

符合MIQE的qPCR基因表达解决方案



BIO-RAD

主要内容

- MIQE是什么，有什么用
- MIQE指南有哪些内容
- Bio-Rad产品如何帮助设计符合MIQE指南的实验



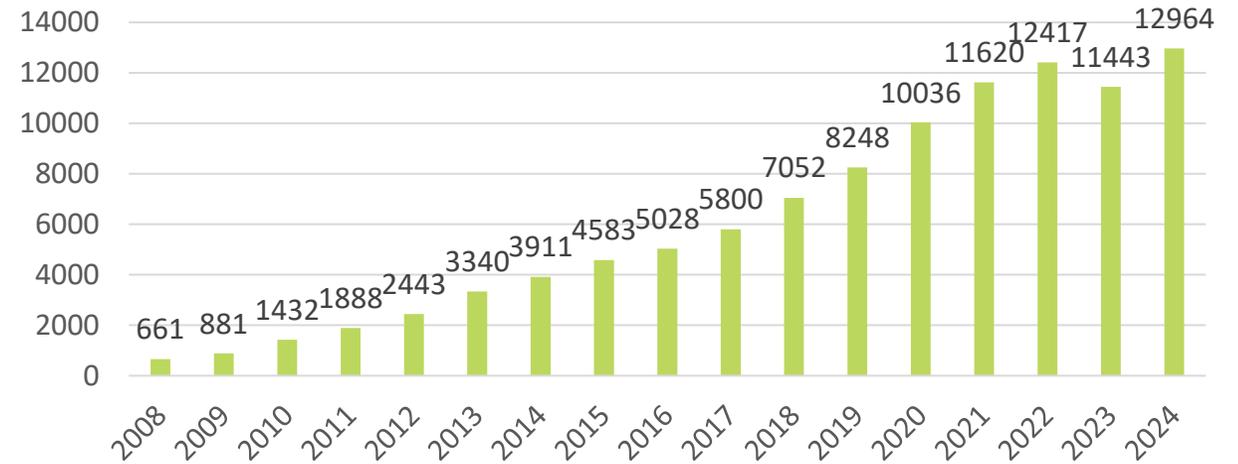
qPCR实验中的挑战

Quantitative PCR (qPCR) is one of the most common techniques for quantification of nucleic acid molecules in biological and environmental samples. Although the methodology is perceived to be relatively simple, there are a number of steps and reagents that require optimization and validation to ensure reproducible data that accurately reflect the biological question(s) being posed.

qPCR is more complex than perceived by many scientists. The production of an amplification curve and an associated C_q value does not necessarily mean interpretable data.



The MIQE guidelines and associated methodology articles published thereafter, underline the ongoing drive to help scientists produce reproducible data from qPCR, culminating in a simple, stepwise methodology to ensure high-quality, reproducible data from qPCR experiments. The analysis of qPCR data can be challenging, especially as experiments grow in sample number and complexity of biological groups. A defined approach to qPCR data analysis is necessary to clarify gene expression analysis.

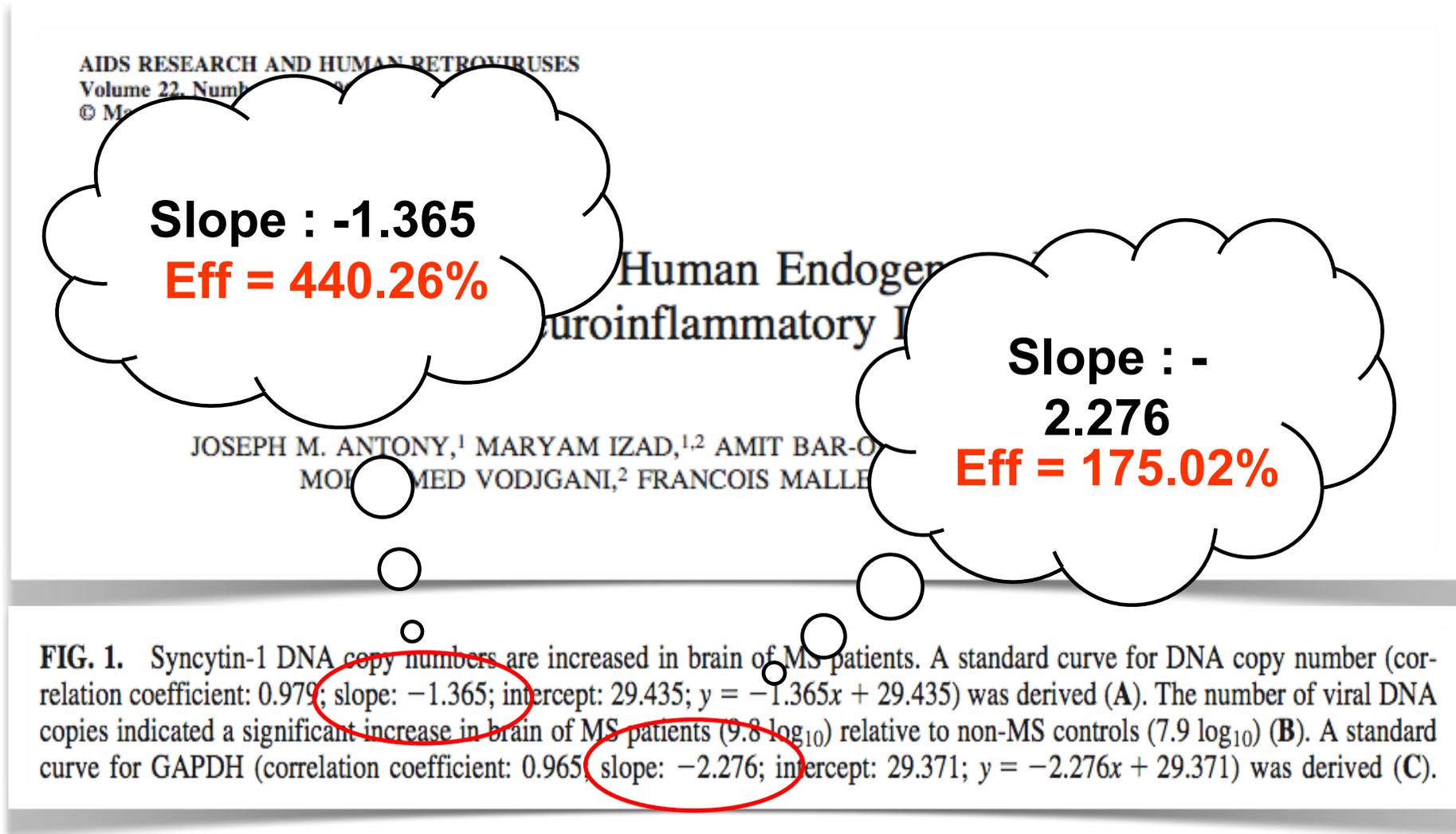


以qPCR为关键词在 NCBI Pubmed 检索

您在qPCR实验中遇到过问题和困惑吗？

- 引用文献，甚至是高影响因子的文献的方案却不能重复结果？
- 即使是相同的样品却没有重复性？
- 不靠谱或前后矛盾的数据？
- 数据与其他实验证据相比存在差异，难以解释？
-

Questionable Data 存疑的数据





MIQE的诞生

成为国际化标准

该文章一经发表，便迅速得到了科研界的广泛认可，现已成为qPCR领域的国际化标准。遵循此标准，极大地提升了qPCR实验结果的可靠性和可重复性。

符合MIQE指南的RT-qPCR 实验流程

实用指导: 如何获得符合 MIQE 指南的 RT-PCR (qPCR) 数据

Bulletin 5859

Tech Note

Sean Taylor, Michael Wakem, Greg Dijkman, Marwan Alsarraj, and Marie Nguyen
Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547

Amplification

Bulletin 5859

Real-Time PCR

MIQE Guidelines for Real-Time PCR: Checklist for Authors, Reviewers, and Editors

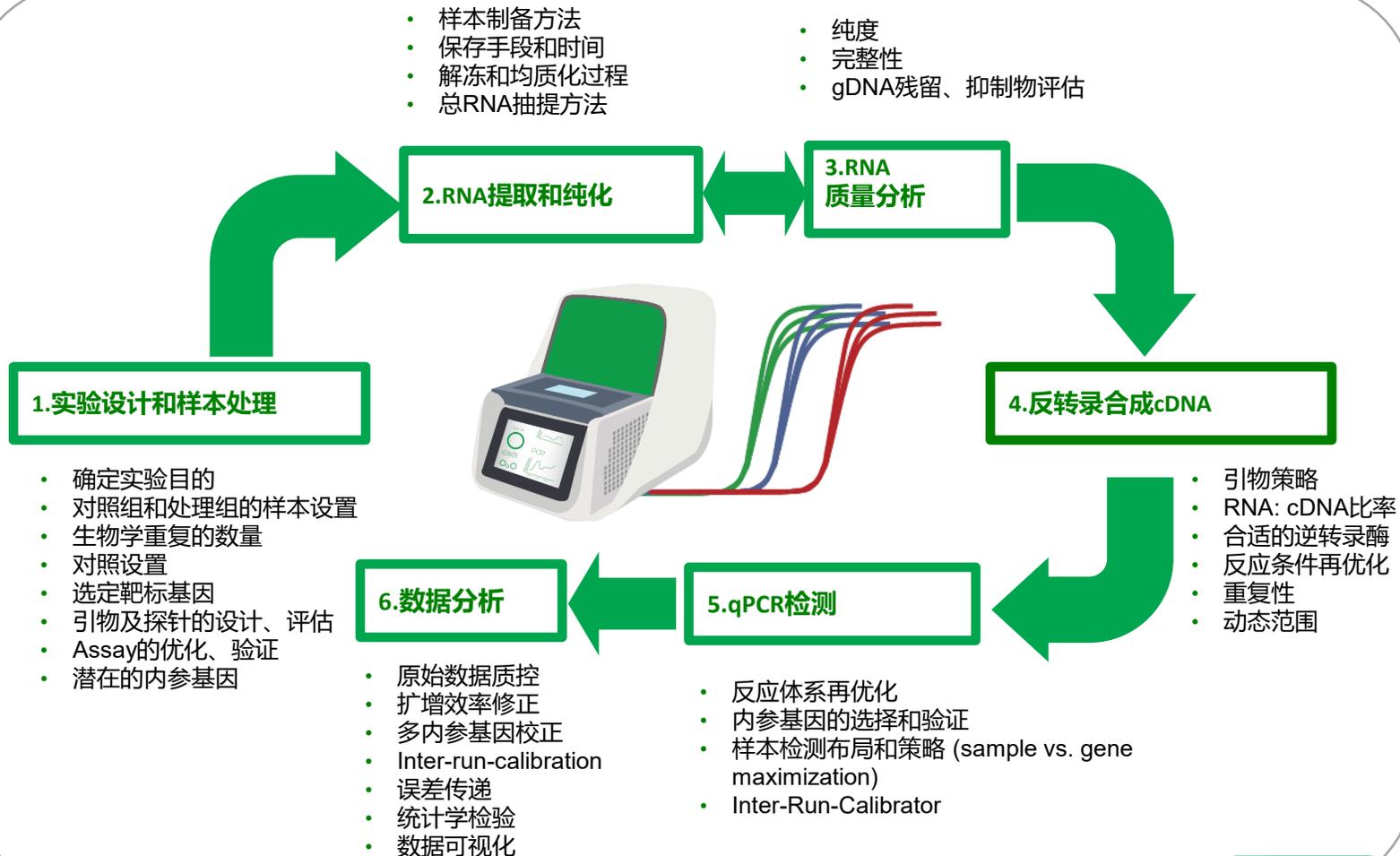
All essential MIQE information (E) must be submitted with the manuscript (see Bustin et al. 2009). Desirable information (D) should be submitted if available. If primers were obtained from RTPimerDB, information on qPCR target, oligonucleotides, protocols, and validation is available from that source.

Item	MIQE	Comments/My information
Experimental Design		
Definition of experimental and control groups	E	
Number within each group	E	5 samples for treated group
Assay location: core or investigator's laboratory	D	
Acknowledgement of authors' contributions	D	
Samples		
Description	E	
Volume/mass of sample processed	D	
Microdissection or macrodissection	E	
Processing procedure	E	
If frozen — how and how quickly?	E	
If fixed — with what, how quickly?	E	

Bulletin 3556

BIO-RAD

基因表达实验流程



BIO-RAD

01 实验设计



实验设计

Item to check	Importance
Experimental design	
Definition of experimental and control groups	E
Number within each group	E
Assay carried out by the core or investigator's laboratory?	D
Acknowledgment of authors' contributions	D

实验设计原则

01 实验流程及技术路线

- 疾病组/处理组
- 目标基因
- 内参基因

02 对照组设置

- 时间进程研究
- 正常vs患病
- 零处理vs药物处理

03 如何设置重复及数量

- 足够的生物学重复&技术重复
- 样本检测顺序和方式的组织布局策略
- 需要的RT和qPCR反应数量及体系优化

04 实验条件

- 成长条件（培养基、时间及OD）
- 胚胎发育的时间
- 药物处理数量
- 足够的试剂耗材及供应商

05 样本处理方案

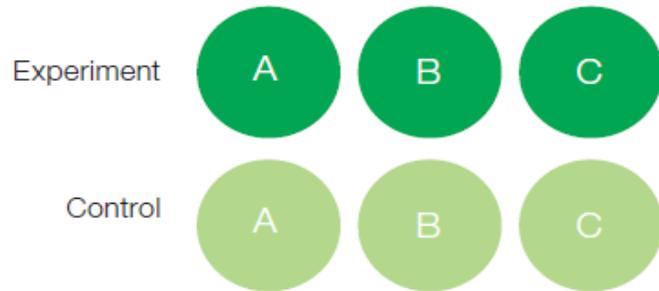
- 收取细胞或组织的准确时间
- 样本制备方法和保存方法
- 解冻及匀浆处理方式
- 总RNA提取方法

06 检测方法如何验证&确认

- 引用文献报道的qPCR方案
- 自建试验方案

重复

Biological Replicates



生物学重复：具有相似特征的不同材料，即相同的背景、相同的处理

RT-qPCR Samples Technical Replicates



技术重复：同一材料的多次重复

重复Replicates

- 生物学处理和Cq值的测定都需要设置足够的重复
- 重复的数量有赖于总体变异度大小以及期望达到的分辨水平
- 低表达基因的分析需要更多的重复以期区分表达差异并具有统计学意义
- 实验设计时，仔细评估要取得统计学意义所需要设置的生物学重复数量

	BG ₁ vs BG ₂ (2)	T ₀ vs T ₁ (2)	Σ(Bio reps)	Tech reps	Wells per target	Targets	Wells
	(10)	20	+ 20 = 40	× 3	= 120	× 4 = 480	
	(4)	8	+ 8 = 16	× 3	= 48	× 4 = 192	
	(50)	100	+ 100 = 200	× 3	= 600	× 4 = 2400	

Planning and Scoping a qPCR-based gene expression analysis

biological group (BG): BG1 vs BG2

Time point (T): T0 vs T1

Biological replicate (Bio Reps)

Technical replicate (Tech reps)

