

荧光定量PCR解决方案

TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO.,LTD

内容概要

 荧光定量PCR的原理及标记方法

 荧光定量PCR数据计算方法

 荧光定量PCR文献解读

 MIQE标准及实验常见问题分析

 定量PCR引物设计技巧

荧光定量PCR原理——定义

Real-time PCR技术:

利用荧光信号的变化实时检测PCR扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化，通过Ct值和标准曲线的关系对起始模板进行定量分析

与常规 PCR技术的比较:

- 1.对PCR反应终产物进行定量和定性分析（电泳）
- 2.无法对起始模板准确定量，无法对扩增反应实时监测

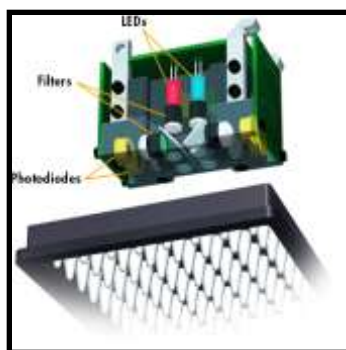
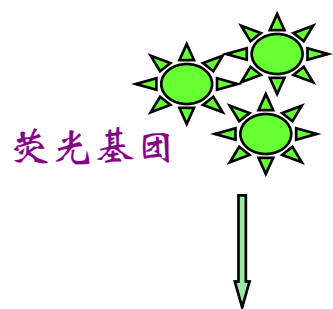
荧光定量PCR原理——常用名词概念

 扩增曲线

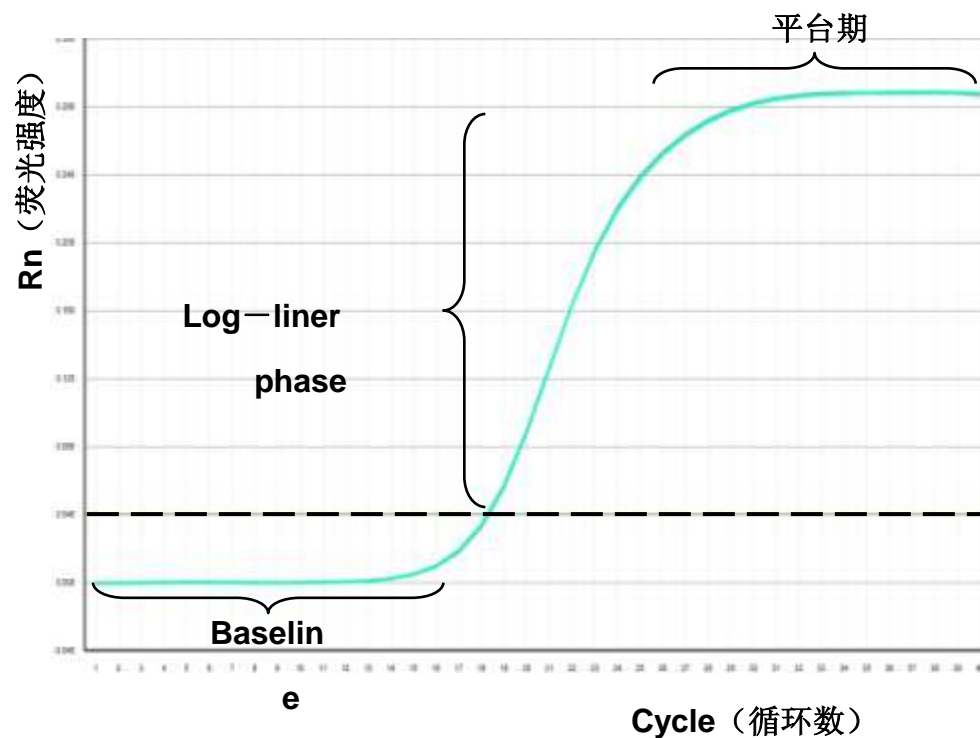
 荧光阈值

 Ct值

荧光定量PCR原理——扩增曲线



荧光检测元件



荧光定量PCR原理——荧光阈值



前15个循环信号作为
荧光本底信号（baseline）



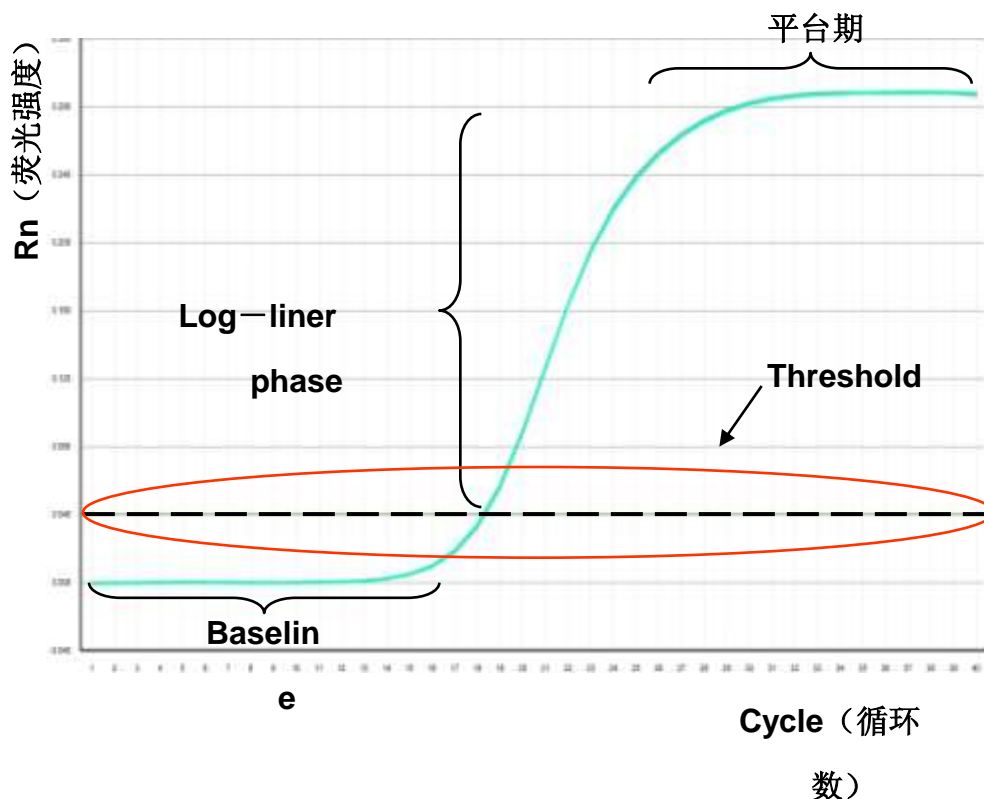
真正的信号: 荧光信号超
过阈值，进入指数扩增期
之后



荧光阈值的缺省设置是
3~15个循环的荧光信号的
标准偏差的10倍



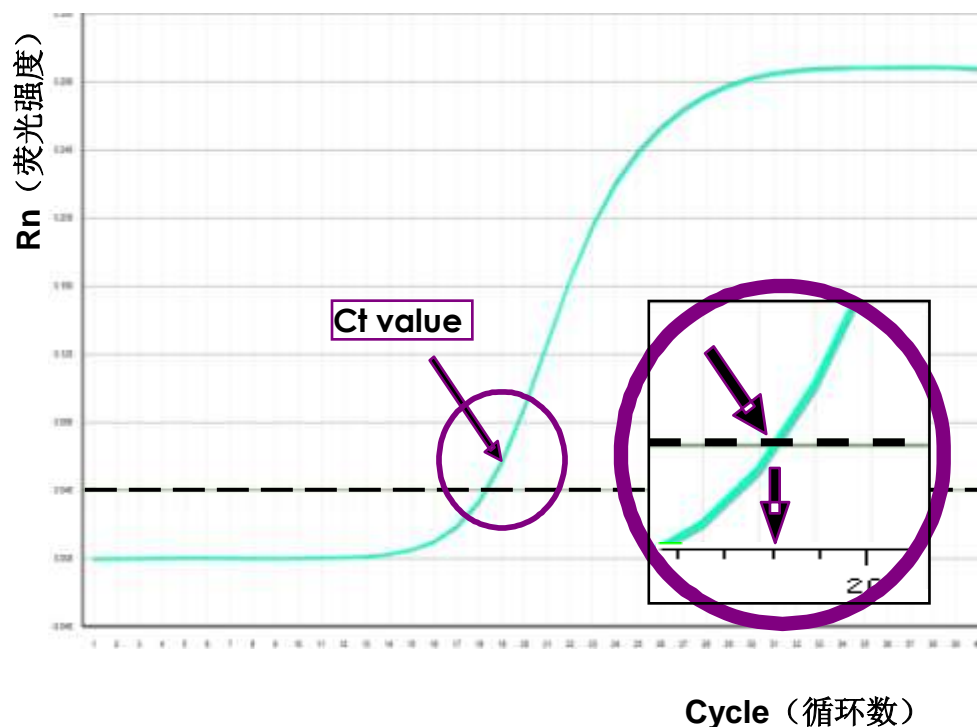
手动设置：大于荧光背
景值和阴性对照的荧光最
高值；进入指数期的最初
阶段



荧光定量PCR原理——Ct值

Ct值的定义：

PCR扩增过程中，扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数



荧光定量PCR原理——Ct值定量的数学原理

理想的PCR反应 $X_n = X_0 * 2^n$

n : 扩增循环数

X_0 : 起始模板数量

X_n : 第 n 次循环后扩增产物数量

荧光定量PCR原理——Ct值定量的数学原理

非理想的PCR反应

$$X_n = X_0 * (1 + E_n)^n$$

n: 扩增循环数

X₀: 起始模板数量

X_n: 第n次循环后扩增产物数量

E_n: 扩增效率

荧光定量PCR原理——Ct值定量的数学原理

在扩增产物达到荧光阈值时，所经历的循环数为Ct

$$X_{Ct} = X_0 * (1 + En)^{Ct} = M \quad (1)$$

X_{Ct} ：在阈值设定以后， X_{Ct} 是一个常数，可以用荧光强度表示的产物量，定为M

方程式（1）两边同取对数得：

$$\text{Log} M = \text{Log} X_0 * (1 + En)^{Ct} \quad (2)$$

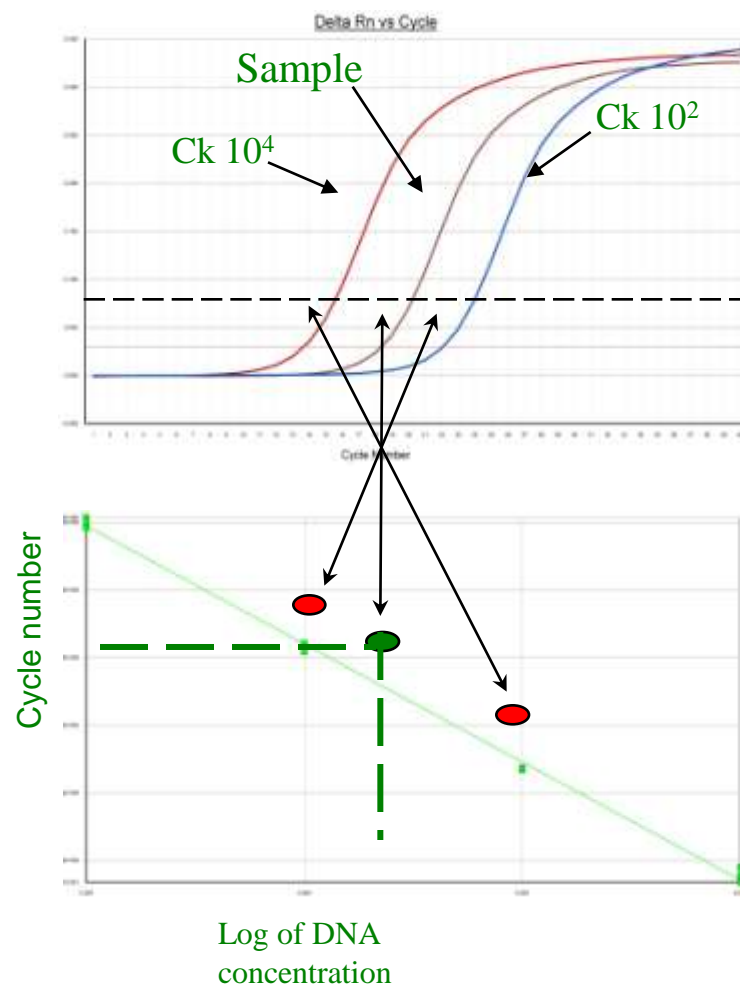
整理方程式（2）：

$$\text{Log} X_0 = \text{Log} M - Ct \text{ Log} (1 + En)$$

荧光定量PCR原理——Ct值与起始模板量的关系

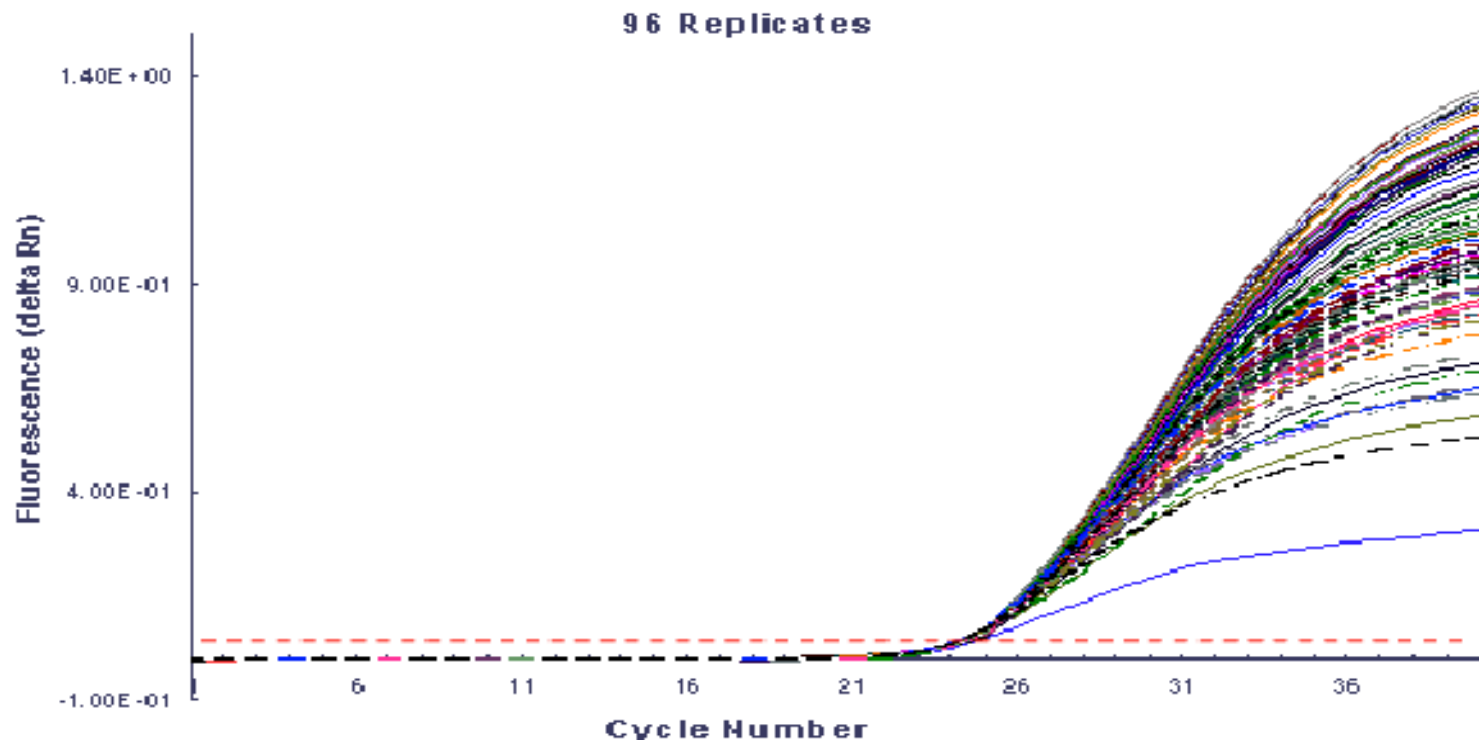
起始模板量越多，荧光达到阈值的循环数越少，即Ct值越小。

Log模板起始浓度与Ct值呈线性关系。






荧光定量PCR原理——PCR vs qPCR

同一个样品重复96次PCR的扩增曲线



荧光定量PCR技术的应用

-  **定性分析研究：** 杂合或纯合子鉴定，（SNPs）分析等
-  **绝对定量研究：** 病毒和病原菌定量分析，基因拷贝数定量，
GMO定量检测等
-  **相对定量研究：** mRNA表达量分析，siRNA效果确认，基
因芯片结果验证，差异显示结果验证等

内容概要

 荧光定量PCR的原理及标记方法

 荧光定量PCR数据计算方法

 荧光定量PCR文献解读

 MIQE标准及实验常见问题分析

 定量PCR引物设计技巧

常用荧光标记方法

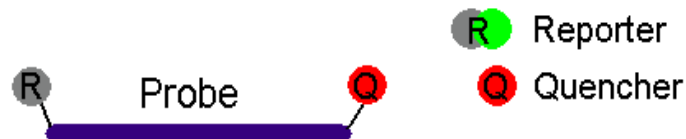
非特异性荧光标记

- SYBR Green I



特异性荧光标记

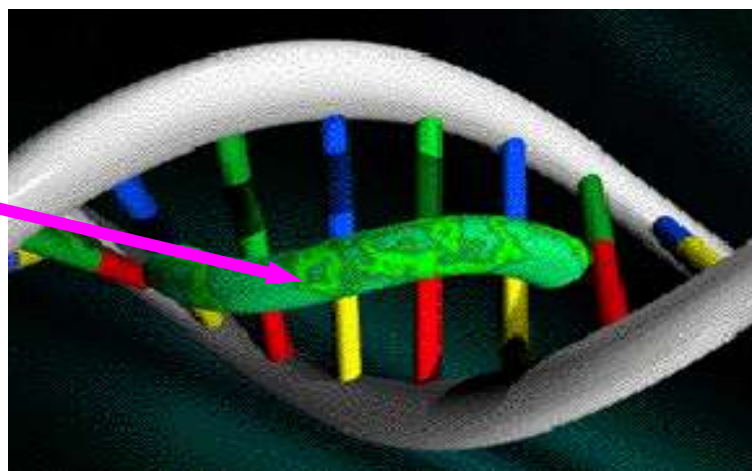
- TaqMan Probe
- 分子信标



SYBR Green I染料法——原理

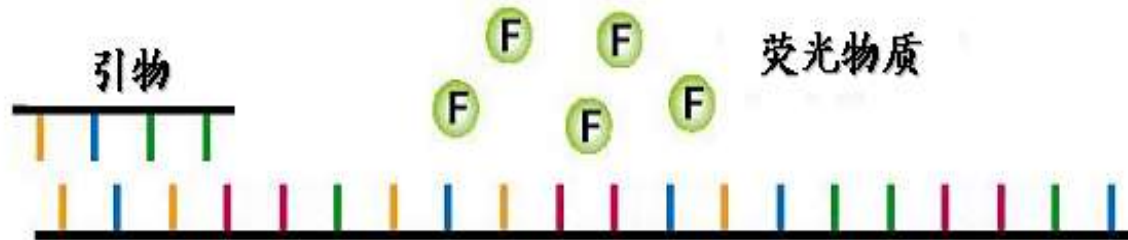
SYBR Green I是一种结合于所有dsDNA双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的染料。

