

实时荧光定量 PCR 国际化标准 — MIQE 指南

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

介绍

实时荧光定量 PCR (qPCR) 目前已成为不同样品间进行基因表达水平定量差异比较的权威性方法。在过去 10 年中, 该方法迅速流行, 查阅 RT (反转录) -qPCR 资料, 出版文章超过 25,000 篇, 涉及科学的多个领域, 包括农业、环境、工业和医学研究。

除了这一技术的应用十分广泛, 另一个使该技术迅速发展的主要原因是杂志的编辑审阅专家组对用 RT-qPCR 方法得到的定量和分子数据来支持表型观察报告的需求不断增加。而且, 基因表达分析也用于支持通过蛋白组检测得到的蛋白表达数据。生物技术公司为配合这一技术的迅速发展, 相继开发出各种可运行 RT - qPCR 实验的相关试剂和仪器。然而, 目前还没有建立严谨的指南, 研究者们通常通过不同的信息来源来设计他们的实验, 这使得实验数据的质量参差不齐。

大量的技术缺陷可能会影响 RT-qPCR 数据的质量, 包括不适当的实验设计, 没有足够的对照和重复, 对实验条件和样品操作技术缺乏适当的定义, 低质量 RNA 样品, 反转录引物选择不理想, qPCR 反应和数据分析方法的不正确等。为帮助科学家们能产生一致的, 高质量的 qPCR 实验数据, 定量 PCR 实验数据发表所必需实验

信息最低限度标准 (MIQE) 已在近日出版 (Bustin et al. 2009)。之后开发了基于 XML 的实时定量 PCR 数据标注语言建立起的 RDML 协议, 使实时定量 PCR 数据得到统一 (Lefever et al. 2009)。这一协议正积极发展合适和标准化的术语、为生物和生物医药研究者提供的最小信息指南、灵活及广泛的数据文件架构, 这些数据架构可通过各种工具来创建、处理和验证 RDML 文件。关于 RDML 项目的所有相关信息可在 www.rdml.org/ 中查到。

MIQE 和 RDML 的最终目标是建立一个清晰的框架, 在这个框架中, 可对 RT-qPCR 实验进行管理, 给审稿人和编辑提供指南, 使其可以使用已构建的标准对投稿文章的技术质量进行评价。同样, 通过使用该方法所产生的数据对于研究结果更具有一致性, 可比性和可靠性。

因为 mRNA 转录的高动态性和样品操作及下游处理步骤的多变性 (Garson et al. 2009), RT-qPCR 流程中每一步的标准化对结果的可靠性和重复性至关重要。MIQE 提供了一个检测列表, 该列表包含 85 个参数来确保实验结果的质量, 满足了所有杂志的接受标准 (Bustin et al. 2009)。

我们将通过这篇文章阐述如何应用 MIQE (<http://medgen.ugent.be/rdm/guidelines.php>) 指南建立完整的实验方法。

1. 实验设计

适当的实验设计是所有基因表达研究的关键。因为 mRNA 转录对外在因素敏感, 该反应需要在严格的控制及设定条件下进行。花费一定的时间对实验过程, 对照组, 样品类型和重复次数, 实验条件和样品操作方法进行设计十分必要, 可以减少每次实验结果可变性 (表 1)。在进行基因表达实验之前, 每一个参数都需要进行仔细记录以确保所发表数据的优良的生物学重现性。

表 1. qPCR 实验设计及样品处理。该表格总结了一个典型的 RT-qPCR 实验流程, 从实验设计到对照组, 重复数及实验条件到样品操作的细节进行设定。这些设定是确保 qPCR 数据产生过程中的关键步骤能产生高质量, 高重复和可发表的 RT-qPCR 数据。

实验设计	对照组	重复	实验条件	样品操作
疾病或处理组	时间长度研究 (i.e., t = 0)	生物学 (每个孔不同样品)	生长条件 (培养基和时间或 OD)	细胞或组织收获的精确时间
靶标基因	正常 vs. 疾病 (i.e. 正常)	技术 (每个孔相同样品)	胚胎发育天数	样品抽提的方法
内参基因	未处理组 vs. 药物处理组 (i.e. 未处理)	—	药物或复合物的单位质量	保存方法和时间
—	—	—	性别, 表型	解冻和均质化过程
—	—	—	孵育时间	总 RNA 抽提过程

2. RNA 抽提

如果样品不得不在采集后要放置一段时间或者样品数量多, 无法立即处理, 则在使用前需要一直把样品保存于合适的条件下 (冷冻于 -80°C 和 / 或保存于 RNA 保存液中)。为缩短 RNA 抽提过程中的操作时间, 我们建议以 10-20 的小批次来进行样品处理。RNA 抽提过程应包括 DNase I 处理步骤以便去除基因组 DNA 污染。一些经济方便的试剂盒, 比如 Aurum RNA 抽提试剂盒 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 可用于任何样品, 包括植物和动物组织的处理, 该试剂盒含有柱上 DNase I 处理步骤。

