

双标准曲线相对定量 PCR 试验原理与方法

徐丽华^{1,2} 刘春雷^{1,2} 常玉梅¹ 梁利群¹ 刘金亮^{1,2} 高国强^{1,2} 韩启霞^{1,2}

(¹中国水产科学院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070 ²上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 实时荧光定量 PCR (FQ-PCR) 是一种准确有效的核酸定量分析技术, 具有易操作、高通量、高敏感性、高特异性、高度自动化和低污染等优点, 并随新定量 PCR 仪及新操作方法的发展而得到广泛应用, 但是, 定量 PCR 的高敏感性特点使得实验操作严格而繁琐。阐述了一种改进的相对定量方法——双标准曲线法的试验原理和特点, 描述了定量 PCR 体系的优化方式, 探讨了试验误差分析方法及试验操作技巧, 并就试验数据的处理方法进行讨论。试验证明, 双标准曲线法是一种经济、简单而准确的定量方法。

关键词: 双标准曲线法 相对定量 PCR 荧光扩增曲线 试验误差分析 归一化值

Theory and Method of Double standard Curves Method of Relative Quantification PCR

Xu Lihua^{1,2} Liu Chunlei^{1,2} Chang Yumei¹ Liang Liqun¹ Liu Jinliang² Gao Guoqiang² Han Qixia²

(¹Heilongjiang River Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070

²College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) is a nucleic acid quantification technique has the advantage of simplicity of operation, high flux, high sensitivity, reliable specificity, highly automated and less polluted, and has been used widely with the introduction of new quantitative PCR instrumentation and operating methods. Real time PCR experiments call for preciseness and redundancy because of high sensitivity. In this view, we discussed the experiment principle and experiment features of double standard curves method—a improved relative quantification PCR method. amplify how to optimize PCR reaction system, then described the analytic approach of experimental error and experimental operative skills. at last, them means of dealing with experiment data. The results showed that double standard curves method is economical, simple and accurate.

Key words: Double standard curves method, Relative Quantification PCR, Fluorescence amplification curve, Analysis of experimental error, Normalized value

实时荧光定量 PCR (real time PCR) 是 20 世纪 90 年代发展起来的一种准确、快速的核酸定量分析技术, 通过在 PCR 反应体系中引入一种荧光化学物质, 对 PCR 扩增反应中每一个循环产物的荧光信号进行实时检测, 得到一条荧光扩增曲线图, 最后通过参照标准曲线对反应体系中未知模板初始浓度进行定量分析。它以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点成为了分子生

物学研究中的重要工具。

实时荧光定量 PCR 常使用的荧光化学方法主要有 5 种, 分别是 DNA 结合染料 (SYBR Green), 水解探针, 分子信标, 荧光标记引物, 杂交探针^[1]。荧光染料的优势在于它能监测任何 dDNA 序列的扩增, 使用方便, 检测成本低, 但是非特异性结合容易导致假阳性信号出现; 其他方法特异性好, 但是设计探针的难度较大, 合成成本也较高。定量分析方法

收稿日期: 2010-08-09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目 (2010CB126305), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (2009HSYX-SJ-05)

作者简介: 徐丽华, 女, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类分子生物学与基因工程育种; Email: zhengrong21@126.com

通讯作者: 梁利群, 女, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 水产动物基因工程育种; Email: liliang@fishbreeding.org

©1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

包括绝对定量分析和相对定量分析,绝对定量指的是用已知的标准曲线推算未知的样本的量,可以得到某个样本中基因的绝对拷贝数和浓度;相对定量指的是在待测样本中靶序列相对于另一对照样本的量的变化,比较对两个或多个不同处理的样本中的基因表达水平的高低变化,得到的结果是比率^[2]。相对定量法又分为比较 Ct法,双标准曲线法和比较定量法,本研究以 Rotor Gene 3000 定量 PCR仪为例,用 SYBR Green 荧光化学法,探讨双标准曲线相对定量分析的试验操作方法。

