

Applications Guide

References

Mathews DH et al., Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters provides robust prediction of RNA secondary structure, *J Mol Biol* 288, 910–940 (1999)

Rozen S and Skaletsky HJ, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, pp 365–386 in *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (Krawetz S and Misener S, eds), Humana Press, Totowa, NJ (2000); source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>

Zuker M et al., Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide, pp 11–43 in *RNA Biochemistry and Biotechnology* (Barciszewski J and Clark BFC, eds), Kluwer Academic Publishers, Boston (1999)

Legal Notices

Amplifluor and UniPrimer are trademarks of Millipore Corporation. AmpliTaq, AmpliTaq Gold, and TaqMan are trademarks of Roche Molecular Systems, Inc. BD QZyme is a trademark of Becton, Dickinson and Company. Beacon Designer is a trademark of PREMIER Biosoft International. BHQ and Black Hole Quencher are trademarks of Biosearch Technologies, Inc. Cy is a trademark of GE Healthcare. DNeasy is a trademark of Qiagen GmbH Corporation. DyNAzyme is a trademark of Finnzymes Oy. Eclipse is a trademark of Epoch Biosciences, Inc. Excel is a trademark of Microsoft Corporation. Hoechst is a trademark of Hoechst Aktiengesellschaft. LUX is a trademark of Invitrogen Corporation. Oligo is a trademark of Molecular Biology Insights, Inc. PicoGreen, SYBR, and Texas Red are trademarks of Molecular Probes, Inc. Roundup Ready is a trademark of Monsanto Company. Scorpions is a trademark of DxS Limited. VIC is a trademark of Applied Biosystems.

Molecular beacons and their use are licensed under patents owned by The Public Health Research Institute of the City of New York, Inc.

Primer3 includes software developed by the Whitehead Institute for Biomedical Research.

Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Molecular Probes, Inc. to sell reagents containing SYBR Green I for use in real-time PCR, for research purposes only.

Notice regarding Bio-Rad thermal cyclers and real-time systems.

Purchase of this instrument conveys a limited non-transferable immunity from suit for the purchaser's own internal research and development and for use in applied fields other than Human In Vitro Diagnostics under one or more of U.S. Patents Nos. 5,656,493, 5,333,675, 5,475,610 (claims 1, 44, 158, 160–163 and 167 only), and 6,703,236 (claims 1–7 only), or corresponding claims in their non-U.S. counterparts, owned by Applied Biosystems. No right is conveyed expressly, by implication or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5' nuclease methods. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Bio-Rad's real-time thermal cyclers are licensed real-time thermal cyclers under Applied Biosystems' United States Patent No. 6,814,934 B1 for use in research and for all other fields except the fields of human diagnostics and veterinary diagnostics.

荧光定量 PCR 应用指南

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Web site www.bio-rad.com **USA** 800 4BIORAD **Australia** 61 02 9914 2800 **Austria** 01 877 89 01 **Belgium** 09 385 55 11 **Brazil** 55 21 3237 9400
Canada 905 364 3435 **China** Shanghai 86 21 6169 8500 Beijing 86 10 5939 0088 Toll-free Tech Support 800 820 5567 **Czech Republic** 420 241 430 532
Denmark 44 52 10 00 **Finland** 09 804 22 00 **France** 01 47 95 69 65 **Germany** 089 318 84 0 **Greece** 30 210 777 4396 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 36 1 455 8800 **India** 91 124 4029300 **Israel** 03 963 6050 **Italy** 39 02 216091 **Japan** 03 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Mexico** 52 555 488 7670
The Netherlands 0318 540666 **New Zealand** 0508 805 500 **Norway** 23 38 41 30 **Poland** 48 22 331 99 99 **Portugal** 351 21 472 7700
Russia 7 495 721 14 04 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 27 861 246 723 **Spain** 34 91 590 5200 **Sweden** 08 555 12700
Switzerland 061 717 95 55 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **United Kingdom** 020 8328 2000

BIO-RAD

目录

1. 荧光定量 PCR 概述	2
1.1 荧光定量 PCR 的主要概念	2
1.1.1 什么是荧光定量 PCR?	2
1.1.2 荧光定量 PCR 工作原理	3
1.1.3 优化的 qPCR 实验特点	4
2. 实验开始	8
2.1 总体注意事项	8
2.2 qPCR 实验设计注意事项	9
2.2.1 单重实验或多重实验?	9
2.2.2 方法选择	9
2.2.2.1 DNA 结合染料	10
2.2.2.2 基于荧光标记的引物或探针的化学机理	12
2.3 SYBR Green I 反应设计及优化	19
2.3.1 引物和扩增子的设计	19
2.3.2 用标准曲线进行反应的评	20
2.3.2.1 退火温度的优化	20
2.3.2.2 用标准曲线进行反应的评估	22
2.4 TaqMan 探针反应设计及优化	23
2.4.1 引物和探针设计	23
2.4.2 实验体系的确定及优化	24
3. 多重实验注意事项	28
3.1 多重实验的引物及探针设计	28
3.2 多重实验的报告基团和淬灭基团选择	29
3.3 多重实验前单个实验的优化	29
3.4 多重实验的验证	29
3.5 多重实验的优化	30

4. 荧光定量 PCR 数据分析	34
4.1 绝对定量	35
4.1.1 什么时候使用绝对定量?	35
4.1.2 使用标准曲线进行绝对定量	35
4.2 相对定量	37
4.2.1 什么时候使用相对定量	37
4.2.2 用质量单位作为标准进行相对定量	38
4.2.3 用参照基因作为标准进行相对定量	40
4.2.3.1 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak) 方法	41
4.2.3.2 用参照基因的 ΔC_T 法	42
4.2.3.3 Pfaffl 方法	43
5. 基因表达分析	46
5.1 实验设计	46
5.2 RNA 分离	47
5.2.1 样品收集	47
5.2.2 RNA 提取	48
5.2.3 检测核酸的质量和数量	48
5.3 cDNA 模板的制备(反转录)	49
5.4 qPCR 实验方法选择	50
5.5 应用举例	51
5.5.1 多重分析的反应组分	51
5.5.2 循环条件	51
5.6 基因表达数据分析	52
6. 基因型/等位基因分析	54
6.1 实验设计	55
6.2 使用 TaqMan 方法设计引物和探针	56
6.3 DNA 提取和样品处理	57
6.4 TaqMan 探针实验的反应组分	58
6.5 实验优化	59
6.6 TaqMan 探针实验的循环条件	59
6.7 等位基因分析的数据处理	59
6.7.1 等位基因分析的结果验证	59
6.7.2 基因型识别	72

7. 转基因生物 (GMO) 检测	76
7.1 实验设计	77
7.2 DNA 提取及样品制备	77
7.3 利用 SYBR Green I 方法对转基因大豆进行定量 PCR 分析	78
7.3.1 反应成分	78
7.3.2 循环条件	79
7.3.3 数据分析	79
7.4 利用 TaqMan 探针转基因大豆进行多重定量 PCR 分析	81
7.4.1 反应成分	82
7.4.2 循环条件	82
7.4.3 数据分析	82
8. 实时荧光定量 PCR 国际化标准及语音规则 — MIQE 指南	85
8.1 实验设计	87
8.2 RNA 抽提	87
8.3 RNA 质量控制	88
8.4 反转录	90
8.5 引物和扩增子设计	90
8.6 qPCR 扩增与 qPCR 验证	91
8.6.1 退火温度、融解曲线分析、扩增子凝胶分析和无模板对照的确定	91
8.6.2 标准曲线的建立 (评价 PCR 扩增效率)	93
8.6.3 qPCR 试剂、仪器和分析软件	95
8.7. 数据分析	96
8.7.1 内参基因的选择	96
8.7.2 实验重复性与重现性	97
8.8 结 论	97
8.9 参考文献	98

荧光定量 PCR 概述

荧光定量 PCR 的主要概念	2
什么是荧光定量 PCR?	2
荧光定量 PCR 工作原理	3
优化的 qPCR 实验特点	4

1. 荧光定量 PCR 概述

核酸扩增和检测技术是当今生物学研究的重要手段之一。包括基础科学、生物技术、医学研究、法医学、诊断学等在内的各领域的科学家们用这种方法进行广泛的应用研究。对于某些应用，核酸定性检测就可以满足需求；而另外一些应用，要求进行定量分析。为你的应用选择最好的解决方案需要对技术有广泛的了解。

本指南介绍荧光定量 PCR 的多项技术特点，包括设计优化的荧光定量 PCR 实验以及不同应用目的的数据处理及分析。第 5-7 章用不同的实验设计和数据来阐述荧光定量 PCR 在专业领域的应用，包括基因表达分析、等位基因分析、转基因生物 (GMO) 检测。

本指南介绍了一项强有力的技术及提供了一些必要的信息，希望能满足您现在及将来的应用需求。

1.1 荧光定量 PCR 的主要概念

1.1.1 什么是荧光定量 PCR？

常规 PCR 中，扩增产物 (扩增子) 是通过终点法来分析检测，即 PCR 反应结束后，DNA 通过琼脂糖凝胶电泳，然后进行成像分析。而荧光定量 PCR 可以在反应进行过程中进行累积扩增产物的分析和检测，即“实时”。

在反应体系中加入荧光分子，通过荧光信号的按比例增加来反应 DNA 量的增加，使 PCR 产物的实时检测成为可能。满足实验目的的荧光化学物质包括 DNA 结合染料和荧光标记的序列特异引物或探针；专门的热循环仪配备荧光检测模块，用于监测扩增时的荧光，检测到的荧光信号反映了每个循环扩增产物的量。

相对常规 PCR 而言，荧光定量 PCR 的主要优点是准确地确定初始模板拷贝数和宽的动态范围内和高的灵敏度。荧光定量 PCR 结果可以用于定性 (判断一段序列的有无)，也可以用于定量 (确定 DNA 拷贝数)，即 qPCR，而常规 PCR 只能做半定量。另外，荧光定量 PCR 的结果无需通过琼脂糖凝胶电泳来评估，大大节省实验时间，提高实验效率。还有，由于 PCR 反应和检测都在反应管中进行，样品污染的几率大大降低，无需扩增后的实验操作。

1.1.2 荧光定量 PCR 工作原理

为了更好的了解荧光定量 PCR 原理，用样品扩增曲线来说明 (图 1.1)。图中，x-轴表示 PCR 循环数，y-轴表示扩增反应的荧光值，与反应管中扩增产物的量有比例关系。

扩增曲线显示 2 个阶段，指数增长阶段和之后出现的非指数平台阶段。在指数增长阶段，每个循环 PCR 产物量大约增加一倍。然而，随着反应的进行，反应体系组成成分的消耗，其中的一种或多种成分限制反应。此时，产物增长速度变慢，反应进入平台期 (图 1.1 中 28-40 个循环)。

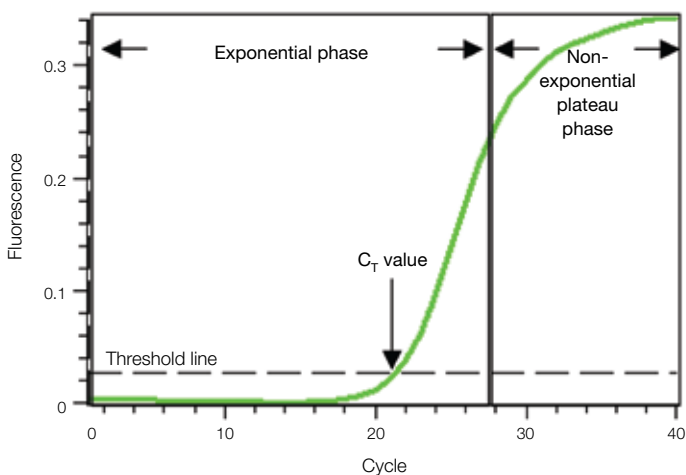


图 1.1 PCR 扩增图 (显示的是基线扣除后的荧光强度)

反应最初，虽然产物是指数增长，但是荧光处于背景水平，检测不到荧光增加（图 1.1 中 1-18 个循环）。当累积了足够的扩增产物，可以产生可检测的荧光信号时，这个循环数叫初始循环数，即 C_T 。由于 C_T 值处于指数期内，这时的反应成分不会抑制扩增反应进行，因此荧光定量 PCR 结果是可靠的，可以准确地反映反应体系中模板的初始量。

C_T 值主要由扩增反应体系中模板的初始浓度决定的。如果模板初始浓度高，只需要较少的扩增循环就可以累积足够的产物，产生高过背景的荧光信号，因此，反应就有一个小或早出现的 C_T ；相反，如果模板初始浓度低，需要较多的扩增循环才能产生高过背景的荧光信号，反应就有一个大或迟出现的 C_T 。两者之间关系的建立是荧光定量 PCR 用于定量的依据，将在第 4 章详细介绍用 C_T 值进行定量。

1.1.3 优化的 qPCR 特点

由于实时定量建立在模板的初始浓度与 C_T 关系的基础上，因此荧光定量 PCR 的优化非常重要，保证样本具有准确可重复的实验结果。优化的 qPCR 结果有以下特点：

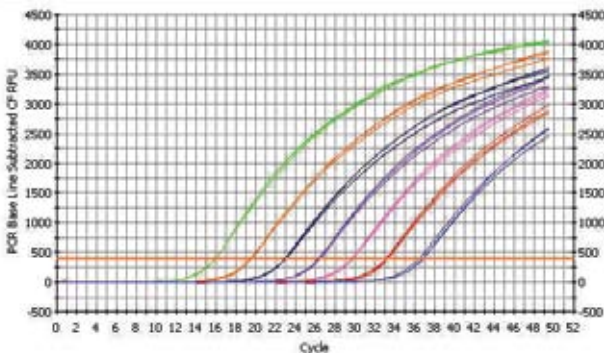
- 线性的标准曲线 ($R^2 > 0.980$ 或 $r > 0.990$)
- 高扩增效率 (90-105%)
- 一致的重复反应

一种有效的用来确定 qPCR 实验是否是最优化的方法：将模板稀释成一系列浓度梯度进行 PCR 反应，用这个结果作标准曲线，模板可以用已知浓度的样品（如纳克级的基因组 DNA 或多个拷贝的质粒 DNA）或未知浓度的样品（如 cDNA）。用模板初始量（或未知量样品的稀释倍数）的 log 值对每个稀释样品的 C_T 值作图，两者呈递减的线性关系，称之为标准曲线。递减的直线关系等式和 Pearson 相关性系数 (r) 或可信度 (R^2) 常常被用来判断 qPCR 条件是否优化。

理论上，一系列稀释样品的扩增曲线之间有均匀的间距，如图 1.2A 所示。如果产物在每一循环都加倍，荧光曲线之间的间距由等式 “ $2^n = \text{稀释倍数}$ ” 决定，这里 n 是阈值线上扩增曲线之间的循环数（或称为 C_T 的差异）。例如，10 倍稀释的 DNA 样品， $2^n = 10$ ，因此， $n=3.32$ ， C_T 值相差 3.32 个循环，由均匀间距的扩增曲线可以产生一个线性的标准曲线，如图 1.2B 所示，图中显示等式和递减线性的 r 值。

标准曲线的 r 或 R^2 值显示实验数据满足衰减的线性程度，即数据的线性程度。线性用来衡量重复样品数据是否一致和不同拷贝数的初始模板是否具有相同的扩增效率。如果重复样品的 C_T 值明显不同， r 或 R^2 值会变低，你应该优化反应条件，保证 qPCR 反应的 r 的绝对值 >0.990 或 R^2 值 >0.980 。

A



B

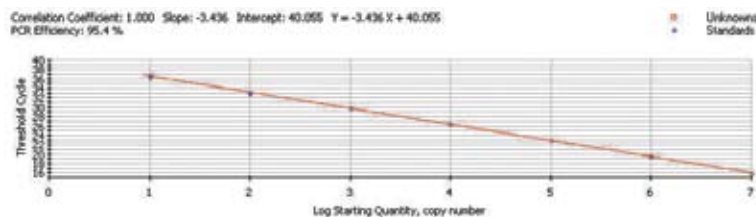


图 1.2. 作标准曲线来评定反应条件的优化。用 iCycler iQ® 实时定量 PCR 仪扩增 10 倍稀释模板的样品实验数据作标准曲线，每个稀释样品重复三次。A. 系列稀释模板的样品扩增曲线。B. 每个稀释样品的 C_T 值对初始模板量的 log 值作的标准曲线。图中显示递减直线的等式和 r 值，计算的扩增效率为 95.4%。

荧光定量 PCR 概述

基础知识与概念

扩增效率，E，与标准曲线的斜率相关，计算方程式如下：

$$E = 10^{-1/\text{斜率}}$$

理论上，在每个指数扩增循环中，PCR 产物的量加倍，即 PCR 产物 2 倍增加，反应效率为 2。在上面等式中反应效率等于 2， $2 = 10^{-1/\text{斜率}}$ ，那么，优化的标准曲线斜率应为 -3.32，斜率的绝对值与上面的荧光曲线间距相同。

扩增效率用百分率表示，即每个循环扩增模板的百分比，将扩增效率E转换成百分率为：

$$\% \text{ 效率} = (E - 1) \times 100\%$$

对于一个理想的反应， $\% \text{ 效率} = (2 - 1) \times 100\% = 100\%$ 。

图 1.2 中显示的反应：

$$E = 10^{-(1/-3.436)} = 1.954$$

$$\% \text{ 效率} = (1.954 - 1) \times 100\% = 95.4\%$$

每个循环的终点，扩增子的拷贝数增加 1.95 倍，或 95.4% 的模板被扩增。

扩增效率接近 100% 是优化的重复性好的实验的最好标志。实际操作时，反应的扩增效率应该在 90–105% 之间，如果扩增效率低，可能的原因是引物设计的不当，或者反应条件未优化；扩增效率 >100%，可能的原因是系列稀释样品加样错误，或者有非特异性产物扩增，如引物二聚体产生。用上述方法确定扩增效率，反应体系中反应抑制剂的出现也可能导致扩增效率的明显增加，原因是含有高浓度模板的样本通常也含有高浓度的抑制剂，导致反应的 C_T 延迟出现，而低浓度模板的样本中抑制剂的浓度低，反应的 C_T 延迟的程度最小，导致斜率的绝对值以及计算所得的扩增效率会增加。如果扩增效率 <90% 或 >105%，建议重新设计引物或探针，参照 2.3 和 2.4 章节引物和探针设计指南。

实验开始

总体注意事项	8
qPCR 实验设计注意事项	9
单重实验或多重实验？	9
方法选择	9
DNA 结合染料	10
基于荧光标记的引物或探针的化学机理	12
SYBR Green I 反应设计及优化	19
引物和扩增子的设计	19
实验体系的确定及优化	20
退火温度的优化	20
用标准曲线进行反应的评估	22
TaqMan 探针反应设计及优化	23
引物和探针设计	23
实验体系的确定及优化	24

2. 实验开始

已经介绍了荧光定量 PCR 的概念，现在我们可以进一步研讨更多的实用细节问题。本章给出建立荧光定量 PCR 检测的建议，包括基本的实验室设备 (2.1 章节)、基本实验设计和反应成分组成 (2.2 章节)、决定单重或多重检测 (2.2.1 章节)、选择荧光定量的化学方法 (2.2.2 章节)，还给出了最常用化学方法 SYBR Green I (2.3 章节) 和 TaqMan (2.4 章节) 来建立 qPCR 反应的更详细的指导。

2.1 总体注意事项

正确的实验技巧是成功的荧光定量 PCR 反应重要然而常被忽视的要素。为得到最佳的实验结果，实验人员要尽可能减少样品间交叉污染的可能，避免将核酸从一个实验带入下一个实验。以下措施有助于避免实验污染问题：

- 用稀释的漂白剂或净化剂抹擦工作台
- 在指定地配有紫外灯的超净室、罩式或台式超净台中准备样品，理想的条件是样品准备与 PCR 扩增分开在不同的区域，注意避免质粒或扩增子污染样品准备区，绝不要将扩增后产物带入指定洁净区
- 在样品准备和配制反应液过程中勤换手套
- 使用轴防护装置的移液器和带滤芯的移液器头
- 勤用稀释的漂白剂清洁移液器
- 只使用 PCR 级的水和 PCR 专用试剂进行 PCR 实验
- 用带旋盖的 EP 管稀释和配制反应液

除了注意以上事项，在进行 PCR 实验时，还应准备一个无模板的对照来验证有无污染发生，而且用热启动酶防止反应开始之前的非特异性扩增。

为最小化实验结果的统计学偏差，先制备混合反应液，建议所有样本有三个重复。大剂量包装的反应试剂，使用前进行分装，尽量减少试剂的反复冻融。

2.2 qPCR 实验设计注意事项

设计实时 PCR 实验的第一步是根据目的确定最好的实验方法，用单重还是多重检验？采用哪种化学方法？下面详细阐述每一种检测办法，并对如何选择最好的实验方法给出指导。

2.2.1 单重实验或多重实验？

在单个反应管中扩增多于一个目标片段时，实际操作和科学的原因都可能迫使你尝试多重反应。最近，依赖荧光定量 PCR 仪的性能，在单个反应管中扩增和定量多达 5 种目标的反应成为可能。比较单重技术，多重技术具有以下优点：

- 减少初始模板用量，这在初始材料量有限时很重要
- 如果对照基因在每个样品中都能被扩增出来，可以减少假阴性
- 增加实验通量，同时减少试剂消耗
- 将样品操作及实验室污染降几率到最低

如果上述事项对于你的实验都不重要，那么单重反应就足够了。第 3 章将对怎样建立和优化多重 qPCR 反应给出实践方案。

2.2.2 方法选择

设计 qPCR 实验的关键一步是选择监测目标序列扩增的化学方法，可用的荧光化学方法多种多样，被分为 2 大类：1) DNA 结合染料 (SYBR Green I)，2) 荧光染料标记地序列特异性寡聚核苷酸引物或探针 (分子信标和 TaqMan、杂交探针、Eclipse 探针，Amplifluor、Scorpions、LUX and BD QZyme 引物)。实时 PCR 最常用的化学方法是 DNA 结合染料 SYBR Green I 和 TaqMan 水解探针，2.2.2.1 和 2.2.2.2 部分概述了这些不同类型的荧光化学方法。

无论是单重或多重反应，还是出于成本考虑，选择化学方法的依据是 qPCR 检验的应用目的。总体来说，对于低通量、单重实验，优先考虑使用 DNA 结合染料，因为这个实验设计简单、条件建立快、开始成本低；而对于高通量实验，荧光标记引物或

探针的实验（单重或多重）更加合适，因为最初的成本可以在以后的多个实验中分摊且多重分析可以节省时间。多重分析要求一个用于标记引物或探针的荧光化学方法，由于 DNA 结合染料缺乏特异性，使得其与多重定量分析矛盾。

2.2.2.1 DNA 结合染料 (SYBR Green I)

SYBR Green I 是荧光定量 PCR 最常用的 DNA 结合染料，与双链 DNA (dsDNA) 非特异性结合。在游离状态下，SYBR Green I 发出微弱的荧光，但一旦与 dsDNA 结合，其荧光增加 1,000 倍 (图 2.1)。所以，一个反应发出的全部荧光信号与出现的 dsDNA 量成比例，且会随扩增产物的增加而增加。

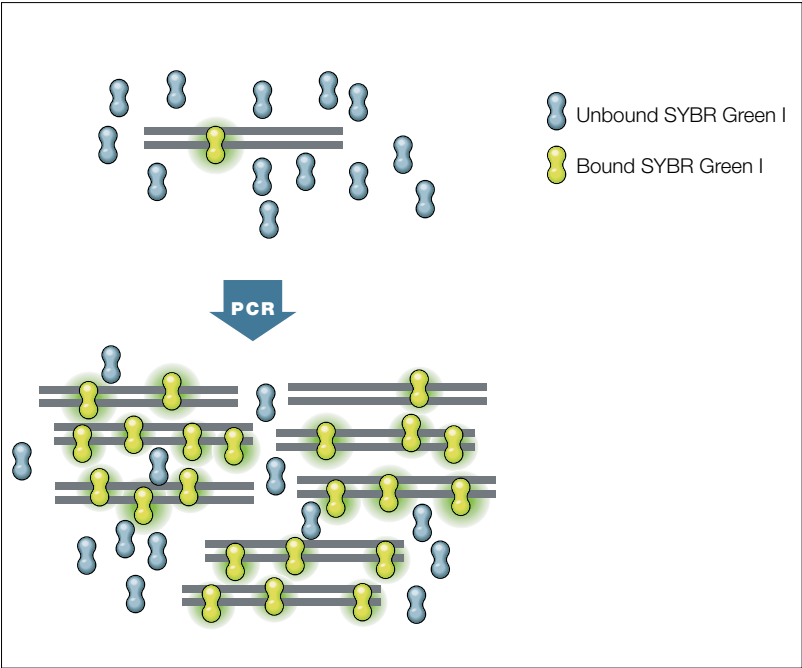


图 2.1. 实时 PCR 中的 DNA 结合染料，当染料分子与 dsDNA 结合时荧光信号剧增。

dsDNA 结合染料的优点包括：实验设计简单（仅需要 2 个引物，不需要设计探针），无需设计多个探针即可以快速检验多个基因（如确认基因芯片实验的多基因表达数据结果），低的初始成本（探针成本高），且能够进行熔点曲线分析检验扩增反应的特异性。

熔点曲线分析可以用来确定不同的反应产物，包括非特异性产物。扩增反应完成后，通过逐渐增加温度同时监测每一步的荧光信号来产生熔点曲线，随着反应中 dsDNA 变性（即 DNA 的溶解），荧光信号降低，用荧光信号改变的负的一次导数与温度作图，在扩增子的溶解温度上有一特征峰（ T_m ，DNA 双链碱基对分离 50% 的温度），用这个特征峰可以将特异产物与其它产物如引物二聚体区分开，因为它们在不同的温度溶解。图 2.2 显示， T_m 值在 89°C 的溶解峰代表特异性产物，对应凝胶中 2、3 泳道上部条带， T_m 值在 78°C 的融解峰代表非特异性产物，对应凝胶中 2、3 泳道下部条带。

