



实时荧光定量PCR技术的原理及应用 (Real time Quantitative PCR)



中科大生命学院仪器实验中心

梁长流

2007-9-17

提 纲:

- 实时荧光定量PCR原理
- 实时荧光定量PCR的方法介绍
- 实时荧光定量PCR在医学和科研中的应用

实时荧光定量PCR定义：

在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号累积实现了实时监测整个PCR进程，对起始模板进行定量分析的方法。

与普通PCR的区别

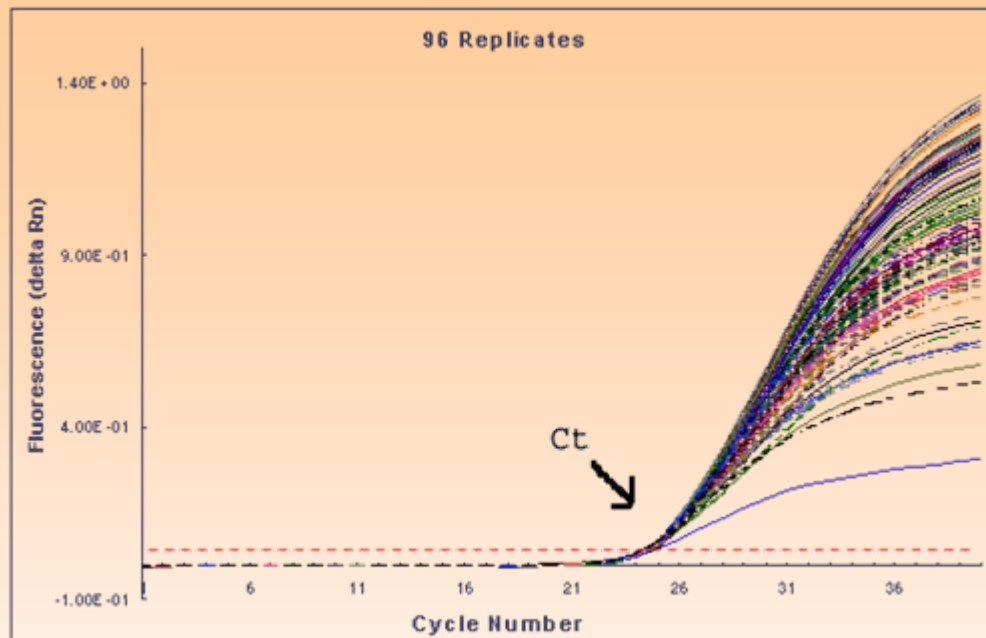
普通PCR技术:

在PCR结束后对终点产物进行定量分析。

实时定量PCR技术:

实时检测PCR扩增，在扩增的指数期对起始模板进行定量。

纵轴：荧光信号量



横轴：PCR反映循环数

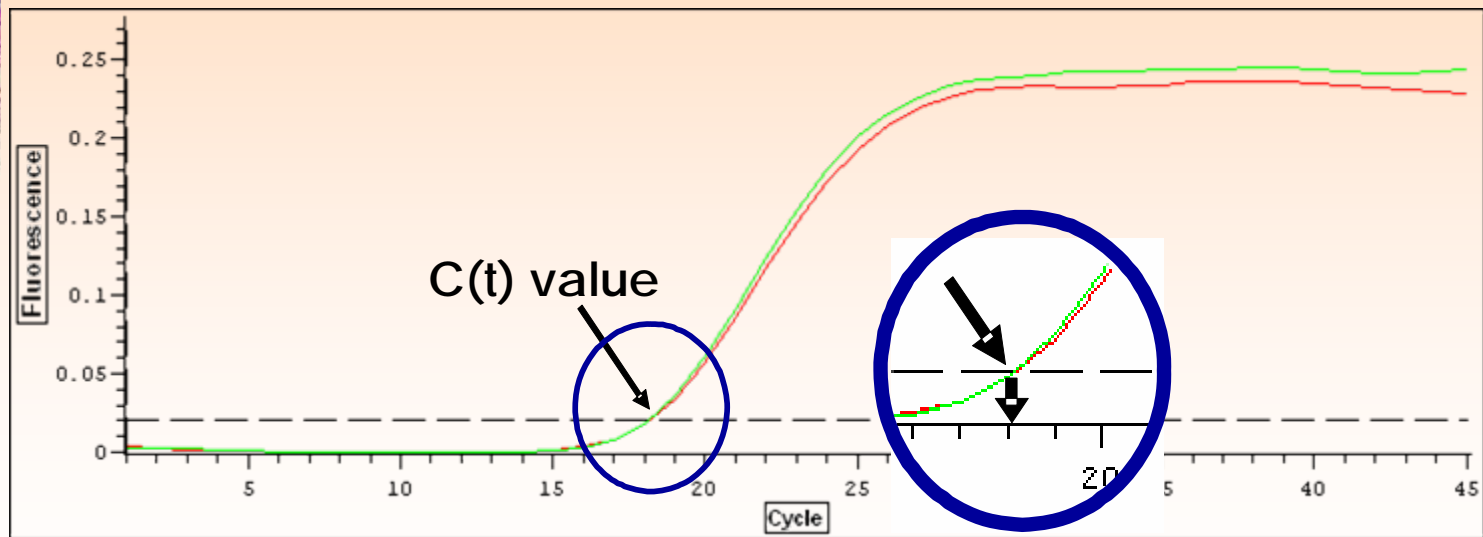
相同模板进行96次扩增，终点处产物量不恒定；

Ct值则极具重现性

Ct值

Ct值的定义：

扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增产物的循环数。此时扩增是呈对数期增长。



定量PCR的数学原理

- 理想的PCR反应：

$$X = X_0 * 2^n$$

- 非理想的PCR反应：

$$X = X_0 (1 + Ex)^n$$

n：扩增反应的循环次数

X：第n次循环后的产物量

X_0 ：初始模板量

Ex：扩增效率

在扩增产物达到阈值线时:

$$X_{Ct} = X_0 (1+Ex)^{Ct} = M \quad (1)$$

X_{Ct} : 荧光扩增信号达到阈值强度时扩增产物的量.

在阈值线设定以后,它是一个常数,我们设为M

方程式(1)两边同时取对数得:

$$\log M = \log X_0 (1+Ex)^{Ct} \quad (2)$$

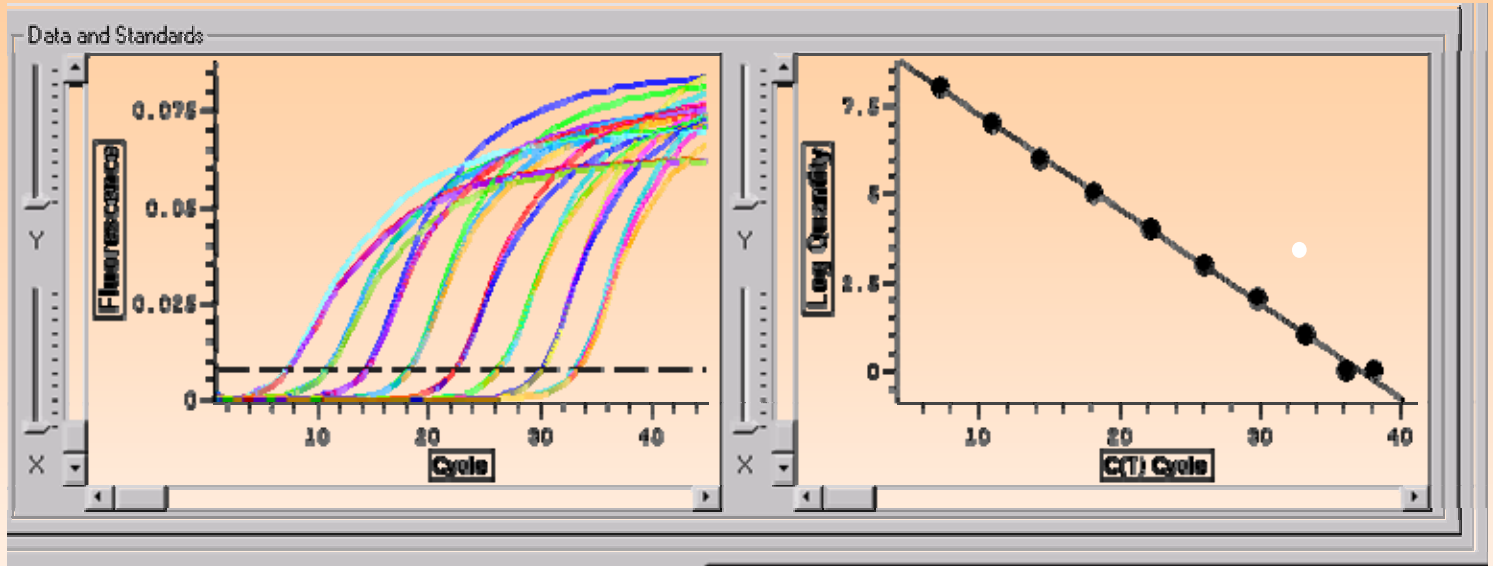
整理方程式(2)得:

$$\log X_0 = -\log(1+Ex) * Ct + \log M \quad (3)$$

最后结论:

Log X_0 与Ct呈线性关系, 根据样品扩增的Ct值就可计算出样品中所含的模板量

标准曲线



Log起始拷贝量与Ct呈线性关系，通过已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线，根据样品Ct值，就可以计算出样品中所含的模板量

提 纲:

- ❑ 实时荧光定量PCR原理
- ❑ 实时荧光定量PCR的方法介绍
- ❑ 实时荧光定量PCR在医学和科研中的应用

DNA 产物的荧光标记

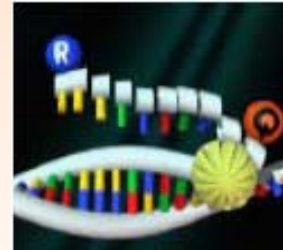
非特异性荧光标记：

1、SYBR Green



特异性荧光标记：

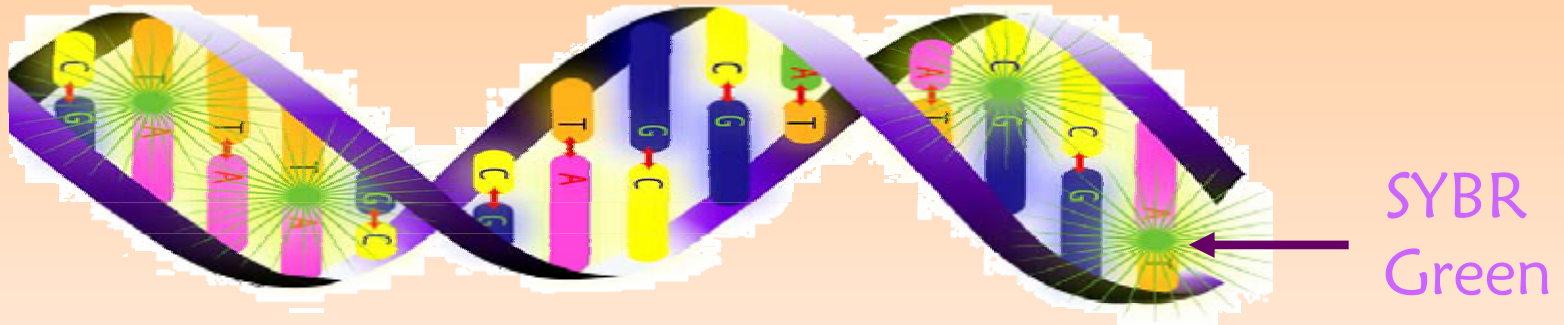
2、TaqMan



3、Molecular Beacon

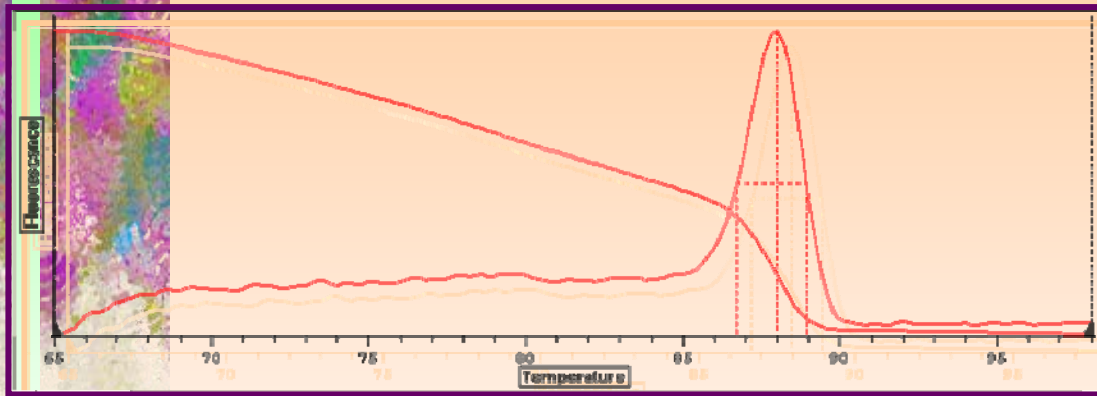


