



Real-time Quantitative PCR

实时荧光定量PCR

张惟材 朱力 王玉飞 主编



化学工业出版社

013032161

Q555
05

生物实验室系列

实时荧光定量 PCR

张惟材 朱 力 王玉飞 主编



化学工业出版社

· 北京 ·



北航

C1639448

Q555
05

131500010

图书在版编目 (CIP) 数据

实时荧光定量 PCR/张惟材等主编. —北京: 化学工业出版社, 2013. 1

(生物实验室系列)

ISBN 978-7-122-15695-2

I. ①实… II. ①张… III. ①聚合酶链式反应
IV. ①Q555

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 253572 号

责任编辑: 傅四周
责任校对: 周梦华

文字编辑: 焦欣渝
装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 17¼ 字数 435 千字 2013 年 5 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 79.00 元

版权所有 违者必究

《生物实验室系列》图书

- 实时荧光定量 PCR 2013 年 5 月
- 基因测序实验技术 2012 年 11 月
- 核酸提取与纯化实验指南 2012 年 9 月
- 冷泉港蛋白质组学实验手册 2012 年 9 月
- microRNA 鉴定与功能分析技术 2012 年 3 月
- 细胞生物学实验技术 (第二版) 2011 年 8 月
- PCR 最新技术原理、方法及应用 (第二版) 2011 年 1 月
- 蛋白质组学实验技术精编 2010 年 6 月
- 蛋白质纯化实验方案与应用 2010 年 4 月
- 发酵工程实验技术 (第二版) 2009 年 5 月
- 蛋白质相互作用实验指南 2009 年 4 月
- 蛋白质结构预测实验指南 2009 年 3 月
- 分子生物学实验参考手册 (第 2 卷) 【译】 2009 年 3 月
- 酶学实验手册 【译】 2009 年 2 月
- 蛋白质组学中的蛋白质纯化手册 【译】 2009 年 2 月
- 基因表达分析手册 【译】 2008 年 10 月
- 生物遗传标记与应用 2008 年 6 月
- 环境微生物实验技术 2008 年 6 月
- 分子免疫学实验技术指南 2008 年 6 月
- 生物实验室数学 【译】 2008 年 2 月
- 分子克隆实验指南精编版 【译】 2008 年 1 月
- 分子生物学实验技术 2008 年 1 月
- RNA 分离与鉴定实验指南——RNA 研究方法 【译】 2007 年 11 月
- 核酸分子杂交 2007 年 7 月
- 现代实验动物学技术 2007 年 1 月
- 蛋白质与蛋白质组学实验指南 【译】 2006 年 10 月
- 生物芯片技术应用详解 2006 年 9 月
- 免疫组织化学实验技术及应用 2006 年 6 月
- 组织工程方法 【译】 2006 年 6 月
- 人肿瘤细胞培养 【译】 2006 年 5 月
- 生物安全实验室建设 2006 年 4 月
- 植物细胞工程实验技术 2006 年 4 月
- PCR 技术实验指南 (原著第二版) 【译】 2006 年 3 月
- 分子生物学与蛋白质化学试验方法 【译】 2006 年 2 月
- 植物分子生物技术应用手册 2006 年 2 月
- 小鼠胚胎操作实验手册 (原著第三版) 【译】 2006 年 1 月
- 医学微生物学实验技术 2006 年 1 月

出版者的话

21世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20世纪后叶，现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为21世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如17世纪Leeuwenhoek等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973年Cohn和Boyer完成了DNA体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988年Kary Mullis发明的PCR技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学每时每刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了《生物实验室系列》图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，邀请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

《生物实验室系列》图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望《生物实验室系列》图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
生物·医药出版分社

