



复习-RNA纯度分析（1）

- RNA质检参数OD260/OD280、OD260/OD230的意义。
- 260、280、320、230 nm下的吸光度分别代表了核酸、蛋白质、盐浓度和有机溶剂的值。
- **A230: 测定其它碳源物质，如酚，糖类等。**
- **A260：核酸的吸收峰测，测RNA，DNA，引物等的浓度。**
- **A280：蛋白质的吸收峰。**



复习-RNA纯度分析（2）

- OD260/OD280(Ratio)在1.8~2.1范围内时，RNA中蛋白的污染是可以容忍。
- **当 $R < 1.8$ 时，溶液中蛋白的污染比较明显。**
- **当 $R > 2.2$ 时，说明RNA已经水解成单核酸了。**
- **纯RNA的OD260/OD280的比值为2.0。**



复习-RNA纯度分析 (3)

- **OD₂₃₀表示样品中存在一些污染物，如碳水化合物、盐（胍盐）等，较纯净的核酸A₂₆₀/A₂₃₀的比值大于2.0。**



All Active On/Off nm 1 260 Units ng/ul

Active	#	Sample ID	nm 1 abs.	A-260	260/280	260/230	ng/ul
<input type="checkbox"/>	1	1	12.56	12.56	1.93	0.92	502.6
<input type="checkbox"/>	1	2	9.837	9.837	1.92	2.11	393.5
<input type="checkbox"/>	1	3	5.204	5.204	4.26	1.06	208.1
<input type="checkbox"/>	1	4	43.91	43.91	2.04	2.25	1756
<input type="checkbox"/>	1	5	9.581	9.581	1.99	0.89	383.2
<input type="checkbox"/>	1	6	2.511	2.511	1.85	1.21	100.4



分子流行病学实验课

--荧光实时定量PCR

邓晓蓓

2018.6.6



常用核酸标志物的检测技术

- **实时定量PCR技术**
- **DNA甲基化检测技术**
- **基因芯片技术**
- **变性高效液相色谱检测技术**
- **原位杂交技术**
- **SNP检测技术**
- **DNA测序技术**

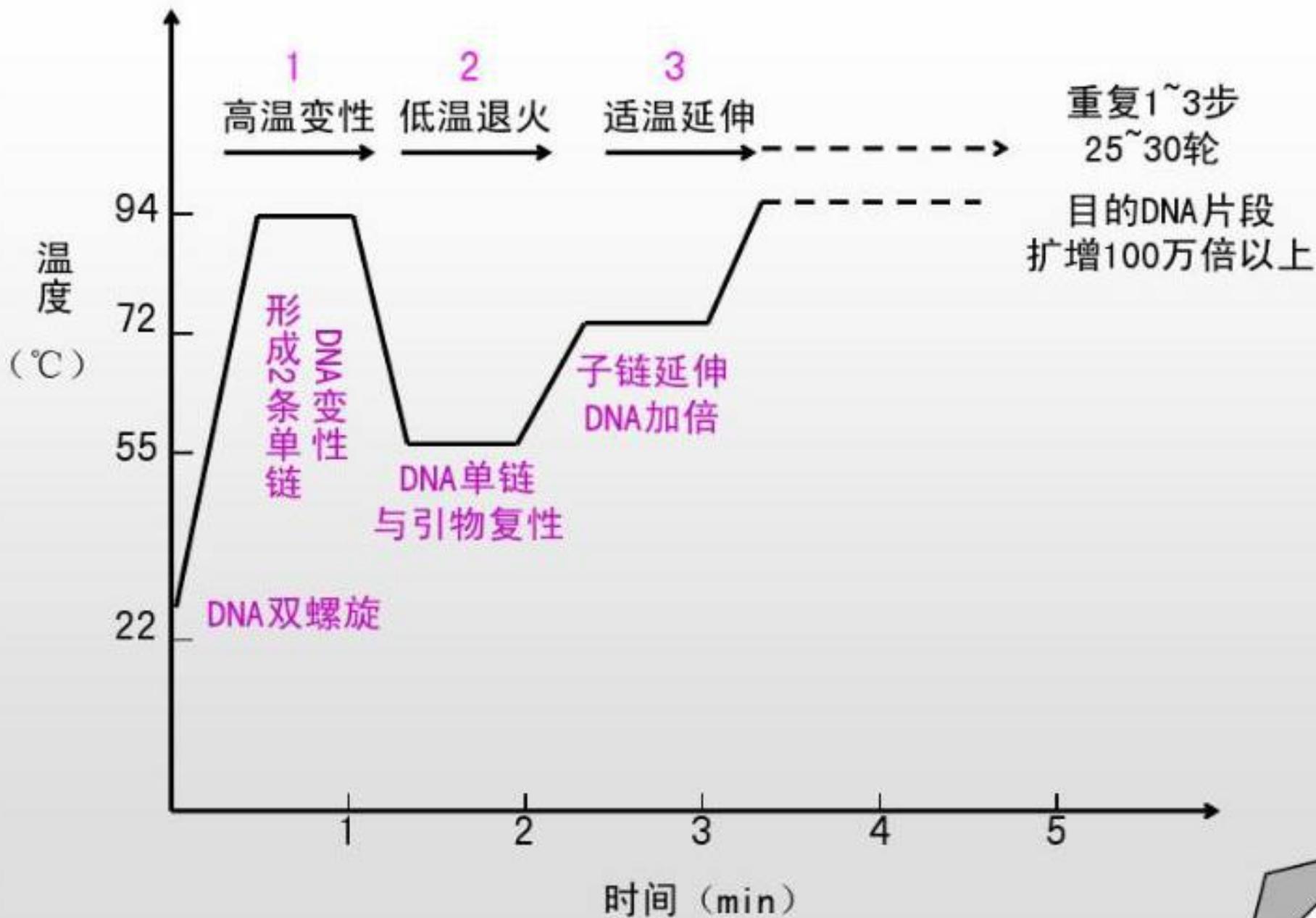


PCR视频 (2分24秒视频)



