



实时定量 PCR: 了解影响 CT 的关键因素

影响 CT 值的因素

CT (阈值循环, Threshold Cycle) 是扩增曲线和阈值线的交叉点 (图 1B)。它是 PCR 反应中模板浓度的相对测量。除了模板浓度外,还有许多因素会影响 CT 的绝对值。我们将要讨论最常见的影响 CT 值的非模板依赖性因素,并描述如何评估实时定量 PCR 反应的效果。

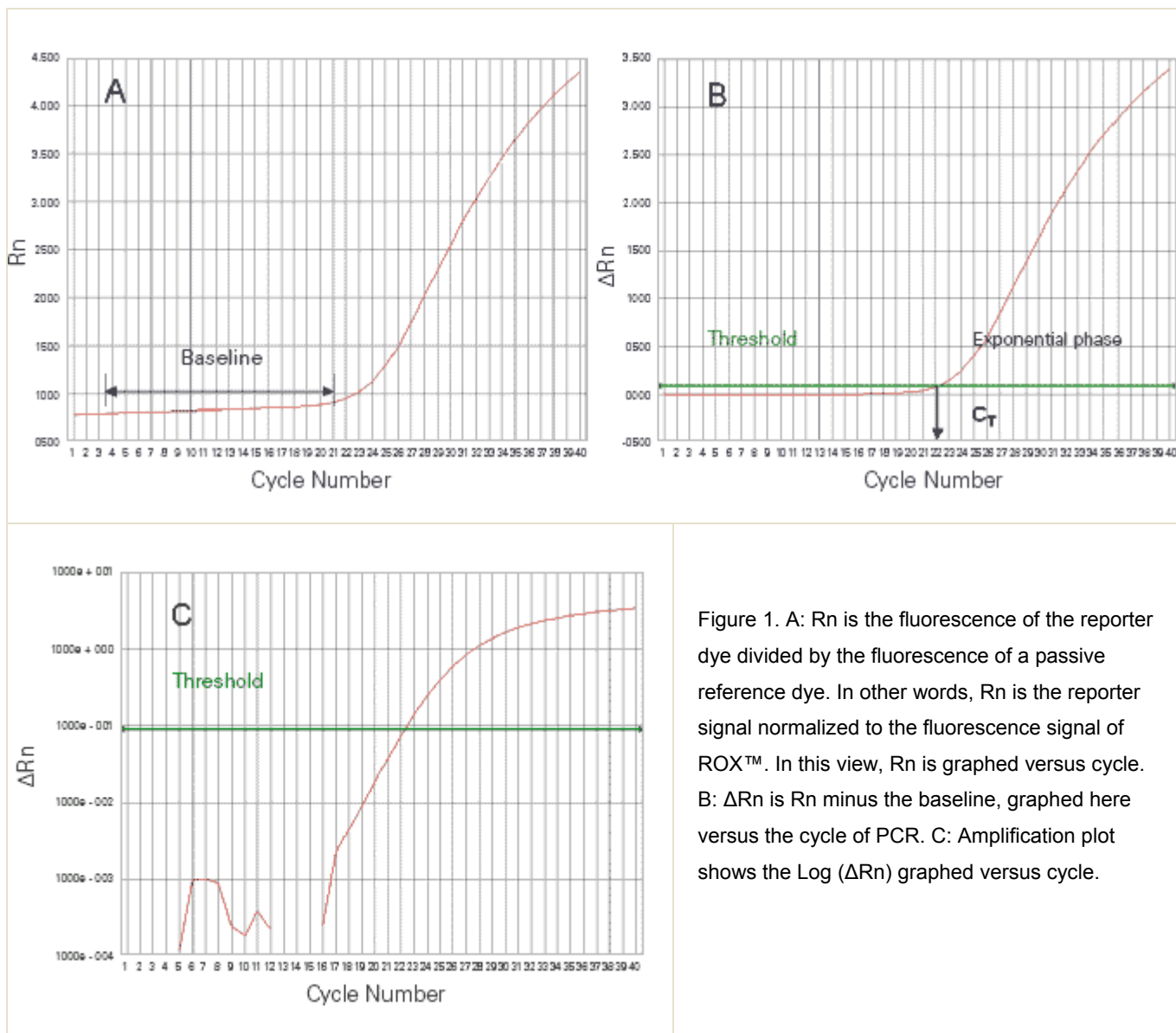


Figure 1. A: R_n is the fluorescence of the reporter dye divided by the fluorescence of a passive reference dye. In other words, R_n is the reporter signal normalized to the fluorescence signal of ROX™. In this view, R_n is graphed versus cycle. B: ΔR_n is R_n minus the baseline, graphed here versus the cycle of PCR. C: Amplification plot shows the $\text{Log}(\Delta R_n)$ graphed versus cycle.

