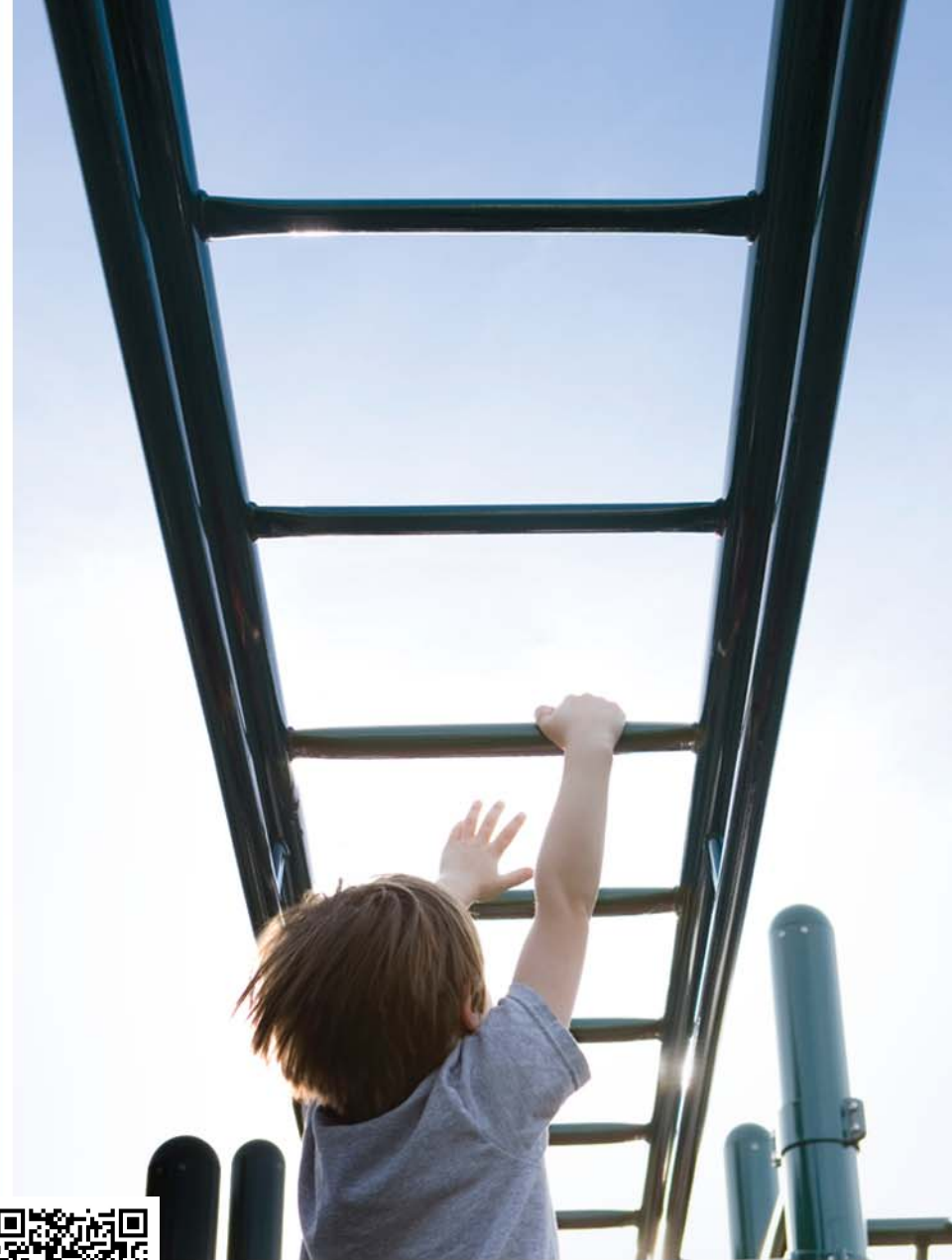


# 实时荧光定量 PCR实验结果 分析

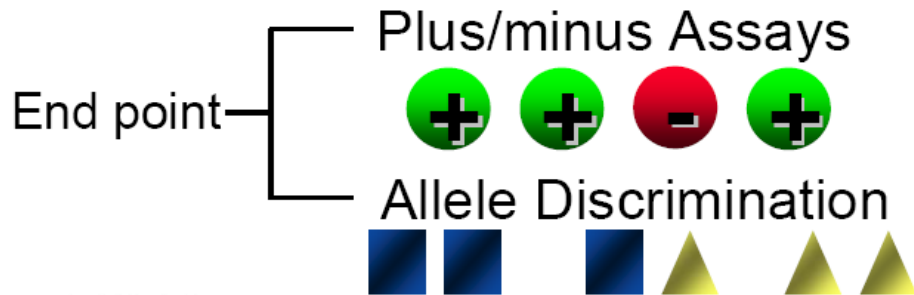
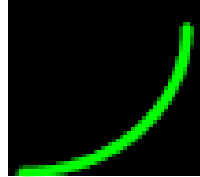
*Hao Angela*

Field Application Specialist  
Gene Expression Division  
North China  
Bio-Rad Laboratories



## ◆ 定量分析

- 绝对定量
- 相对定量



## ◆ 定性分析

- SNP 分析，基因扫描
- 阴阳性判定
- 熔解曲线分析



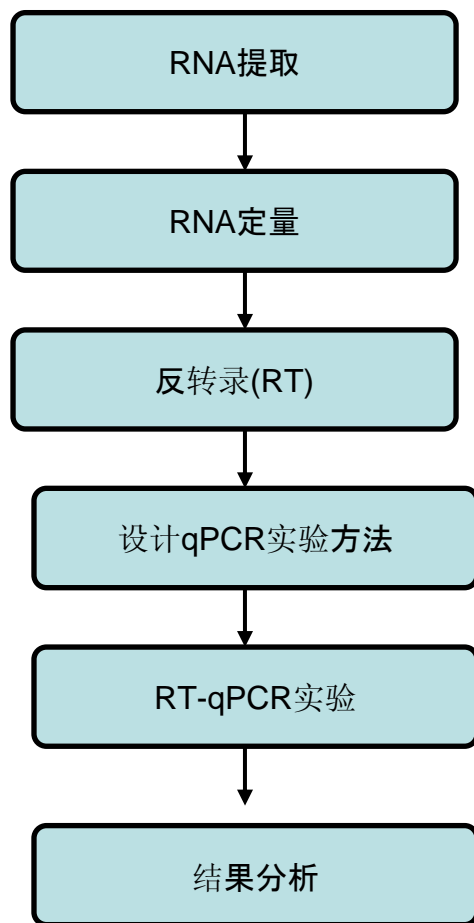


# 应用实例-基因表达分析

## 利用TaqMan技术研究ERBB2 在乳腺肿瘤 组织标本中的表达差异



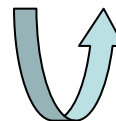
# 实验设计流程



Aurum Total RNA kit



iScript cDNA Synthesis Kit



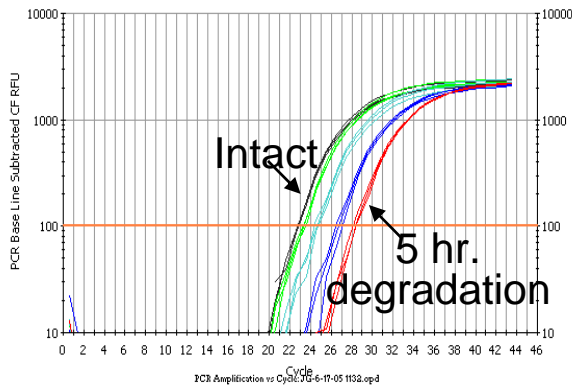
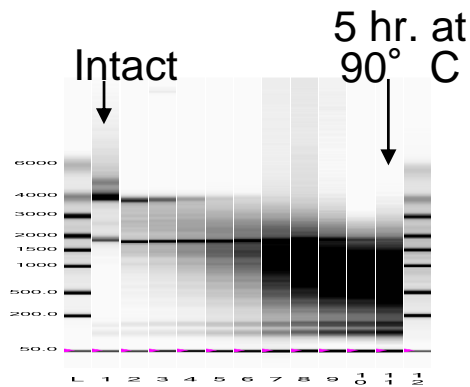


# 材料和方法

- 已知在50%的乳腺肿瘤样本中，**ERBB2**表达异常，因此可以作为一个检测标准
- 选用**GAPDH**作为内标基因
  - FAM**标记的**ERBB2**探针
  - VIC**标记的**GAPDH**探针
- 标准品（质粒）构造标准曲线
- 多重PCR反应
- 阴性对照
  - 无RNA对照（空白）
  - 无逆转录酶对照（监控基因组污染）

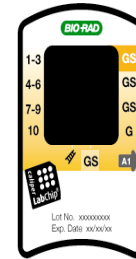
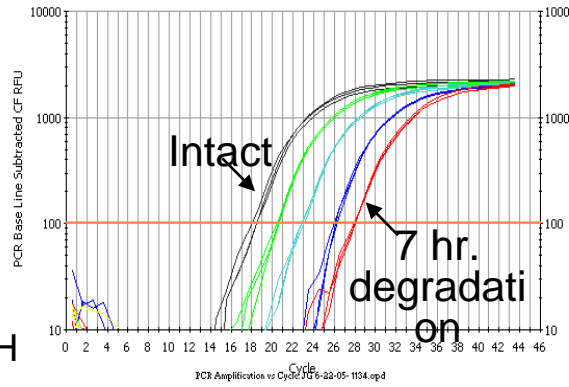
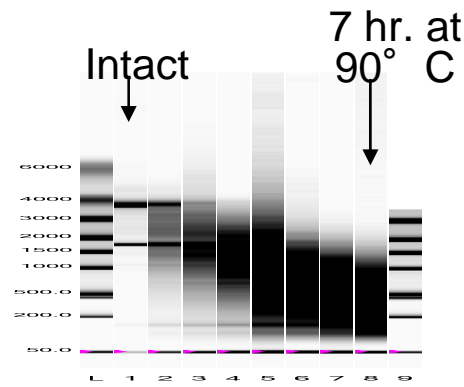
# RNA定性及定量分析

## 正常乳腺组织 RNA



GAPDH  
gene

## 乳癌组织 RNA



Experion™ RNA  
HighSens Chip  
0.1-5 ng/μl  
100-6,000 nt



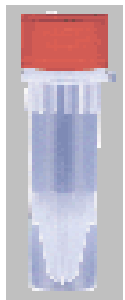
Experion™ RNA  
StdSens Chip  
5-500 ng/μl  
100-6,000 nt

# 一步法 & 两步法

在不同的反应管中运行RT & PCR



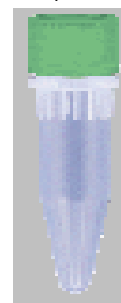
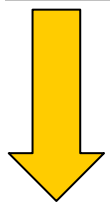
1. 反转录反应  
加热灭活反转酶



2. PCR 反应



1. 反转录反应



2. PCR 反应

iScript cDNA Synthesis Kit

1. 25° C 5 min
2. 42° C 30 min
3. 85° C 5 min
4. 冷却至4° C



# 设计qPCR实验方法

1. 定性条件摸索

2. 荧光化学物质

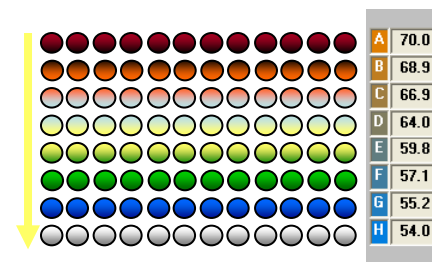
- SYBR GREEN染料
- Taqman探针

3. 定量PCR条件优化

4. 单双通道相互验证



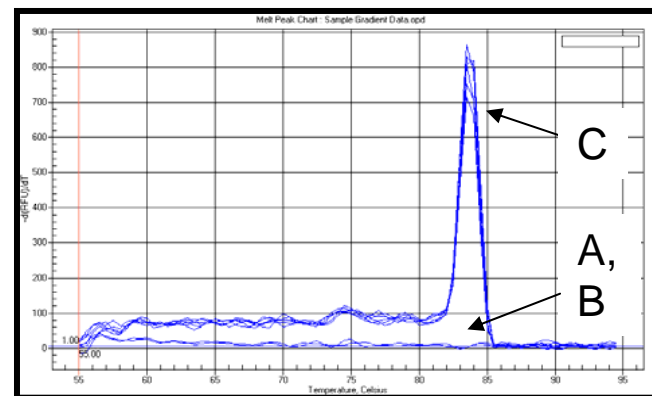
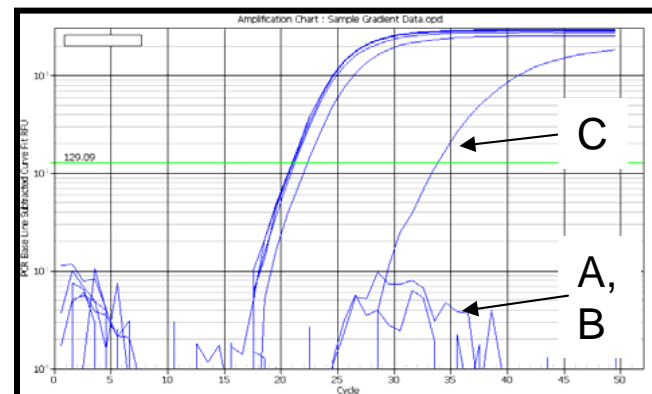
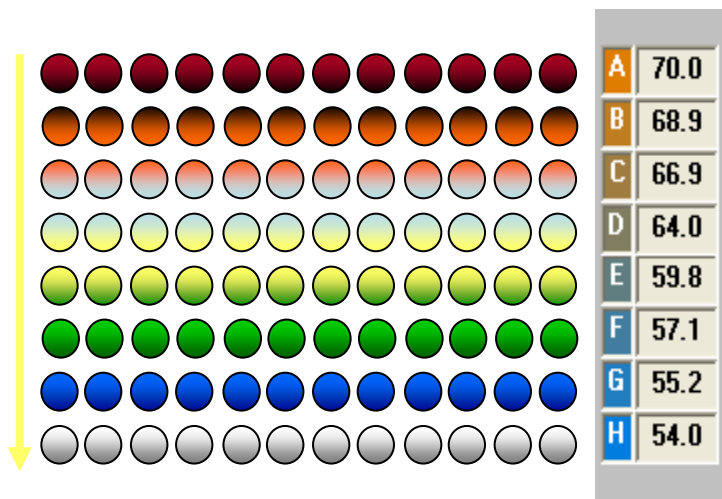
- ☐ Fam标记目标基因探针
- ☐ VIC标记看家基因探针





# 扩增仪—独特的梯度PCR功能

- 采用多点温控和传感技术，可以实现温度梯度PCR功能
- 温度条件与镁离子、引物和酶浓度之间最佳搭配关系
- 温度梯度范围：1–25 °C
- 温度梯度选择范围：40–99 °C
- 在定量和定性状态下都可实现



