

Promega Technologies- **实时荧光定量PCR: Workflow**



2012

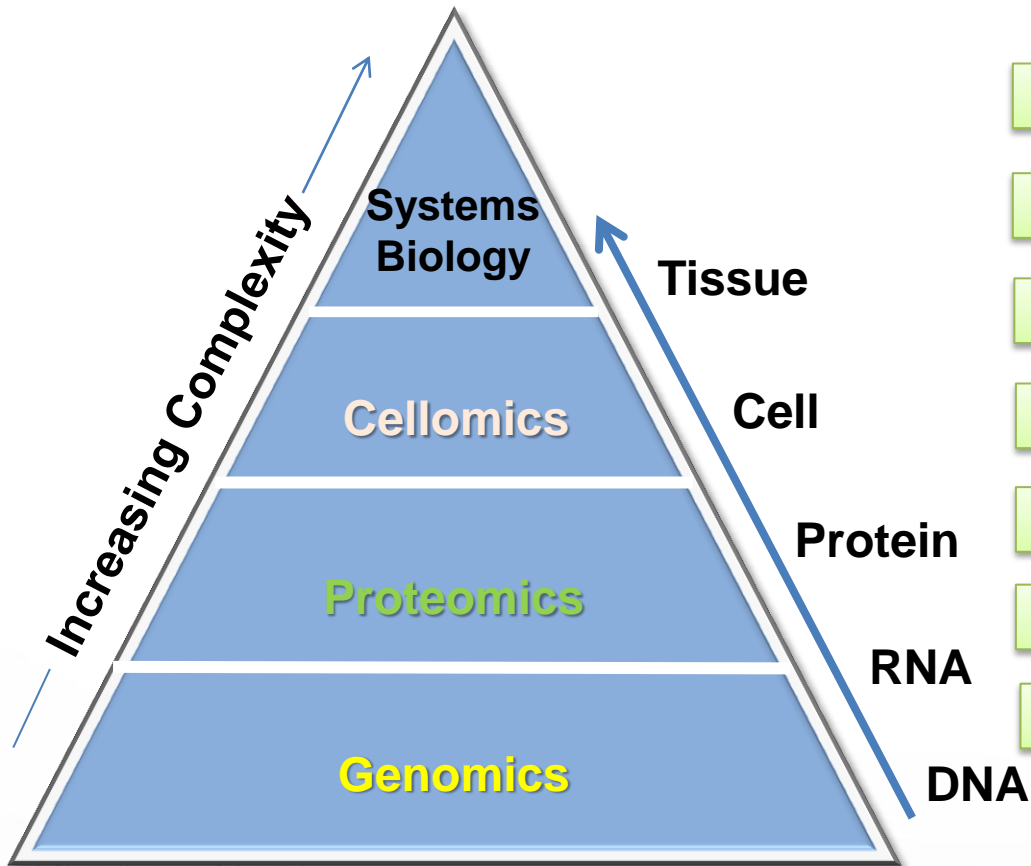
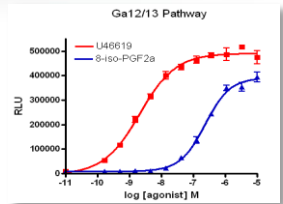
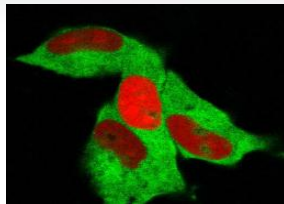
Bill SUN
Technical Sales Specialist



Promega World-Wide Connection



Promega Provides Outstanding Life Science Research Tools



- Little Animal Imaging

- Cellular Analysis

- Protein Protein Interaction

- Cell-Free Protein Expression

- Drug Screening Research Tools

- Epigenetics Research Tool

- DNA , RNA Purification and Analysis

实时荧光定量PCR: Workflow



RNA质量判断



1. RNA浓度:

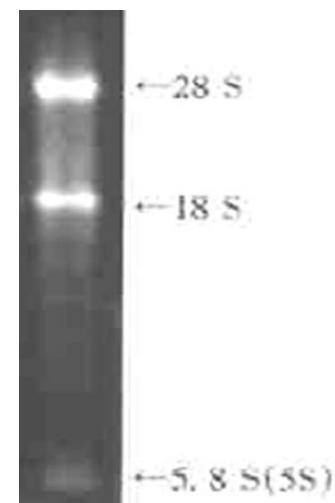
1 OD260=40 $\mu\text{g/ml}$

2. RNA纯度:

OD260/OD280 ≥ 1.7

3. RNA完整性:

取约1 μg RNA，在1%琼脂糖胶中电泳
典型的结果如右图所示:



RNA纯化方法



柱膜法: SV Total RNA Isolation System, Z3100

特点	Trizol法	柱膜法
RNA产量	++++	++
RNA纯度	++	++++
DNA污染	+++	-
RNA完整性	++	++++
操作时间	长	短

RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101)



裂解细胞

加入异丙醇, 震荡5秒

准备吸附柱

1. 裂解物上柱离心;
2. DNA酶消化;
3. 清洗RNA

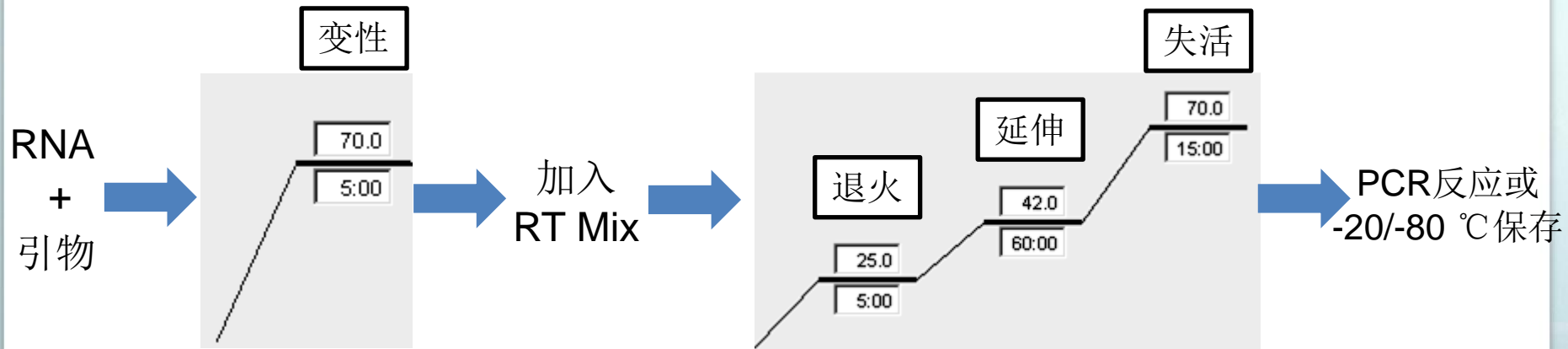
洗脱至DEPC水

RNA反转录——一般注意事项

1. 扩增前与扩增后的处理分开在不同的区域进行，并使用专用的移液器；
2. 戴手套操作并经常更换；
3. 使用带滤芯枪头；
4. 使用无菌、无核酸酶、低挂壁的管子；
5. GoScript™ Reverse Transcriptase, GoScript™ 5X Reaction Buffer 和PCR Nucleotide Mix置于冰上融化，勿加热融化；



Protocol——GoScript反转录



条件优化：模板RNA与引物

Components	Amount
Experimental RNA (up to 5µg/reaction)	X µl
Oligo(dT) (0.5 µg/reaction) and/or Random Primer (0.5 µg /reaction) or gene-specific primer (20 pmol /reaction)]	X µl
Nuclease-Free Water	X µl
Final volume	5 µl

模板量：根据待测基因的丰度调整：1 pg – 5 µg。

引物选择：

1. 随机引物可以反转录总RNA；Oligo dT引物只能反转录带poly A尾的mRNA，不能反转录真核生物的部分无poly A尾的RNA（18s等）、原核生物RNA（细菌）；
2. 加入随机引物+Oligo dT组合可以提高反转录效率；
3. 基因特异的引物：与目的基因3'端配对的一条引物；
4. 引物浓度：Oligo dT 0.01–0.125 µg/µl，Random Primer 0.01–0.1 µg/µl，Gene-specific primer 0.5–1 µM。

条件优化: RT Mix

Components	Amount
Nuclease-Free Water (to a final volume of 15 μ l)	X μ l
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4 μ l
MgCl ₂ (final concentration 2.5 mM)	2 μ l
PCR Nucleotide Mix (final concentration 0.5 mM each dNTP)	1 μ l
RNasin® Ribonuclease Inhibitor (final concentration 1 U/ μ l) (optional)	0.5 μ l
GoScript™ Reverse Transcriptase	1 μ l
Final volume	15 μl

镁离子浓度:

1. GoScript™ 5X Reaction Buffer不含镁离子, 需要加入试剂盒中提供的25 mM 镁离子。
2. 绝大多数的反转录反应, 推荐镁离子终浓度2.5 mM, 即2 μ l/20 μ l体系。
3. 优化镁离子浓度时, 建议每0.25 mM为一个梯度, 在1.5 mM - 5 mM范围内优化。

条件优化：RT程序

变性：

1. 推荐70 °C，在65 °C - 75 °C范围内优化；
2. 复杂二级结构RNA升高温度以打破二级结构；长片段RNA降低温度保证RNA质量。
3. “warm-start” cDNA合成：复杂二级结构RNA的延伸，可在70 °C变性后直接加入RT Mix进行42 °C延伸。
4. 低灵敏度可以接受的话，取消变性阶段，直接将RNA模板、引物、与RT Mix混合后延伸。

退火：延长退火时间至>5 min可以提高检测灵敏度。

延伸：

1. 延伸时间可以缩短至5 min；
2. 绝大部分cDNA合成在15 min内可以完成；
3. 长于12 kb的RNA，可降低延伸温度至42 °C-37 °C；
4. 复杂二级结构RNA，延伸温度升高至42 °C-55 °C；
5. 延长延伸时间>1 hr，可提高cDNA的产量；
6. 将延伸条件（42 °C，60 min）改为两步可提高反转录效率（如改成37 °C 1 min、50 °C 1 sec、40 cycle）。

