

Module 5 : 相对定量 - $\Delta\Delta CT$ 法和相对标准曲线法

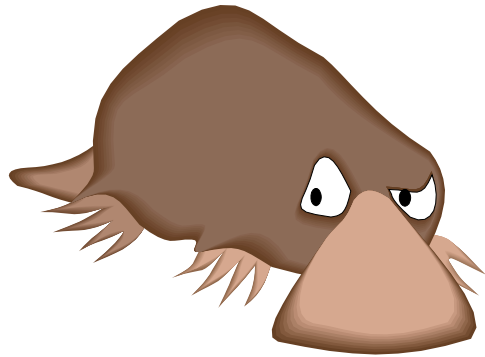
陈 涛

Field Application Scientist

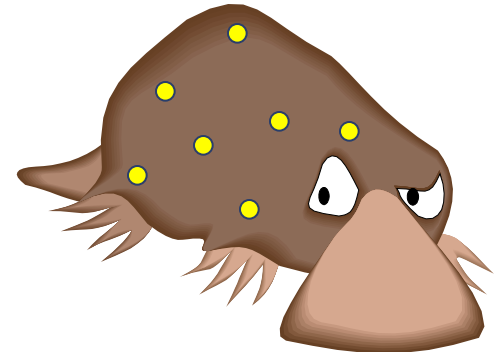
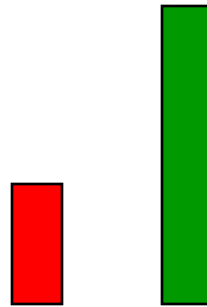
Tel: 800 820 8982 / 400 820 8982

相对定量 PCR: 相对基因表达量

示例实验



未处理 样本



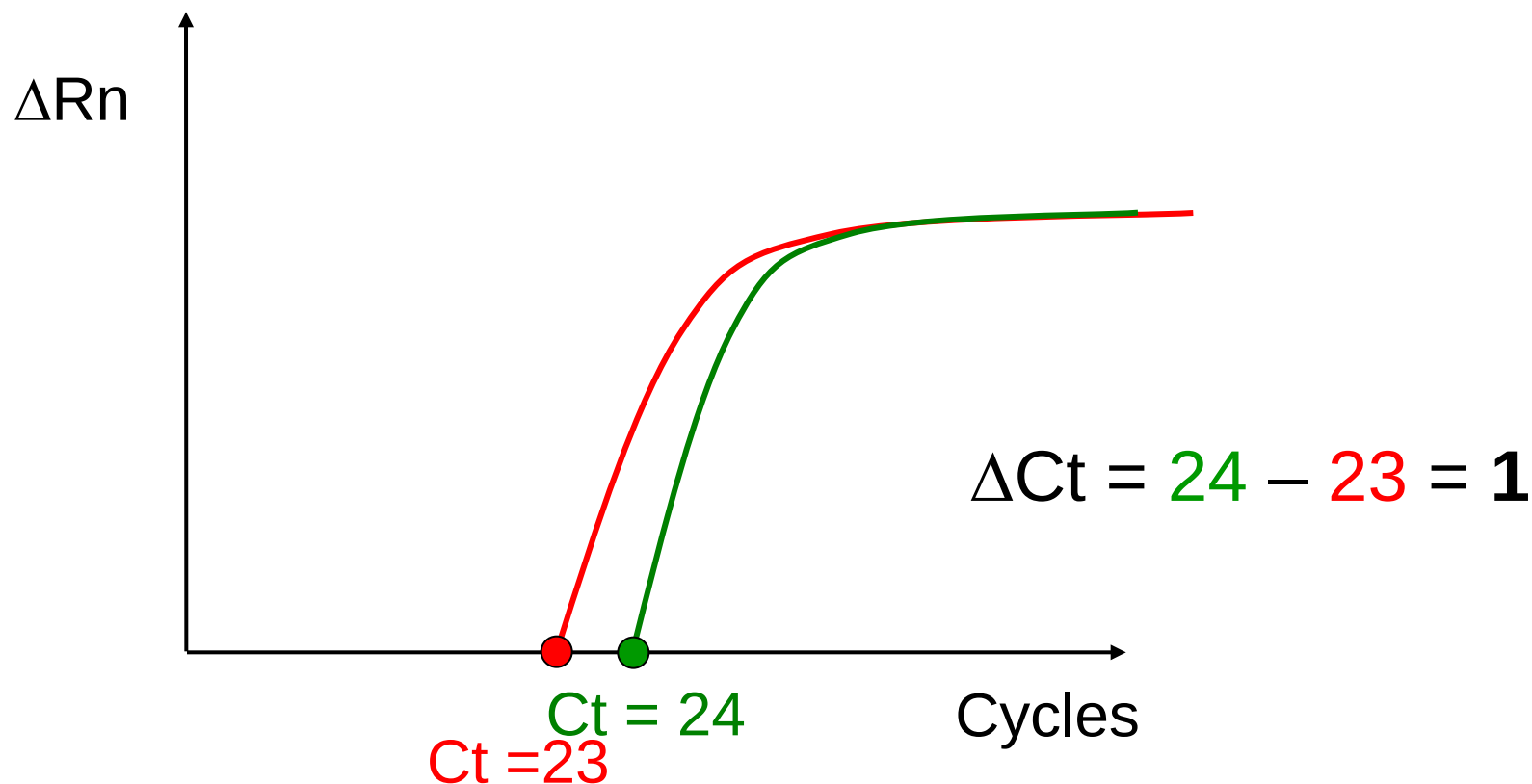
处理后 样本

目的基因: Plat 1

问题: 样本处理后, 目的基因的表达量有什么变化?

