

碧云天定量PCR技术服务

Real-time PCR Services by Beyotime



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology

订购热线：400-168-3301或800-8283301

技术咨询：info@beyotime.com

技术服务：service@beyotime.com

网址：<http://www.beyotime.com>

碧云天定量PCR技术服务

服务介绍

- 碧云天的定量PCR(Quantitative PCR, qPCR)技术服务是采用SYBR Green I 荧光染料法或TaqMan荧光探针法对DNA/RNA进行相对定量或绝对定量。
- ✓ 相对定量：通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算比较目的基因和内参基因(常用GAPDH、 β -actin和36B4等)的表达倍数差异进行相对定量；
- ✓ 绝对定量：需要先制备标准品，然后在检测目的基因的同时检测标准曲线，通过比对标准曲线对未知浓度的样品进行绝对定量，最终计算出样品中特定核酸的拷贝数、摩尔数或者微克数等。

碧云天定量PCR技术服务

服务介绍

- 碧云天凭借多年的PCR相关试剂盒，特别qPCR试剂盒的研发经验，拥有专业的技术团队，可以针对客户的不同实验目的设计实验方案，提供下列样品的相对定量或绝对定量的检测服务，交付真实准确的原始数据和检测报告：
 - ✓ DNA；
 - ✓ mRNA；
 - ✓ 长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)；
 - ✓ 非编码小RNA(non-coding small RNA, ncsRNA，包括miRNA、piRNA、siRNA、tRF等)

碧云天定量PCR技术服务

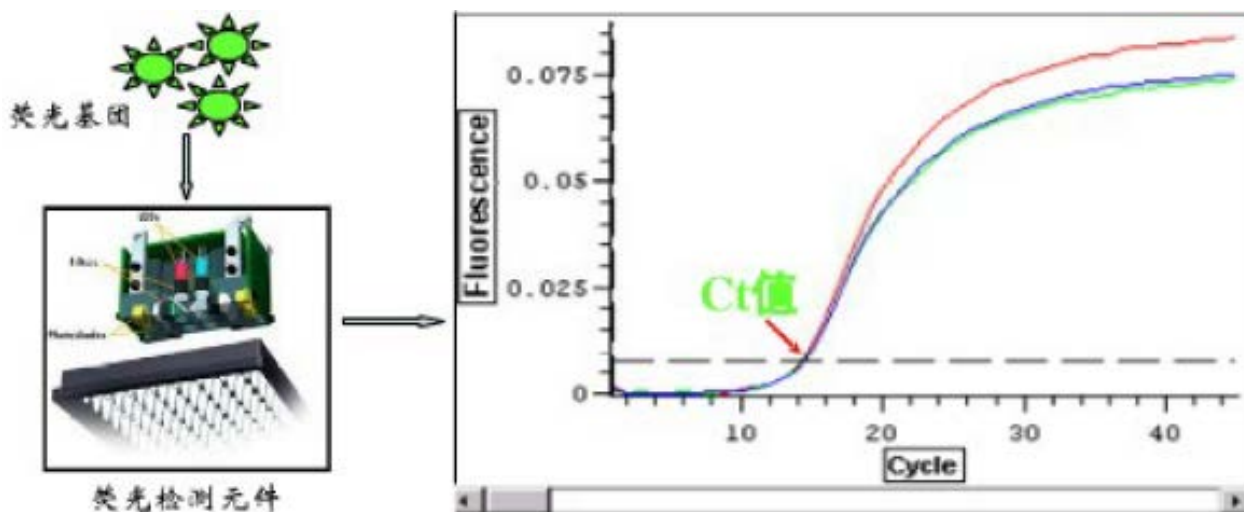
碧云天的优势

- **高品质**——碧云天拥有专业的技术团队，提供严谨的实验设计，每个样品均进行三次平行实验，免费数据分析，交付原始检测数据和定量PCR检测报告。
- **服务全**——碧云天基于多年的研发经验，提供从引物和探针设计到相对或绝对定量分析的全套服务，客户可根据实验需要选择SYBR Green I荧光染料法或TaqMan荧光探针法。
- **效率高**——碧云天成熟稳定的检测体系，多年的定量PCR检测经验，可在最短时间内交付检测结果。
- **仪器好**——碧云天拥有ABI7500、7900等qPCR仪，通量大，可靠性强。