3. RNA 质量控制

在 RT-qPCR 实验流程中使用高纯度 (无污染) 和高完整性 (无降解) 的 RNA 是最关键的因素之一。不纯的

RNA 样品会抑制 PCR 反应, 产生偏离的数据。使用部分降解的 RNA 会产生可变和不正确的定量结果 (Fleige and Pfaffl 2006, Gingrich et al. 2006)。样品的纯度和完整性无直接关联, 因此 RNA 样品的这两个性质是进行下游实验的最低要求。

样品 RNA 中是否有蛋白的污染可以通过 $\text{OD}_{260/280}$ 分光光度法来进行检测。 $\text{OD}_{260/280}$ 比值在 1.8 到 2.0 之间则表示该 RNA 质量好, 没有蛋白和苯酚的污染 (图 1B)。然而从分光光度仪上无法得到关于 RNA 完整性的信息。有几种方法可以用来检测 RNA 的完整性。传统的方法是通过甲醛琼脂糖凝胶电泳及 EB 荧光染料染色来观察。此方法中可观察到分子量一大一小 (核糖体 RNA, rRNA) 的两条尖锐的条带, 其中大分子量的条带亮度是小分子量条带亮度约两倍则提示 RNA 是完整的。这种方法成本低, 但 RNA 的完整性判断具有主观性, 并且需要大约 200ng 的总 RNA, 如果样品稀有, 则相对浪费。使用光密度扫描仪进行成像对 rRNA 条带的亮度进行定量可以改善上面的方法。虽然 28S/18S 的比值在不同组织和细胞类型中会有所变动, 当该比值在 1 至 2 之间则提示 RNA 样品的完整性程度。

RNA 完整性分析可通过微流体电泳系统 (Imbeaud et al. 2005) 得到大的改善, 如 Experion 全自动电泳系统 (Bio-Rad)。该系统在一个步骤中整合了 RNA 的完整性和浓度质量 (从皮克到纳克级) (图 1A 和 1C) 测定。该系统可生成一块虚拟胶, 电泳图和 28S/18S 比值, Experion 系统软件还可自动计算并报告 RNA 质量 (RQI) 指示值 (图 1C)。基于电泳图的多个标准 (Denisov et al. 2008), 该值可反应 RNA 样品的完整性。RQI 值在 1 (降解) 至 10 (完整) 之间, 可提供对 RNA 样品的客观评判, 该值可筛选出降解的样品。

通过确保所有 RNA 样品纯度和质量的一致性可以降低生物学重复的差异 (图 1D) (Imbeaud et al. 2005)。当一批 RNA 样品符合质量控制标准时, 我们建议这批样品可立即用于 qPCR 实验, 或者将其反转录为更加稳定的 cDNA, 以便在质量检测后保持其完整性。