GoScript™ Reverse Transcription System

最适温度



7.5Kb transcript RNA: oligo d(T) cDNA

延伸温度

37 °C 42 °C



GoScript™ Reverse Transcriptase

最适延伸温度 37 °C - 42 °C

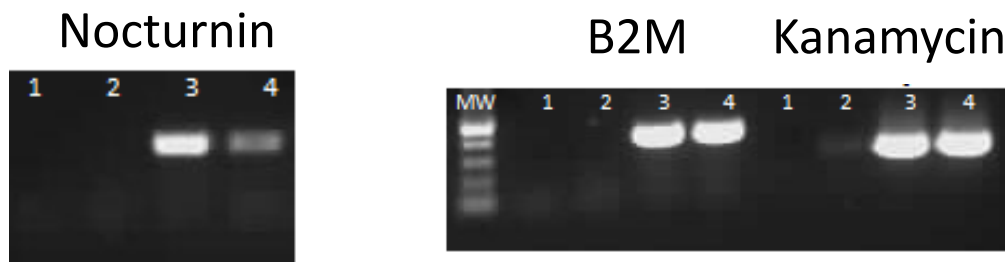


GoScript™ Reverse Transcription System

复杂二级结构RNA: 50℃ 孵育



普通PCR, 产物跑胶分析
Controls:



Loading Order: 1-NTC, 2-noRT control, 3-GoScript, 4-Company A

Real Time PCR定量

Sample	Nocturnin	B2M
GoScript	21.8 ± 0.4	16.7 ± 0.3
Company A	24.1 ± 0.5	16.6 ± 0.4

复杂结构RNA, 可调整孵育温度至50 °C-55 °C

GoScript™ Reverse Transcription System

抵抗抑制劑



RT	0	Ethanol (%)					
		0.1	0.5	1.0	5	10	20
GoScript	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Company A	++	++	++	++	++	++	+

RT	0	Hematin (μM)					
		1	5	10	20	40	60
GoScript	+++	+++	++	+	+	-	-
Company A	++	++	+	+	+	-	-

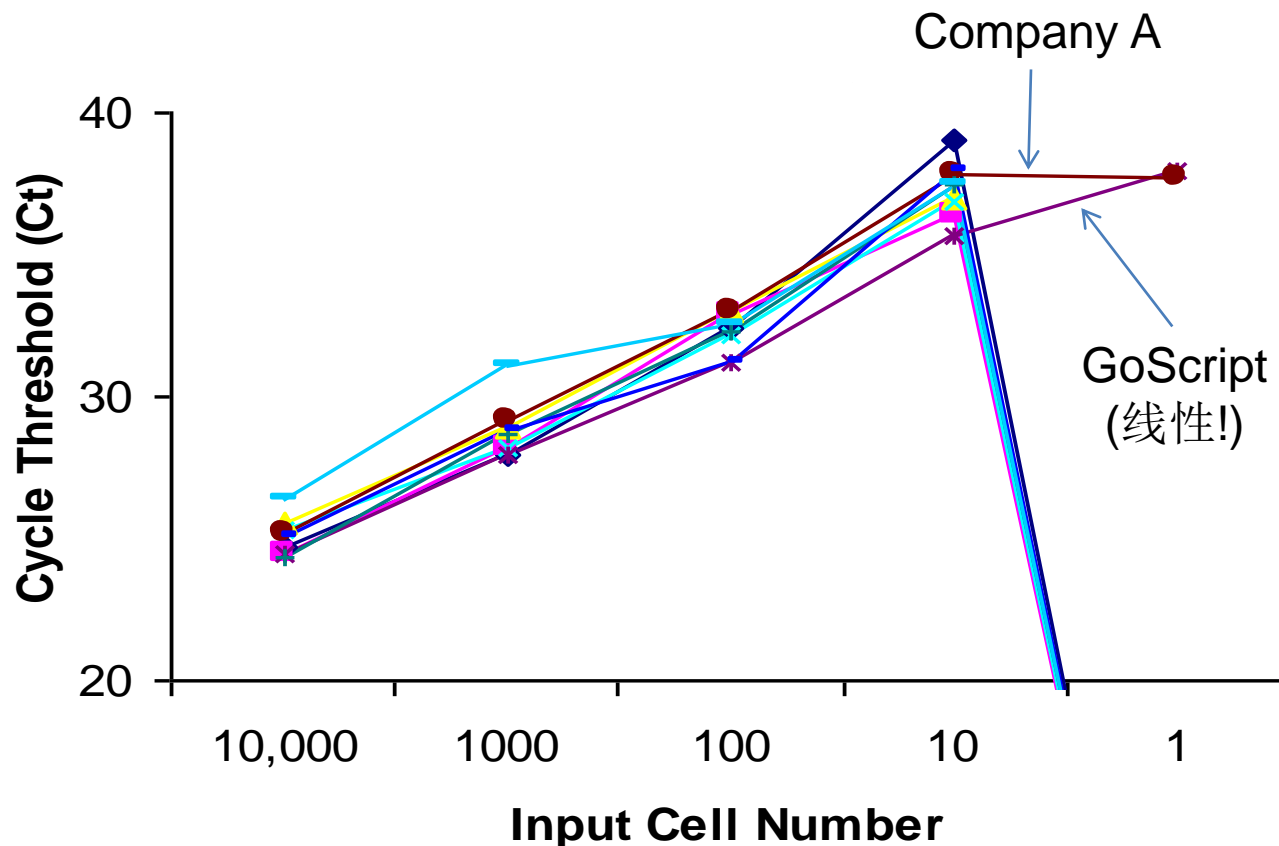
低浓度抑制剂存在时，不影响反转录效率！

8.9Kb 模板



GoScript™ Reverse Transcription System

灵敏度：扩增中等丰度基因 (Lamin A)



高灵敏度，可对单细胞内的基因表达进行定量

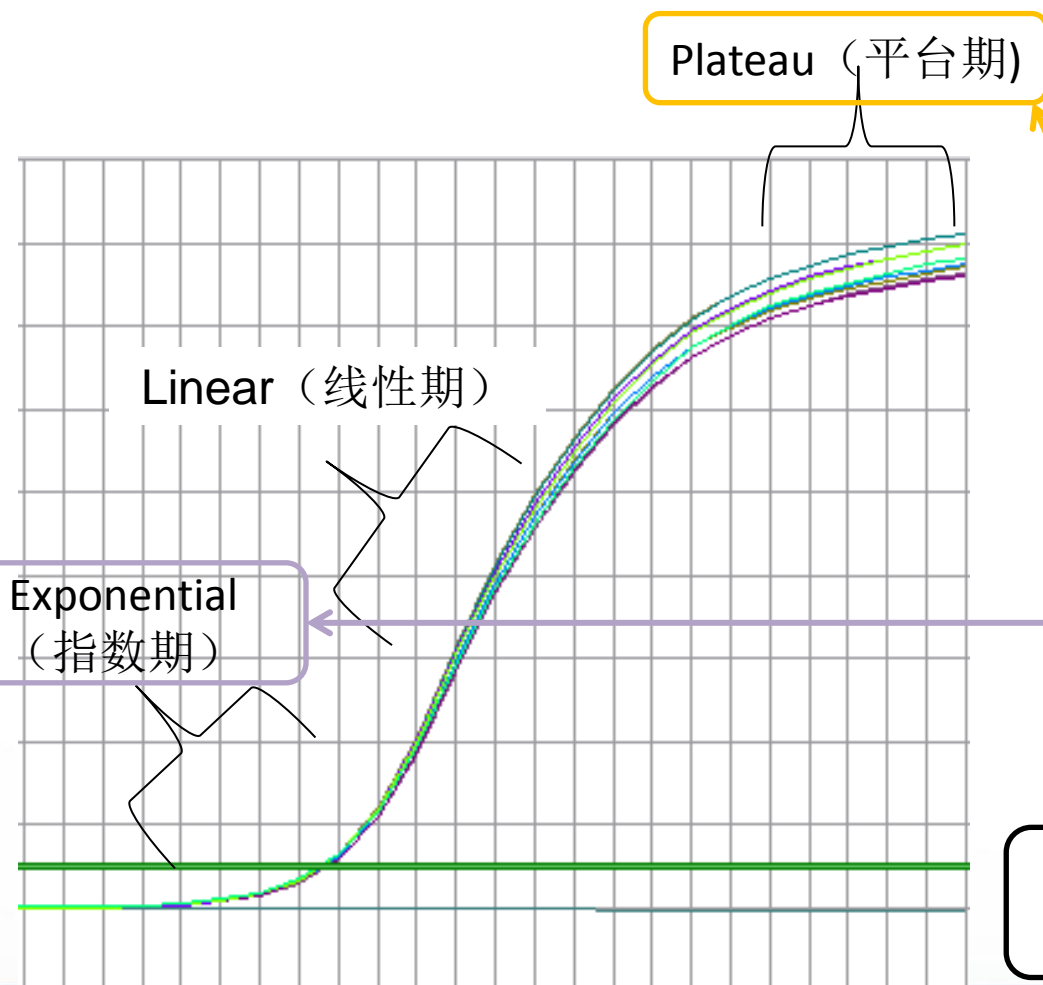
实时荧光定量PCR: Workflow



实时荧光定量PCR的背景及重要性



End-Point vs. Real-Time PCR(终点法与实时荧光定量PCR)