SYBR Green I

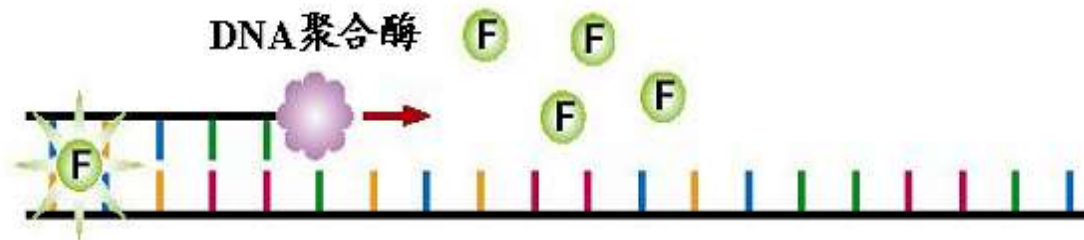


SYBR Green I 染料法——作用机理

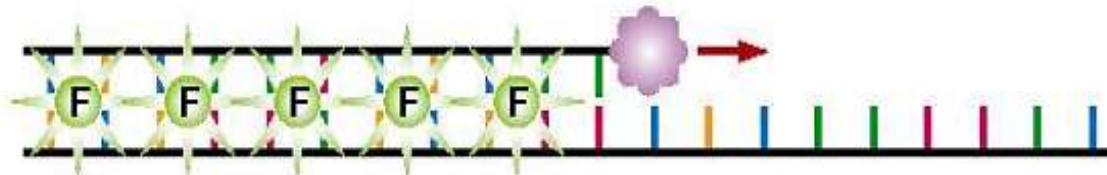
热变性



引物退火



延伸反应



SYBR Green I染料法——问题点与关键点

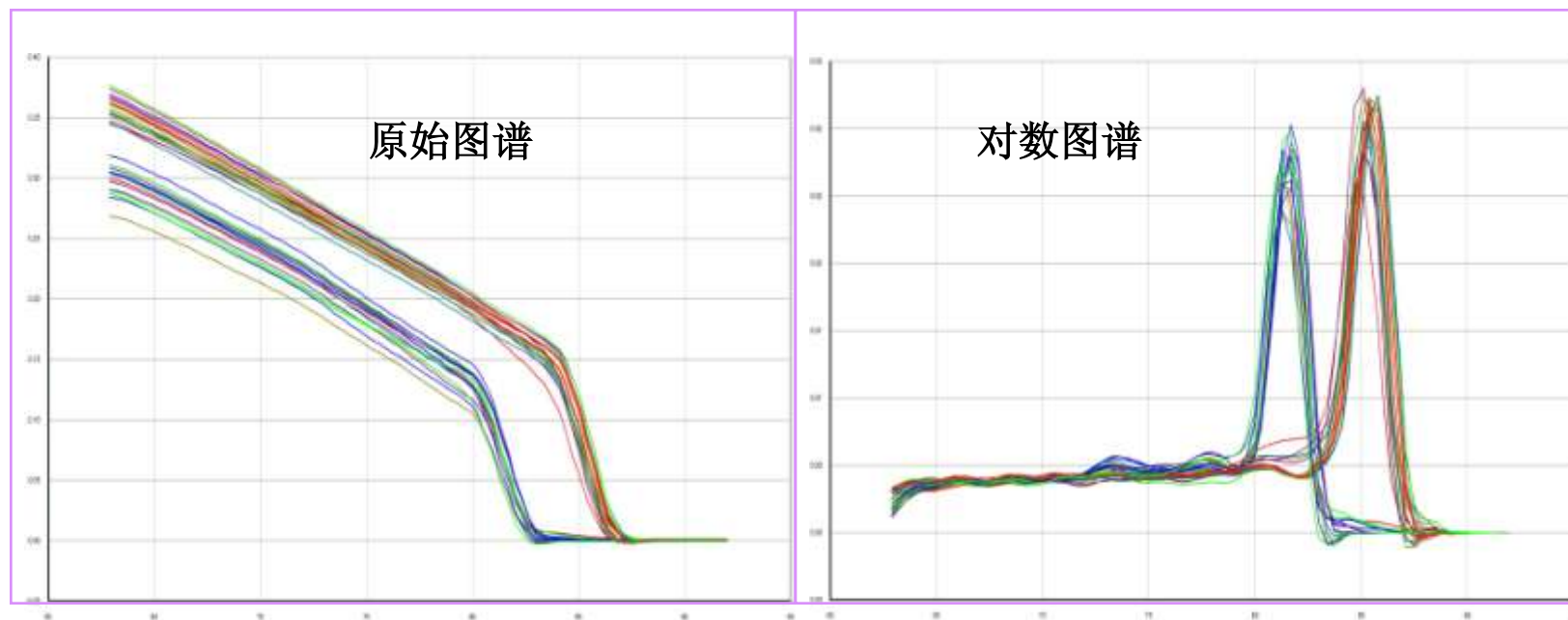
问题点：

SYBR Green I与任何双链DNA进行结合后散发荧光，因此如果反应体系中有非特异性扩增或引物二聚体的产生，也将同时被检测，从而可能导致检测结果不准确。

关键点：

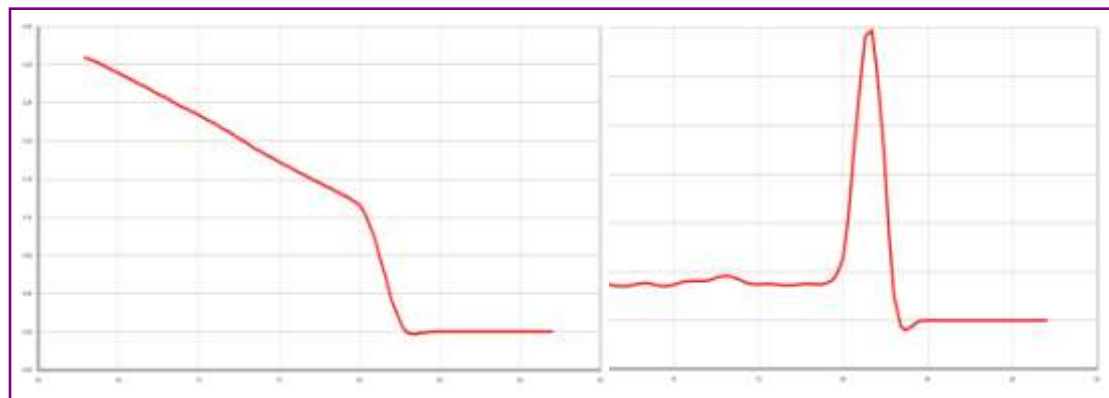
设计合适引物，防止非特异性扩增！

SYBR Green I染料法——融解曲线

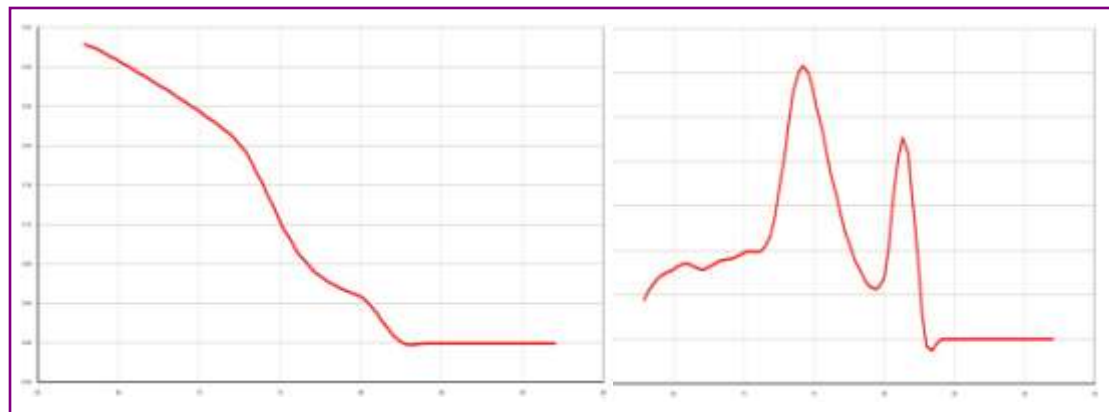


将温度与荧光强度的变化求导 ($-dI/dT$)

SYBR Green I染料法——融解曲线

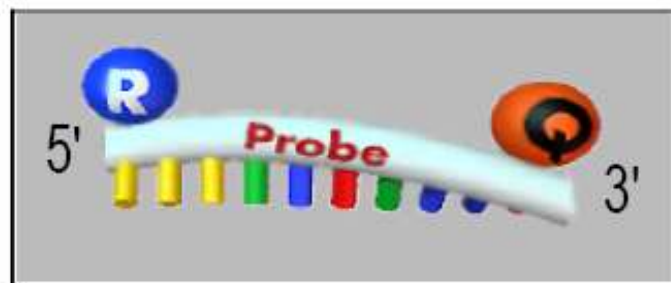


融解曲线分析，单一峰无非特异性荧光
定量准确



融解曲线分析，出现杂峰其他产物出现非特异性荧光，因此定量不准确

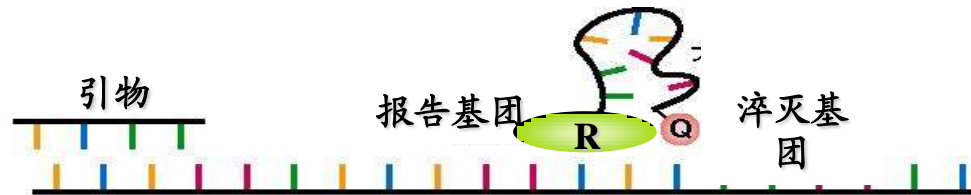
Taqman探针法——原理



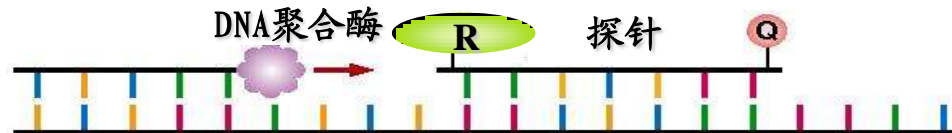
- ☐ 5'端标记有报告基团(Reporter, R) ， 如FAM、 VIC等
- ☐ 3'端标记有荧光淬灭基团 (Quencher, Q)
- ☐ 探针完整， R发射的荧光能量被Q基团吸收 ， 无荧光， R与Q分开， 发荧光
- ☐ Taq酶有 5'→3'外切核酸酶活性， 可水解探针

Taqman探针法——工作原理

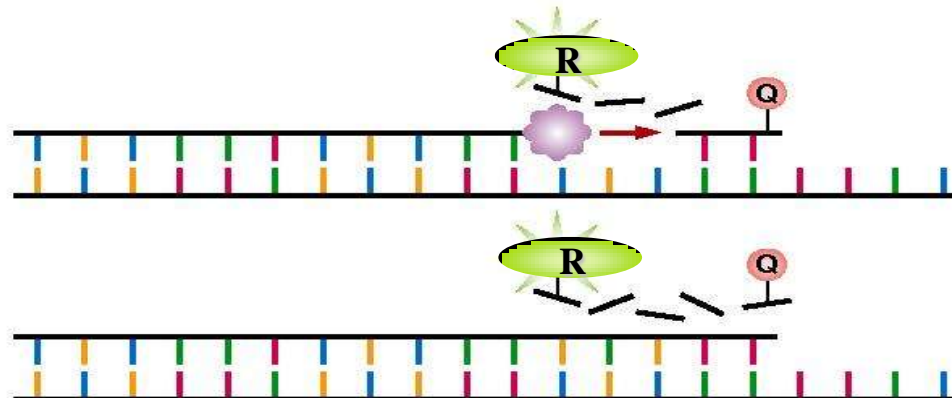
热变性



引物和探针与模板退火



延伸反应



实时荧光定量PCR的分类——几种方法的比较

方 法	优点	缺 点	适 用 范 围
SYBR Green I 方法	适用广 灵敏 方便 便宜	引物要求高 易出现非特异性带	适合科研中对多个目的基因定量分析，基因表达量的研究
TaqMan 方法	特异性高 重复性好	价格高 只适合特定目标	适合病原体检测，疾病耐药基因研究，药物疗效考核，遗传疾病的诊断
HRM 方法	特异性极高 区分度高	对仪器及试剂要求较高	种系的差异研究、SNP等单碱基突变研究

内容概要

 荧光定量PCR的原理及标记方法

 荧光定量PCR数据计算方法

 荧光定量PCR文献解读

 MIQE标准及实验常见问题分析

 定量PCR引物设计技巧

荧光定量PCR的解析方法（依据课题要求提前确定）



绝对定量解析方法



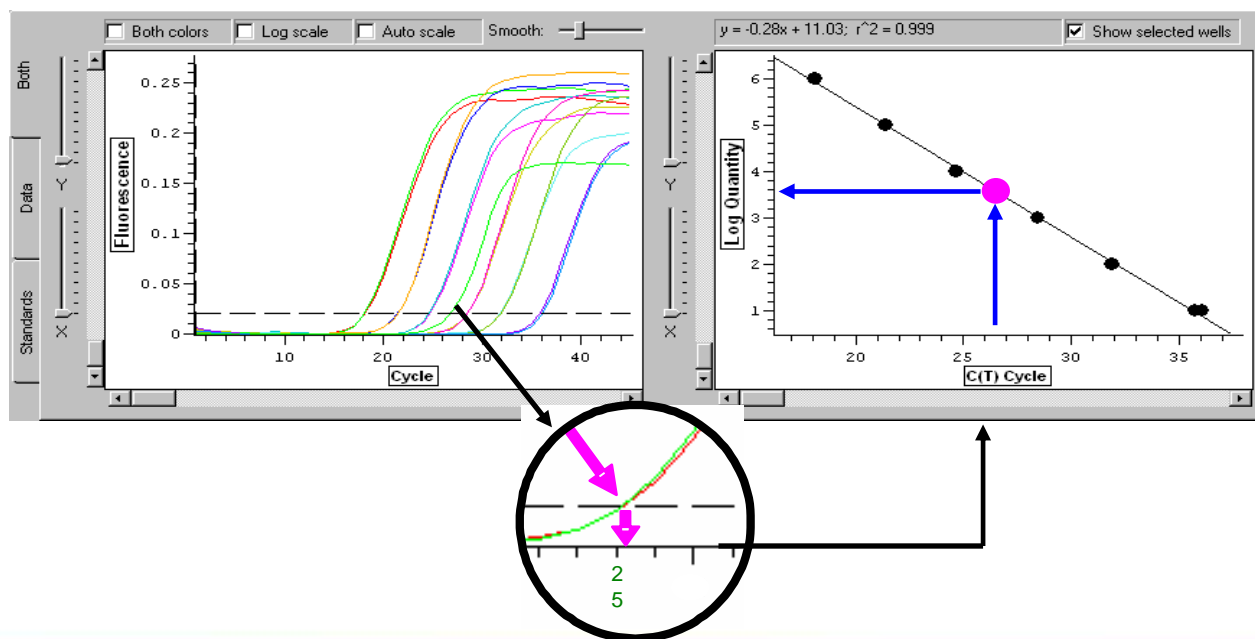
相对定量解析方法



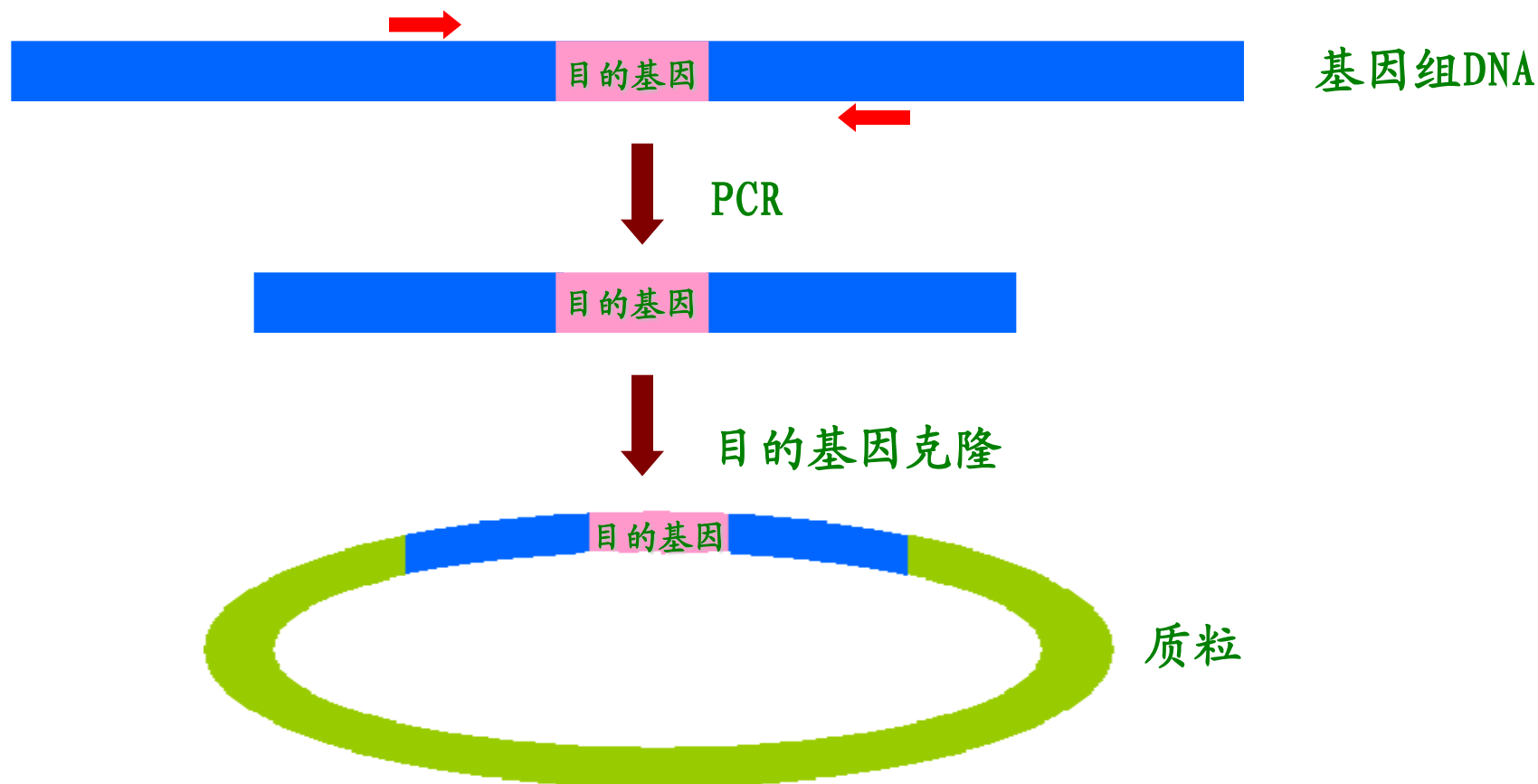
绝对定量解析方法

绝对定量的定义

- Log（起始浓度）与循环数呈线性关系，通过已知起始拷贝数的标准品 可作出标准曲线,即得到该扩增反应存在的线性关系
- 根据样品Ct值，就可以计算出样品中所含的模板量



质粒标准品的制备



质粒提取，OD值定量，将质粒梯度稀释作为标准品使用

质粒标准品稀释方法与拷贝数计算

倍比梯度稀释方法:

1v原液(标准品i) + 9v稀释缓冲液, 得标准品ii

1v标准品ii + 9v稀释缓冲液, 得标准品iii

1v标准品iii + 9v稀释缓冲液, 得标准品iv

1v标准品iv + 9v稀释缓冲液, 得标准品v

拷贝数的计算:

待测样本浓度 (ng/ul) = $OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$

样本分子量 = 碱基数 $\times 324$

待测样本拷贝数 (copies/ul) = $\text{待测样本浓度} / \text{样本分子量} \times 6 \times 10^{14}$

绝对定量实验例——乙肝病人血液中HBV的绝对定量

- ❑ 方 法：从血液中提取病毒DNA，以TaqMan探针法进行荧光定量检测
- ❑ 试 剂：TIANGEN公司探针法试剂RealMasterMix (Probe) (目录号：FP203)
- ❑ 标准品：质粒标准品浓度为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 ；2个重复；设阴性空白对照
- ❑ 实验步骤：提取HBV DNA；
 - 设计特异引物；
 - 设计TaqMan探针并标记探针；
 - 荧光定量扩增；
 - 结果分析：获取血液样品中HBV DNA的精确copy数。