DNA 结合染料最大的缺点是缺乏特异性，即 DNA 结合染料可以结合任一 dsDNA。因此，荧光 PCR 反应中非特异性产物的出现会增加荧光值，影响定量结果的准确性。另外，DNA 结合染料不能用于多重反应，因为不能区分不同扩增子发出的荧光。然而，在用 SYBR Green I 进行荧光定量 PCR 分析时，可以设计平行反应来检测多个基因，例如目标基因和参照基因。

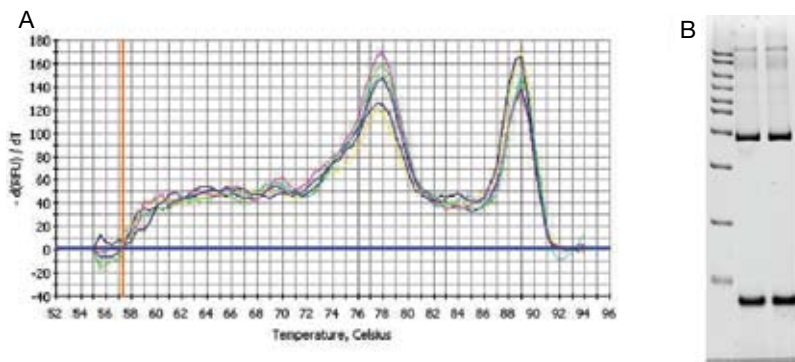


图 2.2. SYBR Green I 反应产物的熔点曲线分析，荧光定量 PCR 仪的熔点曲线分析功能可以用于区分特异性与非特异性产物。A，荧光强度改变的一次负导数与温度的作图，2 个峰代表 2 个 PCR 产物的 T_m 值；B，qPCR 产物凝胶电泳分析。第 1 泳道，分子量标记，50–2,000 bp，第 2,3 泳道，显示 (A) 反应的 2 个重复样品，凝胶中 2 条分离的条带显示 2 个 PCR 产物。

2.2.2.2 基于荧光标记的引物和探针的化学机理

许多基于荧光标记的引物和探针的化学方法已经被设计出来，并且可以从不同的供应商处购买到。在以下部分会详细阐述最普遍使用的化学物质，TaqMan 探针和分子信标，另外还简单的介绍其它的荧光标记引物和探针的化学方法，包括 Eclipse 探针、Amplifluor、Scorpions、LUX 和 BD QZyme 引物。

基于荧光标记的引物和探针的化学方法具有一些共同的特征。总的来说，这些化学方法利用荧光共振能量传递 (FRET)，或一些其它荧光淬灭形式来保证仅在扩增产物出现时特异的荧光才能被监测到。引物或靶标特异的寡聚核苷酸探针被标记上一个荧光报告基团，多数情况下，设计寡聚核苷酸探针，通过在探针上标记淬灭分子和设计相关机制：当特异的靶标不存在时荧光信号被淬灭，当探针结合到特异的靶标上时，报告基团与淬灭基团分离，来监测荧光信号。下面详细阐述各个化学方法的原理。

荧光定量 PCR 实验中，荧光引物和探针有优于 DNA 结合染料的 2 大特征，第一，它们可以特异地监测目标序列，防止非特异性产物的干扰而影响定量的准确性；第二，它们可以用于多重反应。

TaqMan 实验

TaqMan 实验使用一条序列特异地、荧光标记的寡聚核苷酸探针，叫 TaqMan 探针和一对序列特异的引物。图 2.3 显示 TaqMan 实验的工作原理，与所知的 5'-核酸酶实验一样，TaqMan 实验利用某些热稳定的聚合酶的 5'-核酸外切酶的活性，如 *Taq* 或 *Tth*，探针包含 5' 端的荧光报告基团和 3' 端的荧光淬灭基团。当探针完整时，由于接近淬灭基团，报告基团的荧光被淬灭，在扩增反应退火/延伸合并的阶段，探针与靶标杂交，*Taq* 或 *Tth* 的 dsDNA 特异地 5'→3' 外切酶活性切除报告基团，所以，报告基团与淬灭基团分离，产生的荧光信号与样本中扩增产物的量成比例。常用的荧光报告基团为荧光素 (FAM，发出绿色荧光)，淬灭基团为 BHQ 1，表 2.1 列出了合适的报告基团与配对的淬灭基团更多的信息。

TaqMan 探针主要优点包括高特异性、高信噪比和能进行多重反应，缺点是探针的初始成本高和实验设计繁琐，2.4.1 节详细阐述了 TaqMan 实验设计。

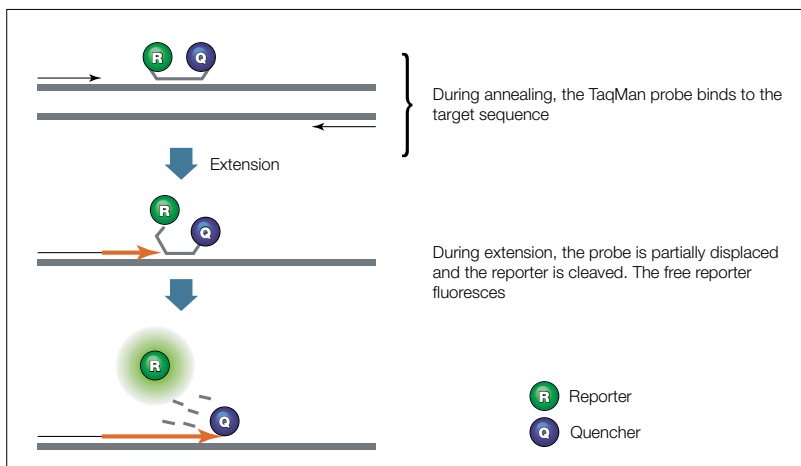


图 2.3 TaqMan 实验

分子信标

除 2 个序列特异的引物荧光，分子信标实验使用一个序列特异、荧光标记的寡聚核苷酸探针叫分子信标。一段荧光标记、具有茎环状发夹结构的寡聚核苷酸 (25-40nt) (图 2.4)，分子信标的 5' 端附有荧光报告基团，3' 端附有淬灭基团，环被设计成与靶标序列的 15-30 核苷酸特异杂交，环的两端各有 5-6 核苷酸互补形成茎结构，将报告基团与淬灭基团连接到一起。发夹结构中，由于报告基团接近淬灭基团，监测不到荧光信号，在扩增反应的退火阶段，分子信标与靶标序列结合，报告基团与淬灭基团分离，因此报告基团不再被淬灭。与 TaqMan 实验不同，在反应中分子信标被替代而不是被破坏，因为所用的 DNA 聚合酶缺乏 5' 核酸外切酶的活性。由分子信标上报告基团发出的荧光信号强度与反应中靶标的量成比例。

分子信标有一些优于其它化学物质的特点：高特异性、可以用于多重反应，如果靶标序列与信标匹配不正确，不能杂交而不能发出荧光——适合区分等位基因。

使用分子信标的最大缺点是它的设计，发夹的茎必须坚固足以防止分子的随机折叠成非发夹结构，非发夹结构会导致随意荧光产生；同时，发夹的茎不要太坚固，否则信标不能与靶标正确杂交。

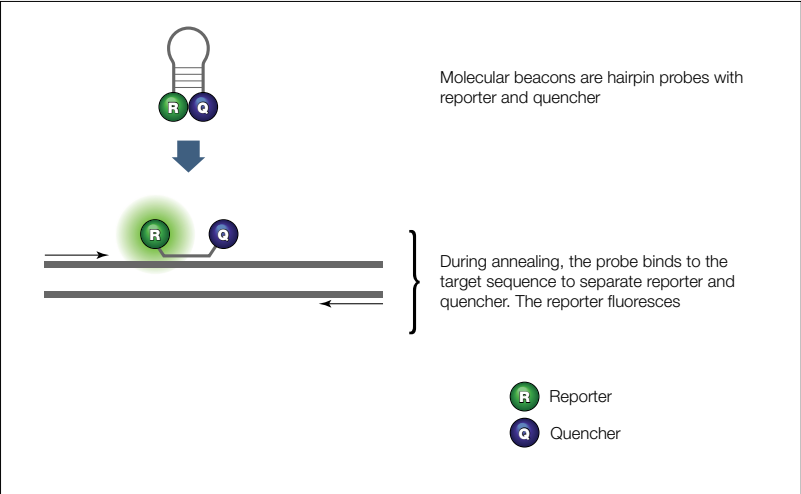


图 2.4 分子信标

其它化学方法

杂交探针实验采用 2 条序列特异性寡核苷酸探针和一对序列特异性引物，2 条探针被设计成结合与靶标上的相邻位置，如图 2.5 所示。第一个探针 3' 端带有供体基团，而第二个探针的 5' 端带有受体基团，选择合适的供体及受体基团，以致供体基团发射波长与受体基团的激发波长显著重叠，而供体基团发射波长与受体基团的发射波长明显分离，在特定波长激发供体基团，在受体基团发射波长处监测。在 PCR 反应退火步骤，探针头尾相连地杂交在靶标序列上，因此荧光分子接近，从供体到受体产生荧光共振能量传递，受体荧光信号的增加与扩增子出现的量成比例。

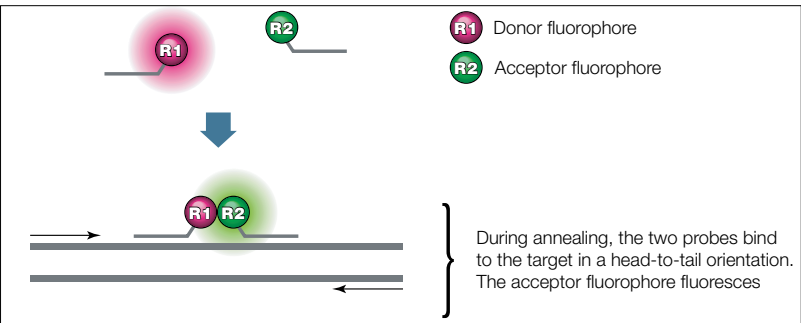


图 2.5 杂交探针

Eclipse 探针的 qPCR 实验采用一对引物和一段序列特异的寡聚核苷酸探针，如图 2.6 所示，探针与扩增子内的序列互补，并且 3' 端带有荧光报告基团、5' 端带有荧光淬灭基团和一个沟结合物 (MGB)。未杂交的探针采用的构型使带有报告基团和淬灭基团在一起，淬灭报告荧光。在 PCR 反应退火步骤，在 MGB 的帮助下，探针与靶序列杂交，探针因此变成线性，报告基团与淬灭基团分离，报告基团发出荧光，由此产生的荧光信号与样本中扩增产物的量成比例。

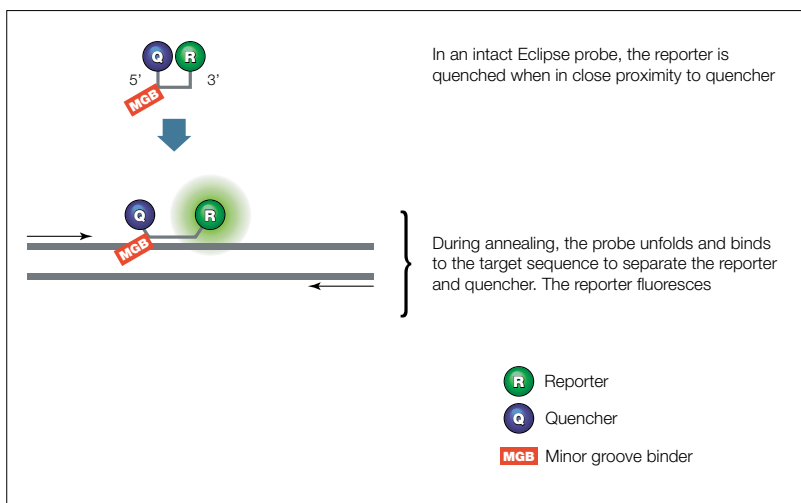


图 2.6 Eclipse 探针

用 **Amplifluor 探针**的 qPCR 实验采用一对靶标特异的引物和一个通用引物叫 UniPrimer，第一个靶标特异引物含有一个 5' 端外延序列叫 Z 序列，Z 序列也存在于 UniPrimer 的 3' 端，如图 2.7 所示，UniPrimer 形成发夹结构，荧光报告基团和淬灭基团分别连在茎结构的 5' 和 3' 端，在这个发夹构型中，由于报告基团与淬灭基团接近，报告基团的荧光被淬灭。第一个扩增循环时，第一个靶标特异的引物（带有 Z 序列）与模板杂交，然后延伸；第二个循环时，第二个靶标特异的引物被用于合成一个新的目标模板，它含有一段与 Z 序列互补的序列，从第二个循环产生的产物可以作为 UniPrimer 的模板，在第三个扩增循环中延伸的 UniPrimer 作为模板用于下一轮扩增，第四个循环，模板扩展到 UniPrimer 的发夹部分，导致 UniPrimer 的开放，成为线性结构，这使得报告基团发出荧光。在紧接之后的循环中，用第二个靶标特异引物和 UniPrimer 进行指数扩增，结果荧光信号与样本中扩增产物的量成比例。

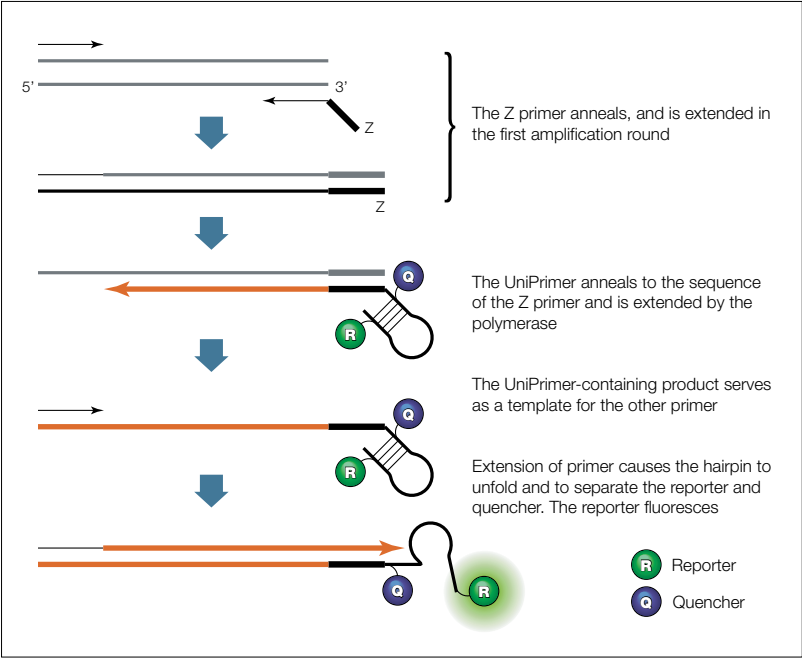


图 2.7 Amplifluor 探针

Scorpions 引物实验采用一对引物，其中一个同时作为探针，具有茎环结构，5' 有荧光报告基团，3' 端有淬灭基团，如图 2.8 所示。引物的环序列与同一条链的靶序列内在的一段互补，第一个扩增循环时，引物延伸，在同一条链上产生与环序列互补的序列，引物的 3' 端的淬灭基团部位含有一个 PCR 阻碍物，以阻止反向链在延伸时通读；之后变性和退火，探针的环通过分子内相互作用与靶标序列杂交，报告基团与淬灭基团分离，最终产生的荧光信号与样本中扩增产物的量成比例。

LUX 引物实验采用一对引物，其中一个的发夹构型，靠近 3' 端带有一个荧光报告基团，如图 2.9 所示，引物完整时，报告基团被发夹的二级结构淬灭。扩增过程中，LUX 引物与产物结合，报告基团发出荧光。

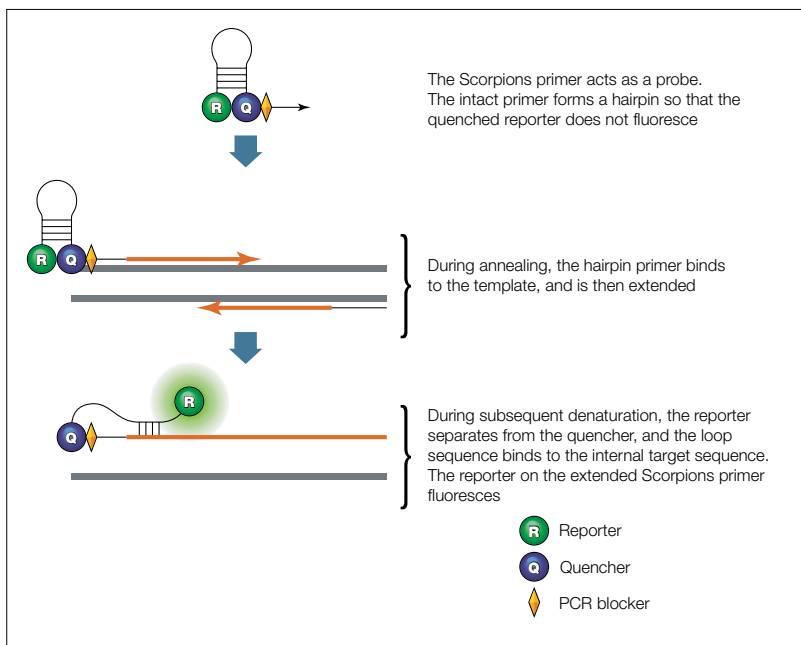


图 2.8 Scorpions 引物

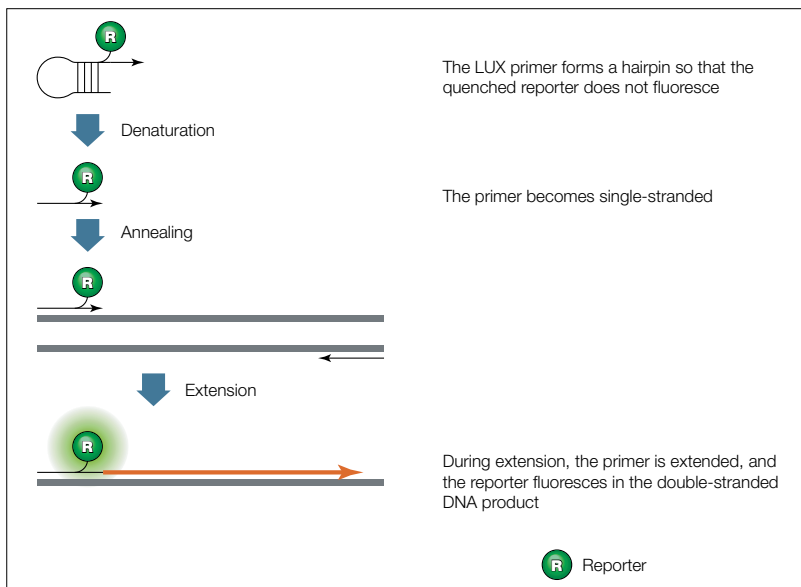


图 2.9 LUX 引物

实验开始

qPCR 实验设计注意事项

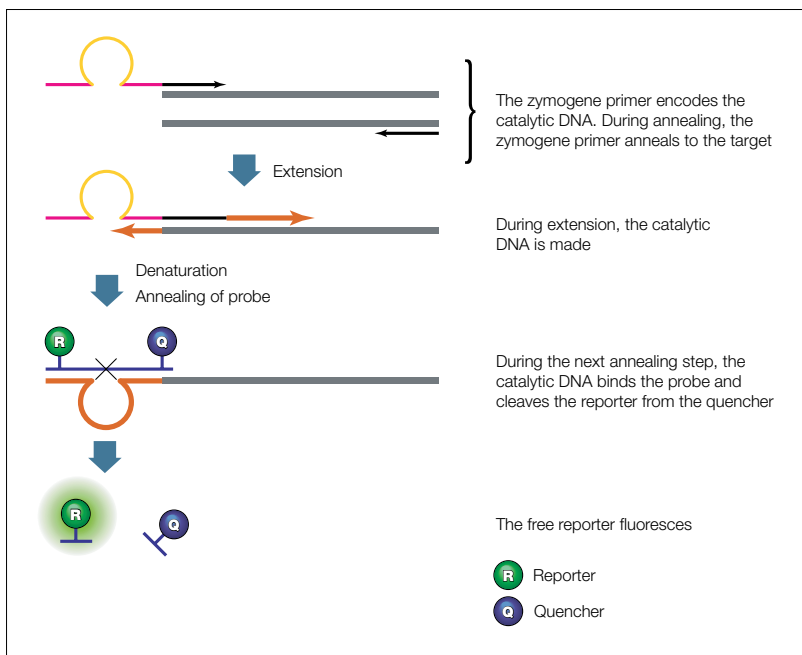


图 2.10 BD QZyme 引物

用 BD QZyme 引物进行 qPCR 实验采用一个靶标特异的酶原引物，一个靶标特异的反向引物和一个通用的寡聚核苷酸底物，如图 2.10 所示。寡聚核苷酸 5' 端有荧光报告基团、3' 端有淬灭基团。当寡聚核苷酸底物完整时，由于接近淬灭基团，报告基团的荧光被淬灭，酶原引物含有一段编码催化 DNA 序列，第一个扩增循环时，酶原引物延伸；第二个扩增循环中，第一个循环的产物作为靶标特异的反向引物的模板，延伸后产生一个新的含有催化 DNA 区域的靶序列。在之后的退火步骤中，荧光标记的寡聚核苷酸底物与催化 DNA 序列杂交，然后被剪切，报告基团与淬灭基团分离，结果产生的荧光信号与样本中的扩增产物的量成比例。

2.3 SYBR Green I 反应设计和优化

SYBR Green I 进行定量 PCR 实验反应体系含有一对用于扩增靶序列内特异区段的 PCR 引物和用于扩增产物使用的 SYBR Green I 染料。SYBR Green I 实验的步骤如下：

- 引物和扩增子设计
- 反应条件确定和优化

详细步骤见 2.3.1 和 2.3.2 节。

2.3.1 引物和扩增子设计

成功的荧光定量 PCR 反应要求高效和特异性扩增产物，引物和靶序列都会影响扩增效率。因此在选择靶序列和设计引物时，必须考虑到这一点。满足实验设计要求的软件程序有很多，有免费的和商业付费的，Primer3 是一个很受欢迎的在线引物设计程序 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)；还有用于引物设计和扩增子选择的商业付费软件如 Beacon Designer。

扩增子设计遵循以下原则：

- 扩增子长度 75—200bp，片段越短扩增效率越高；但如果片段小于 75bp，扩增子很难与可能存在的引物二聚体区分。
- 尽可能的避免产生二级结构。推荐使用软件如 mfold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>) 来预测扩增子在退火温度条件下是否形成二级结构，更多详细资料请参阅 Bio-Rad bulletin 2593
- 模板尽量避免有长的 (>4) 单碱基重复
- GC 含量为 50–60%

引物设计遵循以下原则：

- 引物的 GC 含量为 50–60%
- 熔解温度(T_m) 在 50°C–65°C 之间，计算 T_m 时，建议使用 50mM 盐浓度和 300nM 核苷酸浓度。
- 避免产生二级结构，必要时引物结合位置设计在目标序列二级结构区域之外
- 避免超过 3 个 G 或 C 重复片段
- 引物末端碱基为 G 或 C

- 检查正向和反向引物确保3' 没有互补配对（避免引物二聚体形成）
- 用软件来检验引物的特异性，如 Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)

2.3.2 实验体系的优化

SYBR Green I 实验反应成分如下：

- 含有 SYBR Green I 的 PCR 反应液
- 模板
- 引物

预混的荧光定量 PCR 反应液含有反应缓冲液、DNA 聚合酶、dNTPs 和 SYBR Green I 染料，这些成分可以从多个商家购买，我们推荐使用 iQ™ SYBR® Green 超混合液。

优化的 SYBR Green I PCR 反应灵敏性和特异性高，在宽的动态范围内都有很好的扩增效率。确定一个 SYBR Green I qPCR 反应的性能，通过下面两步来实现：

- 确定最佳的退火温度
- 构建标准曲线来确定反应性能

2.3.2.1 退火温度的优化

qPCR 最佳的退火温度在具有温度梯度的仪器上很容易确定，如 MiniOpticon™，MyiQ™，Chromo4™ and iQ™5 系统。温度梯度的功能允许同时在一个温度范围内优化实验的退火温度，因此一次实验可以得到最佳的退火温度。

为了找到最佳的退火温度，我们建议在计算得到的 T_m 值上下一定范围内，优化退火温度。图 2.11 是一个退火温度优化的实验例子。

由于 SYBR Green I 与染料所有 dsDNA 结合，因此，有必要通过分析扩增产物来检查 qPCR 的特异性，可以利用荧光定量 PCR 仪上的熔点曲线功能，也可以用凝胶电泳分析扩增产物。图 2.12 显示图 2.11 中优化退火温度试验的熔点曲线和凝胶电泳分析结果。优化的 SYBR Green I qPCR 反应的熔点曲线只有一个峰，对应的凝胶电泳如图 2.12 中显示的一条带。图中显示的是退火温度为 62.2°C 时的结果。