PCR技术反应原理

- PCR(聚合酶链式反应) 是利用**DNA在体外摄氏95°高温时变性会变成单链**；
- 低温(经常是60°C左右)时引物与单链按**碱基互补配对的原则**结合；
- 再调温度至**DNA聚合酶最适反应温度(72°C左右)**，**DNA聚合酶**沿着磷酸到五碳糖(5'-3')的方向合成互补链。





PCR技术反应体系

- **引物 (如何设计?)**
- **酶 : Taq DNA聚合酶** ✓
- **缓冲液 : Mg^{2+} 1 ~ 3mmol/L** ✓
- **dNTP : 4种dNTP终浓度各100 ~ 250 μ mol/L** ✓
- **模板 : DNA , RNA**



PCR引物设计

- PCR反应中有两条引物，即**5'端引物和3'引物**。
- 设计引物时以一条DNA单链为基准（常以信息链为基准），**5'端引物与位于待扩增片段5'端上的一小段DNA序列相同**；
- **3'端引物与位于待扩增片段3'端的一小段DNA序列互补**。



PCR引物设计原则（1）

- **引物长度**：15-30bp，常用为20bp左右。
- **引物碱基**：**G+C含量以40-60%为宜**，G+C太少扩增效果不佳，G+C过多易出现非特异条带。ATGC最好随机分布，避免5个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列参照。
- **引物内部不应出现互补序列。**
- 两个引物之间不应存在互补序列，尤其是避免3'端的互补重叠。



PCR引物设计原则（2）

- **引物与非特异扩增区的序列的同源性不要超过70%**，引物3'末端连续8个碱基在待扩增区以外不能有完全互补序列，否则易导致非特异性扩增。
- **引物3'端的碱基，特别是最末及倒数第二个碱基，应严格要求配对，最佳选择是G和C。**
- **引物的5'端可以修饰。**如附加限制酶位点，引入突变位点，用生物素、荧光物质、地高辛标记，加入其它短序列，包括起始密码子、终止密码子等。



PCR引物设计软件

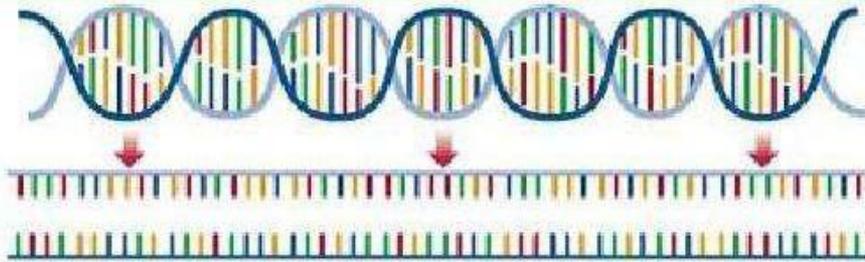
- **Primer Premier5.0**
- **vOligo6**
- **vVector NTI Suit**
- **vDNAsis**
- **vOmiga**
- **vDNAstar**
- **vPrimer3**



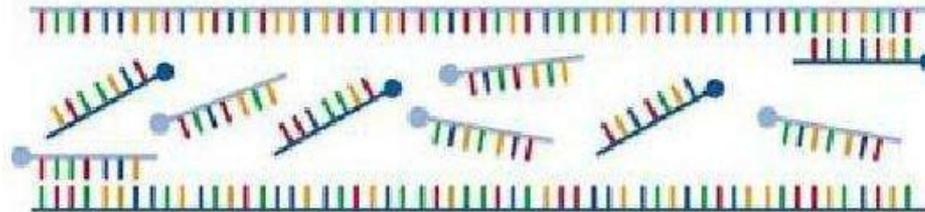
PCR的过程

基本要素:

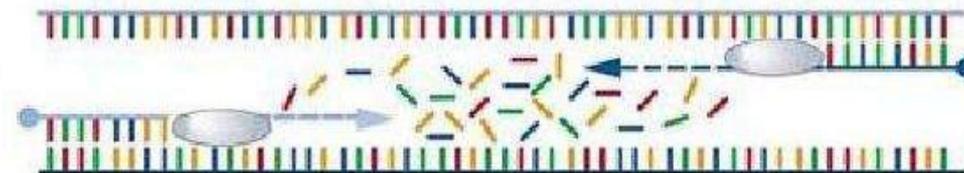
- Template
- Primers
- DNA polymerase
- dNTP, N=A,G,C or T