1 双标准曲线法原理

双标准曲线法就是每次试验都分别用标准品做内参基因和目的基因的标准曲线,并同时扩增各个样本中目的基因和内参基因,然后从各自标准曲线上计算待测样本中初始表达量,将目的基因表达量进行归一化处理以消除初始 RNA或 cDNA量的差异带来的表达差异。归一化值 = 目的基因浓度 / 看家基因浓度,最后通过公式: $F = (\text{待测组样品目的基因浓度} / \text{待测组样品看家基因浓度}) / (\text{对照组样品目的基因浓度} / \text{对照组样品看家基因浓度})$,即可得出不同样本或不同处理下目的基因的表达量差异,假设对照组是表达量为 1 的样本,则待测样本为对照组表达量的 F 倍^[3]。

此方法中目的基因表达量是相对于某个内参基因的量而言的,因此相对定量的标准曲线就比较容易制备,对于所用的标准品只要知道其相对稀释度即可,无需准确计算目的基因拷贝数或浓度。内参基因一般为一些看家基因,因为看家基因理论上没有个体及组织特异性,所以其表达量差异基本可以代表初始 RNA或 DNA量的差异。内参须满足:① 研究样本之间表达量相近;② 处理因素不会影响其表达;③ 可与待测基因同时进行相同的扩增^[4]。常用的内参有 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、 β 肌动蛋白、 β 2 微球蛋白、18S rRNA、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)等。

2 双标准曲线法的特点

双标准曲线相对定量分析方法的最大特点是,应用简便,无需像比较 Ct法那样对试验进行严格的优化,基因扩增效率不要求达到 100% 这种理想状态,也不要求目的基因和看家基因有相同的扩增效

率。不足之处是每次试验都必需对目的基因和看家基因做两组标准曲线,而且必需有一组稳定的标准品;并且,如果用于做标准曲线的标准品不同于样品,如标准品为质粒或纯化的 PCR产物,而待测样品为 cDNA,那么标准曲线的扩增效率并不能真实地反映样品的扩增情况^[5],因此以标准曲线来计算样品的实际浓度就存在一定误差,但是最终试验数据处理是求算待测基因和看家基因的比值,这种误差可以抵消。

双标准曲线法比较适合于样本量不大,但是研究的目的基因数目比较多的试验,相对于比较 Ct法,避免了对每个基因扩增条件的严格优化。同时,最好统一每个目的基因(包括内参基因)的 PCR体系和 PCR扩增条件,这样就避免每次都做内参基因的标准曲线和优化反应体系,达到减少工作量,节省试验成本的目的。

3 双标准曲线法的操作步骤

3.1 引物设计、cDNA模板及标准品的制备

定量试验要求引物的特异性好,避免非特异性扩增干扰目的片段的检测。引物设计原则:引物的长度为 18—27 bp, G+C含量 45%—55%,上下游引物 Tm值差别不超过 2°C, Tm值在 55—62°C之间,引物 3'端不能选择 A,最好选择 T,3'端自由能最好小于 9 kJ/mol,尽量避免引物自身互补,其避免 3'端有发夹结构,PCR产物长度要小于 200 bp,片段太长会使 Ct值延时出现,并过分消耗 PCR反应组分降低 PCR反应效率,影响试验结果的准确性。

制备 cDNA模板要保证所有样本的反转录体系中 mRNA起始量相等,反转录完成后做定量 PCR预试验,扩增所有样本中内参基因,使其 Ct值大约相等。反转录产物原液稀释 10—50倍后作反应模板,否则浓度太高,荧光背景过高,定量结果不准确。为避免模板中掺入抑制剂,如 SDS、EDTA、胍盐、甲硫胺和磷酸钠等,影响 PCR的扩增效率,所以最好使用离心柱提取 RNA。

标准品可以是扩增的目的基因片段,也可以是插入了目的片段的质粒。质粒较单纯的 DNA片段更加稳定,易于保存。用特异性引物,以获得的 cDNA为模板进行 PCR扩增,得到目的片段并进行纯化,将不同基因的 PCR纯化产物与 pMD18-T载体进行连接,

