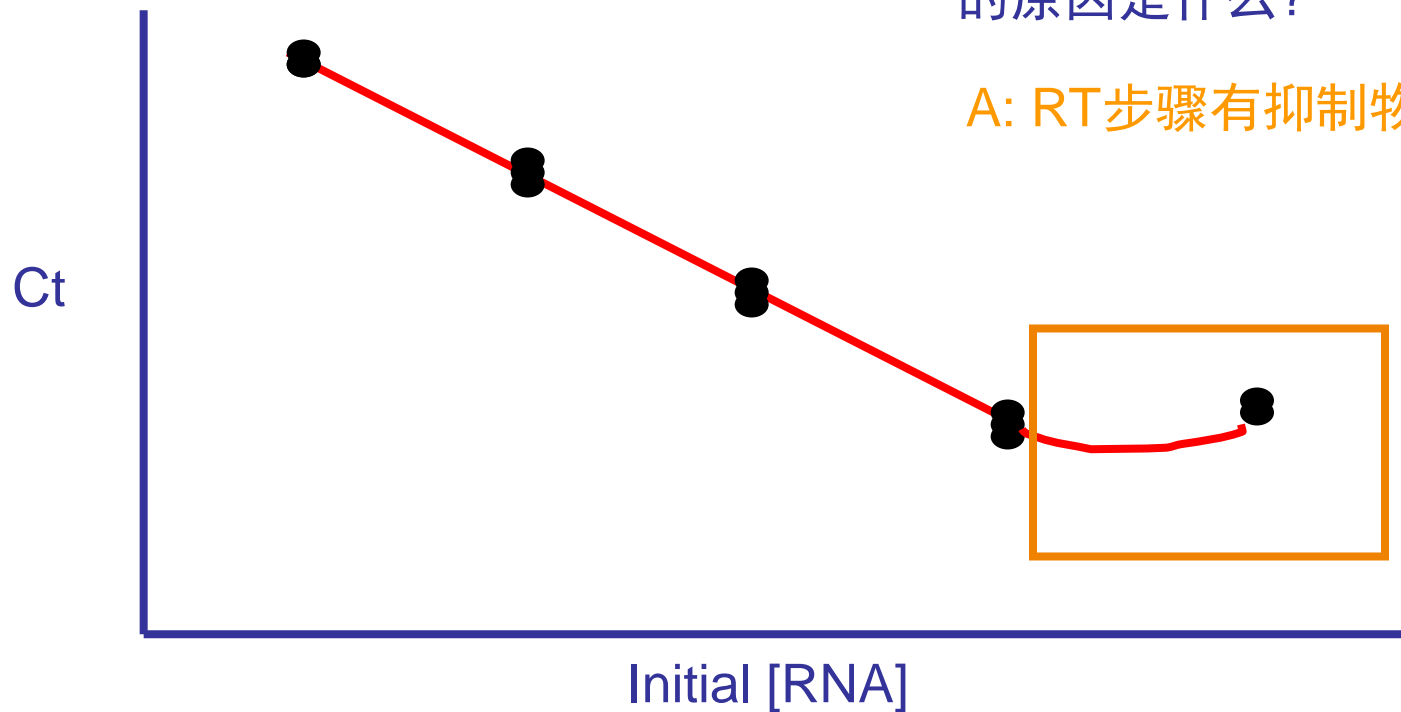
Finally . . .

运行绝对定量生成标准曲线，
注意加入cDNA的模板量应该**一致**。

查看RNA标准曲线的线性



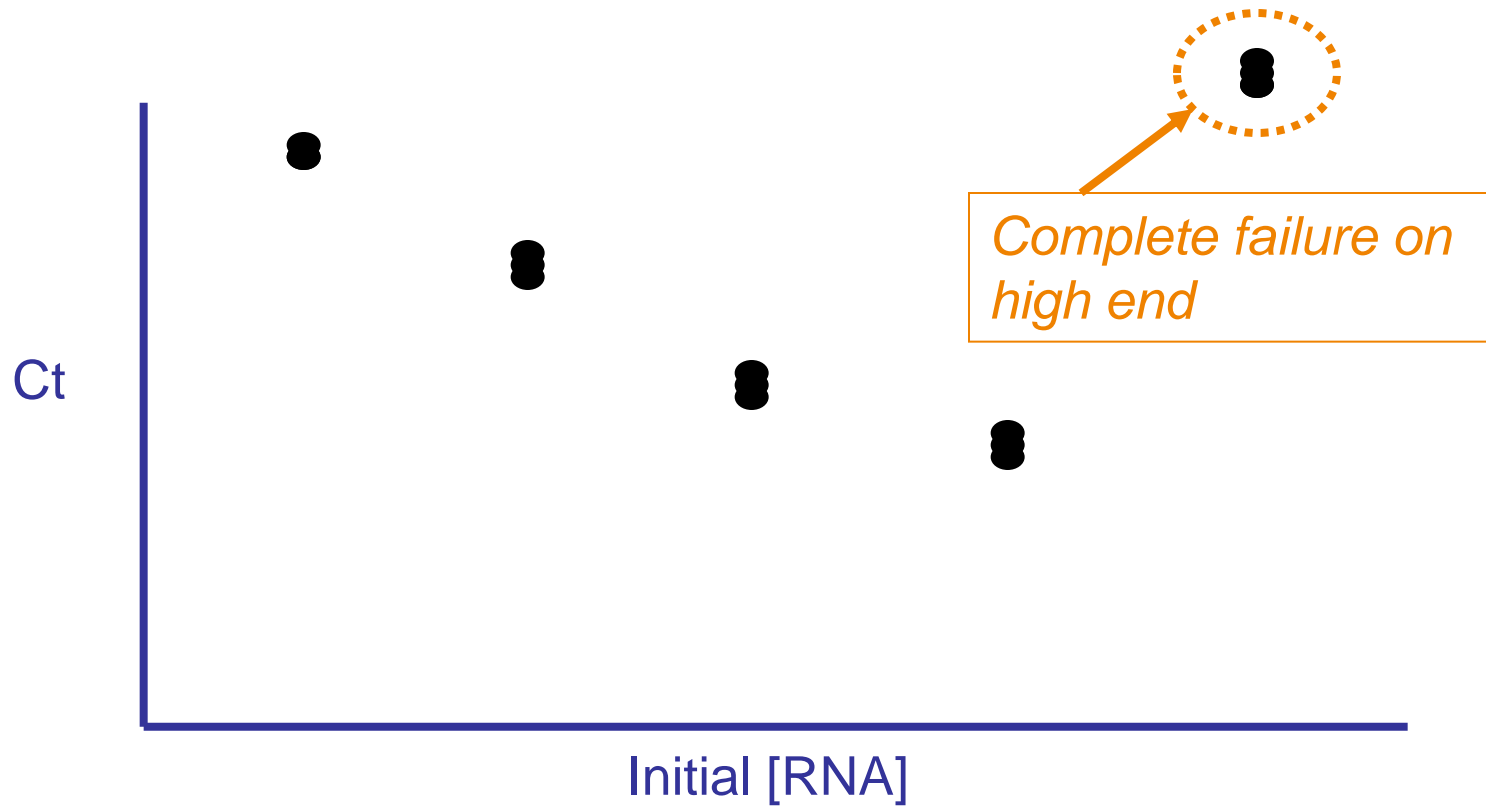
查看RNA标准曲线的线性



Q: 造成这种曲线的原因是什么?

A: RT步骤有抑制物存在

强抑制物存在的例子

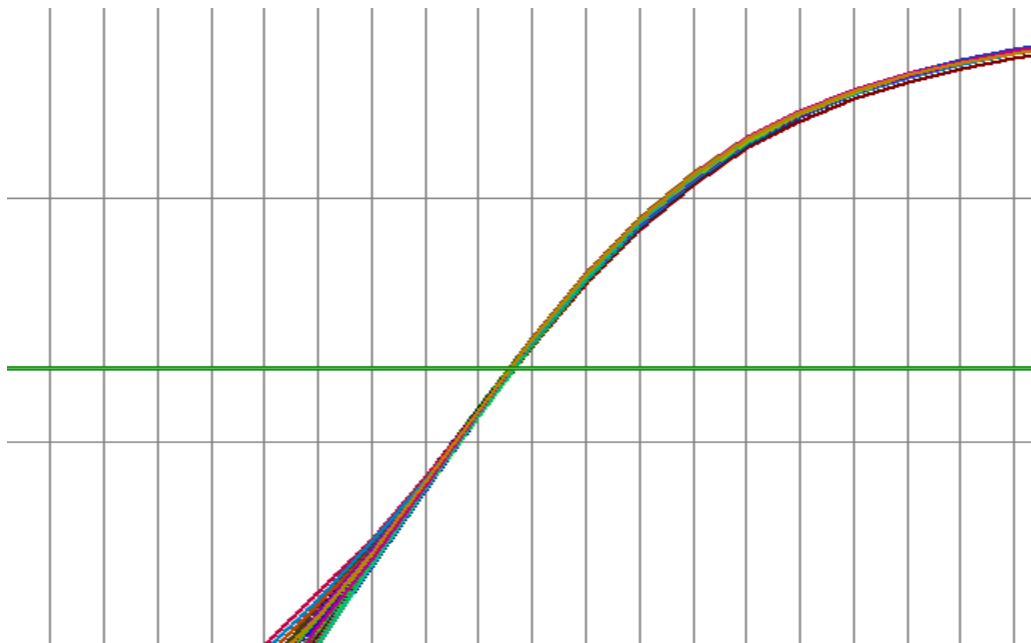


常见问题二：重复性差

实验结果的重复性

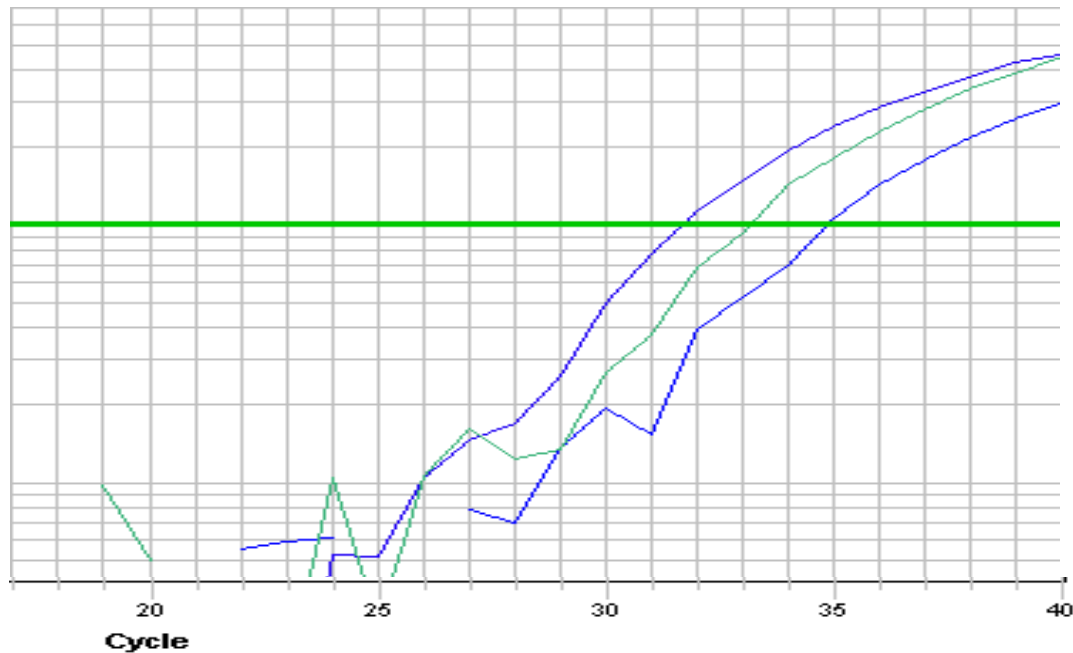
- 为精确定量，对每个样品我们都要做重复实验（通常至少为3个重复）。
- 目标是所有复孔CT值都相近。
- 这样，试验结果就有很好的精确度。

重复性好



40次相同的重复
(Std. dev of Ct = 0.03)