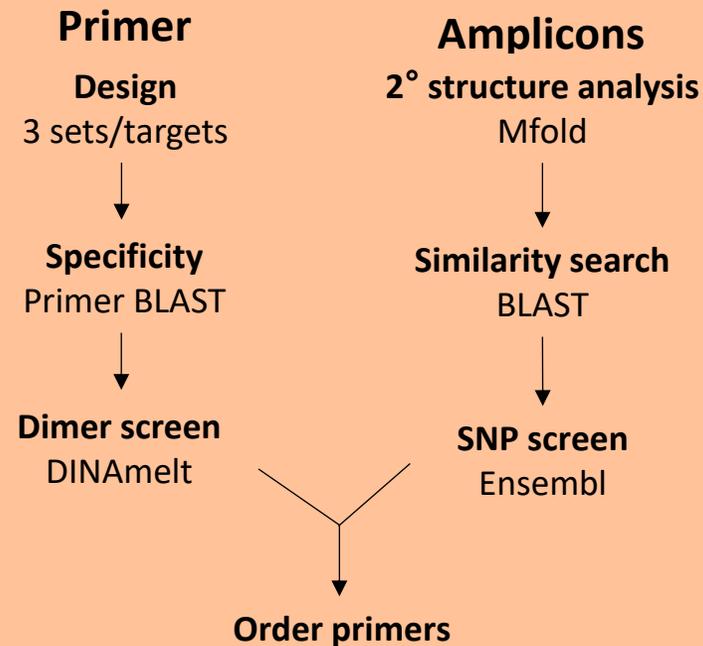
引物/探针设计与验证

In Silico

1. Target Identification

- Accession number
- Splice variant-specific or general assay

2. Assay Properties



Wet lab

3. Primer characterization

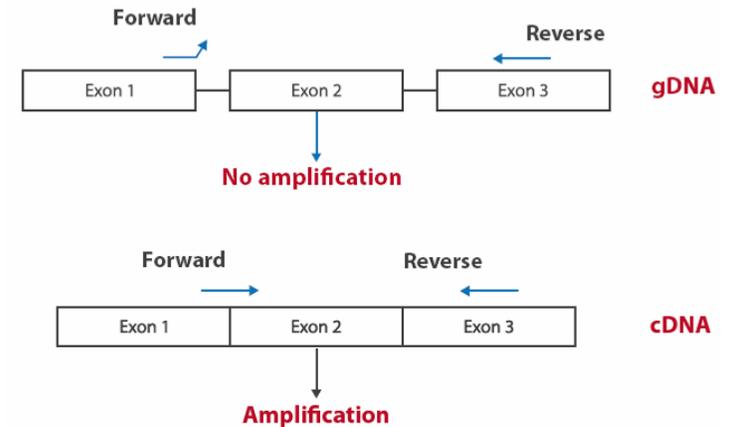
- Optimal primer Ta: Gradient PCR 58 °C-63°C
- Optimal primer concentration: Concentration matrix (100-400nM)
- Optimal primer combination: Lowest C_q, absence of primer dimers
- Primer specificity: Melt curve
- PCR efficiency: Standard curve

4. Assay optimization

- Limits of detection: Lowest amount detected with (stated) probability
- Limits of quantification: Lowest amount quantified with (stated) accepted precision and accuracy

引物/探针设计与验证

- 在公共资源或数据库中或已经发表文献中，或经过实验验证的引物和/或探针。
- GC含量在40~60%，引物长度在18~30bp，Tm在50~65℃；上下游引物 $\Delta Tm \leq 4^\circ C$ 。
- 避免引物和模板间错配，特别是引物3'端的错配。
- 限制二级结构。
- 避免引物位于模板的二级结构丰富区（茎环结构）。
- 限制连续的G或C长度超过3个碱基。
- 将C或G置于引物的3'端，但是3'端最后5个碱基中不要超过2个C或G。
- 避免3'端最后碱基为T（可能产生错配）。
- 避免引物间的互补，以避免产生引物二聚体，特别注意引物间3'端互补不能超过2个碱基。
- 在NCBI数据库上比对引物、探针、扩增子序列，确保特异性。
- 同时检查引物退火位置的是否存在SNP位点。
- 产物长度在75~200bp之间，最大不超过250bp。
- 设计退火位置在不同外显子上的引物，如果必要引物可跨外显子/外显子连接点。



设计跨外显子/外显子连接点的引物

- 如果是为了消除gDNA残留的干扰，并不推荐该策略。更有效的方法是对RNA进行适当的DNase处理，随后以NRT检测法仔细分析是否存在gDNA残留。



Bio-Rad iScript gDNA Clear kit

- ✓ 含gDNA去除
- ✓ 操作最简单
- ✓ 速度快
- ✓ 效率高

02 样本信息



样本采集和处理

- 组织材料：迅速地处死动物、剥取组织并用液氮急冻
- 培养细胞：清洗平板后，加入含RNA保护剂的lysis buffer，刮下细胞，吸打匀化后提取
- 尽可能使用新鲜的样本，尽快提取RNA
 - 长时间冻存的样本或FFPE 样品常导致不稳定的数据，需要校正。
 - 如果样品需长期收集或难以立即处理，应将其冻存在适合的条件（液氮快速冷冻，或冻存于 **-80°C**条件下）。
 - 防止污染，避免反复冻融。



Sample	
Description	E
Volume/mass of sample processed	D
Microdissection or macrodissection	E
Processing procedure	E
If frozen, how and how quickly?	E
If fixed, with what and how quickly?	E
Sample storage conditions and duration (especially for FFPE ^b samples)	E

03 核酸提取



核酸提取及质控

使用高纯度（不含DNA和蛋白质及抑制物）和高度完整（无降解）的RNA进行实验是整个RT-qPCR实验流程中最关键的环节！

- RNA不纯将导致对下游PCR反应的抑制，C_q将右移，产生数据偏差。
- 若RNA发生降解，将导致不正确的结果。
- RNA的纯度和完整性是不相关的，都需要进行检测以确保高质量的RNA用于下游实验。

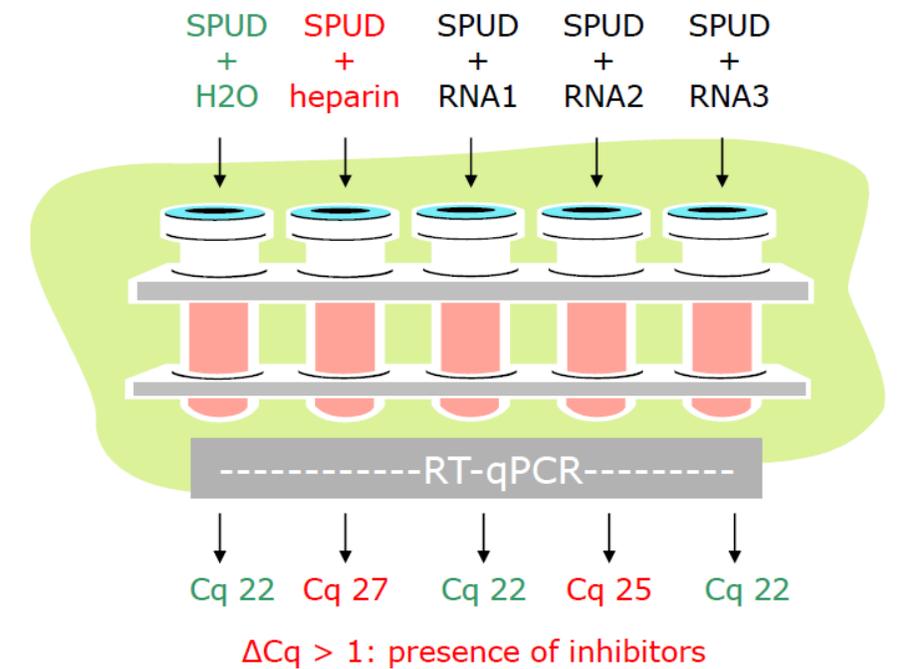


Nucleic acid extraction	
Procedure and/or instrumentation	E
Name of kit and details of any modifications	E
Source of additional reagents used	D
Details of DNase or RNase treatment	E
Contamination assessment (DNA or RNA)	E
Nucleic acid quantification	E
Instrument and method	E
Purity (A_{260}/A_{280})	D
Yield	D
RNA integrity: method/instrument	E
RIN/RQI or C _q of 3' and 5' transcripts	E
Electrophoresis traces	D
Inhibition testing (C _q dilutions, spike, or other)	E

模板RNA的要求：

- **纯度高**（UV absorbance）：
 - $A_{260}/A_{280} = 2$ （1.9-2.2）
 - A_{260} : 0.15~1
 - $A_{260}/A_{230} = 2.5$ （> 2.0）
- **完整性**：降解RNA会干扰定量结果，未发生降解RNA样本 $28S/18S=2.0$

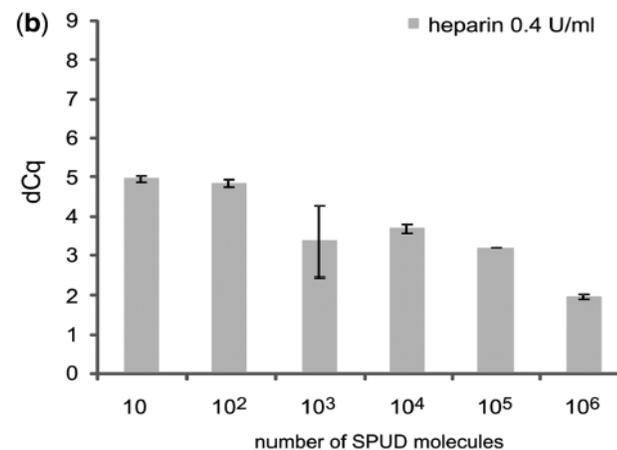
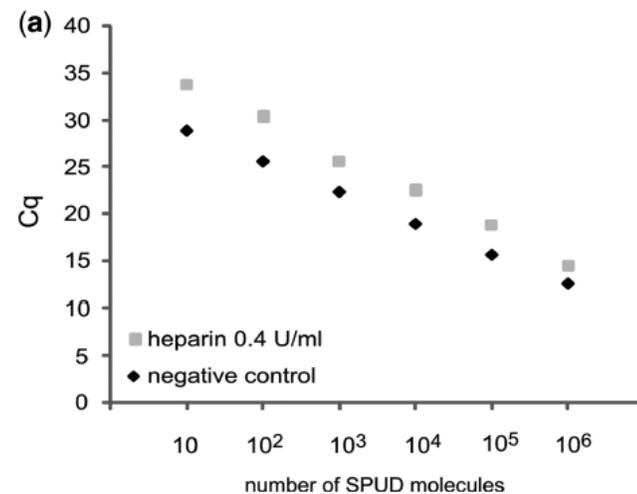
SPUD assay (分析PCR抑制剂)



SPUD: detection of presence of inhibitors

Nolan et al., Anal Biochem, 2006

选择Bio-Rad 耐受PCR抑制物的qPCR Supermix



Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 9

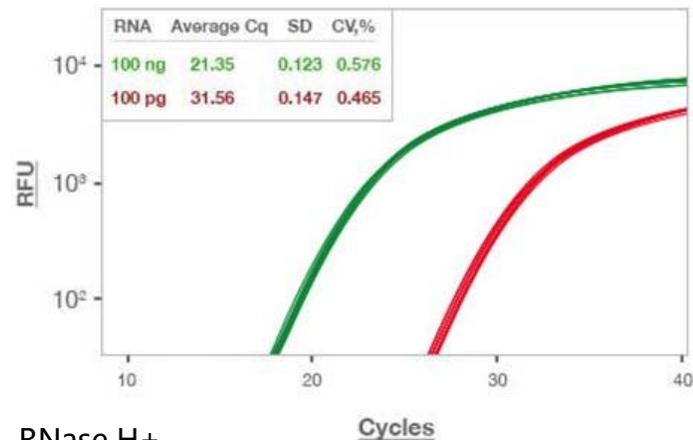
04 反转录



反转录酶

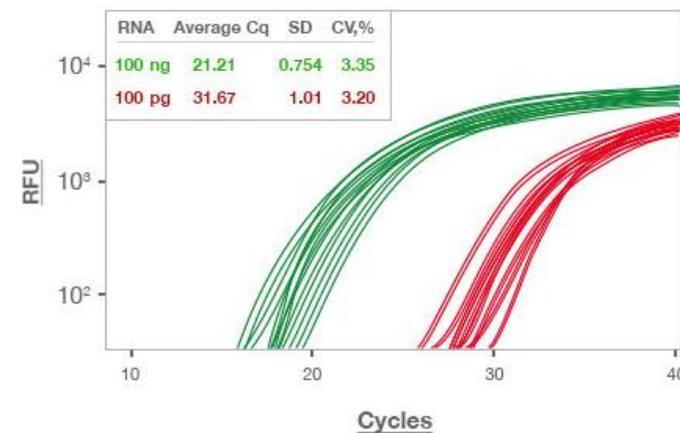


- RNase H+ 活性控制着RNA: cDNA 比率
- RNase H+ 如何工作?
- 逆转录酶的RNase H+ 活性在cDNA合成过程中只降解mRNA: cDNA杂交链中的mRNA, 保留合成的cDNA (无偏RT)
- RNase H- 的逆转录酶可以合成多拷贝的cDNA, 但是会导致模板基因表达量的失真



RNase H+

- PGK-1 基因mRNA (~160bp)
- 100ng 和100pg RNA使用iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR逆转录
- qPCR分析获得的cDNA

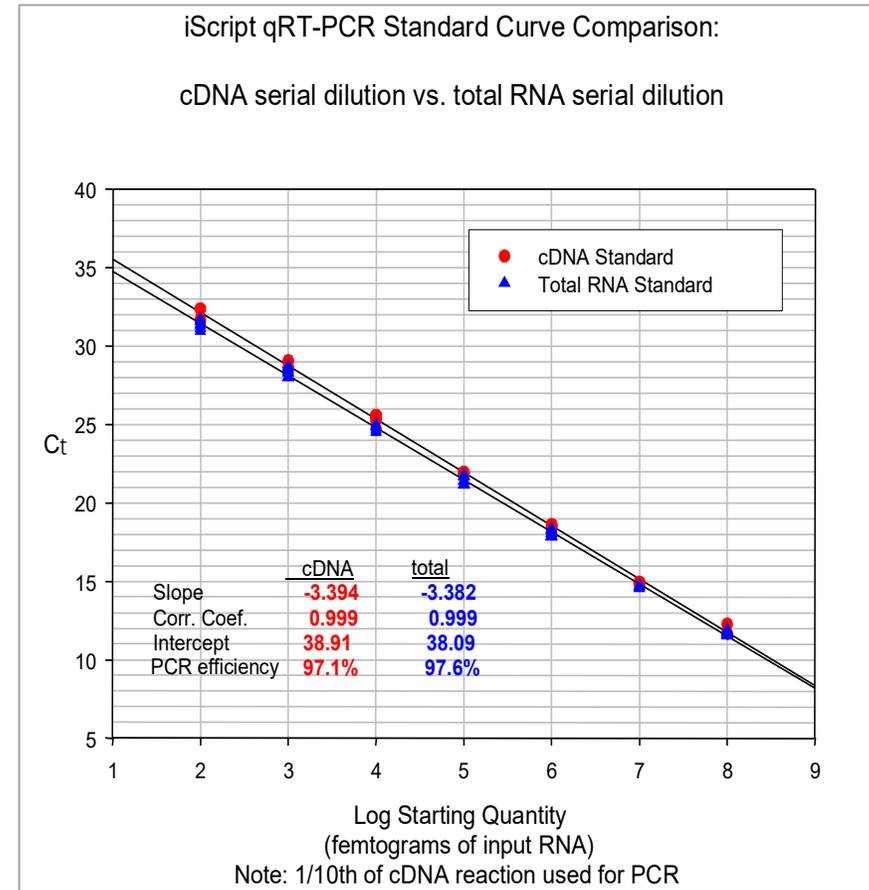
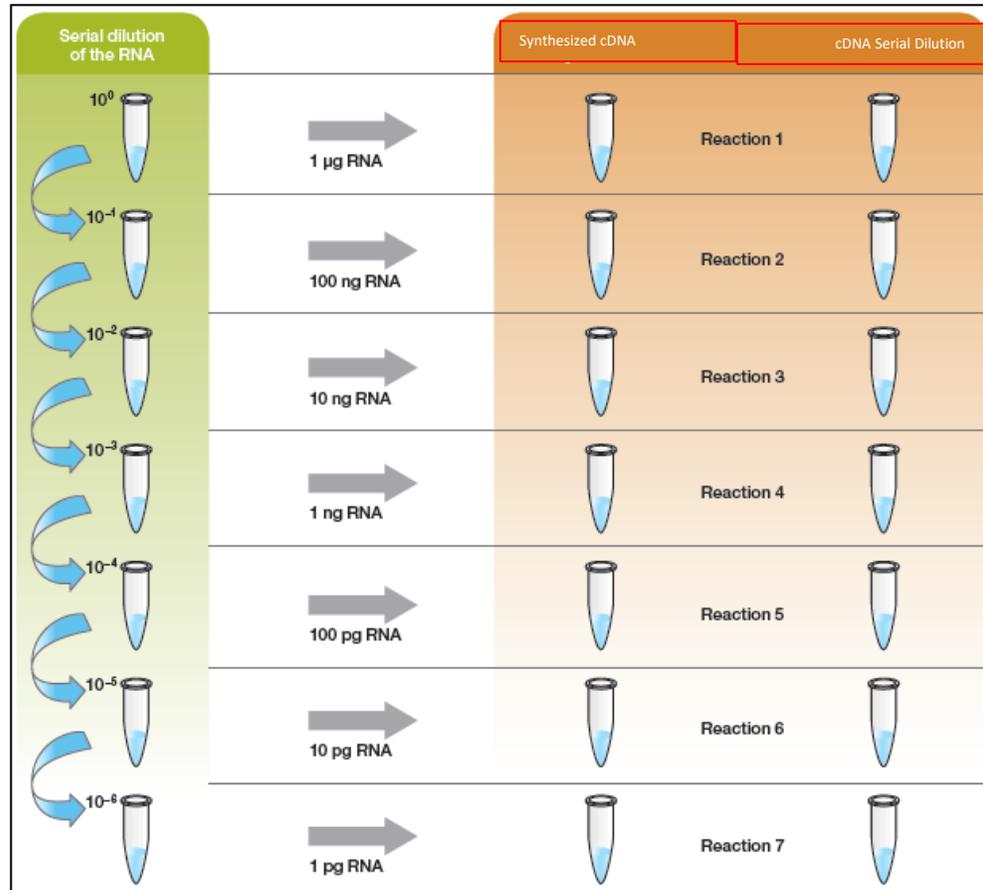