经转化、细菌培养,最后提取质粒用作标准品。

3.2 定量 PCR体系的优化

经过 PCR反应体系的优化,使扩增效率达到 80%—100%,对应的标准曲线斜率在 -3.9—-3.3 之间,此时得到的标准曲线可靠性较高。而使用优质的热启动酶、dNTP Mg^{2+} 及尿嘧啶-N糖基化酶(UNG/dUTP)防污染系统预混成定量 PCR体系也是很重要的,现 QIAGEN ABI等公司出售的 2× SYBR Green PCR MasterMix试剂盒,试验所要添加的只有引物、DNA模板及水,可以最大程度降低反应变量,减少优化参数,提高试验可重复性和可靠性^[6]。一般而言,定量 PCR反应体系中各组分的终浓度:热启动酶 1—2 U, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP/ dUTP) 0.2—0.5 mmol/L, $MgCl_2$ 2.5—5.5 mmol/L, UNG 0.2—1 U 上游(及下游)引物 0.2—1 μ mol/L,退火温度及模板终浓度根据具体试验进行优化^[7,8]。引物储存时间、引物特异性及结合能力、扩增产物的长度及 G+C含量、PCR体系中各组分含量、不同样本间 DNA聚合酶抑制物的存在情况、退火温度以及循环扩增仪上不同位置的差异等都会影响扩增效率,因此,扩增效率太低时要从这些方面进行优化。

3.3 标准曲线的制备

每条标准曲线至少要有 5 个浓度梯度,而且每个浓度梯度至少要有 3 个重复,才能保证标准曲线有好的线性关系。标准品做梯度稀释时要讲求技巧,以 10 倍连续梯度稀释方法为例:取 1 μ l 标准品

原液 + 9 μ l 稀释缓冲液,得 10^{-1} 标准品;取 1 μ l 10^{-1} 标准品 + 9 μ l 稀释缓冲液,得 10^{-2} 标准品,同理依次稀释 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 共 5 个浓度梯度,切勿直接把 1 μ l 标准品原液加入到不同体积的稀释缓冲液中,而且每一个梯度的稀释液一定要充分混匀,再进行下一个浓度梯度的稀释,这样才能使标准曲线有较高的 R^2 值,线性关系好。

如果出现不理想(不规则)的扩增曲线,表现为有高的荧光初始值,线性关系不好,原因是模板浓度高于仪器检测范围,模板一开始就结合大量染料,扰乱了基线,这时要调整标准品稀释梯度,如可以选择 10^{-5} — 10^{-9} 稀释度。一般最高浓度梯度对应的 C_t 值至少不要小于 5 选取的 5 个浓度梯度对应 C_t 值最佳范围位于 10—30 个循环,同时被选点的模板浓度范围要包括待测样本浓度。

C_t 值的确定取决于阈值(threshold),荧光阈值的缺省设置是 3—15 个循环的荧光信号标准偏差的 10 倍。阈值确定后,阈值与扩增曲线的交点所对应的循环数就是 C_t 值,即荧光信号强度达到设定阈值时所经历的循环数^[9]。阈值应在 PCR 反应的指数扩增期设定(图 1),因为这一时期每个模板的 C_t 值与该模板起始拷贝数的对数存在线性关系 $\log N_0 = -C_t \times \log E + \log N$ 起始拷贝数越大, C_t 值越小。利用不同稀释梯度的标准品作标准曲线,其中横坐标代表标准品稀释浓度,纵坐标代表 C_t ,然后通过扩增曲线获得未知样品的 C_t 值,即可从标准曲线上计算出该未知样品目的基因起始浓度。