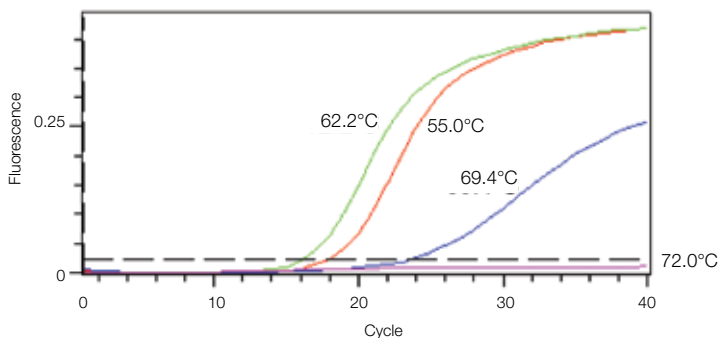


图 2.11. 退火温度优化。在 Chromo4 荧光定量 PCR 仪上设定退火温度梯度范围 55°C 到 72°C，退火温度为 62°C 时 C_T 值最小。因此选择此温度为反应的最佳退火温度。

通过熔点曲线分析来确定可能伴随特异性产物扩增同时出现的非特异性扩增产物。图 2.13 示例，特异性产物熔点曲线峰 T_m 为 89°C，对应凝胶电泳图中上面的条带，非特异性产物熔点曲线峰 T_m 为 78°C，对应凝胶电泳图中下面的条带，比较凝胶电泳图和熔点曲线图，可以判定与特异性产物对应的熔点曲线峰，另外那个非特异性条带为引物二聚体。如果通过熔点曲线分析发现有非特异性产物如引物二聚体产生，我们建议重新设计反应的引物（见 2.3.1 节）。

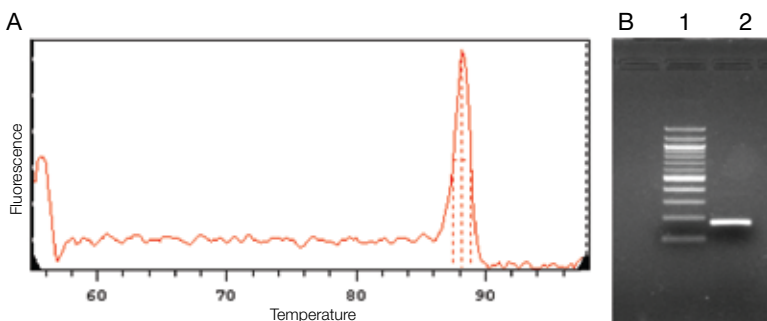


图 2.12. SYBR Green I 反应。A，熔点曲线分析，用荧光强度变化的负一次导数与温度作图。B，扩增产物凝胶电泳分析。第 1 泳道，分子量标记，100–1,000 bp，每 100 bp 递增，1,200 and 1,500 bp；第 2 泳道，单一的 PCR 产物，与图 (A) 中的峰对应。

实验开始

SYBR Green I 反应设计和优化

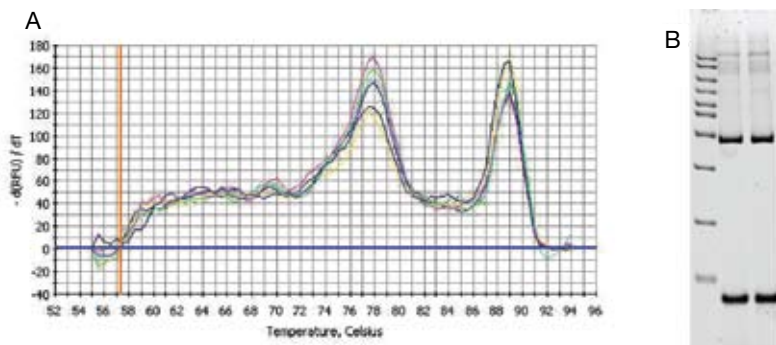


图 2.13. 熔点曲线分析。此反应中有非特异性产物即引物二聚体产生，熔点曲线分析显示一个额外的峰。A, 用荧光强度变化负一次导数与温度作图；B, qPCR 产物凝胶电泳分析。第 1 泳道，分子量标记，50–2,000 bp，第 2,3 泳道，显示 (A) 反应的 2 个重复样。

2.3.2.2 用标准曲线进行反应的评估

如 1.1.3 节描述，用未知样本系列梯度稀释样品构建标准曲线，来判定 SYBR Green I 反应的效率、重复性和动态范围。理想的扩增效率应在 90–105% 之间，标准曲线的 $R^2 > 0.980$ 或 $r > |-0.990|$ ，同时重复样本的 C_T 值应相近。

用作标准曲线的模板浓度范围必须涵盖所有待测样本模板浓度，使得待测样本的实验结果在反应的线性动态范围内。如果待测样本的实验结果在标准曲线范围外，通过以下步骤之一来完善实验：

- 构建更宽地能覆盖待测样本浓度的标准曲线进行分析，同时确保标准曲线在新的浓度范围内的线性
- 如果待测样品 C_T 值低于标准曲线上最高浓度标准品的 C_T 值，稀释待测样品再进行 qPCR 反应
- 如果待测样品 C_T 值高于标准曲线上最低浓度标准品的 C_T 值，增加待测样品量再进行 qPCR 反应。

2.4 TaqMan 探针反应设计和优化

TaqMan 反应包括一对 PCR 引物和序列特异的双标记荧光探针，分析步骤为：

- 引物和探针的设计
- 反应体系的确定和优化

详细步骤见 2.4.1 和 2.4.2 章节。

2.4.1 引物和探针设计

同任何 qPCR 反应一样，基于 TaqMan 探针的 qPCR 反应对扩增的效率和特异性也有要求。引物设计的原则与 2.3.1 节阐述的相同。通常引物设计在退火温度在 55-60 °C 之间。推荐使用设计软件如 Beacon Designer 来设计 TaqMan 探针和引物。由于双标记的探针是 TaqMan 实验最昂贵的成分，建议先订购引物，用 SYBR Green I 反应来确定引物的性能，之后再订购 TaqMan 探针 (SYBR Green I 反应中引物的确定见 2.3 节)。

TaqMan 探针的 T_m 比引物的 T_m 高 5-10°C，在大多数情况下，探针小于 30 个核苷酸且 5' 端不含 G，因为 G 能够淬灭荧光信号。选择在靶序列内一段 GC 含量为 30-80% 的序列设计探针，且探针退火结合的目标单链 G 含量多于 C 含量 (因此探针的 C 含量多于 G 含量)。

设计 TaqMan 探针的一个重要方面是荧光报告基团和淬灭基团的选择，表 2.1 列出常用的报告基团和淬灭基团组合。当设计单重反应时，推荐用 FAM 标记探针，因为其价格便宜、容易合成、性能良好且适用于目前市场上的所有定量仪器。

表 2.1 常用荧光报告基团和淬灭基团组合

报告基团	对应的淬灭基团
FAM	BHQ1, DABCYL,* TAMRA**
TET	BHQ1, DABCYL*
HEX	BHQ1, BHQ2, DABCYL*
TAMRA	BHQ2, DABCYL*
Texas Red	BHQ2, BHQ3, DABCYL*
ROX	BHQ2, BHQ3, DABCYL*
Cy5	BHQ2, BHQ3

* DABCYL 是机械的淬灭基团，仅适用于分子信标

** 不建议使用 TAMRA 作为淬灭基团，但是当进行单色 FAM 实验时 TAMRA 可以作为淬灭基团，TAMRA 在分子信标实验中作为淬灭基团效果较差。

获得准确的 qPCR 数据，需要考虑的另一重要方面是探针的质量。如果探针合成或纯化较差，完美设计的探针也不能成功完成实验。不正确地切除非结合的荧光标记、低效结合、和/或低效淬灭能产生高荧光信号背景或噪音，低的信噪比导致灵敏度下降和小的线性动态范围。由不同的厂家甚至同一厂家不同批次合成，具有同样序列、标记同样荧光基团的二条探针，测出荧光值也可能。因此为了反应数据具有直接可比性，建议最新合成的探针分批保存。

2.4.2 实验体系的确定及优化

基于 TaqMan 探针的 qPCR 反应含有如下成分：

- PCR 反应液
- 模板
- 引物
- 探针

含有缓冲液、DNA 聚合酶和 dNTPs 的 PCR 反应液可以从多个厂家购买，建议用 iQ™ 超混合液来进行 TaqMan 实验，引物浓度均为 300 nM、探针浓度为 200 nM。

TaqMan 实验要特别注意温度条件，常用的 TaqMan 实验用二步法代替传统的变性、退火、延伸三步 PCR 循环。二步法：第一步为变性，第二步为退火和延伸合并，温度为 55–60°C，这确保引物在延伸时探针保持与目标序列的结合。通常，将 TaqMan 探针设计在其 Tm 在 60–70°C 之间。

优化的 TaqMan 实验具有高的灵敏度和特异性，以及在宽的动态范围内良好的扩增效率。用 1.1.3 和 2.3.2 章节阐述的方法来确定 TaqMan 实验性能。用梯度稀释的已知浓

度模板扩增结果作标准曲线，用这条递减直线的 R^2 或 r 值来确定扩增效率。反应效率应在 90-105% 之间， $R^2 > 0.980$ 或 $r > |-0.990|$ ，且重复样本 CT 值相近。

如果实验能满足上述各项要求，实验可以马上开始。如果实验不能满足上述各项要求，建议实验操作者重新设计引物和 TaqMan 探针。

需要注意的是：用于作标准曲线的模板浓度范围必需涵盖全部待测样本模板浓度，使得待测样本模板的扩增结果在实验的动态范围内，如果待测样本反应结果在标准曲线的动态范围之外，必须进行下面三步的调整：

- 构建覆盖待测样本模板浓度的标准曲线，分析并确保在新的动态范围内的线性
- 如果待测样本的 C_T 值低于标准曲线上最高浓度的标准品的 C_T 值，稀释待测样本后重做实验
- 如果待测样本的 C_T 值高于标准曲线上最低浓度的标准品的 C_T 值，增加待测样品量重做实验。

多重实验注意事项

多重实验的引物及探针设计	28
多重实验的报告基团和淬灭基团选择	29
多重实验前单重实验的优化	29
多重实验的验证	29
多重实验的优化	30

3. 多重实验注意事项

如果想在同一个反应管中通过扩增多个靶标进行定量实验，即多重实验（见 2.2.1 节），在实验开始之前请阅读以下内容。

成功的多重实验源于周密的实验设计和反应条件的优化，而不是在同一反应管中将所有引物和模板简单的混合，因为在一个反应管中，任何一个靶标的扩增都能影响其它靶标的扩增。

多重荧光定量 PCR 实验普遍存在的问题是扩增样本中浓度有明显差异的所有靶标。举一基因表达研究实例，研究中用参照基因与目标基因（GOI）作比较。当二者在同一反应管中扩增时（多重反应），如果参照基因大量出现且扩增效率高于 GOI，GOI 的扩增可能受参照基因的扩增抑制，最终导致计算的样本中 GOI 的量偏低。

建立多重反应实验应采用以下步骤：

- 设计引物和探针序列
- 选择标记探针的报告基团和淬灭基团
- 优化单重实验
- 验证多重实验
- 必要时，优化多重实验

以下几节将详细阐述上述每一步骤。

3.1 多重实验的引物和探针设计

如果你正在建立多重的 TaqMan 实验，参考 2.4 节的指导设计单重 TaqMan 实验。设计所有引物的 T_m 接近相同（55–60°C），所有的探针 T_m 接近相同且约高于引物的 T_m 大约 5–10°C。重要一点是不同的引物及探针之间不能互补，因为所有的引物和探针在反应时均在同一反应管中。建议使用商业付费软件如 Beacon Designer 来设计多重反应的引物和探针组合。

3.2 多重实验的报告基团和淬灭基团的选择

多重实验要求使用多个报告基团来追踪每个靶标的扩增反应。为区分每个反应，应选择发射波长最小限度交叠的荧光报告基团。选择的荧光基团需要与所用的荧光定量 PCR 仪的激发和发射滤光片兼容，可以参照仪器手册列出的兼容的荧光基团清单，例如在 Chromo4™ 和 iQ™5 上进行 4 重反应，建议使用 FAM、HEX、Texas Red 和 Cy5；在 iQ™5 系统上进行 5 重反应，我们建议用 FAM、HEX、TAMRA、Texas Red 和 Cy5。

3.3 多重实验前单重实验的优化

建立多重实验的第一步是优化单重反应，通过梯度稀释的已知浓度的模板构建的标准曲线来确定单重反应的扩增效率，细节如 1.1.3 和 2.3.2 节所述。单重反应扩增效率应为 90–105%。

3.4 多重实验的确定

在同一块反应板上进行相应靶序列的单重和多重实验，然后比较 C_T 值。单重和多重实验得到的靶序列的 C_T 值应无明显差异，如果二者差异明显，需要优化反应条件。优化反应如 3.5 节所述，通过改变反应成分的浓度来实现。

3.5 多重实验优化

如果多重反应没有优化，那么样本中扩增效率低或低丰度靶序列的扩增会受扩增效率高或较高丰度靶序列扩增的抑制。这是由于反应组分，例如 DNA 聚合酶和核苷酸，在后期的循环中有限，抑制较低效率或低丰度的靶序列扩增。

在单重反应和多重反应中加入固定量的模板比较抑制影响效果，多重反应的 C_T 值比单重反应的 C_T 值延迟。如图 3.1 显示 4 个靶标的扩增： β -actin、鸟氨酸脱羧酶 (ODC)、抗 ODC 酶 (OAZ) 和抗 ODC 酶抑制剂 (AZI)，在其它反应组分一样的条件下单重反应 (深蓝色线表示) 和多重反应 (浅蓝色线表示) 结果，低丰度的靶序列 ODC 和 AZI 扩增受影响，导致它们在多重反应中的 C_T 值比相应单重反应中的 C_T 值延迟。

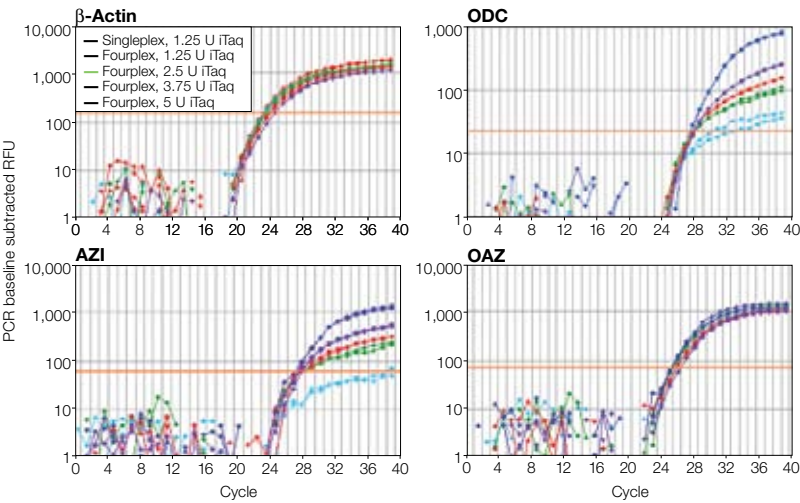


图 3.1. 四重反应中 iTaq™ DNA 聚合酶浓度优化。单重反应 iTaq 浓度 (1x)，多重反应增加 iTaq 酶浓度 (1–4x)，MgCl₂ 和 dNTP 浓度保持一致。 β -actin 和 OAZ 基因 (在同一样本中表达水平最高的基因) 在所有 iTaq 酶浓度测试条件下的单重和多重反应中扩增效率相近；而低表达的基因，AZI 和 ODC，多重扩增反应需要增加 iTaq 酶浓度，才能使它们的扩增效率达到单重反应的相近水平。

优化多重反应的一个方法是增加 DNA 聚合酶、dNTPs 和 $MgCl_2$ 的浓度。因此为优化多重反应中 β -actin、ODC、AZI 和 OAZ 的扩增，需要增加 DNA 聚合酶、dNTPs 和 $MgCl_2$ 的浓度。

首先，在多重反应中增加 DNA 聚合酶浓度，以 1.25 U 增量从每个反应 1.25U 增加到每个反应 5 U，实验结果显示，随着 DNA 聚合酶浓度增加，ODC 和 AZI 的扩增效率增加，如图 3.1 显示。

根据这个结果，我们在以下优化步骤中选用 DNA 聚合酶浓度为 3.75 U。之后，我们验证 $MgCl_2$ 浓度从 3.5 mM 增加到 5 mM 和 dNTPs 浓度从 200 μM 增加到 400 μM 的影响，结果如图 3.2 显示，当多重反应中每 50 μl 反应体积 3.75 U 的 iTaq DNA 聚合酶，200 μM dNTPs，5 mM $MgCl_2$ ，4 个基因的扩增效果最好。

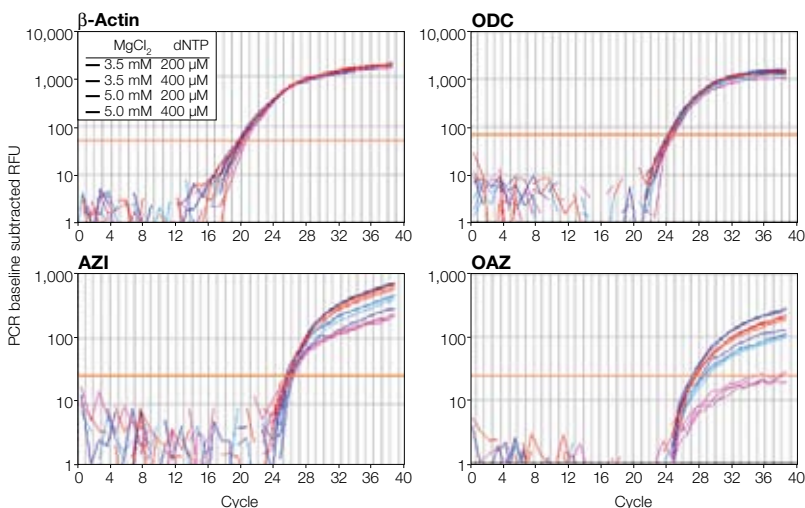
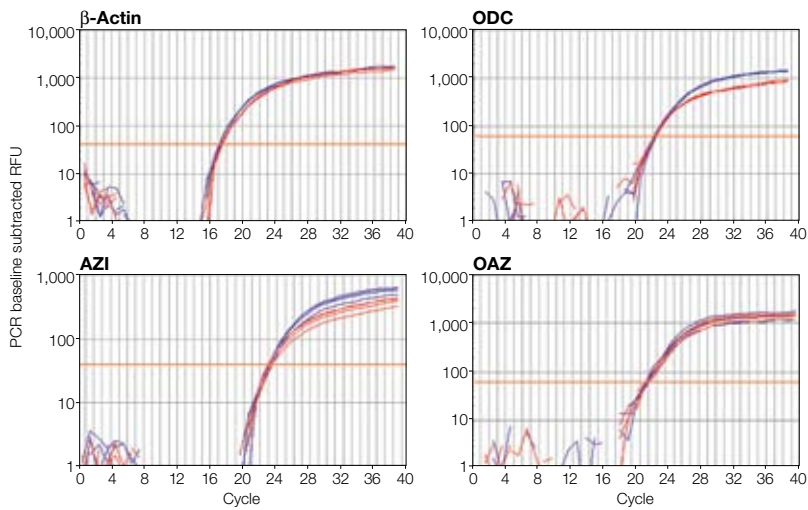


图 3.2 四重反应中 dNTPs 和 $MgCl_2$ 浓度优化。保持 iTaq DNA 聚合酶浓度为 3.75 U 每 50 μl 反应体积不变，评估 dNTPs 和 $MgCl_2$ 浓度的影响，多重扩增反应最优的条件：5.0 mM $MgCl_2$ ，200 μM dNTPs，和 3.75 U iTaq DNA 聚合酶。（单重反应数据未显示。）

为验证优化的多重实验性能，我们用优化的条件（3.75 U iTaq、5 mM MgCl₂、200 μM dNTPs）对每个引物-探针组合同时进行单重和多重反应比较实验，单重和多重反应的实时扩增图显示它们有相同的 C_T 值和在指数增长期扩增的重叠，由此成功地获得以人前列腺（图 3.3）和小肠（数据未显示）抽提的总 RNA 为模板的多重反应条件。



	C _T Values			
	β-Actin	ODC	AZI	OAZ
单重反应	17.0 ± 0.0	23.0 ± 0.2	22.2 ± 0.1	20.8 ± 0.1
多重反应	17.3 ± 0.0	23.1 ± 0.2	22.2 ± 0.1	20.8 ± 0.2

图 3.3 多重实验性能确定。单重实验数据（蓝色）和四重实验数据（红色）（4 个重复样，模板为人前列腺的 cDNA）有层次呈现，在指数增长期各图完全重叠，表中显示单重和多重反应的平均 C_T 值。

荧光定量 PCR 数据分析

绝对定量	35
什么时候使用绝对定量	35
使用标准曲线进行绝对定量	35
相对定量	37
什么时候使用相对定量	37
用质量单位作为标准进行相对定量	38
用参照基因作为标准进行相对定量	40
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) 方法	41
用参照基因的 ΔC_T 法	42
Pfaffl 方法	43

4. 荧光定量 PCR 数据分析

就像第一章所讨论的那样，荧光定量 PCR 是检测样品中核酸数量的方法。即使知道在你样品管中有 500000 个 p53 mRNA 分子也没有任何生物学意义。生物学家通常对下列事情更感兴趣：1) 给定的血样中的病毒颗粒数；2) 相当量的肿瘤组织和正常组织比，p53 mRNA 改变了多少倍。分析这两种假设的方法就分别叫做绝对定量和相对定量。

绝对定量是通过样品的 C_T 值和标准曲线进行比较实现的。分析的结果是给定数量的样品中（给定数量的细胞，每微克总 RNA）中核酸的量（拷贝数、微克）。相对定量的分析结果是在相当量的试验组（样品 A）和对照组（样品 B）中一个靶基因的相对比率（倍数差异）。

这两种方法都需要回答样品数量是多少的问题。并且，相对定量是通过等量样本间比较方法得到结果。绝对定量和相对定量两种方法中，定量 PCR 得到的数值都要进行校准才能使数据有生物学意义。这是通过归一化处理来实现的。在绝对定量中，是通过得到的目标基因的数量和样品的单位数量进行调整或者标准化得到的。在相对定量中，归一化确保相等数量的样品中比较目标基因的量。虽然任何一种定量方法的归一化可以是模板制备的细胞数目、作为 PCR 模板的核酸的微克数或者一个参照基因的表达式，但前两种常常被用来进行绝对定量，第三种被用来进行相对定量。参照基因指的是在各个样品中基因表达保持不变的基因并且在所做的实验处理过程中不发生变化。如果对加入的 RNA 的数量不能精确定量，例如只有很少的起始模板可以使用的情況下，使用参照基因法是很有优势的。

很多不同的方法可以进行绝对定量和相对定量。在下边的几个章节中，我们对什么时候和怎样使用绝对定量或相对定量提供一些具体例子和指导，并且对应用在这两种方法中的归一化定义进行进一步探究

4.1 绝对定量

4.1.1 什么时候使用绝对定量

让我们从一个需要绝对定量的样品实例开始。医生对一个病人的每毫升血液中病毒颗粒数感兴趣。所以医生从 10 毫升血液中提取 DNA，然后通过对病毒 DNA 特异的荧光定量 PCR 检测确定病毒颗粒的数目。通过待测样本的 C_T 值和已知病毒颗粒数的标准曲线进行比较，医生能够确定在分析的 DNA 样品中有 10000 个病毒。基于以上信息，她能够确定每毫升血中有 1000 个病毒。

在以上的例子中，之所以使用绝对定量，是因为医生对给定数量的样品（每毫升血）中的核酸（病毒颗粒数）感兴趣。因此，在这个例子中归一化是“每毫升血”。最终的结果是对单个样品的定量描述，并不依赖于别的样品的性质。换句话说，当你想找出一个给定样品的本质属性的时候，就应该使用绝对定量。

4.1.2 使用标准曲线进行绝对定量

绝对定量中，未知样本的量（即拷贝数或单位数量）可以通过从已知量的标准品范围中推算得出。为了建立标准曲线，需要已知浓度的模板。模板稀释后，用这些稀释样品作为标准样品，将未知的待测样本和标准样品置于同一次实验中进行反应，用稀释的标准样品构建标准曲线，通过推算来确定未知样本中目的基因的量。这与用分子量标记来判定琼脂糖凝胶上未知 DNA 条带分子量大小的原理相似。

图 4.1 示例：用标准曲线来确定特定序列标核酸的拷贝数。在此实验中，我们希望能确定 2 个样本 A 和 B 中 β -actin 基因的拷贝数，用已知浓度的 β -actin 样本 10 倍梯度稀释，得到一组含有 10^2 – 10^7 个拷贝模板数的标准品，标准品和样本在同一实验中运行。

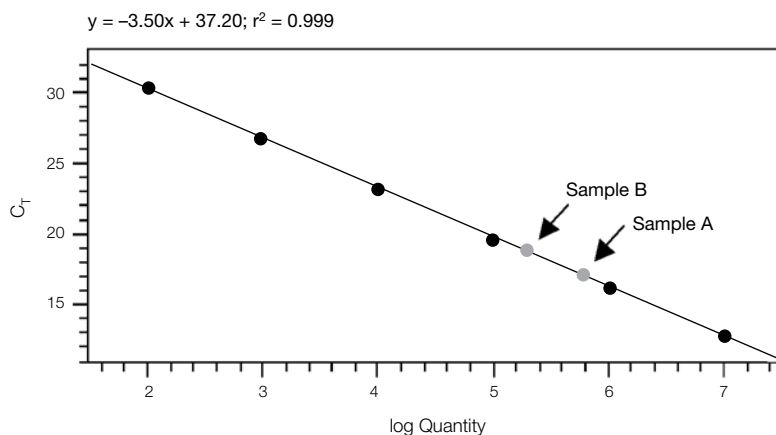


图 4.1. 用标准曲线进行绝对定量。为确定样本 A 和 B 中 β -actin 的拷贝数，10 倍稀释已知浓度样品 (10^2 – 10^7 拷贝数的 β -actin) 和未知样品一起进行 β -actin 特异的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应，通过稀释样品得到的标准曲线来确定未知样本 β -actin 的拷贝数。所有的标准稀释样品和未知样品都有 3 个重复样，定量 PCR 仪为 Chromo4。