RNase H-

- PGK-1 基因 mRNA (~160bp)
- 100ng 和100pg RNA使用RNase H-的逆转录酶逆转录
- qPCR分析获得的cDNA

RT动态范围及重复性

不同浓度RNA逆转录一致性；批次间一致性，样本间RT效率一致性，室间一致性



05 qPCR实验与优化



qPCR实验与优化

Item to check	Importance
qPCR protocol	
Complete reaction conditions	E
Reaction volume and amount of cDNA/DNA	E
Primer, (probe), Mg ²⁺ , and dNTP concentrations	E
Polymerase identity and concentration	E
Buffer/kit identity and manufacturer	E
Exact chemical composition of the buffer	D
Additives (SYBR Green I, DMSO, and so forth)	E
Manufacturer of plates/tubes and catalog number	D
Complete thermocycling parameters	E
Reaction setup (manual/robotic)	D
Manufacturer of qPCR instrument	E
qPCR validation	
Evidence of optimization (from gradients)	D
Specificity (gel, sequence, melt, or digest)	E
For SYBR Green I, C _q of the NTC	E
Calibration curves with slope and y intercept	E
PCR efficiency calculated from slope	E
CI _s for PCR efficiency or SE	D
r ² of calibration curve	E
Linear dynamic range	E
C _q variation at LOD	E
CI _s throughout range	D
Evidence for LOD	E
If multiplex, efficiency and LOD of each assay	E



Feature	CFX Opus 96 System	CFX Opus 384 System	CFX Opus Deepwell System	CFX Duet System
Capacity	96 wells	384 wells	96 wells	96 wells
Light source	6 LEDs in optics shuttle	5 LEDs in optics shuttle	6 LEDs in optics shuttle	3 LEDs in optics shuttle
Optical detection	6 photodiodes	5 photodiodes	6 photodiodes	3 photodiodes
Excitation range	450–684 nm	450–650 nm	450–684 nm	450–535 nm
Detection range	510–730 nm	515–690 nm	510–730 nm	515–580 nm
Multiplex capability	Up to 5 targets	Up to 4 targets	Up to 5 targets	Up to 2 targets
Maximum gradient span	24°C	24°C	24°C	24°C
Maximum ramp rate	5°C/sec	2.5°C/sec	2.5°C/sec	5°C/sec
Real-time PCR software	CFX Maestro Software 2.0 or higher	CFX Maestro Software 2.0 or higher	CFX Maestro Software 2.0 or higher	CFX Maestro Software 2.3 or higher



Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, #HSP9601

- 高品质纯净聚丙烯树脂
- 卓越的孔间均一性
- 可靠且可重复的结果

PCR封板膜

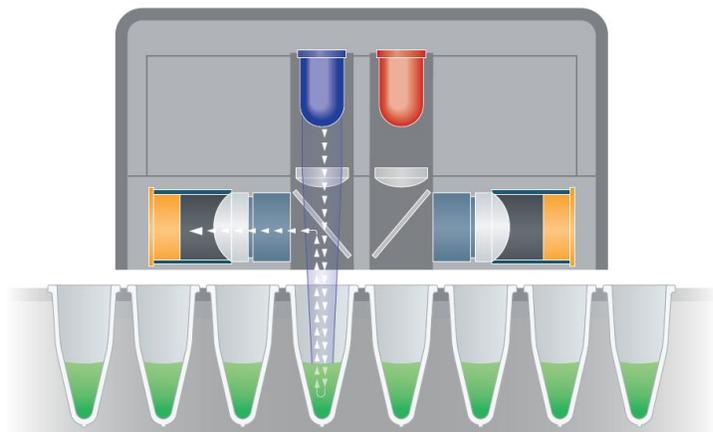
- 特殊优化的粘合剂
- 在 (-40°C-110°C) 下仍有效
- 准确和重现性高的结果

www.bio-rad.com/genomics/pcrsupport

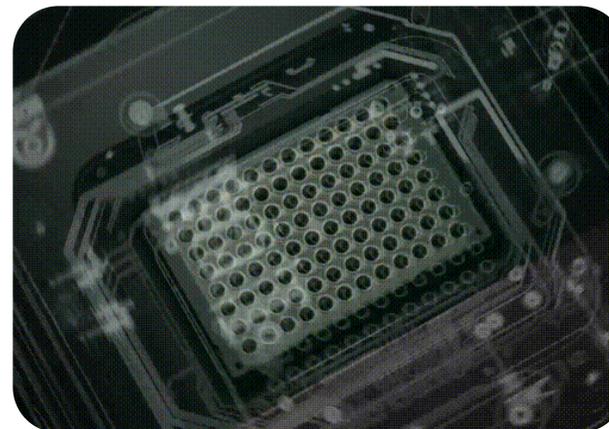
BIO-RAD

仪器耗材

独立激发独立检测

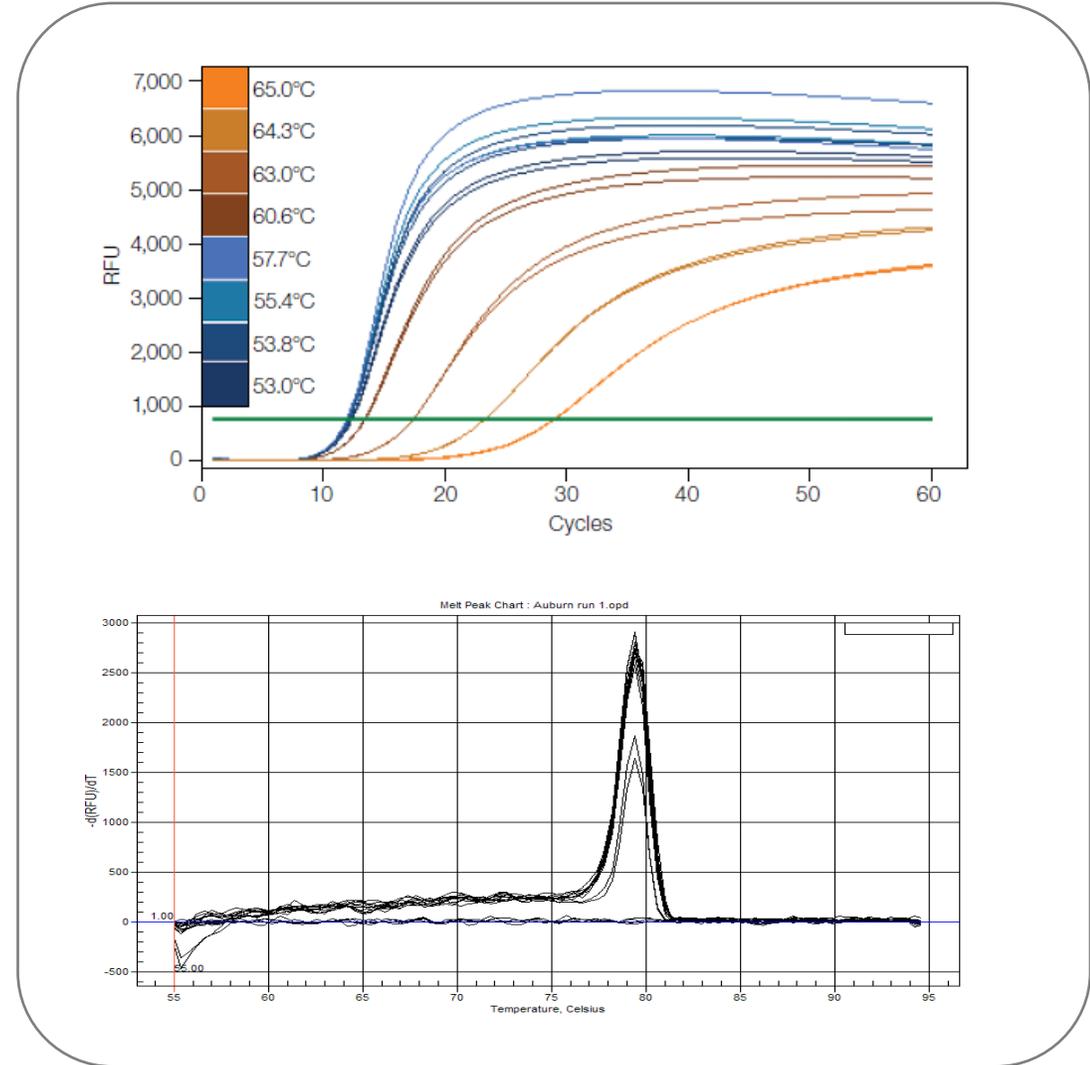
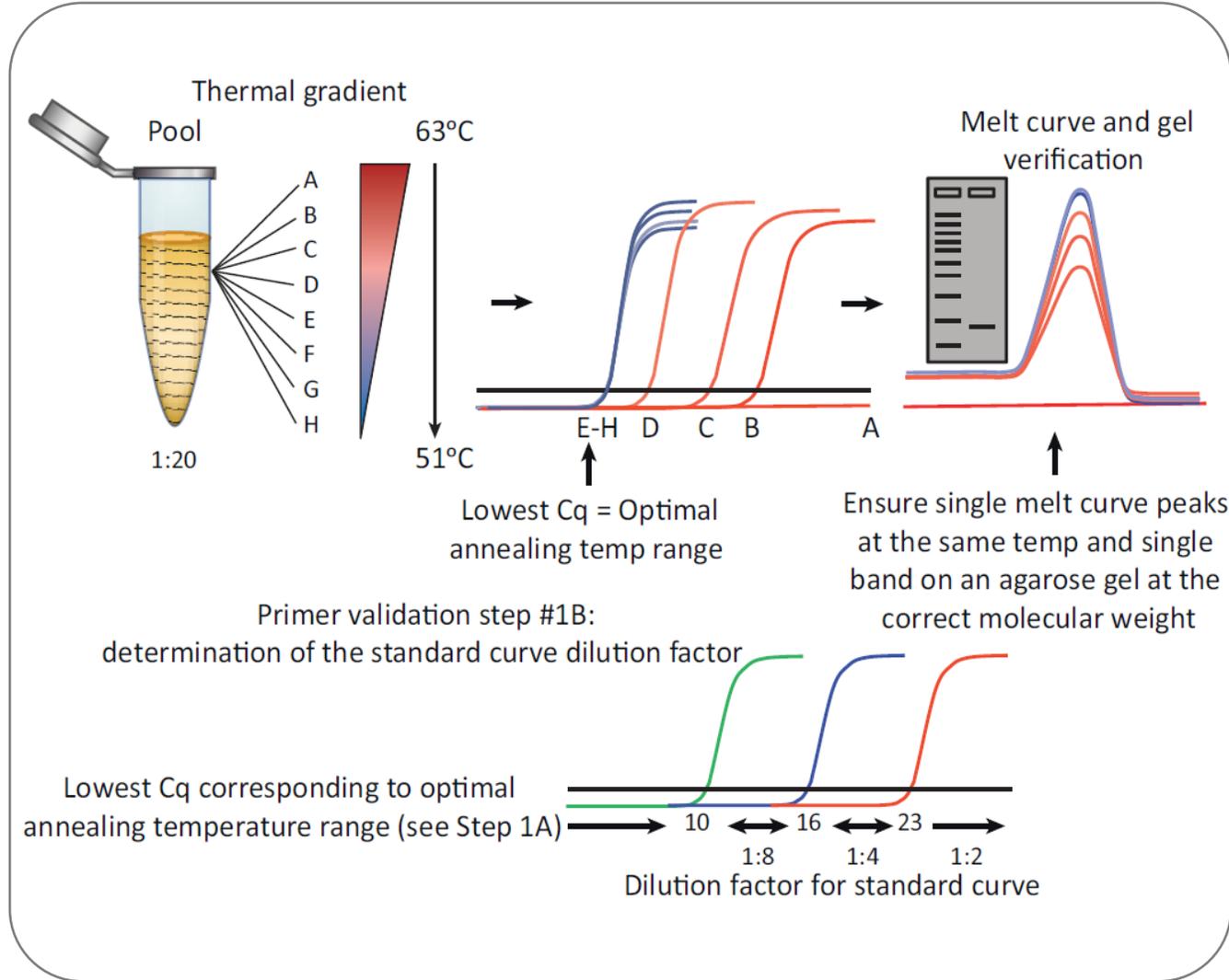


固态一体化光梭扫描检测技术



- 光源/检测器到每个反应孔的距离一致，无光程差，**无需参比荧光染料校正 (ROX)**
- 光源/检测器始终对准每个反应孔，无需错位，**无需对位校正** (ROI, Mask calibration)
- 长寿命LED灯

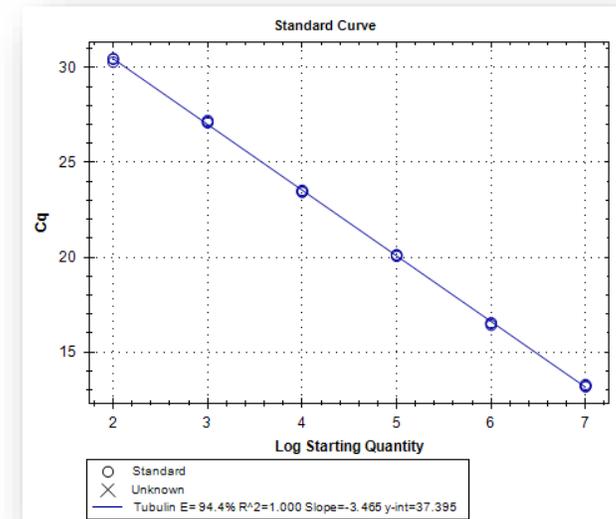
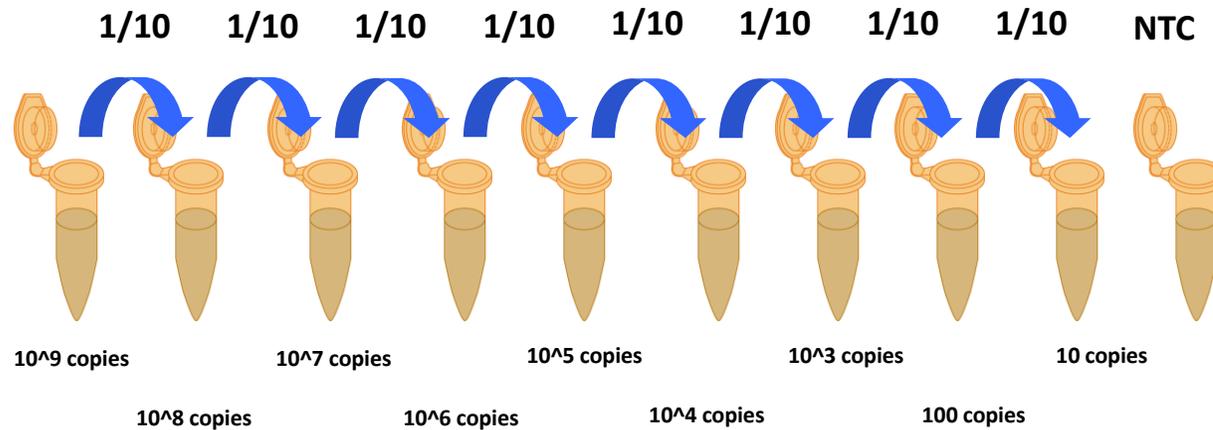
TM优化



