

实时荧光定量 PCR

荧光定量 PCR (Realtime fluorescence quantitative PCR, qPCR) 也称作实时荧光定量 PCR。它是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号累积实时检测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对初始模板进行定量分析的方法。该技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出, 它的出现解决了传统 PCR 不能对初始模板定量分析的问题。荧光定量 PCR 具有准确性高、灵敏度高、特异性强等优点, 目前已广泛应用于分子生物学研究和医学研究等领域。

荧光定量 PCR 原理

在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 随着 PCR 反应的进行, PCR 反应产物不断累积, 荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环收集一个荧光强度信号, 通过荧光强度变化检测产物量的变化, 最终得到得到一条荧光扩增曲线图, 扩增曲线横坐标表示循环数, 纵坐标表示荧光强度。

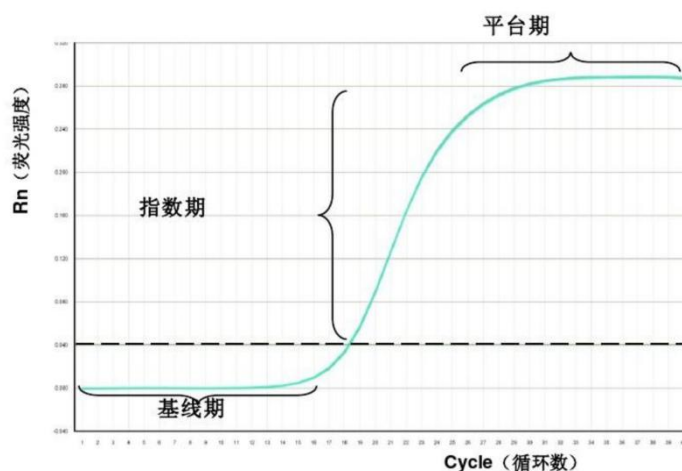


图 1 : qPCR 扩增曲线图

一般而言, 荧光扩增曲线可以分为三个阶段: 荧光背景信号阶段 (基线期)、荧光信号指数扩增阶段和平台期。在荧光背景信号阶段, 扩增的荧光信号被荧光背景信号所掩盖, 无法判断产物量的变化; 在平台期, 扩增产物已不再呈指数级的增加, PCR 的终产物量与起始模板量之间没有线性关系 根据最终的 PCR 产物量也不能计算出起始 DNA 拷贝数; 只有在荧光信号指数扩增阶段, PCR 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系。

荧光定量 PCR 常用术语

在了解荧光定量 PCR 如何对初始模板进行定量之前, 需要了解几个在荧光定量 PCR 分析中常用的术语:

- 基线: 实时荧光定量 PCR 反应的基线是指在 PCR 的最初几个循环中 (一般为 3-15 个循环) 的信号水平。此阶段的荧光信号变化量极小。低水平的基线信号相当于反应的背景或噪声。每个实时荧光定量 PCR 反应的基

线应通过用户分析或扩增曲线自动分析，根据经验确定。基线的设置，会影响到荧光阈值及 Ct 值。

- 荧光阈值：荧光阈值是在荧光扩增曲线上人为设定的一个值，它可以设定在荧光信号指数扩增阶段任意位置上，但一般荧光阈值的缺省值是 PCR 反应前 3-15 个循环荧光信号标准偏差的 10 倍。
- CT 值：CT 值指的是 PCR 扩增过程中扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数。
- 标准曲线：标准曲线是标准物质的物理/化学属性跟仪器响应之间的函数关系。对已知拷贝数的标准样品做系列稀释，对不同稀释度的标准样品进行荧光定量 PCR 并记录 Ct 值，根据 Ct 值及拷贝数的对数绘制得到标准曲线，标准曲线的纵坐标代表起始拷贝数的对数，横坐标代 Ct 值。

如何实现对初始模板的定量

利用实时荧光定量 PCR 对样品的初始模板量进行定量分析，需要利用已知起始拷贝数的标准品作出标准曲线，再通过荧光定量 PCR 获得未知样品的 Ct 值，最后从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