前 言

聚合酶链（式）反应（PCR）技术自 1985 年问世以来就受到生物学家们的普遍关注，极大地推动了生命科学的发展，目前已经成为生物学实验室的常规技术。但传统 PCR 技术不能准确定量，在操作过程中易受污染使得假阳性偏高，应用受到一定限制，不能满足生命科学飞速发展的需求。美国 Applied Biosystems 公司于 1996 年推出了实时荧光定量 PCR 技术（real-time quantitative polymerase chain reaction，简称 Real-time PCR），该技术具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点，又一次受到生物学家们的青睐，促进了生命科学的进一步发展。Real-time PCR 技术是在常规 PCR 反应中加入荧光基团，利用荧光信号的积累实时检测整个 PCR 进程，使得每个循环变得“可见”。它是目前确定样品中 DNA 或 RNA 拷贝数最敏感、最准确的方法，还可进行多重反应，无污染，自动化程度高。

本书除了介绍 Real-time PCR 技术的基本原理之外，更注重 Real-time PCR 在各个领域的应用。在编排过程中发现把这些应用单独罗列出来显得有些凌乱，于是就把它们适当归类，形成九章。但即使这样归类各章内容还是有交叉之处，例如第二章为实时荧光定量 PCR 在致病菌检测中的应用，而后面在第七章“实时荧光定量 PCR 在环境微生物检测中的应用”中也包含了部分致病菌检测的内容，差异仅在样品的制备。因此在阅读时可先寻找符合自己实验的章节，同时还可参阅其他章节。

由于本书是介绍技术方法的书，在编写时力求方法尽可能详细，对每一种方法提供了反应体系、反应条件和结果分析，还附有参考文献，但读者在具体应用时，也不宜照本宣科，在实验过程中应因事制宜，对实验条件进行必要的优化。

本书由军事医学科学院生物工程研究所、疾病预防控制研究所、微生物流行病学研究所、实验动物中心，中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所的中青年科技工作者和博士生撰写，由于时间仓促，水平有限，书中难免有疏漏和错误之处，望读者指正。

张惟材
军事医学科学院生物工程研究所
2013 年 2 月于北京

目 录

第一章 实时荧光定量 PCR 概述	1
第一节 实时荧光定量 PCR 的基本原理	1
一、引言	1
二、原理	1
第二节 实时荧光定量 PCR 仪	3
一、Applied Biosystems 公司的系列实时荧光定量 PCR 仪	4
二、iQ™ 5 实时荧光定量 PCR 仪	4
三、LightCycler 实时荧光定量 PCR 仪	4
四、SmartCycler System 实时荧光定量 PCR 仪	5
五、Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪	5
六、Rotor-Gene 实时荧光定量 PCR 仪	5
第三节 实时荧光定量 PCR 中的荧光化学物质	5
一、荧光染料	5
二、水解探针	6
三、分子信标	7
四、荧光标记引物	9
五、双探针杂交	9
六、复合探针	10
第四节 实时荧光定量 PCR 的定量方法	10
一、绝对定量	10
二、相对定量	12
第五节 实时荧光定量 PCR 的实验方法	16
一、以 DNA 为起始实验材料进行实时荧光定量 PCR 反应	17
二、以 RNA 为起始实验材料进行实时荧光定量 RT-PCR	19
第六节 实时荧光定量 PCR 实验中应注意的问题	23
一、扩增子的设计	23
二、实验方案的优化	23
三、实践中应该注意的问题	25
小结	26
本章参考文献	27
第二章 实时荧光定量 PCR 在病原菌检测中的应用	29
第一节 沙门菌的检测	29
一、引言	29
二、材料	29
三、方法	30
四、注意事项	34

