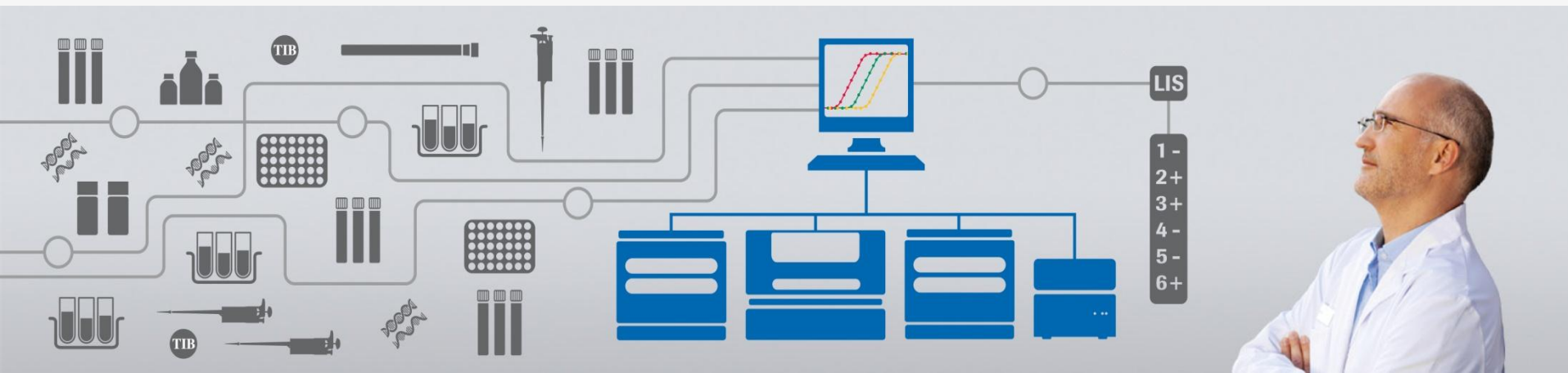


罗氏LightCycler 480 II 装机培训

刘青青

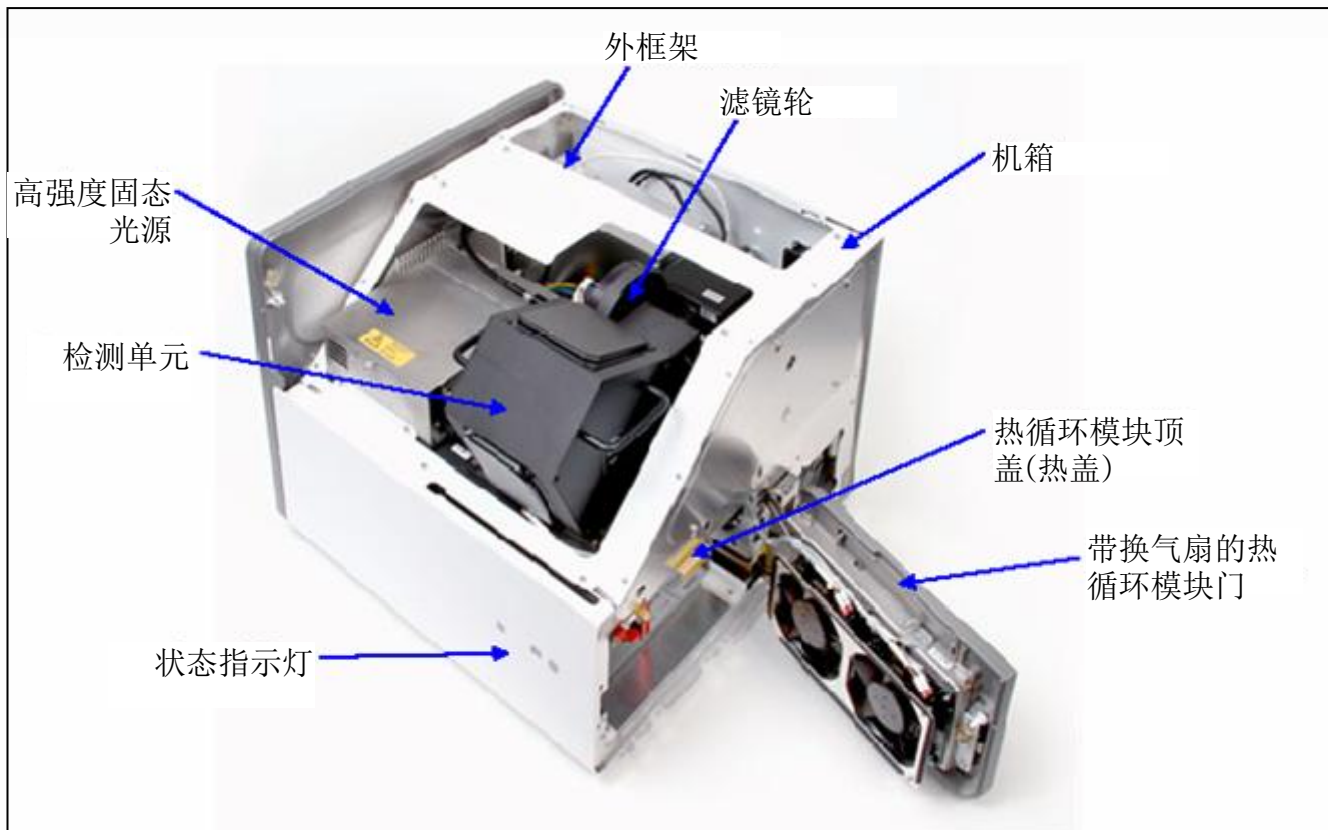
罗氏诊断产品(上海)有限公司



- **LC480硬件介绍**
- **荧光定量PCR原理、染料与探针**
- **绝对与相对定量**

LightCycler[®] 480 II 荧光定量PCR仪

总体结构



qPCR仪
主要结构

- 光学系统 (光源+光路)
- 温控系统
- 检测系统

光学系统 - 各类光源的性能比较



第一代-单色
LED



第二代-卤钨灯

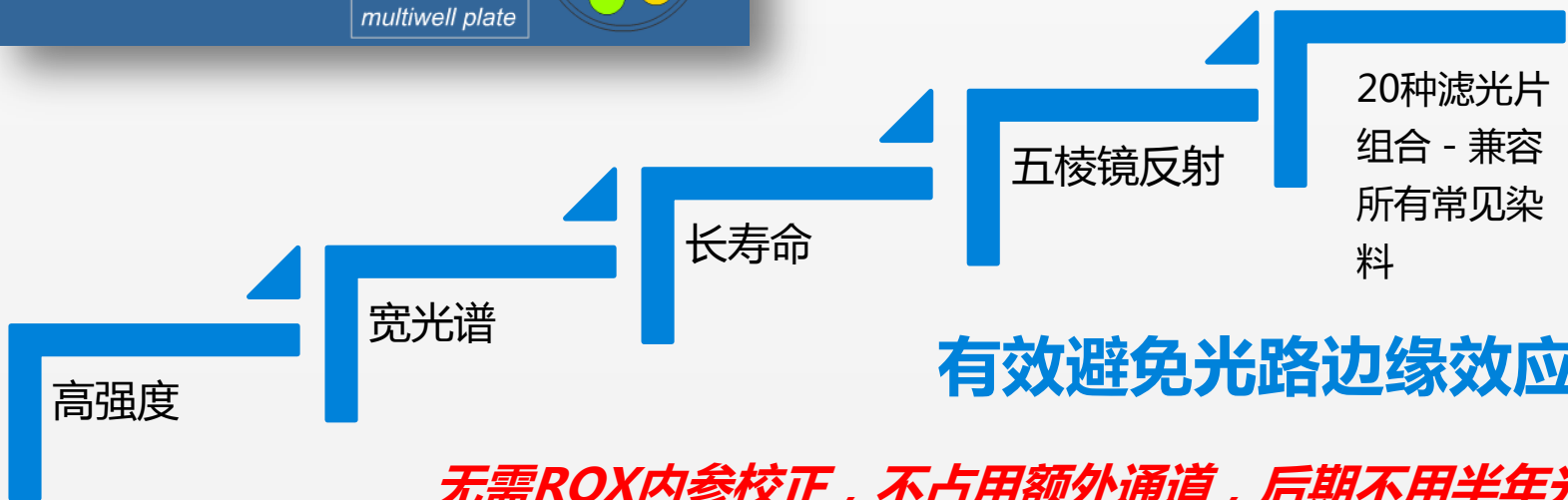
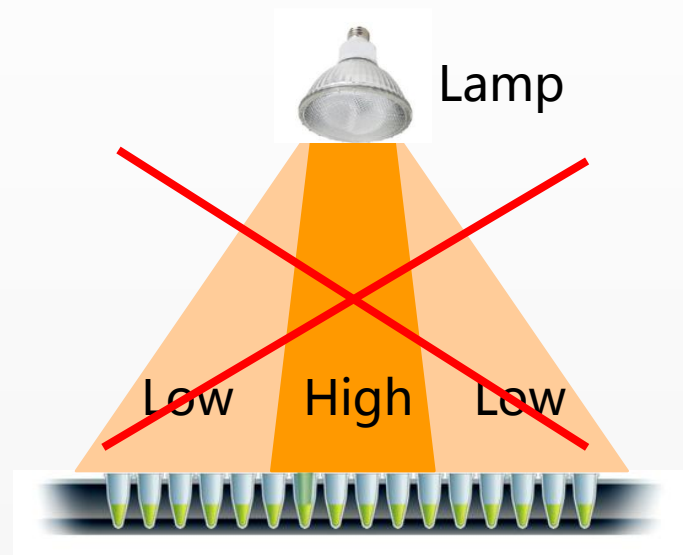
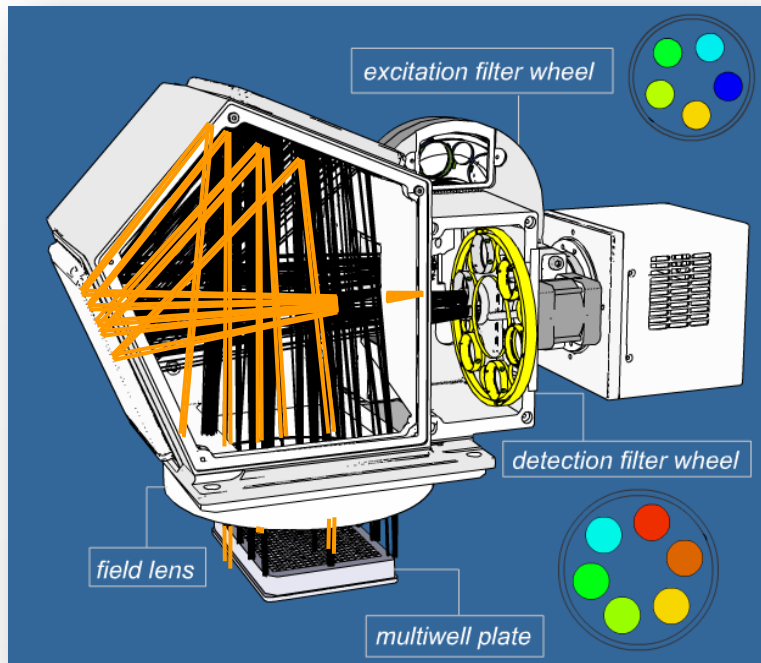


第三代-氙灯
第四代-白光LED

	当前最高发光效率 (lm/W)	寿命 (小时)
白光 LED	150	20000
氙灯	100	1000
卤钨灯	25	2000
单色 LED	10-20	100000

**白光LED亮度高，光谱宽-检测更灵敏，寿命长-无需维护，终身免更换
是现代高端实时荧光定量PCR仪光源的最佳选择**

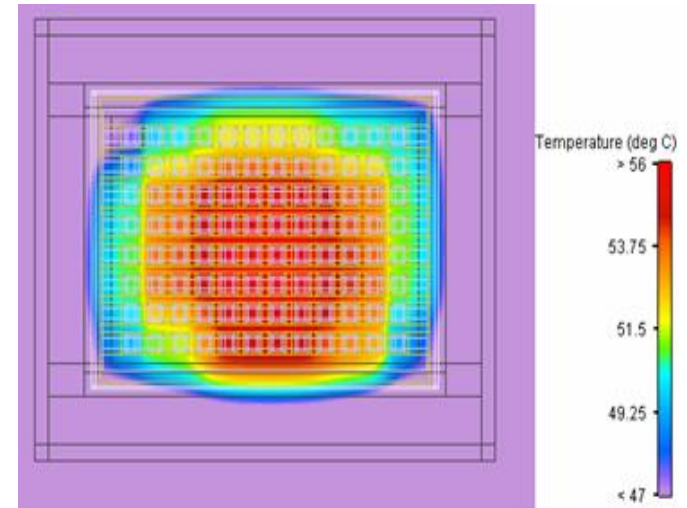
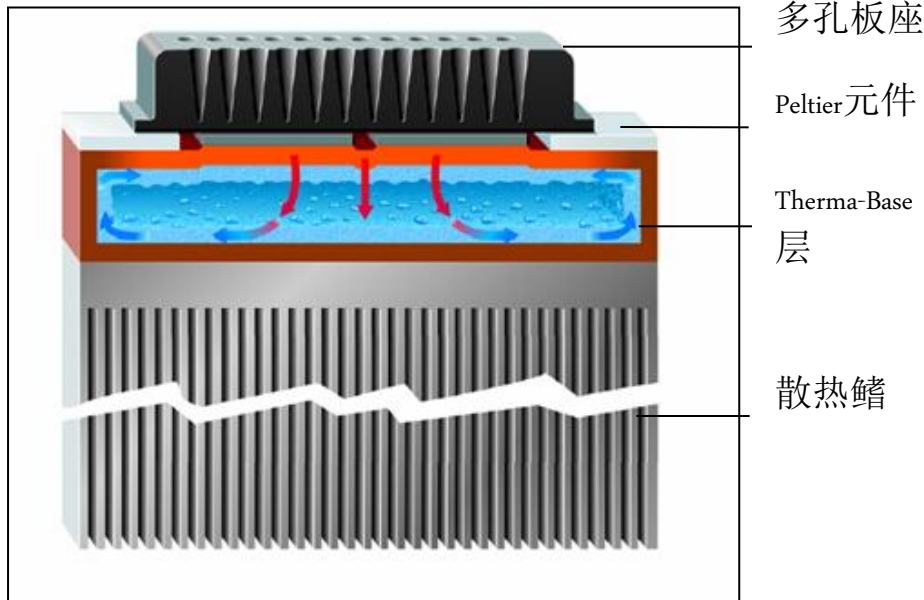
光学系统 - 光路系统-五棱镜-避免边缘效应