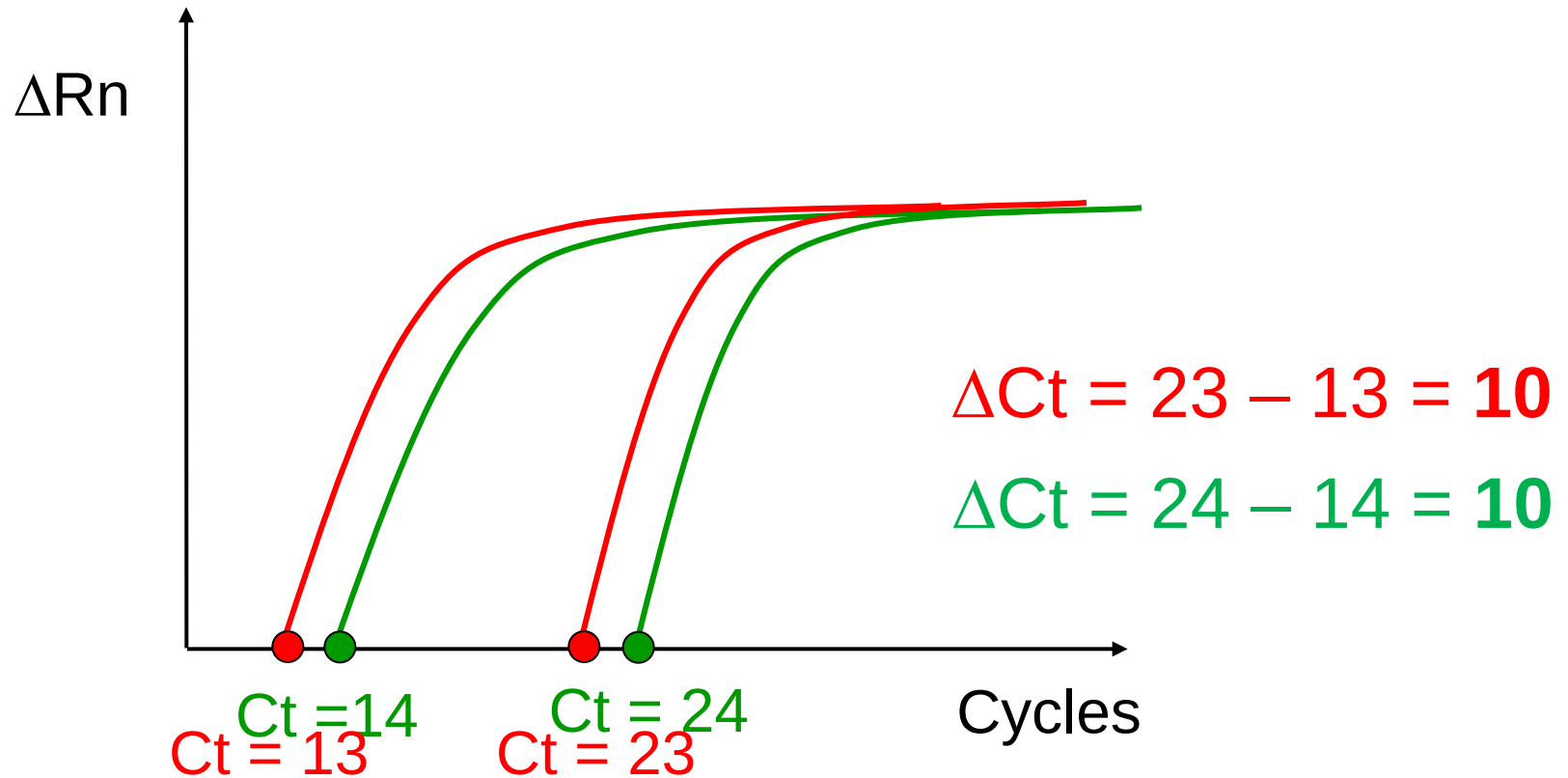
life
technologies

目的基因与目的基因的比较



- 未处理组：目的基因
- 处理组：目的基因

如果加入内参基因会怎样呢？

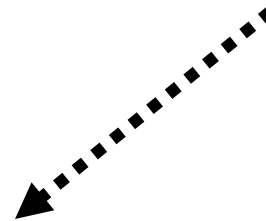
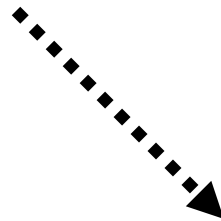


- 未处理组：目的基因和内参基因
- 处理组：目的基因和内参基因

两种相对定量的方法

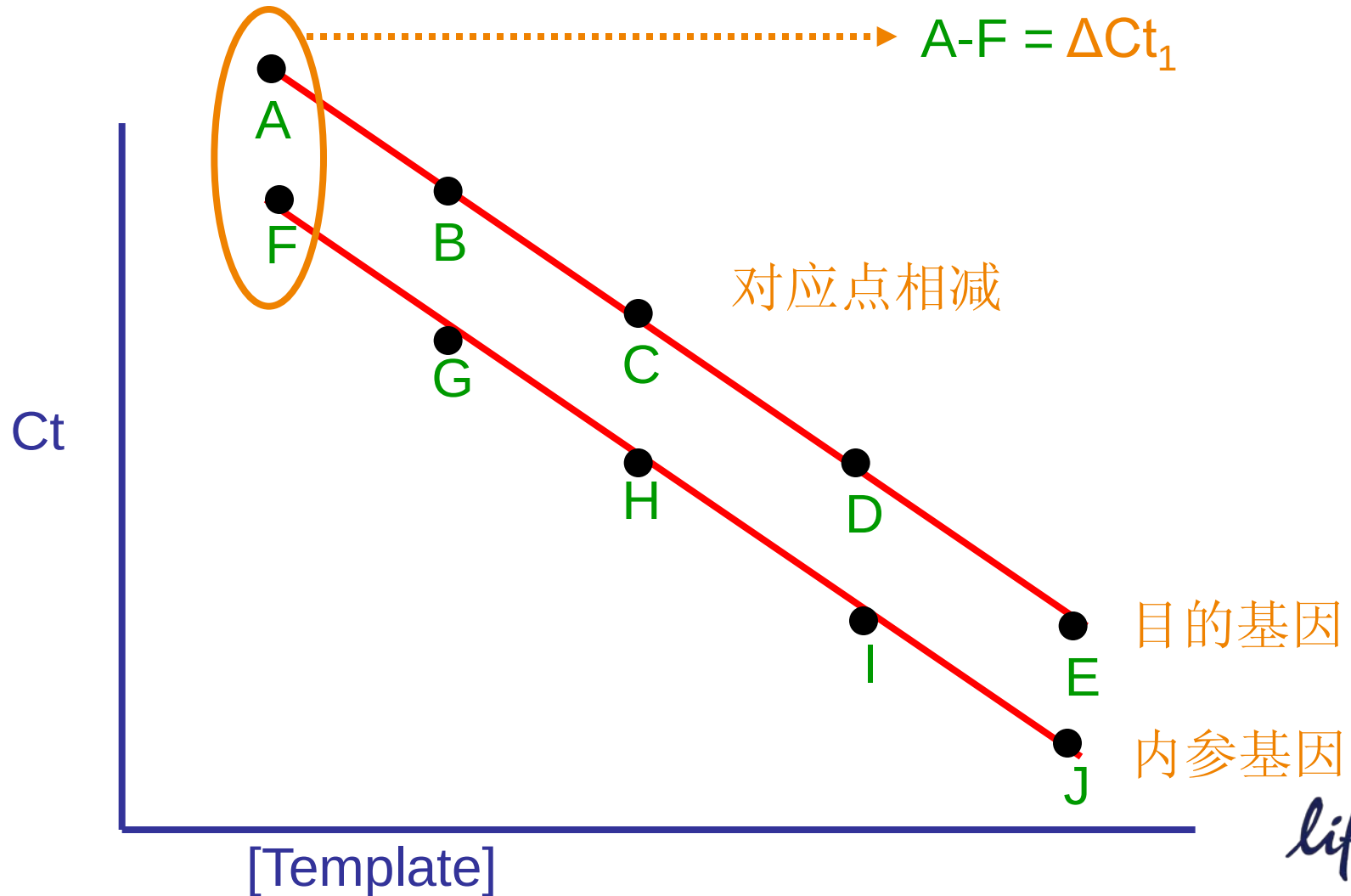
比较 Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) 法