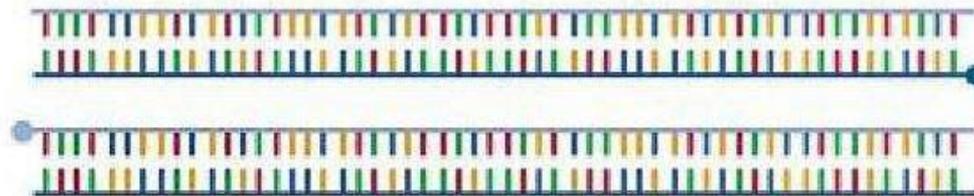
Denaturation:
94 – 96° C



Annealing:
50 – 65° C



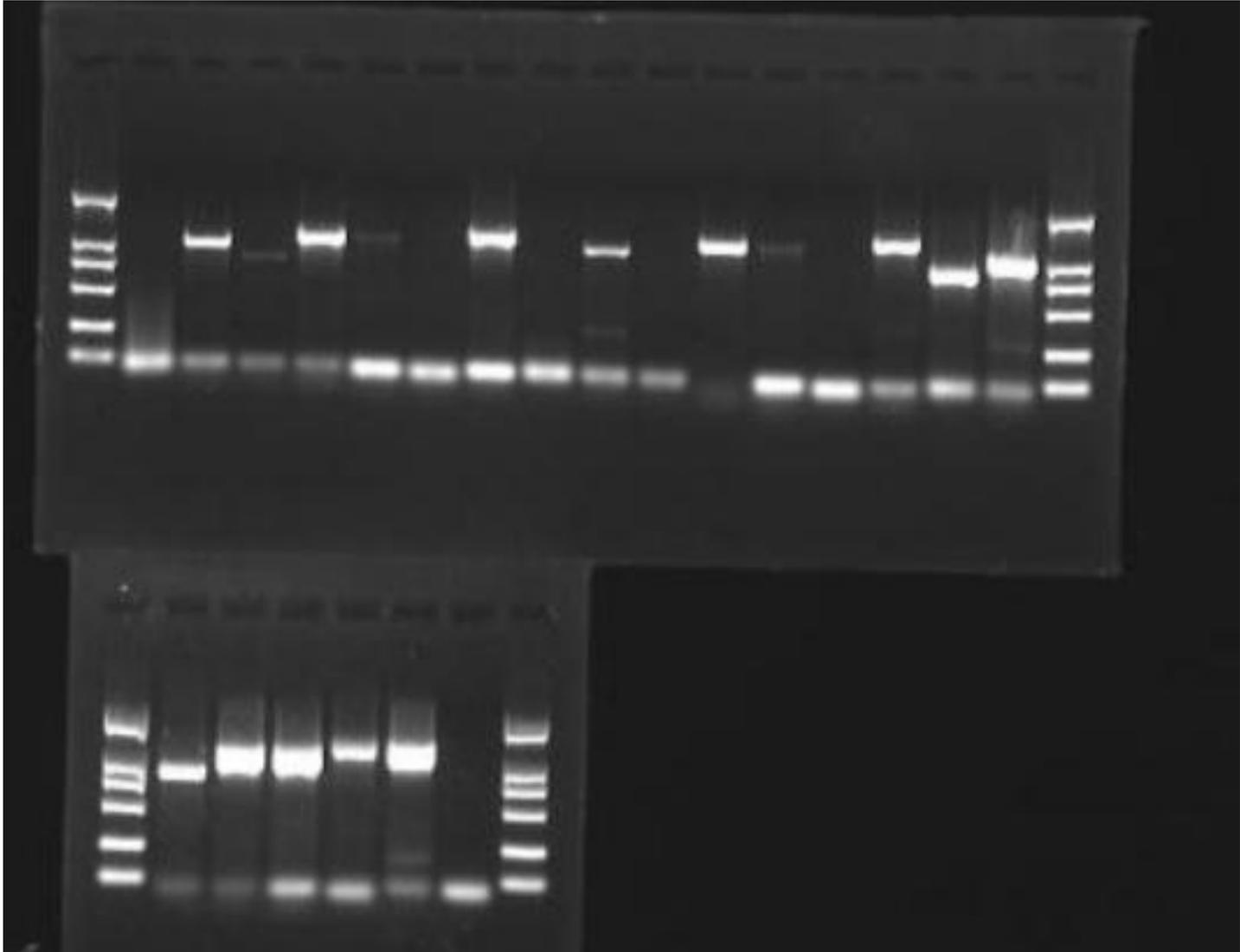
Extension:
70 – 75° C



PCR视频 (3分24秒视频)