碧云天定量PCR技术服务

定量PCR服务

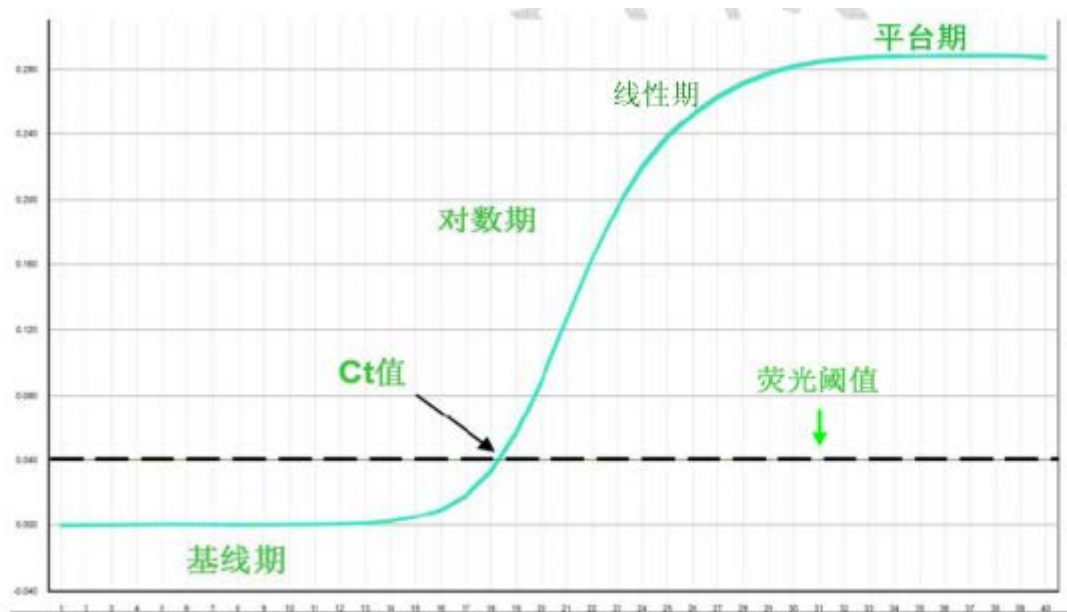
- 定量PCR(Quantitative PCR, qPCR), 也称实时PCR(Real-time PCR)或者实时定量PCR, 是指借助荧光染料或荧光标记的特异性探针, 在PCR指数扩增期间实时监测PCR反应体系中的荧光信号强度的变化, 从而对目的基因进行定量分析的PCR检测技术。该技术具有特异性强、灵敏度高、污染途径少、检测方法准确等特点, 实现了PCR由定性到定量的飞跃, 已成为国际公认的核酸定量的标准方法, 广泛应用于基因表达丰度、拷贝数等研究及临床疾病检测等许多领域。



碧云天定量PCR技术服务

扩增曲线(primary curve)

- 随着PCR反应的进行，扩增产物不断积累，荧光信号强度不断增加。每经过一个循环，收集一次荧光信号，通过荧光强度的变化监测扩增产物量的变化，从而得到扩增曲线图。
- PCR的扩增曲线实际上并不是一条标准的指数曲线，而是呈S型曲线。



纵坐标: R_n (荧光值)

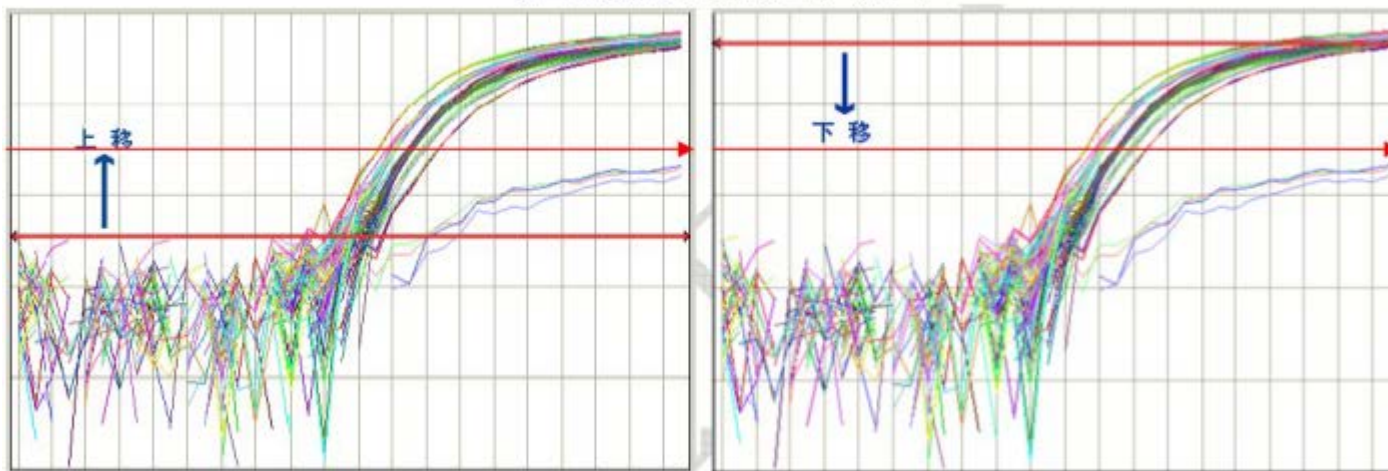
横坐标: cycle number
(循环数)

