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。

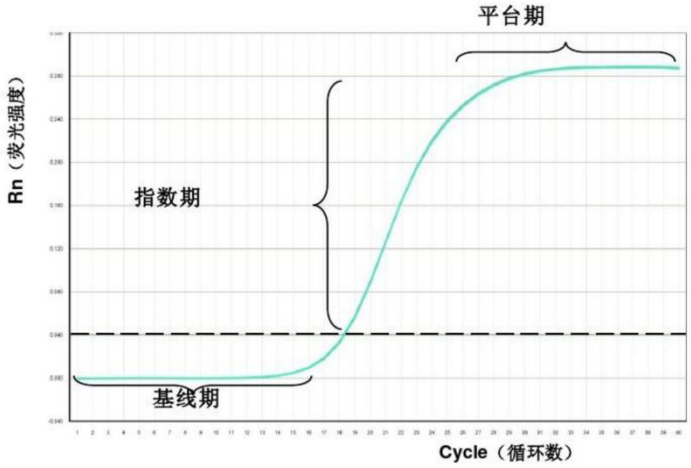


图 1：qPCR 扩增曲线图

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。

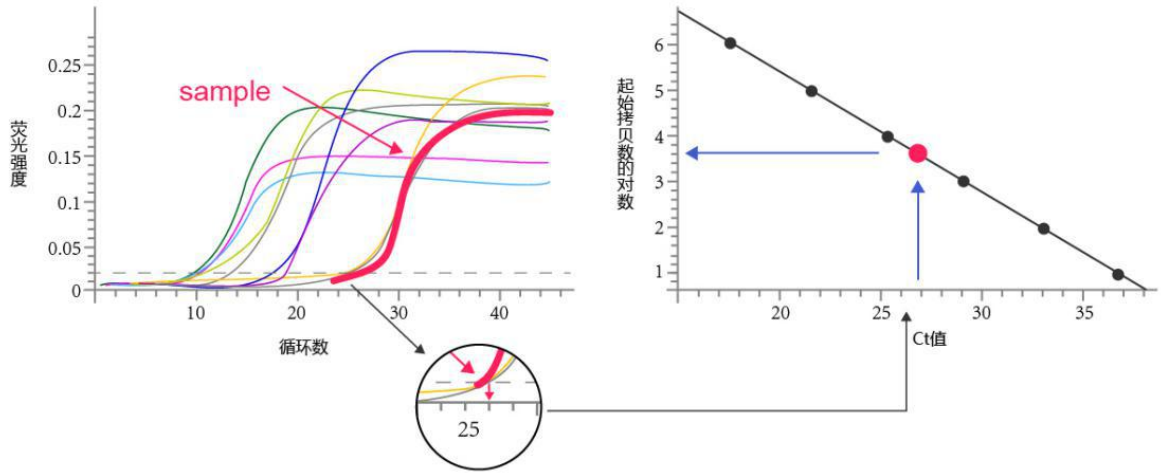


图 3：对初始模板进行定量分析

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：

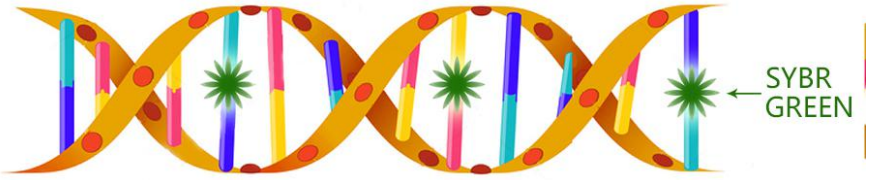


图 3：荧光染料法原理

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。

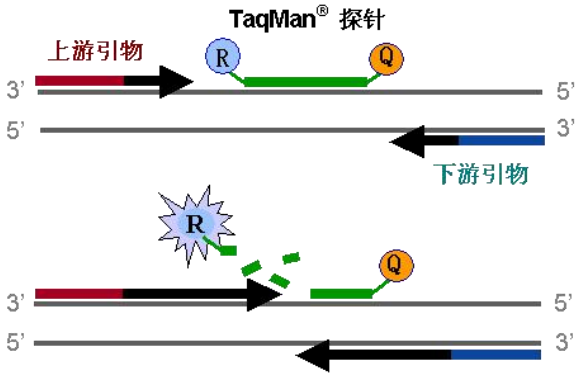


图 4：探针原理

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 proble 探针等。

探针法与染料法对比

	探针法	染料法
优点	● 特异性高 ● 重复性好	● 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	● 只适合一个特定的目标 ● 探针价格较高	● 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中。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 poly-merase 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；