扩增效率评估

评测每个assay的PCR扩增效率，包括所有的靶标基因和参考基因的扩增效率

- 通过梯度稀释高浓度模板绘制标准曲线
- 标准曲线的斜率Slope (S)与PCR扩增效率相关：
 - $\text{Efficiency} = 10^{-(1/s)} - 1$
- 理想的扩增效率（覆盖至少5个数量级的动态范围）
 - 90~110%（使用实际扩增效率参与相对表达量的计算）
 - $R^2 > 0.98$



Sso系列性能更优

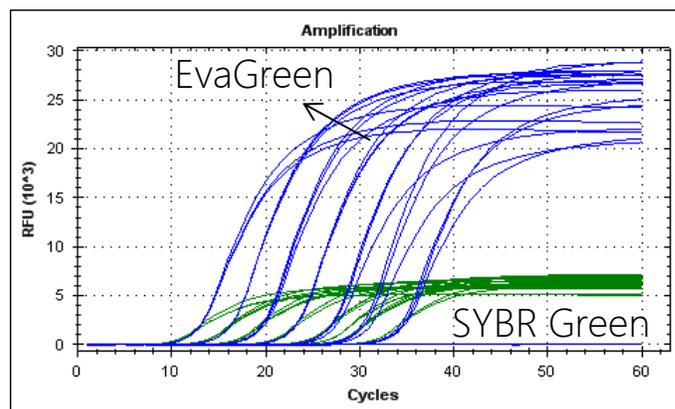
Sso-7d 融合DNA聚合酶技术 (美国专利号: 6,627,424)



- Sso7d DNA 结合蛋白融合到DNA聚合酶上
- Source of Sso7d – 耐热*Sulfolobus solfataricus*古菌
- 7kD, 63 aa., monomeric (3-6 bp/protein molecule)
- 耐热 ($T_m > 90^\circ\text{C}$)
- 无序列偏好



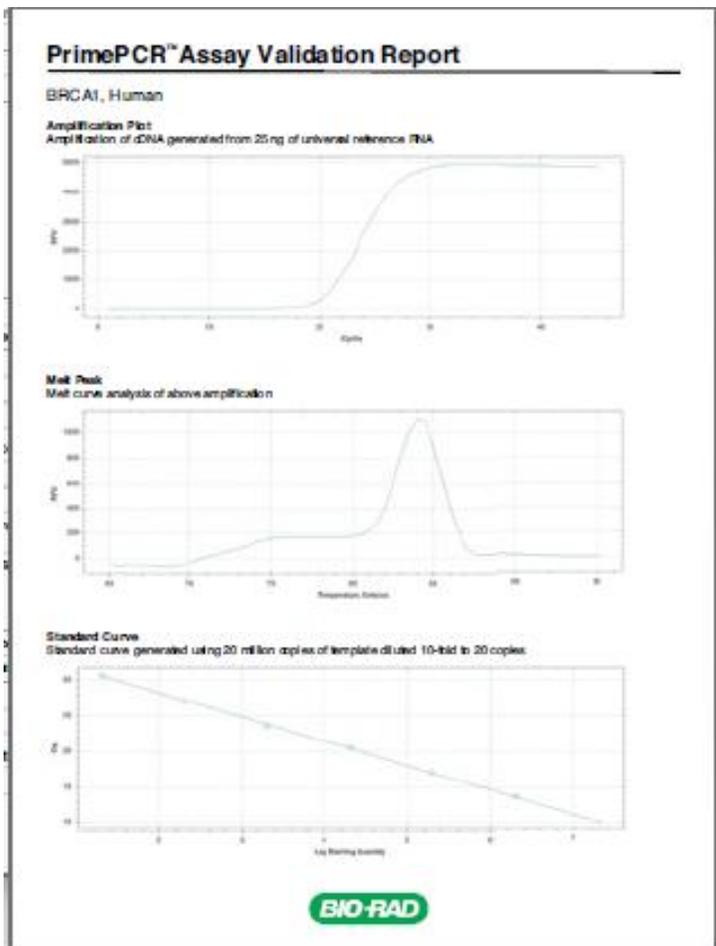
SsoFast EvaGreen Supermix— 使用EvaGreen 饱和染料



- 饱和染料, 更强的荧光信号
- 重复性更佳
- 速度最快 < 40 min
- 还可以用于高分辨率熔解曲线分析HRM
 - 突变分析
 - SNP分析

Sso Advanced 系列经过全基因组实验验证符合MIQE

人, 小鼠, 大鼠等物种的全基因组



使用的iScript Advanced cDNA synthesis kit + SsoAdvanced Supermix进行实验验证

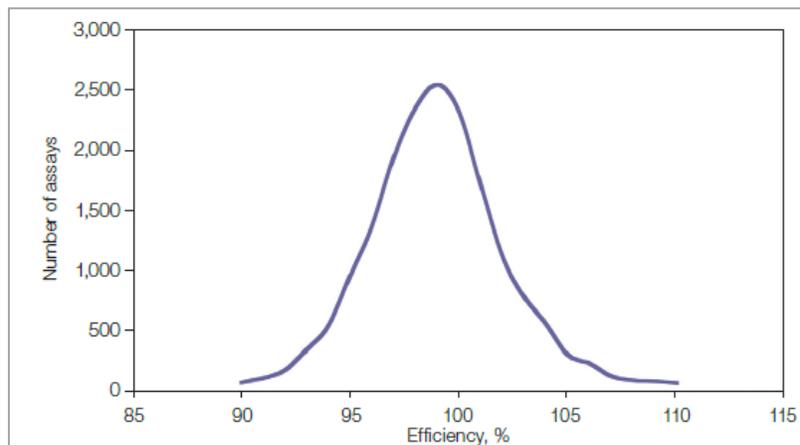


Fig. 1. Distribution of PrimePCR assay efficiencies. While efficiencies of 90–110% were targeted, final analysis shows that a large majority of assays actually fall between 95 and 105%. When assays fail to meet the 90–110% efficiency target, assay redesign and validation are attempted up to three times.

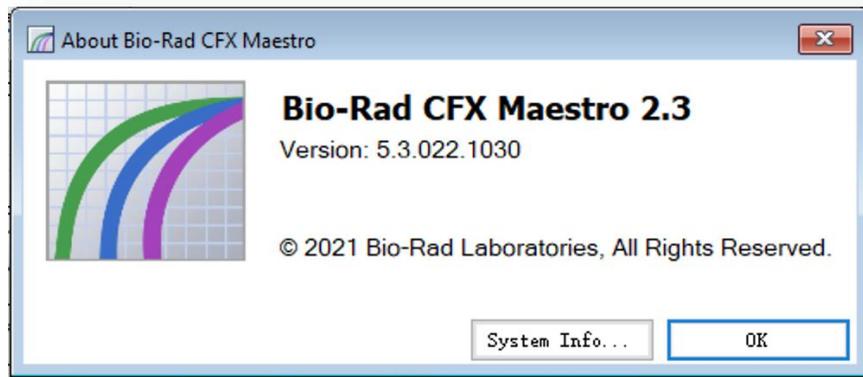
根据MIQE要求验证

- 扩增效率
- 灵敏度
- 动态范围
- 特异性

06 数据分析



Data analysis	
qPCR analysis program (source, version)	E
Method of C _q determination	E
Outlier identification and disposition	E
Results for NTCs	E
Justification of number and choice of reference genes	E
Description of normalization method	E
Number and concordance of biological replicates	D
Number and stage (reverse transcription or qPCR) of technical replicates	E
Repeatability (intraassay variation)	E
Reproducibility (interassay variation, CV)	D
Power analysis	D
Statistical methods for results significance	E
Software (source, version)	E
C _q or raw data submission with RDML	D



01 标准曲线

对每一对引物制作标准曲线来分析扩增效率。例如通过一系列已知浓度的标准模板进行qPCR扩增，绘制出标准曲线，计算出引物的扩增效率为95%。

02 实验组和对照组的C_q值

提供实验组和对照组的C_q值，以便进行结果比较。如实验组的C_q值平均为25，对照组的C_q值平均为28，通过C_q值差异分析基因表达变化。

03 数据计算方法和可视化

明确数据计算方法和归一化方法。如采用 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 法计算基因相对表达量，并以内参基因进行归一化处理，使数据更具可比性。数据可视化能将复杂的qPCR实验数据以直观的图形呈现，帮助我们快速理解数据特征和规律。

CFX Maestro 软件是MIQE第一位推荐的符合数据标准化要求的软件

RDML compliant qPCR instrument software

Logo	Software	Company
	CFX Maestro	Bio-Rad
	StepOne	Life Technologies
	QuantStudio 12K Flex	Life Technologies
	ViiA 7	Life Technologies

<https://rdml.org/instruments.html>



Roche Diagnostics Evolves LightCycler qPCR System for Clinical Use

Nov 27, 2023 | [Madeleine Johnson](#)

英国Anglia Ruskin大学分子医学教授、分子诊断单位负责人Stephen Bustin同意，七重测定试剂设计的挑战可能会限制所有七个通道对研究的实用性，尽管它可能对检测多种病原体有用，例如，在综合症状Panel测试中。

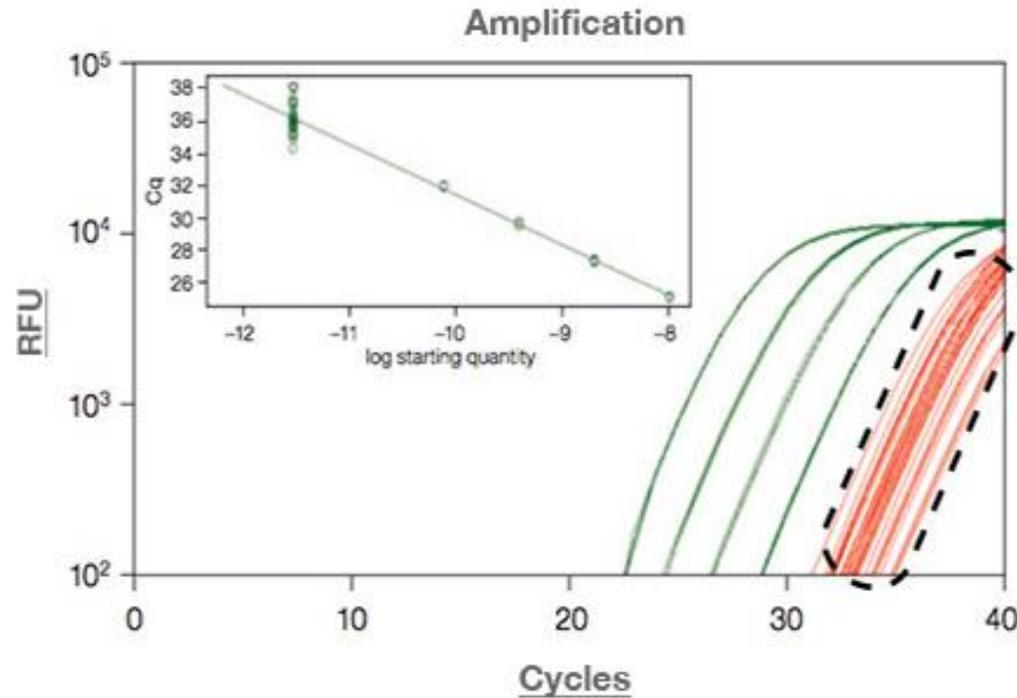
在诊断实验室空间中，"总是需要台式、高通量的诊断仪器，而研究人员希望有廉价、灵活的硬件和用户友好的软件，"Bustin解释。

在IVD模式下运行的热循环仪包括Bio-Rad Laboratories的CFX Opus 96 Dx和Opus 384 Dx系统，以及Opus Dx Deepwell系统，该系统运行体积高达125微升。

Bustin的团队使用Bio-Rad的Opus，以及PCREx Eco和Bio Molecular Systems Mic在实验室中，他发现它们都"非常均匀，"他说。

"市场上的大多数仪器都表现良好，产生一致、可靠、可重复的结果，"Bustin说，不同系统的主要区别在于大小和成本。软件也"从优秀到非常令人沮丧，"他说，他认为Bio-Rad的Opus系统软件属于"优秀"类别，例如。

Cq值与灵敏度



灵敏度：LOD， limit of detection
重复的、可靠地检测到的最低浓度



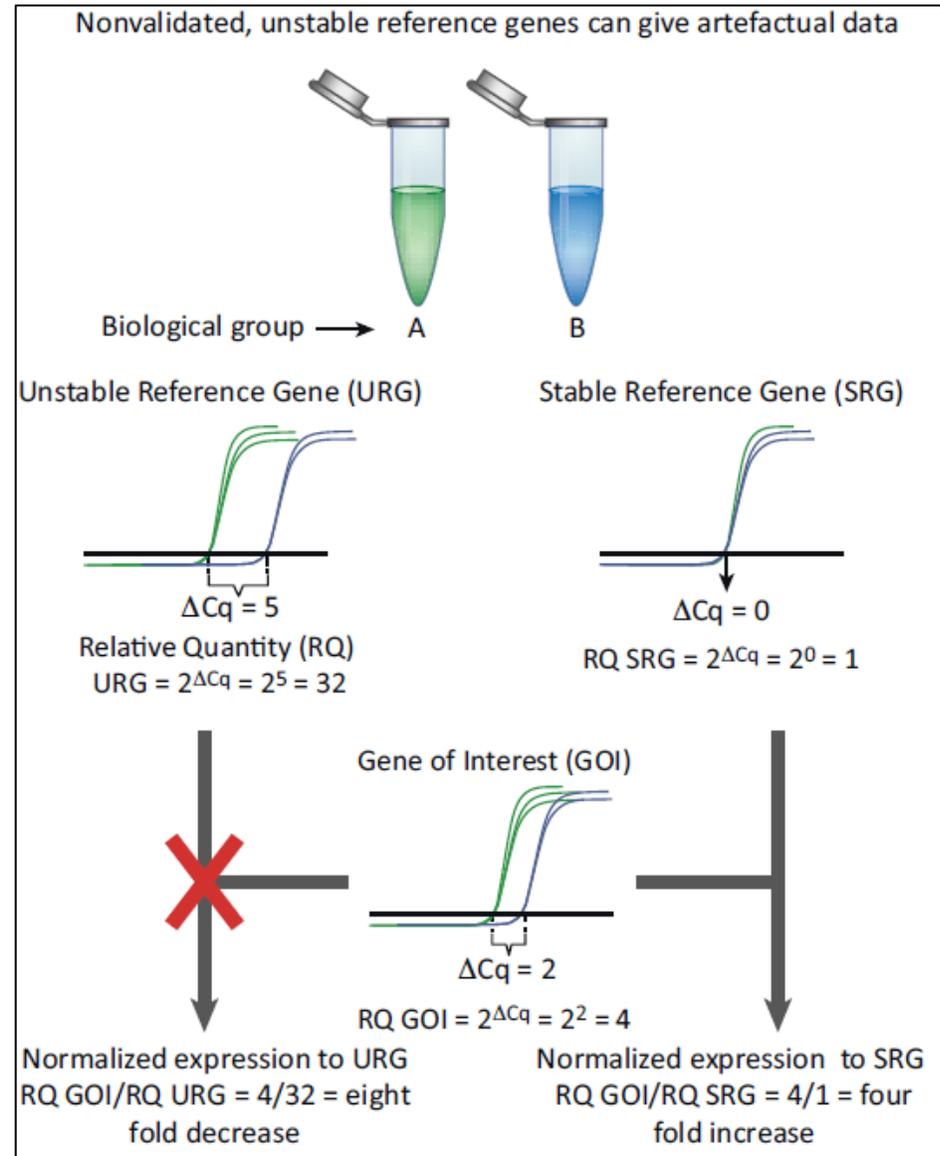
× Cq值越小灵敏度越高?