无需ROX内参校正, 不占用额外通道, 后期不用半年光路校准

温控系统 - 业内最佳温度均一性

独一无二的Therma-Base专利技术



半导体加热固有的边缘效应

彻底解决边缘效应

孔间温度均一性达业内最佳的 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$

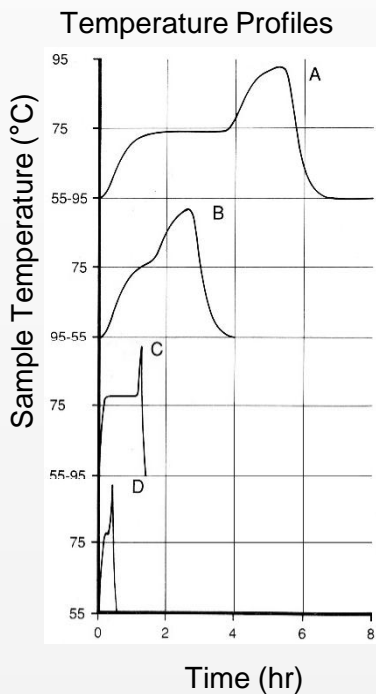
温控系统 – 银质模块，升降温快

40min内完成40个循环的常规检测 – 节省您宝贵时间

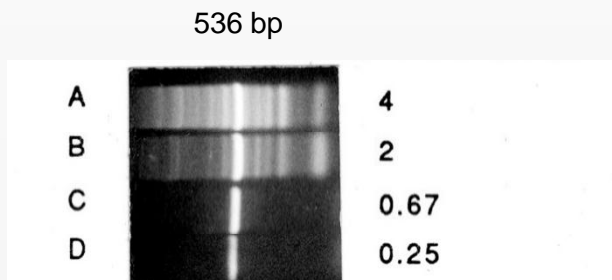
银质模块- 比铜铝合金导热性能高20%以上

快速PCR的好处：

温度变化越快，PCR扩增产物的特异性越好



Gel Analysis Time for 30 Cycles (hr)

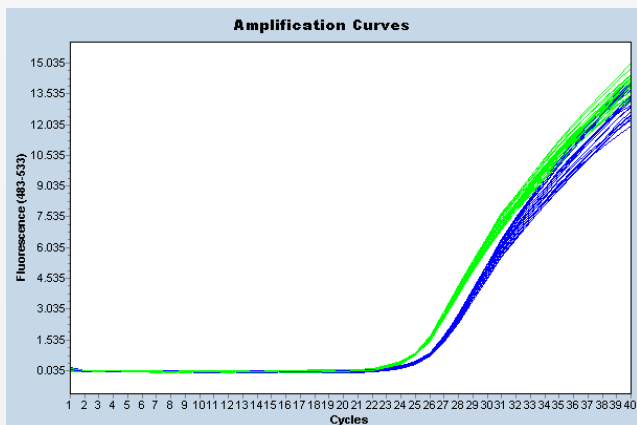
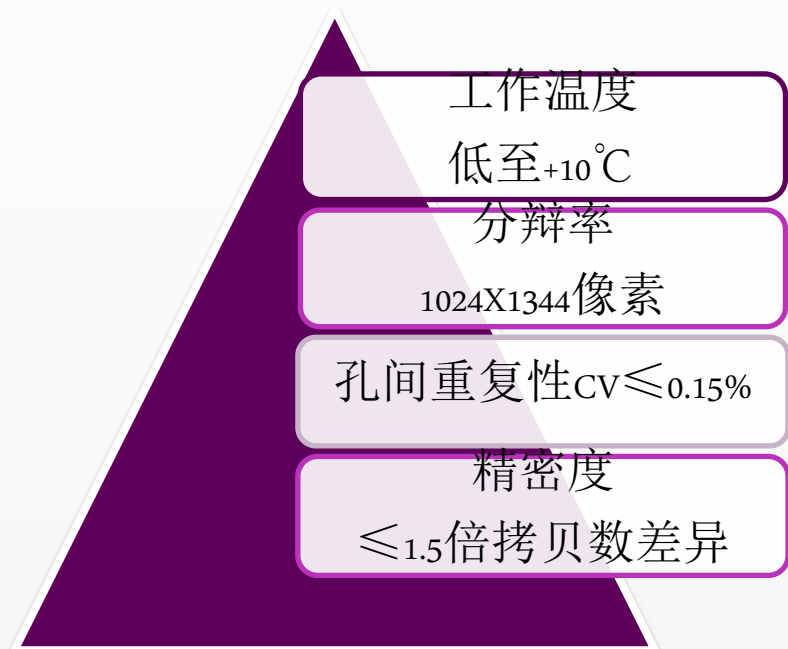
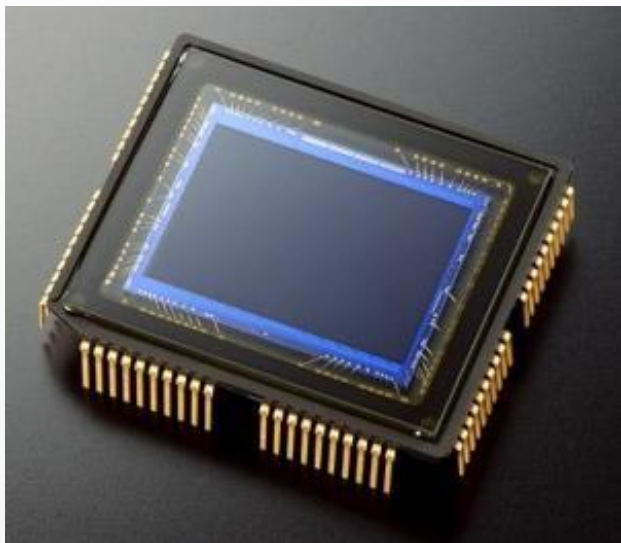


Amplification of a 536 bp β -globin fragment from genomic DNA



检测系统

冷CCD检测芯片保证最好的分辨率和重复性



仪器装机指标：
精确区分**1000拷贝**与**2000拷贝**
C_p值标准差仅0.02~0.04

Samples	Mean Cp	STD Cp	Mean conc	STD conc
Unknown 1	26.68	0.04	1.00E3	2.82E1
Unknown 2	25.72	0.02	1.96E3	2.55E1

LightCycler® 480 II 荧光定量PCR仪

96孔模块与384孔模块互换 – 未来应用更灵活

模块准备



仪器打开



热盖替换



模块替换



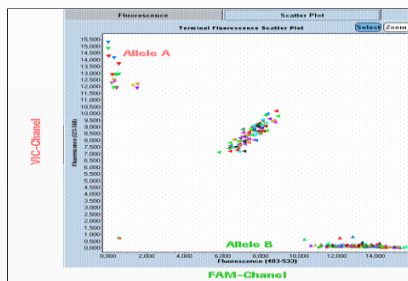
- ✓ 自己动手DIY
- ✓ 1分钟内完成
- ✓ 无需厂家工程师在场
- ✓ **无需重新校准**

LightCycler® 480 II 系统

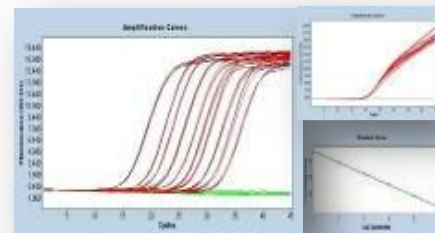
灵活多样的应用方向

LightCycler®

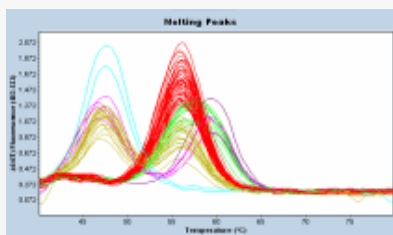
终点法/TaqMan基因分型



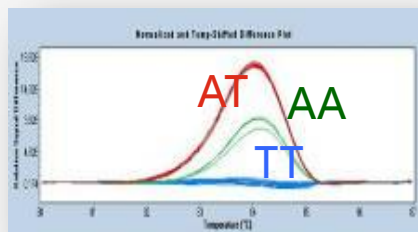
绝对定量



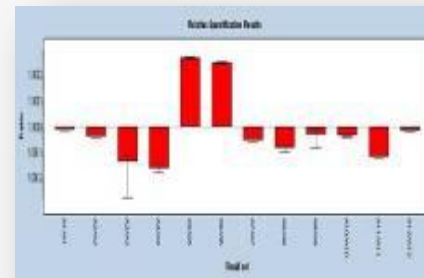
杂交探针基因分型



高分辨率熔解(HRM)
突变扫描



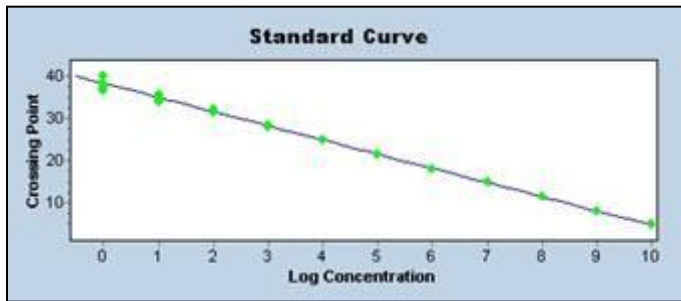
相对定量



分析模式多样，绝对定量、相对定量、基因分型(熔解曲线法及终点法)、高分辨率熔解曲线分析，同时适用市面上主流的检测模式(染料检测、水解探针(TaqMan®探针)、杂交探针、简单探针等)

LightCycler[®] 480 性能

定量：动态范围

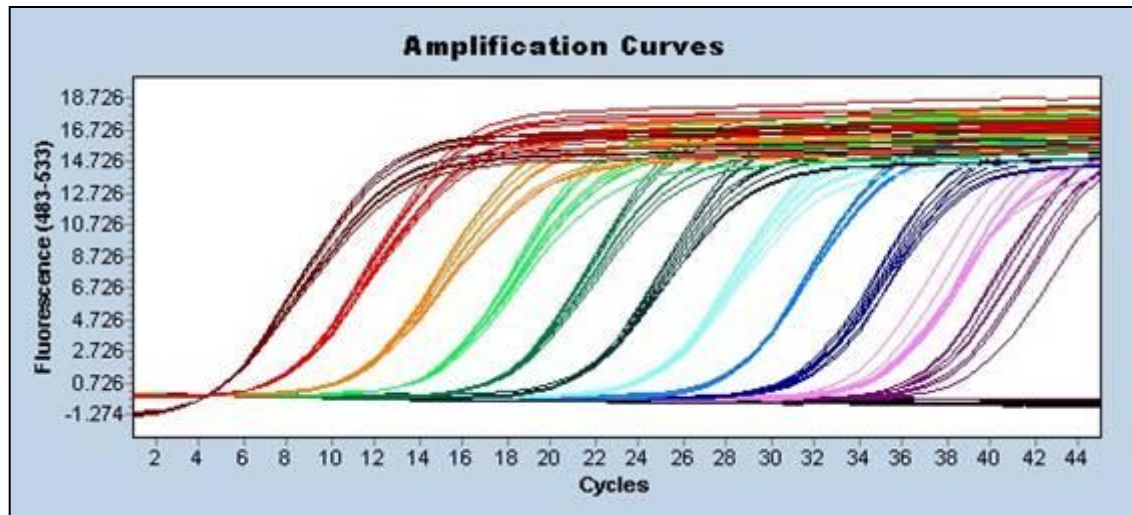


UPL probes

$10^{10} - 1$ copies

11个数量级的动力学范围

检测灵敏度：可检测单拷贝基因



多重荧光检测- 6检测通道

检测模式	水解探针(R)	染料法	水解探针 (R), HybProbe探针 (D), SimpleProbe探针 (R)	水解探针 (R), HybProbe 探针 (A)			
染料 (举例)	LC Cyan 500 Fluo 3	SYBR Green I ResoLight EvaGreen LC Green	Cy3 Cy3.5 Fluorescein FAM TET	HEX JOE VIC Yellow555	TAMRA LC Red610 ROX Texas Red SYPRO Ruby SYPRO Orange	LC Red640 Alexa Fluor 633 Snarf 1 Acid Fuchsin	Cy5 Cy5.5 LC Red670 LC Red705