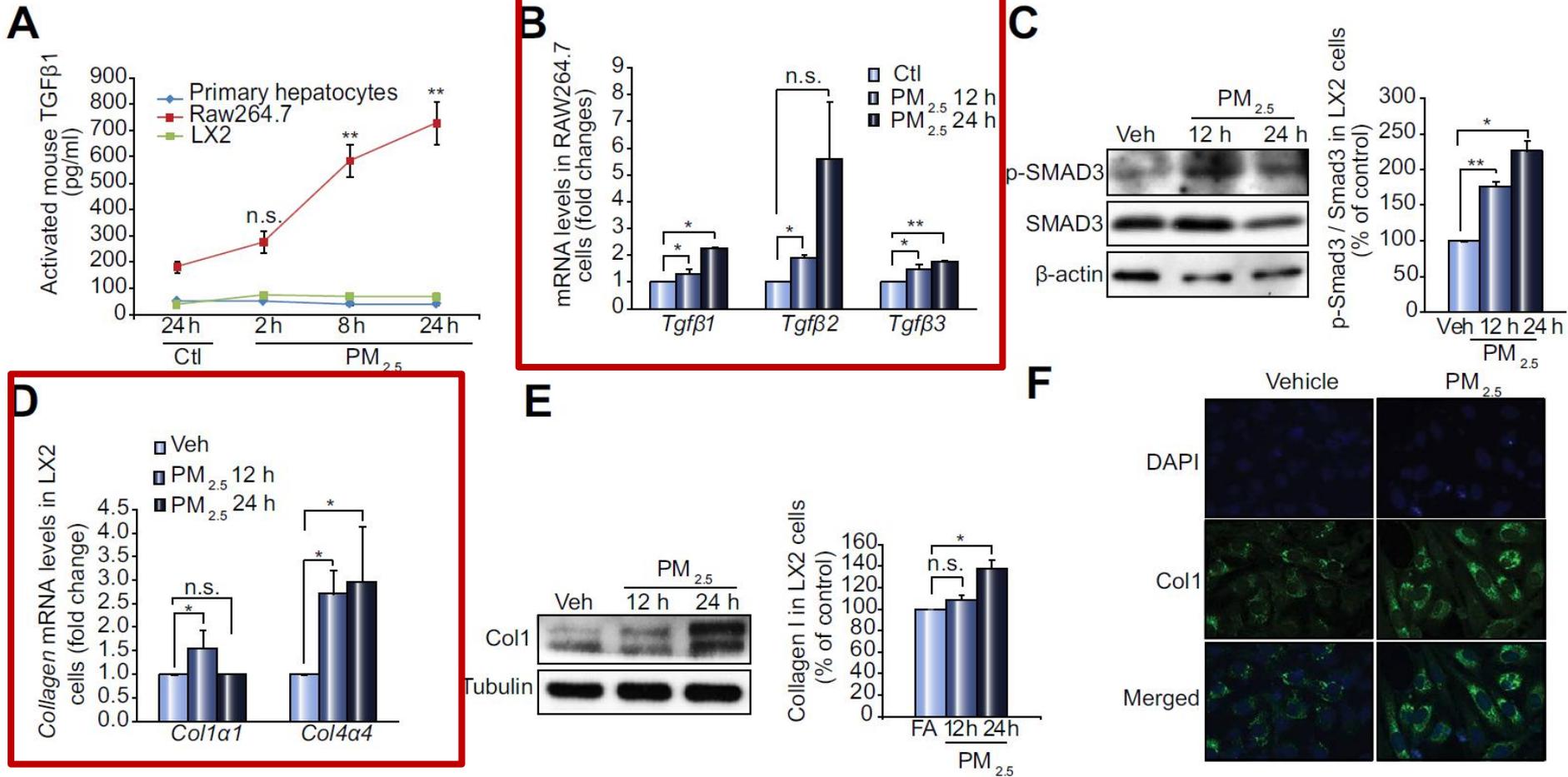


PCR结果展示-核酸凝胶电泳





PM_{2.5}导致巨噬细胞TGF-β信号通路激活， 肝脏细胞中胶原水平升高



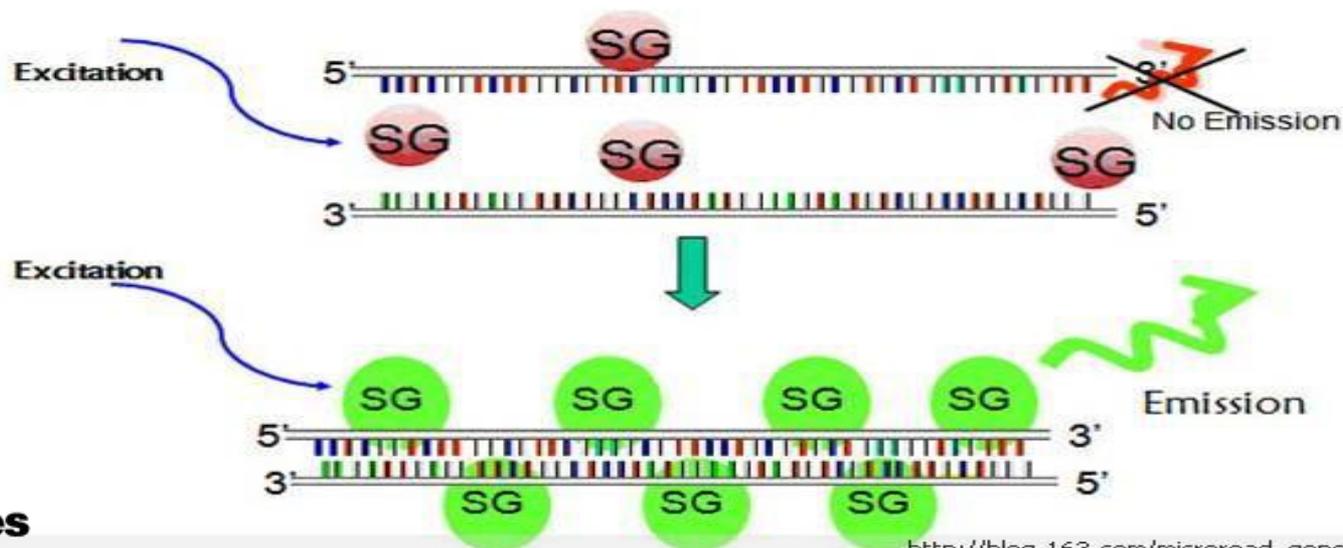
● LX-2, a human HSC cell line; **p-SMAD3**: a key mediator of TGFb-triggered fibrotic response.



实时荧光定量PCR技术

● **基本原理**：在PCR反应体系中加入**荧光基团**，利用**荧光信号积累实时监测整个PCR进程**，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

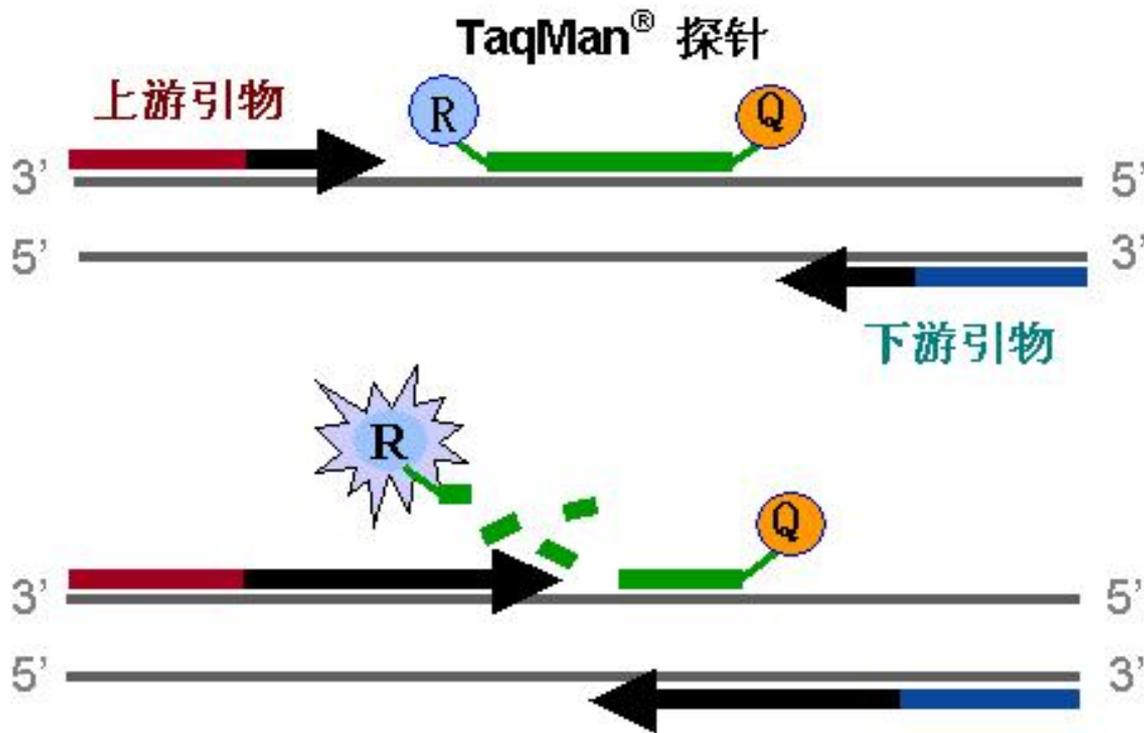
● **SYBRGreen法**：在PCR反应体系中，加入**过量SYBR荧光染料**，SYBR荧光染料特异性地**掺入DNA双链后**，**发射荧光信号**，而**不掺入链中的SYBR染料分子不会发射任何荧光信号**，从而保证荧光信号的增加与PCR产物的增加完全同步。





