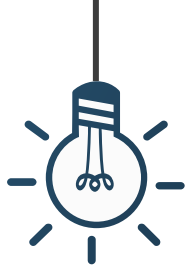




从PCR到qPCR



qPCR原理

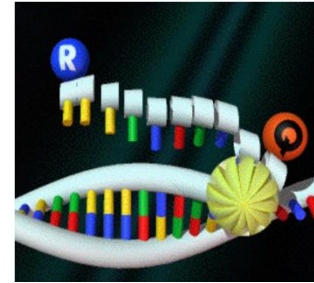


荧光标记

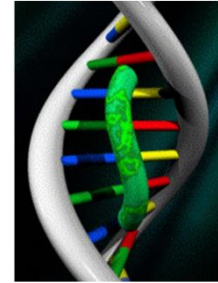
Taqman探针：探针两端分别接荧光基团与荧光淬灭基团,PCR中Taq酶切开探针，分离荧光基团，使之荧光不被淬灭

染料荧光：SYBR染料，结合DNA双螺旋大沟发荧光，与单链不结合

TaqMan探针法



染料法



Ct值

扩增产物的荧光信号达到设定的荧光阈值时的所对应的扩增循环数 (Cycle Threshold)。C代表Cycle，T代表Threshold。简单讲，Ct值就是qPCR中起始模板扩增达到一定产物量时，所对应的循环数