图 1 显示了实时 PCR 反应扩增图的几个参数。图 1B 的对数期对应图 1C 的线性期。在图 1C 扩增图中, 阈值必须设在线性期中。当模板量减少时, CT 值随之增加。然而, 反应混合物或仪器中的任何改变, 只要能影响与

CT 值计算相关的荧光测定, 都会使 CT 值产生非模板依赖性的变化。因此, 在不同条件下或用不同试剂进行的 PCR 反应产生的 CT 值不可以直接进行比较。

反应液成分的影响

任何分子的荧光发射都受环境因素影响---比如溶液的 pH 值和盐浓度。图 2 显示了某个 Taqman 探针在两种不同的反应液背景

下的原始荧光数据。尽管两组反应的扩增目标、探针和 ROX（参比荧光）浓度都相同，反应液 A 中的荧光信号强度更强。

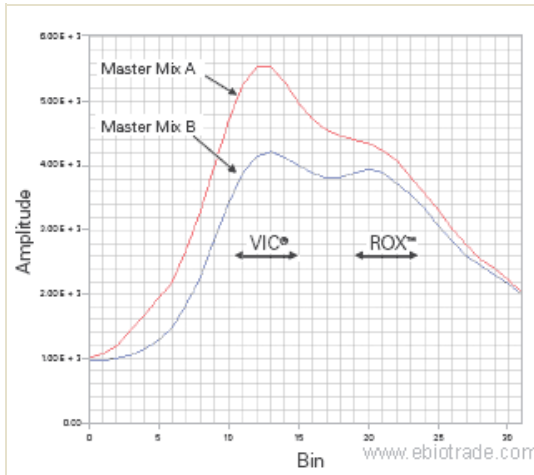


Figure 2. Raw fluorescence data obtained with one assay and two master mixes with the same ROX™ level. The difference in signal is due to the master mix composition. Reaction was performed on an Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System with a VIC® MGB probe. The X axis shows the emission wavelength of the fluorophore and the Y axis shows the intensity of the emission.