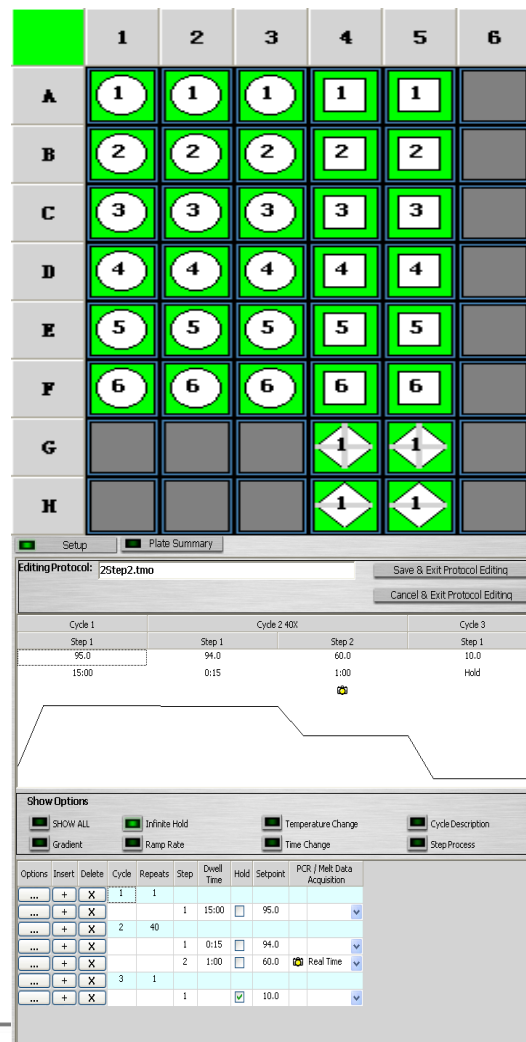


# RT-qPCR实验

- 目标基因: 未知样品
- 生成标准曲线: 标准品梯度
- 监控系统故障: 阳性对照
- 监控污染: 阴性对照/基因组对照

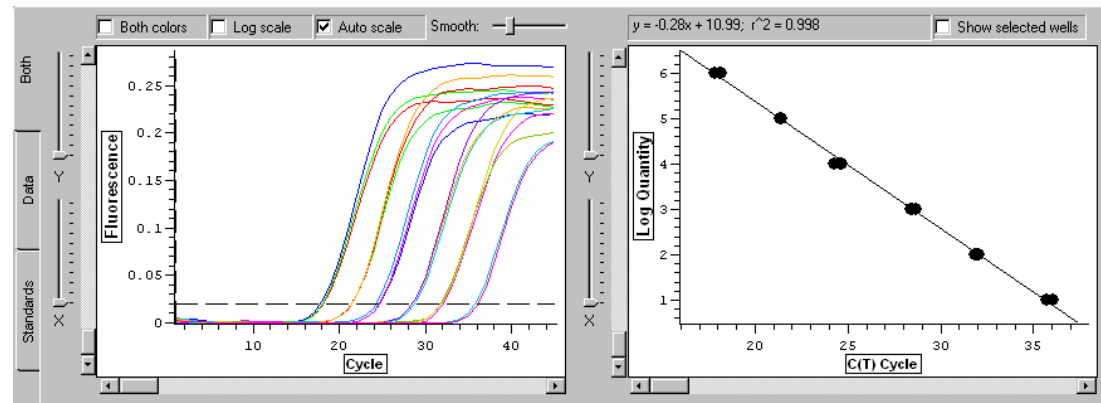
- 校准生物学误差: 看家基因
- 降低其余误差: 重复实验

- 95°C, 15min
- 94°C, 15sec
- 60°C, 1min
- plate read
- go to step 3, 39 more times
- 10°C, forever
- End

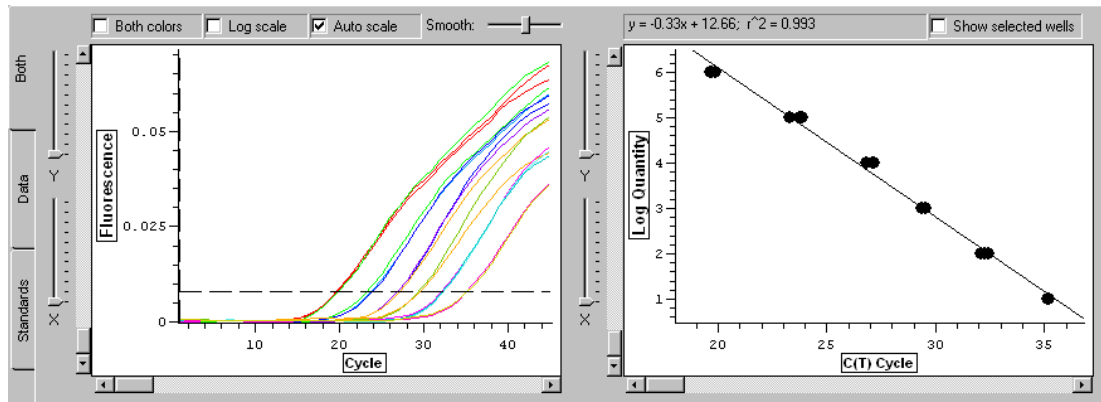


# 结果分析-绝对曲线

Color 1 – FAM  
detection for  
*ERBB2*



Color 2 - VIC  
detection for  
*GAPDH*



# 结果分析-单双通道相互验证

## ERBB2单双通道相互验证的实验结果

### A. Multiplex Reactions

Healthy RNA	Carcinoma
28.48	26.42
28.68	26.98
28.78	26.98
<b>28.65 ± 0.15</b>	<b>26.80 ± 0.32</b>

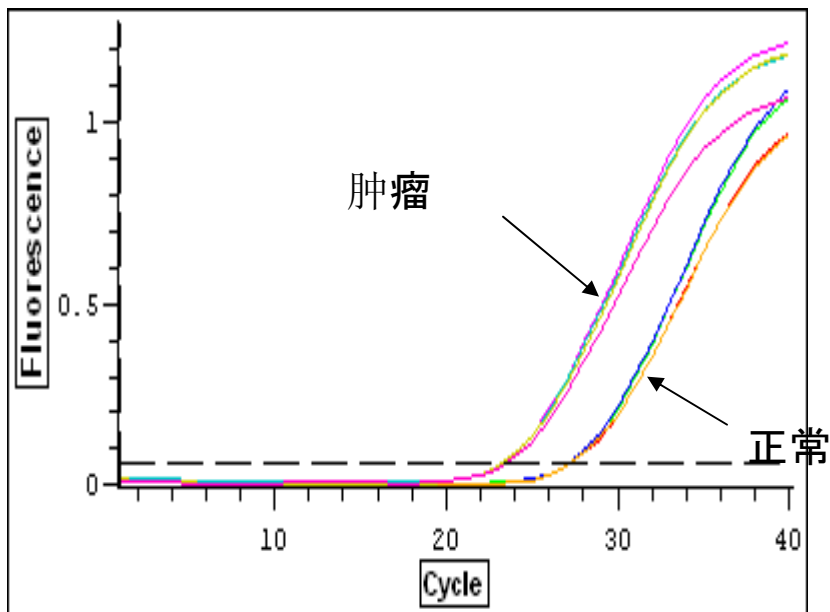
### B. Singleplex reactions

Healthy RNA	Carcinoma
28.67	27.09
28.71	26.68
28.73	26.70
<b>28.70 ± 0.03</b>	<b>26.82 ± 0.24</b>

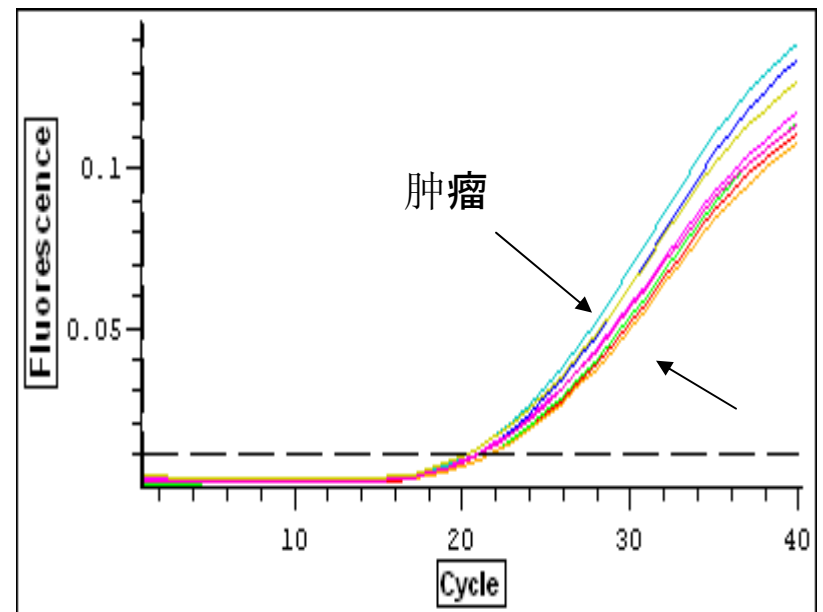
# 结果分析-扩增曲线

样品扩增：正常vs肿瘤

PMT1-FAM detection- *ERBB2*



PMT2-VIC detection- *GAPDH*



# 结果计算-双标准曲线

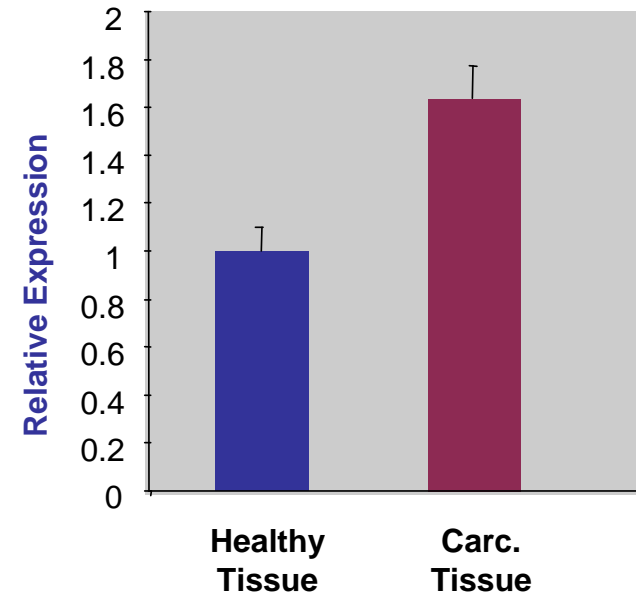
Copies ng/  $\mu$ l Total RNA

	<i>Healthy RNA</i>	<i>Tumor RNA</i>
<b><i>ERBB2</i></b>	1095 1052	2130 2492
<b><i>GAPDH</i></b>	95500 85730	136000 130800

***ERBB2* copies / *GAPDH* copies**

*Healthy RNA*  $1095 / 95500 = 0.011 \rightarrow 0.011$   
 $1052 / 85730 = 0.012$

*Tumor RNA*  $2130 / 136000 = 0.017$   
 $2492 / 130800 = 0.0197 \rightarrow 0.018$



$0.018 / 0.011 = 1.63$



# 结果计算- $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ 法

- $\Delta\Delta C(t) = 4.41 - 5.18$   
 $= -0.77 \pm 0.18$
- $2^{-\Delta\Delta C(t)} = 1.51 - 1.93$
- 结果与双标准曲线法相近

## Healthy RNA

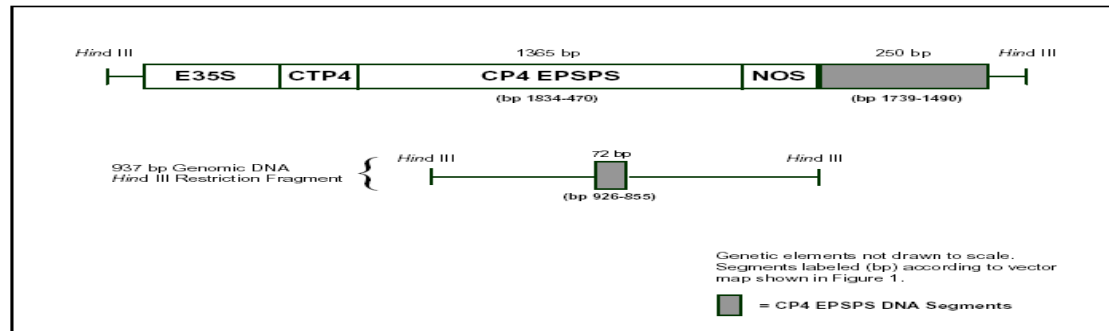
BBER2	GAPDH	$\Delta C(t)$
28.40	23.27	5.31
28.46	23.41	5.05
$28.43 \pm 0.04$	$23.34 \pm 0.10$	$5.18 \pm 0.18$

## Carcinoma RNA

BBER2	GAPDH	$\Delta C(t)$
27.36	22.81	4.55
27.12	22.86	4.26
$27.24 \pm 0.17$	$22.83 \pm 0.03$	$4.41 \pm 0.21$

# 应用实例-绝对定量分析

## 利用SYBR Green 1进行GMO定量



**Figure 2** Updated molecular characterization of RR soybean event 40-3-2.

E35S - 35S transcription promoter  
CTP4 - Chloroplast targeting sequence (polypeptide)  
CP4 EPSPS - the CP4 EPSPS open reading frame (protein)  
NOS - The nopaline synthase 3' transcription terminator





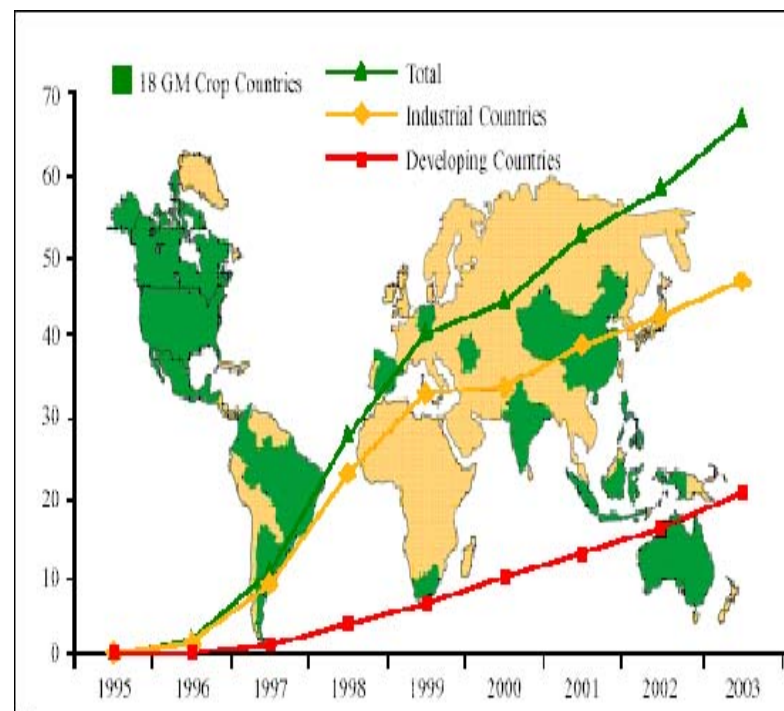
# 转基因作物发展现状

1983年：首例转基因植物—转基因烟草

1986年：转基因植物首次进入田间实验

1994年：首例转基因植物产品—Flavr Savr 延熟保鲜转基因番茄进入市场

1996年—至今：转基因作物迅猛发展期





# 转基因产品介绍

1. “转基因产品”又叫生物技术产品，指用基因工程技术或者其他现代技术改变基因组构成的动物、植物、微生物及其产品。例如，把某些除草剂抗性的基因转入大豆、玉米的植株中，产生除草剂抗性。
2. 转基因食品就是以转基因生物体直接作为食品或以其为原料加工生产的食品。
3. 我国于2001年5月9日通过了转基因生物管理方面的核心法规《农业转基因生物安全管理条例》，标识制度
4. 检测标准：制订了12项转基因产品检测行业标准和7项国家标准



