

发表 qPCR 文章标准-MIQE 及 ISO20395

实时定量 PCR 反应从生物学样品到核酸定量整个过程可能出现诸多的不确定度因素，为了实现实验可靠性、重复性，制定一套 qPCR 标准非常必要。MIQE 是指 Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments，即：发表关于实时定量 PCR 实验文章至少提供的信息。MIQE 指南是由国际上多名科学家在 2009 年共同制定并在 Clinical Chemistry 发表[2]，为 qPCR 文章发表作者提供一套 qPCR 实验流程的“检查清单”。并为审稿人和期刊编辑提供一个公认的标准，用于评估待发表文章的质量，帮助科学界发表更可靠、更可重复的数据。

Guideline > Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
Epub 2009 Feb 26.

The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments

Stephen A Bustin¹, Vladimir Benes, Jeremy A Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, Tania Nolan, Michael W Pfaffl, Gregory L Shipley, Jo Vandesompele, Carl T Wittwer

Affiliations + expand

PMID: 19246619 DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797

2017 年 Bustin 等调查 MIQE 执行情况显示：“说一套，做一套：RT-qPCR 是分子生物学研究中缺乏重复性的典范”。虽然 MIQE 指南公布 8 年，大量 qPCR 文章依然不遵循 MIQE，面临撤稿风险。

Review > Eur J Clin Invest. 2017 Oct;47(10):756-774. doi: 10.1111/eci.12801. Epub 2017 Sep 2.

Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research

Stephen Bustin¹, Tania Nolan²

Affiliations + expand

PMID: 28796277 DOI: 10.1111/eci.12801

公众号 · TOROIVD-is-qPCR

2019年8月国际标准化组织基于MIQE制定了ISO20395:2019标准，规定了qPCR法的性能评估和质量保证的通用要求。



Standards Sectors About us News Taking part Store

ISO 20395:2019

Biotechnology

Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences

qPCR and dPCR

Status: Published

公众号 · TOROIVD-is-qPCR

2022年12月30日中国依据ISO20395:2019发布了GB/T42077—2022国家标准文件，为中国的研究机构及研发企业等提供了qPCR规范化的标准。

2022年12月30日中国依据ISO20395:2019发布了GB/T42077—2022国家标准文件，为中国的研究机构及研发企业等提供了qPCR规范化的标准。

ICS 07.080
CCS A 40

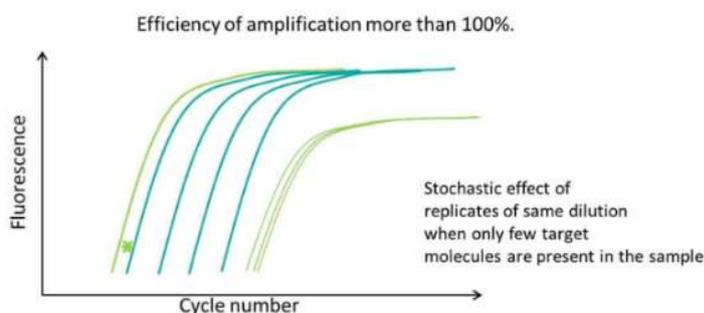


中华人民共和国国家标准

GB/T 42077—2022/ISO 20395:2019

生物技术 核酸靶序列定量方法的性能 评价要求 qPCR法和dPCR法

Biotechnology—Requirements for evaluating the performance of quantification
methods for nucleic acid target sequences—qPCR and dPCR

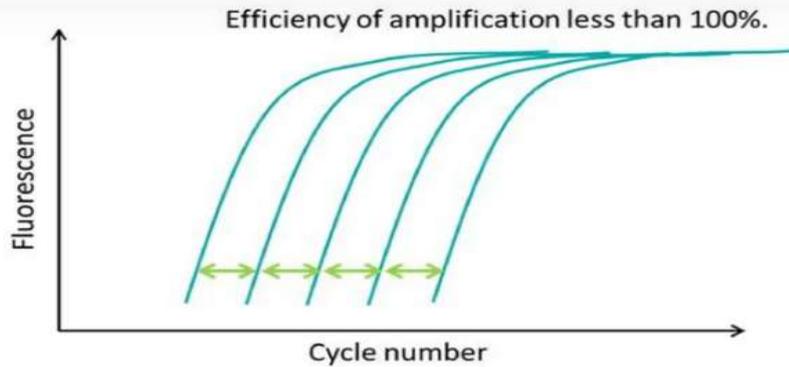


qPCR实验扩增效率为什么会超过100%?