重复性差



3次相同的重复
(large deviation in Cts)

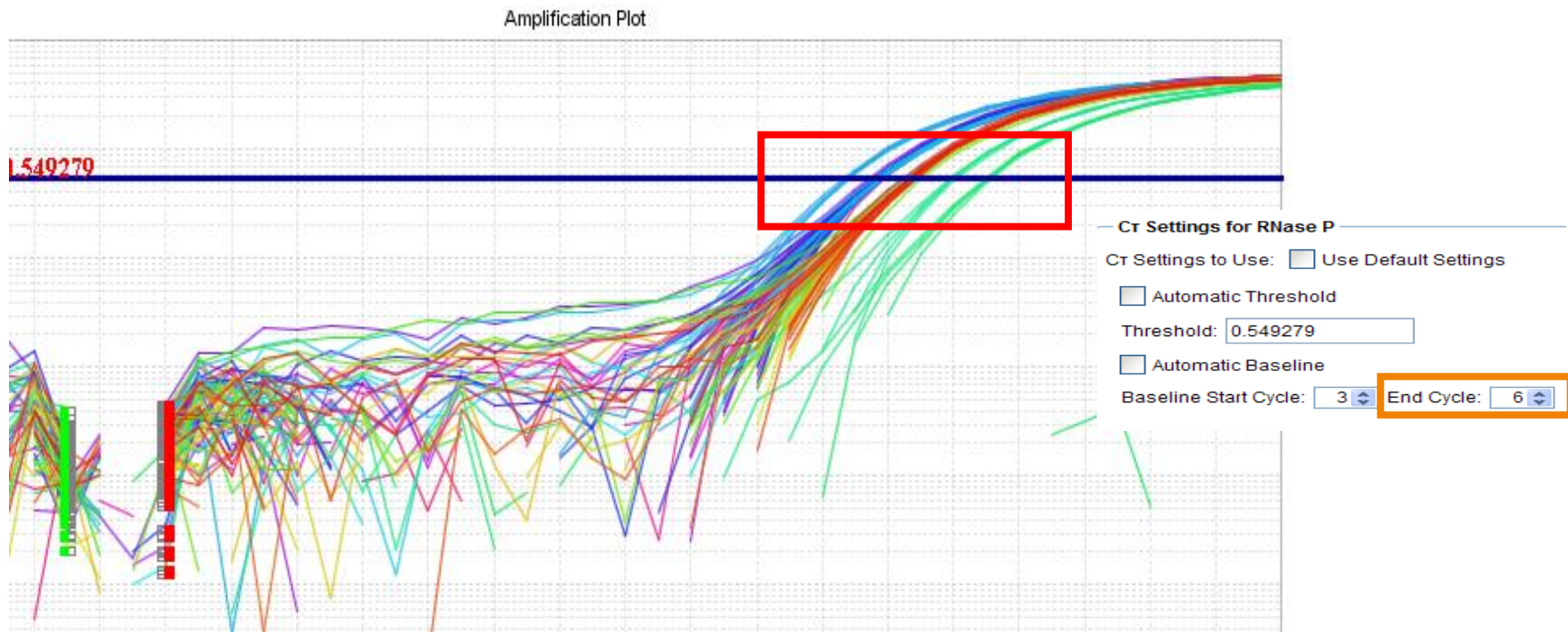
造成重复性差的原因

- 基线，阈值设置
- 加样误差(操作?加样器?)
- 没有将试剂和样品充分混匀
- 低拷贝的样品→泊松分布
- 没有使用ROX校准

造成重复性差的原因

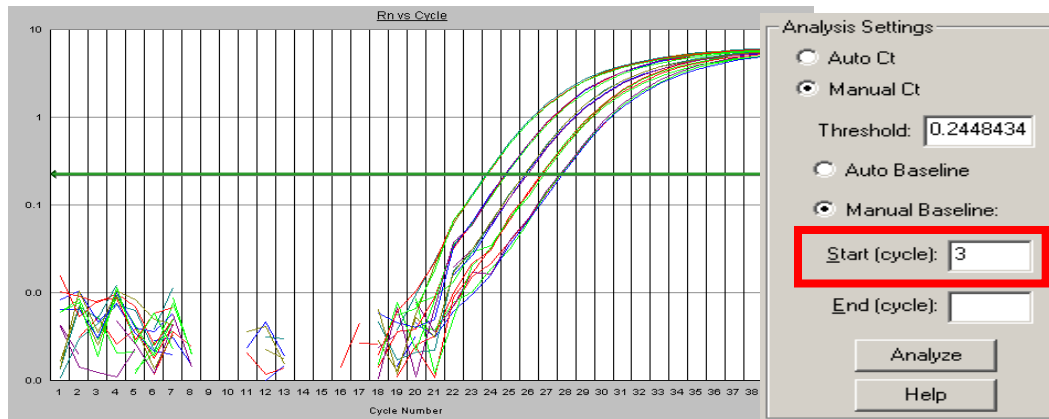
- 基线， 阈值设置
- 加样误差(操作?加样器?)
- 没有将试剂和样品充分混匀
- 低拷贝的样品→泊松分布
- 没有使用ROX校准

基线设置太低影响精确度和准确度



基线终止位置设置太低 (3-6)

起始位置：基线起始值（Start）设置为3...不同试剂？



Analysis Settings

Analysis Settings for EXAMPLE_AQ

CT Settings | Flag Settings | Advanced Settings

CT Settings for RNase P

CT Settings to Use: Use Default Settings

Automatic Threshold

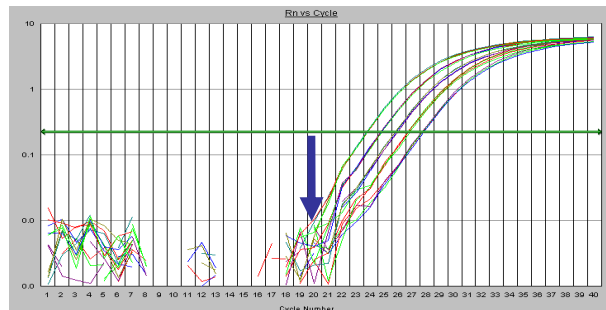
Threshold: 0.549279

Automatic Baseline

Baseline Start Cycle: 3 End Cycle: 4

手动设置基线

终止位置：基线终止值（End）设置在信号上升之前



信号在20个循环开始上升

Analysis Settings

Auto Ct
 Manual Ct

Threshold: 0.2448434

Auto Baseline
 Manual Baseline:

Start (cycle): 3

End (cycle): 19

Analyze

Help

Analysis Settings

Analysis Settings for EXAMPLE_AQ

CT Settings | Flag Settings | Advanced Settings

CT Settings for RNase P

CT Settings to Use: Use Default Settings

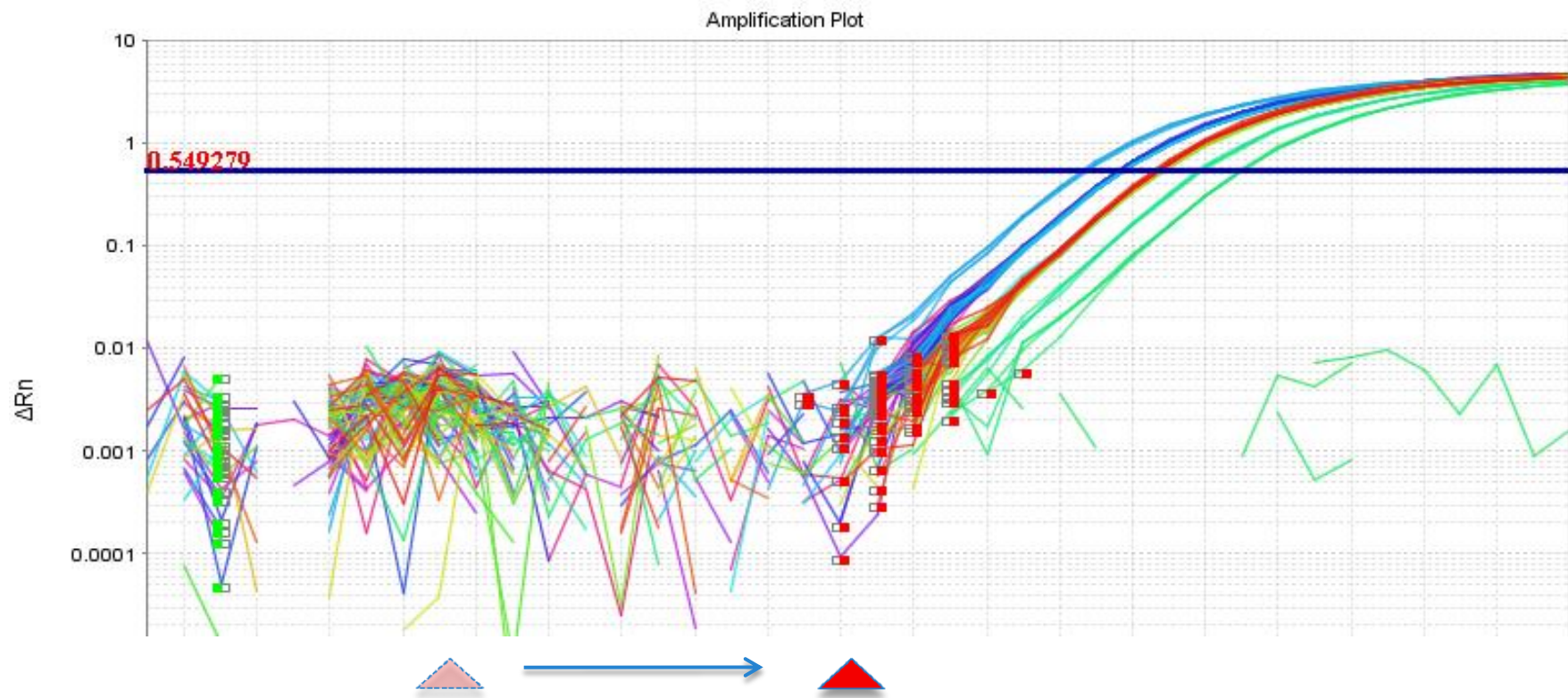
Automatic Threshold

Threshold: 0.549279

Automatic Baseline

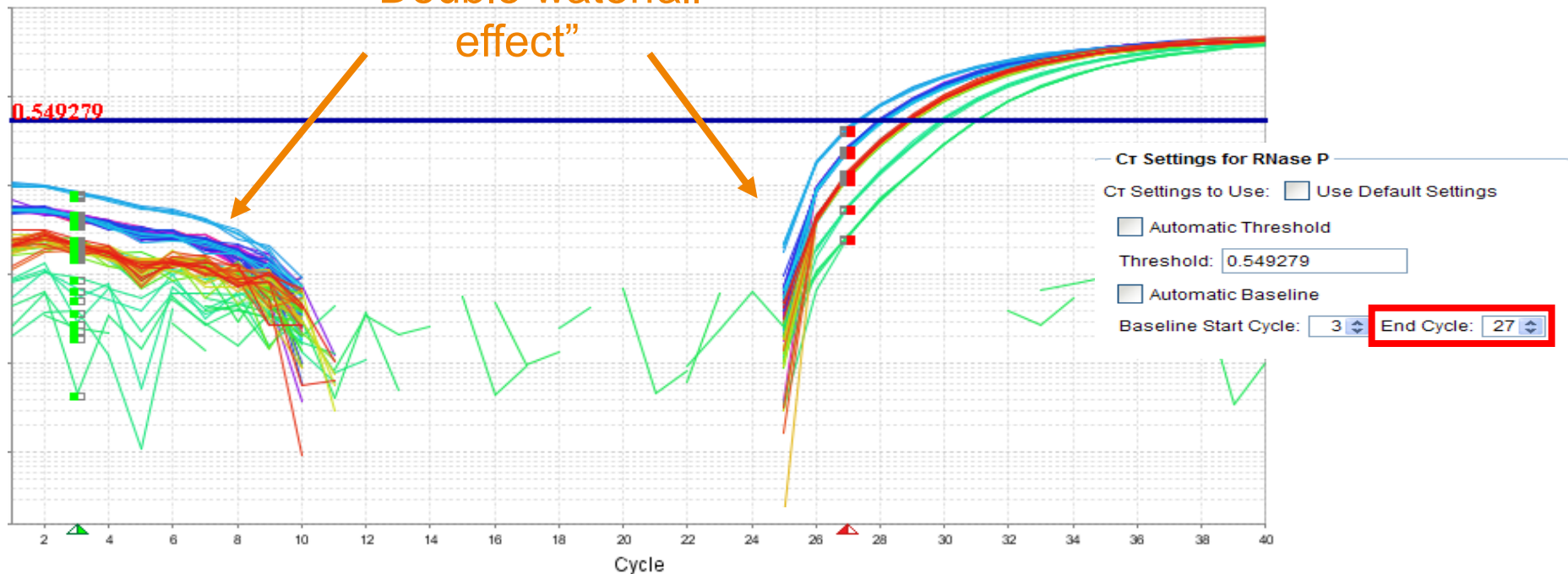
Baseline Start Cycle: 3 | End Cycle: 19

基线终止位置向后调整

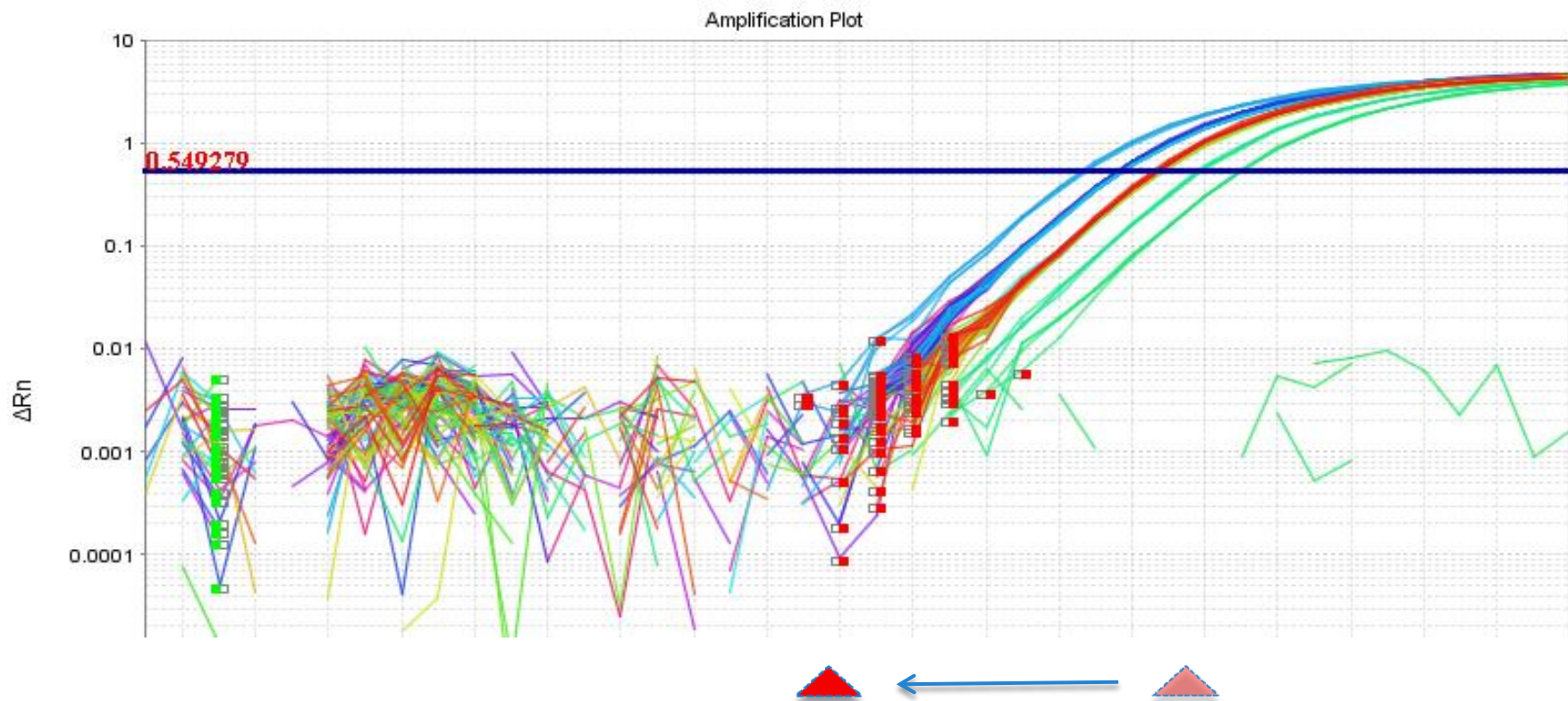


基线设置太高

“Double waterfall effect”

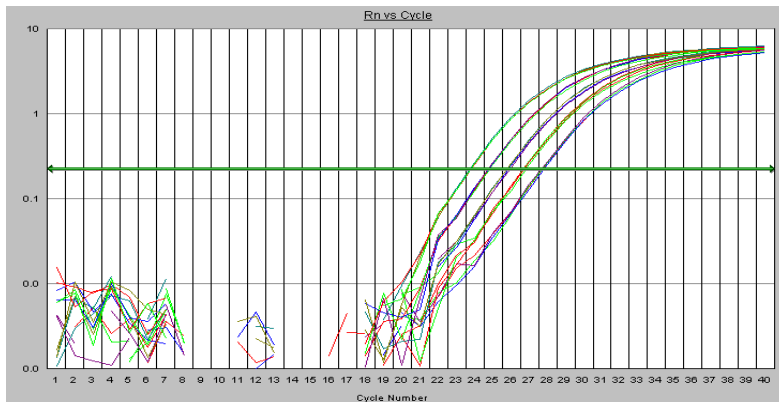


基线终止位置向前调整



如何手动设置阈值

最佳位置: 指数增长期内, 曲线重复性最好的位置



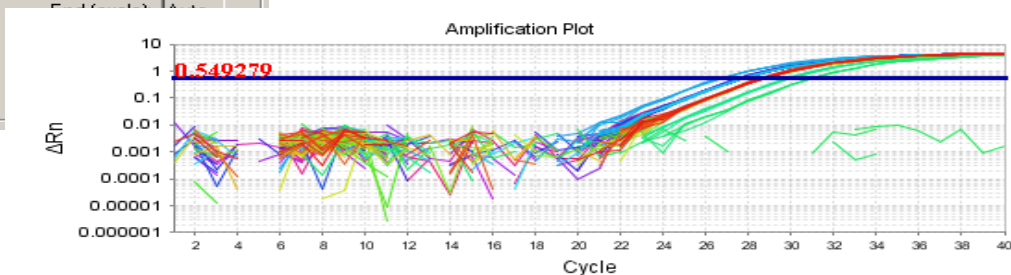
Analysis Settings

- Auto Ct
- Manual Ct

Threshold: 0.2448434

- Auto Baseline
- Manual Baseline:

Start (cycle): Auto



Target: RNase P

Threshold: Auto 0.549279

Auto Bas

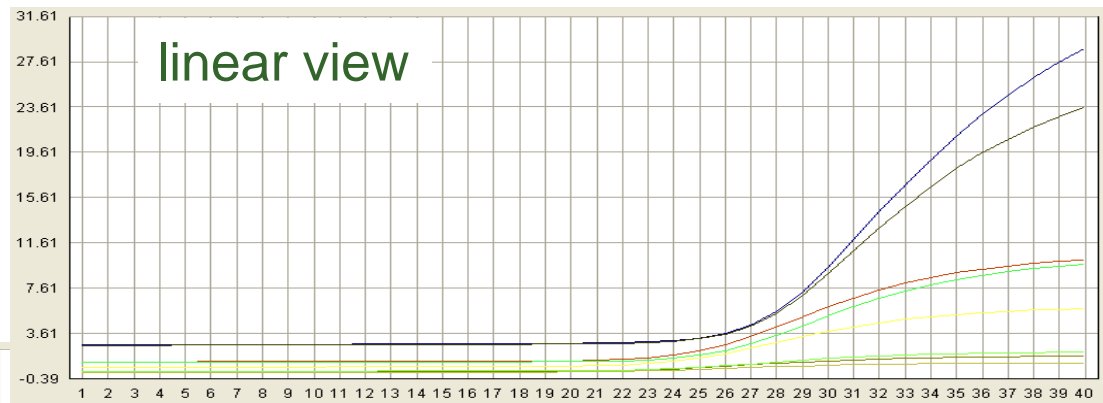
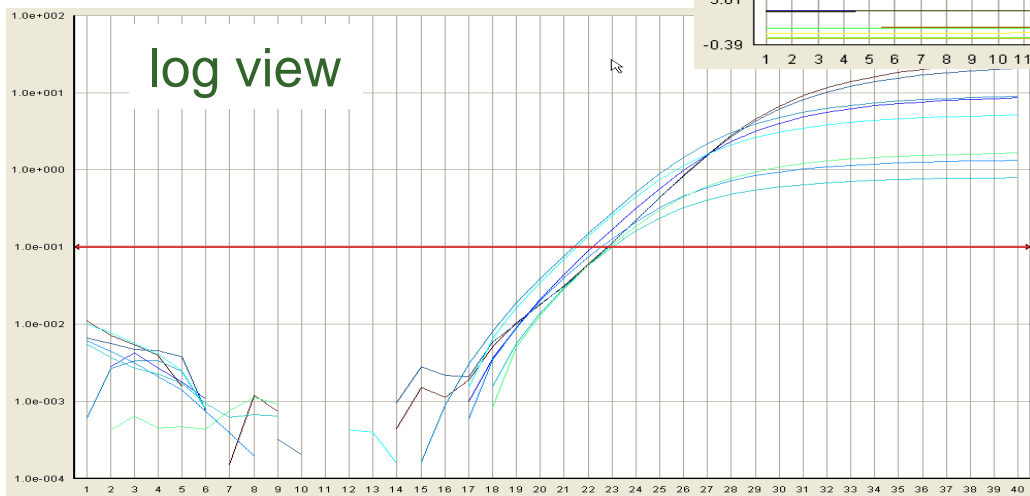
造成重复性差的原因