更多优质服务推荐

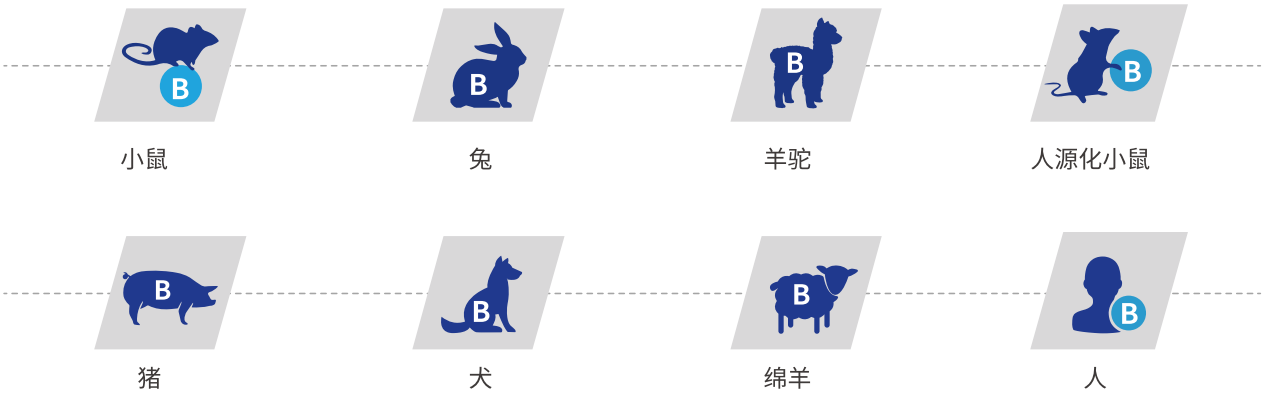
① SingleB® mAb Discovery Service
SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务，利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台，实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象，从动物免疫到获得单抗，快至29天，比传统杂交瘤技术至少节省120天。

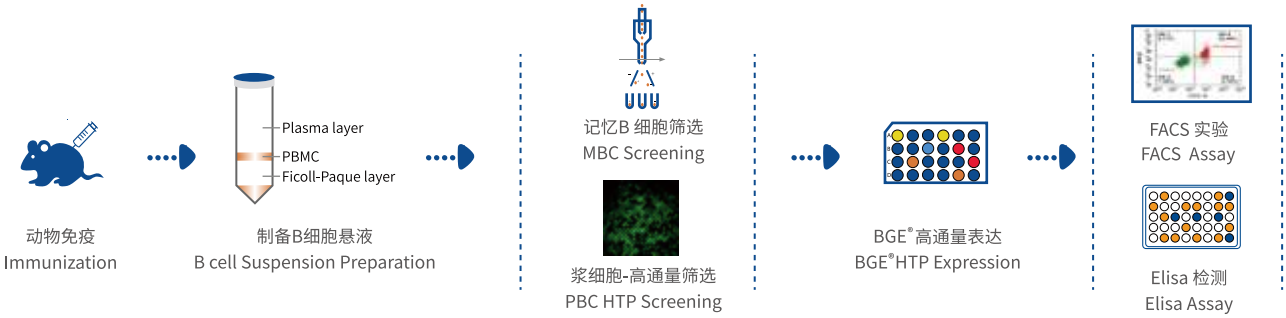
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选，保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高，无需刺激培养，减少多样性损失
- 重轻链天然配对，亲和力更优
- 高通量，周期短，单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程



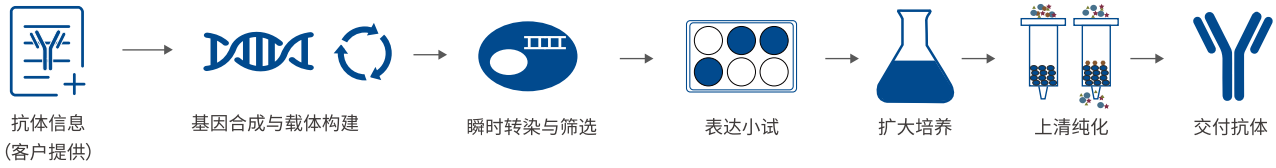
Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')$_2$、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势