因此，如图 3 所示，产生的 ΔRn 值也不同。注意本底荧光信号基线属于非模板依赖的因素，两种反应液的基线是不同的。CT 值的

变化并没有反映出反应体系的总体效果（图 3B）。灵敏度相当的反应液产生的 CT 绝对值可能不同。

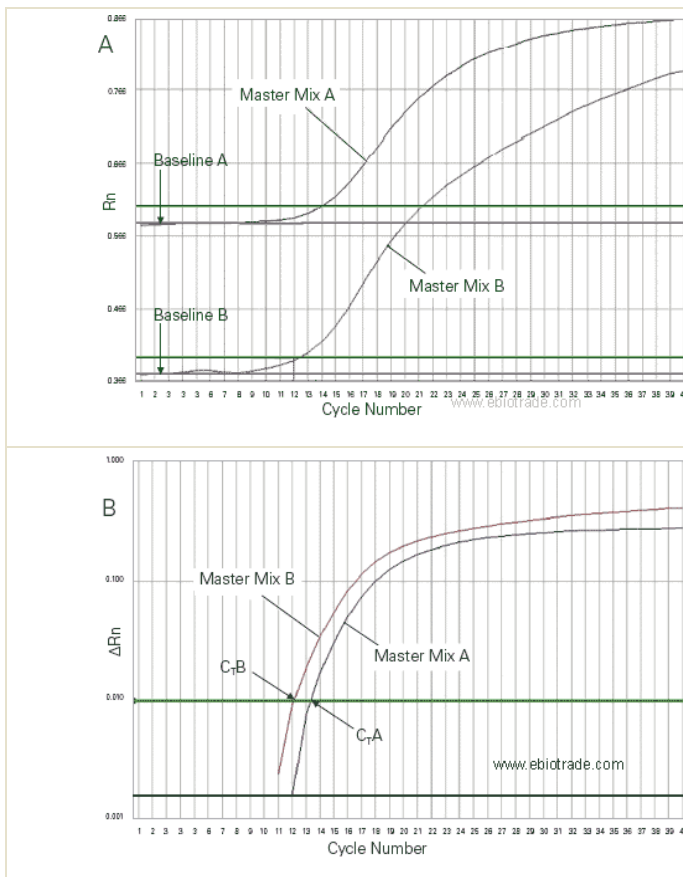


Figure 3. Master Mix A and Master Mix B were used to amplify RNase P in equal amounts of human gDNA using the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Figure 3A shows the Rn versus cycle number and the baselines for both reactions. Figure 3B shows the Log ($\Delta\Delta Rn$) versus cycle number. The threshold (green) is set at the same level for both master mixes. The CT value of Master Mix B (CT_B) is earlier than that of Master Mix A (CT_A) for identical concentrations of target, reflecting the lower baseline of Master Mix B.

ROX 参比荧光

Rn 值是由 FAM 荧光除以 ROX 荧光而得到的比率。因此，假定 FAM 荧光信号保持不变，ROX 量越少，产生的 Rn 值就越高。这将导致 Rn 基线的上升，以及随后 ΔRn 的减小和 CT 值的变化。降低 ROX 水平而得到的

不同 CT 值，没有对反应的真实灵敏度产生任何影响，却有着意想不到的后果。如图 4 所示，降低 ROX 浓度将使 CT 值的标准偏差增加。标准偏差越大，分辨目标模板浓度间的微小区别的可信度就越低。

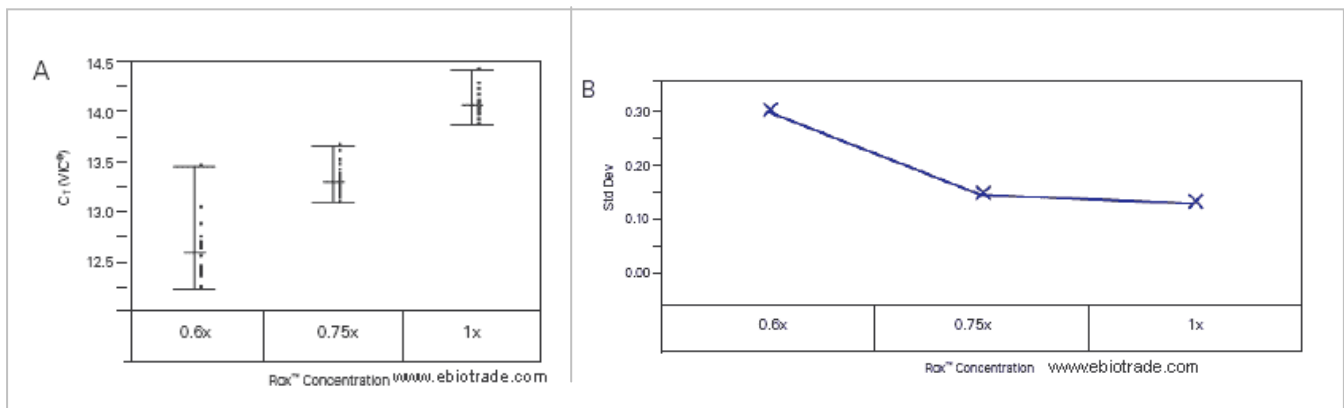


Figure 4. Master mixes containing 3 different concentrations of ROX™ were used to amplify the TGF beta assay on the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System using the 96-well block. Figure 4A shows the CT value and Figure 4B shows the standard deviation with variable ROX concentrations. Decreasing ROX concentration gives an earlier CT but increases the standard deviation.

PCR 反应的效率

PCR 反应的效率也会影响 CT 值。在 PCR 扩增效率低的条件下进行连续梯度稀释扩增，与 PCR 扩增效率高的条件下相比，可能会产生斜率不同的标准曲线。在图 5 中，两个样品 (X 和 Y) 分别在低效率(78%)和高效率 (100%) 条件下扩增，目标模板浓度相

同的情况下得到了不同的 CT 值。在这个例子中，尽管高效率条件 (图 5 中的蓝色曲线) 在高浓度时产生的 CT 值更晚，但它在目标浓度低时却更为灵敏。PCR 效率取决于实验、反应混合液性能和样品质量。一般说来，反应效率在 90-110%之间都是可以接受的。