# 转基因产品成分检测

## ■ 检测方法

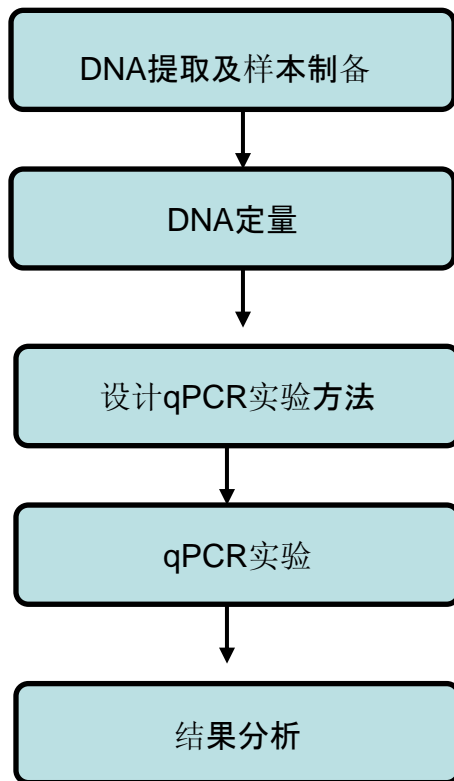
- PCR/Real-time PCR
- DNA Microarray
- ELISA/Quicktest strip
- Captured PCR-ELISA

## ■ 检测基因

- 外源目的基因
- 标记基因
- 基因表达调控元件  
(启动子、终止子)
- 生物内源基因

根据需要可以进行基因特异性、构建特异性或品系特异性检测

# 实验设计流程



标准品: 测定样品的重量百分比[% (w/w)]



# 材料 & 方法

样品制备:

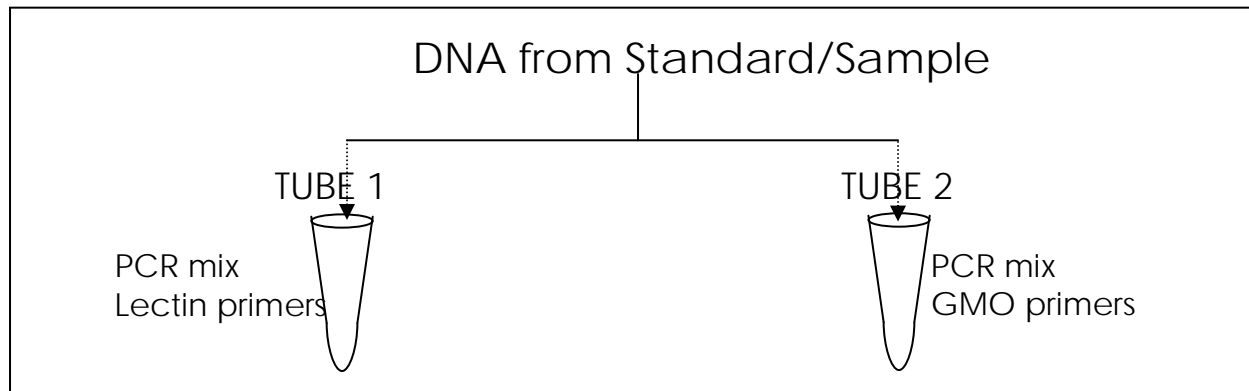
- 从超级市场买来的下列食物用来作为测试样品:大豆饼,豆制甜点 和两个牌子的面粉

标准品的制备:

- 比例混合非转基因大豆粉末与 Roundup Ready大豆粉末得到含有 0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2% 和 5% 定量标准品

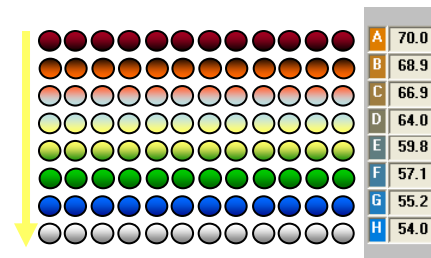
引物设计:

- 转基因大豆 (Roundup Ready) 特异序列 *epsps*
- 大豆内源凝集素基因 *lectin*



# 设计qPCR实验方法

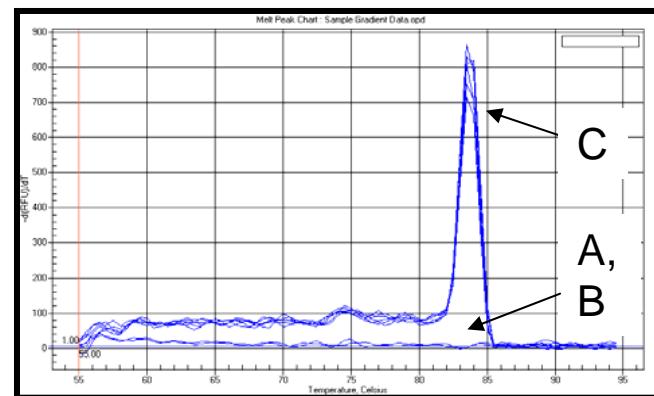
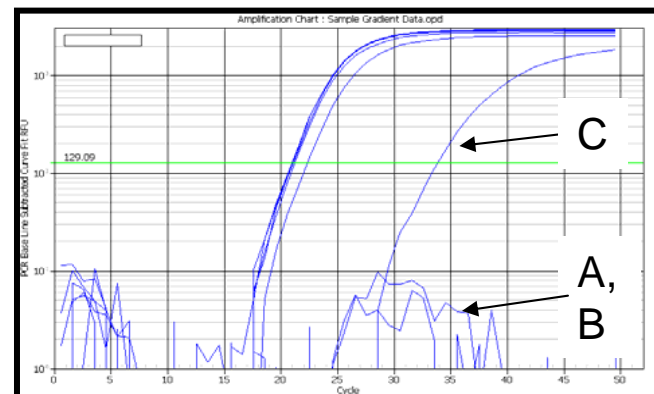
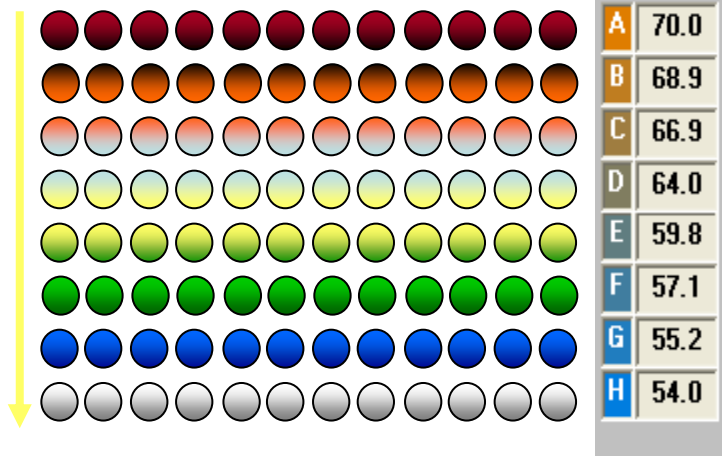
1. 定性条件摸索
2. 荧光化学物质
  - SYBR GREEN染料
3. 定量PCR条件优化
4. 数据处理



- ☐ 熔解曲线分析
- ☐ 标准曲线log%GMO对应 $\Delta C(t)$ 获得

# 扩增仪—独特的梯度PCR功能

- 采用多点温控和传感技术，可以实现温度梯度PCR功能
- 温度条件与镁离子、引物和酶浓度之间最佳搭配关系
- 温度梯度范围：1–25 °C
- 温度梯度选择范围：40–99 °C
- 在定量和定性状态下都可实现



# 数据收集与处理

数据处理：

$$C(t)_{\text{EPSPS}} - C(t)_{\text{lectin}} = \Delta C(t)$$

处理条件：

假定两对引物有相同的扩增效率并且相互独立扩增。

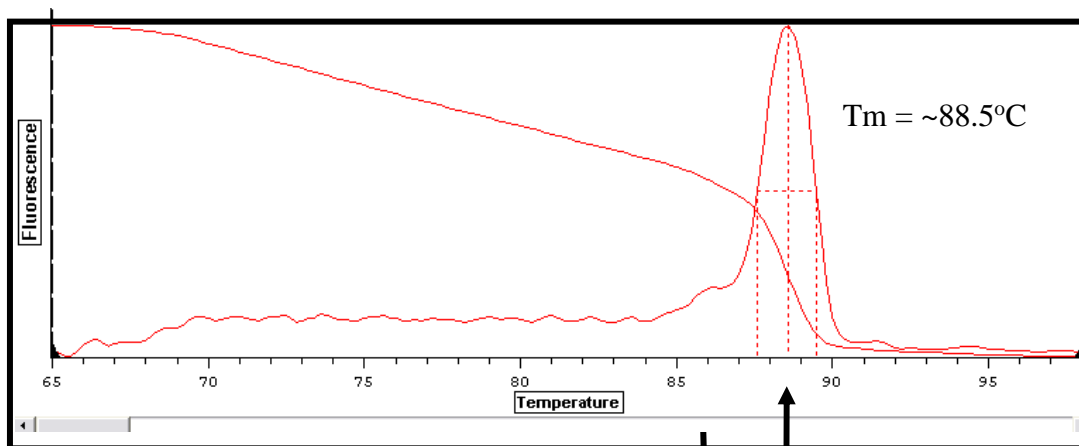
$$\log A/B = \log A - \log B$$

A: EPSPS	GMO
B: Lectin	all bean
A/B:	%GMO

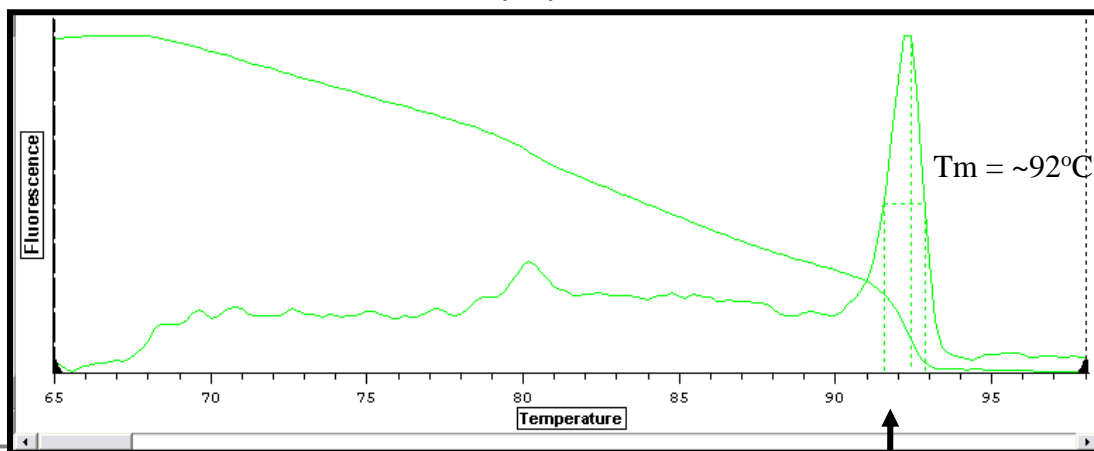


# 数据分析I — 熔解曲线分析

熔解曲线 – Lectin 扩增

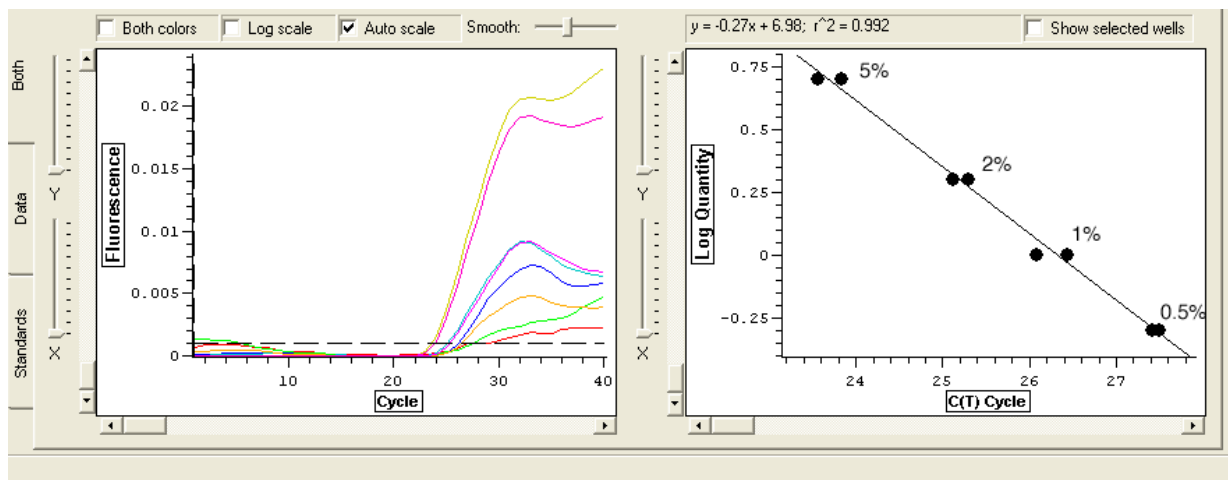


熔解曲线 – *epsps* 扩增

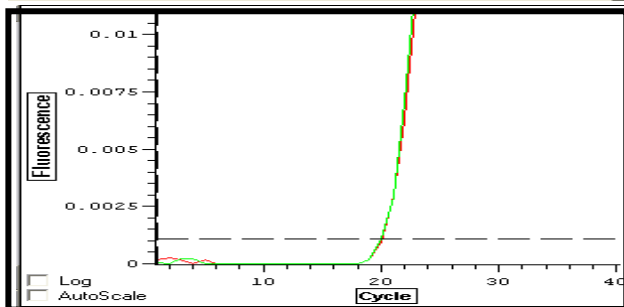


# 数据分析I 一定量结果分析

不同转基因成分含量与Ct<sub>epsps</sub>做标准曲线



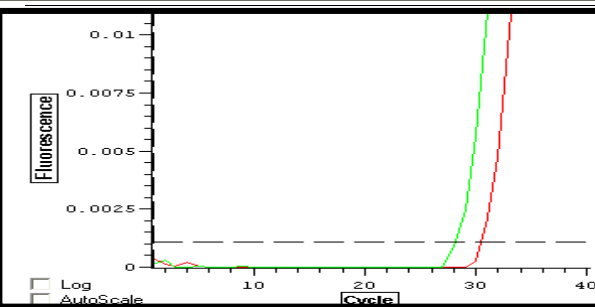
*Lectin*



—

Food Sample #1

*epsps*



—

Food Sample #2



# 数据分析II – $\Delta$ CT 均一化分析

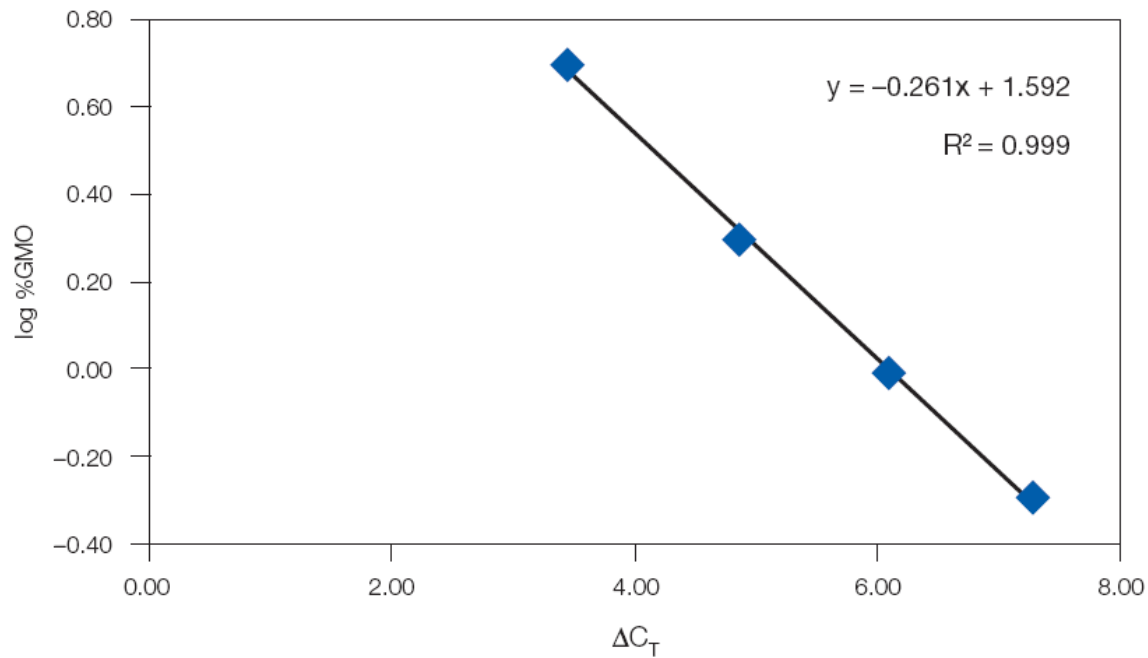
At

Table 7.1. Calculation of $\Delta$ CT		=CT(epsps) – CT(lectin)	
Standard sample	CT(epsps)	CT(lectin)	CT
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