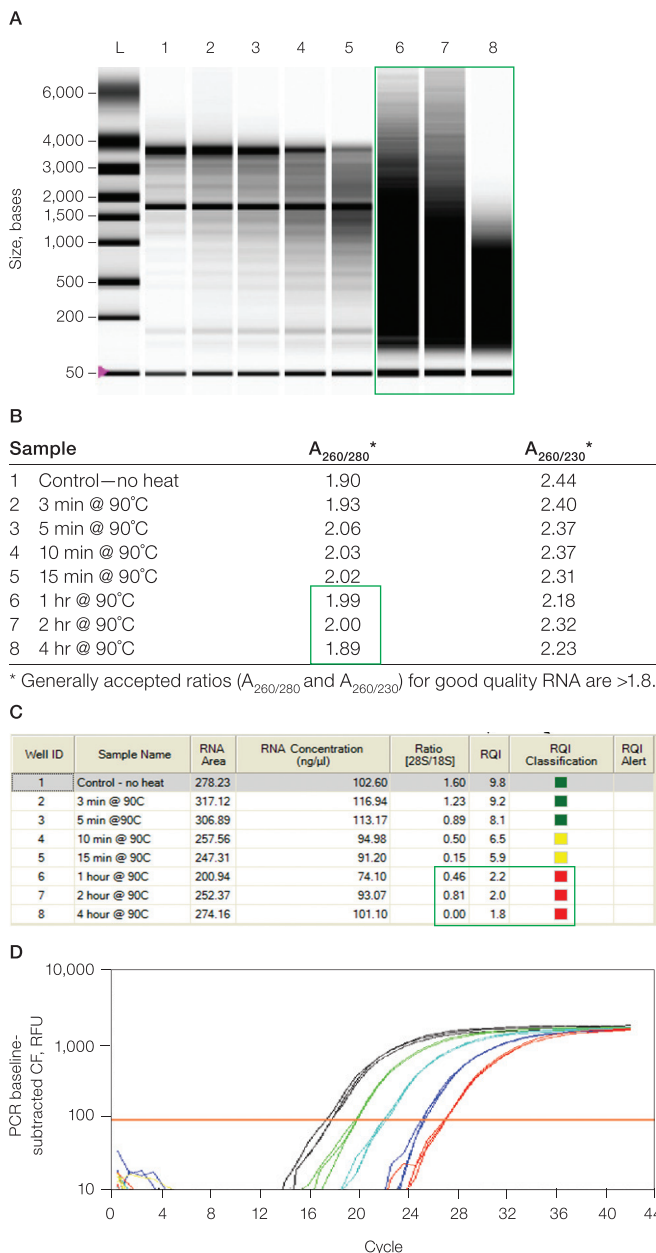


图 1. RNA 纯度和完整性分析。该图显示通过分光光度计和 Bio-Rad Expiration 全自动电泳仪系统对 RNA 纯度和完整性进行分析。小鼠肝脏总 RNA 样品通过在 90°C 加热不同时间进行降解，进行 RNA 纯度和完整性分析。绿色框显示，单单通过吸收值 (≥ 1.8) 提示总 RNA 样品的质量符合要求，但通过 Expiration 系统 RQI 完整性检测得到的低 RQI 值显示该样品已经降解。A, Expiration 软件生成的虚拟凝胶图像显示 RNA 样品不同的降解程度和 18S rRNA 条带逐渐降低的亮度；B, 使用 Nanodrop 分光光度计检测所有样品的 OD_{260}/OD_{280} 比值显示样品没有蛋白污染；C, 使用 Expiration 软件总结 RNA 完整性分析。28S/18S rRNA 比值和 RQI 提示热处理过的 RNA 样品完整性降低。通过颜色分类易于分辨出不符合 qPCR 的样品；D, 降解样品中 GAPDH 的 qPCR 分析 (Gingrich et al.2006)。图形显示降解样品中 C_q 值的增加。

4. 反转录

鉴于 RNase 在环境中广泛存在，我们建议在质量控制检测后将总 RNA 样品立即反转录为 cDNA。这种处理避免了 RNA 样品在反转录为 cDNA 之前因反复冻融而导致的 RNA 降解。在反转录步骤中，关键是抽提的 RNA 样品能连贯完整的覆盖基因组。一些基因长度很长，但有些序列的 RT 产物长度不足，特别是在 RT 引物只是与每个 mRNA 末端配对时。使用 mRNA 末端配对引物和 mRNA 序列随机位点配对引物的组合会得到每个基因的反转录产物群。此方法比单一的末端或随机位点配对转录本更具代表性，可对转录基因组进行更好的覆盖。

反转录缓冲液应该含有随机引物，RNaseH，特异性和灵敏度高的反转录酶，该酶应具有高动态范围，可对 1 μ g 至 1pg 的 RNA 进行反转录，其操作应简单快速。iScript™ (Bio-Rad) cDNA 合成试剂盒满足这些标准并适用于任何总 RNA 样品的反转录。我们建议为了减少不同生物学上重复样品的差异，每次反转录反应使用的 RNA 的量和反应时间应相同。RNA 的反转录本可在使用前一直保存于 -20°C 或 -80°C。

5. 引物和扩增子设计

引物的设计和目标序列的选择对产物的特异性和有效扩增来说至关重要。目标序列应该是唯一的，长度在 75 至 300bp 之间，GC 含量在 50 至 60% 之间，不含二级结构。我们建议引物的 GC 含量在 50 至 60% 之间，融解温度在 55-65°C 之间。应避免引物中含有连续的 G 或 C，但推荐在引物的末端含有 G 或 C。

目前有很多引物对设计和目标序列选择的程序。我们建议使用 Primer-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/indec.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd)，该程序由 NCBI 开发，运用 Primer3 运算法则来运行 (Rozen and Skaletsky 2000)。引物序列可在使用者选择的数据库中进行比对，以确保目标基因的特异性。MFOLD 程序 (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>) 用来分析扩增子是否存在阻碍有效扩增的二级结构 (Zuker