构建标准曲线，用初始模板拷贝数的对数值为 x 轴、对应的 C_T 值为 y 轴作图 (图 4.1)，图上部显示递减线形等式 $[y = mx + b, \text{ 或 } = m(\log \text{ quantity}) + b]$

从递减的线性等式可以推导出如下等式，以确定未知样本的量：

$$N_n = 10^{\left(\frac{n-b}{m}\right)}, n = C_T$$

$$\text{Quantity} = 10^{\left(\frac{C_T-b}{m}\right)}$$

表 4.1 用绝对定量方法确定未知样本 A 和 B 中 β -actin 的拷贝数。用图 4.1 中显示递减线性等式计算未知样本的拷贝数

样品	重复	C_T	拷贝数
A	1	18.61	204,577
	2	18.41	234,115
	3	18.87	172,300
平均值			203,664 $\pm$ 30,917
B	1	17.06	569,789
	2	17.07	563,823
	3	17.00	591,173
平均值			574,928 $\pm$ 14,381

在上述等式中，样本 A 和 B 重复样分析的拷贝数由它们的 C_T 值决定。显然，当有重复样时，会出现平均值和单个的标准差报告，如表 4.1 最后一列所显示。重点提醒：标准曲线只可能用于推算而不能外推未知样本的量，因为在标准样测试范围之外的实验可能不具线性关系。

常用的荧光定量 PCR 应用绝对定量来确定染色体或基因拷贝数和病毒载量，这个定量方法概念简单，数学分析方法简单易学，然而，这个方法要求已知浓度的模板，且每次实验标准样品都必须与待测样品同时平行扩增

4.2 相对定量

4.2.1 何时使用相对定量？

举一个应用相对定量实例：研究者想知道在癌变的和正常的卵巢细胞中 p53 的表达水平是否有差异？如果有差异，相差多少？研究目的是找出等量的 2 种组织中 p53 mRNA 相对的量，或叫“差异倍数”。根据其希望采用归一化的类型，研究者可以选择以下任意一种设计。

(1) 研究者分别从 1,000 个癌变的和 1,000 个正常卵巢细胞中提取 RNA，对样本进行 p53 mRNA 特异地反转录定量 PCR 实验 (RT-qPCR) 确定 p53 mRNA 的量，结果显示了从等量癌变的和正常卵巢细胞中提取的 RNA 样本中 p53 mRNA 分子数目的比率，即 p53 mRNA 的差异倍数。

(2) 如果研究者之前已经确定癌变和正常卵巢细胞中 GAPDH mRNA 的表达水平相等, 那么, 研究者可以从大约等量的癌变和正常卵巢细胞中提取 RNA, 而不需要确定细胞的具体数目, 然后通过 RT-qPCR 实验来确定样本中 p53 mRNA 和 GAPDH mRNA 的水平。相对于正常细胞, 癌细胞中 p53 相对表达量可以由二种不同类型细胞中标准化的 GAPDH 与 p53 的表达水平比例确定。

上述实验中, 由于研究者关心等量样本 A 和 B 中靶序列的相对量, 因此选择相对定量方法。上述两种分析方法的差异在于所用的标准不同, 第一种假设中的标准是细胞数目; 第二种假设中的标准是 GAPDH mRNA 表达水平, 之前已确认 GAPDH mRNA 表达水平在两种不同类型细胞中是保持不变的恒量。4.2.2 和 4.2.3 章节分别阐述了上述两种情况实验数据的数学处理分析, 两个实例的最后结果都是对一个样本某一特性相对其它样本同一特性的数量描述, 即用相对定量去比较多个样本间某一特定性质。

4.2.2 以质量单位作为标准进行相对定量

用质量单位 (如细胞数目或核酸的微克数) 而不用参照基因作为标准的优点是, 实验设计概念简单, 数据数学分析处理简单易学。无论细胞数目或核酸质量是否作为标准, 这个方法要求准确地量化初始材料。

当用相对定量法比较多个样本时, 选择一个样本作为校验样本 (Calibrator, 即我们常说的对照), 所有其它样本目标基因的表达都以对照为标准上调或下调。通常用未处理或基准样本作为对照。在 p53 实验中, 我们可以选择正常的卵巢细胞作为对照, 癌细胞为试验样品。

为确定癌细胞对正常细胞的 p53 相对表达量，从相同数目的癌变的和正常的卵巢细胞中抽取总 RNA，用试验样品（癌细胞）和对照样品（正常细胞）的 C_T 值来计算两者间的比率，计算式如下：

$$\text{Ratio}_{(\text{test/calibrator})} = E^{C_T(\text{calibrator}) - C_T(\text{test})}$$

E 是扩增效率，1.3 章节已经阐述如何确定 E 值。假设反应具有完美的扩增效率（即每个循环模板量加倍），那么上述等式变为：

$$\text{Ratio}_{(\text{test/calibrator})} = 2^{C_T(\text{calibrator}) - C_T(\text{test})}$$

或

$$\text{Ratio}_{(\text{test/calibrator})} = 2^{\Delta C_T}$$

$$\Delta C_T = C_T(\text{calibrator}) - C_T(\text{test})$$

这种计算相对表达量的方法常常被称作 ΔC_T 法。下边的假定的例子告诉你如何使用 ΔC_T 来决定一个靶基因（p53）在肿瘤和正常卵巢组织中的表达的相对表达水平。

例子：从正常和肿瘤组织 50ngRNA 得到的 cDNA 的 C_T 值如下所示：

样品	53 的 C_T 值（目的基因）
正常（校验）	15.0
肿瘤（检测）	12.0

假设扩增效率是 100%（ $E=2$ ），选择正常细胞作为校验样本，p53 基因在肿瘤和正常卵巢细胞的相对计算如下：

$$\begin{aligned} \text{Ratio}_{(\text{test/calibrator})} &= 2^{C_T(\text{calibrator}) - C_T(\text{test})} \\ &= 2^{(15 - 12)} \\ &= 8 \end{aligned}$$

因此，p53 基因在肿瘤组织中的表达水平比在正常组织中高 8 倍。

4.2.3 以参照基因作为标准进行相对定量

用参照基因（如 GAPDH 或 β -actin）而不用质量单位作为标准的优点是，这个方法能准确量化初始材料的载量，尤其当初始材料量常常受限时，进行相对基因表达分析实验十分方便。缺点是这个方法要求得到一个或多个在所有测试样本中恒定表达的已知参照基因，而且表达水平不受研究条件下处理方式的影响。确定这样的参照基因十分重要，最近有报道提出在大多数研究实验中，使用多个参照基因对于准确定量是必须的。（详见：Vandesompele et al., Genome Biology 3, research 0034.1–0034.11, 2002）

如前面章节所讨论，用相对定量比较多个样本，样本之一常被选为参照。在其它所有样本中目标基因的表达都相对于参照上调或下调，通常用未处理的或基准样本作为校准样本。在 p53 实验中，我们可以选择正常卵巢细胞作为校准样本，癌细胞为实验样本，为确定试验样本和校准样本中目标基因相对表达量，以参照基因为标准，目标基因和参照基因的表达水平都需要用 RT- qPCR 来确定，即需要确定 C_T 值，如表 4.2 所示。

表 4.2. 以参照基因为标准的相对定量 C_T 值

	试验样本 Test	校准样本 Calibrator (cal)
目标基因 (Target gene)	$C_{T(target, test)}$	$C_{T(target, cal)}$
参照基因 (Reference gene)	$C_{T(ref, test)}$	$C_{T(ref, cal)}$

确定 C_T 值之后，可以用不同的方法来确定实验样本相对于校准样本目标基因的相对表达水平，下面我们介绍三种用参照基因进行相对定量的方法：1) Livak 法，即众所周知的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法，2) 用参照基因的 ΔCT 法，3) Pfaffl 法。每种方法都有优点和缺点，并且必须满足分析实验结果的前提条件。

4.2.3.1 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak) 方法

进行相对基因表达分析普遍采用操作简便的 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法，条件是目标基因和参照基因扩增效率都接近 100% 且相互间效率偏差在 5% 以内。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法之前，必须验证目标基因和参照基因的扩增效率。1.1.3 章节阐述了扩增效率的确定方法。

一旦确定目标基因和参照基因有相似且接近 100% 的扩增效率，你就可以确定不同样本中目标基因表达水平的相对差异，步骤如下：

首先，对所有的测试样和校准样本，用内参基因的 C_T 值归一目标基因的 C_T 值：

$$\Delta C_{T(\text{test})} = C_{T(\text{target, test})} - C_{T(\text{ref, test})}$$

$$\Delta C_{T(\text{calibrator})} = C_{T(\text{target, calibrator})} - C_{T(\text{ref, calibrator})}$$

其次，用校准样本的 ΔC_T 值归一试验样本的 ΔC_T 值：

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{test})} - \Delta C_{T(\text{calibrator})}$$

最后，计算表达水平比率：

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{表达量的比值}$$

得到的结果是通过参照基因表达水平校准的试验样本中目标基因相对于校准样本的增加或减少的倍数，用参照基因校准目标基因表达的目的是弥补样本组织量的差异。

如果目标和内参基因的扩增效率不相近，可以优化或重新设计实验，或者可以采用 4.2.3.3 节中阐述的 Pfaffl 法。另外，如果目标基因和参照基因有同样的扩增效率，但是扩增效率不等于 2，那么， $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法的公式可以修正为用实际扩增效率值代替等式中的 2。例如，如果目标基因和参照基因的扩增效率都为 1.95，计算公式为 $1.95^{-\Delta\Delta C_T}$ 。

下边的假定的例子告诉你如何使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法来决定一个目标基因（p53）在肿瘤和正常卵巢组织的表达的相对水平。

例子：正常和肿瘤组织 50ngRNA 得到的 cDNA 用来分析 p53（目标基因）和 GAPDH（参照基因）。GAPDH 用来作为参照是因为以前的研究表明这个基因在正常和肿瘤组织中没有差异。

样品	C_T p53 (目标基因)	C_T GAPDH (参照基因)
正常（校准样本）	15.0	16.5
肿瘤（试验样本）	12.0	15.9

为了用上面介绍的方法进行相对定量分析，在检测和校准的样品中靶基因的 C_T 值和内参的 C_T 值进行归一化：

$$\Delta C_{T(正常)} = 15.0 - 16.5 = -1.5$$

$$\Delta C_{T(肿瘤)} = 12.0 - 15.9 = -3.9$$

然后，试验样本的与校准样本的 ΔC_T 值进行归一化

$$\begin{aligned}\Delta\Delta C_T &= \Delta C_{T(肿瘤)} - \Delta C_{T(正常)} \\ &= -3.9 - (-1.5) = -2.4\end{aligned}$$

最后，计算表达比率：

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(-2.4)} = 5.3$$

因此，肿瘤细胞的 p53 表达水平比正常细胞高 5.3 倍

4.2.3.2 用参照基因的 ΔC_T 法

用参照基因的 ΔC_T 法是 Livak 法的一种变化形式，它更容易掌握且结果相同，与 3.2.2 章节中得到的 ΔC_T 值相比， ΔC_T 法用每个样本中参照基因与目标基因的 C_T 值差异。虽然这种方法的操作步骤简单，但同样能真实衡量基因表达水平，将参照基因的表达水平计算在内。结果显示，主要的差异是，校准样本的表达水平不是 1.0。如果用这个方法得到的表达值除以所选的校准样本的表达值，计算结果与 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法的结果正好相同：

$$\text{Ratio (reference/target)} = 2^{C_{T(\text{reference})} - C_{T(\text{target})}}$$

这个方法的数学前提与 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法的相同。

例子：正常和肿瘤组织 50ngRNA 得到的 cDNA 用来分析 p53 (目标基因) 和 GAPDH (参照基因)。GAPDH 用来作为参照是因为以前的研究表明这个基因在正常和肿瘤组织中没有差异。

样品	C _T p53 (目标基因)	C _T GAPDH (参照基因)
正常 (校准样本)	15.0	16.5
肿瘤 (试验样本)	12.0	15.9

为了计算相对表达，对每种样品中的 p53 的表达量进行归一化

$2^{(C_T(GAPDH) - C_T(p53))} = \text{表达}$

对于正常细胞， $2^{(16.5 - 15)} = 2.8$

对于肿瘤细胞， $2^{(15.9 - 12)} = 14.9$

尽管这种方法得到的结果与 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法不同，但是快速分析这两个样本的比值能够得到极其一致的结果。

正常组织的表达=正常/正常 = $2.8/2.8 = 1$

肿瘤组织表达=肿瘤/正常= $14.9/2.8 = 5.3$

4.2.3.3 Pfaffl 法

当目标基因和参照基因的扩增效率相近时，用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法定量相对基因表达是最合适的方法，但是如果两个扩增子扩增效率不同，必须选择另一个方法来确定不同样本中目标基因的相对表达量。用下列公式确定测试样和校准样之间表达比率：

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{T, \text{target (calibrator - test)}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{T, \text{ref (calibrator - test)}}}}$$

上述等式中， E_{target} 和 E_{ref} 分别是目标基因和参照基因的扩增效率， $\Delta C_T \text{ target}$ (calibrator – test) 是校准样本中目标基因的 C_T 减去测试样中目标基因的 C_T ， $\Delta C_T \text{ ref}$ (calibrator – test) 是校准样本中参照基因的 C_T 减去试验样本中参照基因的 C_T 。

上述等式的前提：每个基因（目标和参照）在试验样本和校准样本中有相同的扩增效率，但是目标基因和内参基因之间的扩增效率可以不同。。

$2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法和 Pfaffl 法相关性很大，事实上， $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法是 Pfaffl 法的简单的特例：当 $E_{\text{target}} = E_{\text{ref}} = 2$ 时。如果用 2 代换 E_{target} 和 E_{ref} ，Pfaffl 法简化如下：

$$\begin{aligned}\text{Ratio} &= \frac{2^{\Delta C_{T, \text{target}} (\text{calibrator} - \text{test})}}{2^{\Delta C_{T, \text{ref}} (\text{calibrator} - \text{test})}} \\ &= 2^{-[C_{T, \text{target}} (\text{test}) - C_{T, \text{target}} (\text{calibrator})] - [C_{T, \text{ref}} (\text{test}) - C_{T, \text{ref}} (\text{calibrator})]} \\ &= 2^{-\Delta\Delta C_T}\end{aligned}$$

基因表达分析

实验设计	46
RNA 分离	47
样品收集	47
RNA 提取	48
检测核酸的质量和数量	48
cDNA 模板的制备(反转录)	49
qPCR 实验方法选择	50
应用举例	51
多重分析的反应组分	51
循环条件	51
基因表达数据分析	52

5. 基因表达分析

荧光定量 PCR 最普遍的应用是研究基因表达情况。在现代生物医学研究的许多领域，从基础科学研究到药物研究的实际应用，检测基因表达情况都是基本的也是很重要的工作。很多基因表达研究中，研究者感兴趣的是，待测样品与对照样品相比，基因表达水平的相对变化情况。例如，一个研究者感兴趣的是，某个特定基因在癌变组织与正常组织中基因表达的变化情况。在这个部分，我们会给出概括性指导方针和一个基因表达实验的实例，给大家示范如何利用实时 PCR 进行基因表达分析。

5.1 实验设计

接下来的部分是一个用 TaqMan 探针进行多重 PCR 扩增分析基因表达差异的实例。在这个例子中，我们感兴趣的是聚胺生物合成途径中三个基因在两个不同样本中的相对表达情况。这三个基因分别是鸟氨酸脱羧酶 (ODC)、抗 ODC 酶 (OAZ) 和抗 ODC 酶抑制剂 (AZI)。两个样本是样本 A 和样本 B。考虑到可能存在的加样误差和所使用的 RNA 的定量误差，起始 cDNA 的使用量在不同的定量 PCR 反应体系中会有所不同。在这个例子中，选择参照基因 β -actin 的表达作为标准，均一化处理不同 cDNA，检测 ODC、OAZ 和 AZI 在两个不同样本中相对表达水平。实验步骤如下：

1. 从样本 A 和样本 B 中分离 RNA。
2. 将 RNA 反转录成 cDNA。
3. 用多重 qPCR 法检测每个 cDNA 样本中三个目的基因 (ODC、OAZ 和 AZI) 和参照基因 (β -actin) 的量。
4. 分析数据，并计算出每个目的基因在两个样本中的相对表达情况。

该实验是典型的 RT-qPCR 实验流程。见图 5.1。在接下来的部分，我们会详细介绍这个流程中的每个步骤需要实际注意的事项。

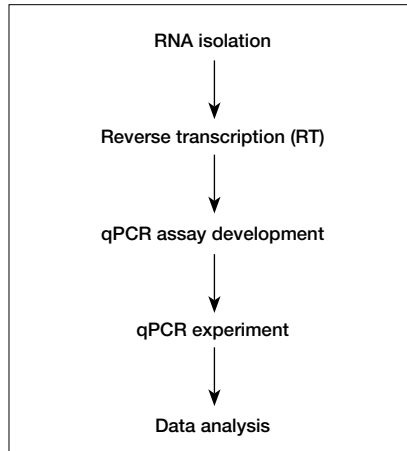


图 5.1 基因表达分析实验流程

5.2 RNA 分离

5.2.1 样品收集

为了很好的检测基因表达情况，样品应该尽可能的保持均一。如果你的样品组织包含许多不同的细胞类型，检测目的基因的表达会变得困难。如果你想得到均一的样本，要用可以分离特定细胞的许多种方法中的一种来操作。这些方法包括组织解剖、穿刺活组织切片检查 (needle biopsies) 和激光捕获微解剖 (laser capture microdissection)。然后，从收集到的细胞中获得 RNA 样品。

5.2.2 RNA 提取

大多数的 RT-qPCR 都能使用总 RNA 和 poly(A+) RNA 的任意一种。在操作 RNA 时一个很重要的问题就是要避免你的溶液、耗材和实验器具出现 RNA 酶污染。要使用的无 RNA 酶的溶液可以从公司购买。或者，用 DEPC 处理后再高压灭菌。使实验器具上存在的 RNA 酶失活有两种方法，一是用 DEPC 处理，二是 250°C 烘烤器具 3 小时。无 RNA 酶的耗材也可以从许多商业公司购买到。

制备得到的 RNA 样品要用 DNA 酶处理一下，来消除可能被扩增的基因组 DNA。如果基因组 DNA 被扩增，mRNA 的拷贝数就会被高估。但是，由于刚开始使用的样品数量是有限制的，我们不推荐使用 DNA 酶处理样品，因为额外的操作会损失 RNA。可以通过设计转录特定的引物来消除基因组 DNA 扩增带来的影响，比如，引物本身或其扩增产物跨外显子。

5.2.3 检测核酸的质量和数量

核酸数量的正确是基因表达分析所必需的，特别是要用总 RNA 的量来对目的基因表达进行标准化时。一般来说，RNA 的浓度和纯度可以用 260 nm 和 280 nm 紫外吸收的比值来检测。总的来讲，这种方法的灵敏度较低，特别是对相对较稀的样品，它不能正确指示 RNA 的质量。为了很好的检测样品的质量和数量，我们推荐使用 Experion™ 全自动电泳系统。(见产品指南)高质量和低质量总 RNA 样品的全自动电泳图见图 5.2。

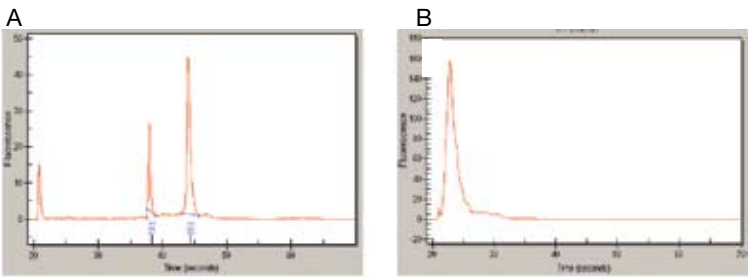


图 5.2 使用 Experion 全自动电泳系统检测的 RNA 质量

A：高质量的总 RNA 样品，显示出 18S 和 28S 两个明显的峰；B：低质量的总 RNA 样品，仅观察到小的降解片段

5.3 cDNA 模板的制备 (反转录)

用 RT-qPCR 定量基因表达有两种方法：“两步法” RT-qPCR 和“一步法” RT-qPCR。两种情况下，RNA 都要反转录生成 cDNA，用 cDNA 作为定量 PCR 扩增的模板。“一步”和“两步”指的是反转录和定量 PCR 是在同一个或分开的反应管中进行。两步法中，首先，RNA 用反转录酶生成 cDNA。取一部分 cDNA 作为模板再进行多个 qPCR 反应。一步法中，反转录和 qPCR 在同一个反应管中进行。

两步法 RT-qPCR 法中，反转录这一步骤可以使用 oligo(dT) 引物、随机引物、这两者的组合或基因特异的引物。一步法 RT-PCR 必须使用基因特异的引物，还需要用一个有内在 RT 活性的 DNA 聚合酶—*Thermus thermophilus* (Tth) 聚合酶，或者使用包括反转录酶和耐热的 DNA 聚合酶的双酶系统。由于 Tth DNA 聚合酶来源于一个耐热的细菌，因而它能在很高的温度下 (>60°C) 进行反转录反应，这样可以将高 GC 含量 mRNA 的二级结构减到最少。

基因表达的正确分析需要反转录有好的可重复性。反转录反应的好坏取决于所使用的反转录酶的灵敏度、动力学范围和特异性。来源于 MMLV 和 AMV 反转录酶是使用最广泛的酶。若需要长的或全长的 cDNA 转录本，MMLV 反转录酶和它的衍生物要好于 AMV 反转录酶，因为 MMLV 反转录酶有更低的 RNase H 活性。然而，还有一种情况存在，为了在 PCR 反应中有效的扩增某些模板和那些含量很低的模板，有时候用 RNase H- 反转录酶进行的反转录反应需要后续的 RNase H 处理。

如上所述，两步法 RT-qPCR 中，反转录这一步骤可以使用 oligo(dT) 引物、随机引物、这两者的组合或基因特异的引物。引物的选择会影响你对目的基因的定量。使用基因特异的引物比使用 oligo(dT) 或随机引物有更低的背景。如果你选择 oligo(dT) 引物进行反转录，你应该将 PCR 引物设计在靠近转录物的 3' 端，避免 mRNA 缩短造成的灵敏度下降；这一点对长一些的转录物尤其重要。如果使用的转录物或物种其 poly(A) 尾较短或者缺少 poly(A)，你在转录反应中就不能使用 oligo(dT) 引物。在 5' 核酸酶分析实验中，我们发现使用 oligo(dT) 生成的 cDNA 表现非常好，但是，随机引物生成的 cDNA 表现同样好，并且对大多数序列来说还要稍好一些，对有些序列来讲要好很多。我们发现，对于大多数的 PCR 反应，使用 iScript™ 和 iScript 选择 cDNA 合成试剂盒能得到最好的反应效果。这个试剂盒用的是 MMLV 反转录酶（见产品指南）。

5.4 qPCR 实验方法选择

基因表达分析可以使用许多种不同的化学方法，可能是单重分析也可能是多重分析。你的实验设计既要考虑实际应用因素也要考虑到科学研究的因素。当你选择是用单重分析还是多重分析时，有一些因素要考虑，详情见 2.2.1 部分。对于单重分析，在 2.2.2 部分中列出的所有化学方法都可以用。对于多重分析，必须使用基于荧光标记的引物或探针化学方法，如在 2.2.2.2 部分中列出的那些。dsDNA 结合染料不能用于多重分析。

关于怎样设计和优化单一和多重 TaqMan 分析，已经在 2.4 部分和第 3 部分详细讨论过；有关实验方法选择和优化这一步骤的详情请参考以上部分。需要指出的是，基因表达分析实验中，设计的引物应该跨越剪切点，以避免扩增出基因组 DNA。

5.5 应用举例

为了检测三个目的基因 ODC、OAZ 和 AZI 以及参照基因 β -actin 在样品 A 和 B 中的表达情况，用多重的两步 RT-qPCR 分析四个基因的表达情况。

5.5.1 多重分析的反应组分

在 50 μ l 反应体系中包括以下组分：

用 100 ng 总 RNA 进行反转录，取全部反应体系的 1/10

300 nM 引物

200 nM 探针

200 μ M dNTP

5 mM $MgCl_2$

3.75 U iTa α [™] DNA 聚合酶

5.5.2 循环条件

循环条件如下：

循环 1	1 个循环	95°C 3 分钟
循环 2	40 个循环	
步骤 1		95°C 10 秒
步骤 2		59°C 60 秒 (采集信号)

5.6 基因表达数据分析

三个目的基因 ODC、OAZ 和 AZI 以及参照基因 β -actin 的相对表达用 4.2.3.1 部分中提到的 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak) 法进行分析。结果见表 5.1。这四个基因的扩增效率是一致的，都是 >99.5%。因为四个基因在一个反应管中进行， β -actin 和三个目的基因的每一个可以看作是配对的数据点；因此，可以计算出每一个重复中参照基因和目的基因的 $\Delta\Delta C_T$ ，然后得出三个重复的平均数。再用每个目的基因在两个组织样品中的平均 $\Delta\Delta C_T$ 计算 $\Delta\Delta C_T$ 。接下来，用 $\Delta\Delta C_T$ 计算这三个目的基因在两个样品间的倍数差异。相对于样品 A，ODC、AZI 和 OAZ 在样品 B 中的表达水平分别提高了 7.0—8.0 倍、2.8—3.7 倍和 3.0—3.5 倍。