相对标准曲线法

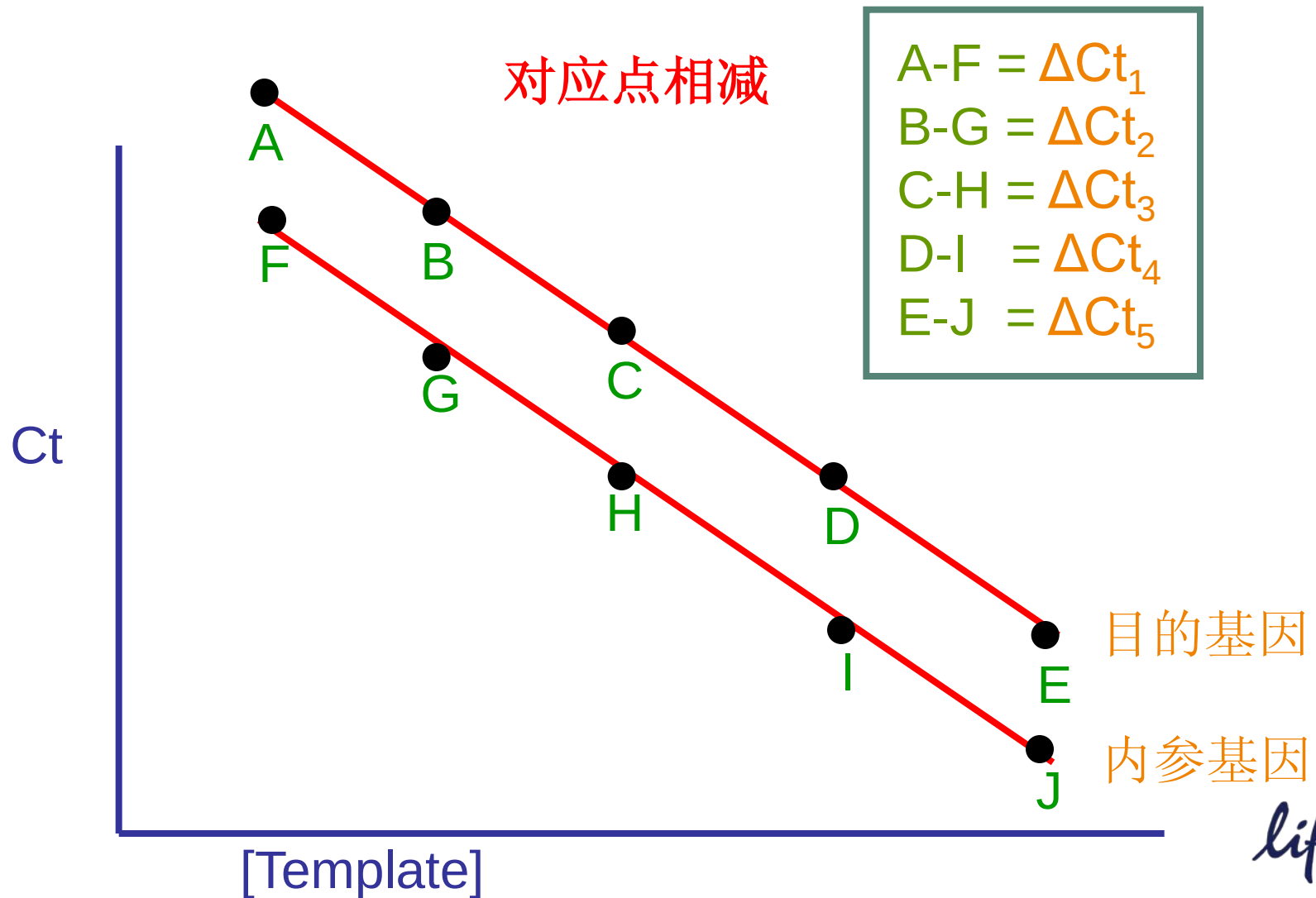


样本间的倍数关系

如何选择相对定量的方法？

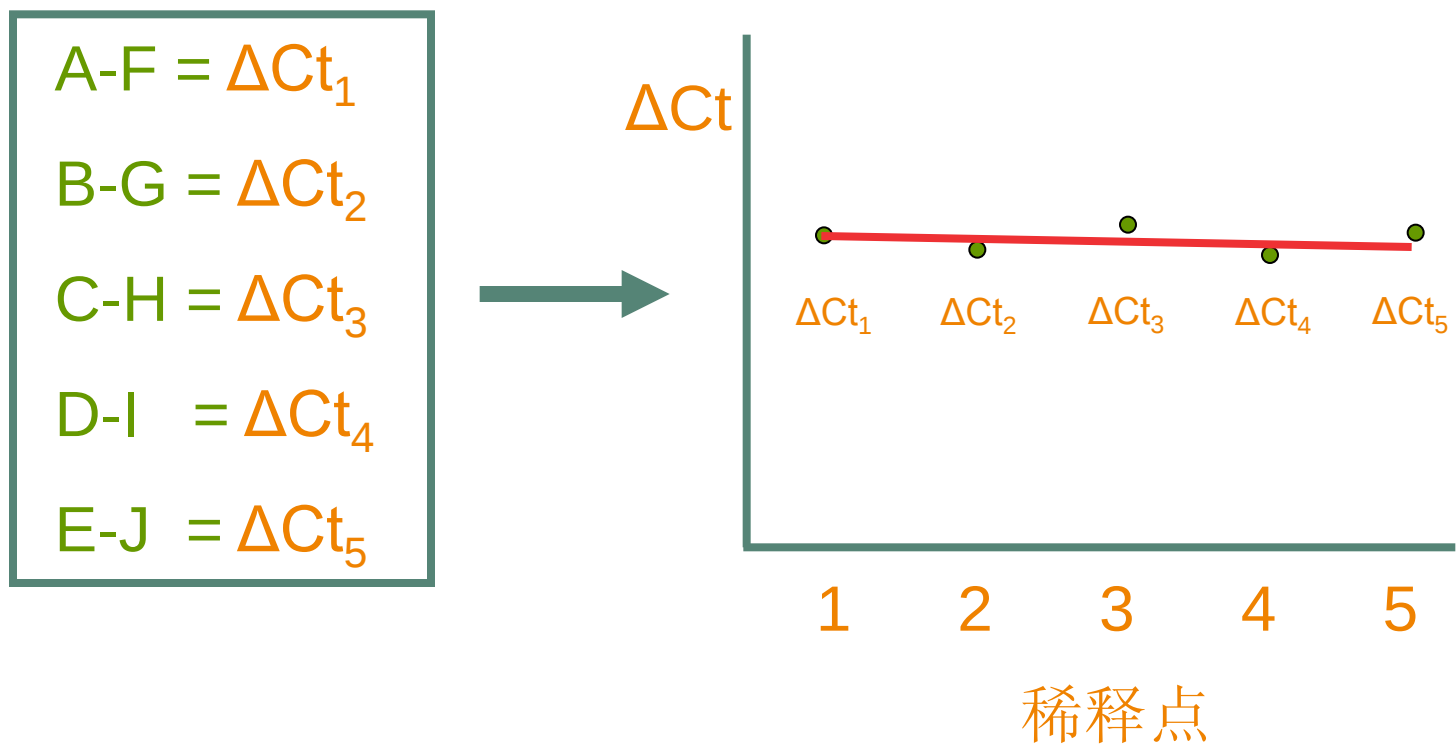


如何选择相对定量的方法？



如何选择相对定量的方法？

在Excel中制作图表



如何选择相对定量的方法？

根据斜率选择一种定量方法

| 斜率 | ≤ 0.1  比较 Ct ($\Delta\Delta C_t$) 法

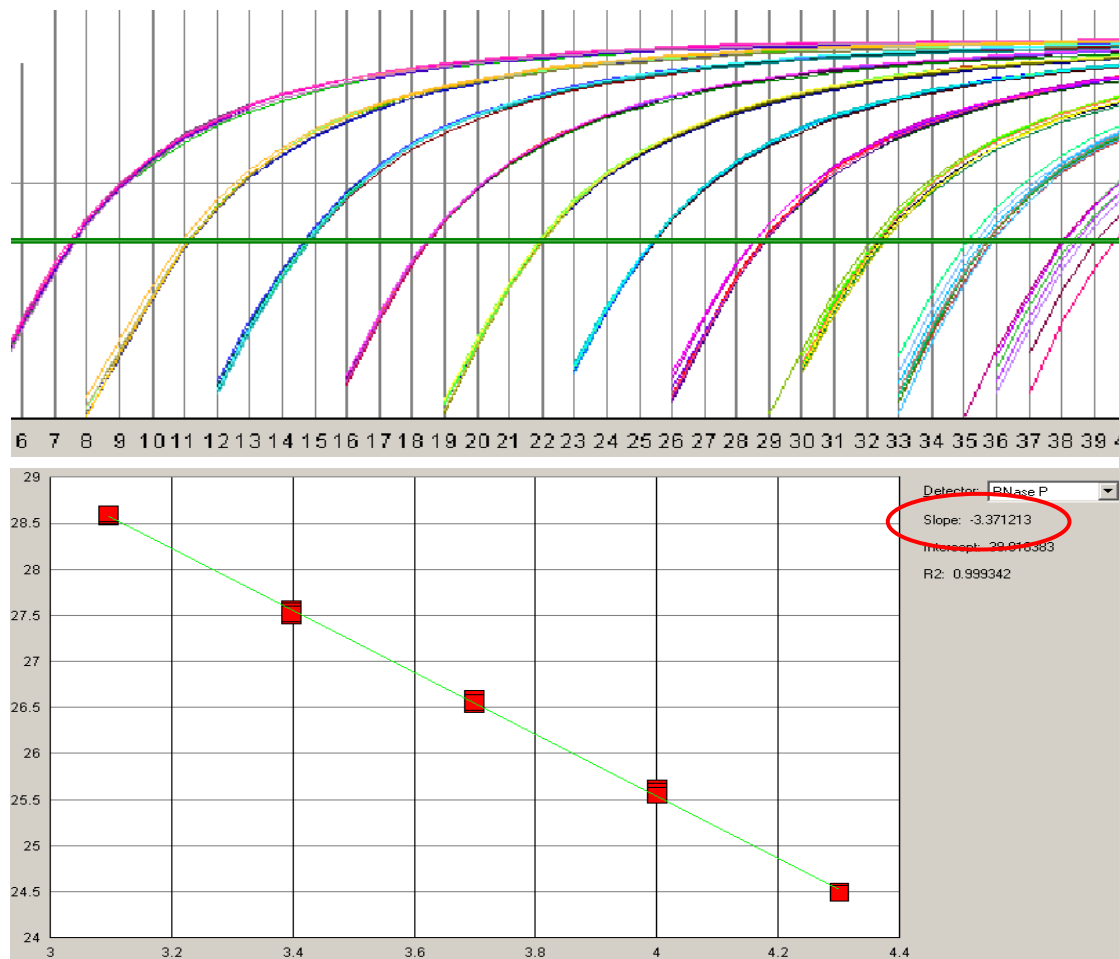
| 斜率 | ≥ 0.1  相对标准曲线法

$\Delta\Delta C_t$ 法

$\Delta\Delta C_t$ 法的必要条件

两个基因 (目的基因和内参基因) 必须有
*相一致的扩增效率, 并尽可能接近
100% !*

$\Delta\Delta Ct$ 法如何确认扩增效率



每对引物一条标准曲线

PCR扩增效率不一致对定量结果的影响

$$T_n = T_0 (1+E)^{Ct}$$

$$\begin{array}{l} Ct = 30 \\ 1+E = 1.95 \end{array} \rightarrow T_n = T_0 1.95^{30} = T_0 \times 5.0 \times 10^8$$