✓ 只根据CQ很难看出灵敏度，因为染料浓度、阈值调节都跟CQ有关，关键要看梯度稀释能检测到的最低稀释样品



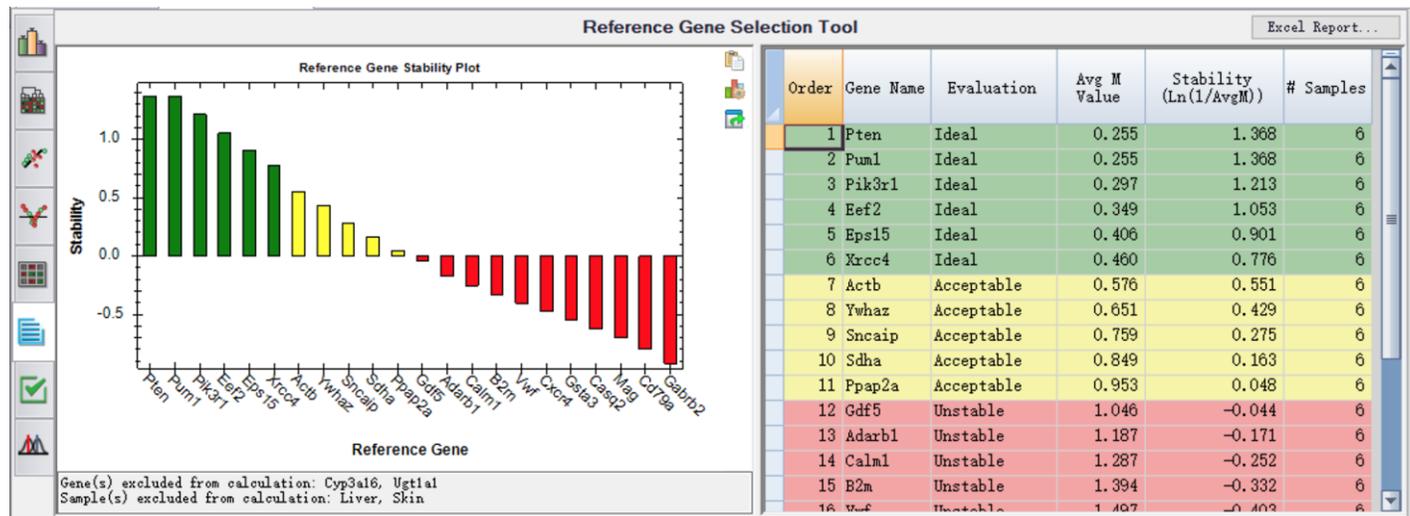
内参基因

- 选择正确的内参基因对于qPCR实验是必不可少的
- 由于生物系统的复杂性，没有任何一个内参基因对于所有的实验都是适用的。
- 正确的内参基因必须保证在实验系统中**恒定表达**（通常是组织特异的）。
- 使用未经验证的**单内参基因将导致明显的偏差** (25%的例子中这种偏差超过3倍，而10%的例子中多达6倍)
- 使用**通过验证的多内参基因**作为校正子是最适当且普遍适用的校正方法。



CFX Maestro的内参筛选功能

Justification of number and choice of reference genes				E
	Gene a	Gene b	Log(a/b)	$V_{a,b}$
Sample 1	a_1	b_1	$\text{Log}(a_1/b_1)$	Standard deviation $V_{a,b}$
Sample 2	a_2	b_2	$\text{Log}(a_2/b_2)$	
Sample 3	a_3	b_3	$\text{Log}(a_3/b_3)$	
.....	
Sample n	a_n	b_n	$\text{Log}(a_n/b_n)$	



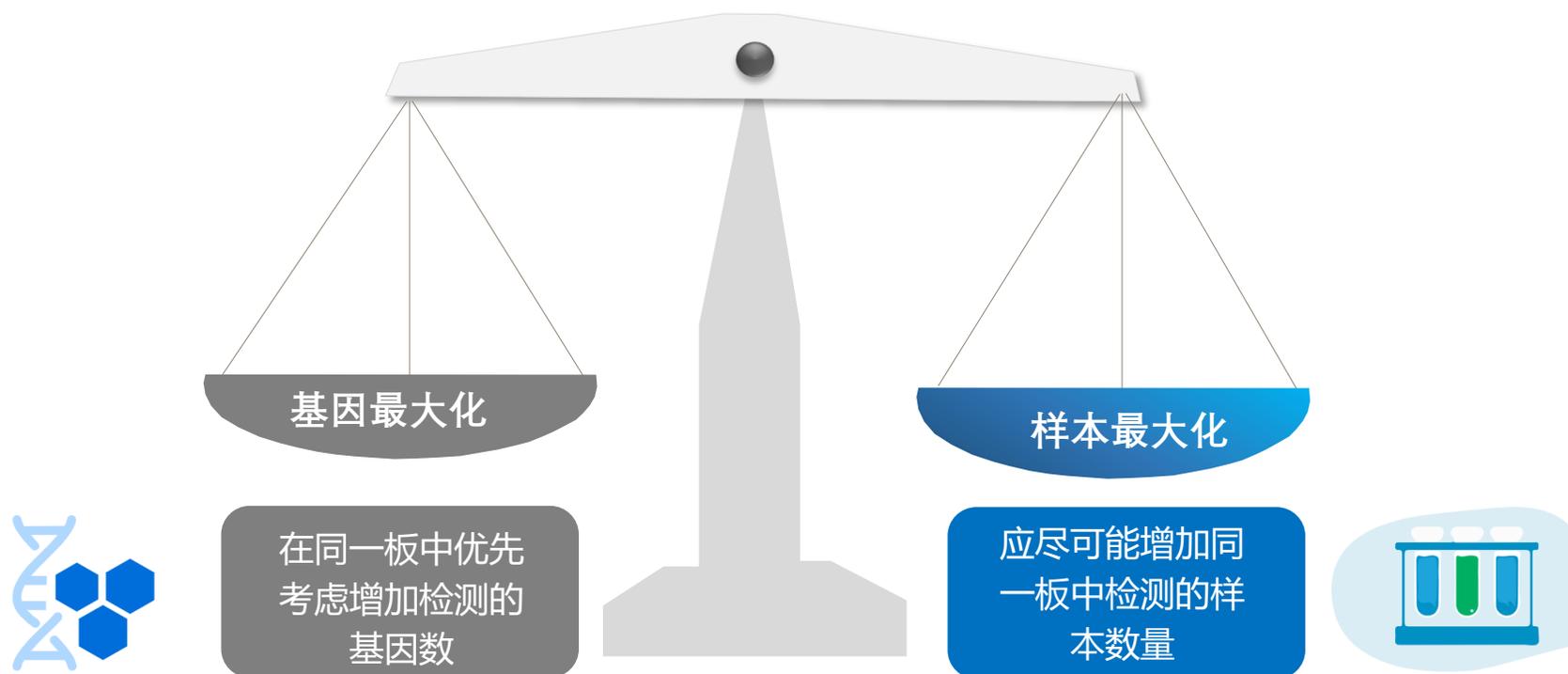
- 成对变异 (即两个备选内参基因之间)
 - $V_{a,b}, V_{a,c}, V_{a,d}, \dots, V_{a,m}$
- M值即该内参基因所有成对变异v的平均值
 - $M_a = (V_{a,b} + V_{a,c} + V_{a,d} + \dots + V_{a,m}) / m$
- M越小, 内参基因表达越稳定
- 多数情况下, 2-3个内参基因有助于提高数据的可靠性

CFX Maestro 软件自动筛选某研究的最适内参基因

- Ideal (Green): 可任意选择, 用作本研究的内参基因
- Acceptable (Yellow): 选择至少3个或更多内参基因用于该研究.
- Unstable (Red): 均不可用作本研究的内参基因

布板策略

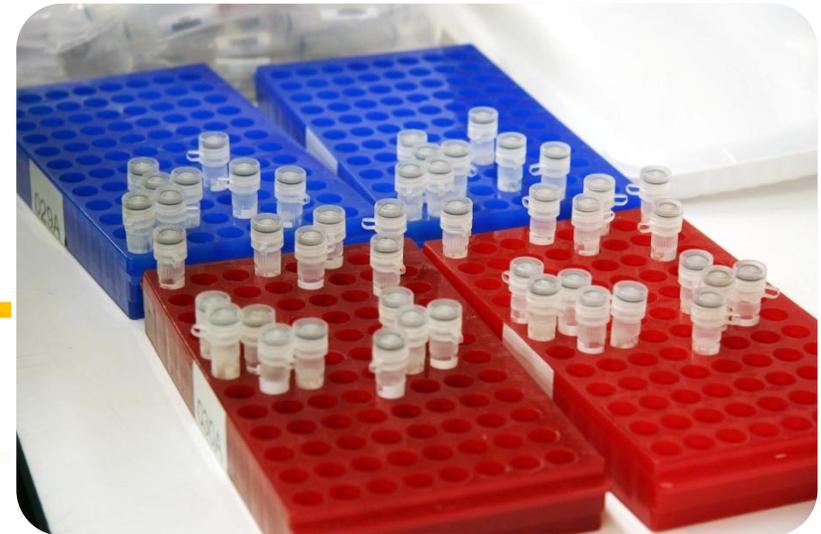
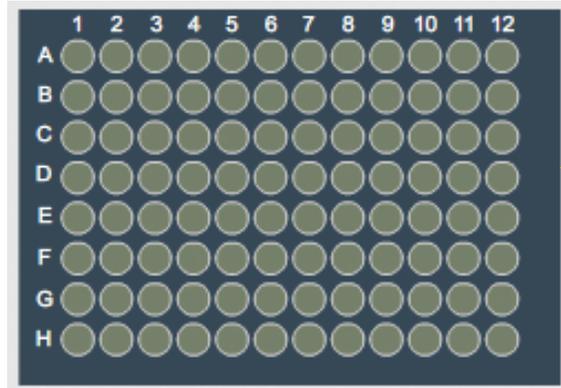
检测基因的数量和检测样品的数量较多时，怎么布板？



- 在使用相对定量法分析基因表达时，**采用样本最大化的布局最合理**，也最方便实验人员进行操作。
- 如果一个基因的所有样本不能在同一板内进行分析时，应采用1个相同的样品进行板间校正，以消除板间偏差。

布板策略

例如有一个基因表达分析实验，包括4个不同基因 (Actb, GAPDH, P53, EGFR)以及30个不同的cDNA样品。
两种样品检测布局策略: Gene maximization and Sample maximization



布板策略

样本最大化

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk-1 Actb	Unk-1 Actb	Unk-1 Actb	Unk-9 Actb	Unk-9 Actb	Unk-9 Actb	Unk-17 Actb	Unk-17 Actb	Unk-17 Actb	Unk-25 Actb	Unk-25 Actb	Unk-25 Actb
B	Unk-2 Actb	Unk-2 Actb	Unk-2 Actb	Unk-10 Actb	Unk-10 Actb	Unk-10 Actb	Unk-18 Actb	Unk-18 Actb	Unk-18 Actb	Unk-26 Actb	Unk-26 Actb	Unk-26 Actb
C	Unk-3 Actb	Unk-3 Actb	Unk-3 Actb	Unk-11 Actb	Unk-11 Actb	Unk-11 Actb	Unk-19 Actb	Unk-19 Actb	Unk-19 Actb	Unk-27 Actb	Unk-27 Actb	Unk-27 Actb
D	Unk-4 Actb	Unk-4 Actb	Unk-4 Actb	Unk-12 Actb	Unk-12 Actb	Unk-12 Actb	Unk-20 Actb	Unk-20 Actb	Unk-20 Actb	Unk-28 Actb	Unk-28 Actb	Unk-28 Actb
E	Unk-5 Actb	Unk-5 Actb	Unk-5 Actb	Unk-13 Actb	Unk-13 Actb	Unk-13 Actb	Unk-21 Actb	Unk-21 Actb	Unk-21 Actb	Unk-29 Actb	Unk-29 Actb	Unk-29 Actb
F	Unk-6 Actb	Unk-6 Actb	Unk-6 Actb	Unk-14 Actb	Unk-14 Actb	Unk-14 Actb	Unk-22 Actb	Unk-22 Actb	Unk-22 Actb	Unk-30 Actb	Unk-30 Actb	Unk-30 Actb
G	Unk-7 Actb	Unk-7 Actb	Unk-7 Actb	Unk-15 Actb	Unk-15 Actb	Unk-15 Actb	Unk-23 Actb	Unk-23 Actb	Unk-23 Actb	NTC	NTC	NTC
H	Unk-8 Actb	Unk-8 Actb	Unk-8 Actb	Unk-16 Actb	Unk-16 Actb	Unk-16 Actb	Unk-24 Actb	Unk-24 Actb	Unk-24 Actb			

Actb

Good DATA

GAPDH

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk-1 GAPDH	Unk-1 GAPDH	Unk-1 GAPDH	Unk-9 GAPDH	Unk-9 GAPDH	Unk-9 GAPDH	Unk-17 GAPDH	Unk-17 GAPDH	Unk-17 GAPDH	Unk-25 GAPDH	Unk-25 GAPDH	Unk-25 GAPDH
B	Unk-2 GAPDH	Unk-2 GAPDH	Unk-2 GAPDH	Unk-10 GAPDH	Unk-10 GAPDH	Unk-10 GAPDH	Unk-18 GAPDH	Unk-18 GAPDH	Unk-18 GAPDH	Unk-26 GAPDH	Unk-26 GAPDH	Unk-26 GAPDH
C	Unk-3 GAPDH	Unk-3 GAPDH	Unk-3 GAPDH	Unk-11 GAPDH	Unk-11 GAPDH	Unk-11 GAPDH	Unk-19 GAPDH	Unk-19 GAPDH	Unk-19 GAPDH	Unk-27 GAPDH	Unk-27 GAPDH	Unk-27 GAPDH
D	Unk-4 GAPDH	Unk-4 GAPDH	Unk-4 GAPDH	Unk-12 GAPDH	Unk-12 GAPDH	Unk-12 GAPDH	Unk-20 GAPDH	Unk-20 GAPDH	Unk-20 GAPDH	Unk-28 GAPDH	Unk-28 GAPDH	Unk-28 GAPDH
E	Unk-5 GAPDH	Unk-5 GAPDH	Unk-5 GAPDH	Unk-13 GAPDH	Unk-13 GAPDH	Unk-13 GAPDH	Unk-21 GAPDH	Unk-21 GAPDH	Unk-21 GAPDH	Unk-29 GAPDH	Unk-29 GAPDH	Unk-29 GAPDH
F	Unk-6 GAPDH	Unk-6 GAPDH	Unk-6 GAPDH	Unk-14 GAPDH	Unk-14 GAPDH	Unk-14 GAPDH	Unk-22 GAPDH	Unk-22 GAPDH	Unk-22 GAPDH	Unk-30 GAPDH	Unk-30 GAPDH	Unk-30 GAPDH
G	Unk-7 GAPDH	Unk-7 GAPDH	Unk-7 GAPDH	Unk-15 GAPDH	Unk-15 GAPDH	Unk-15 GAPDH	Unk-23 GAPDH	Unk-23 GAPDH	Unk-23 GAPDH	NTC	NTC	NTC
H	Unk-8 GAPDH	Unk-8 GAPDH	Unk-8 GAPDH	Unk-16 GAPDH	Unk-16 GAPDH	Unk-16 GAPDH	Unk-24 GAPDH	Unk-24 GAPDH	Unk-24 GAPDH			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk-1 P53	Unk-1 P53	Unk-1 P53	Unk-9 P53	Unk-9 P53	Unk-9 P53	Unk-17 P53	Unk-17 P53	Unk-17 P53	Unk-25 P53	Unk-25 P53	Unk-25 P53
B	Unk-2 P53	Unk-2 P53	Unk-2 P53	Unk-10 P53	Unk-10 P53	Unk-10 P53	Unk-18 P53	Unk-18 P53	Unk-18 P53	Unk-26 P53	Unk-26 P53	Unk-26 P53
C	Unk-3 P53	Unk-3 P53	Unk-3 P53	Unk-11 P53	Unk-11 P53	Unk-11 P53	Unk-19 P53	Unk-19 P53	Unk-19 P53	Unk-27 P53	Unk-27 P53	Unk-27 P53
D	Unk-4 P53	Unk-4 P53	Unk-4 P53	Unk-12 P53	Unk-12 P53	Unk-12 P53	Unk-20 P53	Unk-20 P53	Unk-20 P53	Unk-28 P53	Unk-28 P53	Unk-28 P53
E	Unk-5 P53	Unk-5 P53	Unk-5 P53	Unk-13 P53	Unk-13 P53	Unk-13 P53	Unk-21 P53	Unk-21 P53	Unk-21 P53	Unk-29 P53	Unk-29 P53	Unk-29 P53
F	Unk-6 P53	Unk-6 P53	Unk-6 P53	Unk-14 P53	Unk-14 P53	Unk-14 P53	Unk-22 P53	Unk-22 P53	Unk-22 P53	Unk-30 P53	Unk-30 P53	Unk-30 P53
G	Unk-7 P53	Unk-7 P53	Unk-7 P53	Unk-15 P53	Unk-15 P53	Unk-15 P53	Unk-23 P53	Unk-23 P53	Unk-23 P53	NTC	NTC	NTC
H	Unk-8 P53	Unk-8 P53	Unk-8 P53	Unk-16 P53	Unk-16 P53	Unk-16 P53	Unk-24 P53	Unk-24 P53	Unk-24 P53			