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

# 数据分析III — 标准曲线

根据 $\Delta C(t)$ 值与标准品百分含量做标准曲线



# 数据分析IV 一标准曲线

根据 $\Delta C(t)$ 值标准曲线推算未知样本的转基因成分含量

Standards/ Sample	$\Delta C(t)$	%GMO
0	ND	—
0.1	ND	—
0.5	5.6	—
1.0	4.7	—
2.0	3.4	—
5.0	1.9	—
Soy Dessert	2.1	4.40
Soy Flour	ND	< 0.5
Soy Burger	0.7	> 5

## ◆ 定量分析

- 绝对定量与相对定量
- 基因表达分析
- GMO 检测

## ◆ 定性分析

- SNP 分析
- 基因型分析
- 溶解曲线分析



# 什么是SNP?

## 单点核苷酸多态性Single Nucleotide Polymorphisms



AACCTGCA<sup>T</sup>AATGCCAG



AACCTGCA<sup>G</sup>AATGCCAG



# SNP 分析 & 技术

DNA 样本数

## SNP 发现

Resequencing  
and *in silico*  
analysis to find  
putative SNPs

### **Technology:**

DNA sequencing  
dHPLC, SSCP

## SNP 验证

Confirmation of  
true SNPs and  
allele frequency  
estimation

### **Technology:**

MALDI-TOF 飞行  
质谱  
SBE

## SNP 筛选

Using SNPs for  
research &  
diagnosis

### **Technology:**

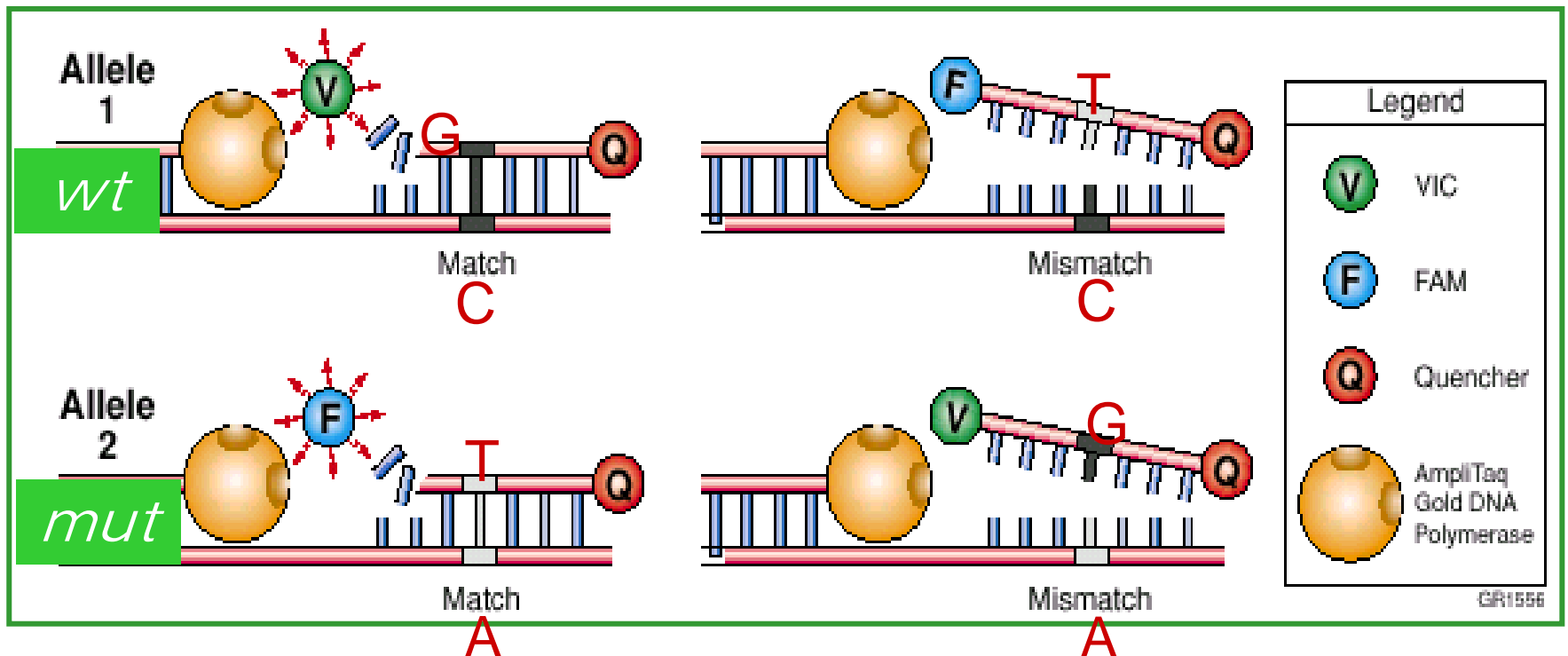
DNA 芯片  
RT-PCR

SNP 位点



# SNP分析-基因分型

两条探针分别针对不同等位基因



# PCR后鉴定

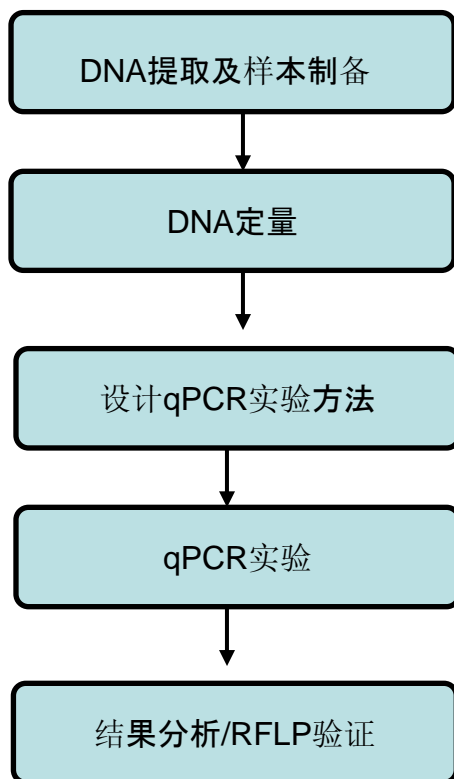
↑FAM=等位基因II纯合子-AA

↑VIC=等位基因I纯合子-CC

↑FAM+VIC=等位基因I、II杂合子-AC



# 实验设计流程



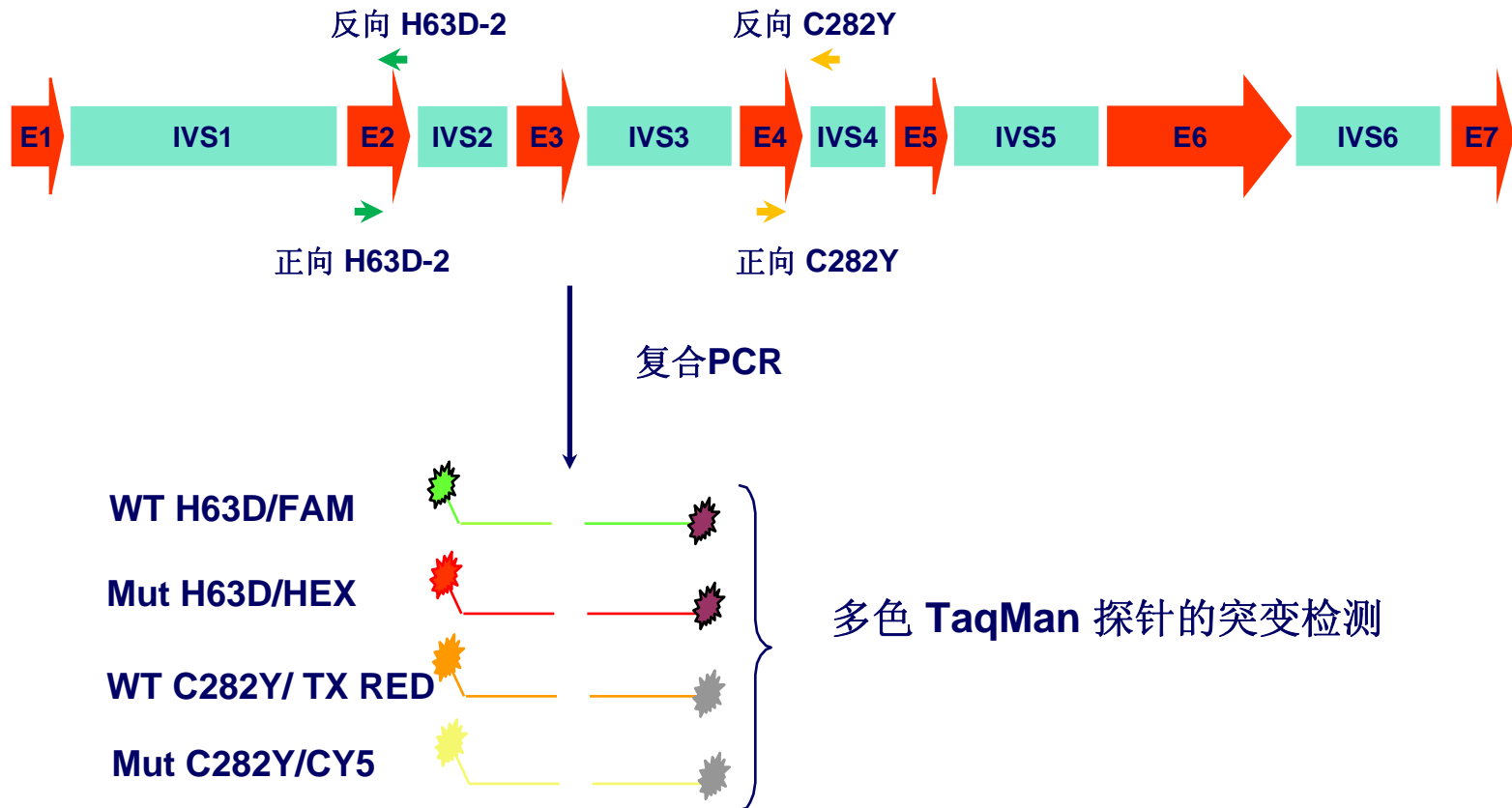


# SNP分析-遗传性血色素沉着症HH

## 实验材料与amp;方法

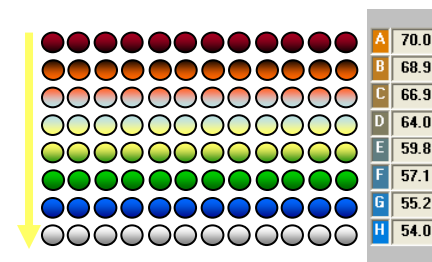
- 遗传性血色素沉着症 (hereditary hemochromatosis, HH), 遗传性血色素沉着症在白人中较常见, 尤其在北欧群体, 发病率可达  $1/400 \sim 1/200$ 。此病特点是铁在人体各器官中过度的沉积而导致器官损伤和衰竭。因HFE基因突变所引起, 主要为Cys282Tyr、His63Asp
- SNP位点:
  1. Cys282Tyr-G845A
  2. His63Asp -C187G
- 样本组: 37全血
- 对照组: 3个阳性对照, 4个阴性对照, 8个空白对照
- 基因组全血DNA提取

# HFE by multiplex TaqMan



# 设计qPCR实验方法

1. 定性条件摸索
2. 荧光化学物质
  - Taqman探针
3. 定量PCR条件优化
4. 数据处理

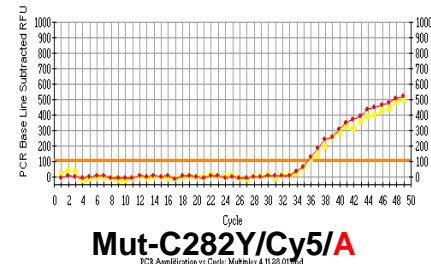
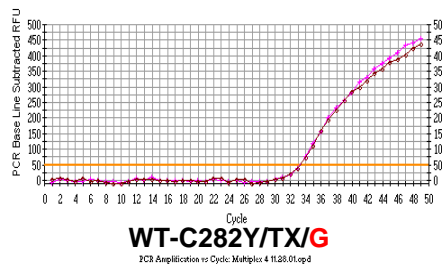
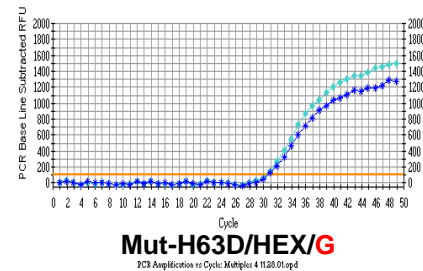
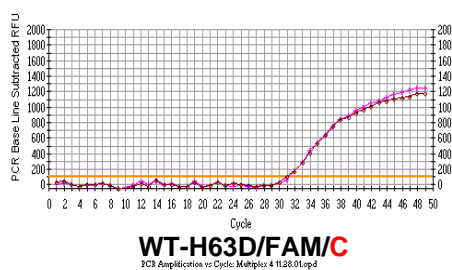
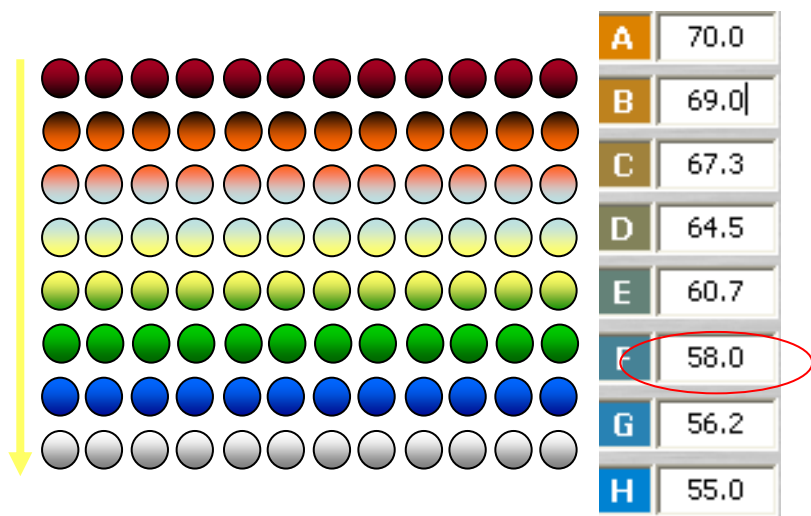




