

实时荧光聚合酶链反应 (PCR)检测技术

朱水芳 主编

PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR

PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR
PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR

PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR

PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR PCR

PCR PCR

PCR PCR PCR PCR

中国计量出版社



实时荧光聚合酶链反应(PCR) 检测技术

朱水芳 主编

中国计量出版社

图书在版编目(CIP)数据

实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测技术/朱水芳主编. —北京:
中国计量出版社, 2003. 7

ISBN 7-5026-1765-5

I. 实… II. 朱… III. 聚合酶—链式反应—荧光分析—检测
IV. Q555

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 031577 号

内 容 提 要

本书介绍了各种 PCR 方法及其应用、实时荧光 PCR 技术的原理, 荧光 PCR 仪的结构、操作使用及其维护知识, 基因扩增实验室技术要求, 实时荧光 PCR 技术在一些热点领域的应用: 转基因产品的检测与生物安全、人类重要疾病医疗及检验、动物源性饲料的检验与疯牛病控制、禽流感及食源性致病细菌检测与食品安全、动植物检疫与外来生物入侵等, 其中有 PCR 实际的检测方法与具体操作步骤, 以及热点应用领域的事件和背景。

本书可供从事检验检疫、医疗、军事、农业、基础科学研究人员参考, 也可作为有关大专院校教学参考用书。

中国计量出版社出版
北京和平里西街甲 2 号
邮政编码 100013
电话 (010)64275360
E-mail jilfb@263.net.cn
北京市迪鑫印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行
版权所有 不得翻印

