



如何对 qPCR 数据进行统计分析

Real-time qPCR 就是在 PCR 扩增过程中，通过荧光信号，对 PCR 进程进行实时检测。由于在 PCR 扩增的指数时期，模板的 Ct 值和该模板的起始拷贝数存在线性关系，所以成为定量的依据。由于常规的 PCR 的缺点，real-time qPCR 由于其操作简便，灵敏度高，重复性好等优点发展非常迅速。设在已经涉及到生命科学研究的各个领域，比如基因的差异表达分析，SNP 检测，等位基因的检测，药物开发，临床诊断，转基因研究等。

我想做过 qPCR 的研究者用过的仪器也无怪乎 ABI 7000、7300、7500、7700、7900HT、StepOnePlus™、StepOne™、PRISM® StepOne™ 系列；BIO-RAD 的 CFX96、iCycler iQ5®、MyiQ®、MJ Research Chromo4™ Opticon 系列；Stratagene Mx™ 系列；Roche LightCycler® 系列；Eppendorf Masericycler®；Corbett Rotor-Gene™；Cepheid SmartCycler® 和 BIOER 的 LineGene 系列。其仪器的设置和数据输出方式基本类似，相差不大。有做过 qPCR 实验经验的研究者可能很快就能熟悉其不同于 PCR 的结果 Ct 值，以及数据的常用运算方法比较 Ct 方法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。那么这个数据到底有没有统计意义呢？这个该如何分析？我们来逐渐了解相对定量 qPCR 的数据统计分析。

首先在数据分析之前，要确保数据的准确性，也就是实验过程的各个部门都要严格操作，也就是 MIQE 标准（具体可见 Bustin SA *et al* Clin Chem 55,611-622 2009）。这些都做到了，那么就可以来分析 Ct 数据了。

统计分析，至少有 3 个数据才可以。那就是在设计实验中，每组至少要有 3 个生物学重复(也就是 3 个不同的样本)。这个和 qPCR 的 3 个 PCR replicate 是完全不同的概念(这儿是同一个样本的 3 个重复)。

下面我们就以一个处理分析的实验来做说明如何来数据统计分析。1 个处理组和 1 个对照组，每组有 3 个样本（也就是生物学重复），来检测某目的基因 (target，设定内参基因为 reference)，在这个处理中，目的基因的表达是否受到抑制？同时这个抑制作用是否有统计学意义。

不管是哪个 qPCR 仪，都可以做此检测，数据也都可以用 excel 表归纳如下：

Group	Sample	Ct target	Ct mean of T	Ct reference	Ct mean of R
CON	sample1	22.89	22.90	15.29	15.63
		22.82		15.91	
		23.00		15.69	
	sample2	22.60	22.64	15.83	15.60
		22.46		15.71	
		22.85		15.27	
	sample3	22.49	22.53	14.81	14.98
		22.49		14.79	
		22.60		15.34	
TRT	sample1	25.32	25.31	14.98	15.18
		25.40		15.33	
		25.20		15.22	
	sample2	25.70	25.60	15.46	15.38



		25.50		15.45	
		25.61		15.22	
	sample3	25.49	25.60	15.25	15.05
		25.68		14.6	
		25.64		15.29	

首先每个样品的目的基因和内参基因的 3 个 PCR replicate 要求出平均值，这个仅仅是技术重复，也就是确定这个数据是可靠的。然后求出在每个样品的目的基因的变化量也就是(目的基因的量和其对应的内参基因的量相比，也就是 $2^{-\Delta Ct}$)。然后再平均对照组中的 3 个 $2^{-\Delta Ct}$ ，在此例子中数据为 0.006482，然后所有 $2^{-\Delta Ct}$ 的都和 0.006482 相比即可到 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，也就是倍数变化 (fold change 或者 relative expression)。

下面就可以对 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 或者 $2^{-\Delta Ct}$ 或者就行统计分析，Ct 的 2 种形式都可以进行统计分析，唯独不能对 Ct 进行统计分析。具体统计分析的方法，任何统计分析软件都可以用比如

Group	Sample	Ct target	Ct mean of T	Ct reference	Ct mean of R	$2^{-\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
CON	sample1	22.89	22.90	15.29	15.63	0.006464	0.99724
		22.82		15.91			
		23.00		15.69			
	sample2	22.60	22.64	15.83	15.60	0.007634	1.17773
		22.46		15.71			
		22.85		15.27			
	sample3	22.49	22.53	14.81	14.98	0.005348	0.82512
		22.49		14.79			
		22.60		15.34			
TRT	sample1	25.32	25.31	14.98	15.18	0.000892	0.13768
		25.40		15.33			
		25.20		15.22			
	sample2	25.70	25.60	15.46	15.38	0.000835	0.12875
		25.50		15.45			
		25.61		15.22			
	sample3	25.49	25.60	15.25	15.05	0.000664	0.10243
		25.68		14.6			
		25.64		15.29			

SPSS, GraphPad 等。这里展示一下 GraphPad 分析的结果。