说明：报告基因(Reporter): R; 供体基因(Donor): D; 受体基因(Acceptor): A。

世面唯一单孔六重荧光试剂盒- 罗氏 LightMix® Modular

Wavelength	500	530	580	610	640	660		
荧光染料	Cyan500	FAM	HEX/ VIC	ROX	LC640	Cy5		
Respiratory 呼吸道	病毒(流感相关 11种, 冠状病毒 6种, 其他呼吸 道病毒7种)		InfA 甲流通用	InfB 乙流通用	RSV-A/B 呼吸道合胞病毒		Internal Controls or Extraction Controls or Roche process Ctrl	
		InfA H1 甲流H1型	InfA H9 甲流H9型	InfA H5 甲流H5型	InfA H3 甲流H3型	InfA H7 甲流H7型		
		PIV-4 人副流感4型	PIV-3 人副流感3型	BocaV 博卡病毒	PIV-2 人副流感2型	PIV-1 人副流感1型		
		HKU1	MERS Orf1a/upE	OC43	229E	NL63		
		Enterov 肠病毒	HpeV 原埃可病毒	MPV 人偏肺病毒	AdV 腺病毒	HRV 鼻病毒		
		非典型肺炎(共8 种)	B.para 副百日咳杆菌		B.pertussis 百日咳杆菌			
	Lpn MIP/PCP 嗜肺军团菌/ 金罗维氏肺孢子虫		M.pneu 肺炎支原体	psittaci 鹦鹉热衣原体	C.pneu 肺炎衣原体	Legionella pn 军团菌属		
	病毒		Norovirus GG1 诺如病毒1型	Norovirus GG2 诺如病毒2型	Rotavirus A 轮状病毒A型	Adenovirus 腺病毒		Astrovirus 星状病毒
			Sapovirus 札如病毒	Norovirus GG1 诺如病毒1型	Rotavirus A 轮状病毒A型	Adenovirus 腺病毒		Enterovirus 肠病毒
	Gastro (Fecal Panel) 胃肠道	细菌	Yersinia 耶尔森菌属	Campylobacter 弯曲杆菌属	Shigella 志贺氏杆菌属	Salmonella/EEC 沙门氏菌属/ 肠侵袭性大肠杆菌		Pleisomonas 邻单胞菌属

- **LC480硬件优势**
- **荧光定量PCR原理、染料与探针**
- **绝对与相对定量**

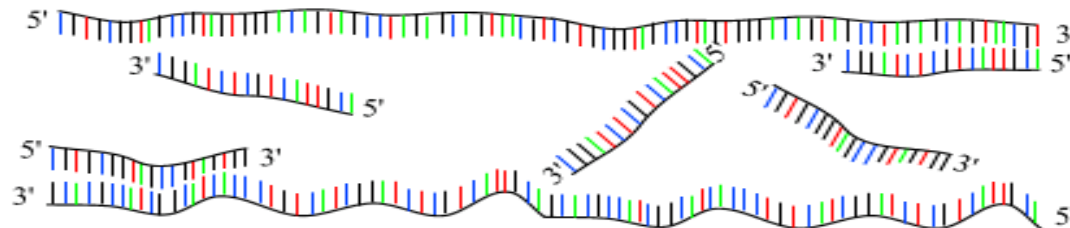
PCR原理

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

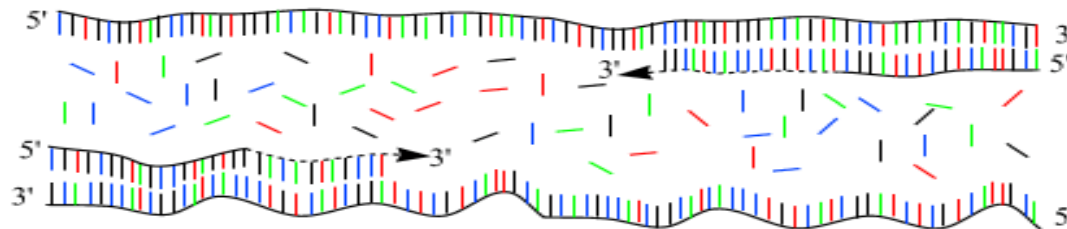
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)

$$N = N_0 \times 2^n$$

PCR 的扩增公式



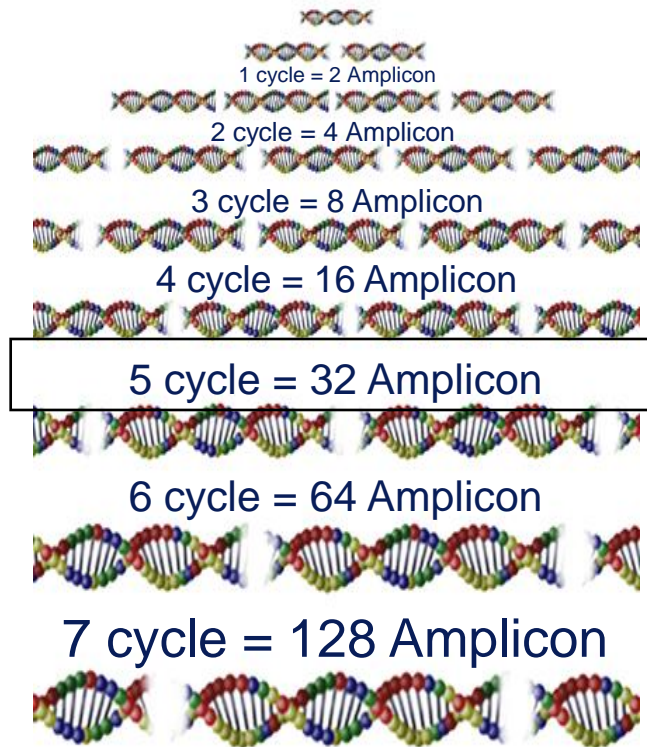
$$N = N_0 \times 2^n$$

N: 扩增子数量

N₀: 起始模板数量

E: 扩增效率, 理论值为2

n: 循环数



No. of Cycles	No. of Target Amplicons
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
10	1024
20	1,048,576 (1.0 E6)
30	1,073,741,824 (1.0 E9)
37	137, 438, 953, 472 (1.3 E11)
40	1,099,511,627,776 (1.1 E12)

普通PCR和荧光定量PCR的区别

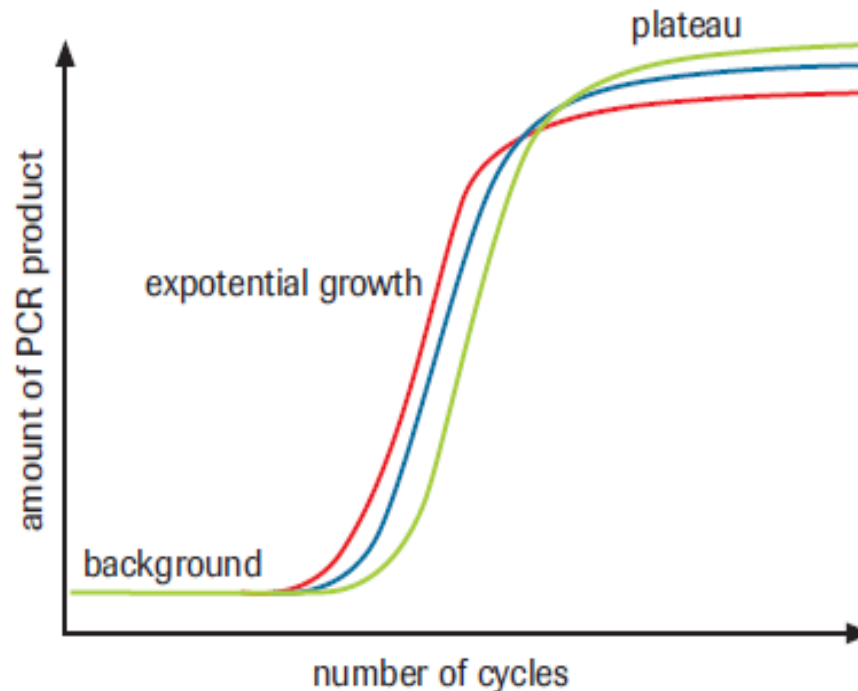


VS

普通PCR	荧光定量PCR
在PCR反应的 平台期 检测， 分析 终点 产物的量	在PCR反应的 对数期 检测， 分析 起始点 产物的量
检测模式为电泳	实时监测荧光信号
动力学范围有限	动力学范围广($10^0 \sim 10^{10}$ 拷贝/mL)
副产物形成不能鉴别	有效鉴别非特异扩增和突变
绝对和相对定量困难(相对于 看家基因的定量复杂)	不仅可以相对定量， 还可以绝对定量

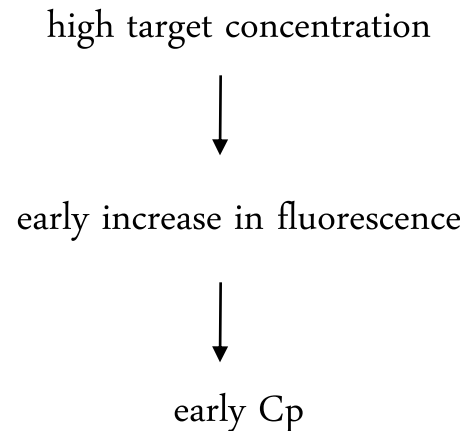
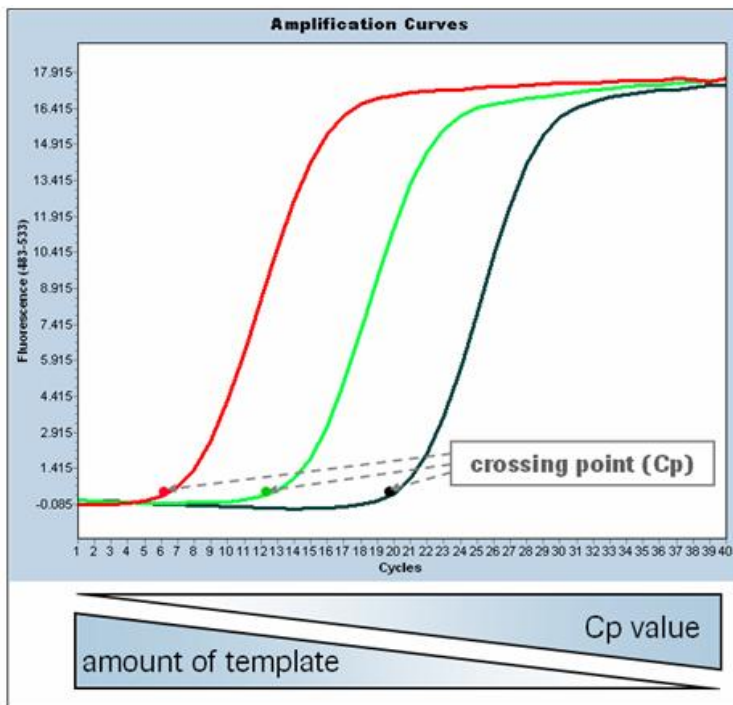
Real-Time PCR的扩增曲线

- 在实时荧光定量PCR反应中，引入了一种荧光化学物质，随着PCR反应的进行，PCR反应产物不断累计，荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环，收集一个荧光强度信号，这样我们就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化，从而得到**荧光扩增曲线**




Real-Time PCR And Crossing Points

- **不同的叫法:** Real-time PCR; Quantitative PCR; Kinetic PCR
- **C_p的定义:** 样品的荧光强度超过背景荧光值（**荧光阈值**）的时刻所对应的循环数，crossing point (C_p), quantification cycle (C_q), threshold cycle (C_t)含义相同。
- **假设:** 对于所有的样品，在“crossing point”时刻，DNA分子数都是一样的