*

850 mm × 1168 mm 32 开本 印张 9.875 字数 245 千字
2003 年 7 月第 1 版 2003 年 7 月第 1 次印刷

*

印数 1—3 000 定价: 25.00 元

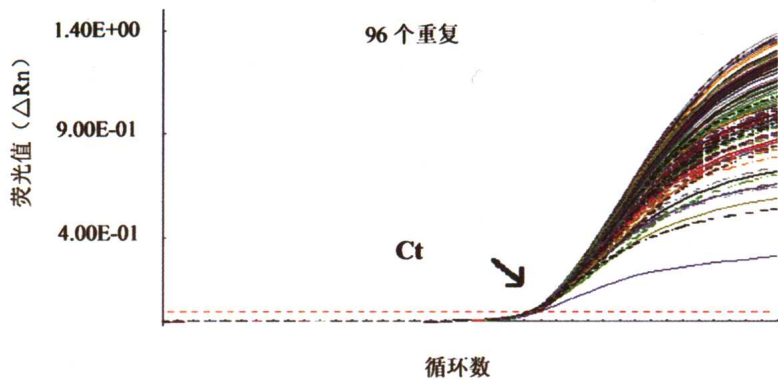


图 A Ct 值的重现性

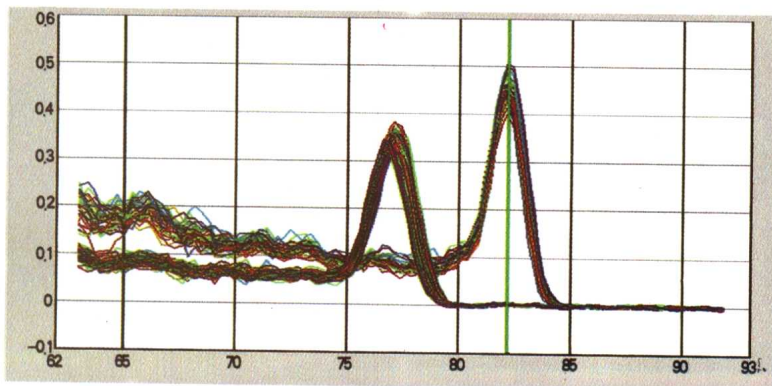


图 B 熔解曲线分析

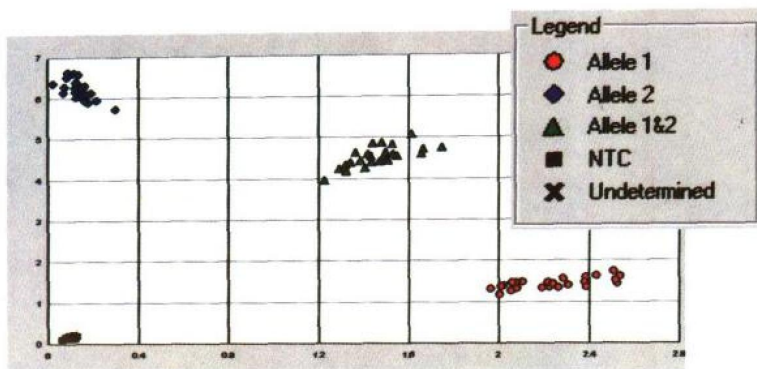


图 C 等位基因鉴定和 SNP 分析实验结果
 1 / 1: 纯合状态的等位基因 1; 2 / 2: 纯合状态的等位基因 2;
 1 / 2: 杂合状态的等位基因 1 和 2; NTC: 阴性对照

1	Ref1 311-00	4.97E-01	22.40	
2	Ref2 211-000	3.29E-01	26.19	
3	Ref3 311-000	4.90E-01	26.00	
4	Ref4 5	1.00E-01	1.00E-01	25.27
5	Ref5 5	2.50E-01	3.00E-01	23.07
6	Ref6 5	6.25E-01	6.00E-01	25.34
7	Ref7 5	1.50E-01	1.00E-01	22.13
8	Ref8 -			
9	GMO 911-00	7.00E-01	24.00	
10	GMO 1011-000	4.07E-01	20.00	
11	GMO 1111-000	4.47E-01	32.00	
12	GMO 12 5	6.25E-01	6.00E-01	25.14
13	GMO 13 5	1.00E-01	1.00E-01	22.41
14	GMO 14 5	3.00E-01	3.75E-01	25.24
15	GMO 15 5	1.00E-01	1.00E-01	20.00
16	GMO 16 -			

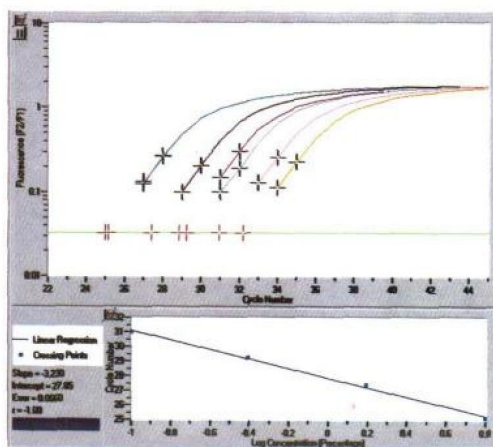


图 D 大豆GMO杂交探针定量结果

- 1 Ref 121-10
- 2 Ref 221-100
- 3 Ref 221-1000
- 4 Ref 45 1.000E-02
- 5 Ref 95 2.500E-01
- 6 Ref 95 6.250E-01
- 7 Ref 75 1.000E-01
- 8 Ref 8
- 9 GMD 921-10
- 10 GMD 1021-100
- 11 GMD 1121-1000
- 12 GMD 125 6.250E-01
- 13 GMD 135 1.000E-01
- 14 GMD 145 2.500E-01
- 15 GMD 155 1.000E-01
- 16 GMD 16-