启衡星

实时荧光定量PCR (qPCR) 是一种非常快速、高效、准确的核酸定量分析方法，是分子生物学中大多数领域的首选使用方法。按应用类型来分，qPCR可分为绝对定量和相对定量以及定性分析。但不管绝对定量还是相对定量，**确定扩增效率**应该是qPCR检测时**首先要做的事情**之一。了解扩增效率以及如何计算扩增效率对于准确的数据解释至关重要。

理想情况下，目标序列的分子数量应在每个扩增循环中翻倍，对应于100%的扩增效率。同样，如果扩增分子的数量少于两倍，这是由于扩增效率低下 - 低于100%导致。扩增效率较低的最常见原因是**不好的引物设计**和**非最佳试剂浓度或反应条件**。另外，二级结构的存在，如二聚体和发夹结构或不适当的退火温度(Tm)会影响引物-模板退火，从而导致扩增不良。在确定扩增效率实验时，通常我们会对模板进行系列梯度稀释来做，但在系列梯度稀释过程中，每一次额外的稀释，稀释液的DNA量可能会比预期的量更低，因此连续稀释样品的Ct值之间会出现差异(见下文)。



已知稀释步骤的 Ct 值之间的差异高于预期。10 倍稀释应该相隔 3.3 个循环，但在这种情况下，它们相距更远。

扩增效率计算

对于扩增效率的计算，我们通过对目标模板进行连续稀释然后进行qPCR扩增获取它们的 Ct 值，然后将Ct值与相应的浓度的对数值绘制曲线。接下来，通过数据点生成线性回归曲线并计算趋势线的斜率。最后，使用以下公式计算扩增效率： $E = -1 + 10 (-1/\text{slope})$ 。我们在计算扩增效率时一定要了解影响扩增曲线斜率的因素，否则它可能会产生误导。

通常，理想的扩增效率范围在90%到110%之间。理论最大值为100%，表明聚合酶处于最大工作效率。那么，扩增效率怎么可能超过100%呢？这意味着在每个qPCR循环中会产生两个以上的序列拷贝，对吗？

扩增效率超过100%，怎么可能？

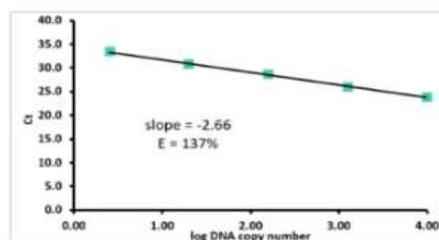
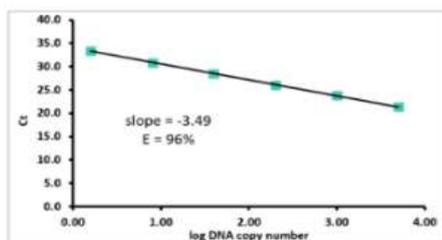
其主要原因是聚合酶抑制。即使将更多模板添加反应体系中，Ct 值也可能不会变得更小。这使扩增效率曲线变平，导致斜率更低，扩增效率超过100%。

聚合酶的抑制剂包括样品中过量的 DNA/RNA 或 残留物质。常见的污染物包括肝素、血红蛋白、多糖、叶绿素、蛋白酶 K、乙酸钠等)。也可能是DNA/RNA提取过程中带入的各种其他物质，如乙醇、苯酚和 SDS。

如果高浓度的样品中存在抑制剂，与没有抑制剂的样品相比，需要更多的扩增循环数才能达到检测阈值。在浓度越高的样品中，抑制作用更容易发生，改善曲线斜率的方法之一是稀释样品。同时也是测试是否存在抑制问题的好方法。

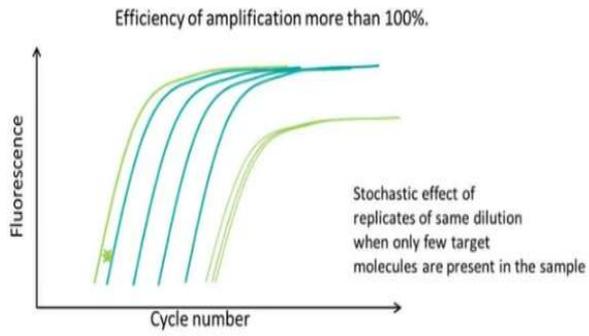
让我们看一个简单的例子。在10倍稀释的样品中，在 100% 的扩增效率下，两个相邻的稀释样品的之间的 ΔCt 应该在3.3左右。然而，如果存在抑制剂，两个样品稀释液之间的 ΔCt 可能会降低到2.8。在抑制较少的高稀释倍数样本点，该值可能会回升至接近3.3。这是由于抑制剂与 DNA/RNA 一起稀释，稀释程度越高，浓度越低，就越没有抑制作用，扩增再次以最高效率运行，Ct值回归正常表现。

因此，高浓度样品和稀释样品之间的 ΔCt 值比预期的要小，导致扩增效率高于 100%。



即使反应体系中存在更多模板，由于抑制作用，Ct值也可能不会发生相应的偏移，从而使扩增效率图变得平坦，斜率较低，扩增效率超过100%。

这种情况通常可以通过使用高度稀释的样品来避免。如果发生抑制，在计算扩增效率时应将高浓度样品排除在分析之外。同样，由于随机效应，在变异性高的情况下，大多数稀释样本也应省略。因此，在定量研究中，超高浓度或过低稀释的样品是不合适的（见下文）。



在 qPCR 实验之前，可使用分光光度法分析 DNA/RNA 样品的纯度，可以很容易的避免扩增抑制的发生。以 260 和 280 nm 处的吸光度值之比（与核酸与其他分子之比相对应）作为纯度评估。纯的 DNA 比值为 1.8，RNA 为 2.0，若纯度不够则应对样品进行纯化。同样，您也可以使用不同的样品制备方法。如果额外的纯化步骤不能解决问题，则样品可能本身就难以处理。在这种情况下，可以考虑使用更耐受抑制剂的 qPCR mix。