实时荧光定量PCR技术

- TaqMan探针法：探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR扩增时，Taq酶的5'-3'外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到**荧光信号**，即**每扩增一条DNA链，就有一个荧光分子形成**，实现了荧光信号的累积与PCR产物的形成完全同步。





SYBRGreen法反应体系

- **引物 (自己设计和合成)**
- **模板：cDNA (上节课提取RNA逆转录)**
- **酶：Taq DNA聚合酶** ✓
- **缓冲液：Mg²⁺ 1 ~ 3mmol/L** ✓
- **dNTP：4种dNTP终浓度各100 ~ 250 μmol/L** ✓
- **SYBRGreen荧光探针** ✓



2.10. Real-time PCR analyses

After exposure to 0, 25, 50, 100, or 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of $\text{PM}_{2.5}$ for 48 h, total RNA of the A549 cells was extracted with TRIZOL according to the protocol of the manufacturer. The cDNA was used as a template to examine the mRNA expression levels of *atg5* and *beclin1* by using SYBR green supermix (Toyobo, Shanghai, China). The primer sequences for real-time PCR were as follows: β -actin, 5'-TGACGTG-GACATCCGCAAAG-3' (sense), 5'-CTGGAAGGG-ACAGCGAGG-3' (antisense); *atg5*, 5'-TCTGCTTTCCTCCACTGCCAT-3' (sense), 5'-GGCCAAAGGTTTCAGCTTCATT-3' (antisense); *beclin1*, 5'-GGCACAATCAATAACT-TCAGGC-3' (sense), 5'-TTATTGGCCAGAG-CATGGAG-3' (anti-sense). The PCR cycle was as follows: initial denaturant at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturant at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. The amount of target genes was analyzed using the ΔCt method following the normalization through β -actin.



引物设计方法 (1)

<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>

PrimerBank

PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification

[Home/Search](#)

[PCR Protocol](#)

[Primer Statistics](#)

[Comments](#)

[Primer
Submission](#)

[Links](#)

[Citation Policy](#)

[Help/FAQ](#)

Primer Search

Search for PCR Primers

Search by

Species

For text

You can blast your sequence against the primerbank sequence DB [here](#).

Order Oligos

You can have primers synthesized and PCR reaction products sequenced at:

DNA Core Facility
Center for Computational and Integrative Biology

PrimerBank is a public resource for PCR primers. These primers are designed for gene expression detection or quantification (real-time PCR). PrimerBank contains over 306,800 primers covering most known human and mouse genes. There are several ways to search for primers: GenBank Accession, NCBI protein accession, NCBI Gene ID, Gene Symbol **New!** PrimerBank ID or Keyword (gene description) or you can blast your gene sequence against the primerbank



引物设计方法 (2)

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

hao123 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=atg12>

收藏夹... hao123_上网从... 126网免费邮... Google 学术搜... Home | Wimasi... Home - PubM... microRNA.o... miRDB - Micr... 用户控制界... Inst

hao123_上网从... primer bank_百... MGPI PrimerBank... atg12 - Gene - I... 对号_百度图片搜... 实时荧光定量PCI... 实时荧光定量PCI... 实时荧光定量PCI

How To

Gene

[Create RSS](#) [Create alert](#) [Advanced](#)

Tabular ▾ 20 per page ▾ Sort by Relevance ▾ Send to: ▾

See [ATG12 autophagy related 12](#) in the Gene database
[atg12](#) in [Homo sapiens](#) [Mus musculus](#) [Rattus norvegicus](#) [All 227 Gene records](#)

Search results

Items: 1 to 20 of 831 << First < Prev Page of 42 Next > Last >>

See also 29 discontinued or replaced items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
<input type="checkbox"/> ATG12 ID: 9140	autophagy related 12 [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 5, NC_000005.10 (115828196..115841851, complement)	APG12, APG12L, FBR93, HAPG12	609608
<input type="checkbox"/> Atg12 ID: 39383	Autophagy-related 12 [<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)]	Chromosome 3L, NT_037436.4 (12136967..12137559)	Dmel_CG10861, ATG12, CG10861, DmelCG10861, atg12	
<input type="checkbox"/> Atg12 ID: 67526	autophagy related 12 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 18, NC_000084.6 (46732417..46741839, complement)	4931423H11Rik, A330058M13Rik, Appg12l, Atg12	
<input type="checkbox"/> ATG12 ID: 852518	Atg12p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	Chromosome II, NC_001134.8 (657832..658392)	YBR217W, APG12	
<input type="checkbox"/> Atg12 ID: 361321	autophagy related 12 [<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)]	Chromosome 18, NC_005117.4 (40721799..40732143, complement)	Appg12l	
<input type="checkbox"/> atg12 ID: 570965	ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae) [<i>Danio rerio</i> (zebrafish)]	Chromosome 16, NC_007127.7 (13883934..13888546)		
<input type="checkbox"/> ATG12 ID: 767903	autophagy related 12 [<i>Bos taurus</i> (cattle)]	Chromosome 10, NC_037337.1 (4680210..4702517, complement)		
<input type="checkbox"/> atg12 ID: 2542368	autophagy-associated ubiquitin-like modifier Atg12 [<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (fission yeast)]	Chromosome I, NC_003424.3 (2199327..2200168, complement)	SPAC1783.06c, appg12	
<input type="checkbox"/> ATG12 ID: 474636	autophagy related 12 [<i>Canis lupus familiaris</i> (dog)]	Chromosome 11, NC_006593.3 (5531062..5543034, complement)		



PrimerBank

The following matches are found for NCBI Gene ID (Human): "9140"

Home/Search

Search for

Search by

Species

For text

You can blast y
sequence DB [h](#)

Gene Descriptions:

NCBI GeneID	9140
GenBank Accession	NM_004707
NCBI Protein Accession	NP_004698
Species	Human
Coding DNA Length	423
Gene Description	Homo sapiens ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae) (ATG12), transcript variant 1, mRNA.