终点法PCR

- 对反应平台期的产物进行检测。

荧光实时定量PCR

- 实时检测指数扩增期的产物，可以对初始模板进行精确定量。

$$\text{PCR产物量} = \text{初始模板量} \times 2^N$$

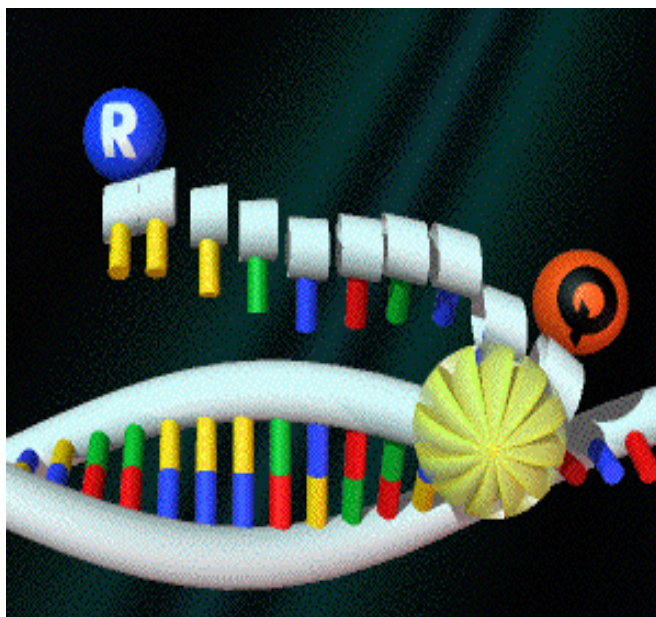
N=循环数

Leading Real-Time PCR Chemistries

实时荧光定量PCR原理

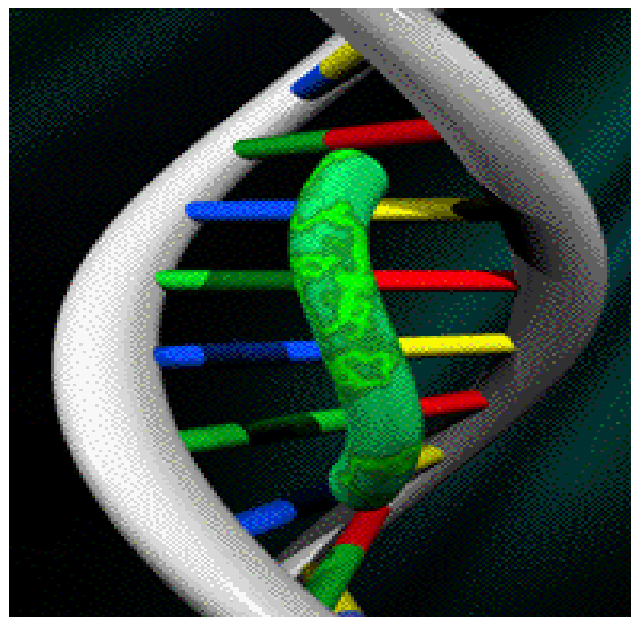


探针法



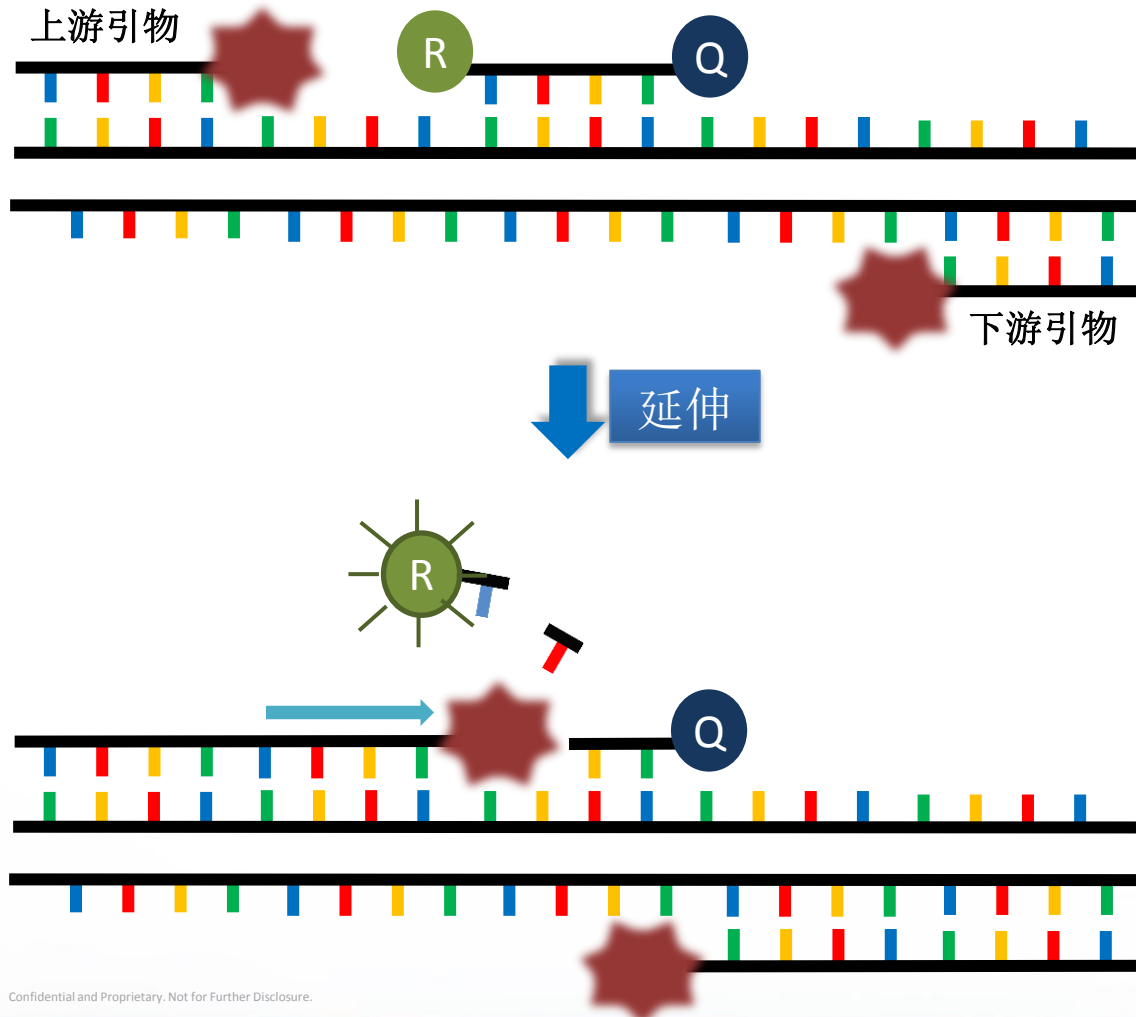
荧光基团标记的探针

染料法



结合DNA双链的染料

探针法原理——FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, 荧光共振能量转移)



具有5'外切酶活性的Taq DNA聚合酶



Reporter: 报告基团。
探针完整时报告基团发射的荧光被淬灭基团吸收，仪器检测不到荧光



Quencher: 淬灭基团。
与报告基团接近时吸收报告基团的荧光



发光的报告基团: 探针被切断后，报告基团与淬灭基团分离，报告基团的荧光被仪器检测到

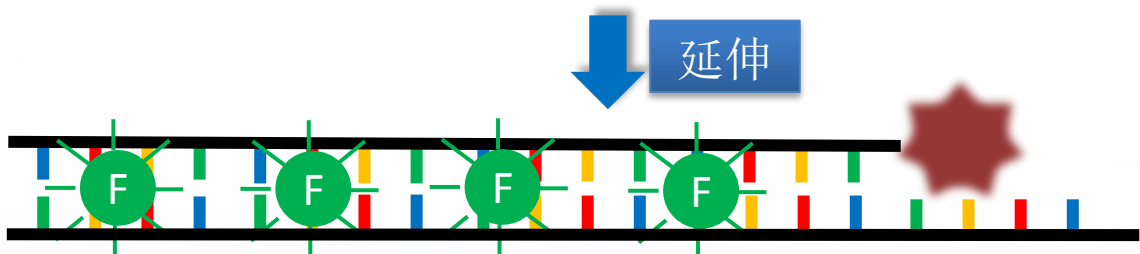
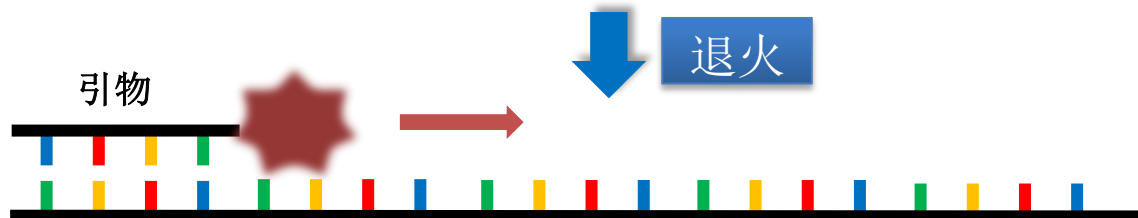
染料法原理——与双链DNA特异性结合的荧光染料



DNA聚合酶

染料在未结合双链DNA前不发荧光

染料结合双链DNA后受激发会发出荧光



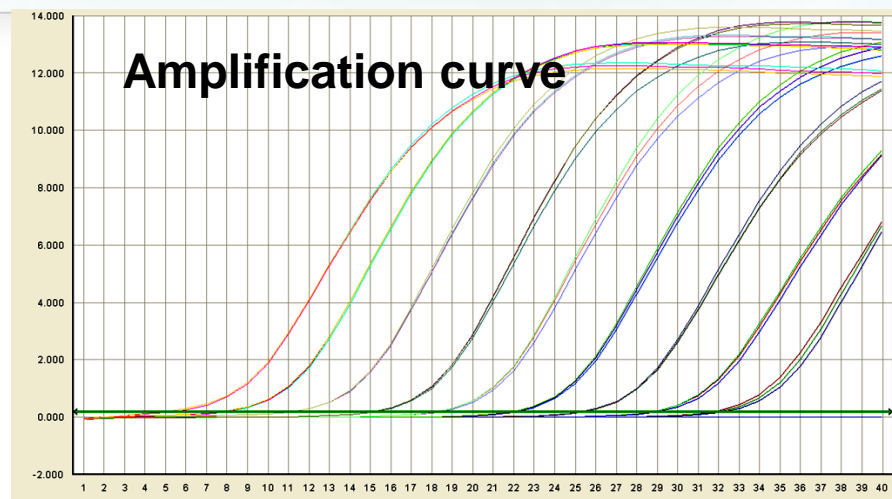
Real Time PCR: 探针法 vs 染料法



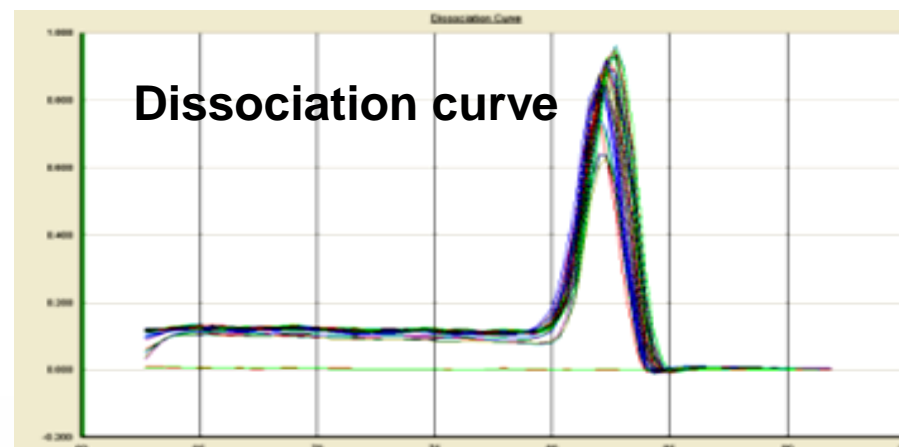
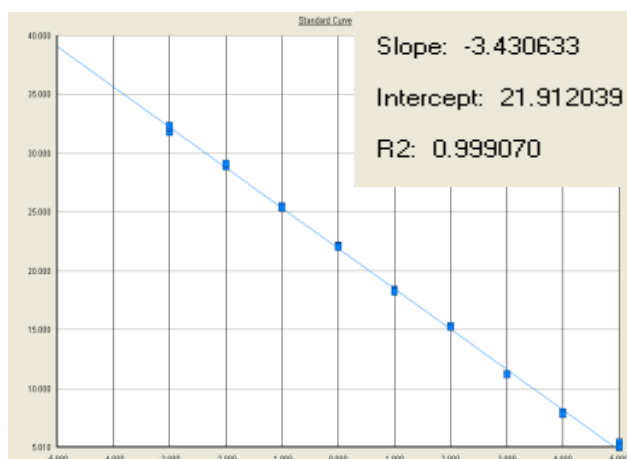
特点	探针法	染料法
多重PCR	++	-
灵敏度	+++	+++
特异性	+++++	++
溶解曲线分析	-	+++++
实验设计简易	++	+++++
Price	\$\$\$	\$