五、应用	35
六、小结	35
本节参考文献	36
第二节 在幽门螺杆菌检测中的应用	37
一、引言	37
二、基本原理	37
三、试验材料	37
四、方法	38
五、注意事项	40
六、应用	41
七、小结	42
本节参考文献	42
第三节 在致病性大肠杆菌检测中的应用	43
一、检测 DNA 样品中 <i>fliC_{H7}</i> 基因的 Real-time PCR 方法	43
二、检测 RNA 样品中 <i>rfbE</i> 和 <i>eae</i> 基因的 Real-time PCR 方法	44
本节参考文献	47
第四节 在肉毒梭菌检测中的应用	47
方案一 SYBR Green I Real-time PCR 方法检测 A 型肉毒梭菌	47
一、引言	47
二、原理	48
三、实验目的	48
四、实验材料和方法	48
五、实验结果	50
六、讨论	51
方案二 用 TaqMan Real-time PCR 对 A 型、B 型和 E 型肉毒梭菌的检测	51
一、引言	51
二、原理	51
三、实验目的	52
四、实验材料和方法	52
五、实验结果	53
六、讨论	54
方案三 TaqMan Real-time PCR 在肉毒梭菌 C 型毒素基因检测中的应用	54
一、引言	54
二、原理	55
三、实验目的	55
四、实验材料和方法	55
五、实验结果	56
六、讨论	56
本节参考文献	56
第五节 在嗜水气单胞菌检测中的应用	57
一、引言	57

二、材料	57
三、方法	58
四、应用	59
本节参考文献	60
小结	60
第三章 实时荧光定量 PCR 在病毒检测中的应用	62
第一节 实时荧光定量 RT-PCR 在甲型 H1N1 检测中的应用	62
一、引言	62
二、试验目的	63
三、材料与试剂	63
四、试验方法	64
五、结果判定	67
六、注意事项	68
七、小结	69
本节参考文献	69
第二节 登革病毒的实时荧光定量 RT-PCR 检测	69
一、引言	69
二、试验目的	70
三、材料与试剂	70
四、操作步骤	71
五、注意事项	73
本节参考文献	74
第三节 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒的实时荧光定量 RT-PCR 检测	74
一、引言	74
二、试验目的	75
三、材料与试剂	75
四、操作步骤	76
五、试验结果判定	77
六、注意事项	78
本节参考文献	78
第四节 肠道病毒 71 型的实时荧光定量 RT-PCR 检测	78
一、引言	78
二、试验目的	79
三、材料与试剂	79
四、操作步骤	80
五、结果分析	80
六、注意事项	81
本节参考文献	81
第五节 多重实时荧光定量 PCR 在呼吸道病毒检测中的应用	81
一、引言	81
二、试验目的	82

三、材料与试剂	82
四、试验原理与方法	82
五、结果判定	85
六、注意事项	85
七、小结	88
本节参考文献	88
第六节 实时荧光定量 PCR 用于重组杆状病毒滴度检测的研究	89
一、引言	89
二、试验目的	89
三、材料	89
四、方法	89
五、结果及分析	91
六、注意事项	92
七、小结	93
本节参考文献	93
第七节 实时荧光定量 PCR 在 HIV 检测中的应用	94
一、引言	94
二、基本原理	94
三、试验材料	95
四、方法	95
五、试验结果判定	97
六、注意事项	97
七、应用	98
本节参考文献	98
第八节 在检测 HBV 和 HCV 方面的应用	99
A. 实时荧光定量 PCR 在检测 HBV 方面的应用	99
一、引言	99
二、材料和方法	100
三、小结	108
B. 实时荧光定量 PCR 在检测 HCV 方面的应用	109
一、引言	109
二、材料和方法	110
三、小结	114
本节参考文献	116
第四章 实时荧光定量 PCR 检测基因突变及临床应用	122
第一节 实时荧光定量 PCR 检测基因突变在遗传病诊断中的应用	122
一、引言	122
二、应用巢式 PCR 和 TaqMan MGB 探针 Real-time PCR 技术检测经典型苯丙酮尿症 (PKU)	125
三、应用 SYBR Green I Real-time PCR 技术检测慢性骨髓增殖性疾病	127
第二节 实时荧光定量 PCR 检测基因突变在肿瘤诊断、治疗和预后中的应用	130