2003)(图2)。理想状态下,在qPCR反应中应至少定制两套寡核苷酸来检测它们在反应中的表现。

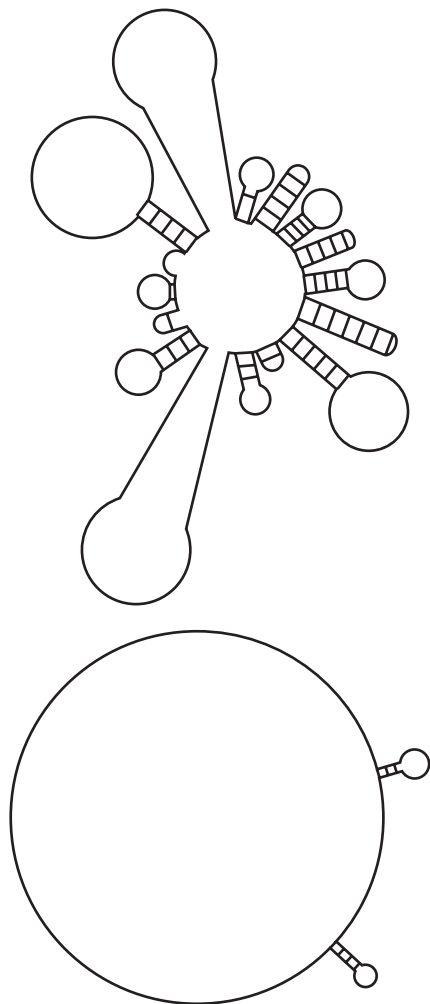


图2. 退火温度对扩增子二级结构的影响。MFOLD程序对扩增子进行的分析可预测在60°C(上图)存在大量二级结构,而在65°C(下图)存在少量二级结构。

6. qPCR 扩增与 qPCR 验证

qPCR 验证检测使用一系列标准品对引物退火温度范围、反应效率和反应特异性进行优化 (Bustin et al.2009)。这将确保反应条件、缓冲液和引物的优化及 cDNA 样品无 Tag 酶抑制剂污染。Bio-Rad 创建的网站资源 (www.

bio-rad.com/genomics/pcrsupport) 可帮助使用者进行 qPCR 设计和验证。验证检测的关键点总结如下:

退火温度、融解曲线分析、扩增子凝胶分析和无模板对照的确定

PCR 反应中的关键一步是引物与目标序列的退火。在合适的温度下,引物可有效的与其目标序列进行退火,与此同时降低了非特异性退火和引物二聚体的形成。最快确定退火温度的方法是使用带有温度梯度功能的热循环仪。Bio-Rad 的所有热循环仪和实时定量 PCR 仪均有温度梯度加热模块选项。研究者应对计算得出的引物退火温度附近的温度进行检测 (图 3A)。

检测 PCR 产物的特异性也非常重要。通过 PCR 反应后进行的融解曲线分析,可对引物退火的特异性进行检测。融解曲线应该显示出一个单一尖锐峰 (图 3B)。此外,每对引物至少有一个样品的扩增产物需要用合适的凝胶 (琼脂糖凝胶或可分辨更小 DNA 片段的聚丙烯酰胺凝胶) 来确定扩增子的大小是否正确 (图 4)。此外,所有的全自动电泳系统,如 Experion 全自动电泳系统 (使用 Experion DNA 1K 分析试剂盒) 可用于快速精确的确定扩增子大小。

因为大多数 qPCR 实验在一个扩增过程中会对多个基因进行研究,所以设计退火温度相近的不同引物,使得在同一次反应中使用的退火温度适合所有引物对就十分重要。每次运行中各对引物都应包括两个非模板对照 (NTC) 重复样以便检测缓冲液和溶液是否有 DNA 污染和引物二聚体。

标准曲线的建立 (评价 PCR 扩增效率)

PCR 扩增效率是指多聚酶把各种试剂 (dNTPs, 寡核苷酸和模板 cDNA) 转变生成扩增子的效率。每个循环扩增子的最大增量为两倍即代表 PCR 反应的效率是 100%。检测 PCR 反应的扩增效率非常重要,因为扩增效率可反映人为原因引起的 qPCR 问题。低扩增效率 (<90%) 可能由于 Tag 酶抑制剂的污染,过高或未优化的退火温度,时间较长或已失活的 Tag 酶,引物设计不合理或