# 扩增仪—独特的梯度PCR功能

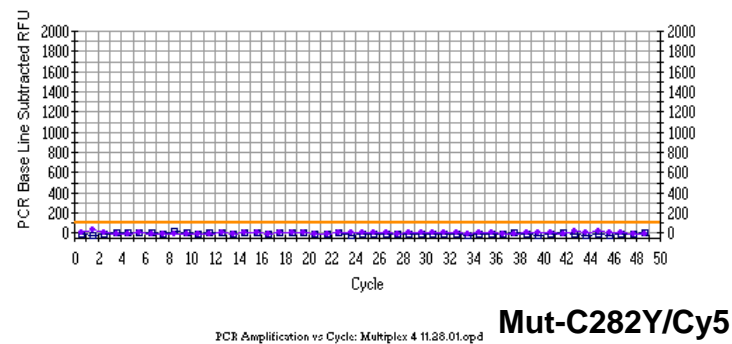
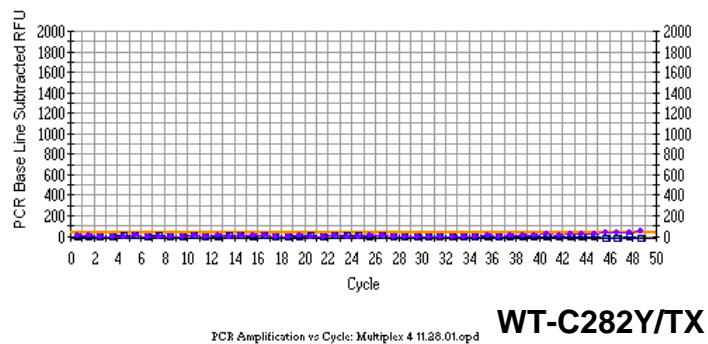
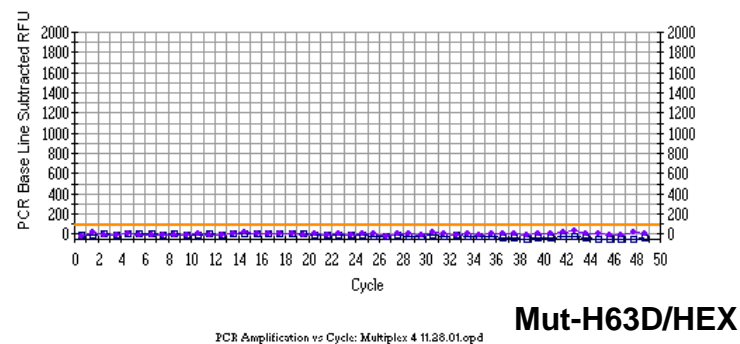
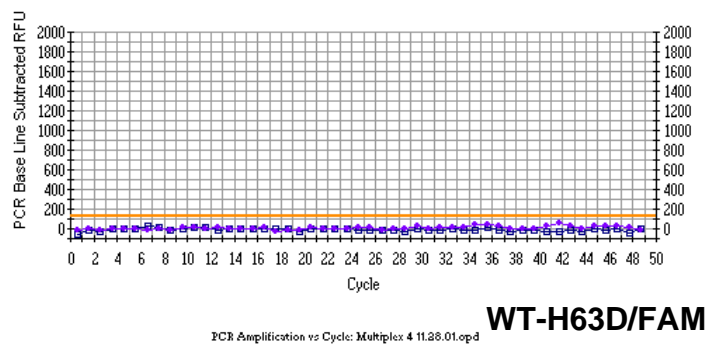
- 采用多点温控和传感技术，可以实现**温度梯度PCR功能**
- 温度条件与镁离子、引物和酶浓度之间最佳搭配关系
- 温度梯度范围：1–25 °C
- 温度梯度选择范围：40–99 °C
- 在定量和定性状态下都可实现

梯度范围：55–70 °C



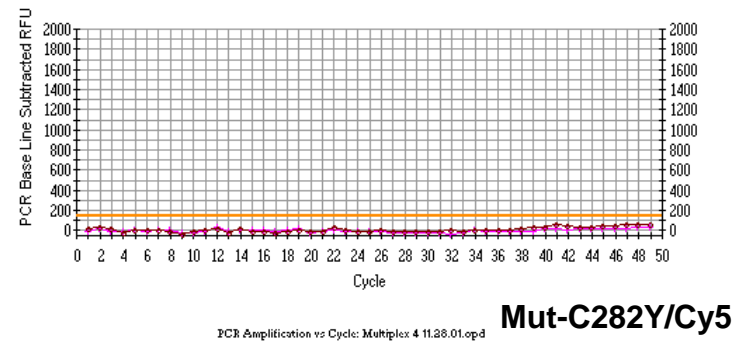
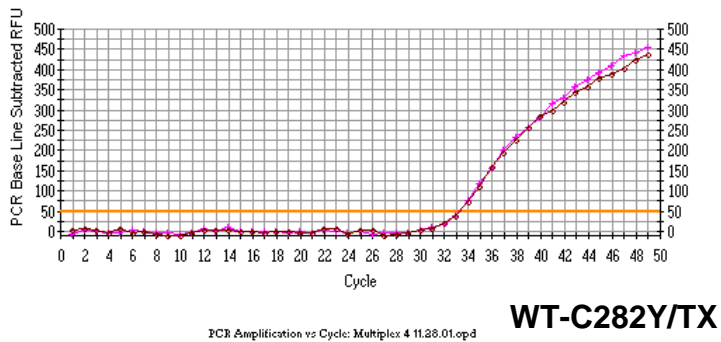
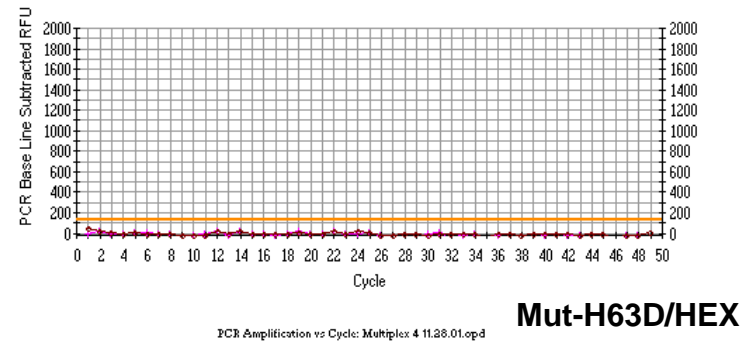
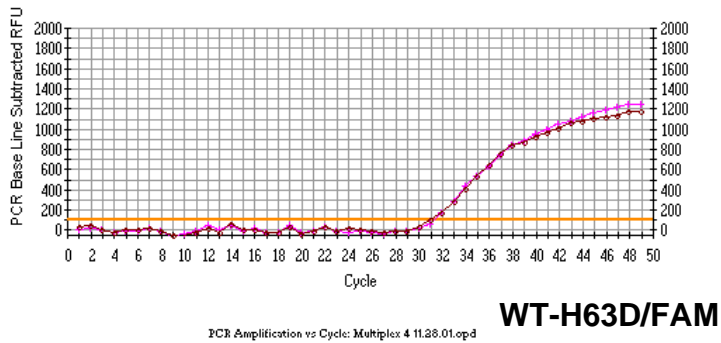


# Negative control



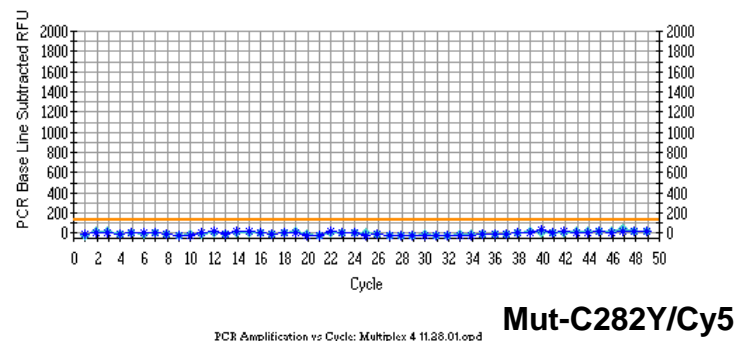
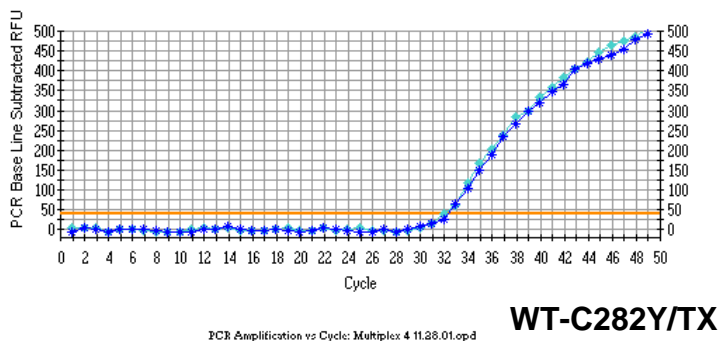
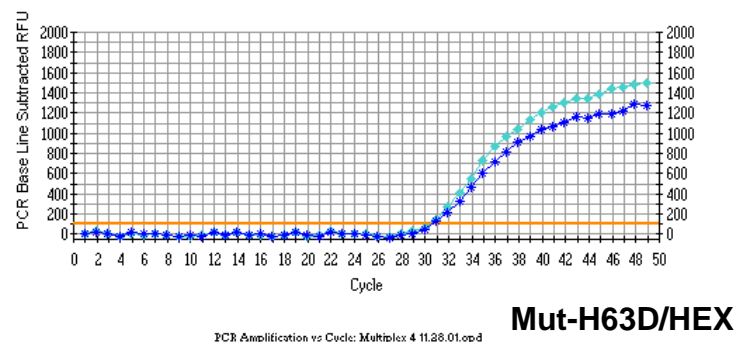
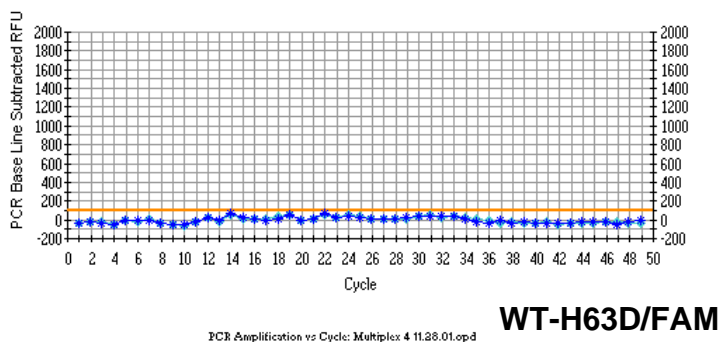


# Genotype: Wild type



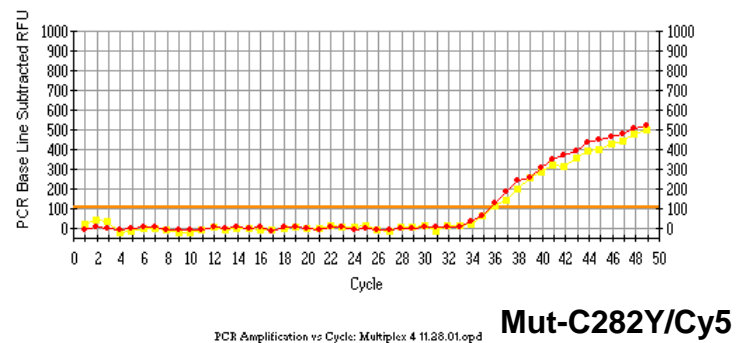
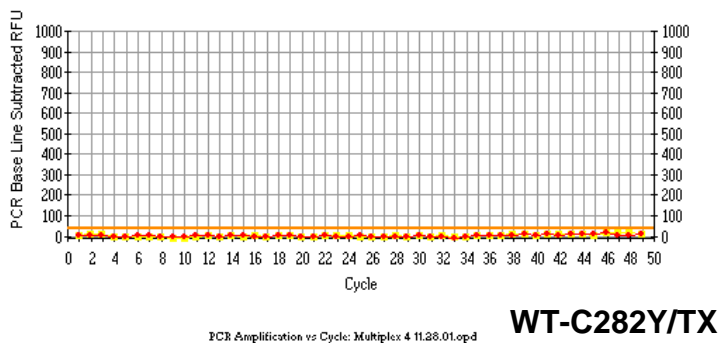
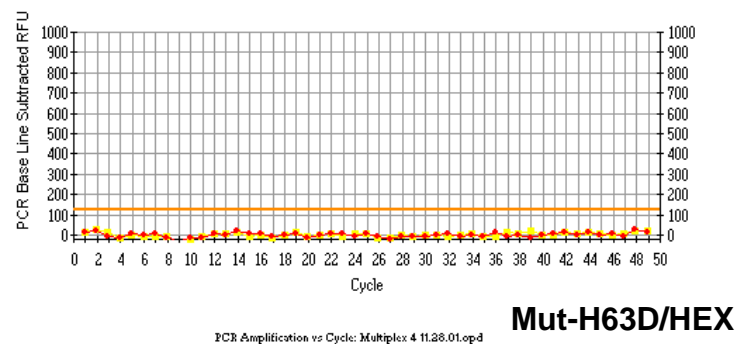
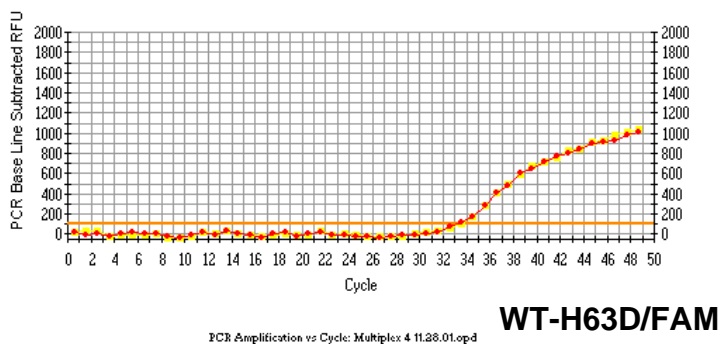