碧云天定量PCR技术服务

荧光阈值(threshold)

- 基线(baseline)：一般把荧光PCR的前15个循环信号作为荧光本底信号，即样本的荧光背景值和阴性对照的荧光值
- 荧光阈值(threshold)：扩增曲线上人为设定的一个值
 - ✓ --缺省设置：PCR反应前3-15个循环荧光本底信号标准偏差的10倍(机器自动设置)
 - ✓ --手动设置：大于样本的荧光背景值

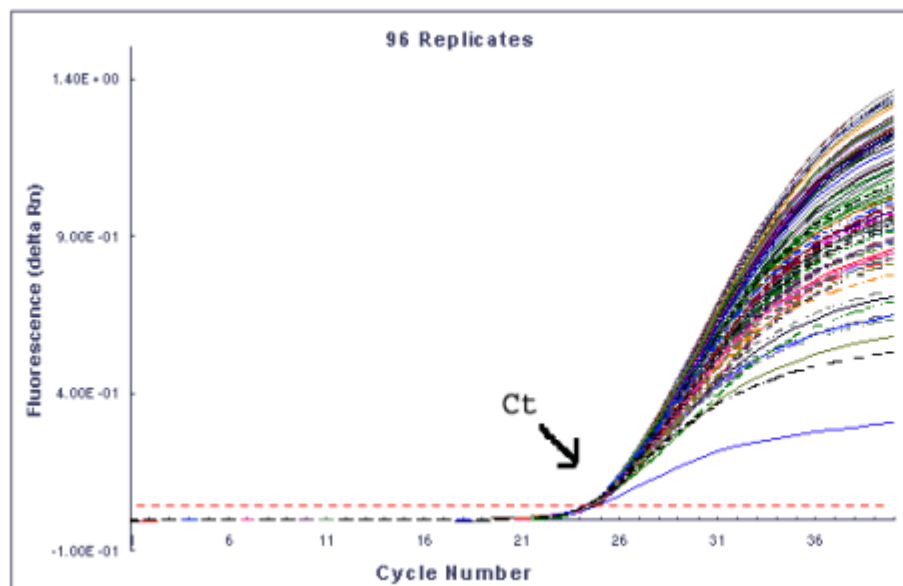
手工调整荧光阈值示意图



碧云天定量PCR技术服务

Ct值(cycle Threshold)