表 5.1 相对于样品 A，ODC、OAZ 和 AZI 在样品 B 中的相对定量

样品		C _T Values			
		β -Actin	ODC	AZI	OAZ
A	Replicate 1	20.3	27.9	25.8	24.0
	Replicate 2	20.2	28.0	25.9	24.2
	Replicate 3	20.3	27.9	26.0	24.0
平均值 ΔC_T			7.6 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.1
B	Replicate 1	20.8	25.5	24.9	22.9
	Replicate 2	20.8	25.4	24.7	23.0
	Replicate 3	20.9	25.6	24.6	22.9
平均值 ΔC_T			4.7 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.1
样品 B ΔC_T - 样品 A ΔC_T -2.9 $\pm$ 0.1			-1.7 $\pm$ 0.2	-1.7 $\pm$ 0.1	
表达量差异 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)			7.0-8.0	2.8-3.7	3.0-3.5

基因型/等位基因分析

实验设计	55
使用 TaqMan 方法设计引物和探针	56
DNA 提取和样品处理	57
Taqman 探针实验的反应组分	58
实验优化	59
Taqman 探针实验循环条件	59
等位基因分析的数据处理	59
等位基因分析的结果验证	59
基因型识别	

6. 基因型/等位基因分析

单核苷酸多态性 (SNPs) 是由 DNA 序列中同一个位置上的碱基对的常见替换造成的个体 DNA 序列差异。通常，对人类而言，如果一个基因在同一个位置上具有多个等位基因且在人群中出现几率大于 1%，这个基因的多个等位基因被认为具有 DNA 多态性。DNA 序列的变化影响很多生物功能，比如个体对疾病的感染几率，及其对药物治疗的反应。在研究受多个基因控制的复杂疾病的过程中，SNPs 分析有助于判断各个基因的具体功能。

因此人类基因突变及其所引起的疾病和 SNPs 的研究需要不断设计和优化用于识别 DNA 变异的分子工具。SNP 检测及基因型、等位基因分析可以通过等位基因特异性 PCR (Allele-specific PCR)，等位基因特异性引物延伸 (Allele-specific primer extension)，多聚核苷酸连接实验 (oligonucleotide ligation assay) 和单链构象多态性分析 (single-strand conformational polymorphism (SSCP) analysis) 实现。最近基于荧光定量 PCR 的 SNP 基因型分析方法正在各大研究和诊断实验室中逐渐普及。与传统基因型分析方法相比，荧光定量 PCR 技术具有高效率，低交叉污染和低劳动量等多方面的优势。

本章我们将介绍利用 TaqMan 探针进行荧光定量 PCR 等位基因分析的方法，其中包括一个利用本方法鉴定高加索地区人群的脑静脉血栓的两个风险因子的案例。这个方法可以很容易的改进和应用到其他各种 SNPs 的检测。

6.1 实验设计

根据实验使用的探针化学方法不同，如 TaqMan 探针或分子信标，荧光定量 PCR 法基因型分析和 SNP 检测可以有多种实验方案（见 2.2.2.2）。以下我们将介绍 TaqMan 探针识别等位基因的机理，并提供使用 TaqMan 探针法进行等位基因识别时实验设计中的各项注意事项。

TaqMan 探针是如何识别碱基变化的呢？TaqMan 探针是一对具有特异荧光标记的寡核苷酸探针。其中一种荧光基团被用来标记野生型，另一种荧光基团则标记突变型。每种探针带有 5' 端特异荧光基团和 3' 端荧光淬灭基团（见 2.4.1 荧光报告基团和淬灭基团选择部分）。如图 6.1，PCR 反应中只有与 DNA 模板的碱基匹配的 TaqMan 探针可以与扩增片段杂交，此时 DNA 聚合酶的 5' 外切酶功能将探针的 5' 端荧光报告基团切除，使其与荧光淬灭基团分离，从而发出特定波长的荧光信号。同时未杂交的探针，其荧光报告基团无法被切除，因此仍然被 3' 端的荧光淬灭基团所淬灭，无法发射任何荧光信号。因此，根据所检测到的荧光信号，可以判断模板 DNA 的基因型。一次实验所检测的碱基变化的数量取决于实验的设计和您的荧光定量 PCR 仪器所支持的荧光基团检测种类。iGlycer iQ[®] Chromo™ 和 iQ™5 系统可以同时检测最多 4 种不同荧光基团检测种类，因此可以用于检测 4 种不同碱基变化。

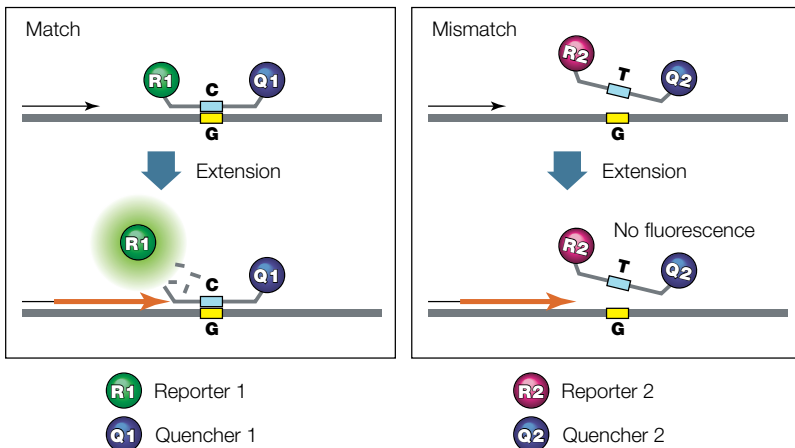


图 6.1. 用 TaqMan 方法进行等位基因分析的原理。

基因型/等位基因分析

使用 TaqMan 方法设计引物和探针

前面已经提到过，荧光定量 PCR 法检测基因型和等位基因可有多种不同实验设计。当待检测的 SNP 是一段碱基序列中同一个位置上的 2 或 4 种碱基变化，您只需要设计一对引物来扩增一段片段，及相应的 2 或 4 种特异荧光标记的探针（每种探针标记有一特异荧光基团）。当待检测的 SNP 是一段碱基序列中多个不同位置上出现的碱基变化，您需要设计多对引物来扩增多个不同片段，再设计两种带有不同荧光标记的特异探针用于 PCR 扩增，同时检测每一个扩增片段中的碱基变化。

下面将介绍一个使用 TaqMan 探针的多色多重荧光定量 PCR 扩增实验，同时检测两种常见的高加索地区脑静脉血栓风险因子（FVL 和 PT，G/A 变异）。这里同一次 PCR 扩增反应包括：1）两对引物用于同时扩增两段扩增片段，分别位于凝血因子 V 基因（包含 FVL G1691A 变异）和凝血因子 II 基因（包含 PT G20210A 变异），2）两对具有特异碱基的荧光标记探针，每对探针分别识别野生型和突变型序列。

6.2 使用 TaqMan 方法设计引物和探针

等位基因分析实验中的引物和探针设计方法和 2.4.1 中介绍的引物设计方法有些不同。这里我们使用 Oligo 6 软件（Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, US）设计等位基因分析实验中的引物，方法与 2.4.1 中介绍的方法大体相同（避免引物自身结合，避免发夹结构产生，避免引物二聚体等），但是引物的 T_m 最好选在 55°C 左右。引物被用来进行多重 PCR 反应，因此具有相似的 T_m 值，并且引物间或引物和探针间均不互补，见 3.1）。我们设计了两对引物，同时扩增凝血因子 V 基因中的一段 97bp 序列片段，和凝血因子 II 基因中的一段 111bp 序列片段，每段扩增片段包含带检测碱基变异位点（FVL 和 PT G/A 变异）。凝血因子 V 引物对为：正向：5'-TCT GAA AGG TTA CTT CAA GGA C-3' 和反向 5'-ATC GCC TCT GGG CTA ATA- 3'，凝血因子 II 引物对为：正向：5'-TTG TGT TTC TAA AAC TAT GGT TCC-3'，反向：5'-AGT AGT ATT ACT GGC TCT TCC T-3'。

对等位基因分析来说，特异性 TaqMan 探针的设计使其与目标扩增片段高特异性结合，而有错配碱基的探针无法与目标基因结合。我们建议探针最好要比较短 (T_m 在 55°C 左右)，而多态性点位于探针的中间。请注意这些设计方针不同于 Livak (1999) 和 2.4.1 中提到过的方法 (探针 T_m 在 65 到 67°C 之间，长度在 23 到 26 碱基之间；引物 T_m 在 58 到 60°C 之间)。虽然长度在 $23 \sim 26$ 碱基之间的探针在定量实验中效果较好，我们仍然建议使用较短的 TaqMan 探针用于等位基因分析。

这里，我们设计的探针大约 17 到 19 个碱基， $T_m = 55 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ ，与跨越 FVL 和 PT 基因的 G/A 碱基变异位点的基因序列互补，且该变异位点位于探针的中间。用于识别凝血因子 V 野生型和 FVL 突变型的探针分别为 $5'$ -[FAM]-TGG ACA GGC GAG GAA TAC-BHQ1- $3'$ (凝血因子 V 野生型)， $5'$ -[TET]-TGG ACA GGC AAG GAA TAC A-BHQ1- $3'$ (FVL G20210A 突变型)。用于识别 PT 野生型和 G20210A 变异型的探针分别为 $5'$ -[TAMRA]-CTC TCA GCG AGC CTC AA-BHQ2- $3'$ (PT 野生型)， $5'$ -[Texas Red]-ACT CTC AGC AAG CCT CAA-BHQ2- $3'$ (PT G20210A 突变型)。

6.3 DNA 提取和样品处理

SNP 检测和基因型分析中，通常是使用从全血样品、细胞系或机体组织 (肿瘤变异检测) 中提取的人类基因组 DNA。我们使用了 AquaPure™ genomic DNA blood kit 或者 InstaGene™ matrix (见产品介绍) 提取基因组 DNA 模板。大分子量的长链基因组 DNA 的变性需要以下操作：1) 使用限制性内切酶切断长链，但是注意不要切断目标扩增片段；和/或 2) 将 DNA 样品在沸水中加热 10 分钟，立即在冰上降温。

本例中，52 个个体的全血样品被用于提取基因组 DNA 模板。这 52 个样本 FVL 和 PT 基因型已经通过 PCR-RFLP 提前确定。DNA 的浓度和纯度通过分光光度计 (OD₂₆₀/OD₂₈₀) 或者核酸染料结合实验 (Hoechst 或者 PicoGreen 结合双链 DNA) 或者荧光光度计 (如 VersaFluor™ 荧光光度计) 来检测。每一个多色多重扩增反应需要大约 10ngDNA。

6.4 TaqMan 探针实验的反应组分

虽然我们在 PCR 反应中混合了单独的反应物成分 (包括缓冲液, DNA 聚合酶, dNTPs, 您也可以使用预混的反应液, 如 iQ™ 超混合液。每个反应包括: 1) 2 对扩增引物, 以扩增凝血因子 V 和 PT 基因, 2) 两对特异性荧光标记的等位基因分型探针, 各用于检测每个基因的野生型和 G/A 突变型。反应组分和最终浓度如下:

- 10 ng DNA 模板
- 400 nM 每种引物
- 400 nM 每种探针
- 200 μM dNTP
- 3 mM MgCl₂
- 20 mM Tris-HCl, pH 8.4
- 50 mM KCl
- 2.25 U iTaq™ DNA 聚合酶
- 加无菌无核酸酶水到终体积 25.0 μl

我们建议您准备比实际需要用量多的 PCR 反应液, 以防止在分装过程中的加样误差。同时我们建议对实验对照至少检测三个重复样品, 包括野生型, 突变型和无模板对照。

6.5 实验优化

我们使用 iCycler iQ® 系统的温度梯度功能优化多种引物和探针的 PCR 反应的最佳退火温度。我们使用了 55 到 70 °C 间的 8 个温度扩增两个不同凝血因子的野生型和突变型和一个无模板对照，发现在 58°C 退火和延伸 45 秒能够最好的识别碱基的不同 (数据未显示)。

6.6 Taqman 探针实验的循环条件

使用 iCycler iQ 系统共同扩增 FVL 和 PT 的扩增循环程序如下。在 58°C 退火和延伸步骤中读取荧光信号。

循环 1	重复 1 次	95°C 3.5 分钟
循环 2	重复 50 次	
步骤 1		95°C 10 秒
步骤 2		58°C 45 秒 (采集信号)

6.7 等位基因分析的数据处理

6.7.1 等位基因分析的结果验证

我们分析了具有野生型或者 FVL 和/或 PT G20210A 基因突变型的个体 DNA 样品，图 6.2 – 6.7 显示了 6 种可能结果。一个野生型个体 (图 6.2) 显示两个野生型探针的荧光信号，但没有任何相应突变型信号。当一个纯合子个体具有两种碱基突变中任何一种时 (图 6.3 和 6.4)，一个基因的野生型 (而不是突变型) 和另一个基因的突变型 (而不是野生型) 的探针信号被检测到。当一个个体是其中一个基因的杂合体时，此基因的野生型和突变型探针信号同时被检测到 (图 6.5 和 6.6)。而在两种基因都是杂合体的双杂合个体样品中，所有的探针信号均被检测到 (图 6.7)。

基因型/等位基因分析

等位基因分析的数据处理

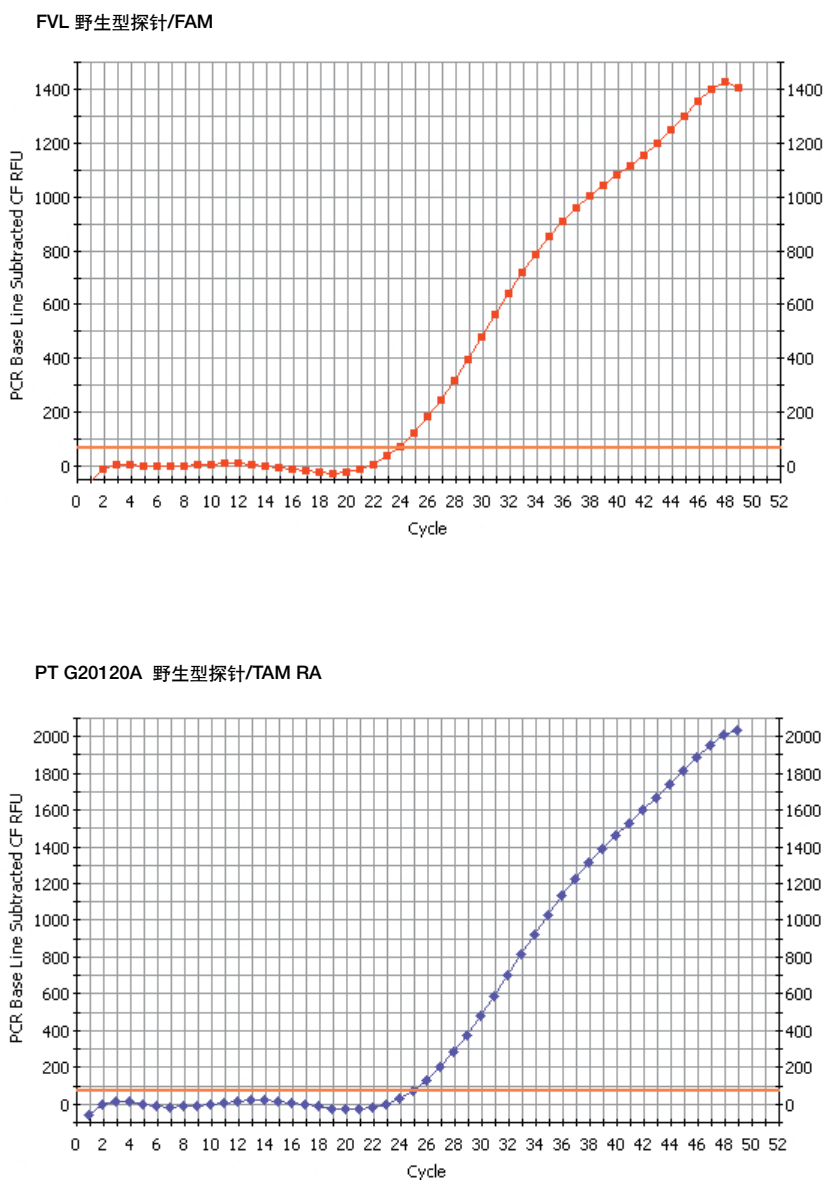
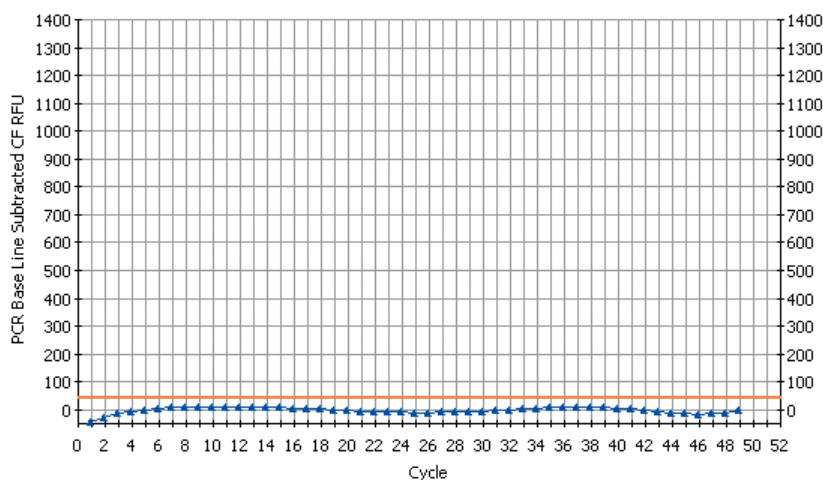
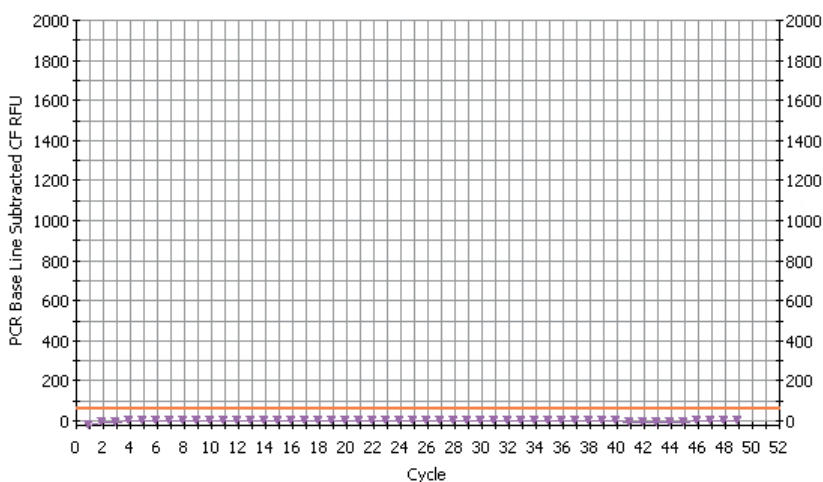


图 6.2. 野生型

FVL 突变型探针/TET



PT G20210A 突变型探针/Texas Red



基因型/等位基因分析

等位基因分析的数据处理

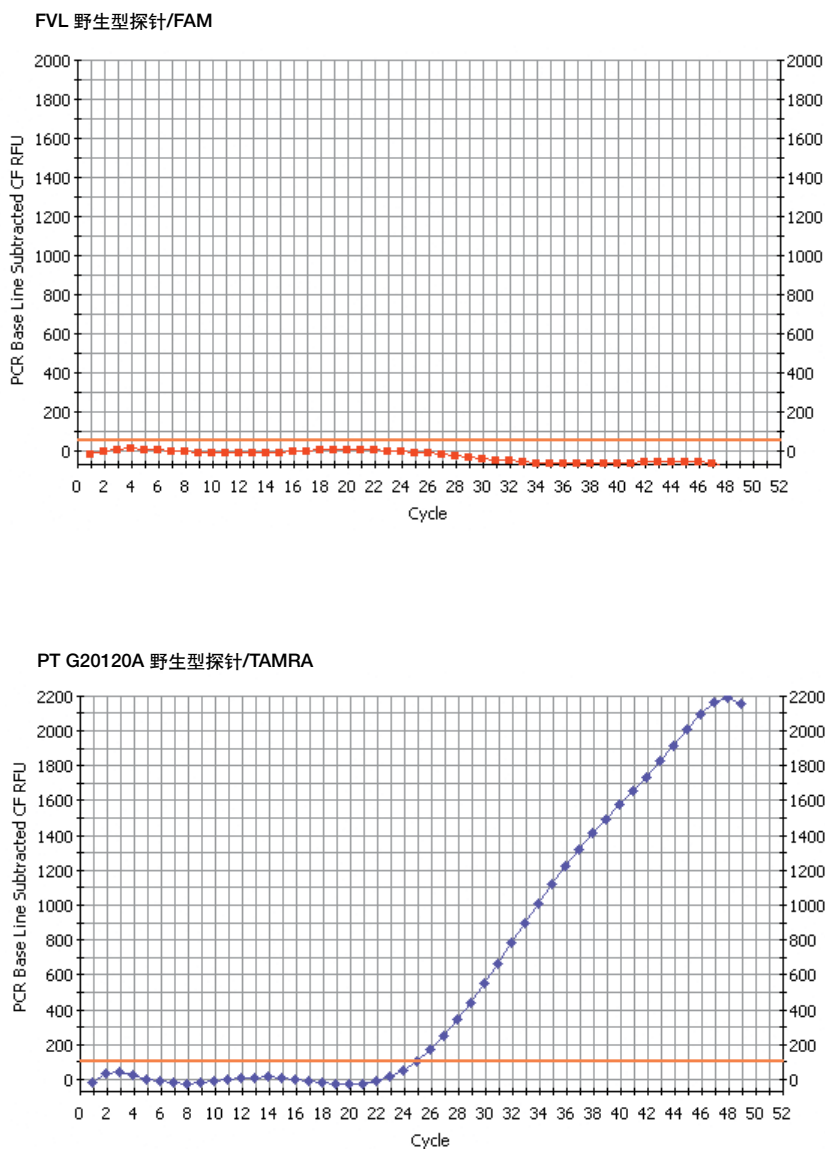
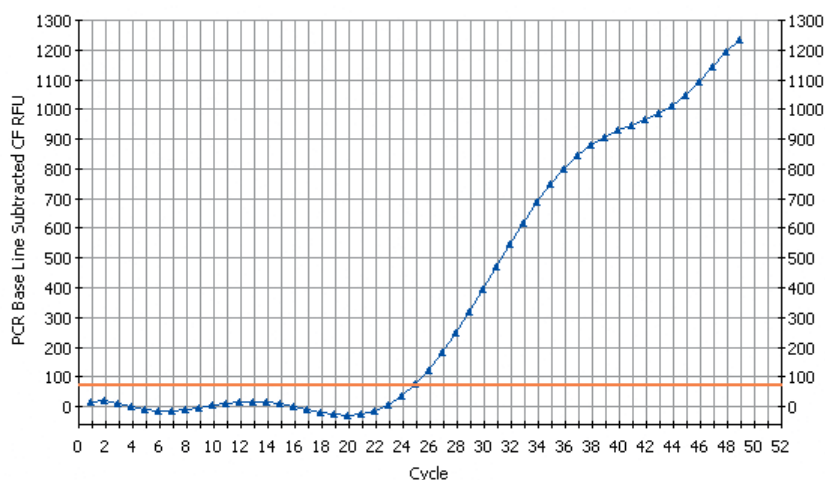
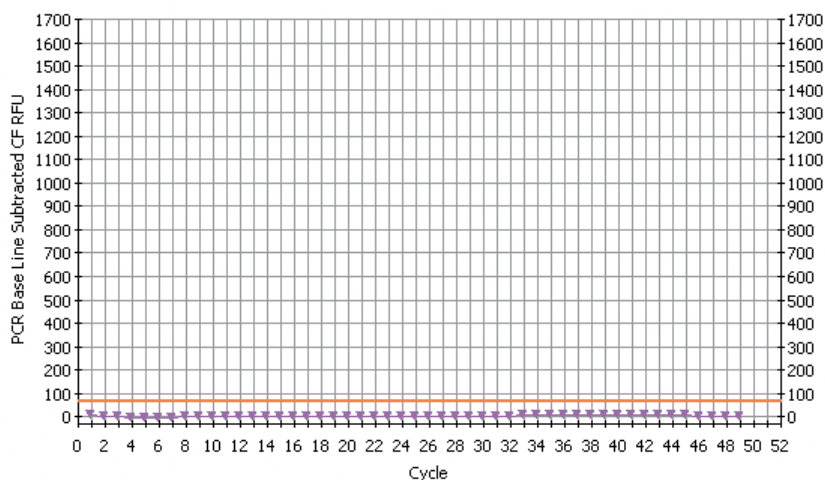