绝对定量实验例——乙肝病人血液中HBV的绝对定量

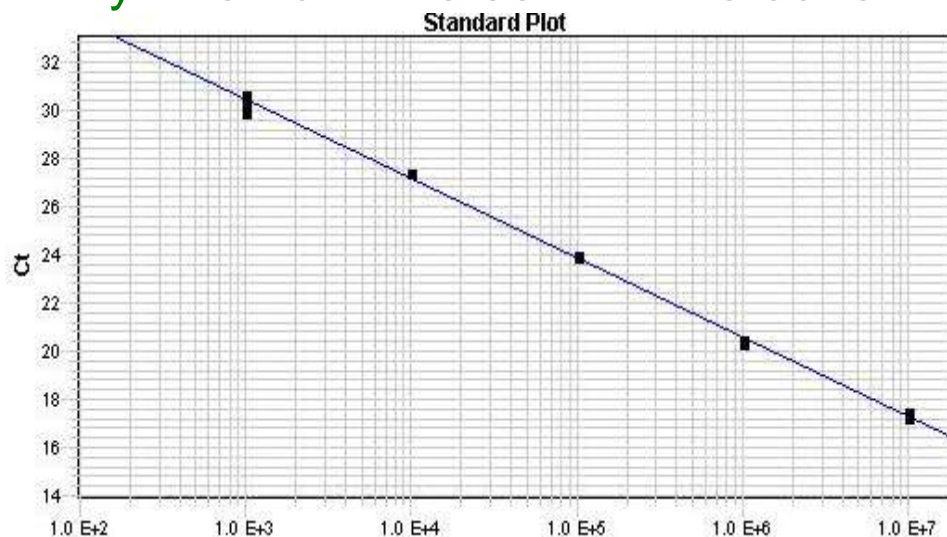
实验数据

Sample	copies/ml	Ct1	Ct2	Mean Ct	STD
标准品	5×10^3	28.18	28.64	28.41	0.16
标准品	5×10^4	25.25	25.14	25.19	0.04
标准品	5×10^5	22.11	22.46	22.28	0.12
标准品	5×10^6	18.63	18.92	18.77	0.10
未知样品	?	20.56	20.45	20.5	0.05
空白对照		None	None		

绝对定量实验例——乙肝病人血液中HBV的绝对定量

标准曲线制作：利用Mean Ct 作图可得到标准曲线

$$y = -3.29x + 40.33 \quad R^2 = 0.9978$$



扩增效率 (E) 计算

$$E = 10^{-1/\text{斜率}} - 1$$

$$= 10^{-1/-3.29} - 1$$

$$= 2.01 - 1$$

$$= 1.01$$

相关系数 (R^2)：大于0.98，越接近1，结果可信度越高。

扩增效率 (E)：0.9-1.2，越接近1，越理想。

绝对定量实验例——乙肝病人血液中HBV的绝对定量

未知样品拷贝数的计算

将Ct值带入线性方程：

$$20.5 = -3.29 X + 40.33$$

$$X = \frac{20.5 - 40.33}{-3.29} = 6.03$$

$$\begin{aligned} \text{QuantityUnknown} &= 10^{6.03} \\ &= 1,071,519 \text{ copies} \end{aligned}$$

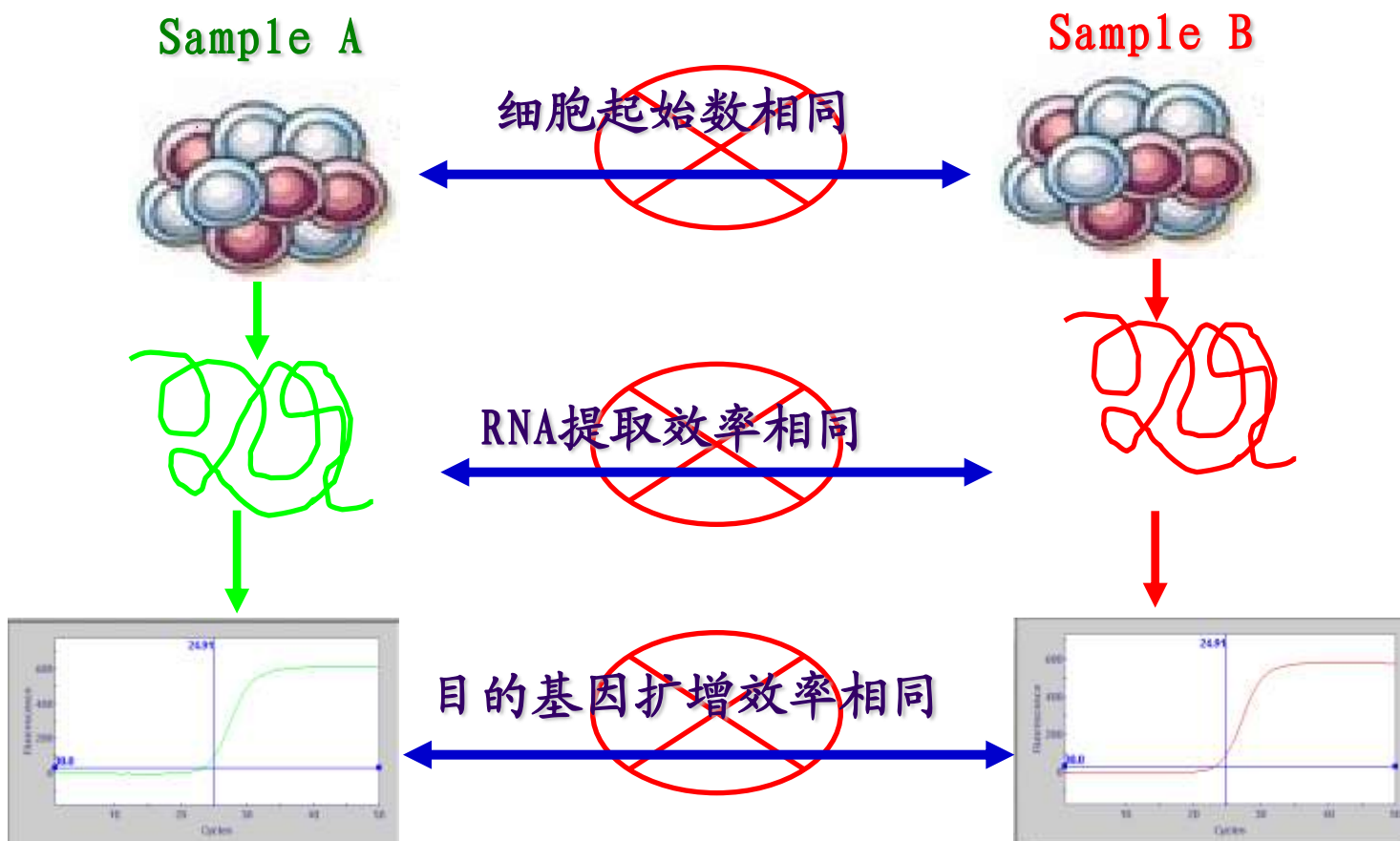




相对定量解析方法

相对定量的必要性

实际目的基因表达量分析



必须用内对照基因（管家基因）进行校正，进行相对表达量分析。

相对定量分析——管家基因筛选

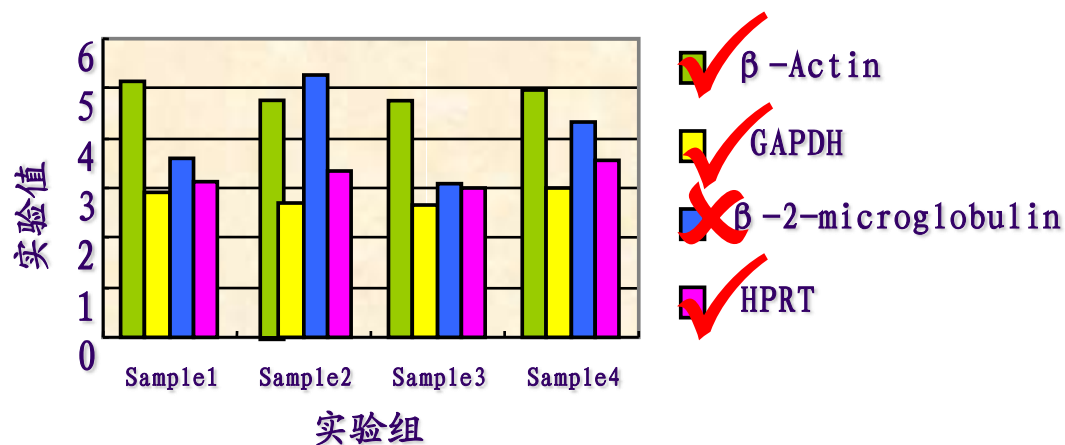
管家基因

维持细胞基本代谢活动所必须的基因，

如：GAPDH、Actin、18S rRNA等

筛选方法

- 根据文献提供
- 通过具体实验筛选



相对定量分析——两种常用的分析方法

- 双标准曲线法
- $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法 (CT值比较法)

相对定量分析——双标准曲线法

通过标准曲线对对照样品、待测样品的目的基因及管家基因进行定量，然后根据计算公式求得相对值即为相对表达量。

公式：

$$\text{校正值} = \frac{\text{目的基因定量结果}}{\text{管家基因定量结果}}$$

$$\text{相对值} = \frac{\text{待测样品的校正值}}{\text{对照样品的校正值}}$$

相对定量分析——双标准曲线法

实验数据

检测样品	管家基因H	目的基因X		
	定量结果	定量结果	校正值	相对量
对照样品	6391.5	343.4	0.0537	1.000
待测样品1	8589.7	17.3	0.0020	0.037
待测样品2	7432.9	1946.1	0.2618	4.874

优点：分析简单，实验优化相对简单

缺点：对每一个基因，每一轮实验都必需做标准曲线

应用：基因表达调控研究中最常用与公认的两种相对定量方法之一

相对定量分析—— $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法

公式：

$$F = 2^{\left\{ \left[\frac{\text{待测组目的基因}}{\text{平均Ct值}} - \frac{\text{待测组管家基因}}{\text{平均Ct值}} \right] - \left[\frac{\text{对照组目的基因}}{\text{平均Ct值}} - \frac{\text{对照组管家基因}}{\text{平均Ct值}} \right] \right\}}$$

优点：无需作标准曲线

缺点：假定扩增效率接近 **100 %**； 假定标准曲线及每次扩增之际间的效率都保持一致；

应用：基因表达调控研究中最常用与公认的两种相对定量方法之一

相对定量分析—— $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法

实验数据:

Sample	Jun(MeanCt)	GAPDH(MeanCt)	E
处理前	18	17	0.95
处理后	16	17.4	0.95

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法: 假设目的基因和参照基因扩增效率都接近100%

$$\Delta Ct(\text{处理前}) = 18 - 17 = 1 \quad \Delta Ct(\text{处理后}) = 16 - 17.4 = -1.4$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{处理后}) - \Delta Ct(\text{处理前}) = -1.4 - 1 = -2.4$$

$$\text{比率}_{(\text{处理后/处理前})} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(-2.4)} = 5.3$$

所以Jun基因在处理后表达水平是处理前的5.3倍

修正方法: 如果我们知道目标基因和参照基因有相同的扩增效率, 但扩增效率不等于1, 那么

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 可以修正为: $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$, 例如扩增效率为0.95, 那么计算公式可修正为
 $1.95^{-\Delta\Delta Ct}$

荧光定量PCR文献分析

TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO.,LTD

经典文献

The Plant Cell, Vol. 21: 1495–1511, May 2009, www.plantcell.org © 2009 American Society of Plant Biologists

***Arabidopsis* ASA1 Is Important for Jasmonate-Mediated Regulation of Auxin Biosynthesis and Transport during Lateral Root Formation**

Jiaqiang Sun,^{a,b} Yingxiu Xu,^{a,c} Songqing Ye,^d Hongling Jiang,^a Qian Chen,^{a,b,c} Fang Liu,^{a,b,c} Wenkun Zhou,^{a,c} Rong Chen,^{a,b,c} Xugang Li,^{b,e} Olaf Tietz,^{b,e} Xiaoyan Wu,^a Jerry D. Cohen,^d Klaus Palme,^{b,e} and Chuanyou Li^{a,b,1}

^a State Key Laboratory of Plant Genomics, National Centre for Plant Gene Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

^b Chinese-German Joint Group for Plant Hormone Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

刊物: PLANT CELL (植物细胞) (9.865)

单位: 中科院遗传所植物基因组国家重点实验室&弗莱堡大学&明尼苏达大学

经典文献

Journal of Experimental Botany, Page 1 of 12
doi:10.1093/jxb/erp223



RESEARCH PAPER

Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*

Xiaoyi Shan^{1,*}, Yongsheng Zhang^{1,*}, Wen Peng¹, Zhilong Wang² and Daoxin Xie^{1,†}

¹ MOE Key Centre of Bioinformatics, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

² Temasek Life Science Laboratory, National University of Singapore, 117604, Republic of Singapore

刊物: *Journal of Experimental Botany* (实验植物学杂志) (4.125)

单位: 清华大学&新加坡国立大学

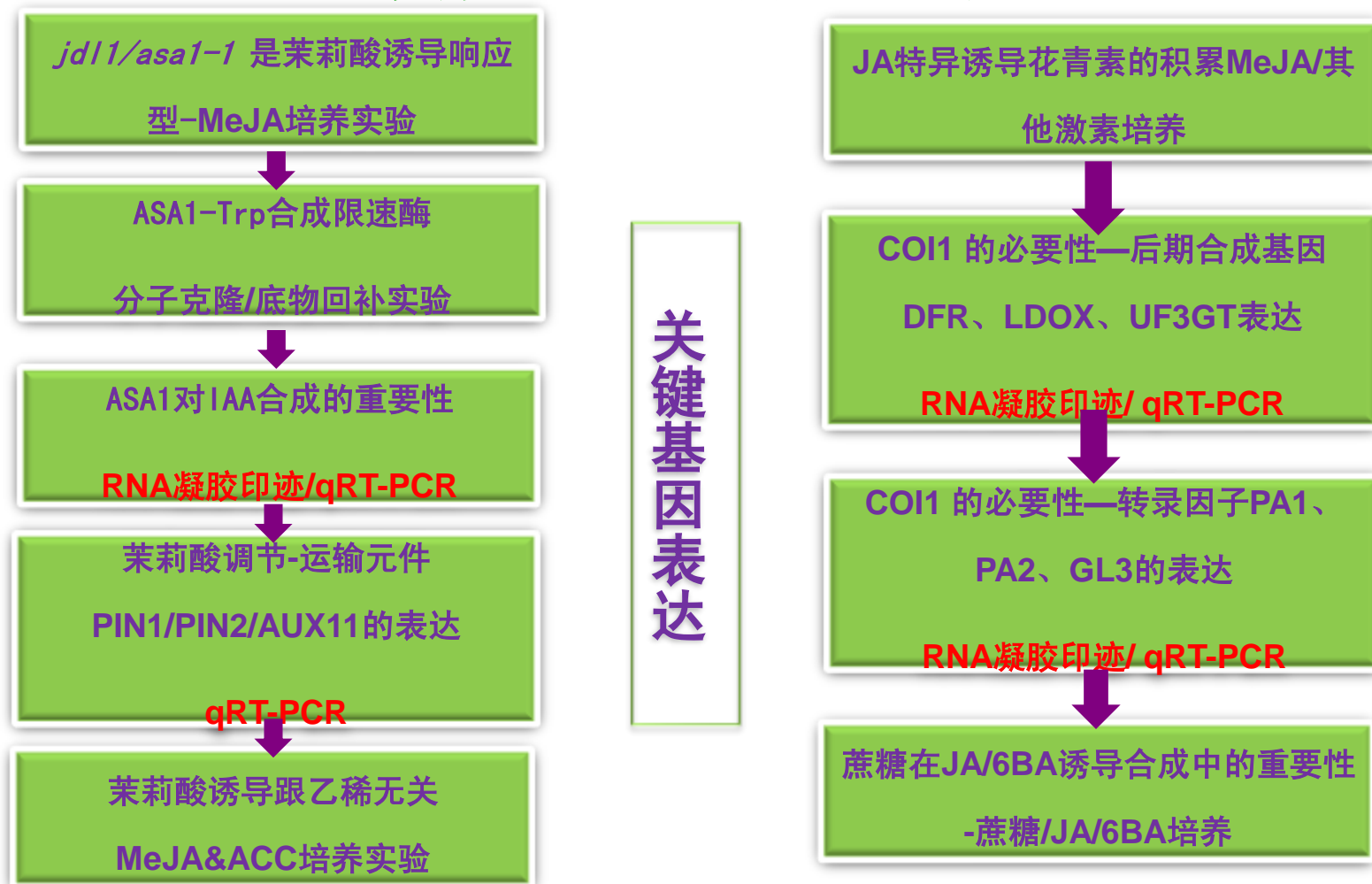
研究内容

Paper1: 通过拟南芥突变株(*jdl1/asa1-1*)分析了茉莉酸和植物激素的相互作用来调节拟南芥的侧根形成, *ASA1*基因在茉莉酸介导的植物激素生物合成和运输调节中的重要性。

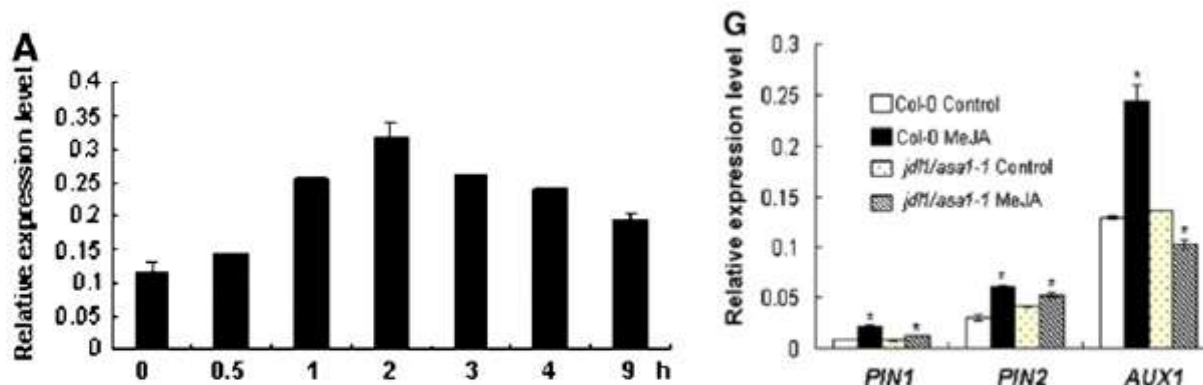
Paper2: 通过分子学和生理学的方法分析了拟南芥中茉莉酸诱导的花青素积累的分子机制, 表明其主要是通过调节转录因子PAP1、PAP2、GL3的表达, 进而调节花青素后期合成基因DFR、LDOX、UF3GT的表达, 最终调节了拟南芥中茉莉酸诱导的花青素的生物合成。