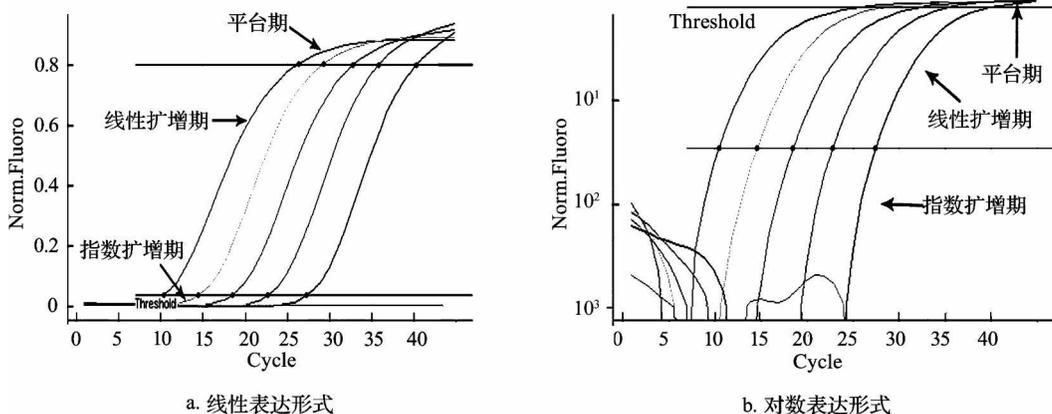


图 1 荧光扩增曲线

3.4 熔解曲线制备

由于 SYBR Green 是一种双链 DNA 结合染料, 能非特异地掺入到双链中去, 导致假阳性出现, 影响定量结果, 所以一般 PCR 反应完成后增加一条熔解曲线, 对 PCR 产物进行特异性检测, 以区分由产物和本底造成的荧光信号^[10]。如果得到的熔解曲线有单一峰值, 而且峰线窄而尖(图 2), 说明引物特异性好, 扩增产物单一。

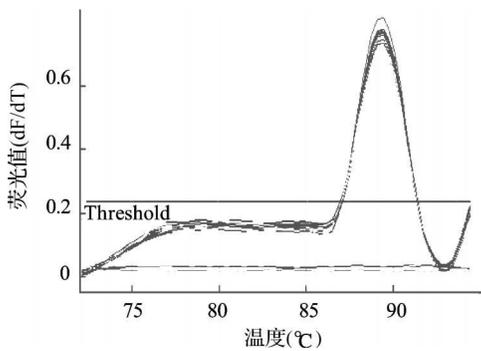


图 2 熔解曲线

3.5 样本中目的基因表达量检测

如果样本量太大, 样本不能与标准品同时进行 PCR 扩增, 则做完标准曲线后再以相同的 PCR 体系和条件扩增各组样本, 然后将标准曲线导入样本扩增曲线来计算各个样本中目的基因浓度。为了导入标准曲线, 需要在样本扩增反应中使用一个已知浓度的参照, 可以选择标准曲线的 5 个浓度点中的任意一个为参照, 在样品编辑中将样品类型设置为标准品并给予相应浓度值。同一参照可以输入多个拷贝以提高该方法的准确性。但不能定义超过一个参照的浓度, 例如, 可以有 3 个重复的 1 000 拷贝参照, 但是在同一试验中不能有一个 1 000 拷贝参照和一个 100 拷贝的参照^[11]。试验完成做熔解曲线。

3.6 试验操作注意事项

定量检测试验十分灵敏, 加样不准确会造成每个样本的重复性不好, 进而影响最终结果。加样要仔细、认真、缓慢, 确定每次加样完毕枪头中无明显的残留。试验过程中使用的枪头、离心管都需经无 DNA 酶的 RNA 酶处理且硅化程度较高。同时, 尽量减少枪头换取频率, 避免耗材间的差异给加样带

来的误差。由于试验中每个基因都对应多个样本模板, 且每个模板都要做 3 次重复, 所以在 PCR 体系构建时, 将 2× SYBR Green PCR Master Mix 引物和无 RNase 水混在一起, 再均分到每个反应管中。而每个模板需要单独加到反应管, 为了避免小量加样带来误差, 每次加样量不要低于 2 μL, 所以如果模板浓度太高可以进行一定程度的稀释, 以增加每次的加样量。

2× SYBR Green PCR Master Mix 中含有热启动 Taq DNA 聚合酶, 所以操作不需在冰上进行, 但是为了避免操作时间太长会对导致引物、模板降解和对 Master Mix 质量产生影响, 建议冰上操作。加样时要避免强光线直射, 强光会加速 Master Mix 中的荧光淬灭。试验药品和材料分装保存, 避免交叉污染。试验中用于引物和模板稀释的水都要确保无菌、无酶、无核酸及无热源污染。

操作台要设在安静, 洁净的环境中, 少有人走动, 空气流动性小, 避免空气中的杂质影响试验结果, 可以在超净工作台上操作但不要开风机或风速要小, 防治水分蒸发导致加样误差。试验前用 75% 乙醇擦拭操作台, 加样枪等试验必需品。试验全程穿戴手套, 口罩和干净的实验服。