# Genotype: H63D突变体纯合子



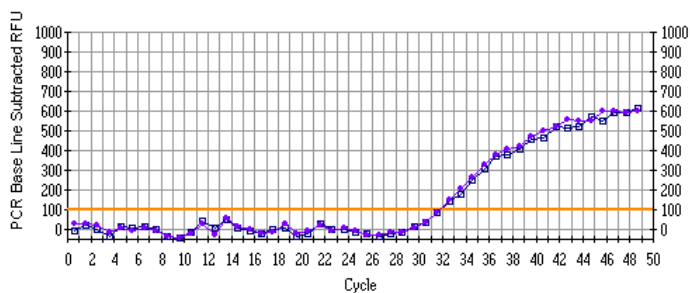


# Genotype: C282Y突变体纯合子



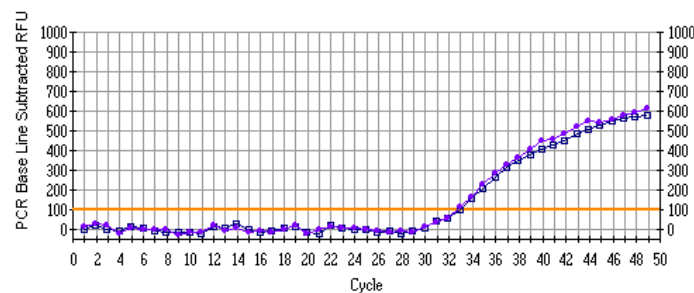


# Genotype: H63D杂合子



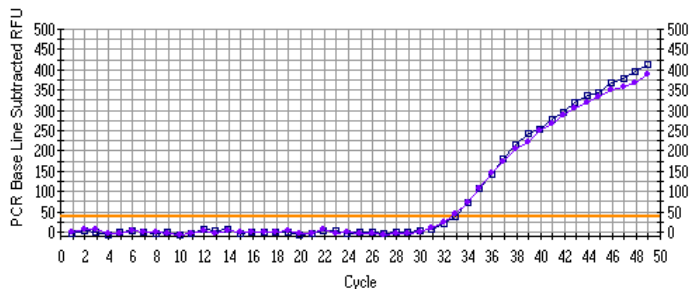
**WT-H63D/FAM**

PCR Amplification vs Cycle: Multiplex 4 11.28.01.opd



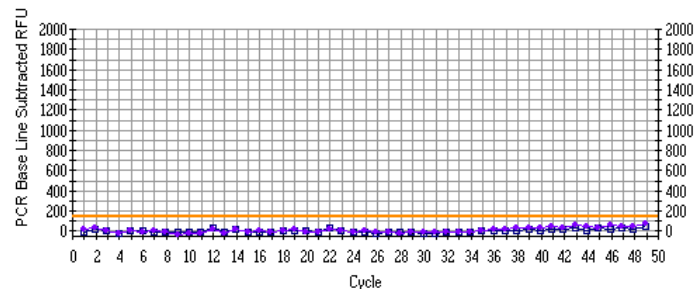
**Mut-H63D/HEX**

PCR Amplification vs Cycle: Multiplex 4 11.28.01.opd



**WT-C282Y/TX**

PCR Amplification vs Cycle: Multiplex 4 11.28.01.opd

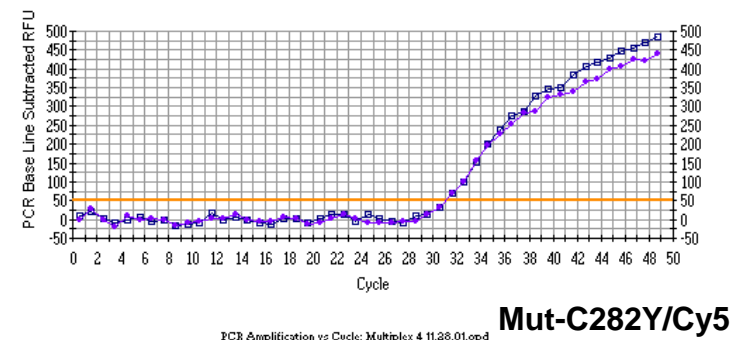
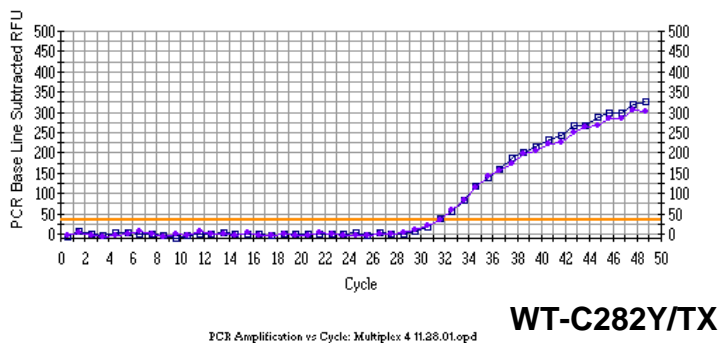
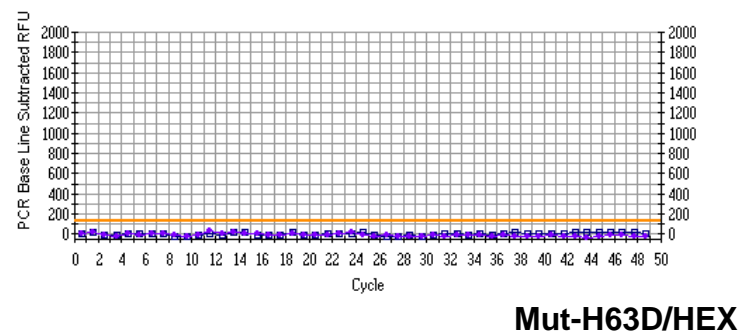
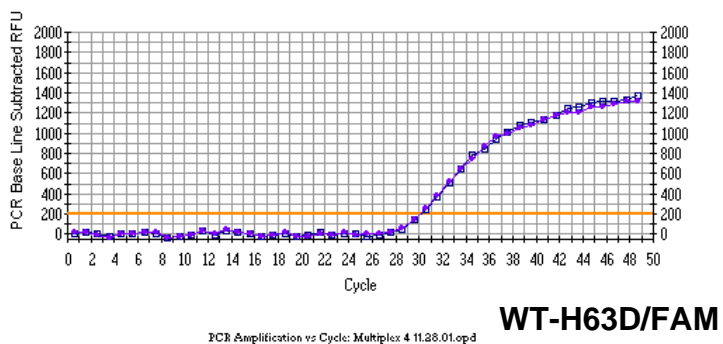


**Mut-C282Y/Cy5**

PCR Amplification vs Cycle: Multiplex 4 11.28.01.opd

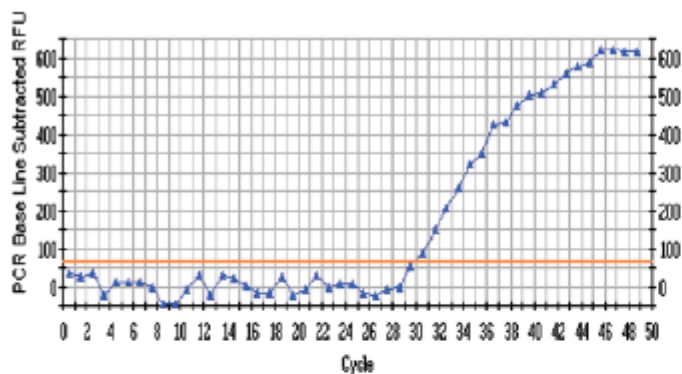


# Genotype: C282Y杂合子

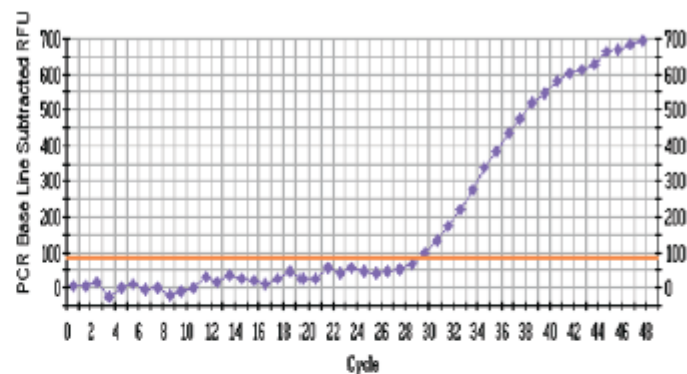




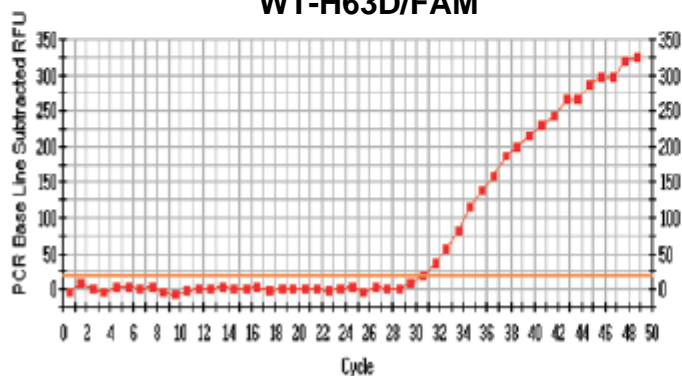
# Genotype: H63D/C282Y杂合子



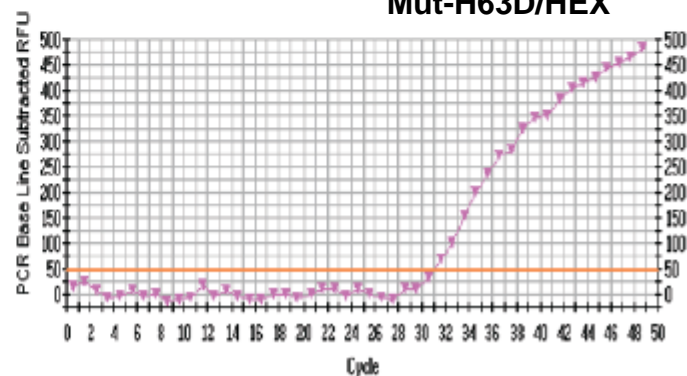
WT-H63D/FAM



Mut-H63D/HEX

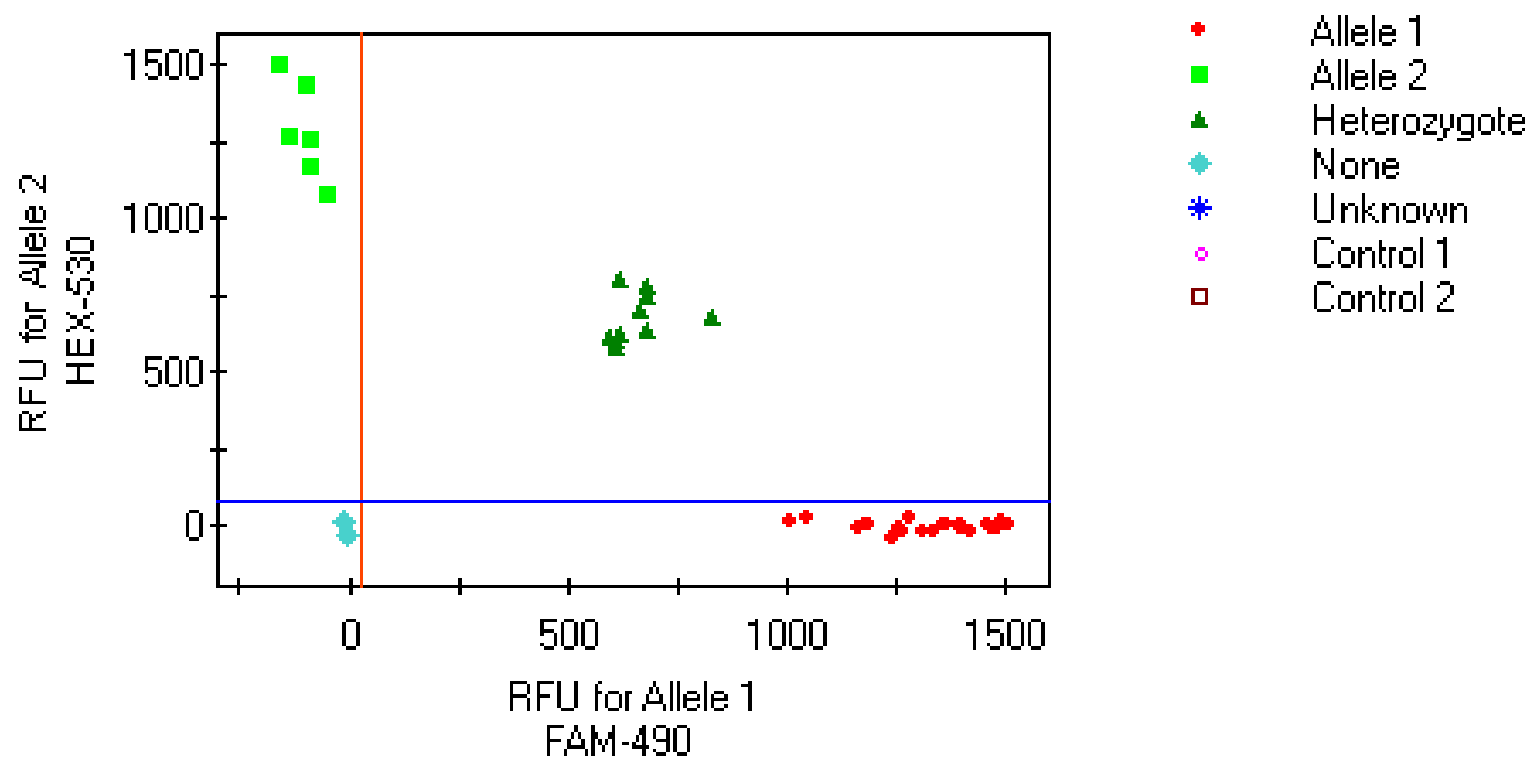


WT-C282Y/TX

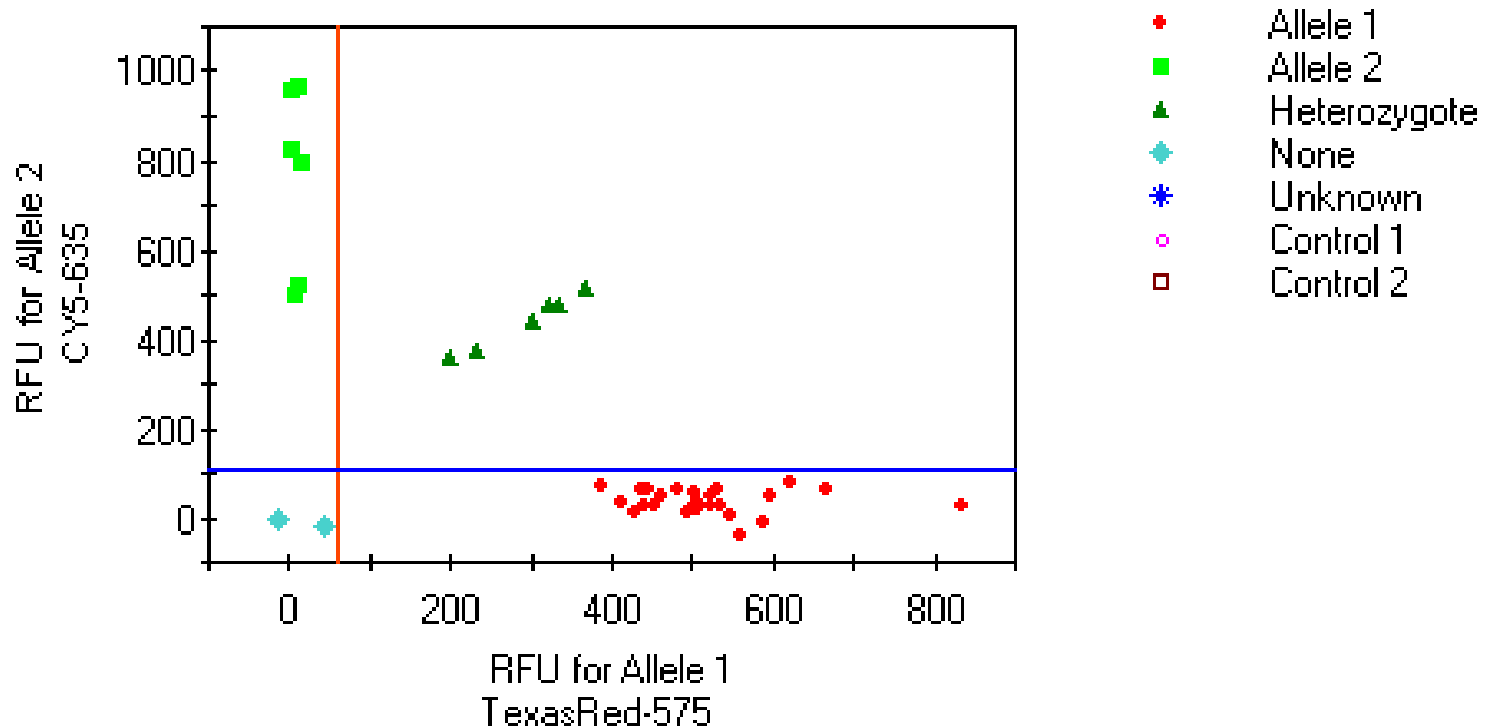


Mut-C282Y/Cy5

# H63D data



# C282Y data





# SNP分析-实验

	Genotype	Num	Flour
	WT	9	FAM TX RED
C282Y	突变体纯合子	6	CY5
	杂合子	5	CY5/TX RED
H63D	突变体纯合子	6	HEX
	杂合子	8	FAM/HEX
C282Y/H63D	杂合子	3	CY5/TX RED/ FAM/HEX