- Ct值：在荧光PCR扩增过程中，当扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数。



Ct值的特点：

- 相同模板进行96次扩增，平台期DNA拷贝数波动很大，但Ct值相对固定；
- Ct值则极具重现性

起始拷贝数越多，经过的循环数就越少，Ct值也就越小，反之亦然。正常的Ct值范围在18-30之间，过大和过小都将影响实验数据的精度。

碧云天定量PCR技术服务

*SYBR Green I*工作原理

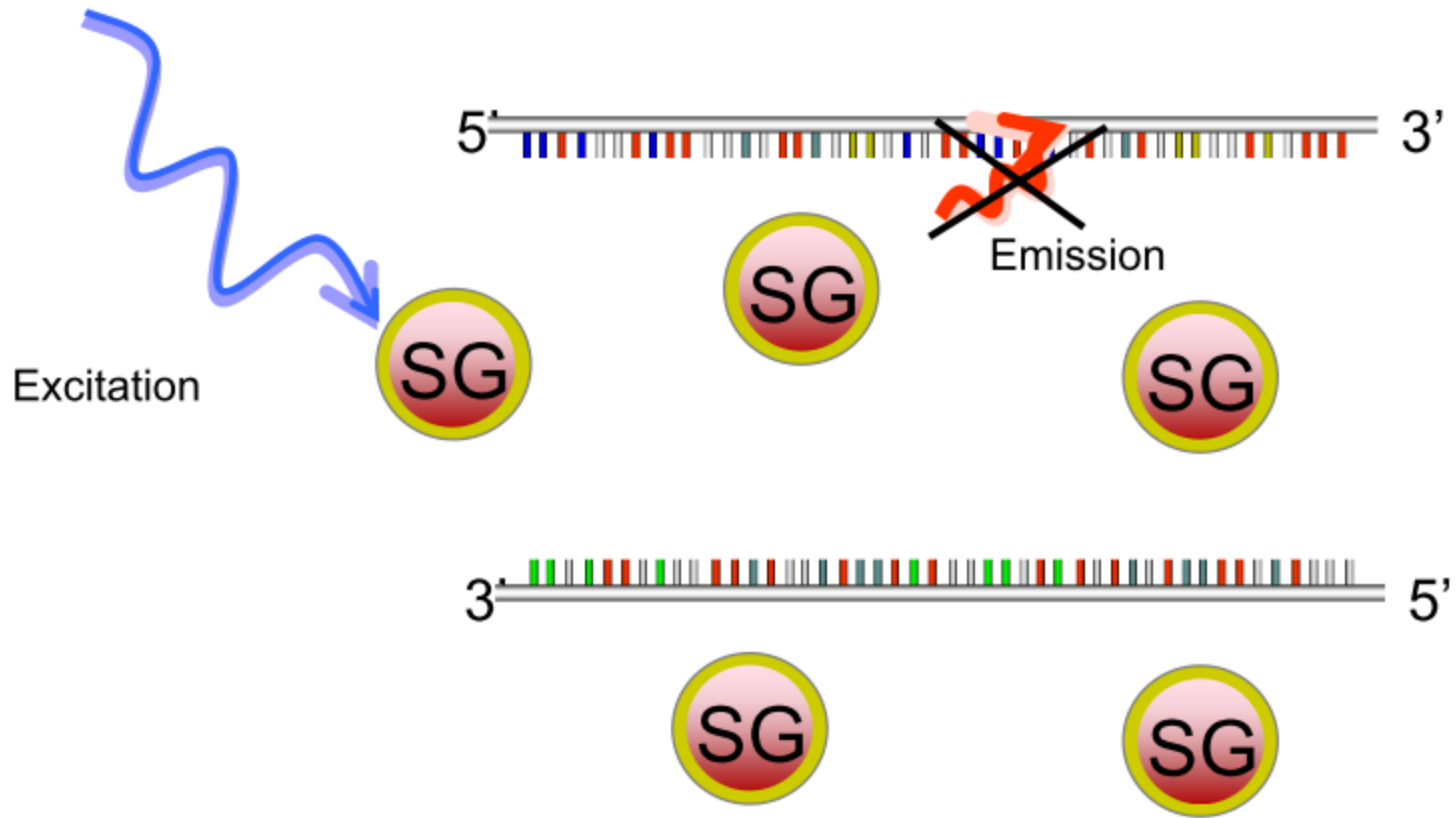


- SYBR Green I是一种与双链DNA小沟结合的荧光染料
- SYBR Green I只与双链DNA结合才能发出荧光
- 荧光信号与双链DNA分子数成正比，随着扩增产物增加而增加