- 基线， 阈值设置
- 加样误差(操作?加样器?)
- 没有将试剂和样品充分混匀
- 低拷贝的样品→泊松分布
- 没有使用ROX校准

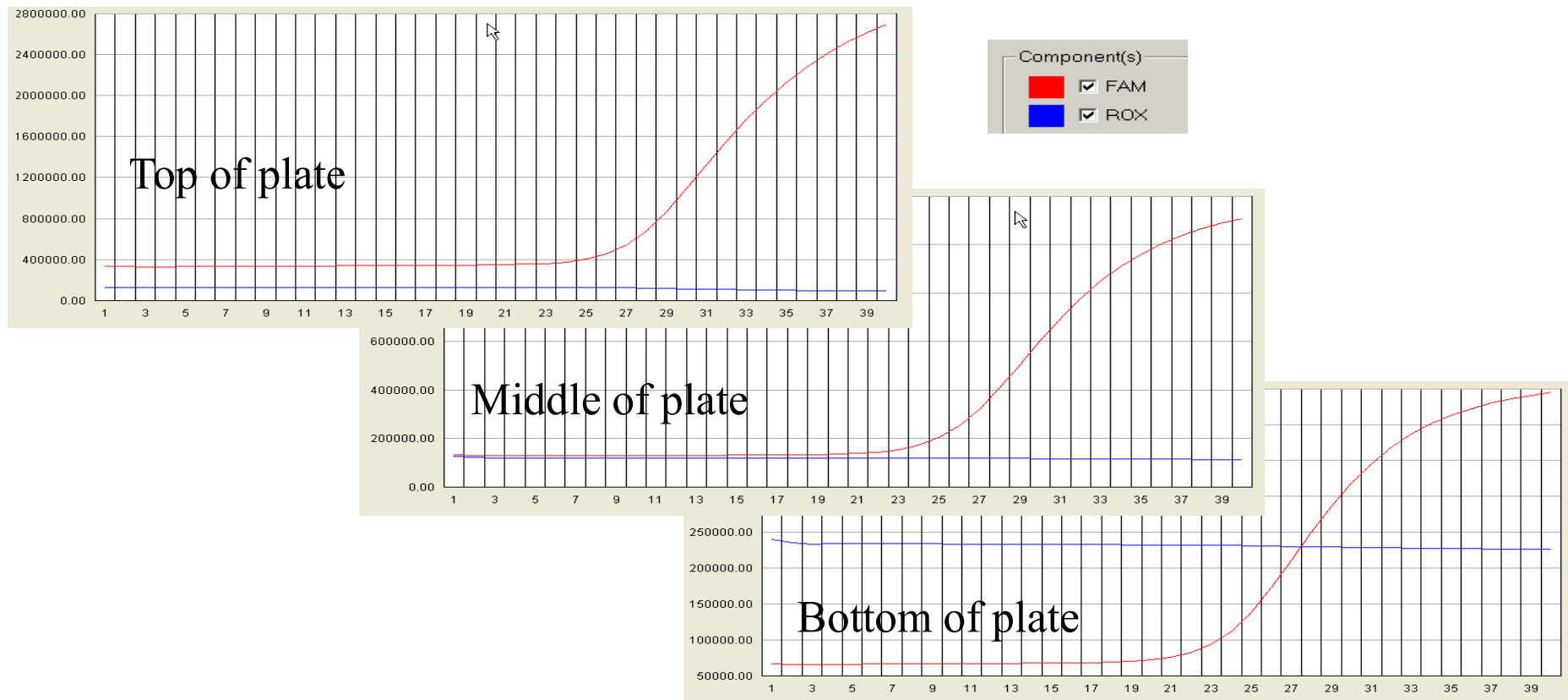
反应液混合不均匀

- 有时候在制备PCR反应液时 (包括master mix、探针引物、纯水), 在分装入反应板 (管) 前没有充分混匀。
- 结果加入到每个孔中的试剂成分就有所不同。

反应液混合不均匀导致重复性差



反应液混合不均匀导致重复性差

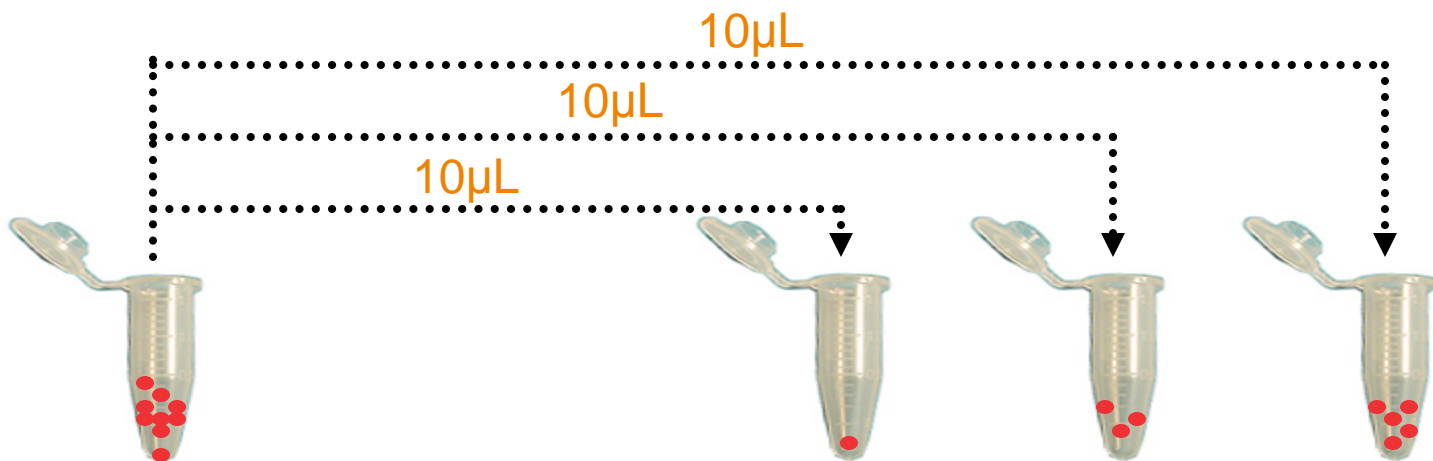


- 在分装反应液之前，要将反应液充分混匀（振荡，吹打）
- 同时上机之前，要将PCR管或者PCR板离心，使所有的液体都在反应管底部。

造成重复性差的原因

- 基线，阈值设置
- 加样误差(操作?加样器?)
- 没有将试剂和样品充分混匀
- 低拷贝的样品→泊松分布
- 没有使用ROX校准

泊松分布



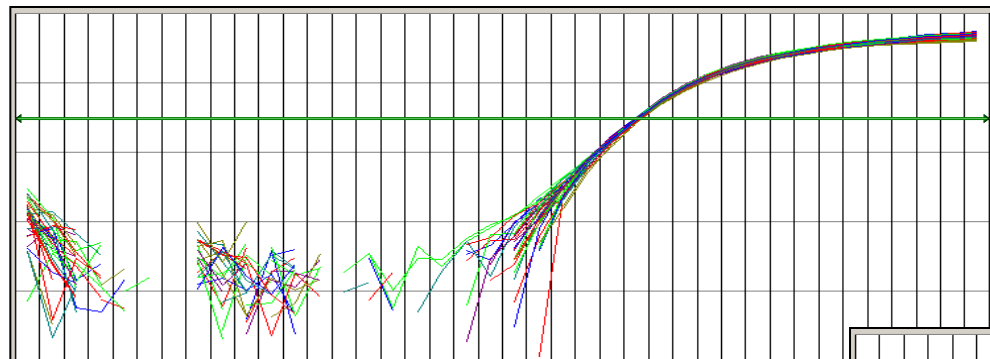
9 molecules in 30 uL

每个反应管均匀的分配到3个模板的几率有多高？

如果每30 uL 含有9000个模板呢，又会怎样呢？

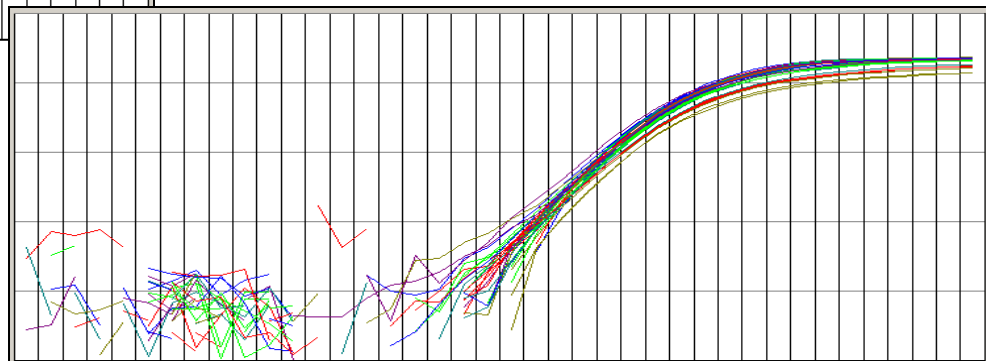
造成重复性差的原因

- 基线， 阈值设置
- 加样误差(操作?加样器?)
- 没有将试剂和样品充分混匀
- 低拷贝的样品→泊松分布
- 没有使用ROX校准



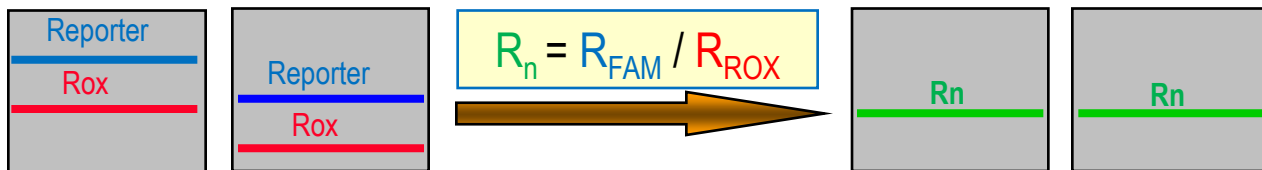
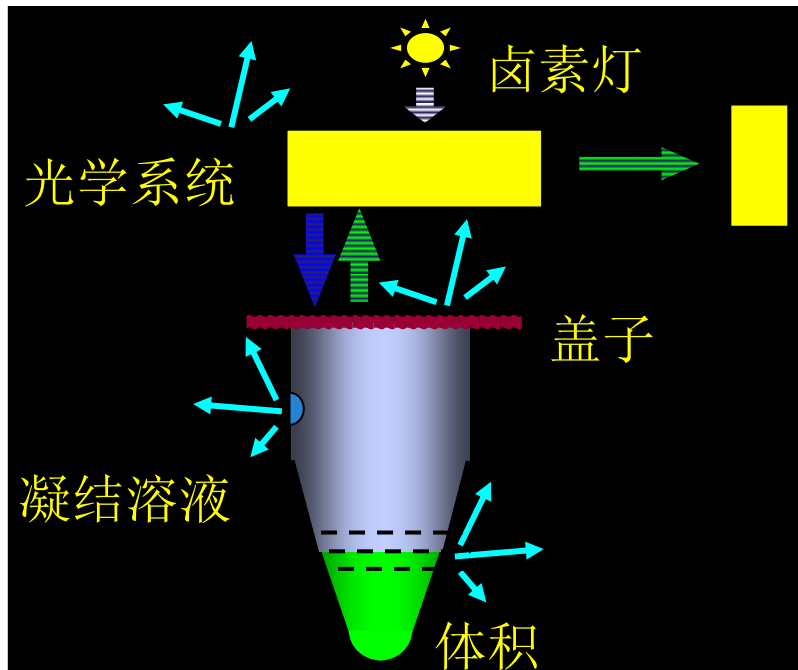
进行ROX 参比染料校准的36个
复孔分析结果

未进行ROX参比染料校准的36
个复孔分析结果



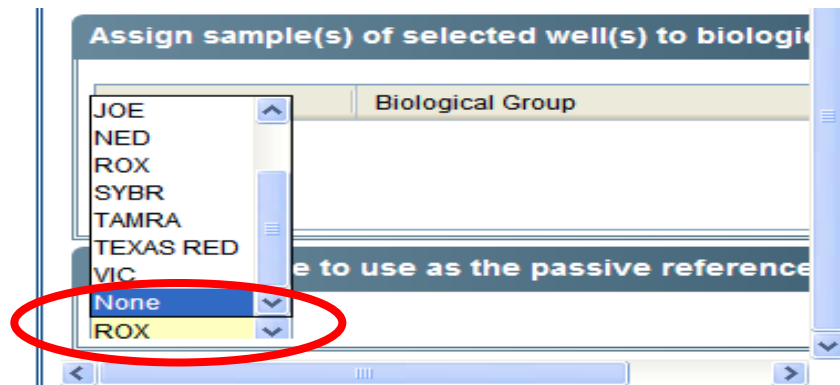
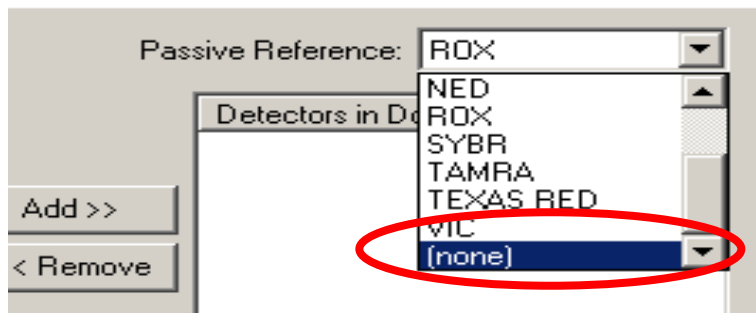
ROX校准:参比荧光

- 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
 - 仪器稳定性：孔间、批间波动
 - 反应体系监控：蒸发