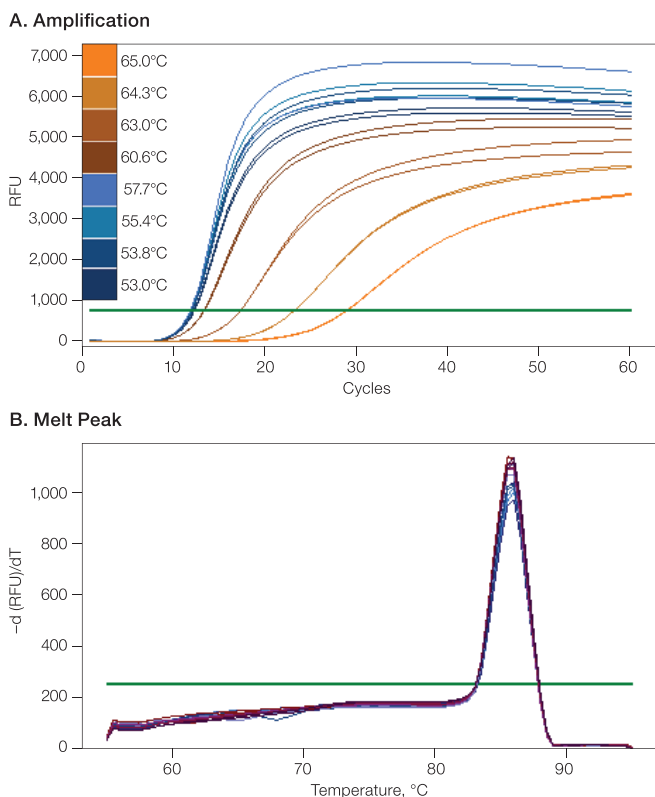


图 3. qPCR 引物的验证。使用梯度加热模块在一定退火温度范围内进行 qPCR 反应。扩增图显示在最低的几个退火温度 (53°C 至 57.7°C) 时, 扩增效率最高, 它们的 C_q 值最低; B, 融解曲线分析显示单一峰, 提示 PCR 产物为单一产物。

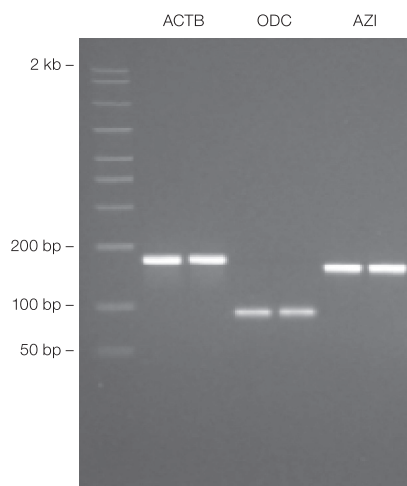


图 4. 对 PCR 产物进行凝胶分析。对扩增子的凝胶电泳分析显示凝胶中有和预期的扩增子大小相符的单一一条带出现。(ODZ, 鸟氨酸脱羧酶; AZI, 抗酶抑制剂)。

扩增子含二级结构。过高反应效率 (>105%) 一般是由引物二聚体或非特异性扩增。而引起过高或过低的反应效率最常见的原因包括移液器不准或不当的移液器操作技术。

标准曲线一般被用来确定 qPCR 的反应效率。标准曲线所用的模板一般是 cDNA 或质粒 cDNA。我们建议实验开始时从 cDNA 样品的最高浓度开始, 可设置 8 个 10 倍系列稀释的点来确保标准曲线能覆盖实验中所有可能会用到的模板浓度 (即形成宽的动态范围)。对每个稀释度来说, 标准 qPCR 流程中每个引物对要重复三次来确定 C_q 值。标准曲线是模板起始浓度的对数值对 C_q 值得到的。其后所得的线性回归直线的方程, Pearson 相关系数 (r) 或决定系数 (R^2) 可用来评价 qPCR 反应是否需要优化。

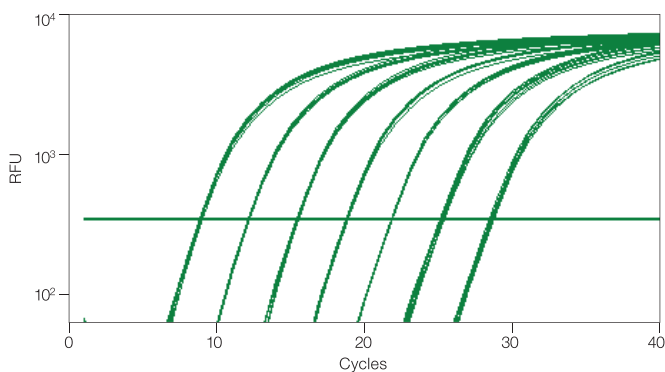
理想情况下, 一系列稀释样品产生的扩增曲线重复应是分布均匀的 (图 5A)。如果每次扩增都是两倍增, 那么荧光曲线之间的间隔可用公式 $2^n = \text{稀释因子}$ 确定, 这里 n 是各曲线在荧光阈值时的循环数差 (即不同曲线之间 C_q 值的差值)。例如, DNA 为 10 倍梯度稀释, 则 $2^n = 10$, 因此 $n = 3.32$, 即表示不同曲线的 C_q 值之间相差为 3.32 个循环。均匀间隔的扩增曲线 (图 5) 可产生线性的标准曲线 (图 5B), 其反应效率在 90 至 105% 之间。