Real Time PCR数据分析



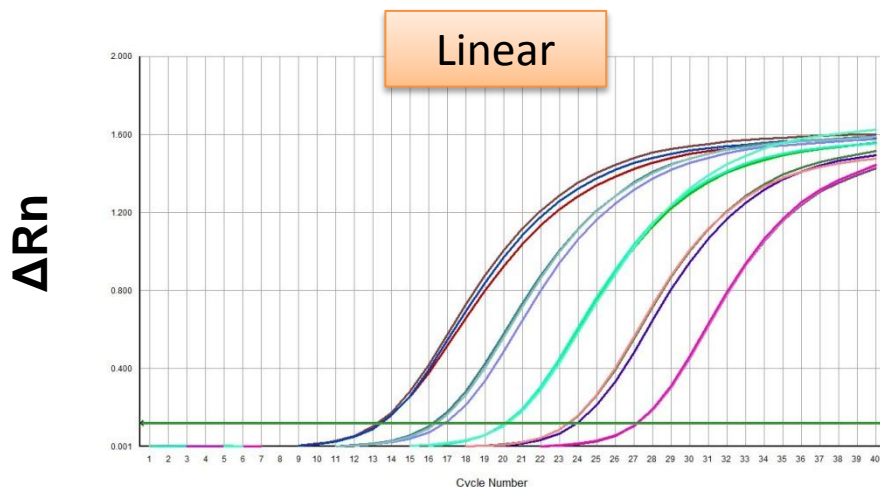
Standard curve



Real Time PCR数据分析：扩增曲线



Amplification curve (扩增曲线)



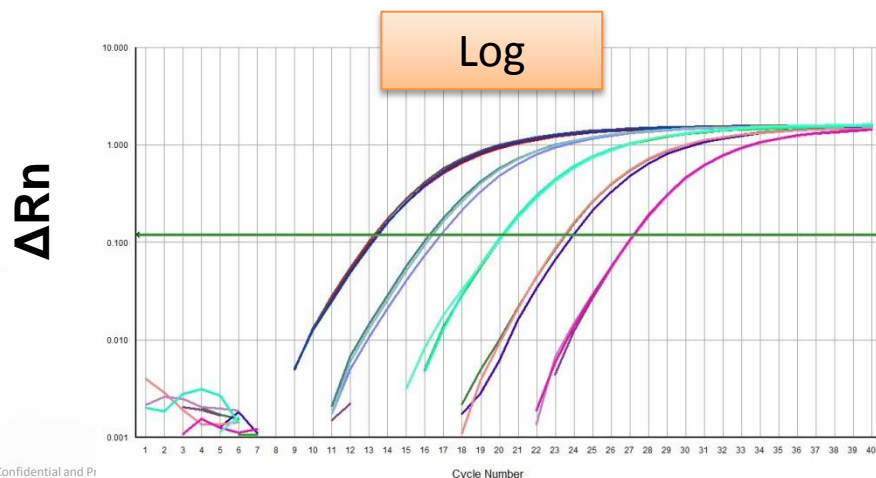
R_n: 一个反应管经 n 次热循环的荧光经参比荧光校正后的强度。

Baseline: 基线

ΔR_n : R_n 减去基线。

Threshold: 荧光 (R_n) 超过本底达到可检测水平时的临界数值。

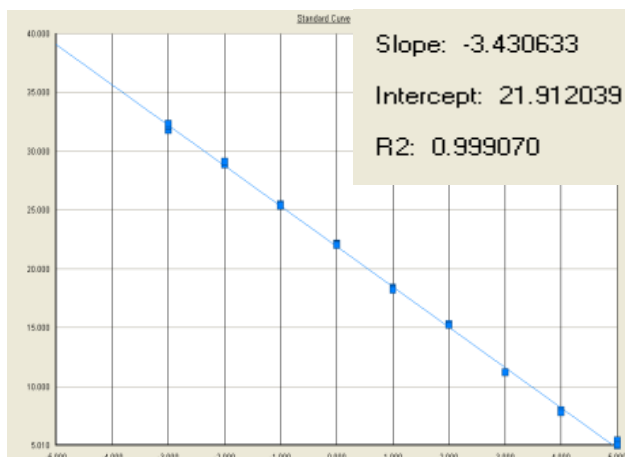
C_T: threshold cycle, 阈值对应的循环数



Real Time PCR数据分析：标准曲线



Standard curve



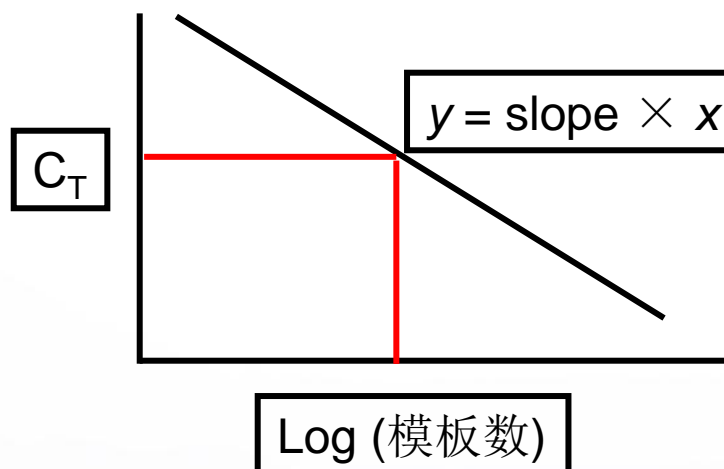
Slope(斜率): relates to efficiency

Intercept: C_T for 1 ng template

R²: linearity (线性度)

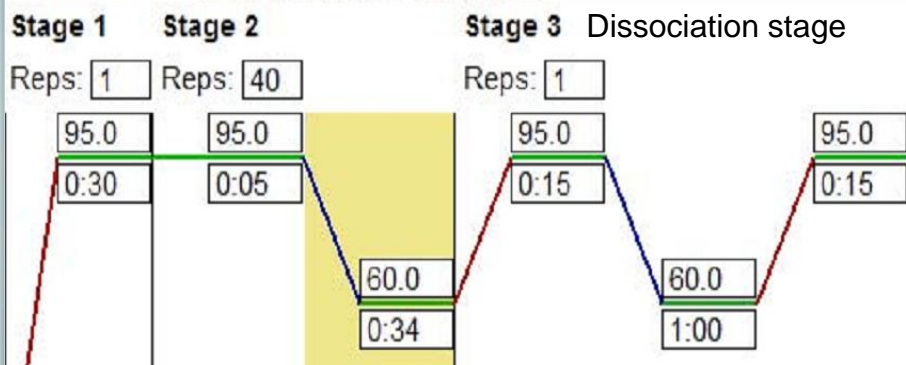
Efficiency: PCR efficiency (PCR扩增效率)

- 100% efficient: slope = -3.3
- Expect -3.3 ± 0.3

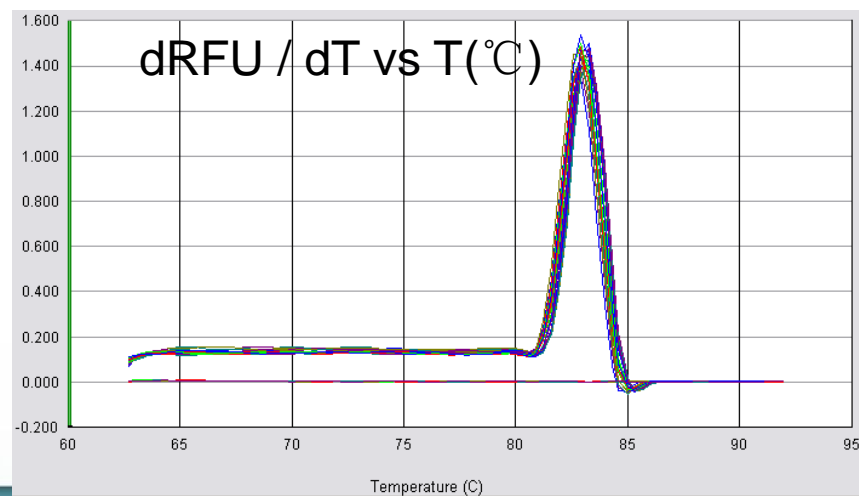
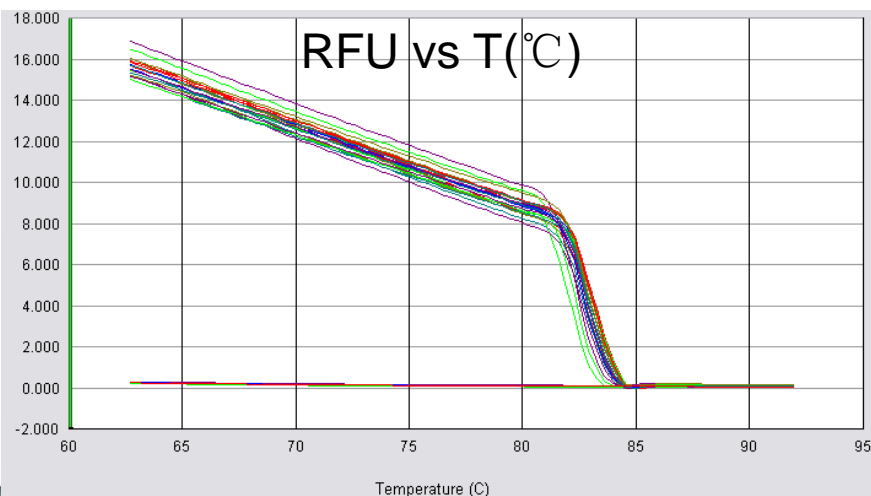


$$\text{Efficiency} = \left[10^{\left(\frac{-1}{\text{slope}} \right) - 1} \right] \times 100\%$$