共同点:信号诱导的植物生长发育的分子机制

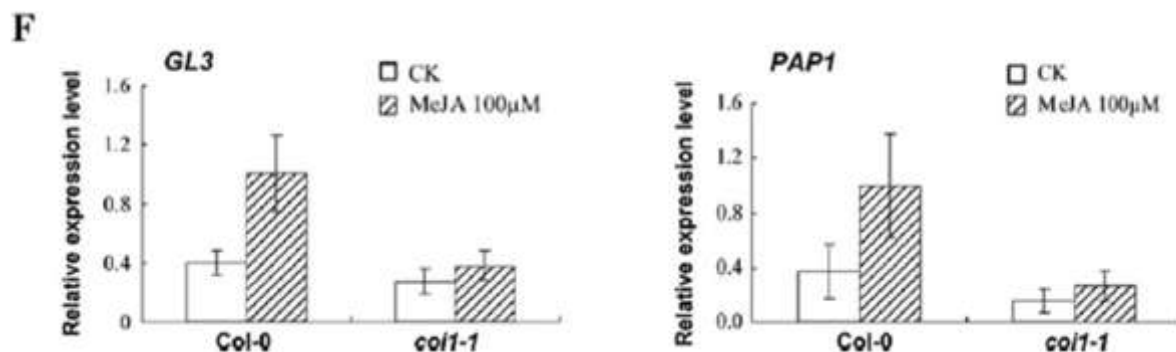
实验思路和技术方法



定量结果



➤ **Paper1:** 茉莉酸处理提高ASA1的表达；调节了运输元件的表达



➤ **Paper2:** 转录因子GL3、PAP1明显受MeJA诱导且依赖于COI1

内容概要

 荧光定量PCR的原理及标记方法

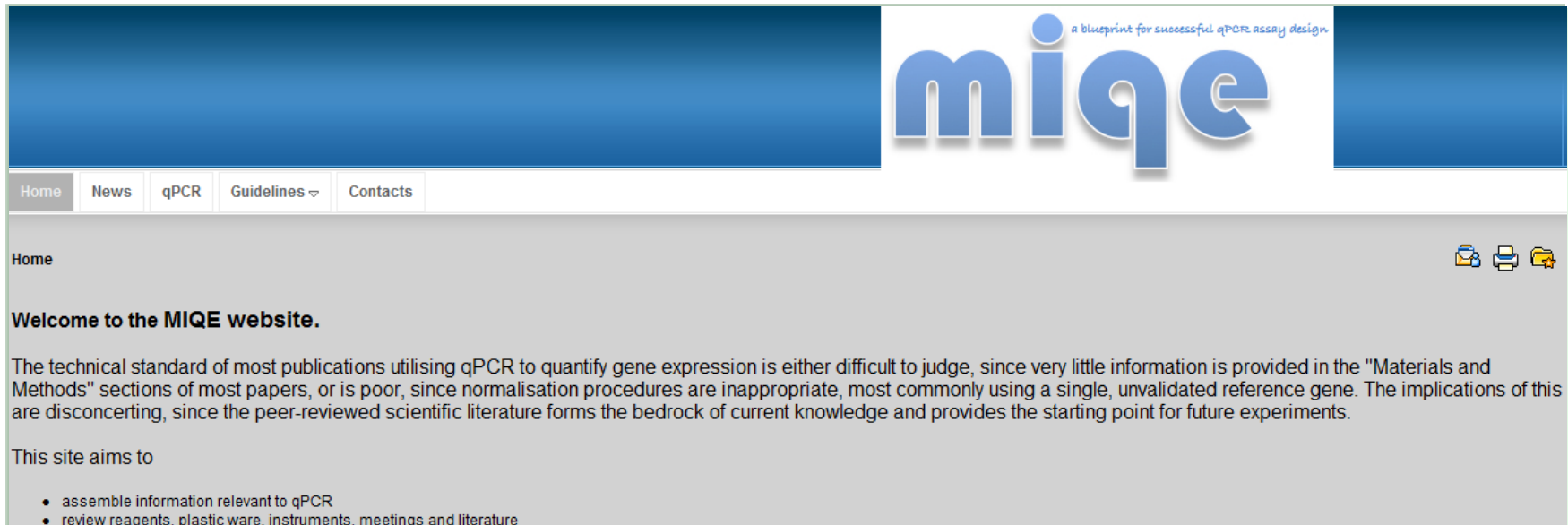
 荧光定量PCR数据计算方法

 荧光定量PCR文献解读

 MIQE标准及实验常见问题分析

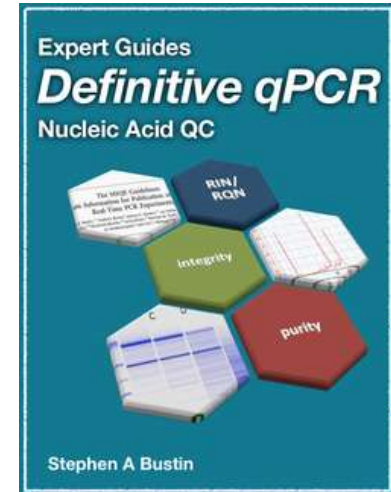
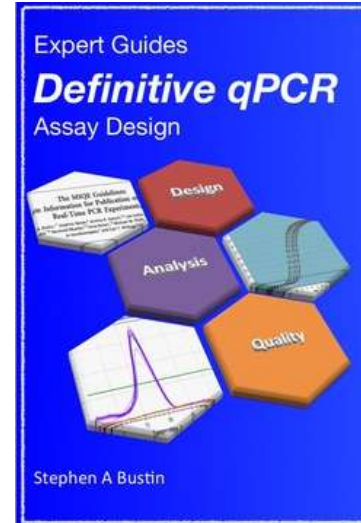
 定量PCR引物设计技巧

荧光定量PCR的国际化标准——MIQE

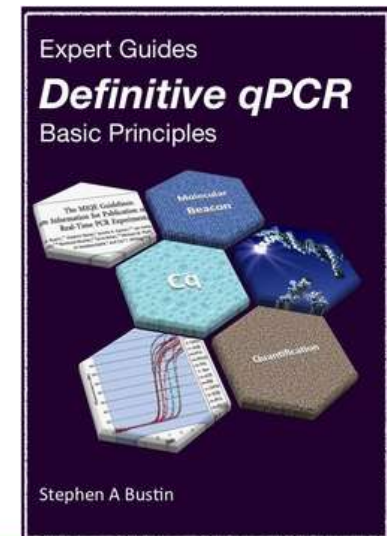


Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time

PCR Experiments <http://miqe.info/>



Stephen Bustin BA(Mod) PhD (TCD) FSB
Professor of Molecular Science
Queen Mary University of London



MIQE

[Home](#)[News](#)[Data Standard](#)[Development](#)[MIQE](#)[Tools](#)[Consortium](#)

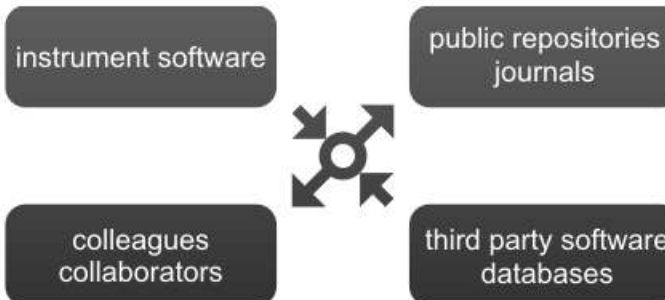
Real-time PCR Data Markup Language

Tools

Create RDML file
Validate RDML file
Browse libraries

Join or support

The Real-time PCR Data Markup Language (RDML) is a structured and universal data standard for exchanging quantitative PCR (qPCR) data. The data standard should contain sufficient information to understand the experimental setup, re-analyse the data and interpret the results. The data standard is a compressed text file in Extensible Markup Language (XML) and enables transparent exchange of annotated qPCR data between instrument software and third-party data analysis packages, between colleagues and collaborators, and between authors, peer reviewers, journals and readers. To support the public acceptance of this standard, both an on-line RDML file generator is available for end users, as well as RDML software libraries to be used by software developers, enabling import and export of RDML data files.



生命科学与生物医学的国际化标准——MIBBI

The Minimum Information for Biological and Biomedical Investigations



-  Portal
-  Foundry
-  MICheckout
-  MIBBI Search
-  MIBBI News
-  Discussion
-  Related
-  About

Project News Highlights

- The report on the last [MIBBI workshop](#) is [available free](#) from the journal [Standards in Genomic Sciences](#).
- MIBBI has a new **funding stream** as part of the [BioSharing](#) network, supported by BBSRC and NERC funds to the [ISA project](#).
- MIBBI Portal use recommended by **BMC journals** ([example](#)) and **OMICS** ([editorial](#))
- **Free download:** [The MIBBI paper \(Nature Biotechnology\)](#) & [supplementary information \(additional figures\)](#)

Site Navigation



[The MIBBI Portal](#)

Access to Minimum Information guidelines from diverse bioscience communities



[MICheckout](#)

Compile made-to-measure checklists in a variety of formats, or just for display.



[The MIBBI Foundry](#)

Towards the next generation of MI guidelines for the biosciences



[MIBBI search](#)

A Google™ Custom Search Engine covering a range of relevant web sites.

荧光定量PCR的国际化标准——MIQE

Clinical Chemistry 55:4
000–000 (2009)

Reviews

The MIQE Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Helleman,⁵ Jim Huggett,⁶
Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹²
Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}

荧光定量PCR的国际化标准——MIQE

规范
目的

鼓励好的实验操作

值得信赖的实验结果

科学文献的完整性和可靠性

实验室之间结果的一致性

增加实验的透明度

规范实验仪器、耗材及试剂

荧光定量PCR的国际化标准——MIQE

规范
内容

概念&术语

研究&临床应用

样本的采集、处理和制备

核酸的质量控制

反转录

qPCR&数据分析

荧光定量PCR的国际化标准——MIQE

ITEM TO CHECK	IMPORTANCE	CHECKLIST
EXPERIMENTAL DESIGN		
Definition of experimental and control groups	E	
Number within each group	E	
Assay carried out by core lab or investigator's lab?	D	
Acknowledgement of authors' contributions	D	
SAMPLE		
Description	E	
Volume/mass of sample processed	D	
Microdissection or macrodissection	E	
Processing procedure	E	
If frozen - how and how quickly?	E	
If fixed - with what, how quickly?	E	
Sample storage conditions and duration (especially for FFPE samples)	E	
NUCLEIC ACID EXTRACTION		
Procedure and/or instrumentation	E	
Name of kit and details of any modifications	E	
Source of additional reagents used	D	
Details of DNase or RNase treatment	E	
Contamination assessment (DNA or RNA)	E	
Nucleic acid quantification	E	
Instrument and method	E	
Purity (A260/A280)	D	
Yield	D	
RNA integrity method/instrument	E	

Table 1. MIQE checklist for authors, reviewers, and editors.^a

Item to check	Importance	Item to check	Importance
Experimental design		qPCR oligonucleotides	
Definition of experimental and control groups	E	Primer sequences	E
Number within each group	E	RTPrimerDB identification number	D
Assay carried out by the core or investigator's laboratory?	D	Probe sequences	D ^d
Acknowledgment of authors' contributions	D	Location and identity of any modifications	E
Sample		Manufacturer of oligonucleotides	D
Description	E	Purification method	D
Volume/mass of sample processed	D	qPCR protocol	
Microdissection or macrodissection	E	Complete reaction conditions	E
Processing procedure	E	Reaction volume and amount of cDNA/DNA	E
If frozen, how and how quickly?	E	Primer, (probe), Mg ²⁺ , and dNTP concentrations	E
If fixed, with what and how quickly?	E	Polymerase identity and concentration	E
Sample storage conditions and duration (especially for FFPE ^b samples)	E	Buffer/kit identity and manufacturer	E
Nucleic acid extraction		Exact chemical composition of the buffer	D
Procedure and/or instrumentation	E	Additives (SYBR Green I, DMSO, and so forth)	E
Name of kit and details of any modifications	E	Manufacturer of plates/tubes and catalog number	D
Source of additional reagents used	D	Complete thermocycling parameters	E
Details of DNase or RNase treatment	E	Reaction setup (manual/robotic)	D
Contamination assessment (DNA or RNA)	E	Manufacturer of qPCR instrument	E
Nucleic acid quantification	E	qPCR validation	
Instrument and method	E	Evidence of optimization (from gradients)	D
Purity (A_{260}/A_{280})	D	Specificity (gel, sequence, melt, or digest)	E
Yield	D	For SYBR Green I, C_q of the NTC	E
RNA integrity: method/instrument	E	Calibration curves with slope and y intercept	E
RIN/RQI or C_q of 3' and 5' transcripts	E	PCR efficiency calculated from slope	E
Electrophoresis traces	D	CI _s for PCR efficiency or SE	D
Inhibition testing (C_q dilutions, spike, or other)	E	r^2 of calibration curve	E
Reverse transcription		Linear dynamic range	E
Complete reaction conditions	E	C_q variation at LOD	E
Amount of RNA and reaction volume	E	CI _s throughout range	D
Priming oligonucleotide (if using GSP) and concentration	E	Evidence for LOD	E
Reverse transcriptase and concentration	E	If multiplex, efficiency and LOD of each assay	E
Temperature and time	E	Data analysis	
Manufacturer of reagents and catalogue numbers	D	qPCR analysis program (source, version)	E

C _q s with and without reverse transcription	D ^c	Method of C _q determination	E
Storage conditions of cDNA	D	Outlier identification and disposition	E
qPCR target information		Results for NTCs	E
Gene symbol	E	Justification of number and choice of reference genes	E
Sequence accession number	E	Description of normalization method	E
Location of amplicon	D	Number and concordance of biological replicates	D
Amplicon length	E	Number and stage (reverse transcription or qPCR) of technical replicates	E
In silico specificity screen (BLAST, and so on)	E	Repeatability (intraassay variation)	E
Pseudogenes, retropseudogenes, or other homologs?	D	Reproducibility (interassay variation, CV)	D
Sequence alignment	D	Power analysis	D
Secondary structure analysis of amplicon	D	Statistical methods for results significance	E
Location of each primer by exon or intron (if applicable)	E	Software (source, version)	E
What splice variants are targeted?	E	C _q or raw data submission with RDML	D

^a All essential information (E) must be submitted with the manuscript. Desirable information (D) should be submitted if available. If primers are from RTPrimerDB, information on qPCR target, oligonucleotides, protocols, and validation is available from that source.

^b FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded; RIN, RNA integrity number; RQI, RNA quality indicator; GSP, gene-specific priming; dNTP, deoxynucleoside triphosphate.

^c Assessing the absence of DNA with a no-reverse transcription assay is essential when first extracting RNA. Once the sample has been validated as rDNA free, inclusion of a no-reverse transcription control is desirable but no longer essential.

^d Disclosure of the probe sequence is highly desirable and strongly encouraged; however, because not all vendors of commercial predesigned assays provide this information, it cannot be an essential requirement. Use of such assays is discouraged.

样品制备



Absolute RNA® Purification Kits
Absolute RNA® FFPE Kit (石蜡包埋样品)
miRACLE miRNA Isolation Kit (miRNA提取)
SideStep® QPCR MasterMix Kit (无需RNA提取)

样品质控



2100 生物分析仪 (RNA国际质控的金标准)

cDNA 合成



AffinityScript™ QPCR cDNA Synthesis Kit and
QRT-PCR MasterMix (包含高保真反转录酶)

RNA 参照标准品



Stratagene® QPCR Reference Total RNA
Alien® Inhibitor Alert
Universal Human mRNA Reference RNA

QPCR 扩增



Brilliant® II QPCR and QRT-PCR Reagent
High-specificity miRNA QRT-PCR Detection Kit

QPCR 检测与分析



Mx3005P® QPCR 仪
Mx3000P® QPCR 仪
MxPro® QPCR 数据分析软件

荧光定量PCR的国际化标准——MIQE

基因检索编号

引物探针序列

TM值

NRT
NTC

模板量

反应条件和程序

CT值

slop

荧光定量PCR反应有效性的确认

线性关系、扩增效率确认

相关系数 (R^2) : 大于0.98

标准曲线斜率: -3 ~ -3.5

PCR扩增效率 (E) : 0.9-1.2

检测灵敏度确认

35Cycles内可得到好的定量结果 (科研领域)

如果采用SYBR检测方法, 30Cycles内无非特异性产物扩

增
35 Cycles内无引物二聚体产生



MIQE qPCR

版本: 1.2

类别: 参考

大小: 7.2 MB

更新时间: 2011-12-08

开发商: Philippe Choquet

固件要求: 与 iPhone、iPod touch、iPad 兼容。需要 iOS 4.0 或更高版本

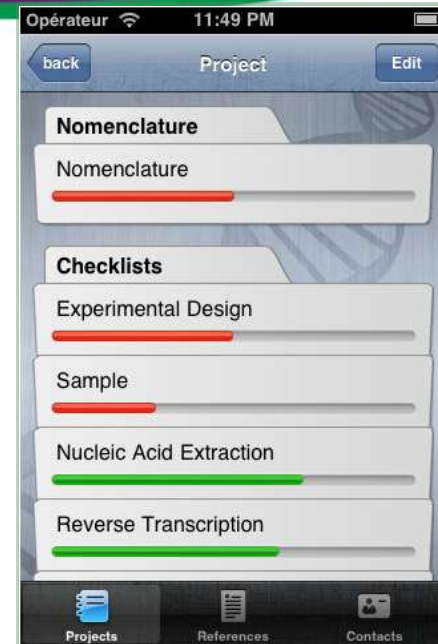
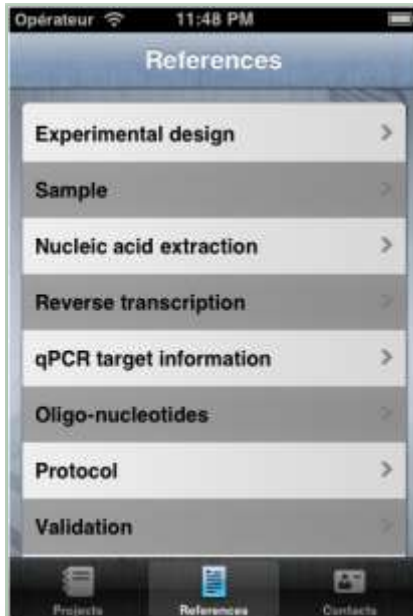


[如何使用同步推安装](#)



官方下载正版

价格: 免费



APP for cell-phone



Real-time PCR and Next Generation Sequencing
Changing the world of molecular diagnostics
and molecular research

November 13th-16th, 2012 - Daejeon, South Korea
SYMPOSIUM - EXHIBITION - WORKSHOPS

[Home](#)

NEWS

- Changed dates!
The qPCR symposium 2012 will be November 13th-16th
- The qPCR symposium 2012 will be November 6th-9th in Daejeon, South Korea

TATAA Biocenter, PhileKorea Technology and Select Biosciences proudly presents and welcomes you to the 1st International Genomics Research Asia