一、引言	130
二、应用 ASB-PCR 方法检测 <i>Kras</i> 基因突变	132
第三节 实时荧光定量 PCR 检测基因突变在耐药病原体监测中的应用	135
一、引言	135
二、通过杂交探针实时荧光定量 PCR 检测临床分离的结核分枝杆菌的异烟肼抗性	135
三、FRET 实时荧光定量 PCR 快速准确检测幽门螺杆菌耐克拉霉素相关的基因点突变	137
本章参考文献	140
第五章 实时荧光定量 PCR 在遗传病研究中的应用	141
第一节 实时荧光定量 PCR 识别 SNP 的方法	141
一、原理	141
二、常用的突变识别方法	142
本节参考文献	145
第二节 实时荧光定量 PCR 在 SNP 分型中的应用	145
一、引言	145
二、试验目的	146
三、试验原理	146
四、试验材料	146
五、试验方法	146
六、结果与讨论	149
本节参考文献	150
第三节 等位基因特异性实时荧光定量 PCR 在 DNA 库中等位基因定量检测中的应用	150
一、引言	150
二、试验目的	150
三、试验原理	150
四、试验材料	151
五、实验方法	151
六、结果与讨论	154
本节参考文献	155
第四节 等位基因特异性 PCR 结合分子信标实时荧光定量 PCR 在肿瘤和线粒体疾病检测中的应用	155
一、引言	155
二、试验目的	156
三、试验原理	156
四、试验材料	156
五、试验方法	156
六、结果与讨论	158
本节参考文献	158
第六章 实时荧光定量 PCR 在肿瘤中的应用	160
第一节 实时荧光定量 PCR 在肿瘤早期诊断中的意义	160

方案 1 Pescadillo 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义	161
一、试验目的	161
二、基本原理	161
三、实验材料	161
四、实验方法	161
五、实验结果	163
六、小结	164
方案 2 实时荧光定量 PCR 检测 microRNA 在不同肿瘤细胞中的表达	164
一、实验目的	164
二、基本原理	164
三、材料	164
四、方法	165
五、结果	165
六、小结	167
第二节 实时荧光定量 PCR 在肿瘤预后评估中的应用	167
方案 1 实时荧光定量 PCR 检测 uPA、PAI-1、TIMP-1 mRNA 表达与乳腺癌预后 的关系	167
一、实验目的	167
二、实验材料	168
三、实验方法	168
四、实验结果	169
五、小结	172
方案 2 实时荧光定量 PCR 检测 uPA mRNA 表达在 HER2 阳性乳腺癌预后中的 意义	172
一、实验目的	172
二、实验材料	173
三、实验方法	174
四、实验结果	175
五、小结	177
第三节 实时荧光定量 PCR 在药物疗效判断中的作用	178
一、实验目的	178
二、材料	178
三、方法	179
四、结果	181
五、小结	183
第四节 实时荧光定量 PCR 在基因表达调控中的应用	183
一、实验目的	183
二、实验材料	183
三、实验方法	183
四、实验结果	184
五、小结	187

本章参考文献	187
第七章 实时荧光定量 PCR 在环境微生物检测中的应用	191
第一节 实时荧光定量 PCR 在检测土壤微生物中的应用	191
一、引言	191
二、试验目的	191
三、原理	191
四、土壤微生物 DNA 提取方法汇总	192
五、操作步骤	195
六、实时荧光定量 PCR 在土壤中病原菌定量检测中的应用	198
七、实时荧光定量 PCR 在土壤中生防菌的动态变化监测中的应用	200
本节参考文献	200
第二节 实时荧光定量 PCR 技术在空气微生物检测中的应用	201
一、引言	201
二、试验目的	201
三、试验材料与方法	202
四、小结	208
本节参考文献	208
第三节 实时荧光定量 PCR 在检测水源微生物方面的应用	208
一、引言	208
二、基本原理	209
三、研究进展	210
四、实验方法	211
五、实验结果	213
六、结果分析	214
本节参考文献	215
第八章 实时荧光定量 PCR 在动物学研究中的应用	217
第一节 实时荧光定量 PCR 在动物感染性疾病监测和检测中的应用	217
一、引言	217
二、原理	217
三、材料	218
四、方法与步骤	218
五、注意事项	220
六、应用	221
本节参考文献	221
第二节 实时荧光定量 PCR 在转基因动物检测中的应用	222
一、引言	222
二、原理	223
三、材料	223
四、方法与步骤	223
五、注意事项	225
六、应用	226