Real Time PCR数据分析：溶解曲线



T_m : Melting Temperature (解链温度), PCR双链产物的退火温度。

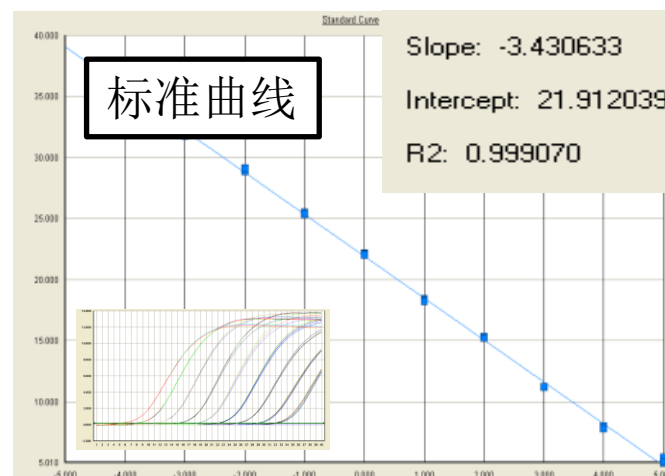
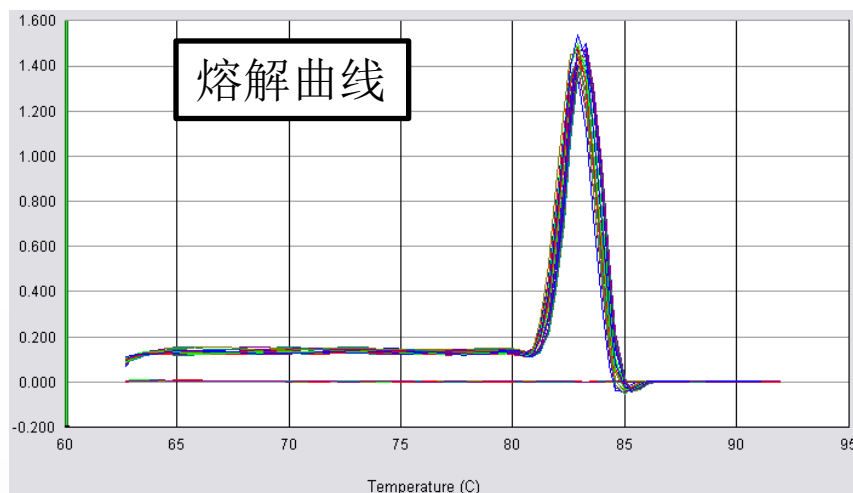
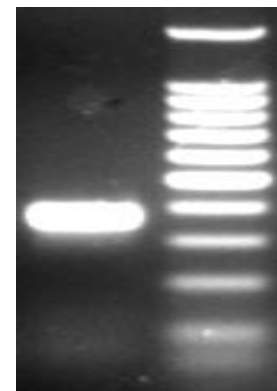


实时荧光定量PCR-质量控制



引物质量的判断（预实验时针对靶基因设计2-3对引物，比较下列参数）：

1. 特异性：熔解曲线要保证是单峰，产物跑胶验证分子量；
2. 灵敏度：同一个样本的检测，Ct值越小越好；
3. 扩增效率：越接近100%越好，通常在90%-110%之间



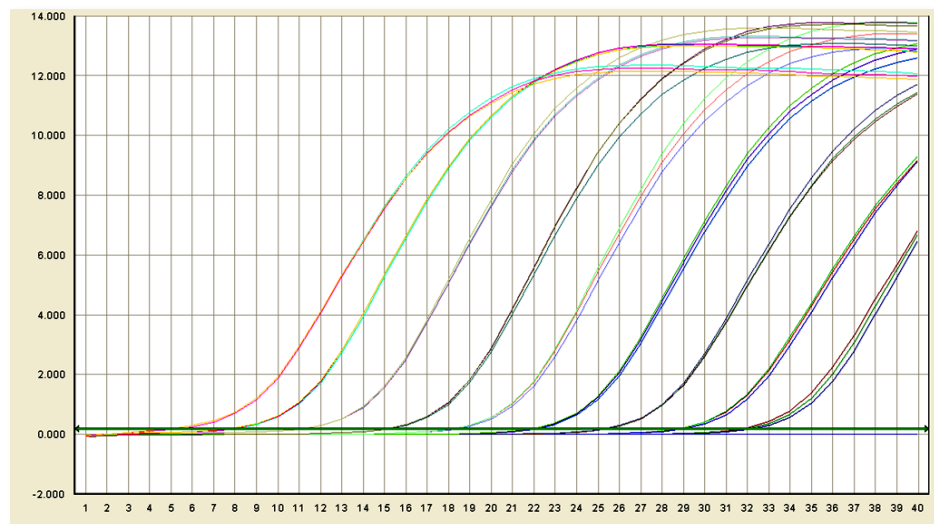
Real Time PCR数据分析:

绝对定量 vs 相对定量



绝对定量：标准曲线.

1. 构建含目的片段DNA的标准品模板
2. 测定纯化模板的 A_{260} ，使用下面的公式计算模板每微升的绝对拷贝数:



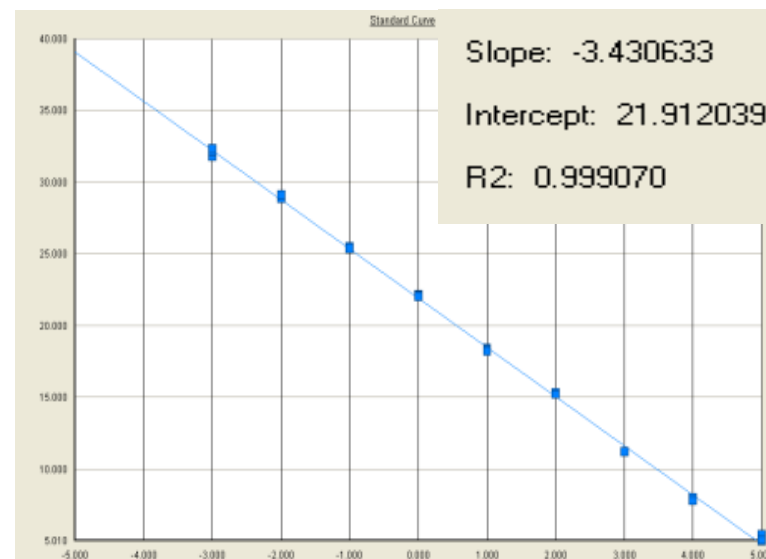
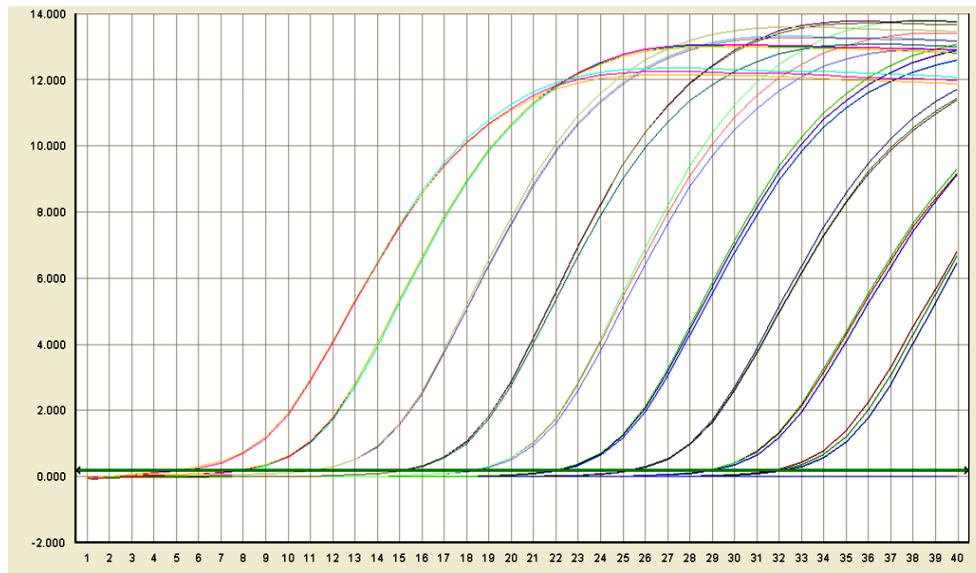
$$\text{DNA (copy/ } \mu\text{L)} = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{copy/mol}) \times \text{DNA concentration } (\mu\text{g/ } \mu\text{L})}{\text{DNA length (bp)} \times 660 (\text{daltons/bp})}$$

Real Time PCR数据分析:

绝对定量 vs 相对定量



3. 将标准品模板进行倍比稀释后进行定量PCR，建立标准曲线，根据样品的 C_T 值在标准曲线中计算出对应的拷贝数。

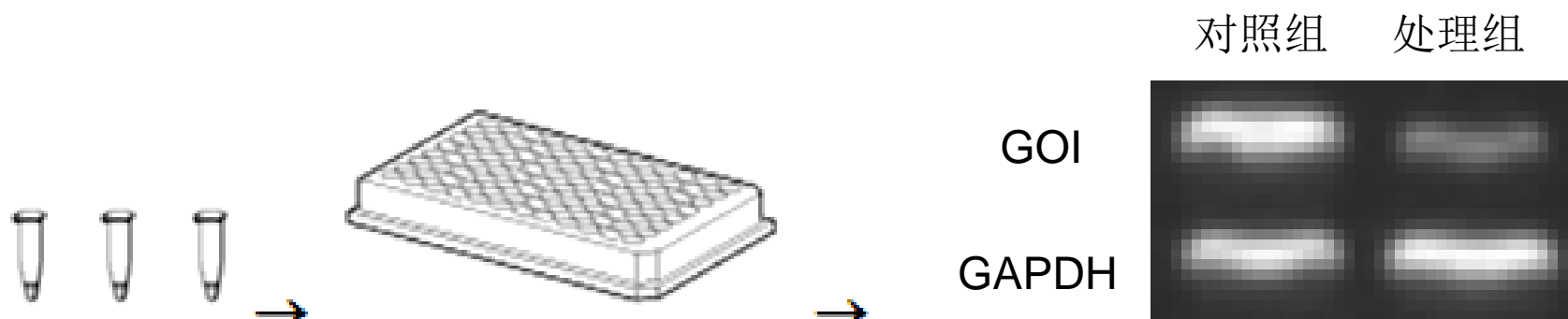


Real Time PCR数据分析:

绝对定量 vs 相对定量



相对定量: 传统方法



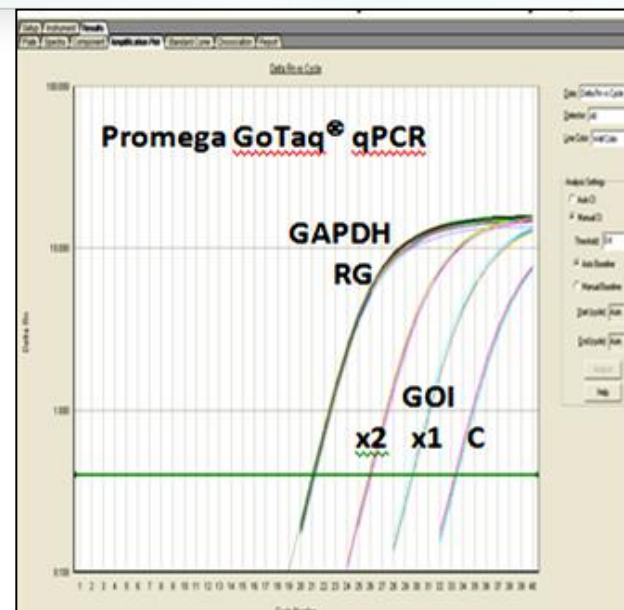
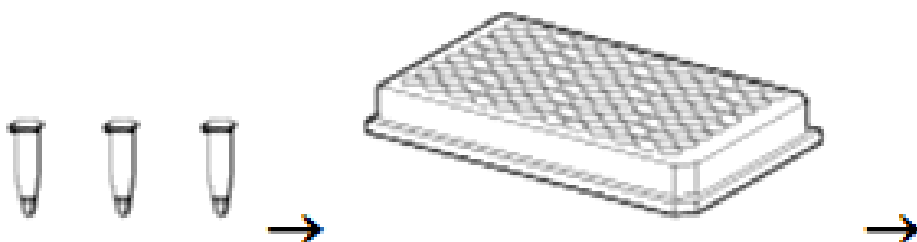
测灰度	对照组	处理组
GOI	10	4.5
GAPDH	8	9
GOI/GAPDH	1.125	0.5
处理组/对照组	1	0.44

Real Time PCR数据分析:

绝对定量 vs 相对定量



相对定量: $2^{-\Delta\Delta C_T}$



GoTaq® qPCR	内参基因 GAPDH	目的基因 对照组(C)	目的基因(GOI) 待测组(X1)	目的基因(GOI) 待测组(X2)
C_T	21.10	33.33	29.56	25.93
ΔC_T		12.23	8.46	4.83
$\Delta\Delta C_T$		0	-3.77	-7.40
$2^{-\Delta\Delta C_T}$		1	13.64	168.9

Livak et al., 2001, METHODS, 25: 402-408

GoTaq[®] qPCR Master Mix

Cat No: A6001, A6002



qPCR检测试剂



2x Master Mix 成分:

- dNTPs;
- MgCl_2 ;
- 专利的缓冲液配方: 在有抑制剂存在或难扩增的PCR反应仍有优异表现;
- GoTaq[®] Hot Start Polymerase (热启动酶): 提高反应特异性;
- BRYT Green[®] dye (专利染料): 荧光信号更强, C_T 值出现更早;
- CXR passive reference dye (参比荧光染料)。

BRYT Green[®] dye



DNA结合染料：不饱和式结合 vs 饱和式结合

不饱和式结合: SYBR Green I



*高浓度时对PCR反应有抑制作用

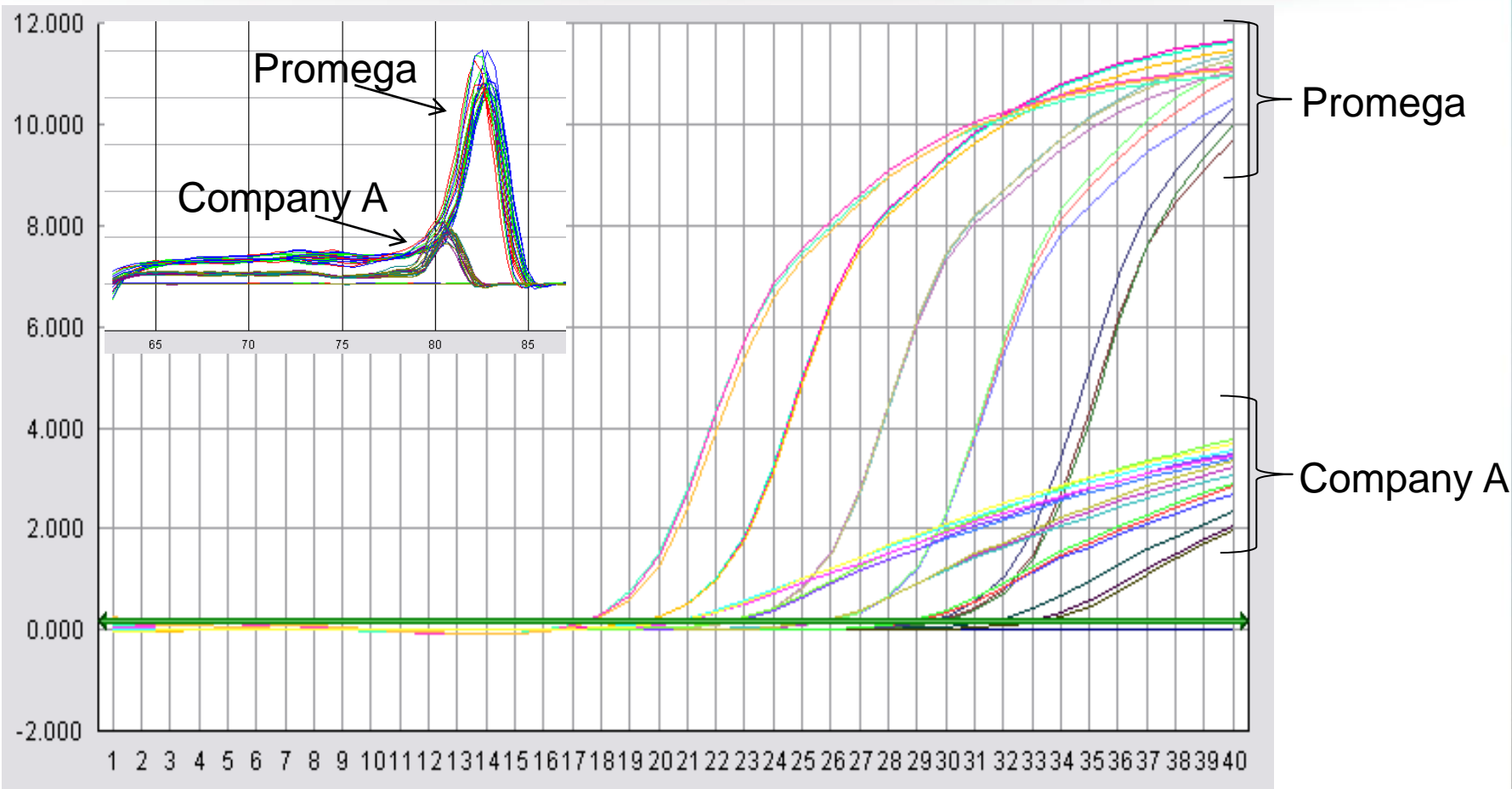
饱和式结合: BRYT Green[®] dye



*对PCR反应无抑制作用，可与双链DNA呈饱和式结合，荧光更亮，灵敏度更高。

GoTaq[®] qPCR Master Mix (Cat No. A6001)

以人类基因组DNA为模板扩增GAPDH



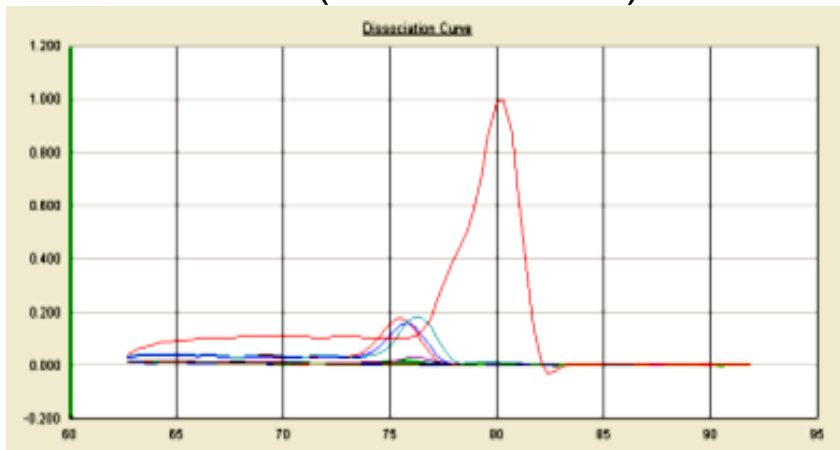
GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega) 与其他公司SYBR green master mix相比产生的荧光更强，C_T值出现的更早！

GoTaq[®] qPCR Master Mix

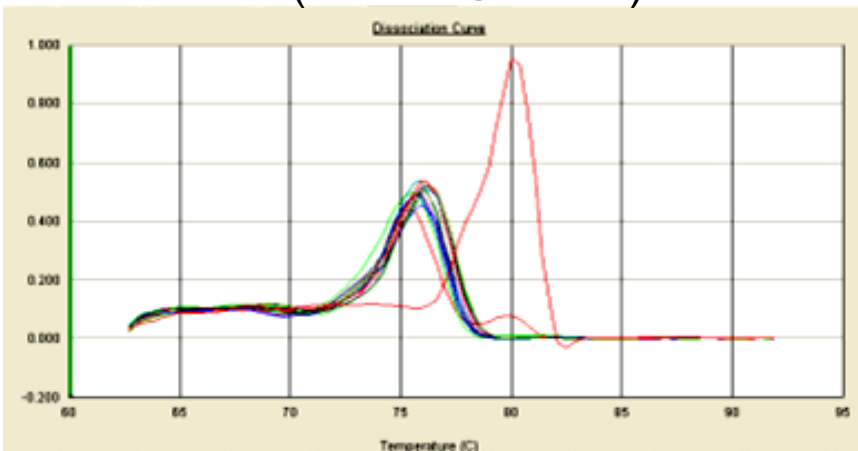
GoTaq[®] Hot Start Polymerase (热启动酶)



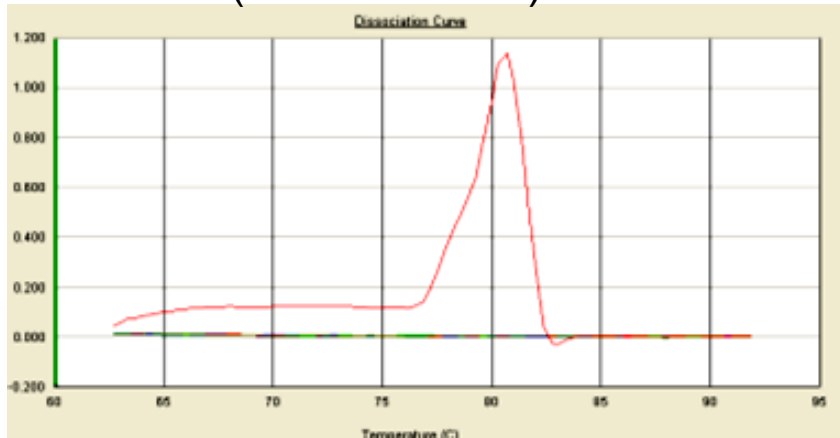
No Hot Start (0 hrs @ 22 °C)