Primer Pair 1 [\(Click here for cDNA and amplicon sequence\):](#)

PrimerBank ID 290560745c1

Amplicon Size 97

	Sequence (5' → 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	CTGCTGGCGACACCAAGAAA	20	63.0	140-159
Reverse Primer	CGTGTTGCTCTACTGCCC	19	62.7	236-218

Primer Pair 2 [\(Click here for cDNA and amplicon sequence\):](#)

PrimerBank ID 290560745c2

Amplicon Size 153

	Sequence (5' → 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	TAGAGCGAACACGAACCATCC	21	61.9	224-244
Reverse Primer	CACTGCCAAAACACTCATAGAGA	23	60.2	376-354



生工生物工程（上海）股份有限公司 引物合成订购表 www.sangon.com

订购日期:	2018/6/6			上海合成部: synth@sangon.com 电话: 021-37772173 / 72 / 71 北京合成部: beijing@sangon.com 电话: 010-81767585 / 86 广州合成部: gz_synth@sangon.com 电话: 020-38452026 武汉合成部: whsynth@sangon.com 电话: 027-65522298 全国免费服务电话: 800-820-3090 订单要求: 1. 如未收到邮件回复确认, 请务必电话查询。切勿重复发送邮件, 以免造成重复合成。 2. 因此订单是电脑自动处理, 订单发送前请仔细核对信息, 订单接收到E-mail回复后将不能再更改或取消。 3. 此表格仅针对E-mail订单使用, 传真订单请勿使用。 4. 客户信息栏中*号表示必填项
*客户姓名:				
*负责人姓名:				
*客户单位:	上海交通大学医学院公共卫生学院			
*发票抬头:	上海交通大学医学院			
开票形式:				
*客户地址:	上海市长宁区仙霞路720号402室			
*客户手机:				
*负责人固定电话:	021-53594658			
*E-MAIL:				

*是否需要双休日发货	是	总碱基数	251
*是否需要部分先发货	是		

ID	Primer名称	序列(5'to3')	碱基数	分装管数	提供总量(O.D)	纯化方法	单价	修饰
	H-CEA-F	TCTTGGCTGATTGATGGGAAC	21	2	2	PAGE		
	H-CEA-R	CACTGGCTGAGTTATTGGCCT	21	2	2	PAGE		
	M-CEA-F	ATTTCACGGGGCAAGCATACA	21	2	2	PAGE		
	M-CEA-R	GTCACCCTCCACGGGATTG	19	2	2	PAGE		
	H-NSE-F	AGCCTCTACGGGCATCTATGA	21	2	2	PAGE		
	H-NSE-R	TTCTCAGTCCCATCCAACCTCC	22	2	2	PAGE		
	M-NSE-F	AGGTGGATCTCTATACTGCCAAA	23	2	2	PAGE		
	M-NSE-R	GTCCCCATCCCTTAGTTCCAG	21	2	2	PAGE		
	H-SCCA-F	TGAGGTTAAGGCGGCTAGGA	20	2	2	PAGE		
	H-SCCA-R	CATGGCGTACTCATCCCCATC	21	2	2	PAGE		
	M-SCCA-F	GGCAGGTGTACCTCGACTAC	20	2	2	PAGE		
	M-SCCA-R	CTGAAACGCTCCTCAACCTCC	21	2	2	PAGE		