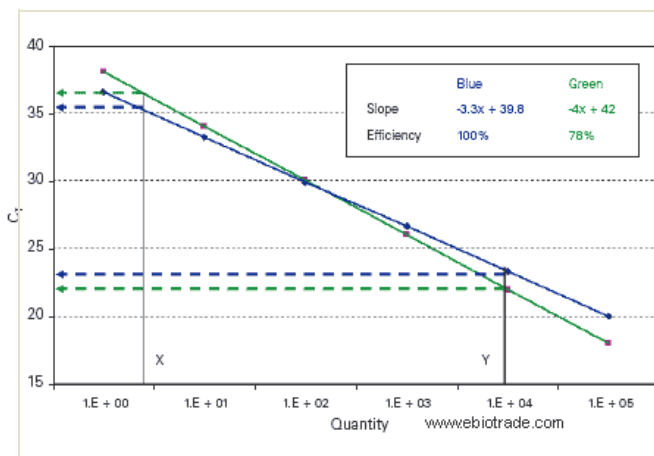


Figure 5. The blue standard curve has an efficiency of 100% (slope is -3.3). The green standard curve has an efficiency of 78% (slope is -4). Amplification of the Y quantity gives an earlier CT with low efficiency condition (green) compared to the high efficiency condition (blue). With a lower quantity (X) there is an inversion and the low efficiency condition (green) gives a later CT compared to the high efficiency condition (blue).

假如所有的实验条件如仪器、试剂和实验都是完全相同的，那么在观察到 A 样品的 CT 值高于 B 样品时，就可以下结论说 A 样品的模板量少于 B 样品。然而如果仪器、试剂、引物和探针或者反应体积不同的话，下这样的结论就不准确。因此，CT 绝对值的比较只有在上述实验条件完全相同的情况下才有意义。

如何评估实时定量 PCR 反应的效果

为了比较不同条件(例如两种不同的反应液或两台不同的仪器)下的两个反应，就必须评估以下参数。

动态范围

为了正确地评估 PCR 扩增效率，至少需要做 3 次平行重复,至少做 5 个数量级倍数(5 logs)连续梯度稀释模板浓度。图 6 说明了这

种建议的理由，它对比了模板浓度连续稀释 1 个数量级倍数(1 log)和 5 个数量级倍数(5 logs)这两种情况下，斜率 (PCR 效率)可能产生的数学偏差。因此，即使实验 100%有效，在按 1 个数量级倍数 (1 log) 梯度稀释时，由于每个稀释点的标准偏差而导致可能的偏移范围达到 70-170%之间。在按 5 个数量级倍数 (5 logs) 梯度稀释时，做同样数量的稀释点和平行重复，可能的偏移只有±8%。这意味着在 5 个数量级倍数 (5 logs) 梯度稀释的条件下如果 PCR 效率为 94%，那么 PCR 反应效率可能的偏移范围在 88%到 100%之间。为了准确判断 PCR 反应的效率，必须进行 5 个数量级倍数(5 logs)的连续稀释。-3.3±10%的斜率意味着 PCR 效率达到 100%±10%。PCR 反应效率越低，那么灵敏度也越低。