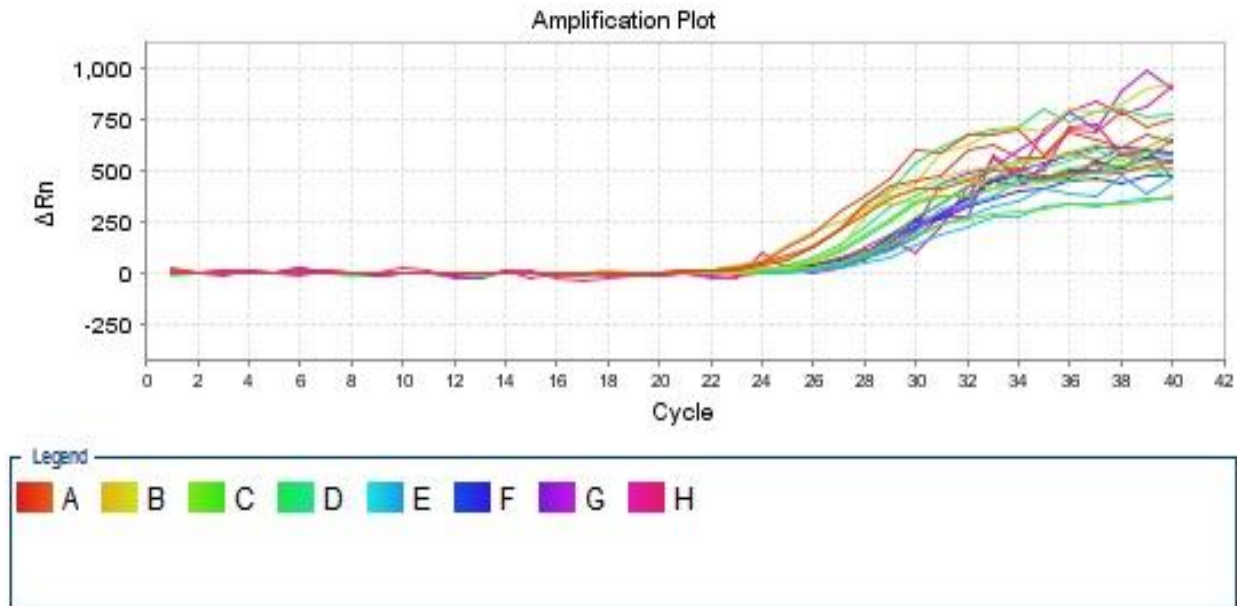


ROX设置

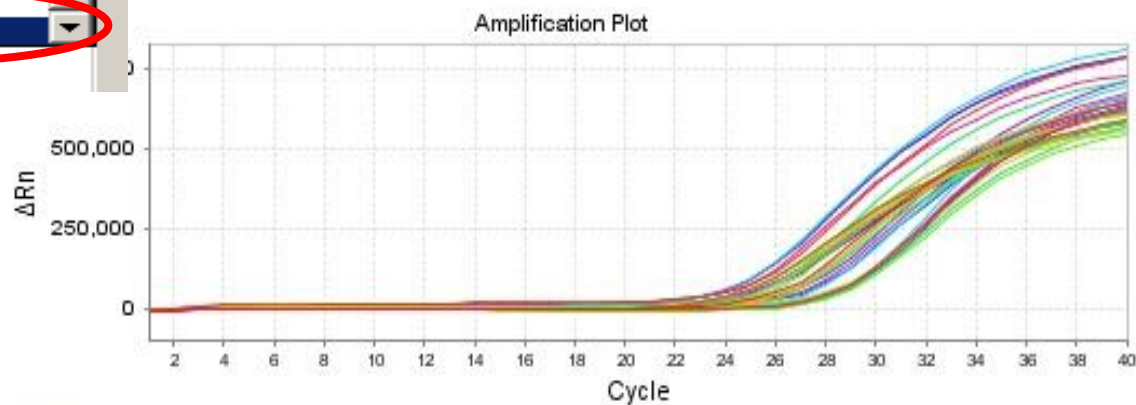
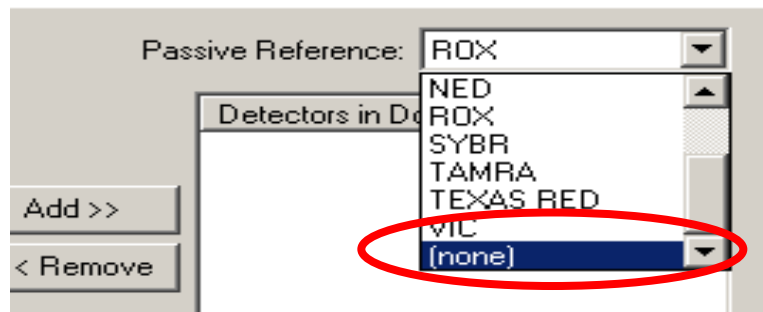
- 仪器软件自动进行ROX校准。
- ROX校准为可选步骤，如果使用的PCR试剂没有添加ROX，或者ROX添加浓度不合适，请将ROX校准关闭。



ROX浓度不合适或未添加

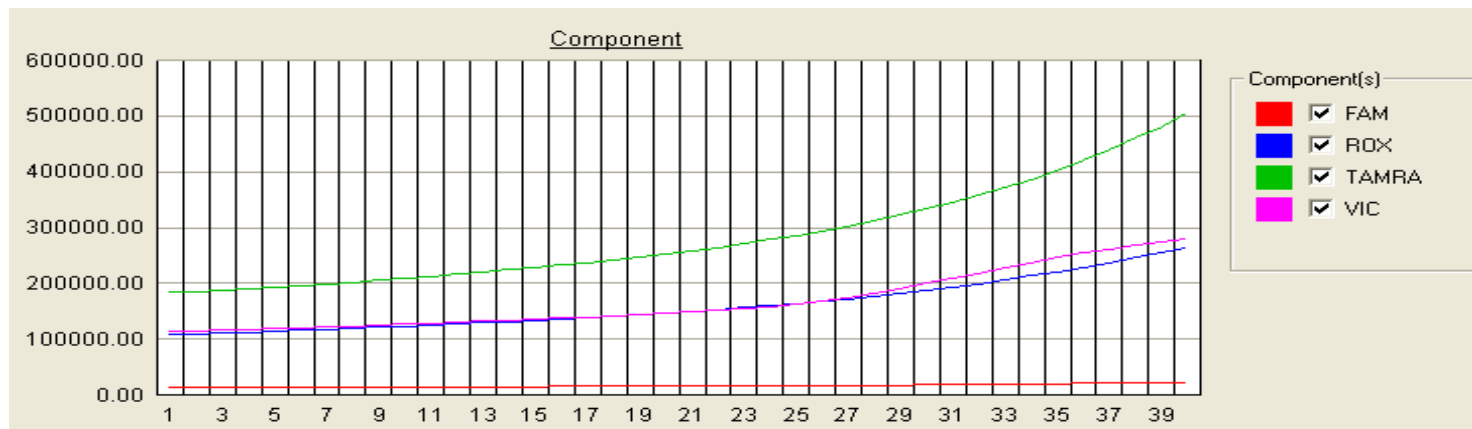


修改软件中ROX的设置



如果反应体系存在蒸发也会导致重复性差

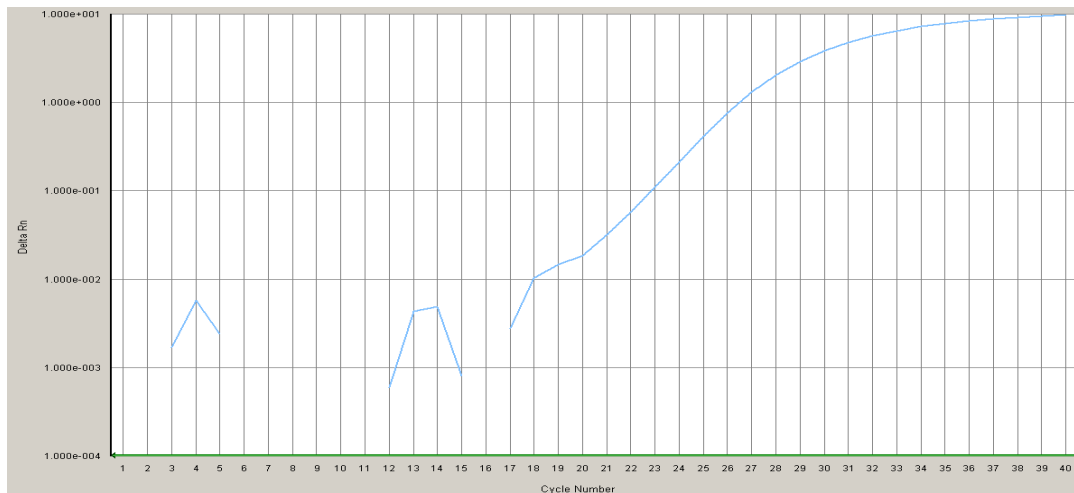
- ROX信号在反应过程中并不是完全平直。
- 但是如果ROX信号有突然上升的现象（类似扩增的信号），则提示该反应孔有蒸发。
 - 查看问题反应孔的体积是否有变化