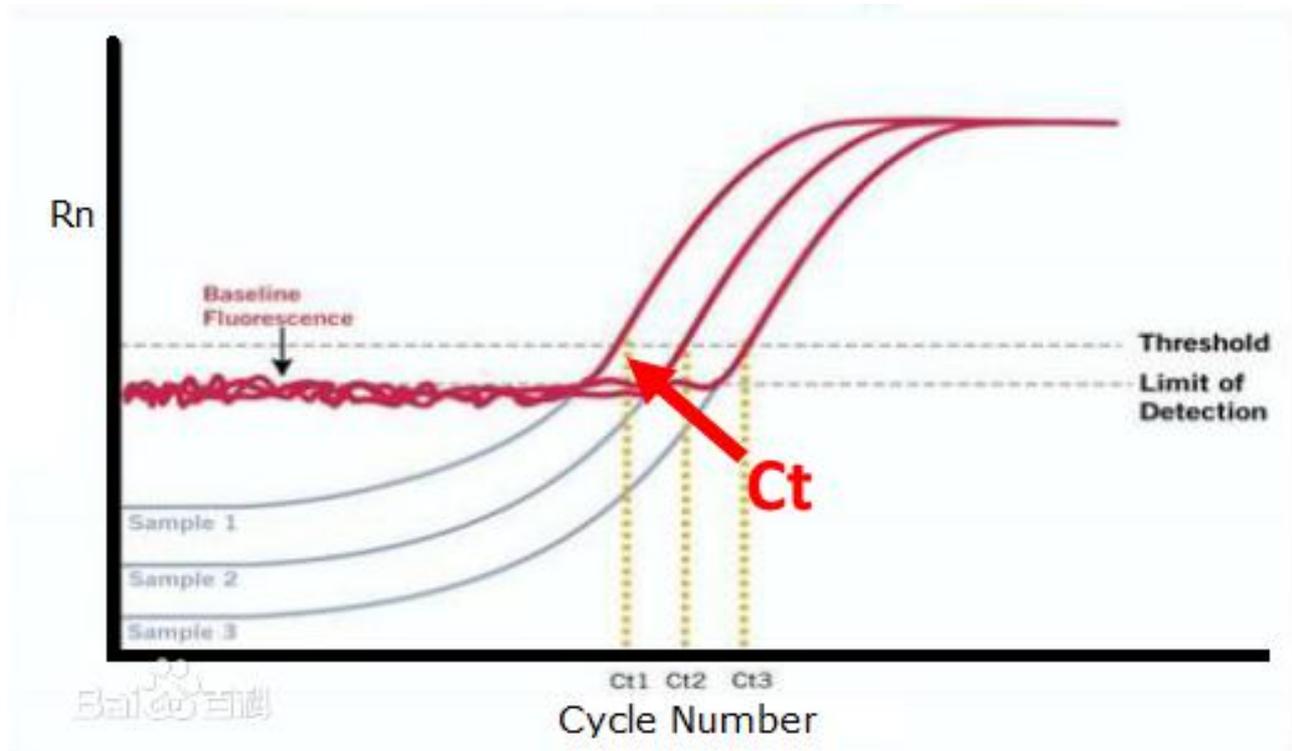
数据计算

- 随着循环次数的增加，被扩增的目的基因片段**呈指数规律增长**，通过实时检测与之对应的随扩增而变化荧光信号强度，**求得Ct值**；
- 同时利用数个已知模板浓度的标准品作对照，即可得出待测标本目的基因的拷贝数。



Ct值

- Ct值 (Cycle threshold , 循环阈值) : 每个反应管内的荧光信号到达**设定阈值**时所经历的循环数。





荧光阈值

荧光阈值的设定

- PCR反应的前15个循环的荧光信号作为荧光本底信号；
- 荧光阈值的缺省（默认）设置是3-15个循环的荧光信号的标准偏差的10倍，即：

$$\text{threshold} = 10 * \text{SD}_{\text{cycle 3-15}}$$



数据计算原理

S形曲线，具有平台效应

•理想的PCR反应：

$$N=N_0*2^n$$

•实际的PCR反应：

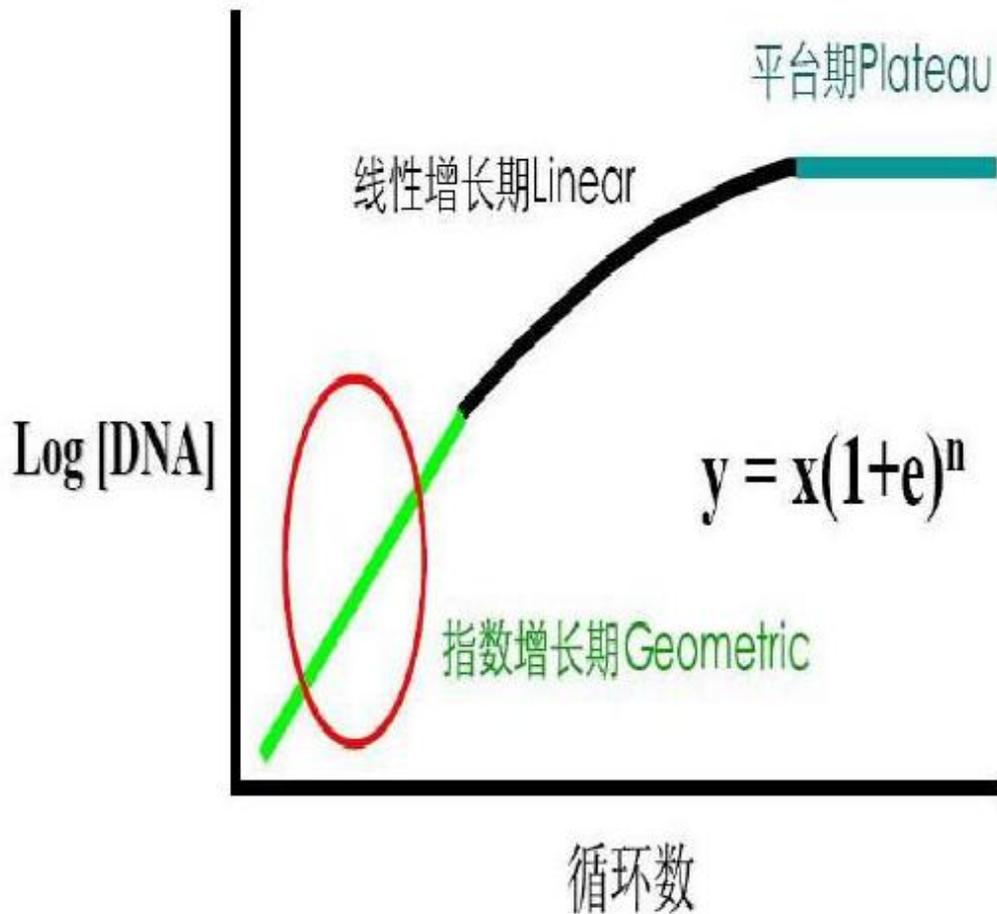
$$N=N_0*(1+E)^n$$

N_0 : 初始模板量

N : 第 n 次循环后的产物量

n : 扩增反应的循环次数

E : 扩增效率





数据计算原理

- 每个模板的**Ct值**与该模板的**起始拷贝数的对数存在线性关系**，公式如下。
 - $Ct = -1/\lg(1+E_x) * \lg X_0 + \lg N / \lg(1+E_x)$
 - n为扩增反应的循环次数，X₀为初始模板量，E_x为扩增效率，N为荧光扩增信号达到阈值强度时扩增产物的量。
- **起始拷贝数越多，Ct值越小。**