4 标准曲线试验误差分析

用不同批次试验来检测人为操作及实验仪器误差对标准曲线制作的影响。本研究以鲤脑组织 cDNA 为模板, 扩增鲤 18S rRNA 基因 200 bp 左右片段序列, 然后将其纯化并连接到 pMD18-T 载体中, 克隆后提取质粒作为标准品。紫外分光光度检测质粒浓度为 20 μg/mL, 将质粒进行 10 倍连续梯度稀释, 经过预试验选择 10⁻³ - 10⁻⁷ 5 个合适的浓度点, 用相同的 PCR 反应体系、PCR 反应程序, 但是分 3 个试验批次做 18S rRNA 基因的标准曲线, 每条标准曲线都有 5 个浓度梯度, 每个浓度梯度做 3 次重复。同一阈值进行 3 次试验结果分析, 得到 3 条 18S rRNA 基因的标准曲线回归方程及相关参数, 结果见表 1。3 次试验 R² 都大于 0.99, 说明线性关系很好, 标准品梯度稀释恰当, 加样误差小; 扩增效率都在 90% 左右, 说明引物设计合理, 而且 PCR 反应体系得到优化。

表 1 标准曲线及相关参数

试验次序	R ²	扩增效率	标准曲线回归方程
1	0.99788	0.92555	CT=-3.514×lg(conc)+36.221
2	0.99865	0.89299	CT=-3.608×lg(conc)+36.832
3	0.99881	0.89422	CT=-3.605×lg(conc)+36.817

利用 Excel 对标准曲线每个浓度点的 3 次试验结果进行单因素方差分析^[12], 得到各浓度点 F 检验结果如表 2 所示。结果表明, 3 次试验中标准曲线 5

个浓度点的检测值差异并不显著 ($P > 0.05$), 而且 3 次试验的 R² 值及扩增效率很接近, 说明试验批次及自身操作所带来的试验误差对试验结果并未产生影响。所以在用双标准曲线法对多个基因进行定量时, 如果各个基因的 PCR 反应体系、反应条件一致, 则不需要同时做内参基因和目的基因的标准曲线, 内参基因标准曲线做一次就足够; 而且如果样本数过多, 一个 RUN 不能完成所有样本的检测, 可以分成不同的批次做, 试验误差不会影响定量结果。

表 2 三次重复试验各浓度梯度 F 检验

浓度梯度	差异源	SS	df	MS	F	P	F _{crit}
10 ⁸	组间	6.42E+13	2	3.21E+13	1.97E-01	0.826659	5.143253
	组内	9.8E+14	6	1.63E+14			
	总计	1.04E+15	8				
10 ⁷	组间	4.05E+12	2	2.02E+12	4.13E+00	0.074423	5.143253
	组内	2.94E+12	6	4.9E+11			
	总计	6.99E+12	8				
10 ⁶	组间	7.19E+10	2	3.59E+10	1.52E+00	0.291623	5.143253
	组内	1.42E+11	6	2.36E+10			
	总计	2.13E+11	8				
10 ⁵	组间	2.07E+08	2	1.03E+08	1.26E+00	0.348876	5.143253
	组内	4.92E+08	6	8.20E+07			
	总计	6.99E+08	8				
10 ⁴	组间	3.77E+06	2	1.88E+06	2.59E+00	0.15424	5.143253
	组内	4.36E+06	6	7.26E+05			
	总计	8.12E+06	8				

5 试验数据处理

为了使结果准确并有统计学意义, 就要求每个试验组 (对照组和待测组) 样本量 ≥ 6 每个样本的重复次数 ≥ 3 。这样目的基因及看家基因的标准曲线和样本不能在一个 RUN 中检测完成 (RG3000 定量 PCR 仪 36 孔转子)。因此, 可以先在一个 RUN 中同时做目的基因和看家基因的标准曲线, 然后在另一个 RUN 中同时扩增每个样本的目的基因和看家基因, 如果样本过多可以分成几个 RUN 来检测, 但是同一个样本的目的基因和看家基因的检测要在同一个 RUN 中完成, 以避免不同试验批次造成的试