P53

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk-1 EGFR	Unk-1 EGFR	Unk-1 EGFR	Unk-9 EGFR	Unk-9 EGFR	Unk-9 EGFR	Unk-17 EGFR	Unk-17 EGFR	Unk-17 EGFR	Unk-25 EGFR	Unk-25 EGFR	Unk-25 EGFR
B	Unk-2 EGFR	Unk-2 EGFR	Unk-2 EGFR	Unk-10 EGFR	Unk-10 EGFR	Unk-10 EGFR	Unk-18 EGFR	Unk-18 EGFR	Unk-18 EGFR	Unk-26 EGFR	Unk-26 EGFR	Unk-26 EGFR
C	Unk-3 EGFR	Unk-3 EGFR	Unk-3 EGFR	Unk-11 EGFR	Unk-11 EGFR	Unk-11 EGFR	Unk-19 EGFR	Unk-19 EGFR	Unk-19 EGFR	Unk-27 EGFR	Unk-27 EGFR	Unk-27 EGFR
D	Unk-4 EGFR	Unk-4 EGFR	Unk-4 EGFR	Unk-12 EGFR	Unk-12 EGFR	Unk-12 EGFR	Unk-20 EGFR	Unk-20 EGFR	Unk-20 EGFR	Unk-28 EGFR	Unk-28 EGFR	Unk-28 EGFR
E	Unk-5 EGFR	Unk-5 EGFR	Unk-5 EGFR	Unk-13 EGFR	Unk-13 EGFR	Unk-13 EGFR	Unk-21 EGFR	Unk-21 EGFR	Unk-21 EGFR	Unk-29 EGFR	Unk-29 EGFR	Unk-29 EGFR
F	Unk-6 EGFR	Unk-6 EGFR	Unk-6 EGFR	Unk-14 EGFR	Unk-14 EGFR	Unk-14 EGFR	Unk-22 EGFR	Unk-22 EGFR	Unk-22 EGFR	Unk-30 EGFR	Unk-30 EGFR	Unk-30 EGFR
G	Unk-7 EGFR	Unk-7 EGFR	Unk-7 EGFR	Unk-15 EGFR	Unk-15 EGFR	Unk-15 EGFR	Unk-23 EGFR	Unk-23 EGFR	Unk-23 EGFR	NTC	NTC	NTC
H	Unk-8 EGFR	Unk-8 EGFR	Unk-8 EGFR	Unk-16 EGFR	Unk-16 EGFR	Unk-16 EGFR	Unk-24 EGFR	Unk-24 EGFR	Unk-24 EGFR			

EGFR

布板策略

基因最大化

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Unk Actb 1	Unk Actb 1	Unk Actb 1	Unk Actb 3	Unk Actb 3	Unk Actb 3	Unk Actb 5	Unk Actb 5	Unk Actb 5	Unk Actb 7	Unk Actb 7	Unk Actb 7	A	Unk Actb 8	Unk Actb 8	Unk Actb 8	Unk Actb 10	Unk Actb 10	Unk Actb 10	Unk Actb 12	Unk Actb 12	Unk Actb 12	Unk Actb 14	Unk Actb 14	Unk Actb 14	
B	Unk GAPDH 1	Unk GAPDH 1	Unk GAPDH 1	Unk GAPDH 3	Unk GAPDH 3	Unk GAPDH 3	Unk GAPDH 5	Unk GAPDH 5	Unk GAPDH 5	Unk GAPDH 7	Unk GAPDH 7	Unk GAPDH 7	B	Unk GAPDH 8	Unk GAPDH 8	Unk GAPDH 8	Unk GAPDH 10	Unk GAPDH 10	Unk GAPDH 10	Unk GAPDH 12	Unk GAPDH 12	Unk GAPDH 12	Unk GAPDH 14	Unk GAPDH 14	Unk GAPDH 14	
C	Unk P53 1	Unk P53 1	Unk P53 1	Unk P53 3	Unk P53 3	Unk P53 3	Unk P53 5	Unk P53 5	Unk P53 5	Unk P53 7	Unk P53 7	Unk P53 7	C	Unk P53 8	Unk P53 8	Unk P53 8	Unk P53 10	Unk P53 10	Unk P53 10	Unk P53 12	Unk P53 12	Unk P53 12	Unk P53 14	Unk P53 14	Unk P53 14	
D	Unk EGFR 1	Unk EGFR 1	Unk EGFR 3	Unk EGFR 3	Unk EGFR 3	Unk EGFR 5	Unk EGFR 5	Unk EGFR 5	Unk EGFR 7	Unk EGFR 7	Unk EGFR 7	Unk EGFR 7	D	Unk EGFR 10	Unk EGFR 10	Unk EGFR 10	Unk EGFR 12	Unk EGFR 12	Unk EGFR 12	Unk EGFR 14	Unk EGFR 14	Unk EGFR 14	Unk EGFR 14	Unk EGFR 14	Unk EGFR 14	
E	Unk Actb 2	Unk Actb 2	Unk Actb 2	Unk Actb 4	Unk Actb 4	Unk Actb 4	Unk Actb 6	Unk Actb 6	Unk Actb 6	Unk Actb 8	Unk Actb 8	Unk Actb 8	E	Unk Actb 11	Unk Actb 11	Unk Actb 11	Unk Actb 13	Unk Actb 13	Unk Actb 13	Unk Actb 15	Unk Actb 15	Unk Actb 15	Unk Actb 17	Unk Actb 17	Unk Actb 17	
F	Unk GAPDH 2	Unk GAPDH 2	Unk GAPDH 2	Unk GAPDH 4	Unk GAPDH 4	Unk GAPDH 4	Unk GAPDH 6	Unk GAPDH 6	Unk GAPDH 6	Unk GAPDH 8	Unk GAPDH 8	Unk GAPDH 8	F	Unk GAPDH 11	Unk GAPDH 11	Unk GAPDH 11	Unk GAPDH 13	Unk GAPDH 13	Unk GAPDH 13	Unk GAPDH 15	Unk GAPDH 15	Unk GAPDH 15	Unk GAPDH 17	Unk GAPDH 17	Unk GAPDH 17	
G	Unk P53 2	Unk P53 2	Unk P53 2	Unk P53 4	Unk P53 4	Unk P53 4	Unk P53 6	Unk P53 6	Unk P53 6	Unk P53 8	Unk P53 8	Unk P53 8	G	Unk P53 11	Unk P53 11	Unk P53 11	Unk P53 13	Unk P53 13	Unk P53 13	Unk P53 15	Unk P53 15	Unk P53 15	Unk P53 17	Unk P53 17	Unk P53 17	
H	Unk EGFR 2	Unk EGFR 2	Unk EGFR 2	Unk EGFR 4	Unk EGFR 4	Unk EGFR 4	Unk EGFR 6	Unk EGFR 6	Unk EGFR 6	Unk EGFR 8	Unk EGFR 8	Unk EGFR 8	H	Unk EGFR 11	Unk EGFR 11	Unk EGFR 11	Unk EGFR 13	Unk EGFR 13	Unk EGFR 13	Unk EGFR 15	Unk EGFR 15	Unk EGFR 15	Unk EGFR 17	Unk EGFR 17	Unk EGFR 17	
A										Unk Actb 29	Unk Actb 29	Unk Actb 29	A													
B										Unk GAPDH 29	Unk GAPDH 29	Unk GAPDH 29	B													
C										Unk P53 29	Unk P53 29	Unk P53 29	C													
D										Unk EGFR 29	Unk EGFR 29	Unk EGFR 29	D													
E										Unk Actb 30	Unk Actb 30	Unk Actb 30	E													
F										Unk GAPDH 30	Unk GAPDH 30	Unk GAPDH 30	F													
G										Unk P53 30	Unk P53 30	Unk P53 30	G													
H										Unk EGFR 30	Unk EGFR 30	Unk EGFR 30	H													
A	Unk Actb 15	Unk Actb 15	Unk Actb 15	Unk Actb 17	Unk Actb 17	Unk Actb 17	Unk Actb 19	Unk Actb 19	Unk Actb 19	Unk Actb 21	Unk Actb 21	Unk Actb 21	A	Unk Actb 22	Unk Actb 22	Unk Actb 22	Unk Actb 24	Unk Actb 24	Unk Actb 24	Unk Actb 26	Unk Actb 26	Unk Actb 26	Unk Actb 28	Unk Actb 28	Unk Actb 28	
B	Unk GAPDH 15	Unk GAPDH 15	Unk GAPDH 15	Unk GAPDH 17	Unk GAPDH 17	Unk GAPDH 17	Unk GAPDH 19	Unk GAPDH 19	Unk GAPDH 19	Unk GAPDH 21	Unk GAPDH 21	Unk GAPDH 21	B	Unk GAPDH 23	Unk GAPDH 23	Unk GAPDH 23	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 27	Unk GAPDH 27	Unk GAPDH 27	Unk GAPDH 29	Unk GAPDH 29	Unk GAPDH 29	
C	Unk P53 15	Unk P53 15	Unk P53 15	Unk P53 17	Unk P53 17	Unk P53 17	Unk P53 19	Unk P53 19	Unk P53 19	Unk P53 21	Unk P53 21	Unk P53 21	C	Unk P53 23	Unk P53 23	Unk P53 23	Unk P53 25	Unk P53 25	Unk P53 25	Unk P53 27	Unk P53 27	Unk P53 27	Unk P53 29	Unk P53 29	Unk P53 29	
D	Unk EGFR 15	Unk EGFR 15	Unk EGFR 15	Unk EGFR 17	Unk EGFR 17	Unk EGFR 17	Unk EGFR 19	Unk EGFR 19	Unk EGFR 19	Unk EGFR 21	Unk EGFR 21	Unk EGFR 21	D	Unk EGFR 23	Unk EGFR 23	Unk EGFR 23	Unk EGFR 25	Unk EGFR 25	Unk EGFR 25	Unk EGFR 27	Unk EGFR 27	Unk EGFR 27	Unk EGFR 29	Unk EGFR 29	Unk EGFR 29	
E	Unk Actb 16	Unk Actb 16	Unk Actb 16	Unk Actb 18	Unk Actb 18	Unk Actb 18	Unk Actb 20	Unk Actb 20	Unk Actb 20	Unk Actb 22	Unk Actb 22	Unk Actb 22	E	Unk Actb 23	Unk Actb 23	Unk Actb 23	Unk Actb 25	Unk Actb 25	Unk Actb 25	Unk Actb 27	Unk Actb 27	Unk Actb 27	Unk Actb 29	Unk Actb 29	Unk Actb 29	
F	Unk GAPDH 16	Unk GAPDH 16	Unk GAPDH 16	Unk GAPDH 18	Unk GAPDH 18	Unk GAPDH 18	Unk GAPDH 20	Unk GAPDH 20	Unk GAPDH 20	Unk GAPDH 22	Unk GAPDH 22	Unk GAPDH 22	F	Unk GAPDH 23	Unk GAPDH 23	Unk GAPDH 23	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 27	Unk GAPDH 27	Unk GAPDH 27	Unk GAPDH 29	Unk GAPDH 29	Unk GAPDH 29	
G	Unk P53 16	Unk P53 16	Unk P53 16	Unk P53 18	Unk P53 18	Unk P53 18	Unk P53 20	Unk P53 20	Unk P53 20	Unk P53 22	Unk P53 22	Unk P53 22	G	Unk P53 23	Unk P53 23	Unk P53 23	Unk P53 25	Unk P53 25	Unk P53 25	Unk P53 27	Unk P53 27	Unk P53 27	Unk P53 29	Unk P53 29	Unk P53 29	
H	Unk EGFR 16	Unk EGFR 16	Unk EGFR 16	Unk EGFR 18	Unk EGFR 18	Unk EGFR 18	Unk EGFR 20	Unk EGFR 20	Unk EGFR 20	Unk EGFR 22	Unk EGFR 22	Unk EGFR 22	H	Unk EGFR 23	Unk EGFR 23	Unk EGFR 23	Unk EGFR 25	Unk EGFR 25	Unk EGFR 25	Unk EGFR 27	Unk EGFR 27	Unk EGFR 27	Unk EGFR 29	Unk EGFR 29	Unk EGFR 29	

BAD DATA

Without inter-run calibration!

批间校正

什么是批间校正 (inter-run calibration) ?

- 修正相同基因在不同qPCR检测批次之间的C_q值差异的数据处理过程

为什么需要inter-run calibration?

- qPCR仪器通量有限, 必须多次运行
- 随机误差 (PCR block, lamp, filters, detectors, and so on) ,
- 数据分析设置 (扩增曲线拟合、基线扣除、阈值线设置) ,
- 试剂耗材的批间差 (反复冻融, 荧光素衰减等)

如何修正批间差 (with inter-run calibrators, IRCs)?

- 在各运行批次间分别测试1个或多组完全相同的样本。
- 这些相同的样本在不同Plate上的C_q值会不一样

How does it work?

- For example.....