相差2.2倍

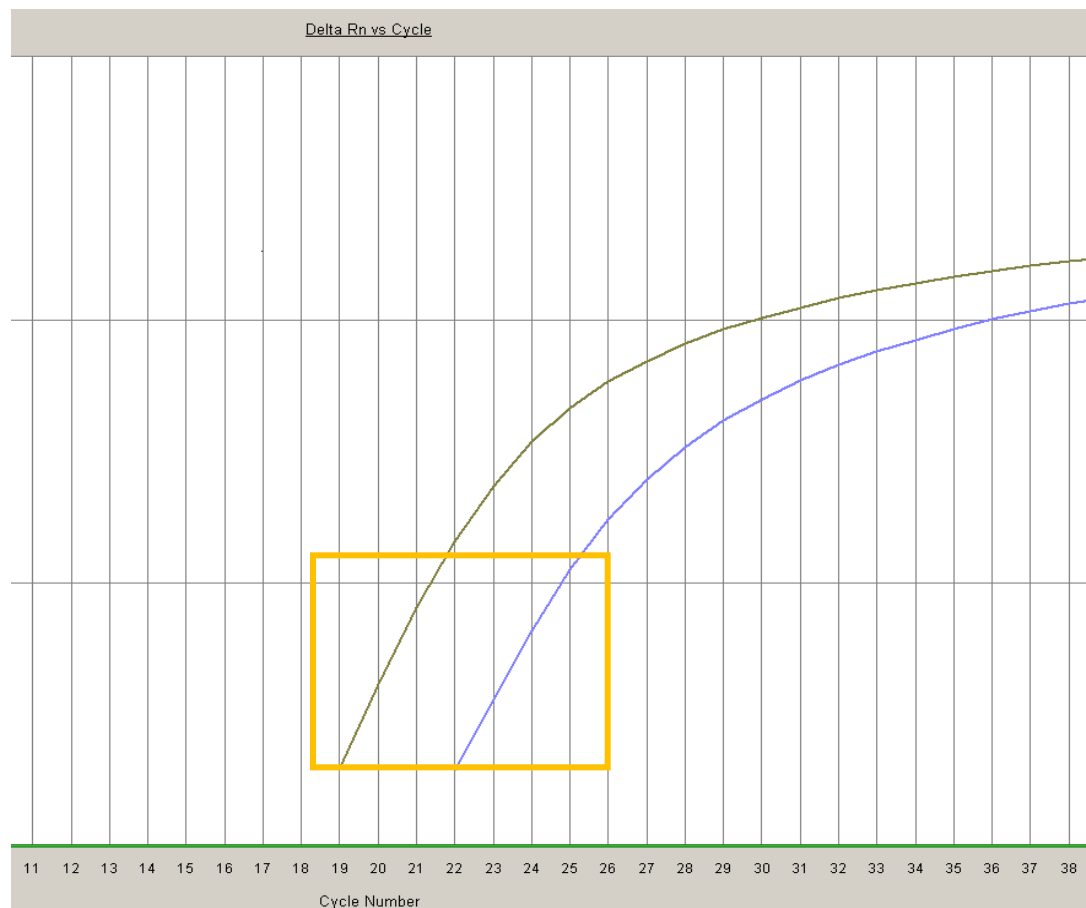
$$\begin{array}{l} Ct = 30 \\ 1+E = 1.90 \end{array} \rightarrow T_n = T_0 1.90^{30} = T_0 \times 2.3 \times 10^8$$

T_n = 扩增产物, T_0 = 起始浓度, E = 扩增效率, Ct = 循环数

实际实验中如何快速判断扩增效率是否一致

同时扩增目的基因和内参基因，通过查看扩增曲线中指数增长期是否平行来确定扩增效率是否相似。

指数增长期的曲线平行说明扩增效率相似



$\Delta\Delta\text{Ct}$ 法结果计算

步骤 1: 内参基因均一化样本差异

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

步骤 2: 其他样本和对照样本比较

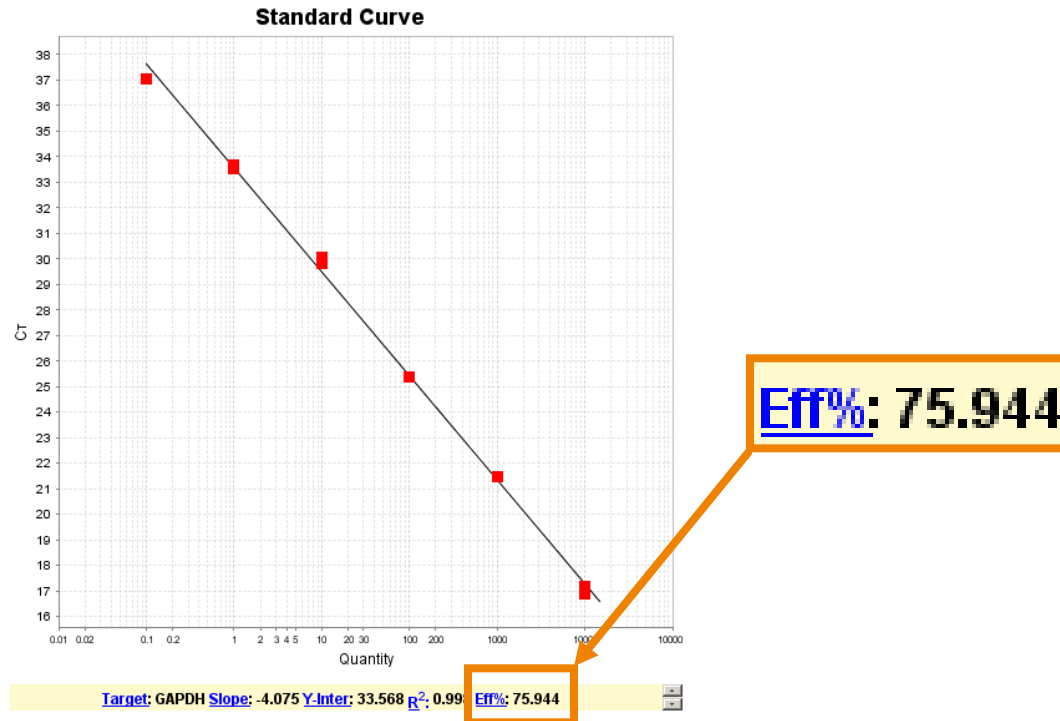
$$\Delta\text{Ct}_{\text{处理样本}} - \Delta\text{Ct}_{\text{对照样本}} = \Delta\Delta\text{Ct}$$