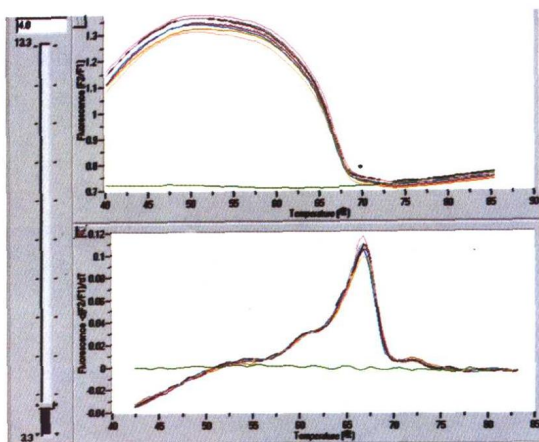


图 E 大豆GMO杂交探针熔解曲线结果

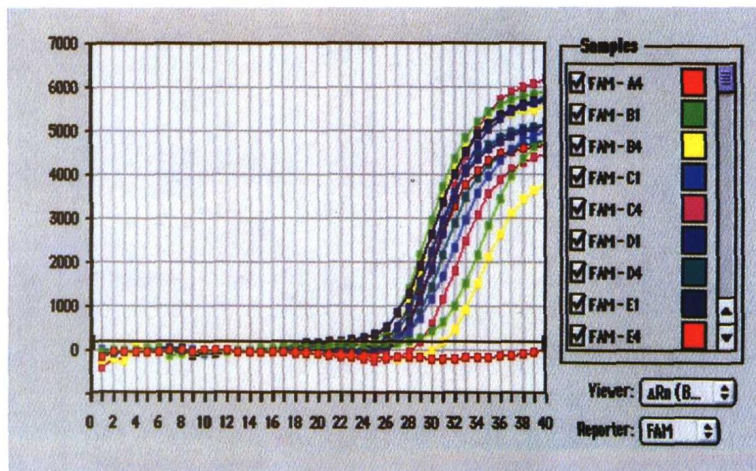
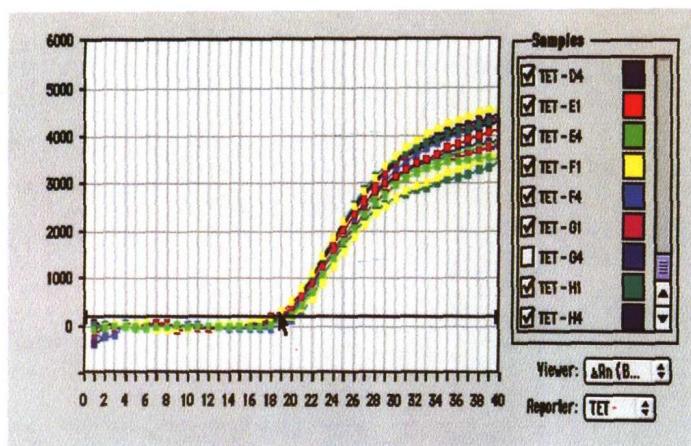
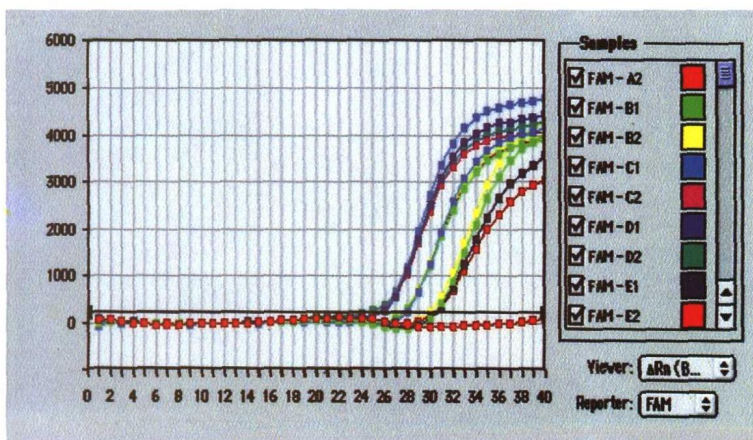