Detection Formats and Dyes

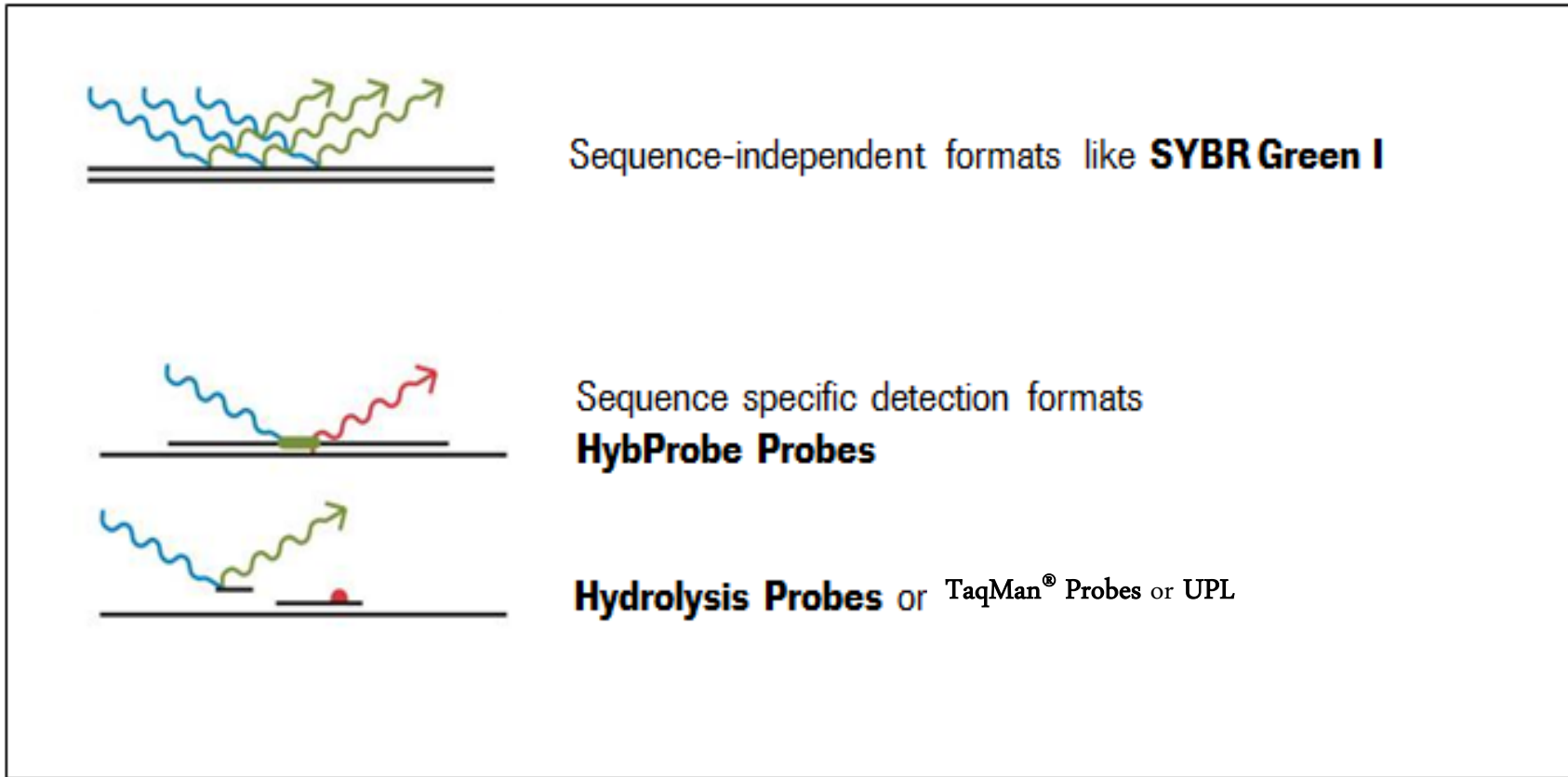
Overview e.g., for LightCycler® 480 System

LED (390 – 710 nm)								
Excitation filters	440	465	498	533			618	
Emission filters	488	510	580	610	640	660		
Dye	LightCycler® Cyan 500	SYBR Green I ResoLight	Fluorescein FAM	HEX (VIC)	LightCycler® Red 610	LightCycler® Red 640	Cy5	
Detection formats	Melting Curve	•						
	HRM	•						
	SimpleProbe probes		•					
	HybProbe probes			*		•	•	•
	Hydrolysis probes 1–3 colors			•	•			•
	Hydrolysis probes 4 colors	•			•	•		•

*FRET Donor

Detection Formats and Dyes

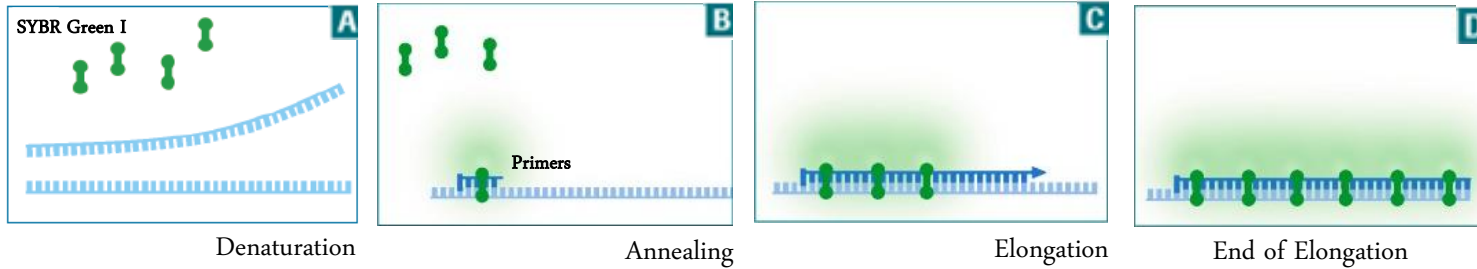
Most commonly used



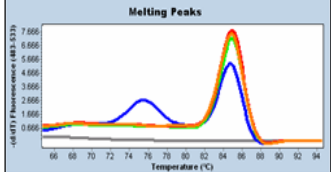
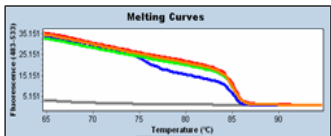
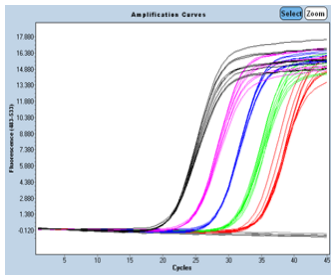
Additional Formats: Molecular Beacons, Scorpions, SimpleProbe Probes, ...

Detection Formats and Dyes

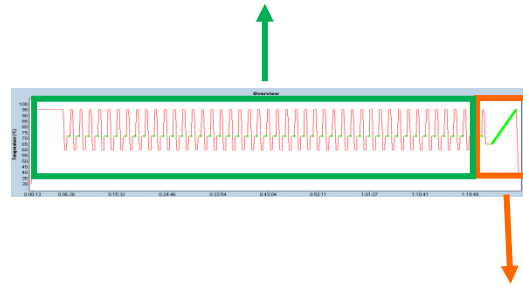
Intercalating dye – SYBR Green I



↑
Measurement once per cycle

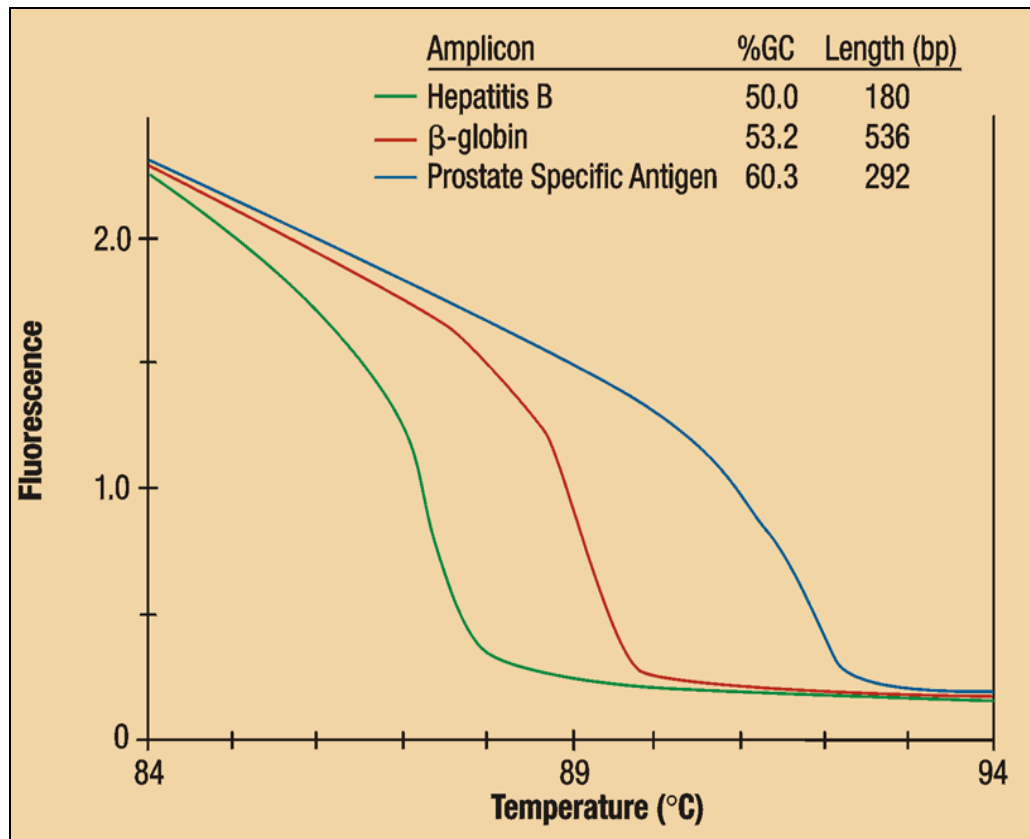


- Sequence independent, double strand DNA intercalating



- Melting curve necessary for verification of specificity

Factors Influencing Melting Behavior



T_m varies by:

GC-content

amplicon length

T_m is also influenced by:

Salt concentration

MgCl₂ concentration

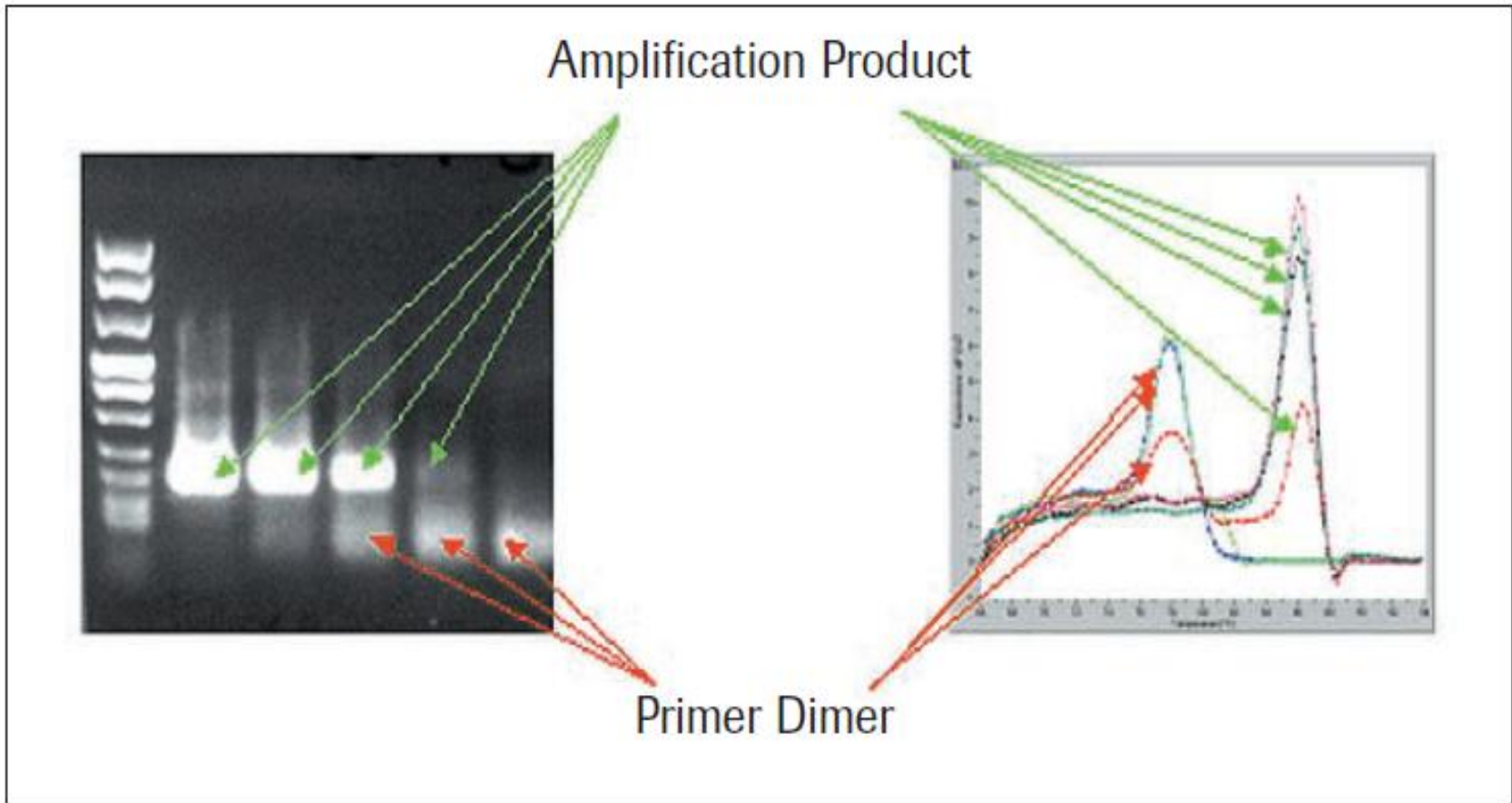
SYBR Green I concentration

Product Identification

Principles

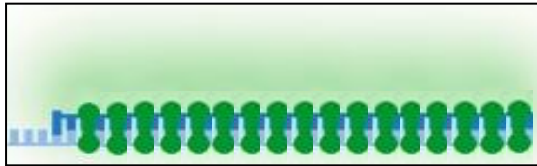
- Melting curves performed with SYBR Green I visualize melting behavior of the product facilitating the identification of a specific amplicon.
- Each PCR product is characterized by its T_m which is defined as the temperature where 50% of the DNA is single-stranded.
- Melting of the PCR product can be monitored by measuring the decrease in fluorescence of double strand-specific dyes while increasing the temperature.
- Two different products will differ in the respective melting temperatures; non-specific products/primer dimers can be identified.