方法1--SYBR Green法工作机制



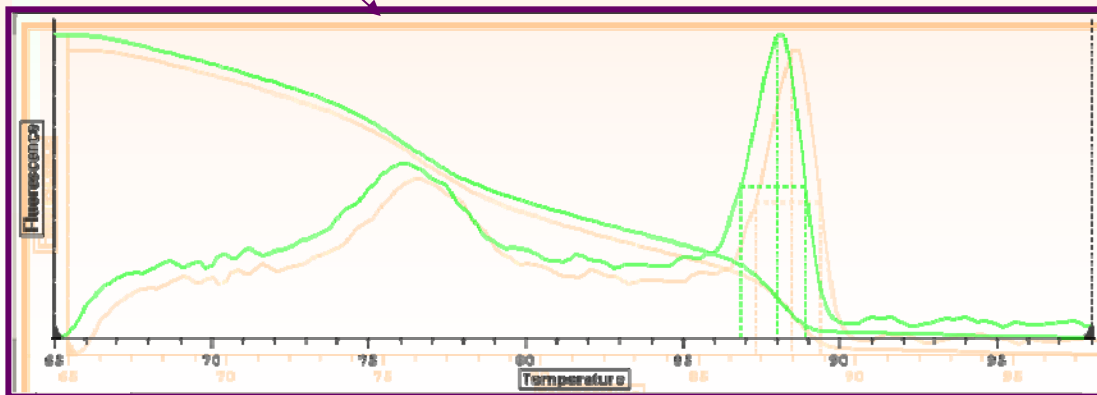
- SYBR Green 只有和双链DNA结合后才发荧光
- 变性时，DNA双链分开，无荧光
- 在延伸结束阶段采集荧光信号。
- SYBR Green也能和非特异的双链DNA结合发光，所以必须在反应结束时做溶解曲线分析。

SYBR Green 熔解曲线分析



融解曲线分析，单一峰
无非特异性荧光，定量
准确

非特异性产物



融解曲线分析，出现杂峰
其他产物出现非特异性荧光，因此定量不准确

PCR反应体系的建立及优化

- ❑ SYBR Green 使用浓度: 太高抑制Taq酶活性, 太低, 荧光信号太弱, 不易检测
- ❑ Primer: 引物的特异性高, 否则扩增有杂带, 定量不准
- ❑ $MgCl_2$ 的浓度: 可以降低到1.5mM, 以减少非特异性产物
- ❑ 反应Buffer体系的优化
- ❑ 反应温度和时间参数: 由酶和引物决定
- ❑ 其他与常规PCR相同