图 6.3. FVL 突变型纯合体

FVL 突变型探针/TET



PT G20210A 突变型探针/Texas Red



基因型/等位基因分析

等位基因分析的数据处理

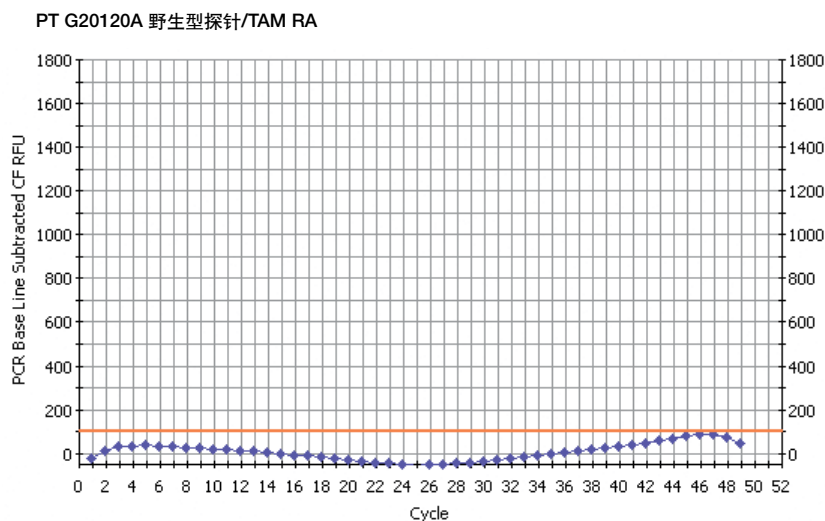
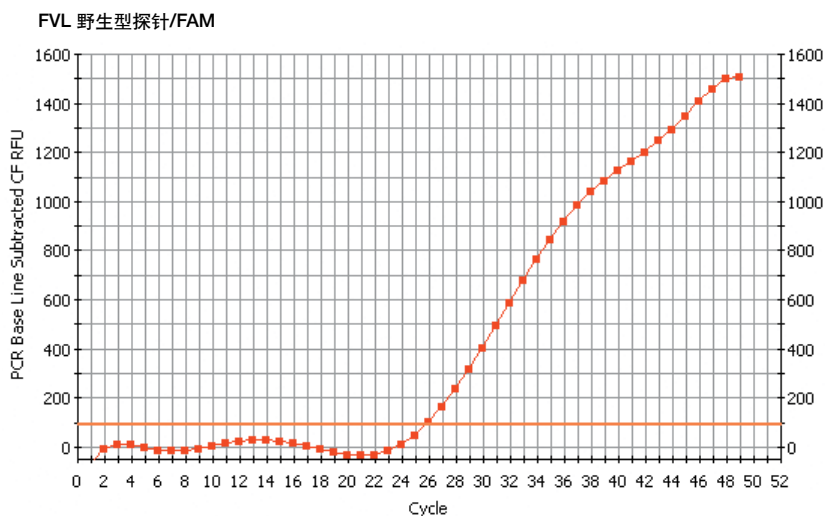
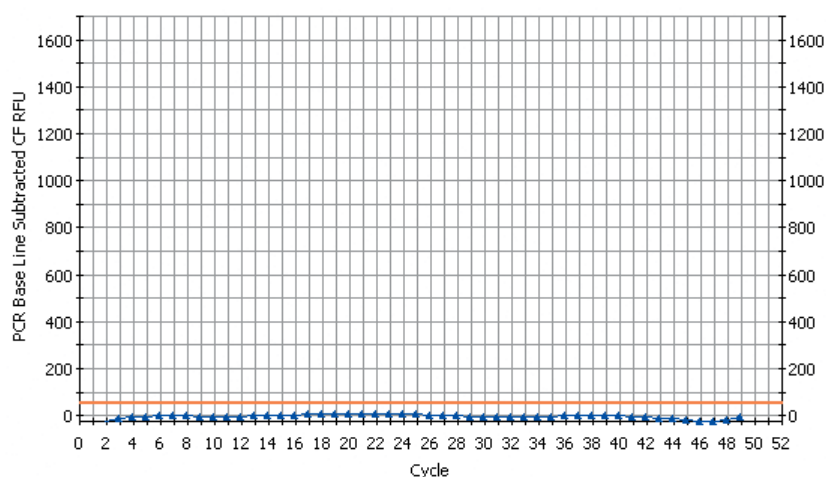
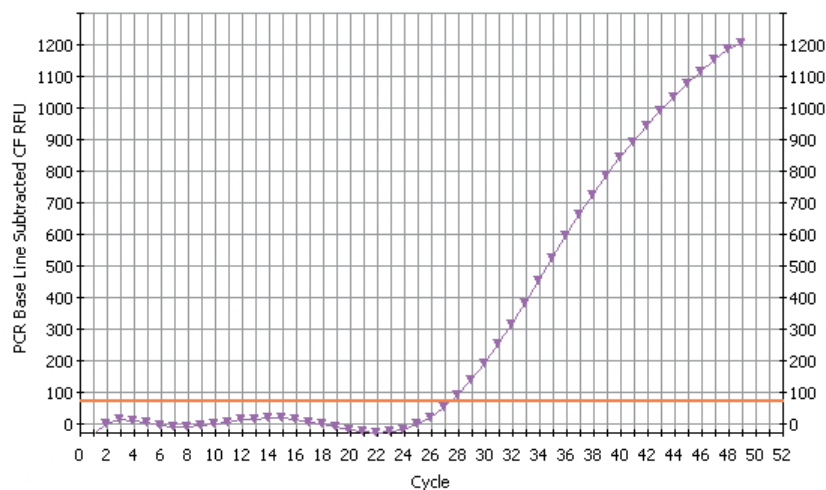


图 6.4. PT G20210A 突变型

FVL 突变型探针/TET



PT G20210A 突变型探针/Texas Red



基因型/等位基因分析

等位基因分析的数据处理

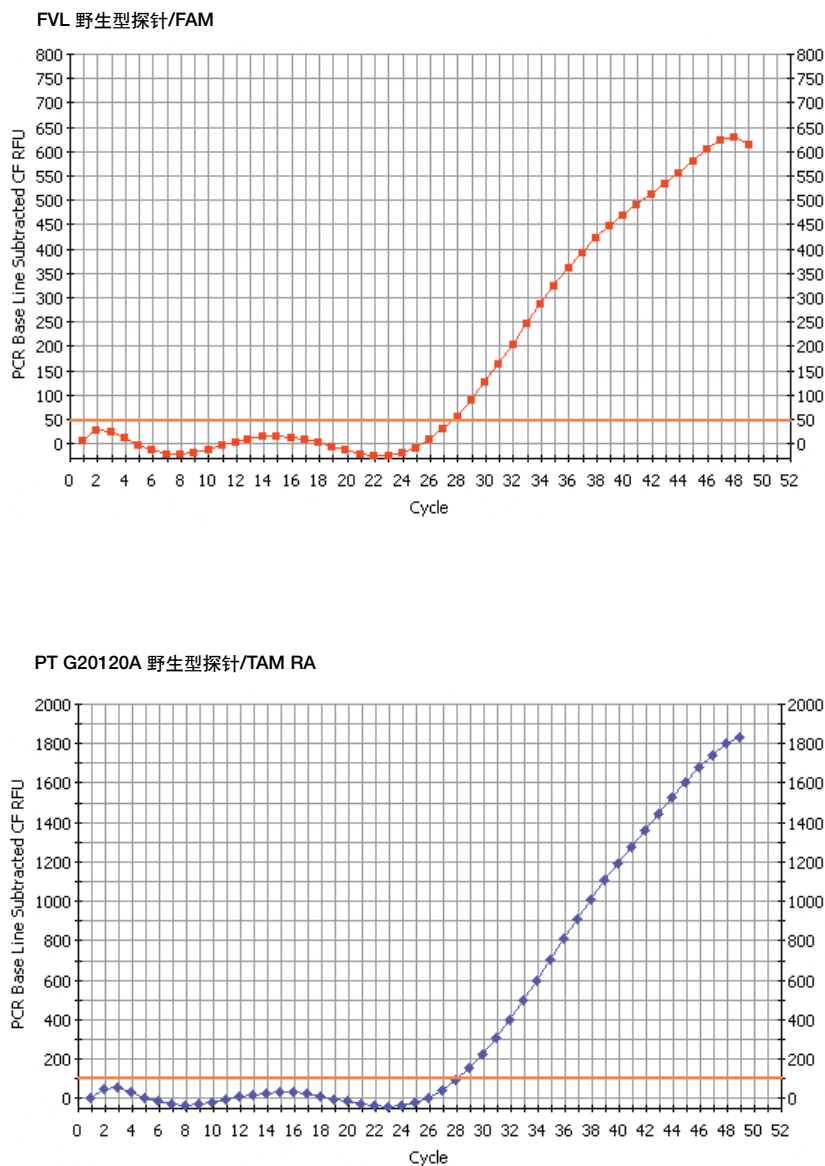
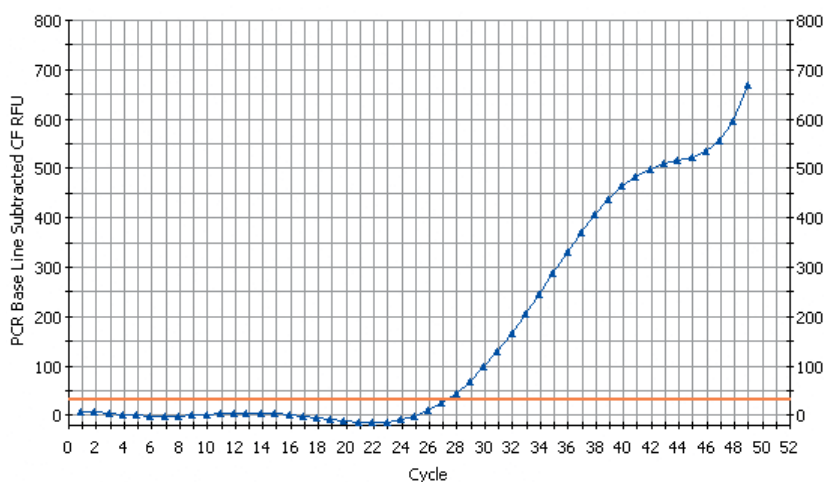
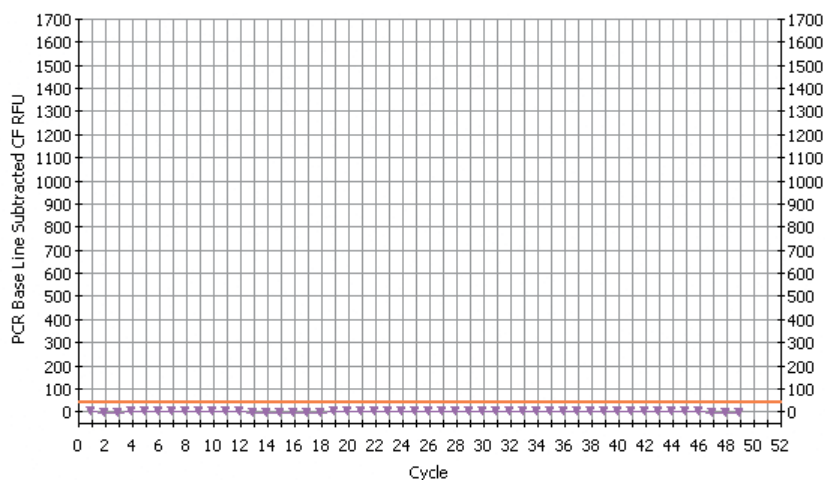


图 6.5. FVL G1691A 杂合体

FVL 突变型探针/TET



PT G20210A 突变型探针/Texas Red



基因型/等位基因分析

等位基因分析的数据处理

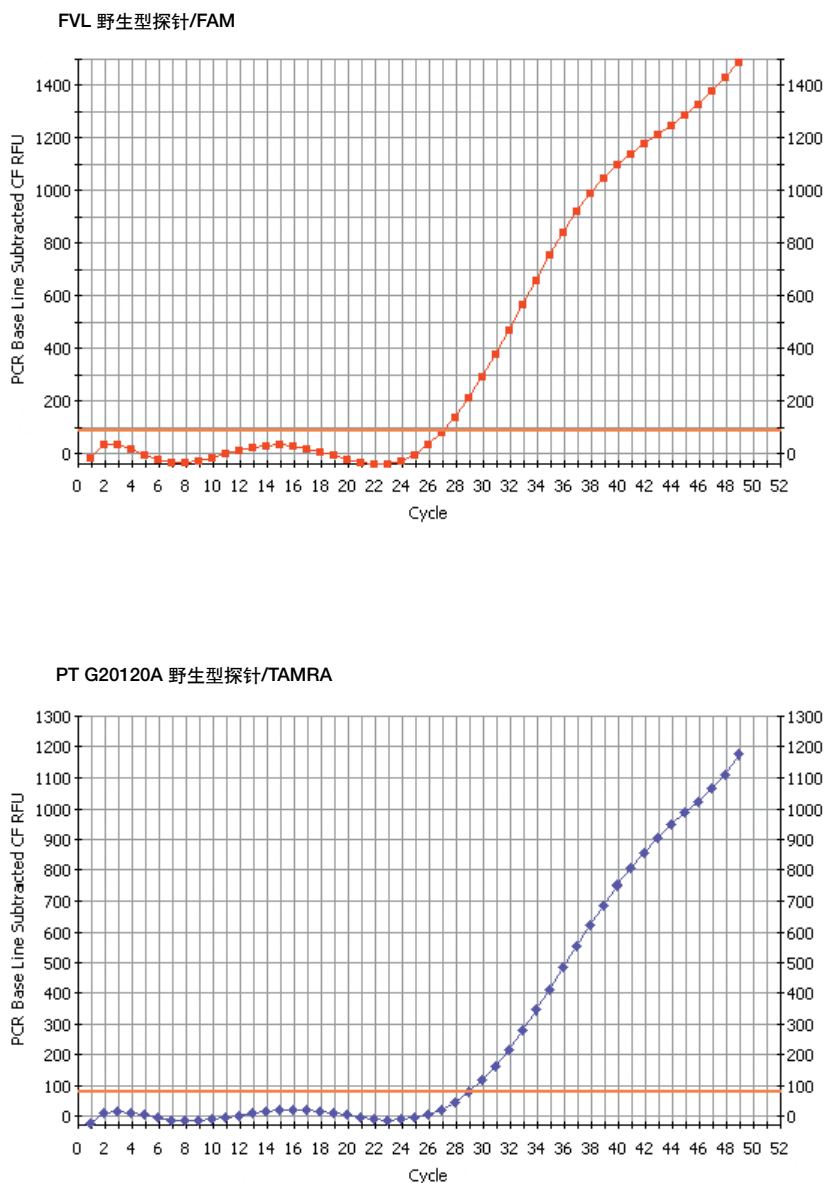
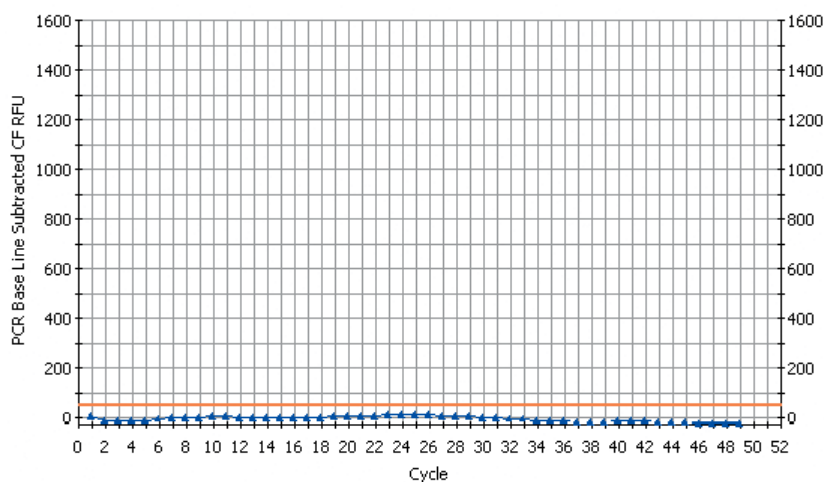
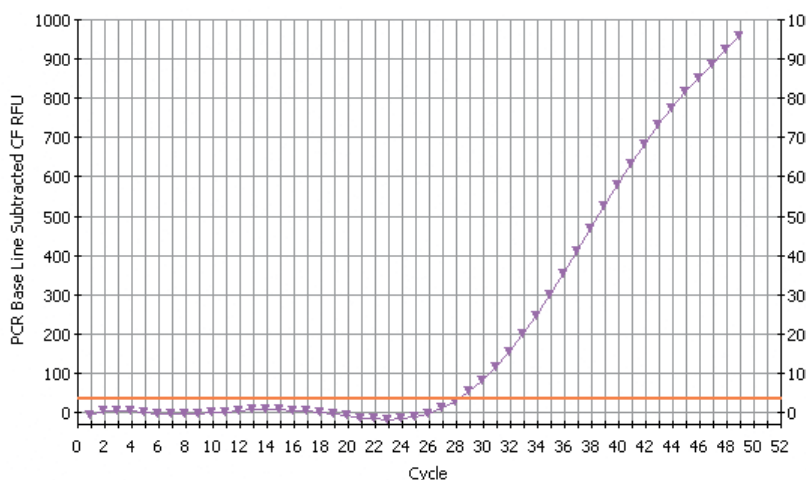


图 6.6. PT G20210A 杂合体

FVL 突变型探针/TET



PT G20210A 突变型探针/Texas Red



基因型/等位基因分析

等位基因分析的数据处理

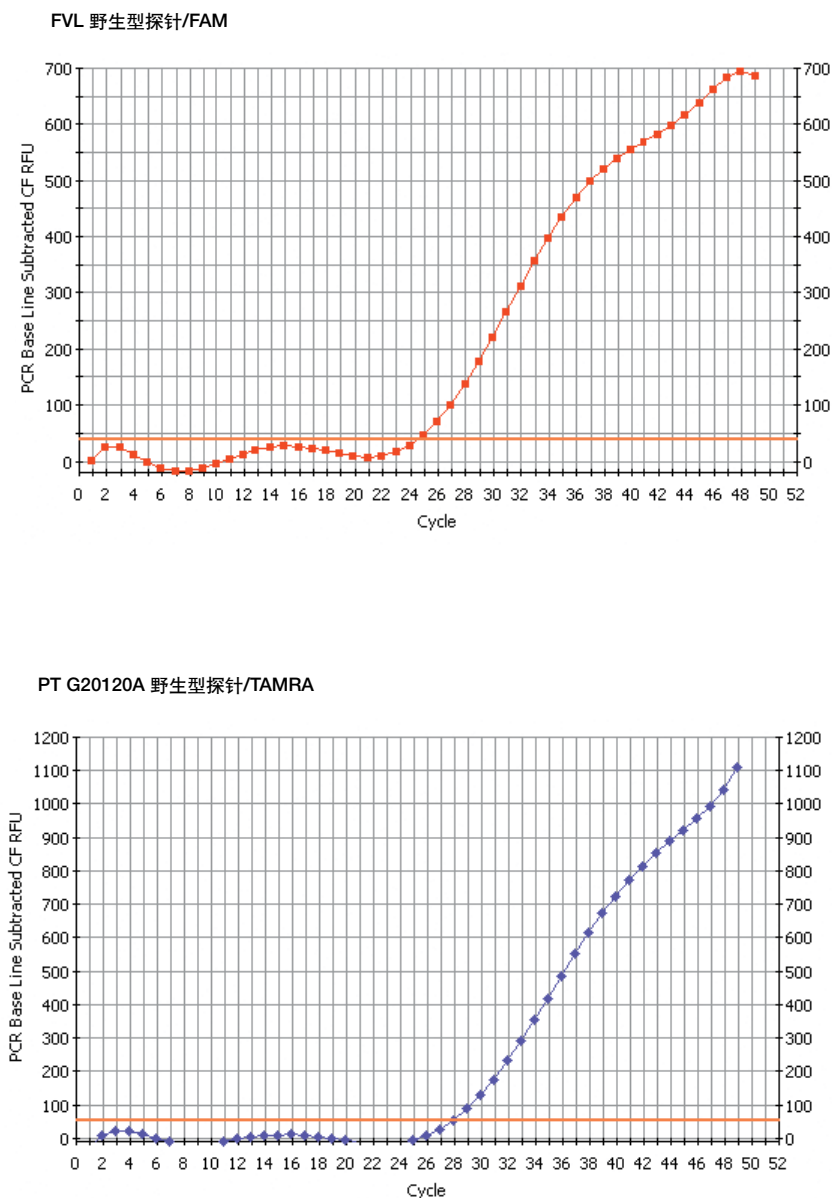
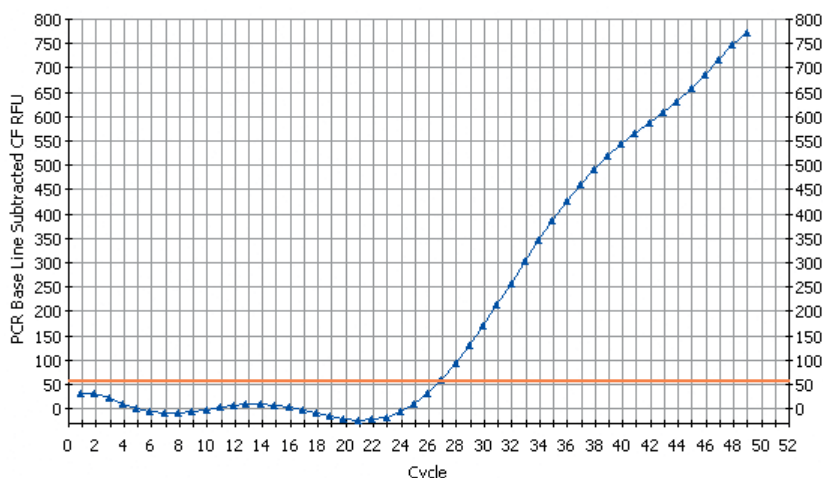
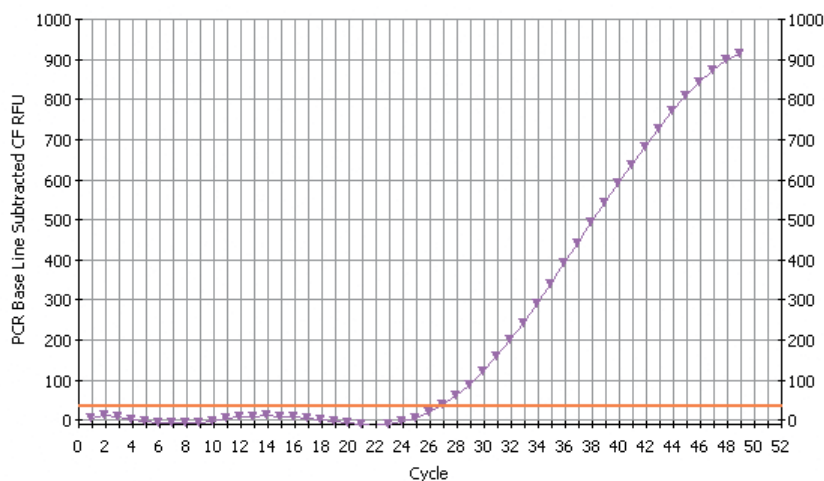


图 6.7. FVL 和 PT G20210A 双杂合体

FVL 突变型探针/TET



PT G20210A 突变型探针/Texas Red



基因型/等位基因分析

等位基因分析的数据处理

为了检测这个 4 色实验的可重复性，我们使用了 6 个已知基因型的 DNA 样品 (WT, FVL 纯合体, PT G20210A 纯合体, FVL 杂合体, PT G20210A 杂合体, 和 FVL、PT G20210A 双杂合体) 和一个无模板对照，通过5次单独的重复实验，每次实验均得到持续准确无争议的结果。

6.7.2 基因型识别

通过分析各碱基特异性探针的扩增曲线或者使用荧光定量 PCR 仪器分析软件 (包括 iCycler iQ、DNA EngineOpticon® 2、Chromo4 和 iQ5) 中的等位基因分析功能，样品的基因型能够得到识别。当 PCR 扩增完成后，iCycler iQ、iQ5 和 Opticon Monitor™ 软件使用特定算法根据指定的野生型和突变型纯合子对照样品的数据来确定待测样本的基因型。这些软件可以计算最终相对荧光值 (RFU) 或者 C_T 值，并利用这些数据绘制散点图。

在以上介绍的多色多重扩增案例中，基因型的识别使用了 iCycler iQ 软件的 RFU 模式，分析结果在两个不同的图中显示。图 6.8 显示了凝血因子 V 的基因型识别，图中各点落入四个不同点群。点群 1 的样品的 FAM 荧光信号 (x 坐标) 在 1,050-1,700RFU，为具有野生型的样品。点群 2 的样品的 TET 荧光信号 (y 坐标) 在1,000-1,6000RFU，为具有 FVL 纯合突变型的样品。点群 3 的 FAM 和 TET 荧光信号均在

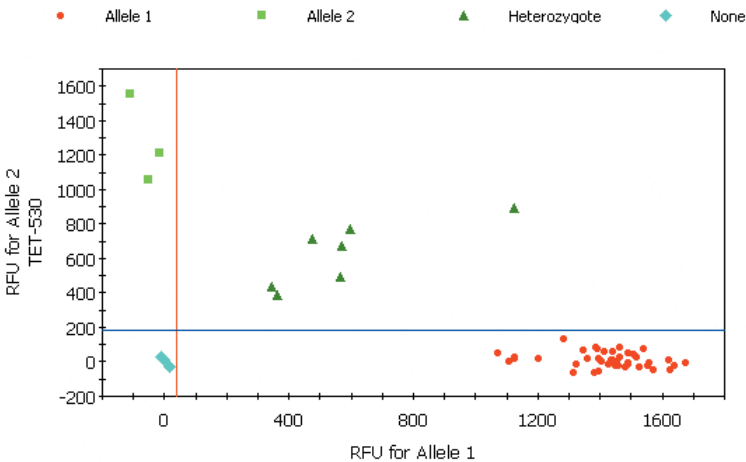


图 6.8. 基于多种 TaqMan 反应的凝血因子 V 基因识别图。
图中显示 FAM (野生型) vs. TET (突变型) 荧光强度值。

300 到 1,100RFU 之间，为 FVL 杂合体样品。点群 4 的样品的两种荧光信号基本都无法检测到，因此这些样品为无模板对照。同理，图 6.9 显示了 PT 基因的各基因型的四个不同点群。因此这个多重四色反应的基因型识别结果与 RFLP 方法基因型识别实验的结果相符（结果未显示）。