荧光信号强度与反应体系中所有双链DNA分子成正比。

碧云天定量PCR技术服务

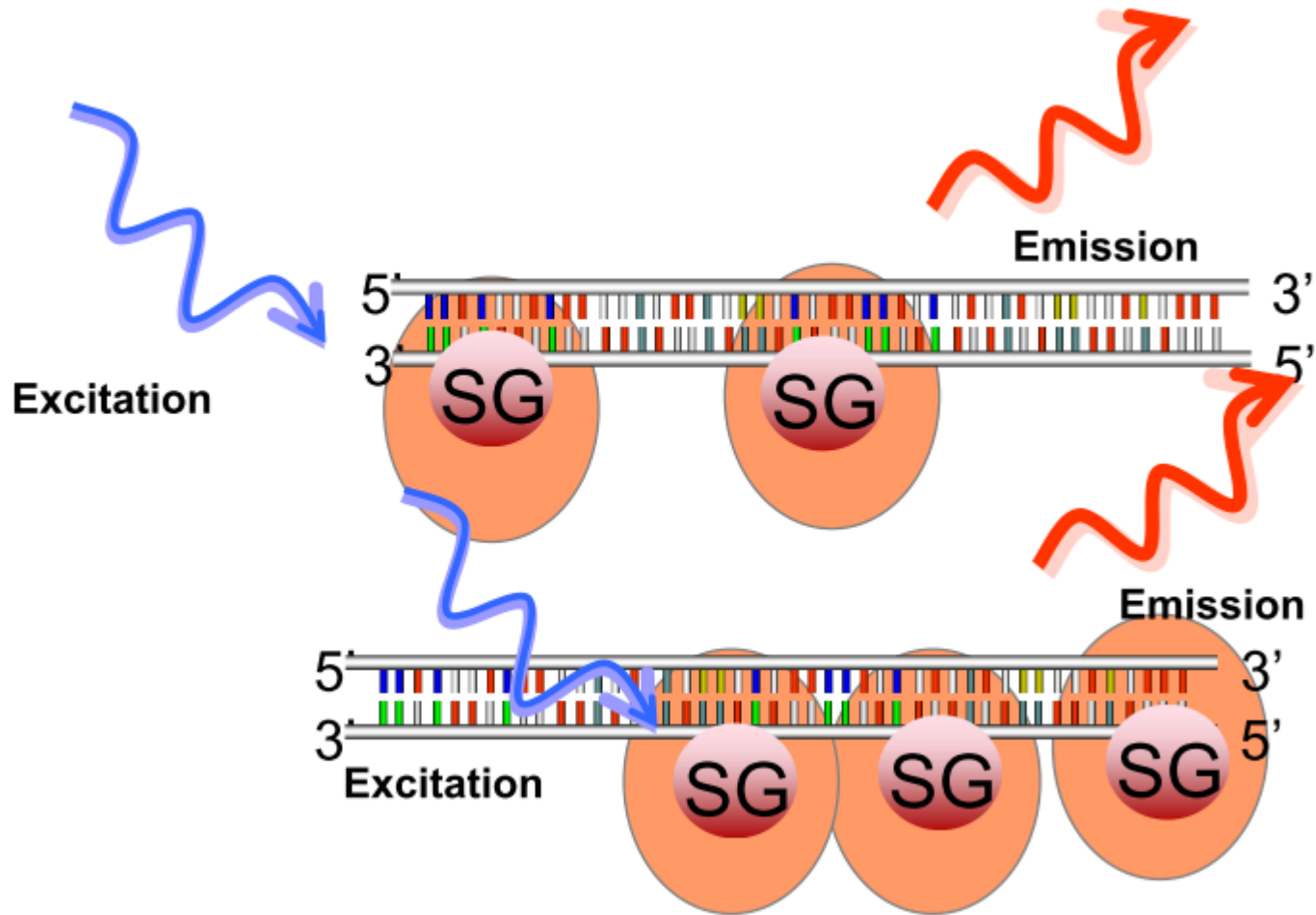
SYBR Green I作用机理示意图：SYBR Green未结合到DNA上



SG: SYBR Green

碧云天定量PCR技术服务

SYBR Green I作用机理示意图：SYBR Green I结合到DNA上



碧云天定量PCR技术服务

*SYBR Green I*优缺点

◆ 优点

- 实验设计简单
 - --仅需设计两个引物
- 通用性好，成本低
 - --对DNA模板没有选择性
- 兼容熔解曲线
 - --鉴定有无PCR杂带，有无引物二聚体