标准曲线的 r 或 R^2 可代表实验数据符合回归曲线的程度, 即数据的线性化程度。线性化可检测重复孔之间的差异性, 不同起始模板拷贝数的扩增效率是否一致。重复孔之间如果有明显的 C_q 值差异, r 或 R^2 值会降低。qPCR 反应的理想 r 绝对值应 >0.990 或 R^2 值应 >0.980。删除标准曲线两末端的点可以得到可接受的斜率值 (效率) 和 R^2 值。标准曲线将最终确定每对引物对适用的 cDNA 浓度动态范围, 这关系到样品的稀释。

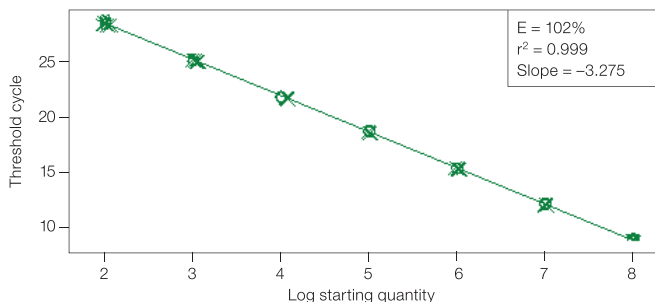
qPCR 试剂、仪器和分析软件

目前市场上供应各种商品化 qPCR 试剂盒。我们推荐使用 Bio-Rad 的 SsoFast EvaGreen 超混液, 该试剂含有 EvaGreen 染料, 这是一种饱和染料, 比 SYBR Green

A. Amplification



B. Standard Curve



C. Melt Peak

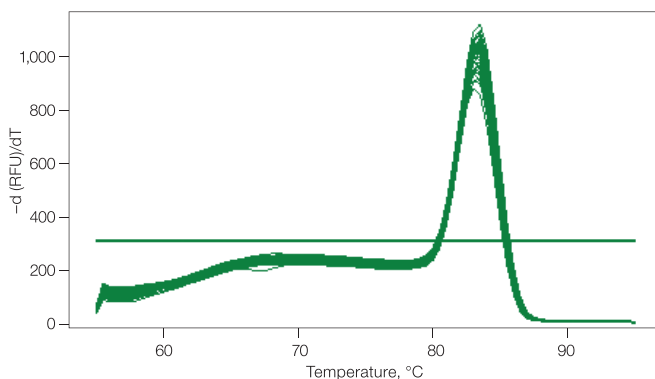


图 5. 标准曲线。A, 对系列稀释的模板进行 qPCR 实验并确定每个稀释度的 C_{q_i} 值。每个浓度的模板进行三次重复。注意, 三次重复的 C_{q_i} 值十分一致, 表明操作误差小; B, 以 C_{q_i} 值对模板拷贝数的对数 (或相对浓度) 作图进行标准曲线制作, 通过斜率得到扩增效率和 R^2 值。理想情况下, 每个稀释度的三个重复样品的扩增曲线的扩增效率均接近 100% (90-105%), R^2 值超过 0.98, 每个基因具有单一、尖锐的溶解曲线峰。C, 扩增子的融解曲线分析显示出单一峰。

的灵敏度更高。除此以外, Sso7d 融合多聚酶及优化缓冲液可抵抗对 Tag 酶有抑制作用的污染, 从而得到出色的重复性。

市场上现在有多种 qPCR 检测仪, 以下原则可用于选择合适的仪器:

1. 标准 96 孔规格, 样品体积在 10-50 μ l, 使用 0.2ml 低位反应板, 反应联管或反应管。
2. 可进行快速升降温并且具有温度梯度功能的加热模块。
3. 无需使用专利性的试剂、消耗品或荧光染料。

Bio-Rad 公司的 CFX96™ 和 CFX384™ 实时定量 PCR 仪可完全符合这些标准。

所有的 qPCR 仪都会有配套的数据分析软件, 我们推荐出色的软件应包括以下特点:

1. 可灵活的进行反应板设置, 在反应运行前, 运行中或运行后都可对反应孔进行描述和编辑。
2. 可对同一块反应板上运行的不同实验进行反应孔分组编辑。
3. 软件带有基因表达分析功能, 可进行多个内参基因 (Vandesompele et al. 2002) 和反应效率的标准化 (Pfaffl 2001)。
4. 可以把多块板的实验数据整合在一起进行大规模的基因研究。