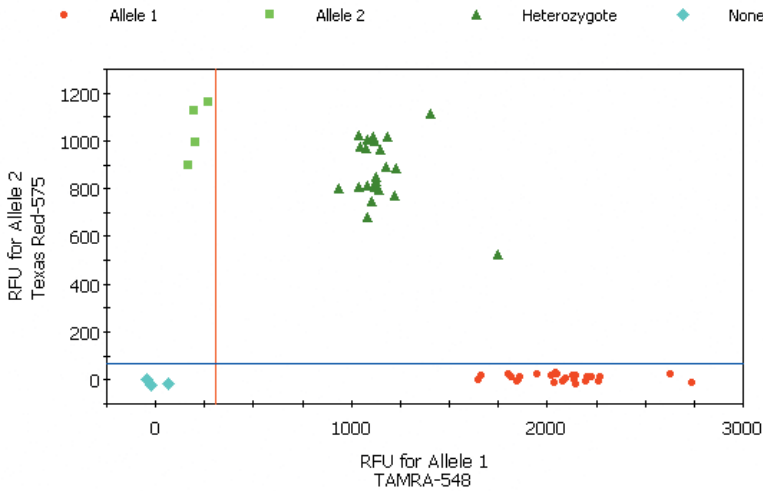


图 6.9. 基于多种 TaqMan 反应的 PT 基因识别图。

图中显示 TAMRA (野生型) vs. Texas Red (突变型) 荧光强度值。

转基因生物 (GMO) 检测

实验设计	77
DNA 提取及样品制备	77
利用 SYBR Green I 方法对转基因大豆进行定量 PCR 分析	78
反应成分	78
循环条件	79
数据分析	79
利用 TaqMan 探针针对转基因大豆进行多重定量 PCR 分析	81
反应成分	82
循环条件	82
数据分析	82

7. 转基因生物 (GMO) 检测

GMOs 是指用基因工程技术或者其他现代生物技术改变基因组构成的生物。目前有许多作物通过遗传改良来获得诸如抗除草剂、抗病、抗虫等性状，常见的有大豆、玉米及棉花。随着反对转基因食品商品化的浪潮，对食物中转基因成分 (GMO) 进行准确可靠的检测就显得越来越重要。

目前，常见的 GMO 检测方法主要分为 2 类，一种是基于 DNA 的 PCR 检测方法，一种是基于蛋白质的酶联免疫吸附试验 (ELISAs)。尽管 ELISAs 方法更加便宜及快捷，但是在实际检测工作中，DNA 检测法得到了更为广泛使用。这主要是因为 PCR 技术除了具有高灵敏度、高特异性及高可靠性等突出的优点以外，还可以选择对转基因成分进行定性或者定量检测。比如荧光定量 PCR 技术就可以准确的检测出食品中某一种转基因成分的含量。

以抗除草剂的大豆为例。大多数抗除草剂性状的获得都是通过抗草甘膦修饰完成的。草甘膦是 EPSPS 的竞争抑制物，而 EPSPS 是植物合成芳香族氨基酸所必需的酶。为了获得草甘膦抗性，植物被转化了一种耐受草甘膦的 epsps 基因，这个基因来自土壤细菌农杆菌的 CP4 菌株。cp4-epsps 基因在植物中表达，产生抗草甘膦性状，这样草甘膦就可以在种植有基因改良作物（例如：Roundup Ready 公司的大豆）的农田中施用。

Roundup Ready 大豆中 cp4-epsps 基因是由 35s 启动子启动表达，目前大部分转基因作物载体构建经常会使用来自花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 35s 启动子，所以 CaMV-35s 启动子可以作为转基因成分定量检测的有效手段。

在这个章节中，我们提供一个标准的荧光定量 PCR 的方法来检测和定量抗除草剂的基因改良大豆。这个程序仅需要较少的起始样本就可以同时检测多个样本，既可以分析原料又可以对加工食品进行检测，此外还可以用于检测其他转基因作物，比如玉米、水稻和花生等。

7.1 实验设计

目前, 有两种 qPCR 方法可以进行食品中转基因大豆成分的检测及定量 (详见定量 PCR 化学方法 2.2.2, SYBR Green I 荧光染料及 TaqMan 探针及单重 PCR 扩增及多重 PCR 扩增注意事项 2.2.1)。第一个方案是利用 SYBR Green I 染料进行单色分析 (单重 PCR 反应), 即同时在两个反应中分别扩增 GMO 特异序列 (除草剂抗性相关的靶基因) 和内源参照基因豆凝集素 (lectin)。第二个方案是利用 2 种不同荧光素标记的 Taqman 探针在一个反应体系中同时扩增 2 个靶基因, 进行双色检测分析: 一个探针检测 GMO 特异的启动子 (35s 启动子), 一个探针检测内源参照基因大豆凝集素 (lectin)。这两种方案均是用特异性引物扩大大豆凝集素 (lectin) 基因的一段序列作为参照, 来校正每一样本中大豆 DNA 的含量。随后利用一系列标准品生成标准曲线确定样本中转基因大豆的含量。

7.2 DNA 提取及样品制备

通过比例混合非转基因大豆粉末与 Roundup Ready 大豆粉末得到含有 0%-5% 定量标准品 (Sigma)。从超级市场买来的下列食品用来作为测试样品: 大豆饼、豆制甜点和两个不同品牌的大豆粉。

干燥的样品、定量标准样品和大豆粉可直接用于 DNA 的提取; 豆饼和甜点用研钵捣碎成均一的糊状, 用于 DNA 提取

如定量 PCR 分析 7.3 及 7.4 所述, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) 用来分离定量标准品和食物样品的 DNA; 按照试剂盒的指南来抽提不同样品的 DNA; 通过分光光度法来确定 DNA 的浓度; 通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳来进行质量检验。平均而言, 我们可以从每个 55-100 mg 的样品中获得 1-2 μ g 的 DNA。

7.3 利用 SYBR Green I 方法对转基因大豆进行定量 PCR 分析

从食品及标准品中提取纯化 DNA 之后 (详见 7.2), 利用 SYBR Green I 方法进行单重 qPCR 分析, 确定大豆加工食品中抗除草剂转基因大豆的含量。本实验分别检测转基因大豆的特异序列 (cp4-epsps 基因) 及在转基因及非转基因大豆中均表达的大豆内源基因 lectin, 确定转基因成分的含量。因为 SYBR Green I 染料可以和任何的双链 DNA 结合, 不能区分特异序列 (转基因大豆的 cp4-epsps 基因) 及大豆内源参照基因 lectin, 因而必须平行的在不同的反应管中进行靶基因的单一 PCR 扩增。通过比较 lectin 基因和 epsps 基因的系列浓度梯度反应的 CT 值, 做出标准曲线; 通过标准曲线可以检测食品中少至 0.5%(w/w) 的 GMO 含量。

7.3.1 PCR 反应成分

扩增转基因大豆特异序列 (cp4-epsps 的扩增片段长度为 356bp), 其正向引物为: 5'-TGG CGC CCA AAG CTT GCA TGG C-3', 反向引物为: 5'-CCC CAA GTT CCT AAA TCT TCA AGT-3'。大豆凝集素基因 lectin (在转基因及非转基因大豆中均表达) 扩增片段长度为 318bp, 其正向引物为: 5'-GAC GCT ATT GTG ACC TCC TC-3', 反向引物为: 5'-GAA AGT GTC AAG CTT AAC AGC GAC G-3'。

此外, 对于 SYBR Green I qPCR 扩增来说, 我们可以单独加入每个反应组分 (如随后实验), 也可以使用预混的 PCR 反应液, 比如伯乐公司的产品 iQ™ SYBR® Green 超混合液。荧光定量 PCR 反应组分及浓度如下。

- 100 ng/μl DNA
- 250 nM of 引物
- 200 μM dNTPs
- 2 mM MgCl₂
- 1x 无 Mg²⁺ 缓冲液
- 0.5x SYBR Green I
- 0.02 U/μl DyNAzyme II DNA 聚合酶 (Finnzymes)
- 无菌、无核酸酶的水, 加至 20 μl

7.3.2 PCR 循环条件

在荧光定量 PCR 仪 Opticon 2 上平行扩增转基因大豆的特异序列 (cp4-epsps 基因) 及在大豆内源基因 lectin, 程序如下 :

1. 94°C, 3 min
2. 94°C, 10 sec
3. 60°C, 15 sec
4. 72°C, 20 sec
5. 86°C, 2 sec
6. Plate read
7. Go to step 2, 39 more times
8. 72°C, 10 min
9. Melt-curve analysis: 65°C to 98°C, 0.2°C/read, 1 sec hold
10. 72°C, 10 min

结束

7.3.3 数据分析

利用 SYBR Green I 染料做定量分析, 我们需要利用熔点曲线确定每个靶基因为特异扩增 (不能有非特异片段的扩增), 即在熔点曲线上每个扩增产物为一个特异的峰 (数据没有显示)。详情请参考 2.2.2.1 如何用熔点曲线来评估反应特异性。

通过以下 3 个步骤分析食品中转基因大豆的含量 :

所有大豆成分对 GMO 含量进行均一化处理, 产生 ΔC_T , 2) 利用标准品得到一条标准曲线 (%GMO 的 log 浓度对 ΔC_T), 3) 利用标准曲线, 通过 ΔC_T 均一化所有样本, 确定食品样本中转基因大豆的成分。

- 1、通过计算 ΔC_T 均一化处理样本中的转基因大豆含量。对每一个标准和样品, 分别用 GMO 特异序列 epsps 扩增产物的 C_T 值减去内源参照基因 lectin 扩增产物的 C_T 值产生一个 ΔC_T 值。对于那些没有扩增出 epsps 的标准品和样品, ΔC_T 用 ND 标记。

$$\Delta C_T = C_T(\text{GMO epsps}) - C_T(\text{lectin})$$

这个 ΔC_T 值的使用是建立在假定两对引物有相同的扩增效率并且相互独立扩增的基础上的。

转基因生物 (GMO) 检测

利用 SYBR Green I 方法对转基因大豆进行定量 PCR 分析

表 7.1. 计算 $\Delta C_T = C_T(\text{epsps}) - C_T(\text{lectin})$

样品或标准品	$C_T(\text{epsps})$	$C_T(\text{lectin})$	ΔC_T
0.0% GMO standard	ND	19.68	ND
0.1% GMO standard	ND	19.78	ND
0.5% GMO standard	26.85	19.58	7.27
1.0% GMO standard	25.62	19.52	6.10
2.0% GMO standard	24.56	19.70	4.86
5.0% GMO standard	22.94	19.48	3.46
Soy dessert	22.78	19.27	3.51
Soy flour	ND	18.13	ND
Soy burger	22.32	19.91	2.41

2、利用标准品产生标准曲线：设定 %GMO 的 log 浓度为 Y 轴，标准品的 ΔC_T 值为 X 轴，得到一条标准曲线（见图 7.1，标准品浓度为 GMO 含量 0–5%）。为了从标准曲线中知道待测食品 GMO 的百分含量，我们使用了 Excel 电子表格的添加“趋势线”功能，并且利用相关系数的 R^2 确定数据线性关系的好坏。

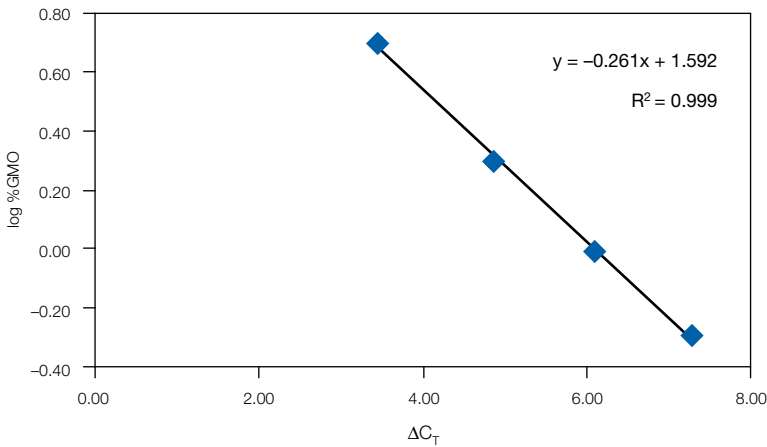


图. 7.1 利用标准样品 ΔC_T 及 GMO% 生成标准曲线图， $R^2 = 0.999$

表 2 7.2. 不同样品中转基因大豆的含量

样品	ΔC_T	%GMO
Soy dessert	2.1	4.40
Soy flour*	ND	0-0.5
Soy burger*	0.7	>5

* 表示样品的浓度超过标准品浓度范围

- 3、为了从标准曲线中知道待测食品 GMO 的百分含量，我们使用了 Excel 电子表格的添加“趋势线”功能。在该功能中，下列值对标准品是特定的： $\log\%GMO$ (已知的 y 值)， ΔC_T 值 (已知的 x) 和样品的 ΔC_T 值。通过公式计算出待测样品 $\log\%GMO$ ，就可以通过 $10^{(\log\%GMO)}$ 计算出样品中 $\%GMO$ 。

7.4 利用 TaqMan 探针对转基因大豆进行多重 qPCR 分析

从食品及标准品中提取纯化 DNA 之后 (详见 7.2)，本节主要是利用 TaqMan 探针进行多重定量 PCR 扩增，分析大豆类食品中抗草甘膦大豆 (如转基因大豆) 的成分。本实验分别检测转基因大豆的特异序列 (CaMV 35S 启动子) 及内源基因 lectin (在转基因及非转基因大豆中均表达)，确定样本转基因成分的含量。因为 Taqman 探针具有序列特异性的特点，可以在一个反应管中同时扩增多个反应。本实验 CaMV 35S 启动子特异探针用 FAM 标记，而大豆内源参照基因 Lectin 特异探针用 VIC 标记通过比较 lectin 基因和 CaMV 35S 基因的系列浓度梯度反应的 C_T 值，做出标准曲线；通过标准曲线可以检测食品中少至 0.5%(w/w) 的 GMO 含量。

转基因生物 (GMO) 检测

利用 TaqMan 探针对转基因大豆进行多重 qPCR 分析

7.4.1 PCR 反应成分

利用 TaqMan 探针进行转基因大豆多重 qPCR 分析的反应成分如下。转基因大豆 35S 检测试剂盒由 Applied Biosystems 公司提供，分别包括缓冲液、DNA 聚合酶、dNTPS，引物及探针。在一个反应管中同时扩增 2 个基因，一个是由 FAM 标记探针检测的 GMO 特异序列 CaMV 35S 启动子，一个由 VIC 标记检测大豆内源参照基因 Lectin。

- 2.0 μ l DNA
- 17.5 μ l GMO kit mix (Applied Biosystems)
- 0.5 μ l AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)
- 20.0 μ l 总体积

7.4.2 PCR 循环条件

荧光定量 PCR 仪 Opticon 2 上扩增转基因大豆的特异序列 (CaMV 35S 启动子) 及在大豆内源基因 lectin，程序如下：

1. 94°C, 9 min
 2. 96°C, 20 sec
 3. 60°C, 1 min
 4. 72°C, 30 sec
 5. Plate read
 6. Go to step 2, 39 more times
- End

7.4.3 数据分析

参考 7.3.3 所述，通过以下 3 个步骤分析食品中转基因大豆的含量：1) 所有大豆成分对 GMO 含量进行均一化处理，产生 ΔC_T 值，2) 利用标准品得到一条标准曲线 (%GMO 的 log 浓度对 ΔC_T)，3) 利用标准曲线，通过 ΔC_T 均一化所有样本，确定食品样本中转基因大豆的成分。用 TaqMan 探针分析结果如下：

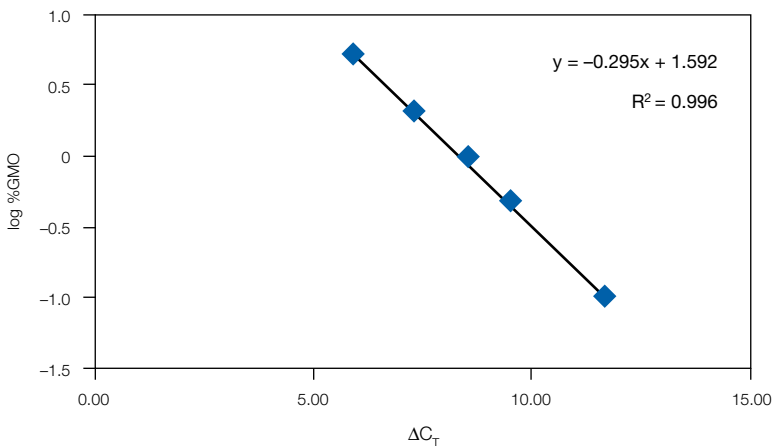
- 1、通过计算 ΔC_T 均一化处理样本中的转基因大豆含量。对于那些没有扩增出 CaMV 的标准品和样品， ΔC_T 值用 ND 标记。

$$\Delta C_T = \Delta C_T(\text{CaMV}) - \Delta C_T(\text{lectin})$$

表 3 7.3. 计算 ΔC_T , $\Delta C_T = C_T(\text{epsps}) - C_T(\text{lectin})$

样品或标准品	$C_T(\text{CaMV})$	$C_T(\text{lectin})$	ΔC_T
0.0% GMO standard	ND	24.40	ND
0.1% GMO standard	35.96	24.30	11.66
0.5% GMO standard	33.19	23.60	9.59
1.0% GMO standard	32.12	23.60	8.52
2.0% GMO standard	31.34	24.00	7.34
5.0% GMO standard	29.76	23.80	5.96
Soy burger	27.22	21.85	5.37
Soy flour	ND	20.73	ND

2、利用标准品产生标准曲线，见图 7.2，标准品浓度为 GMO 含量 0–5%。

图. 7.2 利用标准样品 ΔC_T 及 GMO% 生成标准曲线，见图。 $R^2 = 0.996$

3、从标准曲线中推算待测食品 GMO 的百分含量。

表 4 7.4. 不同样品中转基因大豆的含量

样品	ΔC_T	%GMO
Soy burger*	4.41	>5
Soy flour*	ND	0–0.1

* 表示样品得浓度超过标准品浓度范围

实时荧光定量 PCR 国际化标准 — MIQE 指南

MIQE 指南	86
实验设计	87
RNA 抽提	87
RNA 质量控制	88
反转录	90
引物和扩增子设计	90
qPCR 扩增与 qPCR 验证	91
退火温度、融解曲线分析、扩增子凝胶分析和无模板对照的确定	91
标准曲线的建立 (评价 PCR 扩增效率)	93
qPCR 试剂、仪器和分析软件	95
数据分析	96
内参基因的选择	96
实验重复性与重现性	97
结 论	97
参考文献	98

8. MIQE 指南

Sean Taylor, Michael Wakem, Greg Dijkman, Marwan Alsarraj,
and Marie Nguyen, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547

实时荧光定量 PCR (qPCR) 目前已成为不同样品间进行基因表达水平定量差异比较的权威性方法。在过去 10 年中, 该方法迅速流行, 查阅 RT (反转录) -qPCR 资料, 出版文章超过 25,000 篇, 涉及科学的多个领域, 包括农业、环境、工业和医学研究。

除了这一技术的应用十分广泛, 另一个使该技术迅速发展的主要原因是杂志的编辑审阅专家组对用 RT-qPCR 方法得到的定量和分子数据来支持表型观察报告的需求不断增加。而且, 基因表达分析也用于支持通过蛋白组检测得到的蛋白表达数据。生物技术公司为配合这一技术的迅速发展, 相继开发出各种可运行 RT-qPCR 实验的相关试剂和仪器。然而, 目前还没有建立严谨的指南, 研究者们通常通过不同的信息来源来设计他们的实验, 这使得实验数据的质量参差不齐。

大量的技术缺陷可能会影响 RT-qPCR 数据的质量, 包括不适当的实验设计, 没有足够的对照和重复, 对实验条件和样品操作技术缺乏适当的定义, 低质量 RNA 样品, 反转录引物选择不理想, qPCR 反应和数据分析方法的不正确等。为帮助科学家们能产生一致的, 高质量的 qPCR 实验数据, 定量 PCR 实验数据发表所必需实验信息最低限度标准 (MIQE) 已在近日出版 (Bustin et al. 2009)。之后开发了基于 XML 的实时定量 PCR 数据标注语言建立起的 RDML 协议, 使实时定量 PCR 数据得到统一 (Lefever et al. 2009)。这一协议正积极发展合适和标准化的术语、为生物和生物医药研究者提供的最小信息指南、灵活及广泛的数据文件架构, 这些数据架构可通过各种工具来创建、处理和验证 RDML 文件。关于 RDML 项目的所有相关信息可在 www.rdml.org/ 中查到。

MIQE 和 RDML 的最终目标是建立一个清晰的框架, 在这个框架中, 可对 RT-qPCR 实验进行管理, 给审稿人和编辑提供指南, 使其可以使用已构建的标准对投稿文章的技术质量进行评价。同样, 通过使用该方法所产生的数据对于研究结果更具有一致性, 可比性和可靠性。

因为 mRNA 转录的高动态性和样品操作及下游处理步骤的多变性 (Garson et al. 2009), RT-qPCR 流程中每一步的标准化对结果的可靠性和重复性至关重要。MIQE 提供了一个检测列表, 该列表包含 85 个参数来确保实验结果的质量, 满足了所有杂志的接受标准 (Bustin et al. 2009)。

我们将通过这篇文章阐述如何应用 MIQE (<http://medgen.ugent.be/rdm/guidelines.php>) 指南建立完整的实验方法。

8.1 实验设计

适当的实验设计是所有基因表达研究的关键。因为 mRNA 转录对外在因素敏感，该反应需要在严格的控制及设定条件下进行。花费一定的时间对实验过程，对照组，样品类型和重复次数，实验条件和样品操作方法进行设计十分必要，可以减少每次实验结果可变性（表 1）。在进行基因表达实验之前，每一个参数都需要进行仔细记录以确保所发表数据的优良的生物学重现性。

表 1. qPCR 实验设计及样品处理。该表格总结了一个典型的 RT-qPCR 实验流程，从实验设计到对照组，重复数及实验条件到样品操作的细节进行设定。这些设定是确保 qPCR 数据产生过程中的关键步骤能产生高质量，高重复和可发表的 RT-qPCR 数据。

实验设计	对照组	重 复	实验条件	样品操作
疾病或处理组	时间长度研究 (i.e., t = 0)	生物学 (每个孔不同样品)	生长条件 (培养基和时间或 OD)	细胞或组织收 获的精确时间
靶标基因	正常vs.疾病 (i.e.正常)	技术 (每个孔相同样品)	胚胎发育天数	样品抽提 的方法
内参基因	未处理组vs. 药物处理组 (i.e.未处理)	—	药物或复合物 的单位质量	保存方法 和时间
—	—	—	性别，表型	解冻和均 质化过程
—	—	—	孵育时间	总 RNA 抽 提过程

8.2 RNA 抽提

如果样品不得不在采集后要放置一段时间或者样品数量多，无法立即处理，则在使用前需要一直把样品保存于合适的条件下（冷冻于-80°C 和 / 或保存于 RNA 保存液中）。为缩短RNA抽提过程中的操作时间，我们建议以 10-20 的小批次来进行样品处理。RNA 抽提过程应包括 DNase I 处理步骤以便去除基因组 DNA 污染。一些经济方便的试剂盒，比如 Aurum RNA 抽提试剂盒（Bio-Rad Laboratories, Inc.）可用于任何样品，包括植物和动物组织的处理，该试剂盒含有柱上 DNase I 处理步骤。

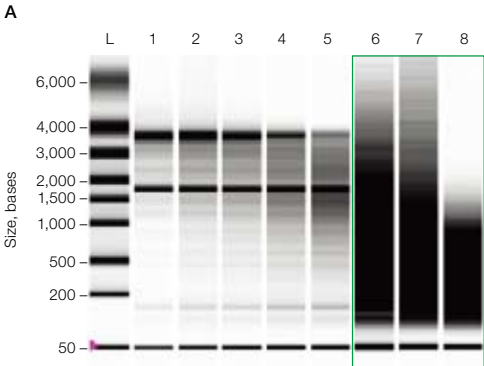
8.3 RNA 质量控制

在 RT-qPCR 实验流程中使用高纯度（无污染）和高完整性（无降解）的 RNA 是最关键的因素之一。不纯的 RNA 样品会抑制 PCR 反应，产生偏离的数据。使用部分降解的 RNA 会产生可变和不正确的定量结果（Fleige and Pfaffl 2006, Gingrich et al. 2006）。样品的纯度和完整性无直接关联，因此 RNA 样品的这两个性质是进行下游实验的最低要求。

样品 RNA 中是否有蛋白的污染可以通过 OD_{260/280} 分光光度法来进行检测。OD_{260/280} 比值在 1.8 到 2.0 之间则表示该 RNA 质量好，没有蛋白和苯酚的污染（图 1B）。然而从分光光度仪上无法得到关于 RNA 完整性的信息。有几种方法可以用来检测 RNA 的完整性。传统的方法是通过甲醛琼脂糖凝胶电泳及 EB 荧光染料染色来观察。此方法中可观察到分子量一大一小（核糖体 RNA，rRNA）的两条尖锐的条带，其中大分子量的条带亮度是小分子量条带亮度约两倍则提示 RNA 是完整的。这种方法成本低，但 RNA 的完整性判断具有主观性，并且需要大约 200ng 的总 RNA，如果样品稀有，则相对浪费。使用光密度扫描仪进行成像对 rRNA 条带的亮度进行定量可以改善上面的方法。虽然 28S/18S 的比值在不同组织和细胞类型中会有所变动，当该比值在 1 至 2 之间则提示 RNA 样品的完整性程度。

RNA 完整性分析可通过微流体电泳系统（Imbeaud et al.2005）得到大的改善，如 Experion 全自动电泳系统（Bio-Rad）。该系统在一个步骤中整合了 RNA 的完整性和浓度质量（从皮克到纳克级）（图 1A 和 1C）测定。该系统可生成一块虚拟胶，电泳图和 28S/18S 比值，Experion 系统软件还可自动计算并报告 RNA 质量（RQI）指示值（图 1C）。基于电泳图的多个标准（Denisov et al.2008），该值可反应 RNA 样品的完整性。RQI 值在1（降解）至 10（完整）之间，可提供对 RNA 样品的客观评判，该值可筛选出降解的样品。

通过确保所有 RNA 样品纯度和质量的一致性可以降低生物学重复的差异（图 1D）（Imbeaud et al. 2005）。当一批 RNA 样品符合质量控制标准时，我们建议这批样品可立即用于 qPCR 实验，或者将其反转录为更加稳定的 cDNA，以便在质量检测后保持其完整性。



B

Sample	$A_{260/280}^*$	$A_{260/230}^*$
1 Control—no heat	1.90	2.44
2 3 min @ 90°C	1.93	2.40
3 5 min @ 90°C	2.06	2.37
4 10 min @ 90°C	2.03	2.37
5 15 min @ 90°C	2.02	2.31
6 1 hr @ 90°C	1.99	2.18
7 2 hr @ 90°C	2.00	2.32
8 4 hr @ 90°C	1.89	2.23

* Generally accepted ratios ($A_{260/280}$ and $A_{260/230}$) for good quality RNA are >1.8.