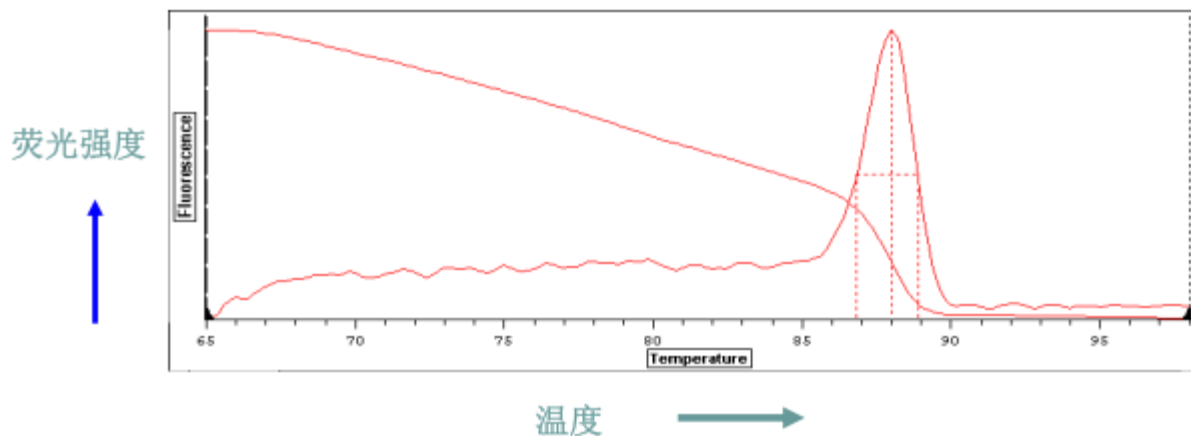
◆ 缺点

- SYBR Green I与所有双链DNA结合
 - --引物二聚体或错误扩增产物造成假阳性
 - --只能检测单一模板，无法进行多重检测
- 灵敏度低
 - --适合于5000拷贝以上的基因定量

碧云天定量PCR技术服务

熔解曲线分析

- PCR过程结束后，将温度缓慢升高，此时双链DNA解链成为单链，内参染料会被释放出来，荧光信号逐渐减弱

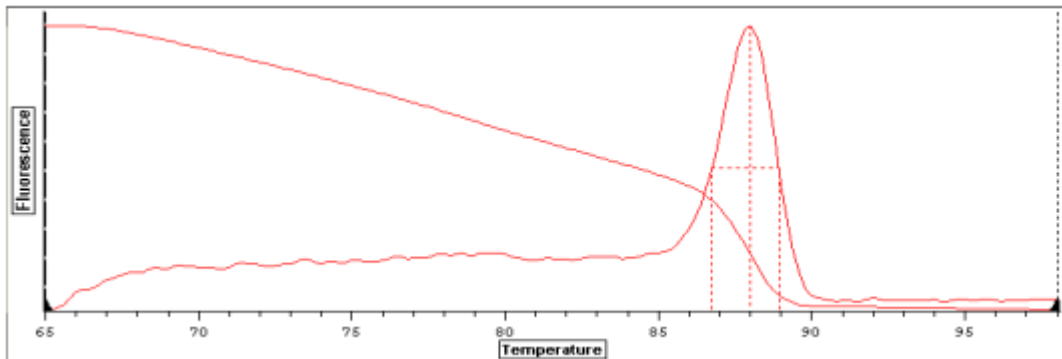


将温度对荧光强度的变化求导($-dI/dT$)

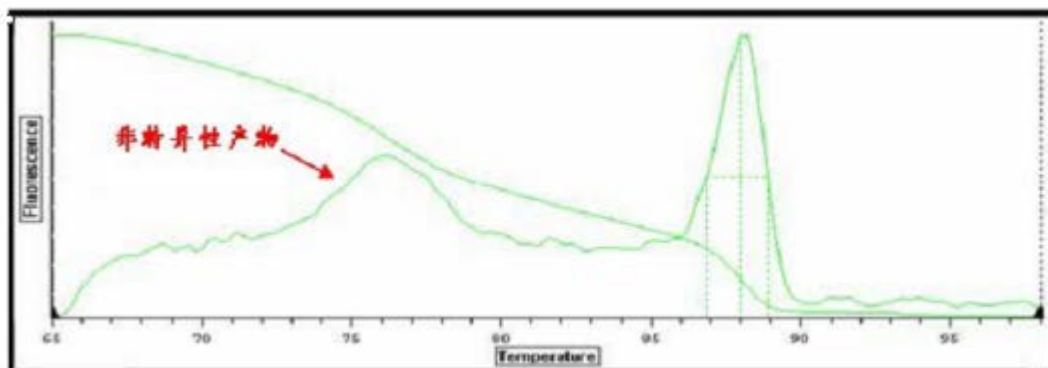
峰值代表斜率改变最大时的温度值，即 T_m ，其值与双链DNA的长度、GC%含量有关，可部分代表序列的特异性。