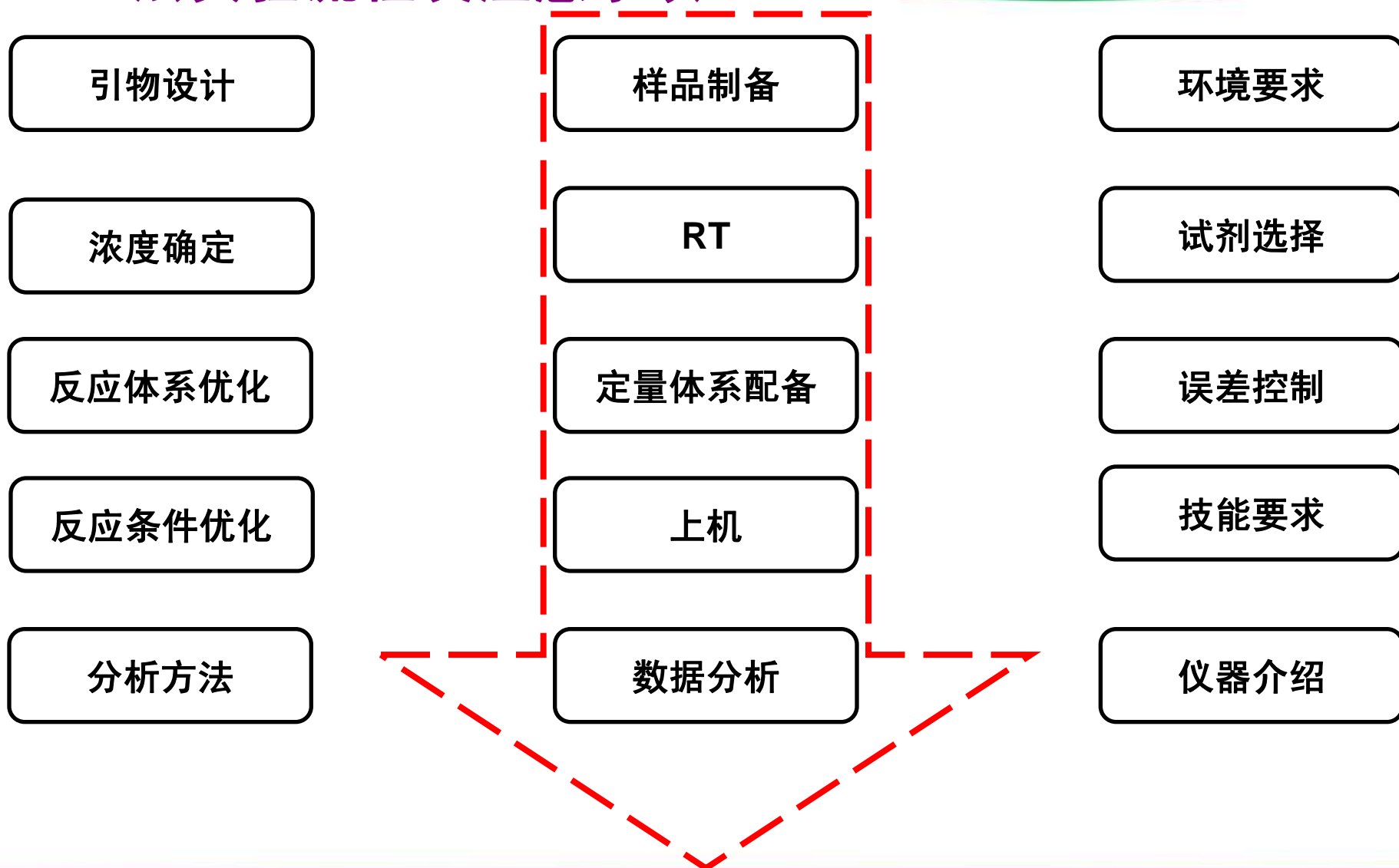


The conference will consist of two days with scientific sessions and industrial exhibition and also conference workshops. Besides interesting talks about the new developments in real-time qPCR and Next Generation Sequencing (NGS) research, special focus in this conference is:

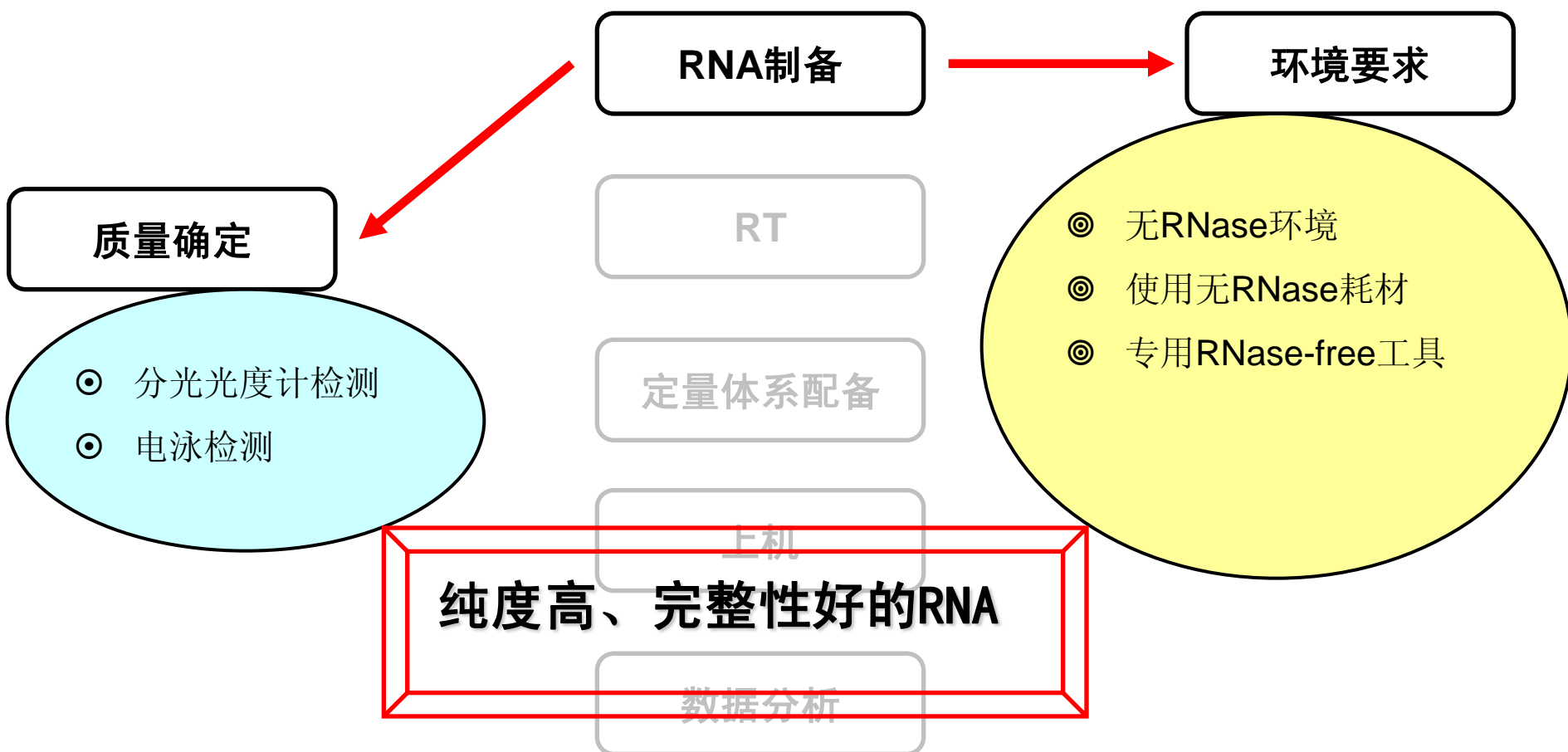
SPONSORS:



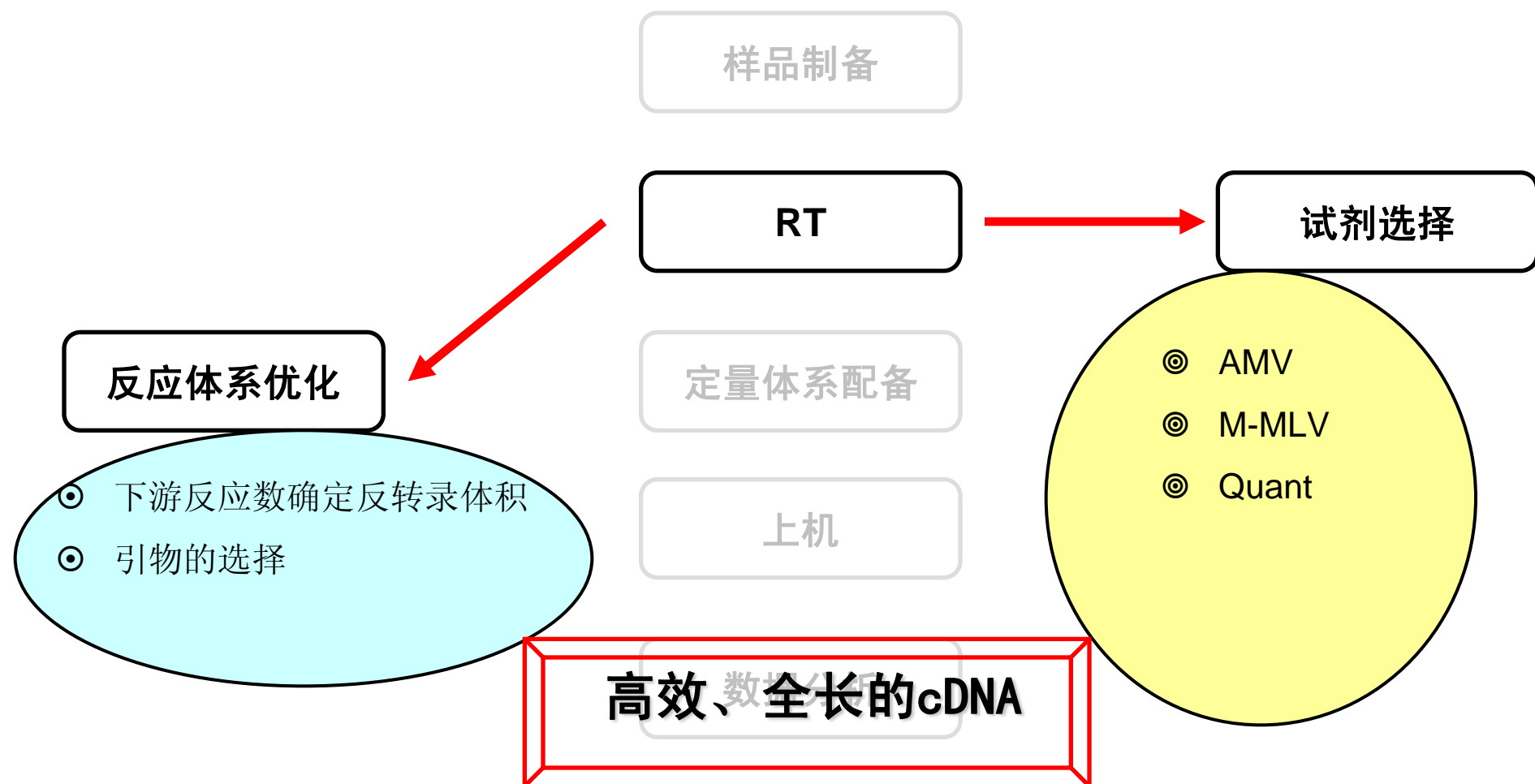
SYBR法实验流程及注意事项



SYBR法实验流程及注意事项



SYBR法实验流程及注意事项



引物设计

- ◎ GC%: 50—60%
- ◎ Tm: 50—65℃
- ◎ 单个碱基重复<4个
- ◎ 无二级结构
- ◎ 扩增长度: 100—200bp

浓度确定

- ◎ 制作标准曲线
- ◎ 设定浓度区间

定量体系配备

均一的反应液和模板混合物

环境要求

- ◎ 核酸制备区
- ◎ 反应液制备区

误差控制

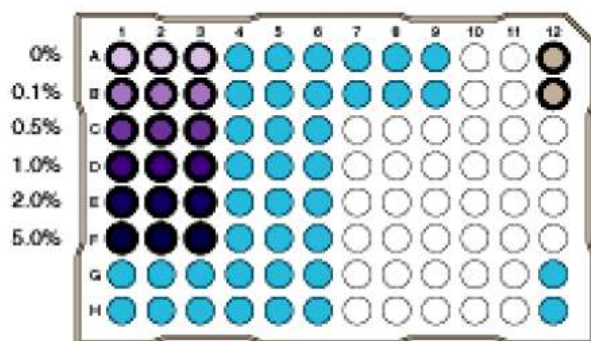
- ◎ 使用mix降低系统误差
- ◎ 设置重复 (≥3次)
- ◎ 设置空白和阴性对照

上机

数据分析

SYBR法实验流程及注意事项

标准品



待测样本

阳性对照

阴性对照

RT

模板准备

反应条件优化

反应体系优化

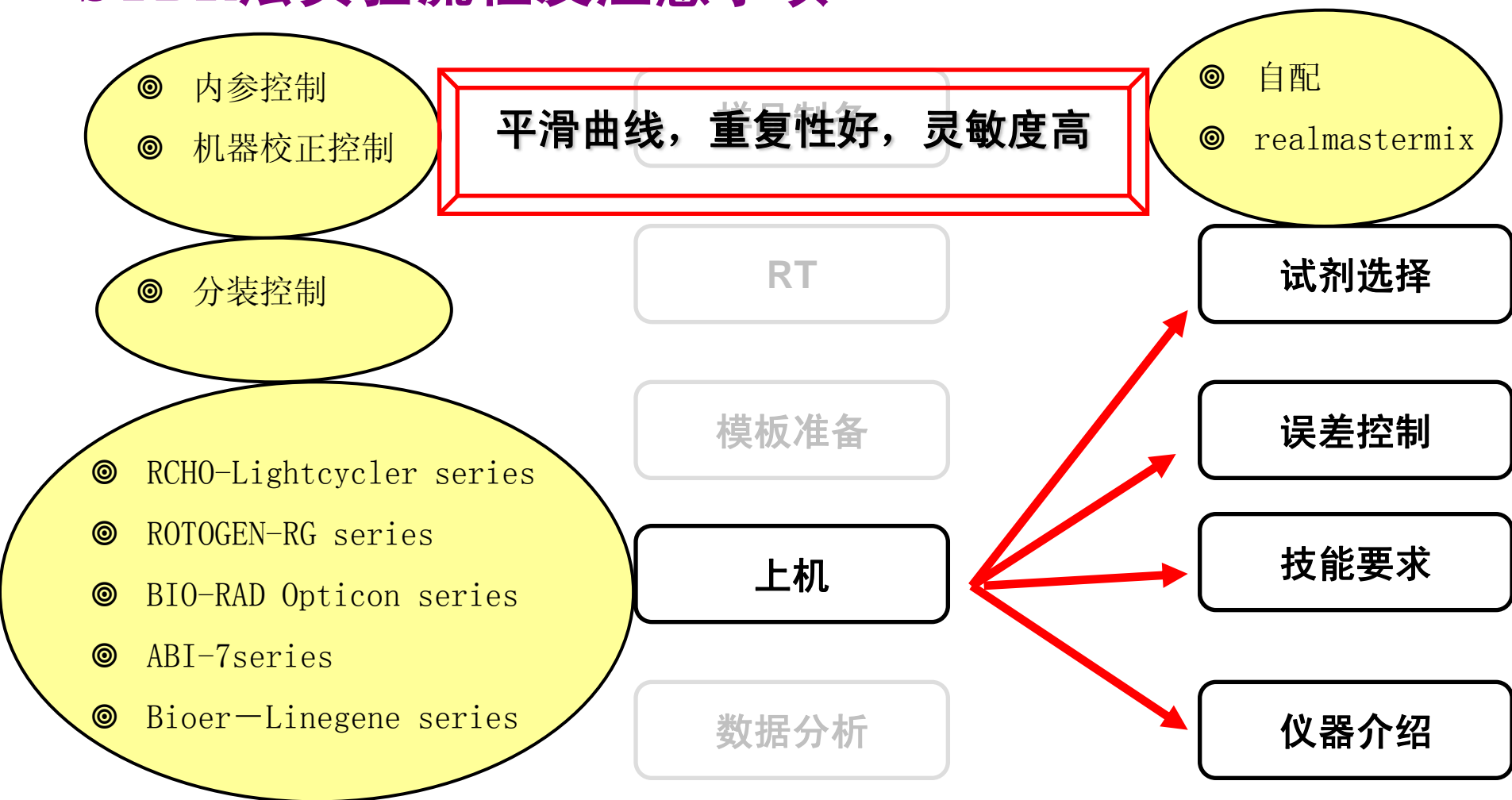
上机

数据分析

- ◎ 退火温度优化：梯度PCR
- ◎ 延伸时间：产物长度决定
- ◎ 反应体积 > 5ul，推荐20—50ul
- ◎ 引物浓度优化，模板量优化
- ◎ Mg²⁺调节，酶活调节

- ◎ 扩增效率：90%—110%
- ◎ 重复性：std < 0.2
- ◎ 标准曲线：R > 0.99 或 R² > 0.98

SYBR法实验流程及注意事项



ABI 7500



ABI StepOne



Roche Lightcycler 1.5



Roche Lightcycler 480



Cepheid SmartCycler



Stratagene Mx3005PTM



Mastercycler ep realplex 4



Bio-rad iQ5



Bio-rad MiniOpticon



杭州博日 LINE-GENE FQD-66A



Corbett Rotor-gene3000



Corbett Rotor-gene6000



SYBR法实验流程及注意事项

样品制备
可靠，准确的数据

RT

模板准备

上机

- ⊙ 相对定量： $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法
- ⊙ 绝对定量：标准曲线法



7500 : 5色检测

分析方法

数据分析

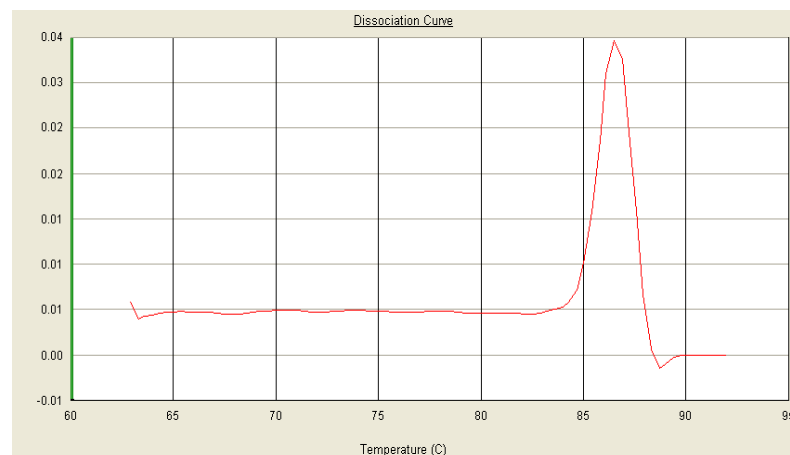
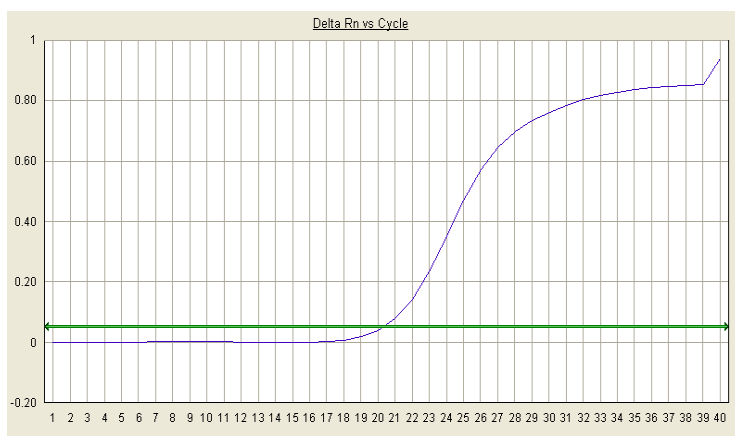
仪器介绍