常见问题三：“可疑的” 扩增曲线

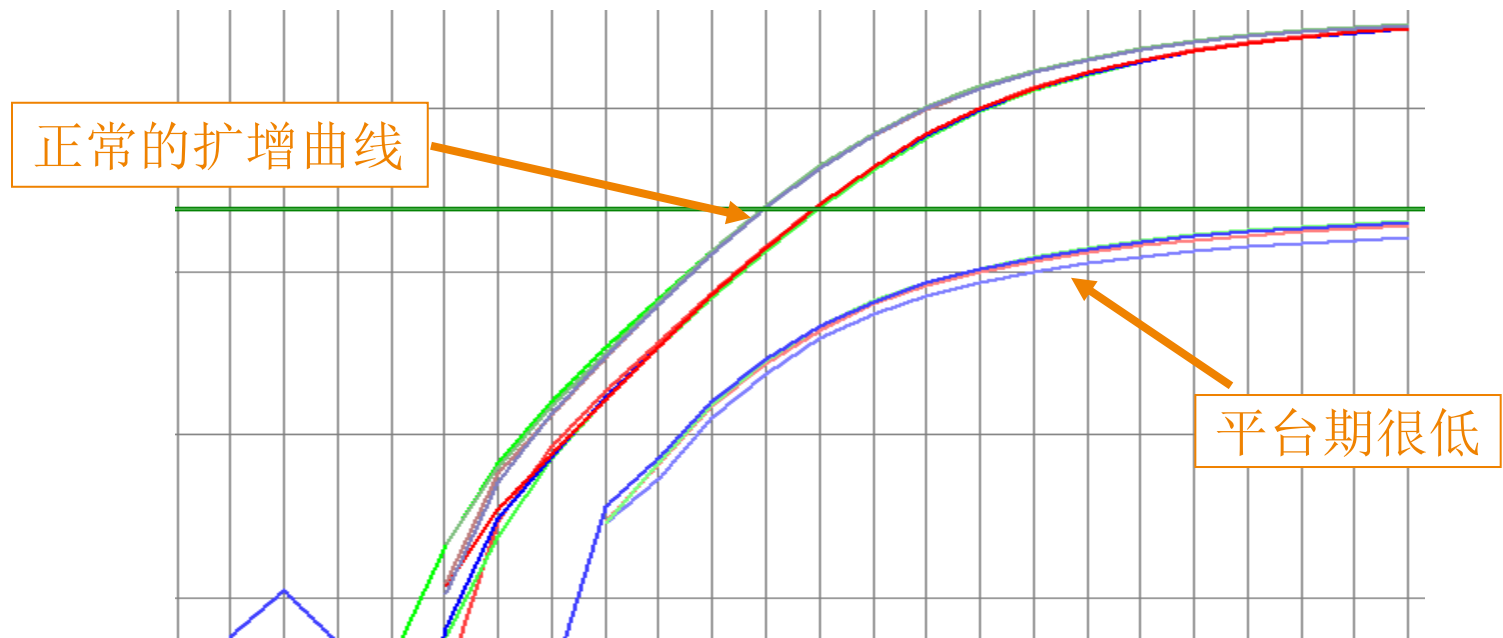
真正的扩增曲线 vs 非扩增曲线

- 由PCR扩增形成的真正的扩增曲线通常很容易确认。
- 有特征的形状：首先背景信号，然后是三个增长阶段（指数增长期、线性增长期和平台期）



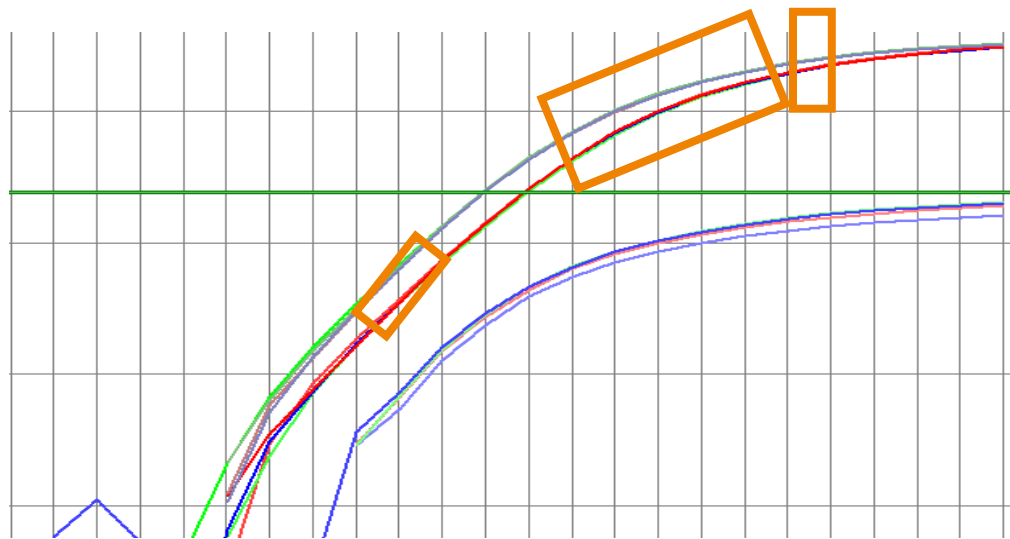
案例1: 是否存在扩增?

- 一些形状和正常的扩增曲线有区别的曲线, 该如何判断呢?



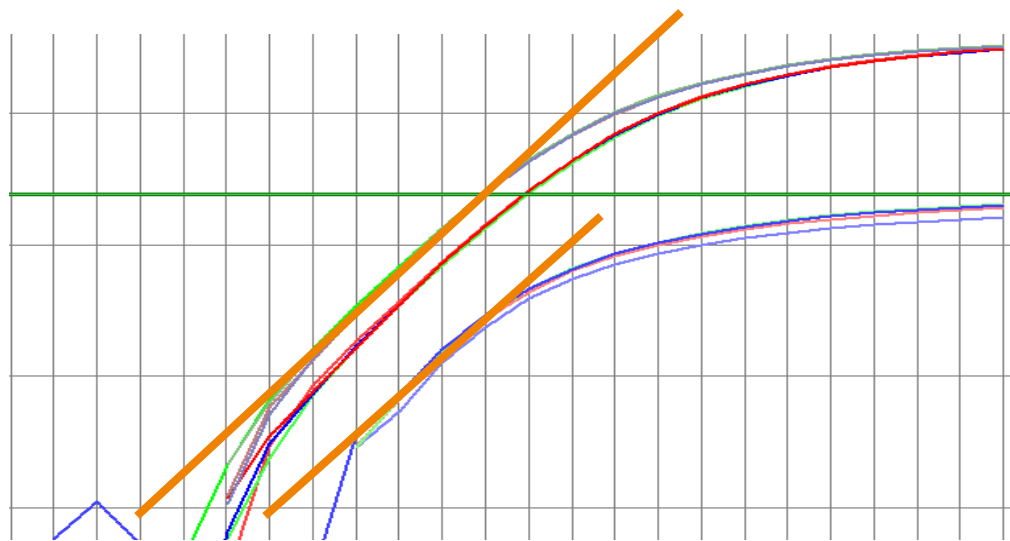
如何判断它们才是真正的扩增?

- 同时也具有特征性的三个增长阶段。



如何判断它们才是真正的扩增?

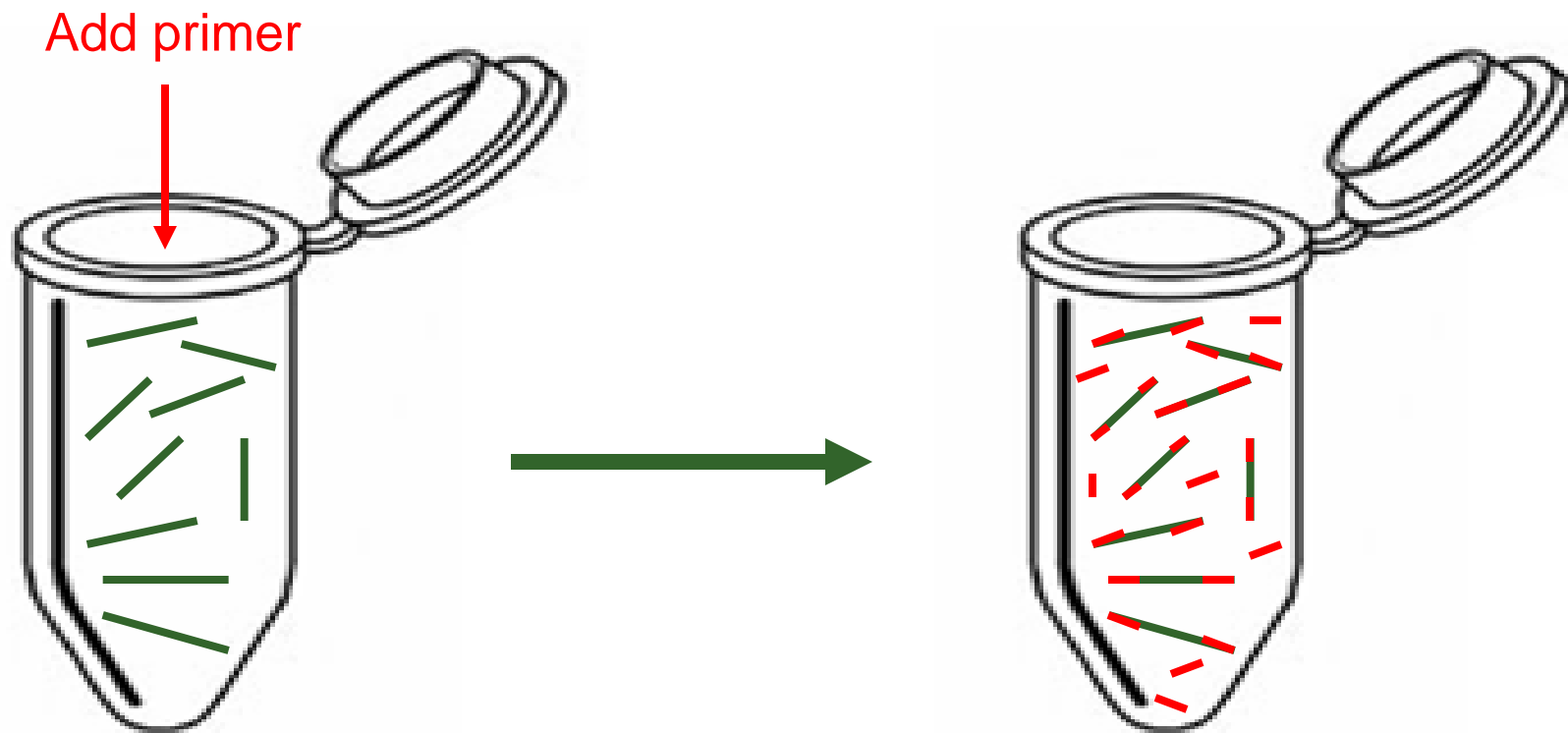
- 同时也具有特征性的三个增长阶段。
- 这些曲线都有典型的指数增长期，而且和其他的曲线平行（虽然比较短）。