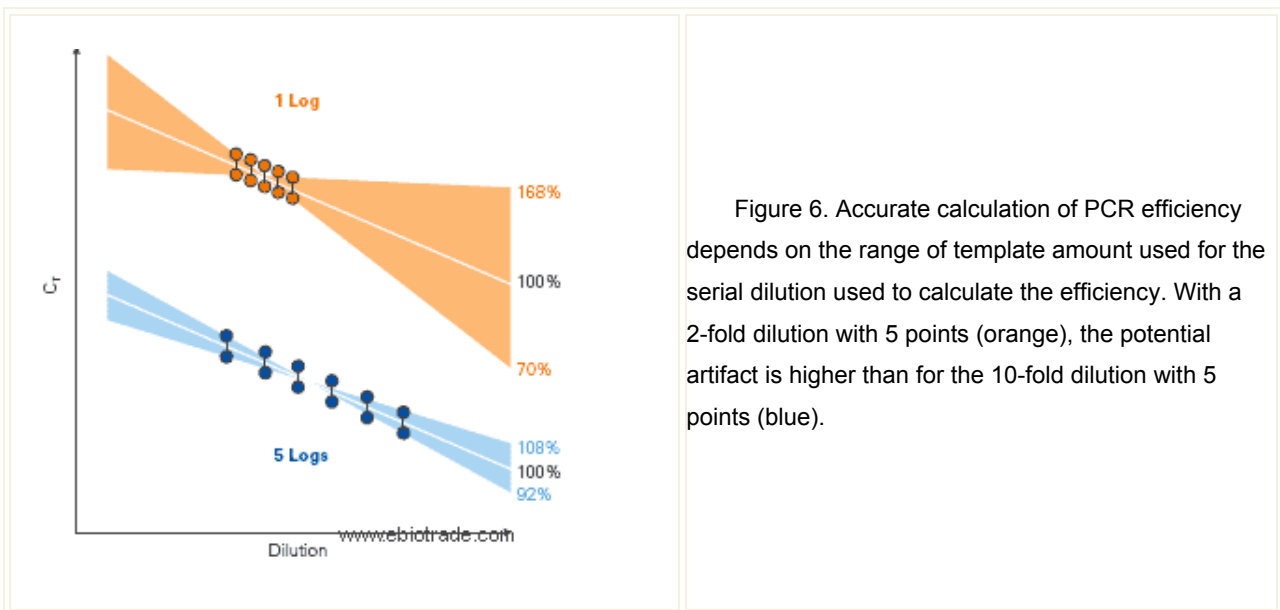


Figure 6. Accurate calculation of PCR efficiency depends on the range of template amount used for the serial dilution used to calculate the efficiency. With a 2-fold dilution with 5 points (orange), the potential artifact is higher than for the 10-fold dilution with 5 points (blue).

R²值

另一个评估PCR效率的关键参数是相关系数R²，它是说明两个数值之间相关程度的统计学术语。如果R²等于 1，那么你可以用

Y 值 (CT) 来准确预测 X 值 (量) (图 7A)。如果 R² 等于 0，你就不能通过 Y 值来预测 X 值 (图 7B)。R² 值大于 0.99 时，两个数值之间相关的可信度很好。

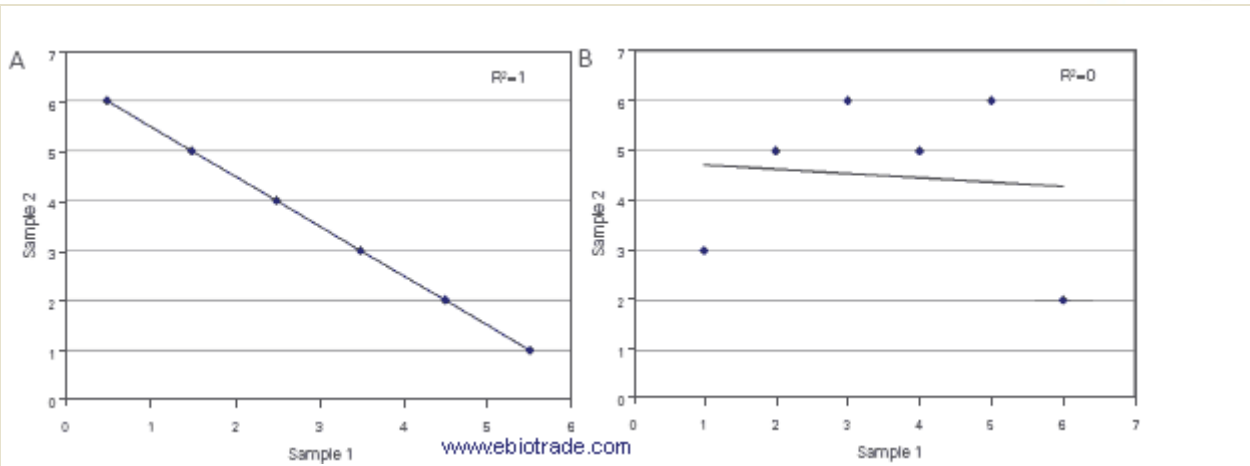


Figure 7. Example of R2 value calculated for 2 straight lines. A: There is a direct relation between x and y values. B: There is no relation between x and y values.