碧云天定量PCR技术服务

熔解曲线分析



融解曲线分析，单一峰
无非特异性荧光
定量准确



融解曲线分析，出现杂峰
其他产物出现非特异性荧光，因此定量不准确

碧云天定量PCR技术服务

Taqman工作原理

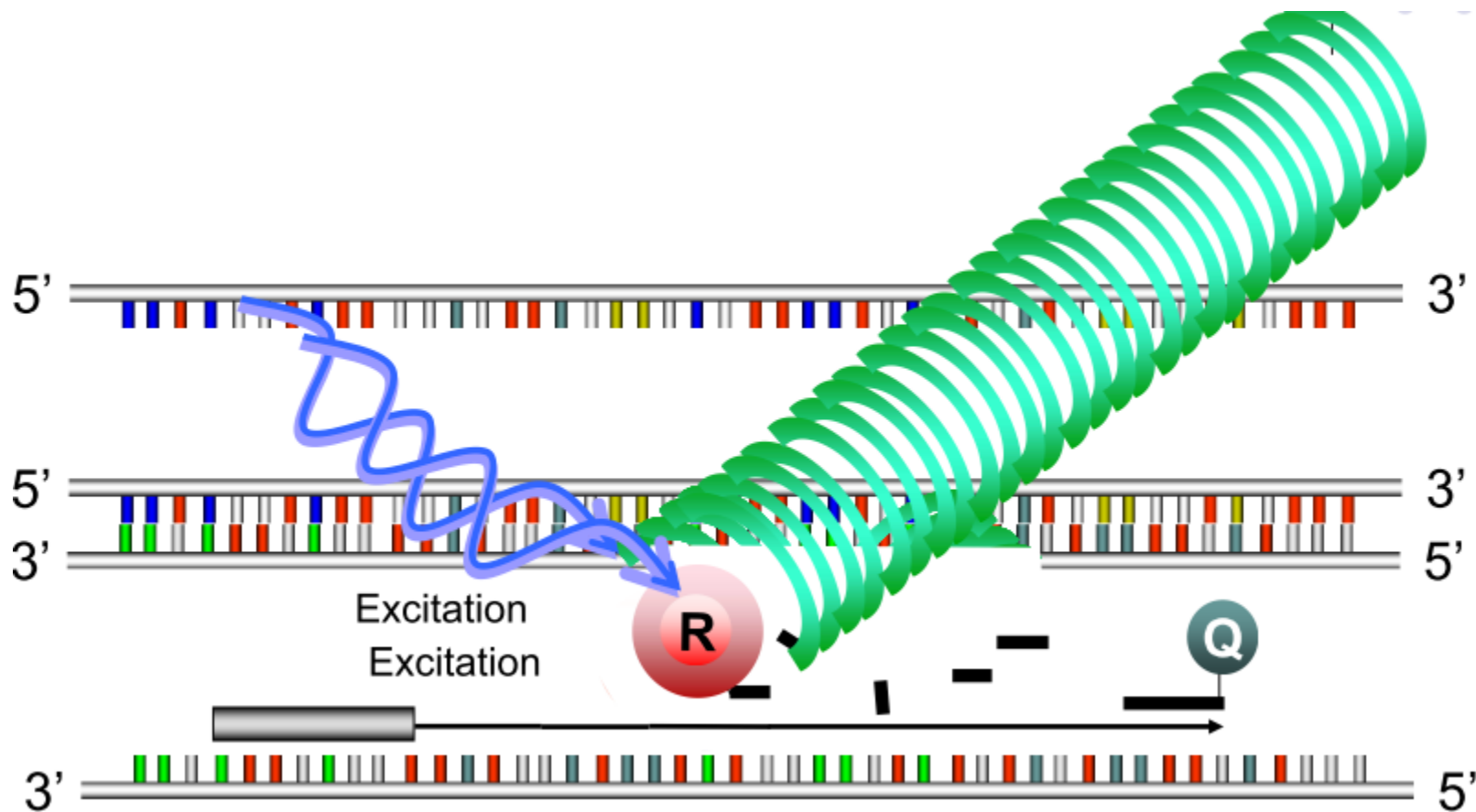


- 探针与靶序列配对(一段序列，两个基团，5' 报告基团、淬灭基团)
- 完整的探针，报告基团R发射的荧光被淬灭基团淬灭，没有荧光产生
- 聚合酶的5' 外切酶活性，报告基团R与淬灭基团Q分离，发射荧光

荧光信号强度与结合探针的DNA分子成正比

碧云天定量PCR技术服务

Taqman工作示意图



碧云天定量PCR技术服务

Taqman法的优缺点

➤ 优点

- 高度特异性
- 重复性好
- 灵敏度高
- 可进行多重定量

➤ 缺点

- 只适合一个特定的目标
- 委托公司标记，价格高
- 不易找到本底低的探针

碧云天定量PCR技术服务

相对定量($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)