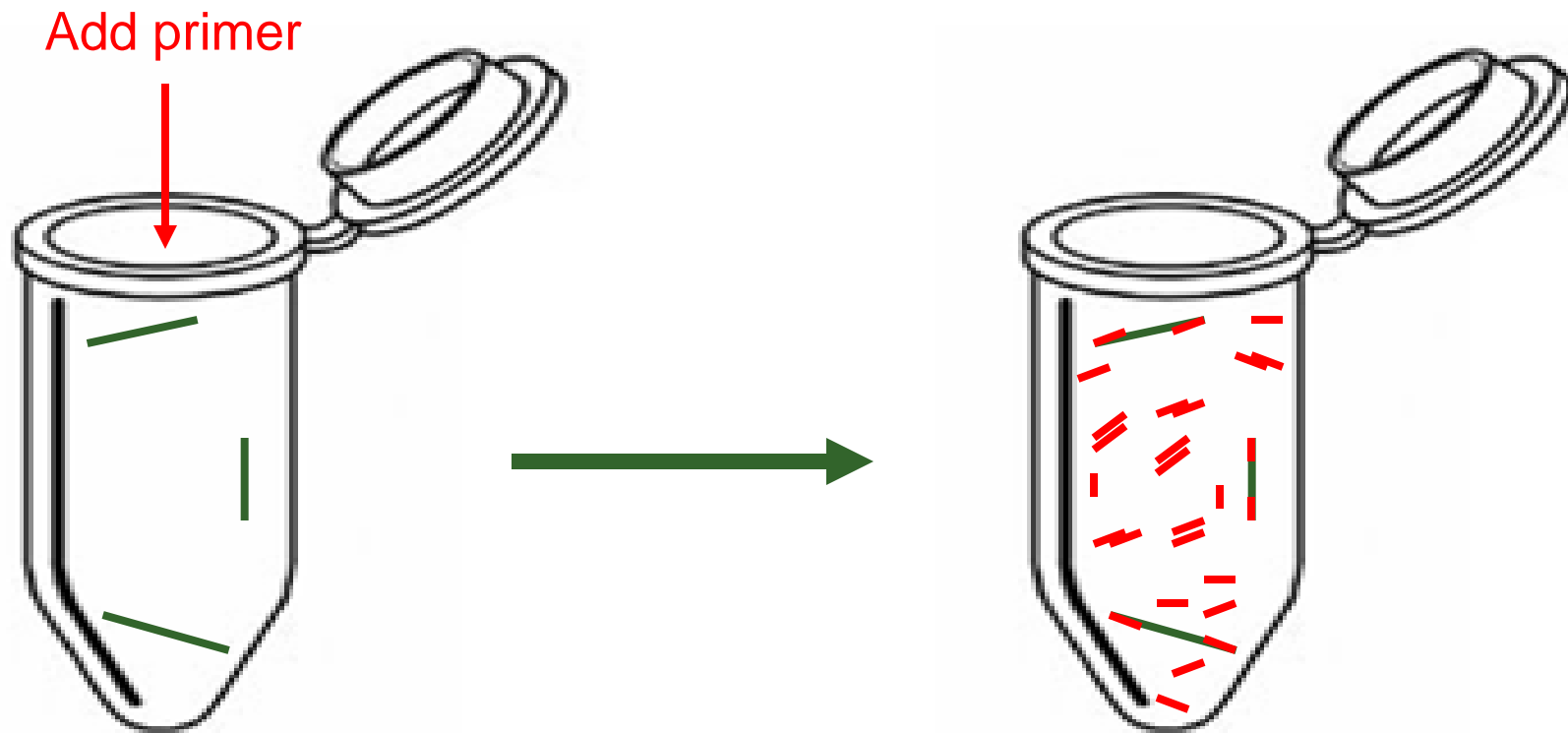
是什么原因造成平台期很低呢？

- 可能是目标样品的浓度太低。
- 通常如果模板的起始浓度太低, 反应体系中会形成大量的引物二聚体。

引物和模板的比例



引物和模板的比例



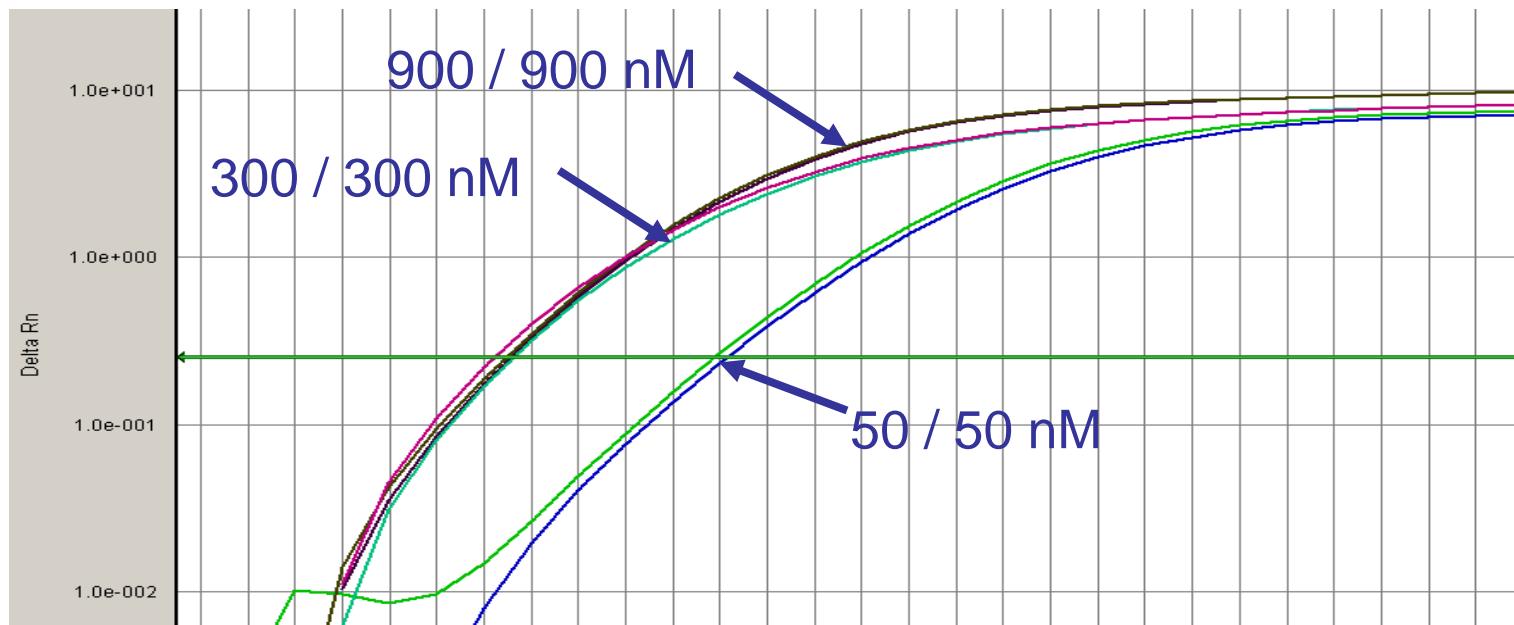
是什么原因造成平台期很低呢？

- 可能是目标样品的浓度太低。
 - 通常如果模板的起始浓度太低, 反应体系中会形成大量的引物二聚体。
 - 大量引物二聚体的形成使得引物很快消耗完, 从而造成扩增曲线的平台期很低。

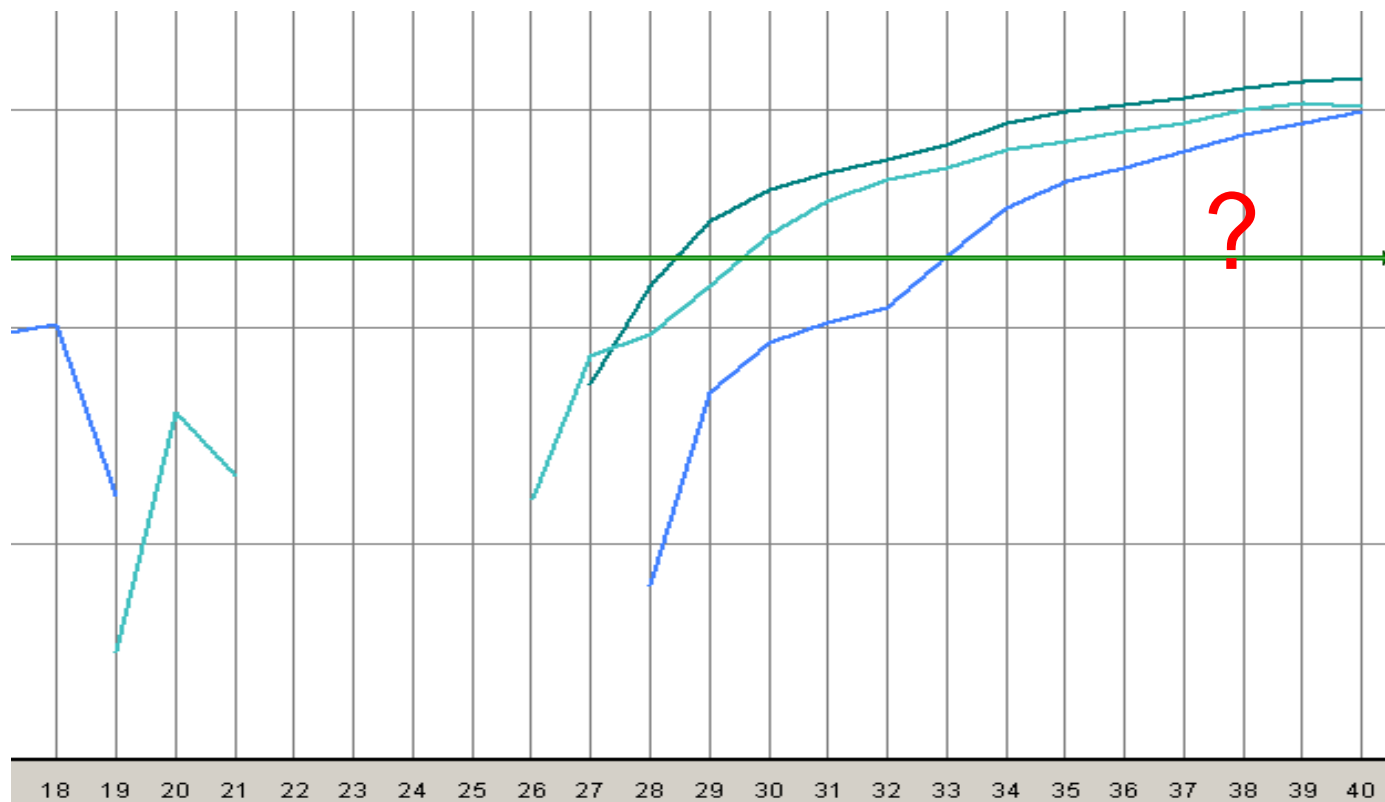
是否可以调整引物和模板的比例？

- 低引物浓度会导致高Ct值 (灵敏度低)。
- 所以对于低浓度的样品，反应体系中引物的浓度却不能太低。

引物浓度和灵敏度

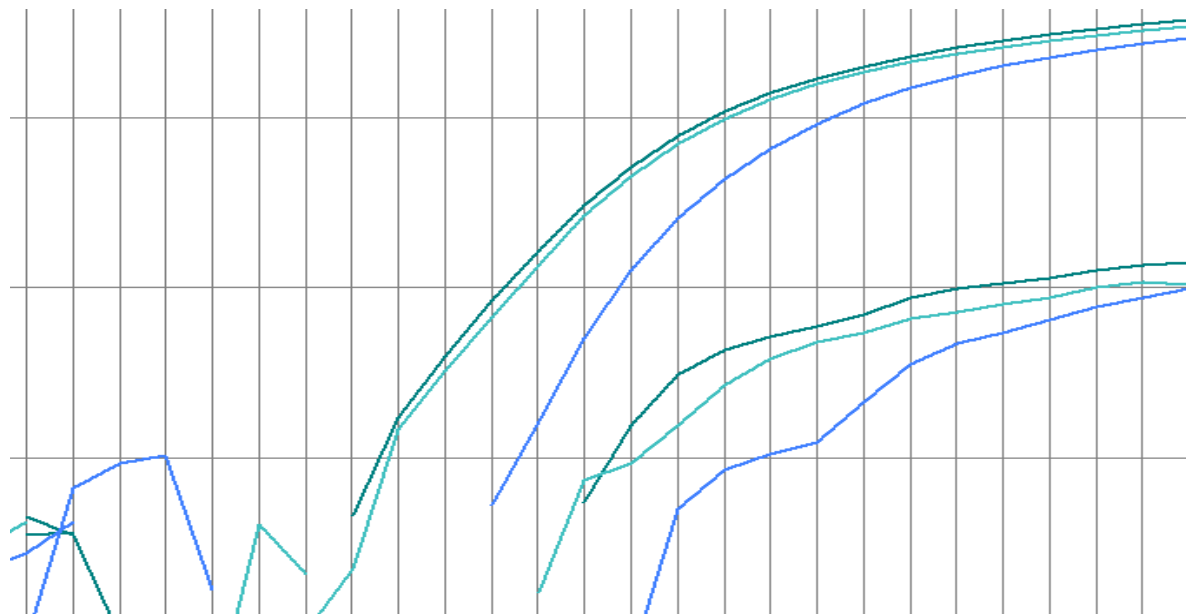


案例2: 是否存在扩增?



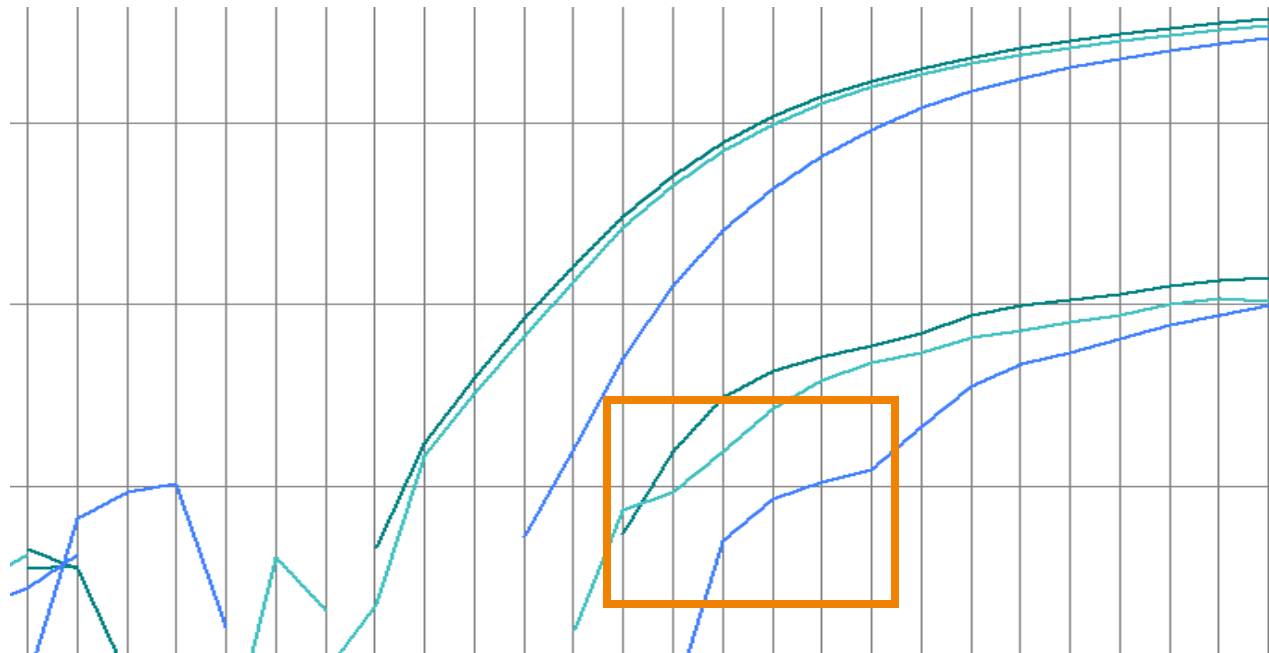
如何判断它们是否存在扩增?