荧光定量PCR实验调试

TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO.,LTD

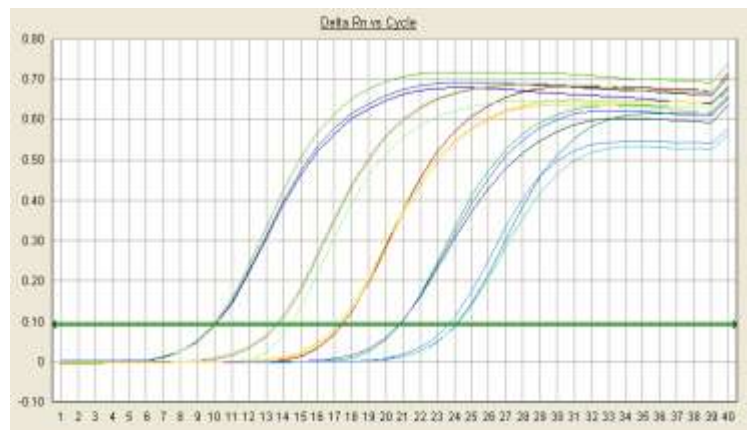
荧光定量结果分析-特异扩增



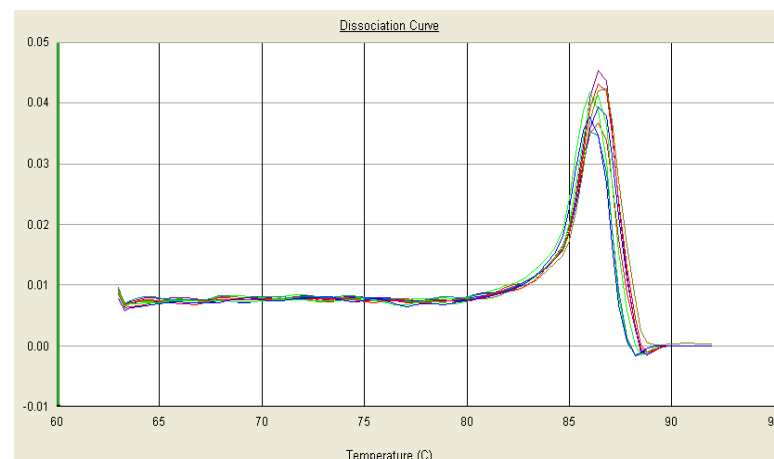
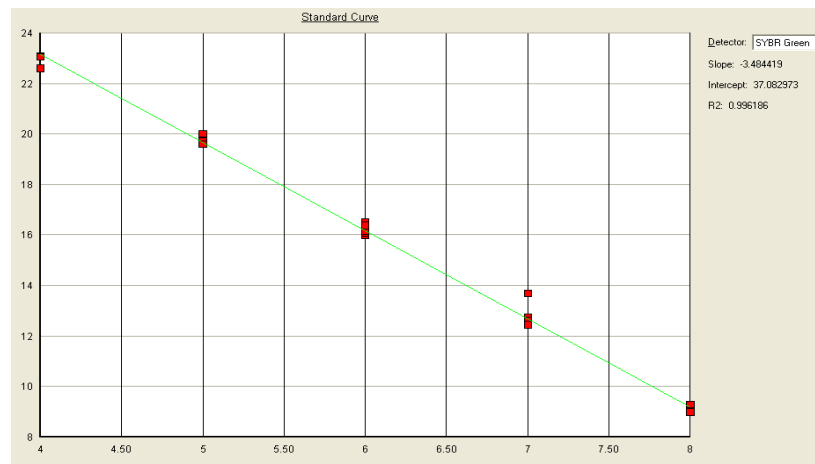
CT值20左右（建议调整到15—30之间★）

特异性扩增（单一峰★）

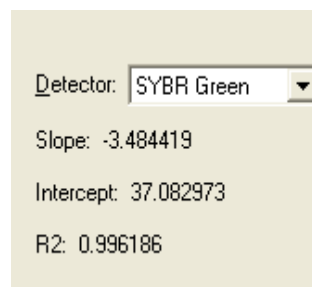
荧光定量结果分析—等比稀释



CT值跨度均一



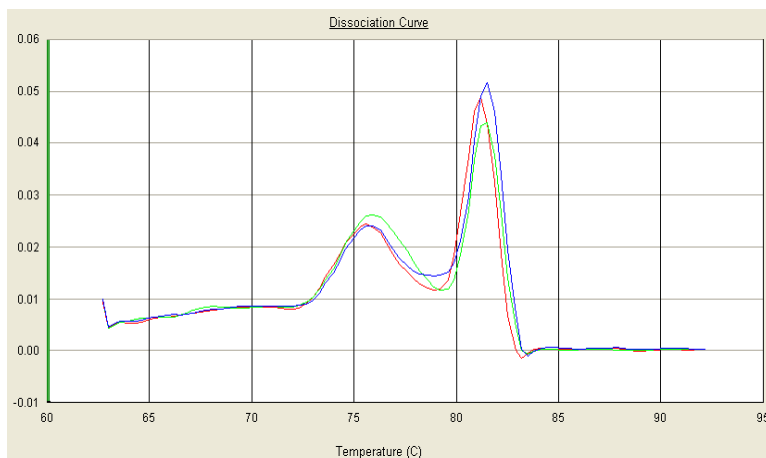
熔解曲线单一



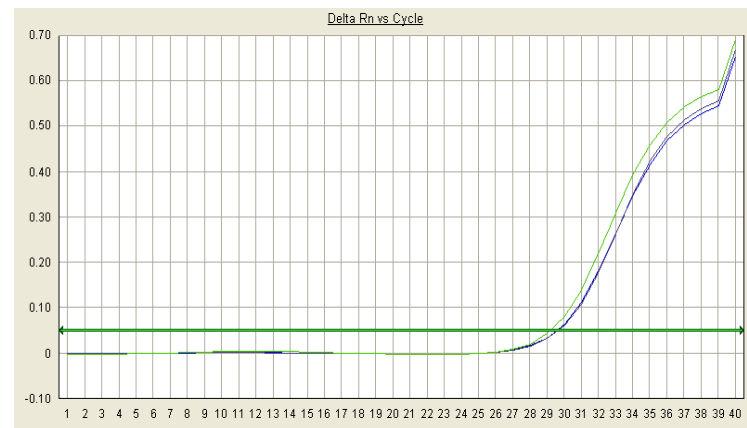
slope → 3.34 ★

R2 → 0.999 ★

荧光定量结果分析—案例分析

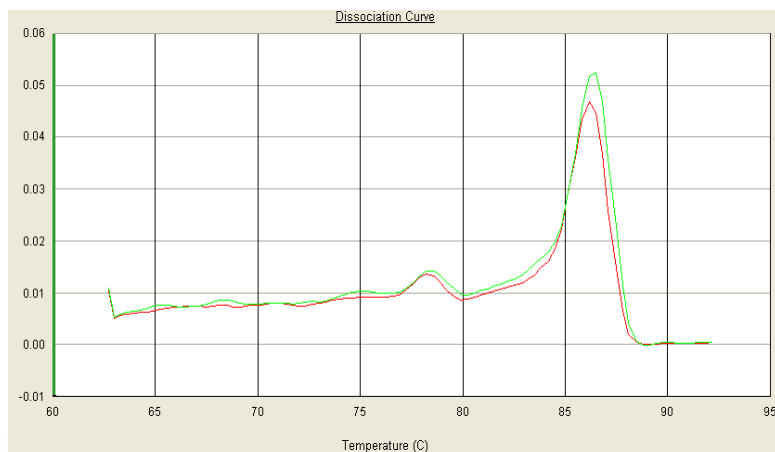


引物二聚体严重



CT值偏大，模板量较小（CT值 ≥ 30 ）

解决方案：调整加入模板量，使
CT值尽量落在15—30之间★



产物电泳结果与熔解曲线不完全一致的情况

➤ 产物电泳结果与熔解曲线不完全一致的情况是有出现的，一般分3种情况：

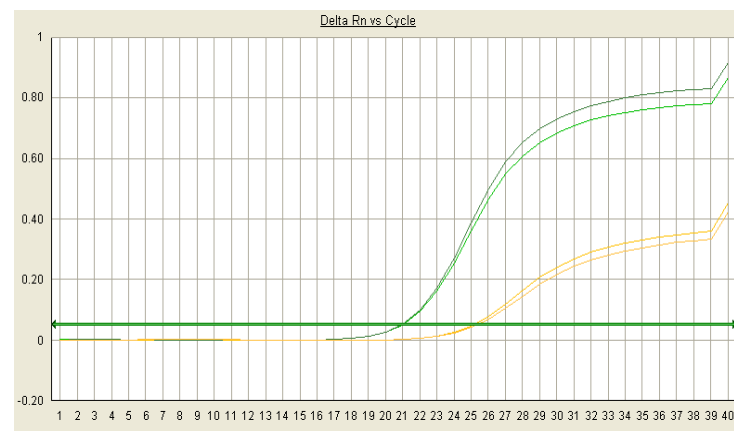
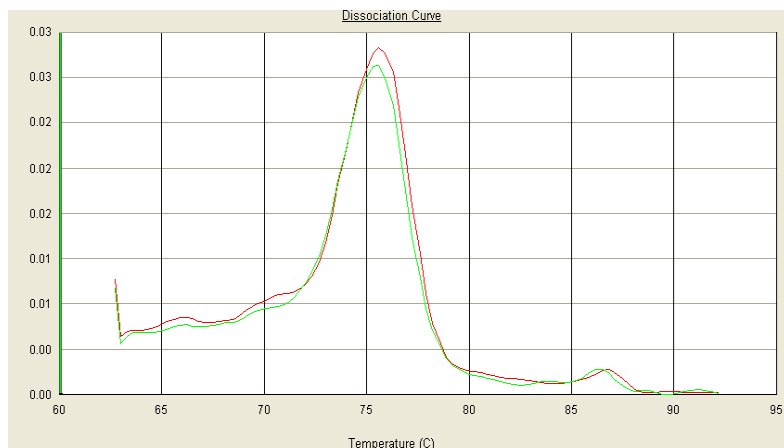
1.非特异条带TM值较低，在熔解曲线（大概60-95度范围）中不能体现，但是电泳能够看到在靠前的位置有小片段。由于其不计入荧光总量，这种情况不用在意。

2.非特异条带在胶中位置较大，成不规则状态，有可能是荧光染料与loading形成的复合物，在目的条带上面一点，所有泳道都会有。这种情况不用在意。

3.产物存在剪接变体，两种扩增片段TM值非常接近，在熔解曲线中不能区分，但长时间跑分辨率高的胶能够略微区分得开，但条带距离非常近。这种情况就需要具体考虑，剪接变体是否是在你实验设计时考虑的。

以上情况中1，2均不需要重新设计引物，因为对于实验数据收集没有造成影响，而且我们一般认为熔解曲线是比跑普通琼脂糖凝胶分辨率更高的。第三种可能需要你进行生物信息学分析。

荧光定量结果分析—案例分析

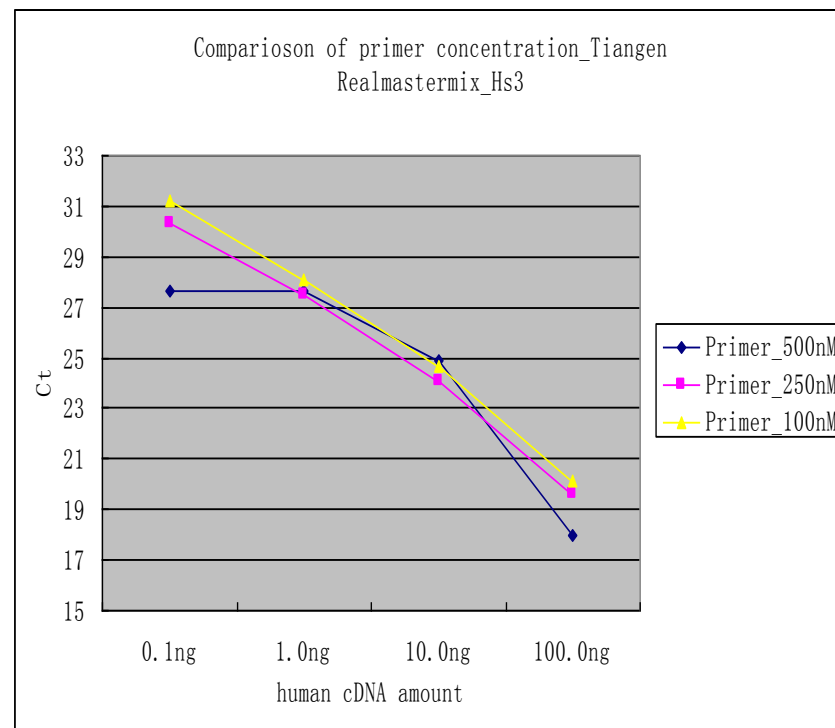
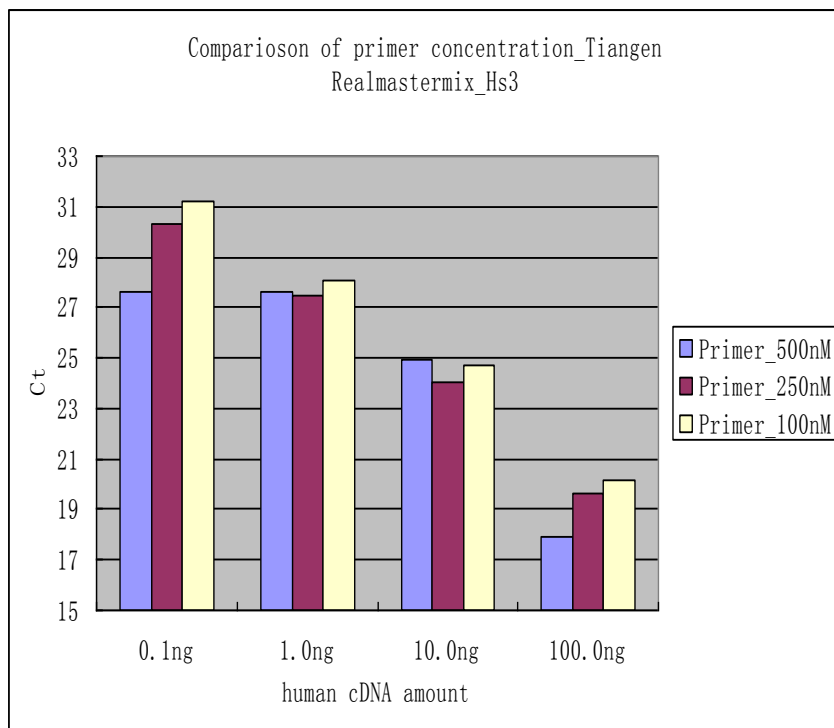