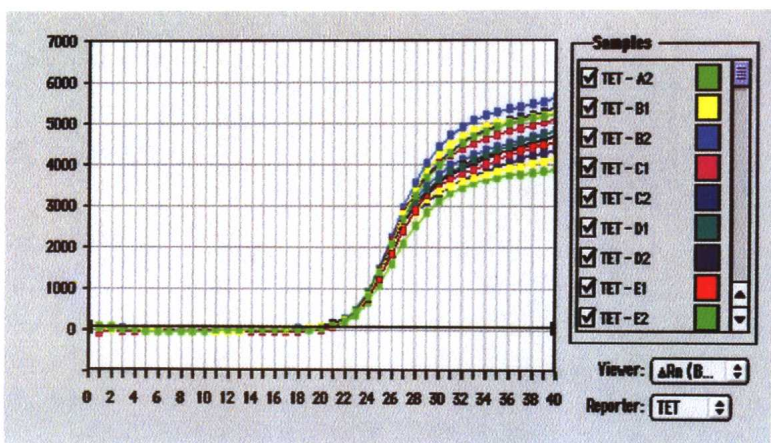
图 F 抗草甘膦大豆参照样品外源基因扩增荧光曲线



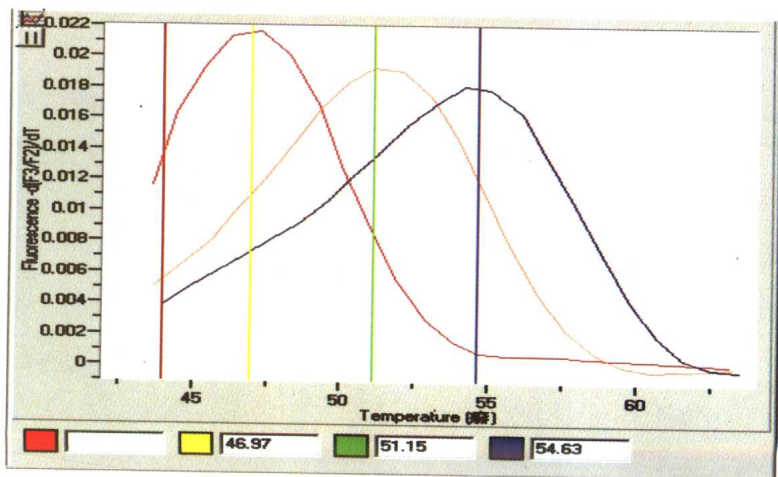
图G 抗草甘膦大豆参照样品内源基因扩增荧光曲线



图H Bt176玉米参照样品外源基因扩增荧光曲线



图I Bt176玉米参照样品外源基因扩增荧光曲线



图J 乙肝病毒 (HBV) YMDD突变型核酸扩增 (PCR) 荧光检测图

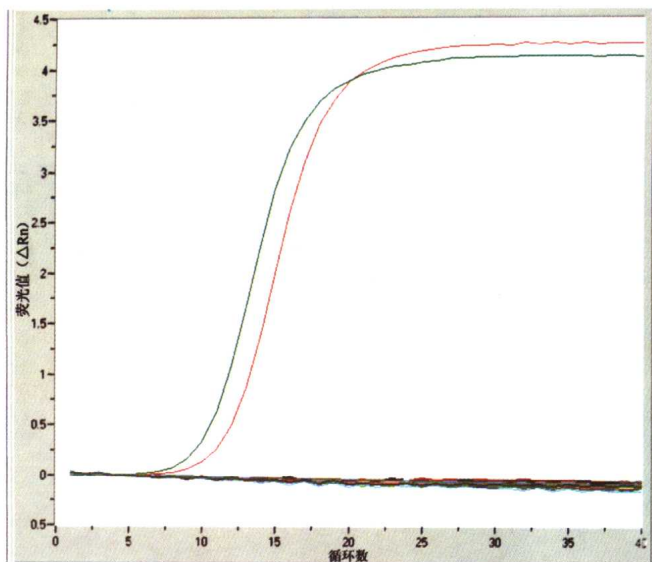


图 K AIVH5 人工感染样品荧光RT-PCR检测结果

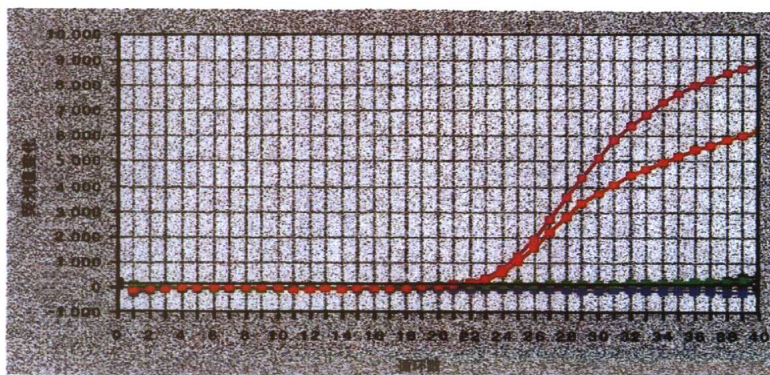


图 L 肉骨粉中牛线立体DNA特异性基因片段实时荧光PCR检测的荧光图谱