# Applications for HRM

- 基因的突变扫描。测序前检测杂合子 **SNP** 、区段 / 碱基缺失、前后重复、杂合子缺失。
- **HLA** 基因组配型
- 等位基因频率分析
- 物种鉴定、品种鉴定
- 甲基化研究
- 法医学鉴定、亲子鉴定。

# Bio-Rad HRM Workflow

## Set up reactions using HRM compatible reagents

*SsoFast EvaGreen Supermix*

## Run PCR protocol for amplification followed by High Resolution Melt on CFX96 or CFX384

*98° C for 2 min*

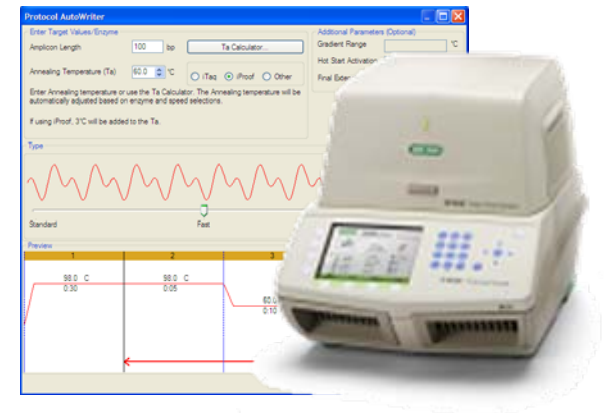
*98° C for 2-5s*

*55-60° C for 2-10sec (plate read)*

*Go to step 2, 39 more times*

*Melt curve 65° C to 95° C increment*

*0.2° C 5-10 sec hold (plate read)*



## Open Precision Melt Analysis software

Import CFX Manager data file (.pcrd) to create Melt file (.melt)



# Experiment Considerations

- Ensure a single product is amplified at high reaction efficiency 特异扩增，且具有较高扩增效率
- Aim for uniformity in reaction mix/sample concentrations DNA浓度及体系一致性
- Ensure sufficient PCR product is generated ( $C(t) \leq 30$ ) Ct值低于30，那么该样品的HRM分析可以不必考虑DNA模板质量的影响
- Analyze short PCR products, smaller the better 片段越小，特异性越强
  - 100-250bp for SNP identification 100-250bp适于SNP分析
  - For longer sequences, consider melt domain complexity (M-fold) 针对长片段，Mfold评估二级结构
  - Avoid areas of secondary structure and high GC content 避免二级结构和高GC含量
- Capture data over at least  $10^\circ\text{C}$  大于 $10^\circ\text{C}$  信号收集范围
- Use primer concentrations  $<300\text{nM}$  as excess primers can encourage primer dimers 引物浓度 $<300\text{nM}$ ，防止引物二聚体扩增

# SNP Genotyping

- Identify samples containing known single nucleotide polymorphisms
- Not all SNPs are equally easy to differentiate

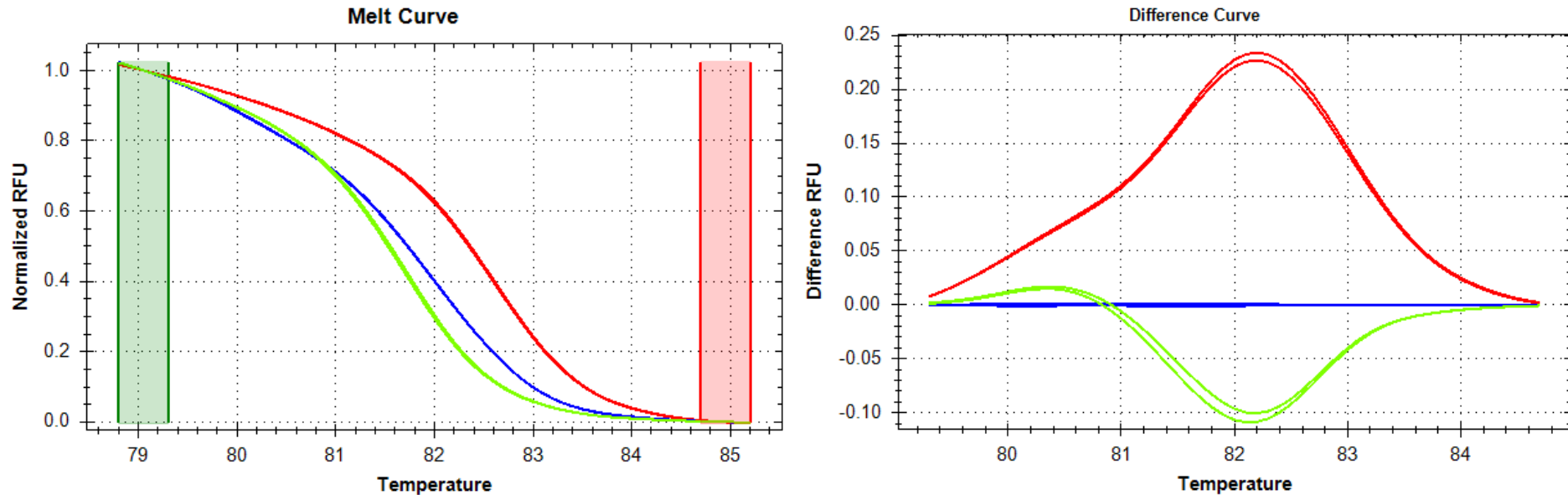
Difficulty	SNP Class	Base Change	Typical $T_m$ Melt Curve Shift	Rarity (in the human genome)
	1	C/T and G/A	Large (>0.5°C) ↓	64%
	2	C/A and G/T		20%
	3	C/G		9%
	4	A/T	Very Small (<0.2°C)	7%

*SNP classes as defined by Venter et al. (2001).*

SNP 是指基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA 序列多态性,在群体中的发生频率不小于1 %。包括单个碱基的**转换**、**颠换**、**插入和缺失**等。所谓转换是指同型碱基之间的转换,如嘌呤与嘌呤( G2A )、嘧啶与嘧啶( T2C ) 间的替换;所谓颠换是指发生在嘌呤与嘧啶(A2T、A2C、C2G、G2T) 之间的替换。依据排列组合原理,SNP 一共可以有6种替换情况,即A/ G、A/ T、A/ C、C/ G、C/ T 和G/ T,但事实上,转换的发生频率占多数,而且是C2T 转换为主,其原因是Cp G的C 是甲基化的,容易自发脱氨基形成胸腺嘧啶T, Cp G 也因此变为突变热点。

# SsoFast EvaGreen & SNP Genotyping

## Discrimination of a Class 2 SNP



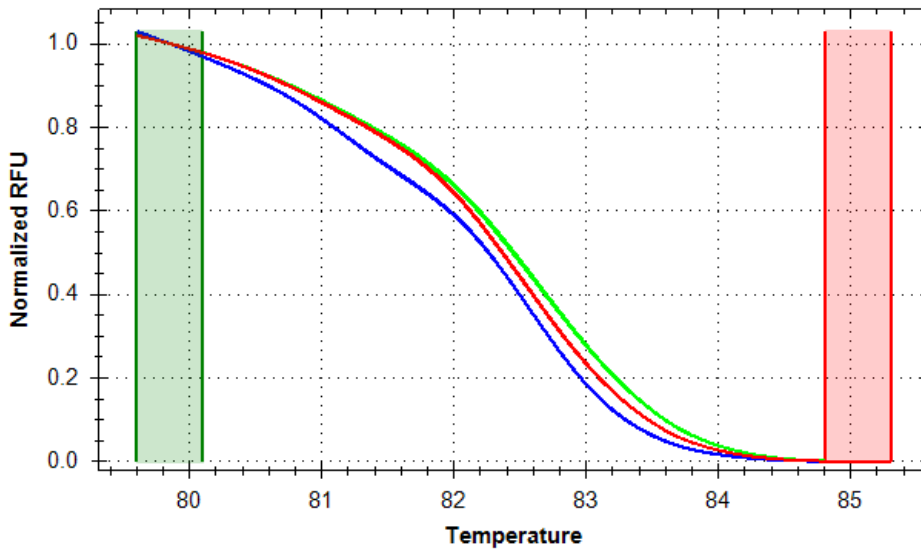
### G→A Mutation

- (—) G:G – Wild-type
- (—) A:A – Homozygous Mutant
- (—) G:A – Heterozygous

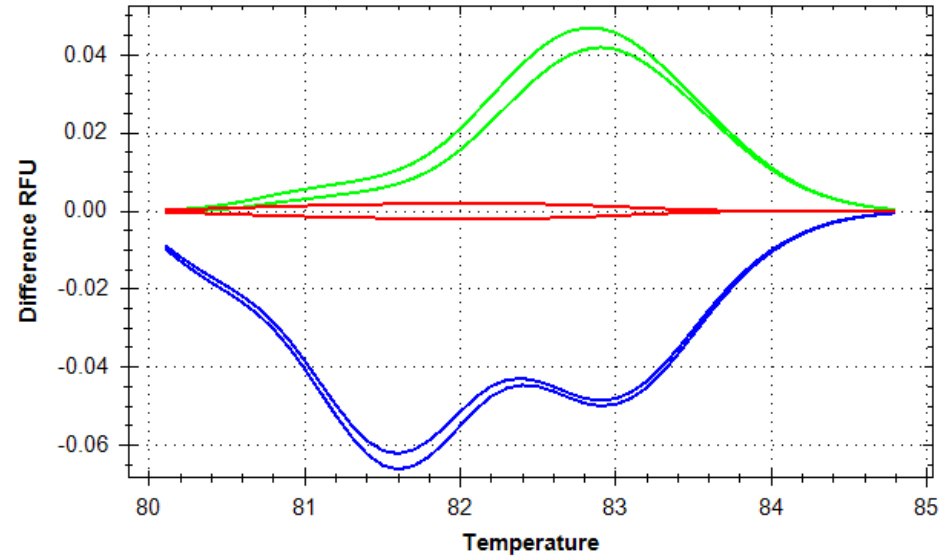
# SsoFast EvaGreen & SNP Genotyping

## Discrimination of a Class 4 SNP

Melt Curve



Difference Curve



### A→T Mutation

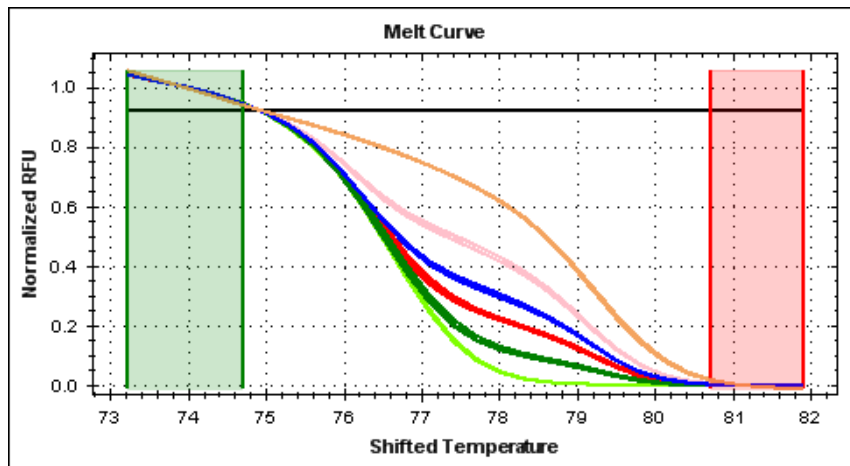
(—) A:A – Wild-type

(—) T:T – Homozygous Mutant

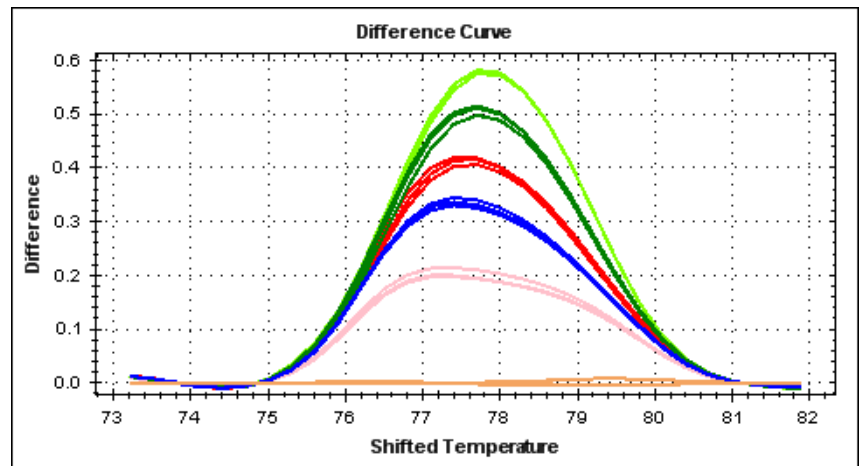
(—) A:T – Heterozygous

# Methylation Studies – CGU (Taipei)

Temperature shifted



Difference curve

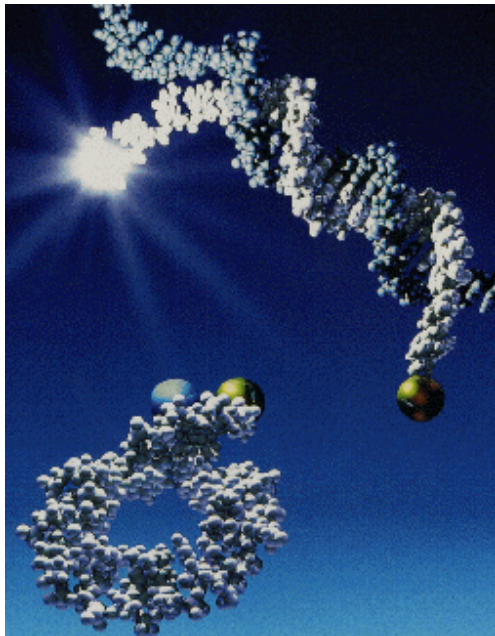






# 实时定量PCR对食品中病原微生物检测

—利用分子信标进行食品中李斯特单增菌检测



# 实验材料与amp;方法

- 试剂：  
    IQ-CHECK LISTERIA MONO II
- 仪器：  
    VORTEX DISRUPTOR细胞破碎仪  
    IQ5实时荧光定量PCR系统
- 对照样本：  
    阳性肉制品、阴性肉制品
- 待测样本：  
    肉类×2  
    牛奶×1  
    罐头鱼×1