无特异性扩增，完全的引物二聚体

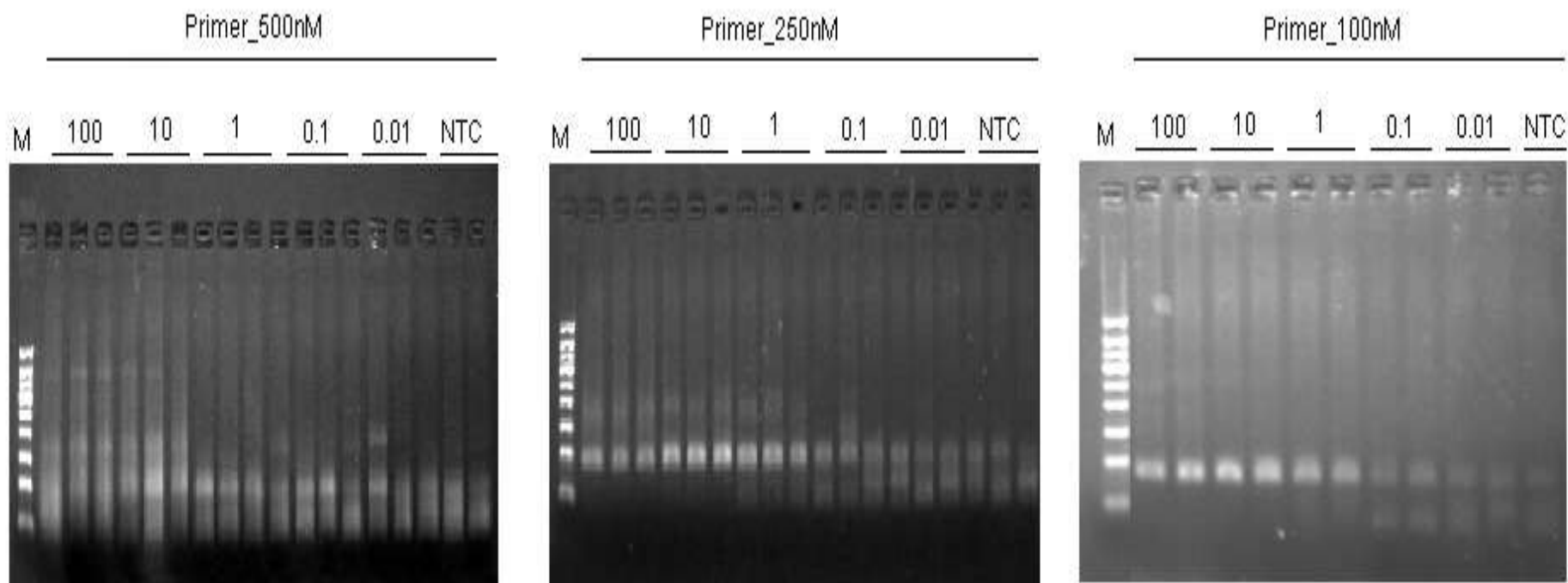
CT值在正常范围，但扩增曲线趋缓，荧光信号值相对偏低，能与目的片段扩增曲线区别

解决方案：PCR产物电泳检测有无目的条带★，以确定加入模板是否正确

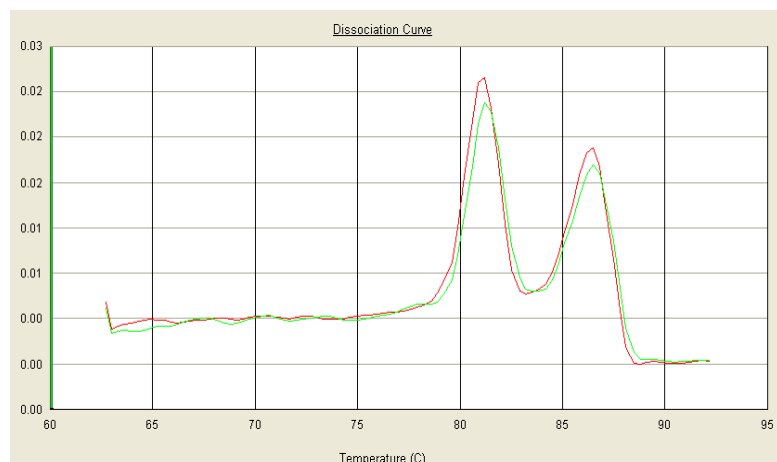
荧光定量结果分析一体系中引物终浓度的选择



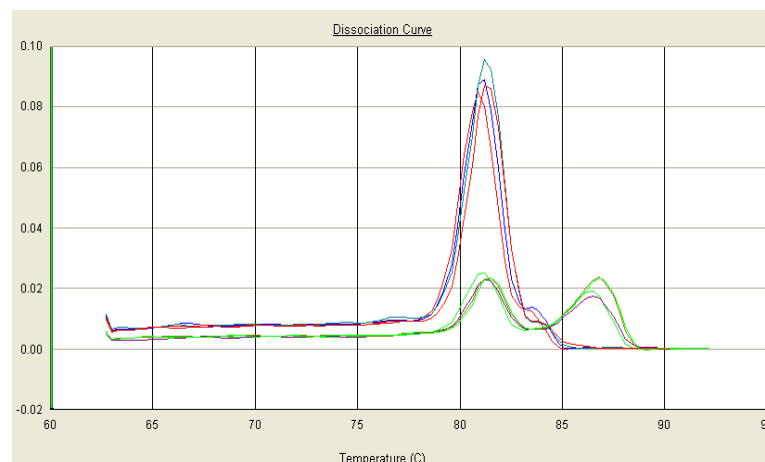
荧光定量结果分析一体系中引物终浓度的选择



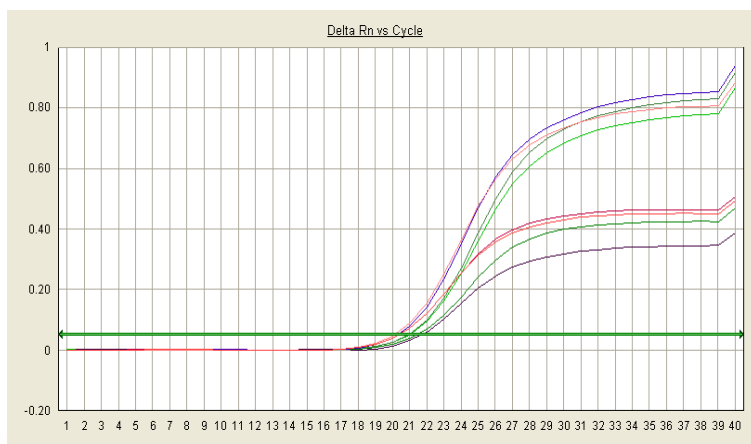
荧光定量结果分析—案例分析



做相对定量时，引物交叉污染导致的体系双扩增



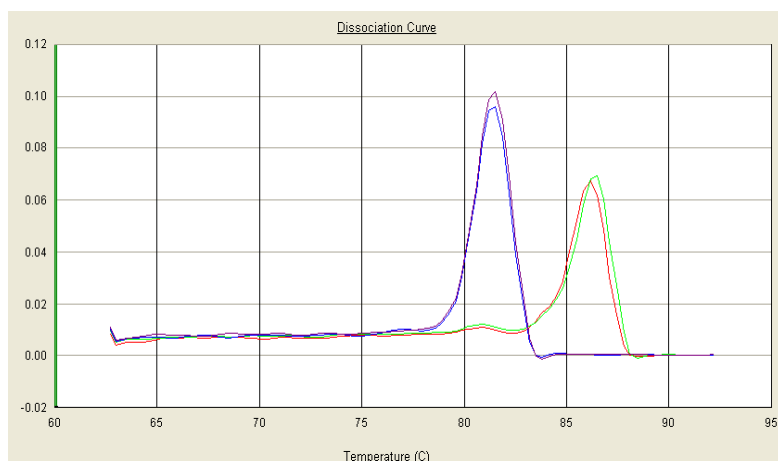
与单一扩增的熔解曲线比较



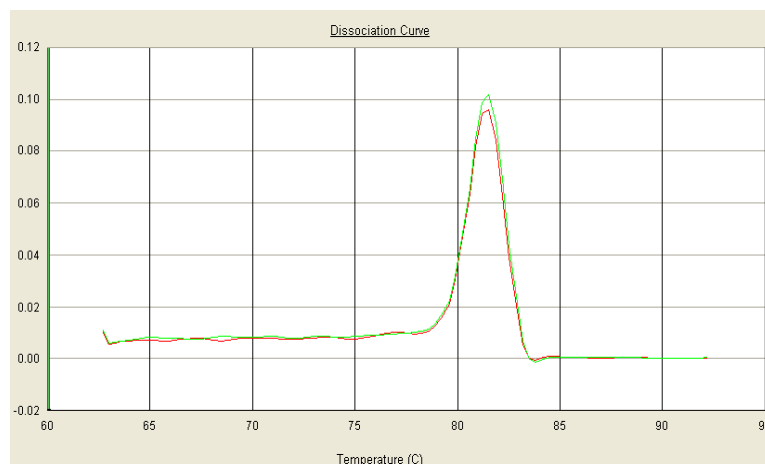
可能原因：引物交叉污染

解决方案：在超净台中，换用移液器分别加入引物，避免交叉污染★

荧光定量结果分析—案例分析

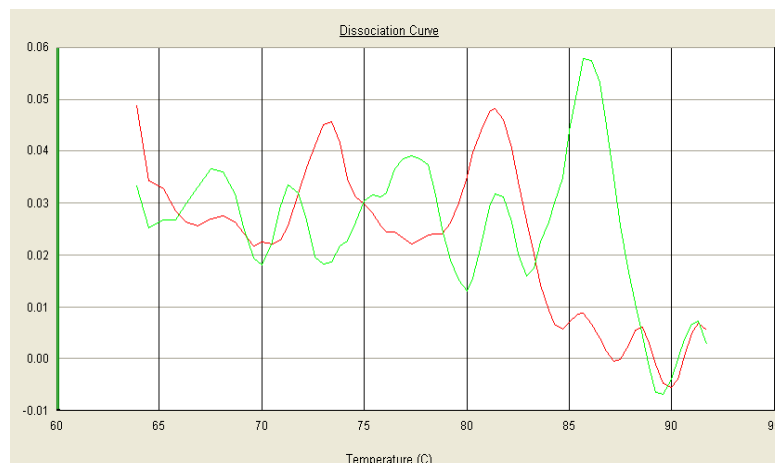


相对定量，正常熔解曲线



正常熔解曲线

荧光定量结果分析—案例分析



其他非正常熔解曲线

可能原因：反应体系污染、试剂失效；

耗材与仪器不匹配；

仪器长时间未做矫正；

解决方案：在无模板洁净区内配制体系；

避免将试剂暴露在强光或高温下；

做好阳性、阴性对照；

选用与仪器匹配的耗材； 定期请工

程师进行仪器校准★

荧光定量PCR引物设计

TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO.,LTD

引物设计原则

- 选择高度保守，碱基分布均匀的靶序列；
- 引物长度通常为20~25bp， T_m 值通常55~60℃并尽量保证上下游引物温度一致，G+C含量在40-60%之间，产物大小在50~250bp；
- 选用 $\Delta G_{3'}$ 端低，5'端和中间相对较高的引物；
- 引物3'端避免使用碱基A，引物3'端避免出现连续3个以上的相同碱基，且最后5个碱基中G和/或C碱基的总数不超过2个；
- 引物二聚体及发夹结构的能值不能过高（不超过4.5kcal/mol）。
- 为避免基因组扩增，引物设计最好能跨两个外显子

Taqman探针法——PCR体系的建立

1、引物、探针的设计原则：

探针 T_m 为68-70℃，<30 bp, 5'不能有G, G可能会淬灭荧光素，
引物尽量靠近探针，扩增片段<200 bp，引物 T_m 为59-60℃

2、反应参数的设定：

一般为：94℃，10-20S

60℃，30-60S（Taq酶5'→3'外切核酸酶活性在60℃最高），也可
通过温度梯度优化退火温度

3、优化引物和探针浓度：获得最小 C_t 值，最大信号/背景比值

引物浓度：100-900nM

探针浓度：50-300nM

4、其他与常规PCR相同

Taqman探针设计原则

Taqman探针发展： Taqman--MGB

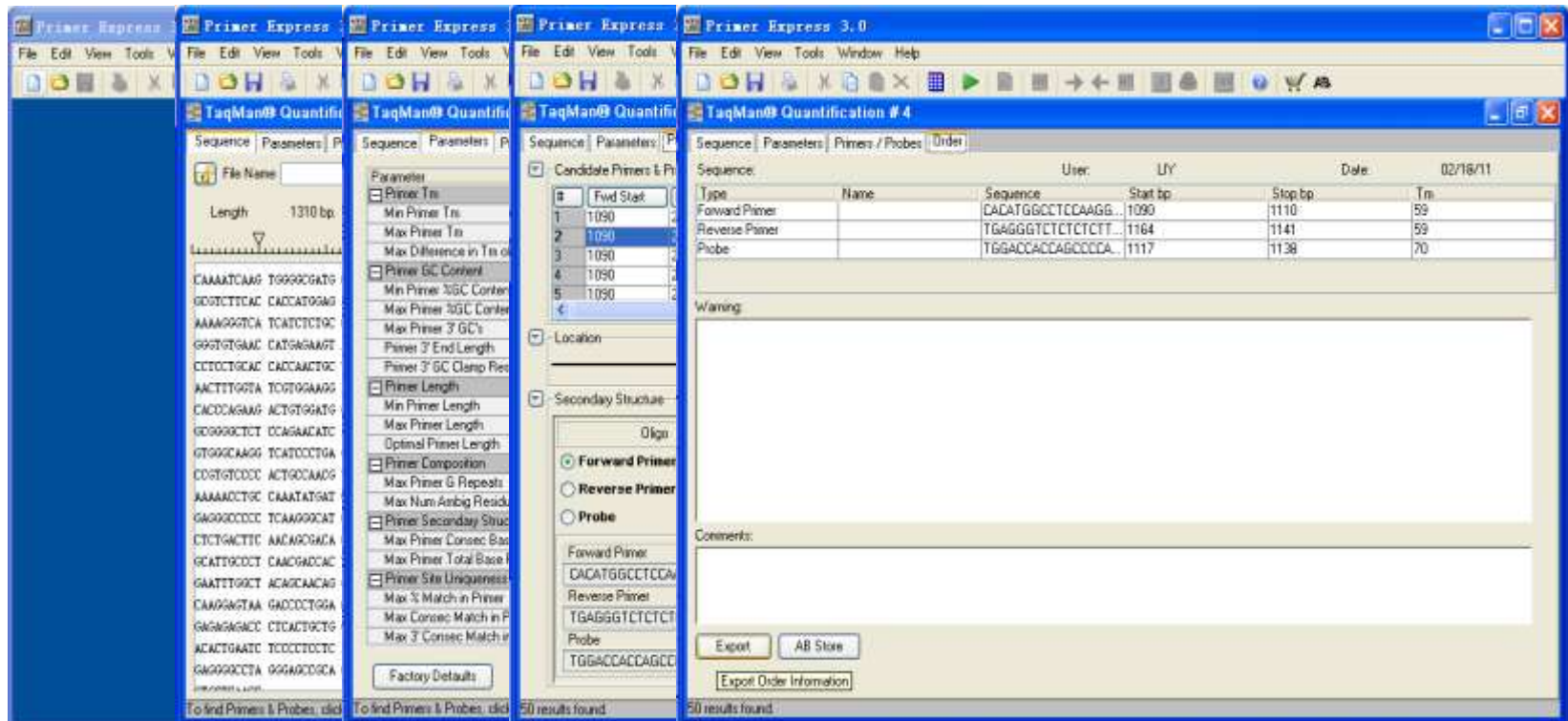
- 序列保守
- 探针位置尽可能靠近上游引物；
- 探针长度通常20~30bp， T_m 值在65~70℃，通常比引物高5~10℃，G-C含量在40-70%之间；
- 避免同一碱基重复过多，特别是G，不可超过4个及以上。
- 5' end不能是G；
- 整条探针中碱基C的含量要高于碱基G，如果不能满足，则使用互补链上的探针

常用引物设计软件

- ❖ Oligo 6: 引物评价
- ❖ Primer Premier 5: 自动搜索
- ❖ Vector NTI Suit: 综合分析
- ❖ Primer 3: 在线服务
- ❖
- ❖ Primer Express: 实时定量PCR引物和探针设计
- ❖ Beacon Designer: 分子信标和Taqman探针设计

Primer Express + Oligo 6

Primer Express 3.0



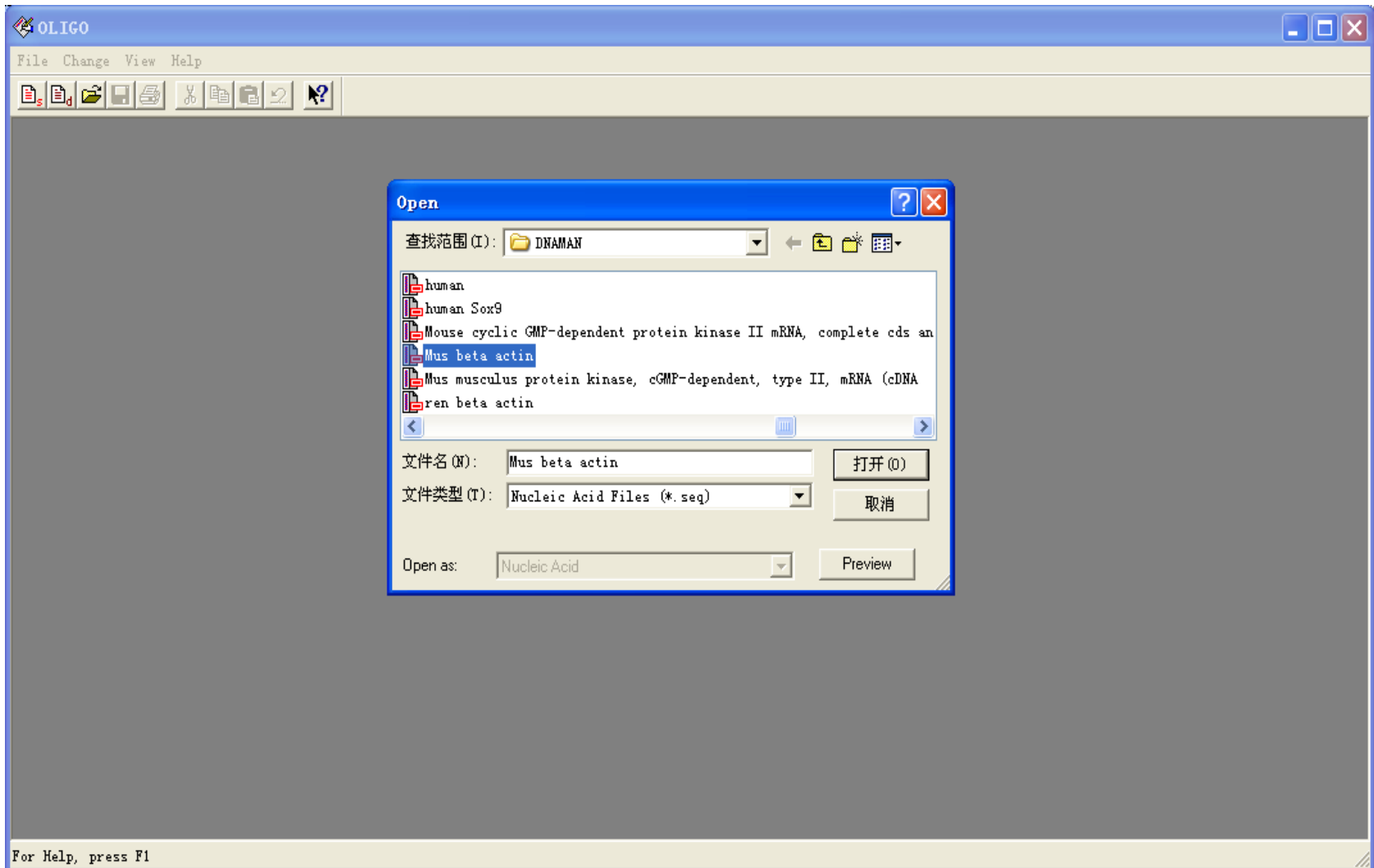
The screenshot displays the Primer Express 3.0 software interface, showing multiple windows for primer design and analysis. The main window, titled "Primer Express 3.0", displays a table of primer results for "TagMan® Quantification #4".

Sequence	Name	Sequence	Start bp	Stop bp	Tm
Forward Primer		CACATGGCCTCCAAGG...	1090	1110	59
Reverse Primer		TGAGGGTCTCTCTCTT...	1164	1141	59
Probe		TGGACCACCAGCCCCA...	1117	1138	70

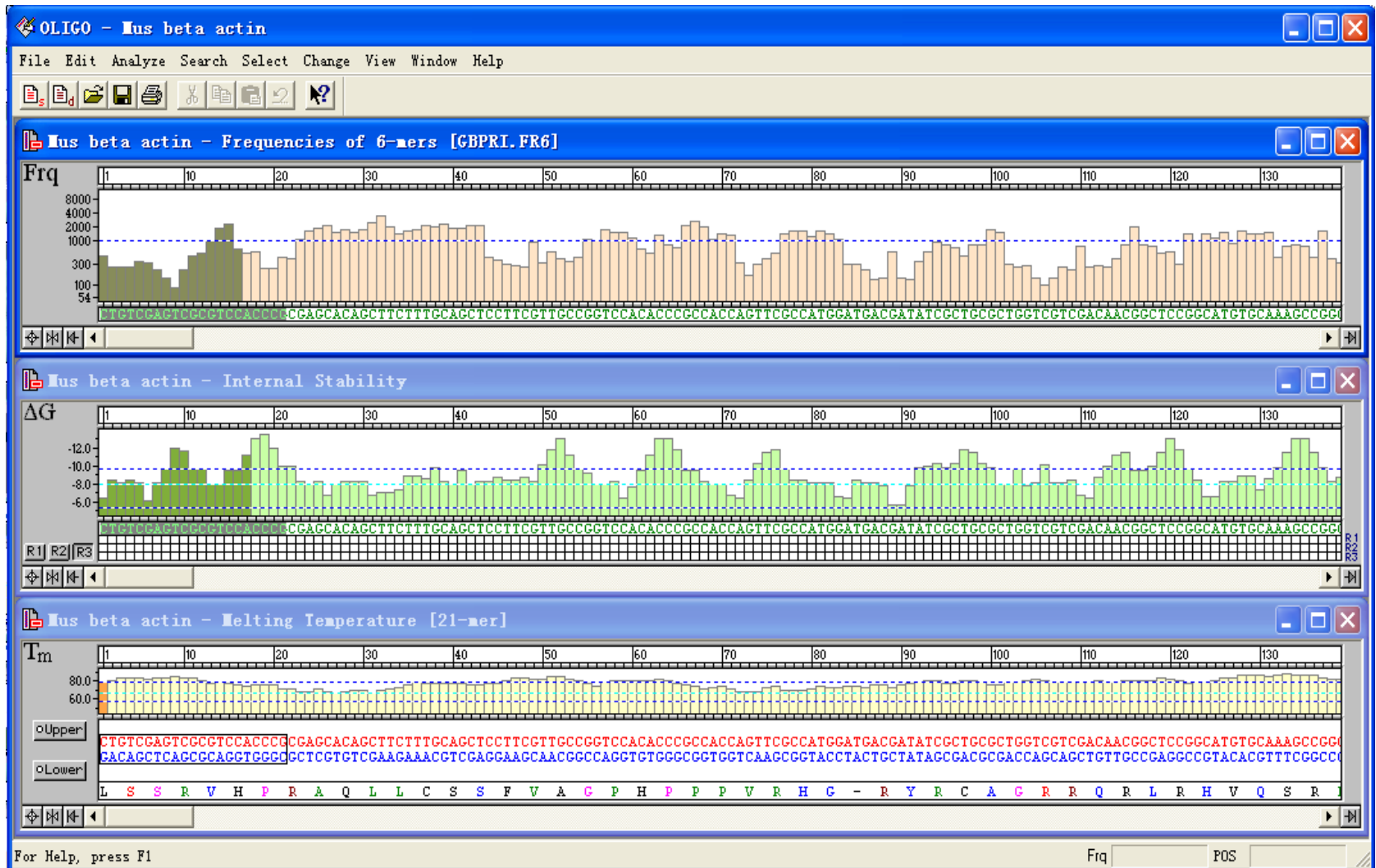
The interface includes several panels for parameter adjustment and analysis:

- Sequence Parameters:** Includes fields for File Name, Length (1310 bp), and a sequence viewer.
- Primer Parameters:** Includes checkboxes for Primer Tm, Primer GC Content, Primer Length, Primer Composition, and Primer Secondary Structure, each with associated sub-parameters.
- Primer Selection:** A list of candidate primers with checkboxes for selection.
- Primer Design Options:** Radio buttons for Forward Primer, Reverse Primer, and Probe.
- Warning and Comments:** A large text area for displaying warnings and user comments.
- Export Options:** Buttons for Export, All Store, and Export Order Information.