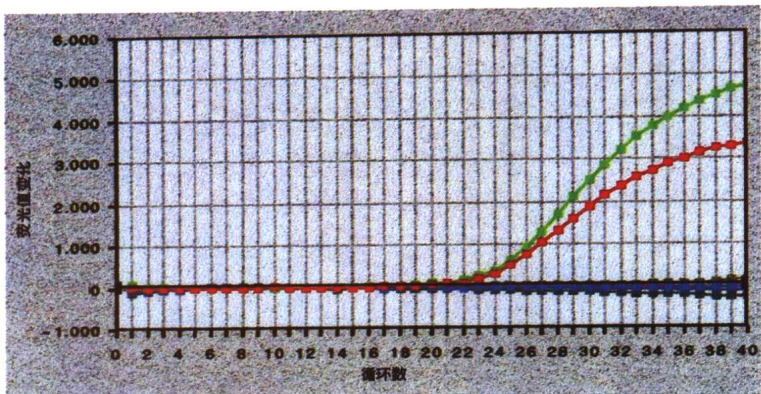


图 M 肉骨粉中羊线立体DNA特异性基因片段实时荧光PCR检测的荧光图谱

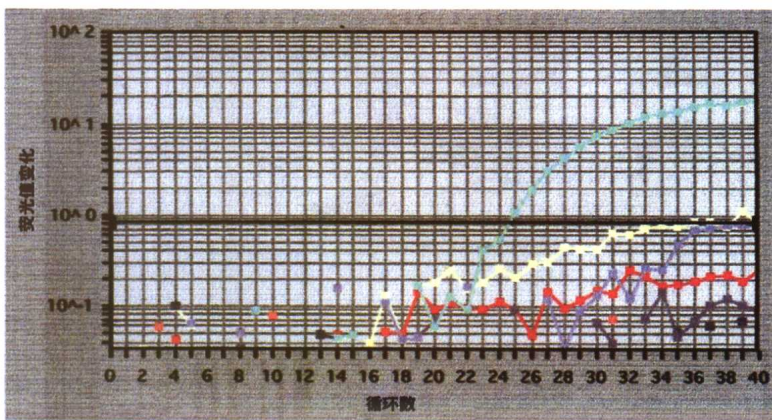


图 N 6种李氏菌实时荧光PCR检测的荧光图

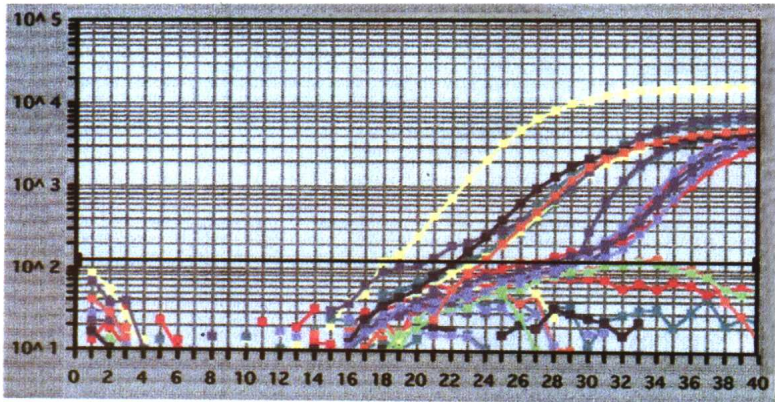


图 O 13种单增李氏菌和10种非单增李氏菌实时荧光PCR检测的荧光图

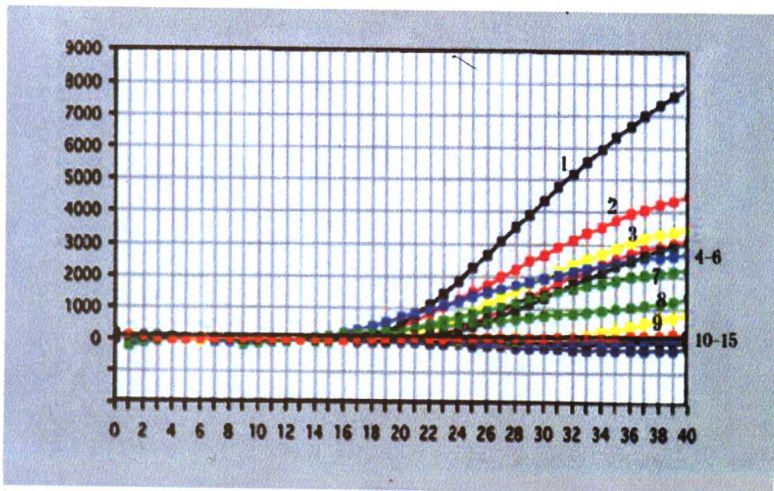


图 P Pprobe 广谱探针实时荧光PCR结果图

编撰人员名单

名誉主编 姚文国

主 编 朱水芳

副主编 曹际娟 章桂明 程英豪 黄文胜 陈红运

撰 稿 人 (以姓氏笔画为序)