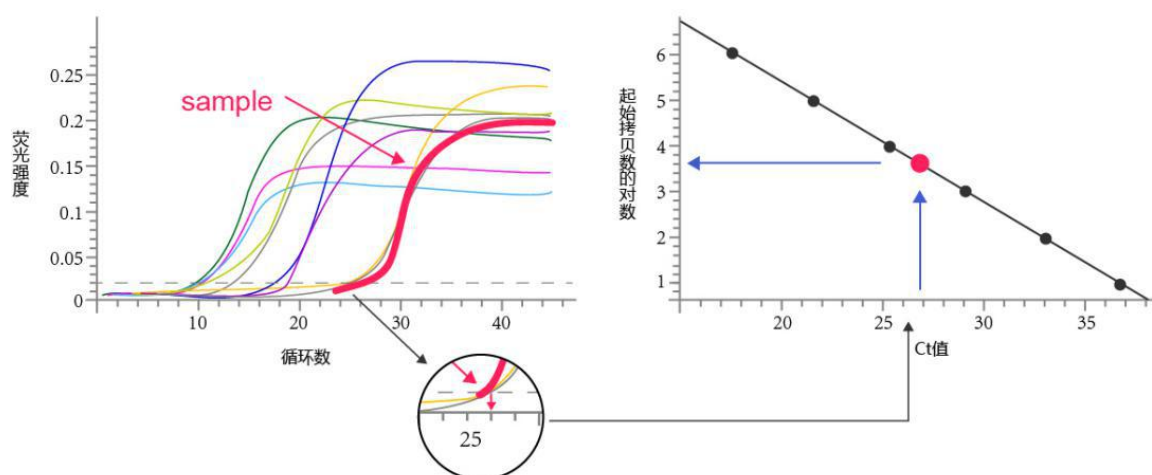


图 3：对初始模板进行定量分析

标准曲线绘制

标准品的制备

设计特定引物，利用 PCR 对目的基因片段进行扩增，随后将目的基因片段克隆至载体中，测序验证是否为阳性重组质粒，最后收集阳性克隆质粒作为标准品。

绘制标准曲线

测定质粒的浓度，依据公式计算出质粒的拷贝数。对质粒进行系列稀释，分别作为模板进行荧光定量 PCR 并记录 Ct 值。最后依据起始拷贝数的对数及 Ct 值绘制标准曲线，得到标准方程。当需要对起始模板进行定量时，只需要

得到扩增曲线，读得 Ct 值，带入标准方程即可对起始模板定量。

荧光标记方法

实时荧光定量 PCR 荧光标记方法可分为荧光染料和荧光探针两类，染料类荧光定量 PCR 是利用与双链 DNA 小沟结合发光的理化特征指示扩增产物的增加；探针类荧光定量 PCR 是利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物的增加。

荧光染料

染料法荧光定量 PCR 是利用荧光染料与双链 DNA 小沟结合发光的理化特征指示扩增产物的增加。现以最常用的 SYBR Green I 为例，介绍染料法荧光定量 PCR 的工作原理：



图 3：荧光染料法原理

SYBR Green I 是一种荧光染料，可与双链 DNA 非特异性结合。在游离状态下，SYBR Green I 发出微弱的荧光，但一旦与双链 DNA 结合，其荧光增加 1000 倍。一个反应发出的全部荧光信号与出现的双链 DNA 量呈比例，且会随扩增产物的增加而增加，可通过荧光信号的增加来记录产物的增加。

荧光探针

探针为一段寡核苷酸，可与 DNA 序列特异性结合，一个模板结合一个探针。探针 5' 端具有报告基团 (R)，可发荧光；3' 端有荧光淬灭基团 (Q)，能吸收荧光。探针完整时 R 基团所发射的荧光能量被 Q 基团吸收，PCR 仪检测不到荧光信号。探针被酶水解后，R 与 Q 分开，PCR 仪可检测到荧光信号。

Taq 酶有 5' → 3' 外切核酸酶活性可水解探针，在 PCR 延伸阶段探针被 Taq 酶酶切降解，报告基团 (R) 与淬灭基团 (Q) 分离，荧光监测系统可接收到荧光信号。每扩增一条 DNA 分子，释放一个荧光信号，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