- 步骤1：内参基因均一化样本差异

$$C_t \text{目的基因} - C_t \text{内参基因} = \Delta C_t$$

- 步骤2：其他和对照样本比较

$$\Delta C_t \text{处理样本} - \Delta C_t \text{对照样本} = \Delta \Delta C_t$$

- 步骤3：使用公式计算

$$\text{倍数变化} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

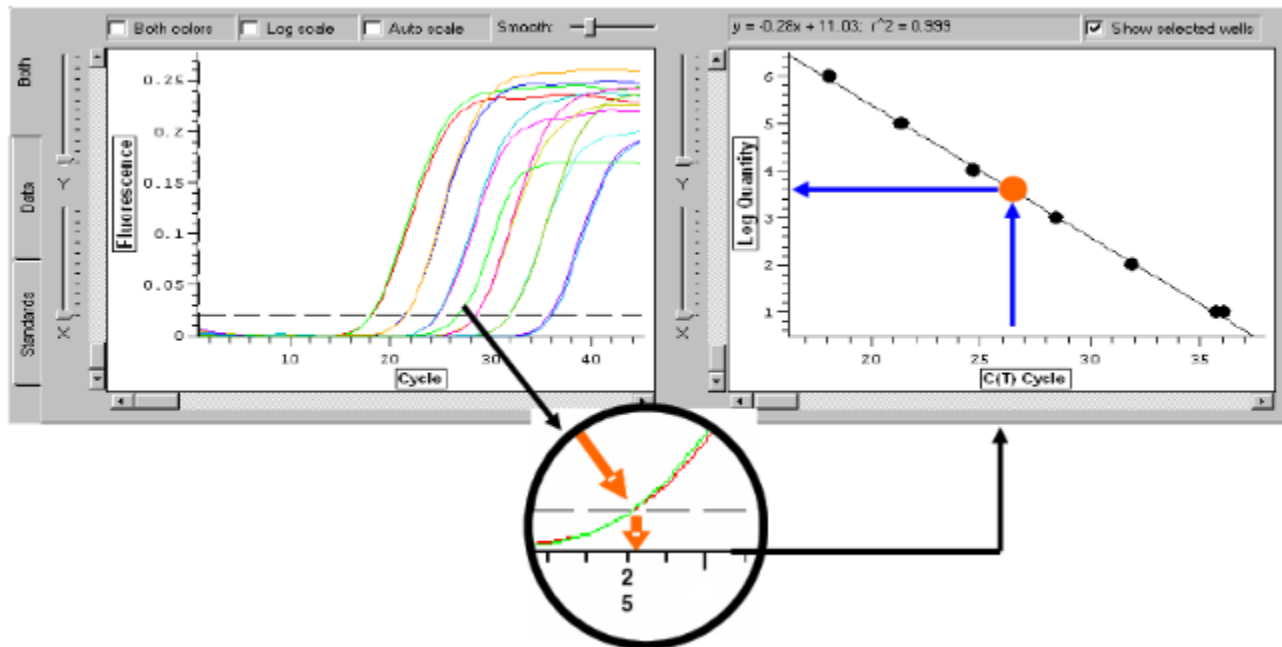
$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

- 2 = 循环间扩增产物量的倍数变化(i.e. PCR扩增产物量倍增)
- $\Delta\Delta C_t$ = 处理样本和对照样本之间校正过的循环数变化
- 所以，这个公式告诉我们对对照样本和处理样本之间目的基因的倍数变化

碧云天定量PCR技术服务

绝对定量(标准曲线法)

- Log(起始浓度)与循环数成线性关系，通过已知拷贝数的标准品，可作出标准曲线，即得到该扩增反应存在的线性关系
- 根据样品Ct值，就可以计算出样品中所含的模板量



碧云天定量PCR技术服务

服务流程



碧云天定量PCR技术服务

服务内容

➤ 客户提供

- 客户需提供待检测目的基因的GenBank Accession Number或基因序列。
- 尽量提供待检测样品的生物物种信息(如Human、Mouse、Rat等)，组织信息，DNA/RNA来源、基因丰度等

➤ 碧云天交付

- 碧云天交付详细的检测报告(包括实验试剂、材料仪器、软件设置参数、实验方法、结果及分析等)。
- 碧云天同时提供RNA或DNA的浓度数据和qPCR的原始数据(包括熔解曲线和扩增曲线)。



Thank You



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订购热线：400-168-3301或800-8283301
技术咨询：info@beyotime.com
技术服务：service@beyotime.com
网址：<http://www.beyotime.com>