步骤 3: 使用公式计算

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

目的基因和内参基因扩增效率不一致

- 另一个选择：预先确定每个基因的扩增效率…



目的基因和内参基因扩增效率不一致

- 分析时，手动输入每个基因的扩增效率

Analysis Settings for Untitled

CT Settings | Flag Settings | **Relative Quantitation Settings**

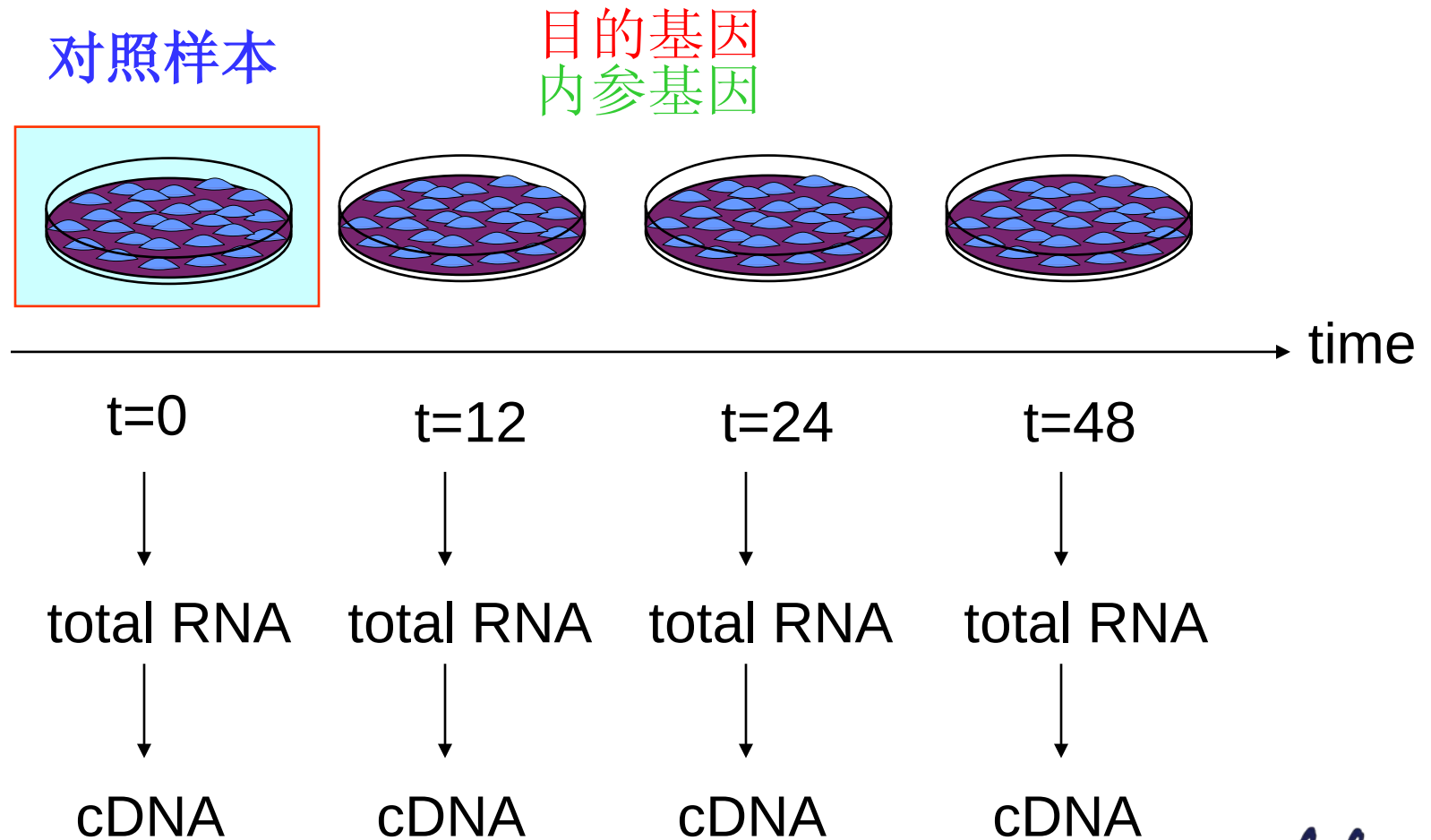
Efficiency

Enter percentage values between 1 and 150%

Detector	Efficiency (%)
Normalizer gene	100.0
Target gene	76.0

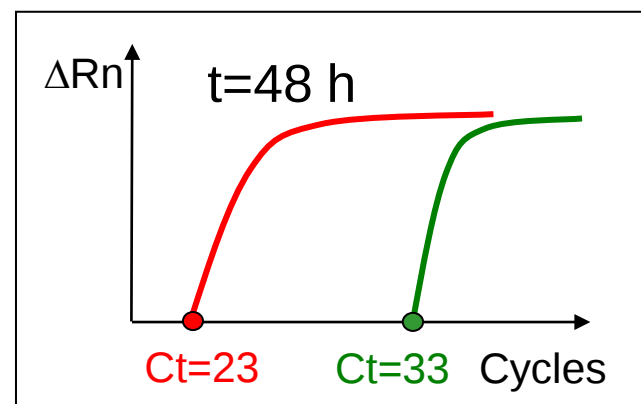
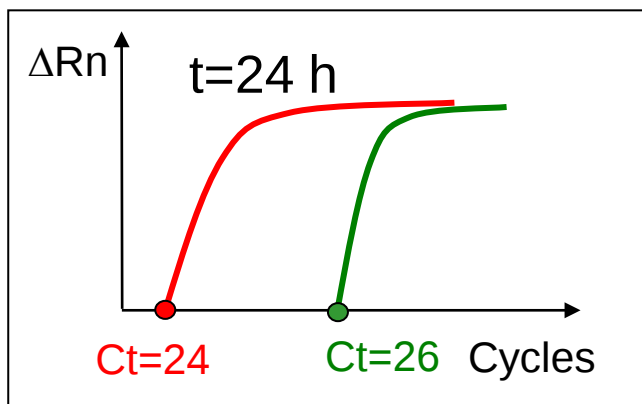
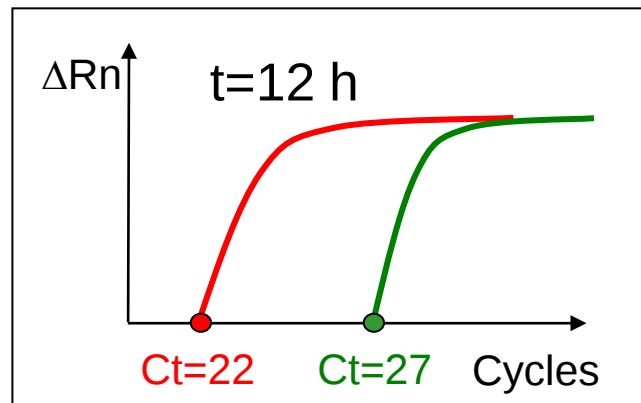
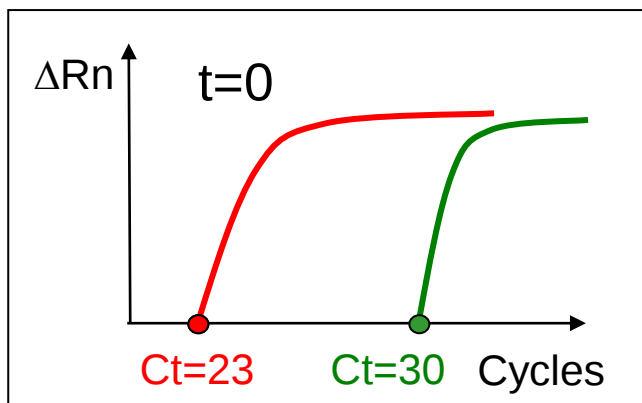
相对定量结果计算就会把每个基因的扩增效率计算进去