王露楠 朱水芳 朱建裕 李金明 陈云弟

陈红运 陈乃中 严 进 吴品珊 林祥梅

姚文国 赵文军 高 奔 徐宝良 耿金培

黄文胜 黄茜华 曹际娟 章桂明 覃 文

程英豪 葛建军 赖平安 潘良文 廖晓兰

前 言

PCR(Polymerase Chain Reaction)技术发明数年后,以超出科学家自身想像的速度在生物学各领域内得到了广泛的应用,大大促进了现代生物学及其相关科学和技术的发展,技术发明者也获得了诺贝尔奖。可见该技术的重要性和意义自不必多言。但用作检验技术特别是有法律效力的检验技术,一直存在争议。主要原因是,传统 PCR 方法容易引起污染,而且操作步骤繁多,人工操作劳动强度大,不适合大样品量的商业性检验。

以基因为基础的分子诊断检验技术,近年来不断有重大的突破,其中最重要的突破就是实时荧光 PCR 技术的出现。这种技术在同一 PCR 试管内完成 PCR 扩增、荧光探针杂交和信号检测,大大降低了污染的可能性,提高了检测特异性,使得这一 PCR 技术准确性达到了最严格的法检要求;荧光探针检测比常规的凝胶染色检测灵敏度提高上百倍,在有些检测领域已接近检测灵敏度的极限,成为最灵敏的检测方法;检测时间缩短到 30min ~ 2h;一次最多能同时检验 384 个样品,真正做到了快速、准确、灵敏和高通量,满足了商业检测的需要,特别是在医院、进出境检验检疫、军事、公安等部门应用优势更加明显。实时荧光 PCR 技术还较好地解决了分子定量检测问题,使得疾病的治疗效果能及时得到明确的答案,转基因产品定量标识问题很容易得到解决。实时荧光 PCR 技术对基因点突变及多重基因的检测能力,使得有些病原物近似种及基因突变体的检测变得非常容易。该方法虽然出现只有短短的几年时间,且所需仪器价格昂贵,但它却在我国生物学各相关领域如医学、检验检疫、军事、农业、基础研究中得到迅速推广使用。

当然实时荧光 PCR 技术也不是一种完美的研究检验技术,如所有 PCR 方法存在的样品中 PCR 抑制物质的问题、RNA 样品的

保存运输问题等,该方法也没有很好的解决。

本书的编者是来自各个领域检验研究第一线的科研人员,他们以自己的科研成果为基础,编写了这本《实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测技术》,是我国第一部实时荧光 PCR 技术的专著。该书概括了我国近几年在实时荧光 PCR 检验方法研究的成功探索,客观地反映了当前我国在该领域的现状,提供了最新的技术、知识和经验。书中介绍的许多内容都是作者具有自主知识产权的方法和步骤,表明我国实时荧光 PCR 技术已与国际水平接轨。特别值得一提的是,在该书即将出版之际,我们还欣喜地了解到该书中的许多方法已上升成国家标准或行业标准,并通过了专家们的审定,很快会发布。

该书涉及的检验鉴定对象范围广泛,有转基因产品、肿瘤、病毒、细菌、真菌、线虫、昆虫及动物,都是目前国内外一些重大的热点、技术难点问题:转基因产品的检测与生物安全、人类重要疾病治疗与检验、动物源性饲料的检验与疯牛病控制、禽流感及食源性致病细菌检测与食品安全、动植物检疫与外来生物入侵等。书中不但介绍了实际的检测方法及具体操作步骤,而且对热点领域和事件背景知识做了简要介绍。我相信,该书的出版,会加速实时荧光 PCR 技术在我国推广应用,也必将促进书中所涉及的问题的解决,对提高检验鉴定水平等方面起积极的作用。

本书分为十四章,较全面地介绍了各种 PCR 检测方法及其应用、实时荧光 PCR 技术的原理、荧光 PCR 仪(主要型号)的结构、操作使用及其维护知识、基因扩增实验室技术要求,实时荧光 PCR 技术在一些领域的应用。本书可供从事检验检疫、医疗、军事、农业、教学、基础科学研究等人员参考。由于实时荧光 PCR 技术出现仅仅几年,本书编写人员经验和水平有限,不足之处,请读者批评指正。