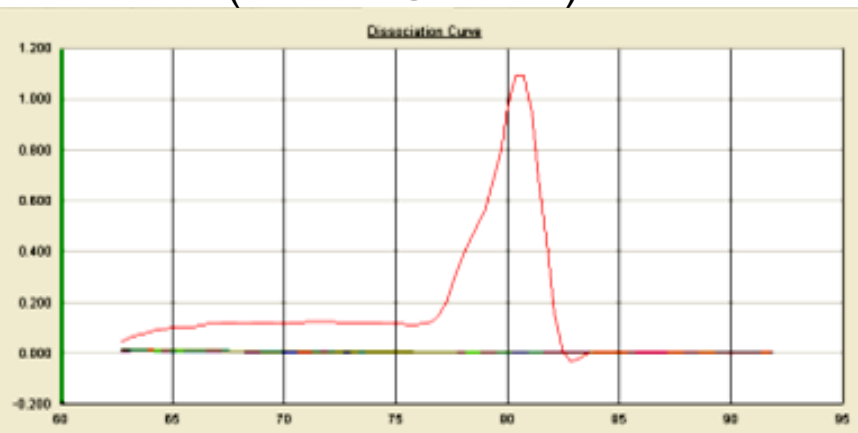
No Hot Start (24 hrs @ 22 °C)



Hot Start (0 hrs @ 22 °C)



Hot Start (24 hrs @ 22 °C)



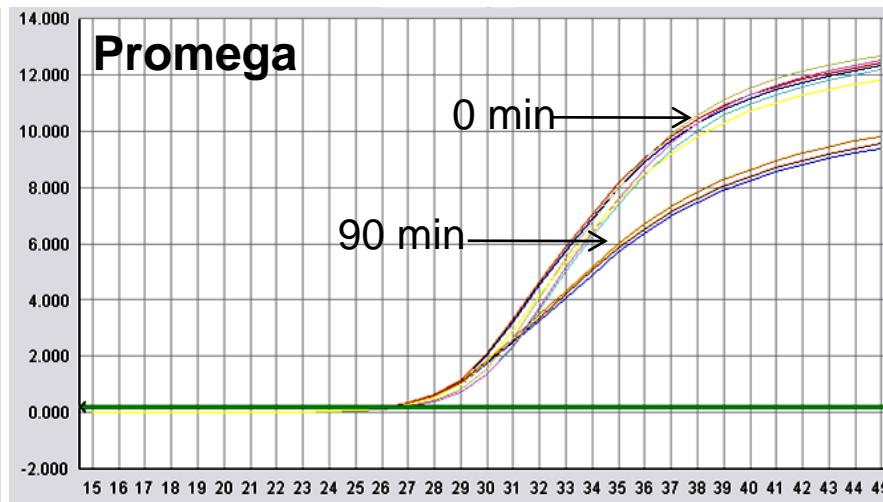
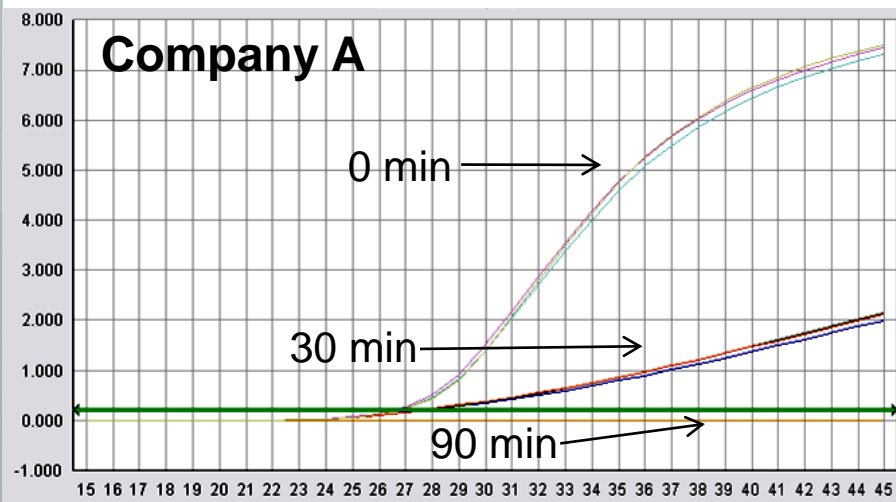
GoTaq[®] qPCR Master Mix的热启动特性表现优异!

GoTaq[®] qPCR Master Mix

GoTaq[®] Hot Start Polymerase (热启动酶)



酶的热稳定性



其他公司的SYBR green master mix 与Promega master mixes 同时加热到96°C，至图示时间时取出进行Real Time PCR。

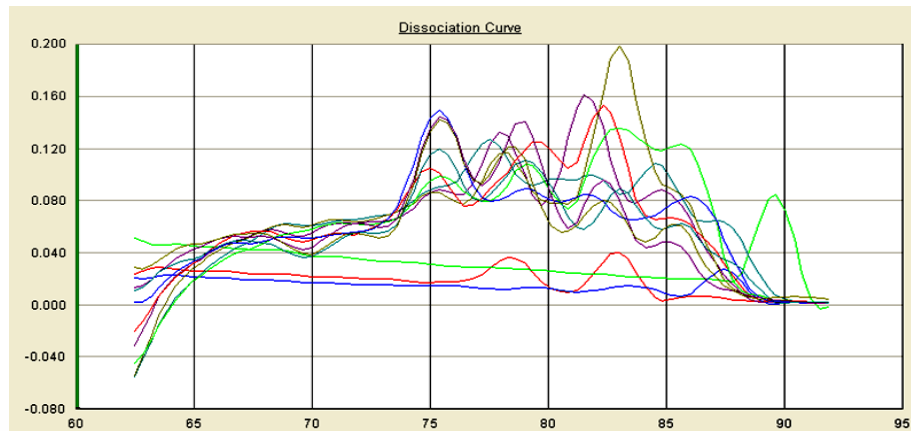
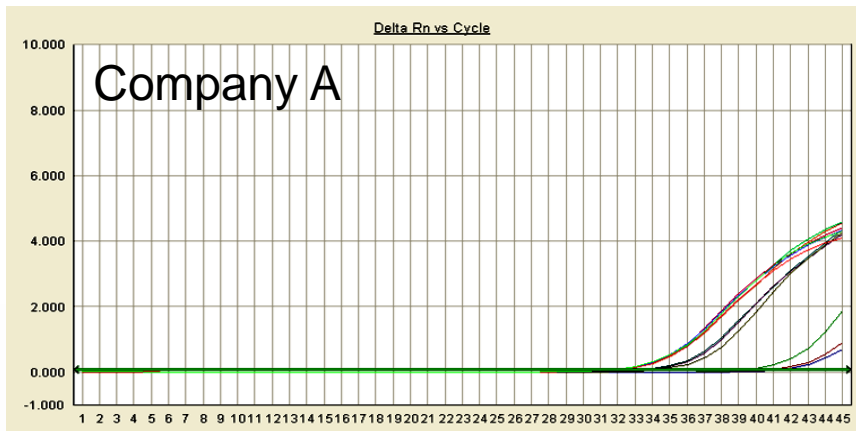
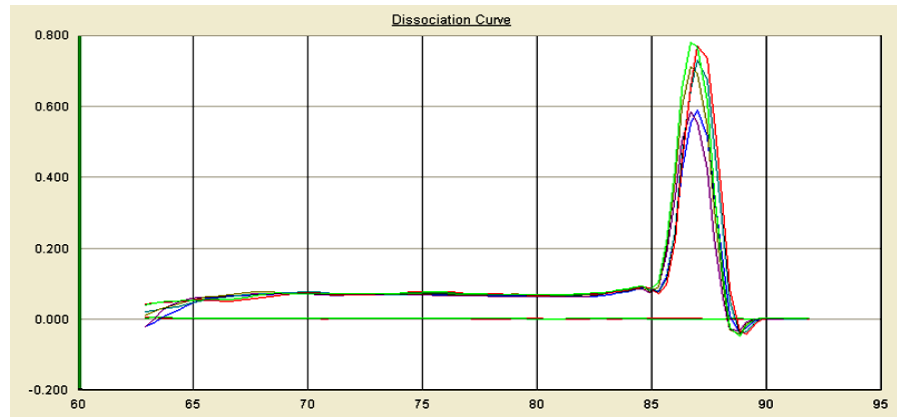
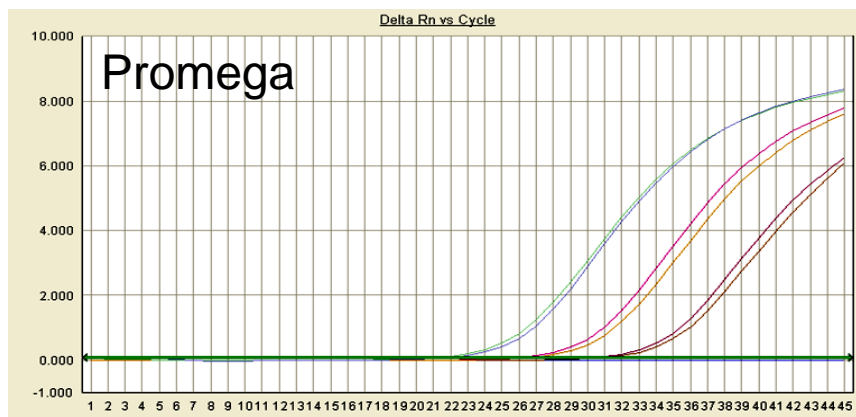
GoTaq[®] qPCR Master Mix支持更多的循环数目（45-50个循环），也与需要较长激活时间（96 °C，10 min）的热循环程序兼容！