$\Delta\Delta Ct$ 实验示例



$\Delta\Delta C_t$ 实验示例

我们来算一下 基因表达变化



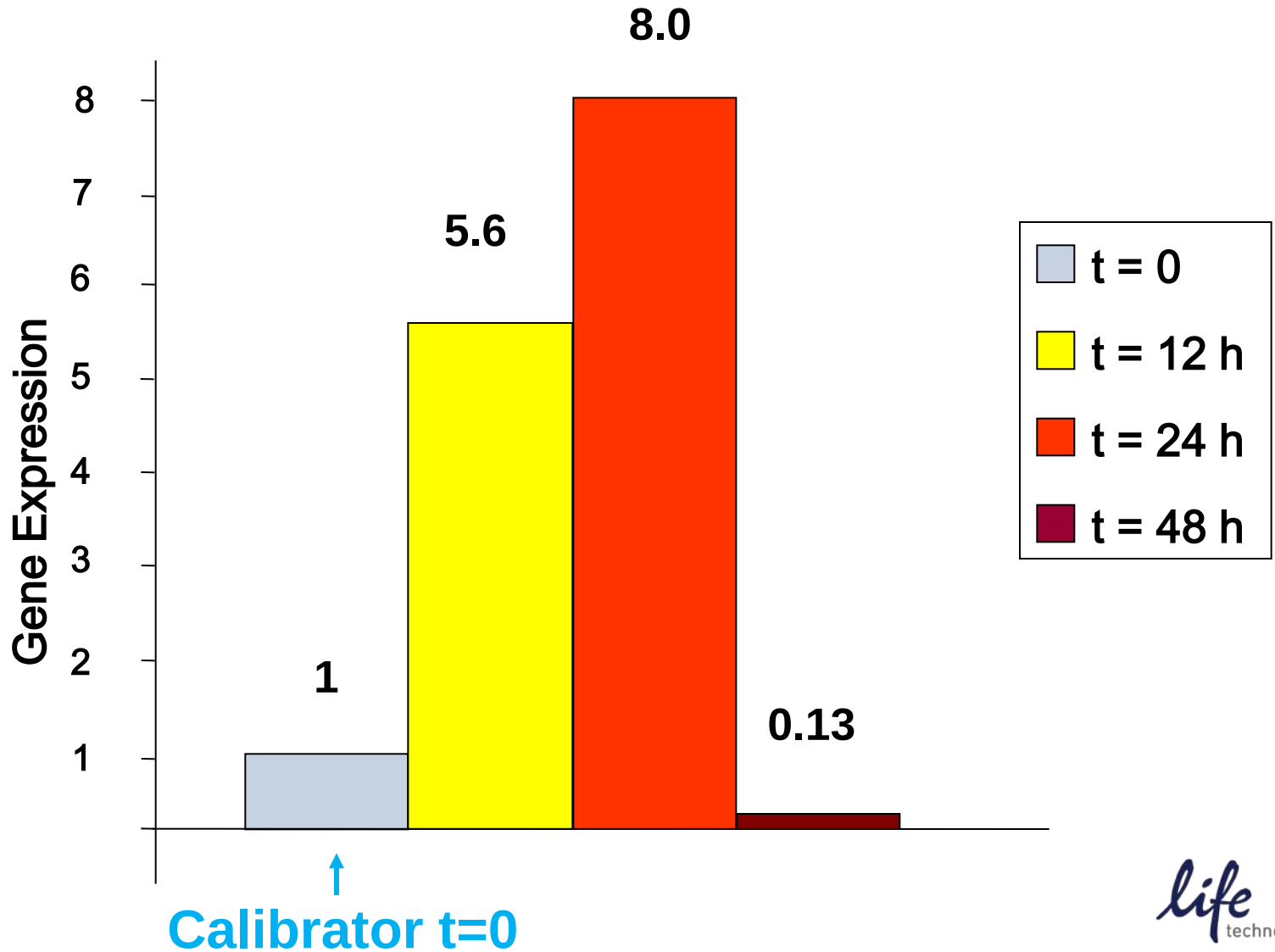
■ 内参基因

■ 目的基因

$\Delta\Delta\text{Ct}$ 实验示例结果计算

Sample	Ct Plat 1 Average Ct	Ct GAPDH Average Ct	ΔCt Plat 1 Ct — GAPDH Ct	$\Delta\Delta\text{Ct}$ $\Delta\text{Ct treated}$ — $\Delta\text{Ct untreated}$	Fold difference in Plat 1 relative to untreated
Time= 0 hr	30.49	23.63	6.86	0.00	1.0
Time= 12 hr	27.03	22.66	4.37	-2.49	5.6
Time = 24 hr	27.06	23.20	3.86	-3.00	8.0
Time = 48 hr	32.83	23.01	9.82	2.96	0.13

相对定量结果



软件计算

Well	...	Sample N...	Target Na...	Task	...	CT	CT Mean	...	ΔCT Mean	ΔCT SE	ΔΔCT	...	RQ
A1	☐	Brain	18S	UNKNOWN	...	10.919253	10.883143	...					
A2	☐	Brain	OGDH	UNKNOWN	...	26.7171	26.800344	...	15.917	0.055	0		1
A3	☐	Brain	EGR3	UNKNOWN	...	27.828663	27.899597	...	17.016	0.05	0		1
A4	☐	Brain	OSGEP	UNKNOWN	...	29.244791	29.34477	...	18.462	0.053	0		1
A5	☐	Brain	MAOB	UNKNOWN	...	25.75427	25.906	...	15.023	0.064	0		1
A6	☐	Brain	SERPING1	UNKNOWN	...	26.913061	26.92132	...	16.038	0.042	0		1
A7	☐	Kidney	18S	UNKNOWN	...	11.380486	11.50616	...					
A8	☐	Kidney	OGDH	UNKNOWN	...	25.183674	25.221848	...	13.716	0.062	-2.202		4.6
A9	☐	Kidney	EGR3	UNKNOWN	...	30.734785	30.922363	...	19.416	0.088	2.4		0.189
A10	☐	Kidney	OSGEP	UNKNOWN	...	28.940151	28.947079	...	17.441	0.057	-1.021		2.029
A11	☐	Kidney	MAOB	UNKNOWN	...	25.134071	25.183146	...	13.677	0.06	-1.346		2.542
A12	☐	Kidney	SERPING1	UNKNOWN	...	25.847473	25.803164	...	14.297	0.058	-1.741		3.343