精确度

标准偏差 (standard deviation, 偏差的平方根) 是最常用的精确度计量方法。如果许多数据点都靠近平均值, 那么标准偏差就小; 如果许多数据点都远离平均值, 则标准偏差就大。

实际上, 足够多重复次数产生的数据组会

形成大致的正态分布。这经常可通过经典的中心极限理论来证明, 独立同分布随机变量在无限多时趋向于正态分布。如图 8A 所示, 约 68% 的数据在平均值的 1 个标准偏差之内, 约 95% 的数据落在平均值的 2 个标准偏差之内, 约有 99.7% 的数据落在平均值的 3 个标准偏差之内。

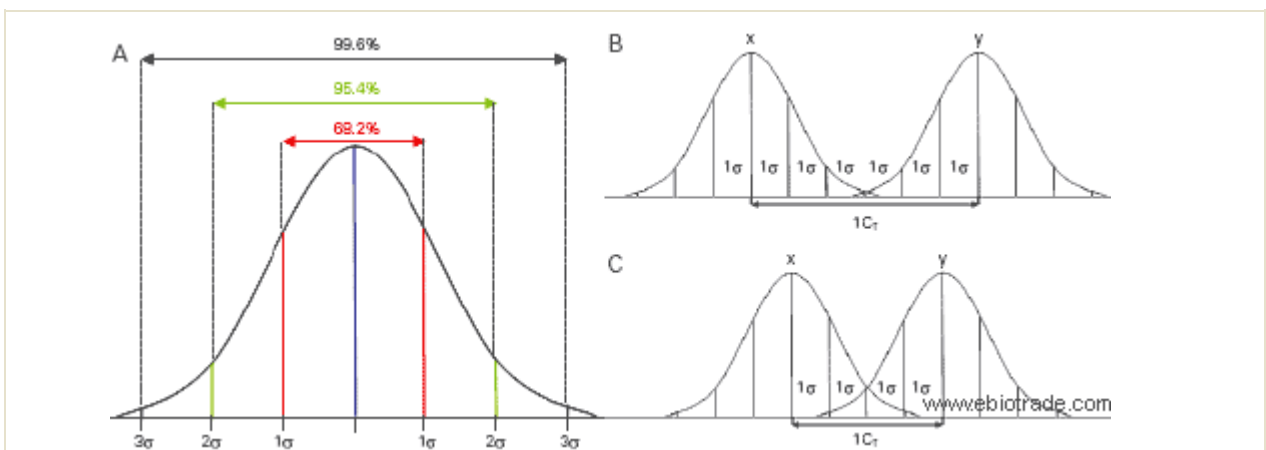


Figure 8. Normal distribution and standard deviation. (A) shows a normal distribution of data. If the PCR efficiency is 100% there is one CT between the mean of 2-fold dilution samples (sample X and sample Y). To be able to quantify both samples in 99.7% of cases, the standard deviation has to be less than 1 CT divided by 6 standard deviations ($1/6=0.167$), shown in (B). To be able to quantify both samples in 95% of the case, the standard deviation has to be less than 1 CT divided by 4 standard deviations ($1/4=0.25$), shown in (C).

如果 PCR 反应效率是 100%, 那么 2 倍稀释点之间的平均 CT 间隔应该恰为 1 个 CT 值 (图 8B)。要以 99.7% 的几率分辨 2 倍稀释浓度, 标准偏差就必须小于等于 0.167。标

准偏差越大, 分辨 2 倍稀释的能力就越低。为了能够在 95% 以上的情况下分辨出 2 倍稀释, 标准偏差必须小于等于 0.250 (图 8C)。

灵敏度

无论 CT 绝对值是多少,任何能够有效扩增和检测起始模板拷贝数为 1 的系统都达到了灵敏度的极限。

如上文所述,PCR 效率是决定反应灵敏度的关键因素(图 5)。在检测极低拷贝数时的另一个重要的考虑因素是,低拷贝时的模

板数量不能按普通情况来预期。相反,它会遵循泊松分布,即进行大量的平行重复,平均应该含有一个拷贝的起始模板,实际上约 37% 不含有拷贝,仅有约 37% 含有 1 个拷贝,约 18% 实际上含有两个拷贝(图 9)。因此,为了更可靠地检测低拷贝,必须做大量的平行重复实验来提供统计显著性,并克服泊松分布的限制。