C

Well ID	Sample Name	RNA Area	RNA Concentration (ng/ μ l)	Ratio [28S/18S]	RQI	RQI Classification	RQI Alert
1	Control - no heat	278.23	102.60	1.60	9.8	Green	
2	3 min @ 90C	317.12	116.94	1.23	9.2	Green	
3	5 min @ 90C	306.89	113.17	0.89	8.1	Green	
4	10 min @ 90C	257.56	94.98	0.50	6.5	Yellow	
5	15 min @ 90C	247.31	91.20	0.15	5.9	Yellow	
6	1 hour @ 90C	200.94	74.10	0.46	2.2	Red	
7	2 hour @ 90C	252.37	93.07	0.81	2.0	Red	
8	4 hour @ 90C	274.16	101.10	0.00	1.8	Red	

D

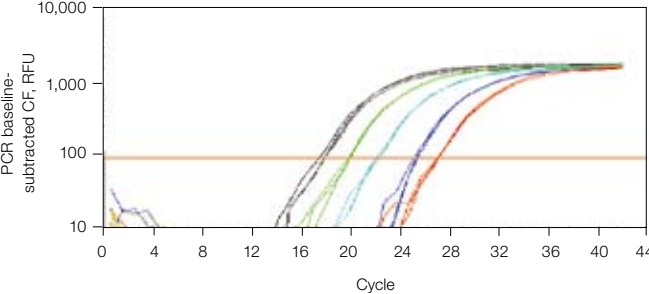


图 1. RNA 纯度和完整性分析。该图显示通过分光光度计和 Bio-Rad Experion 全自动电泳仪系统对 RNA 纯度和完整性进行分析。小鼠肝脏总 RNA 样品通过在 90°C 加热不同时间进行降解，进行 RNA 纯度和完整性分析。绿色框显示，单通通过吸收值 (≥ 1.8) 提示总 RNA 样品的质量符合要求，但通过 Experion 系统 RQI 完整性检测得到的低 RQI 值显示该样品已经降解。A，Experion 软件生成的虚拟凝胶图像显示 RNA 样品不同的降解程度和 18S rRNA 条带逐渐降低的亮度；B，使用 Nanodrop 分光光度计检测所有样品的 OD_{260}/OD_{280} 比值显示样品没有蛋白污染；C，使用 Experion 软件总结 RNA 完整性分析。28S/18S rRNA 比值和 RQI 提示热处理过的 RNA 样品完整性降低。通过颜色分类易于分辨出不符合 qPCR 的样品；D，降解样品中 GAPDH 的 qPCR 分析 (Gingrich et al.2006)。图形显示降解样品中 C_q 值的增加。

8.4 反转录

鉴于 RNase 在环境中广泛存在，我们建议在质量控制检测后将总 RNA 样品立即反转录为 cDNA。这种处理避免了 RNA 样品在反转录为 cDNA 之前因反复冻融而导致的 RNA 降解。在反转录步骤中，关键是抽提的 RNA 样品能连贯完整的覆盖基因组。一些基因长度很长，但这些序列的 RT 产物长度不足，特别是在 RT 引物只是与每个 mRNA 末端配对时。使用 mRNA 末端配对引物和 mRNA 序列随机位点配对引物的组合会得到每个基因的反转录产物群。此方法比单一的末端或随机位点配对转录本更具代表性，可对转录基因组进行更好的覆盖。

反转录缓冲液应该含有随机引物，RNaseH，特异性和灵敏度高的反转录酶，该酶应具有高动态范围，可对 1μg 至 1pg 的 RNA 进行反转录，其操作应简单快速。iScript™ (Bio-Rad) cDNA 合成试剂盒满足这些标准并适用于任何总 RNA 样品的反转录。我们建议为了减少不同生物学上重复样品的差异，每次反转录反应使用的 RNA 的量和反应时间应相同。RNA 的反转录本可在使用前一直保存于 -20°C 或 -80°C。

8.5 引物和扩增子设计

引物的设计和目标序列的选择对产物的特异性和有效扩增来说至关重要。目标序列应该是唯一的，长度在 75 至 300bp 之间，GC 含量在 50 至 60% 之间，不含二级结构。我们建议引物的 GC 含量在 50 至 60% 之间，融解温度在 55-65°C 之间。应避免引物中含有连续的 G 或 C，但推荐在引物的末端含有 G 或 C。

目前有很多引物对设计和目标序列选择的程序。我们建议使用 Primer-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/indec.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd)，该程序由 NCBI 开发，运用 Primer3 运算法则来运行 (Rozen and Skaletsky 2000)。引物序列可在使用者选择的数据库中进行比对，以确保目标基因的特异性。MFOLD 程序 (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>) 可用来分析扩增子是否存在阻碍有效扩增的二级结构 (Zuker 2003) (图 2)。理想状态下，在 qPCR 反应中应至少定制两套寡核苷酸来检测它们在反应中的表现。

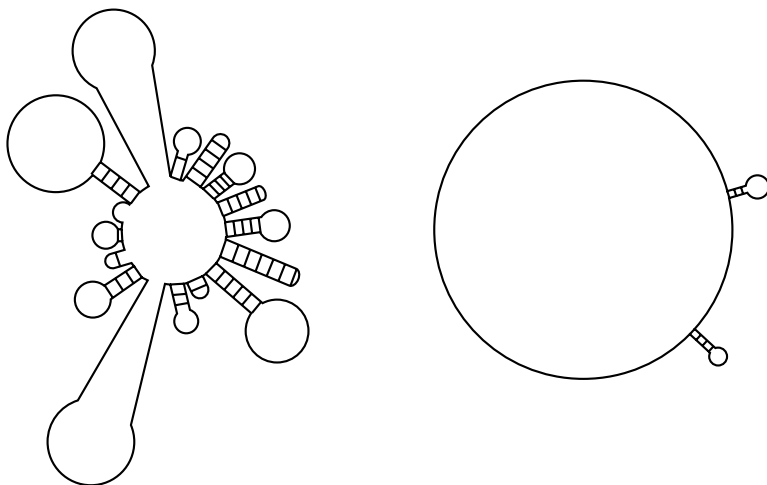


图2. 退火温度对扩增子二级结构的影响。MFOLD 程序对扩增子进行的分析可预测在 60°C (左图) 存在大量二级结构, 而在 65°C (右图) 存在少量二级结构。

8.6 qPCR 扩增与 qPCR 验证

qPCR 验证检测使用一系列标准品对引物退火温度范围、反应效率和反应特异性进行优化 (Bustin et al.2009)。这将确保反应条件、缓冲液和引物的优化及 cDNA 样品无 Tag 酶抑制剂污染。Bio-Rad 创建的网站资源 (www.bio-rad.com/genomics/pcrsupport) 可帮助使用者进行 qPCR 设计和验证。验证检测的关键点总结如下：

8.6.1 退火温度、融解曲线分析、扩增子凝胶分析和无模板对照的确定

PCR 反应中的关键一步是引物与目标序列的退火。在合适的温度下, 引物可有效的与其目标序列进行退火, 与此同时降低了非特异性退火和引物二聚体的形成。最快确定退火温度的方法是使用带有温度梯度功能的热循环仪。Bio-Rad 的所有热循环仪和实时定量 PCR 仪均有温度梯度加热模块选项。研究者应对计算得出的引物退火温度附近的温度进行检测 (图 3A)。

检测 PCR 产物的特异性也非常重要。通过 PCR 反应后进行的融解曲线分析, 可对引物退火的特异性进行检测。融解曲线应该显示出一个单一尖锐峰 (图 3B)。此外, 每对引物至少有一个样品的扩增产物需要用合适的凝胶 (琼脂糖凝胶或可分辨更小 DNA 片

段的聚丙烯酰胺凝胶) 来确定扩增子的大小是否正确 (图 4)。此外, 所有的全自动电泳系统, 如 Experion 全自动电泳系统 (使用 Experion DNA 1K 分析试剂盒) 可用于快速精确的确定扩增子大小。

因为大多数 qPCR 实验在一个扩增过程中会对多个基因进行研究, 所以设计退火温度相近的不同引物, 使得在同一次反应中使用的退火温度适合所有引物对就十分重要。每次运行中各对引物都应包括两个非模板对照 (NTC) 重复样以便检测缓冲液和溶液是否有 DNA 污染和引物二聚体。

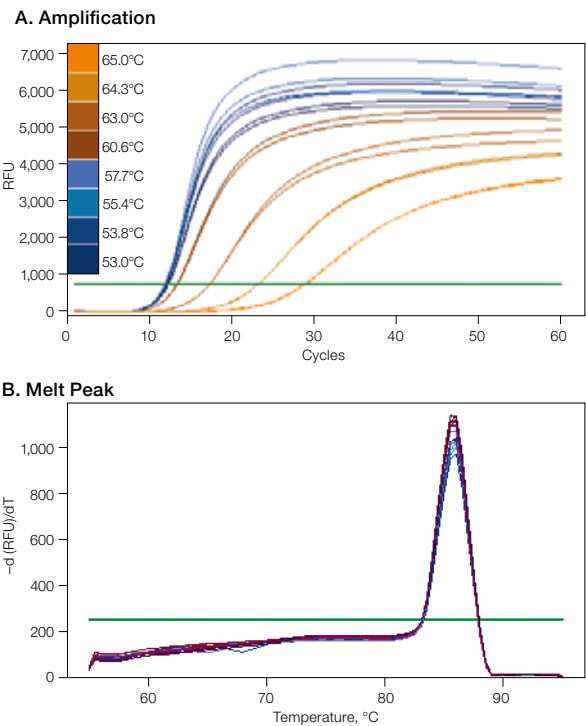


图 3. qPCR 引物的验证。使用梯度加热模块在一定退火温度范围内进行 qPCR 反应。扩增图显示在最低的四个退火温度 (53°C 至 57.7°C) 时, 扩增效率最高, 它们的 C_q 值最低; B, 融解曲线分析显示单一峰, 提示 PCR 产物为单一产物。

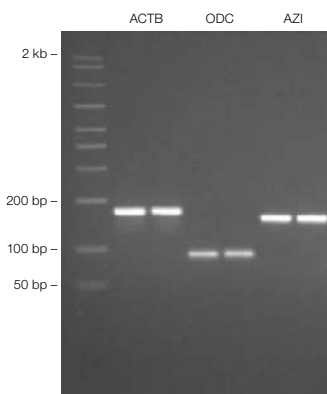


图 4. 对 PCR 产物进行凝胶分析。对扩增子的凝胶电泳分析显示凝胶中有和预期的扩增子大小相符的单一条带出现。
(ODZ, 鸟氨酸脱羧酶; AZI, 抗酶抑制剂)。

8.6.2 标准曲线的建立 (评价 PCR 扩增效率)

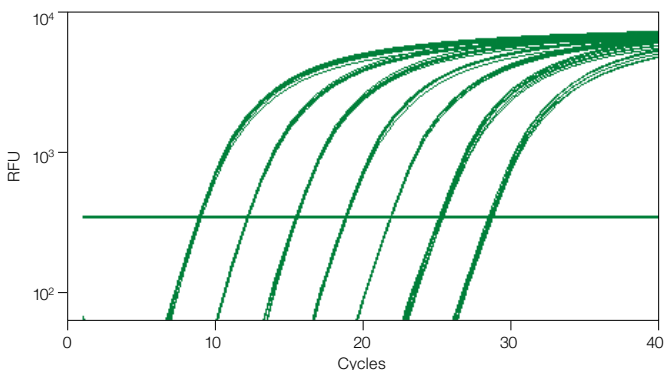
PCR 扩增效率是指多聚酶把各种试剂 (dNTPs, 寡核苷酸和模板 cDNA) 转变生成扩增子的效率。每个循环扩增子的最大增量为两倍即代表 PCR 反应的效率是 100%。检测 PCR 反应的扩增效率非常重要, 因为扩增效率可反映人为原因引起的 qPCR 问题。低扩增效率 (<90%) 可能由于 Tag 酶抑制剂的污染, 过高或未优化的退火温度, 时间较久或已失活的 Tag 酶, 引物设计不合理或扩增子含二级结构。过高反应效率 (>105%) 一般是由于引物二聚体或非特异性扩增。而引起过高或过低的反应效率最常见的原因包括移液器不准或不当的移液器操作技术。

标准曲线一般被用来确定 qPCR 的反应效率。标准曲线所用的模板一般是 cDNA 或质粒 cDNA。我们建议实验开始时从 cDNA 样品的最高浓度开始, 可设置 8 个 10 倍系列稀释的点来确保标准曲线能覆盖实验中所有可能会用到的模板浓度 (即形成宽的动态范围)。对每个稀释度来说, 标准 qPCR 流程中每个引物对要重复三次来确定 C_q 值。标准曲线是模板起始浓度的对数值对 C_q 值得到的。其后所得的线性回归直线的方程, Pearson 相关系数 (r) 或决定系数 (R^2) 可用来评价 qPCR 反应是否需要优化。

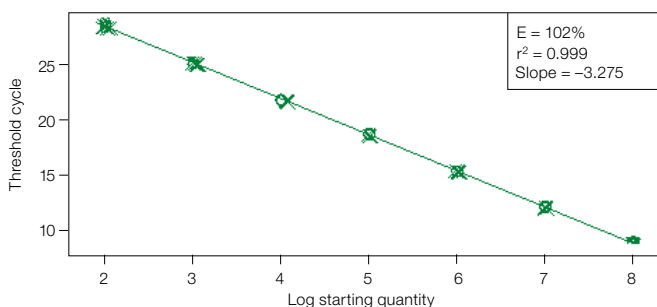
理想情况下, 一系列稀释样品产生的扩增曲线重复应是分布均匀的 (图 5A)。如果每次扩增都是两倍增长, 那么荧光曲线之间的间隔可用公式 $2^n = \text{稀释因子}$ 确定, 这里 n 是各曲线在荧光阈值时的循环数差 (即不同曲线之间 C_q 值的差值)。例如, DNA 为 10 倍梯度稀释, 则 $2^n = 10$, 因此 $n = 3.32$, 即表示不同曲线的 C_q 值之间相差为 3.32 个循环。均匀间隔的扩增曲线 (图 5) 可产生线性的标准曲线 (图 5B), 其反应效率在 90 至 105% 之间。

标准曲线的 r 或 R^2 可代表实验数据符合回归曲线的程度, 即数据的线性化程度。线性化可检测重复孔之间的差异性, 不同起始模板拷贝数的扩增效率是否一致。重复孔之间如果有明显的 C_q 值差异, r 或 R^2 值会降低。qPCR 反应的理想 r 绝对值应 >0.990 或 R^2 值应 >0.980。删除标准曲线两末端的点可以得到可接受的斜率值 (效率) 和 R^2 值。标准曲线将最终确定每对引物对适用的 cDNA 浓度动态范围, 这关系到样品的稀释。

A. Amplification



B. Standard Curve



C. Melt Peak

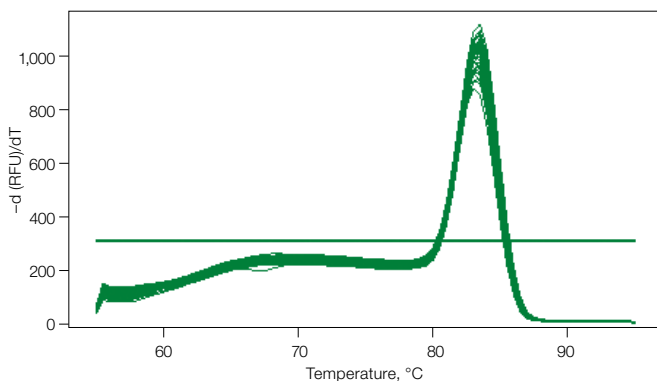


图 5. 标准曲线。 A, 对系列稀释的模板进行 qPCR 实验并确定每个稀释度的 C_q 值。每个浓度的模板进行三次重复。注意, 三次重复的 C_q 值十分一致, 表明操作误差小; B, 以 C_q 值对模板拷贝数的对数 (或相对浓度) 作图进行标准曲线制作, 通过斜率得到扩增效率和 R^2 值。理想情况下, 每个稀释度的三个重复样品的扩增曲线的扩增效率均接近 100% (90-105%), R^2 值超过 0.98, 每个基因具有单一, 尖锐的熔解曲线峰。C, 扩增子的融解曲线分析显示出单一峰。

8.6.3 qPCR 试剂、仪器和分析软件

目前市场上供应各种商品化 qPCR 试剂盒。我们推荐使用 Bio-Rad 的 SsoFast EvaGreen 超混液，该试剂含有 EvaGreen 染料，这是一种饱和染料，比 SYBRGreen 的灵敏度更高。除此以外，Sso7d 融合多聚酶及优化缓冲液可抵抗对 Tag 酶有抑制作用的污染，从而得到出色的重复性。

市场上现在有多种 qPCR 检测仪，以下原则可用于选择合适的仪器：

1. 标准 96 孔规格，样品体积在 10-50 μ l，使用 0.2ml 低位反应板，反应联管或反应管。
2. 可进行快速升降温并且具有温度梯度功能的加热模块。
3. 无需使用专利性的试剂、消耗品或荧光染料。

Bio-Rad 公司的 CFX96™ 和 CFX384™ 实时定量 PCR 仪可完全符合这些标准。所有的 qPCR 仪都会有配套的数据分析软件，我们推荐出色的软件应包括以下特点：

1. 可灵活的进行反应板设置，在反应运行前，运行中或运行后都可对反应孔进行描述和编辑。
2. 可对同一块反应板上运行的不同实验进行反应孔分组编辑。
3. 软件带有基因表达分析功能，可进行多个内参基因 (Vandesompele et al. 2002) 和反应效率的标准化 (Pfaffl 2001)。
4. 可以把多块板的实验数据整合在一起进行大规模的基因研究。

Bio-Rad 的 CFX Manager 软件完全符合这些标准，并与 CFX96 和 CFX384 实时定量 PCR 仪配套使用。

8.7. 数据分析

8.7.1 内参基因的选择

在 RT-qPCR 实验中，内参基因被用来作为数据标准化的对照，以校正作为模板的 cDNA 所存在的数量差异 (Gutierrez et al. 2008, Huggett et al. 2005, Vandesompele et al. 2002)。好的内参基因应该在不同实验条件下或不同时间点上，在各个样品中的表达都无改变。某些基因如 GAPDH, β -actin 或 rRNA 通常被用作内参基因。虽然如此，大量的研究显示，这些基因在不同组织或不同处理条件下的表达都有不同，在这种情况下这些基因可能并不适合被用作内参基因。因此内参基因需要通过实验数据进行仔细的筛选，我们建议通过以下流程进行筛选：

1. 在每个实验条件下或时间点下取至少一个或两个样品进行总 RNA 抽提并确定其纯度和质量 (参照上面步骤 2 和步骤 3)。
2. 标准化样品浓度后以相同体积对每个样品进行反转录 PCR (步骤 4)。
3. 以每个 cDNA 样品为模板，取同样体积进行 qPCR 实验。
4. 比较不同条件下每个基因的 C_q 值。

不同条件或时间点下的 C_q 差异 (ΔC_q) 应不超过 0.5。因为任一特定的基因都可能受不同实验条件影响，我们建议在实验中同时检测至少三个或四个位于不同代谢途径中的特定内参基因，并对表达差异最小的几个基因进行几何平均以准确地标准化数据 (Vandesompele et al. 2002)。

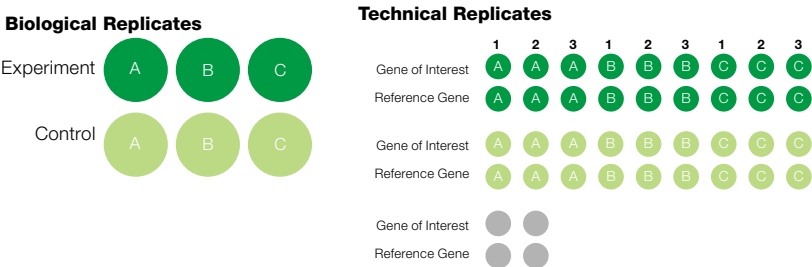


图 6. 实验的重复样。所有的实验都应该联合设置有生物学重复和技术重复样品。图中简单显示了对照 ■ 和处理/实验组 ■ 的三个生物学重复。对每个生物学样品，目标基因和内参基因都设了三个技术重复样。因此实验中共设置至少 36 个样品，加上两个 NTC ■ 重复样，总的反应孔数超过 40 个。

8.7.2 实验重复性与重现性

在基因表达实验中，有两个可变原因可能会影响实验结果：

1. 不同生物个体，组织或培养样品间基因表达水平的内在差异所导致的生物学差异。
2. 由移液操作和移液器本身等原因导致的实验过程本身存在的技术差异。

为减少生物学和技术差异的影响，一般认为在实验中至少要设置三个生物学样品重复，并且每个生物学样品至少有两个技术性重复（图 6）。如果实验是在对照和处理样品之间进行基因表达水平比较，设置的三个生物学重复样品应该来源于在独立实验中分别进行处理的样品。

8.8 结论

RT-qPCR 是基因表达分析方法的选择之一，该方法灵敏度高，可检测极低浓度的 RNA 样品。然而，为确保数据的准确性，重复性和高质量，实验应遵守严格的标准操作流程。发表基因表达实验数据时，应如实汇报所有的实验细节和对照。这将有利于通过科学交流对实验数据进行正确评价，使实验数据能在不同实验室和不同实验中进行比较。

总之 qPCR 实验的关键步骤包括：

1. 实验设计应有合适数目的生物学重复及正确的对照样品设置。
2. 样品的获得应严格遵守实验流程中对采样、处理和保存的要求以确保重复性并减小重复样品间的标准偏差。
3. 对 RNA 的纯度和完整性进行质量控制。
4. 将总 RNA 反转录成 cDNA 的反转录反应。
5. qPCR 实验中正确的引物设计、引物退火温度确定、基因扩增效率摸索。
6. qPCR 实验数据分析中内参基因选择和统计方法计算。

MIQE 指南提供了发表被认可的 RT-qPCR 实验结果所需考虑的所有参数。通过这篇文章我们可以看到在 MIQE 列表中所有最重要的条例，这些可用于实践并确保得到高质量结果。

参考文献

- Bustin SA et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611-622.
- Denisov V et al. (2008). Development and validation of RQI: An RNA quality indicator for the Experion automated electrophoresis system. *Bio-Rad Bulletin* 5761
- Fleige S and Pfaffl MW (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27, 126-139.
- Garson JA et al. (2009). Unreliable real-time PCR analysis of human endogenous retrovirus-w (HERV-W) RNA expression and DNA copy number in multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25, 377-378; author reply 379-381.
- Gingrich J et al. (2006). Effect of RNA degradation on the data quality in quantitative PCR and microarray experiments. *Bio-Rad Bulletin* #5452
- Gutierrez L et al. (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: A serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J* 6, 609-618.
- Hellemans J et al. (2007). Qbase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8, R19.
- Huggett J et al. (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun* 6, 279-284.
- Imbeaud S et al. (2005). Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 33, e56.
- Lefever S et al. (2009). RDML: Structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res Advance Access published February 17, 2009* (accessed May 21, 2009).
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Rozen S and Skaletsky HJ (2000). Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 365-386.
- Vandesompele J et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, research0034.1-0034.11
- Zuker M (2003). MFOLD web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Jo Vandesompele for his insightful comments and helpful contributions to this paper.

Bio-Rad's real-time thermal cyclers are licensed real-time thermal cyclers under Applera's United States Patent 6,814,934 B1 for use in research, human in vitro diagnostics, and all other fields except veterinary diagnostics. This product is covered by one or more of the following U.S. patents or their foreign counterparts owned by Eppendorf AG: U.S. Patent Nos. 6,767,512 and 7,074,367.

EvaGreen is a trademark of Biotium, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Biotium, Inc. to sell reagents containing EvaGreen dye for use in real-time PCR, for research purposes only.

Practice of the patented 5' Nuclease Process requires a license from Applied Biosystems. The purchase of these products includes an immunity from suit under patents specified in the product insert to use only the amount purchased for the purchaser's own internal research when used with the separate purchase of Licensed Probe. No other patent rights are conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

CFX Manager software is for use with authorized real-time instrument or thermal cycler. Please see user manual for complete licensing statement.

Nanodrop is a trademark of Thermo Fisher Scientific, Inc.

Information in this tech note was current as of the date of writing (2009) and not necessarily the date this version (rev A, 2009) was published.