2007-7-12北京市CDC营养与食品卫生所

# 病原菌检测程序

样本 增菌培养



DNA 提取



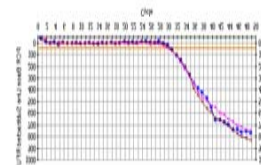
PCR 扩增

&

定量检测



检测结果



伯  
乐

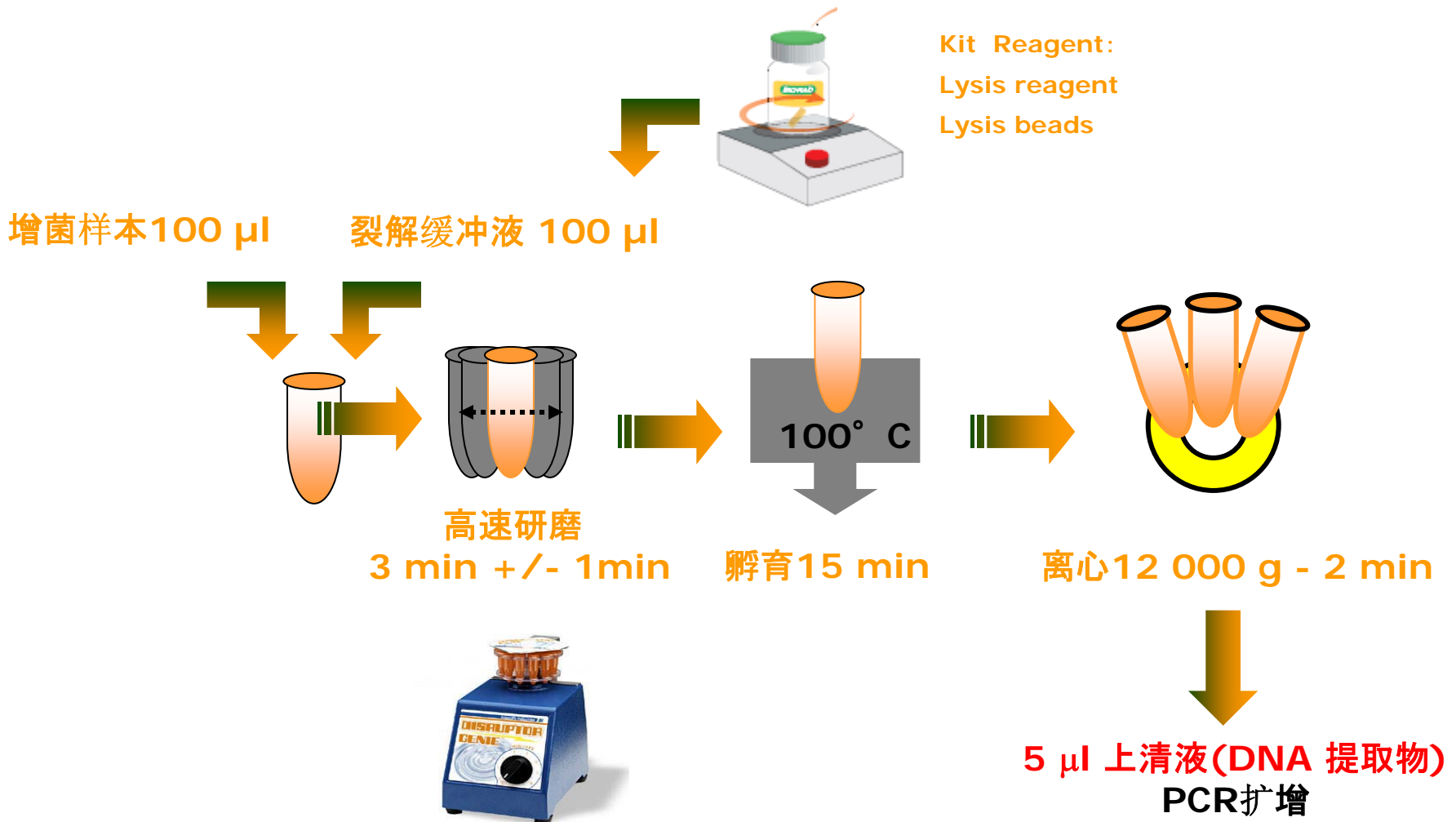
# 样品制备—增菌

- 25 g 食品
- 225 ml LSB 培养基
- 灭菌均质器
- 过夜培养
  - 李斯特单增菌 - 30℃  
培养25 hours +/- 1 hour



大块的食物，在收集前避免晃动均质器  
所有样本只有一次过夜增菌培养




# 样品制备—DNA提取



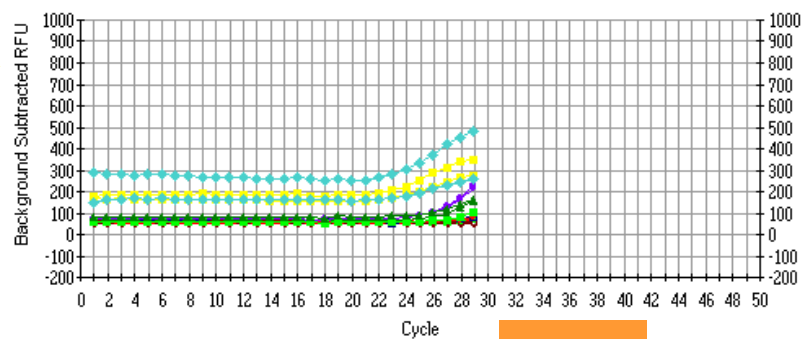
# PCR 扩增



开始扩增

	DNA提取液	5 $\mu$ l
	荧光探针	5 $\mu$ l
	扩增预混液	40 $\mu$ l
总体积/管		50 $\mu$ l

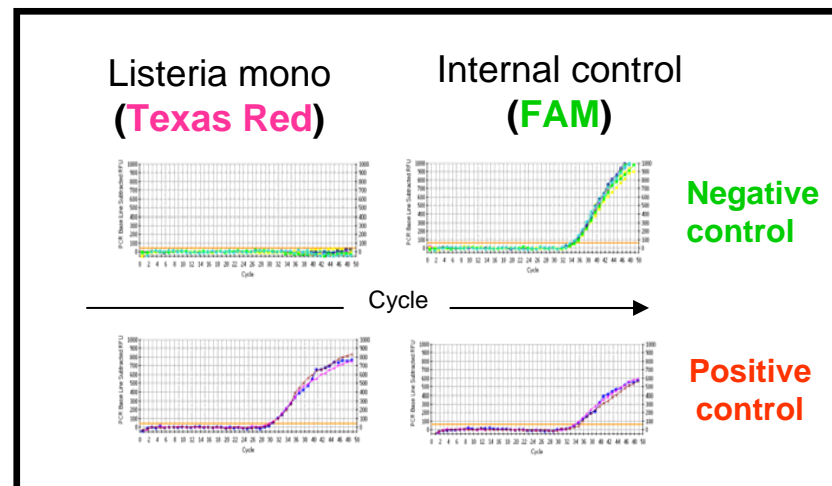
荧光信号强度



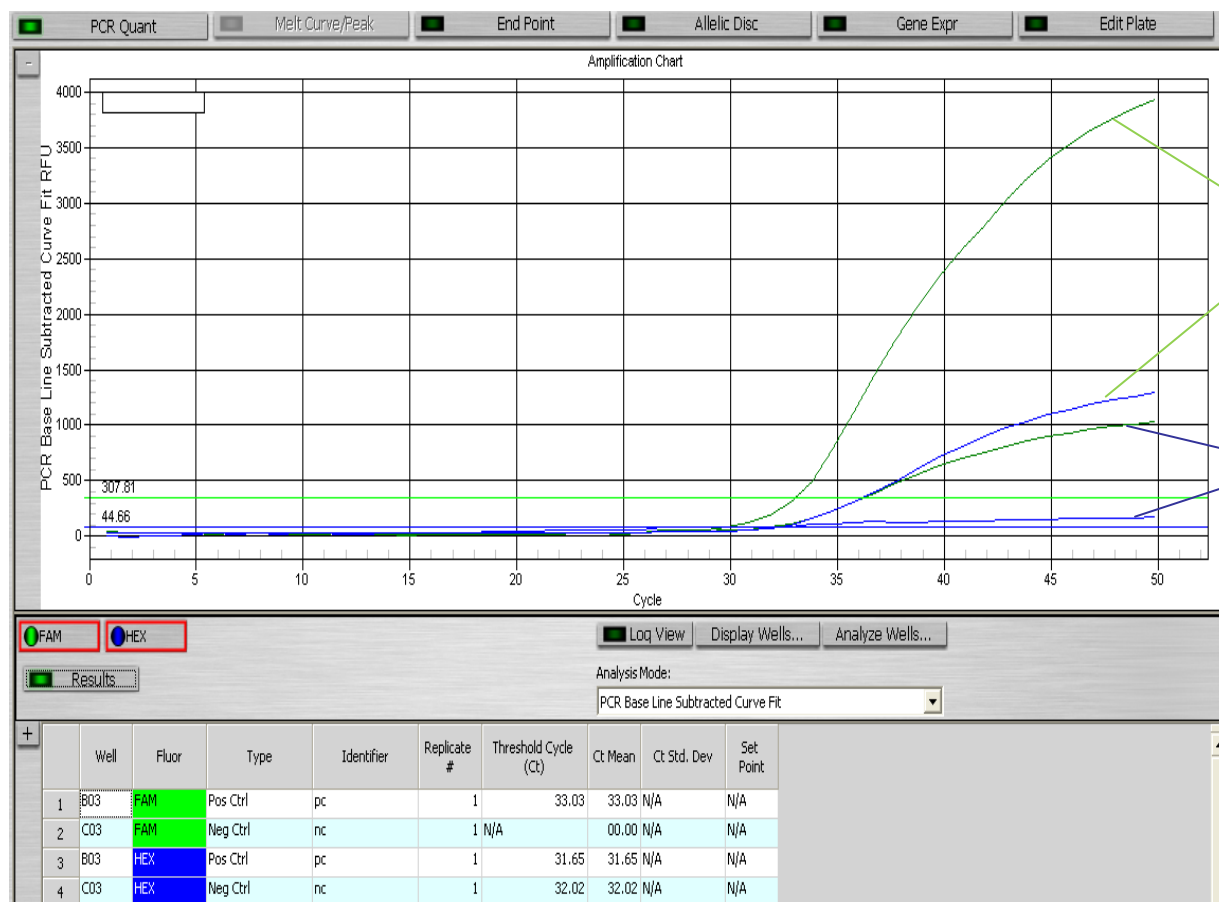
循环数

# 结果分析

	Listeria mono detection (Texas-Red)	Internal Control detection (FAM)
对照:		
阳性对照	$26 < C_T < 36$	Not significant
阴性对照	$C_t = N/A^*$	$30 < C_T < 40$
Samples:		
Positive sample	$C_T \geq 10$	Not significant
Negative sample	$C_t = N/A^*$	$C_T > 10$
Inhibited sample	$C_t = N/A^*$	$C_t = N/A^*$



# 结果分析-阴阳性对照



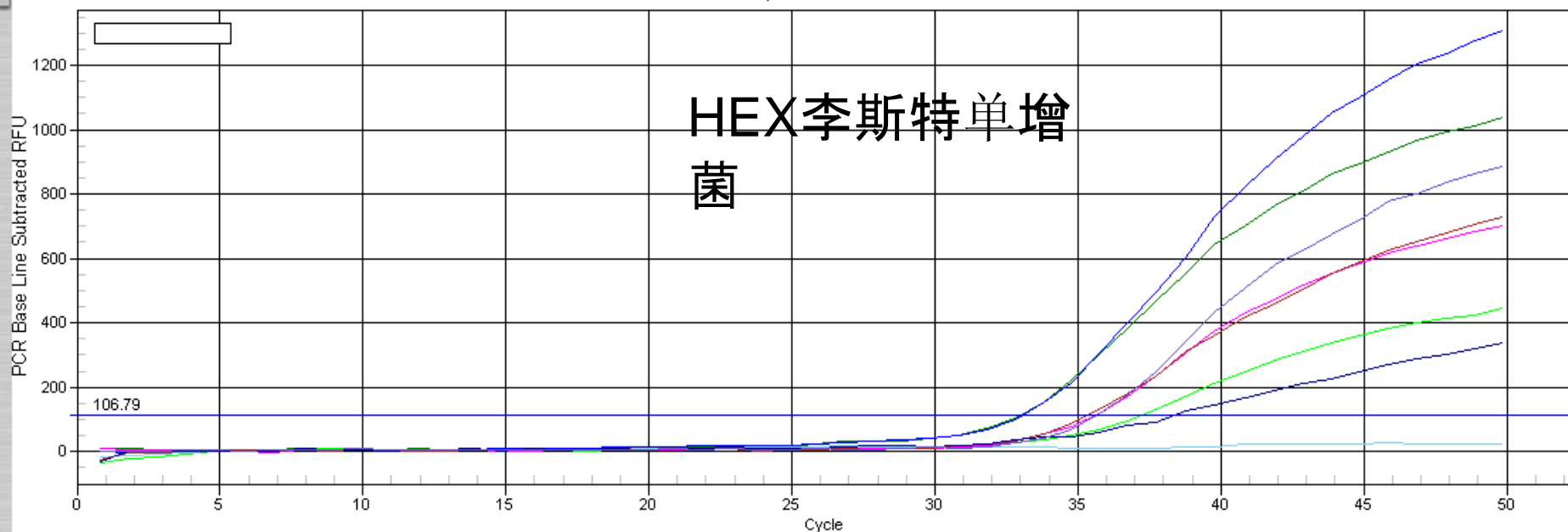
阳性对照

阴性对照



# 结果分析-待测样本

Amplification Chart



☒ FAM
 ☒ HEX

☒ Results
 Analysis Mode:

	Well	Fluor	Type	Identifier	Replicate #	Threshold Cycle (Ct)	Ct Mean	Ct Std. Dev	Set Point
1	B02	FAM	Unkn	1 neg sample	1	32.53	32.53	N/A	N/A
2	B03	FAM	Pos Ctrl	pc	1	33.84	33.84	N/A	N/A
3	C02	FAM	Unkn	2 pos sample	2	25.18	25.18	N/A	N/A
4	C03	FAM	Neg Ctrl	nc	1	N/A	00.00	N/A	N/A
5	D02	FAM	Unkn	3	3	36.25	36.25	N/A	N/A



Current date : 7/5/2007 10:03:59 AM  
 User : cs  
 Instrument used : iQ5  
 PCR data file name :  
 Kit lot number : 3578124

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B		1 neg sample Negative	pc Valid										B
C		2 pos sample Positive	nc Valid										C
D		3 Positive											D
E		4 Positive											E
F		5 Positive											F
G		6 Positive											G
H													H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Negative control	
Criteria	Calculated Ct :
Target Ct = N/A	N/A
Internal control 28 < Ct < 40	32.02
Valid	

Sample interpretation		
Target	Internal control	Interpretation
Ct > 10		Positive
Ct = N/A	Ct > 28	Negative
Ct = N/A	Ct = N/A	Inhibition

Positive control	
Criteria	Calculated Ct :
Target 26 < Ct < 36	34.29
Internal control	31.65
Valid	



Well	Sample id	Ct target	Ct Internal Control	Result
B2	1 neg sample	N/A	35.39	Negative
C2	2 pos sample	21.20	N/A	Positive
D2	3	36.79	33.97	Positive
E2	4	33.88	33.98	Positive
F2	5	27.13	43.91	Positive
G2	6	42.91	34.38	Positive
B3	pc	34.29	31.65	Valid
C3	nc	N/A	32.02	Valid

快捷方式 到 iqca.lnk



谢谢！