Visualization of Primer Dimers

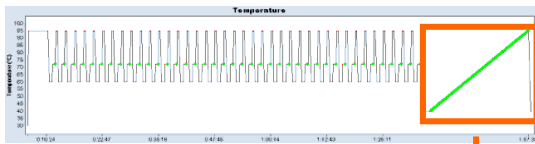


Detection Formats and Dyes

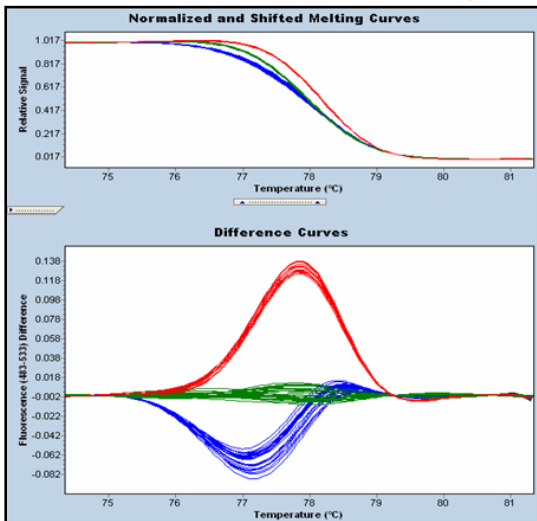
Intercalating dye – LightCycler® 480 ResoLight Dye



- Double strand DNA binding and **saturating** dye



- For High Resolution Melting (HRM) - gene scanning applications

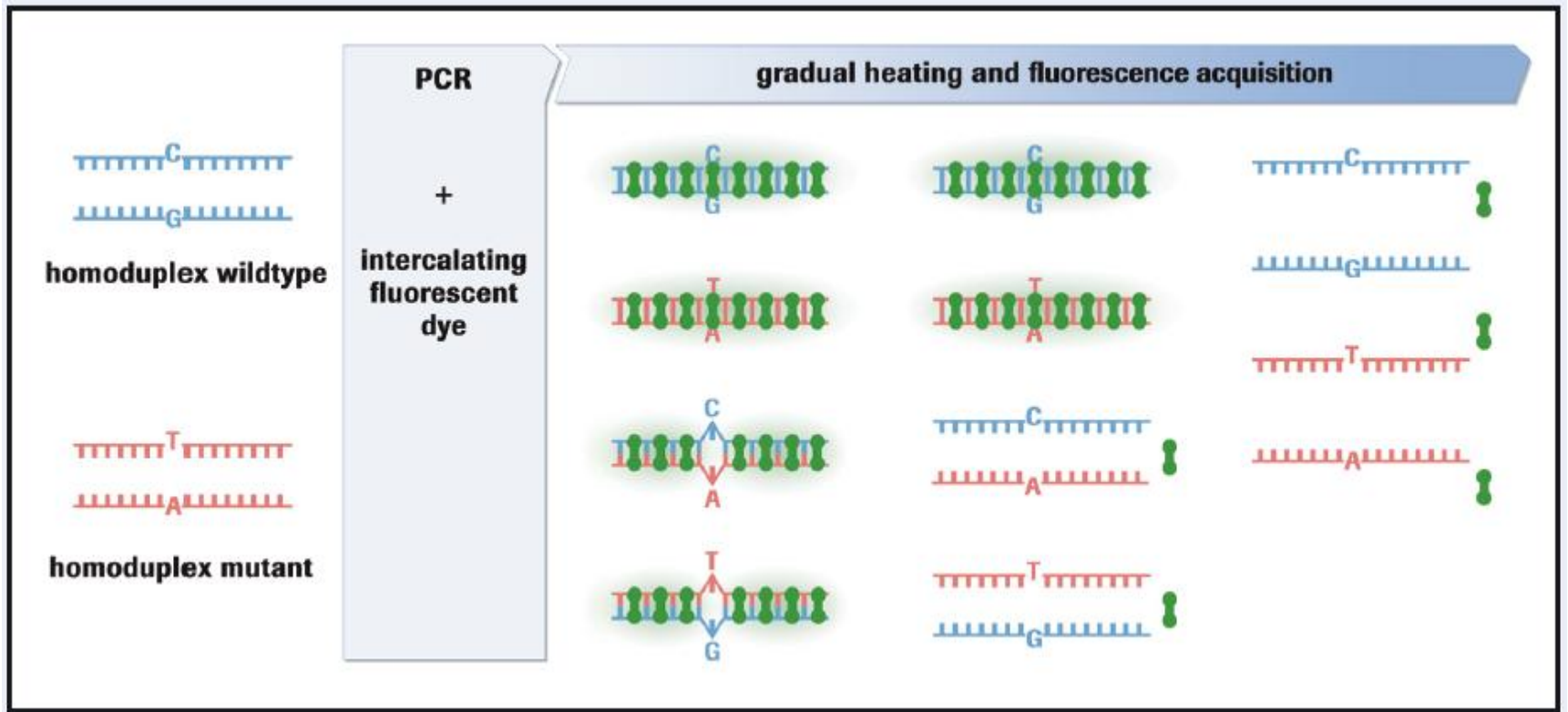


High Resolution Melting

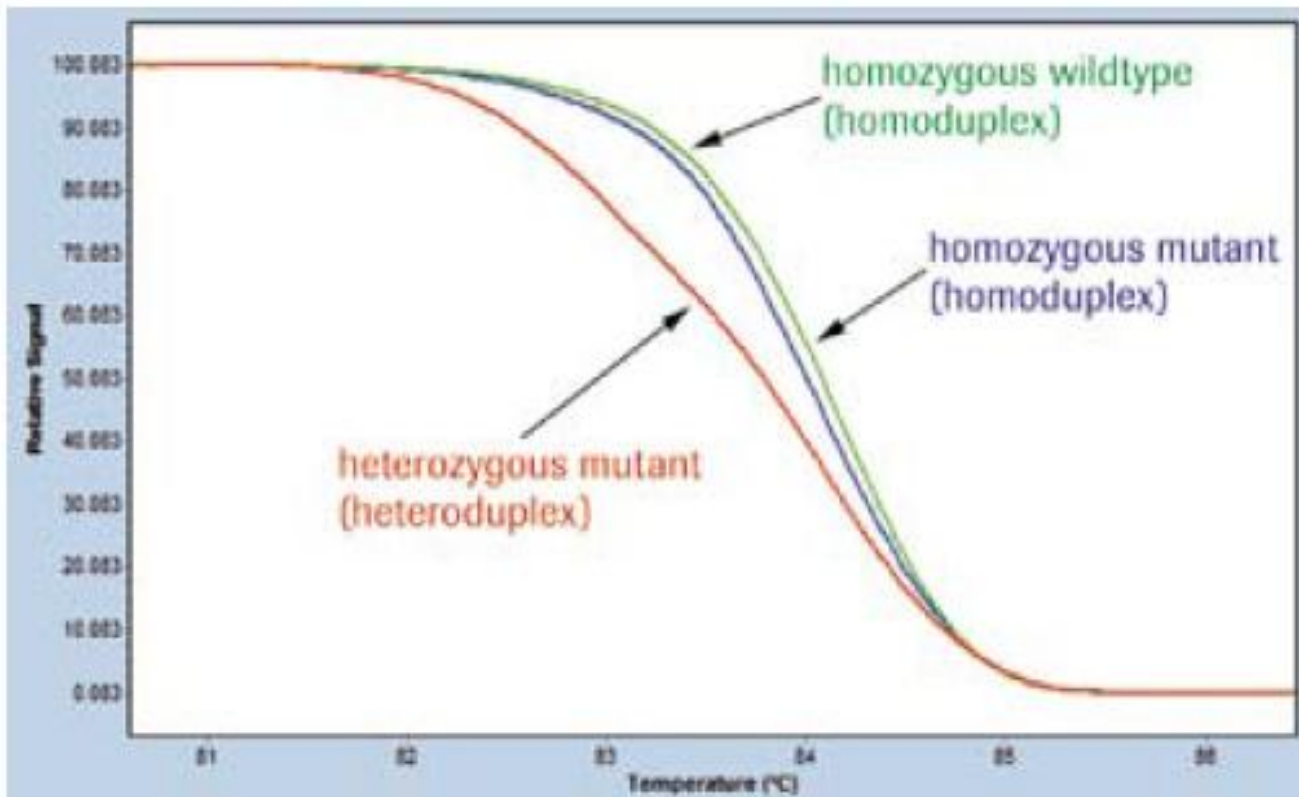
High Resolution Melting (HRM) is an extension of melting curve analysis:

- It requires special fluorophores, a high-performance instrument and special analysis algorithms.
- It enables researchers to study genetic variations (SNPs, mutations) in PCR amplicons prior to sequencing.
- It provides high specificity, sensitivity and convenience at significantly higher speed and lower cost compared to other established (*e.g.*, gel-based) methods.

Principle of High Resolution Melting



Differentiation of Heterozygous Samples



Variation in Melting Temperature

- Amplicon Melting of **homozygote** samples (containing homoduplexes of wildtype or mutant DNA) give very **similar** curve shapes.
- Amplicon Melting of **heterozygote** samples (containing homo and heteroduplexes) give curve shapes which are highly **distinct**.

Human Single Nucleotide Polymorphism (SNP) occurrence and T_m:

Class	Base Change	Occurrence in the Human Genome	Typical T _m Shift
1	C/T & G/A	64%	large (>0.5°C), avg. 1.0°C
2	C/A & G/T	20%	large (>0.5°C), avg. 1.0°C
3	C/G	9%	small (0.2-0.5°C)
4	A/T	7%	very small (<0.2°C)

Example

LightCycler® 480 Gene Scanning Software

Analyses: Gene Scanning for MDR1 +/- wt DNA

Information: Program: High Resolution Melting, Color Compensation: Off

Subset: MDR1 +/- wt DNA

Sample Editor: 12 columns, A-H rows

Analysis: Scanning results

Sum. 1-6, Unknown, Negative

Include	Color	Pos	Name	Results Group	Sensitivity
<input checked="" type="checkbox"/>	Orange	F1	NTC	Negative	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	F2	DNA No. 04	2	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	F3	DNA No. 14	2	
<input checked="" type="checkbox"/>	Blue	F4	DNA No. 15	1	
<input checked="" type="checkbox"/>	Blue	F5	DNA No. 26	1	
<input checked="" type="checkbox"/>	Blue	F6	DNA No. 29	1	
<input checked="" type="checkbox"/>	Blue	F7	DNA No. 45	1	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	F8	DNA No. 47	2	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	F9	DNA No. 63	2	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	F10	DNA No. 64	2	
<input checked="" type="checkbox"/>	Blue	F11	DNA No. 72	1	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	F12	DNA No. 73	2	
<input checked="" type="checkbox"/>	Green	G2	DNA No. 04	3	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	G3	DNA No. 14	2	

Normalized and Shifted Melting Curves

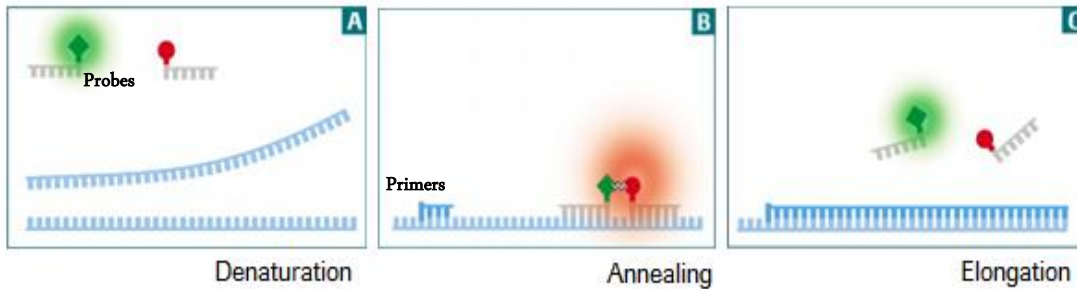
Normalized and Temp-Shifted Difference Plot

New Call: [Dropdown] Apply Show Standards Select base curve

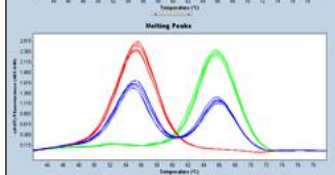
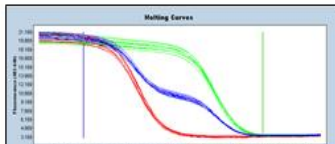
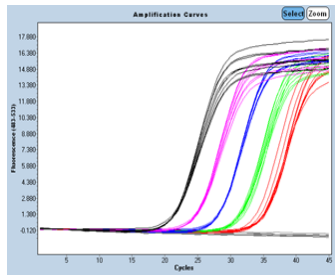
Filter Comb: 483-533 Standards (Auto Group)

Detection Formats and Dyes

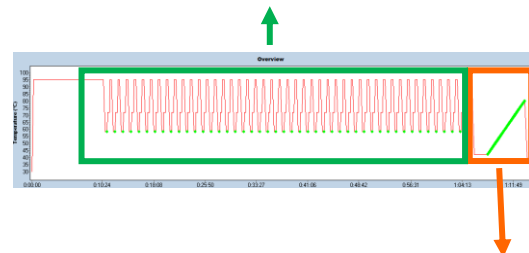
Hybridization (HybProbe) probes



Click on icon to start video
(in presentation mode)