GoTaq[®] qPCR Master Mix

专利的缓冲液配方



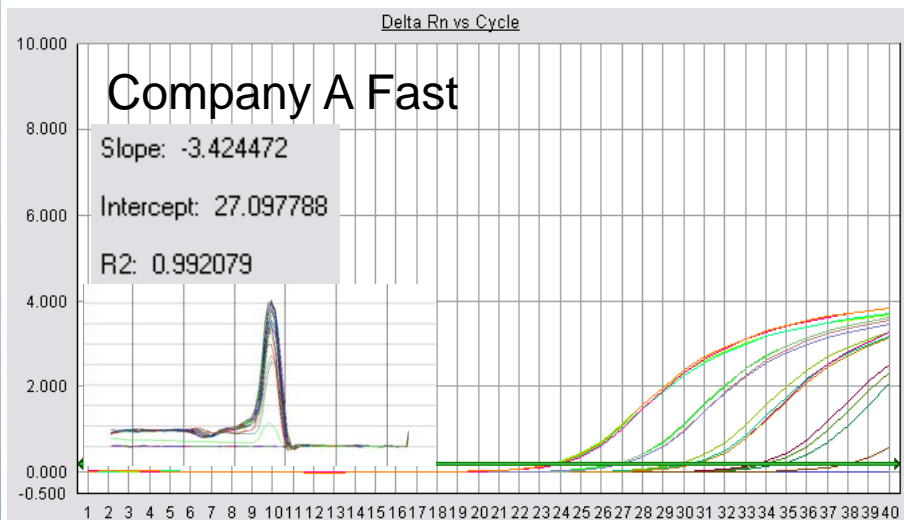
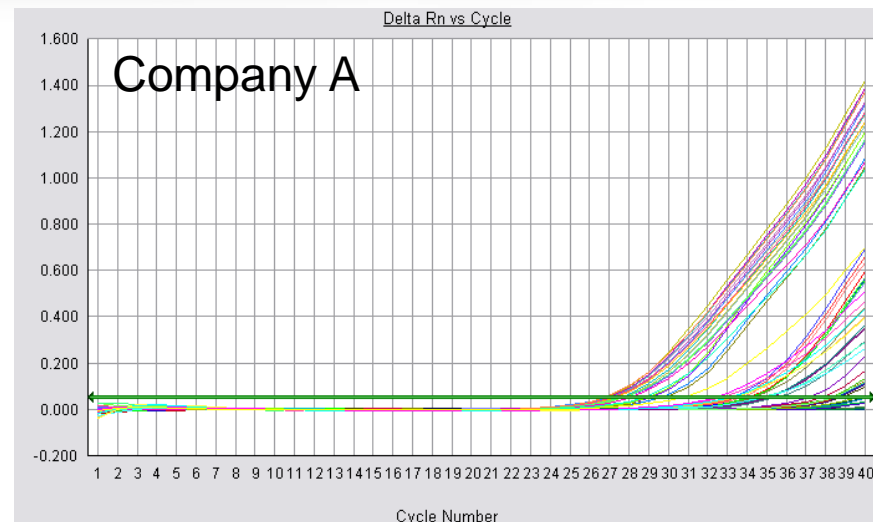
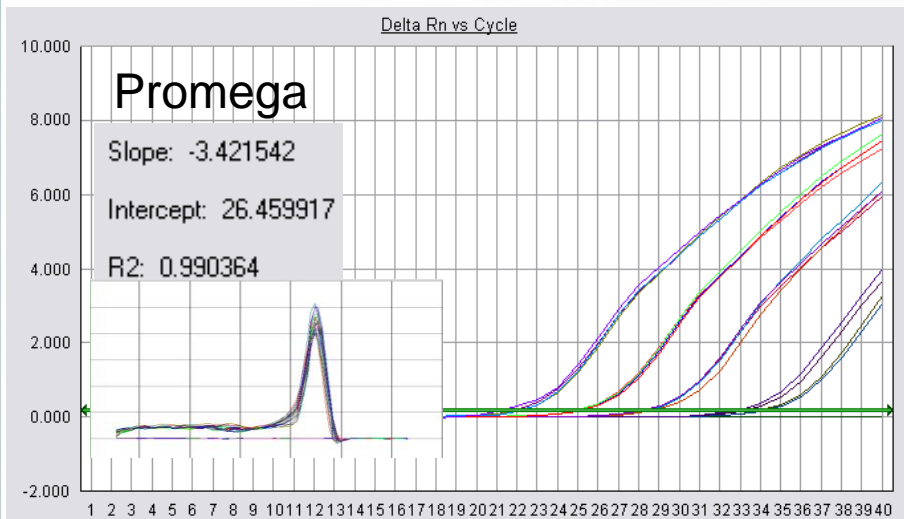
Amplification of Transforming Growth Factor Beta



对难扩增的反应有优异表现！

GoTaq[®] qPCR Master Mix

PCR程序



ABI 7500 FAST Default Cycling Parameters

Activation: 95°C for 20 sec

40 cycles:

Denaturation: 95°C for 3 sec

Anneal/Extend: 60°C for 30 sec

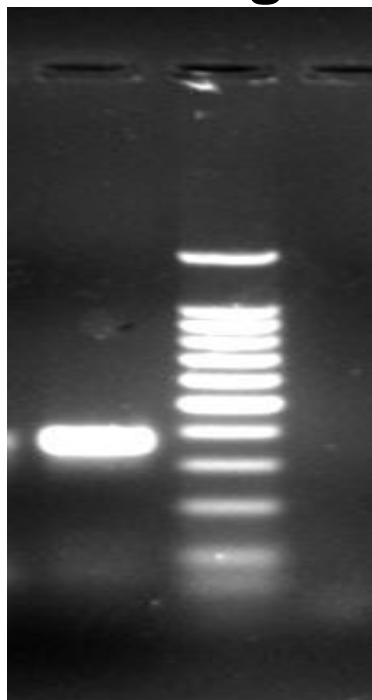
兼容快速PCR反应!

GoTaq[®] qPCR Master Mix

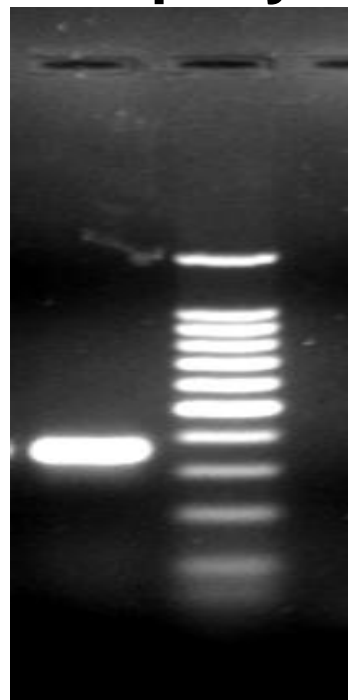


PCR: 50μl amplification of 30ng human gDNA using alpha-1 antitrypsin primer pair, 360bp amplicon.

Promega



Company A



8μl of product visualized vs Bench Top 100bp DNA Ladder : 2% Agarose/TAE/EtBr

与终点法兼容，可以进一步将PCR产物跑胶来验证产物分子量！

GoTaq® qPCR Master Mix

与多种Real Time PCR仪兼容



Applied Bio

7000	需要额外添加CXR
7300	reference dye.
7700	将100X CXR
7900HT	Reference Dye 添
StepOne	加入反应体系中至
StepOnePlus	1X
GeneAmp 5700	

GoTaq qPCR Master Mix直接使用

	<u>Roche</u>	<u>Bio-Rad</u>	<u>Stratagene</u>
<u>Applied Bio</u>	LightCycler 1.5	iCycler iQ5	
7500	LightCycler 2.0	MyCycler	Mx3000p
7500Fast	LightCycler 480	Chromo4	Mx3500p

GoTaq® qPCR Master 适用于任何可检测SYBR® Green I 或 FAM™ 染料的仪器。

GoTaq[®] 2-Step RT-qPCR System (A6010)



- 以两个性能卓越的技术为基础，建立可靠的、整体的基因定量解决方案
- 试剂盒组合，表现更优异，节省实验经费
- 通用的操作步骤
- 组分独立，反应条件灵活掌控
- 出厂前验证，质量有保证

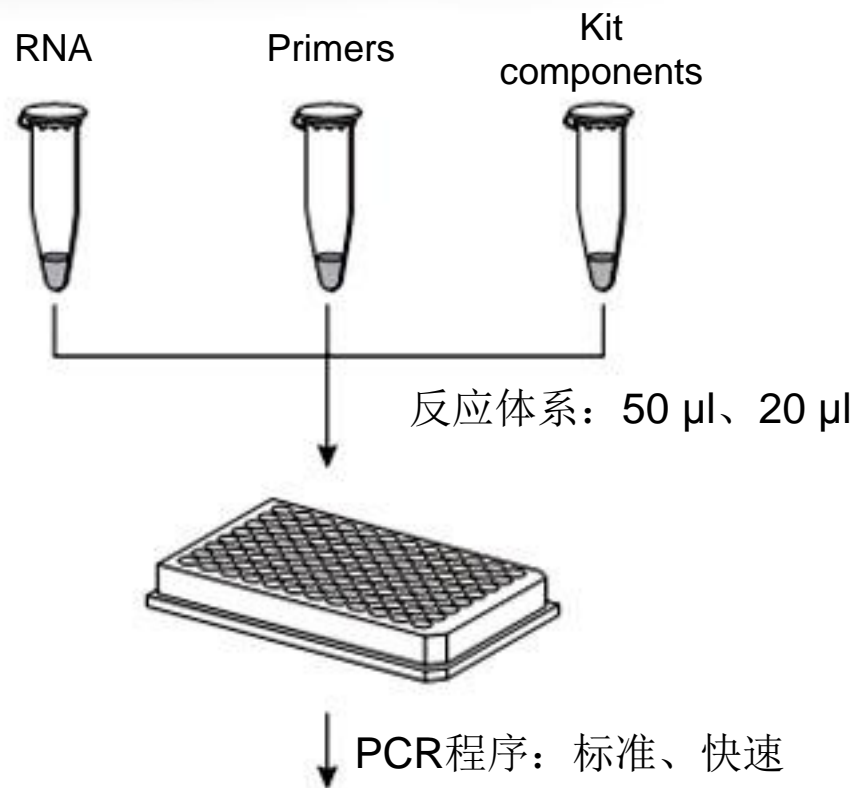
GoScript[™] Reverse
Transcription System
50 rxn

GoTaq[®] qPCR Master
Mix
200 rxn

GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (A6020)

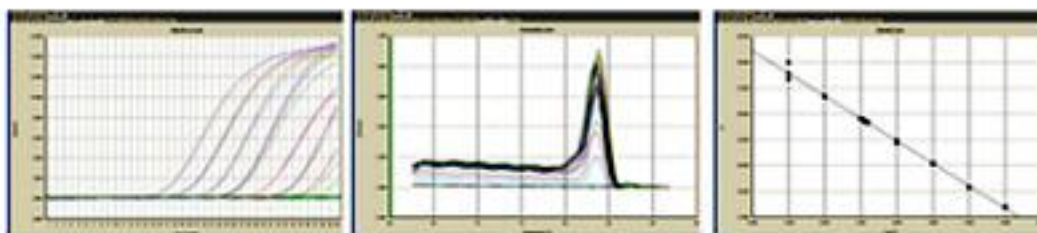


- GoTaq® qPCR Master Mix, 2X
- GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR, 50X
- CXR Reference Dye, 30 μ M
- $MgCl_2$, 25mM
- Nuclease-Free Water



反应体系灵活，操作简便

适用于各种Real Time PCR仪



qRT-PCR 一步法 vs 两步法



一步法的优点：方便，适用于大量样品的高通量检测

两步法的优点：灵活，适用于单个样品中检测多个基因



重点推荐:

Clinical Chemistry 55:4
611–622 (2009)

Special Report

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}

Any Questions?



A6001, A6002;
A6010;
A6020.

灵敏度更高

适用范围更广

“Brighter Dye, Brighter Choice”