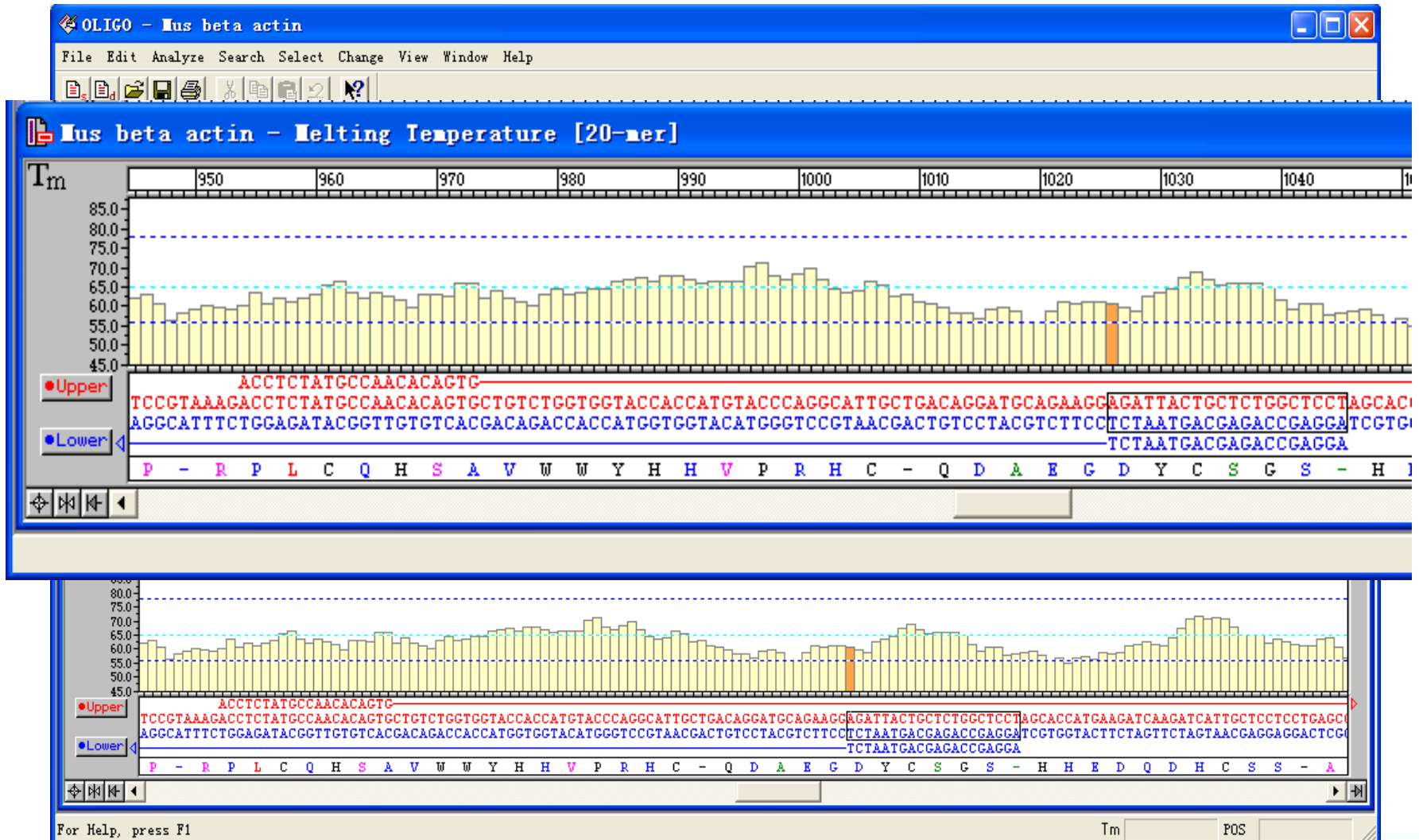
Oligo 6—导入序列



Oligo 6—导入序列

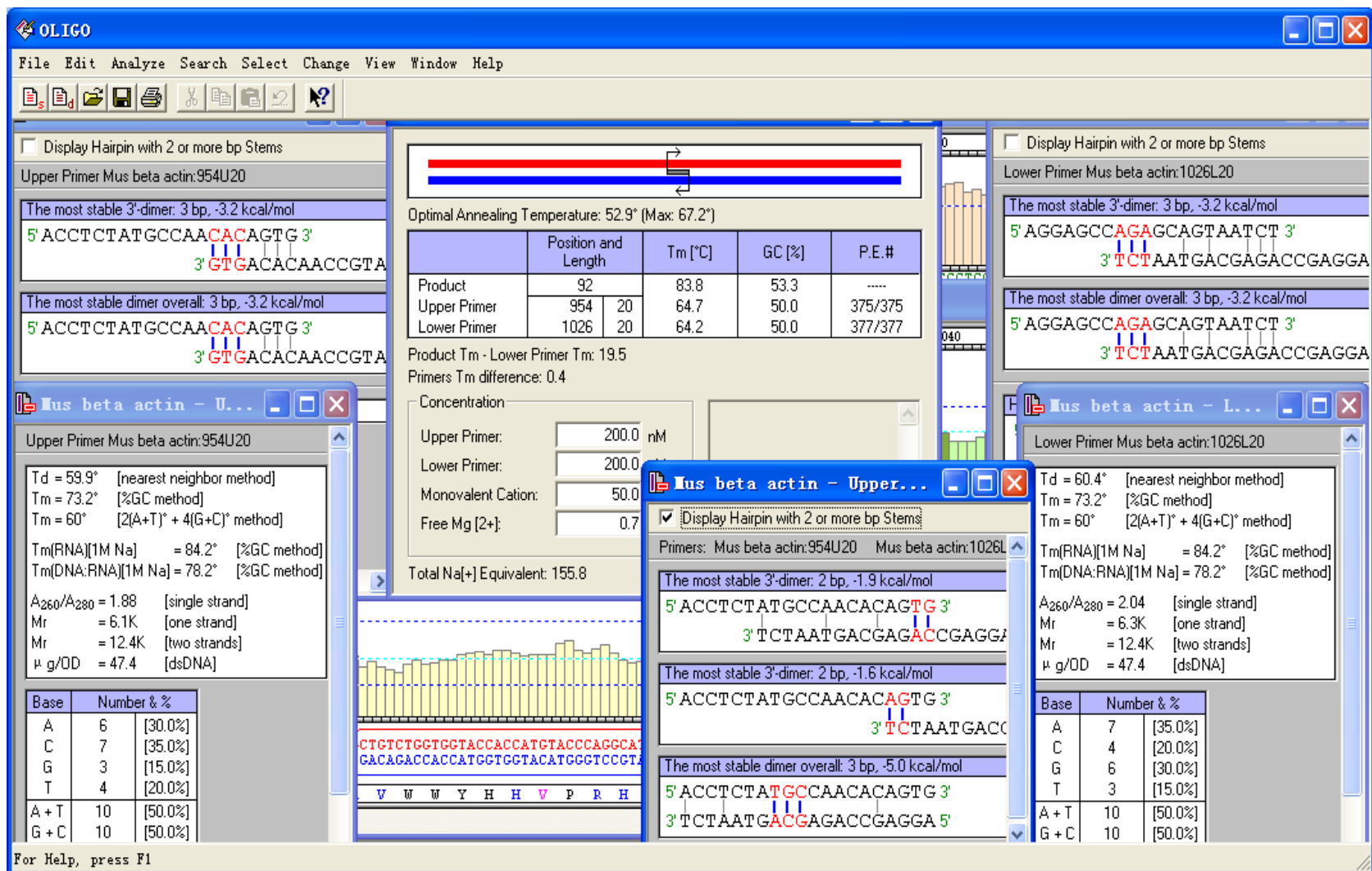


Oligo 6—选择引物





Oligo 6—引物评价



OLIGO 6

File Edit Analyze Search Select Change View Window Help

☐ Display Hairpin with 2 or more bp Stems

Upper Primer Mus beta actin:954U20

The most stable 3'-dimer: 3 bp, -3.2 kcal/mol

5' ACCTCTATGCCAACACAGTG 3'

3' GTGACACAACCGTA

The most stable dimer overall: 3 bp, -3.2 kcal/mol

5' ACCTCTATGCCAACACAGTG 3'

3' GTGACACAACCGTA

Optimal Annealing Temperature: 52.9° (Max: 67.2°)

	Position and Length	T _m [°C]	GC [%]	P.E.#
Product	92	83.8	53.3	-----
Upper Primer	954 20	64.7	50.0	375/375
Lower Primer	1026 20	64.2	50.0	377/377

Product T_m - Lower Primer T_m: 19.5

Primers T_m difference: 0.4

Concentration

Upper Primer: 200.0 nM

Lower Primer: 200.0 nM

Monovalent Cation: 50.0

Free Mg [2+]: 0.7

Total Na[+] Equivalent: 155.8

☐ Display Hairpin with 2 or more bp Stems

Lower Primer Mus beta actin:1026L20

The most stable 3'-dimer: 3 bp, -3.2 kcal/mol

5' AGGAGCCAGAGCAGTAATCT 3'

3' TCTAATGACGAGACCGAGGA

The most stable dimer overall: 3 bp, -3.2 kcal/mol

5' AGGAGCCAGAGCAGTAATCT 3'

3' TCTAATGACGAGACCGAGGA

Mus beta actin - U...

Upper Primer Mus beta actin:954U20

T_d = 59.9° [nearest neighbor method]

T_m = 73.2° [%GC method]

T_m = 60° [2(A+T)° + 4(G+C)° method]

T_m(RNA)[1M Na] = 84.2° [%GC method]

T_m(DNA:RNA)[1M Na] = 78.2° [%GC method]

A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.88 [single strand]

M_r = 6.1K [one strand]

M_r = 12.4K [two strands]

μ g/OD = 47.4 [dsDNA]

Base	Number & %
A	6 [30.0%]
C	7 [35.0%]
G	3 [15.0%]
T	4 [20.0%]
A + T	10 [50.0%]
G + C	10 [50.0%]

Mus beta actin - Upper...

☒ Display Hairpin with 2 or more bp Stems

Primers: Mus beta actin:954U20 Mus beta actin:1026L20

The most stable 3'-dimer: 2 bp, -1.9 kcal/mol

5' ACCTCTATGCCAACACAGTG 3'

3' TCTAATGACGAGACCGAGGA

The most stable 3'-dimer: 2 bp, -1.6 kcal/mol

5' ACCTCTATGCCAACACAGTG 3'

3' TCTAATGACGAGACCGAGGA

The most stable dimer overall: 3 bp, -5.0 kcal/mol

5' ACCTCTATGCCAACACAGTG 3'

3' TCTAATGACGAGACCGAGGA 5'

Mus beta actin - L...

Lower Primer Mus beta actin:1026L20

T_d = 60.4° [nearest neighbor method]

T_m = 73.2° [%GC method]

T_m = 60° [2(A+T)° + 4(G+C)° method]

T_m(RNA)[1M Na] = 84.2° [%GC method]

T_m(DNA:RNA)[1M Na] = 78.2° [%GC method]

A₂₆₀/A₂₈₀ = 2.04 [single strand]

M_r = 6.3K [one strand]

M_r = 12.4K [two strands]

μ g/OD = 47.4 [dsDNA]

Base	Number & %
A	7 [35.0%]
C	4 [20.0%]
G	6 [30.0%]
T	3 [15.0%]
A + T	10 [50.0%]
G + C	10 [50.0%]

For Help, press F1

Oligo 6—自动搜索

OLIGO - Mus beta actin

File Edit Analyze Search Select Change View Window Help

for Primers and Probes F3
for Hairpin Loop Stems
for a Sequence String
for Palindromes
for Restriction Sites...
for Restriction Sites in Protein...

Memory Tables
Copy Memory Table...

Temperature: 52.9° (Max: 67.2°)

Position and Length Tm [°C] GC

92 83.8 53

50

50

Mus beta actin - Primer P...

[1] [2] Sort Sort Sort

#	Positions of Primers	Prod. Len.	Opt. Ta	%GC
1	43 244	221	60.4	63.8
2	43 607	584	60.3	60.1
3	44 243	219	60.0	64.4
4	44 244	220	61.0	64.1
5	44 245	221	59.9	64.3
6	44 245	221	61.0	64.3
7	44 412	388	59.6	60.8
8	44 607	583	60.9	60.2
9	44 832	808	60.7	59.0
10	44 833	809	60.7	59.1
11	44 1404	1380	58.0	52.9
12	45 243	218	59.9	64.2
13	45 409	384	58.5	61.2
14	45 410	385	58.4	61.0
15	45 411	386	58.4	60.9
16	45 412	387	59.6	60.7
17	45 1202	1177	57.4	56.9
18	45 1203	1178	57.5	56.9
19	45 1402	1377	56.7	52.8
20	45 1403	1378	58.0	52.8
21	45 1403	1378	56.7	52.8
22	45 1404	1379	58.0	52.9
23	46 409	383	59.4	61.1
24	46 410	384	59.4	60.9
25	46 411	385	59.3	60.8
26	46 826	800	59.3	58.9
27	46 1202	1176	57.4	56.9

Search for Primers and Probes

☒ + Strand Search ☒ - Strand Search

PCR Primers: ☐ Consensus Primers ☒ Complex Substrate

☒ Compatible Pairs
☐ Compatible with the Upper Primer
☐ Compatible with the Lower Primer

☐ Sequencing Primers
☐ Hybridization Probes

☒ Duplex-free Oligonucleotides
☒ Highly Specific Oligos (3'-end Stability)
☒ Oligonucleotide with GC Clamp
☒ Eliminate False Priming Oligonucleotides
☐ and Continue Above Search in Other File(s)
☒ Oligonucleotides within Selected Stability Limits
☒ Hairpin-free Oligonucleotides
☒ Eliminate Homooligomers / Sequence Repeats
☒ Eliminate Frequent Oligos

Search Mode:
☒ Mark
☐ Unmark

OK Cancel Search Ranges Parameters Defaults

Base Number & %

Base	Number	%
A	6	[30.0%]
C	7	[35.0%]
G	3	[15.0%]
T	4	[20.0%]
A + T	10	[50.0%]
G + C	10	[50.0%]

Search for sequencing and PCR primers or hybridization probes

HRM(高分辨率溶解曲线分析技术)

原理：每一段DNA都有其独特的序列，也就有了独特的熔解曲线形状，应用饱和荧光染料和高分辨率的熔解曲线分析技术可精确对样品的基因型进行分析，精度可达单碱基差异。

优点：高通量、简单、快速、省钱、高灵敏度；

闭管检测，避免污染造成的假阳性；

可检测已知和未知SNP；

<400bp扩增产物内SNP，灵敏度和精确度100%。

缺点：仅LightCycler™ 480 PCR仪，或LightScanner等少量仪器可以使用；

内容概要

 荧光定量PCR的原理及标记方法

 荧光定量PCR数据计算方法

 荧光定量PCR文献解读

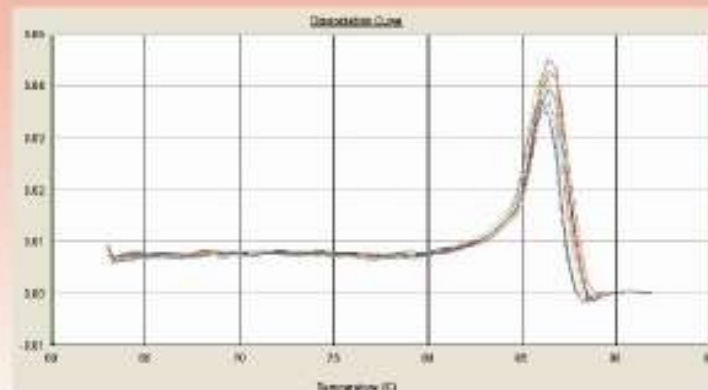
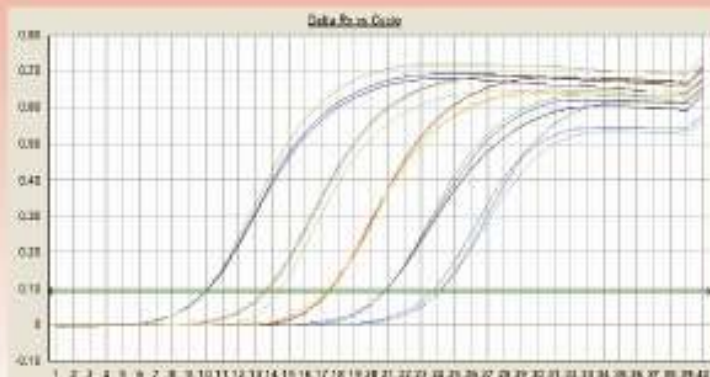
 MIQE标准及实验常见问题分析

 定量PCR引物设计技巧

RealMaster Mix-荧光定量培训班的明星

反应效率和特异性均衡

- 拥有专利的HotMaster Taq热启动酶，有效保证反应效率和扩增特异性
- 稳定的 Mg^{+} 自动调节功能，使扩增效率和特异性达到完美平衡



RealMaster Mix-荧光定量培训班的明星

近期使用TIANGEN定量产品发表的部分SCI文章

发表文章	杂志
Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase	PNAS
Arabidopsis ASA1 Is Important for Jasmonate-Mediated Regulation of Auxin Biosynthesis and Transport during Lateral Root Formation	PLANT CELL
The Arabidopsis RING Finger E3 Ligase RHA2a Is a Novel Positive Regulator of Absciscic Acid Signaling during Seed Germination and Early Seedling Development	Plant Physiology
Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in Arabidopsis	J. Exp. Bot
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Xanthomonas campestris pv. campestris is required for extracellular polysaccharide production and full virulence	Microbiology
Toll-like receptor 2 mediates the induction of IL-10 in corneal fibroblasts in response to Fusarium solu	Immunology and Cell Biology
Inhibition of telomerase RNA (hTR) in cervical cancer by adenovirus-delivered siRNA	Cancer Gene Therapy
Local hyperthermia induces apoptosis of keratinocytes in both normal skin and condyloma acuminata via different pathways	Apoptosis
Spinal D-Amino Acid Oxidase Contributes to Neuropathic Pain in Rats	J. Pharmacol. Exp. Ther
Smad2/3 activities are required for induction and patterning of the neuroectoderm in zebrafish	Developmental Biology
Cloning the PvP5CS gene from common bean (Phaseolus vulgaris) and its expression patterns under abiotic stresses	Journal of Plant physiology

SuperReal PreMix — “双核时代”

特异性

buffer中加入H-band因子，保证扩增效率的同时消除非特异性扩增

化学修饰
Hotstar

抗体修饰
Hotstar

高效性

耐热性能较普通热启动Taq DNA聚合酶更为卓越。HotStart Taq DNA聚合酶具有高度的严谨性和普适性，并且具有较高的扩增效率

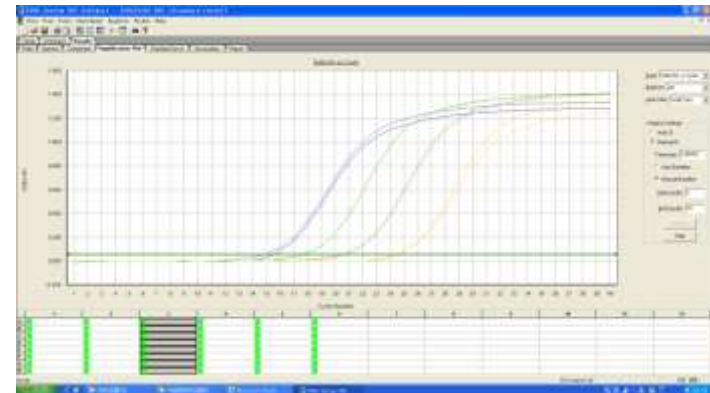
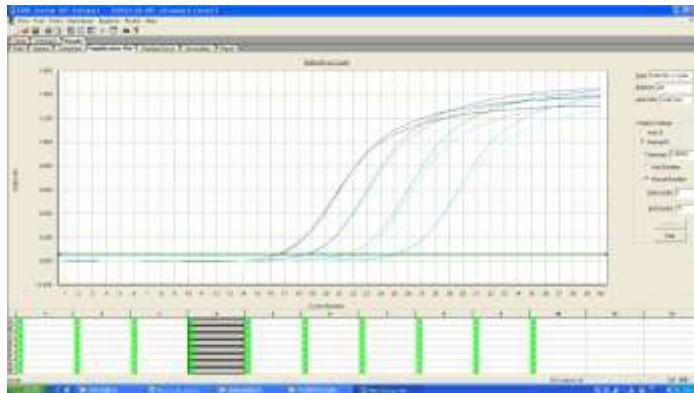
抗抑制性

抑制剂来源广泛，对于单一来源热启动酶的活性可能会有较大影响，而两种酶则会具有双管齐下的效果，大大提高了反应体系对于模板的耐受度

化学修饰
抗体修饰

SuperReal PreMix

比较	单酶	双酶
平均CT值	16.22	15.22
	18.5	17.72
	21.88	20.7
	25.15	24.46



TIANGEN公司荧光定量产品

SYBR Green法

TaqMan探针法

以DNA为模板

以RNA为模板

FP202

**RealMasterMix
(SYBR Green)**

FP204 /FP205

**SuperReal PreMix
(SYBR Green)**

FP302

**Quant qRT-PCR
(SYBR Green) Kit**

FP303

**Quant 一步法qRT
PCR (SYBR Green)**

FP203

**RealMasterMix
(Probe)**

FP304

**Quant 一步法qRT
PCR (Probe)**