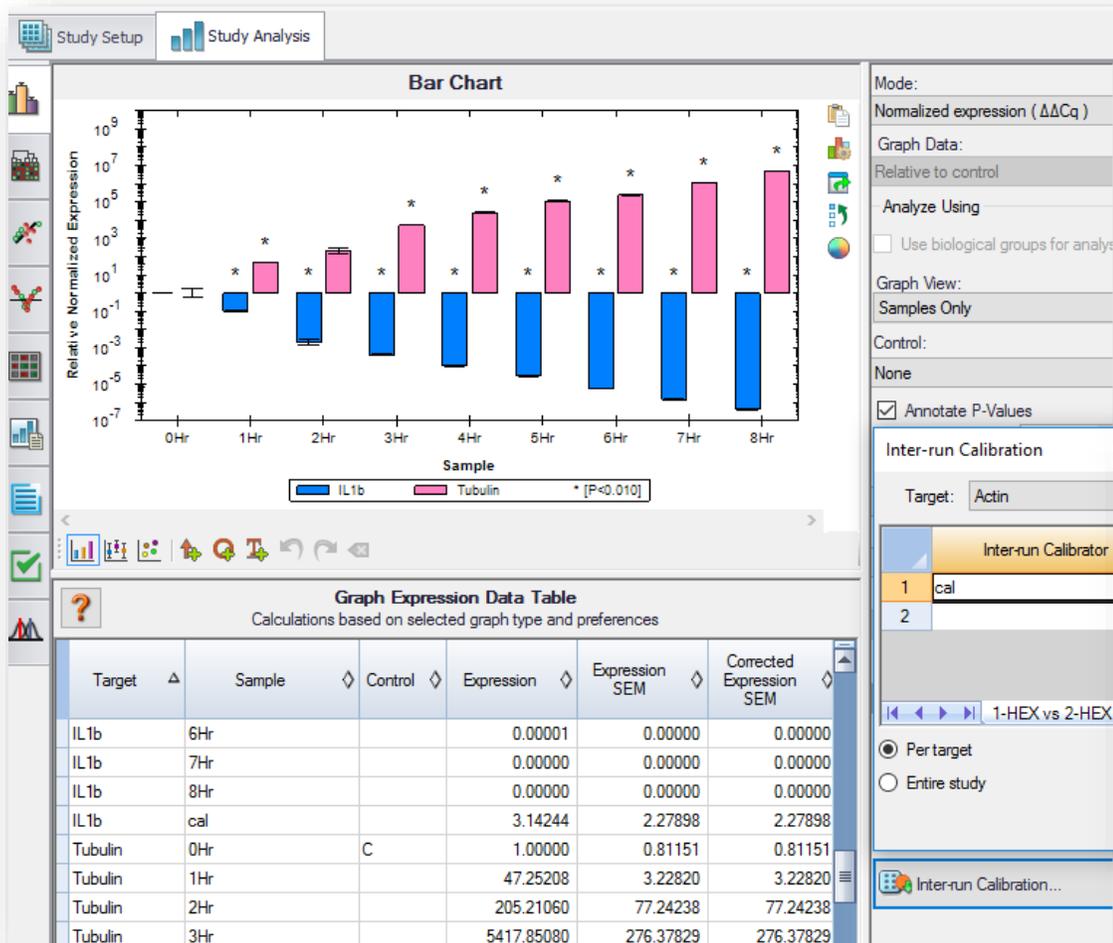
批间校正

基因最大化+批间校正

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk Actb 1	Unk Actb 1	Unk Actb 1	Unk Actb 3	Unk Actb 3	Unk Actb 3	Unk Actb 5	Unk Actb 5	Unk Actb 5	Unk Actb 7	Unk Actb 7	Unk Actb 7	A	Unk Actb 8	Unk Actb 8	Unk Actb 8	Unk Actb 10	Unk Actb 10	Unk Actb 10	Unk Actb 12	Unk Actb 12	Unk Actb 12	Unk Actb 12	Unk Actb 12	
B	Unk GAPDH 1	Unk GAPDH 1	Unk GAPDH 1	Unk GAPDH 3	Unk GAPDH 3	Unk GAPDH 3	Unk GAPDH 5	Unk GAPDH 5	Unk GAPDH 5	Unk GAPDH 7	Unk GAPDH 7	Unk GAPDH 7	B	Unk GAPDH 8	Unk GAPDH 8	Unk GAPDH 8	Unk GAPDH 10	Unk GAPDH 10	Unk GAPDH 10	Unk GAPDH 12	Unk GAPDH 12	Unk GAPDH 12	Unk GAPDH 12	Unk GAPDH 12	Unk GAPDH 12
C	Unk P53 1	Unk P53 1	Unk P53 1	Unk P53 3	Unk P53 3	Unk P53 3	Unk P53 5	Unk P53 5	Unk P53 5	Unk P53 7	Unk P53 7	Unk P53 7	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	Unk EGFR 1	Unk EGFR 1	Unk EGFR 1	Unk EGFR 3	Unk EGFR 3	Unk EGFR 3	Unk EGFR 5	Unk EGFR 5	Unk EGFR 5	Unk EGFR 7	Unk EGFR 7	Unk EGFR 7	A	Unk Actb 26	Unk Actb 26	Unk Actb 26	Unk Actb 28	Unk Actb 28	Unk Actb 28	Unk Actb 30	Unk Actb 30	Unk Actb 30			
E	Unk Actb 2	Unk Actb 2	Unk Actb 2	Unk Actb 4	Unk Actb 4	Unk Actb 4	Unk Actb 6	Unk Actb 6	Unk Actb 6	Unk Actb 7	Unk Actb 7	Unk Actb 7	B	Unk GAPDH 26	Unk GAPDH 26	Unk GAPDH 26	Unk GAPDH 28	Unk GAPDH 28	Unk GAPDH 28	Unk GAPDH 30	Unk GAPDH 30	Unk GAPDH 30			
F	Unk GAPDH 2	Unk GAPDH 2	Unk GAPDH 2	Unk GAPDH 4	Unk GAPDH 4	Unk GAPDH 4	Unk GAPDH 6	Unk GAPDH 6	Unk GAPDH 6	Unk GAPDH 7	Unk GAPDH 7	Unk GAPDH 7	C	Unk P53 26	Unk P53 26	Unk P53 26	Unk P53 28	Unk P53 28	Unk P53 28	Unk P53 30	Unk P53 30	Unk P53 30			
G	Unk P53 2	Unk P53 2	Unk P53 2	Unk P53 4	Unk P53 4	Unk P53 4	Unk P53 6	Unk P53 6	Unk P53 6	Unk P53 7	Unk P53 7	Unk P53 7	D	Unk EGFR 26	Unk EGFR 26	Unk EGFR 26	Unk EGFR 28	Unk EGFR 28	Unk EGFR 28	Unk EGFR 30	Unk EGFR 30	Unk EGFR 30			
H	Unk EGFR 2	Unk EGFR 2	Unk EGFR 2	Unk EGFR 4	Unk EGFR 4	Unk EGFR 4	Unk EGFR 6	Unk EGFR 6	Unk EGFR 6	Unk EGFR 7	Unk EGFR 7	Unk EGFR 7	E	Unk Actb 27	Unk Actb 27	Unk Actb 27	Unk Actb 29	Unk Actb 29	Unk Actb 29	Unk Actb 31	Unk Actb 31	Unk Actb 31	NTC	NTC	NTC
													G	Unk GAPDH 27	Unk GAPDH 27	Unk GAPDH 27	Unk GAPDH 29	Unk GAPDH 29	Unk GAPDH 29	Unk GAPDH 31	Unk GAPDH 31	Unk GAPDH 31	NTC	NTC	NTC
													H	Unk EGFR 27	Unk EGFR 27	Unk EGFR 27	Unk EGFR 29	Unk EGFR 29	Unk EGFR 29	Unk EGFR 31	Unk EGFR 31	Unk EGFR 31	NTC	NTC	NTC
A	Unk Actb 14	Unk Actb 14	Unk Actb 14	Unk Actb 16	Unk Actb 16	Unk Actb 16	Unk Actb 18	Unk Actb 18	Unk Actb 18	Unk Actb 20	Unk Actb 20	Unk Actb 20	B	Unk GAPDH 20	Unk GAPDH 20	Unk GAPDH 20	Unk GAPDH 22	Unk GAPDH 22	Unk GAPDH 22	Unk GAPDH 24	Unk GAPDH 24	Unk GAPDH 24	Unk GAPDH 24	Unk GAPDH 24	Unk GAPDH 24
B	Unk GAPDH 14	Unk GAPDH 14	Unk GAPDH 14	Unk GAPDH 16	Unk GAPDH 16	Unk GAPDH 16	Unk GAPDH 18	Unk GAPDH 18	Unk GAPDH 18	Unk GAPDH 20	Unk GAPDH 20	Unk GAPDH 20	C	Unk P53 20	Unk P53 20	Unk P53 20	Unk P53 22	Unk P53 22	Unk P53 22	Unk P53 24	Unk P53 24	Unk P53 24	Unk P53 24	Unk P53 24	Unk P53 24
C	Unk P53 14	Unk P53 14	Unk P53 14	Unk P53 16	Unk P53 16	Unk P53 16	Unk P53 18	Unk P53 18	Unk P53 18	Unk P53 20	Unk P53 20	Unk P53 20	D	Unk EGFR 20	Unk EGFR 20	Unk EGFR 20	Unk EGFR 22	Unk EGFR 22	Unk EGFR 22	Unk EGFR 24	Unk EGFR 24	Unk EGFR 24	Unk EGFR 24	Unk EGFR 24	Unk EGFR 24
D	Unk EGFR 14	Unk EGFR 14	Unk EGFR 14	Unk EGFR 16	Unk EGFR 16	Unk EGFR 16	Unk EGFR 18	Unk EGFR 18	Unk EGFR 18	Unk EGFR 20	Unk EGFR 20	Unk EGFR 20	E	Unk Actb 21	Unk Actb 21	Unk Actb 21	Unk Actb 23	Unk Actb 23	Unk Actb 23	Unk Actb 25	Unk Actb 25	Unk Actb 25	Unk Actb 25	Unk Actb 25	Unk Actb 25
E	Unk Actb 15	Unk Actb 15	Unk Actb 15	Unk Actb 17	Unk Actb 17	Unk Actb 17	Unk Actb 19	Unk Actb 19	Unk Actb 19	Unk Actb 21	Unk Actb 21	Unk Actb 21	F	Unk GAPDH 21	Unk GAPDH 21	Unk GAPDH 21	Unk GAPDH 23	Unk GAPDH 23	Unk GAPDH 23	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 25	Unk GAPDH 25
F	Unk GAPDH 15	Unk GAPDH 15	Unk GAPDH 15	Unk GAPDH 17	Unk GAPDH 17	Unk GAPDH 17	Unk GAPDH 19	Unk GAPDH 19	Unk GAPDH 19	Unk GAPDH 21	Unk GAPDH 21	Unk GAPDH 21	G	Unk P53 21	Unk P53 21	Unk P53 21	Unk P53 23	Unk P53 23	Unk P53 23	Unk P53 25	Unk P53 25	Unk P53 25	Unk P53 25	Unk P53 25	Unk P53 25
G	Unk P53 15	Unk P53 15	Unk P53 15	Unk P53 17	Unk P53 17	Unk P53 17	Unk P53 19	Unk P53 19	Unk P53 19	Unk P53 21	Unk P53 21	Unk P53 21	H	Unk EGFR 21	Unk EGFR 21	Unk EGFR 21	Unk EGFR 23	Unk EGFR 23	Unk EGFR 23	Unk EGFR 25	Unk EGFR 25	Unk EGFR 25	Unk EGFR 25	Unk EGFR 25	Unk EGFR 25
H	Unk EGFR 15	Unk EGFR 15	Unk EGFR 15	Unk EGFR 17	Unk EGFR 17	Unk EGFR 17	Unk EGFR 19	Unk EGFR 19	Unk EGFR 19	Unk EGFR 21	Unk EGFR 21	Unk EGFR 21													

Good DATA

CFX Maestro自动批间校正



CFX Maestro 自动识别并执行批间差校正
(inter-run-calibration)

Mode:
Normalized expression ($\Delta\Delta Cq$)

Graph Data:
Relative to control

Analyze Using
 Use biological groups for analysis

Graph View:
Samples Only

Control:
None

Annotate P-Values

Inter-run Calibration

Target: Actin

	Inter-run Calibrator	1-HEX	2-HEX	Cq Shift
1	cal	19.5505	22.5152	-2.9648
2		Average:		-2.9648

1-HEX vs 2-HEX | 1-HEX vs 3-HEX

Per target
 Entire study

OK Cancel

相对定量的计算方式



相对定量(Δ CT)

- 没有均一化
- 通过相同的加样量完成均一化

均一化基因表达($\Delta \Delta$ CT)

- 考虑到样本上样差异
- 通常以参考基因为均一化的标准
- 目标基因的相对量被参考基因的相对数所归一化



- 该程序避免了PCR扩增效率评估。
- 每个实验板上的每个基因都需要有标准曲线。
- 不需要已知浓度的标准品

2- $\Delta\Delta Cq$ 的变式

Description of normalization method

E

Comparative Cq Method

$E^{-\Delta Ct}$

No normalized,
equal loading of
samples

$2^{\Delta\Delta Cq}$
Livak Method¹

- Hypothesis of 100% PCR efficiency, 1 reference gene

$$NRQ = 2^{\Delta\Delta Cq}$$

Pfaffl Method²

- adjusted PCR efficiency, 1 reference gene

$$NRQ = \frac{E^{\Delta Cq, goi}}{E_{ref}^{\Delta Cq, ref}}$$

Vandesompele Method³

- adjusted PCR efficiency, multiple reference genes

$$NRQ = \frac{E^{\Delta Cq, goi}}{\sqrt[n]{\prod_i E_{ref}^{\Delta Cq, ref}}}$$



CFX Maestro Software provides all mathematical models.

均一化的必要性

Research

Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes

Jo Vandesompele, Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe and Frank Speleman

Address: Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital 1K5, De Pintelaan 185, B-9000 Ghent, Belgium.

Correspondence: Frank Speleman. E-mail: franki.speleman@rug.ac.be

Published: 18 June 2002

Genome **Biology** 2002, 3(7):research0034.1-0034.11

The electronic version of this article is the complete one and can be found online at <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034>

© 2002 Vandesompele et al., licensee BioMed Central Ltd
(Print ISSN 1465-6906; Online ISSN 1465-6914)

Received: 20 December 2001

Revised: 10 April 2002

Accepted: 7 May 2002

$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Cq, goi}}{\sqrt[n]{\prod_i E_{ref}^{\Delta Cq, ref}}}$$

多个参考基因RQ的几何平均数作为
Normalization factor, NF

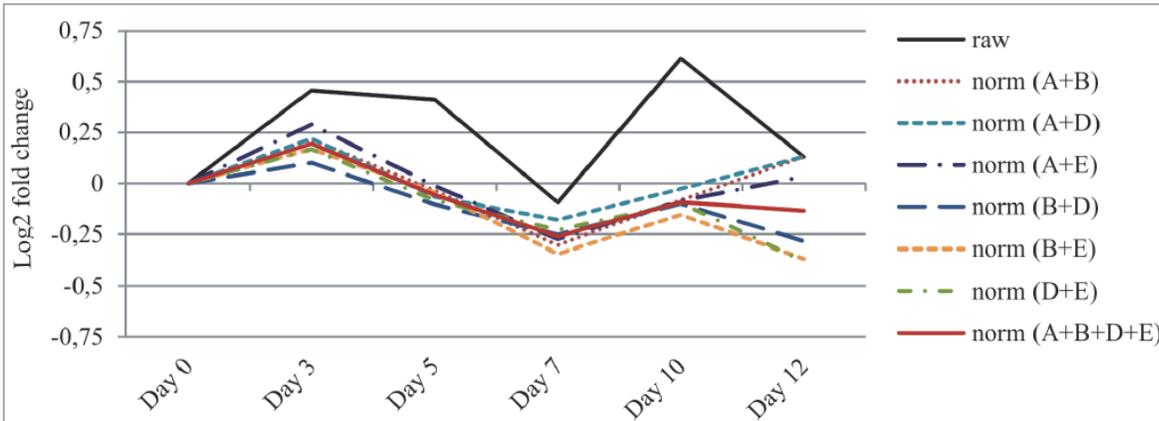
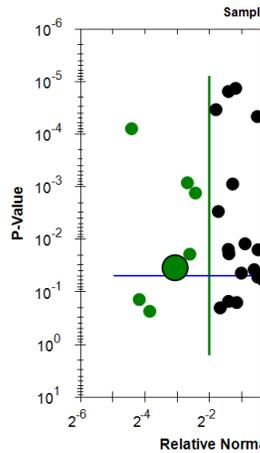


Fig 4. Effect of data normalization on mean Ref C transcript level.