SYBR Green法优缺点

优点

- ❑ 对DNA模板没有选择性
--适用于任何DNA
- ❑ 使用方便
--不必设计复杂探针
- ❑ 非常灵敏
- ❑ 便宜

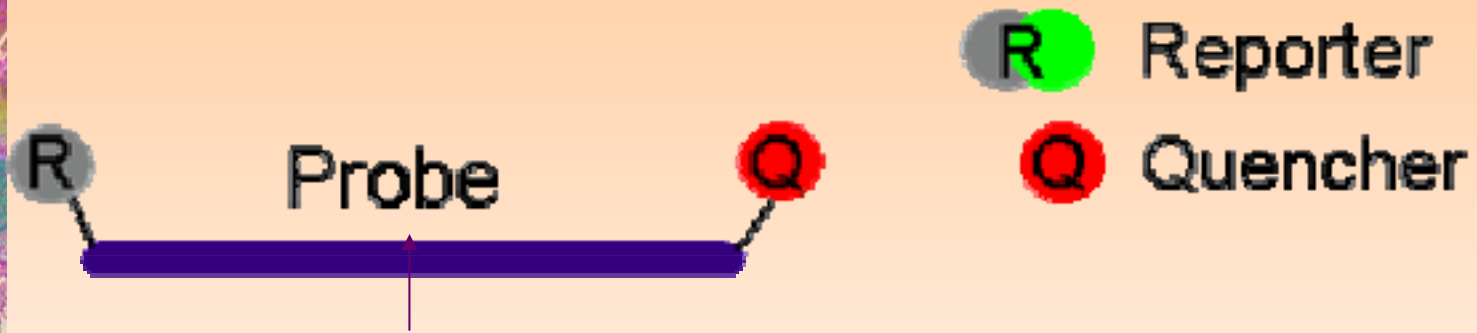
缺点

- ❑ 容易与非特异性双链DNA结合，产生假阳性

但可以通过融解曲线的分析，优化反应条件
- ❑ 对引物特异性要求较高

方法2--TaqMan法

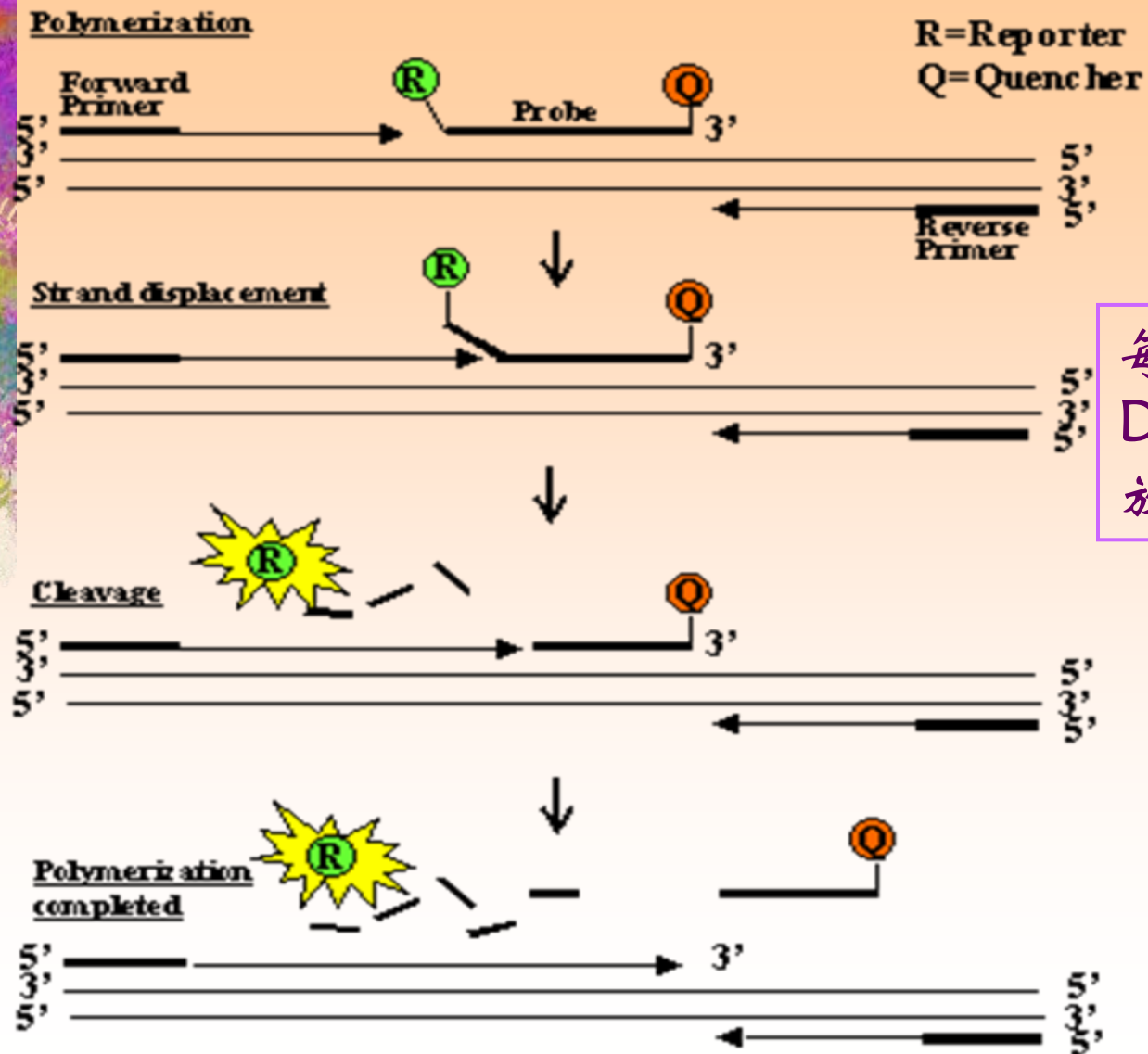
TaqMan---水解型杂交探针



与目标序列互补

- ❖ 5' 端标记有报告基团 (Reporter, R) ， 如FAM、VIC等
- ❖ 3' 端标记有荧光淬灭基团 (Quencher, Q)
- ❖ 探针完整，R所发射的荧光能量被Q基团吸收，无荧光，R与Q分开，发荧光
- ❖ Taq酶有 5' →3' 外切核酸酶活性，可水解探针

TaqMan法工作原理



每扩增一条
DNA分子，释
放一个荧光信号

TaqMan法PCR反应的建立

1、引物、探针的设计:

探针 T_m 为 $68-70^{\circ}\text{C}$ ， $<30\text{ bp}$ ，5'不能有G，G可能会淬灭荧光素，引物尽量靠近探针，扩增片段 $<400\text{ bp}$ ，引物 T_m 为 $59-60^{\circ}\text{C}$

2、反应参数的确定:

一般为： 95°C ，3min

94°C ，15S

60°C ，60S

} 40cycles

(Taq酶 $5' \rightarrow 3'$ 外切酶活性在 60°C 最高也可通过温度梯度优化退火温度)