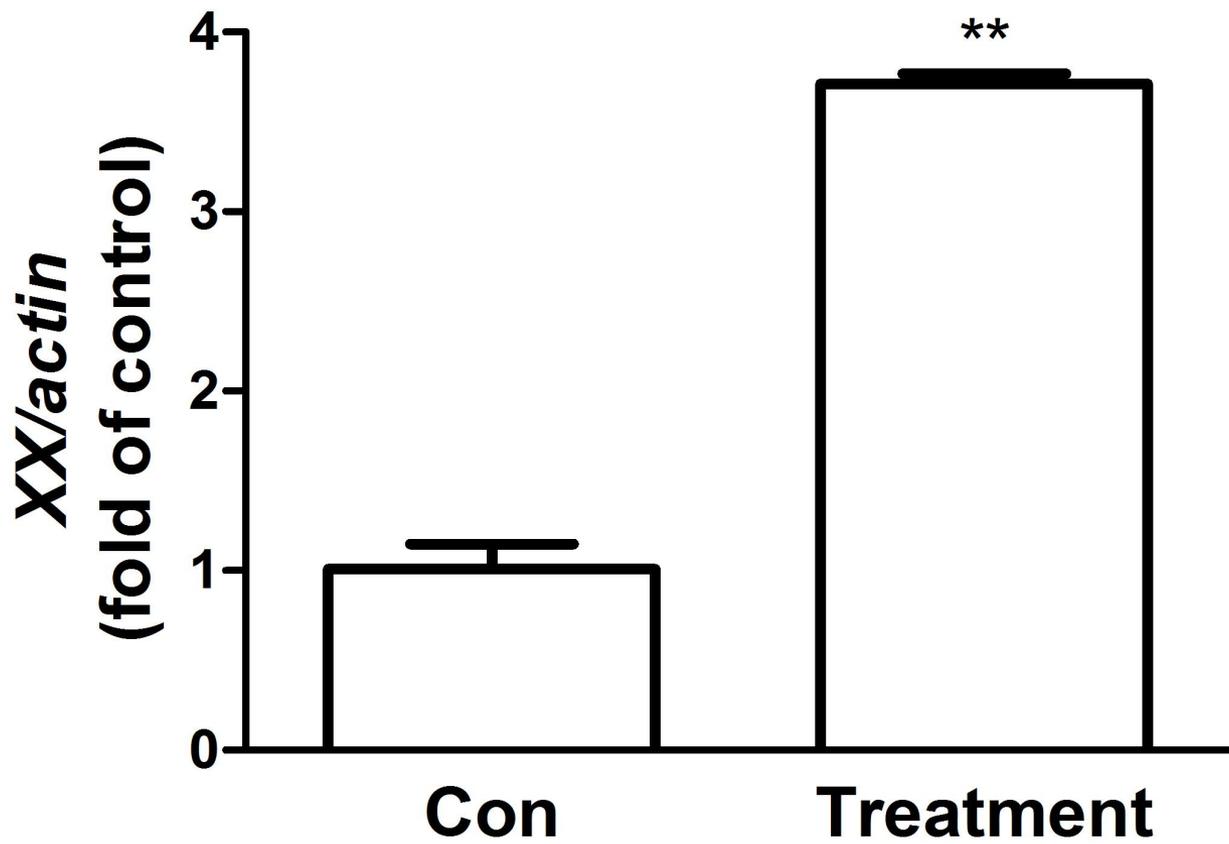
数据计算公式

● **相对定量** : $2^{-\Delta\Delta ct}$

$\Delta\Delta ct = \text{实验组 (目的ct-内参ct)} - \text{对照组 (目的ct-内参ct)}$



数据结果



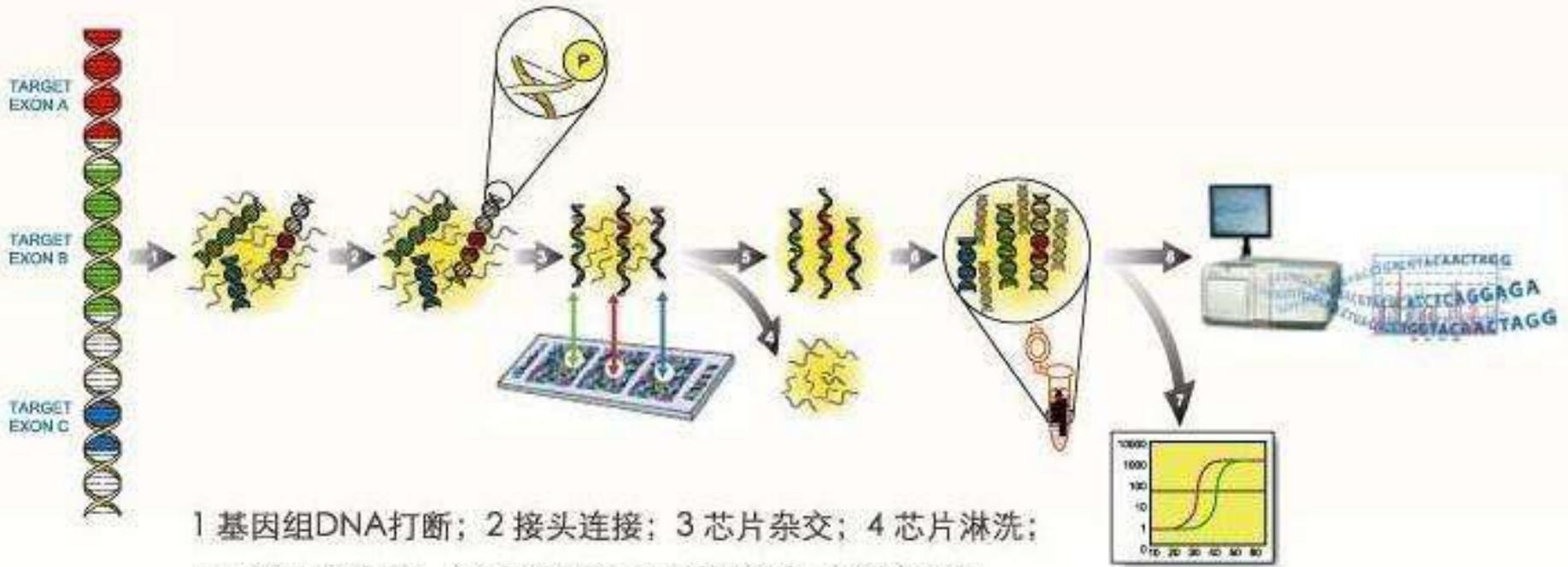


常用核酸标志物的检测技术

- 实时定量PCR技术
- DNA甲基化检测技术
- **基因芯片技术**
- 变性高效液相色谱检测技术
- 原位杂交技术
- SNP检测技术
- DNA测序技术



基因芯片



1 基因组DNA打断；2 接头连接；3 芯片杂交；4 芯片淋洗；
5 目的片段洗脱；6 PCR扩增；7 质控检测；8 测序分析。

约1分钟视频



基因芯片