编著者

2003年2月18日

目 录

第一章 PCR 技术概论	(1)
一、PCR 基本原理	(6)
二、参与 PCR 反应体系的因素及其作用	(9)
三、常用的几种 PCR 反应	(14)
四、基因芯片技术与 PCR 检测关系	(21)
第二章 实时荧光定量 PCR 技术原理	(33)
一、传统定量 PCR 方法简介	(33)
二、荧光探针的技术原理	(34)
三、荧光 PCR 所用探针	(35)
四、实时荧光 PCR 定量检测计算原理和方法	(42)
五、荧光 PCR 的特点	(49)
第三章 实时荧光 PCR 仪简介和维护	(53)
一、ABI 公司荧光 PCR 仪	(53)
二、罗氏公司荧光 PCR 仪	(73)
第四章 实时荧光 PCR 实验室技术要求	(80)
一、实验室总体要求	(80)
二、质量控制与质量保证	(85)
第五章 样品核酸的制备与纯化	(89)
一、样品制备	(89)
二、加工产品 DNA 提取的前处理	(90)
三、DNA 提取的阴性(空白)对照	(91)
四、DNA 浓度测定	(91)
五、DNA 提取方法	(92)
六、DNA 含量的测定	(101)

第六章 转基因产品实时定量 PCR 检测	(105)
一、转基因产品的发展与进出口贸易	(105)
二、转基因产品的安全性与法规	(107)
三、转基因产品定性定量及品系鉴定检测原理与方法	(109)
第七章 人类疾病的实时荧光 PCR 检测	(140)
一、实时荧光定量 PCR 技术在细菌检测中的应用	(141)
二、实时荧光定量 PCR 技术在病毒检测中的应用	(144)
三、实时荧光定量 PCR 技术在肿瘤检测中的应用	(158)
第八章 动物检疫的实时荧光 PCR 检测	(165)
一、用于进出口禽肉产品中禽流感病毒的快速检测	(166)
二、用于进出口活禽的检测	(170)
三、用于美国、香港活鸟零售市场的家禽的快速检测	(171)
第九章 动物源性饲料中牛羊源性成分实时荧光 PCR 检测	(173)
一、动物源性饲料中牛羊源性成分检测的必要性	(173)
二、几种动物源性成分检测技术简介	(174)
三、牛羊源性成分实时荧光 PCR 检测技术	(180)
第十章 食源性致病细菌实时荧光 PCR 检测	(186)
一、单增李氏菌对食品的污染	(186)
二、单增李氏菌的毒力因子	(187)
三、实时荧光 PCR 技术检测单增李氏菌	(188)
第十一章 植物真菌病害实时荧光 PCR 检测	(196)
一、概况	(196)
二、小麦印度腥黑穗病菌实时荧光 PCR 检测方法	(196)
三、 <i>Phaeocryptopus gaeumannii</i> 的实时荧光 PCR 检测	(200)
四、应用实时 PCR 对菌根真菌 <i>Glomus mosseae</i> 进行实时定量 检测和对马铃薯晚疫病 (<i>Phytophthora infestans</i>)、柑橘疫病 (<i>Phytophthora citricola</i>) 进行监控	(202)
第十二章 植物病原细菌和植原体实时荧光 PCR 检测 ..	(207)
一、概况	(207)

二、植原体实时荧光 PCR 检测	(209)
三、玉米细菌性枯萎病菌实时荧光 PCR 检测	(219)
四、梨火疫细菌(<i>Erwinia amylovora</i>)	
实时荧光 PCR 检测	(228)
五、水稻白叶枯病菌与水稻细菌性条斑病菌实时荧光 PCR 快速检测鉴定方法的建立	(231)
六、柑桔黄龙病菌实时荧光 PCR 检测	(245)
第十三章 植物病毒实时荧光 PCR 检测	(259)
一、背景	(259)
二、材料和方法	(261)
三、结果与分析	(267)
四、讨论	(275)
第十四章 实时荧光 PCR 在其他领域的应用	(281)
一、分子生物学技术在线虫分类鉴定中的应用	(281)
二、实时荧光 PCR 技术在昆虫鉴定中的应用	(285)
英汉缩略语及专用名词对照表	(291)