3、优化引物和探针浓度: 获得最小Ct值，最大信号/背景比值

引物浓度： $50-900\text{nM}$

探针浓度： $50-250\text{nM}$

4、其他与常规PCR相同

TaqMan法优缺点

优点

- ❑ 对目标序列的高特异性
 - 阴性结果确定
- ❑ 引物设计相对简单
- ❑ 重复性比较好

缺点

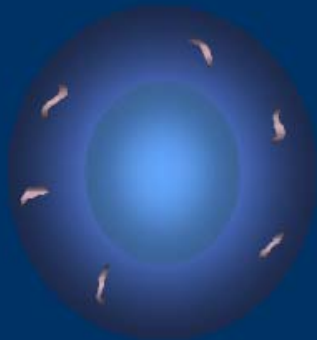
- ❑ 只适合一个特定的目标
- ❑ 委托公司标记，价格较高

提 纲:

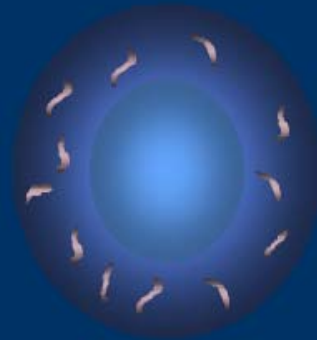
- 实时荧光定量PCR原理
- 实时荧光定量PCR的方法介绍
- 实时荧光定量PCR在医学和科研中的应用

两种定量目标

绝对定量



相对定量



“600个拷贝”

“增加10倍”

两种定量的不同方法

- 绝对定量检测起始模板数的精确拷贝数，
 - 标准曲线法
- 相对定量是确定经过不同处理的样本之间基因的表达差异
 - $2^{-\Delta C(t)}$
 - 双标准曲线法

绝对定量通过标准品定量

绝对定量的标准样品：

已知拷贝数的质粒DNA，做系列稀释。

标准样品的种类：

- 含有和待测样品相同扩增片段的克隆质粒
- 含有和待测样品相同扩增片段的cDNA
- PCR的产物

相对定量通过内标定量

- 内标通常是 β -actin、GAPDH 基因等看家基因
- 在细胞中的表达量或在基因组中的拷贝数恒定，受环境因素影响小
- 内标定量结果代表了样本中所含细胞或基因组数量



谢谢！