本节参考文献	227
第三节 实时荧光定量 PCR 在突变动物检测和突变品系培育中的应用	228
一、引言	228
二、SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 在 HLA-1502 基因检测中的应用	228
三、实时荧光定量 PCR 在白化突变鼠检测中的应用	230
四、注意事项	232
五、应用	233
本节参考文献	234
第四节 实时荧光定量 PCR 在药物效果评价动物实验中的应用	235
一、引言	235
二、实时荧光定量 PCR 在马传染性贫血病毒疫苗效果评价中的应用	236
三、利用实时荧光定量 PCR 评价以离子交换色谱纯化抗体时外源病毒因子的清除效果	238
四、注意事项	240
五、应用	241
本节参考文献	243
第九章 实时荧光定量 PCR 在基因表达检测和流行病学中的应用	244
第一节 实时荧光定量 PCR 在分析基因差异表达中的应用	244
一、实时荧光定量 PCR 实验的设计和优化	244
二、实时荧光定量 PCR 应用实例	246
三、实验注意事项	249
四、小结	250
本节参考文献	250
第二节 实时荧光定量 PCR 检测 CAR 基因在小鼠肺发育不同阶段中的表达	250
一、引言	250
二、材料及方法	251
三、数据分析	254
本节参考文献	255
第三节 实时荧光定量 PCR 在流行病学中的应用	255
一、微生物的检测和鉴定	256
二、耐药分析	256
三、DNA 甲基化、单核苷酸多态性及突变分析	257
四、肿瘤基因检测	257
五、基因表达差异分析	258
六、微生态中微生物种的相对定量	258
本节参考文献	259

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是 1985 年开始出现的一项体外扩增核酸片段的基因检测技术^[1], 由于 PCR 技术具有简便易行、灵敏度高等优点, 该技术被广泛应用于基础和临床研究, 成为分子生物学必不可少的研究工具。但在许多情况下, 研究者们已不再满足于得知某一特异 DNA 序列的存在与否, 他们更着眼于对其进行精确的核酸定量。因而, 借助 PCR 技术对基因进行快速、敏感、特异而准确的定量成为目前分子生物学技术研究的热点之一。实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, Real-time PCR) 技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 以其快速、特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、可实时监测、全封闭反应等优点成为了分子生物学研究中的重要工具, 目前已得到广泛应用^[2]。本章就此技术进行详细的介绍。

第一节 实时荧光定量 PCR 的基本原理

一、引言

传统的 PCR 定量是应用终点 PCR 来对样品中的模板量进行定量, 通常用凝胶电泳分离, 并用荧光染色来检测 PCR 反应的最终扩增产物。但在 PCR 反应中, 由于模板、试剂、焦磷酸盐分子的聚集等因素影响聚合酶反应, 最终导致 PCR 反应不再以指数形式进行而进入“平台期”, 而且一些反应的终产物比另一些要多, 因此终点 PCR 反应方法定量并不准确。此外, 终点 PCR 还容易造成交叉污染, 产生假阳性。

1996 年, 实时荧光定量 PCR 技术由美国 Applied Biosystems 公司首先推出。所谓实时荧光定量 PCR 是指在 PCR 反应中加入荧光基团, 通过连续监测荧光信号出现的先后顺序以及信号强弱的变化, 即时分析目的基因的初始量, 通过与加入已知量的标准品进行比较, 可实现实时定量。

实时荧光定量 PCR 技术较之于以前的以终点法定量 PCR 技术具有明显的优势: ①它操作简便、快速、高效, 具有很高的敏感性、重复性和特异性; ②在封闭的体系中完成扩增并进行实时测定, 大大降低了污染的可能性, 并且无需在扩增后进行电泳等操作; ③它还可以通过不同的引物设计在同一反应体系中同时对多个靶基因分子进行扩增, 即多重扩增^[3~5]。