验误差。试验完成后将标准曲线导入样本扩增曲线中, 得到每个样本目的基因和看家基因 C 值和浓度 (重复样本软件自动算出均值)。试验结果要用归一化值表示, 归一化值 = 目的基因浓度 / 内参基因浓度, 根据公式算出每个样本的归一化值^[13], 然后分别统计待测组和对照组所有样本归一化值的算术平均数及标准偏差, 结果用柱形图表示^[14]。本试验以 18S rRNA 基因为内参基因, 检测鲤低温处理组 (6℃) 和常温对照组 (20℃) 中细胞色素 c 氧化酶亚基 (Ct) 及肌醇-1-磷酸盐合成酶 (G10) 的基因表达量差异, 其结果用柱形图表示, 见图 3。

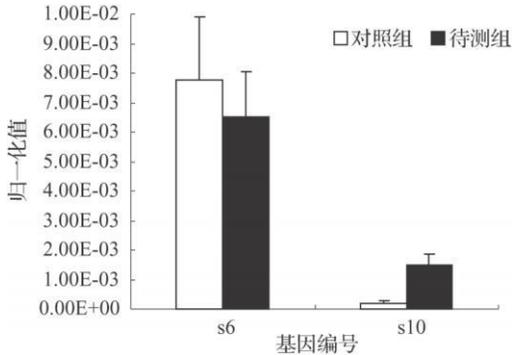


图3 柱形图表示基因表达差异

利用公式相对表达量 = (待测样品目的基因初始浓度 / 待测样品内参基因初始浓度) / (对照样品目的基因初始浓度 / 对照样品内参基因初始浓度), 计算待测组目的基因相对于对照组的表达差异倍数。

6 结束语

相比于其他定量方法, 双标准曲线法在试验操作上有种种优势, 如对 PCR体系和扩增效率的要求不那么严格, 试验误差可以在最终结果处理时消除一部分, 这就大大减少了试验的工作量, 而且得到的试验结果比较可靠, 是一种经济实用, 准确合理的试验方法。目前已有有人将其用于鱼类抗逆方面的研究中^[13], 并得到了预期结果。该方法必将以其高效、简便、准确及易操作的优点, 在基因表达定量研究方面得到广泛应用。

参考文献

- [1] 张驰宇, 成婧, 李全双, 等. 荧光实时定量 PCR的研究进展. 江苏大学学报: 医学版, 2006 16(3): 268-271
- [2] 唐永凯, 贾永义. 荧光定量 PCR数据处理方法的探讨. 生物技术, 2008 18(3): 89-91
- [3] 王行, 王惠民. 实时定量 PCR技术的方法学分类. 临床检验杂志, 2007 25(1): 71-72
- [4] 纪冬, 辛绍杰. 实时荧光定量 PCR的发展和数据分析. 生物技术通讯, 2009 20(4): 598-600
- [5] 基因有限公司 (生命科学组). 荧光定量 PCR技术专辑.
- [6] 轩昊科技. 荧光定量 PCR实验指南. <http://www.transhol.cn/static/pcmm003.htm>
- [7] Applied Biosystems SYBR Green PCR Master Mix and RT-PCR Reagents Protocol
- [8] QIAGEN QuantiTect SYBR Green PCR Handbook
- [9] 李洁. 实时荧光定量 PCR技术及实例分析. 中国现代教育装备, 2009(1): 47-50
- [10] 阳成波, 印遇龙, 黄瑞林, 等. 实时定量 RT-PCR的原理及方法. 免疫学杂志, 2003 19(3): 145-150
- [11] Corbett Research RotorGene 3000的 6.0版本软件操作手册 (中文版)
- [12] 郭文久. Microsoft Excel方差分析的使用. 云南农业大学学报, 2000 15(1): 9-12
- [13] 张鋈. 荧光实时定量 PCR技术初探. 生命科学趋势, 2003 1(4): 1-28
- [14] 侯彦峰, 张照斌, 胡建英, 范光丽. 定量 RT-PCR检测雌二醇诱导的青鳉鱼基因表达. 中国环境科学, 2006 26(5): 599-602
- [15] 李勇, 丁雷, 李言. 低温对鲤鱼的 5个基因在不同组织中表达量的影响. 动物学报, 2008 54(3): 460-466

(责任编辑 李楠)