- Sequence-specific probes
FRET reporting (donor and acceptor dye) detection

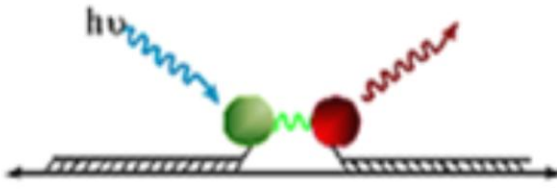


- Optional: Melting curve (detection of known mutations)
as probes stay intact during PCR

Detection Formats and Dyes

Donor and acceptor fluorophores

Hybridization Probes (HybProbes)
Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)



- Donor fluorophore is excited by appropriate wavelength.
- Donor energy is transferred non-radiatively to the acceptor fluorophore
- Excited acceptor emits at longer wavelength

Donor dye (3' end):

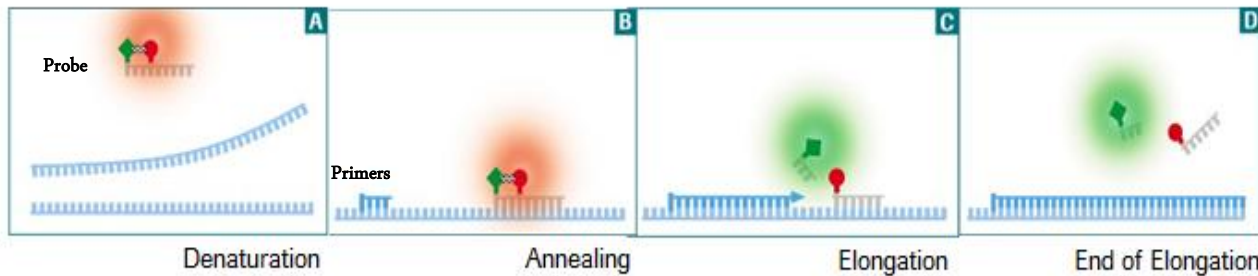
- *always* Fluorescein (Fluos)

Acceptor dyes (5' end):

- LightCycler[®] Red 610
- LightCycler[®] Red 640
- Cy5
- Cy5.5

Detection Formats and Dyes

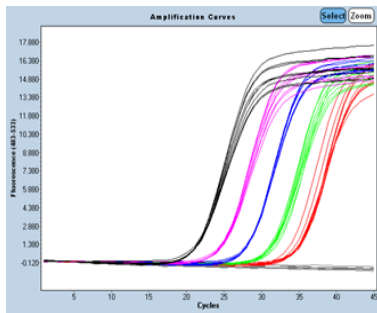
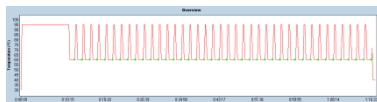
Hydrolysis probes – TaqMan® Probes



↑
Measurement once per cycle



Click on icon to start video
(in presentation mode)



- Sequence-specific probe
- FRET quenching (reporter dye and quencher) detection
- Probes are hydrolysed by 5' exonuclease activity of Taq Polymerase, separating reporter dye from quencher
-> no melting curve analysis
- Accumulating dye

Detection Formats and Dyes

Reporter fluorophores

Reporter dye (5' end):

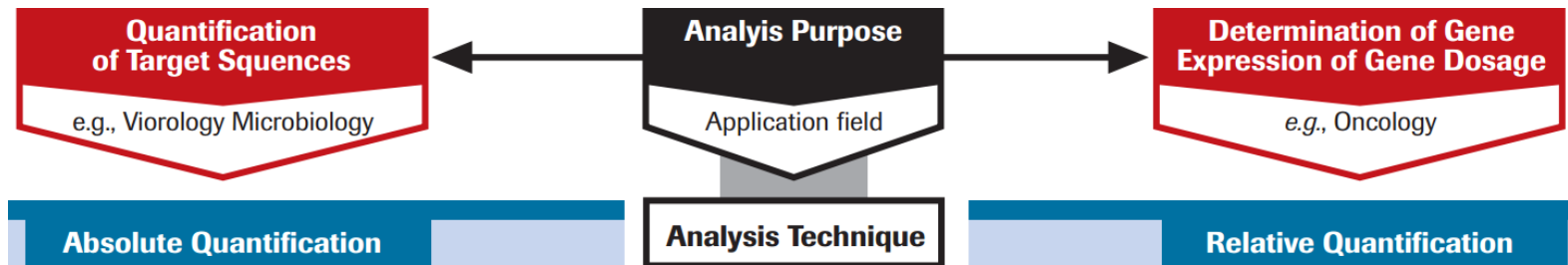
- LightCycler[®] Cyan 500
- FAM
- HEX (VIC), LightCycler[®] Yellow 555
- LightCycler[®] Red 610 (TexasRed), LightCycler[®] Red 640
- Cy5, Cy5.5, ...

Quencher:

- *e.g.*, BHQ-2 (Black hole quencher)

- **LC480硬件优势**
- **荧光定量PCR原理、染料与探针**
- **绝对与相对定量**

荧光定量PCR技术的应用



典型应用领域:

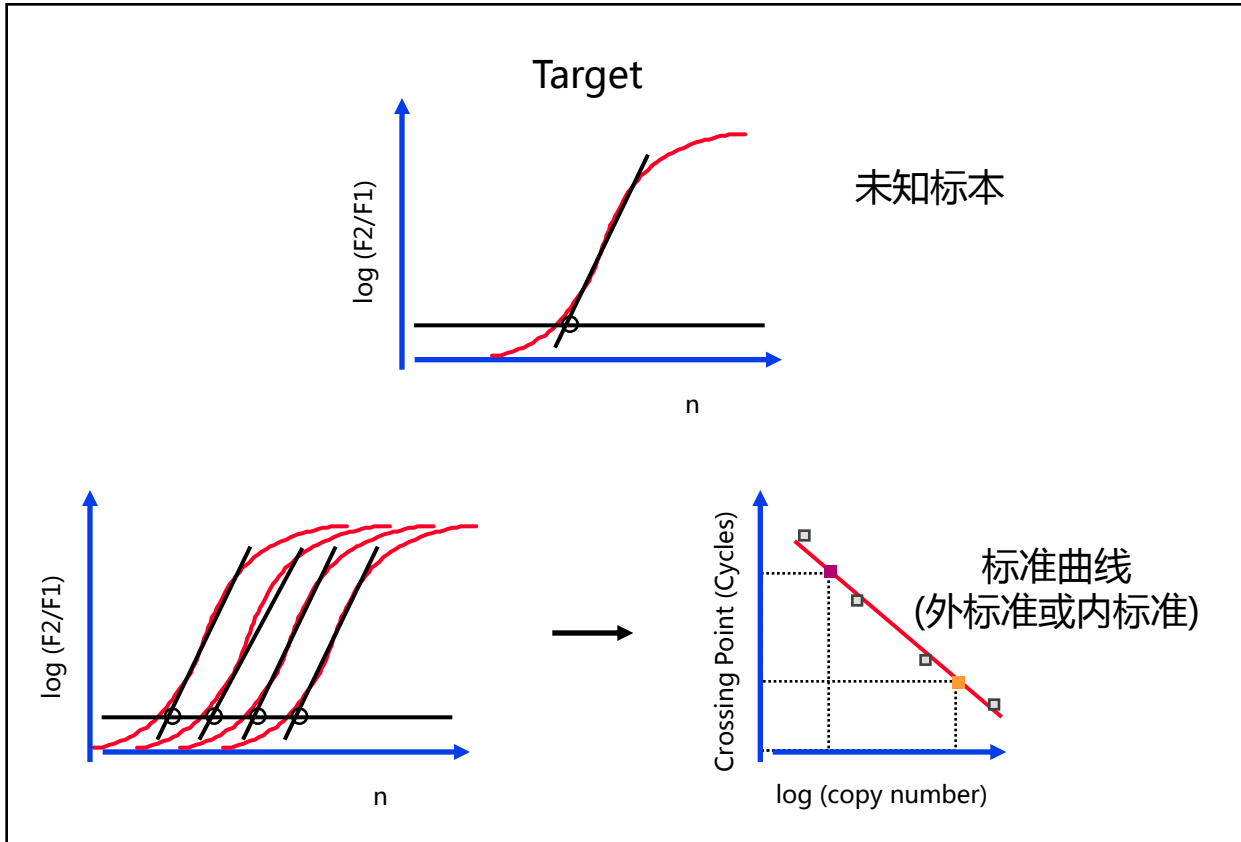
- 特定物种鉴定(e.g. 细菌, 病毒)
- 特定核酸样本检测(e.g. 肿瘤研究)
- 检测病原体载量(e.g. HIV, HBV)
- 筛选抗生素抗性基因(e.g. MRSA, VRE)
- 水质监测... ..

典型应用领域:

- *mRNA 表达水平的检测*(e.g. 细胞因子, 肿瘤)
- 基因定量 (e.g. 染色体缺失)
- 研究疾病的微小残留病灶(MRD)
- GMO 检测...

绝对定量原理

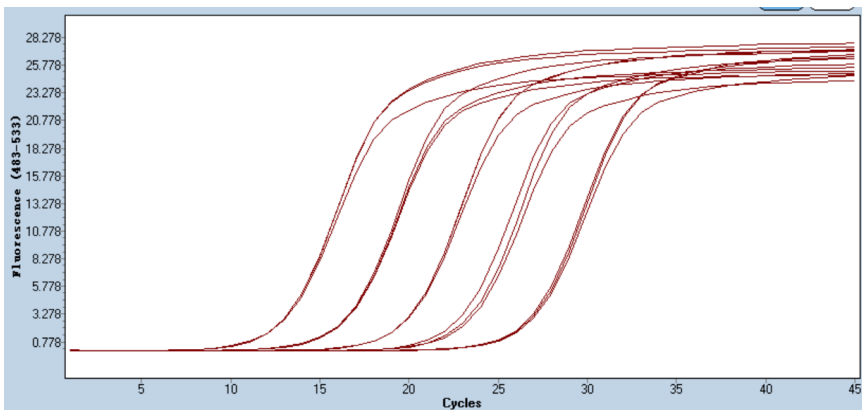
使用标准品进行绝对定量



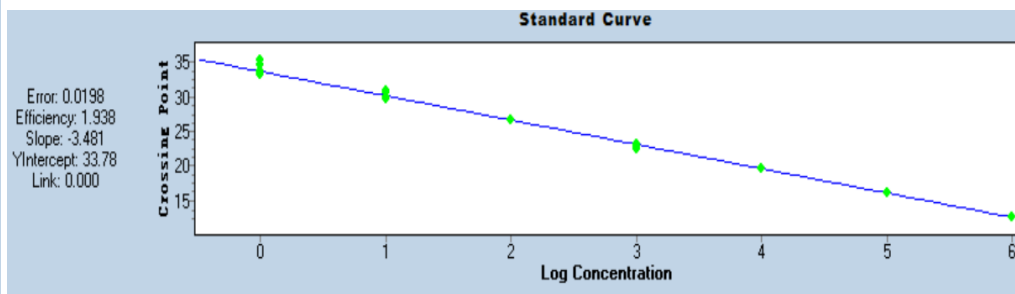
LC480数据展示



1. 扩增曲线



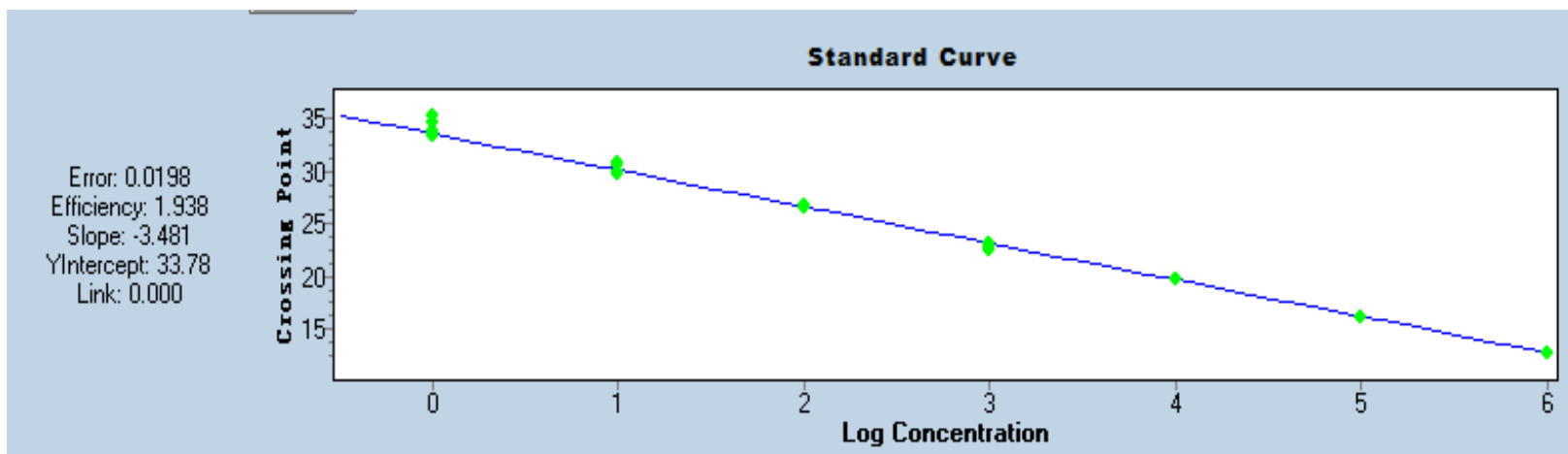
2. 标准曲线



3. 实验结果

Samples					Results			
Include	Color	Pos	Name		Cp	Concentration	Stand...	St
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A1	Sample 1		16.13	1.01E5		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C1	Sample 2		17.12	5.30E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	E1	Sample 3		18.23	2.54E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	G1	Sample 4		19.63	1.00E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	I1	Sample 5		20.63	5.18E3		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F9	Standard 1		12.64	1.02E6	1.00E6	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F10	Standard 2		16.06	1.06E5	1.00E5	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F11	Standard 3		19.60	1.03E4	1.00E4	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F12	Standard 4		23.00	1.08E3	1.00E3	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F13	Standard 5		26.61	9.91E1	1.00E2	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F14	Standard 6		30.69	6.68E0	1.00E1	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F15	Standard 7		33.25	1.23E0	1.00E0	