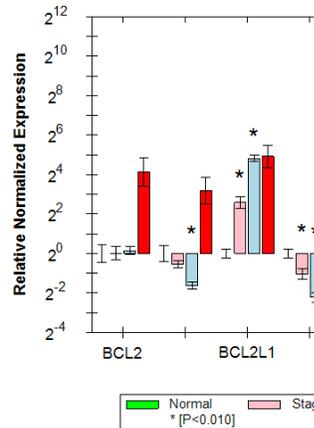
doi:10.1371/journal.pone.0118226.g004

- 单一参考基因可能会导致误差较大的均一化结果
 - 25%的情况误差3倍，10%的情况误差6.4倍，个别超过20倍
- 使用多个参考基因有助于获得更为准确的结果

CFX Maestro不同图表格式的导出



火山图：支持快速辨别具



柱形图：用标准化均值显
也可对您的数据标注P值以

Export Preview ✕

Sample

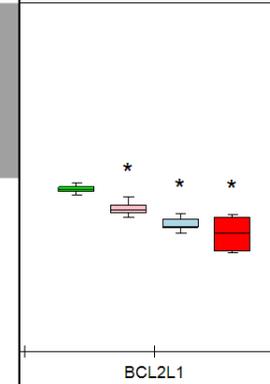
0Hr 1Hr 2Hr 3Hr 4Hr 5Hr 6Hr 7Hr 8Hr

IL1b Tubulin * [P<0.010]

Width: Pixels Resolution (dpi): Export

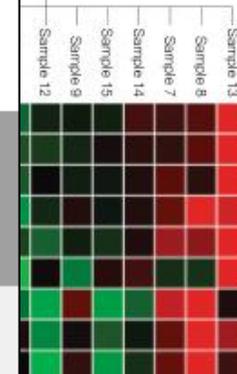
Height: Maintain Aspect Ratio Gray Scale Cancel

Size (w x h) in Inches: 3.263 x 1.647 Export Entire Chart Export Displayed View



Page IV * [P<0.050]

百分位值信息。



数据根据基因表达水

T检验

T检验是用于小样本（样本容量小于30）的两个正态总体平均值差异程度的检验方法。它是用T分布理论来推断差异发生的概率，从而判定两个平均数的差异是否显著。

T-tests 得出 p-values,对于检验水平 $\alpha=0.05$ 或 0.01

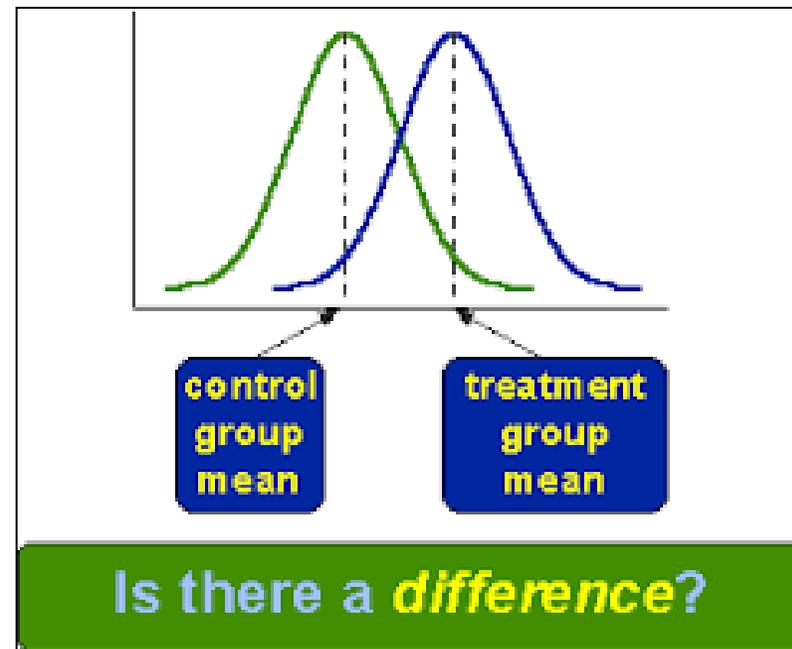
- $P > \alpha$, 不拒绝 H_0 , 无统计学差异
- $P < \alpha$, 接受 H_1 , 有统计学差异

应用t-检验的条件:

- ✓ 随机独立取样
- ✓ 数据满足正态分布
- ✓ 方差同质性检验通过

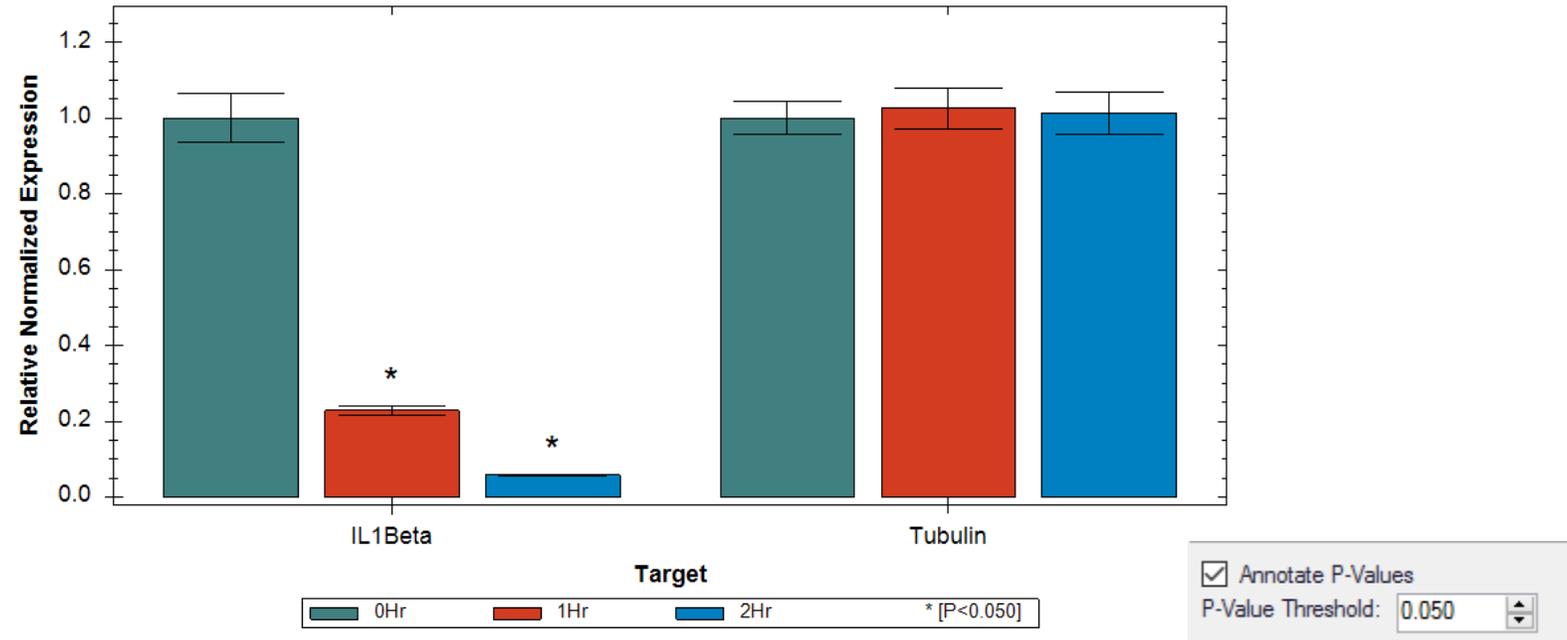
软件特点:

- 自动画图: 柱状图、箱线图、点图等
- 自动计算P值
- 自动标记显著样本
- 自动计算置信区间、标准误差、标准方差



$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

T检验



Target	Sample	Control	Expression	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM	P-Value
Tubulin	0Hr	C	1.00000	0.04264	0.04264	16.68	0.05035	N/A
Actin	1Hr		N/A	N/A	N/A	22.46	0.06808	0.982889
IL1Beta	1Hr		0.22884	0.01212	0.01218	13.87	0.04600	0.000183
Tubulin	1Hr		1.02605	0.05344	0.05344	16.63	0.04412	0.591433
Actin	2Hr		N/A	N/A	N/A	22.49	0.03384	0.994666
IL1Beta	2Hr		0.05796	0.00143	0.00155	15.95	0.01805	0.000081
Tubulin	2Hr		1.01360	0.05563	0.05563	16.68	0.07604	0.814774

CFX Maestro特有功能——方差分析 (ANOVA)

方差分析ANOVA: 又称为F-检验, 用于**两个及两个以上**样本均数差别的显著性检验。

- CFX Maestro提供单因素方差分析 (one-way ANOVA), 用于同一个自变量的多个总体均数 (多个数据集) 间的比较 (即观察一个因素)
- 方差分析首先是比较**各组间总的差异**, 如总差异有显著性, 再进行组间的**两两比较** (多重比较检验)

$$F = \frac{S_1^2/\sigma_1^2}{S_2^2/\sigma_2^2} \sim F(n_1-1, n_2-1)$$

应用ANOVA的条件:

1. 随机样本
2. 来自正态分布
3. 两均数比较时, 要求总体方差相当

软件特点:

- 自动计算是否符合正态分布
- 自动计算组间总差异P值、校正P值
- 自动计算组间两两差异P值
- 自动计算相对表达量比值与置信区间
- 自动给出显著性结果 YES/NO

例如: 用5种不同的药物处理小鼠 (5个处理组), 同时设置未处理组 (对照组), 观察Gene X在这6组小鼠中的表达量是否有差异。这里有一个自变量, 即处理方式, 可使用单因素ANOVA。

Target	Biological Groups	Count	P-Value	Normal	Error
Gene 1	Group 1	10	0.59462	Yes	
	Group 2	10	0.44579	Yes	
	Group 3	10	0.82601	Yes	
Gene 2	Group 1	10	0.90768	Yes	
	Group 2	10	0.51416	Yes	
	Group 3	10	0.77628	Yes	
Gene 3	Group 1	10	0.41335	Yes	
	Group 2	10	0.43301	Yes	
	Group 3	10	0.35485	Yes	

Target	df	P-Value ANOVA	P-Value BH	Contrast	Ratio	Lower Bound (95%)	Upper Bound (95%)	P-Value Tukey	Significant
Gene 1	2	0.34649	0.34649	Group 1 - Group 2	0.47125	0.12834	1.7303	0.33805	No
				Group 1 - Group 3	0.57631	0.15696	2.1161	0.55223	No
				Group 2 - Group 3	1.22295	0.33307	4.4904	0.9223	No
Gene 2	2	0.026	0.039	Group 1 - Group 2	0.53602	0.15698	1.8303	0.42996	No
				Group 1 - Group 3	0.23930	0.070082	0.81712	0.020018	Yes
				Group 2 - Group 3	0.44644	0.13074	1.5244	0.25137	No
Gene 3	2	1.8752E-07	5.6257E-07	Group 1 - Group 2	0.04513	0.013919	0.14632	1.5546E-06	Yes
				Group 1 - Group 3	0.04237	0.013067	0.13737	1.104E-06	Yes
				Group 2 - Group 3	0.93880	0.28955	3.0439	0.99028	No

MIQE指南的意义

全面规范实验参数

MIQE指南详细规定了发表RT - qPCR实验结果所需考虑的所有参数，涵盖从样本采集到数据分析的各个环节，为实验提供全面规范。

提升实验可靠性

通过统一实验条件描述标准，减少因条件差异导致的结果不可靠性，极大提升了RT - qPCR实验的可靠性和重复性。

促进学术交流

在国际范围内提供统一标准，使不同实验室的实验结果更具可比性，有力促进了相关领域的学术交流与研究进展。





如何做出好的qPCR结果?

- 实验设计是基础，RT-qPCR体系优化是关键
- qPCR原始数据的质控是正确分析数据的前提
- 参考基因的选择应该有依据（实验验证）
- 选择正确的相对定量计算方法



符合MIQE指南的RT-qPCR 解决方案

硬件优势

精准温控

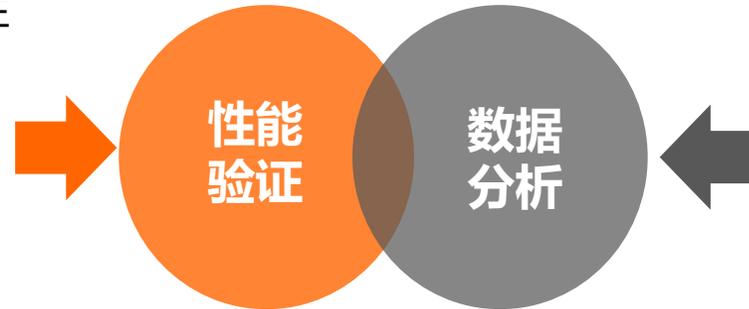
- 保证扩增的稳定性和准确性

动态温度梯度

- 快速简便优化Assay

专利的光学系统

- 满足多基因的精准检测



软件优势

内参选择工具

- 内参基因稳定性数据化筛选

多板合并分析与批间差校正

- 快速准确的处理高通量的数据

统计学分析工具

- 整合统计学分析工具 (t-test, 单因素/双因素方差分析)
- 图形导出工具, 直接用于发表

符合MIQE要求的qPCR高质量实验数据

仪器+试剂+耗材 > MIQE

07 注意事项



qPCR实验注意事项

为了最小化实验结果的统计学偏差，先**制备混合反应液**，所有样本有三个重复。大剂量包装的反应试剂，**使用前进行分装**（引物、模板，水），尽量减少试剂的反复冻融。

样品放置：将PCR反应体系加入到0.2ml**低缘**八联管（15.5mm），盖上管盖；或加入低缘96孔板，用光学级封膜封好。注意，必须带一次性**塑料手套**，不要让手指接触到反应管表面。将反应管按顺序放入仪器的加热孔中。

无论探针法还是染料法，每次试验都要做**NTC**（No Template Control），以验证有无污染发生。

仪器操作注意事项

正确的开关机顺序有助于延长仪器的使用寿命，减少仪器出故障的频率。

- 开机：待仪器开机完成自检后再进行操作；
- 关机：待仪器运行完程序后，再关机；关机后切断仪器电源。
- 开关盖：CFX仪器上盖部分为**全自动控制**，在通电状态，**严禁任何人为干涉上盖开启或关闭**的行为，此类行为会导致上盖故障，危及仪器使用。

良好的实验室环境有助于延长仪器的使用寿命，减少仪器出故障的频率。

推荐以下几个方面：

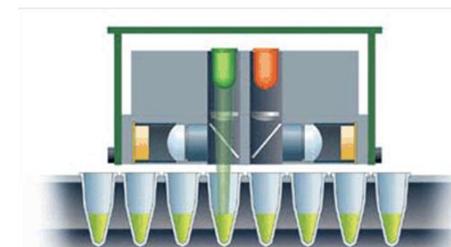
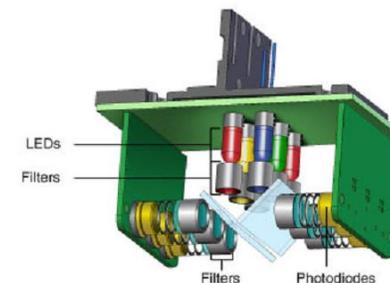
- 电源：推荐配备合适的稳压电源。
- 通风：仪器的通风应该没有阻挡。
- 温度：温度应该控制在10-30℃。
- 湿度：20-80%；梅雨季节，推荐实验室配备除湿机。
- 实验空间：易于操作、干净、安全。

光源： 5个LED+5个特异**激发**波长滤光片

检测器： 5个PDT+5个特异**检测**波长滤光片

数据采集的方式：

光梭控制整个光路，紧贴在反应板的顶部
逐孔扫描，无光程差，**无需ROX校正**。



Channel	Excitation (nm)	Detection (nm)	Calibrated Fluorophores
1	450-490	515-530	FAM™, SYBR Green I™
2	515-535	560-580	VIC® , HEX™, TET™, Cal Gold 540™
3	560-590	610-650	ROX™, TEXAS RED®, Cal Red 610™
4	620-650	675-690	CY5, Quasar 670™
5	450-490	560-580	Accommodates FRET Chemistry

耗材选择--Opus & Duet



- 耗材开放，品牌不限
- 光学级96孔板无裙边，全裙边均可使用，更推荐**全裙边**耗材
- 光学级低缘管（高度15.5mm左右）和高缘管（高度20mm左右）均可使用，推荐使用**低缘管**
- 光学级封膜
- 光学级八联管和管盖
- 白管和透明管都可用



CFX Meastro软件安装包 + 软件操作指南 图文版 + 视频版



微信扫一扫

MIQE指南