- 首先，和同一反应中的其他扩增曲线相比，这些曲线的形状不相同。



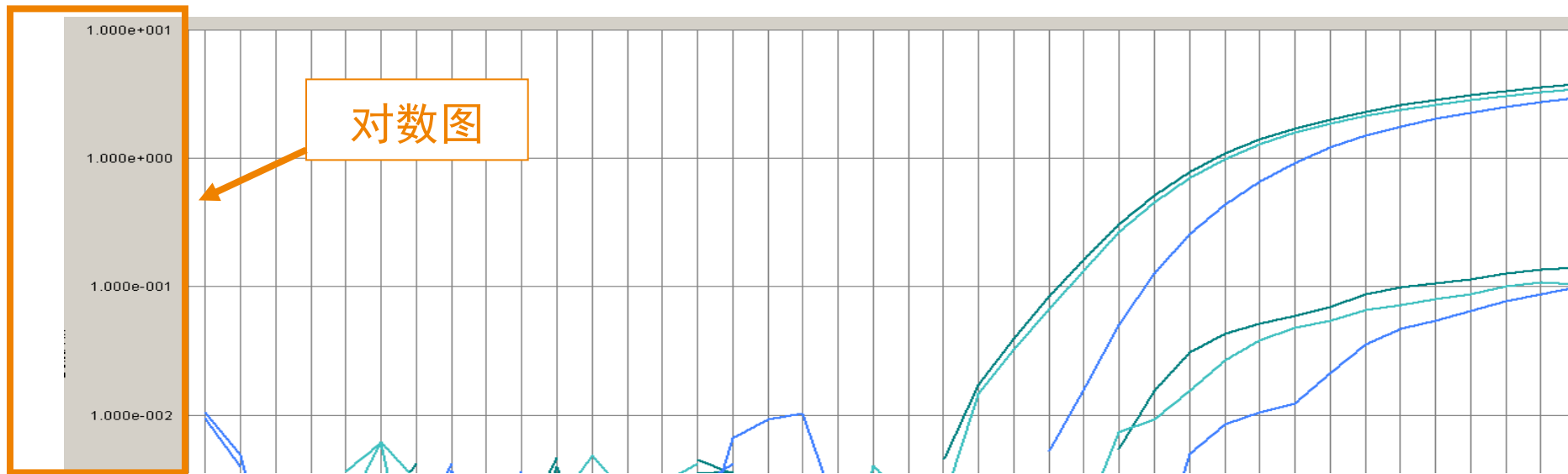
如何判断它们是否存在扩增?

- 同时，这些曲线都没有明显的指数增长期。



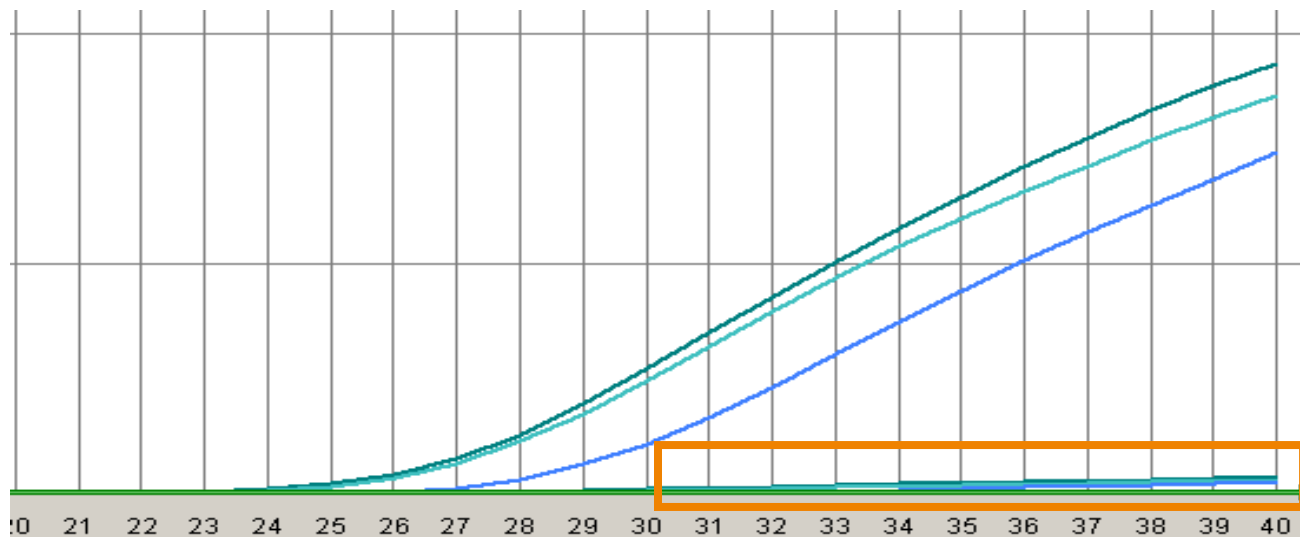
如何判断它们是否存在扩增?

- 其次，看Y轴的数值。
 - 这些“可疑”曲线的指数增长期范围常常是落在 $1e-2$ 的范围内。



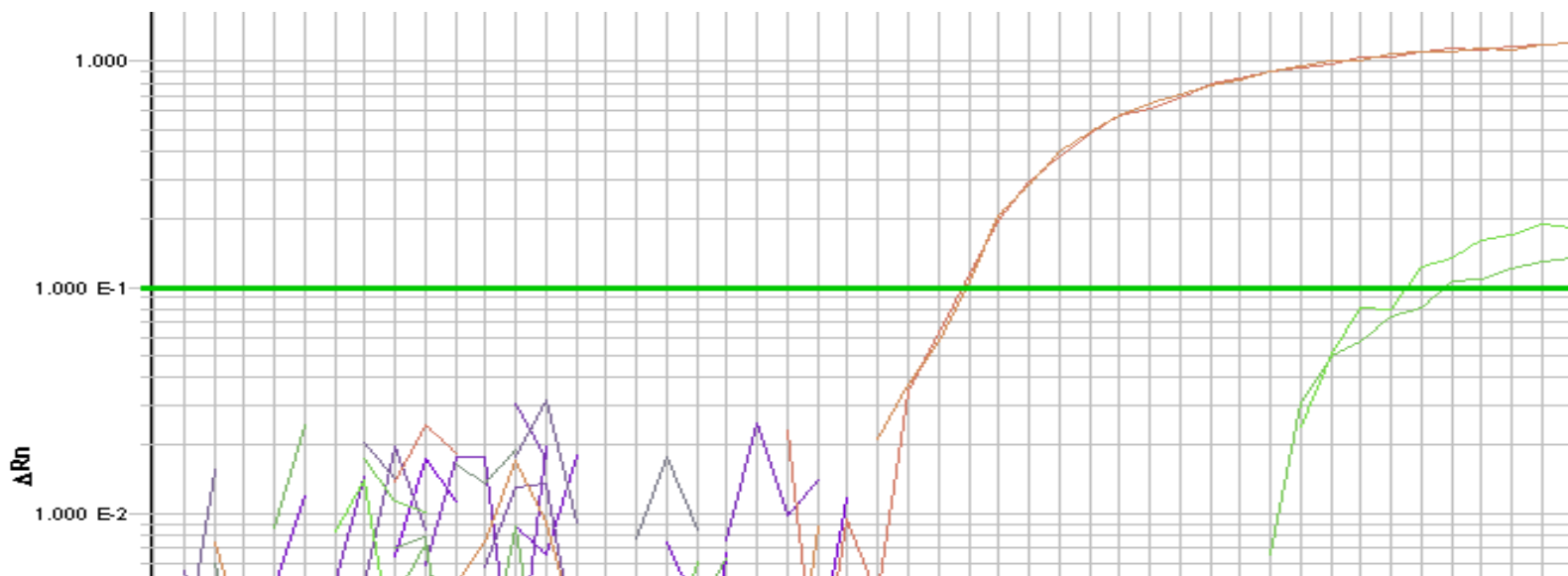
如何判断它们是否存在扩增?

- 最后，看线性图。
 - 曲线一直没有上升的趋势，提示不存在扩增。



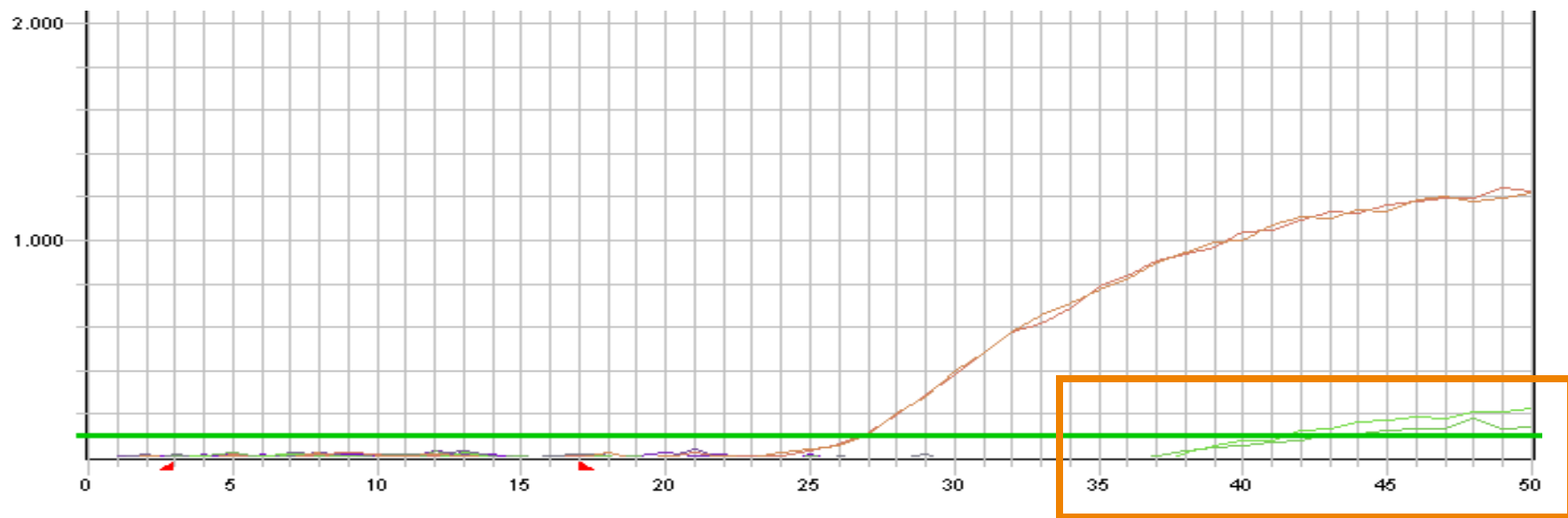
案例3: 是否存在扩增?

- 右侧的曲线形状和扩增曲线很相似，但是曲线不光滑。



有没有发生扩增?

- 切换到线性图，可以看到曲线有一定的上升。



案例三分析

- 这些样品在反应的最后阶段才开始扩增，平台期很接近背景。所以它呈锯齿状，不光滑。
- 虽然我们可以认为这些样品是临界阳性，但是对这些样品的定量结果都是不太准确的。
- 形成这类曲线的原因可能是模板的质量差 (RT / PCR抑制物; 模板浓度低), 也可能是引物探针的设计问题。
- 试剂原因
 - 如果使用的试剂背景信号太强，荧光的增长将会很小，导致扩增曲线的指数增长期会变得很短，或者没有。
 - 荧光信号差的试剂也会有同样的问题。

定量PCR数据常见故障排查

- 对PCR 原理的了解是基础，一切从原理出发。
- 运用不同的工具解决问题：
 - 扩增曲线：
 - 查看扩增曲线的形状：是否有明显扩增阶段（特别是指数增长期）？所有的曲线是否平行？
 - 查看Y轴的数值：是否高于背景信号？
 - 查看线性图：曲线是否有明显的“take off”？
 - 标准曲线：扩增效率是否一致
 - 原始数据：各组分的原始荧光表现
- 常见的问题归类：
 - 抑制物：制作标准曲线查看
 - 重复性差：基线/阈值设置，加样/混匀，泊松分布，参比荧光
 - 可疑的扩增：综合各种图谱分析

Questions ?