LC480



重点关注参数：

- Efficiency : 2.0 (完美?) 1.8~2.1 (可接受范围)
- Error : 0 (完美?) 0~0.2 (可接受范围)
- R² (越接近1越好)

LC96

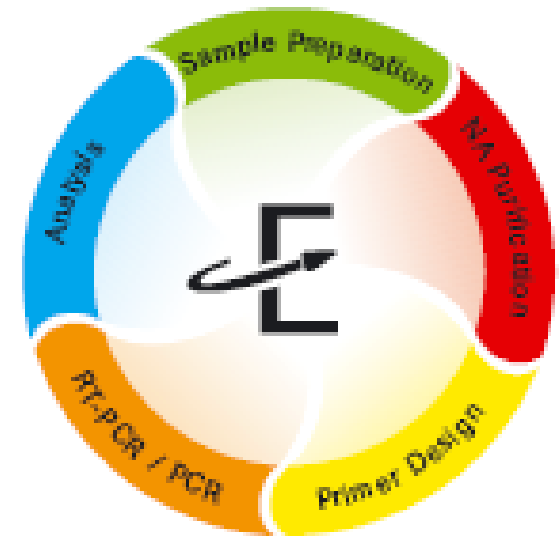
Gene Name	CYP2C9
Slope	-3.3590
Efficiency	1.98
Error	0.16
R ²	1.00
Y-Intercept	35.17

影响扩增效率的因素

在很多情况下，归咎于多种因素，PCR反应不会实现最大效率 $E = 2$ 的扩增。

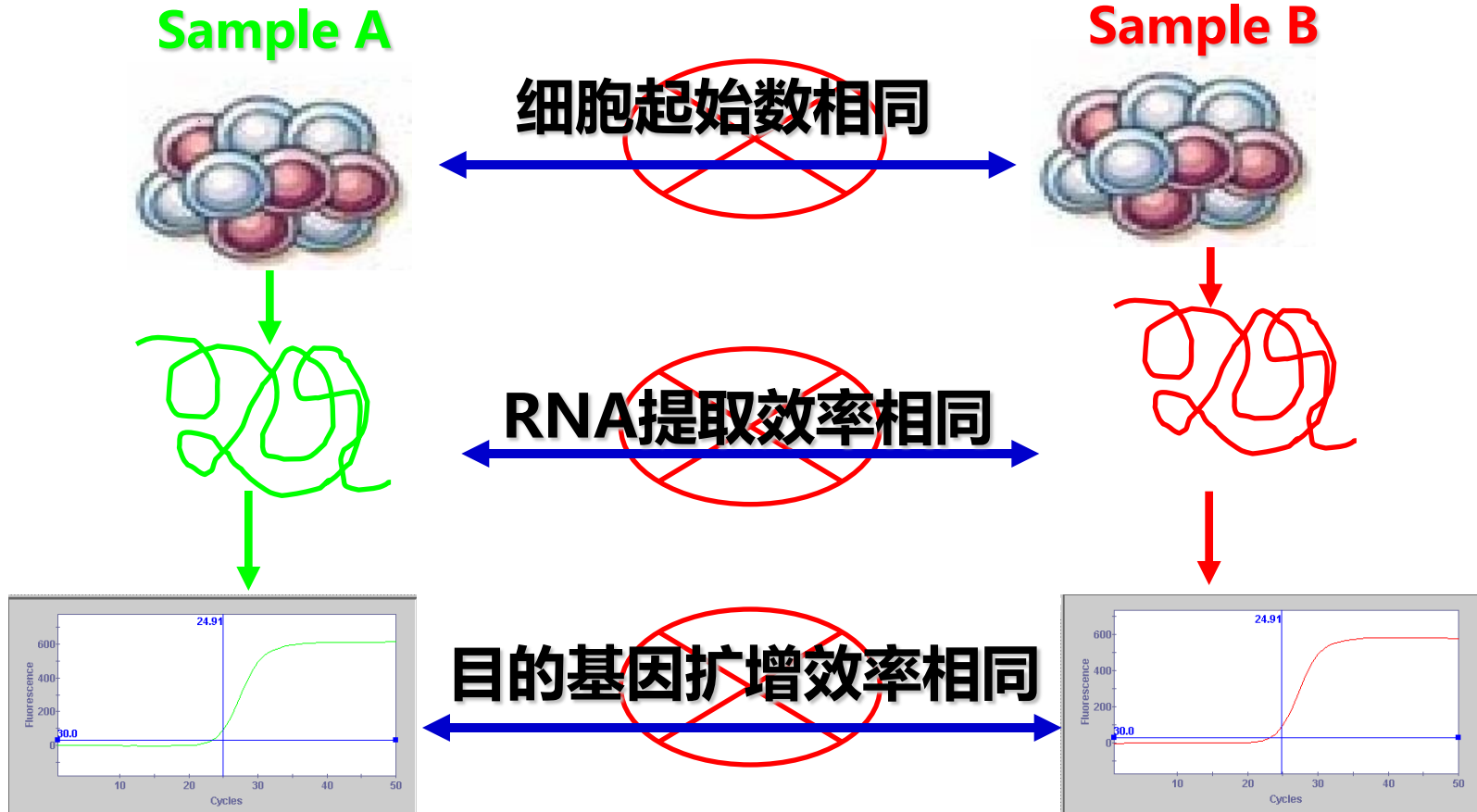
PCR效率对以下因素敏感：

- 扩增序列和长度
- 引物序列和纯度
- 核酸的性质（整体和纯度）
- 酶的稳定性
- 反应中底物浓度减少以及抑制剂（例如焦磷酸盐）累积



相对定量分析的必要性

绝对定量分析的前提不能同时得到满足



相对定量PCR的原理-内参基因

内参基因是在研究的所有样本中，拷贝数恒定不变的核酸序列 (内源性对照)，在检测基因的表达水平变化时常用它来做参照物，因此在相同研究条件下基因的表达水平可被标准化。

内参基因可以修正不同样品中：

- 初始样本量的变化
- 核酸回收率的变化
- 样本材料可能的RNA降解
- 样本和/或核酸性质的不同
- 样本加载/吸样误差的变化
- cDNA合成效率的变化

理想的内参基因：

- 表达水平在所有样品中是持续稳定的：正常组织 vs. 肿瘤组织
- 表达水平不受实验条件变化的影响：处理样本 vs. 未处理的样本
- 一般以看家基因(Housekeeping genes)作为内参基因：编码有基础细胞功能的蛋白质的基因。最常用的是ACTB和GAPDH。

相对定量PCR的原理-校准样品

比较不同样本的表达水平最常见的方式是指定其中一个样本作为**校准品 (Calibrator)**。随后，所有其它样本都与该校准品进行比较。为了标准化最终的结果，将每种**样本的目标基因/内参基因**比除以**校准品样本的目标基因/内参基因**比 (图3)。校准品的标准化值为1。

$$\text{calibrator normalized ratio} = \frac{\frac{\text{concentration of target}}{\text{concentration of reference}} \text{ (sample)}}{\frac{\text{concentration of target}}{\text{concentration of reference}} \text{ (calibrator)}}$$

图3：根据一个校准品样本标准化基因表达结果。

该校准品——通常为阳性质控样本——可能是诸如分离自特定细胞株或组织的RNA。其它典型校准品样本示例为：

- 未经处理的细胞株
- “零”时间点的样本
- 正常组

PCR的方程式

$$N = N_0 \times E^n$$

N	特定循环产生的产生的拷贝数
N_0	初始拷贝数
n	循环数
E	PCR效率

相对定量的计算方法

$$\text{Calibrator Normalized Ratio} = \frac{\frac{\text{concentration of target (sample)}}{\text{concentration of reference (sample)}}}{\frac{\text{concentration of target (calibrator)}}{\text{concentration of reference (calibrator)}}}$$

↓ $N = N_o \times E^{Cp}$

$$= \frac{\frac{N_{To(S)}}{N_{Ro(S)}}}{\frac{N_{To(C)}}{N_{Ro(C)}}} = \frac{\frac{E_T^{CpT(C)}}{E_R^{CpR(C)}}}{\frac{E_T^{CpT(S)}}{E_R^{CpR(S)}}} = \frac{E_T^{CpT(C)}}{E_R^{CpR(C)}} \times \frac{E_R^{CpR(S)}}{E_T^{CpT(S)}} = \boxed{E_T^{CpT(C) - CpT(S)} \times E_R^{CpR(S) - CpR(C)}}$$

↓

Efficiency

$E_T = E_R = 2 ???$

相对定量的计算方法

图15列出了数学计算期望的系统误差，这种误差是由不同于2.0的PCR扩增效率所致。例如当目标基因和内参基因的PCR效率的差值为0.05时，30个循环后计算出的最终结果将达到2倍差值。

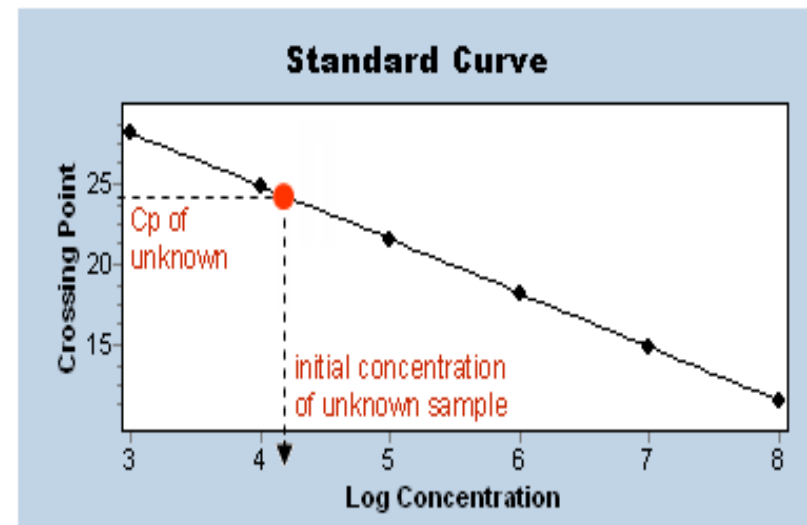
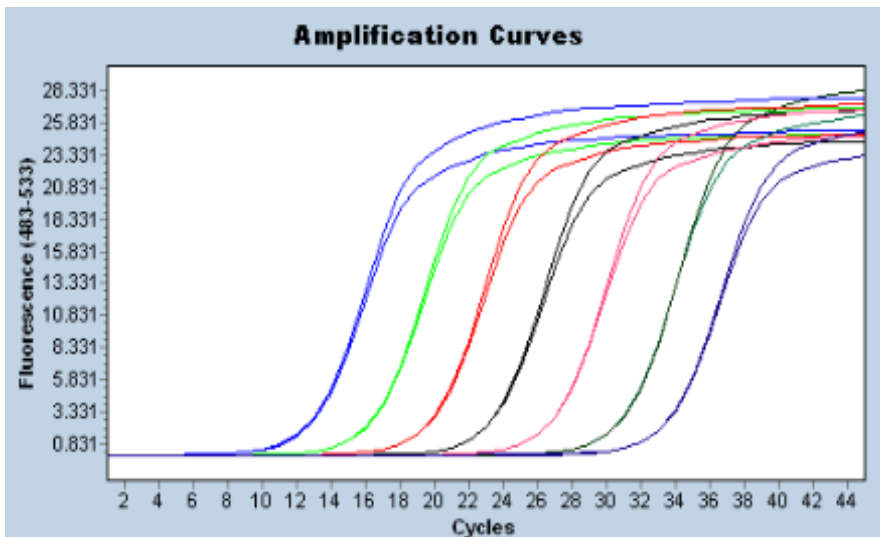
Detection Cycle (n) PCR efficiency (E)	10	20	30
2.00	-	-	-
1.97	16%	35%	57%
1.95	29%	66%	113%
1.90	67%	179%	365%
1.80	187%	722%	2260%
1.70	408%	2080%	13000%