模板浓度与Ct值关系

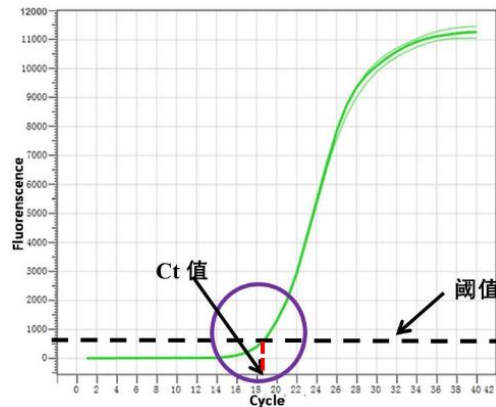
线性关系

理想的PCR反应：

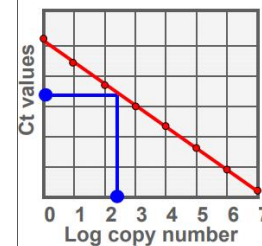
$$X = X_0 * 2^n$$

非理想的PCR反应：

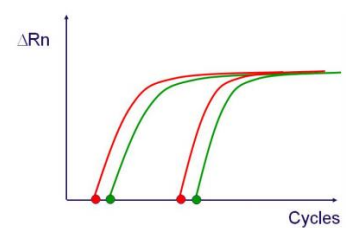
$$X = X_0(1 + E)^n$$

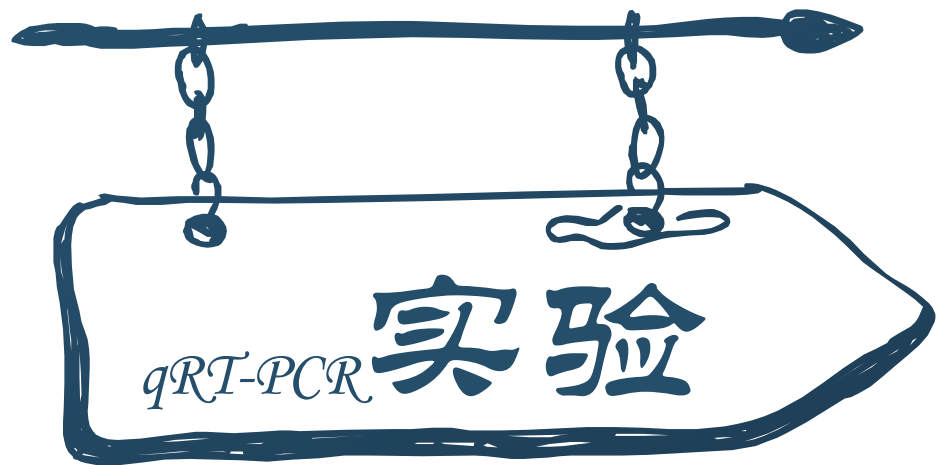


绝对定量



相对定量





qRT-PCR 实验



1 . 模板 制备



2 . 引物 检验

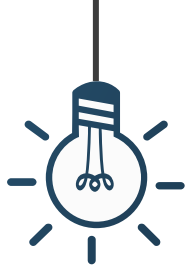


3 . 定量 检测



4 . 结果 分析





模板制备RNA-cDNA



RNA提取

Trizol法（异硫氰酸胍），盐酸胍，CTAB法

裂解材料

核酸分离

沉淀、纯化



RNA逆转录

mRNA/Lnc

利用poly A



随机引物

添加poly A



茎环法

一步到位，无特异性逆转录全部RNA为cDNA

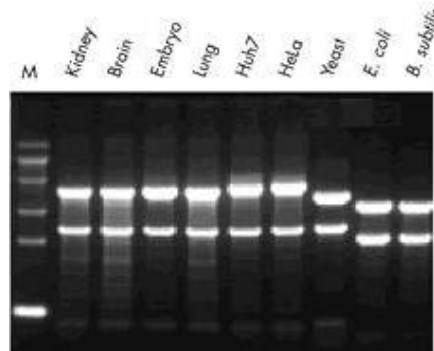
miR

miR特异性序列+茎环结构，每个目标序列需要逆转录一次

5'-端引物在逆转录与qPCR间通用，3'-端随机



模板质量评价

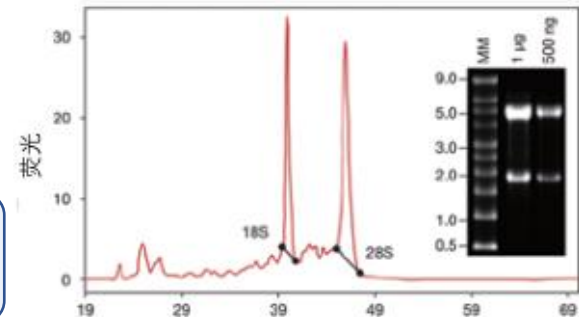


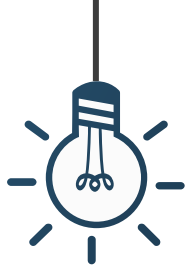
电泳



光度

梯度模板下qPCR扩增曲线





引物设计与检验



qPCR引物设计原则

特异性，二级结构，长度，GC含量，Tm值
核心原则：高特异性+高扩增效率



引物质量评价：评价“高效+特异”

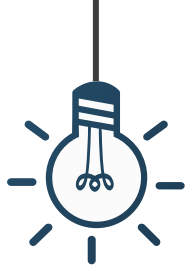
软件打分



PCR验证



qPCR扩增曲线+融解曲线



定量检测



qPCR程序

程序设置与普通PCR无异，但产物长度较小，可使用两步法（退火延伸同时完成）替代三步法，同时需要增加荧光采样点。

也可以使用一步法qRT-PCR：使用目标序列特异性引物，同时完成逆转录与定量。



荧光值到模板量

$$R_n = R_B + X_0 (1 + e)^n R_s$$

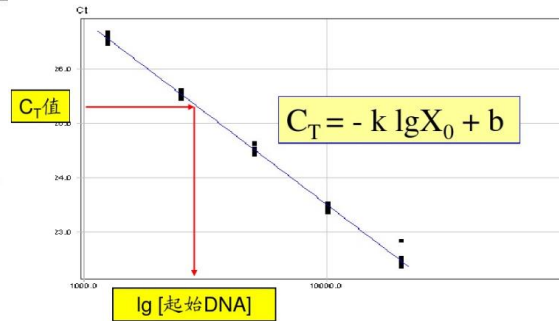
第n次PCR循环时的荧光信号强度(R_n)等于背景信号强度(R_B)加上子的荧光强度(即单位荧光强度, R_s)与分子数目的乘积。

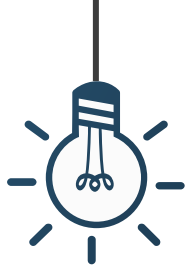
设 $n=C_T$, 则: $R_{CT} = R_B + X_0 (1 + e)^{C_T} R_s$
 $\lg (R_{CT} - R_B) = \lg X_0 + C_T \lg (1 + e) + \lg R_s$
 $C_T \lg (1 + e) = -\lg X_0 + \lg (R_{CT} - R_B) - \lg R_s$

$$C_T = -\frac{\log X_0}{\log(1 + E_x)} + \frac{\log(R_T - R_B) - \log R_s}{\log(1 + E_x)}$$

即 $C_T = -k \lg X_0 + b$ (线性方程)

标准曲线: C_T 值对 $[DNA]_0$ 作图





结果与图片

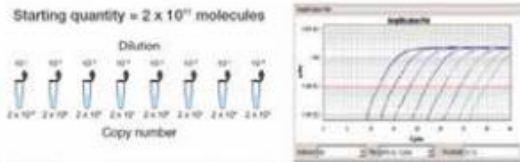


绝对定量-标准曲线

相对定量- $\Delta\Delta C_t$ 法

数据分析

标准品
梯度稀释



PCR-Ct-
扩增曲线



图 22. 绝对定量标准曲线设置流程。

模板浓度
 C_0 -Ct标曲

内参基因

扩增曲线

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

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

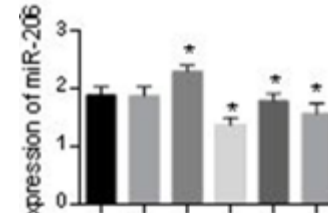
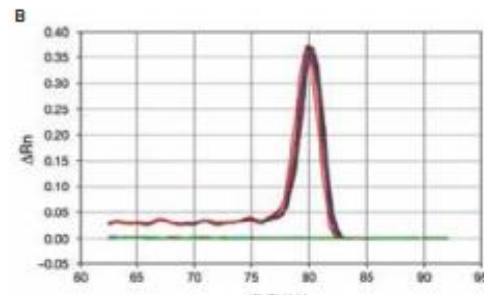
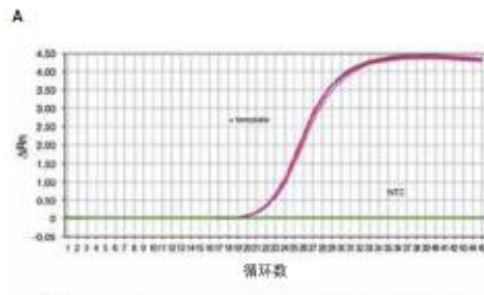
$$\Delta C_{t \text{ 样本}} - \Delta C_{t \text{ 校准品}} = \Delta\Delta C_t$$

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

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

Δ 数学关系

结果图片展示



扩增与融解曲线

表达量柱状图