Bio-Rad 的 CFX Manager 软件完全符合这些标准, 并与 CFX96 和 CFX384 实时定量 PCR 仪配套使用。

7. 数据分析

内参基因的选择

在 RT-qPCR 实验中, 内参基因被用来作为数据标准化的对照, 以校正作为模板的 cDNA 所存在的数量差异 (Gutierrez et al. 2008, Huggett et al. 2005, Vandesompele et al. 2002)。好的内参基因应该在不同实验条件下或不同时间点上, 在各个样品中的表达都无改变。某些基因如 GAPDH, β -actin 或 rRNA 通常被用作内参基因。虽然如此, 有大量的研究显示, 这些基因在不同组织或不同处理条件下的表达都有不同, 在这种情况下这些基因可

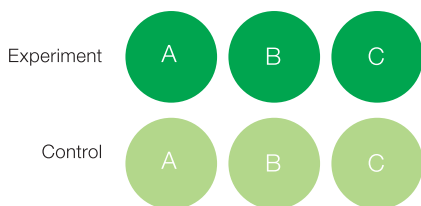
能并不适合被用作内参基因。因此内参基因需要通过实验数据进行仔细的筛选，我们建议通过以下流程进行筛选：

1. 在每个实验条件下或时间点下取至少一个或两个样品进行总 RNA 抽提，以便确定其纯度和质量（参照上面步骤 2 和步骤 3）。
2. 标准化样品浓度后以相同体积对每个样品进行反转录 PCR（步骤 4）。
3. 以每个 cDNA 样品为模板，取同样体积进行 qPCR 实验。
4. 比较不同条件下每个基因的 C_q 值。

不同条件或时间点下的 C_q 差异 (ΔC_q) 应不超过 0.5。因为任一特定的基因都可能受不同实验条件影响，我们建议在实验中同时检测至少三个或四个位于不同代谢途径中的特定内参基因，并对表达差异最小的几个基因进行几何平均以准确地标准化数据 (Vandesompele et al. 2002)。

8. 实验重复性与重现性

Biological Replicates



Technical Replicates

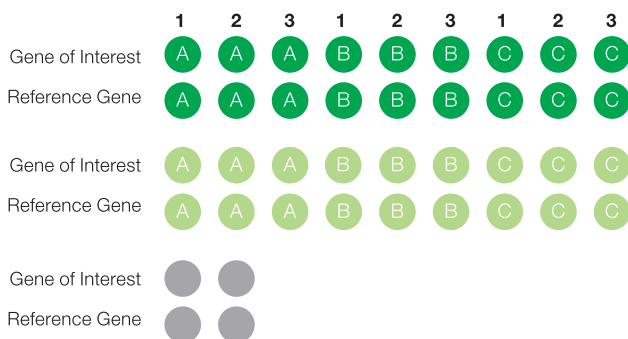


图 6. 实验的重复样。所有的实验都应该联合设置有生物学重复和技术重复样品。图中简单显示了对照 ■ 和处理/实验组 ■ 的三个生物学重复。对每个生物学样品，目标基因和内参基因都设了三个技术重复样。因此实验中共设置至少 36 个样品，加上两个 NTC ■ 重复样，总的反应孔数超过 40 个。

在基因表达实验中，有两个可变原因可能会影响实验结果：

1. 不同生物个体，组织或培养样品间基因表达水平的内在差异所导致的生物学差异。
2. 由移液操作和移液器本身等原因导致的实验过程本身存在的技术差异。

为减少生物学和技术差异的影响，一般认为在实验中至少要设置三个生物学样品重复，并且每个生物学样品至少有两个技术性重复 (图 6)。如果实验是在对照和处理样品之间进行基因表达水平比较，设置的三个生物学重复样品应该来源于在独立实验中分别进行处理的样品。

结论

RT-qPCR 是基因表达分析方法的选择之一，该方法灵敏度高，可检测极低浓度的 RNA 样品。然而，为确保数据的准确性，重复性和高质量，实验应遵守严格的标准操作流程。发表基因表达实验数据时，应如实汇报所有的实验细节和对照。这将有利于通过科学交流对实验数据进行正确评价，使实验数据能在不同实验室和不同实验中进行比较。

总之 qPCR 实验的关键步骤包括：

1. 实验设计应有合适数目的生物学重复及正确的对照样品设置。
2. 样品的获得应严格遵守实验流程中对采样、处理和保存的要求以确保重复性并减小重复样品间的标准偏差。
3. 对 RNA 的纯度和完整性进行质量控制。
4. 将总 RNA 反转录成 cDNA 的反转录反应。
5. qPCR 实验中正确的引物设计、引物退火温度确定、基因扩增效率摸索。
6. qPCR 实验数据分析中内参基因选择和统计方法计算。