实时荧光定量 PCR 技术的出现使分子诊断领域发生重大的变化, 目前已广泛地应用于 mRNA 表达的研究、DNA 拷贝数的检测、单核苷酸多态性的测定、细胞因子的表达分析、肿瘤耐药基因表达的研究以及病原体感染的定量监测等分子生物学研究的各个领域。

二、原理

(一) 两个重要的概念

1. 荧光阈值

荧光阈值 (threshold) 是在荧光扩增曲线指数增长期设定的一个荧光强度标准 (即 PCR 扩增产物量的标准)。

PCR 反应过程中产生的 DNA 拷贝数是呈指数形式增加的, 随着反应循环数的增加, 最终 PCR 反应不再以指数形式生成模板, 从而进入“平台期”。在传统的 PCR 中, 常用凝胶电泳分离并用荧光染色来检测 PCR 反应的最终扩增产物, 因此用终点法对 PCR 产物定量存在不可靠之处。

在实时荧光定量 PCR 中, 对整个 PCR 反应扩增过程进行了实时的监测和连续地分析扩增相关的荧光信号, 随着反应的进行, 监测到的荧光信号的变化可以绘制成一条曲线。荧光扩增曲线一般分为基线期、指数增长期、线性增长期和平台期。在 PCR 扩增早期 (基线期), 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。而在平台期, 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无线性关系, 所以根据最终的 PCR 产物量不能计算出初始模板量。只有在荧光信号指数增长期, PCR 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系, 可以选择在这个阶段进行定量分析。为了便于对所检测样本进行比较, 首先需设定一个荧光信号的阈值 (见图 1-1)。荧光阈值是在荧光扩增曲线上人为设定的一个值, 它可以设定在指数扩增阶段任意位置上。一般荧光阈值设置为 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍, 但实际应用时要结合扩增效率、线性回归系数等参数来综合考虑。

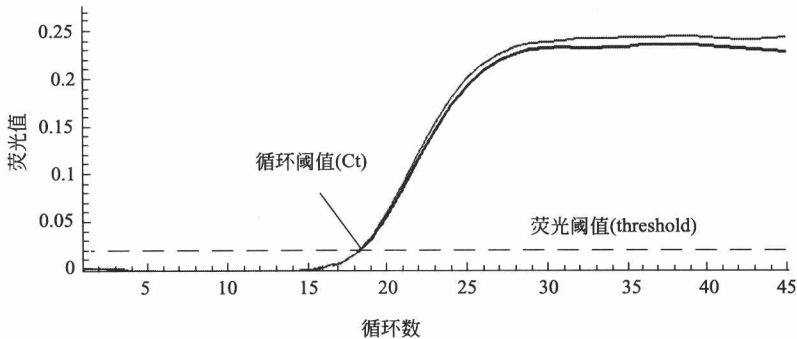


图 1-1 荧光阈值 (threshold) 和循环阈值 (Ct)

2. 循环阈值

循环阈值 (cycle threshold value, Ct) 即 PCR 扩增过程中扩增产物的荧光信号达到设定的荧光阈值时所经过的扩增循环次数 (见图 1-1)。Ct 值与荧光阈值有关。

实时荧光定量 PCR 方法采用始点定量的方式, 利用 Ct 的概念, 在指数扩增的开始阶段进行检测, 此时样品间的细小误差尚未放大且扩增效率也恒定, 因此该 Ct 值具有极好的重复性。从图 1-2 的重复实验中可以看出, 尽管平台期的 DNA 拷贝数波动很大, Ct 值却是相对固定的。

(二) 定量原理

对于一个理想的 PCR 反应:

$$X_n = X_0 \times 2^n$$

对于一个非理想的 PCR 反应:

$$X_n = X_0 (1 + E_x)^n$$

式中, n 为扩增反应的循环次数; X_n 为第 n 次循环后的产物量; X_0 为初始模板量; E_x 为扩增效率。