服务流程

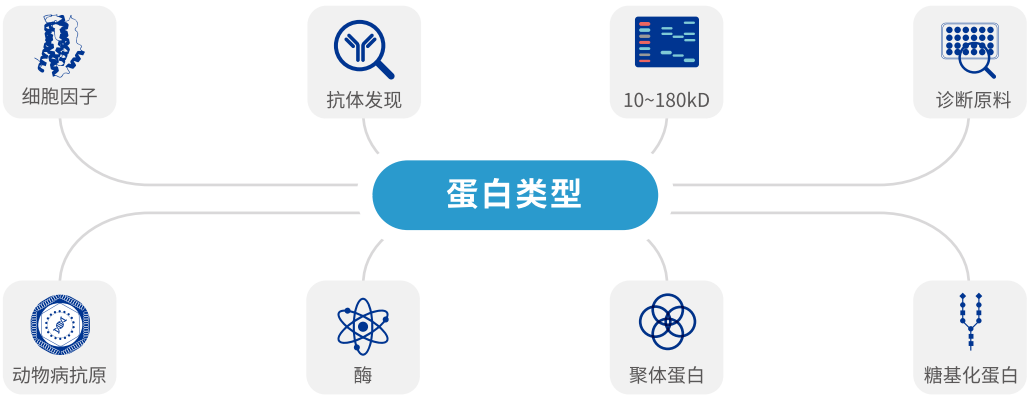


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4 Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service
杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术，能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

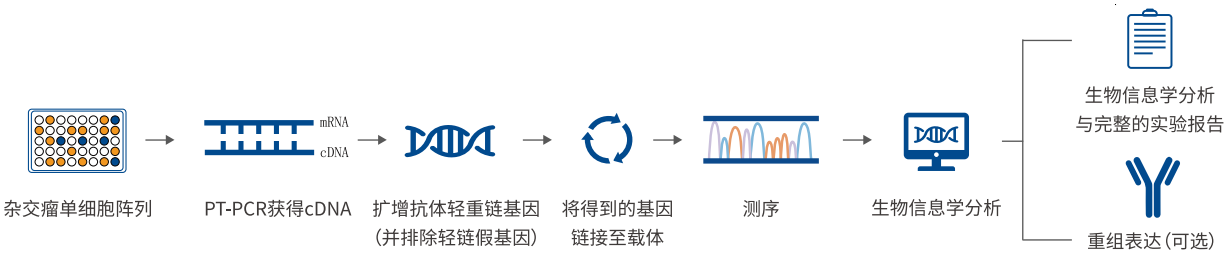
应用场景

- 抗体序列保护：获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份：杂交瘤存在退化转阴风险，抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造：获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验：测序5天，表达5天，全程高通量
- 细胞需求少：只需1~5个细胞，可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确：采用Failsafe®假基因排除技术，可排除κ轻链假基因
- 测序范围广：可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务：德泰生物拥有丰富经验，可提供表达验证服务

服务流程



5 Biomolecular Interaction Analysis Service
分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振（SPR）平台及生物膜干涉技术（BLI）平台，能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down，免疫共沉淀，酵母双杂交等相比，具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围

蛋白和蛋白　蛋白和小分子　蛋白和抗体　蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6 Antibody Humanization Service
抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法，通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算，获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势

- 重链和轻链同时参与优化
- 改造后的抗体人源化程度>90%
- 人源化抗体的亲和力与初始抗体相当
- 可进行多物种的抗体人源化

服务流程

1. Antibody sequence confirmation
2. Human germline acceptor selection
3. CDR grafting
4. Back mutation
5. Mutation energy ranking
6. Antibody expression
7. Affinity ranking

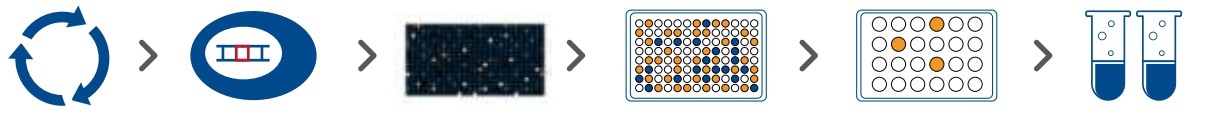
7 Stable Cell Line Development Service
生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务，筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台，较传统筛选流程快近100天，大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



基因合成&质粒抽提 › 稳定转染 › On-chip筛选 › 压力筛选 › 扩大培养 › 交付单克隆细胞株

服务优势

更快的筛选速度	百k级筛选通量	可视化筛选结果	稳定高产
从DNA到细胞株 较传统方法快近100天	一次筛选640k细胞 优选高表达细胞株	先进DeepLight®平台 高表达细胞株实时成像	可稳定转代50代 重组单抗可达5 g/L