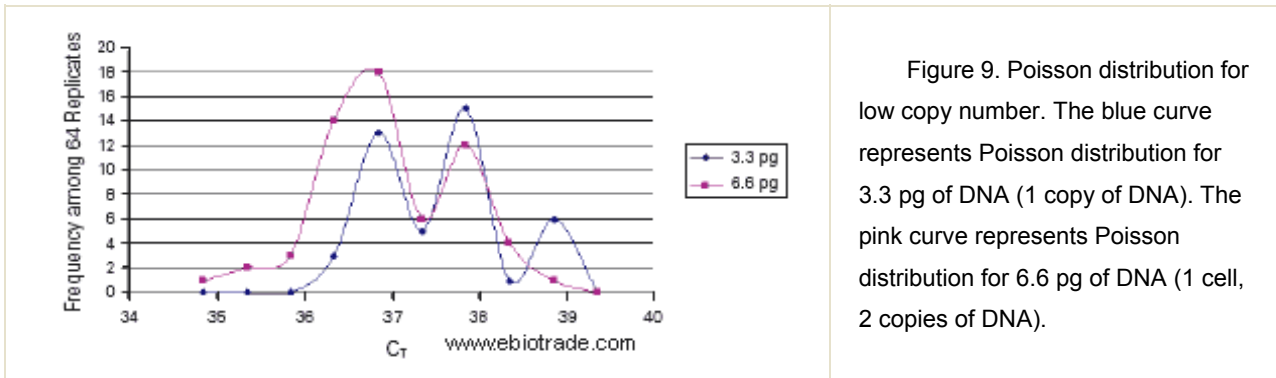


Figure 9. Poisson distribution for low copy number. The blue curve represents Poisson distribution for 3.3 pg of DNA (1 copy of DNA). The pink curve represents Poisson distribution for 6.6 pg of DNA (1 cell, 2 copies of DNA).

结论

当比较不同反应条件下的 PCR 反应时,需要用效率、R2、精确度、灵敏度这些因素来评估 PCR 反应。为了精确严谨地评估,表 1 中所列的所有因素都必须评估。

TABLE 1. 评价荧光 PCR 结果的标准

因素	建议	指标
效率	5 个数量级梯度 稀释	Slope ~ -3.3
		R2 > 0.99
精密度	至少 3 个重复	标准差 < 0.167
灵敏度	增加低浓度样 本的重复数	统计分析

除了这些因素,还必须评估和验证合适的实验对照(如无模板对照,无反转录酶对照等)以及模板质量。

附录

扩增图

扩增图是荧光信号对循环数的坐标图。反应以循环中首次检测到 PCR 产物扩增的时间

点为特征。核酸目标的起始拷贝数越高,就越快观察到荧光的显著增加。

基线

在 PCR 的最初几个循环中,荧光信号是几乎不变的。这确定了扩增图中的基线。在这些初始的循环中,我们看到的其实是反应的荧光背景。通过设定基线以从读数结果中扣除荧光背景。(关于如何设定基线,请从 ABI 公司的网站 www.appliedbiosystems.com 上下载“Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System”文件。)

ΔRn

ΔRn 是 Rn 扣除基线后得到的标准化结果 ($\Delta Rn = Rn - \text{基线}$)。

参比荧光

一种用于提供内部荧光参照的荧光染料,荧光报告基团信号在数据分析时参照它来进行标准化。必须使用标准化来校正由浓度、体积或样品变化引起的荧光波动。

PCR 效率

下面的方程式描述了 PCR 的指数扩增。

$$C_n = C_i * (1 + E)^n$$

C_i = 起始拷贝数

C_n = 在 n 个循环的拷贝数

n = 循环数

E = 目标扩增效率

如果效率最大 ($=1$)，这个方程式就变成： $C_n = C_i * 2^n$ ，它意味着每一个循环的扩增倍数是 2。如果效率降低，每个循环产生 PCR 产物的数量也降低，扩增图将会延滞。推荐的效率是介于 90-110% 之间。

荧光报告基团染料 (Reporter Dye) 是指偶联在 TaqMan 探针 5' 端的荧光基团。这个荧光基团提供的荧光信号可反应特异扩增的情况。如果使用可与双链 DNA 结合的 SYBR

Green I，此时荧光信号的增加也同样可以指示扩增情况。特异性可以通过熔解曲线来分析 ((Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol, P/N 4367218))，或对 PCR 产物进行凝胶分析。

Rn (Normalized reporter) 是荧光报告基团的荧光发射强度与参比染料的荧光发射强度的比值。

阈值 用于确定实时定量分析中的 CT 值的某个 ΔRn 水平。这个水平设定得比基线高，又在扩增曲线的指数增长区域内足够低。阈值是与扩增图相交确定 CT 值(阈值循环)的线。关于如何设定阈值，请从 ABI 公司的网站 www.appliedbiosystems.com 上下载 “Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System”。

阈值循环 (CT) 荧光穿过阈值时的循环数。(ABI 供稿 生物通 译)