MIQE 指南提供了发表被认可的 RT-qPCR 实验结果所需考虑的所有参数。通过这篇文章我们可以看到在 MIQE 列表中所有最重要的条例，这些可用于实践并确保得到高质量结果。

参考文献

- Bustin SA et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611-622.
- Denisov V et al. (2008). Development and validation of RQI: An RNA quality indicator for the Experion automated electrophoresis system. *Bio-Rad Bulletin* 5761
- Fleige S and Pfaffl MW (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27, 126-139.
- Garson JA et al. (2009). Unreliable real-time PCR analysis of human endogenous retrovirus-w (HERV-W) RNA expression and DNA copy number in multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25, 377-378; author reply 379-381.
- Gingrich J et al. (2006). Effect of RNA degradation on the data quality in quantitative PCR and microarray experiments. *Bio-Rad Bulletin* #5452
- Gutierrez L et al. (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: A serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J* 6, 609-618.
- Hellemans J et al. (2007). Qbase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8, R19.
- Huggett J et al. (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun* 6, 279-284.
- Imbeaud S et al. (2005). Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 33, e56.
- Lefever S et al. (2009). RDML: Structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res Advance Access published February 17, 2009* (accessed May 21, 2009).
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Rozen S and Skaletsky HJ (2000). Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 365-386.
- Vandesompele J et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, research0034.1-0034.11
- Zuker M (2003). MFOLD web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Jo Vandesompele for his insightful comments and helpful contributions to this paper.

Bio-Rad's real-time thermal cyclers are licensed real-time thermal cyclers under Applera's United States Patent 6,814,934 B1 for use in research, human in vitro diagnostics, and all other fields except veterinary diagnostics. This product is covered by one or more of the following U.S. patents or their foreign counterparts owned by Eppendorf AG: U.S. Patent Nos. 6,767,512 and 7,074,367.

EvaGreen is a trademark of Biotium, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Biotium, Inc. to sell reagents containing EvaGreen dye for use in real-time PCR, for research purposes only.

Practice of the patented 5' Nuclease Process requires a license from Applied Biosystems. The purchase of these products includes an immunity from suit under patents specified in the product insert to use only the amount purchased for the purchaser's own internal research when used with the separate purchase of Licensed Probe. No other patent rights are conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

CFX Manager software is for use with authorized real-time instrument or thermal cycler. Please see user manual for complete licensing statement.

Nanodrop is a trademark of Thermo Fisher Scientific, Inc.

Information in this tech note was current as of the date of writing (2009) and not necessarily the date this version (rev A, 2009) was published.

伯乐生命医学产品（上海）有限公司
地址：上海市浦东东方路18号
保利广场E栋3楼
电话：021-6169 8500
传真：021-6169 8599
邮编：200120

北京办事处：
地址：北京朝阳区曙光西里5号
A栋凤凰置地广场22楼
电话：010-5939 0088
传真：010-5939 0160
邮编：100028

广州办事处：
地址：广州市环市东路403号
广州国际电子大厦1302-03室
电话：020-8732 2339
传真：020-8732 2332
邮编：510095

武汉办事处：
地址：湖北省武汉市武昌区临江大道96号
武汉万达中心2008-09室
电话：027-8380 6255
传真：027-8380 6265
邮编：430060

伯乐公司中国呼叫中心：800-820-5567（国语），400-820-3630（手机） 欢迎访问：www.bio-rad.com



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Web site www.bio-rad.com **USA** 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 01 877 89 01 **Belgium** 09 385 55 11 **Brazil** 55 11 5044 5699
Canada 905 364 3435 **China** Shanghai 86 21 6169 8500 **Beijing** 86 10 5939 0088 **Toll-free Tech Support** 800 820 5567
Czech Republic 420 241 430 532 **Denmark** 44 52 10 00 **Finland** 09 804 22 00 **France** 01 47 95 69 65 **Germany** 089 31 884 0
Greece 30 210 9532 220 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 36 1 459 6100 **India** 91 124 4029300 **Israel** 03 963 6050 **Italy** 39 02 216091
Japan 03 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 0318 540666 **New Zealand** 64 9 415 2280
Norway 23 38 41 30 **Poland** 48 22 331 99 99 **Portugal** 351 21 472 7700 **Russia** 7 495 721 14 04 **Singapore** 65 6415 3188
South Africa 27 861 246 723 **Spain** 34 91 590 5200 **Sweden** 08 555 12700 **Switzerland** 026 674 55 05 **Taiwan** 886 2 2578 7189
Thailand 800 88 22 88 **United Kingdom** 020 8328 2000