为你完成所有的计算！

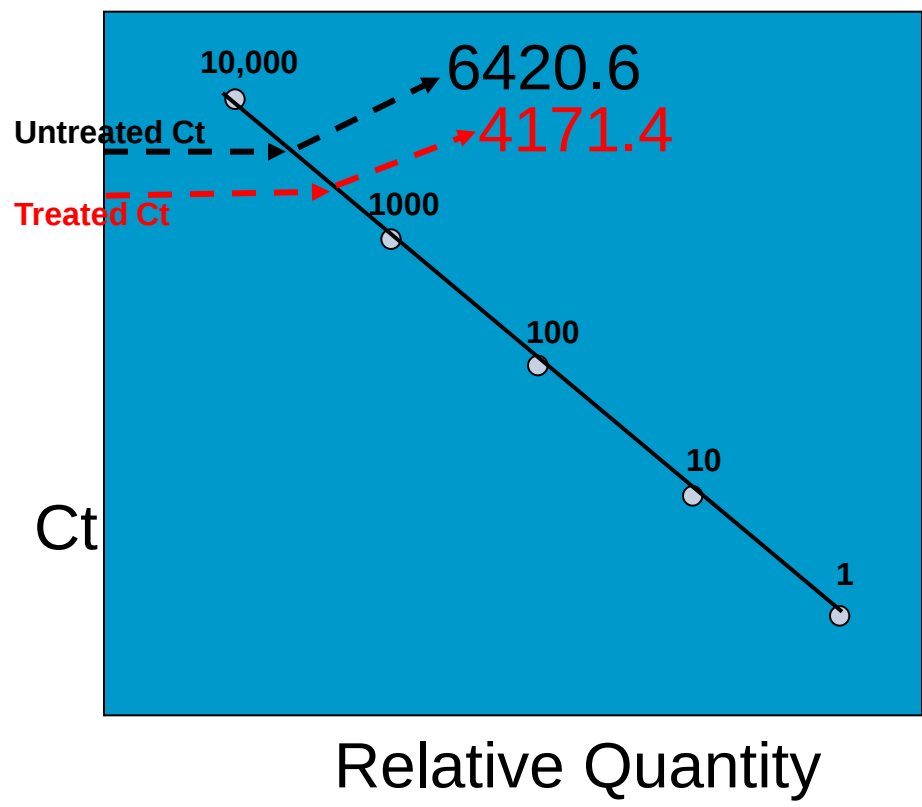
相对标准曲线法

如何选择相对标准曲线的标准品？

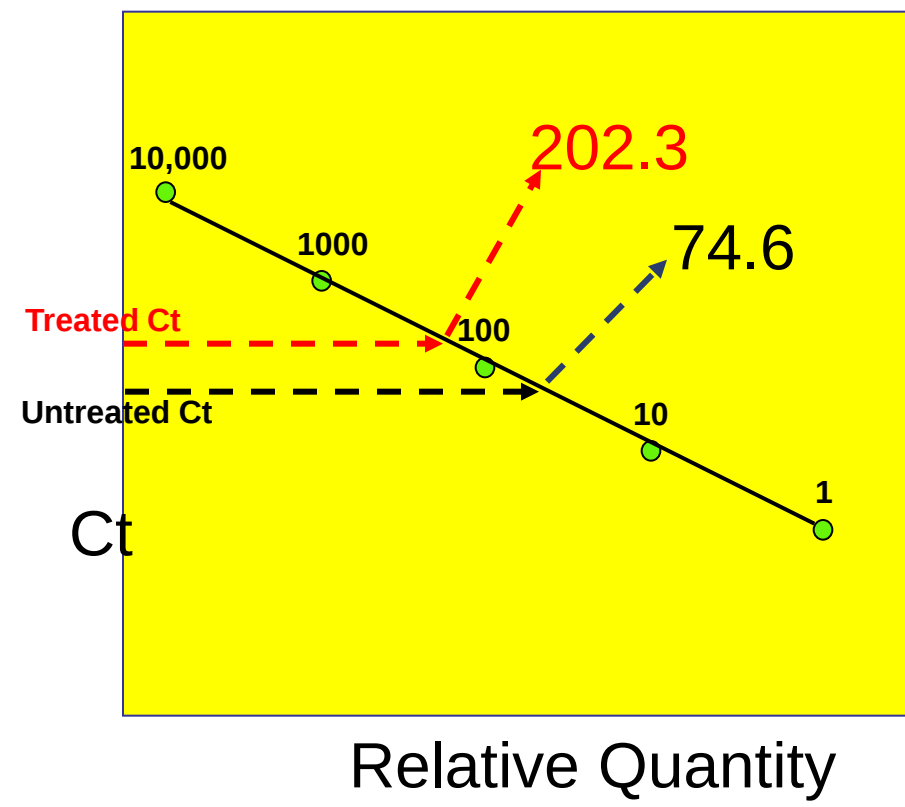
- 任何数量充足，并表达目的基因和内参基因的浓度较高cDNA
- 只需知道稀释倍数，不需要知道浓度
- 养成好的制作标准曲线的习惯

每对引物做一条标准曲线

18s



Insulin



life
technologies

计算举例

	Insulin	18s	Normalized Q
Untreated $Q_{avg.}$	74.6	$\div$ 6420.6	0.0116
Treated $Q_{avg.}$	202.3	$\div$ 4171.4	0.0484

选择一个对照样本： 例如, **Untreated**

$$\begin{array}{lcl} \text{Untreated} \div \text{Untreated} : & 0.0116 \div 0.0116 & = 1 \\ \text{Treated} \div \text{Untreated} : & 0.0484 \div 0.0116 & = 4.2 \end{array}$$

表达倍数差异

life
technologies

为你计算好所有的倍数关系

Well		Sampl...	Target ...	Task		Ct	Ct Mean		Quantity		Normalized Q...	Efficien...	Slope	RQ
A7	☐	Liver	c-myc	UNKNOWN	...	20.6095	20.532211	...	7.386		1.057	86.438	-3.696	1.726
A8	☐	Liver	c-myc	UNKNOWN	...	20.454922	20.532211	...	8.133		1.057	86.438	-3.696	1.726
A9	☒	Liver	c-myc	UNKNOWN	...									
A...	☐	Liver	GAPDH	UNKNOWN	...	28.380135	28.455734	...	0.469			92.853	-3.506	
A...	☐	Liver	GAPDH	UNKNOWN	...	28.464178	28.455734	...	0.444			92.853	-3.506	
A...	☐	Liver	GAPDH	UNKNOWN	...	28.522894	28.455734	...	0.427			92.853	-3.506	
B1	☐	Kidney	c-myc	UNKNOWN	...	21.135685	21.461496	...	5.322		1.111	86.438	-3.696	1
B2	☐	Kidney	c-myc	UNKNOWN	...	21.555302	21.461496	...	4.098		1.111	86.438	-3.696	1
B3	☐	Kidney	c-myc	UNKNOWN	...	21.693499	21.461496	...	3.76		1.111	86.438	-3.696	1
B4	☐	Kidney	GAPDH	UNKNOWN	...	28.479626	28.505972	...	0.439			92.853	-3.506	
B5	☐	Kidney	GAPDH	UNKNOWN	...	28.518414	28.505972	...	0.428			92.853	-3.506	
B6	☐	Kidney	GAPDH	UNKNOWN	...	28.51987	28.505972	...	0.428			92.853	-3.506	

两种方法的区别？

比较 Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) 法

- 已知各个基因的扩增效率
- 不需要每次都做标准曲线
- 简单，经济，通量较高

相对标准曲线法

- 每个基因都要做一条标准曲线
- 准确的扩增效率计算
- 工作量大，成本高，通量较低

Question?