图15：不同的PCR效率所导致的10、20和30PCR循环后的误差计算（ $(2n/E^n - 1) \times 100$ ）。

相对定量的计算方法-PCR扩增效率的计算

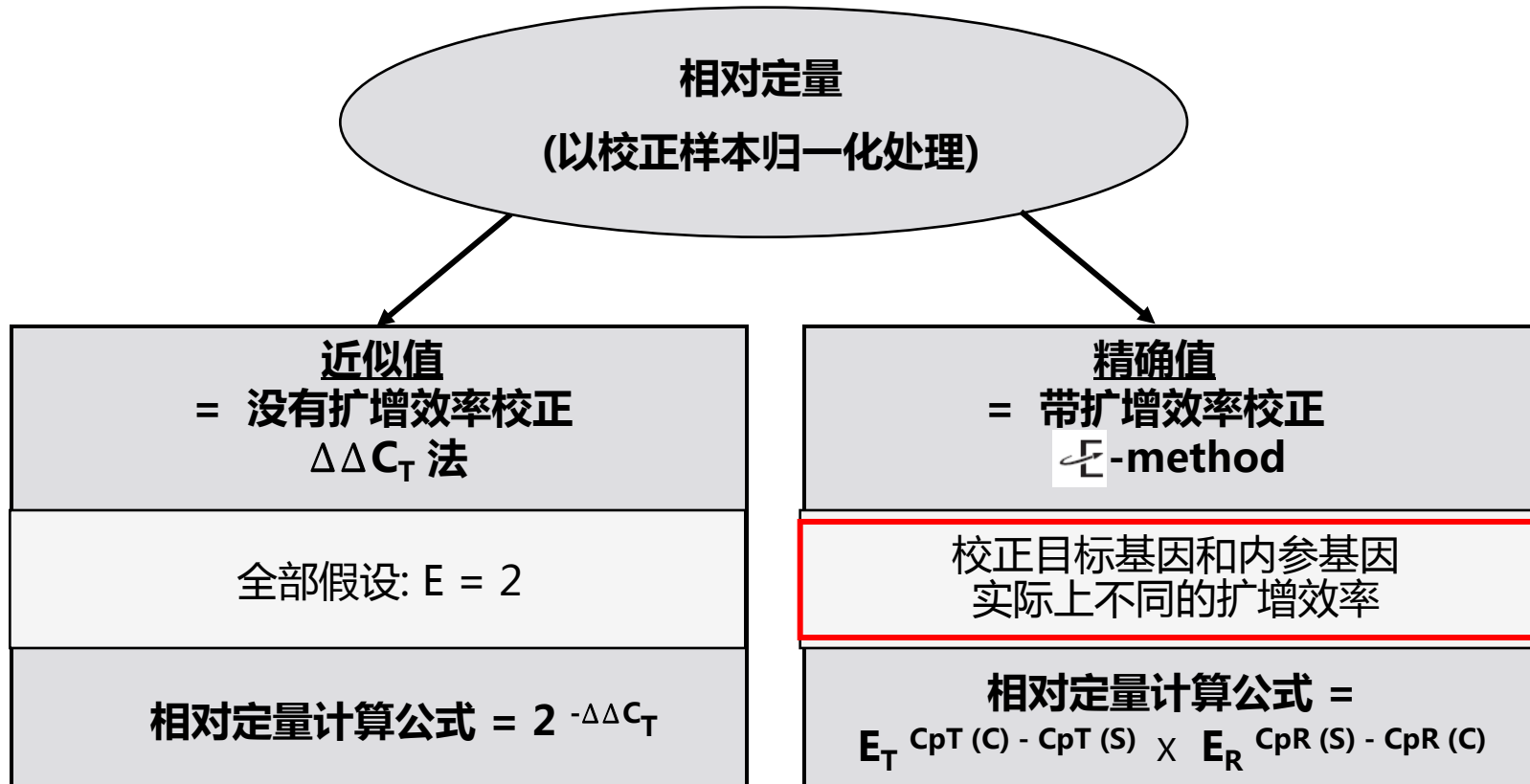
Cp值与起始模板的关系 $C_p = -k \lg X_0 + b$

- 对样品做梯度稀释（一般为10倍），校准样品可作为标准品
- 不需要已知样品的绝对浓度，相对浓度即可
- 利用已知稀释倍数的标准品可作出标准曲线，其中横坐标代表起始拷贝数的对数，纵坐标代表Cp值。
- $E = 10^{-1/\text{slope}}$



利用校正样本进行归一化处理

两种处理方法



相对定量方法 (1)

$\Delta\Delta C_T$ 法

该方法假设：

- 目标基因和内参基因的PCR扩增效率相同
- 扩增过程在整个PCR反应中保持恒定不变 ($E = 2$)

$$\text{归一化的相对比率} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

- 无需标准曲线

	Gene1	18S	Normalized	Calibrated	Fold
	Ave Ct	Ave Ct	Gene1 Exp.	Gene1 Exp.	Difference
			(ΔC_t)	$(\Delta\Delta C_t)$	$2^{-(\Delta\Delta C_t)}$
0 Hr	24.5	12.6	11.9	0	1
2 Hr	23.2	12.5	10.7	-1.2	2.3
24 Hr	25.4	11.6	13.8	1.9	0.27
					(~4 fold decrease)

相对定量方法 (2)

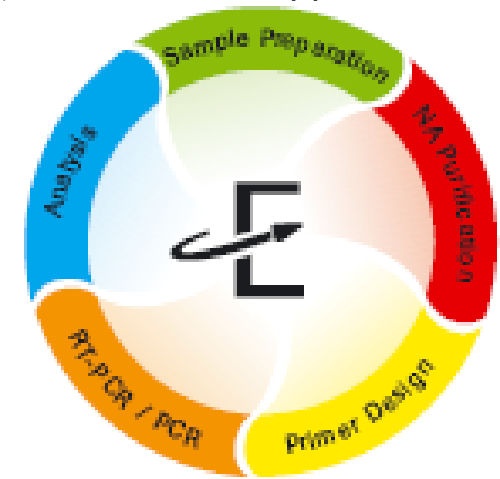
PCR效率校正

- 最大程度的优化PCR反应条件以便获得一个尽可能近似于2.0的扩增效率
- 效率校正

在很多情况下，归咎于多种因素，PCR反应不会实现最大效率E = 2的扩增。

PCR效率对以下因素敏感：

- 扩增序列和长度
- 引物序列和纯度
- 核酸的性质（整体和纯度）
- 酶的稳定性
- 反应中底物浓度减少以及抑制剂（例如焦磷酸盐）累积

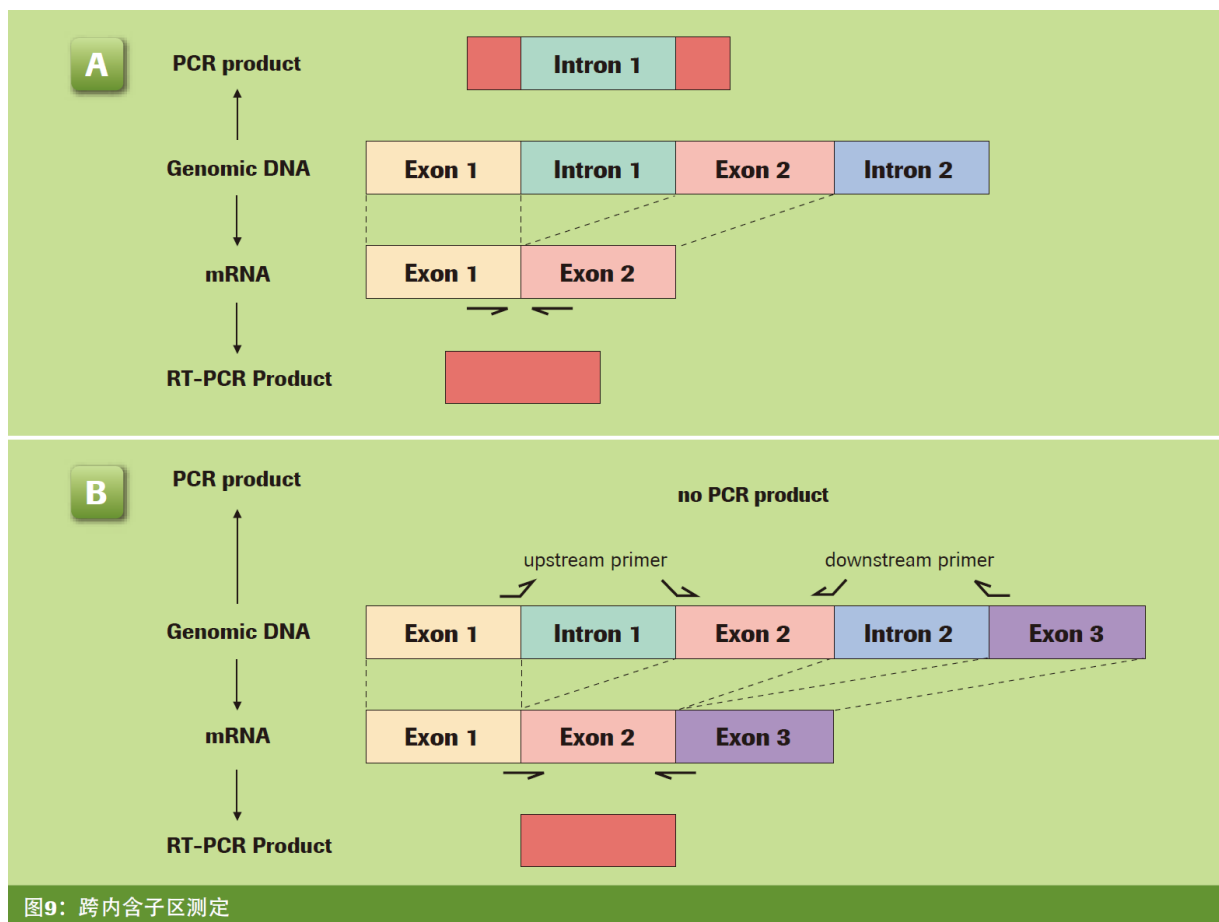


$$\text{Calibrator Normalized Ratio} = \frac{E_T^{CpT(C)} - CpT(S)}{E_R^{CpR(S)} - CpR(C)}$$

最为准确的相对定量结果

相对定量PCR实验优化-引物设计

为了避免基因表达的相对定量过程中检测到DNA，设计应跨内含子区测定（图9）。这可确保扩增的产品只能使用mRNA作为模板。



相对定量PCR实验优化-逆转录

逆转录 (RT) 和随后的qPCR可按两步法 (在分离的试管中执行逆转录和qPCR) 或者配对一步法 (在单个试管中连续执行逆转录和qPCR) 执行。每种方法都具有各自的优势 (图10)。

逆转录 (一步法)

取样步骤更少, 单管测定

- 减少污染风险
- 提高了检测的速率并且更加方便

可使用整个cDNA样本和特定引物

- 提高了灵敏度和特异性

逆转录 (两步法)

RT和PCR都在最适条件下执行

- 尽可能提高了灵敏度

在同一个RT反应中逆转录目标物和看家基因。

- 减少了结果的变异性

随意选择RT引物 (随机、oligo (dT)、基因特异性) 。

- 增加了灵活性

cDNA可被长期储存

从一个RT反应得到的多重PCRs来自普通cDNA混合体系

- 定量多个目标基因时更加便捷

图 10:

10个成功PCR实验的黄金法则

2. 复查计算公式

10个成功PCR实验的黄金法则

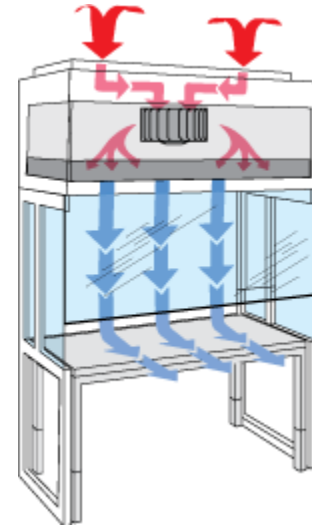
3. 彻底混匀任何试剂组分

10个成功PCR实验的黄金法则

4. 上机前离心

10个成功PCR实验的黄金法则

5. 独立的PCR体系配制区域和设备



10个成功PCR实验的黄金法则

6. 正确溶解保存引物

- ✓ TE : 1×TE (10 mM Tris-HCl , pH 8.0 ; 1 mM EDTA , pH 8.0) 溶解。
- ✓ 母液浓度 : 100 μ M ; -20 °C
- ✓ 中间工作贮液浓度 : 10 μ M 左右 (取0.5-1 μ 加20ul体系) -20 °C
- ✓ 工作浓度 : 0.2 μ M (0.05 μ M-1 μ M)左右 ;
- 怀疑引物降解或者浓度不准 , 可以跑胶看一下 (100 μ M , 2ul跑胶)

10个成功PCR实验的黄金法则

7. 稀释模板

Less is More

10个成功PCR实验的黄金法则

8. 新引物“坚持”做标准曲线

扩增效率

线性范围

- ✓ 质粒或者PCR产物
- ✓ 拷贝数的计算：

待测样本浓度 (ng/ul) = $OD_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数}$

样本分子量 = 碱基数 $\times 324$

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

10个成功PCR实验的黄金法则

9. “总是” 设置对照

NTC : 以水做模板，其他组分照加

--- 污染，引物二聚体

PC : 确定能扩增出来的模板，比如用于做标曲的质粒，尽量使用同一管

--- 样品质量，试剂质量

10个成功PCR实验的黄金法则

10. 检查你的PCR程序

- 温度
- 时间
- 采集点
- 通道



*Doing now what patients need
next*