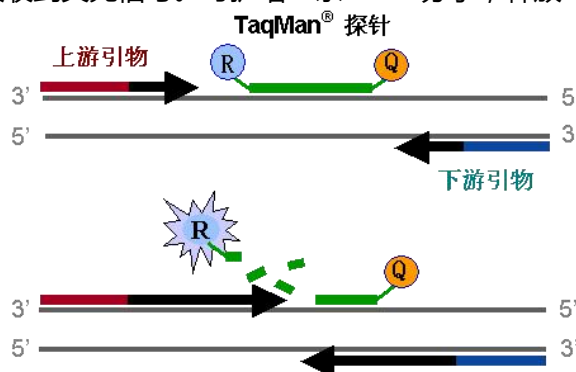


图 4：探针原理

目前已经开发出来的探针有 Taq Man 探针、Taq man MGB 探针、双杂交探针、分子信标、Lux 杂交探针、Simple probe 探针等。

探针法与染料法对比

	探针法	染料法
优点	<ul style="list-style-type: none"> ● 特异性高 ● 重复性好 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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 ● 成本低
缺点	<ul style="list-style-type: none"> ● 只适合一个特定的目标 ● 探针价格较高 	<ul style="list-style-type: none"> ● 容易与非特异性双链 DNA 结合，产生假阳性 ● 对引物特异性要求高

荧光定量 PCR 应用

实时荧光 PCR 技术已广泛应用于临床及生命科学研究的各个领域。在科研方面可定量分析各种基因的表达分析，基因突变和多态性分析，单核苷酸多态 SNP 测定及易位基因的检测；在医疗方面可用于免疫组化分析、临床疾病早期诊断、病原体检测、耐药性分析、肿瘤微小残留病变研究等。

更多阅读

[荧光定量 PCR 常见问题及分析解决](#)

[逆转录 PCR 技术介绍](#)

[巢式 PCR 技术介绍](#)

参考文献

[1] Mikael KA, Jose MA, Martin B, et al. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine[J], 2006, 27: 95-125 ;

[2] 纪冬, 辛绍杰等. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(4): 598-600;

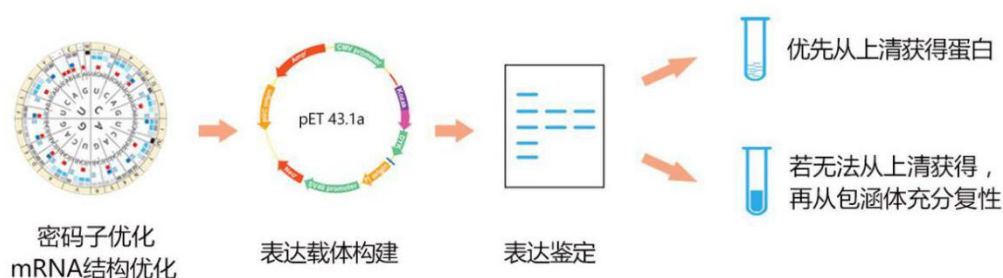
[3] 陈旭, 齐凤坤等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(8) : 148-155 ;

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

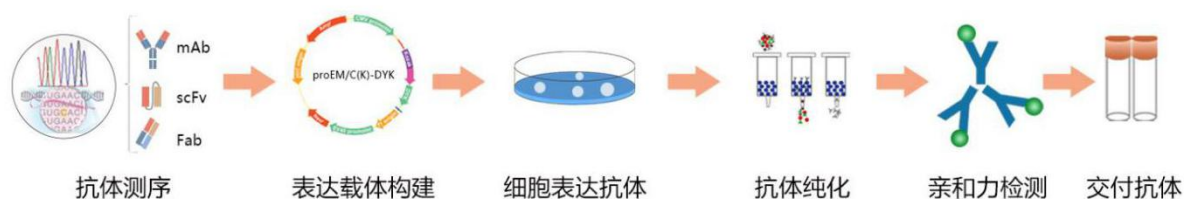
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

